



**ΕΘΝΙΚΟ ΜΕΤΣΟΒΙΟ ΠΟΛΥΤΕΧΝΕΙΟ**

**ΣΧΟΛΗ ΜΗΧΑΝΙΚΩΝ ΜΕΤΑΛΛΕΙΩΝ-ΜΕΤΑΛΛΟΥΡΓΩΝ**

**ΤΟΜΕΑΣ ΜΕΤΑΛΛΟΥΡΓΙΑΣ ΚΑΙ ΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ ΥΛΙΚΩΝ**

**ΑΝΑΠΤΥΞΗ ΤΡΙΣΔΙΑΣΤΑΤΩΝ ΙΚΡΙΩΜΑΤΩΝ**

**ΒΙΟΜΟΡΙΩΝ-ΥΔΡΟΞΥΔΡΑΤΙΤΗ**

**ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ**

**ΝΙΚΟΛΙΤΣ ΗΛΙΑΣ**

**ΕΠΙΒΛΕΨΗ:**

**Α. ΤΣΕΤΣΕΚΟΥ, Αναπληρώτρια Καθηγήτρια Ε.Μ.Π**

**ΑΘΗΝΑ, Φεβρουάριος 2016**

## Πρόλογος

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

Θα ήθελα να εκφράσω τις ευχαριστίες μου σε όλους όσους συνέβαλαν και ήταν κοντά μου με οποιονδήποτε τρόπο καθόλη τη διάρκεια εκπόνησης της διπλωματικής μου εργασίας.

Αρχικά θα ήθελα να ευχαριστήσω ιδιαίτερα την επιβλέπουσα καθηγήτρια κα. Αθηνά Τσετσέκου, Αναπληρώτρια Καθηγήτρια Ε.Μ.Π. για την εμπιστοσύνη που μου έδειξε και την ευκαιρία που μου έδωσε να ασχοληθώ με το θέμα αυτό, καθώς και για την επιστημονική της καθοδήγηση και στήριξη.

Επίσης, θα ήθελα να ευχαριστήσω θερμά τον υποψήφιο διδάκτορα Γεώργιο Στεργίου για την συνεργασία μας, για τη βοήθεια και καθοδήγησή του κατά τη διάρκεια των πειραμάτων και στο χειρισμό των μηχανημάτων ανάλυσης φυσικοχημικών ιδιοτήτων και μικροσκοπίας. Τέλος τον ευχαριστώ για τη στήριξη και την υπομονή του καθόλη τη διάρκεια των πειραμάτων.

Ευχαριστώ πολύ όλα τα μέλη του εργαστηρίου που με υποδέχτηκαν και με βοήθησαν να γίνω κι εγώ μέλος της ερευνητικής τους ομάδας, για το περιβάλλον συνεργασίας και ομαδικότητας και για τις πολύτιμες συμβουλές και τη βοήθειά τους στα διάφορα στάδια αυτής της εργασίας.

Θα ήθελα επίσης να ευχαριστήσω την κα. Η. Χαλικιά και τον κ. Δ. Πάνια, μέλη της τριμελούς εξεταστικής επιτροπής που δέχτηκαν να με τιμήσουν στην αξιολόγηση της διπλωματικής μου εργασίας

Τέλος, θα ήθελα να αφιερώσω την εργασία αυτή στην οικογένειά μου και να τη ευχαριστήσω για την ηθική και οικονομική συμπαράσταση και στήριξή της καθόλη τη διάρκεια των σπουδών μου στο Ε.Μ.Π.

## Περιεχόμενα

Περίληψη .....	3
Summary.....	5
Εισαγωγή. ....	6
<b>1 ΘΕΩΡΗΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ.....</b>	<b>8</b>
<b>1.1 Βιοϋλικά.....</b>	<b>8</b>
1.1.1 Κατηγορίες Βιοϋλικών .....	8
1.1.2 Εφαρμογές Βιοϋλικών .....	10
<b>1.2 Οστικός Ιστός .....</b>	<b>11</b>
1.2.1 Βιολογία του Οστού .....	12
1.2.2 Θεμέλια Ουσία του Οστού .....	13
1.2.3 Οστεοβλάστες.....	14
1.2.4 Οστεοκύτταρα .....	15
1.2.5 Οστεοκλάστες.....	15
<b>1.3 Ιστική Μηχανική-Μηχανική του Οστικού Ιστού .....</b>	<b>16</b>
<b>1.4 Υδροξυαπατίτης .....</b>	<b>19</b>
1.4.1 Μηχανισμός Κρυστάλλωσης Υδροξυαπατίτη .....	21
1.4.2 Τύποι Εμφυτευμάτων Υδροξυαπατίτη .....	23
1.4.3 Οστικά Τσιμέντα Φωσφορικού Ασβεστίου .....	24
1.4.4 Κεραμικά Καθαρού Υδροξυαπατίτη .....	25
1.4.5 Επικαλύψεις Υδροξυαπατίτη.....	26
1.4.6 Πορώδη Κεραμικά Υδροξυαπατίτη.....	27
1.4.7 Μέθοδοι Παρασκευής Υδροξυαπατίτη.....	27
<b>1.5 Χιτοζάνη .....</b>	<b>30</b>
<b>1.6 Αμινοξέα – L-Αργινίνη.....</b>	<b>32</b>
<b>1.7 Poly(ethylene oxide).....</b>	<b>35</b>
<b>1.8 Νανοςωλήνες Άνθρακα.....</b>	<b>37</b>
<b>2 ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ .....</b>	<b>41</b>
<b>2.1 Πειραματική Διαδικασία .....</b>	<b>41</b>
2.1.1 Αντιδραστήρια και εργαστηριακός εξοπλισμός.....	41
2.1.2 Παρασκευή αιωρήματος/σκόνης υδροξυαπατίτη παρουσία χιτοζάνης και L-αργινίνης .....	42
2.1.3 Εισαγωγή Νανοςωλήνων Άνθρακα.....	43
2.1.4 Εισαγωγή Poly(ethylene oxide).....	44
2.1.5 Καλούπωμα και Κατάψυξη Δειγμάτων .....	45
2.1.6 Κωδικοποίηση Τελικών Ικριωμάτων.....	46
<b>2.2 Δοκιμή Αντοχής Ικριωμάτων σε Υδατικό Περιβάλλον .....</b>	<b>47</b>
<b>2.3 Λυοφιλίωση .....</b>	<b>47</b>
<b>2.4 Περιθλασιμετρία Ακτίνων Χ .....</b>	<b>51</b>
<b>2.5 Ηλεκτρονική Μικροσκοπία Σάρωσης .....</b>	<b>55</b>
<b>2.6 Φασματοσκοπία Υπερύθρου με Μετασχηματισμό Fourier (FTIR).....</b>	<b>59</b>

<b>3</b>	<b>ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ – ΣΧΟΛΙΑ .....</b>	<b>65</b>
3.1	Προσδιορισμός Βέλτιστων Παραμέτρων Ενσωμάτωσης των Νανοσωλήνων Άνθρακα .....	65
3.2	Προσδιορισμός Βέλτιστων Παραμέτρων Ενσωμάτωσης του Poly(ethylene oxide) .....	67
3.3	Αποτελέσματα Περίθλασης Ακτίνων Χ .....	69
3.4	Αποτελέσματα Υπέρυθρης Φασματοσκοπίας με Μετασχηματισμό Fourier ..	72
3.5	Αποτελέσματα Ηλεκτρονικής Μικροσκοπίας Σάρωσης.....	76
3.6	Αξιολόγηση Μηχανικής Συμπεριφοράς των Ικριωμάτων .....	80
3.7	Αποτελέσματα Αντοχής Ικριωμάτων σε Υδατικό Περιβάλλον.....	81
<b>4</b>	<b>ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ.....</b>	<b>83</b>
	Προτάσεις για Μελλοντική Έρευνα .....	86
	<b>ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ .....</b>	<b>87</b>

## Περίληψη

Τα τελευταία χρόνια πραγματοποιούνται εκτεταμένες ερευνητικές προσπάθειες, γύρω από τον κλάδο της Αναγεννησιακής Ιατρικής, με σκοπό τη παραγωγή βιοσυμβατών και βιοαποικοδομήσιμων μοσχευμάτων που θα αντικαταστήσουν τα μόνιμα μοσχεύματα και θα προκαλούν και θα ενισχύουν την φυσική διαδικασία ανάπλασης και αναδόμησης τραυματισμένων ή κατεστραμμένων ιστών. Η παρασκευή σύνθετων ικριωμάτων με βάση τον υδροξυαπατίτη έχει δώσει πολλά υποσχόμενα αποτελέσματα για τη δημιουργία βιοσυμβατών οστικών εμφυτευμάτων, με αυξημένη οστεοεπαγωγικότητα και δομή παρόμοια με αυτή των φυσικών οστικών ιστών. Για τον λόγο αυτό, στην παρούσα εργασία πραγματοποιείται προσπάθεια σύνθεσης και ανάπτυξης οστικών ικριωμάτων με υδροξυαπατίτη σε μήτρα των βιοσυμβατών πολυμερών χιτοζάνη και Poly(ethylene oxide) για ενίσχυση των μηχανικών ιδιοτήτων και της βιοσυμβατής και βιοαποικοδομήσιμης συμπεριφοράς τους. Ο υδροξυαπατίτης προκύπτει μέσω βιομιμητικής διαδικασίας καταβύθισης πρόδρομων αντιδραστηρίων παρουσία L-αργινίνης. Στην προσπάθεια περαιτέρω ενίσχυσης των μηχανικών ιδιοτήτων των ικριωμάτων έγινε διασπορά ξηρής σκόνης νανοσωλήνων άνθρακα. Στην παρούσα εργασία μελετήθηκαν οι τρόποι ανάμιξης και ενσωμάτωσης των νανοσωλήνων στο υλικό των ικριωμάτων, καθώς και η βέλτιστες παράμετροι αναλογίας, προετοιμασίας και εισαγωγής του πολυμερούς Poly(ethylene oxide) σε αιώρημα υδροξυαπατίτη-χιτοζάνης ή σε σκόνη υδροξυαπατίτη-χιτοζάνης, για την παρασκευή υλικού από το οποίο, με την διεργασία της λυοφιλίωσης, θα προκύψουν τα τελικά ικρίωματα. Τα δείγματα εξετάστηκαν με φασματοσκοπικές (FT-IR) και κρυσταλλογραφικές (XRD) μεθόδους ανάλυσης για τον έλεγχο παρουσίας της φάσης του υδροξυαπατίτη στο υλικό, όμοια με αυτή που απαντάται στο φυσικό οστό, καθώς και τη διατήρηση των υπολοίπων ενώσεων του υλικού στη φάση που εισήχθησαν, χωρίς να παρουσιάσουν κάποια μεταβολή κατά τη συνολική διαδικασία σύνθεσης των ικριωμάτων. Τέλος, τα τελικά ικρίωματα παρατηρήθηκαν στο ηλεκτρονικό μικροσκόπιο σάρωσης για τη μελέτη της μικροδομής και του πορώδους τους σε σχέση με αυτό που παρατηρείται σε ένα φυσικό οστό. Η μελέτη και ανάλυση των τελικών ικριωμάτων κατέδειξαν ότι η βέλτιστη περιεκτικότητα νανοσωλήνων που πρέπει να προστεθούν είναι 1% κ.β. επί των τελικών ικριωμάτων και ότι η μέθοδος ανάμιξης ξηρής σκόνης υδροξυαπατίτη-χιτοζάνης με διάλυμα Poly(ethylene oxide) με συγκέντρωση οξικού οξέος από 0,5 M και άνω, επιφέρει τις βέλτιστες μέχρι στιγμής

### **«Ανάπτυξη τρισδιάστατων ικριωμάτων βιομορίων-υδροξυαπατίτη»**

μηχανικές ιδιότητες στα ικρίωματα, όσον αφορά τη συνοχή και τη σκληρότητα του υλικού, με την παρουσία ικανοποιητικού μικροπορώδους δικτύου και εξαιρετική αντοχή σε υδατικό περιβάλλον.

## Summary

Recent studies in the field of Regenerative medicine aim to develop biocompatible and bioabsorbable hard tissue implants to enhance the natural tissue restoration procedure. These new implants will potentially replace the metallic components used so far in order to reconstruct and support broken or damaged bones. This current research focuses on hydroxyapatite based materials in order to produce hard tissue scaffolds with increased osteocompatibility and osteogenic properties. For this purpose, hydroxyapatite suspension was synthesized biomimetically, in the presence of L-arginine and chitosan. In order to further improve the mechanical properties of the scaffolds, powder of Multi-walled Carbon Nanotubes has been dispersed in the hydroxyapatite suspension. The suspension was then centrifuged or dried and mixed with Poly(ethylene oxide) solution and finally freeze dried in order to produce the final scaffolds. The samples were then analyzed with Fourier Transformation Infrared Spectroscopy (FT-IR) and X-Ray Diffraction (XRD) analysis in order to specify their chemical and mineral structure. Finally, the scaffolds were observed in the Scanning Electron Microscope (SEM) in order to analyze their microstructure and porosity. Final evaluation of the scaffolds showed that dried hydroxyapatite powder mixed with polymer solution with higher acetic acid concentration ( >0,5 M ) has significantly improved their mechanical properties and resistance to solubility. Furthermore, the addition of the Carbon Nanotubes slightly improved the elastic behavior of the scaffolds. The optimum concentration of nanotubes into the hydroxyapatite matrix was found to be 1 % w/w.

## Εισαγωγή.

Σκοπός της παρούσας διπλωματική εργασίας είναι η παρασκευή τρισδιάστατων ικριωμάτων υδροξυαπατίτη, παρουσία L-αργινίνης και των βιοπολυμερών χιτοζάνης και Poly(ethylene oxide) (PEO), καθώς και εισαγωγή νανοσωλήνων άνθρακα για ενίσχυση των μηχανικών τους ιδιοτήτων, για την παραγωγή βιοσυμβατών οστικών μοσχευμάτων. Η κατασκευή βιοσυμβατών και βιοαποικοδομήσιμων οστικών μοσχευμάτων έχει σαν στόχο την αποκατάσταση βλαβών σε κατεστραμμένα ή φθαρμένα οστά, με την εξ ολοκλήρου ή τμηματική αντικατάστασή τους με τεχνητά ικριώματα. Για τον λόγο αυτό ο κλάδος της Ιστικής Μηχανικής στοχεύει στην κατασκευή μοσχευμάτων τα οποία θα είναι όσο το δυνατόν πιο βιολογικά συγγενή με τους φυσικούς ιστούς, θα είναι βιώσιμα και θα βελτιώνουν και θα ενισχύουν τη λειτουργία και φυσική αποκατάσταση του ιστού.

Η σύγχρονη Ιστική Μηχανική χρησιμοποιεί κατά κύριο λόγο σύνθετα πλαστικά και σύνθετα μεταλλικά υλικά για την αντικατάσταση και επιδιόρθωση βλαβών στον ανθρώπινο οργανισμό. Η εμφύτευση όμως των παραπάνω ειδών υλικών, λόγω της χαμηλής τους βιολογικής συγγένειας με τους φυσικούς ανθρώπινους ιστούς, εγκυμονούν τον κίνδυνο απόρριψης τους από τον οργανισμό μέσω της αντίδραση του ανοσοποιητικού συστήματος σε ξένο σώμα. Οι παραπάνω τύποι εμφυτευμάτων δεν είναι βιοαποικοδομήσιμοι και στοχεύουν μόνο στην αντικατάσταση του φθαρμένου ιστού. Χαρακτηριστικό παράδειγμα στον κλάδο των οστικών μοσχευμάτων αποτελεί η χρήση Τιτανίου, το οποίο παρά την έξοχη μηχανική του συμπεριφορά, εκ φύσεως δεν είναι βιοσυμβατό, γι' αυτό και υπάρχει ο κίνδυνος απόρριψης από τον οργανισμό, καθώς επίσης τα μοσχεύματα τιτανίου υποφέρουν και από φαινόμενα διάβρωσης και φθοράς σε βάθος χρόνου μέσα στον οργανισμό.

Οι σύγχρονες μελέτες στον κλάδο των οστικών μοσχευμάτων στοχεύουν τόσο στην βελτίωση των μοσχευμάτων Τιτανίου, όσο και στην ανάπτυξη καθαυτό βιοσυμβατών και βιοαποικοδομήσιμων μοσχευμάτων που θα ενεργοποιούν και θα ενισχύουν τη φυσική διαδικασία σχηματισμού και επιδιόρθωσης των οστών, παρέχοντας ταυτόχρονα την απαραίτητη υποστήριξη για τη φυσιολογική λειτουργία του τμήματος του οστού που τοποθετήθηκε το μόσχευμα. Στην παρούσα μελέτη έγινε προσπάθεια σύνθεσης βιοσυμβατών και βιοαποικοδομήσιμων ικριωμάτων από υδροξυαπατίτη και χιτοζάνη και προσθήκη του βιοπολυμερούς PEO σε διαφορετικές περιεκτικότητες,



### **«Ανάπτυξη τρισδιάστατων ικριωμάτων βιομορίων-υδροξυαπατίτη»**

καθώς και προσθήκη νανοσωλήνων άνθρακα (Carbon Nano-Tubes CNT), επίσης σε διαφορετικές περιεκτικότητες για ενίσχυση των μηχανικών ιδιοτήτων και του βιοσυμβατού χαρακτήρα των ικριωμάτων. Τα τελικά ικρίωματα παρατηρήθηκαν στο Ηλεκτρονικό Μικροσκόπιο Σάρωσης (SEM), και μελετήθηκαν με Περίθλαση Ακτίνων Χ (XRD) και Φασματομετρία Υπέρυθρου με Μετασχηματισμό Fourier (FTIR) για έλεγχο της δομής και της κρυσταλλικότητάς τους.

## 1 ΘΕΩΡΗΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

### 1.1 Βιοϋλικά

Ως βιοϋλικό σύμφωνα με τον ευρύτερα αποδεκτό ορισμό του Εθνικού Αμερικανικού Ινστιτούτου Υγείας, ορίζεται κάθε ουσία ή συνδυασμός ουσιών, πέραν των φαρμάκων, τεχνητό ή φυσικής προέλευσης, το οποίο μπορεί να χρησιμοποιηθεί οποιαδήποτε χρονική στιγμή για να αυξήσει είτε να επιδιορθώσει ολοκληρωτικά ή τμηματικά οποιονδήποτε ιστό, όργανο ή λειτουργία του σώματος, με σκοπό τη διατήρηση και βελτίωση της ποιότητας ζωής του οργανισμού. [1]

Τα βιοϋλικά μπορούν να προέρχονται φυσικά από κάποιον οργανισμό-δότη, είτε να συντίθενται εργαστηριακά με χημικές μεθόδους και χρήση διαφόρων τύπων υλικών όπως μεταλλικά, κεραμικά πολυμερή και σύνθετα.

Η επιστήμη των Βιοϋλικών σχετίζεται άμεσα με τους κλάδους της Ιατρικής, της Βιολογίας, της Χημείας, της Ιστικής Μηχανικής και της Επιστήμης των Υλικών.

#### 1.1.1 Κατηγορίες Βιοϋλικών

Με βάση τη συμπεριφορά του ιστού του οργανισμού προς το βιοϋλικό, διακρίνονται οι εξής κατηγορίες βιοϋλικών [1][2]:

1. Βιοενεργά: τα υλικά τα οποία μετά την τοποθέτησή τους μέσα στον οργανισμό, αλληλεπιδρούν με τον περιβάλλοντα οστικό ιστό και σε ορισμένες περιπτώσεις και με τους μαλακούς ιστούς. Η σημαντικότερη και κυριότερη αντίδραση είναι η ιοντική ανταλλαγή μεταξύ βιοενεργού εμφυτεύματος και σωματικών υγρών, προς σχηματισμό στρώματος βιολογικά ενεργού ενανθρακωμένου υδροξυαπατίτη στην επιφάνεια του εμφυτεύματος.
2. Βιοαποικοδομήσιμα: τα υλικά τα οποία σταδιακά απορροφώνται και αντικαθίστανται από τον περιβάλλοντα ιστό.
3. Βιοαδρανή: τα υλικά τα οποία μετά την τοποθέτησή τους στον οργανισμό, έχουν ελάχιστη αλληλεπίδραση με τον περιβάλλοντα ιστό τους, δηλαδή δεν πραγματοποιούνται χημικές αντιδράσεις μεταξύ εμφυτεύματος και φυσικού ιστού. Τα υλικά αυτά συνήθως διαχωρίζονται με ένα λεπτό ινώδες ιστικό στρώμα.

## «Ανάπτυξη τρισδιάστατων ικριωμάτων βιομορίων-υδροξυαπατίτη»

Επίσης τα βιοϋλικά διακρίνονται με βάση το υλικό κατασκευής τους στις εξής κατηγορίες:

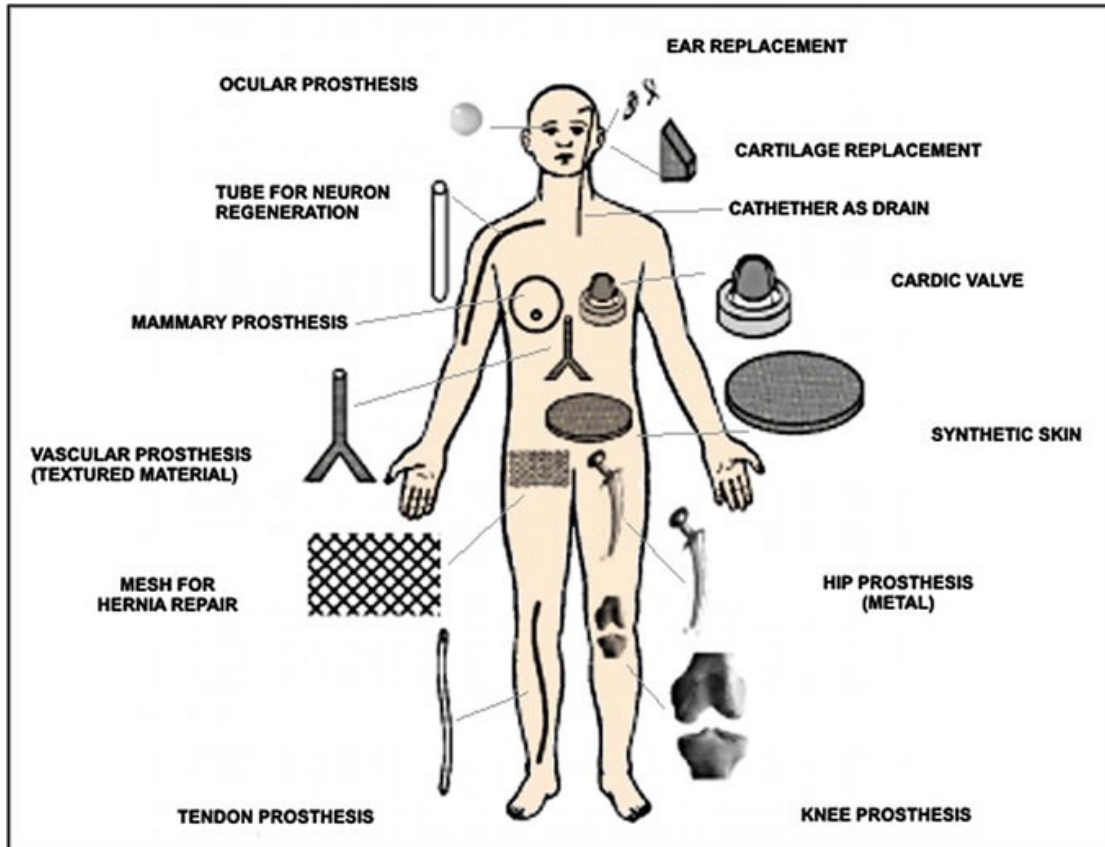
1. **Μεταλλικά Βιοϋλικά:** Τα μεταλλικά εμφυτεύματα, χάρη στις πολύ κακές μηχανικές τους ιδιότητες, κατέχουν κυρίαρχη θέση στον τομέα της ορθοπεδικής χειρουργικής από το 1860, καθώς επίσης χρησιμοποιούνται και στους κλάδους της οδοντιατρικής και της ορθοδοντικής. Ο χρυσός, το ασφάλι, το ασήμι, καθώς και κράματα τιτανίου και κοβαλτίου χρησιμοποιούνται για τη κατασκευή ορθοπεδικών συσκευών και εξαρτημάτων (βίδες, πλάκες οστών), μόνιμων εμφυτευμάτων (αντικαταστάσεις αρθρώσεων), ρίζες και εμφυτεύματα δοντιών, βηματοδότες, στεφανιαία stents και τμήματα τεχνικών οργάνων και ιστών. [3]
2. **Κεραμικά Βιοϋλικά:** Τα υλικά αυτά παρουσιάζουν υψηλή βιοσυμβατότητα, εξαιρετική αντοχή στη διάβρωση και σε θλιπτικά φορτία, καθώς και μικρή θερμική και ηλεκτρική αγωγιμότητα. Τα παραπάνω χαρακτηριστικά καθιστούν τα κεραμικά ιδανικά για την κατασκευή εμφυτευμάτων. Τα ευρύτερα χρησιμοποιούμενα βιοκεραμικά υλικά είναι η αλούμινα, ο άνθρακας, τα βιοενεργά γυαλιά, η ζirkονία, η τιτανία, και με κυριότερο όλων τον υδροξυαπατίτη. Τα βιοκεραμικά βρίσκουν εφαρμογή στους τομείς της οδοντιατρικής, της ορθοπεδικής και στην κατασκευή τμημάτων και εξαρτημάτων διαγνωστικών οργάνων και συσκευών. [4]
3. **Πολυμερή Βιοϋλικά:** Οι χρήσεις των πολυμερικών βιοϋλικών εστιάζουν σε εφαρμογές όπως η μεταφορά φαρμακευτικών ουσιών στον οργανισμό, η κυτταρική ενθυσία, η επιδιόρθωση καρδιακών μυών και βαλβίδων, η ανακατασκευή τενόντων και οστών κ.ά. Χαρακτηριστικά παραδείγματα εφαρμογών είναι ο πολυμεθακρυλικός μεθυλεστέρας (PMMA) για κατασκευή οστικού τσιμέντου και φακών επαφής, το πολυγλυκολακτικό οξύ (PGLA) σε βίδες οστών, η πολυβινυλοσιλοξάνη (PVS) σε οδοντιατρικές επικαλύψεις, η πολυαιθυλενογλυκόλη (PEG) για την παράταση του χρονικού κύκλου κυκλοφορίας ορισμένων φαρμάκων, και το πολυγλυκολικό οξύ (PGA) για την κατασκευή βιοδιασπώμενων ραμμάτων. [5]
4. **Σύνθετά Βιοϋλικά:** τα σύνθετα υλικά προκύπτουν από συνδυασμούς δύο ή περισσότερων από τα παραπάνω υλικά.

Παρόλο που ένα παραγόμενο βιοϋλικό μπορεί να καλύπτει ικανοποιητικά τους παράγοντες βιοσυμβατότητας και βιοαποικοδόμησης προς το περιβάλλον του οργανισμού που θα εφαρμοστεί με σκοπό τη βελτίωση της υγείας και της ποιότητας ζωής του, συχνά παρατηρούνται προβλήματα και επιπλοκές που καθιστούν απαραίτητη την επιδιόρθωση ή αντικατάσταση του βιοϋλικού. Τέτοια προβλήματα οφείλονται σε μηχανική αστοχία του βιοϋλικού, σε περιπτώσεις θρομβώσεων καθώς και λοιμώξεων κοντά στο σημείο τοποθέτησης του εμφυτεύματος. Οι παραπάνω παράγοντες αυξάνουν το κόστος νοσηλείας, το ποσοστό νοσηρότητας και τη δυνατότητα μακροχρόνιας εφαρμογής των βιοϋλικών. Ταυτόχρονα όμως αυτό αφήνει ένα μεγάλο παράθυρο έρευνας και μελέτης για την βελτιστοποίηση και καλύτερη αξιοποίηση της εφαρμογής των βιοϋλικών στο μέλλον. [6][7]

### 1.1.2 Εφαρμογές Βιοϋλικών

Τα βιοϋλικά χρησιμοποιούνται ενδεικτικά στις παρακάτω εφαρμογές της σύγχρονης χειρουργικής [8]:

- Αντικαταστάσεις αρθρώσεων
- Πλάκες οστών
- Οστικό τσιμέντο
- Τεχνητούς συνδέσμους και τένοντες
- Οδοντικά εμφυτεύματα για τη στερέωση δοντιών
- Προσθετικά τμήματα αιμοφόρων αγγείων
- Καρδιακές βαλβίδες
- Συσκευές επισκευής του δέρματος (τεχνητός ιστός)
- Κοχλιακές αντικαταστάσεις
- Φακοί επαφής
- Εμφυτεύματα στήθους
- Μηχανισμοί χορήγησης και μεταφοράς φαρμάκων
- Αγγειακά μοσχεύματα
- Stents (στεφανιαίες επεμβάσεις)
- Νευρικούς αγωγούς
- Χειρουργικά ράμματα, συνδετήρες, συρραπτικά για το κλείσιμο πληγών



Εικόνα 1.1 Παραδείγματα Βιοϊατρικών Υλικών.

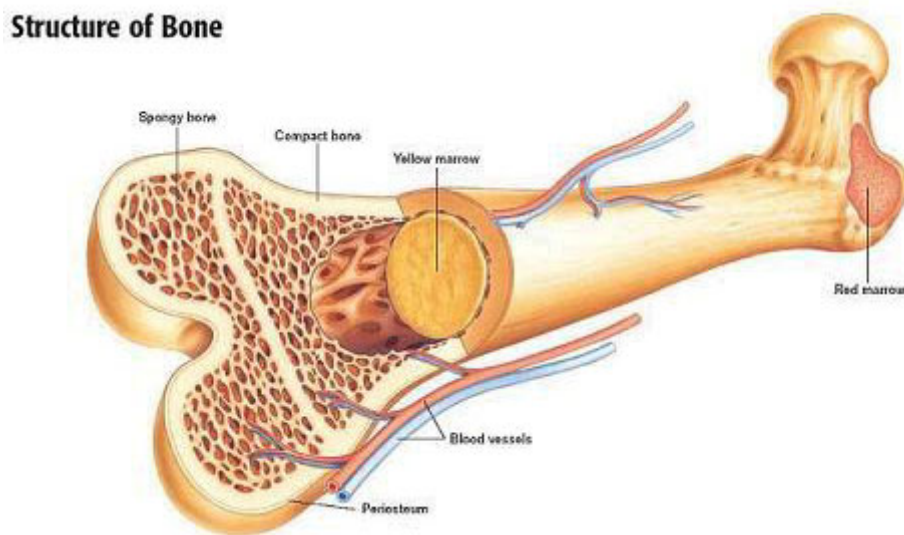
## 1.2 Οστικός Ιστός

Ο οστικός ιστός αποτελεί το κύριο συστατικό του σκελετού του ενήλικα και βοηθά στην υποστήριξη των σωματικών δομών, στην προστασία ζωτικών οργάνων όπως εκείνων της θωρακικής και της κρανιακής κοιλότητας, καθώς επίσης και στην αποθήκευση ασβεστίου, φωσφόρου και άλλων σημαντικών για τον οργανισμό ιόντων, τα οποία είναι δυνατόν να απελευθερώνονται ή να εναποτίθενται με ελεγχόμενο ρυθμό, ώστε να διατηρείται σταθερή η βέλτιστη συγκέντρωσή τους στα υγρά του σώματος.

Επιπλέον τα οστά διαμορφώνουν ένα σύστημα μοχλών το οποίο πολλαπλασιάζει τις δυνάμεις που δημιουργούνται κατά τη διάρκεια της μυϊκής συστολής και τις μετατρέπει σε σωματικές κινήσεις. Συνεπώς ο οστικός ιστός προσφέρει τόσο μηχανικές όσο και μεταβολικές λειτουργίες στον οργανισμό. [9]

### 1.2.1 Βιολογία του Οστού

Τα οστά είναι αγγειωμένα και νευρωμένα όργανα και συντίθενται από τον οστικό ιστό, το μυελό των οστών και ένα περιβάλλοντα συνδετικό ιστό, το περίοστεο. [6]



**Εικόνα 1.2** Σχηματική παράσταση της δομής του οστού.

Με μακροσκοπική παρατήρηση εγκάρσιας διατομής ενός οστού, παρατηρούνται δύο διαφορετικές περιοχές. Η πρώτη περιοχή εμφανίζεται στην περιφέρεια του οστού, είναι αρκετά συμπαγής χωρίς κοιλότητες. Η περιοχή αυτή αποτελεί το συμπαγές οστό, το οποίο έχει πολύ μεγάλη πυκνότητα. Τα συμπαγή οστά περιέχουν ανόργανη ύλη σε ποσοστό 80-90% και αποτελούν το 80% κατά βάρος του οστικού ιστού στο σώμα. Η υψηλή πυκνότητα των συμπαγών οστών ευθύνεται για τις μηχανικές και δομικές ιδιότητες των οστών.[6][9][10][11]

Η δεύτερη περιοχή εντοπίζεται στο εσωτερικό του οστού, στην περιφέρεια των κοιλιοτήτων του μυελού και εμφανίζει πολυάριθμες επικοινωνούσες κοιλότητες. Η περιοχή αυτή αποτελεί το σπογγώδες οστό, το οποίο είναι περίπου 80% πορώδες. Το σπογγώδες οστό έχει θλιπτική αντοχή μικρότερη του 10% του συμπαγούς και μέτρο συμπίεσης μικρότερο του 5% αντίστοιχα πάλι με το συμπαγές. Εξαιτίας του έντονου πορώδους του, το σπογγώδες οστό καταλαμβάνει μεγαλύτερο εμβαδό επιφάνειας σε σχέση με το συμπαγές και θεωρείται ότι έχει πιο σημαντικό ρόλο στις λειτουργίες των οστών, όπως για παράδειγμα στην ομοιοστάση του ασβεστίου και στη ρύθμιση οξέος-βάσης.[6][9][10]

Ο οστικός ιστός αποτελείται από μεσοκυττάριο ασβεστοποιημένο υλικό, τη θεμέλια ουσία του οστού και τρεις τύπους κυττάρων:

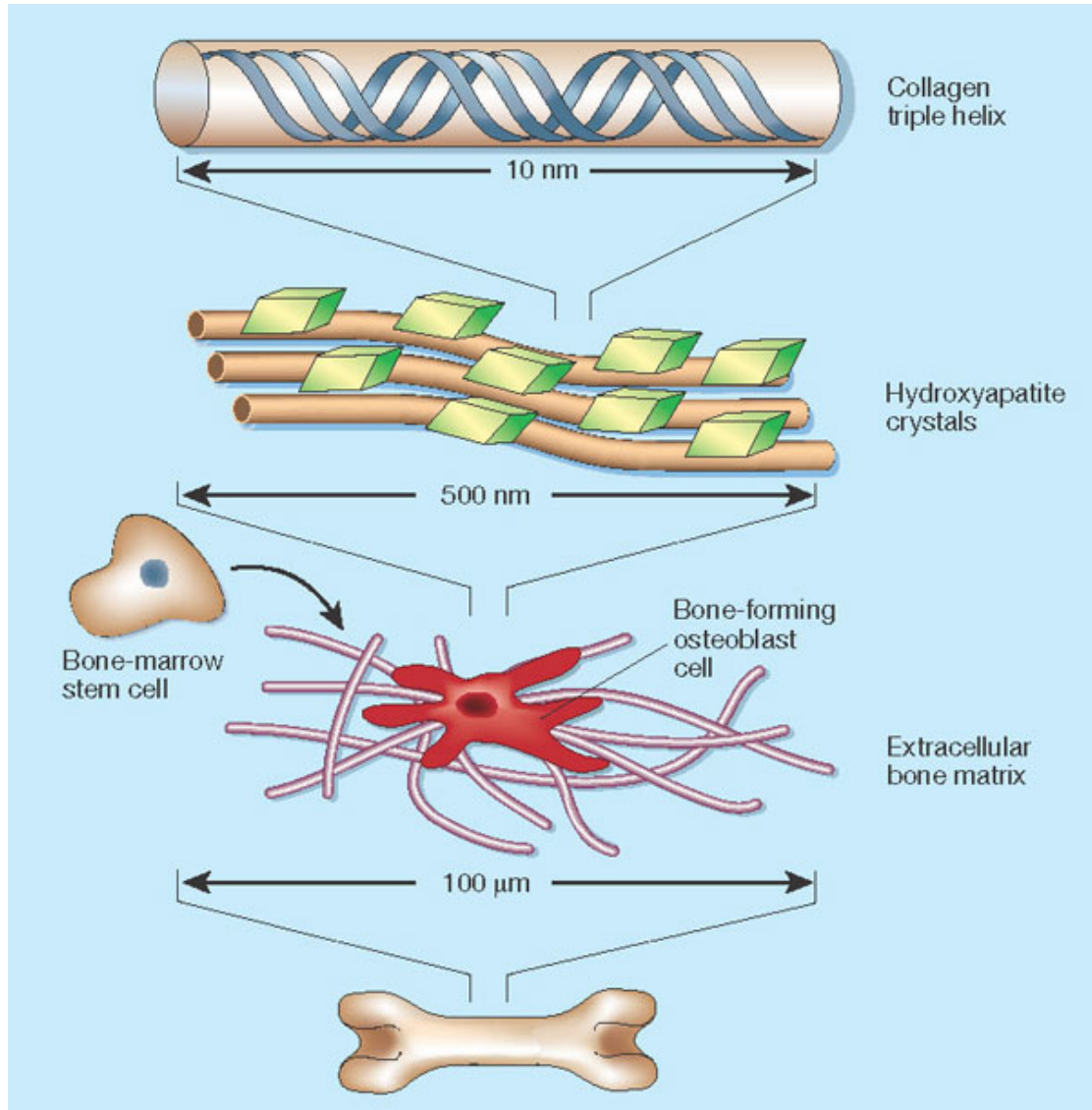
- τα οστεοκύτταρα
- τις οστεοβλάστες
- τις οστεοκλάστες

### 1.2.2 Θεμέλια Ουσία του Οστού

Η θεμέλια ουσία του οστού αποτελείται κατά 50% επί του ξηρού της βάρους από ανόργανες ύλες, με κυριότερες το ασβέστιο και τον φώσφορο, καθώς επίσης και από νάτριο, κάλιο, μαγνήσιο, διττανθρακικά και κιτρικά ιόντα. Το ασβέστιο και ο φώσφορος σχηματίζουν ατελείς κρυστάλλους υδροξυαπατίτη με σύνθεση  $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$ . Οι κρύσταλλοι του οστικού υδροξυαπατίτη έχουν τη μορφή πλακών οι οποίες διατάσσονται κατά μήκος των ινιδίων κολλαγόνου και περιβάλλονται από θεμέλια ουσία. Τα επιφανειακά ενυδατωμένα επιφανειακά ιόντα των κρυστάλλων του υδροξυαπατίτη, βοηθούν στην ανταλλαγή ιόντων μεταξύ κρυστάλλου και σωματικών υγρών.

Το υπόλοιπο κατά βάρος ποσοστό της θεμέλιας ουσίας είναι οργανικό και αποτελείται από κολλαγόνο τύπου I και συσσωματώματα πρωτεογλυκανών και ειδικές δομικές γλυκοπρωτεΐνες, οι οποίες επάγουν την ασβεστοποίηση της θεμέλιας ουσίας του οστού.

Ο συνδυασμός των ανόργανων ουσιών με τις ίνες κολλαγόνου προσφέρουν στον οστικό ιστό την αντίσταση και σκληρότητά του. [6][9][10][11]



**Εικόνα 1.3** Σχηματική παράσταση της διάρθρωσης των δομικών τμημάτων του οστικού ιστού.

### 1.2.3 Οστεοβλάστες

Οι οστεοβλάστες είναι πολικά κύτταρα τα οποία εντοπίζονται αποκλειστικά στην επιφάνεια του οστικού ιστού, διατεταγμένες ή μία δίπλα στην άλλη και προέρχονται από κύτταρα του αρχέγονου σθηκτικού ιστού (μεσέγχυμα). Ο ρόλος τους είναι η σύνθεση και εναπόθεση του κολλαγόνου τύπου I, των πρωτεογλυκανών και των γλυκοπρωτεϊνών, δηλαδή των ανόργανων συστατικών της θεμέλιας ουσίας. Κατά τη διεργασία της σύνθεσης της θεμέλιας ουσίας οι οστεοβλάστες έχουν κυβοειδές προς κυλινδρικό σχήμα και βασεόφιλο κυτταρόπλασμα, ενώ όταν αναστέλλεται η



συνθετική τους δραστηριότητα έχουν επίπεδο σχήμα και λιγότερο βασεόφιλο κυτταρόπλασμα. Οι οστεοβλάστες είναι δυνατόν σταδιακά να καλυφθούν με νεοσχηματισμένη θεμέλια ουσία και να διαφοροποιηθούν σε οστεοκύτταρα. Κατά τη διαδικασία αυτή σχηματίζονται κοιλότητες (βοθρία), οι οποίες καταλαμβάνονται από οστεοκύτταρα και τις αποφυάδες τους, καθώς και από μικρό ποσό εξωκυττάριας μη ασβεστοποιημένης θεμέλιας ουσίας. [6][9][10][11]

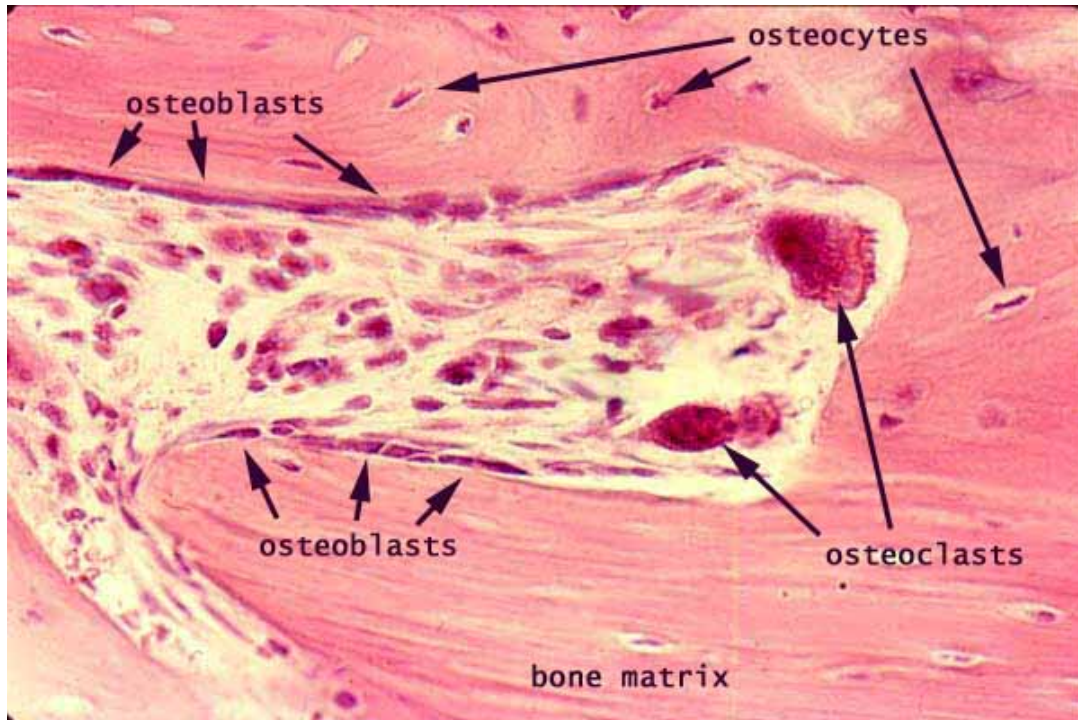
#### **1.2.4 Οστεοκύτταρα**

Τα οστεοκύτταρα προκύπτουν από τη διαφοροποίηση των ώριμων οστεοβλαστών και συναντώνται μέσα σε κοιλότητες (βοθρία) της θεμέλιας ουσίας. Κάθε κοιλότητα περιέχει μόνο ένα οστεοκύτταρο. Οι κυτταροπλασματικές αποφυάδες των οστεοκυττάρων εκτείνονται διαμέσου των σωληνίσκων της θεμέλιας ουσίας και ενώνονται μεταξύ τους, επιτρέποντας έτσι την ανταλλαγή μορίων κι θρεπτικών ουσιών τόσο μεταξύ γειτονικών οστεοκυττάρων, όσο και με τα αιμοφόρα αγγεία. Ο ρόλος των οστεοκυττάρων είναι η διατήρηση της θεμέλιας ουσίας, ενώ ο θάνατος των οστεοκυττάρων προκαλεί την απορρόφησή της. Σε σχέση με τις οστεοβλάστες, τα οστεοκύτταρα έχουν αμυγδαλοειδές σχήμα, καθώς και πιο ελαττωμένο και πιο αδρό ενδοπλασματικό δίκτυο. Το μικρό μέγεθος των οστεοκυττάρων είναι ανάλογο του χαμηλού επιπέδου πρωτεϊνοσύνθεσής τους.

#### **1.2.5 Οστεοκλάστες**

Οι οστεοκλάστες είναι πολυπύρρηνα διακλαδιζόμενα κύτταρα πολύ μεγάλου μεγέθους. Εμφανίζονται μέσα σε σκαφοειδείς κοιλότητες της θεμέλιας ουσίας σε περιοχές όπου πραγματοποιείται απορρόφηση του οστού. Σε αντίθεση με τις οστεοβλάστες και τα οστεοκύτταρα τα οποία προέρχονται από μεσεγχυματικά βλαστικά κύτταρα, οι οστεοκλάστες προέρχονται από αιμοποιητικά κύτταρα του μυελού των οστών. Ο ρόλος των οστεοκλαστών στο μεταβολισμό του οστού είναι η απορρόφησή του. Οι ενεργές οστεοκλάστες παρουσιάζουν δύο διακριτές περιοχές πλασματικής μεμβράνης. Η πρώτη περιοχή δημιουργείται από την αναδίπλωση της κυτταρικής επιφάνειας, που έρχεται σε επαφή με τη θεμέλια ουσία, σε υποδιαιρούμενες προεκβολές, σχηματίζοντας μια πτυχωτή παρυφή. Γύρω από την πτυχωτή παρυφή εμφανίζεται μια δεύτερη κυτταροπλασματική περιοχή, η διαυγής ζώνη, η οποία δεν

περιέχει οργανίδια, αλλά είναι πλούσια σε νημάτια ακτίνης. Η διαυγής αυτή ζώνη αποτελεί τη θέση προσκόλλησης της οστεοκλάστης με τη θεμέλια ουσία, δημιουργώντας ένα υποκυτταρικό θύλακα, μέσα στον οποίο πραγματοποιείται η απορρόφηση του οστού. [6][9][10][11]



**Εικόνα 1.4** Φωτομικρογραφία τομής οστού όπου εντοπίζονται και τα 3 είδη οστικών κυττάρων.

### 1.3 Ιστική Μηχανική-Μηχανική του Οστικού Ιστού

Η επιστήμη της Ιστικής Μηχανικής αποτελεί την εφαρμογή των βιολογικών, χημικών και μηχανικών αρχών, με στόχο την επισκευή, αποκατάσταση και αναγέννηση του ζωντανού ιστού του οργανισμού με τη χρήση είτε βιοϋλικών, είτε κυττάρων, είτε βιοχημικών και φυσικοχημικών παραγόντων, είτε συνδυασμού αυτών.

Συνηθέστερα οι τεχνικές εφαρμογής της Ιστικής Μηχανικής απασχολούν ένα από τα παραπάνω στοιχεία. Χαρακτηριστικό και αρκετά σύνηθες παράδειγμα εφαρμογής της Ιστικής Μηχανικής είναι η κατασκευή πορωδών κριωμάτων ιστών από βιοϋλικά, με στόχο την ανάπτυξη κυττάρων σε αυτά και κατ' επέκταση την επισκευή, αποκατάσταση και αναγέννηση του ιστού (Langer και Vacanti, 1993). Τα παραπάνω

## «Ανάπτυξη τρισδιάστατων ικριωμάτων βιομορίων-υδροξυαπατίτη»

ικριώματα βιοϋλικών μπορούν να χρησιμοποιηθούν ως εμφυτεύματα σε οργανισμούς (in vivo) χωρίς καμία περαιτέρω διεργασία τροποποίησης.

Το επόμενο στάδιο στην παραπάνω μέθοδο παραγωγής ικριωμάτων από βιοϋλικά είναι η καλλιέργεια των ικριωμάτων σε περιβάλλον εργαστηρίου (in vitro), μετά από εμβολιασμό τους με πληθυσμό κυττάρων και κατάλληλου θρεπτικού υλικού, έτσι ώστε τα κύτταρα να πολλαπλασιαστούν και να αντικαταστήσουν σταδιακά το αρχικό ικρίωμα αποικοδομώντας το, με αποτέλεσμα τη δημιουργία ενός νέου ιστού αντικατάστασης ο οποίος κατά την εμφύτευσή του θα λειτουργεί ακριβώς όπως και ο αρχικός ιστός του ξενιστή οργανισμού.

Για να επιτευχθεί ο στόχος της αναδόμησης ενός ιστού, τα ικριώματα πρέπει να πληρούν απαραίτητα κάποιες προϋποθέσεις. Αρχικά η παρουσία έντονου πορώδους και κατάλληλου μεγέθους πόρων είναι απαραίτητα για την μετακίνηση, ανάπτυξη και πολλαπλασιασμό των νέων ιστικών κυττάρων, καθώς και για τη μεταφορά των απαραίτητων θρεπτικών ουσιών που χρειάζονται για τη λειτουργία των κυττάρων. Πολύ μικρό πορώδες δεν θα επιτρέψει ούτε την ανάπτυξη κυττάρων ούτε τη μεταφορά θρεπτικού υλικού στον όγκο του ικριώματος. Από την άλλη πολύ μεγάλο πορώδες θα επιφέρει φαινόμενα ψαθυρότητας του υλικού καθώς και δυσκολίες ανάπτυξης των νέων ιστικών κυττάρων. Επίσης θα πρέπει να διασφαλίζεται ο παράγοντας της ικανότητας βιοαποικοδόμησης του ικριώματος από τον οργανισμό, έτσι ώστε να αποφευχθεί η διαδικασία χειρουργικής αφαίρεσής του, μετά την αποκατάσταση του ιστού. Σημαντικός παράγοντας όσο αφορά στην βιοαποικοδόμηση του ικριώματος, αποτελεί ο ρυθμός με τον οποίο αυτή συμβαίνει. Ιδανικά ο ρυθμός αυτός θα πρέπει να είναι όσο πιο κοντά στον ρυθμό δημιουργίας του νέου ιστού, έτσι ώστε καθώς τα κύτταρα κατασκευάζουν τη δική τους φυσικής μήτρας δομή γύρω από τον εαυτό τους, το ικρίωμα θα είναι σε θέση να αναλαμβάνει το μηχανικό φορτίο που δέχεται ο ιστός παρέχοντας σταθερότητα δομής του οργάνου χωρίς να προκληθεί περαιτέρω βλάβη λόγω μηχανικής αστοχίας. Από ένα σημείο και μετά και εφόσον η αποικοδόμηση του ικριώματος έχει προχωρήσει σε πολύ μεγάλο βαθμό, αυτό θα καταρρεύσει, αφήνοντας το νεοσχηματισμένο φυσικό ιστό να αναλάβει πλήρως το μηχανικό φορτίο.

Η παραπάνω μέθοδος κατασκευής πορωδών ικριωμάτων από βιοϋλικά χρησιμοποιείται από τον κλάδο της Ιστικής Μηχανικής για την κατασκευή οστικών

## «Ανάπτυξη τρισδιάστατων ικριωμάτων βιομορίων-υδροξυαπατίτη»

ικριωμάτων και κατά συνέπεια μοσχευμάτων οστών. Ένα οστικό μόσχευμα θα πρέπει όχι μόνο να έχει κατάλληλο πορώδες και να είναι βιοαποικοδομήσιμο ή βιοδιασπώμενο, αλλά να πληροί ταυτόχρονα και τους επιμέρους παράγοντες της οστεοαγωγιμότητας, της οστεοεπαγωγικότητας και της οστεογενετικότητας, έτσι ώστε να επιτυγχάνεται όσο το δυνατόν καλύτερη οστεοενσωμάτωση, δηλαδή σύνδεση μεταξύ της φυσικής οστικής μήτρας και της σύνθετης μήτρας του εμφυτεύματος.

Οστεοαγωγιμότητα είναι η ικανότητα ενός ικριώματος ή εμφυτεύματος να προωθεί την προσκόλληση των οστεβλαστικών κυττάρων τόσο στην επιφάνεια όσο και σε όλο το εσωτερικό του ικριώματος ή του εμφυτεύματος. Σε μια *in vivo* καλλιέργεια ικριώματος με οστεοβλαστικά κύτταρα, η προσκόλληση, μετακίνηση και πολλαπλασιασμός των κυττάρων, δηλώνει την ύπαρξη οστεοαγωγιμότητας στο υλικό.

Οστεοεπαγωγικότητα είναι η ικανότητα ενός ικριώματος ή εμφυτεύματος να προωθεί την διαφοροποίηση των μεσεγχυματικών βλαστικών κυττάρων σε οστεοβλάστες και κατά συνέπεια στο σχηματισμό οστικού ιστού. Επίσης ως οστεοεπαγωγικότητα αναφέρεται και η δυνατότητα προώθησης της φαινότυπης εξέλιξης ενός οστεοβλάστη, από ένα πρώιμο οστεοβλαστικό κύτταρο σε ένα ώριμο οστεοβλαστικό κύτταρο και στη συνέχεια τη διαφοροποίησή του σε οστεοκύτταρο.

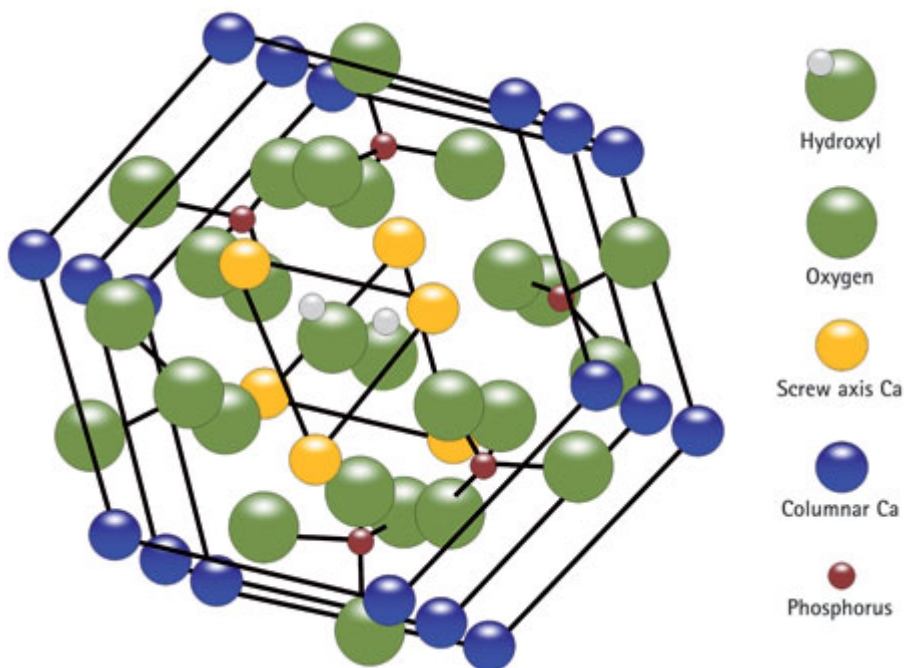
Οστεογενετικότητα είναι η ικανότητα ενός ικριώματος ή εμφυτεύματος να προωθεί εκ νέου τον σχηματισμό οστών, ο οποίος θα συνέβαινε απουσία κυττάρων ξενιστή. Για να εμφανίζει ένα ικρίωμα οστεογενετικότητα θα πρέπει να εμβολιαστεί με κύτταρα πριν από την εμφύτευση.

Τέλος ένα οστικό μόσχευμα θα πρέπει να έχει παραπλήσιες μηχανικές ιδιότητες με τον αντίστοιχο φυσικό οστικό ιστό, προκειμένου να μπορεί να προσφέρει επαρκή μηχανική στήριξη αμέσως μετά την εμφύτευση και μέχρι το τέλος της διαδικασίας αποκατάστασης του οστού. Το εύρος των μηχανικών ιδιοτήτων των οστικών ικριωμάτων εξαρτάται από το αν ο οστικός ιστός είναι συμπαγής ή σπογγώδης. Σε σπογγώδη οστά η αντοχή σε θλίψη κυμαίνεται από 4 έως 12 MPa, και το μέτρο συμπίεστικότητας μεταξύ 100-500 MPa, ενώ για τα συμπαγή οστά η αντοχή σε θλίψη κυμαίνεται από 130 έως 180 MPa, και το μέτρο συμπίεστικότητας μεταξύ 12-18 GPa.

[6]

#### 1.4 Υδροξυαπατίτης

Ο υδροξυαπατίτης (Hap) με χημική σύνθεση  $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$  είναι ένα ορυκτό άλας και αποτελεί ένα βιοσυμβατό και βιοενεργό υλικό με κρυσταλλική δομή παρόμοια με αυτή του βιολογικού απατίτη που συναντάται στους σκληρούς ιστούς, όπως τα οστά και τα δόντια. Είναι το λιγότερο διαλυτό και πιο σταθερό άλας του ασβεστίου και εξαιτίας της πολύ καλής βιοσυμβατότητας, βιοδραστικότητας και οστεοεπαγωγικότητας που εμφανίζει, χρησιμοποιείται ευρέως για την κατασκευή βιοκεραμικών και σύνθετων βιοϋλικών εμφυτευμάτων για ορθοπεδικές και οδοντιατρικές εφαρμογές.



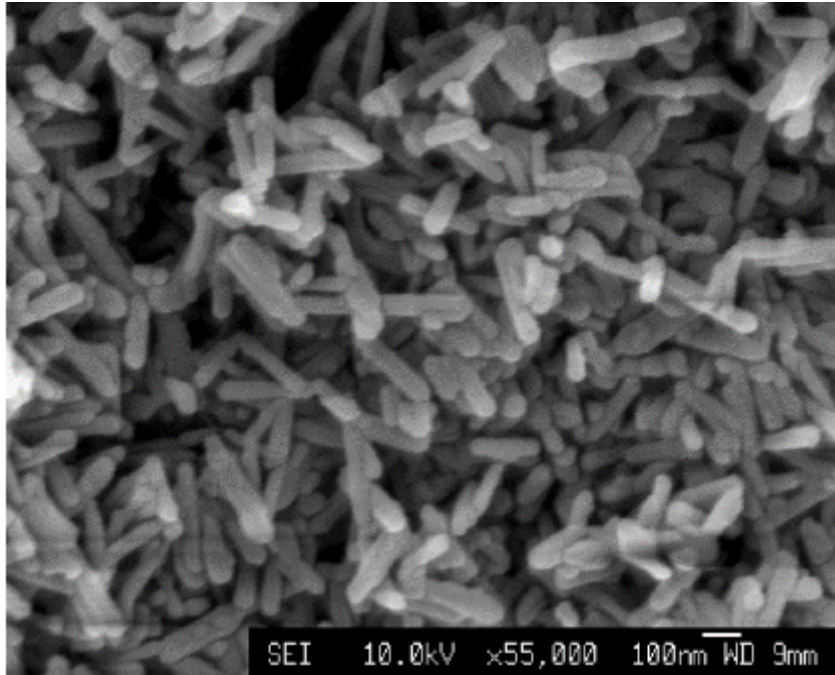
**Εικόνα 1.5** Απεικόνιση της κρυσταλλικής δομής του Υδροξυαπατίτη.

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 συνήθεις πλεγματικές υποκαταστάσεις που υφίστανται οι κρύσταλλοι του υδροξυαπατίτη είναι των ιόντων  $\text{Ca}^{2+}$  από ιόντα  $\text{Sr}^{2+}$  και ιόντων  $\text{PO}_4^{3-}$  από ιόντα  $\text{CO}_3^{2-}$  και  $\text{SO}_4^{2-}$ , καθώς και η πιθανότητα δημιουργίας πλεγματικών κενών στις θέσεις των ιόντων  $\text{Ca}^{2+}$  και  $\text{OH}^-$ . Η αναλογία Ca/P στον φυσικό υδροξυαπατίτη είναι της τάξης του 1,5 ενώ στον συνθετικό της τάξης του 1,67.

### «Ανάπτυξη τρισδιάστατων ικριωμάτων βιομορίων-υδροξυαπατίτη»

Ο υδροξυαπατίτης αποτελεί μια θερμικά ασταθή ένωση και εξαιτίας της παραπάνω ποικιλίας στην στοιχειομετρία του λόγω των υποκαταστάσεων που υφίσταται, το εύρος αποσύνθεσής του ορίζεται σε θερμοκρασίες από 800 °C έως 1200 °C. Αποτελεί ένα κεραμικό βιοϋλικό με πολύ χαμηλές μηχανικές ιδιότητες (σκληρότητα, αντοχή) και στην πυκνή μορφή του δεν διατηρείται για μεγάλα χρονικά διαστήματα σε συνθήκες έντονων φορτίων και τριβών. Εξαιτίας όμως της άριστης βιοσυμβατότητάς του και της ικανότητάς του να σχηματίζει άμεσους δεσμούς με τους σκληρούς ιστούς προωθώντας έτσι την ιστική αναδόμηση, χρησιμοποιείται πολύ συχνά από τον κλάδο της Ιστικής Μηχανικής σε συνδυασμό και με άλλα βιοϋλικά με σκοπό την κατασκευή σύνθετων εμφυτευμάτων και επικαλύψεων με άριστες βιολογικές και μηχανικές ιδιότητες. Ενδεικτικά η εμφύτευση σωματιδίων καθώς και πορωδών ικριωμάτων υδροξυαπατίτη σε οστικούς ιστούς έχει αποδειχτεί ότι μπορεί να οδηγήσει στο σχηματισμό νέων δικτυωτών οστικών πολυστρωμάτων σε διάστημα 4-8 εβδομάδων.

Ο βιολογικός υδροξυαπατίτης κρυσταλλώνεται στο εξαγωνικό σύστημα με παραμέτρους πλέγματος  $a = b = 9,432 \text{ \AA}$  και  $c = 6,881 \text{ \AA}$ , με πιθανότερο προσανατολισμό ανάπτυξης μοναδιαίων κρυσταλλιτών κατά μήκος του άξονα  $c$ . Ο προτιμητέος αυτός προσανατολισμός είναι η πιθανότερη αιτία της βελονοειδούς μορφολογίας των κρυστάλλων του υδροξυαπατίτη. Αντίθετα ο συνθετικός στοιχειομετρικός υδροξυαπατίτης που συντίθεται σε υψηλές θερμοκρασίες (1000-1200 °C) εμφανίζει μονοκλινή δομή. Ο προσανατολισμός και η μορφολογία των κρυστάλλων του υδροξυαπατίτη αποτελούν σημαντικό παράγοντα για τη σχέση σύνδεσης μεταξύ εμφυτεύματος και οστού, καθώς στο φυσικό οστό οι κρύσταλλοι του βιολογικού υδροξυαπατίτη είναι ευθυγραμμισμένοι με τις ίνες κολλαγόνου του οστού. Έτσι για να επιτευχθεί η αρτιότερη σύνδεση μεταξύ εμφυτεύματος και οστού καθώς και μηχανικές ιδιότητες, θα πρέπει να υπάρχει συμφωνία διεύθυνσης των κρυστάλλων υδροξυαπατίτη και από τις δύο πλευρές. [12][13][14][15][17]



**Εικόνα 1.6** Εικόνα μικροσκοπίας διερχόμενης δέσμης (TEM) κρυστάλλων υδροξυαπατίτη.

#### 1.4.1 Μηχανισμός Κρυστάλλωσης Υδροξυαπατίτη

Η κρυστάλλωση του υδροξυαπατίτη φυσιολογικά πραγματοποιείται μέσω της καθίζησης ενός αριθμού ενδιάμεσων φάσεων, που διαλύονται και επανακαθιζάνουν μέχρι τον σχηματισμό της πιο θερμοδυναμικά σταθερής φάσης του. 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 στον σχηματισμό των φάσεων του φωσφορικού ασβεστίου.

## «Ανάπτυξη τρισδιάστατων ικριωμάτων βιομορίων-υδροξυαπατίτη»

Η διαδικασία της κρυσταλλοποίησης ξεκινάει όταν η συγκέντρωση των ιόντων στο διάλυμα ξεπερνά τη σταθερά διαλυτότητας του προϊόντος για τον συγκεκριμένο κρύσταλλο. Η διαλυτότητα του προϊόντος καθορίζει τις θερμοδυναμικές συνθήκες που απαιτούνται για την ανόργανη καθίζηση και συνδέεται με τη δραστικότητα (δραστική συγκέντρωση) των ιόντων στο διάλυμα σε ισορροπία με τη στερεή φάση.

Οι θερμοδυναμικοί υπολογισμοί της κρυσταλλοποίησης πρέπει να συμπεριλάβουν και τους κινητικούς παράγοντες που αφορούν στον σχηματισμό πυρήνων, μία διαδικασία απαραίτητη για την κρυσταλλοποίηση καθώς ο σχηματισμός αυτός 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 μία λεπτή ισορροπία ανάμεσα στην ελεύθερη ενέργεια που απαιτείται για τον σχηματισμό μιας διεπιφάνειας στερεού-υγρού και στην ενέργεια των ιόντων του διαλύματος (κύριος όγκος). 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 υπαρχόντων 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 δραστικότητα 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 τον 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 υπέρκορο σε σχέση με την αρχική φάση. Παρεμπόδιση της κρυσταλλικής ανάπτυξης από πρόσθετα επιτυγχάνεται με προσρόφηση τους στην επιφάνεια του αναπτυσσόμενου κρυστάλλου, μπλοκάροντας έτσι την ανάπτυξή του. Εάν τα πρόσθετα προσροφώνται επιλεκτικά σε συγκεκριμένες κρυσταλλικές επιφάνειες, τότε η ανάπτυξη θα παρεμποδιστεί κατά τη συγκεκριμένη μόνο κατεύθυνση, τροποποιώντας με αυτόν τον τρόπο τη μορφολογία του κρυστάλλου.

#### 1.4.2 Τύποι Εμφυτευμάτων Υδροξυαπατίτη

Τα εμφυτεύματα υδροξυαπατίτη παρασκευάζονται σε κεραμική και μη κεραμική μορφή. Ο κεραμικής μορφής υδροξυαπατίτης χρησιμοποιούταν μέχρι τα μέσα του 1970 σε ιατρικές επεμβάσεις και η παρασκευή του γινόταν μέσω της διαδικασίας πυροσσωμάτωσης (sintering). Κατά τη διαδικασία πυροσσωμάτωσης οι κρύσταλλοι του υδροξυαπατίτη θερμαίνονταν ώστε να συμπυκνωθούν. Στη συνέχεια διατηρούνταν σε συνθήκες χαμηλού pH και επαναθερμαίνονταν σε θερμοκρασία 600-700 °C ώστε το υλικό που τελικά θα προέκυπτε μετά το τέλος της παραπάνω διαδικασίας να ήταν σκληρό, σταθερό και μη απορροφήσιμο λειτουργικά, ώστε να μπορεί να χρησιμοποιηθεί σε οδοντιατρικές και γναθοχειρουργικές εφαρμογές. Με παρόμοια μέθοδο παρασκευάζονταν και τα πορώδη «κοραλλιοειδή» εμφυτεύματα υδροξυαπατίτη για ορθοπεδικές εφαρμογές. Στην μη κεραμική του μορφή ο υδροξυαπατίτης χρησιμοποιούνταν για την παραγωγή βιολογικού τσιμέντου, μέσω της άμεσης *in vivo* κρυσταλλοποίησής του. Τα μη κεραμικά εμφυτεύματα υδροξυαπατίτη παρουσιάζουν μεγαλύτερη διαλυτότητα από τον κεραμικό πυροσσωματωμένο υδροξυαπατίτη αλλά με συγκριτικά χαμηλότερες μηχανικές ιδιότητες και αντοχή.

Για τον παραπάνω λόγω ο κεραμικής μορφής υδροξυαπατίτης δεν ενδείκνυται για εφαρμογές εμφυτευμάτων τα οποία δέχονται έντονα φορτία, όπως οδοντικά και οστικά εμφυτεύματα και η εφαρμογή τους περιορίζεται σε μικρότερα εμφυτεύματα στα οποία ασκούνται πολύ μικρές φορτίσεις. Εξαιτίας όμως των σπουδαίων βιολογικών ιδιοτήτων του υδροξυαπατίτη, γίνονται προσπάθειες βελτίωσης της μηχανικής συμπεριφοράς των κεραμικών υλικών του, με την εισαγωγή πολυμερικών

και μεταλλικών σωματιδιακών ενισχύσεων, σύνθετων πολυμερικών και μεταλλικών υλικών με τον υδροξυαπατίτη, καθώς και κεραμικές επικαλύψεις υδροξυαπατίτη σε μεταλλικά εμφυτεύματα.

#### 1.4.3 Οστικά Τσιμέντα Φωσφορικού Ασβεστίου

Τα οστικά τσιμέντα φωσφορικού ασβεστίου αποτελούν μία κατηγορία βιοϋλικών και περιλαμβάνουν μια οικογένεια υλικών με παρόμοιες ιδιότητες, δομή και χρήσεις. Κύριο συστατικό τους είναι το φωσφορικό ασβέστιο, εξαιτίας της βιοσυμβατότητας του με τους βιολογικούς απατίτες και η τελική δομή τους αποτελείται από απατίτη ή μπρουσίτη. Η ιδέα των οστικών τσιμέντων εμφανίστηκε για πρώτη φορά στα μέσα της δεκαετίας του 80 και η μελέτη τους συνεχίζεται μέχρι και σήμερα.

Η παρασκευή τους βασίζεται στην ανάμιξη και αντίδραση ορθοφωσφορικού ασβεστίου με υγρό μονομερές προς σχηματισμό υλικού με παρόμοια χημική σύσταση με τον υδροξυαπατίτη, με χαμηλή κρυσταλλικότητα και έντονο μικρο-πορώδες και νανο-πορώδες. Ως πρώτες ύλες για την αντίδραση παρασκευής των οστικών τσιμέντων χρησιμοποιούνται σκόνες από  $\text{CaHPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ ,  $\text{Ca}_4(\text{PO}_4)_2\text{O}$ ,  $\text{CaHPO}_4$ ,  $\text{Ca}_8\text{H}_2(\text{PO}_4)_6 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ ,  $\text{Ca}(\text{H}_2\text{PO}_4)_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$  ή TCP και νερό ή άλλο υγρό, όπως φωσφορικό οξύ ( $\text{H}_3\text{PO}_4$ ) ή ένυδρο φωσφορικό άλας του νατρίου ( $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ ). Στη συνέχεια μέσω της πήξης του, το υλικό μετασχηματίζεται στη φάση του υδροξυαπατίτη, ενώ παράλληλα δημιουργείται και ένα έντονο πορώδες δίκτυο (30-50%). Για την προστασία και αλλοίωση του υλικού από τα σωματικά υγρά, γίνεται προσθήκη αλγινικού νατρίου, ενώ επιπλέον προσθήκες μπορούν να πραγματοποιηθούν (πολυμερή, σωματίδια ή ίνες ενίσχυσης, βιοϋαλοι κ.ά.), με σκοπό την ενίσχυση της μηχανικής και βιολογικής συμπεριφοράς του υλικού.

Η σύσταση και η κοκκομετρία των πρώτων υλών για την παρασκευή των οστικών τσιμέντων επηρεάζουν άμεσα την τελική σύσταση και δομή τους, καθώς και τις μηχανικές και ρεολογικές ιδιότητες των υλικών αυτών. Τα οστικά τσιμέντα εμφανίζουν υψηλή βιοσυμβατότητα, βιοδραστικότητα και οστεοεπαγωγικότητα, ενισχύοντας τη φυσική διαδικασία αναδόμησης και ανάπλασης των οστικών ιστών του οργανισμού και τη σύνδεση μεταξύ εμφυτεύματος και οστού. Το βασικό τους όμως μειονέκτημα είναι η χαμηλή μηχανική τους αντοχή. Αν και παρουσιάζουν

εύκολη μορφοποίηση κατά το στάδιο της πήξης τους, οι κακές μηχανικές τους αποδόσεις περιορίζουν στο ελάχιστο τις εφαρμογές τους σε σχέση με τα αμιγώς κεραμικά υλικά.

#### 1.4.4 Κεραμικά Καθαρού Υδροξυαπατίτη

Για την παραγωγή κεραμικών υλικών καθαρού υδροξυαπατίτη είναι απαραίτητη συγκεκριμένη στοιχειομετρική αναλογία ιόντων ασβεστίου και φωσφόρου. Η τιμή της ατομικής αναλογίας Ca/P δε πρέπει να υπερβαίνει το 1,67, αλλιώς κατά την πυροσυσσώματωση της σκόνης του υδροξυαπατίτη σχηματίζεται οξείδιο του ασβεστίου (CaO), το οποίο προκαλεί μείωση των μηχανικών ιδιοτήτων και της συνεκτικότητας του πυροσυσσωματωμένου υλικού. Η πυροσυσσώματωση κάποιων κόνεων υδροξυαπατίτη μπορεί να πραγματοποιηθεί απουσία πίεσης σε θερμοκρασίες 1000-1200 °C. Οι μέθοδοι θερμής μονοαξονικής συμπίεσης (hot pressing) και θερμής ισοστατικής συμπίεσης (hot isostatic pressing) κατά την πυροσυσσώματωση της σκόνης του υδροξυαπατίτη μειώνουν την απαιτούμενη θερμοκρασία συσσωμάτωσης και προκαλούν πιο πυκνό «πακετάρισμα» των κόκκων. Λόγω λοιπόν της μικρότερης θερμοκρασίας πυροσυσσώματωσης και των συνθηκών πίεσης, με τις παραπάνω μεθόδους είναι δυνατό να παραχθούν κεραμικά υλικά υδροξυαπατίτη με μικρότερη κοκκομετρία, μεγαλύτερη θερμική σταθερότητα και πυκνότητα και κατ' επέκταση καλύτερη μηχανική συμπεριφορά και αντοχή.

Οι βέλτιστες τιμές αντοχής των κεραμικών καθαρού υδροξυαπατίτη προκύπτουν για τιμή του λόγου Ca/P=1,67, ενώ η αντοχή των τελικών πυροσυσσωματωμένων υλικών είναι αντιστρόφως ανάλογη του πορώδους που τελικά σχηματίζεται. Συναρτήσε των συνθηκών πυροσυσσώματός του, το μέτρο ελαστικότητας των υλικών αυτών είναι μεταξύ 35-120 MPa, ενώ το εύρος του μέτρου Weibull είναι μεταξύ 5-18 δηλώνοντας τον ψαθυρό κεραμικό χαρακτήρα θραύσης τους. Εξαιτίας των προαναφερθέντων χαμηλών ιδιοτήτων τους το εύρος εφαρμογών των συγκεκριμένων υλικών περιορίζεται σε εμφυτεύματα τα οποία δέχονται μηδενικές ή πολύ χαμηλές μηχανικές φορτίσεις.

#### 1.4.5 Επικαλύψεις Υδροξυαπατίτη

Μια από τις σύγχρονες εφαρμογές του υδροξυαπατίτη αποτελεί η τεχνική επικάλυψής του σε μεταλλικά ορθοπεδικά και οδοντιατρικά εμφυτεύματα. Με την παραπάνω τεχνική παράγονται σύνθετα εμφυτεύματα τα οποία έχουν τις υψηλές μηχανικές ιδιότητες των μετάλλων, σε συνδυασμό με τις βιολογικές ιδιότητες του υδροξυαπατίτη στην επιφάνειά τους.

Τα μη επικαλυμμένα μεταλλικά εμφυτεύματα δεν συνδέονται με τον γειτονικό οστικό ιστό, αλλά περιβάλλονται από πυκνό ινώδη ιστό, με αποτέλεσμα την μειωμένη πρόσφυση και διανομή των τάσεων μεταξύ φυσικού οστού και εμφυτεύματος. Αντίθετα, τα επικαλυμμένα με υδροξυαπατίτη εμφυτεύματα συνδέονται με τον γειτονικό οστικό ιστό, εξασφαλίζοντας καλύτερη πρόσφυση του εμφυτεύματος με το οστό και μειώνοντας τον κίνδυνο απόρριψης του εμφυτεύματος από τον οργανισμό. Το στρώμα επικάλυψης του υδροξυαπατίτη μειώνει την αποδέσμευση μεταλλικών ιόντων προς τον οργανισμό και προστατεύει τη μεταλλική μήτρα του εμφυτεύματος από συνθήκες διάβρωσης από το περιβάλλον του οργανισμού. Επιπλέον στην περίπτωση των πορωδών μεταλλικών εμφυτευμάτων η ανάπτυξη των οστικών ιστών πραγματοποιείται και εντός των πόρων, εξαιτίας της παρουσίας και της σύνδεσης με τον υδροξυαπατίτη. Τέλος, εκτός από τους παράγοντες της οστεοσυμβατότητας και της οστεογενετικότητας, η παρουσία του υδροξυαπατίτη στην επιφάνεια των μεταλλικών εμφυτευμάτων αυξάνει και την αιμοσυμβατότητά τους. Κατά την εμφύτευση ενός εμφυτεύματος εμφανίζεται η τάση να προσκολλώνται πάνω του αιμοπετάλια και κατά την εναπόθεση των αιμοπεταλίων σχηματίζεται ένα λεπτό στρώμα πρωτεϊνών (φιλμ) το οποίο τροποποιεί τις επιφανειακές ιδιότητες του βιοϋλικού. Χωρίς την προσθήκη του υδροξυαπατίτη, το λεπτό αυτό φιλμ πολλές φορές είναι ατελές και επειδή έρχεται σε επαφή με το αίμα και τα υγρά του σώματος οδηγεί στη γένεση θρόμβων.

Ο υδροξυαπατίτης που χρησιμοποιείται για τις επικαλύψεις εμφυτευμάτων μπορεί να είναι είτε φυσικής προέλευσης, από τα οστά κάποιου ζώου (συνηθέστερα βοοειδών), είτε συνθετικός. Η συνηθέστερη μέθοδος επικάλυψης του υδροξυαπατίτη είναι με ψεκασμό πλάσματος σε ατμοσφαιρική πίεση (APS) ή υπό κενό (VPS). Εναλλακτικές τεχνικές επικάλυψης είναι με θερμή ισοστατική πίεση, με ηλεκτροχημική απόθεση και με ψεκασμό χρώματος. Οι επικαλύψεις πραγματοποιούνται τόσο σε μεταλλικά υλικά (κράματα Ti, Ca-Cr-Mo), καθώς και σε πολυμερή (PMMA), σε κεραμικά

( $ZrO_2$ ,  $Al_2O_3$ ) και σε σύνθετα υλικά (με ενισχύσεις γραφιτικών ινών). Ο κυριότερος παράγοντας όσον αφορά στη φύση του επικαλυπτόμενου υποστρώματος και του επιστρώματος είναι η απουσία μορφών φωσφορικού ασβεστίου, οι οποίες μπορεί να αλλοιώσουν τη χημική σταθερότητα των εμφυτευμάτων και να προκαλέσουν την αποικοδόμησή τους.

#### 1.4.6 Πορώδη Κεραμικά Υδροξυαπατίτη

Η χρήση πορωδών κεραμικών εμφυτευμάτων υδροξυαπατίτη βασίζεται στο πλεονέκτημα της επαφής και σύνδεσής τους με το φυσικό οστό και της δυνατότητας ανάπτυξης νέων οστικών κυττάρων και ιστών εντός των πόρων του εμφυτεύματος. Ο νέος οστικός ιστός που αναπτύσσεται εντός των πόρων του εμφυτεύματος αυξάνει την αντοχή του καθώς και την συνοχή με το γειτονικό οστό. Καθώς αναπτύσσεται ο νέος οστικός ιστός εντός των πόρων του εμφυτεύματος, το ίδιο το εμφύτευμα σταδιακά βιοαποικοδομείται από τον ίδιο τον οργανισμό με ρυθμό λίγο εκατοστιαίων μονάδων ετησίως, μέχρις ότου το νεοσύστατο οστό να αντικαταστήσει πλήρως το εμφύτευμα. Ο συγκεκριμένος τύπος εμφυτευμάτων εφαρμόζεται σε περιπτώσεις πλήρωσης υλικού σε θραυσμένα οστά, σε ορθογναθικές επεμβάσεις και επεμβάσεις αύξησης της φατνιακής ζώνης και σε συνδυασμό με συστήματα απελευθέρωσης φαρμακευτικών ουσιών.

Η συνηθέστερη μέθοδος παρασκευής πορωδών κεραμικών υδροξυαπατίτη είναι μέσω της πυροσυσσωμάτωσης σκόνης με κατάλληλα προσθετικά (παραφίνη, ναφθαλίνη, υπεροξειδίο του υδρογόνου) με σκοπό τη δημιουργία πορώδους δικτύου (μεγέθους πόρων 100-600  $\mu m$ ), εξαιτίας της έκλυσης αερίων σε υψηλές θερμοκρασίες. Η αύξηση του ποσοστού και του μεγέθους κόκκων των τελικών κεραμικών είναι αντιστρόφως ανάλογη της αντοχής και της σκληρότητάς τους. Σε σύγκριση με τα κεραμικά καθαρού υδροξυαπατίτη τα πορώδη κεραμικά παρουσιάζουν μικρότερη αντοχή σε κόπωση και μηχανικές ιδιότητες.

#### 1.4.7 Μέθοδοι Παρασκευής Υδροξυαπατίτη

Εξαιτίας της σημασίας και της χρησιμότητας του υδροξυαπατίτη στον τομέα των βιοϋλικών κυρίως για ορθοπεδικές και οδοντιατρικές εφαρμογές, τα τελευταία χρόνια

## «Ανάπτυξη τρισδιάστατων ικριωμάτων βιομορίων-υδροξυαπατίτη»

έχουν δοκιμαστεί ποικίλες μέθοδοι παρασκευής του εργαστηριακά. Οι κυριότερες αυτών παρατίθεται παρακάτω[15]:

- Μέθοδος Καταβύθισης-Χημικής Εναπόθεσης: Η τεχνική αυτή αποτελεί την πιο διαδεδομένη μέθοδο παραγωγής υδροξυαπατίτη και βασίζεται στην αντίδραση εξουδετέρωσης πρόδρομων αντιδραστηρίων, με μοναδικό παραπροϊόν το νερό. Συνηθέστερα τα πρόδρομα αντιδραστήρια που επιλέγονται για την δημιουργία του ένυδρου φωσφορικού άλατος του ασβεστίου είναι ορθοφωσφορικό οξύ και υδροξείδιο του ασβεστίου σύμφωνα με την παρακάτω αντίδραση εξουδετέρωσης:



Εναλλακτικά ως πρόδρομα αντιδραστήρια χρησιμοποιούνται ουσίες ή συνδυασμοί ουσιών που δίνουν τα απαραίτητα φωσφορικά και ασβεστικά ιόντα για την δημιουργία του υδροξυαπατίτη, όπως για παράδειγμα το φωσφορικό αμμώνιο  $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$  και το νιτρικό ασβέστιο  $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ . Η επιλογή των πρόδρομων ουσιών, καθώς και οι παράγοντες θερμοκρασίας, pH και ρυθμού πραγματοποίησης της αντίδρασης σύνθεσης του υδροξυαπατίτη επηρεάζουν άμεσα το ρυθμό και την ομοιογένεια κρυστάλλωσης του τελικού υλικού, καθώς και τη μορφολογία και τη δομή του.

- Υδροθερμική μέθοδος: Η μέθοδος αυτή βασίζεται στην πραγματοποίηση απλών ή ετερογενούς φάσης αντιδράσεων, υπό συνθήκες αυξημένης θερμοκρασίας ( $>25 \text{ }^\circ\text{C}$ ) και πίεσης ( $>100 \text{ kPa}$ ), μέσα σε υδατικό διάλυμα με στόχο την άμεση κρυστάλλωση της φάσης του υδροξυαπατίτη. Η αύξηση των παραγόντων θερμοκρασίας και πίεσης βοηθούν στη βέλτιστη ρύθμιση του λόγου Ca/P στο τελικό προϊόν.
- Μέθοδος Επικάλυψης με Ηλεκτροπόθεση: Η μέθοδος αυτή χρησιμοποιείται για την επικάλυψη με πολύ λεπτό στρώμα νανο-υδροξυαπατίτη μιας επιφάνειας, μέσω ηλεκτροπόθεσης από διάλυμα ηλεκτρολύτη με φυσιολογικό pH. Στην περίπτωση αυτή ο ηλεκτρολύτης πρέπει να περιέχει την επιθυμητή συγκέντρωση ιόντων ασβεστίου  $[\text{Ca}^{2+}] = 6,1 \cdot 10^{-4} \text{ M}$  και φωσφόρου  $[(\text{PO}_4)^{3-}] = 3,4 \cdot 10^{-4} \text{ M}$ , η επιφάνεια απόθεσης να έχει υποστεί την κατάλληλη

### «Ανάπτυξη τρισδιάστατων ικριωμάτων βιομορίων-υδροξυαπατίτη»

προετοιμασία, καθώς και να γίνει έλεγχος του κατάλληλου ανοδικού δυναμικού για τον επιτυχή σχηματισμό της επικάλυψης.

- Μέθοδος Βιομιμητικής Απόθεσης: Στη μέθοδο αυτή γίνεται απόθεση μετασταθών συνθετικών σωματικών υγρών (SBF), πάνω σε βιοϋλικά, με στόχο τη δημιουργία ιστοσυμβατών επικαλύψεων με οστεογενετικές ιδιότητες, ενισχύοντας τη σύνδεση μεταξύ εμφυτεύματος και φυσικού ιστού. Τα συνθετικά σωματικά υγρά έχουν χημική σύσταση και συγκεντρώσεις ιόντων όμοιες σχεδόν με αυτές του ανθρωπίνου πλάσματος και βοηθούν στην αυθόρμητη πυρήνωση και ανάπτυξη ανθρακούχου υδροξυαπατίτη. In vitro έχει αποδειχθεί ότι η χρήση επιστρωμάτων συνθετικών σωματικών υγρών σε βιοϋλικά, σε φυσιολογικές συνθήκες θερμοκρασίας και pH, προωθεί την κυτταρική διαφοροποίηση των οστικών κυττάρων και ενισχύει τη σύνδεση μεταξύ σύνθετης και φυσικής οστικής μήτρας. Η μέθοδος της Βιομιμητικής Απόθεσης έχει αποδειχτεί εργαστηριακά ότι συμβάλει έντονα και αποτελεσματικά στην ενίσχυση της φυσικής διαδικασίας επανασηματισμού και αποκατάστασης των τραυματισμένων οστικών ιστών.
- Μέθοδος Λύματος-Πηκτής (Sol-Gel): Στη μέθοδο αυτή χρησιμοποιούνται πρόδρομα αντιδραστήρια όμοια με αυτά στη μέθοδο Καταβύθισης. Στη μέθοδο Sol-Gel τα πρόδρομα αντιδραστήρια δημιουργούν αρχικά ένα κολλοειδές υδατικό αιώρημα (Sol). Στη συνέχεια, υπό συγκεκριμένες συνθήκες τα κολλοειδή σωματίδια των πρώτων υλών αντιδρούν χημικά μεταξύ τους και σχηματίζουν ένα συνεχές τρισδιάστατο πλέγμα, το οποίο ονομάζεται ζελατίνη (Gel). Η ζελατίνη περιέχει αρχικά πόρους γεμάτους με αιώρημα και με την πάροδο του χρόνου συμπυκνώνεται και σκληραίνει. Με τον τρόπο αυτό παρασκευάζονται είτε συμπαγές υλικό υδροξυαπατίτη, είτε μικρά σωματίδια υδροξυαπατίτη σε μορφή σκόνης. Τα δείγματα υδροξυαπατίτη που παράγονται με την τεχνική Λύματος-Πηκτής έχει παρατηρηθεί ότι βελτιώνουν την σύνδεση και τη σταθερότητα της διεπιφάνειας μεταξύ φυσικής οστικής μήτρας και μήτρας εμφυτεύματος. Η μέθοδος αυτή προσφέρει πολύ καλό έλεγχο των παραμέτρων (ρυθμός, θερμοκρασία, pH) της διαδικασίας παραγωγής του υδροξυαπατίτη, καθώς επιδρούν άμεσα στην τελική δομή του υλικού.

## 1.5 Χιτοζάνη

Η χιτοζάνη αποτελεί ένα γραμμικό πολυσακχαρίτη που προκύπτει μετά τη μερική αποακετυλίωση της χιτίνης. Η χιτίνη, πολυ(β-(1→4)-N-ακετυλο-D-γλυκοζαμίνη, είναι ένας φυσικός βιοπολυμερής πολυσακχαρίτης, ο οποίος απαντάται σε πολύ μεγάλο αριθμό οργανισμών και αποτελεί το δεύτερο μεγαλύτερο σε ετήσια ποσότητα παραγωγής πολυμερές, μετά την σελουλόζη. Στη φύση η χιτίνη εμφανίζεται με τη μορφή διατεταγμένων κρυσταλλικών μικροϊνών, αποτελώντας δομικό συστατικό των κελυφών των αρθρώπων και των οστρακοειδών, καθώς και των κυτταρικών τοιχωμάτων μυκήτων και ζυμών. [17]

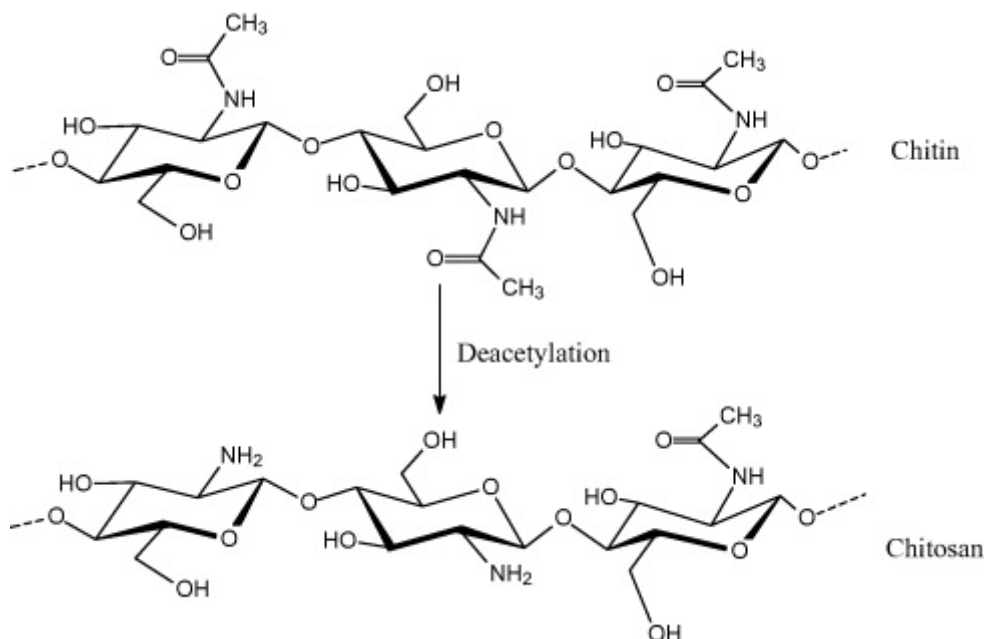


**Εικόνα 1.7** Χιτοζάνη σε μορφή σκόνης.

Όταν ο βαθμός αποακετυλίωσης της χιτίνης είναι μεγαλύτερος περίπου του 50%, τότε γίνεται διαλυτή σε όξινο υδατικό μέσο και ονομάζεται χιτοζάνη. Κατά τη διάλυση της χιτοζάνης σε όξινο υδατικό μέσο, μέσω του κατιονισμού των αμινικών ομάδων της γλυκοζαμίνης, ο πολυσακχαρίτης μετατρέπεται σε πολυηλεκτρολύτη. Η διαλυτότητα της σε υδατικό μέσο, επιτρέπει τη χρήση της χιτοζάνης σε εφαρμογές με τη μορφή αιωρημάτων, υδρογελών, επικαλύψεων και ινών.



## «Ανάπτυξη τρισδιάστατων ικριωμάτων βιομορίων-υδροξυαπατίτη»



**Εικόνα 1.8** Αποακετυλίωση της χιτίνης προς σχηματισμό χιτοζάνης.

Στη στερεή της μορφή η χιτοζάνη είναι ένα ημικρυσταλλικό πολυμερές το οποίο κρυσταλλώνεται στο ορθορομβικό σύστημα με παραμέτρους πλέγματος  $a = 8,07 \text{ \AA}$ ,  $b = 8,44 \text{ \AA}$  και  $c = 10,34 \text{ \AA}$ . Η μοναδιαία κυψελίδα της περιέχει δύο αντιπαράλληλες αλυσίδες χιτοζάνης, απουσία μορίων νερού. Ο παράγοντας κρυστάλλωσης της χιτοζάνης εξαρτάται τόσο από το βαθμό αποακετυλίωσής της, όσο και από το μοριακό της βάρος.

Ο βιοσυμβατός και βιοαποικοδομήσιμος φυσικοχημικός χαρακτήρας της χιτοζάνης, σε συνδυασμό με την κατιονική της συμπεριφορά, η οποία της προσδίδει αντιμικροβιακές ιδιότητες και ικανότητα σύνδεσης με πρωτεΐνες, λιπίδια, χολικά οξέα και παράγοντες ανάπτυξης, την καθιστούν ένα πολύ καλό βιοϋλικό με ποικίλες εφαρμογές στους τομείς της Βιοϊατρικής, της Ιστικής Μηχανικής, της Φαρμακευτικής και της προσωπικής υγείας και φροντίδας.

Ενδεικτικά οι κυριότερες εφαρμογές της χιτοζάνης, ανά κατηγορία, εξαιτίας των προαναφερθέντων ιδιοτήτων της είναι οι εξής:

- Βιοϊατρική: ως υλικό οδοντιατρικών εμφυτευμάτων, χειρουργικών ραμμάτων, τεχνητού δέρματος, αναδόμησης οστών, φακών κερατοειδούς και ως φορέας ελεγχόμενης μεταφοράς φαρμακευτικών ουσιών.

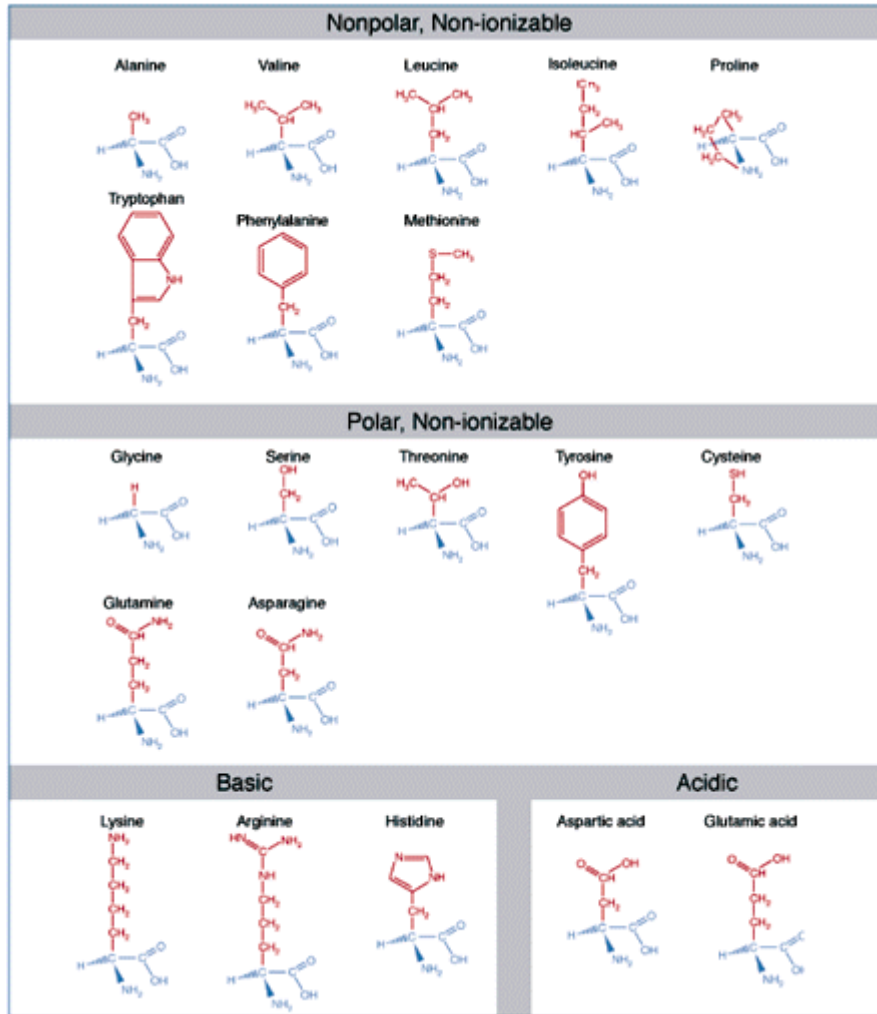
## «Ανάπτυξη τρισδιάστατων ικριωμάτων βιομορίων-υδροξυαπατίτη»

- Φαρμακευτική: σε φάρμακα θεραπείας ανοσολογικών και ογκολογικών προβλημάτων, για βακτηριακές μολύνσεις, αιμοστατικές παθήσεις και προβλήματα πήξης του αίματος καθώς και αντιογκολογική θεραπεία.
- Γεωργία: για την ενίσχυση της ανάπτυξης των καλλιεργειών και της άμυνάς τους, για αντοχή στον παγετό, για την προστασία των σπόρων και για τον έλεγχο απομάκρυνσης των λιπασμάτων στο έδαφος.
- Ύδρευση: για τον καθαρισμό των υδάτων από βαρέα μέταλλα, για φιλτράρισμα του πόσιμου νερού και μείωση των οσμών
- Τρόφιμα: ως συστατικό διαιτητικών ινών (μη εύπεπτο συστατικό), για την μείωση και απομάκρυνση λίπους και χοληστερίνης, για την προστασία φρούτων από μύκητες και βακτήρια, ως συντηρητικό τροφών και ως σταθεροποιητικός και πηκτικός παράγοντας σε σάλτσες
- Καλλυντικά και προϊόντα περιποίησης: σε σαμπουάν, βαφές, κρέμες και σπρέι μαλλιών, για την ενυδάτωση και περιποίηση του δέρματος και σε προϊόντα στοματικής περιποίησης (οδοντόπαστες και τσίχλες κατά της πλάκας).

### 1.6 Αμινοξέα – L-Αργινίνη

Τα αμινοξέα είναι χημικές βιολογικές ενώσεις, οι οποίες περιέχουν τουλάχιστον ένα ενεργό άκρο αμινομάδας ( $-NH_2$ ) και ένα ενεργό άκρο καρβονικού οξέος ( $-RCOOH$ ). Αποτελούν τα βασικά συστατικά σύνθεσης των πρωτεϊνών, των πεπτιδίων και των λιπιδίων, καθώς επίσης βοηθούν στην μεταφορά νευρικών σημάτων και στις διαδικασίες βιοσύνθεσης. Διακρίνονται σε κατηγορίες βάσει των κύριων ενεργών τους άκρων, της πολικότητάς τους, των επιπέδων pH που εμφανίζουν σε υδατικά διαλύματα και των τύπων πλευρικών αλυσίδων τους. Αν και έχουν γίνει γνωστά από την επιστήμη πάνω από 500 αμινοξέα, μόνο 20 από αυτά περιέχονται στον γενετικό κώδικα των ζωντανών οργανισμών και χρησιμοποιούνται από αυτούς για τη σύνθεση των πρωτεϊνών [Εικόνα 1.9]. Μετά το νερό αποτελούν το δεύτερο μεγαλύτερο σε αφθονία συστατικό υλικό των ανθρωπίνων μυών, κυττάρων και ιστών. [14][16]

## «Ανάπτυξη τρισδιάστατων ικριωμάτων βιομορίων-υδροξυαπατίτη»



**Εικόνα 1.9** Πίνακας με τα 20 αμινοξέα που χρησιμοποιούνται για την πρωτεϊνοσύνθεση των οργανισμών.

Στον άνθρωπο, 8 από τα 20 αμινοξέα που χρησιμοποιούνται στη σύνθεση πρωτεϊνών δεν μπορούν να συντεθούν από τον οργανισμό και πρέπει να λαμβάνονται από την τροφή, για το λόγο αυτό καλούνται απαραίτητα αμινοξέα (essential amino acids). 4 από τα 20 είναι ημιαπαραίτητα, αφού δεν μπορούν να συντεθούν στα παιδιά. Τα υπόλοιπα 8 συντίθενται μέσω βιοχημικών διαδικασιών του οργανισμού.

Πολλά αμινοξέα (συντίθενται) από άλλα αμινοξέα με μια διαδικασία που λέγεται διαμίνωση ή τρανσαμίνωση, αν και οι περισσότεροι οργανισμοί λαμβάνουν τα απαραίτητα αμινοξέα με την τροφή. [net]

Η L-Αργινίνη αποτελεί ένα από τα 20 απαραίτητα από τους οργανισμούς αμινοξέα για τη φυσιολογική λειτουργία τους. Χαρακτηρίζεται ως ημιαπαραίτητο αμινοξύ

## «Ανάπτυξη τρισδιάστατων ικριωμάτων βιομορίων-υδροξυαπατίτη»

καθώς είναι απαραίτητο σε μεγαλύτερες ποσότητες στα παιδιά εξαιτίας του σταδίου ανάπτυξης τους και λιγότερο στους ενήλικες. Η L-αργινίνη μαζί με τη Λυσίνη και την Ιστιδίνη αποτελούν τα 3 από τα 20 πρωτεϊνογενετικά αμινοξέα τα οποία εμφανίζουν βασικό pH σε υδατικό διάλυμα και χαρακτηρίζονται ως βασικά.

Ο βασικός ρόλος της L-αργινίνης στον ανθρώπινο οργανισμό είναι η παραγωγή νιτρικών οξειδίων, τα οποία είναι απαραίτητα και σχετίζονται με τη ρύθμιση του ανοσολογικού συστήματός του και την έκκριση ινσουλίνης, στην καλή αγγειακή λειτουργία και την αποκατάσταση μυϊκών και ιδιαίτερα οστικών ιστών. Επίσης η L-Αργινίνη σχετίζεται και με την παραγωγή της πολυαμίνης και της L-προλίνης οι οποίες συμμετέχουν στη σύνθεση του κολλαγόνου, της αυξητικής ορμόνης και της ορμόνης IGF-1, που με τη σειρά τους είναι απαραίτητα για τη δόμηση και αποκατάσταση των οστικών ιστών και την δημιουργία οστεοβλαστών. [18][19][20]

Η τυπική ημερήσια πρόσληψη L-αργινίνης από τη διατροφή ενός ενήλικου είναι 2,5-5 g, ποσό που αντιστοιχεί στα ελάχιστα απαραίτητα όρια πρόσληψης του αμινοξέος για την εξασφάλιση των αναγκών πρωτεϊνοσύνθεσης, επιδιόρθωσης ιστών και διατήρησης του ανοσοποιητικού των κυττάρων. Το παραπάνω ποσό αντιστοιχεί στο 5-7% της ημερήσιας προσλαμβανόμενης ποσότητας αμινοξέων από τις διατροφικές πηγές ενός ενήλικου. [20] Έρευνες έχουν δείξει ότι διαβητικοί ασθενείς εμφανίζουν μειωμένη περιεκτικότητα L-αργινίνης στον οργανισμό τους, γεγονός που σχετίζεται άμεσα με διάφορα συμπτώματα της ασθένειας όπως για παράδειγμα η οστεοπόρωση. [19]

Διατροφικές πηγές πρόσληψης της L-αργινίνης είναι οι εξής:

- Ζωικές πηγές: γαλακτοκομικά προϊόντα (π.χ., τυρί cottage, ricotta, γάλα, γιαούρτι, ρόφημα πρωτεΐνης ορού γάλακτος), βόειο κρέας, χοιρινό κρέας (π.χ., μπέικον, ζαμπόν), ζελατίνη, πουλερικά (π.χ. κοτόπουλο και γαλοπούλα), άγρια θηράματα (π.χ. φασιανός, ορτύκια), θαλασσινά (π.χ. αστακός, σολομός, γαρίδες, σαλιγκάρια, τόνος)
- Φυτικές πηγές: φύτρο σιταριού, αλεύρι, λούπινα, φαγόπυρο, γκρανόλα, πλιγούρι βρώμης, ξηροί καρποί (φυστίκια, καρύδια, πεκάν, κάσιους, καρύδα, αμύγδαλα, καρύδια Βραζιλίας, φουντούκια, κουκουνάρι), σπόροι (κολοκύθα, σουσάμι, ηλίανθος), ρεβίθια, σόγια

## 1.7 Poly(ethylene oxide)

Το Poly(ethylene oxide) (PEO), ή αλλιώς Poly(ethylene glycol) (PEG) ή poly(oxyethylene) είναι ένα συνθετικό, μη ιονικό, γραμμικό πολυμερές και θεωρείται ένα από τα εκτενέστερα ερευνηθέντα πολυμερή στη σύγχρονη Φαρμακευτική. Η ποικιλία στην ονομασία του πολυμερούς αντιστοιχεί στο εύρος των μοριακών βαρών που είναι διαθέσιμο. Όταν το πολυμερές έχει μοριακό βάρος  $M_w < 100000$  αναφέρεται ως PEG, ενώ για εύρος μοριακών βαρών από 100000 έως και 8000000 αναφέρεται ως PEO.

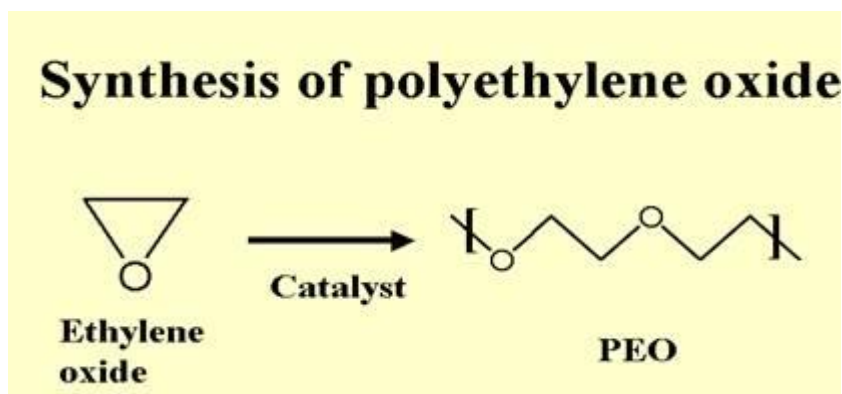
Η ιδιαίτερη σημασία του συγκεκριμένου πολυμερούς στην επιστήμη των Βιοϋλικών οφείλεται στην απλότητα του μονομερούς του  $-(CH_2CH_2O)-$ , καθώς και στον αμφίφυλο χαρακτήρα που παρουσιάζει με το νερό και τα διαλύματά του. Η παρουσία του ατόμου οξυγόνου στο πολυμερές αλλάζει εξ ολοκλήρου τη φύση των αλληλεπιδράσεων και ως εκ τούτου, τις θερμοδυναμικές ιδιότητες του πολυμερούς όταν αυτό διαλύεται σε κάποιον διαλύτη.

Οι ομάδες  $CH_2CH_2$  των μονομερών εμφανίζουν υδρόφοβο χαρακτήρα και προκαλούν τη δημιουργία επάλληλων υδρόφοβων στρωμάτων από μόρια νερού γύρω από την αντίστοιχη ομάδα κάθε μονομερούς. Το πρώτο στρώμα δημιουργείται από 2-3 μόρια νερού γύρω από την επιφάνεια του μονομερούς. Αντίθετα, οι διατομικές αποστάσεις των ατόμων οξυγόνου των μονομερών, είναι παρόμοιες με αυτές των ατόμων οξυγόνου της δομής του καθαρού νερού, με αποτέλεσμα τα άκρα οξυγόνου των μονομερών να είναι υδρόφιλα και να δεσμεύουν τα μόρια του νερού. Αυτή είναι και η κύρια αιτία που το πολυμερές PEO είναι διαλυτό στο νερό για μεγάλο εύρος θερμοκρασιών και συγκεντρώσεων. Επίσης το PEO κρυσταλλώνεται στο νερό μόνο σε θερμοκρασίες κατώτερες των  $66^\circ C$  και σε συγκεντρώσεις μικρότερες του 50%.

Η πολυαιθυλενογλυκόλη (PEG) παράγεται από την αλληλεπίδραση του οξειδίου του αιθυλενίου είτε με νερό, είτε με αιθυλενογλυκόλη, είτε με ολιγομερή αιθυλενογλυκόλης. Η αντίδραση παραγωγής του PEG καταλύεται από όξινους ή βασικούς καταλύτες. Η αιθυλενογλυκόλη και τα ολιγομερή της είναι προτιμότερα ως ένα υλικό έναρξης της αντίδρασης παραγωγής του PEG, αντί του νερού, διότι επιτρέπουν τη δημιουργία πολυμερών με χαμηλή πολυδιασπορά (στενή κατανομή μοριακού βάρους). Το μήκος της αλυσίδας του πολυμερούς εξαρτάται από την αναλογία των αντιδρώντων. Ανάλογα με τον τύπο του καταλύτη, ο μηχανισμός του

πολυμερισμού μπορεί να είναι κατιονικός ή ανιονικός. Ο ανιονικός μηχανισμός είναι προτιμότερος, επειδή επιτρέπει την παραγωγή PEG με χαμηλή πολυδιασκορπισσιμότητα. Ο πολυμερισμός του οξειδίου του αιθυλενίου είναι μία εξώθερμη διαδικασία. Υπερθέρμανση ή μόλυνση του οξειδίου του αιθυλενίου με καταλύτες όπως αλκάλια ή οξείδια μετάλλων μπορεί να οδηγήσει σε ανεξέλεγκτο πολυμερισμό, προκαλώντας μέχρι και έκρηξη του υλικού μετά από μερικές ώρες.

Το οξύδιο του πολυαιθυλενίου (PEO) ή υψηλού μοριακού βάρους πολυαιθυλενογλυκόλη, συντίθεται μέσω διαδικασίας πολυμερισμού αιωρήματος. Κατά τη διάρκεια της διαδικασίας πολυσυμπυκνώσεως για τη σύνθεση του PEO, είναι απαραίτητη η διατήρηση της αυξανόμενης πολυμερικής αλυσίδας εντός του διαλύματος. Η αντίδραση καταλύεται από ενώσεις μαγνησίου, αργιλίου, ή ασβεστίου με οργανικά στοιχεία. Για να αποφευχθεί η πήξη των πολυμερικών αλυσίδων από το διάλυμα, χρησιμοποιούνται χηλικά πρόσθετα όπως διμεθυλογλυοξίμη.



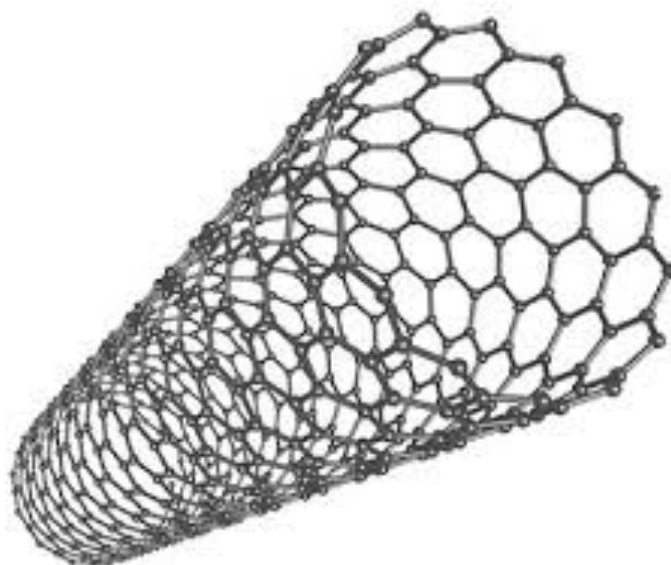
**Εικόνα 1.10** Σχεδιάγραμμα της σύνθεσης του PEO μέσω καταλυτικής αντίδρασης.

Στην εμπορική του μορφή το πολυμερές PEO είναι λευκή κρυσταλλική σκόνη με μέσο μέγεθος σωματιδίων 150 nm και τα διαλύματά του εμφανίζουν ελαφρά βασικό pH. Δεν είναι καθόλου τοξικό για τον ανθρώπινο οργανισμό και χρησιμοποιείται στους τομείς της Φαρμακευτικής και της Βιοϊατρικής για την παραγωγή φαρμακευτικών δισκίων ως συνδέτης είτε ως υλικό επικάλυψης, ως πυκνωτικός παράγοντας, ως βιοσυγκολλητικό υλικό για βλεννογόνους αδένες, για την παραγωγή υδρογελών για βιολογικές εφαρμογές, σε σύνθετα βιοϋλικά για πλήρωση ή αντικατάσταση οστικών χόνδρων, και ως συνδέτης ή υλικό μήτρας για την παραγωγή βιοσυμβατών ικριωμάτων για σκληρούς και μαλακούς ιστούς.

Ο σημαντικότερος τομέας εφαρμογής του πολυμερούς PEO όμως είναι στην τεχνολογία ελεγχόμενης μεταφοράς φαρμακευτικών ουσιών σε οργανισμούς. Η ιδιότητα αυτή βασίζεται στην δυνατότητα και στο ρυθμό αποικοδόμησης του πολυμερούς από τον οργανισμό, συναρτήσει του μοριακού του βάρους. Πολυμερή με μικρότερο σχετικά μοριακό βάρος όπως το PEG αποβάλλονται αρκετά γρήγορα από τον οργανισμό χωρίς να έχουν υποστεί καμία μεταβολή στη δομή τους και χωρίς να επιβαρύνουν καθόλου τη λειτουργία και την υγεία του οργανισμού. Αντίθετα όσο αυξάνεται το μοριακό βάρος του πολυμερούς τόσο αυξάνεται και ο χρόνος αποικοδόμησης του από τον οργανισμό. Το παραπάνω χαρακτηριστικό σε συνδυασμό με το μεγάλο διαθέσιμο εύρος μοριακών βαρών τους, καθιστά τα πολυμερή της δεδομένης οικογένειας κατάλληλα για εφαρμογές θεραπειών με ελεγχόμενη και σταδιακή απελευθέρωση των φαρμακευτικών ουσιών στον πάσχοντα οργανισμό. [21][22][23]

### **1.8 Νανოსωλήνες Άνθρακα**

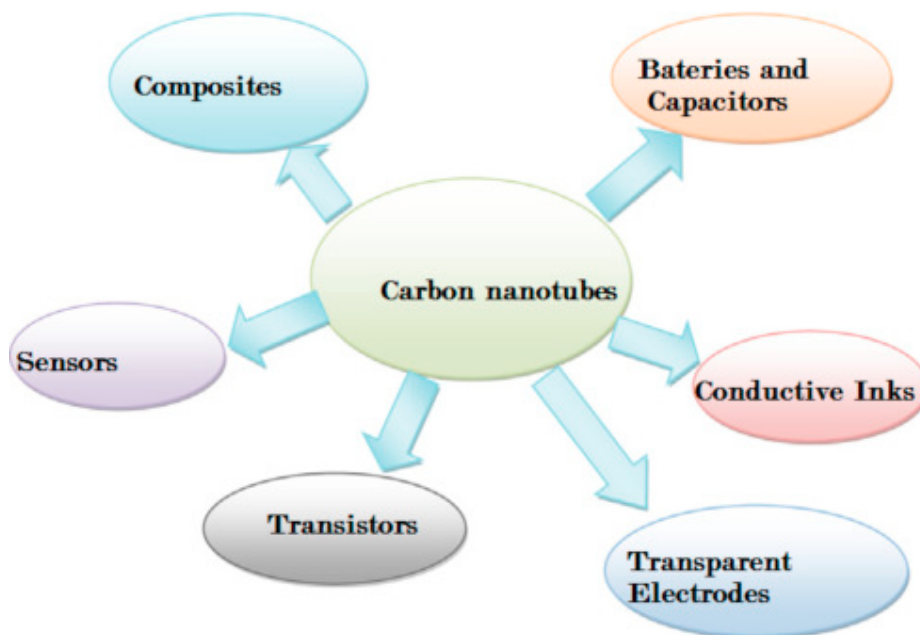
Οι νανოსωλήνες άνθρακα (Carbon Nanotubes, CNT) αποτελούν μερικά από τα πιο σημαντικά και ανερχόμενα νανοϋλικά στην ανάπτυξη του κλάδου της νανοτεχνολογίας. Αποτελούν αλλότροπα του άνθρακα, κατασκευασμένα από γραφίτη με τη μορφή κυλινδρικών σωλήνων με διάμετρο μερικών νανομέτρων και μήκος λίγων μικρομέτρων.



**Εικόνα 1.11** Απεικόνιση τρισδιάστατης δομής νανοσωλήνα άνθρακα.

Ανακαλύφθηκαν στα τέλη του 1950 ενώ κατασκευάστηκαν πρώτη φορά από τον Iijima το 1991 και εξαιτίας της μοναδικής τους δομής καθώς και των ηλεκτρονικών και μηχανικών τους ιδιοτήτων αποτελούν έκτοτε για τους ερευνητές ένα πολύ αξιόλογο και υποσχόμενο υλικό για πολύ μεγάλο εύρος εφαρμογών. Οι εξαιρετικές τους ιδιότητες όπως το μεγάλο εμβαδόν επιφάνειάς τους, οι υψηλές μηχανικές αντοχές τους, η χημική τους σταθερότητα και η υψηλή ηλεκτρική τους αγωγιμότητα καθιστούν τους νανοσωλήνες άνθρακα ιδανικά υλικά για εφαρμογές στους τομείς της νανοηλεκτρονικής, των σύνθετων υλικών, στην έρευνα των πηγών ενέργειας και στη φαρμακευτική. Σήμερα χάρη στις πολύ καλές ηλεκτρονικές, οπτικές, μηχανικές, θερμικές και ηλεκτροχημικές του ιδιότητες, οι νανοσωλήνες άνθρακα χρησιμοποιούνται σε εφαρμογές όπως για την κατασκευή υπεραγωγών, σε κυψέλες καυσίμων, σε μπαταρίες, σε βιοκαύσιμα, σε φωτοκαταλύτες, σε φωτοβολταϊκά, σε βιοαισθητήρες, σε χημικούς αισθητήρες, σε αισθητήρες αερίων, σε συσκευές LED, σε οπτικούς αισθητήρες, σε τρανζίστορ πεδίου και λεπτού υμενίου, σε χημικές κλινικές εφαρμογές, στην βιοϊατρική κ.ά.





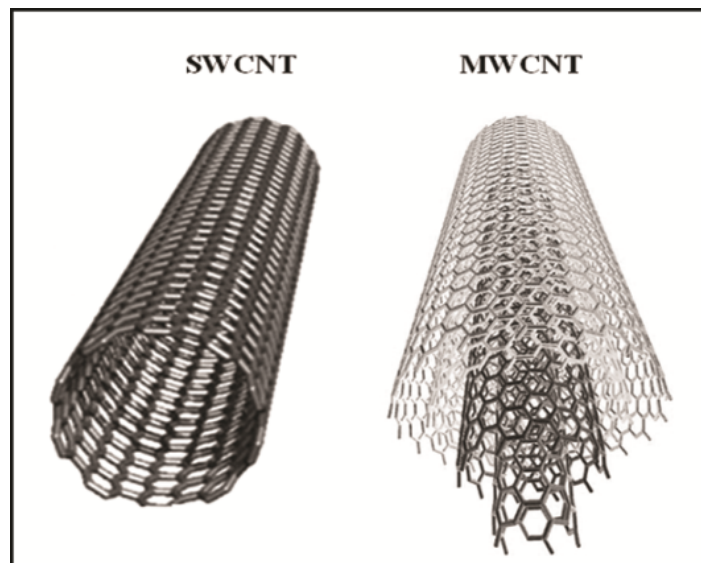
Εικόνα 1.12 Εφαρμογές των νανοσωλήνων άνθρακα.

Η μελέτη και εισαγωγή της χρήσης των νανοσωλήνων άνθρακα στους κλάδους της Φαρμακευτικής, της Ιατρικής και της Ιστικής Μηχανικής έχει ξεκινήσει από τις αρχές του 21<sup>ου</sup> αιώνα. Η πλούσια ηλεκτρονιακή πολυαρωματική δομή τους, τους δίνει την ικανότητα να απορροφούν ή να συνδέονται με θεραπευτικά μόρια, όπως μόρια φαρμάκων, αντισώματα, πρωτεΐνες, DNA, ένζυμα κλπ. Η παραπάνω ιδιότητα σε συνδυασμό με τη χημική σταθερότητα και αδράνεια που εμφανίζουν οι νανοσωλήνες, επιτρέποντάς τους να εισέρχονται στα κύτταρα και να μεταφέρουν σε αυτά αναλλοίωτη τη θεραπευτική ουσία, καθιστούν τα συγκεκριμένα υλικά ιδανικά για την μέθοδο ελεγχόμενης μεταφοράς φαρμακευτικών ουσιών σε οργανισμούς. Πραγματοποιούνται ήδη μελέτες για τη εφαρμογή τους σε αντινεοπλασματικά και αντιβιοτικά φάρμακα καθώς και για τη σύνδεσή τους με βιομόρια για τη θεραπεία νόσων και ιστών. Ωστόσο τα παραπάνω ευρήματα βρίσκονται ακόμη σε πειραματικό στάδιο και δεν έχουν εφαρμοστεί ακόμη σε ανθρώπινους οργανισμούς.

Η παραγωγή των νανοσωλήνων γίνεται σήμερα με διάφορες μεθόδους, οι κυριότερες των οποίων είναι με καταλυτική χημική εξάχνωση και εναπόθεση, με εκκένωση τόξου και με εκτομή με λέιζερ. Η τεχνική εκκένωσης τόξου αποτελεί την πιο κοινή

μέθοδο σύνθεσης νανοσωλήνων άνθρακα, όμως δεν επιτρέπει εύκολα τον έλεγχο των διαστάσεων και τον αριθμό των στρωμάτων τους. Σε σύγκριση με τις άλλες δύο μεθόδους, η μέθοδος χημικής εναπόθεσης και εξάχνωσης αποτελεί την ευρύτερα χρησιμοποιούμενη τεχνική για την παραγωγή νανοσωλήνων, εξαιτίας του χαμηλού της κόστους, της υψηλής παραγωγικότητας και της ευκολίας αύξησης του όγκου παραγωγής της.

Υπάρχουν δύο κύριοι τύποι νανοσωλήνων: οι νανοσωλήνες μονού τοιχώματος (Single-Walled Carbon Nanotubes, SWCNTs), ο οποίος αποτελείται από ένα μόνο τυλιγμένο στρώμα γραφενίου και οι νανοσωλήνες πολλαπλών τοιχωμάτων (Multi-Walled Carbon Nanotubes, MWCNTs), οι οποίοι αποτελούνται από πολλά ομόκεντρα στρώματα γραφενίου με αύξουσες διαμέτρους, με απόσταση μεταξύ των στρωμάτων 0,34 nm. Στις μεθόδους παραγωγής υψηλής θερμοκρασίας (εκκένωση τόξου και εκτομή με λέιζερ), οι νανοσωλήνες πολλαπλών τοιχωμάτων μπορούν να παραχθούν με την εξάχνωση καθαρού άνθρακα, ενώ για τη σύνθεση μονοστρωματικών νανοσωλήνων απαιτείται η παρουσία μεταλλικού καταλύτη. Στη μέθοδο χημικής εξάχνωσης και εναπόθεσης η παρουσία καταλύτη είναι απαραίτητη για την σύνθεση και των δύο τύπων νανοσωλήνων, καθώς επίσης επιτρέπει και τη σύνθεση νανοϊών άνθρακα. Για βιοϊατρικές εφαρμογές, όπως για παράδειγμα σε φαρμακευτικά σκευάσματα, βιοσυμβατές υδρογέλες και ικρίωματα σκληρών και μαλακών ιστών, χρησιμοποιούνται οι νανοσωλήνες πολλαπλών τοιχωμάτων. [24] – [32]



**Εικόνα 1.13** Απεικόνιση δομής μονοστρωματικών και πολυστρωματικών νανοσωλήνων άνθρακα.

## 2 ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

*Ανάπτυξη τρισδιάστατων βιοσυμβατών ικριωμάτων από υδροξυαπατίτη (Hap), χιτοζάνη (Chit), Poly(ethylene oxide) (PEO) και νανοσωλήνες άνθρακα (CNT), παρουσία του αμινοξέος L-Αργινίνη.*

*Προσδιορισμός των βέλτιστων παραμέτρων και συνθηκών προσθήκης του PEO και των CNT, καθώς και της βέλτιστης τεχνικής προετοιμασίας των υλικών πριν τη διαδικασία λυοφιλίωσης.*

### 2.1 Πειραματική Διαδικασία

#### 2.1.1 Αντιδραστήρια και εργαστηριακός εξοπλισμός

Τα αντιδραστήρια που χρησιμοποιήθηκαν για την παρασκευή των βιοσυμβατών ικριωμάτων ήταν: Διάλυμα Ορθοφωσφορικού οξέος  $H_3PO_4$  85%, διάλυμα Οξικού οξέος  $CH_3COOH$  glacial, Χιτοζάνη μεγάλου μοριακού βάρους ( $C_{12}H_{24}N_2O_9$ ), σκόνη L-Αργινίνης ( $C_6H_{14}N_4O_2$ ), και σκόνη Poly(ethylene oxide) ( $M_w=600000$ ) από την εταιρεία Sigma-Aldrich. Υδροξείδιο του ασβεστίου  $Ca(OH)_2$  σε μορφή σκόνης από την Neolab Migge Laborbedarf-Vertriebs GmbH και σκόνη Νανοσωλήνων Άνθρακα (NTX3) από την εταιρεία NanothinX.

Ο εργαστηριακός εξοπλισμός που χρησιμοποιήθηκε περιλάμβανε μηχανικό διασπορέα της εταιρείας IKA, τύπου T25 digital ULTRA-TURRAX) με τον οποίο έγινε η ανάμιξη των πρόδρομων διαλυμάτων φωσφορικού οξέος- χιτοζάνης και του υδατικού αιωρήματος υδροξειδίου του ασβεστίου. Η ανάδευση κατά τη διάρκεια της αντίδρασης των πρόδρομων διαλυμάτων έγινε σε αυτοσχέδιο λουτρό με την χρήση μαγνητικού αναδευτήρα με θερμαινόμενη επιφάνεια. Η παρακολούθηση της θερμοκρασίας του λουτρού γινόταν μέσω θερμοστοιχείου. Η διάλυση του PEO έγινε επίσης με χρήση μαγνητικού αναδευτήρα με θερμαινόμενη επιφάνεια επαφής με το δοχείο του δείγματος. Τέλος για το διαχωρισμό των στερεών προϊόντων από το υπερκείμενο υγρό χρησιμοποιήθηκε συσκευή φυγοκέντρωσης της εταιρείας HERMLE τύπου Z326.

### 2.1.2 Παρασκευή αιωρήματος/σκόνης υδροξυαπατίτη παρουσία χιτοζάνης και L-αργινίνης

Για το σκοπό της παρούσας εργασίας παρασκευάστηκαν αρχικά αιωρήματα υδροξυαπατίτη παρουσία του πολυμερούς χιτοζάνη και του αμινοξέος L-αργινίνη, μέσω βιομιμητικής διαδικασίας σύμφωνα με βιβλιογραφική έρευνα. Οι αναλογίες σύνθεσης των αιωρημάτων με τα παραπάνω αντιδραστήρια είναι:

- Μοριακή αναλογία Ca/P = 10:6
- Κατά βάρος αναλογία Hap/Chit = 70:30
- Στοιχειομετρική αναλογία  $Ca^{2+}$ /L-αργινίνη = 1:2
- Συγκέντρωση διαλύματος ορθοφωσφορικού οξέος  $H_3PO_4$  = 0,06 M

Οι παραπάνω αναλογίες για την παρασκευή του υδροξυαπατίτη προκύπτουν από δημοσιεύσεις και διδακτορικές διατριβές που έχουν πραγματοποιηθεί στο εργαστήριο Μεταλλογνωσίας της Σχολής Μηχανικών Μεταλλείων Μεταλλουργών, με σκοπό την κατασκευή αιωρημάτων και ικριωμάτων Hap-Chit με τη μέθοδο καταβύθισης, με τη βέλτιστη βιολογική συμπεριφορά και μηχανικές ιδιότητες και είχαν τα καλύτερα αποτελέσματα. [14][15][16][33][34]

Αρχικά λοιπόν υπολογίστηκαν οι ποσότητες των αντιδραστηρίων σύμφωνα με τις παραπάνω αναλογίες. Συγκεκριμένα:

- Χιτοζάνη = 0,316 g
- Υδροξείδιο του ασβεστίου = 0,5439 g
- L-αργινίνη = 1,2786 g
- $H_3PO_4$  = 0,3 ml

Η διαδικασία βιομιμητικής σύνθεσης του υδροξυαπατίτη είναι η ακόλουθη:

Αρχικά ζυγίζονται οι σκόνες των παραπάνω στερεών αντιδραστηρίων. Σε δοχείο ζέσεως προστίθενται 29 ml νερό και τα 0,3 ml ορθοφωσφορικού οξέος και το διάλυμα τίθεται υπό ανάδευση σε μαγνητικό αναδευτήρα για 2-3 λεπτά. Στη συνέχεια στο ίδιο δοχείο ζέσεως προστίθεται η ποσότητα σκόνης της χιτοζάνης και τοποθετείται για ανάδευση με μηχανικό διασπορέα στις 8000 στροφές/λεπτό για 30-35 λεπτά, έως ότου διαλυθεί πλήρως η χιτοζάνη. Στη συνέχεια σε ποτήρι ζέσεως προστίθενται 29,3 ml απιονισμένου νερού και η σκόνη του υδροξειδίου του

## «Ανάπτυξη τρισδιάστατων ικριωμάτων βιομορίων-υδροξυαπατίτη»

ασβεστίου και το αιώρημα αναδεύεται επίσης με μηχανικό διασπορέα στις 5000 στροφές/λεπτό για 10-15 λεπτά. Επίσης σε δοχείο ζέσεως με 14,65 ml νερού προστίθεται η σκόνη της L-αργινίνης και το δοχείο αυτό στη συνέχεια τοποθετείται μέσα σε λουτρό σταθερής θερμοκρασίας 40 °C και τίθεται υπό ανάδευση με μαγνητικό αναδευτήρα. Τέλος, μόλις η θερμοκρασία στο διάλυμα της L-αργινίνης φτάσει τους 40 °C, προστίθενται σε αυτό παράλληλα στάγδην, το διάλυμα της χιτοζάνης και το αιώρημα του υδροξειδίου του ασβεστίου, προς σχηματισμό του τελικού αιωρήματος του υδροξυαπατίτη, βάσει της μεθόδου καταβύθισης. Μετά το τέλος της προσθήκης των δύο αντιδραστηρίων, το τελικό αιώρημα αφήνεται υπό ήπια ανάδευση για περίπου 20-30 λεπτά.

Στο σημείο αυτό ακολουθεί απομάκρυνση της υγρασίας, η οποία γίνεται με 2 εναλλακτικούς τρόπους, πριν το τελικό στάδιο της λυοφιλίωσης {2.2}:

1. Φυγοκέντρωση των αιωρημάτων 1 φορά για 5 λεπτά στις 11000 στροφές και 1 φορά για 3 λεπτά στις 10000 στροφές με ενδιάμεση απομάκρυνση του υπερκείμενου νερού, για την παρασκευή ικριωμάτων με **ανάμιξη αιωρήματος Har-Chit και διαλύματος PEO**.
2. Ξήρανση των αιωρημάτων για παραλαβή ξηρής σκόνης υδροξυαπατίτη-χιτοζάνη, για την παρασκευή ικριωμάτων με **ανάμιξη σκόνης Har-Chit και διαλύματος PEO**. Η ξήρανση γίνεται είτε στο πυριαντήριο για 3-4 μέρες, είτε με λυοφιλίωση μέσα σε 24 ώρες.

### 2.1.3 Εισαγωγή Νανοσωλήνων Άνθρακα

Στην παρούσα εργασία χρησιμοποιήθηκαν νανοσωλήνες άνθρακα πολλαπλών στρωμάτων (MWCNTs), σε μορφή ξηρής σκόνης, καθαρότητας  $\leq 98,5\%$  και με διαστάσεις εξωτερικής διαμέτρου 20-40 nm και μήκος  $\geq 10 \mu\text{m}$ . Ο συγκεκριμένος τύπος νανοσωλήνων συνίσταται για βιοϊατρικές εφαρμογές.

Βάσει βιβλιογραφικής αναζήτησης σε διεργασίες παρασκευής βιοϋλικών για οστικά ικρίωματα που έχουν χρησιμοποιηθεί MWCNTs, το σύνηθες εύρος προσθήκης είναι από 1-5% w/w του ικριώματος. Οι τρόποι προσθήκης είναι είτε ανάδευση μέσα σε κάποιο αιώρημα ή διάλυμα, είτε με λειοτρίβηση σε σφαιρόμυλο (ball-milling). Στη συγκεκριμένη εργασία η διασπορά των νανοσωλήνων έγινε μέσω προσθήκης και

ανάδευσης με μαγνητικό αναδευτήρα σε υδατική φάση.  
[26][29][30][31][32][35][36][37][38]

Τα τελικά ικριώματα που μελετήθηκαν, παρασκευάστηκαν με προσθήκη 1% w/w MWCNTs. Επίσης για κάθε σύνθεση παρασκευής ικριωμάτων που δοκιμάστηκε, παρασκευάστηκαν και ικριώματα χωρίς την προσθήκη MWCNTs, για τη μελέτη και σύγκρισή τους με τα αντίστοιχα ενισχυμένα με νανοσωλήνες.

#### **2.1.4 Εισαγωγή Poly(ethylene oxide)**

Το PEO που χρησιμοποιήθηκε στην πειραματική διαδικασία ήταν σε μορφή υδατοδιαλυτής ξηρής σκόνης με μοριακό βάρος  $M_w=600000$ .

Βάσει βιβλιογραφικής έρευνας, αρχικά πραγματοποιήθηκε διάλυση της ξηρής σκόνης του PEO σε διάλυμα οξικού οξέος υπό ανάδευση με μαγνητικό αναδευτήρα για 24 ώρες σε θερμοκρασία 40 °C. Στη συνέχεια το διάλυμα του PEO-οξικού οξέος, αναμειγνύοταν χειροκίνητα είτε με το αιώρημα Har-Chit μετά τη φυγοκέντρωσή του, είτε με την ξηρή σκόνη Har-Chit. Σημειώνεται ότι δοκιμάστηκαν διαφορετικές ποσότητες κατά βάρος προσθήκης πολυμερούς PEO στο υπόλοιπο υλικό σε διαφορετικές κατά βάρος αναλογίες με την σταθερή ποσότητα της χιτοζάνης, καθώς και διαφορετικές τιμές συγκέντρωσης οξικού οξέος κατά την διαδικασία προετοιμασίας του διαλύματος του πολυμερούς τόσο με τη μέθοδο ανάμιξης ξηρής σκόνης Har-Chit, όσο και με τη μέθοδο ανάμιξης αιωρήματος Har-Chit.

Τα ικριώματα της μεθόδου ανάμιξης αιωρήματος Har-Chit με το διάλυμα του PEO-οξικού οξέος που μελετήθηκαν παρασκευάστηκαν με κατά βάρος αναλογία PEO/Chit=1:4 και 1:2 και συγκέντρωση διαλύματος οξικού οξέος 0,5 M.

Τα ικριώματα της μεθόδου ανάμιξης σκόνης Har-Chit με το διάλυμα του PEO-οξικού οξέος που μελετήθηκαν παρασκευάστηκαν με κατά βάρος αναλογία PEO/Chit=1:2,5 και συγκέντρωση διαλύματος οξικού οξέος 0,1 M, 0,2 M, 0,5 M και 0,7 M.

### 2.1.5 Καλούπωμα και Κατάψυξη Δειγμάτων

Μετά την προετοιμασία του τελικού υλικού των ικριωμάτων πριν το τελικό στάδιο της λυοφιλίωσης, το υλικό τοποθετούνταν σε πολυμερή καλούπια για διαστάσεις τελικού ικριώματος 5x5x20 mm.

Μετά την παρασκευή του υλικού των ικριωμάτων και την τοποθέτησή του στα καλούπια, καταψύχεται για 3 ώρες στους -55 °C, πριν ξεκινήσει η διαδικασία της εξάχνωσης κατά τον κύκλο της διεργασίας λυοφιλίωσης για 24 ώρες. Επίσης δοκιμάστηκε και η παραμονή των δειγμάτων για 24 ώρες στους -4 °C (καταψύκτης ψυγείου) και στη συνέχεια 3ωρη κατάψυξη στους -55 °C και εξάχνωση. Όμως η παραμονή στους -4 °C είχε σαν συνέπεια αν το υλικό πριν τη λυοφιλίωση ήταν αρκετά ιξώδες, να διογκώνεται λόγω διαστολής του πάγου του περιεχόμενου νερού με αποτέλεσμα την αστοχία του τελικού ικριώματος. Επίσης αν το υλικό ήταν αρκετά ρευστό και περιείχε εγκλωβισμένο αέρα, μετά την πολύωρη παραμονή του στους -4 °C, η επιφάνεια του υποχωρούσε τείνοντας να συμπληρώσει το κενό του αέρα που απομακρύνθηκε.

Τα τελικά ικριώματα προέκυπταν μετά το τέλος του κύκλου της διεργασίας λυοφιλίωσης .



**Εικόνα 2.1** Φωτογραφία των καλουπιών που χρησιμοποιήθηκαν για την παραγωγή ικριωμάτων, γεμισμένα με υλικό χωρίς (λευκό) και με νανοσωλήνες (μαύρο), πριν την διαδικασία λυοφιλίωσης.

### 2.1.6 Κωδικοποίηση Τελικών Ικριωμάτων

Στον παρακάτω πίνακα αναφέρεται ο κωδικός κάθε τελικού ικριώματος που εξετάστηκε με τις τεχνικές FT-IR και XRD και παρατηρήθηκε στο ηλεκτρονικό μικροσκόπιο σάρωσης. Το πρόθεμα S (Suspension) υποδεικνύει ότι το ικρίωμα παρασκευάστηκε με τη χρήση **αιωρήματος Hap-Chit**, ενώ το πρόθεμα P (Powder) υποδεικνύει τη χρήση **σκόνης Hap-Chit**.



Κωδικός	w/w PEO/Chit	1% w/w MWCNTs	Συγκέντρωση CH <sub>3</sub> COOH
S 1:4-5	1/4	-	0,5M
S 1:4-5-CNT	1/4	NAI	0,5M
S 1:2-5	1/2	-	0,5M
S 1:2-5-CNT	1/2	NAI	0,5M
P 1:2,5-1-CNT	1/2,5	NAI	0,1M
P 1:2,5-2-CNT	1/2,5	NAI	0,2M
P 1:2,5-5-CNT	1/2,5	NAI	0,5M
P 1:2,5-5	1/2,5	-	0,5M
P 1:2,5-7-CNT	1/2,5	NAI	0,7M
P 1:2,5-7	1/2,5	-	0,7M

## 2.2 Δοκιμή Αντοχής Ικριωμάτων σε Υδατικό Περιβάλλον

Τα τελικά ικρίωματα τοποθετήθηκαν σε φυαλίδια με απιονισμένο νερό, τα οποία στη συνέχεια παρέμειναν στο πυριαντήριο σε θερμοκρασία 40 °C. Κάθε 1-3 μέρες τα φυαλίδια με τα δείγματα ανακινούνταν ελαφρά προκειμένου να παρατηρηθεί τυχόν αλλοίωση στη δομή τους ή διάλυση του υλικού τους. Όσα δείγματα δεν παρουσίασαν οποιαδήποτε μεταβολή στη δομή τους κατά την παραμονή τους σε απιονισμένο νερό για διάστημα 1-2 εβδομάδων, τοποθετούνταν σε διάλυμα αιθανόλης και εκ νέου παραμονή τους στο πυριαντήριο με συχνή παρατήρηση της συμπεριφοράς τους.

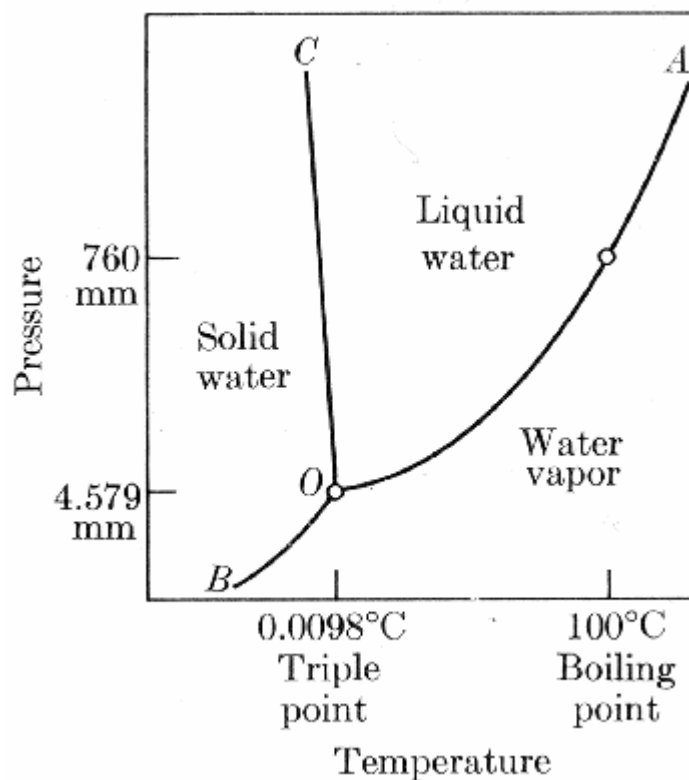
## 2.3 Λυοφιλίωση

Η λυοφιλίωση ή λυοφιλοποίηση ή κρυοξηράνση είναι μια διεργασία χαμηλής θερμοκρασίας ξήρανσης, που βασίζεται στις αρχές της μεταφοράς μάζας και θερμότητας και χρησιμοποιείται για να μετατρέψει διαλύματα ασταθών (θερμικά) υλικών σε στερεά, προκειμένου αυτά να αποκτήσουν επαρκή σταθερότητα για τη διανομή και την αποθήκευσή τους.

Η μέθοδος της λυοφιλίωσης έχει ευρεία εφαρμογή στη φαρμακευτική βιομηχανία καθώς και στη βιομηχανία τροφίμων. Ουσιαστικά, χρησιμοποιείται για να αφυδατώσει θερμοευαίσθητα τρόφιμα ή προϊόντα με υψηλή εμπορική αξία ή για ειδικές δραστηριότητες. Η λειτουργία της βασίζεται στην εξάχνωση, δηλαδή στη μετατροπή του νερού από πάγο σε ατμό χωρίς να περάσει από την υγρή φάση. Οι συνθήκες θερμοκρασίας και πίεσης που είναι απαραίτητες για να συμβεί το φαινόμενο της εξάχνωσης προκύπτουν από το διάγραμμα φάσεων του νερού και σε

## «Ανάπτυξη τρισδιάστατων ικριωμάτων βιομορίων-υδροξυαπατίτη»

συνθήκες χαμηλότερες του τριπλού σημείου του νερού. (Εικόνα 2.2) Αναλυτικότερα, όταν η θερμοκρασία είναι χαμηλότερη από 0°C, σχηματίζεται καθαρός πάγος στο εσωτερικό του προς ξήρανση δείγματος, ο οποίος μπορεί να εξαχνωθεί με την εφαρμογή κατάλληλων συνθηκών κενού.

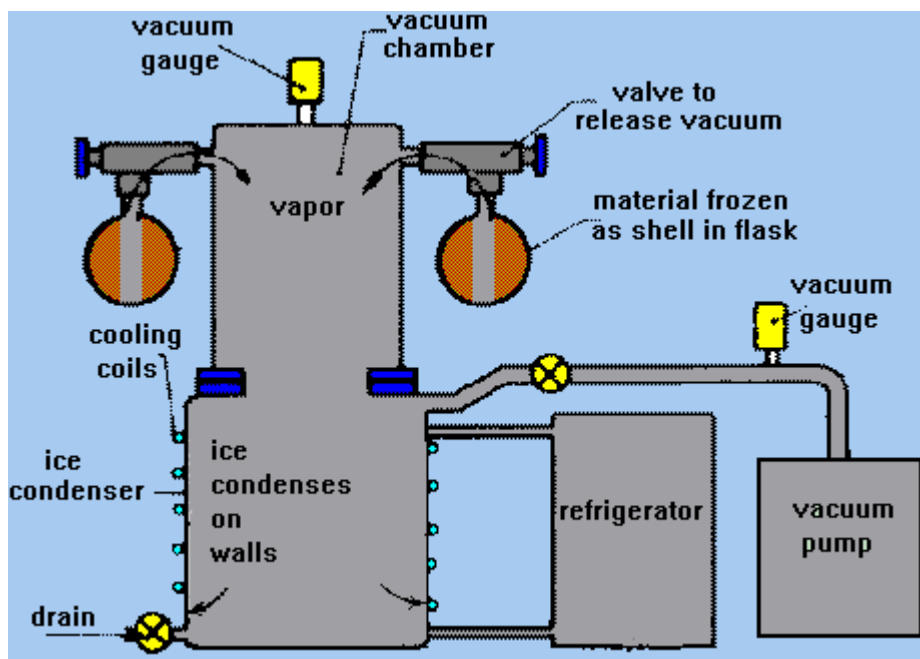


**Εικόνα 2.2** Διάγραμμα πίεσης/θερμοκρασίας των φάσεων του νερού.

Η διαδικασία της εξάχνωσης όμως καθιστά τη λυοφιλίωση μία ακριβή και χρονοβόρα μέθοδο ξήρανσης. Ωστόσο, υπάρχουν πολλά πλεονεκτήματα επιλογής της αντί της συμβατικής ξήρανσης στον αέρα, καθώς η απουσία θέρμανσης στη διαδικασία αυτή διατηρεί τα οργανοληπτικά χαρακτηριστικά και τα θρεπτικά συστατικά στο εσωτερικό των παραγόμενων προϊόντων.

Μια τυπική συσκευή λυοφιλίωσης αποτελείται από ένα θάλαμο ξήρανσης στον οποίο τα προς ξήρανση δείγματα τοποθετούνται σε ράφια ελεγχόμενης θερμοκρασίας. Η θερμοκρασία των ραφιών ρυθμίζεται και ελέγχεται κατά τη διάρκεια της επεξεργασίας χρησιμοποιώντας ένα θερμικό ρευστό που ρέει μέσα από τα ράφια. Ένας κύκλος λυοφιλίωσης αποτελείται από τρία διαδοχικά στάδια: κατάψυξη, πρώτο

στάδιο ξήρανσης και δεύτερο στάδιο ξήρανσης. Κατά τη διάρκεια της κατάψυξης, τα ράφια είναι παγωμένα και το μεγαλύτερο μέρος του νερού στα δείγματα κρυσταλλώνεται σε πάγο, συγκεντρώνοντας έτσι τις διαλυτές ουσίες μεταξύ των κρυστάλλων του πάγου. Όσες από τις διαλυτές ουσίες δεν κρυσταλλώνονται κατά την κατάψυξη, μετατρέπονται σε υαλώδεις φάσεις καθώς η θερμοκρασία του δείγματος πέφτει κάτω από τη θερμοκρασία υαλώδους μετάπτωσης ( $T_g$ ) της άμορφης μήτρας του. Το πρώτο στάδιο της ξήρανσης πραγματοποιείται με τη μείωση της πίεσης του θαλάμου και την αύξηση της θερμοκρασίας των ραφιών (με σκοπό την παροχή ενέργειας για την εξάχνωση), με αποτέλεσμα την απομάκρυνση των κρυστάλλων πάγου από το υλικό. Η εξάχνωση αρχικά πραγματοποιείται στην επιφάνεια των δειγμάτων και σταδιακά εξελίσσεται προς το εσωτερικό τους. Η διατήρηση της θερμοκρασίας των δειγμάτων κάτω από τη θερμοκρασία κατάρρευσής τους ( $T_c$ ) κατά το πρώτο στάδιο της ξήρανσης, εξασφαλίζει ότι η δομή τους θα παραμείνει στερεή και ανέπαφη μετά τη λυοφιλίωση. Ο κύκλος της διαδικασίας λυοφιλίωσης τελειώνει με ένα δεύτερο στάδιο ξήρανσης υπό μεγάλο κενό, όπου το περισσότερο νερό το οποίο δεν πάγωσε (π.χ. το νερό που υπήρχε διαλυμένο εντός της στερεής άμορφης φάσης), απομακρύνεται με εκρόφηση. Δεδομένου ότι κατά το δεύτερο στάδιο της ξήρανσης δεν υπάρχει πάγος εντός των δειγμάτων, πραγματοποιείται σε υψηλότερη θερμοκρασία ραφιών, καθώς δεν υπάρχει κίνδυνος απόψυξης και κατάρρευσης του υλικού. [39][40]



Εικόνα 2.3 Σχηματικό διάγραμμα συσκευής λυοφιλίωσης.

Η τελική μορφολογία του υλικού μετά τη λυοφιλίωση εξαρτάται σε μεγάλο βαθμό από το ρυθμό κατάψυξης του. Γρήγορη ή και άμεση κατάψυξη (π.χ. μέσω εμβάπτισης των δειγμάτων σε υγρό άζωτο) έχει σαν συνέπεια τη δημιουργία μικρών κρυστάλλων πάγου στο εσωτερικό του υλικού των δειγμάτων. Αντίθετα πολύ αργή κατάψυξη δίνει τη δυνατότητα σχηματισμού μεγαλύτερων κρυστάλλων πάγου, οι οποίοι κατά την εξάχνωσή τους μπορεί να δημιουργήσουν έντονες ασυνέχειες και ψαθυρότητα του τελικού υλικού. Συνεπώς η επιλογή του κατάλληλου ρυθμού κατάψυξης πριν την εξάχνωση, επιτρέπει τον έλεγχο του πορώδους των τελικών δειγμάτων. Η αύξηση του ρυθμού κατάψυξης αυξάνει αναλογικά και το μέγεθος του πορώδους του υλικού μετά τη λυοφιλίωση. Την παραπάνω τεχνική εκμεταλλεύεται ο εργαστηριακός κλάδος των Βιοϋλικών για την παρασκευή πορωδών βιοσυμβατών υλικών, με σκοπό τη δημιουργία οστικών ικριωμάτων με πορώδεις δομές παρόμοιες με αυτές των φυσικών οστικών ιστών.

Η τεχνική της λυοφιλίωσης ήταν γνωστή αιώνες πριν από τους Ίνκας και τους Ινδιάνους οι οποίοι αποθήκευαν πατάτες, καθώς και άλλα γεωργικά προϊόντα σε μεγάλο υψόμετρο πάνω στα βουνά, όπου οι χαμηλές θερμοκρασίες λόγω του χιονιού και κατά τη διάρκεια της νύχτας, καθώς και η χαμηλή πίεση λόγω υψομέτρου, βοηθούσαν στη διατήρηση και στη μείωση του βάρους των τροφίμων τους. Στη σύγχρονη εποχή από το 1930 η τεχνική της λυοφιλίωσης άρχισε να έχει εμπορική

## «Ανάπτυξη τρισδιάστατων ικριωμάτων βιομορίων-υδροξυαπατίτη»

σημασία στην ξήρανση φαρμακευτικών και βιολογικών ουσιών (εμβόλια ένζυμα, αντιβιοτικά κ.ά.) και από το 1951 και μετά ξεκίνησε να χρησιμοποιείται και στον τομέα επεξεργασίας και διατήρησης τροφίμων.

Η συσκευή λυοφιλίωσης που χρησιμοποιήθηκε στο εργαστήριο ήταν της εταιρείας Telstar, τύπου LyoQuest. Οι παράμετροι λειτουργίας της συσκευής είναι:

- Θερμοκρασία κατάψυξης:  $-55^{\circ}\text{C}$
- Συνθήκες κενού: 0,350 mbar



**Εικόνα 2.4** Συσκευή λυοφιλίωσης του εργαστηρίου.

### 2.4 Περιθλασιμετρία Ακτίνων X

Η περιθλασιμετρία ακτίνων X βοηθά στην ταυτοποίηση των κρυσταλλικών δομών μέσα σε ένα δείγμα μέσω του φάσματος περίθλασης των ακτίνων δεδομένης μονοχρωματικής ακτινοβολίας που διέρχονται από τη μάζα του υλικού. Αποτελεί την πιο διαδεδομένη τεχνική χαρακτηρισμού πολύμορφων υλικών.

## «Ανάπτυξη τρισδιάστατων ικρνωμάτων βιομορίων-υδροξυαπατίτη»

Οι ακτίνες X ή ακτίνες Ρέντγκεν (Röntgen) αποτελούν ένα τμήμα του ηλεκτρομαγνητικού φάσματος με περιοχή μήκους κύματος μεταξύ 10 nm με 10 pm, που αντιστοιχεί σε περιοχή συχνότητας από 30 PHz - 30 EHz και σε περιοχή ενέργειας 120eV - 120 keV. Αυτό το τμήμα του ηλεκτρομαγνητικού φάσματος βρίσκεται μεταξύ των τμημάτων της υπεριώδους ακτινοβολίας και των ακτίνων γ. Η παραγωγή των ακτίνων X γίνεται όταν στα ηλεκτρόνια εσωτερικών στιβάδων του ατόμου ενός μετάλλου προσδοθεί ενέργεια από δέσμη ηλεκτρονίων μεγάλης ενέργειας με αποτέλεσμα τη μεταπήδησή τους σε ηλεκτρονιακές στιβάδες υψηλότερης ενέργειας. Η παραμονή των ηλεκτρονίων αυτών στις στιβάδες υψηλότερης ενέργειας γίνεται για ελάχιστο χρονικό διάστημα και στη συνέχεια μεταπίπτουν στην αρχική τους κατάσταση εκπέμποντας την περίσσεια ενέργειας που απορρόφησαν με τη μορφή ακτίνων X (φωτονίων).

Βάσει του φαινομένου της περίθλασης, όταν μια παράλληλη μονοχρωματική δέσμη διέρχεται μέσα από ένα περιοδικά διατεταγμένο σύστημα, περιθλάται, με αποτέλεσμα τη συμβολή ή αλληλοαναίρεση των εξερχόμενων κυμάτων. Κάθε ένωση χαρακτηρίζεται από συγκεκριμένες αποστάσεις κρυσταλλικών επιπέδων. Όταν το φράγμα περίθλασης αποτελεί η μάζα ενός πολυκρυσταλλικού υλικού ταυτοποίησης, οι αποστάσεις των κρυσταλλικών επιπέδων  $d$  αποτελούν τα σημεία περίθλασης των ακτίνων. Η ακτίνες X που προσπίπτουν πάνω στα κρυσταλλικά επίπεδα προσπίπτουν με διαφορετική γωνία  $\theta$  ανάλογα με τη θέση των επιπέδων και τη διεύθυνση των ακτίνων. Όταν 2 ανακλώμενες ακτίνες από την επιφάνεια των κρυσταλλικών επιπέδων συμβάλλουν, το φάσμα συμβολής τους συναρτήσε των παραπάνω παραμέτρων καταγράφεται και αποτελεί ένδειξη ταυτοποίησης του υλικού. Η ανάλυση της παραπάνω ακτινοβολίας που προκύπτει μετά την περίθλαση από το υλικό για την τεχνική του XRD, γίνεται βάσει του νόμου του Bragg:

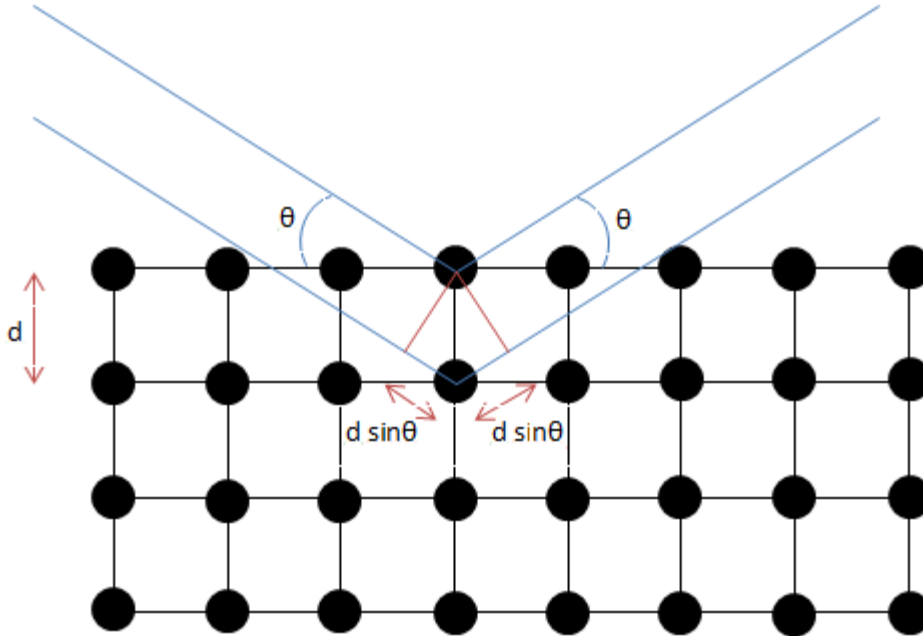
$$n * \lambda = 2 * d * \sin\theta$$

όπου:

- $n=1,2,3\dots$  ακέραιος αριθμός
- $\lambda$ = το μήκος κύματος της δέσμης των ακτίνων X που είναι γνωστό και εξαρτάται από το στοιχείο της καθόδου
- $d$ = οι αποστάσεις των κρυσταλλικών επιπέδων

## «Ανάπτυξη τρισδιάστατων κριωμάτων βιομορίων-υδροξυαπατίτη»

- $\theta$  = είναι η γωνία πρόσπτωσης ή ανάκλασης της ακτίνας X σε σχέση με τα κρυσταλλικά επίπεδα



Εικόνα 2.5 Σχεδιαγραμματική απεικόνιση του νόμου του Bragg.

Στο εργαστήριο η συσκευή περιθλασιμετρίας ακτίνων X για την πραγματοποίηση της διαδικασίας παραγωγής και περίθλασης των ακτίνων X από τα δείγματα λειτουργεί πραγματοποιώντας τις εξής διεργασίες:

1. Λυχνία βολφραμίου ( $A_r=183,84$ ) που λειτουργεί υπό κενό (για την αποφυγή οξείδωσης του βολφραμίου), θερμαίνεται με ρεύμα έντασης 40mA με αποτέλεσμα τον ιονισμό του μετάλλου και την παραγωγή νέφους ηλεκτρονίων. Το νέφος με τη επιβολή πεδίου τάσης 40kV χτυπά πάνω σε πλάκα χαλκού. Η διέγερση και μετάπτωση των ηλεκτρονίων των εσωτερικών στιβάδων των ατόμων χαλκού από το επιταχυνόμενο νέφος ηλεκτρονίων, έχει σαν αποτέλεσμα την παραγωγή φωτονίων ακτίνων X διαφόρων μηκών κύματος. Η παραγόμενη ακτινοβολία περνά μέσα από μονοχρωματικό φίλτρο για την απομόνωση των φωτονίων που προκύπτουν από τη διέγερση και μετάπτωση των ηλεκτρονίων των στιβάδων  $K_a$  του χαλκού ( $K_a=1,5406\text{nm}$ ).
2. Με τη χρήση γωνιομέτρου σαρώνεται η επιφάνεια του δείγματος με τις παραγόμενες ακτίνες X με γωνιακό εύρος και βήμα (χρόνο) σάρωσης που

### «Ανάπτυξη τρισδιάστατων ικριωμάτων βιομορίων-υδροξυαπατίτη»

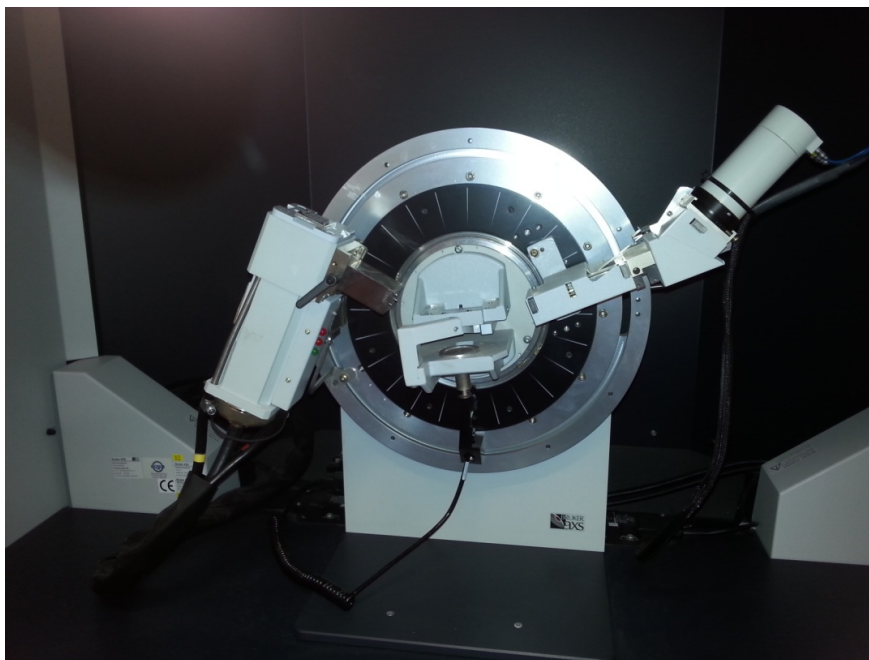
ορίζεται από το χειριστή. Στο δεδομένο εργαστήριο το γωνιακό εύρος σάρωσης ήταν  $10^{\circ}$ - $100^{\circ}$ . Η γωνία μεταξύ των ακτίνων σάρωσης και των κρυσταλλικών επιπέδων αντιστοιχεί στη γωνία  $\theta$  στον τύπο του Bragg.

3. Οι περιθλώμενες ακτίνες X συλλέγονται από τον κρύσταλλο του ανιχνευτή, και εκπέμπουν φωτόνια, τα οποία μετατρέπονται μέσω του φωτοπολλαπλασιαστή σε σήμα έντασης εξόδου.

Οι κορυφές των σημάτων εντάσεων εξόδου ποικίλουν ανάλογα με τη φάση του υλικού που αναλύεται (κρυσταλλικές αποστάσεις) και τις αντίστοιχες γωνίες περίθλασης. Όταν η συμβολή είναι πιο έντονη τότε σημειώνονται εντονότερες κορυφές σημάτων έντασης εξόδου. Συνεπώς για κάθε στοιχείο ή ένωση υπάρχει μια αντιστοιχία έντασης κορυφών σε συγκεκριμένες τιμές γωνιών  $2\theta$  σύμφωνα με τον τύπο του Bragg. Η ταυτοποίηση των περιεχομένων φάσεων ενός υλικού γίνεται μέσω αντιστοίχισης των κορυφών έντασης που καταγράφονται με αυτές από τη βάση δεδομένων που υπάρχει στο πρόγραμμα ανάλυσης της συσκευής. Επειδή λόγω ομοιότητας των κρυσταλλικών πλεγμάτων και πολύ μικρών διαφορών στις πλεγματικές αποστάσεις, πολλές κρυσταλλικές ενώσεις παρουσιάζουν όμοιες κορυφές κατά την ανάλυσή τους με τη μέθοδο XRD. Για τον παραπάνω λόγο τα αποτελέσματα της ανάλυσης δίνουν έναν αριθμό φάσεων που αντιστοιχούν, καθώς και το % ποσοστό αντιστοίχισης με την αναλυόμενη φάση.

Η συσκευή περιθλασιμετρίας ακτίνων X (XRD) που χρησιμοποιήθηκε στο εργαστήριο ήταν της εταιρείας BRUKER τύπου D8-FOCUS.





**Εικόνα 2.6** Συσκευή περιθλασιμετρίας ακτίνων X (XRD) του εργαστηρίου.

## 2.5 Ηλεκτρονική Μικροσκοπία Σάρωσης

Το ηλεκτρονικό μικροσκόπιο σάρωσης (SEM) αποτελεί την τεχνολογικά εξελιγμένη μορφή του οπτικού μικροσκοπίου προσφέροντας τις ίδιες πληροφορίες με το οπτικό μικροσκόπιο σε πολύ μεγαλύτερη κλίμακα παρατήρησης και αξιολόγησης, καθώς η πληθώρα των λειτουργιών πάνω στις οποίες βασίζεται παρέχουν επιπλέον πληροφορίες για τις ιδιότητες και τη σύσταση των παρατηρούμενων περιοχών των δειγμάτων σε αντίθεση με το οπτικό μικροσκόπιο. Το ηλεκτρονικό μικροσκόπιο έχει πολύ μεγαλύτερη διακριτική ικανότητα σε σχέση με το οπτικό μικροσκόπιο, της τάξης των 0,2 $\mu\text{m}$  στο οπτικό ενώ στο SEM της τάξης των 100 $\text{\AA}$ . Παράλληλα λοιπόν με τη διακριτική ικανότητα το ηλεκτρονικό μικροσκόπιο μπορεί να φτάσει και σε τιμές χρήσιμης μεγέθυνσης περίπου 20 φορές την τιμή μέγιστης μεγέθυνσης του οπτικού μικροσκοπίου, δηλαδή φτάνει μέχρι 20.000 φορές μεγέθυνση του δοκιμίου.

Η λειτουργία ενός ηλεκτρονικού μικροσκοπίου βασίζεται στην καταγραφή των δευτερογενών ηλεκτρονίων και των οπισθοσκεδαζόμενων ηλεκτρονίων που εκπέμπονται από το δοκίμιο όταν πάνω σε αυτό προσκρούσει μια δέσμη ηλεκτρονίων παραγόμενη από πηγή βολφραμίου. Η πηγή βολφραμίου (νήμα βολφραμίου) θερμαίνεται και κατά συνέπεια εκπέμπει νέφος ηλεκτρονίων. Στο χώρο της πηγής επικρατούν συνθήκες υψηλού κενού ώστε να αποφεύγονται φαινόμενα οξείδωσης της επιφάνειας του βολφραμίου. Με επιβολή διαφοράς δυναμικού της τάξης των 20-30

kV μεταξύ της ανόδου και της καθόδου της στήλης του κανονιού ηλεκτρονίων της συσκευής, τα ηλεκτρόνια οδηγούνται προς την άνοδο της στήλης του μικροσκοπίου. Κάτω από το νήμα βολφραμίου τοποθετείται ένα πηνίο παραγωγής υψηλής διαφοράς δυναμικού που λειτουργεί σαν συγκεντρωτικός φακός της παραγόμενης ακτίνας ηλεκτρονίων, συγκεντρώνοντας έτσι τα ηλεκτρόνια ώστε η δέσμη να μη διαχέεται στο χώρο της καθόδου και παράλληλα ωθεί τη δέσμη προς την άνοδο λόγω της διαφοράς δυναμικού. Η δέσμη των ηλεκτρονίων περνά μέσα και από ένα δεύτερο σύστημα πηνίων σάρωσης, το οποίο έχει αντίστοιχο ρόλο με τον αντικειμενικό φακό του οπτικού μικροσκοπίου οδηγώντας τη δέσμη να προσκρούσει ακριβώς πάνω στην επιφάνεια του προς μελέτη δοκιμίου που έχει τοποθετηθεί μέσα στο θάλαμο του μικροσκοπίου. Το σύστημα πηνίων σάρωσης επιτρέπει τον έλεγχο κίνησης της δέσμης ηλεκτρονίων κατά τον x και y άξονα, έτσι ώστε τελικά η δέσμη να σαρώνει μια τετραγωνική περιοχή της επιφάνειας του δείγματος. Ο έλεγχος και αλλαγή του σημείου σάρωσης γίνεται από το χειριστή μέσω των οργάνων ελέγχου κατεύθυνσης, μεγέθυνσης και της εικόνας σάρωσης.

Κατά την πρόσκρουση των ηλεκτρονίων της δέσμης στην επιφάνεια του δοκιμίου εκπέμπονται ηλεκτρόνια 3 ειδών:

- Δευτερογενή ηλεκτρόνια: Τα ηλεκτρόνια που παράγονται εξαιτίας των ανελαστικών συγκρούσεων των ηλεκτρονίων της δέσμης (πρωτογενή) που παράγει η πηγή του μικροσκοπίου με τα άτομα της επιφάνειας του δοκιμίου σε βάθος  $\sim 10\text{nm}$ . Τα ηλεκτρόνια αυτά έχουν ενέργεια κοντά στα 50 eV. Τα ηλεκτρόνια της δέσμης συγκρούονται με τα ηλεκτρόνια σθένους ή αγωγιμότητας των ατόμων της επιφάνειας, με αποτέλεσμα αριθμός των ηλεκτρονίων των ατόμων του δοκιμίου να εκτινάσσονται από τη θέση τους στο χώρο. Τα εκτινασσόμενα αυτά ηλεκτρόνια συγκεντρώνονται από έναν ανιχνευτή ο οποίος αποτελείται από μία φθορίζουσα οθόνη πάνω στην οποία αποτυπώνεται η εικόνα των ηλεκτρονίων και στη συνέχεια ο ανιχνευτής μετατρέπει το αποτύπωμα της φθορίζουσας οθόνης στην τελική εικόνα μικροσκοπίας του δοκιμίου. Μέσω της ανάλυσης των δευτερογενών ηλεκτρονίων προκύπτει η εικόνα της μικροδομής και της μορφολογίας του δοκιμίου που εξετάζεται.

### «Ανάπτυξη τρισδιάστατων ικριωμάτων βιομορίων-υδροξυαπατίτη»

- Οπισθοσκεδαζόμενα ηλεκτρόνια: Είναι τα ηλεκτρόνια της δέσμης του μικροσκοπίου τα οποία διαχέονται κατά την ελαστική πρόσκρουση στην επιφάνεια του δοκιμίου σε βάθος  $\sim 100\text{nm}$ . Η ενέργεια των ηλεκτρονίων αυτών φτάνει μέχρι τα  $30\text{ keV}$ , αρκετά μεγαλύτερη από αυτή των δευτερογενών. Η αποτύπωση της εικόνας των οπισθοσκεδαζόμενων ηλεκτρονίων μας δίνει πληροφορίες για το ανάγλυφο και τις διαφορές στη χημική σύσταση μεταξύ των συστατικών που περιέχει το δοκίμιο. Ενδεικτικά τα συστατικά του υλικού με μεγαλύτερο μοριακό βάρος αποτυπώνονται πιο ανοιχτόχρωμα σε σχέση με τα ελαφρύτερα συστατικά τα οποία συγκριτικά φαίνονται πιο σκοτεινά.
- Ηλεκτρόνια Auger: Εκτός από την περίπτωση ένα διεγερμένο ηλεκτρόνιο ατόμου του υλικού να αποδιεγερθεί επιστρέφοντας σε χαμηλότερη στιβάδα αποβάλλοντας την περίσσεια ενέργειάς του, υπάρχει η πιθανότητα να μεταδώσει την ενέργεια αυτή σε ένα άλλο ηλεκτρόνιο (ηλεκτρόνιο Auger). Η ενέργεια αυτού του Auger ηλεκτρονίου εξαρτάται από το είδος του ατόμου και είναι της τάξης του  $\text{keV}$ . Το φαινόμενο Auger είναι πιο συχνό στα στοιχεία με χαμηλό ατομικό αριθμό. Τα ηλεκτρόνια αυτά είναι χρήσιμα για την χημική ανάλυση των ατόμων μιας επιφάνειας.

Η απορρόφηση των παραπάνω τριών ειδών ηλεκτρονίων γίνεται από κατάλληλους ανιχνευτές που αναπτύσσουν κατάλληλες διαφορές δυναμικού ανάλογες με την ενέργεια των αντίστοιχων ηλεκτρονίων που αναλύουν.

Επίσης κατά τη σύγκρουση των ηλεκτρονίων της δέσμης με τα άτομα της επιφάνειας του δοκιμίου κάποια ηλεκτρόνια των ατόμων απομακρύνονται από τα άτομα εξαιτίας της σύγκρουσης. Την κενή θέση που δημιουργήθηκε στη στιβάδα από όπου έφυγε το προηγούμενο ηλεκτρόνιο θα αντικαταστήσει ένα ηλεκτρόνιο της επόμενης στιβάδας. Π.χ. αν κατά την πρόσκρουση ενός ηλεκτρονίου της δέσμης απομακρύνθηκε από το άτομο ένα ηλεκτρόνιο από τη στιβάδα K τότε ένα ηλεκτρόνιο της στιβάδας L με μεγαλύτερη ενέργεια θα συμπληρώσει τη θέση αυτή. Τα ηλεκτρόνια δηλαδή με μεγαλύτερη ενέργεια τείνουν να συμπληρώνουν θέσεις σε στιβάδες μικρότερης ενέργειας ώστε να βρίσκονται σε πιο σταθερή ενεργειακή κατάσταση. Οπότε το ηλεκτρόνιο για να καταλάβει την κενή πλέον θέση στη στιβάδα K θα πρέπει να αποβάλει μέρος της ενέργειάς του η οποία αποβάλλεται με τη μορφή ακτίνων X

## «Ανάπτυξη τρισδιάστατων ικριωμάτων βιομορίων-υδροξυαπατίτη»

(φωτονίων). Η συλλογή και καταγραφή των ακτίνων X από τον ανιχνευτή του ηλεκτρονικού μικροσκοπίου μας δίνει πληροφορίες για το είδος των στοιχείων ή των ενώσεων που περιέχει το δείγμα του δοκιμίου όμοια με τη μέθοδο XRD, καθώς και μια ποσοτική αναλογία των δεδομένων φάσεων στη μελετώμενη περιοχή του δείγματος. Η παραπάνω δυνατότητα στοιχειακής χημικής ανάλυσης (EDS) πραγματοποιείται για τον προσδιορισμό της χημικής σύνθεσης μιας μεγάλης ή μιας μικρής περιοχής του δείγματος. Η ανάλυση EDS γίνεται με κατάλληλη συσκευή ανάλυσης, η οποία λειτουργεί παράλληλα με τη συσκευή του SEM και βρίσκεται προσαρτημένη πάνω στο κανόνι του μικροσκοπίου για την ικανότητα λήψης από ανιχνευτή των φωτονίων των ακτίνων X που παράγονται από το δείγμα.

Η συσκευή SEM που χρησιμοποιήθηκε στο εργαστήριο ήταν της εταιρείας JEOL και τύπου JSM-6380LV, ενώ στήλη EDS ήταν της εταιρείας OXFORD INSTRUMENTS και τύπου INCA x-sight. Οι παράμετροι λειτουργίας που ορίστηκαν στο SEM για την παρατήρηση και ανάλυση των δειγμάτων ήταν:

- Accelerating voltage: 20kV
- Working distance: 15mm



**Εικόνα 2.7** Συσκευή μικροσκοπίας SEM με στήλη ανάλυσης EDS

## 2.6 Φασματοσκοπία Υπερύθρου με Μετασχηματισμό Fourier (FTIR)

Η υπέρυθη φασματοσκοπία (Infrared Spectroscopy, IR) θεωρείται σημαντική φασματοσκοπική τεχνική στην Οργανική Χημεία, λόγω της ευκολίας λήψης φασμάτων και της σύγκρισής τους με φάσματα γνωστών οργανικών ενώσεων. Χρησιμοποιείται ευρύτατα κατά τη σύνθεση χημικών ενώσεων και για την πιστοποίηση της καθαρότητάς τους. Στην περιοχή υπέρυθρου του φάσματος της ηλεκτρομαγνητικής ακτινοβολίας (IR) συμβαίνουν απορροφήσεις που οφείλονται σε δονήσεις ή κάμψεις των δεσμών των μορίων για ενώσεις με μόνιμη διπολική ροπή, που μεταβάλλεται κατά την παραμόρφωση του μορίου και απορροφούν ισχυρά στην περιοχή υπέρυθρου.

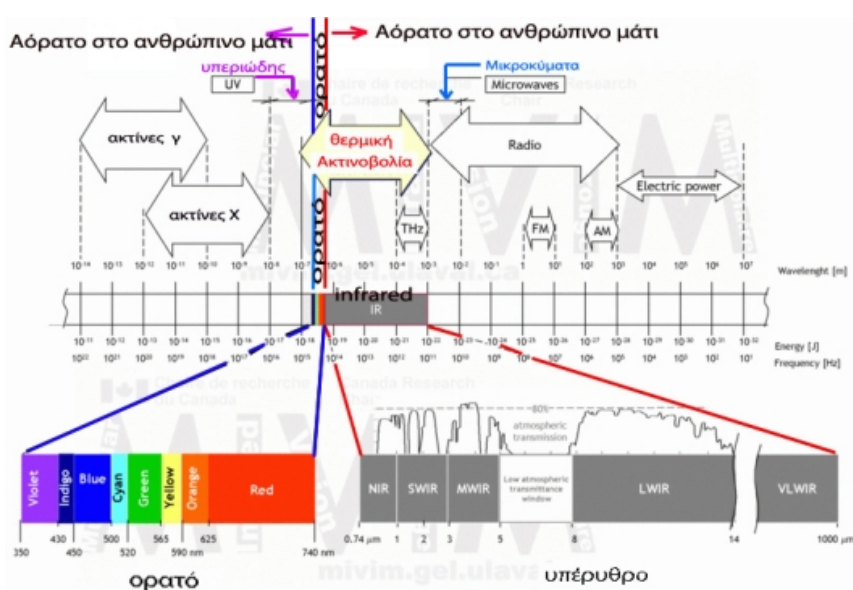
Το υπέρυθρο (Infrared – IR) είναι εκείνο το τμήμα της ηλεκτρομαγνητικής ακτινοβολίας, το οποίο εκτείνεται πέρα από το ορατό και φθάνει μέχρι την περιοχή των μικροκυμάτων.

Διακρίνεται σε 3 περιοχές:

Εγγύς υπέρυθρο: 0,8μ – 2μ

Κυρίως υπέρυθρο: 2μ – 15μ

Άπω υπέρυθρο: 15μ – 400μ



**Εικόνα 2.8** Φάσμα ηλεκτρομαγνητικής ακτινοβολίας με έμφαση στην ορατή και στην υπέρυθρη περιοχή

Τα φάσματα υπέρυθρου είναι φάσματα απορρόφησης. Για την περιγραφή τους δε χρησιμοποιείται η συχνότητα ή το μήκος κύματος της ακτινοβολίας αλλά εισάγεται η έννοια του κυματαριθμού ( $\nu$ ) ο οποίος δίνεται από τη σχέση:

$$\nu(cm^{-1}) = \frac{1}{\lambda(cm)}$$

$\lambda$ : το μήκος κύματος της ακτινοβολίας

Τα άτομα των μορίων ακόμη και στην βασική ενεργειακή τους κατάσταση δεν παραμένουν ποτέ ακίνητα, αλλά αντιθέτως εκτελούν κινήσεις δόνησης και περιστροφής. Όταν μια ποσότητα ύλης ακτινοβολείται με υπέρυθρη ακτινοβολία, ένα ποσοστό από τα μόρια που δέχονται την ακτινοβολία διεγείρονται, αυξάνοντας την ενέργεια δόνησης και περιστροφής τους. Για να λάβει χώρα απορρόφηση ενέργειας από τα μόρια, θα πρέπει η συχνότητα της προσπίπτουσας ακτινοβολίας να συμπέσει με την συχνότητα δόνησης των ατόμων του δεσμού. Οι συχνότητες με τις οποίες δονούνται τα άτομα στο μόρια εξαρτώνται μόνο από τις μάζες των ατόμων, τον τύπο του δεσμού και το σχήμα του μορίου. Αν ένα μόριο είναι συμμετρικό δεν παρατηρείται απορρόφηση υπέρυθρης ακτινοβολίας. Ένα μόριο θα απορροφήσει στο IR μόνο εφόσον μεταβάλλεται η διπολική ροπή του κατά την διάρκεια της δόνησης. Διαφορετικά, η δόνηση θεωρείται ανενεργή στο IR. Όσο μεγαλύτερη είναι η μεταβολή της διπολικής ροπής, τόσο ισχυρότερη είναι και η απορρόφηση.

Το μόριο απορροφά ενέργεια  $\Delta E = h\nu$  από την IR πηγή - η οποία εκπέμπει ακτινοβολία έντασης  $I$  - σε κάθε δονητική μετάβαση. Η διέλευσης μπορεί να πάρει οποιαδήποτε τιμή μεταξύ του 0 και του 1 και συχνά εκφράζεται ως ποσοστό επί τοις εκατό. Η εξίσωση που δίνει τη σχέση μεταξύ απορρόφησης και διέλευσης είναι η εξής:

$$P = P_0 \text{Exp}[-ab]$$

P: η ισχύς της εξερχόμενης ακτινοβολίας μετά τη διέλευση του δείγματος

P<sub>0</sub>: η ισχύς της προσπίπτουσας ακτινοβολίας

## «Ανάπτυξη τρισδιάστατων κριωμάτων βιομορίων-υδροξυαπατίτη»

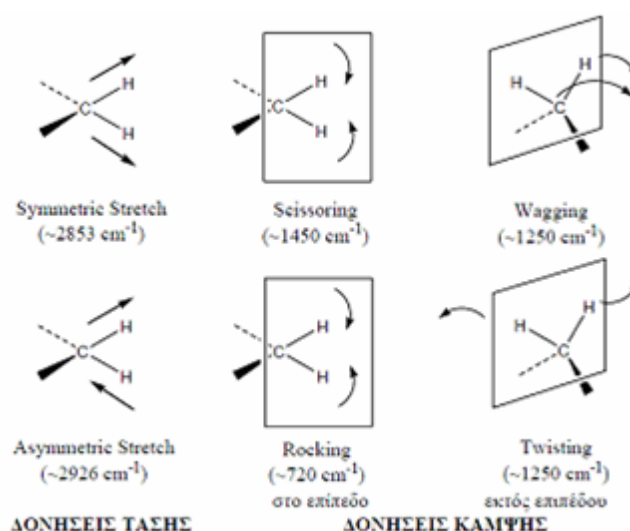
α: σταθερά απορρόφησης

β: πάχος του δείγματος

Οι δονήσεις που λαμβάνουν χώρα διακρίνονται σε 2 κατηγορίες:

**Δονήσεις τάσης:** Τα άτομα του δεσμού διαδοχικά πλησιάζουν και απομακρύνονται μεταξύ τους κινούμενα κατά μήκος του δεσμού.

**Δονήσεις κάμψης:** Τα άτομα των γειτονικών δεσμών κινούνται έτσι ώστε να αλλάξει η γωνία των δεσμών.



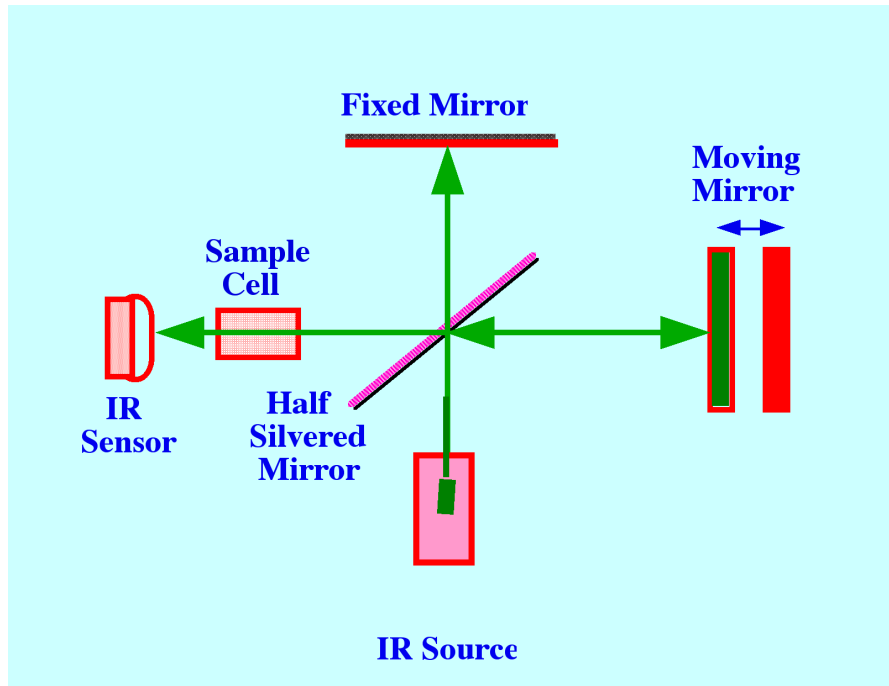
**Εικόνα 2.9** Είδη μοριακών δονήσεων

Εκτός από τις παραπάνω λαμβάνουν χώρα και συνδυασμένες δονήσεις. Υπάρχουν δηλαδή και άλλα είδη παραμόρφωσης της δομής των μορίων (ψαλιδωτή κίνηση, κλυδωνισμός, στρέβλωση και άλλα. Οι μοριακές ταλαντώσεις ορισμένων ομάδων είναι ιδιαίτερα χαρακτηριστικές. Για αυτό και η φασματοσκοπία υπέρυθρου είναι κατάλληλη για τον χαρακτηρισμό ορισμένων ομάδων σε ένα μόριο (π.χ. υδροξύλια, καρβοξύλια, αμινομάδες, διπλοί και τριπλοί δεσμοί κ.ά.)

Η μέθοδος που έχει επικρατήσει είναι η φασματοσκοπία με χρήση μετασχηματισμού Fourier (FT-IR). Είναι η τεχνική μέτρησης για τη συλλογή των υπέρυθρων φασμάτων στην οποία αντί να καταγράφεται το ποσό της ενέργειας που απορροφάται για διάφορες συχνότητες της ακτινοβολίας, το φως IR οδηγείται στο δείγμα αφού πρώτα διαμορφωθεί μέσω ενός συμβολόμετρου. Αφού περάσει μέσα από το δείγμα, το

## «Ανάπτυξη τρισδιάστατων ικριωμάτων βιομορίων-υδροξυαπατίτη»

μετρούμενο σήμα είναι το συμβολογράφημα και έχει ως αποτέλεσμα ένα φάσμα όμοιο με εκείνο που παίρνουμε από τη συμβατική φασματοσκοπία διασποράς.

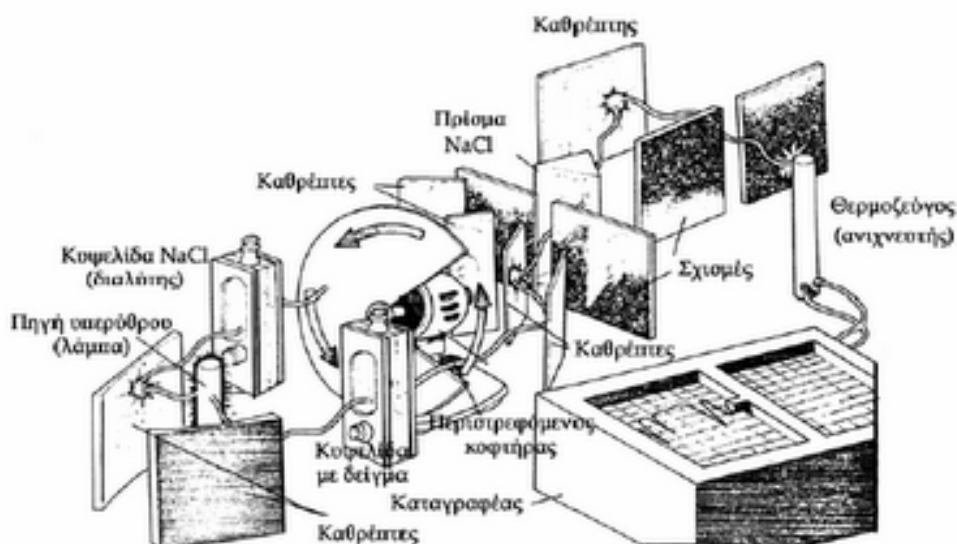


Εικόνα 2.10 Απεικόνιση ροής ακτίνας στο FTIR.

Ένα τυπικό φασματοφωτόμετρο IR μετασχηματισμού Fourier (FT-IR) αποτελείται από τα εξής κύρια τμήματα:

- Την πηγή υπέρυθρης ακτινοβολίας
- Την πηγή λέιζερ
- Το συμβολόμετρο Michelson
- Τον ανιχνευτή





**Εικόνα 2.11** Σχηματική αναπαράσταση διάταξης συσκευής FTIR.

Μπορούν να ληφθούν φάσματα για υγρές, στερεές ουσίες καθώς και για αέρια. Η λήψη του φάσματος FT-IR μπορεί να γίνει με την τεχνική της διάχυτης ανάκλασης ή με την τεχνική της εξασθενημένης ολικής ανάκλασης.

Τα φάσματα υπέρυθρου έχουν τετμημένη το μήκος κύματος της ακτινοβολίας σε μμ ή τον κυματαριθμό της σε  $\text{cm}^{-1}$  (συνηθέστερα) και σαν τεταγμένη την διαπερατότητα  $T(\%)$  και σπανιότερα την απορρόφηση  $A(\%)$ . Το φάσμα διακρίνεται σε 2 βασικές περιοχές. Η μια περιέχει τις απορροφήσεις πάνω από  $1500\text{cm}^{-1}$ . Στην περιοχή αυτή απαντούν οι απορροφήσεις όλων των χαρακτηριστικών ομάδων. Η δεύτερη περιοχή αφορά τους κυματαριθμούς με τιμές μικρότερες από  $1500\text{cm}^{-1}$ . Η περιοχή αυτή αφορά απορροφήσεις, οι περισσότερες από τις οποίες δεν μπορούν ανά αποδοθούν σε συγκεκριμένες διεγέρσεις. Η περιοχή αυτή χαρακτηρίζεται σαν περιοχή δακτυλικού αποτυπώματος του μορίου.

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

- Περιοχή τάσης Υδρογόνου ( $4.000 - 2.500\text{cm}^{-1}$ ). Η απορρόφηση στις περιοχές αυτές προκαλείται από δονήσεις τάσεων δεσμών C-H, O-H, N-H και S-H. Η συχνότητα απορρόφησης εξαρτάται από το άτομο που με το οποίο συνδέεται το H.
- Περιοχή τάσεως τριπλού δεσμού ( $2.500 - 2.000 \text{cm}^{-1}$ ). Στην περιοχή αυτή απορροφούν οι τριπλοί δεσμοί μεταξύ ατόμων άνθρακα και οι τριπλοί δεσμοί

### «Ανάπτυξη τρισδιάστατων ικριωμάτων βιομορίων-υδροξυαπατίτη»

μεταξύ ατόμων άνθρακα και αζώτου. Στην ίδια περιοχή απορροφούν και οι δεσμοί  $-C=C=C-$  και  $N=C=O$ .

- Περιοχή τάσης διπλού δεσμού ( $2.000 - 1.600 \text{ cm}^{-1}$ ). Υπεύθυνες για την απορρόφηση στην περιοχή αυτή είναι οι δονήσεις των δεσμών  $C=C$ ,  $C=O$  και  $C=N$ .
- Περιοχή τάσης και κάμψης απλού δεσμού ( $1.500 - 700 \text{ cm}^{-1}$ ). Στην περιοχή αυτή εμφανίζονται πολλές απορροφήσεις, π.χ. δονήσεις κάμψεως των δεσμών  $C-H$  και οι δονήσεις τάσεων και κάμψεως απλών δεσμών που συνδέουν ομάδες, όπως του μεθυλενίου ( $-CH_2-$ ), μεθυλίου ( $-CH_3$ ) και αμινομάδες. Η περιοχή αυτή ονομάζεται περιοχή δακτυλικού αποτυπώματος, επειδή το φάσμα στην περιοχή αυτή χαρακτηρίζει το μόριο ως σύνολο.

Η συσκευή φασματοσκοπίας υπέρυθρου με μετασχηματισμό Fourier που χρησιμοποιήθηκε για τη μελέτη των ικριωμάτων ήταν της εταιρείας NICOLET, τύπου 6700 FT-IR with Smart Orbit FT-IR accessory.



**Εικόνα 2.12** Φωτογραφία της συσκευής NICOLET 6700 FT-IR

### **3 ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ – ΣΧΟΛΙΑ**

Οι συνθήκες και η όλη μεθοδολογία για την ανάπτυξη ικριωμάτων με ενσωμάτωση νανοσωλήνων και χρήση του αποικοδομήσιμου πολυμερούς ΡΕΟ μελετήθηκαν και αναλύθηκαν εκτενώς ώστε να καταστεί δυνατή η παρασκευή ικριωμάτων με καλές μορφολογικές ιδιότητες και μηχανικές αντοχές.

Τα τελικά ικρίωματα που παρήχθησαν κατά την πειραματική διαδικασία, παρέμειναν περίπου για ένα μήνα στο πυριαντήριο στους 40°C και στη συνέχεια κονιορτοποιήθηκαν για τη φυσικοχημική τους μελέτη με τις μεθόδους Περίθλασης Ακτίνων Χ και Υπέρυθρης Φασματομετρίας με Μετασχηματισμό Fourier. Τα δείγματα που μελετήθηκαν στο Ηλεκτρονικό Μικροσκόπιο Σάρωσης, επικαλύφθηκαν αρχικά με ιόντα χρυσού, ώστε η επιφάνειά τους να γίνει αγωγή και να αλληλεπιδρά με τη δέσμη ηλεκτρονίων.

#### **3.1 Προσδιορισμός Βέλτιστων Παραμέτρων Ενσωμάτωσης των Νανοσωλήνων Άνθρακα**

Αρχικά δοκιμάστηκε η προσθήκη των MWCNTs στο διάλυμα της χιτοζάνης και του ορθοφωσφορικού οξέος. Όμως ο όγκος του διαλύματος ήταν πολύ μικρός και η διασπορά τους δεν ήταν εύκολη με αποτέλεσμα τη δημιουργία έντονων συσσωμάτων νανοσωλήνων. Λόγω της πολύ μικρής τους επιφάνειας και της έντονης επιφανειακής τους ενέργειας οι νανοσωλήνες τείνουν πολύ εύκολα να συσσωματώνονται. Επίσης το ιξώδες του διαλύματος της χιτοζάνης αύξανε με την προσθήκη των MWCNTs, γεγονός που δυσκόλεψε στη συνέχεια την προσθήκη του στο λουτρό της L-αργινίνης για την αντίδραση παραγωγής του υδροξυαπατίτη. Τέλος στο τελικό αιώρημα του υδροξυαπατίτη με την παραπάνω μέθοδο δεν υπήρχε τόσο ομοιόμορφη διασπορά των νανοσωλήνων. Η παραπάνω μέθοδος απορρίφθηκε.

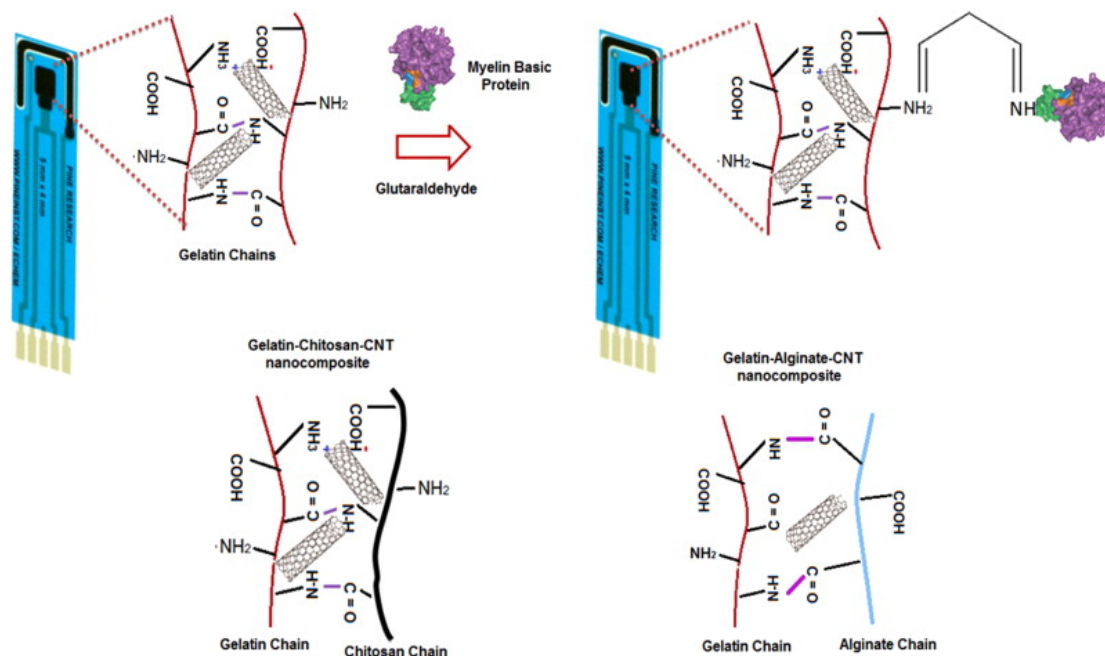
Στη συνέχεια δοκιμάστηκε χειροκίνητη ανάμιξη σε γυάλινο σκεύος και με μικροσπάτουλα της σκόνης των MWCNTs με ξηρή σκόνη Har-Chit και σταδιακή προσθήκη ποσότητας νερού έως 4-5 ml. Το υλικό που προέκυψε είχε τη μορφή συμπαγούς ιξώδους πάστας με έντονη ανομοιομορφία, καθώς παρατηρούνταν λευκοί ψευδόκοκκοι στους οποίους δεν είχαν ενσωματωθεί νανοσωλήνες. Το τελικό υλικό

### «Ανάπτυξη τρισδιάστατων ικριωμάτων βιομορίων-υδροξυαπατίτη»

μετά και τη λυοφιλίωση είχε πολύ τραχειά επιφάνεια με πολύ μεγάλους κόκκους ανομοιόμορφης σύστασης. Η παραπάνω μέθοδος απορρίφθηκε.

Τα καλύτερα αποτελέσματα για την εισαγωγή των νανοσωλήνων στο υλικό έδωσε η διαδικασία προσθήκης τους στο τελικό αιώρημα Har-Chit, πριν τη φυγοκέντρηση ή/και ξήρασή του. Μετά το πέρας της προσθήκης των αντιδραστηρίων και πραγματοποίηση της αντίδρασης καταβύθισης για παραγωγή του υδροξυαπατίτη, η ποσότητα των MWCNTs προστίθεται στο αναδευόμενο αιώρημα (με μαγνητικό αναδευτήρα), με ρυθμό ανάδευσης 1500 rpm, και σε θερμοκρασία περιβάλλοντος. Η ανάδευση πραγματοποιείται για 1 ώρα, έτσι ώστε να πραγματοποιηθεί μια ομοιόμορφη διασπορά και τα συσσωματώματα των νανοσωλήνων να σπάσουν, χωρίς την χρήση μηχανικής ανάδευσης η οποία μπορεί να αλλοιώσει τη δομή τους.

Οι MWCNTs δεν αντιδρούν χημικά με καμιά από τις φάσεις του αιωρήματος, αλλά «παγιδεύονται» (Εικόνα 3.1) εντός των πολυμερικών αλυσίδων της χιτοζάνης. Η ενσωμάτωσή τους μετά την παραπάνω διαδικασία διασποράς τους είναι πλήρης καθώς με μετέπειτα φυγοκεντρήσεις του αιωρήματος δεν παρατηρείται απώλεια νανοσωλήνων στο υπερκείμενο νερό που αφαιρείται.



**Εικόνα 3.1** Σχεδιαγραμματική αναπαράσταση ενσωμάτωσης CNTs μεταξύ των αλυσίδων βιοπολυμερών (χιτοζάνης, ζελατίνης).

Η προσθήκη των MWCNTs δοκιμάστηκε σε ποσότητες 0,5%, 1%, 2% και 3% w/w επί του τελικού στερεού υλικού των ικριωμάτων που προκύπτει από τις παραπάνω στερεές φάσεις αντιδραστηρίων μετά το τέλος και της διαδικασίας λυοφιλίωσης. Με τη μέθοδο διασποράς στο τελικό αιώρημα Har-Chit για ποσότητες προσθήκης MWCNTs  $\geq 2\%$  w/w, τα τελικά ικριώματα παρουσίαζαν πιο έντονη ψαθυρότητα και μειωμένη συνεκτικότητα υλικού σε σχέση με τα αντίστοιχα ικριώματα χωρίς νανοσωλήνες. Επίσης, σε αυτή την περίπτωση, η δημιουργία και μη διάλυση συσσωμάτων νανοσωλήνων μετά το πέρας της διαδικασίας διασποράς τους ήταν εντονότερη. Η ποσότητα προσθήκης 1% w/w MWCNTs θεωρήθηκε μετά από δοκιμές ως η καλύτερη, με τα καλύτερα αποτελέσματα διασποράς και αύξησης της φαινόμενης ελαστικότητας των δειγμάτων, χωρίς υποβάθμιση της συνεκτικότητας τους και της σκληρότητάς τους.

### 3.2 Προσδιορισμός Βέλτιστων Παραμέτρων Ενσωμάτωσης του Poly(ethylene oxide)

Αρχικά και βάσει βιβλιογραφίας [51] παρασκευάστηκαν 10 ml διαλύματος οξικού οξέος ( $\text{CH}_3\text{COOH}$ ) συγκέντρωσης 0,5 M. Στην ποσότητα των 10 ml προστέθηκαν 0,316 gr σκόνη PEO, σε αναλογία κατά βάρος 1:1 με τη χιτοζάνη, και το διάλυμα τέθηκε υπό ανάδευση με μαγνητικό αναδευτήρα με ρυθμό 400 rpm για 24 ώρες σε θερμοκρασία 40 °C, ώστε να πραγματοποιηθεί πλήρης διάλυση της σκόνης του πολυμερούς στο διάλυμα. Στη συνέχεια τα 10 ml διαλύματος του πολυμερούς προστέθηκαν σε υλικό αιωρήματος Har-Chit μετά από φυγοκέντρωση. Τα ικριώματα που προέκυψαν μετά τη λυοφιλίωση θρυμματίζονταν και το υλικό ήταν πάρα πολύ μαλακό και χωρίς συνοχή. Η ποσότητα διαλύματος PEO που χρησιμοποιήθηκε θεωρήθηκε υπερβολική και στη συνέχεια δοκιμάστε επανάληψη της ίδιας διαδικασίας με προσθήκες 1 ml, 2,5 ml και 5 ml του παραπάνω διαλύματος PEO/  $\text{CH}_3\text{COOH}$ . Με προσθήκη 2,5 ml αυτού του διαλύματος, έτσι ώστε η τελική αναλογία κατά βάρος με τη χιτοζάνη να είναι 1:4, προέκυψαν τα καλύτερα ικριώματα με συνεκτική δομή και ομοιομορφία. Με προσθήκη 5 ml διαλύματος (αναλογία κατά βάρος 1:2 με τη χιτοζάνη) προέκυψαν συνεκτικά ικριώματα τα οποία θρυμματίζονταν σχετικά εύκολα, ενώ τα ικριώματα με 1 ml διαλύματος διαλύονταν κατά το ξεκαλούπωμά τους μετά τη λυοφιλίωση. (Εικόνα 3.2)

## «Ανάπτυξη τρισδιάστατων ικριωμάτων βιομορίων-υδροξυαπατίτη»

Παρασκευάστηκαν επίσης διαλύματα 10 ml PEO/ CH<sub>3</sub>COOH με προσθήκες σκόνης πολυμερούς 0,14 g, 0,4 g και 0,55 g από το καθένα από τα οποία λήφθηκαν 3-5 ml και προστέθηκαν σε υλικό φυγοκεντρημένου αιωρήματος για την παραγωγή ικριωμάτων ομοίως με την αρχική διαδικασία. Τα υλικά που προέκυψαν δεν παρουσίασαν καλύτερη συμπεριφορά σε σχέση με την προηγούμενη διαδικασία με την αναλογία PEO/Chit=1:4. Για προσθήκες 0,4 g και 0,55 g PEO τα ικρίωματα ήταν πολύ εύπλαστα χωρίς όμως να θρυμματίζονται, ενώ για προσθήκη PEO 0,14 g τα ικρίωματα ήταν πολύ εύθρυπτα.

Η προσθήκη 2,5 ml διαλύματος PEO με 0,5 M CH<sub>3</sub>COOH (PEO/Chit=1:4) θεωρείται ότι έδωσε τα καλύτερα αποτελέσματα ικριωμάτων με τη μέθοδο ανάμιξης αιωρήματος Har-Chit και διαλύματος PEO.

Στην συνέχεια δοκιμάστηκε η προσθήκη 3 ml, 4 ml και 5 ml του διαλύματος PEO 0,5 M σε ξηρή σκόνη Har-Chit και χειροκίνητη ανάμιξή τους. Το υλικό που προέκυψε είχε τη μορφή κολλώδους και πολύ ιξώδους πάστας. Τα ικρίωματα που προέκυψαν μετά τη λυοφιλίωση υλικού με προσθήκη 4ml διαλύματος PEO 0,5 M (κατά βάρος αναλογία PEO/Chit=1:2,5) είχαν την πιο έντονη σκληρότητα και αντοχή. Τα συγκεκριμένα δείγματα στάλθηκαν για βιοκαλλιέργεια σε εργαστήριο της Οδοντιατρικής Σχολής, και παρατηρήθηκε ότι η επιφάνειά τους είναι δυσμενής για την ανάπτυξη κυττάρων λόγω έντονης οξύτητας που παρουσιάζουν.

Θεωρώντας ότι ο παράγοντας της οξύτητας οφείλεται στην προσθήκη του CH<sub>3</sub>COOH για την παρασκευή του διαλύματος του PEO, παρασκευάστηκαν αντίστοιχα διαλύματα πολυμερούς χωρίς προσθήκη οξέος. Τα ικρίωματα που παρασκευάστηκαν με ανάμιξη διαλύματος PEO χωρίς CH<sub>3</sub>COOH με υλικό αιωρήματος Har-Chit καθώς και με ξηρή σκόνη Har-Chit απορρίφθηκαν, καθώς ήταν υπερβολικά εύθρυπτα και με ελάχιστη έως μηδενική συνοχή και συνεπώς δεν πραγματοποιήθηκε καμία περαιτέρω μελέτη τους.



**Εικόνα 3.2** Φωτογραφία εύθρυπτων και μη συνεκτικών δειγμάτων των οποίων οι μέθοδοι και οι παράμετροι παραγωγής απορρίφθηκαν.

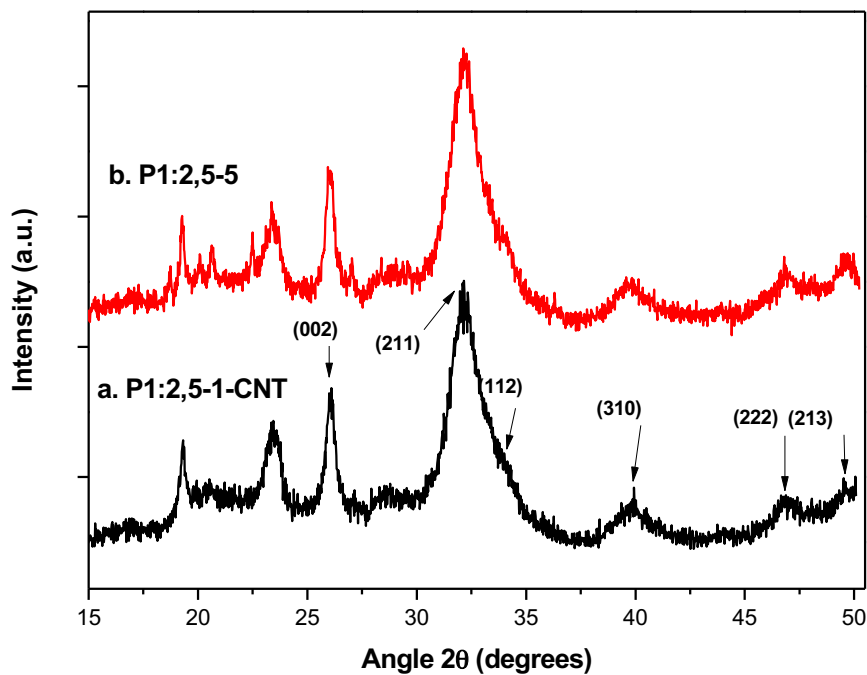
Όπως επιβεβαιώθηκε και βιβλιογραφικά, το όξινο περιβάλλον του διαλύματος, εξαιτίας της παρουσίας του οξικού οξέος, επιδρά σημαντικά στον πολυμερισμό του PEO κατά την 24ωρη παραμονή του υπό ανάδευση, επιδρώντας πολύ έντονα στην τελική συμπεριφορά και συνεκτικότητα του υλικού του ικριώματος.

Τέλος για τον παραπάνω λόγο παρασκευάστηκαν ικριώματα με ανάμιξη ξηρής σκόνης Har-Chit και 4 ml διαλύματος PEO με περιεκτικότητες 0,1 M, 0,2 M, και 0,7 M σε  $\text{CH}_3\text{COOH}$ , για τη μελέτη και σύγκριση του βαθμού πολυμερισμού του PEO στη δομή των τελικών ικριωμάτων.

### 3.3 Αποτελέσματα Περίθλασης Ακτίνων X

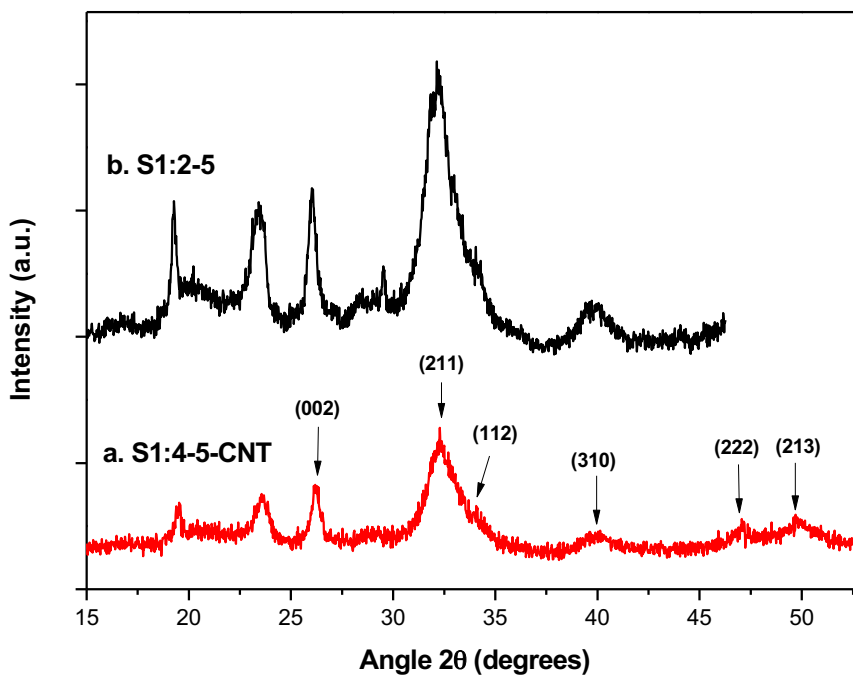
Τα φάσματα περιθλασιμετρίας ακτίνων X που ελήφθησαν από τα ικριώματα παρουσιάζονται στα **Σχήματα 3.1 και 3.2**. Παρατηρώντας αναλυτικά τα παρακάτω φάσματα, είναι εμφανείς οι χαρακτηριστικές κορυφές του εξαγωνικού υδροξυαπατίτη, οι οποίες είναι όμοιες με αυτές του υδροξυαπατίτη που απαντάται στον φυσικό οστικό ιστό. Συγκεκριμένα οι κορυφές στις γωνίες  $2\theta = 26^\circ, 32^\circ, 33,8^\circ, 39,8^\circ, 46,8^\circ$  και  $49,5^\circ$  αντιστοιχούν στα κρυσταλλικά επίπεδα (002), (211), (112), (310), (222) και (213) του φυσικού εξαγωνικού υδροξυαπατίτη. Επίσης παρατηρούνται οι χαρακτηριστικές κορυφές του PEO στις γωνίες  $2\theta = 19,3^\circ$  και  $23,4^\circ$ .

Τα δείγματα τα οποία επιλέχθηκαν ενδεικτικά να εξεταστούν με τη μέθοδο ανάλυσης περίθλασης ακτίνων X, ήταν ικριώματα τα οποία παρήχθησαν με τη μέθοδο ανάμειξης σκόνης Har-Chit με διαφορετικές τιμές συγκέντρωσης οξικού οξέος στο διάλυμα του πολυμερούς και με προσθήκη και μη MWCNTs (Σχήμα 3.1), καθώς και ικριώματα τα οποία παρήχθησαν με τη μέθοδο ανάμειξης αιωρήματος Har-Chit με διαφορετικές τιμές λόγου PEO/Chit και με προσθήκη και μη MWCNTs (Σχήμα 3.2).



**Σχήμα 3.1** Φάσματα XRD για δείγματα **a.** με ανάμειξη σκόνης Har-Chit με 4 ml διαλύματος PEO με 0,1M CH<sub>3</sub>COOH (PEO/Chit=1:2,5) και 1% w/w MWCNTs και **b.** με ανάμειξη σκόνης Har-Chit με 4 ml διαλύματος PEO με 0,5M CH<sub>3</sub>COOH (PEO/Chit=1:2,5)





**Σχήμα 3.2** Φάσματα XRD για δείγματα **a.** με ανάμιξη αιωρήματος Hap-Chit με 2,5 ml διαλύματος PEO με 0,5M  $\text{CH}_3\text{COOH}$  (PEO/Chit=1:4) και 1% w/w MWCNTs και **b.** με ανάμιξη αιωρήματος Hap-Chit με 5 ml διαλύματος PEO με 0,5M  $\text{CH}_3\text{COOH}$  (PEO/Chit=1:2)

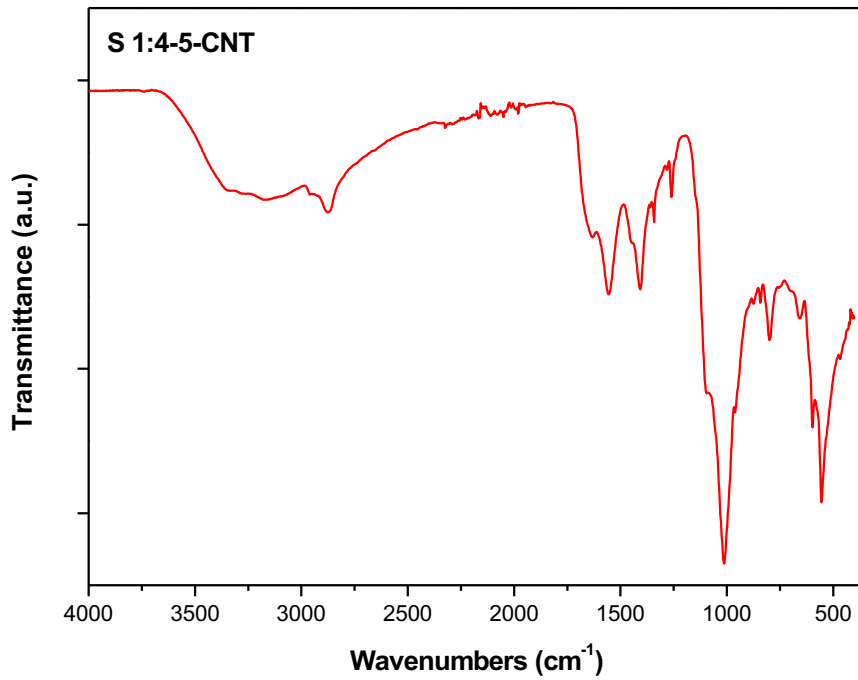
Στο **Σχήμα 3.2** παρατηρείται επίσης ότι για μεγαλύτερη προσθήκη PEO στο υλικό, προκύπτουν εντονότερες κορυφές ανάλυσης τόσο του ίδιου του πολυμερούς όσο και του υδροξυαπατίτη. Η παρατήρηση αυτή πιθανόν να παρέχει μια ένδειξη ότι η προσθήκη του PEO ίσως επιδρά στη διαδικασία κρυστάλλωσης του υδροξυαπατίτη, επιταχύνοντας τη διαδικασία μεγέθυνσης των κρυστάλλων, αν και αυτό χρήζει λεπτομερέστερης ανάλυσης και περαιτέρω μελέτης.

Η κύρια κορυφή του γραφίτη (002) των MWCNTs ( $2\theta=26.6^\circ$ ) δεν παρατηρήθηκε στα φάσματα περίθλασης των ικριωμάτων. Αυτό συμβαίνει κυρίως επειδή η μικρή ποσότητα του CNT που χρησιμοποιείται για την παρασκευή των ικριωμάτων ήταν δύσκολο να ανιχνευθεί εντός του ορίου ευαισθησίας του οργάνου, καθώς και γιατί η κύρια κορυφή του πέφτει πολύ κοντά με την έντονη κορυφή του υδροξυαπατίτη στις  $26^\circ$ .

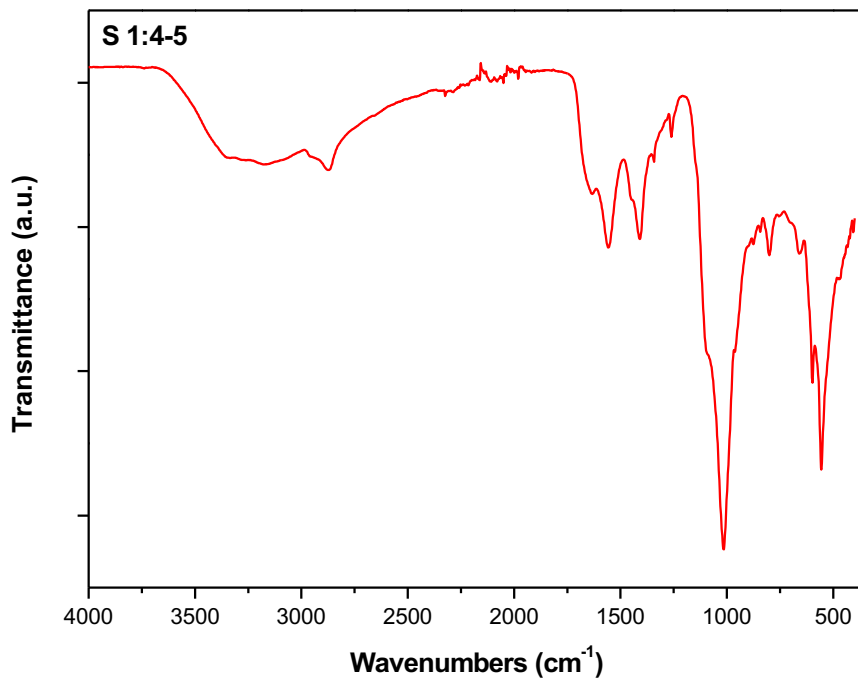
Η σύγκριση των παραπάνω δειγμάτων έγινε σε αντιπαραβολή με οστικό και οδοντικό υδροξυαπατίτη της βάσης δεδομένων Crystal Diffraction Open Database 2011 (COD 2011).

### 3.4 Αποτελέσματα Υπέρυθρης Φασματοσκοπίας με Μετασχηματισμό Fourier

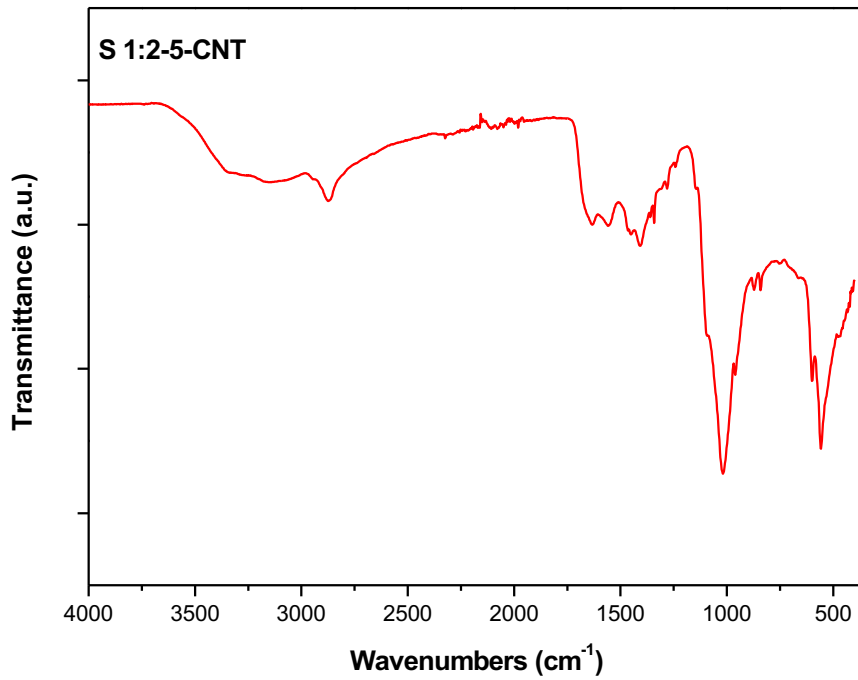
Όλα τα παρακάτω φάσματα **Σχήμα 3.3 - Σχήμα 3.9** έδωσαν τις ίδιες κορυφές στα φάσματα αναλύσεις FT-IR με ελάχιστες αποκλίσεις, οι οποίες δεν συνεπάγονται διαφορετικό είδος δονήσεων. Συγκεκριμένα, οι κορυφές στα 468, 555 και 598  $\text{cm}^{-1}$  αντιστοιχούν στις δονήσεις κάμψεως των δεσμών O-P-O των φωσφορικών ομάδων, ενώ η κορυφή στα 1017  $\text{cm}^{-1}$  αποδίδεται στις  $\nu_3$  αντι-συμμετρικές εκτατικές δονήσεις του δεσμού P-O. Οι κορυφές των  $\nu_1$  συμμετρικών εκτατικών δονήσεων των φωσφορικών ομάδων ( $\text{PO}_4$ ) δίνουν κορυφή στα 961  $\text{cm}^{-1}$ , ενώ οι αντισυμμετρικές εκτατικές δονήσεις των ίδιων ομάδων δίνουν κορυφή στα 1095  $\text{cm}^{-1}$  στα φάσματα των **Σχημάτων 3.3 και 3.6**. Οι κορυφές στα 1409 και 1451  $\text{cm}^{-1}$  αποδίδονται στις  $\nu_3$  εκτατικές δονήσεις των ανθρακικών ομάδων ( $\text{CO}_3$ ), ενώ η κορυφή στα 874  $\text{cm}^{-1}$  στις  $\nu_2$  εκτατικές δονήσεις τους. Οι κορυφές στα 1634 και 2875  $\text{cm}^{-1}$  αντιστοιχούν στις χαρακτηριστικές κορυφές των αλληλεπιδράσεων μεταξύ των μορίων της χιτοζάνης, ενώ οι κορυφές στα 660, 753 και 1560  $\text{cm}^{-1}$  αντιστοιχούν στην L-αργινίνη. Για το Poly(ethylene oxide) οι κορυφές που παρατηρούνται είναι των εκτατικών δονήσεων C-H στα 2875  $\text{cm}^{-1}$ , των δονήσεων συστροφής  $\text{CH}_2$  στα 1280  $\text{cm}^{-1}$ , των δονήσεων κίνησης  $\text{CH}_2$  εκτός επιπέδου στα 1340 και 1360  $\text{cm}^{-1}$ , και των δονήσεων κίνησης  $\text{CH}_2$  εντός επιπέδου στα 841  $\text{cm}^{-1}$ , ενώ οι κύριες κορυφές εκτατικών δονήσεων C-O-C του PEO στα 1095 και 1145  $\text{cm}^{-1}$  αποτυπώνονται σαν καμπύλες στην πλευρά της εντονότερης κορυφής στα 1017  $\text{cm}^{-1}$  των φωσφορικών ομάδων που αναφέρθηκε προηγουμένως. Τέλος, η μόνη κορυφή που βάσει βιβλιογραφίας μπορεί να αποδοθεί στους δεσμούς των νανοσωλήνων είναι αυτή των 1630  $\text{cm}^{-1}$  (κοινή και για τη χιτοζάνη), η οποία αντιστοιχεί στην εκτατική δόνηση του δεσμού C-C. [14][15][16][26][29][32][33][34][41][42][43]



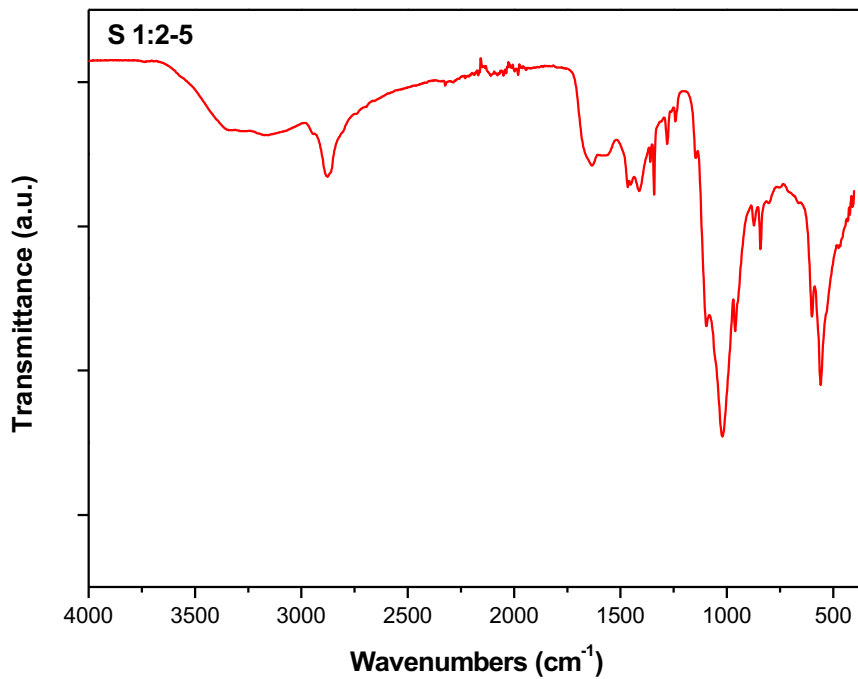
**Σχήμα 3.3** Φάσμα FT-IR για δείγμα από ανάμιξη αιωρήματος Hap-Chit με 2,5 ml διαλύματος PEO με 0,5M CH<sub>3</sub>COOH (PEO/Chit=1:4) και 1% w/w MWCNTs



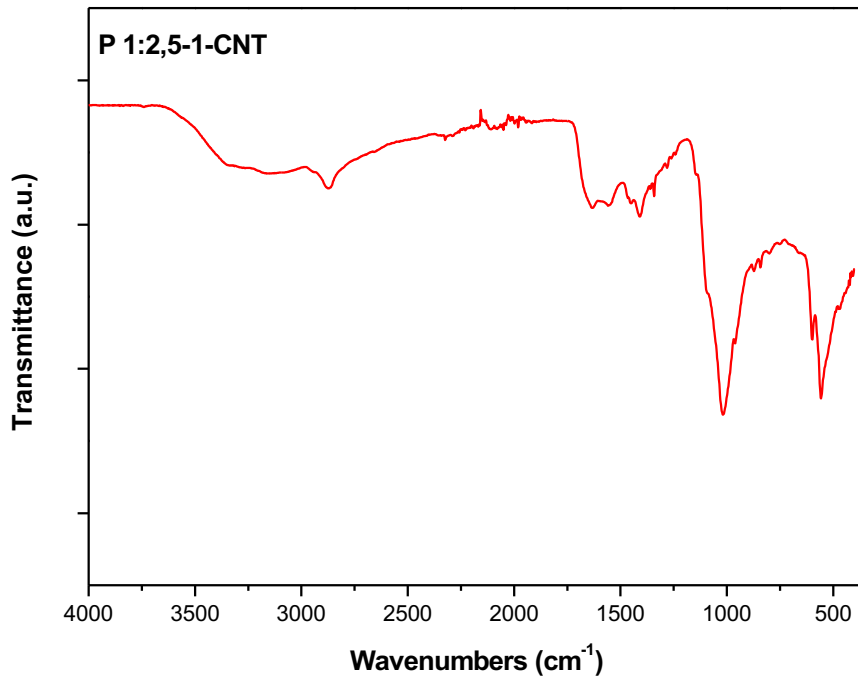
**Σχήμα 3.4** Φάσμα FT-IR για δείγμα από ανάμιξη αιωρήματος Hap-Chit με 2,5 ml διαλύματος PEO με 0,5M CH<sub>3</sub>COOH (PEO/Chit=1:4)



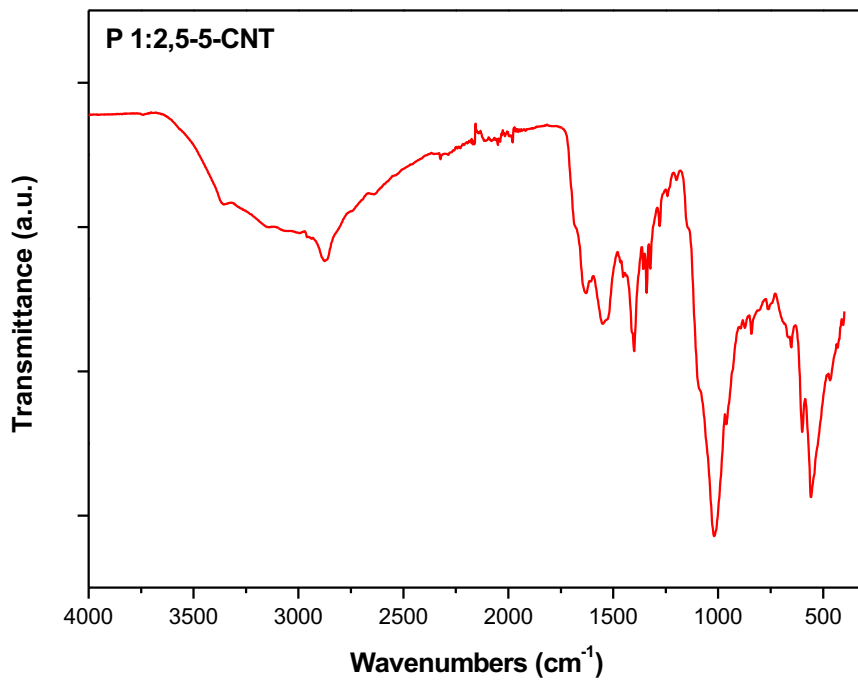
Σχήμα 3.5 Φάσμα FT-IR για δείγμα από ανάμιξη αιωρήματος Hap-Chit με 5 ml διαλύματος PEO με 0,5M CH<sub>3</sub>COOH (PEO/Chit=1:2) και 1% w/w MWCNTs



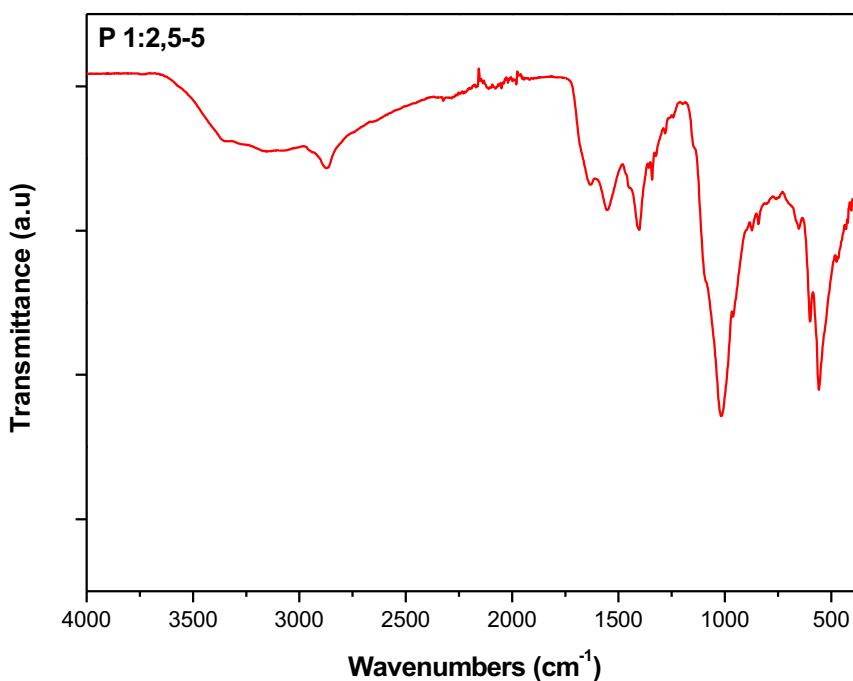
Σχήμα 3.6 Φάσμα FT-IR για δείγμα από ανάμιξη αιωρήματος Hap-Chit με 5 ml διαλύματος PEO με 0,5M CH<sub>3</sub>COOH (PEO/Chit=1:2)



Σχήμα 3.7 Φάσμα FT-IR για δείγμα από ανάμιξη σκόνης Har-Chit με 4 ml διαλύματος PEO με 0,1M CH<sub>3</sub>COOH (PEO/Chit=1:2,5) και 1% w/w MWCNTs



Σχήμα 3.8 Φάσμα FT-IR για δείγμα από ανάμιξη σκόνης Har-Chit με 4 ml διαλύματος PEO με 0,5M CH<sub>3</sub>COOH (PEO/Chit=1:2,5) και 1% w/w MWCNTs



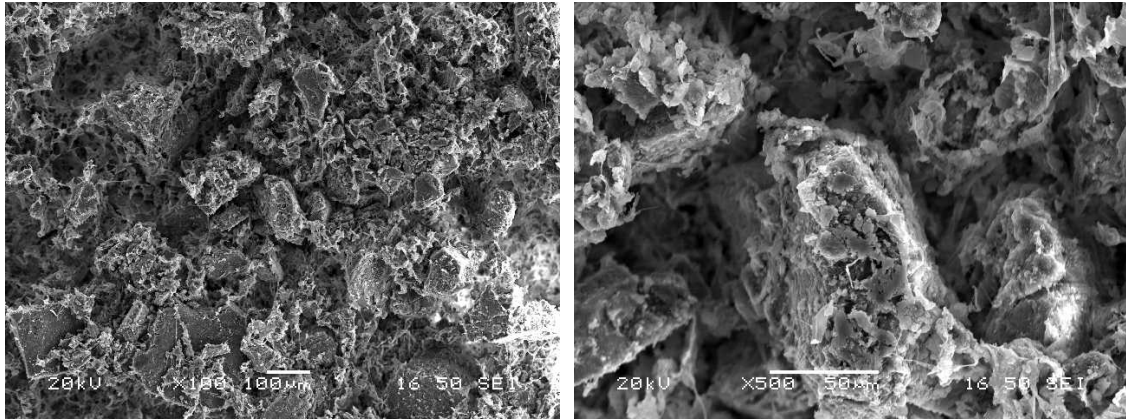
**Σχήμα 3.9** Φάσμα FT-IR για δείγμα από ανάμιξη σκόνης Har-Chit με 4 ml διαλύματος PEO με 0,5M CH<sub>3</sub>COOH (PEO/Chit=1:2,5)

### 3.5 Αποτελέσματα Ηλεκτρονικής Μικροσκοπίας Σάρωσης

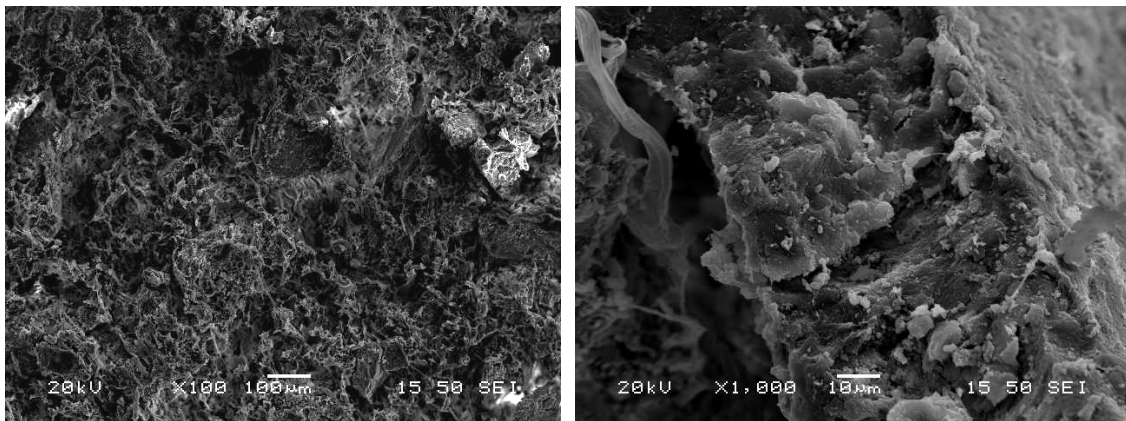
Από τις **Εικόνες 3.3-3.12** του SEM προκύπτει ότι τα ικρίωματα που παρασκευάστηκαν με τη μέθοδο ανάμιξης αιωρήματος Har-Chit, αλλά και με τη μέθοδο ανάμιξης σκόνης Har-Chit, με διάλυμα του πολυμερούς PEO και οξικού οξέος, παρουσιάζουν αρκετά πυκνή δομή με μικρο-πορώδες της τάξης των 10 μm και ελάχιστο μακρο-πορώδες της τάξης των 100 μm. Η πυκνή δομή τους παραπέμπει στη δομή των φυσικών συμπαγών οστικών ιστών.

Σε αυτό το σημείο πρέπει να επισημανθεί ότι στην περίπτωση των ικριωμάτων που προέκυψαν από ανάμιξη σκόνης Har-Chit με το πολυμερές, για συγκέντρωση οξικού οξέος  $\geq 0,5M$ , στις μικροδομές παρατηρήθηκαν λεπτές πολυμερικές ίνες, οι οποίες διακλαδίζονται μεταξύ των κόκκων των υλικών, πιθανότατα εξαιτίας του εντονότερου πολυμερισμού λόγω των όξινων συνθηκών του διαλύματος.

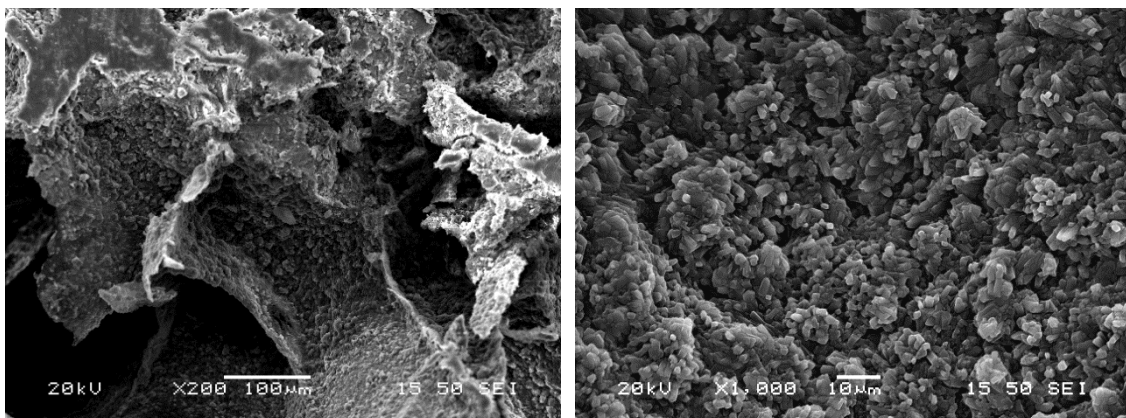
«Ανάπτυξη τρισδιάστατων ικριωμάτων βιομορίων-υδροξυαπατίτη»



**Εικόνα 3.3** Εικόνες SEM για δείγμα από ανάμιξη σκόνης Hap-Chit με 4 ml διαλύματος PEO με 0,1M CH<sub>3</sub>COOH (PEO/Chit=1:2,5) και 1% w/w MWCNTs (P1:2,5-1-CNT)

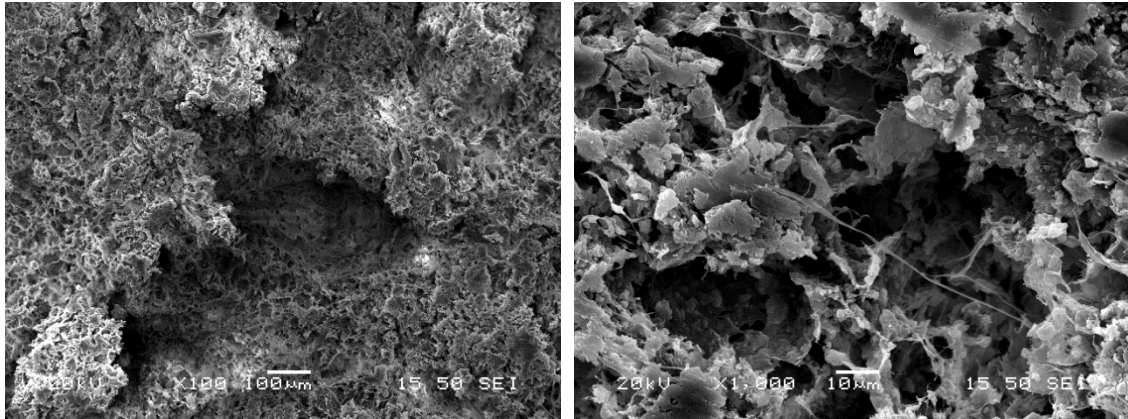


**Εικόνα 3.4** Εικόνες SEM για δείγμα από ανάμιξη σκόνης Hap-Chit με 4 ml διαλύματος PEO με 0,2M CH<sub>3</sub>COOH (PEO/Chit=1:2,5) και 1% w/w MWCNTs (P1:2,5-2-CNT)

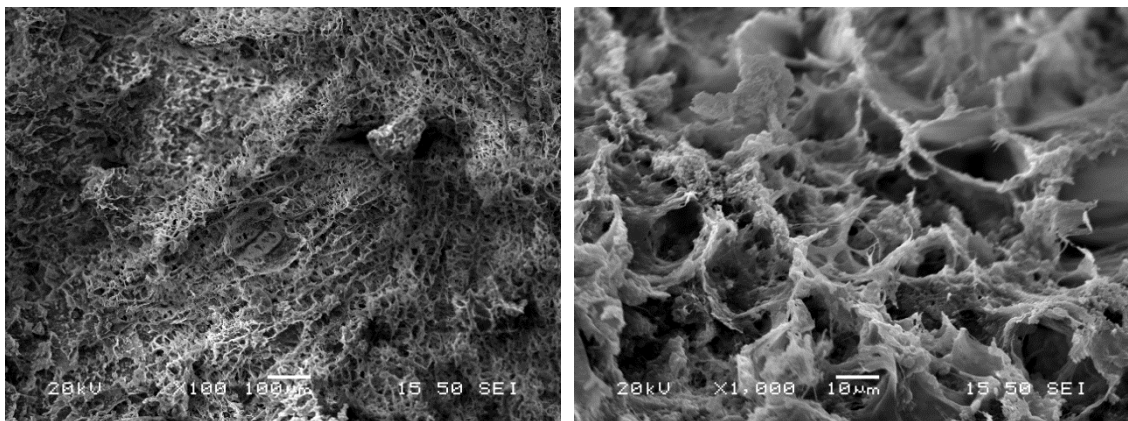


**Εικόνα 3.5** Εικόνες SEM για δείγμα από ανάμιξη σκόνης Hap-Chit με 4 ml διαλύματος PEO με 0,5M CH<sub>3</sub>COOH (PEO/Chit=1:2,5) (P1:2,5-5)

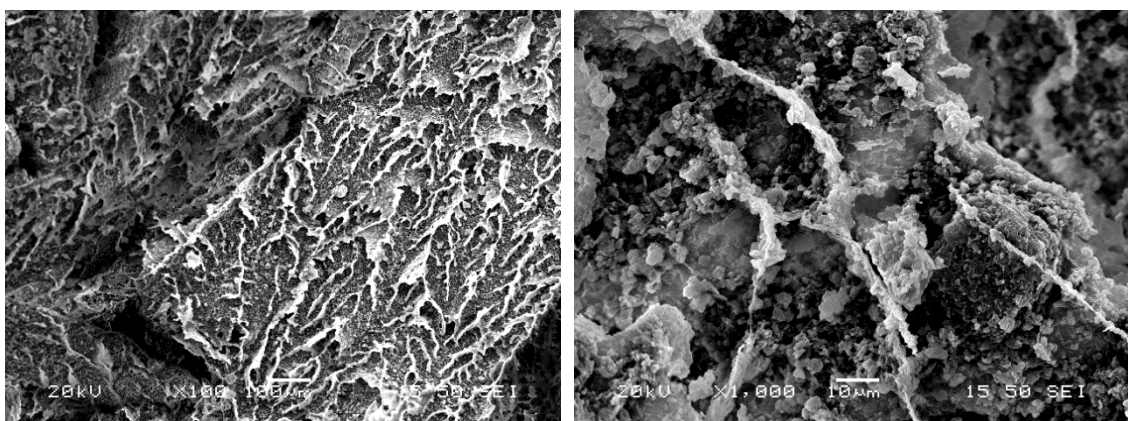
«Ανάπτυξη τρισδιάστατων ικριωμάτων βιομορίων-υδροξυαπατίτη»



**Εικόνα 3.6** Εικόνες SEM για δείγμα από ανάμιξη σκόνης Hap-Chit με 4 ml διαλύματος PEO με 0,5M CH<sub>3</sub>COOH (PEO/Chit=1:2,5) και 1% w/w MWCNTs (P1:2,5-5-CNT)

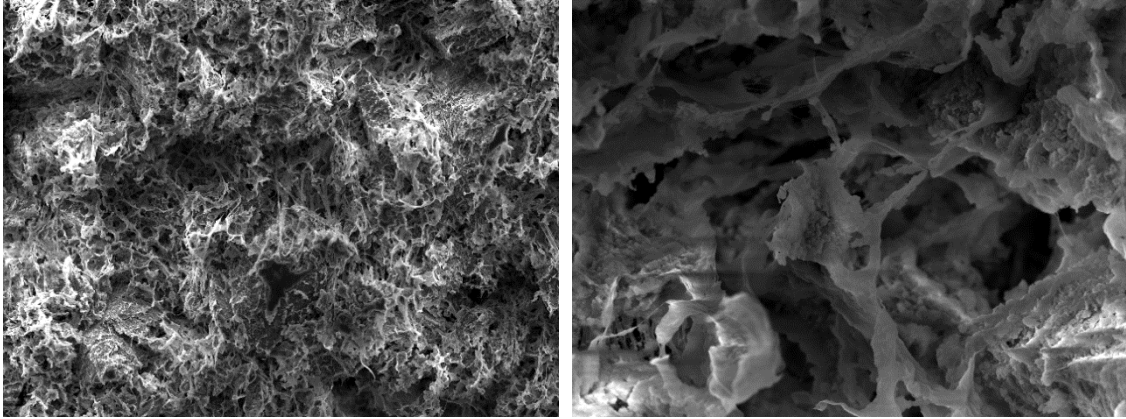


**Εικόνα 3.7** Εικόνες SEM για δείγμα από ανάμιξη σκόνης Hap-Chit με 4 ml διαλύματος PEO με 0,7M CH<sub>3</sub>COOH (PEO/Chit=1:2,5) (P1:2,5-7)

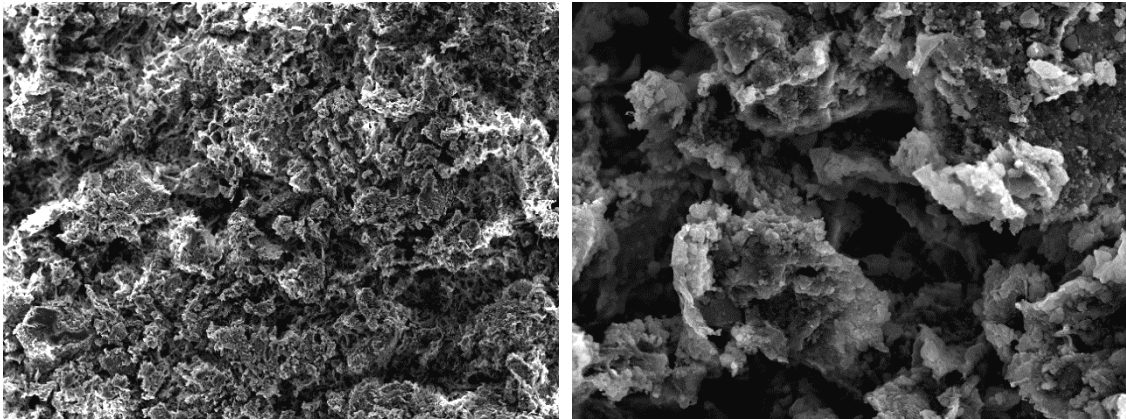


**Εικόνα 3.8** Εικόνες SEM για δείγμα από ανάμιξη σκόνης Hap-Chit με 4 ml διαλύματος PEO με 0,7M CH<sub>3</sub>COOH (PEO/Chit=1:2,5) και 1% w/w MWCNTs (P1:2,5-7-CNT)

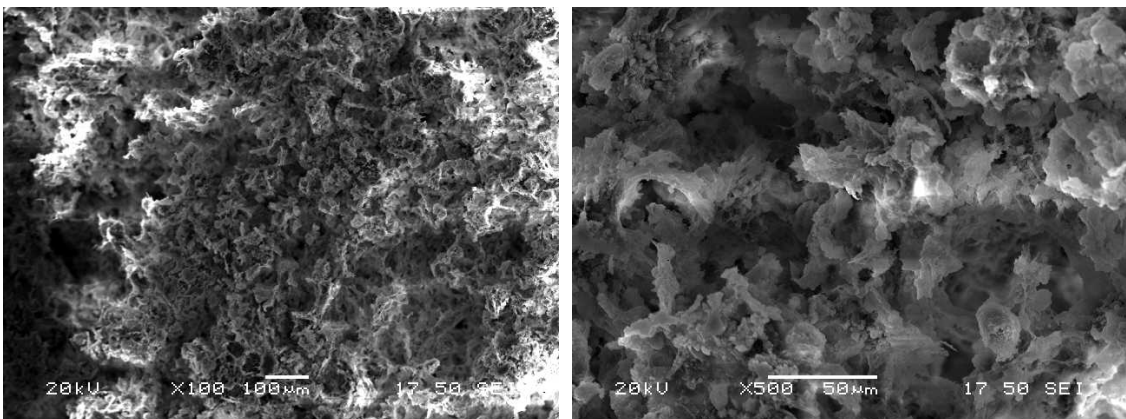




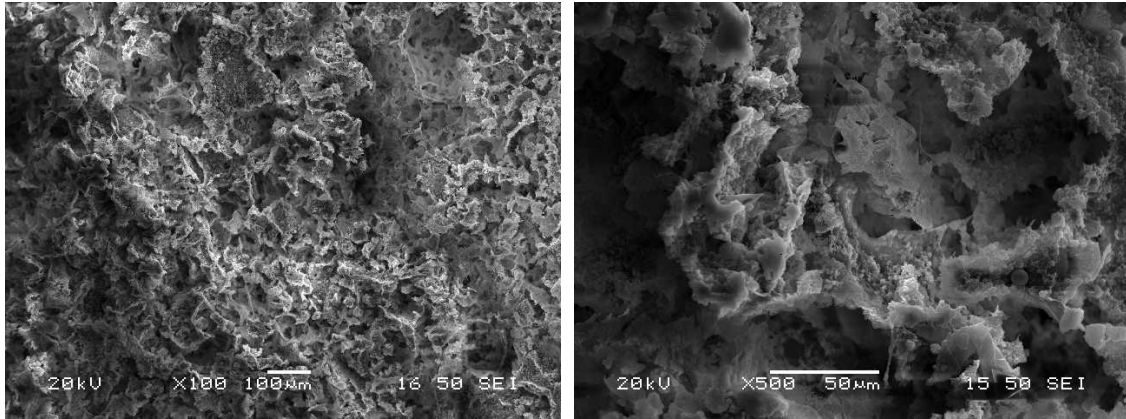
**Εικόνα 3.9** Εικόνες SEM σε μεγέθυνση x100(αριστερά) και x1000(δεξιά) για δείγμα από ανάμιξη αιωρήματος Hap-Chit με 5 ml διαλύματος PEO με 0,5M CH<sub>3</sub>COOH (PEO/Chit=1:2) (S1:2-5)



**Εικόνα 3.10** Εικόνες SEM σε μεγέθυνση x100(αριστερά) και x1000(δεξιά) για δείγμα από ανάμιξη αιωρήματος Hap-Chit με 5 ml διαλύματος PEO με 0,5M CH<sub>3</sub>COOH (PEO/Chit=1:2) και 1% w/w MWCNTs (S1:2-5-CNT)



**Εικόνα 3.11** Εικόνες SEM για δείγμα από ανάμιξη αιωρήματος Hap-Chit με 2,5 ml διαλύματος PEO με 0,5M CH<sub>3</sub>COOH (PEO/Chit=1:4) (S1:4-5)



**Εικόνα 3.12** Εικόνες SEM για δείγμα από ανάμιξη αιωρήματος Har-Chit με 2,5 ml διαλύματος PEO με 0,5M CH<sub>3</sub>COOH (PEO/Chit=1:4) και 1% w/w MWCNTs (S1:4-5-CNT)

### 3.6 Αξιολόγηση Μηχανικής Συμπεριφοράς των Ικριωμάτων

Τα ικριώματα με τη μέθοδο ανάμιξης αιωρήματος Har-Chit παρουσίαζαν πολύ χαμηλές μηχανικές ιδιότητες και έντονη ψαθυρότητα. Σε αντίθεση όμως με τα ικριώματα από την ίδια μέθοδο, που απορρίφθηκαν γιατί θρυμματίζονταν πάρα πολύ εύκολα, τα ικριώματα που μελετήθηκαν παραπάνω διατηρούσαν τη δομή τους μετά τη θραύση χωρίς να θρυμματίζονται. (Εικόνα 3.11)

Τα ικριώματα με τη μέθοδο ανάμιξης σκόνης Har-Chit για τιμές συγκέντρωσης οξικού οξέος στο διάλυμα του πολυμερούς  $\leq 0,2M$  παρουσίαζαν χαμηλή μηχανική συμπεριφορά, αλλά συνεκτική δομή χωρίς να θρυμματίζονται αλλά συμπιέζονταν πολύ εύκολα. Τα ίδια ικριώματα που προέκυψαν με την ανάμιξη με διάλυμα PEO με συγκέντρωση οξικού οξέος  $\geq 0,5M$  παρουσίαζαν έντονη σκληρότητα και αντοχή και πολύ συνεκτική και πυκνή δομή. (Εικόνα 3.11)

Οι δοκιμές αντοχής όλων των ικριωμάτων που παρήχθησαν κατά τη διάρκεια της διπλωματικής εργασίας έγιναν καθαρά με πίεση του χεριού. Τα ικριώματα από την ανάμιξη αιωρήματος Har-Chit με το διάλυμα του πολυμερούς, αν και στις πιο επιτυχημένες συνθέσεις που δοκιμάστηκαν και παρατηρήθηκαν παραπάνω διατηρούσαν το σχήμα τους χωρίς να θρυμματίζονται, με πολύ ελαφριά πίεση του χεριού συμπιέζονταν (PEO/Chit=1:2) ή έσπαγαν (PEO/Chit=1:4). Αντίθετα τα ικριώματα με όξινο διάλυμα PEO (0,5M και 0,7M) και ανάμιξη με σκόνη Har-Chit χρειάζονταν πολύ έντονη πίεση χεριού για να θραυτούν χωρίς να θρυμματίζονται.



**Εικόνα 3.13** Φωτογραφία των τελικών δειγμάτων τρισδιάστατων ικριωμάτων που αναπτύχθηκαν και μελετήθηκαν στην παρούσα έρευνα με προσθήκη (μαύρα) και χωρίς προσθήκη νανοσωλήνων άνθρακα (λευκά). Τα 4 στη πάνω σειρά πρέκυσαν με τη μέθοδο ανάμιξης κόνεως, ενώ τα 3 στην κάτω σειρά με τη μέθοδο ανάμιξης αιωρήματος.

### 3.7 Αποτελέσματα Αντοχής Ικριωμάτων σε Υδατικό Περιβάλλον

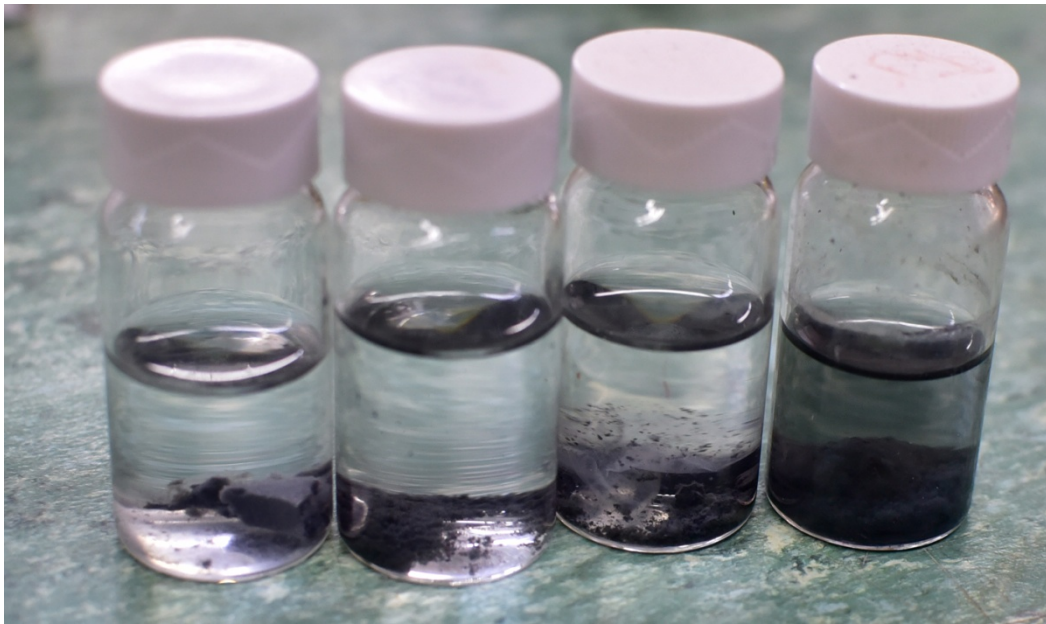
Τα ικριώματα που παρασκευάστηκαν με τη μέθοδο ανάμιξης αιωρήματος Har-Chit, παρουσίαζαν ελάχιστη έως μηδενική αντοχή στο νερό. Συγκεκριμένα στα καλύτερα ικριώματα της συγκεκριμένης μεθόδου με αναλογία PEO/Chit=1:4 και με συγκέντρωση οξικού οξέος 0,5 M στο διάλυμα του πολυμερούς, μετά από 2-3 μέρες παραμονής τους στο νερό παρατηρούνταν απώλειες τμημάτων υλικού. Τα ικριώματα με την ίδια μέθοδο που περιείχαν μεγαλύτερη ποσότητα πολυμερούς PEO και ήταν πιο εύπλαστα έχαναν τη συνεκτικότητά του σε λιγότερο από μία μέρα, ενώ όσα περιείχαν μικρότερη ποσότητα PEO και ήδη μειωμένη συνεκτικότητα, διαλύονταν αμέσως στο νερό χρωματίζοντας το. (Εικόνα 3.12)

Τα ικριώματα που παρασκευάστηκαν με τη μέθοδο ανάμιξης σκόνης Har-Chit, παρουσίαζαν μειωμένη έως εξαιρετική αντοχή στο νερό. Τα ικριώματα με αναλογία PEO/Chit=1:4 και με συγκέντρωση οξικού οξέος 0,5 M στο διάλυμα του πολυμερούς που παρουσίαζαν και την πιο συνεκτική και σκληρή δομή είχαν και την βέλτιστη

### «Ανάπτυξη τρισδιάστατων ικριωμάτων βιομορίων-υδροξυαπατίτη»

αντοχή σε υδατικό περιβάλλον. Συγκεκριμένα με την παραμονή τους σε απιονισμένο νερό αλλά και σε διάλυμα αιθανόλης, δεν παρατηρήθηκε καμία αλλοίωση της δομής τους ούτε διάλυσή τους σε διάστημα 1-2 μηνών. Όμοια συμπεριφορά εμφάνισαν και τα δείγματα τα οποία παρασκευάστηκαν με συγκέντρωση οξικού οξέος 0,7 M στο διάλυμα του πολυμερούς. Αντίθετα τα ικρίωματα τα που παρασκευάστηκαν με την ίδια μέθοδο και αναλογία PEO/Chit, αλλά με μικρότερη συγκέντρωση οξικού οξέος (0,1 και 0,2 M), μετά από 3-4 μέρες παραμονής τους στο νερό παρατηρούνταν αλλοιώσεις και απώλειες στη δομή τους χωρίς όμως να διαλύονται στο νερό. (Εικόνα 3.12)

Αξίζει επίσης να σημειωθεί ότι η παρουσία ή μη σωματιδιακής ενίσχυσης με νανοσωλήνες άνθρακα δεν επέφερε καμία απολύτως διαφορά στην αντοχή των ικριωμάτων σε υδατικά μέσα.



**Εικόνα 3.14** Φωτογραφία των ικριωμάτων τα οποία δεν εμφάνιζαν αντοχή σε υγρό περιβάλλον. Το πρώτο από αριστερά φυαλίδιο περιέχει ικρίωμα με ανάμιξης σκόνης Har-Chit και διαλύματος PEO με συγκέντρωση οξικού οξέος 0,1M, ενώ τα υπόλοιπα περιέχουν διαλυμένα ικρίωματα με τη μέθοδο ανάμιξης αιωρήματος.

## 4 ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

Στη συγκεκριμένη διπλωματική εργασία μελετήθηκαν οι τρόποι παρασκευής ικριωμάτων υδροξυαπατίτη, απουσία μετάλλου, με βιοσυμβατές, βιοαποικοδομήσιμες και οστεογενετικές ιδιότητες. Στόχος ήταν ο προσδιορισμός των βέλτιστων παραμέτρων προετοιμασίας, αναλογιών και τρόπου ενσωμάτωσης οργανικών προσθέτων για την βελτίωση και ενίσχυση των βιολογικών και μηχανικών ιδιοτήτων των ικριωμάτων.

Η βιομιμητική σύνθεση του υδροξυαπατίτη έγινε με τη μέθοδο της καταβύθισης πρόδρομων αντιδραστηρίων: διαλύματος φωσφορικού οξέος και αιωρήματος υδροξειδίου το ασβεστίου, παρουσία του αμινοξέος L-αργινίνη, με μοριακή αναλογία ασβεστίου προς φώσφορο 10/6 και αναλογία ασβεστίου προς L-αργινίνη 1:2 προκειμένου να σχηματιστούν κρύσταλλοι υδροξυαπατίτη με δομή και σύνθεση παρόμοια με τους κρυστάλλους που απαντώνται στον υδροξυαπατίτη του φυσικού οστού. Η σύνθεση έγινε παρουσία του πολυμερούς χιτοζάνη σε αναλογία υδροξυαπατίτη προς χιτοζάνη 70/30 για τη δημιουργία πολυμερικής μήτρας που θα βελτιώσει την αντοχή και τη βιολογική συμπεριφορά του υλικού. Στη συνέχεια δοκιμάστηκαν δύο εναλλακτικές μέθοδοι προετοιμασίας του τελικού υλικού των ικριωμάτων:

- Με ανάμιξη αιωρήματος Har-Chit με διάλυμα του πολυμερούς PEO
- Με ανάμιξη ξηρής σκόνης Har-Chit με διάλυμα του πολυμερούς PEO

Στόχος των παραπάνω διαδικασιών ήταν η παρασκευή σύνθετου υλικού αποτελούμενου από μήτρα 2 πολυμερικών φάσεων και τη φάση του υδροξυαπατίτη. Επίσης για την επιπλέον ενίσχυση των μηχανικών ιδιοτήτων των ικριωμάτων πραγματοποιήθηκε διασπορά ξηρής σκόνης πολυστρωματικών νανοσωλήνων άνθρακα εντός των πολυμερικών φάσεων του υλικού των ικριωμάτων. Τα τελικά ικρίωματα προέκυψαν μετά από διαδικασία λυοφιλίωσης με σκοπό τη δημιουργία δομής με εκτεταμένο εσωτερικό πορώδες δίκτυο.

Η μελέτη της προσθήκης των νανοσωλήνων έδειξε ότι τα καλύτερα αποτελέσματα προκύπτουν για ποσοστό προσθήκης 1% w/w επί των τελικών ικριωμάτων. Το αιώρημα Har-Chit μετά την προσθήκη των νανοσωλήνων παραμένει υπό μαγνητική ανάδευση για 1 ώρα. Με αυτόν τον τρόπο, οι νανοσωλήνες παγιδεύονται εντός των

πολυμερικών αλυσίδων και δεν απομακρύνονται από το υλικό με φυγοκέντρηση. Η σύγκριση των τελικών ικριωμάτων με και χωρίς προσθήκη νανοσωλήνων κατέδειξε ότι η παρουσία των νανοσωλήνων αυξάνει τη συνεκτικότητα και την ελαστικότητα των ικριωμάτων, χωρίς να έχει επίπτωση στη σκληρότητα και στην αντοχή τους. Μετά το τέλος της διαδικασίας διασποράς τους στο αιώρημα Har-Chit παρατηρήθηκαν ελάχιστα συσσωματώματα νανοσωλήνων το μέγεθος των οποίων δεν μειωνόταν με περαιτέρω ανάδευση. Οι συνθήκες πλήρους και ομοιόμορφης διασποράς τους στο υλικό των ικριωμάτων χρήζουν περαιτέρω μελέτης. Επίσης η παρατήρησή τους στο ηλεκτρονικό μικροσκόπιο σάρωσης ήταν αδύνατη λόγω του μεγέθους τους και χρήζει επιπλέον μελέτης με ηλεκτρονικό μικροσκόπιο σάρωσης υψηλής διακριτικής ικανότητας (FESEM) ή ηλεκτρονική μικροσκοπία διερχόμενης δέσμης για προσδιορισμό της κατανομής και της δομής τους εντός του υλικού των ικριωμάτων.

Όσο αφορά στην προσθήκη του πολυμερούς PEO στο υλικό των ικριωμάτων, η μελέτη κατέληξε στο ότι η βέλτιστη συνθήκη είναι η προετοιμασία του σε ξεχωριστό διάλυμα οξίνου χαρακτήρα και στη συνέχεια ανάμιξή του με το υπόλοιπο υλικό των ικριωμάτων. Συγκεκριμένα η διάλυση υπό μαγνητική ανάδευση του PEO σε διάλυμα οξικού οξέος συγκέντρωσης  $\geq 0,5$  M για 24 ώρες, επιδρά στο βέλτιστο βαθμό πολυμερισμού του πριν την ανάμιξή του με το υλικό Har-Chit, δίνοντας μετά τη λυοφιλίωση ικριώματα με συνεκτικές και σκληρές δομές. Η βέλτιστη αναλογία κατά βάρος για την περίπτωση ανάμιξης του διαλύματος του PEO με αιώρημα Har-Chit είναι PEO/Chit=1:4, ενώ στην περίπτωση ανάμιξής του με σκόνη Har-Chit η βέλτιστη αναλογία είναι PEO/Chit=1:2,5. Για μικρότερες συγκεντρώσεις οξικού οξέος το υλικό δεν πολυμερίζεται επαρκώς με αποτέλεσμα να προκύπτουν μαλακές ή εύθρυπτες δομές ικριωμάτων. Αν και η παρουσία οξικού οξέος αυξάνει τον βαθμό πολυμερισμού του PEO, βελτιώνοντας την αντοχή και τη σκληρότητα των ικριωμάτων, ο όξινος χαρακτήρας των υλικών είναι δυσμενής για την ανάπτυξη κυττάρων. Κυτταροκαλλιέργειες σε βιοαντιδραστήρα της Οδοντιατρικής Σχολής, που πραγματοποιήθηκαν σε υλικά ικριωμάτων με ανάμιξη σκόνης Har-Chit και διαλύματος PEO με συγκέντρωση  $\text{CH}_3\text{COOH}=0,5$  και  $0,7$  M έδειξαν ότι η ανάπτυξη και ο πολλαπλασιασμός των κυττάρων στην επιφάνεια των υλικών δεν ευνοείται από την παρουσία όξινου περιβάλλοντος.

## «Ανάπτυξη τρισδιάστατων ικριωμάτων βιομορίων-υδροξυαπατίτη»

Συγκρίνοντας τις δύο μεθόδους παραγωγής των τελικών ικριωμάτων, με ανάμιξη σκόνης και με ανάμιξη αιωρήματος Har-Chit με το διάλυμα του πολυμερούς, τα καλύτερα αποτελέσματα όσον αφορά στη μηχανική συμπεριφορά και αντοχή των ικριωμάτων έδωσε η ανάμιξη με χρήση σκόνης Har-Chit. Μεταξύ αυτών, τα ικρίωματα που παρασκευάστηκαν με την ανάμιξη σκόνης Har-Chit με το πολυμερές με συγκέντρωση οξικού οξέος  $\geq 0,5$  M έδωσαν πολύ πιο σκληρές και συνεκτικές δομές σε σχέση τόσο με τα ικρίωματα ανάμιξης σκόνης Har-Chit με μικρότερη συγκέντρωση οξικού οξέος, όσο και με όλα τα ικρίωματα που παρήχθησαν με τη μέθοδο ανάμιξης με αιώρημα Har-Chit. Επίσης μετά την παραμονή τους για 1-2 μήνες μέσα σε απιονισμένο νερό και σε διάλυμα αιθανόλης σε θερμοκρασία 40 °C στο πυριαντήριο δεν παρατηρήθηκε καμία αλλοίωση της δομής τους, σε αντίθεση με όλα τα υπόλοιπα ικρίωματα με τη μέθοδο σκόνης τα οποία μετά από 3-4 μέρες έσπαγαν μέσα στο υγρό, καθώς και με τα ικρίωματα από τα αιωρήματα τα οποία μετά από 2-3 μέρες διαλυόντουσαν.

Συγκεντρωτικά από τα αποτελέσματα των φυσικοχημικών αναλύσεων XRD και FTIR στα τελικά ικρίωματα προκύπτει ότι η δομή και σύσταση του υδροξυαπατίτη που σχηματίζεται κατά τη βιομιμητική σύνθεσή του μέσω αντίδρασης καταβύθισης είναι όμοια με αυτή του φυσικού απατίτη που απαντάται στον οστικό ιστό. Επιπλέον επιβεβαιώνεται η διατήρηση των υπολοίπων οργανικών φάσεων χωρίς να έχουν υποστεί οποιαδήποτε μεταβολή καθόλη τη διάρκεια της πειραματικής διαδικασίας παραγωγής των τελικών ικριωμάτων.

Η μελέτη των ικριωμάτων στο ηλεκτρονικό μικροσκόπιο σάρωσης έδειξε ότι τα ικρίωματα που παρασκευάστηκαν και με τις δύο μεθόδους παρουσιάζουν αρκετά συμπαγή αλλά και ομοιόμορφη δομή με ομοιόμορφους μικρούς πόρους της τάξης των 10  $\mu\text{m}$ , αλλά με ελάχιστους έως μηδενικούς μεγαλύτερους πόρους ( $\geq 100$   $\mu\text{m}$ ). Η παραπάνω δομή είναι παρόμοια της δομής των συμπαγών οστικών ιστών.

Μελλοντικός στόχος είναι η βελτίωση των φυσικοχημικών και μηχανικών ιδιοτήτων των ικριωμάτων του συνθετικού υδροξυαπατίτη για την παρασκευή των εμφυτευμάτων με τελικό σκοπό την καλύτερη οστεοενσωμάτωση και βιοαποικοδόμηση.

### Προτάσεις για Μελλοντική Έρευνα

Παρακάτω αναφέρονται μερικές ιδέες-προτάσεις για μελλοντική δοκιμή και μελέτη προς βελτίωση των φυσικοχημικών και μηχανικών ιδιοτήτων των ικριωμάτων με βάση τον υδροξυαπατίτη που παρασκευάστηκαν στη δεδομένη εργασία.

- Παρατήρηση των ικριωμάτων στο ηλεκτρονικό μικροσκόπιο διέλευσης για μελέτη της διασποράς των νανοσωλήνων και των κρυστάλλων του υδροξυαπατίτη.
- Κύκλοι εμβαπτίσεων των σκληρών ικριωμάτων σε απιονισμένο νερό ή βασικό διάλυμα και στη συνέχεια ξήρανση, προκειμένου να μειωθεί η οξύτητά τους από την παρουσία του οξικού οξέος.
- Διασπορά των νανοσωλήνων στο υλικό με χρήση σφαιρόμυλου σε ξηρή σκόνη Har προκειμένου να επιτευχθεί καλύτερη και πιο ομοιόμορφη διασπορά τους και μείωση των συσσωμάτων που δημιουργούνται με την διασπορά σε αναδευόμενο υγρό μέσο.
- Χημική κατεργασία των νανοσωλήνων για τη δημιουργία καρβοξυλικών άκρων και εισαγωγή τους στο αιώρημα της χιτοζάνης. Ο ιοντικός δεσμός μεταξύ των ανιονικών καρβοξυλικών άκρων και του κατιονικού χαρακτήρα των αλυσίδων της χιτοζάνης βιβλιογραφικά έχει δείξει ότι προκαλεί ομοιόμορφη και πιο σταθερή διασπορά τους στο υλικό χωρίς τη δημιουργία συσσωμάτων.
- Αντικατάσταση της χιτοζάνης με κολλαγόνο. Προηγούμενες έρευνες και δημοσιεύσεις που πραγματοποιήθηκαν στο εργαστήριο Μεταλλουργίας της σχολής Μ.Μ.Μ. έδειξαν ότι τα ικριώματα που παρήχθησαν με χρήση κολλαγόνου είχαν καλύτερες βιολογικές και μηχανικές ιδιότητες.
- Χρήση πολυμερούς PEO με μεγαλύτερα μοριακά βάρη και έλεγχος του ρυθμού αποικοδόμησής του από τον οργανισμό, σε συνάρτηση με το μοριακό του βάρος, μέσω κατάλληλων κυτταροκαλλιερικών. Το PEO παρέχει με τον τρόπο αυτό τη δυνατότητα συνδυασμού της λειτουργίας των ικριωμάτων με τη μέθοδο της ελεγχόμενης απελευθέρωσης φαρμακευτικών ουσιών.
- Εναλλακτικά της μεθόδου της λυοφιλίωσης, εφαρμογή της μεθόδου πυροσυσσωμάτωσης (απουσία πίεσης, με μονοαξονική ή ισοστατική πίεση),



### «Ανάπτυξη τρισδιάστατων ικριωμάτων βιομορίων-υδροξυαπατίτη»

για τη δημιουργία συμπαγών ικριωμάτων υψηλής αντοχής. Σε πειράματα και μελέτες παραγωγής ικριωμάτων σκληρών ιστών, όπου χρησιμοποιείται σκόνη πολυμερών υψηλών μοριακών βαρών όπως διάφοροι τύποι PEO, HDPE (High Density Polyethylene) και UHMWPE (Ultra High Molecular Weight Polyethylene), εφαρμόζεται η τεχνική της πυροσυσσωμάτωσης.

- Εισαγωγή και διασπορά μικρο/νανο-σωματιδίων βιοαδρανούς αλούμινας  $Al_2O_3$  ή Μαγνησίας MgO για την ενίσχυση της μηχανικής συμπεριφοράς των ικριωμάτων.
- Σωματιδιακή ενίσχυση με διασπορά φωτοσκληρυνόμενων υλικών.

### **ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ**

- [1] David Franklyn Williams, The Williams Dictionary of Biomaterials, pp. 9-13

- [2] G. Heness, B. Ben-Nissan, Innovative Bioceramics, Materials Forum, Vol. 27, 2004
- [3] Qizhi Chen, George A. Thouas, Metallic implant biomaterials, 2015
- [4] Alejandro Sáenz, Eric Rivera-Muñoz, Witold Brostow, and Victor M. Castaño, Ceramic Biomaterials: An Introductory Overview
- [5] B.L Seal, T.C Otero, A. Panitch, Polymeric biomaterials for tissue and organ regeneration, 2001
- [6] Ratner BD, Hoffman AS, Schoen FJ, Lenons JE, Biomaterials Science: A Multidisciplinary Endeavor in Biomaterials Science, 2004
- [7] Ratner BD, Hoffman AS, Non-fouling Surfaces in Biomaterials Science: An Introduction to Materials in Medicine, 2004
- [8] Ratner BD, A History of Biomaterials in Biomaterials Science: An Introduction to Materials in Medicine, 2004
- [9] Luiz Carlos Junqueira, Jose Carneiro, Basic Histology, Tenth Edition, 2003
- [10] Paul R. Wheater, H. George Burkitt, Victor G. Daniels, Wheater's Functional Histology
- [11] Walter F. Boron, Emile L. Boulpaep, Medical Physiology A Cellular and Molecular Approach
- [12] R. Gonzalez McQuire, Fabrication of Hydroxyapatite Sponges by Dextran Sulfate/Amino acid Templating, 2005
- [13] Padilla S, Roman J, Vallet-Regi M. Synthesis of porous hydroxyapatites by combination of gelcasting and foams burn out methods. J Mater Sci: Mater Med, 2002
- [14] Στεργίου Γεώργιος, Διπλωματική Εργασία: «Σύνθεση κόνεως υδροξυαπατίτη παρουσία του βιοπολυμερούς χιτοζάνη και αμινοξέων», Ε.Μ.Π, Αθήνα, 2013
- [15] Βάου Βασιλική, Μεταπτυχιακή Εργασία: «Μελέτη του μηχανισμού βιομμητικής σύνθεσης υδροξυαπατίτη παρουσία βιομορίων», Ε.Μ.Π. Αθήνα, 2012

- [16] Μπρασινίκα Δέσποινα, Διδακτορική Διατριβή: «Βιομιμητική ανάπτυξη σύνθετων βιοκεραμικών υδροξυαπατίτη-βιοπολυμερών με ελεγχόμενες ιδιότητες για βιολογικές εφαρμογές», Ε.Μ.Π. Αθήνα, 2015
- [17] Marguerite Rinaudo, Chitin and chitosan: Properties and applications, 2006
- [18] Lauren J. Auerbach, Brittney K. DeClerk, C. Garrison Fathman, Geoffrey C. Gurtner, Paul S. Auerbach, Poly-L-Arginine Topical Lotion Tested in a Mouse Model for Frostbite Injury, 2014
- [19] Shohda A. El-Maraghy, Noha Ali Mehana, Modulatory effects of l-arginine and soy enriched diet on bone homeostasis abnormalities in streptozotocin-induced diabetic rats, 2015
- [20] Mohamed Z. Gad, Anti-aging effects of l-arginine, 2010
- [21] Boualem Hammouda, Derek L. Ho, Steve Kline, Insight into Clustering in Poly(ethylene oxide) Solutions, *Macromolecules* 2004 37, pp.6932-6937
- [22] Apicella A., Cappello B., Del Nobile M.A., La Rotonda M.I., Mensitieri G., Nicolais L. Poly (ethylene oxide) (PEO) and different molecular weight PEO blends monolithic devices for drug release. *Biomaterials* 14, 1993
- [23] Efentakis M., Vlachou M., July 2000. Evaluation of high molecular weight polyox polymer: Studies of flow properties and release rates of furosamide and captopril from controlled release hard gelatin capsules, *Pharmaceutical Development and Technology*, Vol. 5, Issue 3
- [24] Abdulazeez T. Lawal, Synthesis and utilization of carbon nanotubes for fabrication of electrochemical biosensors, *Materials Research Bulletin*, 2016
- [25] Burak Derkus, Kaan Cebesoy Emregul, Emel Emregul, Evaluation of protein immobilization capacity on various carbon nanotube embedded hydrogel biomaterials, *Materials Science and Engineering: C*, 2015

- [26] Wei Wang, Susan Liao, Ming Liu, Qian Zhao, Yuhe Zhu, Polymer Composites Reinforced by Nanotubes as Scaffolds for Tissue Engineering, 2014
- [27] Lorena Athie Goulart, Fernando Cruz de Moraes, Lucia Helena Mascaro, Influence of the different carbon nanotubes on the development of electrochemical sensors for bisphenol A, Materials Science and Engineering: C, 2016
- [28] Hua He, Lien Ai Pham-Huy, Pierre Dramou, Deli Xiao, Pengli Zuo, Chuong Pham-Huy, Carbon Nanotubes: Applications in Pharmacy and Medicine, 2013
- [29] S.P. Khanal, H. Mahfuz, A.J. Rondinone, Th. Leventouri, Improvement of the fracture toughness of hydroxyapatite (HAp) by incorporation of carboxyl functionalized single walled carbon nanotubes (CfSWCNTs) and nylon, Materials Science and Engineering: C, 2016
- [30] Jia Yan, Tianhao Wu, Zezun Ding, Xiaokang Li, Preparation and characterization of carbon nanotubes/chitosan composite foam with enhanced elastic property, Carbohydrate Polymers, 2016
- [31] Rui Yu, Maofei Ran, Jie Wen, Wenjing Sun, Wei Chu, Chengfa Jiang, Zhiwei He, The effect of hydroxylation on CNT to form Chitosan-CNT composites: A DFT study, Applied Surface Science, 2015
- [32] Jayachandran Venkatesan, BoMi Ryu, P.N. Sudha, Se-Kwon Kim, Preparation and characterization of chitosan-carbon nanotube scaffolds for bone tissue engineering, International Journal of Biological Macromolecules, 2012
- [33] 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.
- [34] Dimitris Tsiourvas, Athena Tsetsekou, Maria-Izoldi Kammenou, Nikos Boukos, Biomimetic synthesis of ribbon-like hydroxyapatite employing poly(l-arginine), 2016

- [35] Susmita Mukherjee, Biswanath Kundu, Abhijit Chanda, Swarnendu Sen, Effect of functionalisation of CNT in the preparation of HAp–CNT biocomposites, *Ceramics International*, 2015
- [36] Lanlan Pan, Xibo Pei, Rui He, Qianbing Wan, Jian Wang, Multiwall carbon nanotubes/polycaprolactone composites for bone tissue engineering application, *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 2012
- [37] Ankur Gupta, Garima Tripathi, Debrupa Lahiri, Kantesh Balani, Compression Molded Ultra High Molecular Weight Polyethylene–Hydroxyapatite–Aluminum Oxide–Carbon Nanotube Hybrid Composites for Hard Tissue Replacement, *Journal of Material Science & Technology*, 2013
- [38] Anup Kumar Patel, Kantesh Balani, Dispersion fraction enhances cellular growth of carbon nanotube and aluminum oxide reinforced ultrahigh molecular weight polyethylene biocomposites, *Materials Science and Engineering: C*, 2015
- [39] M. J. Pikal, *Encyclopedia of Pharmaceutical Technology*, 2002, pp. 1299-1326
- [40] J.C. Kasper, W. Friess, The freezing step in lyophilisation: physico-chemical fundamentals, freezing methods and consequences on process performance and quality attributes of biopharmaceuticals, *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, 2011, pp. 248-263
- [41] Adebola Oyefusi, Opeyemi Olanipekun, Gururaj M. Neelgund, Deforest Peterson, Julia M. Stone, Ebonee Williams, Laura Carson, Gloria Regisford, Aderemi Oki, Hydroxyapatite grafted carbon nanotubes and graphene nanosheets: Promising bone implant materials, *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*, 2014
- [42] Emanuele Calabrò and Salvatore Magazù, Demicellization of Polyethylene oxide in water solution under static magnetic field exposure studied by FTIR spectroscopy, *Advances in Physical Chemistry*, Volume 2013

- [43] Nirali Gondaliya, Dinesh Kumar Kanchan, Poonam Sharma, Prajakta Joge, Structural and Conductivity Studies of Poly(Ethylene Oxide)—Silver Triflate Polymer Electrolyte System, Materials Sciences and Applications, 2011
- [44] B. Vagaska, L. Bacakova, E. Filova, K. Balik, Osteogenic Cells on Bio-Inspired Materials for Bone Tissue Engineering, 2009
- [45] Jazmín I. González Ocampo, Diana M. Escobar Sierra, Claudia P. Ossa Orozco, Porous bodies of hydroxyapatite produced by a combination of the gel-casting and polymer sponge methods
- [46] Ramay HR, Zhang M. Preparation of porous hydroxyapatite scaffolds by combination of gel-casting and polymer sponge methods. Biomaterials, 2003
- [47] Rubaiya Yunus Basha, Sampath Kumar T.S., Mukesh Doble, Design of biocomposite materials for bone tissue regeneration, 2015
- [48] Inmaculada Aranaz, María C. Gutiérrez, María Luisa Ferrer, Francisco del Monte, Preparation of Chitosan Nanocomposites with a Macroporous Structure by Unidirectional Freezing and Subsequent Freeze-Drying, 2014
- [49] Susmita Mukherjee, Biswanath Kundu, Swarnendu Sen, Abhijit Chanda, Improved properties of hydroxyapatite–carbon nanotube biocomposite: Mechanical, in vitro bioactivity and biological studies, Ceramics International, 2014
- [50] Fereydoun Pourdanesh, Ali Jebali, Seyedhossein Hekmatimoghaddam, Azra Allaveisie, In vitro and in vivo evaluation of a new nanocomposite, containing high density polyethylene, tricalcium phosphate, hydroxyapatite, and magnesium oxide nanoparticles, Materials Science and Engineering: C, 2014,
- [51] Yu Xiao, Tao Gong, Ying Jiang, Yapin Wang, Zezhang T. Wen, Shaobing Zhou, Chongyun Bao, Xiaoming Xu, Fabrication and characterization of a glucose-sensitive antibacterial chitosan–polyethylene oxide hydrogel, Polymer, 2016