



**ΕΘΝΙΚΟ ΜΕΤΣΟΒΙΟ ΠΟΛΥΤΕΧΝΕΙΟ**  
**ΣΧΟΛΗ ΜΗΧΑΝΙΚΩΝ ΜΕΤΑΛΛΕΙΩΝ ΜΕΤΑΛΛΟΥΡΓΩΝ**  
**ΤΜΗΜΑ ΕΠΙΣΤΗΜΗ ΚΑΙ ΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑ ΥΛΙΚΩΝ**

**ΑΝΑΠΤΥΞΗ ΚΑΙ ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΜΟΣ**  
**ΙΚΡΙΩΜΑΤΩΝ**  
**ΝΑΝΟΪΔΡΟΞΥΑΠΑΤΙΤΗ ΜΕ ΤΗΝ**  
**ΤΕΧΝΙΚΗ ΤΗΣ ΛΥΟΦΙΛΙΩΣΗΣ**

**ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ**

**ΜΠΑΣΔΑΝΗ ΚΩΝΣΤΑΝΤΙΝΟΥ**

**ΕΠΙΒΛΕΨΗ:**

**Α. ΤΣΕΤΣΕΚΟΥ**

Αν. Καθηγήτρια Ε.Μ.Π.

**ΑΘΗΝΑ, Οκώβριος 2014**

## ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

Πρόλογος .....	3
Περίληψη.....	4
Εισαγωγή.....	5
<b>ΘΕΩΡΗΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ</b>	
Σκοπός.....	8
Βιοϋλικά.....	8
Κριτήρια Επιλογής Βιοϋλικών.....	11
Είδη Βιοϋλικών.....	12
Μηχανικής Ιστών (Tissue Engineering) .....	13
Το προσωρινό ικρίωμα Ικρίωμα ιστοτεχνολογίας .....	17
Βιοδιασπώμενα Υλικά.....	18
Πολυμερή.....	18
Φυσικά Πολυμερή.....	19
Υδροξυαπατίτης .....	21
Μηχανισμός Κρυσταλλοποίησης Υδροξυαπατίτη .....	24
Αμινοξέα .....	28
Χρήση και Εφαρμογές Αργινίνης .....	30
Δομή και ιδιότητες του Κολλαγόνου.....	32
Δομή και ιδιότητες της Χιτοζάνης.....	35
Χρήσεις χιτοζάνης .....	36
Διασταυρούμενη ή διαμοριακή σύνδεση (cross-linking) .....	38
Ιδιότητες Υλικών.....	41
Εφαρμογές Βιοϋλικών.....	45
Λυοφιλίωση.....	51

## ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

Αντιδραστήρια και εξοπλισμός.....	62
Πειραματική Διαδικασία παρασκευής του υλικού .....	63
Παράμετροι Λυοφιλίωσης.....	68
Τεχνικές Χαρακτηρισμού Υλικών.....	70

## ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

Περίθλαση Ακτίνων Χ (XRD) .....	77
Υπέρυθρη Φασματομετρία Μετασχηματισμού Fourier (FTIR).....	79
Ηλεκτρονική Μικροσκοπία Σάρωσης (SEM) .....	81
Μελέτη Συνθηκών Λυοφιλίωσης.....	81
Βελτίωση Μηχανικής Συμπεριφοράς.....	88

ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ .....	95
--------------------	----

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ .....	98
--------------------	----

## Πρόλογος

Η παρούσα διπλωματική εργασία εκπονήθηκε στο Εργαστήριο Μεταλλογνωσίας του Τομέα Μεταλλουργίας και Τεχνολογίας Υλικών της Σχολής Μηχανικών Μεταλλείων και Μεταλλουργών του ΕΜΠ.

Αισθάνομαι την ανάγκη να ευχαριστήσω όλους όσους συνέβαλαν με οποιονδήποτε τρόπο στην επιτυχή εκπόνηση αυτής της διπλωματικής εργασίας. Ιδιαίτερα θα ήθελα να εκφράσω τις ευχαριστίες μου:

Στην επιβλέπουσα καθηγήτρια κα. Αθηνά Τσετσέκου, Αναπληρώτρια Καθηγήτρια Ε.Μ.Π. Την ευχαριστώ θερμά για την ανάθεση αυτού του θέματος αλλά και για τη συνεχή επιστημονική καθοδήγηση. Η ενεργός συνεισφορά και οι επιστημονικές συμβουλές της υπήρξαν πολύτιμες σε όλη τη διάρκεια της εργασίας αυτής.

Επιπλέον, θα ήθελα να ευχαριστήσω την υποψήφια Διδάκτορ Δέσποινα Μπρασινίκα για την άψογη συνεργασία μας, την συνεχή υποστήριξη αλλά και την βοήθεια που μου προσέφερε στην αντιμετώπιση των δυσκολιών που συνάντησα κατά την διεξαγωγή της εργασίας αυτής. Ήταν πάντα διαθέσιμη να μου προσφέρει τις γνώσεις και την επιστημονική εμπειρία της. Τέλος την ευχαριστώ για τη βοήθεια στις λήψεις φωτογραφιών από το ηλεκτρονικό μικροσκόπιο.

Βαθιά ευχαριστώ όλα τα μέλη της ομάδας του εργαστηρίου Μεταλλογνωσίας, τόσο για τις πολύτιμες συμβουλές τους στα διάφορα στάδια της εργασίας αυτής, όσο και για τον τρόπο που με υποδέχτηκαν και με βοήθησαν να ενταχθώ στην ερευνητική ομάδα.

Ευχαριστώ την κα. Η. Χαλικιά και τον κ. Χ. Αργυρούση μέλη της τριμελούς εξεταστικής επιτροπής που δέχτηκε να με τιμήσει με την παρουσίας στην αξιολόγηση της διπλωματικής εργασίας αυτής.

Τέλος, θα ήθελα να αφιερώσω την εργασία αυτή στην οικογένειά μου για την ηθική και οικονομική συμπαράστασή τους όλα τα χρόνια των σπουδών μου στο Ε.Μ.Π.

## Περίληψη

Τα τελευταία χρόνια οι ερευνητικές προσπάθειες επικεντρώνονται στη βιομιμητική σύνθεση τρισδιάστατων ικριωμάτων για βιολογικές εφαρμογές. Τα ικριώματα αυτά θα πρέπει να αποτελούνται από υλικά με αυξημένη βιοσυμβατότητα και οστεοεπαγωγικότητα, καθώς πρόκειται να αντικαταστήσουν κάποιο κατεστραμμένο τμήμα φυσικού ιστού και να έρθουν σε επαφή με τους ιστούς του οργανισμού. Για τον λόγο αυτό, στην παρούσα εργασία, πραγματοποιείται ανάπτυξη τρισδιάστατων ικριωμάτων τα οποία αποτελούνται από ναοκρυστάλλους υδροξυαπατίτη. Οι κρύσταλλοι αυτοί προκύπτουν από μία βιομιμητική διαδικασία ανάπτυξης ναοϋδροξυαπατίτη παρουσία των βιομορίων χιτοζάνη και L – αργινίνη. Οι κρύσταλλοι του υδροξυαπατίτη αυτοί έχουν χαρακτηριστεί ως προς τη κρυσταλλική τους δομή με χρήση Περίθλασης Ακτίνων X (XRD) και Ηλεκτρονικής Μικροσκοπίας Διερχόμενης Δέσμης (TEM) και έχει επιβεβαιωθεί η ανάπτυξη πλακόμορφων κρυστάλλων με μέγεθος περίπου 10x10 nm, όμοιων με αυτούς που συναντώνται στο φυσικό οστό [1]. Από τα αιωρήματα του υδροξυαπατίτη πραγματοποιείται η ανάπτυξη των τρισδιάστατων πορώδων ικριωμάτων με τη μέθοδο της λυοφιλίωσης. Πρόκειται για μία τεχνική ταχύτατης ξήρανσης κατά την οποία το υλικό αρχικά ψύχεται και στην συνέχεια οι παγωμένοι κρύσταλλοι νερού εξαχνώνονται δημιουργώντας πορώδες δίκτυο στο εσωτερικό των παραγόμενων ικριωμάτων. Για τη βελτιστοποίηση της διαδικασίας αυτής, πραγματοποιείται μελέτη των συνθηκών λυοφιλίωσης, δηλαδή του ρυθμού ψύξης του υλικού καθώς και του ρυθμού εξάχνωσης ώστε να επιτευχθεί ο ιδανικός συνδυασμός εσωτερικού πορώδους δικτύου και ικανοποιητική μηχανική συμπεριφορά. Ωστόσο, η ύπαρξη του πορώδους επηρεάζει αρνητικά τις μηχανικές αντοχές των παραγόμενων ικριωμάτων και ως εκ τούτου επιχειρείται η χρήση κατάλληλων διασυνδετών (cross-linkers) και πηκτικών παραγόντων, οι οποίοι προσδίδουν στα ικριώματα μεγαλύτερη σταθερότητα. Με χρήση Ηλεκτρονικού Μικροσκοπίου Σάρωσης (SEM) εξετάζεται το εσωτερικό πορώδες δίκτυο των εκάστοτε ικριωμάτων, καθώς και η επίδραση του προστιθέμενου διασυνδέτη στο ποσοστό και στη μέση τιμή μεγέθους των πόρων.

## Εισαγωγή

Η αναγεννητική ιατρική έχει τη δυνατότητα να επιφέρει μελλοντικά αλλαγές στον τρόπο αντιμετώπισης ορισμένων ασθενειών. Στηριζόμενη σε νέες τεχνητές κυτταροκαλλιέργειες και στο σχεδιασμό βιοαποικοδομήσιμων πολυμερών, η μηχανική ιστών εμφανίζεται στο προσκήνιο ως η πιο προηγμένη μέθοδος θεραπείας στην αναγεννητική ιατρική. Στους στόχους της μηχανικής ιστών συγκαταλέγονται η αναγέννηση παθολογικών ιστών και η πρόληψη και θεραπεία χρόνιων διαταραχών που επιφέρουν ανικανότητα, όπως η οστεοαρθρίτιδα, και ασθενειών του καρδιαγγειακού και κεντρικού νευρικού συστήματος.

Η μηχανική ιστών περιλαμβάνει τη χρήση κυττάρων για τη δημιουργία τεχνητών δομών με στόχο την αντικατάσταση προβληματικών ιστών και οργάνων του σώματος. Περιλαμβάνει την απόθεση/ανάπτυξη κυττάρων σε πορώδη, βιοαποικοδομήσιμα ικρίωματα, τα οποία στη συνέχεια διαφοροποιούνται αποκτώντας μορφή φυσικών ιστών ικανά να μιμηθούν τις λειτουργίες αυτών. Οι τεχνητές αυτές δομές εμφυτεύονται στη συνέχεια σε ασθενείς με στόχο την αντικατάσταση ασθενικών ή κατεστραμμένων ιστών. Με την πάροδο του χρόνου, τα ικρίωματα αφομοιώνονται από τον ανθρώπινο οργανισμό και στη θέση τους αναπτύσσονται ιστοί οι οποίοι φέρουν αιμοφόρα αγγεία και νεύρα.

Στον τομέα της βιοτεχνολογίας/βιοϋλικών, ο όρος βιομίμηση (biomimesis) έχει οριστεί για να περιγράψει την προσομοίωση των λειτουργιών των φυσικών οργάνων. Η φιλοσοφία της βιομίμησης μπορεί να συνοψιστεί σε τρία βασικά στοιχεία: έξυπνα βιοϋλικά, μόρια που διεγείρουν βιο-αποκρίσεις και κύτταρα. Έξυπνα βιοϋλικά χαρακτηρίζονται τα απορροφήσιμα από τον οργανισμό σύνθετα υλικά (κεραμικά-πολυμερή) σχεδιασμένα σε μοριακό επίπεδο για να άγουν συγκεκριμένες κυτταρικές αποκρίσεις. Αυτά αποτελούν ιδιαίτερα ελκυστικά υλικά για να χρησιμοποιηθούν ως ικρίωματα ή μήτρες στην αναγέννηση ιστών.

Τα έξυπνα αυτά βιοϋλικά έχουν σχεδιαστεί έτσι ώστε να αντιδρούν σε αλλαγές στο άμεσο περιβάλλον τους (π.χ. pH, θερμοκρασία, ηλεκτρικά ή φυσικά ερεθίσματα, ενεργειακή κατάσταση) και να διεγείρουν συγκεκριμένες κυτταρικές αποκρίσεις σε μοριακό επίπεδο [1, 2].

Η νανοτεχνολογία επιτρέπει επίσης τη βελτίωση των μη-απορροφήσιμων από τον οργανισμό υλικών (π.χ. κεραμικών υλικών) και τον αποτελεσματικό έλεγχο των

βιολογικών αντιδράσεων με στόχο τη δραματική αύξηση της λειτουργικότητας και της μακροβιότητας των εμφυτευμάτων.

Οι στόχοι της νανοτεχνολογίας σε ότι αφορά τα έξυπνα βιοϋλικά για τα επόμενα χρόνια είναι οι εξής: i) βιοαποικοδομήσιμα έξυπνα βιοϋλικά με βιοδραστικές επιφάνειες και ελεγχόμενους ρυθμούς αποικοδόμησης, ii) βιοϋλικά που ενεργοποιούν γονίδια ειδικά σχεδιασμένα για συγκεκριμένες ασθένειες, iii) έξυπνα ικρίωματα με ελεγχόμενη δομή για μηχανική ιστών, iv) λειτουργικές βιομιμητικές μεμβράνες οι οποίες μιμούνται τις κυτταρικές μεμβράνες, v) τεχνολογία αισθητήρων για την αποτίμηση της ενσωμάτωσης και λειτουργικότητας των εμφυτευμάτων, vi) αισθητήρες για την ακριβή ενεργοποίηση γονιδίων και τον έλεγχο της ανάπτυξης των κυττάρων και των ιστών, vii) έλεγχος της ασυμβατότητας μεταξύ δότη και παραλήπτη, των μολύνσεων εξαιτίας των εμφυτευμάτων και της απόρριψης του εμφυτεύματος και ix) νανο-οργάνωση βιοϋλικών που διεγείρουν την εξωκυτταρική μεμβράνη των ιστών [3].

Βιοενεργά κεραμικά υλικά όπως ο υδροξυαπατίτης  $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$ , ο οποίος εμφανίζει χημική ομοιότητα με τα συστατικά των σκληρών ιστών του ανθρώπου, όπως τα οστά και τα δόντια, καθώς και πολλά φυσικά ή συνθετικά βιοπολυμερή έχουν ήδη χρησιμοποιηθεί ευρέως για την ανάπτυξη εμφυτευμάτων. Τα υλικά αυτά εμφανίζουν την επιθυμητή βιοδραστικότητα, αυξημένη οστεοεπαγωγικότητα, αποικοδομούνται εύκολα και δεν εμφανίζουν καθόλου τοξικότητα ή ανοσολογική αντίδραση του οργανισμού όταν έρθουν σε επαφή με τους φυσικούς ιστούς. Ωστόσο η μηχανική συμπεριφορά των εμφυτευμάτων που αποτελούνται από τα υλικά αυτά υστερεί σε σχέση με αυτή που απαντάται στους σκληρούς ιστούς του ανθρώπινου οργανισμού και εξαρτάται σε μεγάλο βαθμό από το εσωτερικό πορώδες δίκτυο που παρουσιάζουν.

Ο υδροξυαπατίτης μπορεί να παρασκευασθεί με μία πληθώρα μεθόδων, όπως αντιδράσεις καταβύθισης και στερεάς κατάστασης, υδροθερμικές μεθόδους ανάπτυξης των κρυστάλλων του και κρυστάλλωση με τεχνικές sol – gel. Ωστόσο, αυτές οι μέθοδοι παρέχουν συνήθως είτε υλικά με κρυστάλλους στη μικροκλίμακα, που δεν ταυτίζονται με τα μεγέθη σωματιδίων (νανοκλίμακα) που παράγονται στη φύση, είτε με ανώμαλα σχήματα κόκκων σε αντίθεση με τα λεπτά πλακίδια του φυσικού υδροξυαπατίτη, γεγονός που οδηγεί σε τελείως μη ελεγχόμενη συμπεριφορά. Με βάση τα παραπάνω, οι ερευνητικές προσπάθειες στρέφονται προς μία βιομιμητική προσέγγιση της σύνθεσης των κρυστάλλων του υδροξυαπατίτη σε συνδυασμό με

διάφορα βιοπολυμερή και αμινοξέα με τελικό στόχο τη ρύθμιση της διεργασίας πυρήνωσης και ανάπτυξης των κρυστάλλων του. Ένα ακόμη ζητούμενο είναι η ανάπτυξη να μπορεί να εστιάσει στην εισαγωγή ορισμένων κυτταρικών αποκρίσεων σε μοριακό επίπεδο, δηλαδή η οστεοενσωμάτωση και η ανάπτυξη του οστού να είναι κατευθυνόμενες.

Η σύνθεση των κρυστάλλων του υδροξυαπατίτη παρουσία βιομορίων που περιέχουν συγκεκριμένα κατάλοιπα αμινοξέων όπως η L-αργινίνη ενισχύουν σημαντικά την κυτταρική διασύνδεση, ανάπτυξη και διαφοροποίηση στις επιφάνειες του υδροξυαπατίτη. Η μίμηση της βιολογικής σύνθεσης στο εργαστήριο παρουσία αμινοξέων έχει δείξει ότι μπορεί να επηρεάζει καθοριστικά τη διεργασία πυρήνωσης και ανάπτυξης, ευνοώντας με αυτό τον τρόπο το σχηματισμό υδροξυαπατίτη σε φυσιολογική θερμοκρασία και επιδρώντας στο σχήμα, αλλά και στο μέγεθος των παραγόμενων κόκκων.

Βιολογικά μακρομόρια όπως η χιτοζάνη (Chit) θα μπορούσαν να αποδειχθούν κατάλληλα για τη βιομιμητική σύνθεση των κρυστάλλων του υδροξυαπατίτη. Η χιτοζάνη είναι ένας γραμμικός πολυσακχαρίτης, το αποακετυλιωμένο παράγωγο της χιτίνης, και το δεύτερο σε αφθονία φυσικό πολυμερές [4, 5]. Έχει χρησιμοποιηθεί ευρέως στην Μηχανική Ιστών σε κλινικές επιδιορθώσεις, καθώς αποτελεί ένα υλικό με αυξημένη βιοσυμβατότητα, βιοδιασπώμενο, μη – τοξικό και βιολειτουργικό, ενώ κατά την εμφύτευση προκαλεί ελάχιστη ανοσοποιητική αντίδραση από τον οργανισμό [6, 7]. Η επιφάνεια της χιτοζάνης είναι υδρόφιλη, γεγονός που διευκολύνει την προσκόλληση των κυττάρων, τον πολλαπλασιασμό και την διαφοροποίησή τους. Ένα ακόμα πολύ ενδιαφέρον χαρακτηριστικό της, είναι ότι μπορεί να διαμορφωθεί σε πορώδεις δομές και σε συνδυασμό με τον υδροξυαπατίτη να συντελέσουν στην ανάπτυξη σύνθετων ικριωμάτων. Τα σύνθετα αυτά ικριώματα εμφανίζουν ικανοποιητικό ρυθμό βιοαποικοδόμησης, αυξημένη βιοσυμβατότητα και οστεοαγωγικότητα, και βελτιωμένες τιμές αντοχής σε εφελκυσμό και μέτρου ελαστικότητας. Τέλος στα σύνθετα ικριώματα υδροξυαπατίτη – χιτοζάνης βρέθηκε ότι σχηματίζεται πορώδες δίκτυο με μέση τιμή μεγέθους πόρων περίπου 100 μm [8, 9].



## **ΘΕΩΡΗΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ**

### **Σκοπός**

Στην παρούσα εργασία στόχος είναι η ανάπτυξη υβριδικών τρισδιάστατων ικριωμάτων αποτελούμενων από ναοκρυστάλλους υδροξυαπατίτη, οι οποίοι έχουν συντεθεί παρουσία των βιομορίων χιτοζάνη και αργινίνη. Στα ικριώματα αυτά προστίθενται οι απαραίτητοι διασυνδέτες ώστε να επιτευχθεί βελτίωση των μηχανικών τους αντοχών με παράλληλη διατήρηση ικανοποιητικού πορώδους δικτύου. Η ανάπτυξη των τρισδιάστατων ικριωμάτων πραγματοποιήθηκε με τη μέθοδο της λυοφιλίωσης.

Από άποψη δομής, η εργασία αυτή διαιρείται σε δύο μέρη, το θεωρητικό και το πειραματικό. Το θεωρητικό μέρος περιλαμβάνει στοιχεία βιβλιογραφίας σχετικά με τα βιοϋλικά, εστιάζοντας περισσότερο σε εκείνα που χρησιμοποιήθηκαν κατά την πειραματική διαδικασία σύνθεσης ικριωμάτων υδροξυαπατίτη, τα χρησιμοποιούμενα βιομόρια, τις αρχές λειτουργίας των μεθόδων που χρησιμοποιήθηκαν και στοιχεία σχετικά με τον μηχανισμό αντίδρασης σε διαλύματα. Το πειραματικό μέρος περιλαμβάνει περιγραφή της πειραματικής διαδικασίας που ακολουθήθηκε, του εξοπλισμού και των πρώτων υλών που χρησιμοποιήθηκαν και γίνεται αναφορά στα πειραματικά αποτελέσματα που προέκυψαν. Τέλος, σε ξεχωριστή ενότητα γίνεται σχολιασμός των αποτελεσμάτων και εξαγωγή συμπερασμάτων

### **Βιοϋλικά**

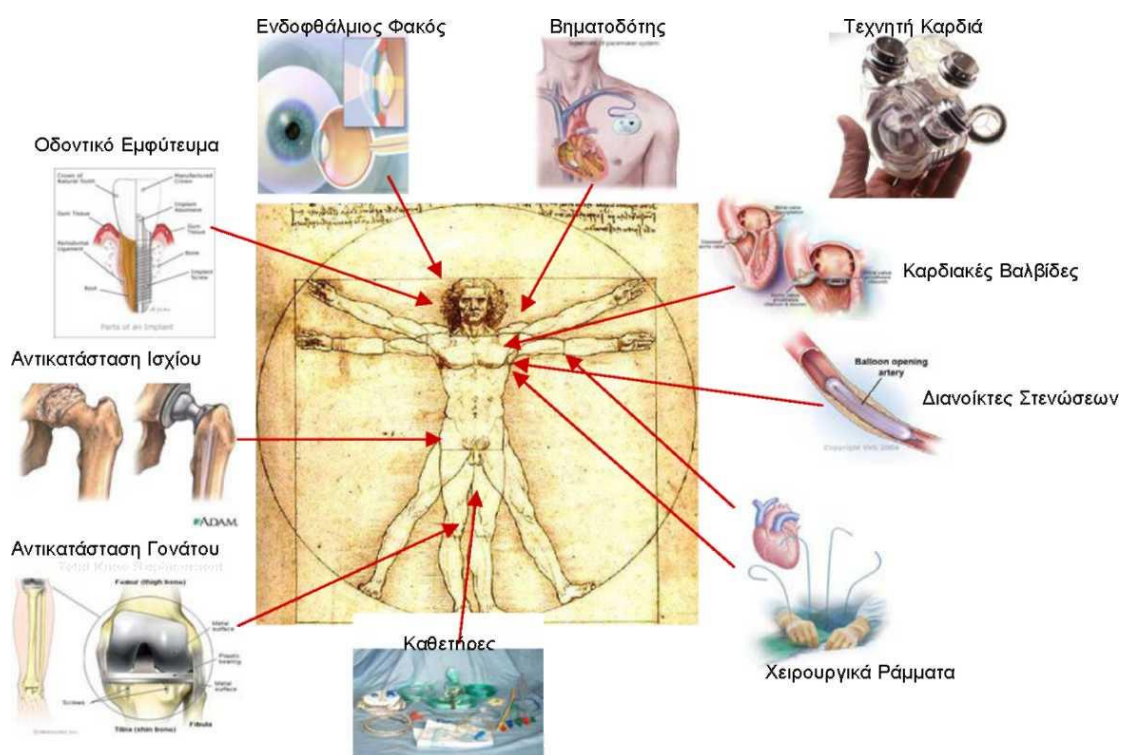
Η επιστήμη των βιοϋλικών μελετά υλικά, φυσικής προέλευσης ή κατασκευασμένα από τον άνθρωπο, που χρησιμοποιούνται ως πρόσθετα ή για να αντικαταστήσουν δυσλειτουργούντες ιστούς στο ανθρώπινο σώμα.

Βιοϋλικά είναι κάθε υλικό, απλό μέλος μιας γενικής κατηγορίας υλικών ή συνδυασμός δυο ή περισσότερων μελών της ίδιας ή διαφορετικών κατηγοριών, που μπορεί να χρησιμοποιηθεί σε ένα ζωντανό οργανισμό για κάποιο συγκεκριμένο εμφύτευμα ή ομάδα εμφυτευμάτων και το οποίο δεν προκαλεί αρνητικές αντιδράσεις από τον οργανισμό, είναι σταθερό ή αποδομείται κατά ελεγχόμενο τρόπο.

Η χρήση των βιοϋλικών έχει τις ρίζες της σε αρχαίους ακόμα πολιτισμούς. Τεχνητά μάτια, αυτιά, μύτες και δόντια βρέθηκαν σε αιγυπτιακές μούμιες ενώ οι

Κινέζοι και οι Ινδοί χρησιμοποίησαν κόλλες, κεριά και ιστούς για να αντικαταστήσουν μέρη του σώματος που έλειπαν ή παρουσίαζαν κάποια δυσλειτουργία. Με το πέρασμα των αιώνων, η βελτίωση των συνθετικών υλικών, των χειρουργικών τεχνικών και των μεθόδων αποστείρωσης, επέτρεψαν τη χρήση των βιοϋλικών με ολοένα και περισσότερους τρόπους [10].

Η ιατρική πρακτική αξιοποιεί σήμερα ένα μεγάλο αριθμό συσκευών και εμφυτευμάτων. Βιοϋλικά, με τη μορφή εμφυτευμάτων, όπως χειρουργικά ράμματα, αντικαταστάτες αρθρώσεων και συνδέσμων, μοσχεύματα αρτηριών, βαλβίδες καρδιάς, ενδοφθάλμιοι φακοί, φακοί επαφής και οδοντικά εμφυτεύματα, και με τη μορφή ιατρικών συσκευών, όπως βηματοδότες, καθετήρες, βιοαισθητήρες, τεχνητές καρδιές, αιμοφόρα αγγεία κ.ά., χρησιμοποιούνται ευρέως για να αντικαταστήσουν ή να βελτιώσουν τη λειτουργία τραυματισμένων ή εκφυλισμένων ιστών ή οργάνων, να βοηθήσουν στη θεραπεία, να διορθώσουν μη φυσιολογικές αποκρίσεις και επομένως να βελτιώσουν την ποιότητα ζωής των ασθενών [11]. **(Εικόνα 1)**



**Εικόνα 1.** Εφαρμογές Βιοϋλικών

Όπως φαίνεται και από τον πίνακα 1., ο αριθμός των εμφυτευμάτων και των ιατρικών συσκευών που χρησιμοποιούνται ανά έτος παγκοσμίως είναι πολύ μεγάλος. Σύμφωνα με μια έρευνα των Lysaght, και O'Laughlin, το 2000, η ζωή περισσότερων

από είκοσι εκατομμυρίων ανθρώπων είχε διατηρηθεί, υποστηριχθεί ή σημαντικά βελτιωθεί από την αντικατάσταση οργάνων και λειτουργιών τους. Ο αριθμός των ανθρώπων στους οποίους έχει αντίκτυπο η εφαρμογή των βιοϋλικών αυξάνει κατά περίπου 10% ανά έτος.

Πέρα από τον μεγάλο αντίκτυπο που τα βιοϋλικά έχουν στον τομέα της υγείας, επηρεάζουν σημαντικά και τον τομέα της οικονομίας. Το κόστος του πρώτου έτους της ανάρρωσης μετά από αντικατάσταση οργάνου ή τοποθέτηση εμφυτεύματος υπερβαίνει τα 200 δισεκατομμύρια ευρώ το χρόνο παγκοσμίως και αντιπροσωπεύει το μεταξύ 7% και 8% του συνολικού κόστους για τον τομέα της υγείας, ανά τον κόσμο. Στις Ηνωμένες Πολιτείες, το κόστος της θεραπείας, που σχετίζεται με την ανάπτυξη της τεχνολογίας για την αντικατάσταση οργάνων, υπερβαίνει το 1% του ακαθάριστου εθνικού προϊόντος. Επομένως, το οικονομικό ενδιαφέρον της εφαρμογής των βιοϋλικών είναι πραγματικά μεγάλο [11].

**Πίνακας 1.** Αριθμός Ιατρικών Συσκευών που Χρησιμοποιείται ανά Έτος Παγκοσμίως (Lysaght, και O'Laughlin, 2000)

Ιατρικές Συσκευές	Αριθμός που Χρησιμοποιείται / Χρόνο Παγκοσμίως
Ενδοφθάλμιοι Φακοί	7 000 000
Φακοί Επαφής	75 000 000
Αγγειακά Μοσχεύματα	400 000
Αντικαταστάτες Ισχίου/Γονάτου	1 000 000
Καθετήρες	300 000 000
Βηματοδότες	200 000
Καρδιακές Βαλβίδες	200 000
Διανοίκτες Στενώσεων	> 2 000 000
Οδοντιατρικά Εμφυτεύματα	500 000

Παρότι τα περισσότερα βιοϋλικά και οι ιατρικές συσκευές εκπληρώνουν ικανοποιητικά το σκοπό για τον οποίο χρησιμοποιούνται, βελτιώνοντας την ποιότητα ζωής των ασθενών ή ακόμα και σώζοντας ζωές, συχνά δημιουργούν επιπλοκές και προβλήματα, κάνοντας την απομάκρυνση τους από το ανθρώπινο σώμα και την

τοποθέτηση νέου επιβεβλημένη. Τα σημαντικότερα προβλήματα που σχετίζονται με την χρήση εμφυτευμάτων και ιατρικών συσκευών προκύπτουν από μηχανική αστοχία του βιοϋλικού [11] θρόμβωση περιοχών όπου αυτό έχει εμφυτευθεί, αλλά από την εμφάνιση νοσοκομειακών σηψαιμικών επεισοδίων σχετιζόμενων με λοιμώξεις που προκαλούνται από βιοϋλικά [12]. Αυτές είναι οι κύριες αιτίες που εμποδίζουν την μακροχρόνια χρήση των βιοϋλικών και αυξάνουν τη νοσηρότητα, το κόστος νοσηλείας αλλά και τη θνησιμότητα.

Επομένως, το πεδίο των βιοϋλικών δεν έχει ακόμα ερευνηθεί πλήρως. Πρόκειται για ένα πεδίο η μελέτη του οποίου εξελίσσεται σταθερά τα τελευταία πενήντα περίπου χρόνια και αυτό που απαιτεί είναι μια πολυδιάστατη και πειθαρχημένη προσέγγιση η οποία να φέρνει κοντά και σε σαφή επικοινωνία ερευνητές με διαφορετικά ακαδημαϊκά υπόβαθρα και γνώσεις. Κάποιες ειδικότητες που θα πρέπει να διασταυρωθούν για την μελέτη, δημιουργία και εφαρμογή υλικών που θα είναι συμβατά, τόσο ως προς την επιφάνεια όσο και ως προς τη δομή τους με τους ιστούς ξενιστές, είναι αυτές του: εμβιομηχανικού, ιατρού, χημικού, μηχανικού, ηλεκτρολόγου μηχανικού, μηχανολόγου μηχανικού, επιστήμονα των υλικών, βιολόγου [11].

### **Κριτήρια Επιλογής Βιοϋλικών**

Σύμφωνα λοιπόν και με τα παραπάνω, τα κριτήρια με βάση τα οποία επιλέγεται να χρησιμοποιηθεί ένα υλικό ως βιοϋλικό είναι πολλά.

(i) Καταρχήν, πρέπει να έχει τέτοιες μηχανικές ιδιότητες ώστε να αντικαταστήσει τη λειτουργία του οργανικού ιστού ή του οργάνου που έχει υποστεί βλάβη. Δηλαδή πρέπει να είναι συμβατό ως προς τη δομή του, ώστε να προσαρμοστεί, όσο το δυνατό καλύτερα, στη μηχανική συμπεριφορά του ιστού ξενιστή. Έτσι η συμβατότητα δομής αναφέρεται στις μηχανικές ιδιότητες του εμφυτεύματος και τέτοιες είναι το μέτρο ελαστικότητας (Young's Modulus), η αντοχή, η σκληρότητα και η σωστή μεταφορά τάσης στη διεπιφάνεια εμφυτεύματος - ιστού.

(ii) Το υλικό κατά δεύτερο λόγο πρέπει να είναι βιοσυμβατό. Οι ερευνητές έχουν συνδέσει τον όρο «βιοϋλικό» με τον όρο «βιοσυμβατότητα», εννοώντας ότι το υλικό πρέπει να γίνει δεκτό και να ενοποιηθεί με τον οργανισμό με ελεγχόμενο και

προβλεπόμενο τρόπο, ώστε να εξασφαλίζεται η αρμονική συμβίωση βιοϋλικού και ζώντος οργανισμού. Ο όρος «βιοσυμβατότητα» λοιπόν αναφέρεται στην συμβατότητα της επιφάνειας, εννοώντας τη χημική, βιολογική και φυσική, συμπεριλαμβάνοντας και τη μορφολογία της επιφάνειας, καταλληλότητα του εμφυτεύματος για τον κάθε ιστό ξενιστή. Απαραίτητη επίσης προϋπόθεση της βιοσυμβατότητας είναι το υλικό να μη είναι τοξικό, να μην εκλύει δηλαδή τοξικές ουσίες οι οποίες μπορούν να νεκρώσουν τον ιστό που το περιβάλλει.

Υλικά που έρχονται σε άμεση επαφή με το αίμα δεν πρέπει να καταστρέφουν κύτταρα του αίματος ή να ενισχύουν τη δημιουργία θρόμβων. Όταν το αίμα έρχεται σε επαφή με ξένα υλικά, υπάρχει μια άμεση αντίδραση που οδηγεί στην εναπόθεση πρωτεϊνών και αιμοκυττάρων στο υλικό. Η διαδικασία αυτή συχνά οδηγεί σε θρόμβωση που μπορεί να γενικευτεί και να έχει δυσάρεστη εξέλιξη. Επομένως, η δημιουργία, συν τοις άλλοις, αντιθρομβωτικών υλικών αποτελεί αναγκαιότητα ειδικά για εμφυτεύματα που έρχονται σε άμεση επαφή με το αίμα και τέτοια είναι οι ενδοφλέβιοι καθετήρες, οι καρδιακές βαλβίδες, τα τεχνητά αιμοφόρα αγγεία και διανοίκτες αγγείων με στένωση (stents), αλλά ιατρικές συσκευές όπως τα φίλτρα αιμοκάθαρσης [11].

### **Είδη Βιοϋλικών**

Η κλινική εμπειρία έχει δείξει ότι δεν μπορούν όλα τα υλικά που συνήθως χρησιμοποιούνται σε μηχανικές κατασκευές να χρησιμοποιηθούν και ως βιοϋλικά. Επειδή λοιπόν κανένα υλικό δεν μπορεί να θεωρηθεί απόλυτα αδρανές για τον οργανισμό, πολλοί κατατάσσουν τα βιοϋλικά σε κατηγορίες με βάση την αλληλεπίδραση τους με το όργανο, ιστό-ξενιστή, και αυτές είναι:

- (i) το υλικό απελευθερώνει κάποιες τοξικές ουσίες που περιέχει και αυτές οδηγούν στη νέκρωση του ιστού που το περιβάλλει (τοξικό) [11].
- (ii) το υλικό δεν είναι τοξικό αλλά σταδιακά αναρροφείται και αντικαθίσταται από τον ιστό που το περιβάλλει και που είναι υπό θεραπεία (βιοαποικοδομήσιμο).
- (iii) το υλικό δεν είναι τοξικό και είναι βιολογικά ανενεργό αλλά δεν μπορεί να αποσυντεθεί από τον οργανισμό (βιοσταθερό) [12].
- (iv) το υλικό δεν είναι τοξικό και είναι έντονα δραστικό με τον ιστό που το περιβάλλει, σχηματίζοντας χημικούς δεσμούς που το σταθεροποιούν (πυκνά

κεραμικά υδροξυαπατίτη, βιοενεργά γυαλιά, βιοενεργά κεραμικά-γυαλιά και βιοενεργά σύνθετα είναι μερικά παραδείγματα της τελευταίας κατηγορίας) (βιοσύνθετο-βιοενεργό) [13].

Τα βιοϋλικά μπορούν επίσης να καταταχθούν με βάση το υλικό από το οποίο είναι κατασκευασμένα. Έτσι χωρίζονται σε τέσσερις κατηγορίες:

(i) μέταλλα και κράματα τους. Τα μέταλλα που με επιτυχία χρησιμοποιούνται ως βιοϋλικά είναι ο χρυσός και το ανοξείδωτο ατσάλι αλλά και τα κράματα τιτανίου και κοβαλτίου. Μεταλλικά εμφυτεύματα και συσκευές βρίσκουν εφαρμογή, στην ορθοπεδική, την οδοντιατρική άλλα και σε καρδιαγγειακά εμφυτεύματα όπως τμήματα τεχνητής καρδιάς, βηματοδότες, προσθετικές βαλβίδες, διανοίκτες στενώσεων, καθετήρες [14].

(ii) κεραμικά. Τα κεραμικά που χρησιμοποιούνται με επιτυχία είναι: αλούμινα, τιτανία, ζirkόνια, βιοενεργά γυαλιά, άνθρακας και υδροξυαπατίτης, και χαρακτηρίζονται και από την αρκετά καλή βιοσυμβατότητά τους. Χρησιμοποιούνται για την κατασκευή οπτικών γυαλιών και διαγνωστικών συσκευών, στην ορθοπεδική και την οδοντιατρική [13].

(iii) πολυμερή. Τα πολυμερή χρησιμοποιούνται ευρέως για την κατασκευή βιοϋλικών με ποικίλες βιοϊατρικές εφαρμογές. Εκείνα που χρησιμοποιούνται πιο συχνά είναι τα: πολυαιθυλένιο (PE), πολυουρεθάνη (PU), πολυμεθακρυλικός μεθυλεστέρας (PMMA), πολυτερεφθαλικός αιθυλενεστέρας (PET), πολυβινυλοχλωρίδιο (PVC), σιλκόνη (Si), πολυσουλφόνη (PS), πολυλακτικό οξύ (PLA), πολυγλυκολικό οξύ (PGA) αλλά και πολλά ακόμη [15].

(iv) σύνθετα. Τα σύνθετα φτιάχνονται με συνδυασμούς των τριών πρώτων κατηγοριών [16].

### **Μηχανική Ιστών (Tissue Engineering)**

Η μηχανική ιστών αποτελεί ένα επιστημονικό πεδίο το οποίο αναπτύχθηκε σχετικά πρόσφατα και χρησιμοποιεί τις προόδους της κυτταρικής και μοριακής βιολογίας, της χημείας των υλικών, της μηχανικής και άλλων ειδικοτήτων για τη δημιουργία μεταμοσχεύσιμων ιστών. Από τους πρώτους καρπούς της Μηχανικής

Ιστών υπήρξε το τεχνητά παραγόμενο δέρμα, ενώ αμέσως μετά παρήχθη και χόνδρος. Οι προσπάθειες των ερευνητών επικεντρώνονται τώρα στη δημιουργία περιπλοκότερων ιστών αλλά και οργάνων, όπως οστά, μύες, ήπαρ και νεφροί. Η Μηχανική Ιστών ξεκίνησε τη δεκαετία του '70 για να καλύψει τις ανάγκες των χειρουργών οι οποίοι ζητούσαν υποκατάστατα βιολογικών στοιχείων τα οποία δεν ήταν δυνατόν να ληφθούν από δότες.

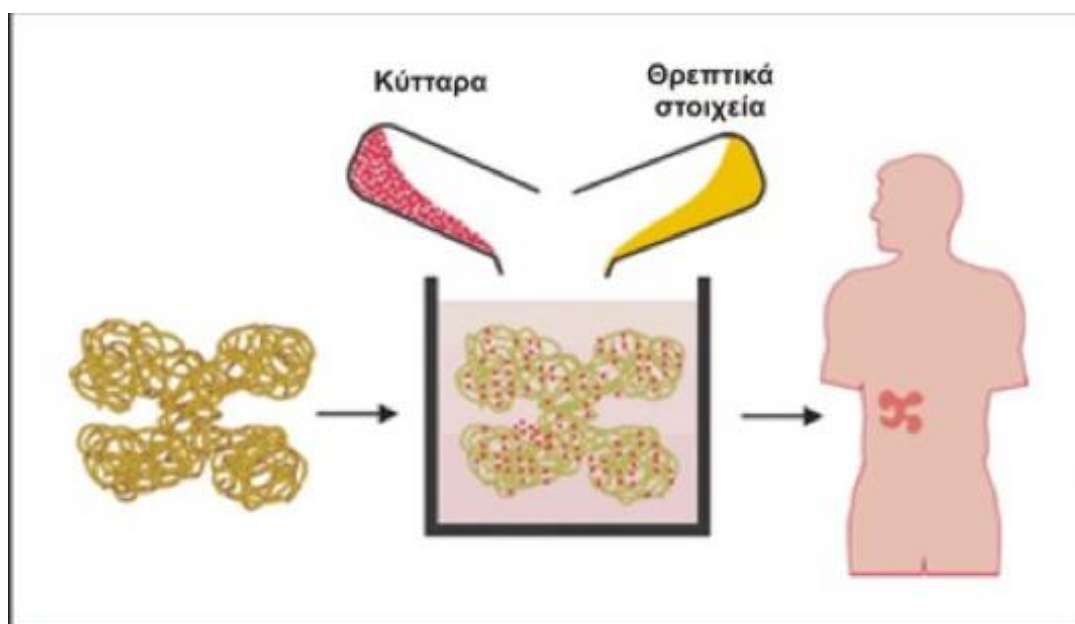
Το γεγονός ότι απαιτείται η συνεργασία πολλών επιστημόνων προκειμένου να δημιουργηθούν ιστοί και όργανα στο εργαστήριο καθίσταται προφανές αν αναλογιστεί κανείς πως τα βασικά συστατικά στη «συνταγή» δημιουργίας ιστών είναι τρία: τα κύτταρα τα οποία θα πρέπει να έχουν ή να αποκτήσουν την ταυτότητα που απαιτείται για κάθε εφαρμογή, η εξωκυττάρια ουσία η οποία θα πρέπει να λειτουργήσει ως πλαίσιο στήριξης των κυττάρων (ικρίωμα) αλλά και η οποία θα καθορίσει το τελικό σχήμα του ιστού που θα παραχθεί και τέλος τα μοριακά σήματα τα οποία δίνουν οδηγίες στα κύτταρα για να μπορέσουν αυτά να αναπτυχθούν.

Η Μηχανική Ιστών έχει πολλά επιτεύγματα να επιδείξει. Για παράδειγμα, η μεταμόσχευση κυττάρων σε συγκεκριμένα σημεία του οργανισμού, αλλά και η μεταφορά και η απελευθέρωση βιολογικών ενεργών ουσιών σε σημεία όπου αυτές απαιτούνται έχει καταστεί δυνατή χάρη στα νέα υλικά τα οποία όχι μόνο αποικοδομούνται στον οργανισμό όταν έχουν επιτελέσει τον ρόλο τους (έτσι ώστε να αποφεύγονται οι φλεγμονές), αλλά η αποικοδόμησή τους είναι και ελεγχόμενη, έτσι ώστε να εξασφαλίζεται ο κατάλληλος ρυθμός απελευθέρωσης των κυττάρων ή των μορίων που περιέχονται σε αυτά [17].

Η μεταφορά των κυττάρων αυτών σε τραυματισμένα σημεία των ιστών, η οποία θα έχε ως αποτέλεσμα την αποκατάσταση των τραυμάτων, επιτυγχάνεται με την κατασκευή ικριωμάτων ιστών που δημιουργούν το κατάλληλο περιβάλλον για την καθοδήγηση του νέου ιστού, την υποστήριξη της ανάπτυξής του, την εξάπλωση και τη διαφοροποίηση εμφυτευμένων κυττάρων. Η μελέτη των παραμέτρων οι οποίες εξασφαλίζουν τα καλύτερα αποτελέσματα στην δημιουργία των ικριωμάτων αυτών, αποτελεί σήμερα μία από τις σημαντικότερες εφαρμογές της Εμβιομηχανικής.

Αυτά τα ικριώματα ιστών, προσφέρουν μια μηχανικά σταθερή και πορώδη δομή που επιτρέπει στα κύτταρα να μεταναστεύσουν μέσα στο περιβάλλον και έτσι να προωθήσουν την ανακατασκευή του ιστού, τόσο μέσα στον οργανισμό όσο και σε τεχνητό περιβάλλον. Ο τομέας της επιστήμης που ασχολείται με την κατασκευή

ικριωμάτων κατάλληλων για την αναπαραγωγή και προσθετικών μελών ονομάζεται τεχνολογία ιστών.



**Εικόνα 2.** Ανακατασκευή ιστού σε τεχνητό περιβάλλον όσο και μέσα στον οργανισμό.

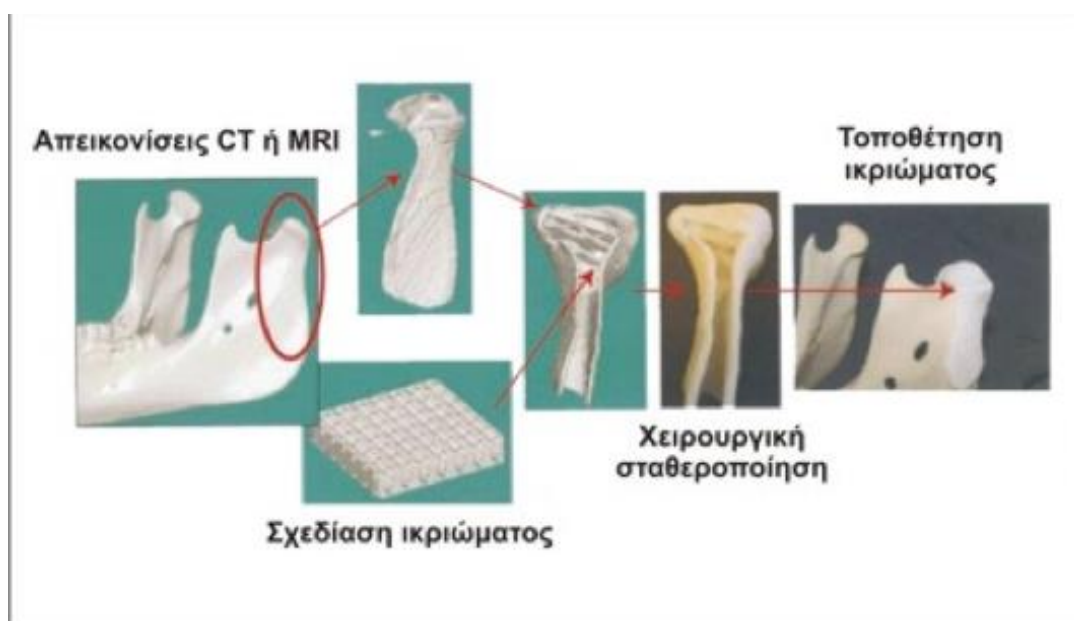
Με τη βοήθεια βιοσυνθετικών υλικών που αποτελούν το “ικρίωμα” (τη σκαλωσιά), και αυξητικών παραγόντων, αποτελούν ως στρωματικά κύτταρα, το ιδανικό υπόστρωμα για ανάπτυξη, είτε των παρακείμενων κυττάρων του ιστού “στόχου” (αυτόλογων κυττάρων), είτε επιθηλιακών κυττάρων παραπλήσιων ιδιοτήτων, με τα οποία έχουμε εμπλουτίσει το ικρίωμα (scaffold).

Η επιτυχία και η λειτουργικότητα του κατασκευασμένου ικρίωματος, εξαρτάται από πολλούς παράγοντες που καθορίζουν σε ποιο βαθμό το ικρίωμα μπορεί να μιμηθεί τα χαρακτηριστικά του φυσικού εξωκυτταρικού δικτύου. Είναι πλέον γνωστό ότι πολλά λειτουργικά μόρια, υλικά εξωκυτταρικών δικτύων και κύτταρα, αλληλεπιδρούν ιδιαιζόντως σε κλίμακα μεγέθους νανομέτρων. Άρα μεγάλη σημασία για τη επιτυχή δημιουργία ικριωμάτων ιστών έχει η κατασκευή των κατάλληλων τρισδιάστατων δομών στη νανο-κλίμακα.

Ιδανικά στοχεύουμε στην δημιουργία ικρίωματος το οποίο θα διαθέτει κατάλληλο πορώδες θα είναι βιοσυμβατό και βιοαποικοδομήσιμο θα έχει την κατάλληλη επιφανειακή χημεία ενώ θα διαθέτει και κατάλληλες μηχανικές ιδιότητες.



Τα ικριώματα δημιουργούν το κατάλληλο περιβάλλον για την καθοδήγηση του νέου ιστού, την υποστήριξη της ανάπτυξής του, την εξάπλωση και τη διαφοροποίηση εμφυτευμένων κυττάρων. Προσφέρουν ακόμα μια μηχανικά σταθερή και πορώδη δομή που επιτρέπει στα κύτταρα να μεταναστεύσουν μέσα στο περιβάλλον και έτσι να προωθήσουν την ανακατασκευή του ιστού, τόσο μέσα στον οργανισμό (σε μεταμοσχεύσεις, στην επανορθωτική ιατρική και στην ανακατασκευαστική χειρουργική), όσο και σε τεχνητό περιβάλλον.



**Εικόνα 3.** Απεικόνιση βιοενεργών και βιοσυμβατών εμφυτευμάτων με χημική σύσταση, νανοδομή και βιολογική απόκριση παρόμοια με της φυσικής οδοντοστοιχίας.

Ουσιαστικά αποτελούν ένα βιοαπορροφήσιμο μέσο εμφύτευσης των κυττάρων μέσα στον ανθρώπινο οργανισμό. Η τεχνολογία των ικριωμάτων αποτελεί μέχρι και σήμερα πρόκληση για τον ερευνητικό τομέα, δεδομένου ότι ακόμα υπολείπονται πολλά στοιχεία τα οποία θα μπορούσαν να οδηγήσουν στην ολοκλήρωση της γνώσης γύρω από τα βιολογικά ικριώματα. Ένα από τα στοιχεία αυτά είναι ο μηχανικός και ο δομικός χαρακτηρισμός βιολογικά ενεργών ικριωμάτων για διάφορες εφαρμογές. Προς την κατεύθυνση αυτή κινείται και η παρούσα διπλωματική εργασία, δεδομένου ότι στοχεύει στην δημιουργία ικριωμάτων με κατάλληλο πορώδες και μηχανικές αντοχές, με σκοπό την πιθανή χρήση τους σε

περιπτώσεις όπου χρειάζεται αναγέννηση, επανόρθωση ή αντικατάσταση ανθρώπινων ιστών.

Μέχρι σήμερα έχουν διερευνηθεί διάφορες κατασκευαστικές μέθοδοι αλλά και πειραματικές τεχνικές για τη δημιουργία ικριωμάτων ιστών. Στις τεχνικές για την κατασκευή ικριωμάτων συγκαταλέγεται και η κατασκευή αυτών δια της μεθόδου της λυοφιλίωσης.

Είναι γεγονός όμως η πρόκληση της κατασκευής ικριωμάτων με την επιθυμητή τρισδιάστατη δομή και διαστατική ακρίβεια, καθώς είναι αρκετά δύσκολο να καθοδηγηθούν οι νανοϊνες που παράγονται από τις διατάξεις, σε προκαθορισμένες επιθυμητές θέσεις τόσο στις δύο όσο και στις τρεις διαστάσεις. Προς το παρόν, είναι δυνατό με κατάλληλες διατάξεις να κατασκευαστούν δισδιάστατα ή εξαιρετικά λεπτά ικριώματα που μπορούν να χρησιμοποιηθούν ως μοσχεύματα στο μυοκάρδιο, στην ανακατασκευή αγγείων, τεχνητού δέρματος και σε άλλες εφαρμογές που δεν απαιτείται διακριτή τρισδιάστατη δομή.

Για την κατασκευή ικριωμάτων ερευνώνται επίσης και διάφορες μέθοδοι ταχείας προτυποποίησης όπως η τρισδιάστατη εκτύπωση πολυμερών υλικών, η εναπόθεση τηγμένου υλικού, η στερεολιθογραφία και άλλες. Βασικό χαρακτηριστικό των μεθόδων αυτών είναι η χρήση τρισδιάστατων ψηφιακών μοντέλων δημιουργημένων σε κατάλληλα συστήματα CAD, για την καθοδήγηση των κεφαλών εναπόθεσης των υλικών σε συγκεκριμένες και προκαθορισμένες θέσεις. Αν και με τις μεθόδους ταχείας προτυποποίησης είναι δυνατό να δημιουργηθεί η τρισδιάστατη επιθυμητή δομή των ικριωμάτων, δεν είναι δυνατή η δημιουργία ικριωμάτων με εσωτερική δομή σε τάξεις μεγέθους νανοκλίμακας ενώ δεν μπορεί να επιτευχθεί το επιθυμητό πορώδες του ικριώματος [17].

### **Το προσωρινό ικρίωμα - Ικρίωμα ιστοτεχνολογίας**

Η χρήση ενός προσωρινού ικριώματος μπορεί να εφαρμοστεί σε καταστάσεις όπου το φυσικό στρώμα του ιστού έχει εξασθενήσει από μόλυνση, πληγή ή επέμβαση και απαιτεί κάποια τεχνητή υποστήριξη, ή κάποιο όργανο έχει χάσει τη λειτουργικότητα του. Κάποια παραδείγματα τέτοιων περιπτώσεων είναι ένα σπασμένο οστό, μια πληγή σε στάδιο ανάρρωσης, ένα κατεστραμμένο αγγείο ή όργανο. Τα ράμματα, οι συσκευές σταθεροποίησης οστών (όπως βίδες ή πλάκες), οι ενδοαγγειακοί διανοίκτες και τα ικριώματα ιστοτεχνολογίας θα μπορούσαν να είναι

παραδείγματα των αντίστοιχων συσκευών υποστήριξης. Σε όλα αυτά τα περιστατικά, το βιοδιασπώμενο μόσχευμα παρέχει προσωρινή μηχανική υποστήριξη έως ότου θεραπευτεί ο φυσικός ιστός και ανακτήσει τις δυνάμεις του ή αποκατασταθεί η λειτουργία του οργάνου. Ειδικά στην περίπτωση των ικριωμάτων ιστοτεχνολογίας, κύτταρα καλλιεργούνται στο ικρίωμα (για παράδειγμα ηπατικά, αν στόχος είναι η δημιουργία συκωτιού) ώστε σταδιακά να αποκτήσει τόσο τη δομή όσο και τη λειτουργικότητα του οργάνου που πρόκειται να αντικαταστήσει. Προκειμένου να λειτουργήσει σωστά το προσωρινό ικρίωμα, θα πρέπει να υπάρξει μια σταδιακή μετατόπιση τάσης: καθώς ο φυσικός ιστός θεραπεύεται ή το όργανο αναπτύσσεται, το μόσχευμα θα πρέπει σταδιακά να εξασθενεί.

### **Βιοδιασπώμενα Υλικά**

Υπάρχουν περιπτώσεις που ένα εμφύτευμα δε χρειάζεται να αφαιρεθεί με επέμβαση όταν δεν είναι πλέον χρήσιμο. Τα βιοδιασπώμενα υλικά έχουν αξία στις εφαρμογές που απαιτούν μόνο την προσωρινή παρουσία του εμφυτεύματος. Ένα επιπρόσθετο πλεονέκτημα είναι ότι η χρήση του μπορεί να παρακάμψει κάποια από τα προβλήματα που σχετίζονται με τη μακροχρόνια χρήση των εμφυτευτικών συσκευών. Από μια πρακτική άποψη είναι βολικό να διακριθούν τέσσερις κύριες κατηγορίες βιοδιασπώμενων εμφυτευμάτων: το προσωρινό ικρίωμα-ικρίωμα ιστοτεχνολογίας, το προσωρινό φράγμα, η συσκευή αποδέσμευσης (διανομής) φαρμάκων και το πολυλειτουργικό μόσχευμα [11].

### **Πολυμερή**

Τα κλασσικά πολυμερή αποτελούνται συνήθως από μόρια άνθρακα ενωμένα σε μια γραμμική, αλυσιδωτή δομή με ομοιοπολικούς δεσμούς. Οι δεσμοί μέσα στην αλυσίδα χρησιμοποιούν δύο ηλεκτρόνια σθένους από κάθε άτομο, αφήνοντας τους άλλους δύο δεσμούς διαθέσιμους για τη συμπλήρωση από ποικιλία ατόμων (π.χ. H<sub>2</sub>), μορίων, λειτουργικών ομάδων κ.ά.

Τα πολυμερή, με βάση την οργάνωση της αλυσίδας τους κατατάσσονται σε τρεις κατηγορίες [16]:

ι) Τα θερμοσκληρυνόμενα: είναι πολυμερή με πλευρικές αλυσίδες μεταξύ των οποίων δημιουργούνται ενώσεις, σχηματίζοντας μια σταθερή τρισδιάστατη δομή, η οποία όμως μετά από θέρμανση και ψύξη, εξαιτίας των σταυροδεσμών που σχηματίζονται, δεν επανακτά την αρχική της ομοιομορφία (μη αντιστρεπτή διαδικασία)

ιι) Τα θερμοπλαστικά: είναι πολυμερή με λίγες ή καθόλου διακλαδώσεις οι οποίες συγκρατούνται κοντά μεταξύ τους με δυνάμεις Van der Waals και υδρογόνου, δηλαδή ασθενείς δυνάμεις, οπότε και τα υλικά αυτά έχουν μικρότερη ισχύ από ότι τα θερμοσκληρυνόμενα. Όμως, μετά από θέρμανση και ψύξη, εξαιτίας της έλλειψης σταυροδεσμών, δεν χάνουν τις αρχικές τους ιδιότητες (η θέρμανση-ψύξη μπορεί να επαναληφθεί για 1-2 φορές), δηλαδή είναι επαναμορφοποιήσιμα.

ιιι) Τα ελαστομερή: είναι πολυμερή με ελάχιστους σταυροδεσμούς. Μάλιστα με βουλκανισμό (θείωση) αυξάνονται οι δεσμοί αυτοί ώστε να προκύψουν πολυμερή με μεγάλη σκληρότητα και ευκαμψία.

### **Φυσικά Πολυμερή**

Η μεγάλη ποικιλία των πολυμερών περιλαμβάνει και τα φυσικά πολυμερή όπως η κυτταρίνη, το άμυλο, το φυσικό κόμμι και το DNA, το γενετικό υλικό όλων των ζώντων οργανισμών. Ενώ αυτά τα πολυμερή είναι αναμφισβήτητα ενδιαφέροντα και έχουν ευρεία χρήση σε πολυάριθμες εφαρμογές, ορισμένες φορές εκλείπουν από την ατέλειωτη ποικιλία των συνθετικών πολυμερών που είναι διαθέσιμα σήμερα [18].

Τα φυσικά πολυμερή προσφέρουν το πλεονέκτημα του να είναι συχνά όμοια με τις μακρομοριακές ουσίες τις οποίες το βιολογικό περιβάλλον είναι προετοιμασμένο να αναγνωρίσει και να σχετιστεί μαζί τους μεταβολικά. Τα προβλήματα τοξικότητας και διέγερσης μιας χρόνιας μολυσματικής αντίδρασης, η οποία συχνά προκαλείται από πολλά συνθετικά πολυμερή, μπορούν ως εκ τούτου να κατασταλούν. Περαιτέρω, η ομοιότητα με τις φυσικές ουσίες προσφέρει την ικανότητα σχεδιασμού βιοϋλικών που λειτουργούν βιολογικά στο μοριακό παρά στο μακροσκοπικό επίπεδο. Έτσι, αφού η δομή τους είναι πολύ πιο σύνθετη από αυτή των περισσότερων συνθετικών πολυμερών, είναι περισσότερο τεχνολογικά επεξεργάσιμα. Επομένως, τα φυσικά πολυμερή ή οι χημικά επεξεργασμένες εκδόσεις τους προσφέρουν απεριόριστες λύσεις και έχουν πολλές εφαρμογές.

Ένα χαρακτηριστικό των φυσικών πολυμερών είναι η δυνατότητα να αποικοδομούνται από την παρουσία φυσικών ενζύμων. Αυτό είναι μια ορατή

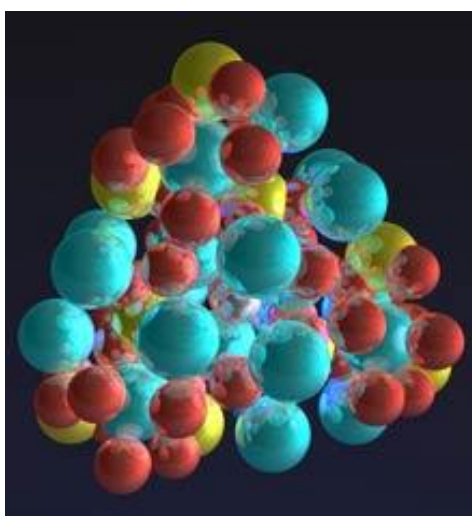
εγγύηση ότι το μόσχευμα θα μεταβολιστεί τελικά με φυσιολογικούς μηχανισμούς. Αυτή η ιδιότητα μπορεί, με την πρώτη ματιά, να φαίνεται ως μειονέκτημα αφού μειώνεται έτσι η αντοχή του μοσχεύματος. Μπορεί να χρησιμοποιηθεί όμως ως πλεονέκτημα στις εφαρμογές στις οποίες είναι επιθυμητή μια συγκεκριμένη λειτουργία για ένα μικρό διάστημα, όπου μετά αναμένεται να απορριφθεί το μόσχευμα από φυσιολογικές μεταβολικές διεργασίες. Αφού λοιπόν είναι εφικτό να ελέγχεται ο ρυθμός αποικοδόμησης του εμφυτευμένου πολυμερούς με χημικές διεργασίες, ο σχεδιαστής έχει τη δυνατότητα να ελέγχει τη διάρκεια ζωής του μοσχεύματος.

Ένα μειονέκτημα της χρήσης των φυσικών πολυμερών ως βιοϋλικά προκύπτει από το γεγονός ότι αυτά τα πολυμερή τυπικά υφίστανται πυρολυτικές τροποποιήσεις σε θερμοκρασίες κάτω από αυτή του σημείου τήξης, επομένως αποκλείουν τις μεθόδους επεξεργασίας που απαιτούν υψηλές θερμοκρασίες, κατά την κατασκευή του εμφυτεύματος, όπως η χύτευση. Παρόλα αυτά έχουν δημιουργηθεί μέθοδοι για την κατασκευή τέτοιων, ευαίσθητων στη θερμοκρασία πολυμερών, σε θερμοκρασία περιβάλλοντος. Ένα άλλο σημαντικό μειονέκτημα είναι η φυσική ποικιλία στη δομή των μακρομοριακών ουσιών που προέρχονται από ζωικές πηγές. Κάθε ένα από αυτά τα πολυμερή εμφανίζεται ως μια χημικώς διακριτή οντότητα, όχι μόνο από είδος σε είδος αλλά και από τον ένα ιστό στον άλλο.

Τα περισσότερα από τα φυσικά πολυμερή είναι συστατικά μιας εξωκυττάριας μήτρας συνεκτικών ιστών όπως τένοντες, δέρμα, αγγεία αίματος και οστά. Αυτοί οι ιστοί είναι παραμορφώσιμα, ενισχυμένα με ίνες, σύνθετα υλικά εκπληκτικής αρχιτεκτονικής, που η κύρια λειτουργία τους είναι η συντήρηση του οργάνου, καθώς και του ίδιου του οργανισμού. Οι ιστοί θα μπορούσαν να παραλληλισθούν με τεχνητά σύνθετα υλικά, όπου οι ίνες κολλαγόνου και ελαστίνης ενισχύουν μηχανικά μια μήτρα, που αποτελείται κυρίως από πρωτεΐνες και πολυσακχαρίδια σε νερό. Εκτενείς χημικοί δεσμοί συνδέουν αυτά τα μακρομόρια μεταξύ τους, καθιστώντας τους ιστούς αδιάλυτους και επομένως αδύνατο να χαρακτηριστούν με διαλυτικές μεθόδους, εκτός αν ο ιστός έχει καθαιρεθεί χημικά και φυσικά. Στην τελευταία περίπτωση, τα διαλυόμενα συστατικά αποσπώνται τελικά και χαρακτηρίζονται από βιοχημικές και φυσικοχημικές μεθόδους. Τα πιο γνωστά φυσικά πολυμερή που χρησιμοποιούνται ως βιοϋλικά είναι το κολλαγόνο και η χιτίνη.

## Υδροξυαπατίτης

Ο υδροξυαπατίτης (HAp),  $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$ , ο οποίος όπως αναφέρεται και παραπάνω, εμφανίζει χημική ομοιότητα με τα συστατικά των σκληρών ιστών του ανθρώπου. Ως εκ τούτου, έχει πραγματοποιηθεί εκτενής έρευνα και ανάπτυξη εμφυτευμάτων που περιέχουν κυρίως το υλικό αυτό. Τα εμφυτεύματα αυτά εμφανίζουν την επιθυμητή βιοδραστικότητα, αυξημένη οστεοεπαγωγικότητα, αποικοδομούνται εύκολα και δεν εμφανίζουν καθόλου τοξικότητα ή ανοσολογική αντίδραση του οργανισμού όταν έρθουν σε επαφή με τους φυσικούς ιστούς.

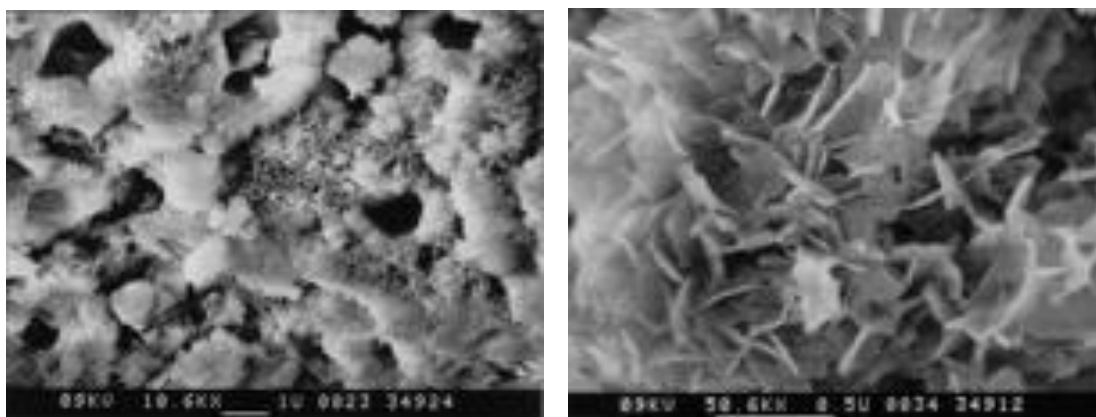


**Εικόνα 4.** Απεικόνιση του κρυστάλλου υδροξυαπατίτη .

Στα βιολογικά συστήματα δεν υπάρχει καθαρός υδροξυαπατίτης, καθώς είναι ιδιαίτερα δύσκολο να αποφευχθεί η ισόμορφη υποκατάσταση των ιόντων στο πλέγμα του, η οποία και πραγματοποιείται ώστε να σταθεροποιηθεί στην εξαγωνική κρυσταλλική δομή

Οι υποκαταστάσεις μπορεί να περιλαμβάνουν την υποκατάσταση του  $\text{Ca}^{2+}$  από  $\text{Sr}^{2+}$  του  $\text{Na}^+$  από  $\text{Mg}^+$ , του  $\text{OH}^-$  από  $\text{F}^-$  και  $\text{Cl}^-$  και του  $\text{PO}_4^{3-}$  από  $\text{CO}_3^{2-}$  και  $\text{SO}_4^{2-}$ , καθώς επίσης υπάρχει και το ενδεχόμενο σχηματισμού πλεγματικών κενών στη θέση των  $\text{Ca}^{2+}$  και του  $\text{OH}^-$ . Στο φυσικό υδροξυαπατίτη υπάρχει έλλειμμα ασβεστίου, αφού η αναλογία  $\text{Ca} / \text{P}$  είναι 1,5, έναντι της στοιχειομετρικής αναλογίας του 1,67 που επιτυγχάνεται στο συνθετικό υδροξυαπατίτη. Ο βιολογικός υδροξυαπατίτης περιέχει 4% κατά βάρος ανθρακικά άλατα. Είναι σταθερός σε pH 9 – 12 και εμφανίζει μία

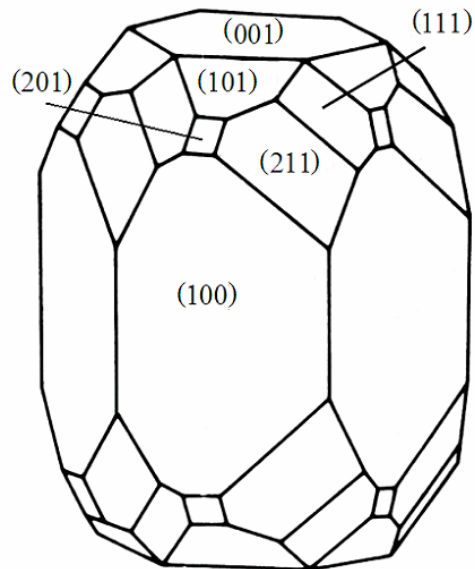
μέγιστη κορυφή στο φάσμα ανάλυσης με περίθλαση ακτίνων X στην τιμή  $d = 2,81$  [18]



**Εικόνα 5.** Διαφορετικές μορφολογίες υδροξυαπατίτη.

Η σύνθεση στοιχειομετρικού υδροξυαπατίτη με καθίζηση απαιτεί προσεκτική ρύθμιση του pH, της θερμοκρασίας και της αναλογίας προσθήκης των αντιδραστηρίων, καθώς επίσης και την περιεχόμενη στην ατμόσφαιρα ποσότητα σε  $\text{CO}_2$ . Ο πιο συνηθισμένος τρόπος παρασκευής υδροξυαπατίτη είναι με διάλυση του  $\text{CaHPO}_4$  με περίσσεια νερού και θέρμανση σε υψηλές θερμοκρασίες για αρκετές ημέρες.

Ο βιολογικός και ο συνθετικός HAρ βρίσκονται κατά κύριο λόγο σε εξαγωνική κρυσταλλική συμμετρία και ανήκουν στην  $P6_3/m$  ομάδα, με μοναδιαία κυψελίδα ρομβικού σχήματος και τιμές παραμέτρων  $a = b = 9,432\text{\AA}$  και  $c = 6,881\text{\AA}$ . Ο συνθετικός, στοιχειομετρικός υδροξυαπατίτης, που συντίθεται σε υψηλές θερμοκρασίες ( $1000 - 1200^\circ\text{C}$ ) βρίσκεται στη μονοκλινή δομή με space group  $P21/b$ . Η εικόνα που παρατίθεται παρακάτω (Εικόνα 6) παρουσιάζει την εξαγωνική μορφολογία του HAρ, παρουσιάζοντας τις κύριες έδρες της δομής, αλλά ωστόσο ο HAρ μπορεί να διαφέρει από αυτή τη μορφολογία σε επιμήκη ραβδοειδή τμήματα με παρεμπόδιση της ανάπτυξης κατά την διεύθυνση της έδρας  $[100]$  ή σε κρυστάλλους με μορφή δίσκου (όπως στα οστά) με παρεμπόδιση της ανάπτυξης κατά τη διεύθυνση της έδρας  $[001]$  [19].

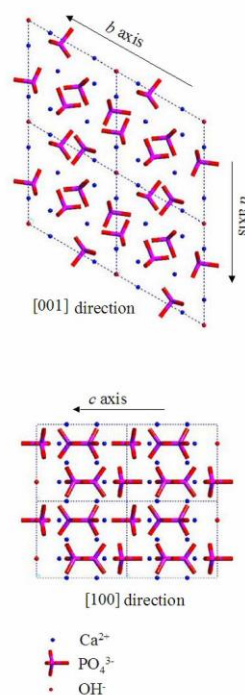


**Εικόνα 6.** Εξαγωνική μορφή του κρυστάλλου υδροξυαπατίτη [20].

Η παρεμπόδιση αυτή της ανάπτυξης είναι αποτέλεσμα της προσκόλλησης οργανικών σωματιδίων (όπως πρωτεΐνες ή αμινοξέα) σε συγκεκριμένες κρυσταλλικές φάσεις, δυσχεραίνοντας την ανάπτυξη κατά τη συγκεκριμένη κατεύθυνση. Η δομή του εξαγωνικού υδροξυαπατίτη αποτελείται από μία διάταξη των 10 ιόντων  $\text{Ca}^{2+}$  σε δύο διαφορετικές κρυσταλλογραφικές περιοχές,  $\text{Ca}_1$  (τέσσερα άτομα Ca) και  $\text{Ca}_2$  (έξι άτομα Ca). Τα άτομα  $\text{Ca}_1$  βρίσκονται σε γωνίες και προσκολλώνται σε έξι άτομα οξυγόνου από φωσφορικές ομάδες, ενώ τα  $\text{Ca}_2$  προσκολλώνται σε έξι άτομα οξυγόνου από φωσφορικές ομάδες συν ένα ιόν υδροξυλίου (Εικόνα 7). Τα ιόντα αυτά υδροξυλίου σχηματίζουν κανάλια καθώς ενώνονται με τα κύτταρα παρέχοντας έτσι το κατάλληλο «μονοπάτι» για διάχυση, ώστε να πραγματοποιηθεί ισόμορφη υποκατάσταση.

Μεγάλος αριθμός μεθόδων καταβύθισης και στερεάς κατάστασης έχουν χρησιμοποιηθεί για την παρασκευή υδροξυαπατίτη, αλλά ωστόσο αυτές οι μέθοδοι παρέχουν συνήθως υλικά με μεγάλο μέγεθος σωματίδια ( $\mu\text{m}$  κλίμακα), που δεν ταυτίζονται με τα μεγέθη σωματιδίων ( $\text{nm}$  κλίμακα) που παράγονται στη φύση. Παρατηρήθηκε πρόσφατα ανάπτυξη νέων προοπτικών ή / και τροποποίηση των ήδη υπαρχόντων τεχνικών για την παραγωγή νανοσωματιδίων υδροξυαπατίτη, με ή χωρίς τη βοήθεια οργανικού υποστρώματος ή παραγόντων που καθορίζουν τη δομή.





**Εικόνα 7.** Προβολή της δομής του κρυστάλλου HAp κατά μήκος των κατευθύνσεων [100] και [001] για 4 κελιά (C. Armstrong, 2005).

Λαμβάνοντας υπ' όψιν ότι η παρουσία των πρωτεϊνών στα βιολογικά υλικά είναι συνδεδεμένη με την βιοδραστικότητα του υδροξυαπατίτη, χρησιμοποιήθηκαν σε ορισμένες από τις παραπάνω μελέτες για να αυξήσουν τη βιοδραστικότητα του συνθετικού υδροξυαπατίτη, με την ανάπτυξη πολλών μιγμάτων υδροξυαπατίτη/πρωτεϊνών. Επιπλέον έχουν διεξαχθεί έρευνες σχετικά με την αλληλεπίδραση του υδροξυαπατίτη με διάφορα αμινοξέα αν και αυτές έχουν εστιάσει εξ' ολοκλήρου στην απορρόφηση, στην παρεμπόδιση της κρυσταλλικής ανάπτυξης και τις επιδράσεις των αμινοξέων στον υδροξυαπατίτη, παρά στην παραγωγή σύνθετων υλικών υδροξυαπατίτη/αμινοξύ [20].

### Μηχανισμός Κρυσταλλοποίησης

Η κρυσταλλοποίηση του υδροξυαπατίτη φυσιολογικά πραγματοποιείται μέσω της καθίζησης ενός αριθμού ενδιάμεσων φάσεων, που διαλύονται και επανακαθαρίζουν μέχρι τον σχηματισμό της πιο θερμοδυναμικά σταθερής φάσης του υδροξυαπατίτη (HAp). Γενικότερα, σε υψηλές τιμές pH παρατηρείται μία αρχική

καθίζηση από άμορφο φωσφορικό ασβέστιο (ACP) και στη συνέχεια φωσφορικό οκτασβέστιο (OCP) με τον επακόλουθο μετασχηματισμό τους σε υδροξυαπατίτη. Σε χαμηλότερες τιμές pH είναι πιθανό να εμφανιστούν άλλες φάσεις όπως το ένυδρο φωσφορικό διασβέστιο (DCPD). Η καθίζηση αυτών των ενδιάμεσων φάσεων ακολουθεί τον νόμο του Ostwald για την καθίζηση ελαφρώς διαλυτών ιοντικών αλάτων, ο οποίος προβλέπει ότι η φάση που τείνει να σχηματιστεί είναι η λιγότερο σταθερή φάση, η οποία έχει τη μεγαλύτερη διαλυτότητα. Ωστόσο, ορισμένοι κινητικοί παράγοντες παίζουν σημαντικότερο ρόλο στον καθορισμό της φάσης του φωσφορικού ασβεστίου που θα σχηματιστεί. Άλλοι παράγοντες, όπως η ύπαρξη και η επίδραση προσθέτων ή ιόντων, ή η ύπαρξη άλλων κρυστάλλων μέσα στους οποίους μπορεί να πραγματοποιηθεί επιταξιακή ανάπτυξη, έχουν σημαντική επίδραση στο σχηματισμό των φάσεων του φωσφορικού ασβεστίου .

Η διαδικασία της κρυσταλλοποίησης ξεκινάει όταν η συγκέντρωση των ιόντων στο διάλυμα ξεπερνά τη σταθερά διαλυτότητας του προϊόντος για το συγκεκριμένο κρύσταλλο. Η διαλυτότητα του προϊόντος καθορίζει τις θερμοδυναμικές συνθήκες που απαιτούνται για την ανόργανη καθίζηση και συνδέεται με την δραστηκότητα (δραστική συγκέντρωση) των ιόντων συστατικών στο διάλυμα σε ισορροπία με τη στερεή φάση. Για ένα συγκεκριμένο καθαρό στερεό ( $A_nB_m$ ), η διαλυτότητα του προϊόντος,  $K_{sp}$ , σε ισορροπία, μπορεί να εκφραστεί από τον τύπο :

$$K_{sp} = [A^-]^n[B^+]^m$$

Όπου  $[B^+]$  και  $[A^-]$  είναι οι δραστικές συγκεντρώσεις των ιόντων στο διάλυμα και  $[A^-]^n[B^+]^m$  είναι η δραστηκότητα (AP) του διαλύματος. Όταν το  $K_{sp}$  είναι μικρότερο από το AP, τότε το διάλυμα θεωρείται υπέρκορο και η καθίζηση πραγματοποιείται. Ο υπερκορεσμός  $S$ , είναι η θερμοδυναμικά κινητήρια δύναμη για την κρυσταλλοποίηση και δίνεται από τον τύπο :

$$S = AP/K_{sp}$$

Αυτή η κινητήρια δύναμη μπορεί να εκφραστεί και σαν ελεύθερη ενέργεια μεταφοράς κατά Gibbs,  $\Delta G_g$ , από ένα υπέρκορο σε ένα κορεσμένο διάλυμα :

$$-\Delta G_g = (RT/v)\ln S$$

Όπου το R είναι η σταθερά των αερίων, T η θερμοκρασία του διαλύματος και ν ο αριθμός των ιόντων στον κρύσταλλο.

Οι θερμοδυναμικοί υπολογισμοί της κρυσταλλοποίησης πρέπει να συμπεριλάβουν και τους κινητικούς παράγοντες που αφορούν το σχηματισμό πυρήνων. Ο σχηματισμός πυρήνων είναι μία διαδικασία απαραίτητη για την κρυσταλλοποίηση καθώς ο σχηματισμός αυτός των πυρήνων αποτελεί τη βάση για την ανάπτυξη των κρυστάλλων. Η διαδικασία σχηματισμού πυρήνων μπορεί να πραγματοποιηθεί είτε αυθόρμητα (ομογενής) ή να χρειάζεται ενεργοποίηση με την παρουσία ξένων ουσιών ή άλλων κρυστάλλων (ετερογενής). Η διαδικασία αυτή διέπεται από μια λεπτή ισορροπία ανάμεσα στην ελεύθερη ενέργεια, που απαιτείται για το σχηματισμό μιας διεπιφάνειας στερεού – υγρού και στην ενέργεια των ιόντων του διαλύματος (κύριος όγκος). Η ελεύθερη ενέργεια για τη δημιουργία ενός συμπλέγματος (πυρήνας),  $\Delta G_N$ , ορίζεται ως η διαφορά ανάμεσα στην ενέργεια επιφάνειας,  $\Delta G_I$ , και την ενέργεια κύριου όγκου (bulk),  $\Delta G_B$  :

$$\Delta G_N = \Delta G_I - \Delta G_B$$

Η επιφανειακή ενέργεια είναι ένας όρος πάντα θετικός και εξαρτάται από την επιφάνεια του συμπλέγματος, και η ενέργεια του κύριου όγκου είναι ένας όρος πάντα αρνητικός και εξαρτάται από τον όγκο του διαλύματος και έτσι προκύπτει ότι :

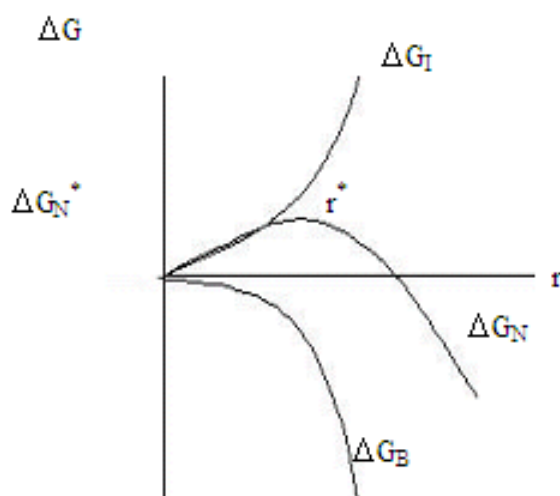
$$\Delta G_I = 4\pi r^2 \sigma$$

και

$$\Delta G_B = 4\pi r^3 \Delta G_v / 3V_m$$

Όπου το  $\sigma$  είναι η ενέργεια της διεπιφάνειας ανά μονάδα επιφάνειας,  $\Delta G_v$ , είναι η ενέργεια ανά mole και σχετίζεται με την εναλλαγή στερεής – υγρής φάσης και  $V_m$  είναι ο μοριακός όγκος. Οι παραπάνω εξισώσεις αναφέρονται στην κλασσική περίπτωση ενός σφαιρικού συμπλέγματος. Το Σχήμα 7, που παρατίθεται αμέσως μετά δείχνει ένα διάγραμμα των  $\Delta G_I$  και  $\Delta G_B$  σαν συνάρτηση του r (το μέγεθος του συμπλέγματος), καθώς και ένα συνδυασμό και των δύο σε ένα διάγραμμα του  $\Delta G_N$ . Το  $\Delta G_N$  περνάει από μία μέγιστη τιμή ενέργειας ( $\Delta G_N^*$ ) που αντιστοιχεί σε ένα κρίσιμο μέγεθος του συμπλέγματος ( $r^*$ ), η οποία είναι ίση με την ενέργεια ενεργοποίησης για τον ομογενή σχηματισμό πυρήνων. Όταν ένα σύμπλεγμα φτάσει

το κρίσιμο μέγεθος υπάρχουν οι ίδιες πιθανότητες το σύμπλεγμα αυτό είτε να αναπτυχθεί ή να διασπασθεί και εάν το κρίσιμο μέγεθος ξεπερασθεί, ο κρύσταλλος θα αναπτυχθεί και θα προέλθει άμεσα υπερκορεσμός.



**Εικόνα 8.** Ελεύθερη ενέργεια σχηματισμού πυρήνων συναρτήσει του μεγέθους του σωματιδίου ( $r$ ) [20].

Αντίθετα, ο ετερογενής σχηματισμός πυρήνων είναι θερμοδυναμικά πιο εφικτός, καθώς παρέχεται επιφάνεια πάνω στην οποία μπορεί να πραγματοποιηθεί η κρυσταλλική ανάπτυξη και έτσι απαιτείται μικρότερος υπερκορεσμός και κατ' επέκταση μειώνεται και η απαίτηση για υπέρβαση της ενέργειας ενεργοποίησης του σχηματισμού πυρήνων. Η ενέργεια που απαιτείται για την κρυσταλλοποίηση μειώνεται περαιτέρω εάν υπάρχει καλή χημική και δομική αλληλεπίδραση μεταξύ των νέων και των ήδη υπάρχοντων φάσεων. Η ύπαρξη προσθέτων, που δρουν σαν σημεία εκκίνησης του σχηματισμού πυρήνων, μειώνει επίσης την ενέργεια που απαιτείται για την κρυσταλλοποίηση, διευκολύνοντας έτσι την ανάπτυξη κρυστάλλων προς συγκεκριμένες κατευθύνσεις.

Η ανάπτυξη των κρυστάλλων εξαρτάται από τη διαθεσιμότητα των ιόντων στο διάλυμα. Καθώς ο υπερκορεσμός είναι εντονότερος από τη δραστηριότητα του προϊόντος, η ανάπτυξη των κρυστάλλων θα συνεχιστεί και θα σταματήσει όταν επιτευχθεί ισορροπία. Ωστόσο, σε ένα διάλυμα με συγκεκριμένη συγκέντρωση ιόντων, όσο μεγαλύτερος είναι ο αριθμός διαθέσιμων σημείων για το σχηματισμό πυρήνων, τόσο μικρότεροι θα είναι οι παραγόμενοι κρύσταλλοι. Η κρυσταλλική ανάπτυξη εξαρτάται επίσης από τη δομή των αναπτυσσόμενων κρυστάλλων και από τη φάση που καθιζάνει. Εάν η δομή περιέχει μεγάλο αριθμό επιφανειακών ατελειών,

στις οποίες η κρυσταλλοποίηση δεν είναι πλέον θερμοδυναμικά εφικτή, η ανάπτυξη θα σταματήσει. Ομοίως, εάν μία δεύτερη πιο διαλυτή φάση επικαθήσει πάνω από την πρωταρχική φάση, λόγω διακυμάνσεων στις συνθήκες του διαλύματος, η κρυσταλλική ανάπτυξη θα σταματήσει ακόμα και αν το διάλυμα είναι ακόμα υπέκορο σε σχέση με την αρχική φάση. Παρεμπόδιση της κρυσταλλικής ανάπτυξης από πρόσθετα επιτυγχάνεται με προσρόφηση τους στην επιφάνεια του αναπτυσσόμενου κρυστάλλου, μπλοκάροντας έτσι την ανάπτυξη του. Εάν τα πρόσθετα προσροφόνται επιλεκτικά σε συγκεκριμένες κρυσταλλικές επιφάνειες, τότε η ανάπτυξη θα παρεμποδιστεί κατά τη συγκεκριμένη μόνο κατεύθυνση, τροποποιώντας με αυτό τον τρόπο τη μορφολογία του κρυστάλλου [20].

## **Αμινοξέα**




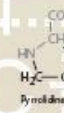
Τα αμινοξέα εκτελούν πολλαπλές χρήσεις μέσα στους οργανισμούς. Κατά βάση είναι τα συστατικά των πεπτιδίων και των πρωτεϊνών και των λιπιδίων ενώ αρκετά από αυτά λειτουργούν ως νευροδιαβιβαστές. Τα αμινοξέα είναι βασικό μέρος των τροφών που καταναλώνονται από τον άνθρωπο. Από τα αμινοξέα που υπάρχουν συνολικά στην φύση μόνο τα 20 από αυτά, που περιέχονται στον γενετικό κώδικα, καλούνται πρωτεϊνογεννητικά.

Κατηγοριοποιούνται με βάση την χημική δομή και τις ιδιότητες των πλευρικών τους ομάδων και ειδικά την πολικότητά τους ή την τάση τους να αντιδρούν με νερό σε βιολογικό pH κοντά στο 7. Η πολικότητα ποικίλει από μη πολικά και υδρόφοβα σε ισχυρά πολικά και υδροφιλικά που είναι υδατοδιαλυτά .

Τελικά τα αμινοξέα χωρίζονται σε αλιφατικά (γλυκίνη, αλανίνη, βαλίνη, λευκίνη, ισολευκίνη), τα θειούχα αμινοξέα κυστεΐνη και μεθειονίνη, αρωματικά (φαινυλαλανίνη, τυροσίνη, τριπτοφάνη και υστιδίνη), τα ουδέτερα αμινοξέα (σερίνη, θρεονίνη, ασπαργίνη, γλουταμίνη), τα όξινα (ασπαρτικό οξύ και γλουταμινικό οξύ) και τέλος τα βασικά αμινοξέα λυσίνη και αργινίνη [21].

Πίνακας 2. Πίνακας απεικόνισης των 20 βασικών αμινοξέων

A. The proteinogenic amino acids

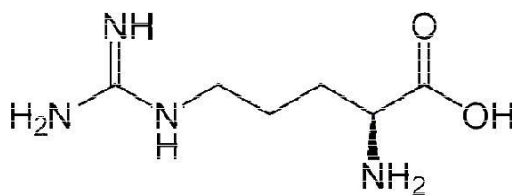
Aliphatic					Sulfur-containing	
Glycine (Gly, G)	Alanine (Ala, A)	Valine (Val, V) *	Leucine (Leu, L) *	Isoleucine (Ile, I) *	Cysteine (Cys, C)	Methionine (Met, M) *
H	CH <sub>3</sub>	H <sub>3</sub> C-CH   CH <sub>3</sub>	CH <sub>2</sub>   H <sub>2</sub> C-CH   CH <sub>3</sub>	H <sub>3</sub> C-CH   CH <sub>2</sub>   CH <sub>3</sub>	CH <sub>2</sub>   SH 8.3 pK <sub>a</sub> value	CH <sub>2</sub>   CH <sub>2</sub>   S   CH <sub>3</sub>
-2.4	-1.9	-2.0	-2.3	-2.2	-1.2	-1.5
Aromatic			Cyclic	Neutral		
Phenylalanine (Phe, F) *	Tyrosine (Tyr, Y)	Tryptophan (Trp, W) *	Proline (Pro, P)	Serine (Ser, S)	Threonine (Thr, T) *	
CH <sub>2</sub>   	CH <sub>2</sub>    OH 10.1	CH <sub>2</sub>    Indole ring	 COO <sup>-</sup>   HN-CH   CH <sub>2</sub>   H <sub>2</sub> C-CH <sub>2</sub>   H	CH <sub>2</sub>   OH	H <sub>3</sub> C-CH   OH	
+0.8	+6.1	+5.9	+6.0	+5.1	+4.9	
Neutral			Acidic	Basic		
Asparagine (Asn, N)	Glutamine (Gln, Q)	Aspartic acid (Asp, D)	Glutamic acid (Glu, E)	Histidine (His, H)	Lysine (Lys, K) *	Arginine (Arg, R)
CH <sub>2</sub>   CONH <sub>2</sub>	CH <sub>2</sub>   CH <sub>2</sub>   CONH <sub>2</sub>	CH <sub>2</sub>   COO <sup>-</sup> 4.0	CH <sub>2</sub>   CH <sub>2</sub>   COO <sup>-</sup> 4.3	CH <sub>2</sub>   HN=C   CH   Imidazole ring 6.0	CH <sub>2</sub>   CH <sub>2</sub>   CH <sub>2</sub>   CH <sub>2</sub>   NH <sub>3</sub> <sup>+</sup> 10.5	CH <sub>2</sub>   CH <sub>2</sub>   CH <sub>2</sub>   NH   C   NH <sub>2</sub> 12.5
+9.7	+9.4	+11.0	+10.2	+10.3	+15.0	+20.0

\* Essential amino acids      □ Chiral center

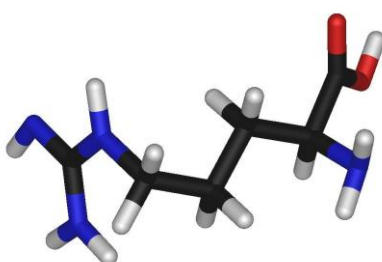
Η γνώση των χημικών ιδιοτήτων των αμινοξέων είναι βασική για την κατανόηση της βιοχημείας και λειτουργίας αυτών. Για απλούστευση, τα αμινοξέα μελετώνται ως προς τις ιδιότητες τους ομαδικά σύμφωνα με την κατάταξη τους. Ορισμένα αμινοξέα έχουν την δυνατότητα να λειτουργήσουν και σαν οξύ και σαν βάση. Μετά την διάλυση τους σε νερό υπάρχουν στο διάλυμα είτε ως διπολικά ιόντα είτε ως «ωβριδικά ιόντα». Ένα «ωβριδικό ιόν» μπορεί να λειτουργήσει είτε σαν οξύ, ως δότης πρωτονίων, είτε σαν βάση ως δέκτης πρωτονίων. Ουσίες με αυτήν την διττή φύση λέγονται αμφολύτες. Στα αμινοξέα οι πιο υδρόφιλες ομάδες R είναι αυτές που είναι πιο θετικά ή αρνητικά φορτισμένες.

Η αργινίνη ανήκει στην κατηγορία των αμινοξέων. Έχει σημαντικό θετικό φορτίο σε φυσιολογικό pH ~7 λόγω της γουανιδικής της ομάδας με PKa= 12,48.

## Δομή και ιδιότητες της L-Αργινίνης (Arg)



Εικόνα 9. Απεικόνιση Δομής της αργινίνης-L

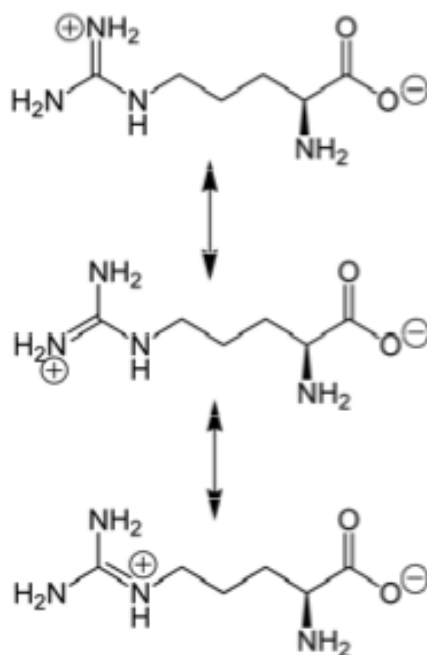


Εικόνα 10. Τρισδιάστατη απεικόνιση αργινίνης-L

Η Αργινίνη (Arg ή (S)-2 -Amino-5-guanidinopentanoic acid κατά IU PAC) είναι ένα αμινοξύ με μοριακό τύπο  $C_6H_{14}N_4O_2$  και μοριακή μάζα  $174.2 \text{ g mol}^{-1}$ . Η L απεικόνιση της αποτελεί ένα από τα πιο κοινά φυσικά αμινοξέα. Η αργινίνη αποτελείται από μια αλειφατική ευθεία αλυσίδα 4 ανθράκων, το τέλος της οποίας καλύπτεται από μια σύνθετη γουανιδινομάδα. Εξαιτίας της κλίσης μεταξύ του διπλού δεσμού και των απομονωμένων ζευγών αζώτου, το θετικό φορτίο είναι απεντοπισμένο, επιτρέποντας το σχηματισμό πολλαπλών δεσμών υδρογόνου. Η γεωμετρία, η διασπορά του φορτίου και η ικανότητα να δημιουργεί δεσμούς υδρογόνου καθιστά την αργινίνη ιδανική περίπτωση για τη σύνδεση αρνητικά φορτισμένων ομάδων.

Με  $PK_a = 12,48$  η γουανιδική ομάδα είναι θετικά φορτισμένη σε ουδέτερα, όξινα και ακόμα και στα περισσότερα βασικά περιβάλλοντα και για τον λόγο αυτό προσδίδει στην βασικότητα του αμινοξέος. Η αργινίνη ως βασικό αμινοξύ, έχει πολικές πλευρικές ομάδες γουανιδίνης πλήρως ιονισμένες, δηλαδή θετικά φορτισμένες σε ουδέτερο pH. Έτσι το μόριο της αργινίνης είναι ισχυρά πολικό και για τον λόγο αυτό και ισχυρά βασικό. Λόγω της σύζευξης μεταξύ του διπλού δεσμού

και των «μμοναχικών» ζευγών αζώτου, το θετικό φορτίο μετατίθεται μεταφέρεται, επιτρέποντας τον σχηματισμό πολλαπλών δεσμών υδρογόνου.



**Εικόνα 11.** Απεικόνιση της αργινίνης και της δυνατότητας της να "μεταφέρει" το θετικό φορτίο κατά μήκος της αλυσίδας της.

**Πίνακας 3.** Ιδιότητες και παραδοχές των βασικών αμινοξέων των πρωτεϊνών

Amino acid	Abbreviation/ symbol	$M_r$	$pK_a$ values			$pI$	Hydropathy index*	Occurrence in proteins (%) <sup>†</sup>
			$pK_1$ (-COOH)	$pK_2$ (-NH <sub>3</sub> <sup>+</sup> )	$pK_R$ (R group)			
<b>Positively charged</b>								
<b>R groups</b>								
Lysine	Lys K	146	2.18	8.95	10.53	9.74	-3.9	5.9
Histidine	His H	155	1.82	9.17	6.00	7.59	-3.2	2.3
Arginine	Arg R	174	2.17	9.04	12.48	10.76	-4.5	5.1

Ο παραπάνω πίνακας δείχνει μερικές ιδιότητες και παραδοχές των βασικών αμινοξέων των πρωτεϊνών



## **Βιολογική χρήση - Εφαρμογές της Αργινίνης στην επιστήμη**

Η αργινίνη συντελεί πολλούς ρόλους στην κυτταρική φυσιολογία. Συμμετέχει στην σύνθεση των πρωτεϊνών, στην ενεργοποίηση της κυτταρικής ανάπτυξης, μέσα από την παραγωγή μονοξειδίου του αζώτου και μέσα από τον μεταβολισμό της σε ορνιθίνη και άλλες πολυαμίνες. Λόγω των πολλαπλών του λειτουργιών, παίζει σημαντικό ρόλο στην διαδικασία επούλωσης των τραυμάτων και πολλές έρευνες έχουν αποδείξει ότι η χορήγηση συμπληρωμάτων αργινίνης οδηγούν στην κανονικοποίηση ή και βελτίωση της επούλωσης τραυμάτων.

Εκτός από την χρήση της για την επούλωση τραυματισμών χρησιμοποιείται και σε άλλες ιατρικές εφαρμογές όπως για βελτίωση της ανοσοποιητικής αντίδρασης και στην νοσηλεία ανθρώπων που παρουσιάζουν χρόνια καρδιακή ανεπάρκεια. Ακόμα χρησιμοποιείται σε έρευνες βιοχημείας, στην ιατρική και ως συμπλήρωμα διατροφής. Στην έρευνα ανάπτυξης νανοσωματιδίων υδροξυαπατίτη, η αργινίνη μπορεί να χρησιμοποιηθεί για την διεύρυνση της βιοδραστικότητας των νανοσωματιδίων με επιφανειακή ενεργοποίηση. Επιπλέον οφέλη για αυτήν την χρήση της είναι το σχετικά χαμηλό κόστος της, η ενδογενής της βιοσυμβατότητα και η ικανότητα της να αλληλεπιδρά με τις επιφάνειες του υδροξυαπατίτη. Παλαιότερες μελέτες που έχουν γίνει, έδωσαν έμφαση στη χρήση των αμινοξέων ως αναστολέων ανάπτυξης της κρυστάλλωσης του υδροξυαπατίτη και όχι στην χρήση τους ως βοηθητικών μορίων για την παραγωγή νανοσωματιδίων με επιθυμητή λειτουργικότητα [22].

## **Δομή και ιδιότητες του Κολλαγόνου**

Το κολλαγόνο ανήκει σε μια οικογένεια ινωδών πρωτεϊνών που εμφανίζεται σε όλους τους πολυκύτταρους οργανισμούς. Είναι το βασικό ινώδες συστατικό του δέρματος, των οστών, των τενόντων, των δοντιών και άλλων. Είναι χαρακτηριστικό φυσικό πολυμερές το οποίο απαντάται στο εξωκυττάριο υλικό των συνδετικών ιστών. Περισσότερο από το 90% του ποσοστού εξωκυττάριας πρωτεΐνης που παράγεται στους τένοντες και στα οστά είναι κολλαγόνο. Ο ρόλος του είναι δομικός και προσδίδει αντοχή και ακεραιότητα της δομής του συνδετικού ιστού και των οργάνων του σώματος.

Οι πιο σημαντικοί λόγοι της χρήσης του κολλαγόνου ως βιοϋλικό εστιάζεται στην μειωμένη ανοσοαντίδραση του οργανισμού προς το βιοπολυμερές και στην ικανότητα διαμόρφωσης του σε διάφορες μορφές, όπως φύλλα, ράβδοι, σπογγώδη υλικά, gel, σκόνη αλλά και ενέσιμα αιωρήματα.

Το κολλαγόνο αποτελείται από μια ομάδα γενετικώς διαφορετικών μορίων τα οποία έχουν κοινή δομή αυτήν της τριπλής έλικας. Το κολλαγόνο του δέρματος, των τενόντων, του κερατοειδούς χιτώνα και των οστών είναι κολλαγόνο τύπου I και αποτελείται, συχνότερα από τρεις πολυπεπτιδικές αλυσίδες του ίδιου μήκους δύο  $\alpha 1(I)$  και μια  $\alpha 2(I)$ , και σπανιότερα από τρεις ίδιες αλυσίδες  $\alpha 1(I)_3$ . Η χημική σύσταση των αλυσίδων  $\alpha 1$  και  $\alpha 2$  φαίνεται στον πίνακα που ακολουθεί:

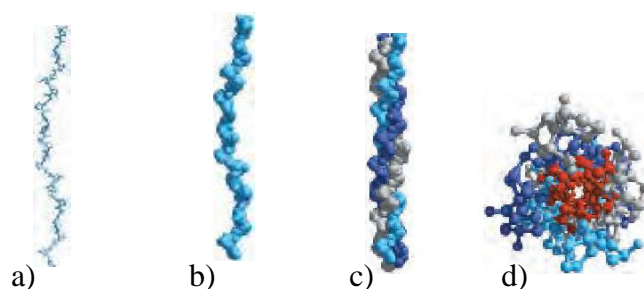
**Πίνακας 4.** Σύσταση σε αμινοξέα των Αλυσίδων του Κολλαγόνου τύπου I

Αμινοξύ	$\alpha 1(I)$	$\alpha 2(I)$
Αλανίνη	124	111
Αργινίνη	53	56
Ασπαραγίνη	13	23
Ασπαρτικό οξύ	33	24
Γλουταμινικό οξύ	52	46
Γλουταμίνη	27	24
Γλυκίνη	345	346
Ιστιδίνη	3	8
Υδροξυλυσίνη	4	9
Υδροξυπρολίνη	114	99
Ισολευκίνη	9	18
Λευκίνη	22	33
Λυσίνη	34	21
Μεθιονίνη	7	4
Φαινυλαλανίνη	13	15
Προλίνη	127	108
Σερίνη	37	35
Θρεονίνη	17	20
Πυροσίνη	5	4
Βαλίνη	17	34
Συνολικά Αμινοξέα ανά αλυσίδα	1056	1038

Η ακολουθία των αμινοξέων στο κολλαγόνο είναι πολύ κανονική και σχεδόν κάθε τρίτο αμινοξύ είναι γλυκίνη. Οι ακολουθίες αμινοξέων των πολυπεπτιδικών αλυσίδων συμβολίζονται με τον γενικό τύπο: Gly(γλυκίνη)-X-Y όπου X και Y συνήθως τα αμινοξέα προλίνη και υδροξυ-προλίνη (Pro και HyPro). Ο πυρολιδικός

δακτύλιος της προλίνης και της υδροξυ-προλίνης, επηρεάζει την δευτεροταγή δομή της πρωτεΐνης.

Η παραγωγή του κολλαγόνου γίνεται από εξειδικευμένα κύτταρα όπως οι οστεοβλάστες, οδοντοβλάστες και άλλα. Αρχικά γίνεται σχηματισμός των πεπτιδικών αλυσίδων και στην συνέχεια η προλίνη και η λυσίνη υδροξυλιώνονται και στις παραγόμενες υδροξυλυσίνες προστίθενται σάκχαρα με την δράση ειδικών ενζύμων. Ακολουθεί ο σχηματισμός της τριπλής αλυσίδας «πρωτοκολλαγόνου» δέσμες του οποίου εκκρίνονται στο εξωκυττάριο χώρο όπου κόβονται τα μη ελικοειδή άκρα τους, από πρωτεάσες ώστε τελικά τα μόρια γίνονται «τροποκολλαγόνου». Τα μόρια του τροποκολλαγόνου συγκροτούνται σε σειρές μετατοπισμένες η μια προς την άλλη και δίνουν τις ίνες του κολλαγόνου. Οι ίνες του κολλαγόνου ισχυροποιούνται με διασύνδεση μεταξύ διαφορετικών μορίων του τροποκολλαγόνου μεταξύ καταλοίπων λυσίνης και υδροξυλυσίνης.



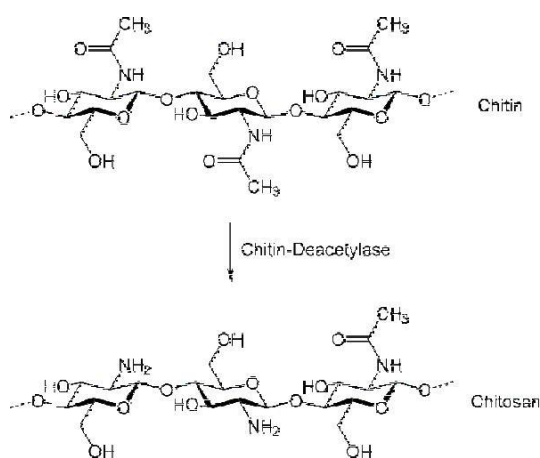
**Εικόνα 12.** Απεικόνιση της δομής του κολλαγόνου a) μία μονή πολυπεπτιδική αλυσίδα με δευτεροταγή επαναλαμβανόμενη αλληλουχία τριών πεπτιδίων Gly-X-Pro, Gly-X-4-Hyp με ελικοειδή περιτύλιξη b) Η ίδια δομή σε τρισδιάστατη εικόνα c) Τρεις διαφορετικές αλυσίδες περιπλεγμένες μεταξύ τους αριστερόστροφα, d) Η τρίκλωβη υπερέλικα κολλαγόνου σε κάτοψη με τα υπολειπόμενα μόρια – gly με κόκκινο χρώμα

Η έλικα των αλυσίδων του κολλαγόνου είναι δεξιόστροφη και έχει τρία υπολειπόμενα αμινοξέα σε κάθε στροφή. Κάθε ίνα κολλαγόνου αποτελείται από τρεις διαφορετικές αλυσίδες πολυπεπτιδίων οι οποίες περιπλέκονται μεταξύ τους σχηματίζοντας ένα νέο περιστραμμένο ελατήριο με διακριτή τριτοταγή και τεταρτοταγή δομή. Η περιτύλιξη των ελίκων είναι αριστερόστροφη αντίστροφης φοράς από τις περιτυλίξεις της έλικας των αλυσίδων.

Τα φυσικά πολυμερή, όπως το κολλαγόνο, προτιμούνται για την παραγωγή βιοϋλικών καθώς παρουσιάζουν μειωμένη δημιουργία τοξικών αντιδράσεων και πρόκληση φλεγμονών στον δέκτη, λόγω χημικής ομοιότητας με τα μακρομόρια του περιβάλλοντος που εμφυτεύεται. Επιπλέον η ικανότητα αποικοδόμησης των υλικών αυτών από βιολογικά ένζυμα, δίνει την εγγύηση ότι το υλικό θα μεταβολιστεί με φυσιολογικό τρόπο. Η ιδιότητα αυτή δεν είναι πάντα επιθυμητή καθώς είναι υπεύθυνη για την μείωση των αντοχών του υλικού, είναι όμως πολύτιμη όταν το υλικό εμφυτεύεται και επιτελέσει το σκοπό του σε μικρό χρονικό διάστημα [23].

### Δομή και ιδιότητες της Χιτοζάνης

Η χιτοζάνη είναι ένα φυσικό, μη τοξικό, βιοαποικοδομήσιμο, πολυκατιονικό πολυμερές (πολυηλεκτρολύτης). Το μόριο της είναι ένας γραμμικός πολυσακχαρίτης, αποτελούμενος από γλυκοσαμίνη (glucosamine) και N-ακετυλογλυκοζαμίνη συνδεδεμένες κατά β(1-4) που προκύπτει μετά από απακυλίωση της χιτίνης. Η χιτοζάνη, όπως και η χιτίνη μπορούν να απομονωθούν από φυσικά απόβλητα όπως τα κελύφη οστρακοειδών. Ανάλογα με την πηγή και την διαδικασία που ακολουθείται για την παραγωγή της χιτοζάνης το μοριακό της βάρος μπορεί να εκτείνεται σε εύρος από 300 μέχρι 1000 kD και ποσοστό απακυλίωσης από 30% μέχρι 95%. Στην κρυσταλλική της μορφή η χιτοζάνη είναι αδιάλυτη σε υδατικά διαλύματα με pH>7, ενώ διαλύεται σε οξέα δηλαδή σε υδατικά διαλύματα με pH<6, όπου οι ελεύθερες αμινικές ομάδες στην γλυκοζαμίνη διευκολύνουν την διάλυση του μορίου.



**Εικόνα 13.** Απακετυλίωση της χιτίνης προς παραγωγή χιτοζάνης

Η κατιοντική φύση της χιτοζάνης είναι κατ' αρχάς υπεύθυνη για την αντίδραση με τα αρνητικά φορτισμένα (ανιονικά) μόρια, όπως λ.χ. οι (GAG-glycosaminoglykans) γλυκοζαμινογλυκάνες. Αυτή η ιδιότητα σε συνδυασμό με την καλή βιοσυμβατότητα, την αντιβακτηριδιακή της ικανότητα και την ικανότητα της να συνδέεται με παράγοντες ανάπτυξης, καθιστούν την χιτοζάνη πολύ χρήσιμο υλικό για μελέτη της χρήσης της σε εφαρμογές ανάπτυξης οστικών ιστών σε κλινικές εφαρμογές. Ο ρυθμός αποδόμησης (degradation) της χιτοζάνης από βιολογικούς παράγοντες συνδέεται άμεσα με τον βαθμό κρυσταλλικότητας και κατ' επέκταση με το ποσοστό απακετυλίωσης της ένωσης. Η έντονα απακετυλιωμένες δομές μπορούν να διατηρηθούν αρκετούς μήνες *in vivo*, παράγοντας κατά την διάσπασή τους CS ολιγοσακχαρίτες ποικίλων διαφορετικών μηκών.

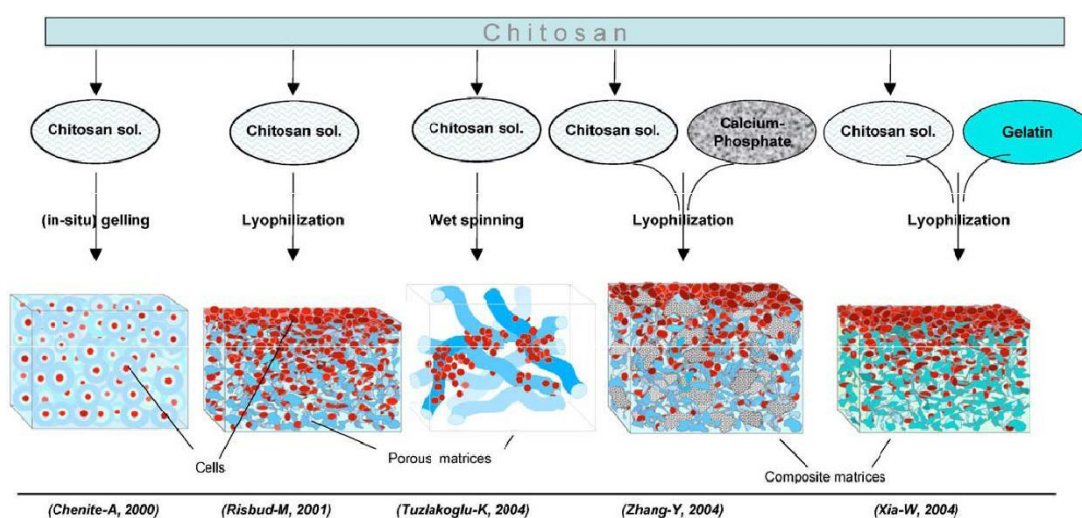
### **Χρήσεις χιτοζάνης**

Οι βασικές εφαρμογές που βρίσκει η χιτοζάνη είναι κυρίως στην χρήση για την θεραπεία ασθενών με εγκαύματα, λόγω της εξαιρετικής βιοσυμβατότητας, της ικανότητας της να μορφοποιείται σε πορώδεις δομές καθώς και της ικανότητας να δημιουργεί ισχυρές, απορροφητικές μεμβράνες. Γενικά πορώδη ικριώματα χιτοζάνης παράγονται με ψύξη και λυοφιλοποίηση διαλυμάτων χιτοζάνης ή με διαδικασίες προσθήκης ανθρακικού ασβεστίου  $\text{CaCO}_3$  προς εσωτερικού αφρισμού (internal bubbling process) με την παραγωγή πηκτής χιτοζάνης-ανθρακικού ασβεστίου. Τέλος η χιτοζάνη είναι διαπερατή στο οξυγόνο ώστε επιτρέπει στον τραυματισμένο ιστό να αναπνέει. Ακόμα, αποδομείται φυσικά από τα ένζυμα του οργανισμού και χρησιμοποιείται σαν αιμοστατική ουσία λόγω της προσκόλλησης της στα ερυθροκύτταρα και πρόωθησης της συγκόλλησης τους.

Πολύ σημαντική είναι και η χρήση της στην μηχανική οστών, η οποία είναι εκτεταμένη καθώς έχει αποδειχτεί πως η χιτοζάνη προωθεί την ανάπτυξη μήτρας πλούσιας σε εναποτιθέμενα άλατα σε καλλιέργεια οστεοβλαστών. Ερευνητικά έχει μελετηθεί και στον τομέα ανάπτυξης υποκατάστατου οστού, όπου γίνεται συνδυασμός πολυμερούς με άλας ώστε το τελικό υλικό να έχει την δυσθραυστότητα (toughness) και ελαστικότητα του πολυμερούς και την σκληρότητα και αντοχή του πληρωτικού άλατος, το οποίο είναι συνήθως υδροξυαπατίτης.

Τα πλεονεκτήματα τέτοιων συνθέτων είναι η αναβάθμιση της οστεογεννητικής δυνατότητας με την ενσωμάτωση βιοενεργού υδροξυαπατίτη στην

πολυμερή μήτρα η οποία λειτουργεί και ως συνδέτης εμποδίζοντας έτσι την «μετανάστευση» του υδροξυαπατίτη. Η χρήση της χιτίνης και των παραγώγων της σε αυτές τις εφαρμογές δίνει σημαντικά πλεονεκτήματα στο παραγόμενο υλικό αρχικά, καθότι είναι βιοσυμβατή και βιοαποικοδομήσιμη ουσία μμεγιστοποιώντας την δυνατότητα του οστού να αναγεννηθεί. Λόγω της δόμησης της σε παράλληλες διατάξεις αλυσίδων συνδεδεμένων με δεσμούς υδρογόνου μπορεί να δώσει προϊόντα με μηχανικές ιδιότητες συγγενικές με το πραγματικό οστό, προσφέροντας σταθερότητα στο εμφύτευμα και μεγάλη φέρουσα ικανότητα φορτίου.

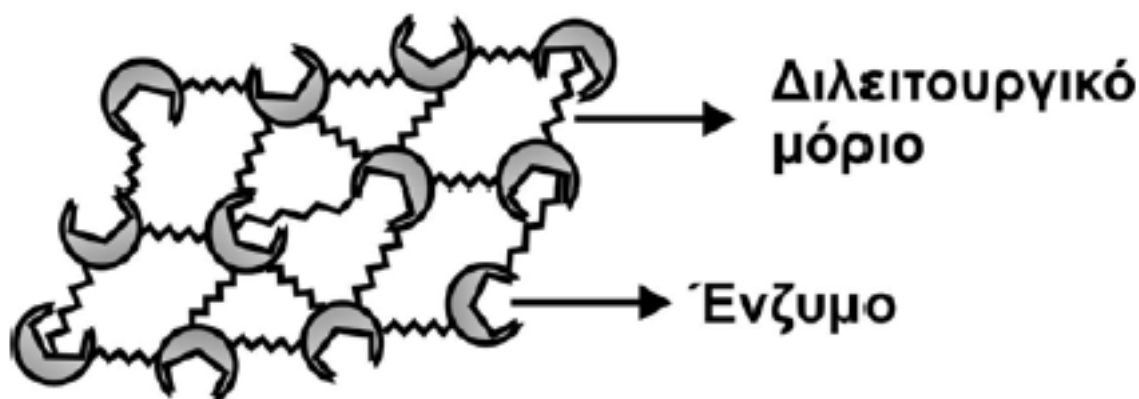


**Εικόνα 14.** Απεικόνιση επιλεγμένων παραδειγμάτων διεργασιών χιτοζάνης για χρήση στην μηχανική των ιστών.

Ο συνδυασμός της χιτοζάνης με άλλα βιοσυμβατά υλικά όπως ζελατίνη και φωφορικό ασβέστιο γίνεται ώστε να επιτευχθεί τροποποίηση των βιομηχανικών ιδιοτήτων και της αλληλεπίδρασης της μήτρας με τα κύτταρα. Η χιτοζάνη έχει μελετηθεί και για τη χρήση της στην παραγωγή φορέων και συστημάτων μεταφοράς θρεπτικών ουσιών, ειδικών μορίων πρωτεϊνών και γονιδίων, λόγω της ιδιότητάς της να μπορεί εύκολα να περιπλεχθεί γύρω από αρνητικά φορτισμένες πρωτεΐνες και στο DNA, χάση στο θετικό της φορτίο [24].

### Διασταυρούμενη ή διαμοριακή σύνδεση (cross-linking)

Η μέθοδος διαμοριακής σύνδεσης χρησιμοποιείται συχνά και πολλές φορές συνδυάζεται και με άλλες μεθόδους προκειμένου να περιοριστεί η εκρόφιση του ενζύμου από το υλικό ακινητοποίησης που συχνά παρατηρείται στις φυσικές μεθόδους ακινητοποίησης. Βεβαίως η μέθοδος μπορεί να χρησιμοποιηθεί αυτούσια για την ακινητοποίηση ενζύμων σε διάφορα υλικά στήριξης. Η πιο διαδεδομένη χρήση της μεθόδου διαμοριακής σύνδεσης είναι στην παρασκευή ενζυμικών μεμβρανών, με διλειτουργικά αντιδραστήρια, τα οποία με το ένα άκρο τους δεσμεύουν το βιομόριο και με το άλλο μπορούν να συνδεθούν με την πηκτική πολυμερούς ή με άλλα βιομόρια ή με την επιφάνεια ενός ηλεκτροδίου

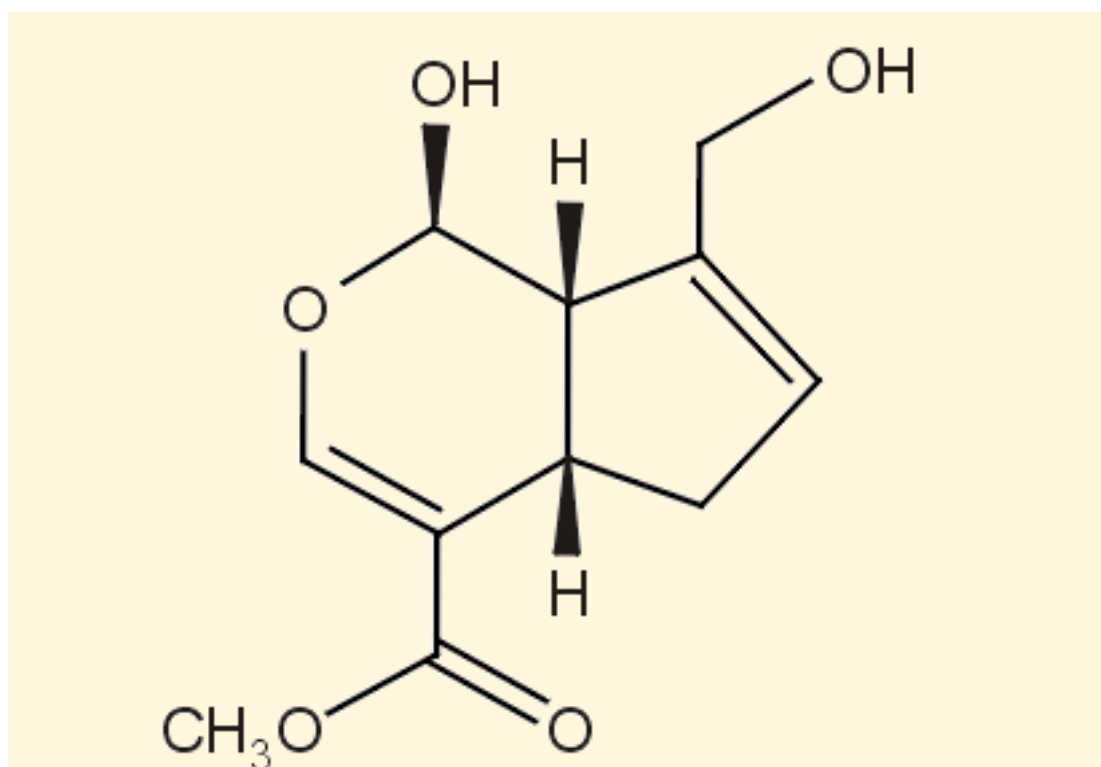


**Εικόνα 15.** Απεικόνιση της ακινητοποίησης ενζύμου με διασταυρούμενη σύνδεση.

Τα ευρύτερα χρησιμοποιούμενα διλειτουργικά αντιδραστήρια είναι η γλουταραλδεΰδη, η διαζωβενζιδίνη, το εξαμεθυλενο-δι(ιωδοακεταμίδιο) και το δις-(N-υδροξυσουκνιμιδυλο)-διθειοδιπροπιονικό οξύ. Σε πολλές περιπτώσεις η χρήση των παραπάνω αντιδραστηρίων συνδυάζεται με ένα πρωτεϊνικό φορέα, όπως η αλβουμίνη. Τα πλεονεκτήματα της διαμοριακής σύνδεσης είναι η απλότητα και οι ισχυροί δεσμοί σύνδεσης του βιομορίου με το υλικό στήριξης. Σοβαρό μειονέκτημα της μεθόδου είναι η ευαισθησία των βιομορίων στα αντιδραστήρια σύνδεσης. Συχνά παρατηρείται ελάττωση ή ολική απώλεια της ενζυμικής ενεργότητας λόγω των χημικών μεταβολών, που υφίστανται τα ενεργά κέντρα των ενζύμων [25].

## Γενιπίνη (GP)

Η γενιπίνη έχει αποτελέσει αντικείμενο έρευνας της περίφημης ομάδας συνθετικής χημείας Djerassi et al. Το 1961 η ομάδα Djerassi συνέθεσε τη GP και έτσι πιστοποίησε τη δομή της. Ο μοριακός τύπος της GP είναι  $C_{11}H_{14}O_5$  και το μόριό της περιλαμβάνει ένα δακτύλιο διυδροπυρανίου. Χαρακτηριστική της ιδιότητα είναι η άμεση αντίδρασή της με αμινοξέα με παραγωγή μιας έντονα κυανής χρωστικής.



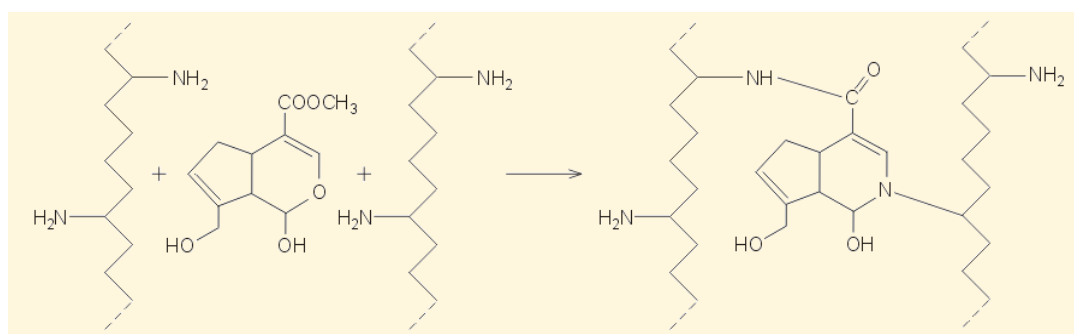
**Εικόνα 16.** Genipin: Cyclopenta(c) pyran-4-carboxylic acid, 1,4a-alpha,5,7a-alpha-tetrahydro-1-hydroxy-7-(hydroxymethyl)-, methyl ester

Παρουσιάζει δύο ενδιαφέρουσες χημικές ιδιότητες: α) Ως αναλυτικό αντιδραστήριο ανίχνευσης και προσδιορισμού πρωτοταγών αμινών και β) ως αντιδραστήριο διασύνδεσης (cross-linker) μορίων φυσικών ή τεχνητών μακρομοριακών ενώσεων, ιδιότητα που εκμεταλλευόμαστε και στην εργασία αυτή.



## Η γενιπίνη ως αντιδραστήριο διασύνδεσης (cross-linker) μακρομοριακών ενώσεων

Ο μηχανισμός των σχετικών αντιδράσεων δεν έχει διευκρινισθεί πλήρως. Εικάζεται ότι πρώτα η GP υφίσταται ένα είδος διμερισμού μέσω αντίδρασης ριζών. Το προϊόν του διμερισμού οδηγεί σε ενδομοριακές και διαμοριακές διασυνδέσεις με συνδετικές γέφυρες ετεροκυκλικού χαρακτήρα μακρομοριακών ενώσεων, που περιέχουν πρωτοταγείς αμινομάδες. Σε μια περίπτωση αναφέρεται η παρακάτω αντίδραση διασύνδεσης μέσω ενός μόνο μορίου γενιπίνης.



Εικόνα 17. Αντίδραση διασύνδεσης μορίου γενιπίνης

Μερικές από τις φυσικές ή τεχνητές μακρομοριακές ενώσεις που έχουν χρησιμοποιηθεί είναι η ζελατίνη (πρωτεΐνη), η χιτοζάνη (πολυσακχαρίτης της γλυκοζαμίνης), η πολυαιθυλενογλυκόλη (PEG). Η δράση της γενιπίνης είναι ανάλογη με εκείνη γνωστών διλειτουργικών (bifunctional) αντιδραστηρίων, όπως η γλουταρική διαλδεύδη (OHCCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CHO), με τη διαφορά ότι αυτή είναι πολύ λιγότερο τοξική (αναφέρεται ως 10.000 φορές λιγότερο τοξική), είναι βιοσυμβατή και οι προκύπτουσες από τη διασύνδεση μακρομοριακές ενώσεις (διασταυρούμενα μακρομόρια) υφίστανται ευκολότερα βιοδιάσπαση. Για παράδειγμα, το προϊόν της αντίδρασης GP και ζελατίνης δρα ως δυσδιάλυτη στο νερό "βιοσυγκολλητική ουσία" (bioadhesive), σε αντίθεση με την απλή ζελατίνη, που διαλύεται εύκολα. Η "κόλλα" αυτή συνδυάζεται με στερεό φωσφορικό ασβέστιο παρέχοντας ένα είδος κόνιας, που μπορεί να χρησιμοποιηθεί ως υποκατάστατο οστικού ιστού για την "επιδιόρθωση" οστών (defect bone substitute).

Η GP αντιδρά ταχύτατα με πρωτοταγείς αμίνες παρέχοντας εντόνως κυανέρυθρες χρωστικές, όπως επίσης και με κάθε ένωση που διαθέτει πρωτοταγείς αμινομάδες, όπως π.χ. τα αμινοξέα. Το προϊόν της αντίδρασης γενιπίνης, χιτοζάνης και αλγινικού νατρίου έχει εξετασθεί ως υλικό-ελεγχόμενης αποδέσμευσης φαρμακευτικών ουσιών, ενώ η αντίδραση της GP με πολυαιθυλενογλυκόλη οδηγεί στην παρασκευή υδρογελών (hydrogels), που είναι κατάλληλα ως υλικά κατασκευής ικριωμάτων (scaffolding) για μεγάλη ποικιλία τεχνητών ιστών (tissue engineering) [26].

### **Ιδιότητες Υλικών**

Οι ιδιότητες των υλικών είναι πολλές, μηχανικές, φυσικοχημικές, θερμικές, μαγνητικές κ.τ.λ. Αυτές που κυρίως έχουν ενδιαφέρον για υλικά που χρησιμοποιούνται ως βιοϋλικά είναι οι μηχανικές και οι φυσικοχημικές [12]. Γι αυτές λοιπόν έχουμε:

### **Μηχανικές Ιδιότητες**

Κάθε εμφύτευμα και τεχνητό όργανο σχεδιάζεται με βάση τις μηχανικές απαιτήσεις της βιοϊατρικής εφαρμογής για την οποία προορίζεται και εξαρτάται ουσιαστικά από τις φυσικοχημικές ιδιότητες του υλικού/υλικών από το/τα οποίο/α αποτελείται. Συγκεκριμένα μια εμφύτευση ισχίου πρέπει να είναι άκαμπτη και δεν πρέπει να αστοχεί κάτω από μεγάλα φορτία για τουλάχιστον 10 χρόνια, το βιοϋλικά που θα αντικαταστήσει ένα τένοντα πρέπει να είναι εύκαμπτο. Μια βαλβίδα καρδιάς πρέπει να είναι εύκαμπτη αλλά και να αντέχει σε πολλούς κύκλους κόπωσης. Οι οφθαλμικοί φακοί πρέπει να είναι εύκαμπτοι και διαυγείς. Οι καθετήρες πρέπει επίσης να είναι εύκαμπτοι.

Πρέπει λοιπόν να διαπιστώνεται εάν ένα υλικό έχει τέτοιες μηχανικές ιδιότητες ώστε να μπορεί να χρησιμοποιηθεί ως βιοϋλικά σε μια συγκεκριμένη ιατρική εφαρμογή. Για το σκοπό αυτό, γνωρίζοντας τις προϋποθέσεις που πρέπει να πληρεί, οι μηχανικές ιδιότητες που ελέγχονται είναι η αντοχή στον εφέλκυσμό, τη θλίψη, τη διάτμηση, τον ερπυσμό και την κόπωση.

Από άποψη μηχανικών ιδιοτήτων, τα πολυμερή είναι σε γενικές γραμμές εύκαμπτα αλλά και αδύναμα να αντιμετωπίσουν τις μηχανικές απαιτήσεις τις ορθοπεδικής χειρουργικής στις περιπτώσεις των σκληρών ιστών δηλαδή στα οστά. Αντίθετα, τα μέταλλα, και λιγότερο τα κεραμικά, είναι ανθεκτικά και με μέτρο ελαστικότητας το οποίο είναι 10-20 φορές μεγαλύτερο από αυτό των σκληρών ιστών, με αποτέλεσμα αυτή η διαφορά στο μέτρο ελαστικότητας να οδηγεί σε μη σωστή μετάδοση τάσεων από το εμφύτευμα στους ιστούς-οστά, οπότε το οστό δέχεται μικρότερες τάσεις από ότι το εμφύτευμα και σταδιακά ατροφεί.

Το πρόβλημα αυτό τείνει να αντιμετωπιστεί με τη χρήση των σύνθετων υλικών, δηλαδή πολυμερών ενισχυμένων με ίνες, τα οποία έχουν μεγάλη ανθεκτικότητα, οπότε ενδείκνυται η χρήση τους και σε πολυάριθμες ορθοπεδικές εφαρμογές. Επίσης, καθορίζοντας κάθε φορά τον όγκο των ινών και τη διάταξη τους στο σύνθετο, οι ιδιότητες του εμφυτεύματος μπορούν να ποικίλουν και να προσαρμόζονται κάθε φορά στις μηχανικές και φυσικοχημικές απαιτήσεις των διαφόρων εφαρμογών. Έτσι, τα σύνθετα υλικά προσφέρουν μεγαλύτερη δυνατότητα δομικής συμβατότητας με τους ιστούς από ότι τα ομογενή υλικά. Αυτό όμως συμβαίνει και εξαιτίας του ότι οι ιστοί είναι και οι ίδιοι σύνθετα υλικά με ανισότροπες ιδιότητες, οι οποίες εξαρτώνται από τη δομική διάταξη και το ρόλο των διαφόρων συστατικών τους (ελαστίνη, κολλαγόνο, υδροξυαπατίτης). Μιμούμενοι λοιπόν τη φύση, τα σύνθετα υλικά σχεδιάζονται με παρόμοιο τρόπο προκειμένου να ξεπεραστούν τα διάφορα μειονεκτήματα των ομογενών υλικών και να ανταποκρίνονται στις ανάγκες της κάθε εφαρμογής [11].

### **Φυσικοχημικές Ιδιότητες**

Τα στερεά ξεχωρίζουν από τις άλλες καταστάσεις (υγρά και αέρια), στο ότι τα άτομα (που τα αποτελούν) συγκρατούνται μεταξύ τους με ισχυρές ενδομοριακές δυνάμεις. Οι ηλεκτρονικές και ατομικές δομές αλλά και οι μηχανικές όπως και πολλές φυσικοχημικές ιδιότητες των υλικών εξαρτώνται από τη φύση και την ισχύ των ενδοατομικών και ενδομοριακών δεσμών. Υπάρχουν δύο διαφορετικοί τύποι ενδοατομικών άρα ισχυρών δεσμών, ο ιοντικός και ο ομοιοπολικός, και οι ασθενείς ενδομοριακοί δεσμοί υδρογόνου και van der Waals [12].

## Ιοντικός δεσμός

Στον ιοντικό δεσμό, τα άτομα - δότες ηλεκτρονίων (μεταλλικά) δίνουν ένα ή περισσότερα ηλεκτρόνια σε ένα άτομο - δέκτη ηλεκτρονίων (μη μεταλλικό). Τα δύο άτομα, τότε, γίνονται κατιόν (μέταλλο) ή ανιόν (μη μέταλλο), τα οποία έλκονται δυνατά με ηλεκτροστατικές δυνάμεις. Αυτή η έλξη των κατιόντων και ανιόντων αποτελεί τον ιοντικό δεσμό.

Τα ιοντικά στερεά, διατάσσονται έτσι ώστε το κατιόν να περικλείεται από όσο το δυνατόν περισσότερα ανιόντα, με σκοπό να μειωθεί η αμοιβαία απώθηση των κατιόντων. Αυτό το «στοίβαγμα» μειώνει τη συνολική ενέργεια και οδηγεί σε μια διάταξη μεγάλης τάξης, που ονομάζεται κρυσταλλική δομή.

## Ομοιοπολικός δεσμός

Τα στοιχεία που βρίσκονται στο σύνορο μεταξύ μετάλλων και αμέταλλων, όπως ο άνθρακας και το πυρίτιο, έχουν άτομα με τέσσερα ηλεκτρόνια σθένους και περίπου ισοδύναμες τάσεις να δώσουν ή να πάρουν ηλεκτρόνια. Γι' αυτό το λόγο δεν δημιουργούν ισχυρούς ιοντικούς δεσμούς. Οι σταθερές ηλεκτρονικές δομές επιτυγχάνονται με το να μοιράζονται τα ηλεκτρόνια σθένους. Για παράδειγμα, δύο άτομα άνθρακα μπορούν να συνεισφέρουν το καθένα από ένα ηλεκτρόνιο σε ένα κοινό ζεύγος. Αυτό το κοινό ζεύγος ηλεκτρονίων αποτελεί τον ομοιοπολικό δεσμό.

Αν ένα κεντρικό άτομο άνθρακα συμμετέχει σε τέσσερις ομοιοπολικούς δεσμούς (δύο ηλεκτρόνια ανά δεσμό), έχει επιτύχει μια σταθερή εξωτερική στοιβάδα με οκτώ ηλεκτρόνια σθένους. Περισσότερα άτομα άνθρακα μπορούν να προστεθούν, έτσι ώστε κάθε άτομο να έχει τέσσερα γειτονικά άτομα με τα οποία μοιράζεται από ένα δεσμό. Έτσι, σε ένα μεγάλο σύνολο, κάθε άτομο έχει μια σταθερή δομή ηλεκτρονίων και τέσσερα γειτονικά άτομα. Αυτά συχνά δημιουργούν ένα τετράεδρο. Πολλά τέτοια τετράεδρα συναθροίζονται σε ένα επαναλαμβανόμενο πρότυπο (δηλαδή κρύσταλλο). Τέτοια είναι η δομή του διαμαντιού και της σιλικόνης. Το διαμάντι είναι το πιο σκληρό υλικό, γεγονός που δείχνει ότι οι ομοιοπολικοί δεσμοί είναι πολύ ισχυροί.

Σε αντίθεση με τον ιοντικό και τον ομοιοπολικό δεσμό που είναι ισχυροί υπάρχουν οι ασθενείς ή δευτερεύοντες δεσμοί που όμως επηρεάζουν σημαντικά τις ιδιότητες μερικών στερεών και ειδικά των πολυμερών.

### **Δεσμός Υδρογόνου**

Δεσμός υδρογόνου ονομάζεται ένα είδος ελκτικής διαμοριακής δύναμης που αναπτύσσεται όταν ένα άτομο υδρογόνου συνδέεται με ένα ισχυρά ηλεκτροαρνητικό στοιχείο, και τέτοιο μπορεί να είναι το οξυγόνο, το άζωτο ή το φθόριο. Τότε, το ηλεκτραρνητικό στοιχείο προσελκύει το ηλεκτρονικό νέφος από την περιοχή γύρω από τον πυρήνα του ατόμου υδρογόνου και, εκτρέποντας το νέφος από το κέντρο, αφήνει το άτομο του υδρογόνου με μερικώς θετικό φορτίο. Λόγω του μικρού μεγέθους του υδρογόνου σε σχέση με άλλα άτομα και μόρια, το προκύπτει φορτίο, αν και μόνο μερικό, εν τούτοις αντιπροσωπεύει μια σημαντική πυκνότητα φορτίου. Ένας δεσμός υδρογόνου προκύπτει όταν αυτή η ισχυρή θετική κατανομή φορτίου στο άτομο του υδρογόνου προσελκύει ένα ασύζευκτο ζεύγος ηλεκτρονίων ενός άλλου ατόμου, που γίνεται ο δέκτης του δεσμού υδρογόνου. Αν και ο δεσμός υδρογόνου είναι ασθενέστερος τόσο του ομοιοπολικού όσο και του ιοντικού δεσμού, παίζει πολύ σημαντικό ρόλο στα πολυμερή, τόσο συνθετικά όσο και φυσικά, στη δομή βιολογικών μορίων όπως είναι οι πρωτεΐνες, το DNA αλλά και στις αλληλεπιδράσεις μεταξύ βιολογικών υλικών και βιοϋλικών.

### **Δεσμοί van der Waals**

Οι δεσμοί Van der Waals είναι ασθενέστεροι από όλους τους παραπάνω δεσμούς. Είναι κυρίως δεσμοί μεταξύ μορίων (ή ατόμων που δεν συνδέονται με ιοντικούς ή ομοιοπολικούς δεσμούς) για το σχηματισμό της ύλης. Οφείλονται στις αδύναμες ηλεκτροστατικές έλξεις ανάμεσα στα ουδέτερα αυτά μόρια. Οι δυνάμεις

Van der Waals είναι τριών ειδών:

i) Ο Δύναμη διπόλου-διπόλου: Αλληλεπίδραση μορίων με μόνιμη διπολική ροπή (λόγω της ανομοιόμορφης κατανομής φορτίου στο κάθε μόριο). Το μόριο αλληλεπιδρά με το ηλεκτρικό πεδίο που δημιουργείται από το άλλο μόριο.

ο Δύναμη διπόλου-διπόλου εξ επαγωγής: Το ηλεκτρικό πεδίο του ενός μορίου-διπόλου πολώνει το δεύτερο μόριο.

ii) Ο Δύναμη διασποράς: Δύναμη μεταξύ μη πολικών μορίων. Λόγω της ανομοιόμορφης κατανομής φορτίου στο κάθε μόριο τα φορτία του ενός, όταν τα μόρια έλθουν κοντά, "βλέπουν" τα φορτία του άλλου.

Οι δεσμοί Van der Waals παρότι ασθενείς είναι αυτοί που καθορίζουν αν μια ουσία θα είναι υγρή ή αέρια σε θερμοκρασία περιβάλλοντος. Μια ουσία που αποτελείται από μη πολικά μόρια περιμένουμε να είναι αέρια (π.χ.  $H_2$ ), ενώ μια ουσία που αποτελείται από πολικά μόρια θα είναι υγρή (π.χ.  $H_2O$ ). Όπως και στην περίπτωση των δεσμών υδρογόνου, οι δεσμοί Van der Waals είναι ιδιαίτερα σημαντικοί τόσο για τα βιολογικά μόρια όσο και για τις αλληλεπιδράσεις βιολογικών υλικών-υλικών.

Το είδος των ενδοατομικών και ενδομοριακών δεσμών είναι αυτό που καθορίζει τόσο τις μηχανικές ιδιότητες όσο και τις φυσικοχημικές. Έτσι λέγοντας φυσικοχημικές ιδιότητες ενός υλικού και συγκεκριμένα της επιφάνειας, μιας και μόνο η επιφάνεια έρχεται σε επαφή με το βιολογικό υλικό είτε αυτό είναι πρωτεΐνες, κύτταρα ή ιστοί συνήθως εννοούνται τα εξής [11]:

- i) Χημική σύσταση της επιφάνειας
- ii) Επιφανειακή Ενέργεια
- iii) Φορτίο
- iv) Μορφολογία και Τραχύτητα

### **Εφαρμογές Βιοϋλικών**

Γενικά οι ιστοί μπορούν να διακριθούν σε δύο κατηγορίες: τους σκληρούς και τους μαλακούς. Σαν σκληρούς ιστούς μπορούμε να αναφέρουμε τα οστά και τα

δόντια, ενώ σαν μαλακούς ιστούς μπορούμε να αναφέρουμε το δέρμα, τα αγγεία και τους συνδέσμους.

Ας δούμε λοιπόν πιο αναλυτικά τους διάφορους ιστούς και πώς ομογενή αλλά και σύνθετα υλικά χρησιμοποιούνται για την επούλωση και αντικατάσταση τους, αλλά και για θεραπευτικούς σκοπούς.

## **Βιοϋλικά-Σκληροί Ιστοί:**

### **I. Οστά**

Διάφορα βιοϋλικά χρησιμοποιούνται για την επούλωση καταγμάτων, ως εμφυτεύματα σπονδυλικής στήλης, για την αντικατάσταση συνδέσμων όπως μηριαίου-λαγόνιου οστού και γόνατος [27]. Για το σκοπό αυτό χρησιμοποιούνται βιοϋλικά με τη μορφή δισκίων, βιδών και συνδέσμων. Τα εμφυτεύματα αυτά είναι κατασκευασμένα από ανοξείδωτο ατσάλι και κράματα του τιτανίου ή κοβαλτίου αλλά και από κεραμικά υλικά. Χρησιμοποιούνται επίσης τα πολυμερή PMMA, PP, PE, PET, PU και nylon με ίνες άνθρακα. Συχνά χρησιμοποιούνται και υλικά που αποικοδομούνται με το χρόνο οπότε χάνουν σταδιακά τις μηχανικές τους ιδιότητες. Τέτοια υλικά δεν χρειάζονται χειρουργική απομάκρυνση. Ως τέτοια χρησιμοποιούνται μήτρες κατασκευασμένες από poly(lactic acid) και ίνες από calcium phosphate based glass και poly(glycerol acid). Πολλές φορές όμως τα υλικά αυτά έχουν ίνες μη αποικοδομήσιμες όπως άνθρακα και πολυαμιδίου προκειμένου να βελτιώσουν τις μηχανικές τους ιδιότητες [28].

### **II. Οδοντικά Εμφυτεύματα**

Η αντιμετώπιση προβλημάτων των δοντιών είναι από τις συνηθισμένες περιπτώσεις ασθενειών και περιλαμβάνουν από συμπλήρωση κοιλοτήτων (σφράγισμα) μέχρι αντικατάσταση κομματιών ή αλλοιωμένων δοντιών. Αμαλγάματα, χρυσός, ζirkόνια, ακρυλικές ρητίνες και σιλκόνες είναι τα ευρύτερα χρησιμοποιούμενα βιοϋλικά για σφραγίσματα, αλλά και σύνθετα με ρητίνες ως μήτρα και γυαλιά βορίου και σιλκόνες ως συμπληρώματα.

Σε περιπτώσεις που το υπόλειμμα του υγιούς δοντιού είναι μικρό χρησιμοποιούνται θήκες από ανοξείδωτο ατσάλι, κράματα Ni-Cr, Au-Pt, Ti. Στις περιπτώσεις εκείνες που εξαγωγή του δοντιού είναι απαραίτητη, χρησιμοποιούνται οδοντικά εμφυτεύματα αντί για γέφυρες. Πολλά υλικά χρησιμοποιούνται για το σκοπό αυτό όμως τα σύνθετα πλεονεκτούν έναντι των μετάλλων και των κεραμικών ως προς την αντοχή στην κόπωση. Όσον αφορά τις γέφυρες, χρησιμοποιούνται τα σχετικά φθηνά και εύχρηστα σύνθετα με μήτρα το PMMA και ίνες γυαλιού [14,17,18].

### **Βιοϋλικά-Μαλακοί Ιστοί:**

#### **I. Καθετήρες**

Οι καθετήρες χρησιμοποιούνται ολοένα και περισσότερο προκειμένου να τροφοδοτήσουν τον οργανισμό με υγρά όπως θρεπτικά υλικά, ισοτονικό ορό, γλυκόζη, φάρμακα, αίμα, και προϊόντα του αίματος. Χρησιμοποιούνται επίσης για τη συλλογή πληροφοριών όπως αρτηριακή πίεση, μέτρηση της συγκέντρωσης αερίων (O<sub>2</sub>, CO<sub>2</sub>) στο αίμα, καθώς και για τη συλλογή δειγμάτων του αίματος για εργαστηριακή ανάλυση. Τα υλικά που συνήθως χρησιμοποιούνται για την εφαρμογή αυτή είναι PU, SR εξαιτίας της ευκαμψίας τους και της ευκολίας μορφοποίησης τους σε διάφορα μεγέθη και μήκη προκειμένου να μπορούν να εξυπηρετήσουν κάθε μέγεθος. Ένας ιδανικός λοιπόν καθετήρας πρέπει να είναι αρκετά εύκαμπτος προκειμένου να επιτρέπει την κίνηση της φλέβας και του ασθενούς χωρίς να τραυματίζει τη φλέβα και το περίβλημά της. Επιπλέον, καθώς το υλικό έρχεται σε επαφή με το αίμα πρέπει να εξασφαλίζεται η συμβατότητα του με το αίμα, δηλαδή η μη θρομβογεννησιμότητά του και η βακτηριοστατικότητά του προκειμένου να μην προκαλεί η παρουσία του λοιμώξεις από την προσκόλληση στην επιφάνεια του βακτηρίων (Costerton et al., 2004). Τα καινούρια υλικά αποτελούνται από πολυμερή όπως PU, PVC με ίνες Ni-Ti, οπότε ο καθετήρας αποτελείται από λεπτά τοιχώματα και ελεγχόμενη σκληρότητα [29, 30]



## II. Συμπληρώματα «Χώρου»

Χρησιμοποιούνται για την αποκατάσταση αισθητικών ατελειών, ιδιαίτερα στο κεφάλι και το λαιμό, ατροφιών και απωλειών χόνδρου που συναντούνται στην οστεοαρθρίτιδα. Για το σκοπό αυτό χρησιμοποιούνται σύνθετα με ίνες άνθρακα και μήτρα: PET, PTFE, PU, SR. Τα υλικά αυτά δεν φαίνεται να προκαλούν ερεθισμούς [29].

## III. Επικάλυψη Τραύματος

Σε περιπτώσεις εγκαυμάτων απαιτούνται υλικά για την επικάλυψη του δέρματος που θα είναι εύκαμπτα και ελαστικά. Τα υλικά αυτά πρέπει από τη μια να αποτρέπουν την απώλεια υγρών, ηλεκτρολυτών και βιομορίων καθώς και τη διέλευση βακτηριδίων, από την άλλη όμως πρέπει να είναι σε κάποιο βαθμό διαπερατά προκειμένου να επιτρέπουν αποβολή προϊόντων μεταβολισμού. Επιπλέον πρέπει να απλώνονται στην επιφάνεια του τραύματος χωρίς όμως να προκαλούν νέες πληγές στο νεοσυσταθέντα ιστό ή να αναχαιτίζουν την ανάπτυξη του κατά την απομάκρυνση τους. Πρέπει επίσης να είναι βακτηριοστατικά και να μην επιτρέπουν την ανάπτυξη βακτηρίων. Σύνθετα υλικά ή πορώδεις στοιβάδες από πολυμερή όπως κολλαγόνο, PLLA χρησιμοποιούνται για την αντικατάσταση δέρματος. Επιπλέον συνδυασμοί έμβιας ύλης (όπως καλλιέργειες κυττάρων)- άβιας (όπως σύνθετα πολυμερή) σχεδιάζονται προκειμένου να βοηθήσουν την έναρξη, επιτάχυνση και έλεγχο παραγωγής νέου δέρματος [31].

## IV. Πρόσθετα Ουροποιητικού Συστήματος

Τα υλικά που συνήθως χρησιμοποιούνται είναι PVC, PE, SR, PTFE, nylon. Σε γενικές γραμμές πάντως αστοχούν όταν χρησιμοποιούνται για μεγάλα διαστήματα εξαιτίας της δυσκολίας σύνδεσης του εμφυτεύματος στο ζωντανό σύστημα. Επιπλέον συχνά εμφανίζονται προβλήματα βακτηριακής μόλυνσης και απόφραξης λόγω εναπόθεσης ασβεστίου. Για το λόγο αυτό χρησιμοποιούνται ίνες πολυεστέρα σε gel μεθακρυλικής γλυκόλης όμως, παρότι το υλικό είναι αρκετά υδρόφιλο, δεν έχει λυθεί

το πρόβλημα της μικροβιακής προσκόλλησης, του μικρού συντελεστή τριβής και της ελεγχόμενης προσρόφησης κυττάρων και πρωτεϊνών

#### V. Λειτουργικοί Μεταφορείς Φορτίου και Εμφυτεύματα Στήριξης

Οι τένοντες είναι σκληροί ινώδεις ιστοί που εκτείνονται μεταξύ μυών και οστών, ενώ οι σύνδεσμοι είναι συνδετικοί ιστοί μεταξύ οστών. Και οι δύο λοιπόν συγκρατούν τα οστά σε μια σύνδεση διευκολύνοντας τη σταθερότητα και την κίνηση. Μεταφέρουν επίσης δυνάμεις μεταξύ μυών και οστών. Έτσι η αντικατάστασή τους από εμφυτεύματα είναι ιδιαίτερα απαιτητική. Πρέπει να έχει τέτοια ελαστικότητα, όπως ο ιστός που τα περιβάλλει, ώστε να κάμπτονται στην άρθρωση και να μεταφέρουν το φορτίο στο μυ. Σε γενικές γραμμές είναι δύσκολη η σύνδεσή τους με το οστό, η μη αστοχία μετά από μεγάλα διαστήματα και η μη φλεγμονώδης αντίδραση του οργανισμού. Τα υλικά που συνήθως χρησιμοποιούνται είναι UHMWPE, PP, PET, PTFE και PU με ίνες, άνθρακα, και κολλαγόνου.

#### VI. Αγγειακά Μοσχεύματα

Τα αιμοφόρα αγγεία είναι πολύπλοκες, πολύστρωτες δομές που αποτελούνται από ίνες κολλαγόνου, ελαστίνης, λείους μύες και ενδοθηλιακό τοίχωμα. Τα αγγειακά μοσχεύματα χρησιμοποιούνται για να αντικαταστήσουν τμήματα του αγγειακού συστήματος (επιτυχώς για αγγεία διαμέτρου μεγαλύτερης των 5mm) που λόγω εναποθέσεων αθηρωματικής πλάκας στο εσωτερικό τους δεν επιτρέπουν την ομαλή κυκλοφορία του αίματος. Έτσι βρίσκουν εφαρμογή σε περίπτωση ανευρύσματος, θρομβοφλεβίτιδας και σε εγχειρήσεις bypass για την αποκατάσταση της κυκλοφορίας του αίματος μετά από έμφραγμα του μυοκαρδίου. Οι βασικές ιδιότητες που πρέπει να χαρακτηρίζουν αυτά τα υλικά είναι, το πορώδες τους, προκειμένου να ευνοούν την ανάπτυξη του ιστού όχι όμως και την απώλεια αίματος. Για το σκοπό αυτό συμπολυμερίζονται με κολλαγόνο ή ζελατίνη ώστε να καλύπτονται οι πόροι αλλά και να σταθεροποιείται το μόσχευμα. Επιπλέον πρέπει να έχουν καλή διαστολή και αντίσταση στη χαλάρωση καθώς υπόκειται σε συνεχείς παλμούς και στατική πίεση. Πρέπει επίσης κατά την επαφή με το αίμα να μην καταστρέφουν αιμοκύτταρα, να μην προσροφούν πρωτεΐνες και αιμοπετάλια και άρα να μην είναι θρομβογεννητικά. Πρέπει τέλος να επιτρέπουν την ανάπτυξη ενδοθηλιακών κυττάρων στο εσωτερικό

τους προκειμένου να μην προκαλούν θρομβώσεις και να ταιριάζει η συμπεριφορά τους κατά τη θλίψη με αυτή των φυσιολογικών ιστών, διαφορετικά παρατηρείται μεγάλη διατμητική τάση και τυρβώδης ροή που μπορεί να προκαλέσει αιμόσταση σε κάποια σημεία και καταστροφή του αρτηριακού τοιχώματος. Προς το παρόν δεν έχει βρεθεί κάποιο υλικό που να πληρεί όλες αυτές τις προϋποθέσεις όμως οι μελέτες στρέφονται σε σύνθετα υλικά με ίνες PU και μήτρα PU, lactic acid και polyethylene glycol (PEG).

### **Πρόσθετα Άκρα**

Αρχικά τα τεχνητά πόδια φτιάχνονταν από μεταλλικά υλικά ή ξύλο όμως αυτά περιορίζονται λόγω του μεγάλου βάρους, της μικρής διάρκειας λόγω της διάβρωσης και της διόγκωσης εξαιτίας της υγρασίας. Σε αντίθεση με τα υλικά αυτά, τα σύνθετα λόγω του μικρού τους βάρους, της αντίστασης στην διάβρωση και την κόπωση, την καλή απόκριση στα φορτία, την αισθητική τους και την ευκολία στο χειρισμό, εμφανίζονται ως η ιδανική επιλογή για την κατασκευή πρόσθετων άκρων. Τα θερμοπλαστικά πολυμερικά σύνθετα με ίνες άνθρακα ή γυαλιού είναι τα ευρύτερα χρησιμοποιούμενα. Το πιο κρίσιμο σημείο των πρόσθετων άκρων είναι η περιοχή της σύνδεσης με το ελλιπές άκρο. Η καλύτερη διαδικασία είναι αυτή της κατασκευής του αμέσως πριν την εφαρμογή προκειμένου να προσαρμοστεί με τον καλύτερο δυνατό τρόπο. Για το πέλμα χρησιμοποιούνται εποξειδικά με ίνες άνθρακα και σχεδιάζονται να είναι επίπεδα, να προστατεύουν από τα τραντάγματα και να απελευθερώνουν την ενέργεια που αποθήκευσαν, καθώς το σώμα μετακινείται προς τα εμπρός, συμβάλλοντας σε ομαλότερο βάδισμα [11,12, 18, 31].

### **Όργανα για Ιατρική Χρήση**

Υψηλής τεχνολογίας όργανα χρησιμοποιούνται ολοένα και περισσότερο για διαγνωστικούς σκοπούς. Τα όργανα αυτά, εξαιτίας του μεγάλου βάρους τους, βρίσκονται πάνω σε μεγάλα μετακινούμενα τραπέζια, τα υλικά από τα οποία κατασκευάζονται είναι ιδιαίτερα ανθεκτικά, σκληρά αλλά και ελαφρά, ακτινοπερατά και μη μαγνητικά. Έτσι προτιμούνται τα πολυμερικά σύνθετα με ίνες άνθρακα [16].

## Λυοφιλίωση

Η μέθοδος της λυοφιλίωσης, επίσης γνωστή ως κρυοξήρανση (Freeze-drying ή cryodesiccation) αποτελεί μέθοδος ξήρανσης, η οποία βασίζεται στην απομάκρυνση του νερού σε πολύ χαμηλές θερμοκρασίες. Αυτή επιτυγχάνεται παγώνοντας το υλικό και στη συνέχεια μειώνοντας την πίεση και αυξάνοντας τη θερμοκρασία, επιτρέποντας έτσι στο παγωμένο νερό που υπάρχει μέσα στο υλικό να περάσει απευθείας από τη στερεά μορφή στην οποία βρίσκεται στην αέρια [32].

Στις περισσότερες παραδοσιακές διεργασίες ξήρανσης η υγρασία ενός υλικού συνήθως απομακρύνεται από αυτό με θέρμανση. Υπάρχουν όμως και προβλήματα σ' αυτή τη διεργασία.

Ορισμένες ουσίες υφίστανται παραμορφώσεις ή/και φθορές κατά την ξήρανση, επίσης ορισμένες ουσίες δεν μπορούν να θερμανθούν στην απαιτούμενη θερμοκρασία, γιατί υπάρχει κίνδυνος να υποστούν αλλοιώσεις ή, ειδικά στα τρόφιμα, μεταβολές στα οργανοληπτικά χαρακτηριστικά τους, που να τα καθιστούν δυσάρεστα και ανεπιθύμητα. Τέλος, με την απλή ξήρανση μόνο το 90%-95% της υγρασίας μιας ουσίας μπορεί να απομακρυνθεί.

Σε ευαίσθητες σε αλλοιώσεις ουσίες, όπως π.χ. στα φαρμακευτικά υλικά, το υπολειπόμενο νερό είναι αρκετό για να διατηρηθεί μια μικρή μεν αλλά υπαρκτή ενζυμική ή/και μικροβιακή δραστηριότητα, με αποτέλεσμα τη βαθμιαία αλλοίωση του προϊόντος. Ως εκ τούτου ένας εναλλακτικός τρόπος ξήρανσης των ευαίσθητων υλικών αναζητήθηκε. Σύμφωνα με την μέθοδο αυτή τα προς ξήρανση προϊόντα ψύχονται σε χαμηλή θερμοκρασία, και στη συνέχεια το νερό απομακρύνεται από αυτά με εξάχνωση. Η διεργασία αυτή ονομάζεται λυοφιλίωση ή κρυοξήρανση και βρίσκει ευρύτατη εφαρμογή σε διάφορους βιομηχανικούς κλάδους, όπως για παράδειγμα στη συντήρηση τροφίμων και την παρασκευή φαρμάκων και φαρμακευτικών ειδών (πρωτεΐνες, εμβόλια, κ.ά.). Αναφέρονται επίσης και άλλες, πιο «εξωτικές» και λιγότερο παραγωγικές εφαρμογές, όπως είναι η συντήρηση αρχαιολογικού ή/και αρχαιακού υλικού.

Ο όρος λυοφιλίωση (αλλιώς, λυοφιλίωση) προέρχεται από το γεγονός ότι οι ουσίες που αφυδατώνονται με τη μέθοδο αυτή εμφανίζουν μια πολύ εκτεταμένη επιφάνεια και, συνεπώς, είναι αρκετά υγροσκοπικές (λυόφιλοι). Η απορρόφηση του

νερού από μια ουσία που λυοφιλιώνεται είναι ταχύτατη, ακόμα και αν η ουσία αυτή είναι λίγο διαλυτή ή αδιάλυτη στη δεύτερη περίπτωση, η προσθήκη νερού προκαλεί τον άμεσο σχηματισμό ενός γαλακτώματος ή ενός κolloειδούς διαλύματος.

Επειδή η τάση των ατμών του νερού κάτω του σημείου της πήξης του ( $0\text{ }^{\circ}\text{C}$ ) είναι ελάχιστη, η εξάτμιση είναι δυνατόν να πραγματοποιηθεί μόνο με τη βοήθεια ενός πολύ υψηλού κενού, με πιέσεις που φτάνουν την τάξη των 10 mm στήλης υδραργύρου. Με ένα κενό σχεδόν απόλυτο, των 1-2 mm στήλης υδραργύρου, είναι δυνατή η επίτευξη ξήρανσης μέχρι τους  $-75\text{ }^{\circ}\text{C}$ . Στη λυοφιλίωση, η ξήρανση μπορεί να πραγματοποιηθεί με την απευθείας μετατροπή του νερού από τη στερεά κατάσταση του πάγου στην κατάσταση του ατμού, χωρίς να μεσολαβήσει υγρή κατάσταση, δηλαδή με εξάχνωση [33].

Οι παράγοντες που ενεργούν ώστε να διατηρούνται σχεδόν αναλλοίωτα τα χημικά και τα οργανοληπτικά χαρακτηριστικά των ξηραϊνόμενων ουσιών με τη λυοφιλίωση είναι ουσιαστικά η χαμηλή θερμοκρασία, οι συνθήκες του υψηλού κενού και η απευθείας εξάχνωση του νερού. Οι δύο πρώτες συνθήκες αποτρέπουν τις αλλοιώσεις που οφείλονται στη θέρμανση και στην οξείδωση από το οξυγόνο του αέρα, ενώ η εξάχνωση αποτρέπει την απώλεια συστατικών, όπως τα αιθέρια έλαια και τα αρώματα, τα οποία κατά τη συνήθη ξήρανση παρασύρονται από το ρεύμα του ατμού και απομακρύνονται.

Επειδή όμως η εξάχνωση του νερού απορροφά αρκετή ποσότητα θερμότητας, η αναγκαία θερμότητα προσφέρεται με ακτινοβολία, έτσι ώστε να διατηρείται σταθερή η θερμοκρασία της ουσίας κατά την πορεία της μεθόδου.

Σε γενικές γραμμές, τα λυοφιλιωτικά μηχανήματα αποτελούνται από έναν θάλαμο με σταθερή πίεση, ο οποίος συνδέεται με τις αντλίες κενού και είναι εφοδιασμένος με ένα σύστημα ψύξης. Στο εσωτερικό του θαλάμου είναι τοποθετημένοι οι επίπεδοι δίσκοι με το προς επεξεργασία υλικό και οι μικρές ακτινοβολούσες επιφάνειες για τη θέρμανση. Οι επιφάνειες αυτές είναι τοποθετημένες έτσι ώστε να απέχουν μόνο λίγα εκατοστά από την επιφάνεια των υλικών. Το φαινόμενο είναι ασυνεχές και γι' αυτό απαιτείται αυτόματος έλεγχος της θερμοκρασίας.

Τα στοιχεία που υπάρχουν σχετικά με την κρυοξήρανση και την αξιοποίησή της χρονολογούνται από τους αρχαίους Ίνκας. Ο αρχαίος πληθυσμός των Ίνκας στο Περού γνώριζε ότι η κρυοξήρανση των τροφίμων ήταν αποτελεσματική. Οι πατάτες και άλλες καλλιέργειες που αποθηκεύονταν στο βουνό σε ύψος πάνω από το Machu

Picchu διατηρούνταν περισσότερο από άλλα τρόφιμα και ήταν ελαφρά, κάτι που σημαίνει ότι μεταφέρονταν και πιο εύκολα. Οι Ινδιάνοι χρησιμοποιούσαν το κλίμα του βουνού - θερμοκρασίες που κατά τη διάρκεια της νύχτας έπεφταν κάτω από το μηδέν - και τη χαμηλή πίεση του αέρα στα μεγάλα υψόμετρα για να παγώνουν τα τρόφιμα και να εξατμίζουν αργά τον πάγο και το νερό από το εσωτερικό των τροφίμων.

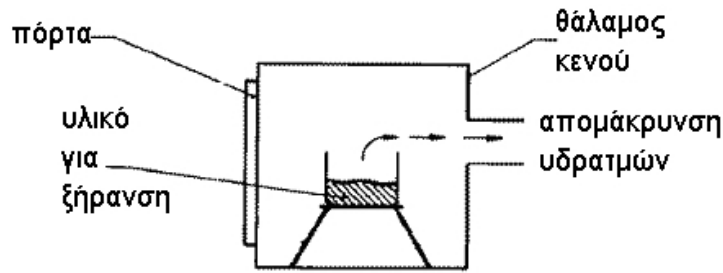
Στη σύγχρονη εποχή η λυοφιλίωση μετατράπηκε για πρώτη φορά σε εμπορική τεχνική στα τέλη του 1930. Αρχικά εφαρμόστηκε στην ξήρανση φαρμακευτικών και βιολογικών ουσιών: οροί, εμβόλια, ένζυμα, πλάσμα αίματος και αντιβιοτικά, προϊόντα. Από το 1951 και έπειτα, μελετήθηκαν εγκαταστάσεις λυοφιλίωσης και για την επεξεργασία ειδών διατροφής, όπως ο καφές, οι χυμοί φρούτων κ.ά.

Η σύγχρονη τεχνική λυοφιλίωσης πραγματοποιείται με τη χρήση μιας ειδική μηχανής: του λυοφιλιωτή. Αυτό το μηχάνημα αποτελείται από ένα μεγάλο θάλαμο για κατάψυξη και από μία αντλία κενού για απομάκρυνση της υγρασίας.

Η λυοφιλίωση μπορεί να οδηγήσει σε εξαιρετικά χαμηλή περιεκτικότητα σε υγρασία, προλαμβάνοντας την ανάπτυξη βακτηρίων και μούχλας, αλλά και τη δράση των ενζύμων από το να προκαλέσουν χημικές αντιδράσεις αλλοίωσης στα τρόφιμα. Τα λυοφιλιωμένα προϊόντα έχουν μακρά διάρκεια ζωής: σε σφραγισμένη συσκευασία που προστατεύονται από την υγρασία, το φως και το οξυγόνο, μπορούν να αποθηκευτούν σε θερμοκρασία δωματίου για πολλά χρόνια.

### **Αρχή της λυοφιλίωσης**

Σε συνθήκες χαμηλής θερμοκρασίας και υψηλής πίεσης μια ουσία μεταβαίνει από τη στερεή στην αέρια φάση απευθείας, με εξάχνωση, χωρίς να περάσει από το στάδιο της υγρής φάσης. Συνεπώς, προκειμένου να ξηρανθεί μια ουσία, μπορούμε να ακολουθήσουμε την εξής διαδικασία: αρχικά, ψύχουμε την ουσία, οπότε το περιεχόμενο σ' αυτή νερό παγώνει. Στη συνέχεια, την τοποθετούμε σε αεροστεγή χώρο (Εικόνα 18.) όπου μειώνεται η πίεση σε σημείο κάτω από το τριπλό σημείο του νερού (ή γενικότερα του διαλύτη, σε περίπτωση που έχει χρησιμοποιηθεί άλλο υγρό).

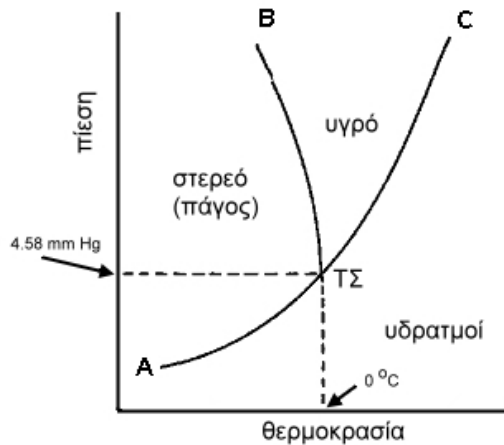


**Εικόνα 18.** Βασική διάταξη λυοφιλίωσης.

Στη χαμηλή αυτή πίεση, το νερό απομακρύνεται με εξάχνωση και απομακρύνεται με κατάλληλο συμπυκνωτή – παγίδα υδρατμών, ενώ ταυτόχρονα το υλικό ψύχεται, δεδομένου ότι για την εξάχνωση του νερού απαιτείται η αντίστοιχη λανθάνουσα θερμότητα εξάχνωσης [34].

Συνήθως για την επιτάχυνση της διεργασίας το υλικό θερμαίνεται ελαφρά. Στην εικόνα 19, φαίνεται ότι το τριπλό σημείο του νερού είναι σε θερμοκρασία  $T_{ΤΣ}=0\text{ }^{\circ}\text{C}$  και πίεση  $P_{ΤΣ} @ 610.5\text{ Pa}$  ( $= 4.58\text{ mm Hg}$ ). Τριπλό σημείο αποκαλείται το σημείο εκείνο όπου τέμνονται οι τρεις καμπύλες ισορροπίας αέριο–υγρό, υγρό–στερεό και αέριο–στερεό στο διάγραμμα φάσεων ή διάγραμμα θερμοκρασίας–πίεσης (P–T) του νερού. Στο τριπλό σημείο, οι τρεις καταστάσεις — αέρια, στερεά και υγρή — της ίδιας ουσίας βρίσκονται σε ισορροπία και αποτελεί αμετάβλητο σημείο της κάθε ουσίας, δηλ. χαρακτηριστική ιδιότητα της κάθε ουσίας

Έστω ότι μια ποσότητα νερού ψύχεται σε θερμοκρασία κάτω των  $0\text{ }^{\circ}\text{C}$  και ότι η πίεσή του είναι κάτω από την πίεση  $P_{ΤΣ}$ , δηλαδή το νερό βρίσκεται στον χώρο αριστερά από την καμπύλη «Α-ΤΣ» της Εικόνας 19, Θερμαίνοντας στη συνέχεια το νερό, χωρίς μεταβολή της πίεσης, προσεγγίζουμε την καμπύλη «Α-ΤΣ», οπότε το νερό περνάει από την στερεή στην αέρια φάση (εξάχνωση) χωρίς να παρεμβληθεί η υγρή φάση.



**Εικόνα 19.** Τριπλό σημείο νερού.

Στην πράξη, ακολουθείται ένας διαφορετικός τρόπος απομάκρυνσης της υγρασίας: ο θάλαμος, μέσα στον οποίο έχει τοποθετηθεί το υλικό, επικοινωνεί με άλλον θάλαμο, όπου επικρατεί ακόμα χαμηλότερη θερμοκρασία, και οι υδρατμοί τείνουν να φύγουν από το ξηραϊνόμενο υλικό και να αποτεθούν στην πιο κρύα επιφάνεια.

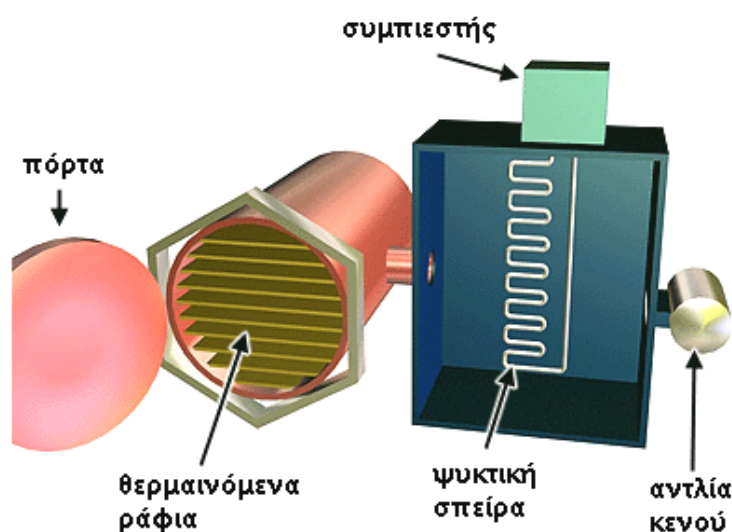
Για παράδειγμα, έστω ότι διατηρούμε το υλικό στους  $-14\text{ }^{\circ}\text{C}$  (σ' αυτή τη θερμοκρασία, η τάση ατμών του νερού είναι  $181.3\text{ Pa}$  ( $= 1.36\text{ mm Hg}$ ), και σε συγκοινωνούντα θάλαμο έχουμε μια επιφάνεια σε θερμοκρασία  $-40\text{ }^{\circ}\text{C}$  (όπου η τάση ατμών του νερού είναι  $12.9\text{ Pa}$  ( $= 0.097\text{ mm Hg}$ ). Η διαφορά πίεσης που παρατηρείται ανάμεσα στην επιφάνεια του υλικού και στην πιο κρύα επιφάνεια είναι αρκετή για να επιτείνει την απομάκρυνση της υγρασίας του υλικού και την ξήρανσή του.

Σημειώνεται ότι σε πολλά υλικά το νερό βρίσκεται σ' αυτά με δυο μορφές: το «ελεύθερο» και το «δεσμευμένο» ή κρυσταλλικό νερό και η λυοφιλίωση γίνεται σε δύο φάσεις. Ο στόχος της πρώτης φάσης είναι να παγώσει και να απομακρυνθεί το «ελεύθερο» νερό. Ο ρυθμός με τον οποίο ψύχεται το υλικό επηρεάζει το μέγεθος των κρυστάλλων πάγου, που σχηματίζονται: αν η ψύξη είναι ταχεία, οι κρύσταλλοι είναι μικροί, ενώ αν η ψύξη γίνει αργά και σταδιακά, οι κρύσταλλοι είναι μεγαλύτεροι. Το μέγεθος των κρυστάλλων του πάγου επηρεάζει και τη δομή του προϊόντος, που προκύπτει από την κρυοξήρανση: από υλικό με λεπτοκρυσταλλικό πάγο προκύπτει ξηρό υλικό με μικρούς πόρους, ενώ από μεγαλοκρυσταλλικό πάγο προκύπτει υλικό με μεγάλους πόρους.



Μερικά υλικά ξηραίνόμενα σχηματίζουν επιφανειακά ένα λεπτό στρώμα, που μειώνει τον ρυθμό εξάχνωσης και παρεμποδίζει τη διεργασία. Σ' αυτές τις περιπτώσεις, συνήθως προτιμούνται μικροί περιστρεφόμενοι θάλαμοι, ώστε να μην μπορεί να σχηματιστεί αυτό το επιφανειακό στρώμα στο υλικό.

Σε δεύτερη φάση, το υλικό θερμαίνεται ελαφρά και απομακρύνεται και το κρυσταλλικό ή «δεσμευμένο» νερό. Στη φάση αυτή, συνήθως, εφαρμόζεται η χαμηλότερη δυνατή πίεση. Στην περίπτωση λυοφιλίωσης διαλυμάτων, το υλικό πρέπει να ψυχθεί σε θερμοκρασία τόσο χαμηλή ώστε να προκύπτει αποκλειστικά στερεή φάση, δηλαδή να είναι χαμηλότερη από το τυχόν χαμηλότερο ευτηκτικό σημείο ( $T_{eut}$ ), που είναι πιθανό να σχηματίζουν τα συστατικά του διαλύματος. Υπάρχουν όμως και ουσίες, που όταν στερεοποιούνται δεν σχηματίζουν κρυστάλλους, αλλά άμορφο υλικό, οπότε η αντίστοιχη οριακή θερμοκρασία, κάτω από την οποία πρέπει να ψυχθεί το υλικό είναι η θερμοκρασία υαλώδους μετάπτωσης ( $T_g$ , glass transition temperature), που εξαρτάται από τη σύσταση του άμορφου παγωμένου προϊόντος. Όσο υπάρχει «ελεύθερο» νερό, η θερμοκρασία του θαλάμου πρέπει να διατηρείται κάτω από τη θερμοκρασία του ευτηκτικού ή/και του υαλώδους σημείου.



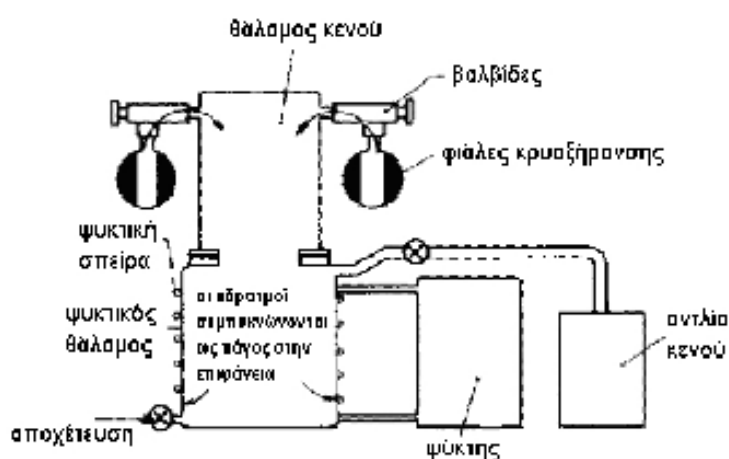
Εικόνα 20. Σχηματικό διάγραμμα θαλάμου λυοφιλίωσης

## Συνθήκες κρυοξήρανσης

Στην Εικόνα 20, παρουσιάζεται η χαρακτηριστική σχηματική διάταξη της κρυοξήρανσης, που περιλαμβάνει τον κύριο θάλαμο, την ψυχόμενη ατμοπαγίδα με την ψυκτική μονάδα και την αντλία κενού.

### Ψυχόμενος Θάλαμος

Ο ψυχόμενος θάλαμος πρέπει να είναι αεροστεγής, να διαθέτει κατάλληλο άνοιγμα για την εύκολη πρόσβαση στο εσωτερικό του και στο υλικό, και να αντέχει στην εξωτερική ατμοσφαιρική πίεση ( $101.3 \text{ kPa} = 1 \text{ atm}$ ).



**Εικόνα 21.** Σχηματικό διάγραμμα εργαστηριακής συσκευής κρυοξήρανσης.

### Συμπυκνωτής

Ο ψυχόμενος συμπυκνωτής πρέπει αφενός να βρίσκεται σε κατάλληλη θέση, ώστε να διέρχονται από αυτόν οι υδρατμοί, και αφετέρου να έχει τη δυνατότητα «απόψυξης», ώστε να απομακρύνεται ο σχηματιζόμενος πάγος, ενδεχομένως χωρίς διακοπή της διεργασίας.

Όπως φαίνεται στην Εικόνα 21, στις συσκευές μικρής κλίμακας οι θάλαμοι είναι ξεχωριστοί και προσαρτώνται στον ψυκτικό θάλαμο με ειδικές βαλβίδες, που επιτρέπουν την απομόνωση των θαλάμων, έτσι ώστε να είναι δυνατή η απομάκρυνση του σχηματιζόμενου πάγου, χωρίς να διακόπτεται το κενό στους θαλάμους.

### *Αντληση Ατμών*

Η απομάκρυνση των υδρατμών από τον χώρο της κρυοξήρανσης επιταχύνει τον ρυθμό της διεργασίας. Η απομάκρυνση αυτή επιτυγχάνεται με μια αντλία κενού.

Η αντλία κενού πρέπει να μπορεί να διατηρεί την πίεση μέσα στον θάλαμο κάτω από τα 533.2 Pa (= 4 mm Hg). Συνήθως, συνιστάται η πίεση στον θάλαμο να διατηρείται μεταξύ 4 Pa και 40 Pa ( $0.03 < P < 0.3 \text{ mm Hg}$ ).

### *Ψυκτικό Σύστημα*

Το ψυκτικό σύστημα συνήθως παρέχει δύο επίπεδα ψύξης (με δύο διαφορετικά κυκλώματα): ένα σε θερμοκρασία κάτω των  $-5 \text{ }^\circ\text{C}$  (για το υλικό) και το άλλο σε πολύ χαμηλότερη θερμοκρασία (από  $-40 \text{ }^\circ\text{C}$  έως  $-60 \text{ }^\circ\text{C}$ ) για την απομάκρυνση των υδρατμών.

Σημειώνεται επίσης ότι στην αρχή της διεργασίας πολλά υλικά έχουν την τάση να σχηματίζουν αφρό ή ακόμα και να βράσουν. Γι' αυτόν τον λόγο είναι προτιμότερο να προψύχεται το υλικό, πριν τοποθετηθεί στον θάλαμο της συσκευής κρυοξήρανσης.

### *Θέρμανση*

Για να εξαχωθεί μια ποσότητα νερού, πρέπει να απορροφήσει ορισμένη ενέργεια, που αντιστοιχεί στη λανθάνουσα θερμότητα εξάχνωσης. Για μικρές ποσότητες υλικού, όπως αναφέρθηκε παραπάνω, η απαιτούμενη ενέργεια παραλαμβάνεται είτε από το ίδιο το υλικό, το οποίο έτσι ψύχεται, είτε από το περιβάλλον μέσα από τα τοιχώματα της συσκευής.

Για μεγάλες ποσότητες υλικού είναι αναγκαία η θέρμανσή του με άλλα μέσα, αλλιώς μειώνεται σταδιακά ο ρυθμός της κρυοξήρανσης. Συνήθως, η παροχή της απαιτούμενης ενέργειας εξασφαλίζεται με θέρμανση του χώρου με ηλεκτρικές αντιστάσεις, που είναι συχνά ενσωματωμένες στα ράφια (βλ. Εικόνα 20.).

Τα περισσότερα δοχεία, μέσα στα οποία τοποθετείται το υλικό μέσα στον θάλαμο, είναι γυάλινα, κι επειδή το γυαλί έχει χαμηλό συντελεστή θερμικής αγωγιμότητας, η θέρμανση του υλικού και η εξάχνωση προχωρούν αργά. Για να επιταχυνθεί η διαδικασία, σε ορισμένες συσκευές κυκλοφορεί εσωτερικά θερμό αδρανές αέριο (π.χ. άζωτο), με αποτέλεσμα να αυξηθεί ο ρυθμός μετάδοσης θερμότητας και συνεπώς και της διεργασίας. Σημειώνεται ότι σε τέτοια περίπτωση

πρέπει να ελέγχεται η πίεση μέσα στον θάλαμο, ώστε να παραμένει κάτω από την τάση ατμών του πάγου.

## **Εφαρμογές**

### **Φαρμακευτικά παρασκευάσματα**

Η κρυοξήρανση σήμερα χρησιμοποιείται εκτενέστατα για την παρασκευή φαρμακευτικών ουσιών (πλάσμα αίματος, εμβόλια, ορούς κ.ά.), αλλά και πολλά φάρμακα. Ας σημειωθεί ότι σε μερικά προϊόντα – π.χ., πρωτεΐνες, πεπτίδια – είναι απαραίτητη η ύπαρξη ορισμένης ποσότητας νερού για να διατηρηθεί η δομή και η δραστηριότητά τους, οπότε είναι απαραίτητο η κρυοξήρανσή τους να γίνει σε ελεγχόμενες συνθήκες.

### **Τρόφιμα**

Η κρυοξήρανση των τροφίμων εξυπηρετεί δύο σκοπούς: αφενός τα προϊόντα μπορούν να διατηρηθούν για μεγάλο χρονικό διάστημα, μια και έχει απομακρυνθεί – σε ποσοστό μέχρι και 98% - η υγρασία και έχει περιοριστεί πολύ η μικροβιακή αλλοίωση, αλλά αφετέρου και γιατί περιορίζεται έτσι το βάρος και ο όγκος του προϊόντος. Είναι προφανές ότι σε περίπτωση υγρών προϊόντων, συμφέρει από άποψη κόστους να αποθηκεύεται και να μεταφέρεται αποξηραμένο υλικό, το οποίο ανακτά την αρχική του μορφή με προσθήκη νερού στον τόπο προορισμού ή/και κατανάλωσής του. Η κρυοξήρανση τροφίμων έχει δώσει επίσης λύση στο πρόβλημα του περιορισμού όγκου και βάρους για τις τροφές των αστροναυτών.

Για παράδειγμα, ένα χιλιόγραμμο φράουλες που έχουν υποστεί κρυοξήρανση αντιστοιχεί σε δέκα κιλά «κανονικής» φράουλας, ενώ από ποσότητα 3 kg κρέατος από κοτόπουλο προκύπτει 1 kg αποξηραμένου υλικού. Ένα από τα πιο γνωστά και διαδεδομένα προϊόντα, που παράγονται με κρυοξήρανση, είναι ο «στιγμιαίος» καφές. Αρχικά, από τον ψημένο κοκκώδη καφέ παρασκευάζεται το ρόφημα, που στη συνέχεια ψύχεται στους -40 °C. Το παγωμένο στερεό υφίσταται λειοτρίβηση μέχρι το επιθυμητό μέγεθος και το κοκκώδες στερεό τοποθετείται σε θάλαμο, όπου θερμαίνεται ελαφρά κάτω από κενό, απομακρύνεται το παγωμένο νερό, και παραλαμβάνεται το τελικό προϊόν, που είναι οι ευδιάλυτοι κόκκοι του καφέ .

## Βιολογικό Υλικό

Η λυοφιλίωση εφαρμόζεται στη συντήρηση ολόκληρων οργανισμών, όπως για παράδειγμα μικροβίων, ενζύμων, πρωτοζώων, βακτηριδίων κ.ά., αλλά και για μεγαλύτερα ζώα που προορίζονται για μουσειακά εκθέματα, για τα οποία είναι απαραίτητο να διατηρηθεί όχι μόνο ο ιστός αλλά και η εμφάνιση του ζώου.

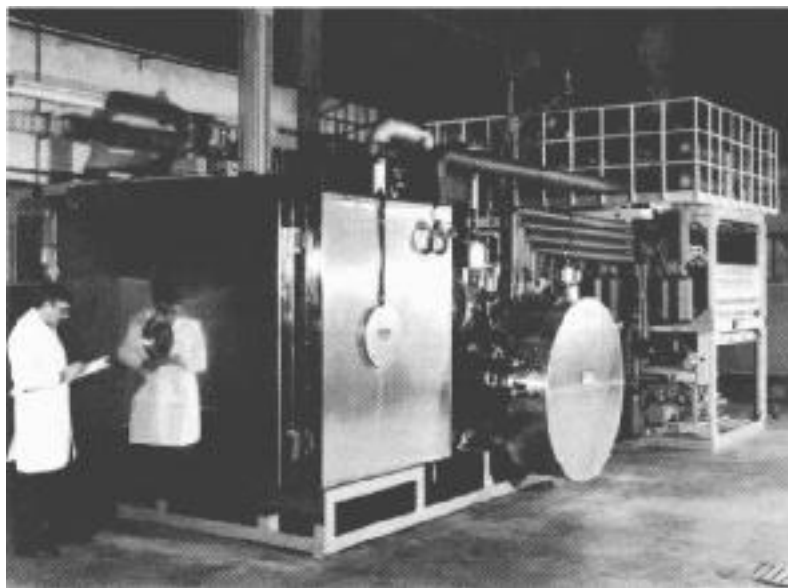
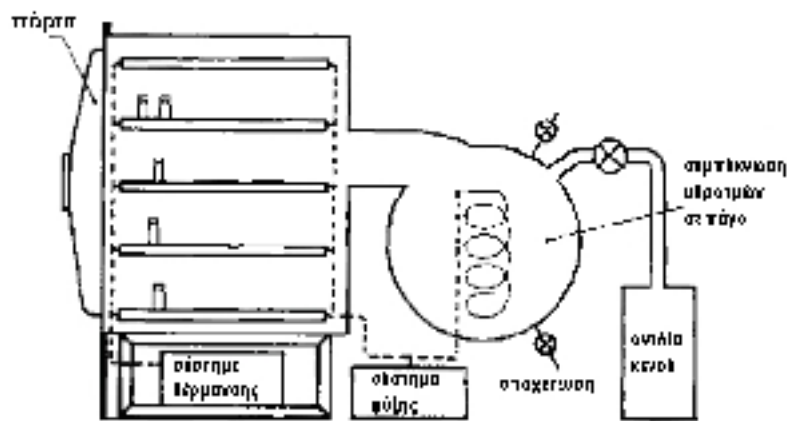
## Βιβλία – Αρχαιακό και αρχαιολογικό υλικό

Υδραυλικές αστοχίες σε κτήρια αλλά και φυσικές καταστροφές (πλημμύρες κλπ.) έχουν ως αποτέλεσμα να βραχεί πολύτιμο αρχαιακό υλικό (βιβλία κ.ά.), που από τη φύση τους δεν μπορούν να ξηραθούν με θέρμανση. Σ' αυτές τις περιπτώσεις εφαρμόζεται με μεγάλη επιτυχία η λυοφιλίωση.

Σε μια τέτοια περίπτωση, τα βιβλία τοποθετούνται σε ράφια σε ειδικό θάλαμο, που έχει προψυχθεί στους  $-30\text{ }^{\circ}\text{C}$  και εφαρμόζεται κενό  $0.1\text{ mm Hg}$ , με το δεύτερο ψυκτικό κύκλωμα του συμπυκνωτή στους  $-50\text{ }^{\circ}\text{C}$ , ενώ μετά από μια ώρα, τα ράφια θερμαίνονται στους  $40\text{ }^{\circ}\text{C}$ . Ο χρόνος, που χρειάζεται για να ξηραθούν τα βιβλία είναι της τάξης των πέντε ημερών – ο χρόνος αυτός εξαρτάται από το πάχος των βιβλίων – και σ' όλη τη διάρκεια της διεργασίας η πίεση διατηρείται περίπου στα  $0.06\text{ mm Hg}$ .

Σε μιαν άλλη παρόμοια εφαρμογή, τα βιβλία διατηρούνται για 56 ώρες σε πίεση  $10\text{-}3\text{ mm Hg}$  και θερμοκρασία  $< -101\text{ }^{\circ}\text{C}$ , με θερμοκρασία ραφιών  $\leq 54.4\text{ }^{\circ}\text{C}$  και θερμοκρασία βιβλίων  $\leq 37.8\text{ }^{\circ}\text{C}$ . Η διεργασία διακόπτεται όταν σταθεροποιηθεί η ποσότητα του απομακρυνόμενου πάγου, αποκαθίσταται κανονική πίεση στον θάλαμο, και αν υπάρχουν βιβλία που είναι ακόμα ελαφρώς υγρά, αφήνονται σε θερμαινόμενα ράφια ( $T \leq 54.4\text{ }^{\circ}\text{C}$ ) σε ελαττωμένη πίεση ( $10\text{ mm Hg}$ ) για 26 ώρες. Η διεργασία διακόπτεται όταν η θερμοκρασία των βιβλίων γίνει  $> 12.8\text{ }^{\circ}\text{C}$ .

Η κρυοξήρανση βρίσκει επίσης εφαρμογή στη διάσωση και συντήρηση ξύλινων αντικειμένων (κυρίως υπολειμμάτων από πλοία) ή και άλλων υλικών οργανικής προέλευσης (δέρματα, υφάσματα), που βρίσκονται μέσα σε υδάτινους χώρους (π.χ. βάλτους, θάλασσες). Η απλή ξήρανση θα είχε ως αποτέλεσμα τη συρρίκνωση και καταστροφή του υλικού, ενώ η λυοφιλίωση απομακρύνει το νερό διατηρώντας ανέπαφη τη μορφή και υφή του [35].



**Εικόνα 22.** Συσκευές κρυοξήρανσης βιομηχανικής κλίμακας

### **Παρασκευή πορωδών υλικών**

Όπως αναφέρθηκε παραπάνω, ανάλογα με την ταχύτητα ψύξης του αρχικού υλικού, οι σχηματιζόμενοι κρύσταλλοι του πάγου θα έχουν μεγάλο ή μικρό μέγεθος, με αντίστοιχη συνέπεια στη δομή του πορώδους αποξηραμένου προϊόντος. Την ιδιότητα αυτή εκμεταλλευόμαστε και στο πείραμά μας, κατά την παραγωγή ικριωμάτων με ορισμένο τύπο πορώδους, που να είναι κατάλληλο για της διεργασίες που απαιτούμε. Πιο συγκεκριμένα, η φαινόμενη πυκνότητα των αφυδατωμένων υλικών αυξήθηκε με την αύξηση της πίεσης που εφαρμόζεται κατά τη διάρκεια της λυοφιλίωσης, ενώ το πορώδες μειώθηκε. Οι μηχανικές ιδιότητες των αφυδατωμένων υλικών αυξήθηκαν με την αύξηση της πίεσης και επομένως τη μείωση του πορώδους.

## ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

*Προσδιορισμός των βέλτιστων συνθηκών λυοφιλίωσης (Freeze Drying) για την ανάπτυξη των ικριωμάτων.*

*Βελτίωση των μηχανικών ιδιοτήτων τους και αύξηση της αντοχής τους σε υδατικό περιβάλλον.*

### Πειραματική διαδικασία

#### Αντιδραστήρια και εξοπλισμός

Τα αντιδραστήρια που χρησιμοποιήθηκαν για την παρασκευή των βιοκεραμικών προϊόντων ήταν : Διάλυμα Ορθοφωσφορικού οξέος **H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> 85%** από την εταιρεία **Sigma-Altrich** και Υδροξείδιο του ασβεστίου **Ca(OH)<sub>2</sub>** σε μορφή σκόνης από την **Neolab Migge Laborbedarf-Vertribs GmbH**. Τα βιομόρια που χρησιμοποιήθηκαν είναι : Κολλαγόνο από αγίλλειο τένοντα βοδινού τύπου I, Χιτοζάνη μεγάλου μοριακού βάρους (**C<sub>12</sub>H<sub>24</sub>N<sub>2</sub>O<sub>9</sub>**) και σκόνη **L-Αργινίνης (C<sub>6</sub>H<sub>14</sub>N<sub>4</sub>O<sub>2</sub>)**, τα οποία παρελήφθησαν από την **Sigma – Aldrich**. Η ζελατίνη σε σκόνη προμηθεύτηκε από την **GmbH**, το διάλυμα γλουταραλδεύδης (50% σε νερό) από την **FLUKA**, η γενιπίνη από την **Sigma – Altrich** και χρησιμοποιήθηκε και Μαστίχα Χίου.

Ο εργαστηριακός εξοπλισμός που χρησιμοποιήθηκε περιλάμβανε ένα διασπορέα (IKA T25 digital ULTRA-TURRAX) με τον οποίο έγινε η ανάμιξη των πρόδρομων διαλυμάτων φωσφορικού οξέος-κολλαγόνου, φωσφορικού οξέος-χιτοζάνης και του υδατικού διαλύματος υδροξειδίου του ασβεστίου. Η ανάδευση κατά τη διάρκεια της αντίδρασης των πρόδρομων διαλυμάτων έγινε σε αυτοσχέδιο λουτρό με την χρήση μαγνητικού αναδευτήρα πάνω σε κατάλληλες θερμαινόμενες πλάκες μέσω των οποίων ελέγχονταν ο ρυθμός ανάδευσης και η θερμοκρασία του λουτρού. Η παρακολούθηση της θερμοκρασίας του λουτρού γινόταν μέσω θερμοστοιχείου και οι μετρήσεις **pH** με ηλεκτρονικό πεχάμετρο με ηλεκτρόδιο καλομέλανα.

Η γήρανση του παραγόμενου προϊόντος γίνεται σε κατάλληλο υδατόλουτρο, ο

διαχωρισμός του στερεού προϊόντος από το υπερκείμενο υγρό έγινε με την χρήση φυγοκέντρου (HERMLE Z306) και η λυοφιλίωση σε μηχάνημα TELSTAR LyoQuest του Εργαστηρίου Μεταλλογνωσίας της σχολής Μηχανικών Μεταλλείων - Μεταλλουργών.

### **Πειραματική Διαδικασία παρασκευής του υλικού**

Η πειραματική διαδικασία μπορεί να χωριστεί σε πέντε στάδια:

#### ***Παρασκευή νανοκρυστάλλων υδροξυαπατίτη παρουσία κολλαγόνου ή χιτοζάνης και αργινίνης.***

Στο **πρώτο** στάδιο γίνεται παραγωγή των απαραίτητων υδατικών διαλυμάτων αργινίνης (**Arg**), φωσφορικού οξέος (**H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>**) και υδροξειδίου του ασβεστίου **Ca(OH)<sub>2</sub>** που θα χρησιμοποιηθούν στη συνέχεια για την παρασκευή της σκόνης υδροξυαπατίτη. Οι περιεκτικότητες σε φωσφορικό οξύ και υδροξείδιο του ασβεστίου υπολογίζονται ώστε στο τελικό αιώρημα η μοριακή αναλογία Ca/P να ισούται με 10/6. Για την παρασκευή του διαλύματος φωσφορικού οξέος, το οξύ αραιώνεται με ορισμένη ποσότητα νερού και αναδεύεται με μαγνητικό αναδευτήρα. Στο διάλυμα του φωσφορικού οξέος διαλύεται υπό έντονη ανάδευση με χρήση διασπορέα στα **9.200 rpm** το φυσικό πολυμερές που θα χρησιμοποιηθεί στην εκάστοτε περίπτωση. Οι ίνες του κολλαγόνου (**Col**) υφίστανται ανάδευση για 2 ώρες ενώ η χιτοζάνη (**Chit**) για μισή ώρα αντίστοιχα. Τα δύο αυτά φυσικά πολυμερή μπορούν να διαλυθούν μόνο σε όξινα διαλύματα για αυτό και επιλέγεται η διάλυση τους να πραγματοποιηθεί στο διάλυμα ορθοφωσφορικού οξέος. Κατά το στάδιο αυτό παρατηρείται αύξηση της θερμοκρασίας μέσα στο δοχείο κατά την ανάδευση γεγονός που μπορεί να επηρεάζει την διάλυση των ινών του κολλαγόνου.

Στη συνέχεια το αιώρημα του υδροξειδίου του ασβεστίου παράγεται με έντονη ανάδευση του στερεού υδροξειδίου σε συγκεκριμένη ποσότητα νερού με τη χρήση του διασπορέα, με ρυθμό ανάδευσης **6.000 rpm** και διατήρηση του αιωρήματος υπό ανάδευση με μαγνητικό αναδευτήρα καθ' όλη την διάρκεια του πειράματος ώστε να παραμείνει το αιώρημα ομοιογενές και να διατηρηθεί σε αιώρηση το υδροξείδιο. Τέλος, παρασκευάζεται το διάλυμα της αργινίνης με ανάδευση της σκόνης της L-αργινίνης με τη χρήση μαγνητικού αναδευτήρα μέσα σε ποσότητα νερού.



Στο **δεύτερο** στάδιο τα αιωρήματα φωσφορικού οξέος – βιοπολυμερούς (κολλαγόνου ή χιτοζάνης) προστίθενται στάγδην ταυτόχρονα με το αιώρημα υδροξειδίου του ασβεστίου μέσα στο διάλυμα της αργινίνης που αποτελεί το «περιβάλλον» σχηματισμού του υδροξυαπατίτη. Οι κρύσταλλοι του υδροξυαπατίτη δημιουργήθηκαν στο υδατικό διάλυμα της αργινίνης όπου συμβαίνει εξουδετέρωση της βάσης και του οξέος με παραγωγή νερού και φωσφορικού άλατος του ασβεστίου (υδροξυαπατίτη). Τα φωσφορικά ιόντα του ορθοφωσφορικού οξέος υδρολύονται στα υγρά του σώματος χωρίς να προκαλέσουν ασβεστοποίηση σε ανεπιθύμητες θέσεις όταν βρεθούν στον οργανισμό σε υψηλές συγκεντρώσεις, όπως μπορεί να συμβεί με τα πρό- και μετά- φωσφορικά ιόντα .

Το διάλυμα της αργινίνης είναι τοποθετημένο μέσα σε λουτρό ώστε η θερμοκρασία του να διατηρείται στους **40 °C** και αναδεύεται με μαγνητικό αναδευτήρα καθ' όλη την διάρκεια της προσθήκης των διαλυμάτων ώστε το μίγμα να ομογενοποιείται. Η θερμοκρασία ελέγχεται μέσω θερμοστοιχείου. Η μέτρηση του **pH** στα αρχικά διαλύματα και στα ενδιάμεσα στάδια γίνεται με πεχάμετρο.

Το **pH** κατά την αντίδραση οξέος και βάσης παρουσία αργινίνης αφέθηκε να μεταβληθεί χωρίς την προσθήκη ρυθμιστικού διότι τα πειραματικά μοντέλα στα οποία επιτρέπεται η ελεύθερη μεταβολή του **pH** προσεγγίζουν καλύτερα τις συνθήκες που επικρατούν στον ανθρώπινο οργανισμό κατά τον σχηματισμό του οστού. Επιπλέον, το διάλυμα της αργινίνης εμφανίζει ήδη τιμές **pH** περίπου στο **9** οπότε δρα και σαν ρυθμιστικό διάλυμα και δεν χρειάζεται περαιτέρω ρύθμιση. Κατά την σύνθεση του, το **pH** στο περιβάλλον του οστού κυμαίνεται μεταξύ **8** και **8,8** και δεν μένει απολύτως σταθερό.

Η υδρόλυση των φωσφορικών αλάτων του εμφυτεύματος οφείλεται στις συνθήκες του περιβάλλοντος διαλύματος που δημιουργούνται μετά την εμφύτευση. Λόγω κυτταρικής λειτουργίας και της ύπαρξης ενζύμων στο περιβάλλον του εμφυτεύματος δημιουργούνται όξινες συνθήκες και ενεργοποιείται μερική διαλυτοποίηση του υδροξυαπατίτη προκαλώντας απελευθέρωση ιόντων  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{HPO}_4^-$  και  $\text{PO}_4^{2-}$  αυξάνοντας τοπικά τον υπερκορεσμό του μικρο-περιβάλλοντος ως προς τα άλατα φωσφορικού ασβεστίου .

Τα δείγματα φωσφορικών αλάτων (κεραμικού υδροξυαπατίτη) που εξετάστηκαν είχαν παρασκευαστεί ώστε στο τελικό προϊόν να διατηρείται η αναλογία

μαζών **HAp/Col** ή **Chit = 70/30** και η μοριακή αναλογία **Arg/Ca<sup>2+</sup> = 1/1**. Σύμφωνα με τις αναλογίες αυτές καθορίζεται η περιεκτικότητα στο πολυμερές που χρησιμοποιείται στην κάθε περίπτωση (κολλαγόνο ή χιτοζάνη) καθώς και η ποσότητα της αργινίνης που προστίθεται στην αντίδραση παραγωγής υδροξυαπατίτη. Η αντίδραση πραγματοποιείται σε βιομιμητικές συνθήκες δηλαδή σε θερμοκρασία **40 °C** και **pH** μεταξύ **9** και **10**.

Στο **τρίτο** στάδιο το παραγόμενο αιώρημα φωσφορικού άλατος του ασβεστίου φυγοκεντρείται και το υπερκείμενο νερό απομακρύνεται ώστε να διαχωριστεί η φάση του **gel** υδροξυαπατίτη-φυσικού πολυμερούς (κολλαγόνου ή χιτοζάνης) από την υγρή φάση.

Στο **τέταρτο** στάδιο το μίγμα τοποθετείται σε καλούπια ώστε μετά την διαδικασία της λυοφιλίωσης να παραχθεί αντικείμενο στερεό-ικρίωμα με το επιθυμητό μέγεθος. Τα καλούπια με το υλικό, στη συνέχεια τοποθετούνται και πάλι για φυγοκέντρηση ώστε να απομακρυνθεί περισσότερη ποσότητα νερού και το ικρίωμα να αποκτήσει πιο συμπαγή δομή.

Τέλος, στο **πέμπτο** στάδιο τα ικρίωματα τοποθετούνται στο σύστημα λυοφιλίωσης ώστε να παραχθούν τα επιθυμητά τρισδιάστατα υβριδικά ικρίωματα υδροξυαπατίτη με εσωτερικό πορώδες δίκτυο.

Η ανάπτυξη των τρισδιάστατων ικριωμάτων πραγματοποιήθηκε με τη μέθοδο της λυοφιλίωσης, όπου το αιώρημα του υδροξυαπατίτη ψύχεται για 3 ώρες με αποτέλεσμα το νερό που περιείχε να παγώσει. Στη συνέχεια δημιουργήθηκε υψηλό κενό σε χαμηλή θερμοκρασία και το νερό απομακρύνθηκε με εξάχνωση.

Ωστόσο, τα τρισδιάστατα ικρίωματα που παράγονται κατά τον παραπάνω τρόπο παρουσιάζουν αρκετά χαμηλή μηχανική αντοχή σε κάμψη και εφελκυσμό, όπως επίσης και χαμηλή αντοχή σε υδατικό περιβάλλον. Έχοντας πάντα σαν στόχο την δημιουργία ικριωμάτων για βιολογικές εφαρμογές όπως την αντικατάσταση κάποιου κατεστραμμένου τμήματος φυσικού ιστού, στοχεύσαμε στην επίλυση των προβλημάτων αυτών και τη βελτίωση της μηχανικής συμπεριφοράς των ικριωμάτων.

Για τη βελτίωση των μηχανικών αντοχών των παραγόμενων ικριωμάτων και την αύξηση της αντοχής τους σε υδατικό περιβάλλον χρησιμοποιήθηκαν:

1) Κατάλληλοι διασυνδέτες οι οποίοι εμφανίζουν και τις απαραίτητες ιδιότητες

βιοσυμβατότητας.

2)Φυτική ρητίνη

3)Πηκτικοί παράγοντες

Ως διασυνδέτες μελετήθηκαν η γλουταραλδεϋδη (**GA**) και η γενιπίνη (**GN**). Πρόκειται για πρωτεϊνικούς διασυνδέτες, οι οποίοι δημιουργούν ισχυρούς δεσμούς με τα αμινικά άκρα των βιοπολυμερών που συμμετέχουν στην αντίδραση και με αυτό τον τρόπο προσδίδουν στο τελικό ικρίωμα πιο σταθερή δομή με μεγαλύτερη ελαστικότητα, σκληρότητα και βελτιωμένες ιδιότητες διαβροχής.

Ωστόσο, η γλουταραλδεϋδη εμφανίζει τοξικότητα όταν η συγκέντρωσή της στο τελικό αιώρημα ξεπερνάει το 2,5% επί του συνόλου των αμινομάδων που υπάρχουν στα πολυμερή που συμμετέχουν στην αντίδραση. Για την επίλυση αυτού του προβλήματος προτείνεται η χρήση της γενιπίνης, που αποτελεί έναν φυσικό διασυνδέτη, ο οποίος βελτιώνει και αυτός τις μηχανικές αντοχές των παραγόμενων ικριωμάτων, εμφανίζοντας παράλληλα πολύ χαμηλή τοξικότητα σε σύγκριση με την διασύνδεση με γλουταραλδεϋδη. Η γενιπίνη αποτελεί παράγωγο από εκχύλισμα γαρδένιας.

Οι διασυνδέτες αυτοί προστίθενται στο αιώρημα ναοκρυστάλλων υδροξυαπατίτη που έχει παρασκευαστεί ώστε να πραγματοποιηθεί η αντίδραση με τις αμινομάδες του κολλαγόνου ή της χιτοζάνης και της αργινίνης. Το διάλυμα της γλουταραλδεϋδης προστίθεται σε ποσοστό 1,67% στο αιώρημα του υδροξυαπατίτη και αφήνεται για ανάδευση για 2 ώρες. Η γενιπίνη προστίθεται σύμφωνα με την αναλογία μαζών σε ποσοστό 1% επί του συνολικού περιεχομένου σε πολυμερές και παραμένει υπό ανάδευση 24 ώρες. Ένδειξη για την πραγματοποίηση της διασύνδεσης με την γενιπίνη αποτελεί το γεγονός ότι το αιώρημα αποκτά μπλε χρώμα.

Αφού ολοκληρωθεί το στάδιο της διασύνδεσης, το εκάστοτε αιώρημα τοποθετείται για φυγοκέντρηση με σκοπό την έκπλυση του αιωρήματος για την απομάκρυνση τυχόν υπολειμμάτων των διασυνδετών. Η διαδικασία της έκπλυσης επαναλαμβάνεται 5 φορές στη φυγόκεντρο στα 10.000 rpm και ακολουθεί κανονικά η διαδικασία της λυοφιλίωσης.

Για την περαιτέρω βελτίωση των μηχανικών αντοχών των ικριωμάτων χρησιμοποιήθηκε ένας πηκτικός παράγοντας. Πρόκειται για μια υδρογέλη ζελατίνης, ένα βιοσυμβατό και βιοδασπώμενο υλικό που προσδίδει σκληρότητα, μηχανικές

αντοχές και αντοχή σε υδατικό περιβάλλον. Η υδρογέλη αυτή, με βασικά συστατικά της το οξικό οξύ και την ζελατίνη, αποτελεί ένα μη τοξικό υλικό και αναμένεται να αλλάξει σε σημαντικό βαθμό την εικόνα των τρισδιάστατων ικριωμάτων του υδροξυαπατίτη, δημιουργώντας πλέον ικρίωματα που πραγματικά προσομοιάζουν την δομή και τις αντοχές οστού. Ακόμα, αναμένεται να προσδώσει και σημαντική βελτίωση στην αντοχή των ικριωμάτων σε υδατικό περιβάλλον.

Η ζελατίνη αποτελεί ένα βιοπολυμερές, το οποίο προκύπτει από την υδρόλυση των ινών του κολλαγόνου. Χρησιμοποιείται σαν πηκτικός παράγοντας διότι εμφανίζει ενδιαφέρουσες ιδιότητες διαλυτότητας και ζελατινοποίησης. Είναι απόλυτα διαλυτή σε ζεστό νερό, ενώ σε χαμηλότερες θερμοκρασίες (κρύο νερό) διογκώνεται. Η προσθήκη διαλυμένης ζελατίνης σε ένα οποιοδήποτε διάλυμα προκαλεί μετατροπή της δομής του από υγρή σε gel. Η δομή αυτή (γέλη) εμφανίζει παρόμοιες ιδιότητες με μία αντίστοιχη στερεή φάση με μόνη διαφορά την απουσία πλήρους σταθερότητας. Κατ' επέκταση, η προσθήκη της υδρογέλης ζελατίνης σε ένα διάλυμα έχει σαν αποτέλεσμα την αύξηση του ιξώδους του διαλύματος.

Η υδρογέλη ζελατίνης εμφανίζει ιδιότητες θερμοαντιστρεπτότητας. Πιο συγκεκριμένα, κατά την ψύξη του διαλύματος της γέλης το ιξώδες αυξάνεται σταδιακά, μετατρέποντας το υγρό σε gel. Αντίθετα, κατά τη θέρμανση του το gel διαλύεται και επιστρέφει στην αρχική υγρή κατάσταση. Η διαδικασία αυτή μπορεί να επαναληφθεί, ωστόσο η διαδοχική θέρμανση και ψύξη του υλικού είναι πιθανό να επιφέρει μείωση της ιδιότητας ζελατινοποίησης της υδρογέλης [36].

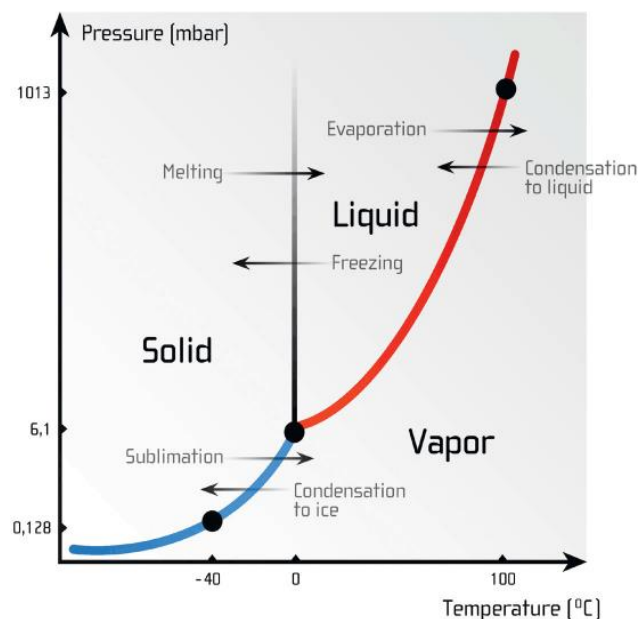
Η προσθήκη της υδρογέλης ζελατίνης στο αιώρημα του υδροξυαπατίτη πραγματοποιείται μετά το στάδιο της φυγοκέντρωσης και το τελικό υλικό αναδεύεται προσεκτικά ώστε να αφομοιωθεί πλήρως από αυτό πριν τη λυοφιλίωση.

Τέλος στα ικρίωματα έγινε επικάλυψη με Μαστίχα Χίου, μια αρωματική φυτική ρητίνη, φιλική προς τον ανθρώπινο οργανισμό, με αντιφλεγμονώδη δράση. Σκοπός της χρήσης της ήταν η επιπλέον ενίσχυση των μηχανικών αντοχών αλλά και της αντοχής σε υδατικό περιβάλλον των παραγόμενων ικριωμάτων. Η μαστίχα τοποθετείται κατά τρόπο ώστε να δημιουργεί ένα υδρόφοβο και ταυτόχρονο φιλικό προς τον ανθρώπινο οργανισμό και τα κύτταρά του περίβλημα, το οποίο συγκρατεί και προστατεύει το ικρίωμα σε υδατικό περιβάλλον από τον κίνδυνο να χάσει το σχήμα του και τις μηχανικές αντοχές του.

Στη φάση αυτή το τρισδιάστατο ικρίωμα εμβαπτίζεται σε διάλυμα φυτικής ρητίνης - Μαστίχας Χίου και αφήνεται να ξηραθεί σε θερμοκρασία περιβάλλοντος.

### Παράμετροι Λυοφιλίωσης

Η αρχή λειτουργίας της λυοφιλίωσης βασίζεται, όπως έχει ήδη αναφερθεί, στην ψύξη στους  $-55\text{ }^{\circ}\text{C}$  του προς ξήρανση δείγματος (οπότε το περιεχόμενο νερό παγώνει) και στη συνέχεια την τοποθέτηση του μέσα σε θάλαμο υψηλού κενού, ώστε οι παγωμένοι κρύσταλλοι του νερού να μεταβούν κατευθείαν από την στερεή στην αέρια φάση, δημιουργώντας πορώδες δίκτυο στο εσωτερικό των ικριωμάτων. Οι συνθήκες αυτές οδηγούν σε περιοχή κάτω από το τριπλό σημείο του νερού, όπως φαίνεται στην Εικόνα 23. Η εξάχνωση πραγματοποιείται με τη βοήθεια αντλίας κενού, η οποία δημιουργεί το υψηλό κενό στο εσωτερικό του δοχείου λυοφιλίωσης.



**Εικόνα 23.** Οι κρύσταλλοι του νερού απομακρύνονται με εξάχνωση, ενώ ταυτόχρονα το υλικό ψύχεται, δεδομένου ότι για την εξάχνωση του νερού απαιτείται η αντίστοιχη λανθάνουσα θερμότητα εξάχνωσης.

Οι παράμετροι που επηρεάζουν την διαδικασία της λυοφιλίωσης είναι ο ρυθμός ψύξης του δείγματος καθώς και ο ρυθμός εξάχνωσης. Όταν η διαδικασία της κατάψυξης είναι γρήγορη, σχηματίζονται μονό μικροί κρύσταλλοι νερού. Αντίθετα, η αργή ψύξη πιθανόν να οδηγήσει στο σχηματισμό πολύ μεγαλύτερων κρυστάλλων

πάγου και κατά συνέπεια να καταστρέψει την ομοιογένεια και τη δομή του εκάστοτε δείγματος. Κατά τη διάρκεια της εξάχνωσης, η τιμή της επιβαλλόμενης πίεσης καθορίζει το ρυθμό με τον οποίο θα πραγματοποιηθεί η εξάχνωση. Ο ρυθμός αυτός επηρεάζει το ποσοστό πορώδους που σχηματίζεται στο εσωτερικό των ικριωμάτων καθώς και το μέγεθος των πόρων.

### **Ρυθμός ψύξης του υλικού**

Μελετήθηκαν τρεις ρυθμοί ψύξης, ένας αργός και σταδιακός, ένας ενδιάμεσος και ένας γρήγορος.

Αρχικά επιλέχθηκε ένας σχετικά αργός ρυθμός ψύξης. Το υλικό τοποθετήθηκε για σταδιακή ψύξη στους  $-5\text{ }^{\circ}\text{C}$  σε καταψύκτη. Μετά από διάστημα εικοσιτεσσάρων ωρών τοποθετήθηκε στο ειδικό μηχάνημα λυοφιλίωσης στους  $-55\text{ }^{\circ}\text{C}$  όπου ακολούθησε η εξάχνωση του νερού και η παραγωγή των ικριωμάτων.

Κατά την απευθείας ψύξη στους  $-55\text{ }^{\circ}\text{C}$  το υλικό τοποθετείται απευθείας στο ειδικό μηχάνημα λυοφιλίωσης, όπου και ξεκίνησε η διαδικασία του freeze drying και η παραγωγή ικριώματος.

Τέλος κατά την απότομη ψύξη του gel υδροξυαπατίτη χρησιμοποιήθηκε υγρό άζωτο, ψύχοντας το ακαριαία στους  $-190\text{ }^{\circ}\text{C}$ . Το υλικό βρισκόταν σε ειδικά πλαστικά καλούπια τα οποία εμβαπτίστηκαν σε δοχείο με υγρό άζωτο με αποτέλεσμα να παγώσει απότομα. Στη συνέχεια, τοποθετήθηκε αμέσως για εξάχνωση.

### **Ρυθμός εξάχνωσης**

Μετά από αρκετές πειραματικές διαδικασίες και έχοντας μια γενική εικόνα πως το τελικό πορώδες δίκτυο των ικριωμάτων επηρεάζεται από την επιβαλλόμενη πίεση κατά την διαδικασία παραγωγής τους, επιλέξαμε τις παρακάτω τιμές πίεσεως προκειμένου να μελετήσουμε σε ηλεκτρονικό μικροσκόπιο διερχόμενης δέσμης (SEM) το αποτέλεσμα κάθε τιμής πάνω στο τελικό μας προϊόν. Επιλέχθησαν να μελετηθούν δύο ακραίες και μια ενδιάμεση τιμή (0,7 mbar, 0,35 mbar, 0,1 mbar). Η επιλογή των τιμών αυτών προέκυψε μετά από την παρατήρηση του πορώδους των ικριωμάτων σε διάφορες τιμές πίεσης. Έχοντας πάντα κατά νου τον στόχο για την

παραγωγή ενός ικριώματος που εκτός της βιοσυμβατότητας θα φέρει και τις κατάλληλες μηχανικές αντοχές, όπως επίσης και ένα δίκτυο στο εσωτερικό του από μακροπόρους με ομοιόμορφη κατανομή μεγέθους των πόρων προκειμένου να είναι δυνατή η διέλευση θρεπτικών συστατικών από τα κύτταρα του ανθρώπινου σώματος, αποκλείσαμε τιμές μεγαλύτερες των **0,7 mbar** καθώς τα ικριώματα είχαν ικανοποιητικό πορώδες, αλλά παρουσίαζαν πολύ χαμηλές μηχανικές αντοχές. Επίσης δεν χρησιμοποιήθηκαν πιέσεις μικρότερες του **0,1 mbar** αφού τα παραγόμενα ικριώματα είχαν καλές μηχανικές αντοχές αλλά δεν είχαν ικανοποιητικό πορώδες.

### Τεχνικές Χαρακτηρισμού Υλικών

Οι κρύσταλλοι του υδροξυαπατίτη που αναπτύσσονται, χαρακτηρίζονται με βάση της μορφολογίας τους, του μεγέθους τους και της κρυσταλλικότητά τους κυρίως με τη χρήση Περίθλασης Ακτίνων X (XRD) και Υπέρυθρης Φασματομετρίας Μετασχηματισμού Fourier (FTIR). Τέλος με τη χρήση Ηλεκτρονικού Μικροσκοπίου Σάρωσης (SEM) εξετάζεται το εσωτερικό πορώδες δίκτυο αυτών, καθώς και η επίδραση της συγκέντρωσης του προστιθέμενου διασυνδέτη στο ποσοστό του μικροπορώδους και μακροπορώδους δικτύου που αναπτύσσεται.

#### Περιθλασιμετρία ακτίνων X (XRD)

Η τεχνική χαρακτηρισμού με βάση τις ακτίνες X περίθλασης (**XRD**) εκμεταλλεύεται την αλληλεπίδραση της ύλης και της ακτινοβολίας **X**, κάτω από ορισμένες συνθήκες, κάνοντας δυνατή τη μελέτη της κρυσταλλικής δομής και τον χαρακτηρισμό των υλικών τόσο σε ερευνητικές όσο και σε βιομηχανικές εφαρμογές. Η περίθλαση των ακτίνων X είναι μια διαδικασία εκπομπής ακτίνων X συγκεκριμένου μήκους κύματος  $\lambda$  επάνω στα επίπεδα του κρυσταλλικού πλέγματος των εξεταζόμενων ενώσεων. Με την πρόσπτωση των ακτίνων πάνω στο κρυσταλλικό στερεό, μπορεί είτε οι διάφορες ανακλώμενες δέσμες να μην είναι ομοφασικές (οπότε δεν παρατηρείται ενίσχυση της έντασης της ακτινοβολίας) είτε οι ανακλώμενες δέσμες για κάποια συγκεκριμένη γωνία πρόσπτωσης  $\theta$  (γωνία **Bragg**) να είναι ομοφασικές (οπότε συμβάλλουν με αποτέλεσμα την ενίσχυση της εξερχόμενης ακτινοβολίας). Η σχέση μεταξύ της γωνίας  $\theta$ , του μήκους κύματος  $\lambda$ , των ακτίνων  $\chi$  αλλά και της διαπλεγματικής απόστασης **d**, η οποία στα κρυσταλλικά στερεά είναι

της ίδιας τάξης μεγέθους με το μήκος κύματος  $\lambda$  της προσπίπτουσας ακτινοβολίας, δίνεται από την εξίσωση **Bragg**  $n\lambda = 2d\eta\mu\theta$ .

Η συσκευή περιθλασιμετρίας ακτίνων **X** αποτελείται από: πηγή ακτίνων **X** συγκεκριμένου μήκους κύματος  $\lambda$ , έναν ανιχνευτή ακτίνων  $\chi$  και ένα γωνιόμετρο. Η ένταση της περιθλώμενης ακτινοβολίας σε συνάρτηση με την γωνία  $2\theta$  καταγράφεται. Χρησιμοποιώντας την εξίσωση **Bragg** υπολογίζονται οι χαρακτηριστικές διαπλεγματικές αποστάσεις **d** για τα διάφορα επίπεδα. Από βάσεις δεδομένων λαμβάνονται οι φάσεις του προς εξέταση υλικού.

Η περιθλασιμετρία ακτίνων **X** βρίσκει εφαρμογή κυρίως στην έρευνα της ποιοτικής και ποσοτικής ανάλυσης φάσεων κυρίως μεταλλικών και κεραμικών υλικών, στον προσδιορισμό της κρυσταλλικότητας πολυμερών και ταχέως στερεοποιούμενων μετάλλων και στην ανίχνευση κρυσταλλογραφικού ιστού. Στα πλαίσια της παρούσας εργασίας, οι έλεγχοι με περιθλασιμετρία ακτίνων **X** έγιναν με την χρήση περιθλασίμετρου **XRD D8 Brucker** της σχολής Μεταλλειολόγων-Μεταλλουργών.

#### Υπέρυθρη Φασματομετρία Μετασχηματισμού Fourier (FTIR)

Η υπέρυθη περιοχή του φάσματος βρίσκεται μεταξύ της ορατής περιοχής και της περιοχής των μικροκυμάτων, δηλαδή μεταξύ 0,8 έως 300  $\mu\text{m}$  και διακρίνεται σε τρεις περιοχές :

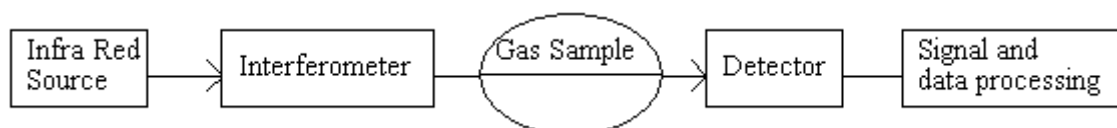
- α) το εγγύς IR (800nm έως 2,5 $\mu\text{m}$ )
- β) το κύριο IR (2,5 $\mu\text{m}$  έως 50 $\mu\text{m}$ )
- γ) το άπω IR (50 $\mu\text{m}$  έως 1000 $\mu\text{m}$ ).

Η φασματομετρία υπέρυθρου βασίζεται στην απορρόφηση υπέρυθρης ακτινοβολίας από τα μόρια μιας ένωσης, τα οποία διεγείρονται σε υψηλότερες στάθμες δόνησης ή περιστροφής. Ενεργά υπέρυθρες ενώσεις είναι μόνο αυτές στις οποίες οι δονήσεις και οι περιστροφές των ατόμων τους έχουν μία διαρκή διπολική ροπή, όπως στα μόρια που αποτελούνται από δύο ετεροάτομα ή στα μόρια όπου αλλάζει η διπολική ροπή κατά τη διάρκεια της δονητικής και περιστροφικής διαδικασίας. Η περιοδική αλλαγή της διπολικής ροπής λόγω περιστροφής ή δόνησης



επιτυγχάνεται μόνον σε ορισμένες συχνότητες. Απορρόφηση συμβαίνει όταν η προσπίπτουσα ακτινοβολία έχει την ίδια συχνότητα με τη συχνότητα του διπόλου.

Το φάσμα απορρόφησης υπερέθρου αποτελεί μία θεμελιώδη ιδιότητα κάθε μορίου και χρησιμεύει κυρίως στην ποιοτική ανάλυση, για τη διαλεύκανση της δομής μιας ένωσης, δηλαδή για τη φύση των δεσμών των ατόμων που βρίσκονται στο μόριο και τη διάταξη τους στο χώρο, δίνοντας το δακτυλικό αποτύπωμα μιας ουσίας. Από την άλλη πλευρά επειδή το ποσό της απορροφούμενης ενέργειας είναι συνάρτηση του αριθμού των υπαρχόντων μορίων, προκύπτουν από το φάσμα IR πληροφορίες και ως προς τη συγκέντρωση ενός συστατικού σε ένα δείγμα, συγκρίνοντας το βάθος μιας χαρακτηριστικής ταινίας απορρόφησης προς το βάθος της ίδιας ταινίας ενός φάσματος που περιέχει γνωστή συγκέντρωση του προς ανάλυση συστατικού.



**Εικόνα 24.** Βασικά τμήματα της λειτουργία του FTIR.

Τα βασικά τμήματα του FTIR απεικονίζεται σχηματικά στο Εικόνα 24. Η πηγή υπέρυθρης ακτινοβολίας εκπέμπει σε μία ευρεία ζώνη διαφορετικών μηκών κύματος της υπέρυθρης ακτινοβολίας. Η πηγή υπερέθρων που χρησιμοποιείται κατά κύριο λόγο είναι ένα κεραμικό SiC στη θερμοκρασία των 1550K. Η ακτινοβολία IR διέρχεται από το συμβολόμετρο και ρυθμίζει την υπέρυθρη ακτινοβολία. Το συμβολόμετρο εκτελεί οπτικό αντίστροφο μετασχηματισμό Fourier κατά την είσοδο της ακτινοβολία IR. Η διαμορφωμένη δέσμη υπερέθρων περνά διαμέσου του δείγματος αερίων όπου απορροφάται σε διαφορετικό βαθμό από τα υπάρχοντα μόρια σε διάφορα μήκη κύματος. Τέλος, η ένταση της δέσμης υπερέθρων ανιχνεύεται από έναν ανιχνευτή. Το σήμα που ανιχνεύεται ψηφιοποιείται και τροποποιείται κατά Fourier από τον υπολογιστή ώστε να ληφθεί το φάσμα υπερέθρου του δείγματος.

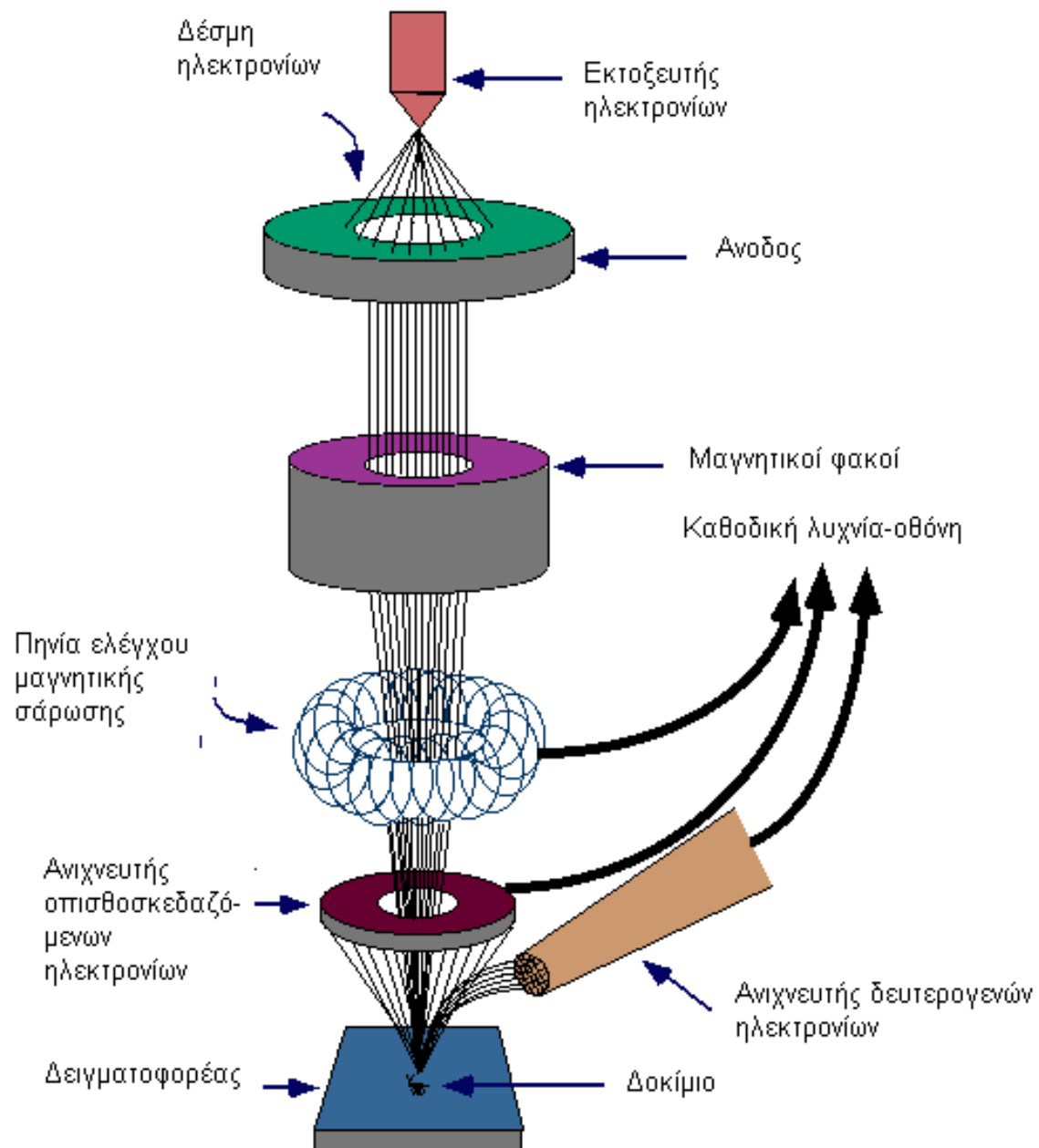
#### Ηλεκτρονική μικροσκοπία Σάρωσης (SEM)

Αρχή λειτουργίας Ηλεκτρονικού Μικροσκοπίου Σάρωσης (Scanning Electron

Microscope,SEM)

Τα βασικά τμήματα ενός Ηλεκτρονικού Μικροσκοπίου Σάρωσης φαίνονται στην παρακάτω εικόνα. (Εικόνα 25)

Η στήλη παραγωγής και εστίασης της δέσμης ηλεκτρονίων, λειτουργεί σε κενό ( $<10^3$  Pa).Γενικά μια δέσμη ηλεκτρονίων δεν μπορεί να παραχθεί ή να διατηρηθεί χωρίς την ύπαρξη κενού.



Εικόνα 25. Βασικά τμήματα Ηλεκτρονικού Μικροσκοπίου Σάρωσης.

Πιο συγκεκριμένα τα μόρια του αέρα αλληλεπιδρούν με τη δέσμη των ηλεκτρονίων με αποτέλεσμα η δέσμη αυτή να γίνεται εξαιρετικά ασταθής. Πέρα όμως από αυτό, είναι δυνατόν η αλληλεπίδραση αυτής της δέσμης των ηλεκτρονίων με τα μόρια του αέρα να προκαλέσει ιονισμό των ηλεκτρονίων, που βρίσκονται στην τελευταία στοιβάδα των τελευταίων. Κάτι τέτοιο θα παρήγαγε τυχαίες αποφορτίσεις που θα μείωναν την ευκρίνεια και την απόδοση των Ηλεκτρονικών Μικροσκοπίων Σάρωσης.

Πηγή των ηλεκτρονίων είναι ένα απλό νημάτιο, κατασκευασμένο συνήθως από Βολφράμιο. Το νημάτιο αυτό, που έχει ελικοειδές σχήμα, λειτουργεί ως κάθοδος. Στην κάθοδο εφαρμόζεται ισχυρή τάση με αποτέλεσμα αυτή να θερμανθεί. Η άνοδος, θετική, σε σχέση με την δέσμη των ηλεκτρονίων, ασκεί ισχυρές ελκτικές δυνάμεις στα ηλεκτρόνια. Αυτό τα αναγκάζει να επιταχυνθούν προς την άνοδο. Η δέσμη αυτή (πρωτογενή ηλεκτρόνια) διερχόμενη μέσω μιας σειράς μαγνητικών φακών, επιταχύνεται, συγκεντρώνεται και εστιάζεται πάνω στην επιφάνεια του δοκιμίου. Το υπό εξέταση δοκίμιο σαρώνεται από την προσπίπτουσα δέσμη ηλεκτρονίων, τα εκπεμπόμενα από την επιφάνεια του δοκιμίου ηλεκτρόνια συλλέγονται και ενισχύονται έτσι ώστε να δημιουργήσουν ένα οπτικό σήμα σε μια οθόνη που σαρώνεται με την ίδια συχνότητα.

Το είδος της εκπεμπόμενης ακτινοβολίας από την επιφάνεια του δοκιμίου, εξαρτάται από την αλληλεπίδραση των πρωτογενών ηλεκτρονίων και των ατόμων του υλικού, και μπορεί να είναι:

#### *Ηλεκτρόνια Auger*

Είναι τα ηλεκτρόνια που προέρχονται από την αλληλεπίδραση των πρωτογενών ηλεκτρονίων και των υποστοιβάδων των επιφανειακών ατόμων (σε βάθος έως 1nm). Το φάσμα που προκύπτει είναι κατάλληλο για στοιχειομετρικές χημικές αναλύσεις της επιφάνειας του υλικού.

#### *Δευτερογενή ηλεκτρόνια*

Είναι τα ηλεκτρόνια που προέρχονται από τις ανελαστικές κρούσεις των πρωτογενών ηλεκτρονίων με τα άτομα των επιφανειακών στρωμάτων (βάθους έως 10nm). Έχουν ενέργεια ίση με 50eV και προέρχονται από την αμέσως επόμενη βαθμίδα της επιφάνειας. Η ένταση του σήματος από τη δέσμη των δευτερογενών

ηλεκτρονίων αφορούν κυρίως την τοπογραφία της επιφάνειας.

#### *Οπισθοσκεδαζόμενα ηλεκτρόνια*

Είναι τα ηλεκτρόνια που προέρχονται από τις ελαστικές συγκρούσεις μεταξύ των πρωτογενών και των ατόμων των επιφανειακών στρωμάτων (βάθους έως 100nm). Η ενέργεια τους κυμαίνεται από 5 έως 50keV και η ένταση του παραγόμενου σήματος εξαρτάται από τον ατομικό αριθμό των στοιχείων της επιφάνειας και από τον κρυσταλλογραφικό προσανατολισμό, ενώ η αντίθεση που δημιουργείται είναι πολύ μεγαλύτερη από αυτήν που επιτυγχάνεται με τη χρήση των δευτερογενών ηλεκτρονίων.

#### *Ακτίνες-X*

Τα οπισθοσκεδαζόμενα ηλεκτρόνια σε συνδυασμό και με τις ακτίνες X δίνουν πληροφορίες για τη χημική σύσταση του δείγματος. Οι ακτίνες X παράγονται από το επιφανειακό στρώμα του δοκιμίου έως το βάθος του 1μm και εξαρτώνται από το είδος των ατόμων της επιφάνειας. Η ανάλυση των εκπεμπόμενων ακτινών X οδηγεί σε χημική ανάλυση της επιφανείας (γνωστή και ως μικροανάλυση ακτινών X), η οποία γίνεται συνήθως παράλληλα με την παρατήρηση στο Ηλεκτρονικό Μικροσκόπιο Σάρωσης. Μέσα στο θάλαμο που τοποθετείται το δοκίμιο και ο οποίος βρίσκεται στη βάση της στήλης παραγωγής και εστίασης της δέσμης των ηλεκτρονίων είναι τοποθετημένοι ειδικοί ανιχνευτές που σκοπό έχουν να συλλέγουν τα εκπεμπόμενα από την επιφάνεια του δοκιμίου ηλεκτρόνια. Ο χειριστής του μικροσκοπίου έχει τη δυνατότητα να επιλέξει ποιον ανιχνευτή θα χρησιμοποιήσει κάθε φορά. Χρησιμοποίηση του ανιχνευτή δευτερογενών ηλεκτρονίων παράγει μια μεγάλης ευκρίνειας τοπογραφική εικόνα του δείγματος. Αντίθετα ο ανιχνευτής των οπισθοσκεδαζομένων ηλεκτρονίων παράγει μια εικόνα που είναι χρήσιμη κατά τον καθορισμό της σύνθεσης του δείγματος. Σε αυτή κάθε στοιχείο στο δείγμα εμφανίζεται ως διαφορετική σκιά, από σχεδόν άσπρο έως μαύρο

Κατά την χρήση του SEM, η στήλη πρέπει να βρίσκεται υπό κενό για να μπορεί να παραχθεί και διατηρηθεί σταθερή η ακτίνα των ηλεκτρονίων. Ειδικά τα ηλεκτρόνια συγκρούονται με τα μόρια του αέρα και απορροφώνται. Το κενό επιτυγχάνεται με την χρήση δύο αντλιών και είναι της τάξης των 2 Pa.

Σύστημα ανίχνευσης:

Περιλαμβάνει τους διαφόρους ανιχνευτές που δέχονται τα σήματα τα οποία παράγονται από την αλληλεπίδραση της δέσμης ηλεκτρονίων με το δείγμα και το σύστημα παρουσίασης (μεγέθυνση-παρουσίαση-καταγραφή). Οι ανιχνευτές που διαθέτει το Jeol 6300 είναι ανιχνευτές δευτερογενών ηλεκτρονίων (ETD) και ανιχνευτής οπισθοσκεδαζόμενων ηλεκτρονίων (BSE). Επίσης είναι εξοπλισμένος με ένα φασματοφωτόμετρο (SiLi), με τον οποίο ανιχνεύουμε ενεργειακή διασπορά ακτίνων - X (Energy Dispersive Spectrometer, EDS), διαμέσω ανιχνευτή διόδου λιθίου – πυριτίου.

Προετοιμασία του δείγματος

Οι διαστάσεις του υπό εξέταση δείγματος χρειάζεται να είναι κατάλληλου μέγεθος, ώστε να τοποθετηθεί με ασφάλεια στο μικροσκόπιο. Στην περίπτωση του Εργαστηρίου, ο θάλαμος του Jeol 6300, δέχεται δείγματα που δεν πρέπει να ξεπερνούν σε διαστάσεις τα 2 cm.

Αρχικά λοιπόν, τοποθετούμε τμήμα του υλικού που μας ενδιαφέρει να εξετάσουμε διαστάσεων ~ 2 cm. Στο στάδιο αυτό απαιτείται ιδιαίτερα μεγάλη προσοχή και δεξιότητα από τον χειριστή του κοπτικού, αφού πλέον κόβει επί της θραυσιγενούς επιφάνειας, με κάθε λάθος να αποτελεί και την καταστροφή αυτής.

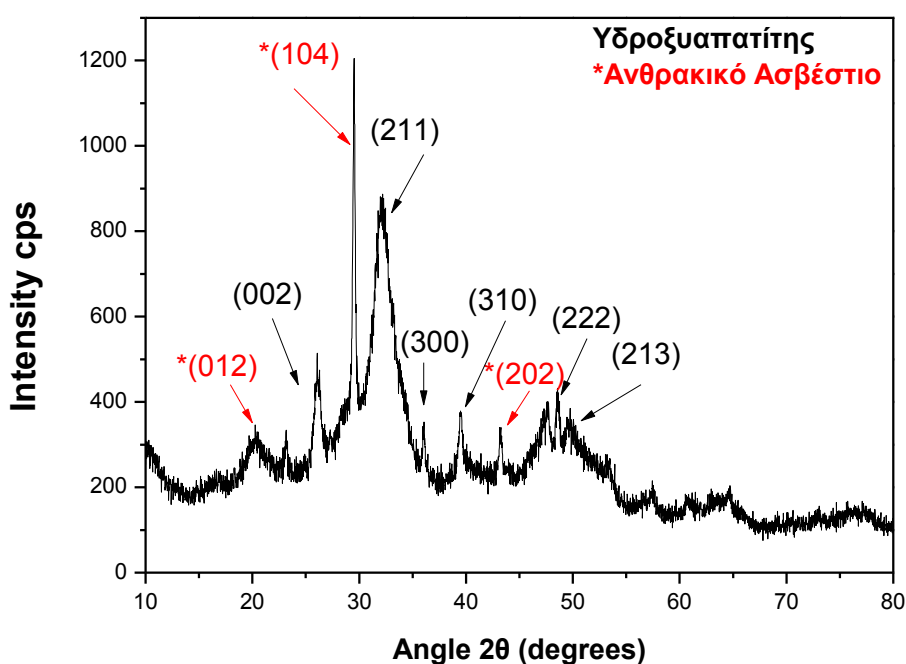
Μετά τη δημιουργία κατάλληλων σε μέγεθος δειγμάτων, ακολουθεί ο καθαρισμός τους από κάθε είδους ακαθαρσία και η επιχρύσωσή τους. Τα δείγματα στη συνέχεια τοποθετούνται στο SEM.

## ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

### Περίθλαση Ακτίνων X (XRD)

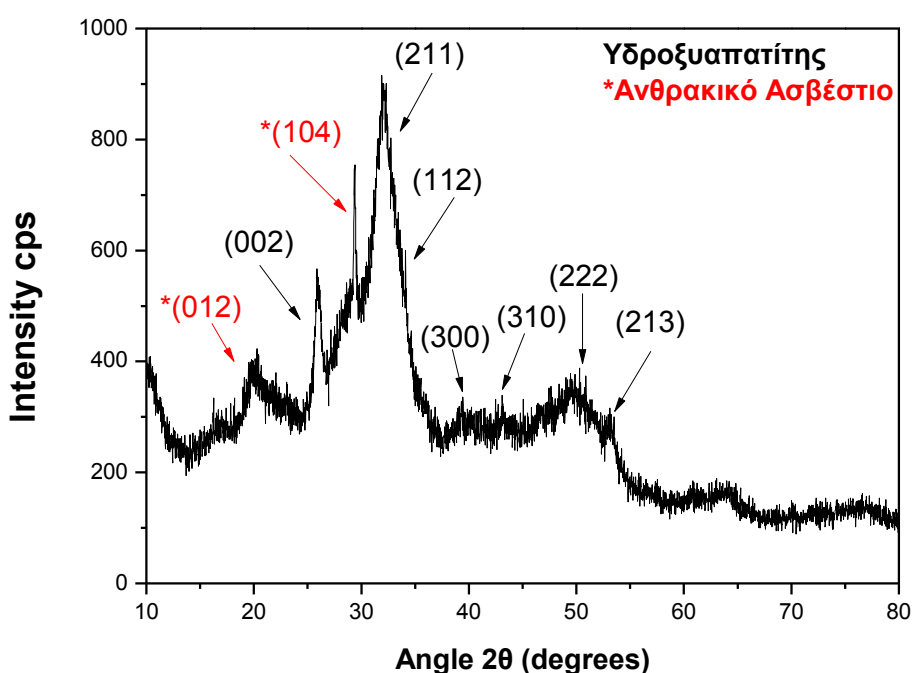
Η κρυσταλλική δομή των παραγόμενων ικριωμάτων μελετήθηκε με Περίθλαση Ακτίνων X με χρήση περιθλασίμετρου Bruker D8 Focus με λυχνία  $\text{CuK}\alpha_1$  και φίλτρο νικελίου. Η ανάλυση αυτή πραγματοποιείται για να ελεγχθεί η κρυσταλλική δομή των δειγμάτων του υδροξυαπατίτη που αναπτύχθηκαν και από τα οποία προέκυψαν τα τρισδιάστατα ικριώματα.

Συγκρίνοντας τα Σχήματα 1 και 2 με το χαρακτηριστικό φάσμα του εξαγωνικού κρυσταλλικού υδροξυαπατίτη (JCPDS 9-432), παρατηρείται ότι και στις δύο περιπτώσεις έχουν αναπτυχθεί κρύσταλλοι υδροξυαπατίτη στο αρχικό αιώρημα που χρησιμοποιήθηκε για την παρασκευή των τρισδιάστατων ικριωμάτων.

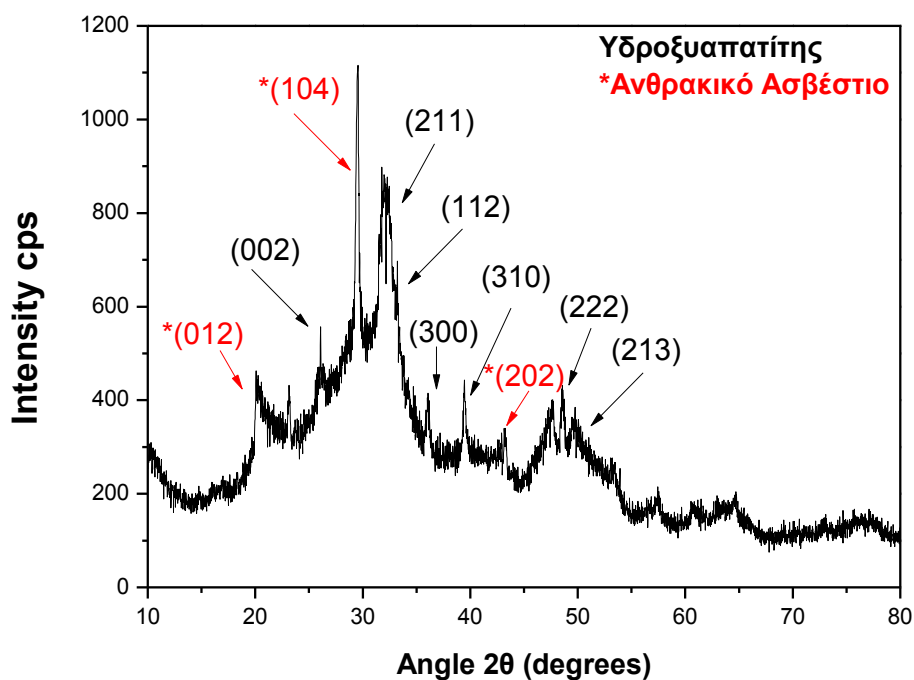


**Σχήμα 1.** Φάσμα ανάλυσης ακτίνων X από ικρίωμα υδροξυαπατίτη – χιτοζάνης - αργινίνης διασυνδεδεμένο σε ποσοστό 1,67% με διάλυμα γλουταραλδεύδης.

Οι κορυφές που εμφανίζονται στα φάσματα αντιστοιχούν στα κρυσταλλικά επίπεδα του εξαγωνικού υδροξυαπατίτη που συναντάται στο φυσικό οστό, ενώ δεν παρατηρούνται καθόλου κορυφές πρόδρομων φάσεων υδροξυαπατίτη (π.χ. μπρουσίτης ή μονετίτης). Επιπλέον και στα δύο σχήματα εμφανίζονται και κορυφές που αντιστοιχούν σε ανθρακικό ασβέστιο, το οποίο πιθανόν να δημιουργείται κατά τη διάρκεια της λυοφιλίωσης των αιωρημάτων του υδροξυαπατίτη, καθώς οι αντίστοιχες κορυφές παρατηρούνται και στην ανάλυση ακτίνων X του δείγματος που έχει υποστεί λυοφιλίωση αλλά όχι διασύνδεση (σχήμα 3).



**Σχήμα 2.** Φάσμα ανάλυσης ακτίνων X από ικρίωμα υδροξυαπατίτη – χιτοζάνης - αργινίνης διασυνδεδεμένο με γενιπίνη σε αναλογία μαζών Chit:Gen = 100:1.



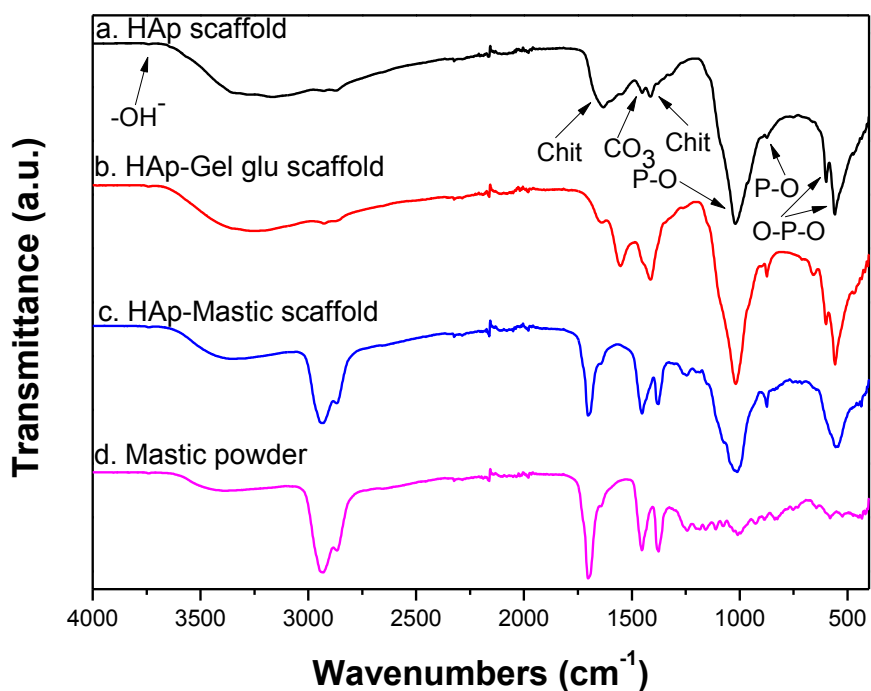
**Σχήμα 3.** Φάσμα ανάλυσης ακτίνων X από ικρίωμα υδροξυαπατίτη – χιτοζάνης - αργινίνης χωρίς διασύνδεση.

### **Υπέρυθρη Φασματομετρία Μετασχηματισμού Fourier (FTIR)**

Η αλληλεπίδραση μεταξύ των ανόργανων και οργανικών ενώσεων της αντίδρασης εξετάστηκε με Υπέρυθρη Φασματομετρία με Μετασχηματισμό Fourier κάνοντας χρήση φασματόμετρου Nicolet 6700 (το οποίο διαθέτει κρύσταλλο Smart Orbit, Thermo Electron Corporation, Madison, WI).

Σε συμφωνία με τα αποτελέσματα από την ανάλυση με XRD, η υπέρυθη φασματομετρία μετασχηματισμού Fourier αποδεικνύει την ανάπτυξη υδροξυαπατίτη στα δείγματα που χρησιμοποιήθηκαν για την ανάπτυξη των ικριωμάτων. Από τα φάσματα του σχήματος 4 παρατηρείται σε όλες τις περιπτώσεις μία χαρακτηριστική κορυφή περίπου στα  $3700\text{ cm}^{-1}$ , που αντιστοιχεί στη συμμετρική έκταση καθώς και μία κορυφή στα  $629\text{ cm}^{-1}$  που αναφέρεται στην κάμψη της ομάδας του  $\text{OH}^-$  του υδροξυαπατίτη [37, 38].





**Σχήμα 4.** Φάσματα ανάλυσης υπέρυθρης φασματοσκοπίας για a. Ικρίωμα HAp διασυνδεδεμένο με διάλυμα γλουταραλδεϋδης, b. Ικρίωμα HAp το οποίο περιέχει και την υδρογέλη ζελατίνης, c. Ικρίωμα HAp επικαλυμμένο με Μαστίχα και d. Σκόνη Μαστίχας.

Η κορυφή στα  $1019\text{ cm}^{-1}$  αναφέρεται στις χαρακτηριστικές συμμετρικές και μη συμμετρικές εκτάσεις του δεσμού P-O ενώ η κορυφή στα  $961\text{ cm}^{-1}$  αντιστοιχεί στην εκτατική δόνηση του ίδιου δεσμού [38, 39]. Επιπλέον παρατηρούνται οι κορυφές στα  $599$  και  $558\text{ cm}^{-1}$ , που αναφέρονται στις τάσης κάμψης του δεσμού O-P-O. Οι κορυφές που εντοπίζονται στα  $1414$  και  $1452\text{ cm}^{-1}$  υποδεικνύουν τις εκτατικές δονήσεις των ομάδων του καρβοξυλίου, λόγω των ιχνών  $\text{CO}_2$  που υπάρχουν στο διάλυμα [40, 41]. Οι κορυφές αυτές αποτελούν ένδειξη της ύπαρξης ανθρακικών αλάτων στα ικρίωματα. Τέλος, οι χαρακτηριστικές κορυφές του μορίου της χιτοζάνης στα  $1380$ ,  $1320$  και  $1650\text{ cm}^{-1}$  είναι επίσης εμφανείς σε όλα τα φάσματα [1].

Από τα φάσματα του Σχήματος 4 παρατηρείται επίσης η ύπαρξη των κορυφών που αντιστοιχούν στην παρουσία της μαστίχας, στην περίπτωση των ικριωμάτων που έχουν αναπτυχθεί με χρήση της φυτικής αυτής ρητίνης, όπως φαίνεται από τη σύγκριση με το φάσμα απορρόφησης πούδρας μαστίχας (Σχήμα 3c και 3d).

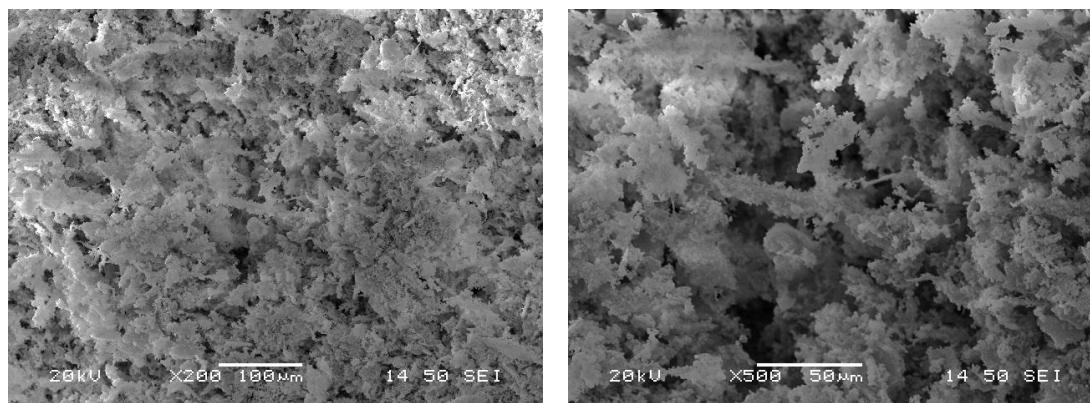
## Ηλεκτρονική Μικροσκοπία Σάρωσης (SEM)

### Μελέτη Συνθηκών Λυοφιλίωσης

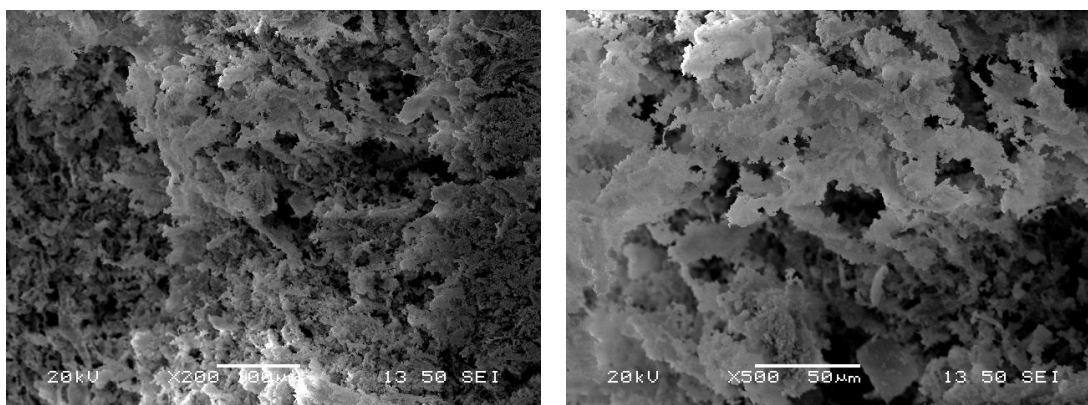
Ο χαρακτηρισμός της πορώδους δομής των ικριωμάτων υδροξυαπατίτη έγινε με τη λήψη εικόνων από ηλεκτρονικό μικροσκόπιο σάρωσης τύπου JEOL 6380LV (USA) με συνθήκες λειτουργίας 20kV και απόσταση εργασίας 15mm. Εξετάσθηκαν τρεις διαφορετικοί ρυθμοί ψύξης και η επιβολή τριών διαφορετικών τιμών πίεσεως κατά τη λυοφιλίωση.

Στα παρακάτω σχήματα παρουσιάζονται εικόνες ηλεκτρονικής μικροσκοπίας SEM εγκάρσιων και κάθετων τομών ικριωμάτων Υδροξυαπατίτη – Χιτοζάνης – Αργινίνης με προσθήκη γλουταραλδεΐδης σε αναλογία 1.7% επί του αριθμού των αμινομάδων που περιέχονται στα πολυμερή που χρησιμοποιούνται. Η σύνθεση των ικριωμάτων στην περίπτωση αυτή, παραμένει μονίμως σταθερή και μεταβάλλονται οι συνθήκες λυοφιλίωσης, ώστε να μελετηθεί η επίδρασή τους στο εσωτερικό πορώδες δίκτυο που αναπτύσσεται στα ικρίωματα (σχήμα, μέγεθος και κατανομή μεγέθους πόρων).

### Εγκάρσια τομή



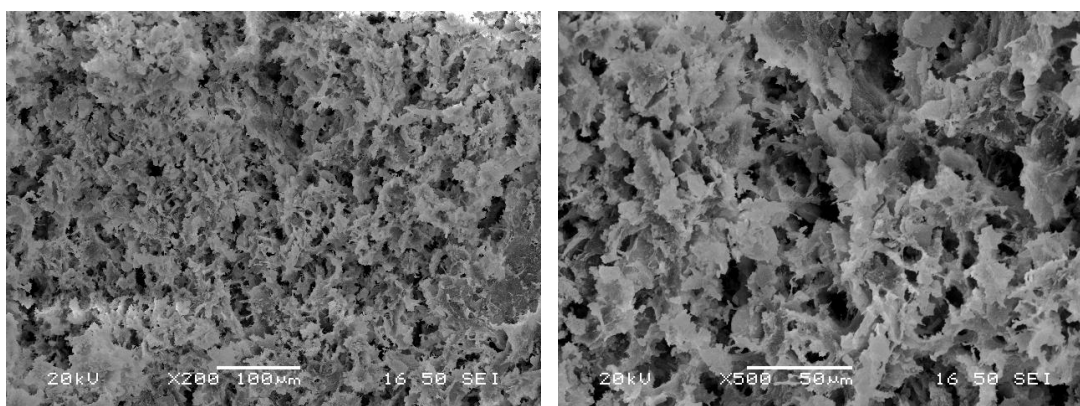
### Κάθετη τομή



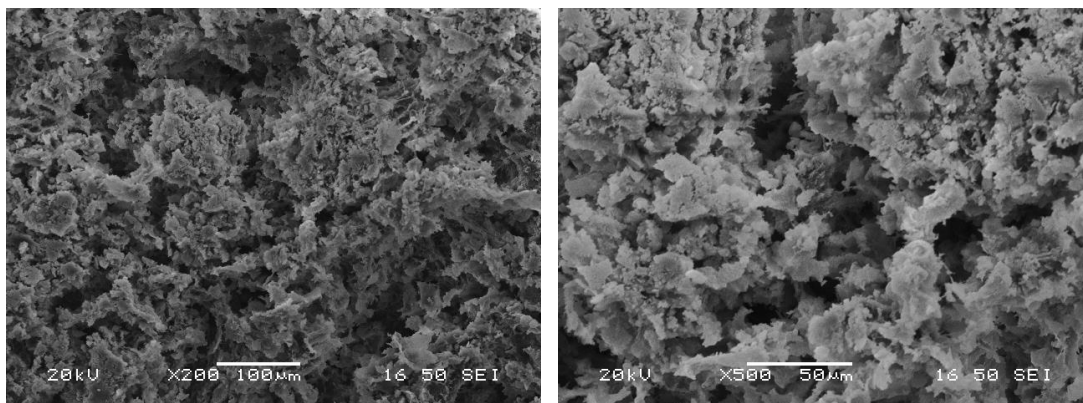
**Σχήμα 5.** Εικόνες Ηλεκτρονικού Μικροσκοπίου Σάρωσης από εγκάρσια και κάθετη τομή ικρίωματος Υδροξυαπατίτη – Χιτοζάνης – Αργινίνης, στο οποίο έγινε σταδιακή ψύξη πριν τη λυοφιλίωση στους  $-5^{\circ}\text{C}$  και στη συνέχεια στους  $-55^{\circ}\text{C}$ .

Οι εικόνες SEM απεικονίζουν το εσωτερικό πορώδες δίκτυο που έχει αναπτυχθεί στο εσωτερικό του ικρίωματος υδροξυαπατίτη. Παρατηρείται η ανάπτυξη ικανοποιητικού και ομοιόμορφου εσωτερικού πορώδους δικτύου το οποίο αποτελείται από πόρους μεγέθους 5 έως 10  $\mu\text{m}$  και μεγαλύτερους πόρους με μέση τιμή μεγέθους τα 50  $\mu\text{m}$ , ενώ εντοπίζονται και ορισμένοι πόροι που ξεπερνούν τα 100  $\mu\text{m}$ .

### Εγκάρσια τομή



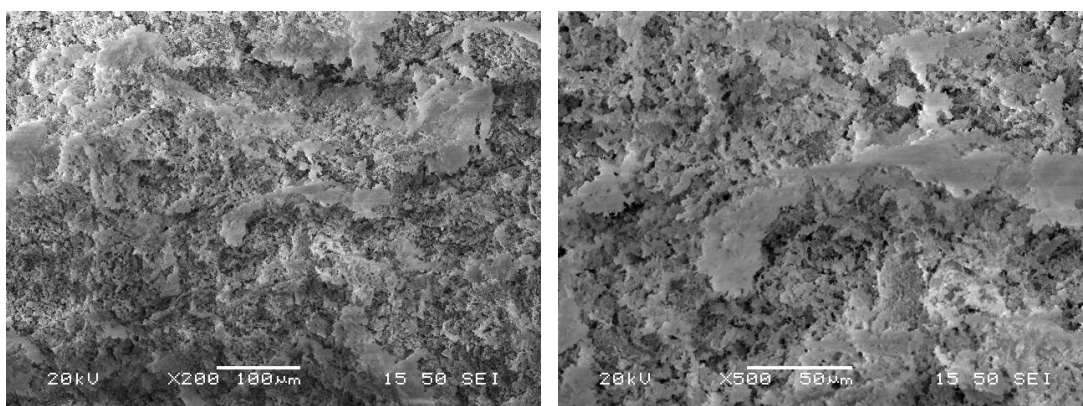
### Κάθετη τομή



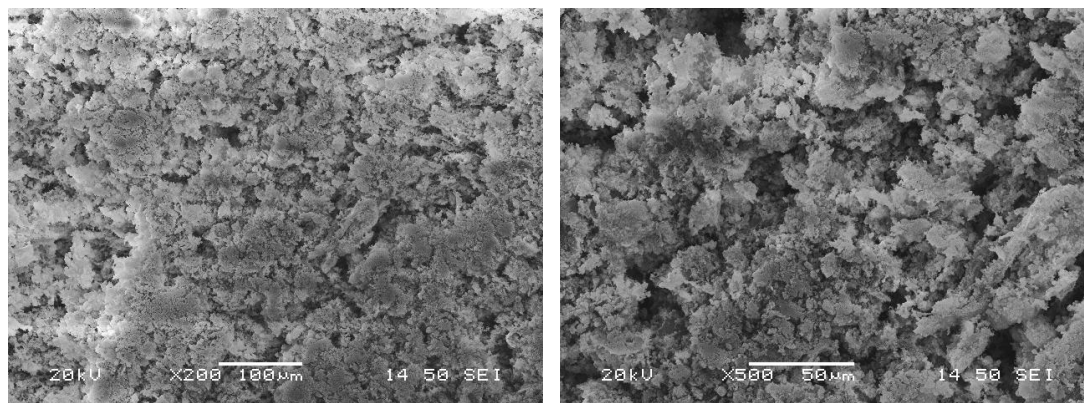
**Σχήμα 6.** Εικόνες Ηλεκτρονικού Μικροσκοπίου Σάρωσης από εγκάρσια τομή και κάθετη τομή κριώματος Υδροξυαπατίτη – Χιτοζάνης – Αργινίνης, στο οποίο έγινε κατευθείαν ψύξη πριν τη λυοφιλίωση στους  $-55\text{ }^{\circ}\text{C}$ .

Στην περίπτωση που η ψύξη των αιωρημάτων πραγματοποιήθηκε κατευθείαν στους  $-55\text{ }^{\circ}\text{C}$ , το εσωτερικό των κριωμάτων που αναπτύσσονται, εμφανίζει και σε αυτήν την περίπτωση ομοιόμορφη δομή. Αποτελείται από εκτεταμένο πορώδες δίκτυο με πόρους της τάξεως των  $5 - 10\text{ }\mu\text{m}$  και μεγαλύτερους πόρους με μέγεθος περίπου στα  $100\text{ }\mu\text{m}$ .

### Εγκάρσια τομή



### Κάθετη τομή



**Σχήμα 7.** Εικόνες Ηλεκτρονικού Μικροσκοπίου Σάρωσης από εγκάρσια τομή και κάθετη τομή ικριώματος Υδροξυαπατίτη – Χιτοζάνης – Αργινίνης, στο οποίο έγινε ταχύτατη ψύξη πριν τη λυοφιλίωση με υγρό άζωτο στους  $-196\text{ }^{\circ}\text{C}$ .

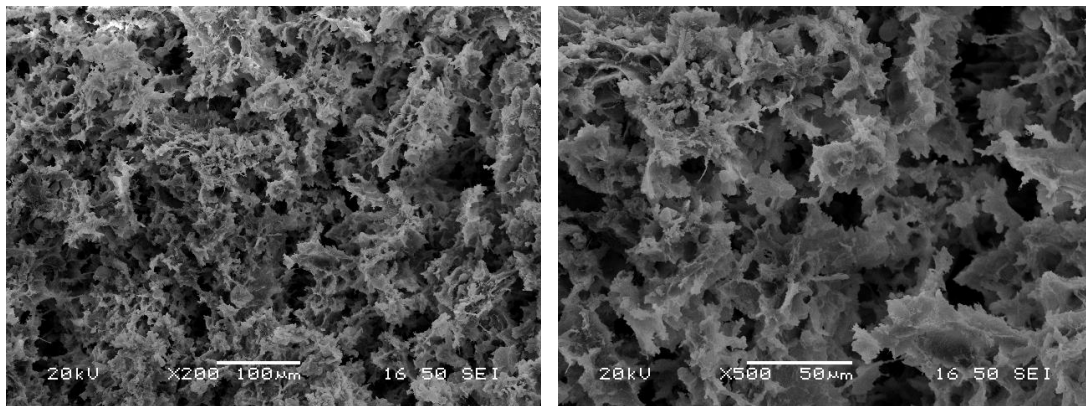
Αντίθετα, όταν η ψύξη των αιωρημάτων του υδροξυαπατίτη έγινε με τη χρήση υγρού αζώτου με το οποίο επιτυγχάνεται ψύξη στους  $-196\text{ }^{\circ}\text{C}$ , τα ικριώματα που αναπτύχθηκαν παρουσίασαν αρκετά διαφορετική δομή στο εσωτερικό τους. Στην περίπτωση αυτή παρατηρείται αισθητή μείωση του πορώδους δικτύου. Εντοπίζονται πόροι με μέγεθος περίπου 5 με 10  $\mu\text{m}$  ενώ δεν υπάρχουν σχεδόν καθόλου μεγαλύτερου μεγέθους πόροι.

Συγκρίνοντας τις εικόνες αυτές του μικροσκοπίου SEM μεταξύ τους (Σχήμα 5, 6 και 7), μπορεί να επιλεγεί ο βέλτιστος ρυθμός ψύξης των αιωρημάτων του υδροξυαπατίτη, ώστε να αναπτυχθούν ικριώματα με τις επιθυμητές ιδιότητες (μηχανικές αντοχές και εσωτερικό πορώδες δίκτυο). Συνεπώς, απορρίπτεται η γρήγορη ψύξη των αιωρημάτων του υδροξυαπατίτη με υγρό άζωτο καθώς οδηγεί σε ικριώματα χωρίς μεγάλους πόρους και ελάχιστους μικρούς με μέση τιμή μεγέθους τα 10  $\mu\text{m}$ . Ανάμεσα στον αργό και τον ενδιάμεσο ρυθμό ψύξης των αιωρημάτων παρατηρούνται λίγες διαφορές ως προς το εσωτερικό τους πορώδες δίκτυο. Ωστόσο, ως βέλτιστος ρυθμός ψύξης επιλέγεται η ψύξη κατευθείαν στους  $-55\text{ }^{\circ}\text{C}$ , διότι σε αυτήν την περίπτωση το μακροπορώδες δίκτυο αποτελείται από μεγαλύτερους πόρους (Σχήμα 6) σε σύγκριση με την σταδιακή ψύξη πρώτα στους  $-5\text{ }^{\circ}\text{C}$  και έπειτα στους  $-55\text{ }^{\circ}\text{C}$  (Σχήμα 5).

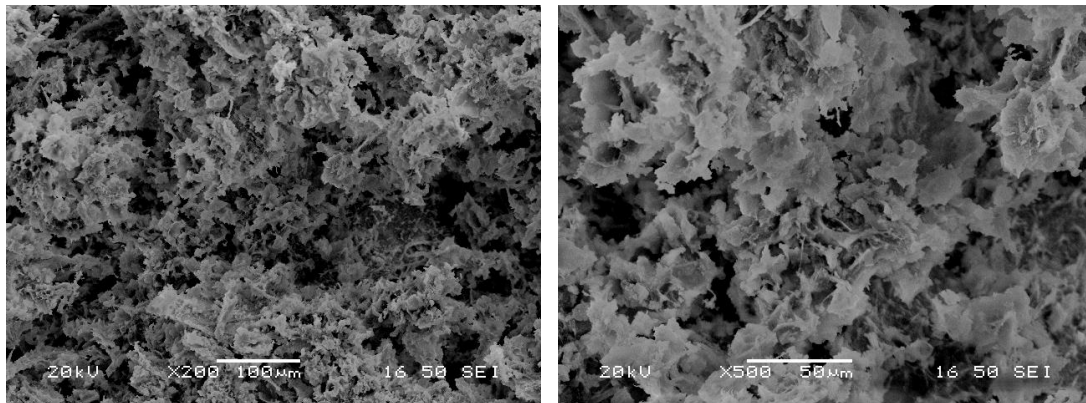
Στη συνέχεια παρουσιάζονται εικόνες από το Ηλεκτρονικό Μικροσκόπιο Σάρωσης για τα ικριώματα υδροξυαπατίτη τα οποία έχουν αναπτυχθεί με

διαφορετικούς ρυθμούς εξάχνωσης (διαφορετική τιμή επιβαλλόμενης πίεσης).

### Εγκάρσια τομή

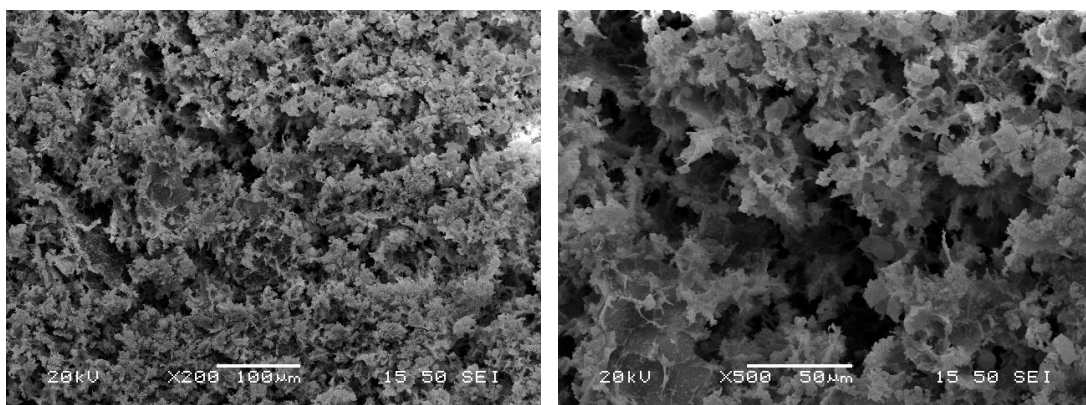


### Κάθετη τομή

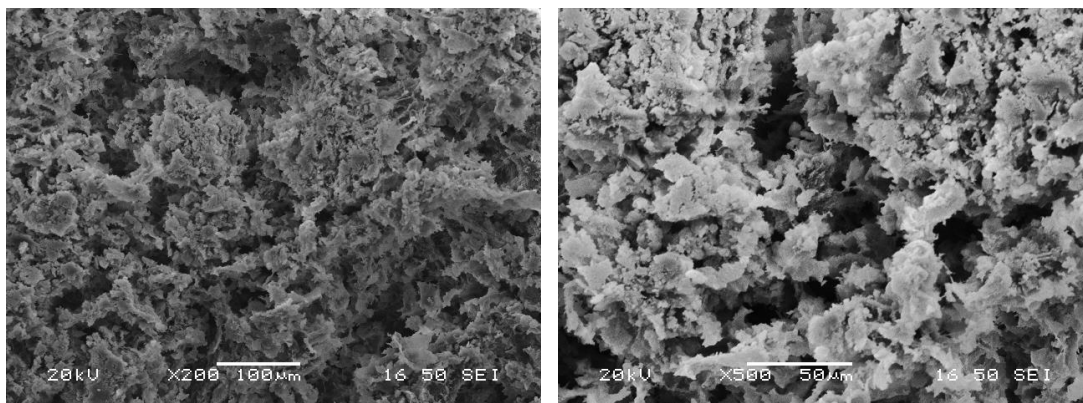


**Σχήμα 8.** Εικόνες Ηλεκτρονικού Μικροσκοπίου Σάρωσης από εγκάρσια τομή και κάθετη τομή ικρίωματος Υδροξυαπατίτη – Χιτοζάνης – Αργινίνης, στο οποίο έγινε εξάχνωση στα 0,7 mbar.

### Εγκάρσια τομή



### Κάθετη τομή



**Σχήμα 9.** Εικόνες Ηλεκτρονικού Μικροσκοπίου Σάρωσης από εγκάρσια τομή και κάθετη τομή ικριώματος Υδροξυαπατίτη – Χιτοζάνης – Αργινίνης, στο οποίο έγινε εξάχνωση στα 0,35 mbar.

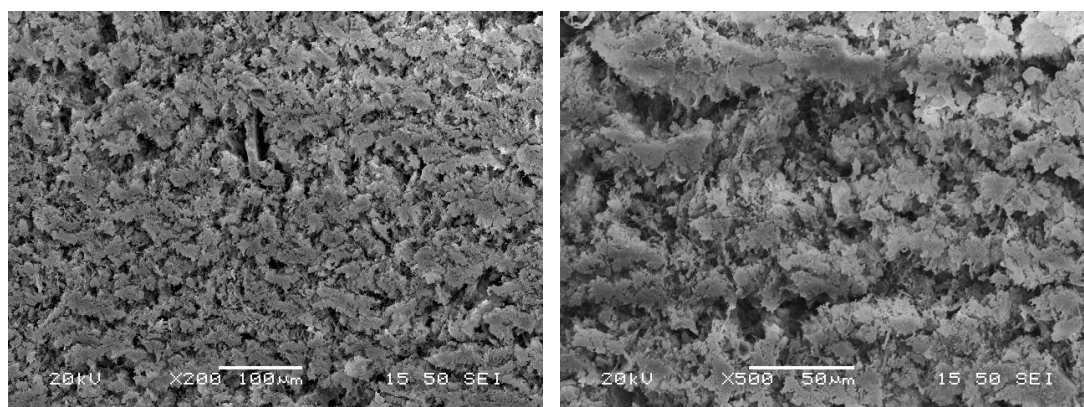
Στα Σχήματα 8 και 9 εμφανίζονται οι εικόνες από τα ικριώματα τα οποία αναπτύχθηκαν με εξάχνωση στα 0,7 και 0,35 mbar αντίστοιχα. Τα ικριώματα αυτά παρουσιάζουν παρόμοια εσωτερική δομή, η οποία αποτελείται από σύνθετο πορώδες δίκτυο με μικρούς και μεγάλους πόρους. Ωστόσο, στην περίπτωση της εξάχνωσης στα 0,7 mbar παρατηρούνται οι πόροι με το μεγαλύτερο μέγεθος, που σε ορισμένες περιπτώσεις ξεπερνούν και τα 200  $\mu\text{m}$ , ενώ καθώς η πίεση μειώνεται στα 0,35 mbar η μέση τιμή μεγέθους των πόρων μειώνεται με το μέγεθος τους να κυμαίνεται από 50 έως 100  $\mu\text{m}$ . Επιπλέον, από τις εικόνες αυτές εντοπίζεται και δίκτυο μικρότερων πόρων με μέση τιμή μεγέθους τα 10  $\mu\text{m}$ . Στην περίπτωση που η εξάχνωση πραγματοποιηθεί στα 0,1 mbar παρατηρείται εμφανής μείωση του ποσοστού των μεγαλύτερων πόρων (50-100  $\mu\text{m}$ ) και στο εσωτερικό των ικριωμάτων εμφανίζονται κυρίως μικροί πόροι (5-10  $\mu\text{m}$ ) (Σχήμα 10). Από τις εικόνες αυτές του SEM για τις διαφορετικές τιμές επιβαλλόμενης πίεσης οδηγούμαστε στο συμπέρασμα ότι η υποπίεση που δημιουργείται στο εσωτερικό του θαλάμου λυοφιλίωσης επηρεάζει το πορώδες δίκτυο που αναπτύσσεται στο εσωτερικό των ικριωμάτων. Αυτό πιθανόν οφείλεται σε φαινόμενα τοπικής τριχοειδούς συμπύκνωσης στο εσωτερικό τους. Πιο συγκεκριμένα οι κρύσταλλοι νερού, οι οποίοι έχουν δημιουργηθεί στο εσωτερικό των ικριωμάτων κατά τη διάρκεια της ψύξης, αναμένεται να εξαχνωθούν κατευθείαν στο εύρος πιέσεων που χρησιμοποιείται και στις τρεις περιπτώσεις σύμφωνα με το διάγραμμα φάσεων του νερού, καθώς οι συνθήκες αυτές εντοπίζονται κάτω από το



τριπλό σημείο του νερού. Παρόλα αυτά στην περίπτωση της εξάχνωσης στα 0,7 mbar μπορεί να θεωρηθεί ότι λόγω του φαινομένου της τριχοειδούς συμπύκνωσης, οι συνθήκες που επικρατούν στο εσωτερικό των πόρων οδηγούν σε πιθανή μερική υγροποίηση των κρυστάλλων του πάγου. Η υγροποίηση αυτή έχει σαν αποτέλεσμα την συνένωση ορισμένων κρυστάλλων νερού, κατά την εξάχνωση των οποίων δημιουργούνται και οι μεγαλύτερου μεγέθους πόροι που παρατηρήθηκαν στις εικόνες του SEM (Σχήμα 8). Η μείωση της επιβαλλόμενης πίεσης εξασφαλίζει ότι οι συνθήκες στο εσωτερικό των κριωμάτων θα επιφέρουν πλήρη εξάχνωση των κρυστάλλων του πάγου αποτρέποντας την πιθανή υγροποίηση αυτών. Η υπόθεση αυτή μπορεί να αιτιολογήσει το γεγονός ότι όσο μεώνεται η τιμή της πίεσης παρατηρείται και μείωση του μεγέθους των πόρων, για αυτό και στην περίπτωση της εξάχνωσης στα 0,1 mbar το πορώδες δίκτυο στο εσωτερικό του κριώματος διαφέρει από αυτό των κριωμάτων που έχουν υποστεί εξάχνωση σε μεγαλύτερες πιέσεις.

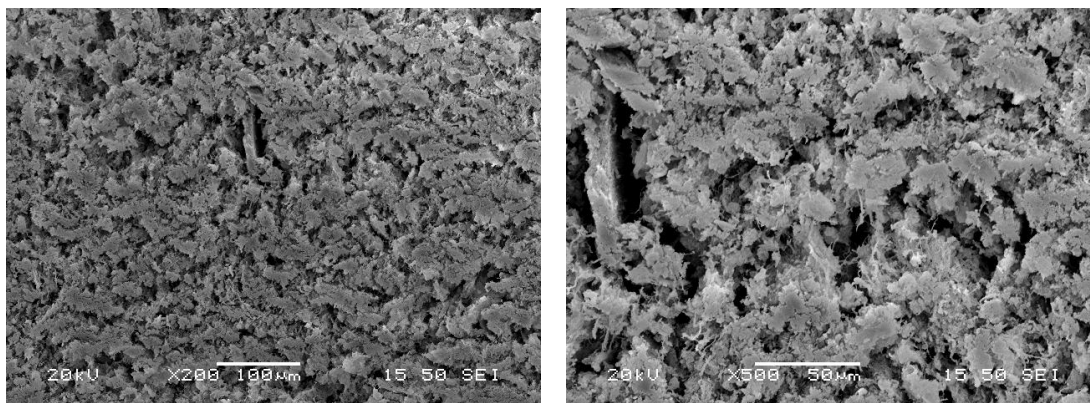
Από τις διαφορετικές τιμές επιβαλλόμενης πίεσης αυτή που επιλέχθηκε ως βέλτιστη είναι τα 0,35 mbar καθώς συνδυάζει εκτεταμένο εσωτερικό πορώδες δίκτυο και την καλύτερη μηχανική συμπεριφορά σε σύγκριση με τις άλλες δύο περιπτώσεις.

### Εγκάρσια τομή





### Κάθετη τομή

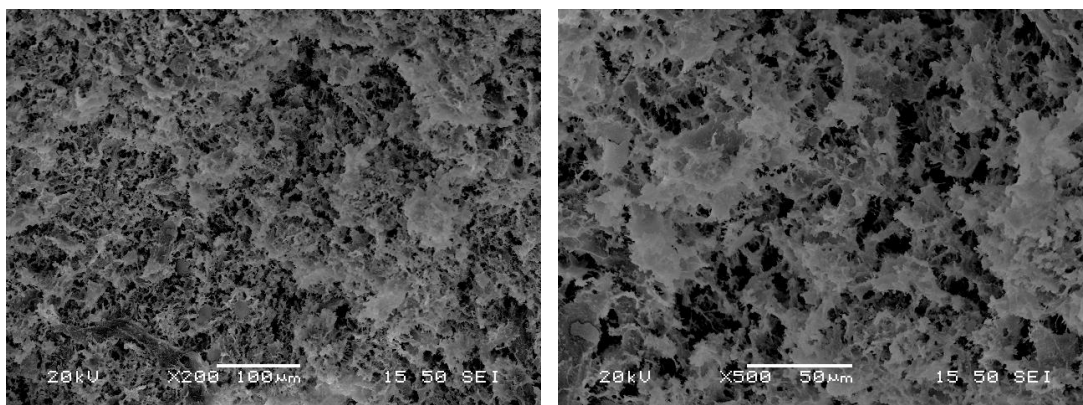


**Σχήμα 10.** Εικόνες Ηλεκτρονικού Μικροσκοπίου Σάρωσης από εγκάρσια τομή και κάθετη τομή ικριώματος Υδροξυαπατίτη – Χιτοζάνης – Αργινίνης, στο οποίο έγινε εξάχνωση στα 0,1mbar.

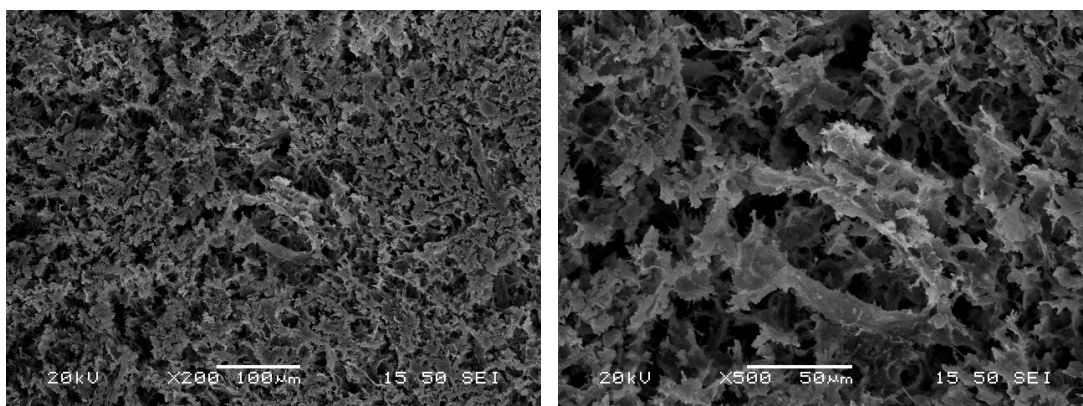
### Βελτίωση Μηχανικής Συμπεριφοράς

Στη συνέχεια επιχειρείται η βελτίωση των μηχανικών ιδιοτήτων των τρισδιάστατων ικριωμάτων που αναπτύσσονται από τα αιωρήματα υδροξυαπατίτη – χιτοζάνης – αργινίνης, κάνοντας χρήση των βέλτιστων συνθηκών λυοφιλίωσης (ρυθμός ψύξης και ρυθμός εξάχνωσης) όπως αυτές επιλέχθησαν παραπάνω, δηλαδή ψύξη στους  $-55\text{ }^{\circ}\text{C}$  και εξάχνωση στα 0,35 mbar. Τα ικριώματα που αναπτύχθηκαν με διασύνδεση με διάλυμα γλουταραλδεΐδης εμφανίζουν χαμηλές μηχανικές ιδιότητες και χαμηλή αντοχή σε υδατικό περιβάλλον. Για τη βελτίωση της μηχανικής συμπεριφοράς των τρισδιάστατων ικριωμάτων πραγματοποιήθηκε αρχικά διασύνδεση με έναν διαφορετικό διασυνδέτη. Πρόκειται για την γενιπίνη, έναν φυσικό πρωτεϊνικό διασυνδέτη ο οποίος βελτιώνει και αυτός τις μηχανικές αντοχές των παραγόμενων ικριωμάτων, εμφανίζοντας παράλληλα πολύ χαμηλή τοξικότητα σε σύγκριση με την διασύνδεση με γλουταραλδεΐδη.

### Εγκάρσια τομή



### Κάθετη τομή



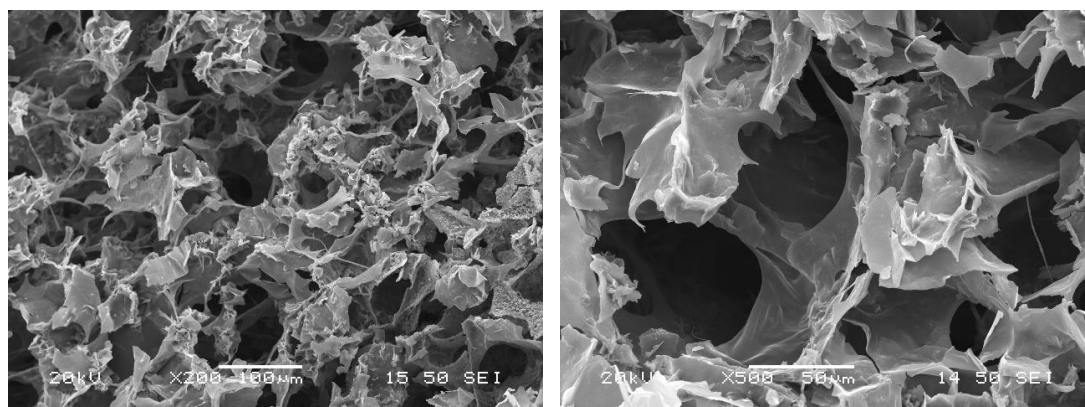
**Σχήμα 11.** Εικόνες Ηλεκτρονικού Μικροσκοπίου Σάρωσης από εγκάρσια και κάθετη τομή ικρίωματος Υδροξυαπατίτη – Χιτοζάνης – Αργινίνης, στο οποίο έχει πραγματοποιηθεί διασύνδεση με γενιπίνη σε ποσοστό 1%.

Τα ικρίωματα που αναπτύχθηκαν με διασύνδεση με τον φυσικό διασυνδέτη γενιπίνη, παρουσιάζουν βελτιωμένη μηχανική συμπεριφορά σε σύγκριση με αυτά που έχουν διασυνδεθεί με διάλυμα γλουταραλδεύδης και αυξημένη αντοχή σε υδατικό περιβάλλον, καθώς τα ικρίωματα αυτά παρέμειναν σε υδατικό περιβάλλον για διάστημα μεγαλύτερο από 2 εβδομάδες χωρίς να χάσουν το αρχικό τους σχήμα. Από τις εικόνες του μικροσκοπίου SEM (Σχήμα 10), παρατηρείται ότι στα ικρίωματα που έχουν διασυνδεθεί με γενιπίνη έχει δημιουργηθεί έντονο πορώδες δίκτυο παρόμοιο με αυτό που εμφανίζεται και στα ικρίωματα που έχουν διασυνδεθεί με γλουταραλδεύδη. Ομοίως και στην περίπτωση αυτή το πορώδες δίκτυο αποτελείται από πόρους με μεγαλύτερο μέγεθος που κυμαίνεται από 50 έως 100 µm και μικρότερους περίπου

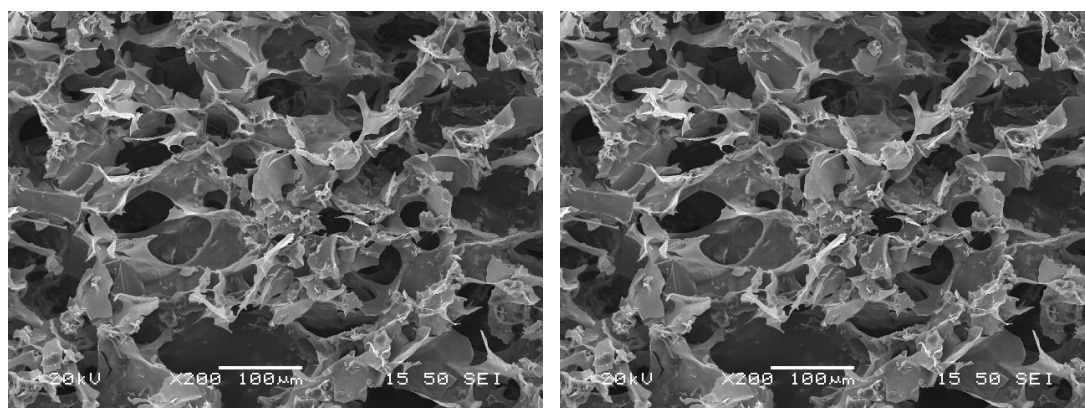
στα 10  $\mu\text{m}$ . Η πορώδης δομή είναι ομοιόμορφη τόσο στην κάθετη όσο και στην εγκάρσια τομή του ικριώματος χωρίς μεγάλη διακύμανση στο μέγεθος των πόρων.

Στη συνέχεια, εκτός από την διασύνδεση του υλικού με κάποιο οργανικό διασυνδέτη, επιχειρήθηκε η αύξηση των μηχανικών αντοχών των ικριωμάτων με την προσθήκη μιας βιοσυμβατής υδρογέλης στο αιώρημα του υδροξυαπατίτη, η οποία όπως αναφέρθηκε αποτελείται από ζελατίνη και διάλυμα οξικού οξέος. Η υδρογέλη αυτή είτε αναμείχθηκε απευθείας με το αιώρημα του υδροξυαπατίτη πριν τη λυοφιλίωση ή εναποτέθηκε σαν επικάλυψη στο τρισδιάστατο ικρίωμα. Στις εικόνες που ακολουθούν (Σχήμα 12 και 13) παρουσιάζονται οι εικόνες SEM από τις εγκάρσιες και κάθετες τομές των ικριωμάτων αυτών.

### Εγκάρσια τομή

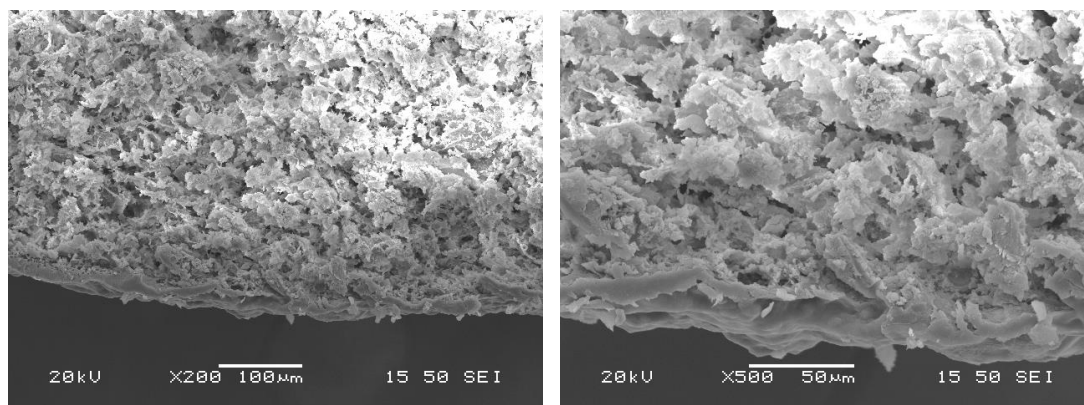


### Κάθετη τομή

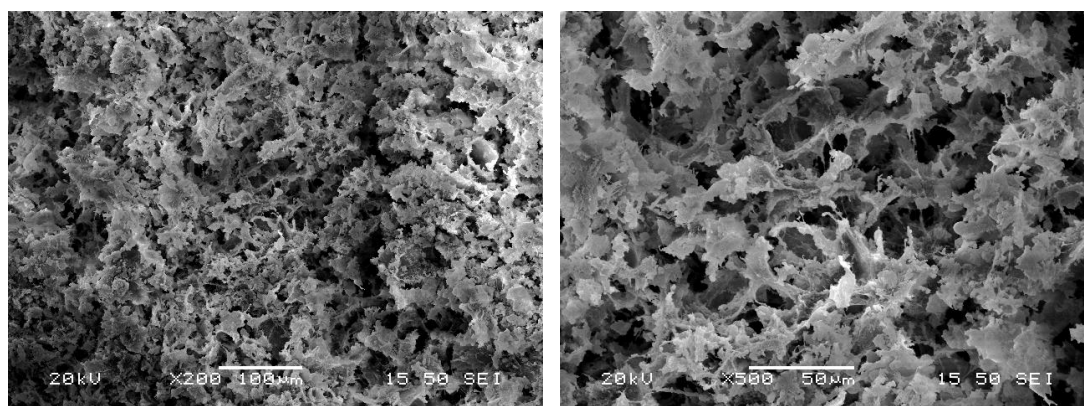


**Σχήμα 12.** Εικόνες Ηλεκτρονικού Μικροσκοπίου Σάρωσης από εγκάρσια και κάθετη τομή ικριώματος Υδροξυαπατίτη – Χιτοζάνης – Αργινίνης, στο οποίο έχει πραγματοποιηθεί διασύνδεση με 1,7% διαλύματος γλουταραλδεΐδης και έχει προστεθεί στο εσωτερικό του Υδρογέλη Ζελατίνης.

### Εγκάρσια τομή



### Κάθετη τομή



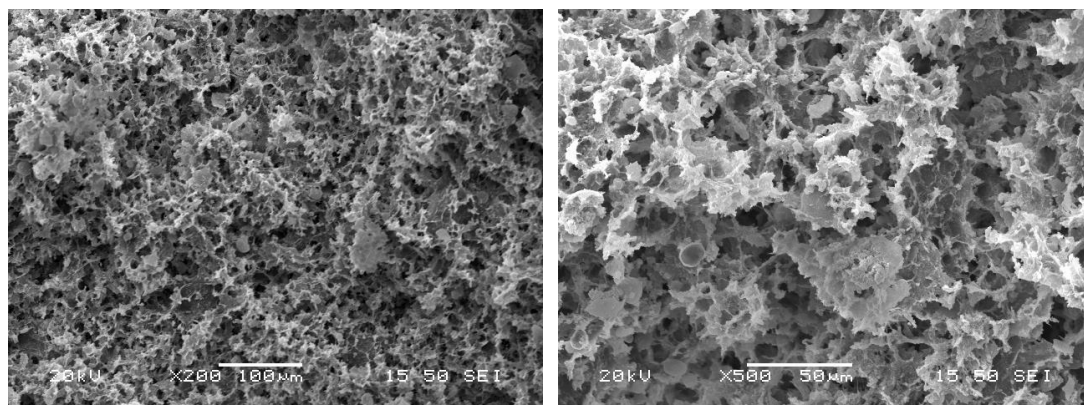
**Σχήμα 13.** Εικόνες SEM από εγκάρσια τομή και κάθετη τομή ικρίωματος Υδροξυ-απατίτη – Χιτοζάνης – Αργινίνης, στο οποίο έχει πραγματοποιηθεί διασύνδεση με 1,7% διαλύματος γλουταραλδεΰδης και επικάλυψη με την Υδρογέλη Ζελατίνης.

Στην περίπτωση που η υδρογέλη ζελατίνης αναμείχθηκε με το αρχικό αιώρημα του υδροξυαπατίτη πριν από την λυοφιλίωση, τα ικρίωματα που αναπτύχθηκαν εμφάνισαν αισθητά βελτιωμένες μηχανικές ιδιότητες έναντι όλων των υπολοίπων περιπτώσεων όπως επίσης και η αντοχή σε υδατικό περιβάλλον. Ωστόσο, παρά την αύξηση των μηχανικών αντοχών, παρατηρήθηκε και αντίστοιχη αύξηση του μέσου μεγέθους των πόρων στο εσωτερικό των ικριωμάτων, όπως φαίνεται από τις εικόνες SEM του σχήματος 12. Το πορώδες δίκτυο είναι ιδιαίτερα εκτεταμένο και εμφανίζονται πόροι οι οποίοι σε ορισμένες περιπτώσεις ξεπερνούν τα 200 μm, ενώ υπάρχουν και οι μικρότεροι που κυμαίνονται περίπου στα 20 μm. Όταν η υδρογέλη ζελατίνης χρησιμοποιήθηκε σαν επικάλυψη στο ικρίωμα, το εσωτερικό του πορώδες

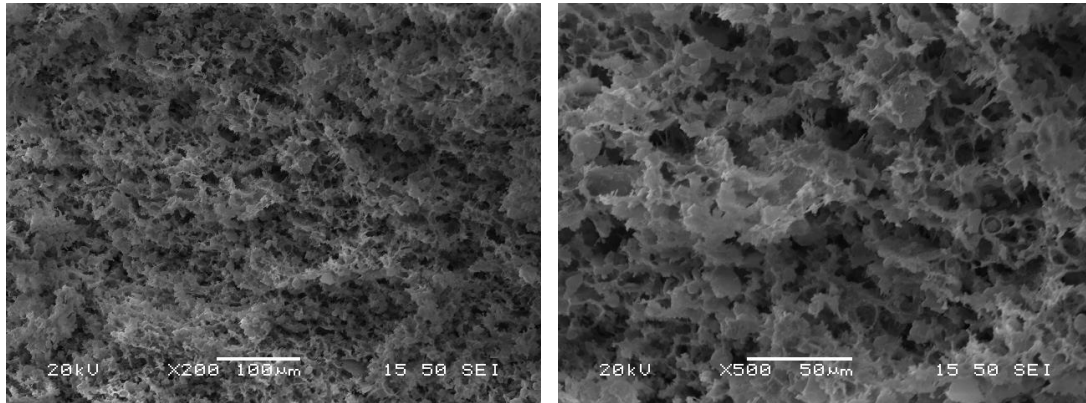
δίκτυο παρέμεινε αμετάβλητο, ενώ εξωτερικά δημιουργήθηκε ένα λεπτό φιλμ «προστασίας» το οποίο πρόσδωσε στο ικρίωμα αυξημένη μηχανική αντοχή και αντοχή σε υδατικό περιβάλλον. Παρόλ' αυτά η τεχνική παρουσιάζει το μειονέκτημα ότι στα ικρίωματα είναι δύσκολη στην εφαρμογή της, καθώς τα ικρίωματα τις πιο πολλές φορές χάνουν το αρχικό τους σχήμα.

Τέλος, ένας επιπλέον τρόπος που αναπτύχθηκε, για τη βελτίωση των μηχανικών αντοχών των ικριωμάτων του υδροξυαπατίτη είναι η επικάλυψη των ικριωμάτων αυτών με τη φυτική ρητίνη μαστίχα. Οι εικόνες από το SEM για τα ικρίωματα που έχουν επικαλυφθεί με μαστίχα, αποδεικνύουν ότι η ρητίνη δεν έχει εισχωρήσει στο εσωτερικό των ικριωμάτων και κατ' επέκταση τόσο οι μεγαλύτεροι όσο και οι μικρότεροι πόροι του εσωτερικού δικτύου παραμένουν σταθεροί. Ωστόσο και στην περίπτωση αυτή τα ικρίωματα έχουν αποκτήσει βελτιωμένη μηχανική συμπεριφορά σε σχέση με τα αρχικά ικρίωματα, ενώ η αντοχή σε υδατικό περιβάλλον είναι η βέλτιστη διότι η ρητίνη της μαστίχας αποτελεί υδρόφοβο υλικό.

#### Εγκάρσια τομή



### Κάθετη τομή



**Σχήμα 14.** Εικόνες Ηλεκτρονικού Μικροσκοπίου Σάρωσης από εγκάρσια τομή και κάθετη τομή ικριώματος Υδροξυαπατίτη – Χιτοζάνης – Αργινίνης, στο οποίο έχει πραγματοποιηθεί διασύνδεση με 1,7% διαλύματος γλουταραλδεΐδης και επικάλυψη με αιώρημα Μαστίχας Χίου.

## ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

Στην συγκεκριμένη εργασία μελετήθηκε η ανάπτυξη τρισδιάστατων ικριωμάτων υδροξυαπατίτη, τα οποία θα εμφανίζουν εσωτερικό πορώδες δίκτυο και ικανοποιητική μηχανική αντοχή. Τα πρόδρομα αιωρήματα που χρησιμοποιήθηκαν για την ανάπτυξη αυτή αποτελούνται από ναοκρυστάλλους υδροξυαπατίτη, οι οποίοι έχουν αναπτυχθεί παρουσία του βιοπολυμερούς χιτοζάνη και του αμινοξέος L-αργινίνη. Πρόκειται για μία βιομιμητική σύνθεση, η οποία έχει αποδειχθεί ιδιαίτερος επιτυχής αφού το σχήμα και οι διαστάσεις των κρυστάλλων του υδροξυαπατίτη που αναπτύχθηκαν είναι παρόμοια με τους κρυστάλλους που απαντώνται στον υδροξυαπατίτη του φυσικού οστού.

Για να θεωρηθεί η ανάπτυξη των ικριωμάτων επιτυχής, θα πρέπει στο εσωτερικό τους να φέρουν μακροπόρους τόσο της τάξεως των 100  $\mu\text{m}$  όσο και μικρότερους με μέγεθος στα 10 $\mu\text{m}$ , ώστε να είναι δυνατή η διέλευση σε όλο το μήκος του ικριώματος των κυττάρων αλλά και των θρεπτικών συστατικών, που είναι ζωτικής σημασίας για την ανάπτυξη και των πολλαπλασιασμό τους. Τα τρισδιάστατα ικριώματα παρασκευάστηκαν με χρήση της μεθόδου λυοφιλίωσης. Πρόκειται για μία τεχνική ξήρανσης κατά την οποία αρχικά το υλικό υφίσταται ψύξη σε χαμηλή θερμοκρασία ώστε το περιεχόμενο σε αυτό νερό να μετατραπεί σε πάγο. Στη συνέχεια, εφαρμόζεται υποπίεση στο εσωτερικό του θαλάμου λυοφιλίωσης και οι παγωμένοι κρύσταλλοι νερού περνούν κατευθείαν στην αέρια φάση δημιουργώντας έτσι ένα πορώδες δίκτυο στο εσωτερικό των παραγόμενων ικριωμάτων.

Για τη βελτιστοποίηση της διαδικασίας της λυοφιλίωσης, πραγματοποιήθηκε μελέτη των συνθηκών αυτής. Συγκεκριμένα μελετήθηκαν ο ρυθμός ψύξης του υλικού (ψύξη από -5 έως -196 °C με διαφορετικούς ρυθμούς) καθώς και ο ρυθμός εξάχνωσης (0,7, 0,35 και 0,1 mbar) ώστε να επιτευχθεί ο ιδανικός συνδυασμός εσωτερικού πορώδους δικτύου και μηχανικής συμπεριφοράς. Ωστόσο επειδή η ύπαρξη του πορώδους επηρεάζει αρνητικά τις μηχανικές αντοχές των παραγόμενων ικριωμάτων εξετάστηκε η χρήση κατάλληλων πρωτεϊνικών διασυνδετών (cross-linkers) και ηχητικών παραγόντων, οι οποίοι αναμένεται να προσδώσουν στα ικριώματα μεγαλύτερη σταθερότητα και αντοχή σε υδατικό περιβάλλον.

Τα ικριώματα που υδροξυαπατίτη, που αναπτύχθηκαν με τη μέθοδο της λυοφιλίωσης, εξετάστηκαν ως προς το εσωτερικό πορώδες δίκτυο τους με χρήση της Ηλεκτρονικής Μικροσκοπίας Σάρωσης.

Από τις εικόνες του Μικροσκοπίου SEM παρατηρήθηκε ότι τα ικριώματα υδροξυαπατίτη, που έχουν διασυνδεθεί με διάλυμα γλουταραλδεύδης εμφανίζουν εξαιρετικό εσωτερικό πορώδες δίκτυο αποτελούμενο από μεγαλύτερους πόρους με μέγεθος από 50 έως 100  $\mu\text{m}$  αλλά και μικρότερους της τάξεως των 10  $\mu\text{m}$ . Καθώς αυξάνεται η περιεκτικότητα σε γλουταραλδεύδη, η εσωτερική δομή των παραγόμενων ικριωμάτων εμφανίζει μεγαλύτερη ομοιογένεια και κατ' επέκταση και καλύτερη μηχανική συμπεριφορά. Τέλος, τα ικριώματα, που έχουν διασυνδεθεί με γλουταραλδεύδη, συμπεριφέρονται εξίσου ικανοποιητικά και σε υδατικό περιβάλλον.

Η χρήση του φυσικού διασυνδέτη γενιπίνη οδηγεί και αυτή στην ανάπτυξη ικριωμάτων με ικανοποιητικό εσωτερικό πορώδες δίκτυο. Σε αυτή την περίπτωση, το εσωτερικό πορώδες δίκτυο αποτελείται από πόρους μεγαλύτερου μεγέθους των οποίων η μέση τιμή είναι στα 50  $\mu\text{m}$  αλλά και από μικρότερους στα 10  $\mu\text{m}$ . Ωστόσο τα ικριώματα αυτά επιδεικνύουν ελαφρώς βελτιωμένες μηχανικές αντοχές συγκρινόμενα με αυτά που έχουν διασυνδεθεί με γλουταραλδεύδη. Σε όλες τις περιπτώσεις, το γεγονός, ότι τόσο οι εικόνες από τις εγκάρσιες όσο και από τις κάθετες τομές των ικριωμάτων παρουσιάζουν παρόμοια μορφή, υποδεικνύει ότι οι πόροι είναι διασυνδεδεμένοι σε όλο το εσωτερικό του ικριώματος.

Η προσθήκη του πηκτικού παράγοντα υδρογέλη ζελατίνης στα αιωρήματα υδροξυαπατίτη, οδήγησε στην ανάπτυξη τρισδιάστατων ικριωμάτων με αισθητά βελτιωμένες μηχανικές αντοχές όπως επίσης και αντοχής σε υδατικό περιβάλλον, συγκριτικά με κάθε άλλη μέθοδο παραγωγής τρισδιάστατων ικριωμάτων που χρησιμοποιήθηκε. Όπως φαίνεται από τις εικόνες του SEM, στο εσωτερικό αυτών των ικριωμάτων εμφανίζεται έντονο πορώδες δίκτυο, με ιδιαίτερα αυξημένο το ποσοστό των μεγάλων πόρων, οι οποίοι κυμαίνονται από 100 έως 200  $\mu\text{m}$  ενώ υπάρχουν και ελάχιστοι μικροί. Παρά την αύξηση του μακροπορώδους δικτύου τα ικριώματα αυτά εμφάνισαν και αισθητά βελτιωμένες μηχανικές αντοχές ενώ συμπεριφέρονται εξαιρετικά και σε υδατικό περιβάλλον.

Τα ικριώματα στα οποία εφαρμόστηκε η φυτική ρητίνη Μαστίχα Χίου, εμφανίζουν σημαντική αύξηση των μηχανικών τους αντοχών. Η σημαντικότερη αύξηση παρουσιάζεται στην αντοχή των ικριωμάτων σε υδατικό περιβάλλον χωρίς ωστόσο να επηρεαστεί το αρχικό πορώδες δίκτυο που είχε σχηματιστεί στο ικριώμα.



## Συμπεράσματα για τον ρυθμό ψύξης και τις τιμές επιβαλλόμενης πίεσης.

Τα ικρίωματα που υπέστησαν σταδιακή ψύξη, δηλαδή ψύξη αρχικά στους  $-5$  °C και στη συνέχεια στους  $-55$  °C εμφάνισαν ικανοποιητικό εσωτερικό πορώδες δίκτυο, χωρίς όμως την επιθυμητή μηχανική αντοχή αφού τα παραγόμενα ικρίωματα αποδείχθηκαν ιδιαίτερα ψαθυρά.

Στην περίπτωση της απότομης ψύξης με υγρό άζωτο, τα ικρίωματα παρουσίασαν επίσης προβληματικό και μη επιθυμητό πορώδες δίκτυο, εμφανίζοντας έλλειψη μεγάλων πόρων (δηλαδή πόρους με μέγεθος γύρω στα  $100$   $\mu\text{m}$ ). Την καλύτερη εικόνα παρουσίασαν τα ικρίωματα που υπέστησαν ψύξη στους  $-55$  °C, καθώς το εσωτερικό τους παρουσιάζει πορώδη δομή με μακροπόρους έως  $100$   $\mu\text{m}$  και μικρότερους πόρους περίπου στα  $10$   $\mu\text{m}$ .

Στην περίπτωση των διαφορετικών τιμών επιβαλλόμενης πίεσης την βέλτιστη συμπεριφορά εμφάνισαν τα ικρίωματα που εξαχνώθηκαν στα  $0,35$  mbar, συνδυάζοντας εσωτερικό εκτεταμένο πορώδες δίκτυο και ικανοποιητικές μηχανικές αντοχές. Με την τιμή πίεσης στα  $0,7$  mbar προέκυψαν ικρίωματα με αποδεκτό πορώδες δίκτυο, αλλά ανύπαρκτες μηχανικές αντοχές, ενώ στην τιμή του  $0,1$  mbar τα ικρίωματα είχαν καλές μηχανικές αντοχές χωρίς όμως να εμφανίζουν το επιθυμητό πορώδες δίκτυο. Το παραπάνω γεγονός υποδεικνύει πως όσο αυξάνεται η υποπίεση τα ικρίωματα που προκύπτουν έχουν πιο συμπαγή δομή. Αυτό όμως έχει και σαν αποτέλεσμα να χάνεται το πορώδες τους. Συνεπώς, καθορίστηκε ως ιδανική πίεση τα  $0,35$  mbar όπου και προκύπτουν ικρίωματα που φέρουν εξίσου ικανοποιητικές μηχανικές αντοχές σε συνδυασμό με το επιθυμητό μακροπορώδες δίκτυο.

## **ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ**

- [1] Tsetsekou A, Brasinika D, Vaou V, Chatzitheorides E, On the synthesis of tailored biomimetic hydroxyapatite nanoplates through a bioinspired approach in the presence of collagen or chitosan and L-arginine, *Mater Sci Eng C* 2014.
- [2] Εφαρμογές Νανοτεχνολογίας στην Ιατρική Τεύχος 04, Μάιος 2008.
- [3] Κ. Κυπαρισσίδης, Ο. Καμμώνα, Εφαρμογές της Νανοτεχνολογίας στον Τομέα της Υγείας, ΠΣΧΜ 2011.
- [4] Thein-Han W.W., Saikhun J., Pholpramoo C., Misra R.D.K., Kitiyanant Y., Chitosan- gelatin scaffolds for tissue engineering: Physico-chemical properties and biological response of buffalo embryonic stem cells and transfectant of GFP-buffalo embryonic stem cells, *Acta Biomaterialia*, 2009.
- [5] Mali S., Misra R.D.K., Somani M.C., Karjalainen L.P., Biomimetic nanostructured coatings on nano-grained / ultrafine-grained substrate: Microstructure, surface adhesion strength, and biosolubility, *Materials Science & Engineering C*, 2009.
- [6] Zhang Y., Zhang M., Three-dimensional macroporous calcium phosphate bioceramics with nested chitosan sponges for load-bearing bone implants, *Wiley Periodicals* 2002.
- [7] Thein-Han W.W., Misra R.D.K., Biomimetic chitosan-nanohydroxyapatite composite scaffolds for bone tissue engineering, *Acta Biomaterialia* 2009.
- [8] Zhao F., Grayson W.L., Ma T., Bunnell B., Lu W.W., Effects of hydroxyapatite in 3-D chitosan-gelatin polymer network on human mesenchymal stem cell construct development, *Biomaterials*, 2006.
- [9] Khor E., Lim L.Y., Implantable applications of chitin and chitosan, *Biomaterials*, 2003.
- [10] Ratner BD, *A History of Biomaterials in Biomaterials Science: An Introduction to Materials in Medicine*, 2004.
- [11] Ratner BD, Hoffman AS, Schoen FJ, Lenons JE, *Biomaterials Science: A Multidisciplinary Endeavor in Biomaterials Science*, 2004.

- [12] Ratner BD, Hoffman AS, Non-fouling Surfaces in Biomaterials Science: An Introduction to Materials in Medicine, 2004.
- [13] Hench LL, Best S, Ceramics, Glasses and Glass-Ceramics, 2004.
- [14] Brunski BJ, Metals 2011.
- [15] Cooper SL, Visser SA, Hergenrother RW, Lamba NK, Polymers, 2004.
- [16] Migliaresi C, Alexander H, 2004.
- [17] U Meyer, HP Wiesmann, Tissue engineering: a challenge of today's medicine, 2005.
- [18] LB Clapp, C Hansch, Identification of amino acids in a protein hydrolysate by paper chromatography, 1960.
- [19] R. Gonzalez McQuire, Fabrication of Hydroxyapatite Sponges by Dextran Sulfate/Amino acid Templating, 2005
- [20] Nudelman F, Pieterse K, George A, Bomans PHH, Friedrich H, Brylka LJ, Hilbers PAJ, de With G, Sommerdijk NAJM. The role of collagen in bone apatite formation in the presence of hydroxyapatite nucleation inhibitors, Nature Mater, 2010.
- [21] Fratzl P, Gupta HS, Paschalis EP, Roschger P, Structure and mechanical quality of the collagen-mineral nano-composite in bone, J Mater Chem, 2004.
- [22] S. M. Sibalic , N. V. Radej, Determination of Lysine, Arginine, and Histidine by High Temperature Paper Chromatography, 1961.
- [23] Huang Z, Tian J, Yu B, Xu Y, Feng Q, A bone - like nano-hydroxyapatite / collagen loaded injectable scaffold. Biomed, Mater 2009.
- [24] Prabakaran B Chitosan derivatives as promising materials for controlled drug delivery, 2008.
- [25] Y. J. Zhou, P. Luner and P. Caluwe, Mechanism of crosslinking of papers with polyfunctional carboxylic acids, 2003.
- [26] Almog J, Cohen Y, Azoury M, Hahn TR, Genipin--a novel fingerprint reagent with colorimetric and fluorogenic activity, 2004.

- [27] Nakano T, Kan T, Ishimoto T, Ohashi Y, Fujitani W, Umakoshi Y, Hattori T, Higuchi Y, Tane M, Nakajima H, Evaluation of bone quality near metallic implants with and without lotus-type pores for optimal biomaterial design, *Mater Trans*, 2006.
- [28] Giannoudis PV, Dinopoulos H, Tsiridis E, Bone substitutes: An update, *Injury*, 2005.
- [29] Bose S, Roy, M, Bandyopadhyay, A, Recent advances in bone tissue engineering scaffolds, *Trends in Biotechnology*, 2012.
- [30] Αγαθόπουλος, Σ. Υλικά της βιοϊατρικής – Βιοϋλικά, Πανεπιστήμιο Ιωαννίνων, 2001.
- [31] Peppas NA, “Hydrogels” in *Biomaterials Science: An Introduction to Materials in Medicine*, 2007.
- [32] Hunger PM, Donius AE, Wegst UGK, Structure – property – processing correlations in freeze-cast composite scaffolds, *Acta Biomaterialia*, 2013.
- [33] Xia Z, Yu X, Jiang X, Brody HD, Rowe DW, Wei M, Fabrication and characterization of biomimetic collagen–apatite scaffolds with tunable structures for bone tissue engineering, *Acta Biomaterialia*, 2013.
- [34] Wegst UGK, Schechter M, Donius AE, Hunger PM, *Biomaterials by freeze casting*, *Phil. Trans. R. Soc. A*, 2010.
- [35] Konstantinidis AK, Kuu W, Otten L, Nail NS, Sever RR, Controlled Nucleation in Freeze-drying: Effects on Pore Size in the Dried Product Layer, Mass Transfer Resistance, and Primary Drying Rate, *American Pharmacists Association J Pharm Sci.*, 2011.
- [36] Kozlov PV, The structure and properties of solid gelatin and the principles of their modification, *Polymer*, 1983.
- [37] Tsiourvas D, Tsetsekou A, Kammenou MI, Boukos N, Controlling the Formation of Hydroxyapatite Nanorods with Dendrimers, *Am Ceram Soc*, 2011.
- [38] Tie W, Yubao L, Weiqun C, Yi Z, A study of nano-composite of hydroxyapatite, *J Mater Sci*, 2003.

[39] Rusu VM, Ng CH, Wilke M, Tiersch B, Fratzl P, Peter MG, Size – controlled hydroxyapatite nanoparticles as self – organized organic – inorganic composite materials, *Biomaterials* 2005.

[40] Chang MC, Tanaka J, FT-IR study for hydroxyapatite / collagen nanocomposite cross-linked by glutaraldehyde, *Biomaterials* 2002.

[41] Koutsopoulos S, Synthesis and characterization of hydroxyapatite crystals: A review study on the analytical methods, *J Biomed Mater Res* 2002.