



ΕΘΝΙΚΟ ΜΕΤΣΟΒΙΟ ΠΟΛΥΤΕΧΝΕΙΟ

ΔΙΑΤΜΗΜΑΤΙΚΟ ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΩΝ
ΣΠΟΥΔΩΝ (Δ.Π.Μ.Σ.):
"ΕΠΙΣΤΗΜΗ ΚΑΙ ΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑ ΥΛΙΚΩΝ"

**ΑΝΑΠΤΥΞΗ ΚΑΙ ΒΕΛΤΙΩΣΗ ΤΩΝ
ΙΔΙΟΤΗΤΩΝ ΤΡΙΣΔΙΑΣΤΑΤΩΝ
ΙΚΡΙΩΜΑΤΩΝ ΝΑΝΟΥΔΡΟΞΥΔΙΑΠΑΤΗ-
ΒΙΟΠΟΛΥΜΕΡΩΝ ΓΙΑ ΒΙΟΪΑΤΡΙΚΕΣ
ΕΦΑΡΜΟΓΕΣ**



**ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ
ΠΑΝΟΥ ΜΑΡΙΑΝΝΑ**

Διπλωματούχου Σχολής Επιστήμης των Υλικών Πανεπιστημίου Πατρών

ΕΠΙΒΛΕΨΗ:

ΑΘΗΝΑ ΤΣΕΤΣΕΚΟΥ

Καθηγήτρια Μηχανικών Μεταλλείων Μεταλλουργών Ε.Μ.Π.

ΑΘΗΝΑ, Ιούνιος 2017



ΕΘΝΙΚΟ ΜΕΤΣΟΒΙΟ ΠΟΛΥΤΕΧΝΕΙΟ

ΔΙΑΤΜΗΜΑΤΙΚΟ ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΩΝ
ΣΠΟΥΔΩΝ (Δ.Π.Μ.Σ.):
"ΕΠΙΣΤΗΜΗ ΚΑΙ ΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑ ΥΛΙΚΩΝ"

**ΑΝΑΠΤΥΞΗ ΚΑΙ ΒΕΛΤΙΩΣΗ ΤΩΝ
ΙΔΙΟΤΗΤΩΝ ΤΡΙΣΔΙΑΣΤΑΤΩΝ
ΙΚΡΙΩΜΑΤΩΝ ΝΑΝΟΥΔΡΟΞΥΔΡΑΠΑΤΙΤΗ-
ΒΙΟΠΟΛΥΜΕΡΩΝ ΓΙΑ ΒΙΟΪΑΤΡΙΚΕΣ
ΕΦΑΡΜΟΓΕΣ**

**ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ
ΠΑΝΟΥ ΜΑΡΙΑΝΝΑ**

Διπλωματούχου Σχολής Επιστήμης των Υλικών Πανεπιστημίου Πατρών

ΤΡΙΜΕΛΗΣ ΕΞΕΤΑΣΤΙΚΗ ΕΠΙΤΡΟΠΗ:

κ. ΤΣΕΤΣΕΚΟΥ ΑΘΗΝΑ

κ. ΜΟΥΤΣΑΤΣΟΥ ΑΓΓΕΛΙΚΗ

κ. ΚΟΡΔΑΤΟΣ ΚΩΝΣΤΑΝΤΙΝΟΣ

ΑΘΗΝΑ, Ιούνιος 2017

Πρόλογος

Η μεταπτυχιακή εργασία με θέμα «Ανάπτυξη και Βελτίωση των Ιδιοτήτων Τρισδιάστατων Ικριωμάτων Νανουδροξυαπατίτη-βιοπολυμερών για Βιοϊατρικές Εφαρμογές», πραγματοποιήθηκε στο εργαστήριο του Τομέα Μεταλλουργίας και Τεχνολογίας Υλικών της Σχολής Μηχανικών Μεταλλείων-Μεταλλουργών του Εθνικού Μετσόβιου Πολυτεχνείου, κατά το ακαδημαϊκό έτος 2016-2017. Επιβλέπουσα καθηγήτρια ήταν η Καθηγήτρια κυρία Αθηνά Τσετσέκου, ενώ στην τριμελή εξεταστική επιτροπή συμμετείχαν επιπλέον η κυρία Αγγελική Μουτσάτσου και ο κύριος Κωνσταντίνος Κορδάτος.

Ευχαριστώ θερμά την Καθηγήτρια της Σχολής Μηχανικών Μεταλλείων Μεταλλουργών κ. Τσετσέκου Αθηνά για το ότι μου μετέδωσε τις γνώσεις και την εμπειρία της στην ανάπτυξη νανοσύνθετων τρισδιάστατων ικριωμάτων, τις εύστοχες υποδείξεις της κατά την πρόοδό μου, καθώς και για την καθοδήγηση και εμπιστοσύνη που με έδειξε.

Θα ήθελα να εκφράσω τις ευχαριστίες μου προς τον κ. Παπαδόπουλο Τριαντάφυλλο, Καθηγητή του Τμήματος Οδοντιατρικής, για την πολύτιμη βοήθεια που με έδωσε στα τεχνικά θέματα της πειραματικής μου διαδικασίας, για τις παρατηρήσεις του κατά τη συγγραφή της μεταπτυχιακής μου και γενικά για την άποψη συνεργασία μας. Επίσης, θα ήθελα να ευχαριστήσω τον Καθηγητή κ. Ζαούτσο Στεφάνο και την κ. Τατούδη Ζωή για την βοήθειά τους στο μέρος τεχνικού χαρακτηρισμού των ικριωμάτων μου.

Τις ειλικρινείς ευχαριστίες μου θα ήθελα να εκφράσω προς τον Στεργίου Γιώργο για την αρχική μου εκπαίδευση, Πετράκη Φωτεινή για την συμπαράσταση και τη ανεκτίμητη βοήθειά της καθόλη τη διάρκεια των πειραμάτων μου, την Ρούσση Ελένη και την Κίτσου Ιωάννα για τη βοήθεια που μου προσέφεραν στα πρώτα μου βήματα. Ευχαριστώ, επίσης, τους συναδέλφους του εργαστηρίου Καραγιάννη Παναγιώτη και ιδιαίτερος τον Κατσαρό Γιάννη για την συνεργασία, καθώς και τον Οικονόμου Γιώργο για την συμπαράστασή του και την φιλία του. Επιπλέον, ένα ευχαριστώ στο τεχνικό προσωπικό για τη βοήθεια που μου έδωσαν και σε όλους τους φοιτητές του εργαστηρίου.

Θα ήθελα, ακόμη, να εκφράσω τις ευχαριστίες μου προς το ερευνητικό ινστιτούτο Alexander Fleming, την εταιρεία EBETAM και τα TEI Θεσσαλίας για την συμβολή τους στο τεχνικό χαρακτηρισμό της δουλειάς μου.

Επιπλέον, ευχαριστώ όλους τους καθηγητές του Δ.Π.Μ.Σ. Επιστήμης και Τεχνολογίας των υλικών για τα εφόδια που μου έδωσαν.

Τέλος, ένα μεγάλο ευχαριστώ στην οικογένειά μου και τα πιο κοντινά μου πρόσωπα για την αγάπη, την αμέριστη συμπαράσταση, τη φροντίδα και την στήριξη που μου προσέφεραν σε όλη την διάρκεια των σπουδών μου.

Μαριάννα Πάνου,

Ιούνιος 2017

ΠΙΝΑΚΑΣ ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΩΝ

Περίληψη

Abstract

Πίνακας συντομογραφιών

Κεφάλαιο 1ο: Θεωρητικό Μέρος

1.1.Εισαγωγή.....	1
1.2.Βιοϋλικά	1
1.3.Ιστομηχανική.....	4
1.4.Βιολογία και κύτταρα οστού.....	4
1.5.Ικριώματα	10
1.6.Κεραμικά βιοϋλικά.....	13
1.7.Τύποι διεπιφανειακών δεσμών οστού- βιοϋλικού.....	19
1.8.Υδροξυαπατίτης.....	24
1.9.Χιτοζάνη.....	33
1.10. L-αργινίνη.....	36
1.11. Πολυαιθυλενογλυκόλη / Οξείδιο του πολυαιθυλενίου.....	39
1.12. Νανοσωλήνες άνθρακα.....	44
1.13. Πορώδες ικριωμάτων.....	49
1.14. Μηχανική αντοχή ικριωμάτων.....	51
1.15. Μέθοδος προσομοίωσης σωματικών ρευστών (SBF).....	55
1.16. Λιοφυλίωση	57

Κεφάλαιο 2ο: Βασικές Τεχνικές Χαρακτηρισμού

2.1. Περιθλασομετρία ακτίνων X (XRD).....	62
2.2. Ηλεκτρονική μικροσκοπία σάρωσης (SEM).....	65
2.3.Διάταξη Λιοφιλίωσης.....	69
2.4. Ποροσιμετρία υδραργύρου (MIP).....	71
2.5. Υπολογιστική τομογραφία (CT-Scan).....	73
2.6. Μηχανικές δοκιμές.....	76

Κεφάλαιο 3ο: Πειραματικό Μέρος

3.1. Αντιδραστήρια και ερευνητικά όργανα	79
3.2. Σύνθεση ικριωμάτων νανοϋδροξυαπατίτη-βιοπολυμερών.....	80

3.3. Σύνθεση ικριωμάτων νανοϋδροξυαπατίτη-βιοπολυμερών ενισχυμένων με νανοσωλήνες άνθρακα.....	82
3.4. Σύνθεση προσομοιωμένων σωματικών υγρών.....	85
3.5. Μελέτη υδατικής προσρόφησης και αντοχής σε υδατικό περιβάλλον.....	86
3.6. Μελέτη πορώδους δομής.....	87
3.7. Έλεγχος μηχανικής αντοχής.....	88

Κεφάλαιο 4ο: Αποτελέσματα-Συζήτηση

4.1. Σύσταση ικριωμάτων.....	88
4.2. Πορώδες ικριωμάτων.....	91
4.3. Σύγκριση μεθόδων ενσωμάτωσης των CNTs.....	107
4.4. Υδατική προσρόφηση ικριωμάτων.....	109
4.5. Δομική ακεραιότητα ικριωμάτων σε νερό και αιθανόλη	111
4.6. Ανάλυση προσομοιωμένων σωματικών υγρών (SBF).....	113
4.8. Μηχανική αντοχή ικριωμάτων.....	116

Κεφάλαιο 5ο Συμπεράσματα.....119

Προτάσεις για μελλοντική έρευνα.....	122
Βιβλιογραφία.....	122

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Όσον αφορά στην ιστομηχανική πρόοδο, η χρήση προηγμένων βιοδιασπώμενων βιοϋλικών νανοδιαστάσεων αποτελεί μια πολλά υποσχόμενη τεχνική αναγέννησης οστών. Στόχος της παρούσας έρευνας είναι η ανάπτυξη τρισδιάστατων κριωμάτων για ορθοπεδικές εφαρμογές, τα οποία να προάγουν την καλλιέργεια και πολλαπλασιασμό κυττάρων και να φέρουν την κατάλληλη μηχανική αντοχή. Η συγκεκριμένη μέθοδος απαιτεί την ύπαρξη διασυνδεδεμένου πορώδους, μικρο-, μακρομορφολογίας και την εξασφάλιση επαρκούς μεγέθους πόρων (>100 μm). Τα κριώματα αποκτούν περαιτέρω μηχανική αντοχή και διασύνδεση πορώδους, μέσω υβριδοποίησής τους δια της προσθήκης βιοσυμβατών νανοσωλήνων άνθρακα (CNTs). Τα σύνθετα κριώματα χιτοζάνης/υδροξυαπατίτη/πολυαιθυλενικού οξέος (Chit/ HAρ/PEO) παρασκευάστηκαν μέσω βιομιμητικής μεθόδου σε περιβάλλον βιοπολυμερών και με την τεχνική της λυοφιλίωσης. Η παραχθείσα σκόνη Chit/HAρ δημιούργησε σταυροδεσμούς με το PEO σε μοριακή αναλογία PEO/Chit 1/2,5. Ακολούθησαν παρασκευές κριωμάτων Chit/ HAρ/PEO ίδιας μοριακής αναλογίας με επιπλέον προσθήκη ~1% CNTs, που προστέθηκαν είτε στο αιώρημα Chit σε αρχικό στάδιο παραγωγής είτε στο τελικό υβριδικό αιώρημα υδροξυαπατίτη. Οι ιδιότητες του PEO είναι εξαρτώμενες από το μοριακό βάρος του και το χρόνο πολυμερισμού του, συνθήκες που μελετήθηκαν με αλλαγή παραμετροποίησης. Τα σύνθετα κριώματα αναλύθηκαν με SEM, XRD, CT-Scan, έκθεση σε διάλυμα SBF και μονοαξονική συμπίεση. Η μελέτη και ανάλυση των τελικών κριωμάτων κατέδειξαν ότι η διασύνδεσή τους με PEO βελτιώνει ραγδαία την μηχανική τους απόκριση, συγκριτικά με τα κριώματα απουσίας PEO, ενώ το πληρωτικό μέσο CNTs τους προσδίδει επιπρόσθετη συνεκτικότητα και αντοχή.

Αυτή η *in vitro* μελέτη παρουσιάστηκε σε poster στο συνέδριο 6th Int'l Conference on Tissue Engineering in conjunction with the 3rd Int'l Conference on Regenerative Biomedical Materials με τίτλο 'Development of 3D Bone Scaffolds of Chitosan/ Hydroxyapatite/ Polyethylene Oxide Through Freeze Drying Process'. Επίσης, η μελέτη πάνω σε κριώματα ενισχυμένα με CNTs εγκρίθηκε στο συνέδριο ESB 2017, όπου είμαι ομιλήτρια, με τίτλο 'Development of 3D Scaffolds of Hydroxyapatite-Carbon Nanotubes-Biopolymers for Bone Regeneration'. Στο ESB 2017 Conference στάλθηκε επιπλέον ένα poster, στο οποίο τα κριώματα χωρίς CNTs μελετώνται ως προς την βιολογική τους απόκριση, με τίτλο 'Synthesis and evaluation of hydroxyapatite/chitosan/polyethylene oxide scaffolds by freeze drying'.

ABSTRACT

Marianna Panou, School of Chemical Engineering, National Technical University of Athens

The vital need for bone implants, which are able of regeneration, set biodegradable nanomaterials of utmost importance. In this work 3D scaffolds for bone rebirth to promote cell growth, proliferation and mechanical endurance, were produced. It is essential that the porosity is interconnected, micro- and macro-structured and adequate for bone ingrowth, with pore size ($>100\ \mu\text{m}$). It is noticed a significant improvement of scaffold's both mechanical strength and interconnectivity of porous network, through the addition of CNTs. Hybrid chitosan/hydroxyapatite/PEO scaffolds were prepared by a bioinspired method and the freeze-drying process. The Chit/HA powder was crosslinked with Polyethylene oxide (PEO) in molar ratio of PEO/Chit 1/2,5. Furthermore, crosslinkable polyethylene oxide/hydroxyapatite /chitosan nanocomposites with nearly 1% CNTs and in molar ratio of PEO/Chit 1/2,5, were prepared. The CNTs were added in the Chitosan solution during the first experimental stage or into the final HA suspension. The properties of PEO are strongly dependent on the polymer molecular weight, thus different cases were investigated by altering the molecular weight of PEO and its duration of polymerization. Artificial scaffolds were soaked into simulated body fluid (SBF), characterized with SEM, XRD, uniaxial compression test and CT-Scan. Concerning the findings, scaffolds crosslinked with PEO showed a significant improvement in both mechanical strength and porosity, in contrast with no crosslinked ones and CNTs offer additional cohesion and strength.

This in vitro study was presented in a poster at the 6th Int'l Conference on Tissue Engineering in conjunction with the 3rd Int'l Conference on Regenerative Biomedical Materials entitled 'Development of 3D Bone Scaffolds of Chitosan/Hydroxyapatite/Polyethylene Oxide Through Freeze Drying Process'. Moreover, the study on CNT-reinforced scaffolds was approved at the ESB 2017 conference, where I am the speaker, entitled 'Development of 3D Scaffolds of Hydroxyapatite-Carbon Nanotubes-Biopolymers for Bone Regeneration'. The ESB 2017 Conference also sent a poster in which CNTs-free scaffolds are studied for their biological response, entitled 'Synthesis and evaluation of hydroxyapatite/chitosan/polyethylene oxide scaffolds by freeze drying'.

Πίνακας Συντομογραφιών

HAp: Hydroxyapatite, Υδροξυαπατίτης

CNTs: Carbon Nanotubes, νανοσωλήνες άνθρακα

Chit: Chitosan, χιτοζάνη

L-Arg: L-Arginine, L-Αργινίνη

SBF: Simulated body fluid, Προσομοιωμένα σωματικά υγρά

N: Neat Hydroxyapatite Scaffold/(or powder), Ικρίωμα/ (ή σκόνη) Υδροξυαπατίτη

NC: Carbon Nanotubes-Hydroxyapatite Scaffold, Ικρίωμα Υδροξυαπατίτη ενισχυμένου με νανοσωλήνες άνθρακα (στο τελικό αιώρημα)

CC: Carbon Nanotubes-in Chitosan Hydroxyapatite Scaffold, Ικρίωμα Υδροξυαπατίτη ενισχυμένου με νανοσωλήνες άνθρακα (στο αιώρημα χιτοζάνης)

PEO: Poly(ethylene) Oxide, Οξείδιο Πολυαιθυλενίου

XRD: X-Ray Diffraction, Περιθλασομετρία ακτίνων X

SEM: Scanning Electron Microscopy, Ηλεκτρονική μικροσκοπία σάρωσης

CT-Scan: Computer Tomography, Αξονική Τομογραφία

MIP: Mercury Intrusion Porosimetry, Ποροσομετρία Υδραργύρου

1.1 Εισαγωγή

Τα τελευταία χρόνια, παρατηρείται ραγδαία εξέλιξη στον κλάδο μηχανικής του σκελετικού συστήματος. Αρχικά, τα μεταλλικά οστικά εμφυτεύματα αντικαθιστούσαν τον κατεστραμμένο ιστό, έπειτα αντικαταστάθηκαν από τα σύνθετα βιοϋλικά, αργότερα ακολούθησαν τα βιοαπορροφήσιμα και βιοενεργά ικριώματα, έως την βελτιστοποίηση αυτών, καθιστώντας τα κατάλληλα για την πλήρη αναγέννηση του οστού, μέσω κυτταροκαλλιεργιών και αγγείωσης. Η διερεύνηση και προσομοίωση των χημικών συστατικών και της ιεραρχικής μικροδομής του φυσικού οστού, προσφέρουν την δυνατότητα σύνθεσης βιοϋλικών με βιομιμητικά χαρακτηριστικά. Το φυσικό οστό είναι ένα σύνθετο υλικό, αποτελούμενο από περίπου 25 wt% νανοίνες κολλαγόνου τύπου I, 65wt% κρυσταλλικό απατίτη και 10wt% νερό. Για το λόγο αυτό, αναπτύσσονται τρισδιάστατες δομές, τα ικριώματα, τα οποία να έχουν πορώδη δομή, κρυσταλλικότητα και σύσταση όμοια με του σπογγώδους οστού, προωθώντας έτσι την εσωτερική ανάπτυξη των κυττάρων, πολυκυτταρικών σφαιροειδών, νεύρων και τριχοειδών αγγείων εντός της δομής τους, οδηγώντας στην ταχεία αναγέννηση των ιστών. Προϋπόθεση της άρτιας λειτουργίας των τεχνητών αυτών δομών, αποτελεί η εξασφάλιση της βιολογικής τους απόκρισης, της βιοσυμβατότητας, μηχανικής αντοχής, καθώς και η δυνατότητα διατήρησης του πορώδους δικτύου τους. Στην παρούσα πειραματική έρευνα, πραγματοποιήθηκε σύνθεση τρισδιάστατων ικριωμάτων νανοδροξαπατίτη σε μήτρα βιοσυμβατών πολυμερών χιτοζάνης και πολυαιθυλενικού οξέος, μέσα σε βιομιμητικό περιβάλλον L-Αργινίνης, καθώς και εισαγωγή νανοσωλήνων άνθρακα που έδρασε ως ενισχυτικό μέσο. Ο σχηματισμός τρισδιάστατου πορώδους ικριώματος πραγματοποιήθηκε μέσω της τεχνικής λυοφιλίωσης, κατά την οποία το προς ξήρανση δείγμα καταψύχεται και στη συνέχεια τοποθετείται μέσα σε θάλαμο υψηλού κενού, όπου γίνεται εξάχνωση προς σχηματισμό πορώδους δικτύου.

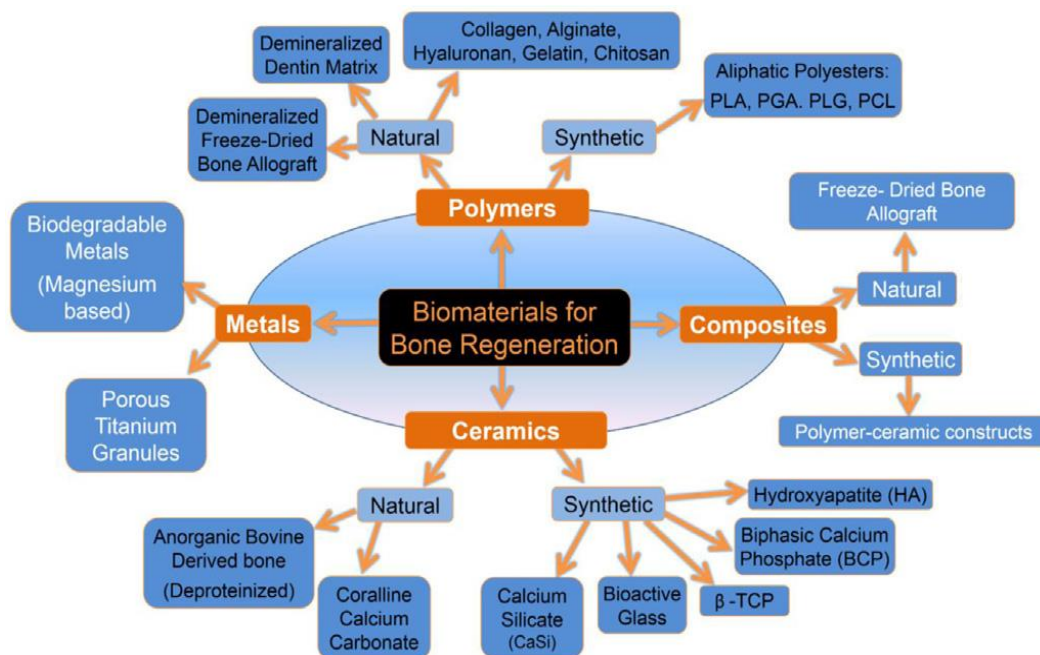
1.2. Βιοϋλικά

Ο αρχικός ορισμός του όρου βιοϋλικό αναφέρεται κάθε ουσία, μη φαρμακευτική ή ο συνδυασμός ουσιών συνθετικής ή φυσικής προέλευσης που χρησιμοποιείται για οποιαδήποτε χρονική περίοδο αυτόνομο ή ως μέρος ενός συστήματος με σκοπό τη θεραπεία, υποβοήθηση στην αύξηση ή αντικατάσταση ιστού, οργάνου ή λειτουργίας του σώματος. Πρόκειται για ένα μη βιώσιμο υλικό που αλληλοεπιδρά με τα βιολογικά συστήματα. ⁽¹⁾

Πριν παραχθεί ένα βιοϋλικό περνάει από μία διαδοχική αλληλουχία σταδίων, που περιλαμβάνει α) τον καθορισμό του προβλήματος το οποίο θα κληθεί το υλικό να λύσει (θεραπεία, αντικατάσταση οργάνου, αισθητικοί λόγοι), στην συνέχεια β) τον σχεδιασμό της συσκευής, τη σύνθεση και τον έλεγχο των υλικών (μηχανικές ιδιότητες, τοξικότητα, βιολογική απόκριση, αντοχή σε διάβρωση, αλληλεπίδραση με

πρωτεΐνες, με κύτταρα και ιστούς), την κατασκευή υλικού, αποστείρωση του και τυποποίησή του, γ) τον έλεγχο της συσκευής (σε πειραματόζωα, in vitro) κλινικές μελέτες, κλινικές δοκιμές και δ) την παρακολούθηση της χρήσης του για μεγάλο χρονικό διάστημα in vivo, in vitro και σε ασθενείς.

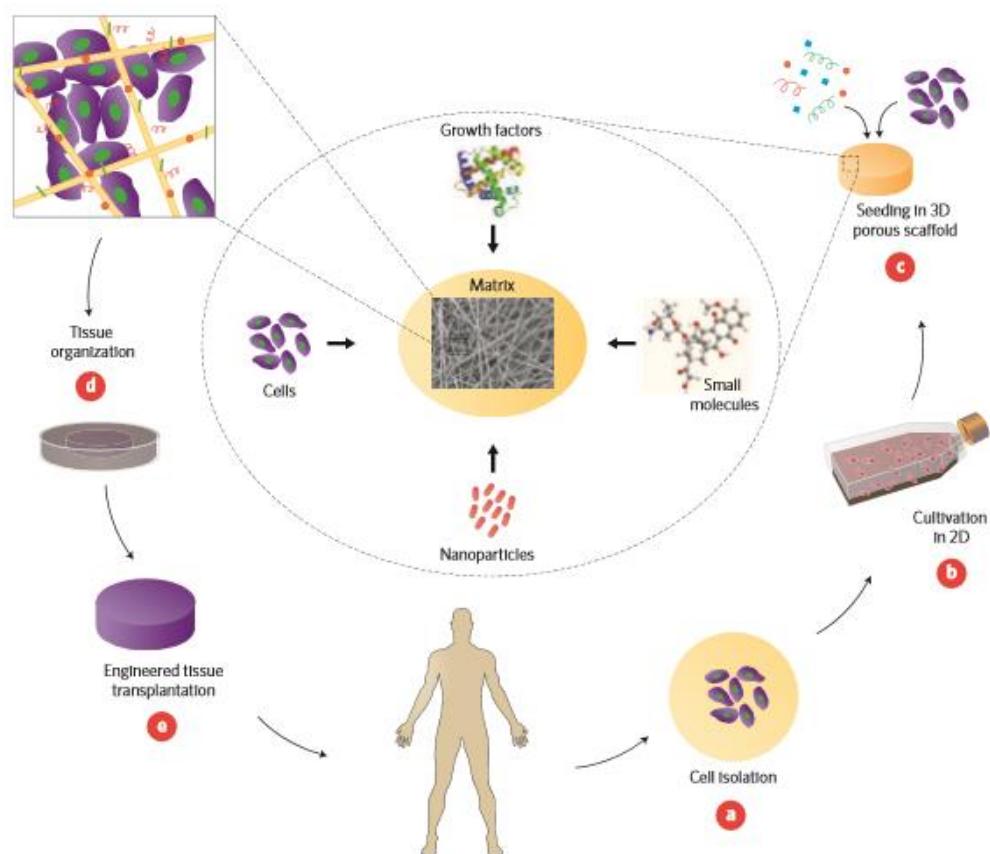
Συνοπτικά οι πιο σημαντικοί σταθμοί στην ιστορία των βιοϋλικών περιλαμβάνουν την ανάπτυξη άσηπτων χειρουργικών επεμβάσεων (1860-1870), παραγωγή και χρήση προσθέτων από ανοξείδωτο χάλυβα για την πόρωση καταγμάτων (1893-1912), κραμάτων βαναδίου για ορθοπεδικές εφαρμογές (1912), τη συσκευή αιμοδιάλυσης (1944), η κατασκευή καρδιακών βαλβίδων (1960), η χρήση βιοκεραμικών (1960), η κατασκευή τεχνητής καρδιάς (1980) και τα τρισδιάστατα ικριώματα για τη μηχανική ιστών (1990).(i) Στον τομέα της ιστομηχανικής, ήδη από τη δεκαετία του 1960, τα μέταλλα και τα κράματά τους αποτέλεσαν τα πρώτα αδρανή οστικά εμφυτεύματα. Κατόπιν το 1970, χρησιμοποιήθηκαν τα βιοκεραμικά και βιοπολυμερή (φυσικά ή συνθετικά) ως βιοενεργά ή βιοαπορροφήσιμα οστικά μοσχεύματα, ενώ στη σύγχρονη ιστομηχανική παρουσιάζεται η τρίτη γενιά βιοϋλικών, που συμπεριλαμβάνει τα σύνθετα ή νανοσύνθετα με βιοενεργές και βιοαπορροφήσιμες ιδιότητες (Εικ. 1.2.1).(ii)



Εικ. 1.2.1. Σχηματική απεικόνιση κατηγοριοποίησης βιοϋλικών των οστικών μοσχευμάτων
(iii)

Τα νανοσύνθετα βιοϋλικά, πλεονεκτούν έναντι των υλικών μεγαλύτερης κλίμακας επιδεικνύοντας ανώτερη αντοχή και σκληρότητα, καθώς οι φυσαλίδες και οι τυχόν ατέλειες μειώνονται με το μέγεθος του κρυσταλλικού κόκκου. Επιπλέον, με τη μείωση του μεγέθους κόκκου, επέρχεται μείωση της δυσθραυστότητας και βελτιωμένη αντοχή σε θραύση λόγω του αυξημένου ορίου κόκκων ολίσθησης. Τα νανοϋλικά έχουν αυξημένο συντελεστή στρέψης και μέτρο εφελκυσμού, φαινόμενο

το οποίο οφείλεται στο μικρό μέγεθος κόκκου, την μεγάλη ειδική επιφάνεια και την ισχυρή διεπιφανειακή αλληλεπίδραση. Όσον αφορά την ιστομηχανική, το οστό θεωρείται ένα νανοδομημένο σύνθετο, επομένως η επιλογή νανοσυνθέτων ικριωμάτων με σκοπό την αναγέννησή του, αποτελεί βέλτιστη λύση προσδίδοντας εξαιρετικές ιδιότητες, όπως καθορισμένο ρυθμό αποικοδόμησης ίσο με τον ρυθμό ανάπτυξης του νεοσυντεθειμένου οστού, βέλτιστη επούλωση οστικών εμφυτευμάτων και μείωση επιπλοκών. Επιπρόσθετα, ο νανοϋδροξυαπατίτης καταστέλλει σημαντικά την ανάπτυξη καρκινικών κυττάρων, ενώ δεν επιδρά στα υγιά κύτταρα. Το πορώδες δίκτυο τέτοιων ικριωμάτων είναι νανοκλίμακας, όπως επίσης και οι υποδοχείς κυττάρων και οι υπόλοιπες διαρθρωτικές-λειτουργικές περιοχές. Οι αλληλεπιδράσεις μεταξύ βιομορίων, κυττάρων, συστατικών εξωκυττάριας μήτρας ακολουθούν νόμους νανοκλίμακας, επομένως τα νανοικρίωματα δύναται να μιμηθούν την δομή και λειτουργία της μήτρας του φυσικού οστού (Εικ. 1.2.2.). Επιπλέον, η εισαγωγή κατάλληλων νανοσωματιδίων στο ικρίωμα μπορεί να προσδώσει διαφορετικές ιδιότητες στο βιοϋλικό, όπως βελτιωμένη κυτταρική προσκόλληση και μηχανική αντοχή μέσω ενίσχυσης με νανοσωλήνες άνθρακα. (iv) (v)



Εικ. 1.2.2. Σχηματική απεικόνιση νανοδομημένων υλικών για οστική αναγέννηση, a) απομόνωση κυττάρων από ασθενή και καλλιέργεια αυτών, b) in vivo 2D επιφάνειες αποδοτικής επέκτασης κυττάρων, c) διάχυση κυττάρων σε πορώδη ικρίωματα μαζί με αυξητικούς παράγοντες, μικρομόρια, νανοσωματίδια, d) περαιτέρω καλλιέργεια κυττάρων σε βιοαντιδραστήρες, e) μεταμόσχευση του βιοϋλικού στον οργανισμό (v)

1.3. Ιστομηχανική

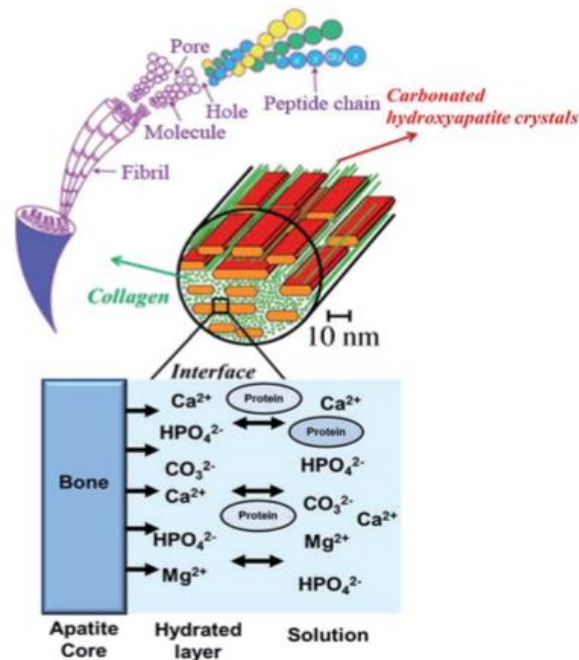
Η μηχανική ιστών είναι ο συνδυασμός επιστήμης και μηχανικής για την αποκατάσταση του ανθρώπινου μυοσκελετικού ιστού. Συνδυάζει μία πληθώρα βιολογικών και μηχανικών αρχών για τη δημιουργία λειτουργικών ιστών και οργάνων για μεταφύτευση, οι οποίες αποκαθιστούν, υποστηρίζουν ή βελτιώνουν τη λειτουργία των ιστών. Η αρχή της βασίζεται στο γεγονός ότι οι ιστοί μπορούν να απομονωθούν από έναν ασθενή, να επεκταθούν με μία καλλιέργεια και να εμφυτευτούν μέσα σε μια εξωκυττάρια μήτρα που καλείται ικρίωμα (scaffold). Τα ικρίωματα παραγόμενα από δομικά υλικά σχηματίζουν το νέο ιστό σύμφωνα με το τρισδιάστατο σχήμα τους. Η τρισδιάστατη αυτή κατασκευή μπορεί να μεταφτευθεί στον ίδιο ασθενή ως υποκατάστατο ιστού. Ακολούθως, αναπτύσσονται αιμοφόρα αγγεία εντός του νέου ιστού, το ικρίωμα αποικοδομείται και ο νέος ολοκληρωμένος ιστός συνδέεται με αυτούς που τον περιβάλλουν. Η τεχνολογία που αναπτύσσεται στη Μηχανική Ιστών υποστηρίζει τη δημιουργία ποικίλων ιστών συμπεριλαμβανομένων του δέρματος, χόνδρου, οστού, ήπατος, των νεύρων και αγγείων. Η επιτυχία της αναδημιουργίας ιστών αποδίδεται σε μεγάλο βαθμό στην ικανότητα του ικρίωματος για δομική μορφοποίηση και στην βιοδραστικότητά του με τα εμφυτευμένα κύτταρα. Οι βέλτιστες δομικές και θρεπτικές συνθήκες για την ανάπτυξη ενός ιστού διασφαλίζονται όταν χρησιμοποιείται ένας ήδη υπάρχων βιολογικός δομημένος τρισδιάστατος ιστός ως πρότυπο σύμφωνα με τον οποίο μπορεί να σχεδιαστεί η δομή του ικρίωματος. Για αυτό το σκοπό έχουν γίνει πολλές πρόοδοι στη Μηχανική Ιστών, στην επιστήμη των βιοϋλικών, στη βιομηχανική, βελτιστοποιήσεις στην ενσωμάτωση και λειτουργία των ιστών και επίσης στο σχεδιασμό, τη σύνθεση και την κατασκευή προηγμένων ικριωμάτων (tissue scaffold).(vi)(vii)(viii)(ix)(x)

1.4. Βιολογία και κύτταρα οστού

Το σκελετικό σύστημα αποτελείται από περίπου 205 οστά, τα οποία συνδέονται με αρθρώσεις και χόνδρους. Το οστό αποτελεί βασικό συστατικό του μυοσκελετικού συστήματος και η βασική του λειτουργία είναι η προστασία και υποστήριξη του σώματος. Σχετικά με την ιστομηχανική προσέγγιση, το κόκκαλο θεωρείται ένα ανισότροπο σύνθετο υλικό ιεραρχικής δομής και πορώδους, που εμπεριέχει οστικά κύτταρα, αιμοφόρα αγγεία μέσα σε μια διφασική μήτρα οργανικής και ανόργανης φύσεως (Εικ. 1.4.1.). Η οργανική φάση αποτελείται από ίνες κολλαγόνου, λιπίδια, πεπτιδία, πρωτεΐνες, γλυκοπρωτεΐνες, πολυσακχαρίτες και κιτρικά άλατα, ενώ η ανόργανη φάση αποτελείται από ασβεστοφωσφορικά, ανθρακικά, φθοριούχα άλατα, νάτριο και μαγνήσιο. Το κύριο στοιχείο του οργανικού μέρους της διφασικής μήτρας του οστού είναι το κολλαγόνο, μια ελαστική πρωτεΐνη, ενώ το βασικό ανόργανο μέρος της μήτρας είναι μια στερεά οστική ανόργανη ουσία φυσικής προέλευσης, το οποίο καλείται ανθρακικός υδροξυαπατίτης υποκατάστασης. Τα οστικά κύτταρα αποτελούν το 2-5% της οργανικής φάσης, εκ των οποίων το 95% είναι οι οστεο-

βλάστες και τα οστεοκύτταρα. Η κυτταρική συμπεριφορά καθορίζεται από χημικές παραμέτρους, όπως η λειτουργία αυξητικών παραγόντων, πρωτεολυτικών ενζύμων και αναστολέων. (i) (xi)

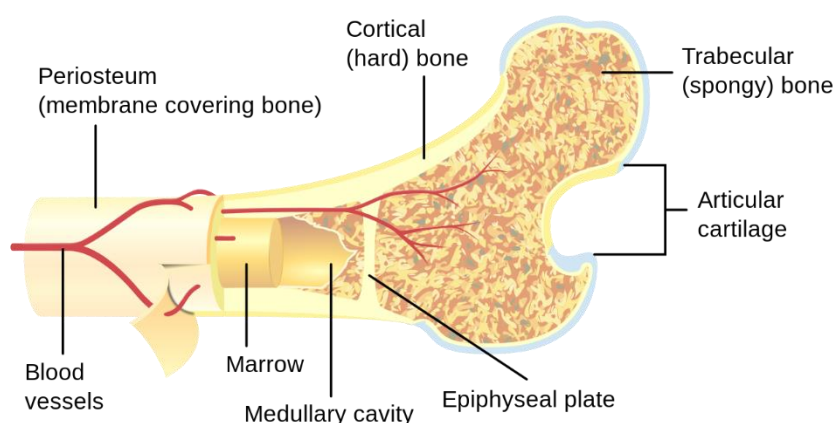
Το κολλαγόνο υπό μορφή ινών (κυρίως τύπου I), αποτελείται από μια βασική υπομονάδα μεταλλικών ινιδίων κολλαγόνου, τα οποία αυτόσυναρμολογούνται σε τριπλές έλικες μορίων κολλαγόνου. Η τριπλή κυλινδρική έλικα έχει μέση διάμετρο 1,5 nm και μήκος 300 nm, ενώ κάθε ινίδιο περιέχει τρεις πολυπεπτιδικές αλυσίδες με 1000 αμινοξέα έκαστην. Οι νανοκρυσταλλίτες υδροξυαπατίτη αναπτύσσονται πάνω στα ινίδια, με τον άξονα yy' των νανοκρυστάλλων ευθυγραμμισμένο με το μεγάλο άξονα των ινιδίων. Η διασύνδεση των κρυστάλλων νανουδροξυαπατίτη με τα ινίδια κολλαγόνου δύναται να λαμβάνει χώρα απευθείας επί των ινιδίων, είτε μέσω ενδιάμεσων μακρομορίων-καθοδηγητών, τα οποία συνδέονται με τα ινίδια κολλαγόνου. Οι μη κολλαγονούχες όξινες πρωτεΐνες που συνδέονται με το οστό πιθανόν ευθύνονται για την αναστολή ή προώθηση της πυρηνοποίησης και της ανάπτυξης των νανοκρυστάλλων υδροξυαπατίτη. Σχετικά με την μορφολογία νανοκρυστάλλων υδροξυαπατίτη, τα οποία αποτελούν το 70% του οστικού βάρους, έχουν θεμελιώδη μονάδα ένα κρύσταλλο σχήματος πλάκας μήκους περίπου 100 Å και πλάτους 20-30 Å. Οι κρύσταλλοι είναι διατεταγμένοι σε παράλληλα στρώματα εντός του κολλαγονώδους πλαισίου. Σε πολλά οστά τα στρώματα αυτά οργανώνονται σε μεγαλύτερες δομές υψηλής διάταξης, από μοριακό σε μακροσκοπικό επίπεδο. Τέλος, βασικό συστατικό του οστού αποτελεί το νερό, η ποσότητα του οποίου αποτελεί βασική παράμετρο καθορισμού μηχανικής συμπεριφοράς.



Εικ. 1.4.1. Σχηματική απεικόνιση της οστικής δομής, η οποία περιέχει κρυστάλλους ανθρακικού υδροξυαπατίτη και ίνες κολλαγόνου ^{xii}

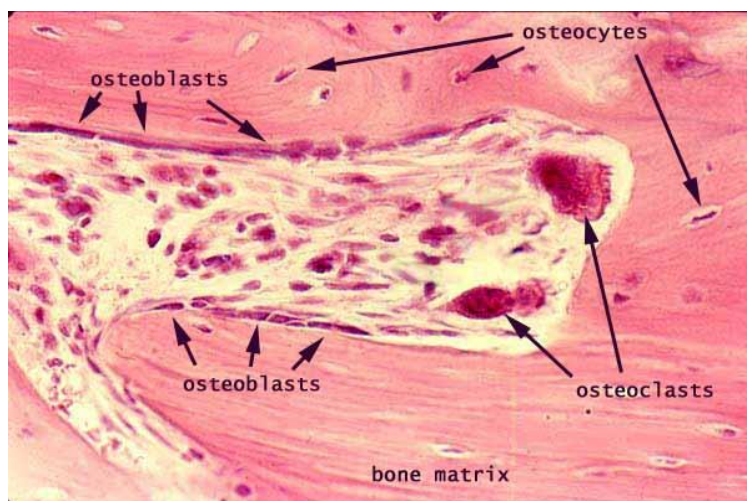
Ο συνδυασμός ινών κολλαγόνου, νανοκρυστάλλων ανθρακικού υδροξυαπατίτη και κυττάρων προσδίδει στο οστό την αντοχή, σκληρότητα και ικανότητα αυτοϊασής του.

Η αναλογία οστικών συστατικών και η δομή του ποικίλει ανάλογα με την ηλικία του οστού, την θέση του στον οργανισμό και την ιατρική προϊστορία του, σαν επακόλουθη την διαφορετική κατάταξή του ανάλογη με τα μηχανικά και λειτουργικά χαρακτηριστικά. Η βασική κατηγοριοποίηση του οστού αναφέρεται ως σπογγώδης (δοκιδώδης) ή φλοιώδης (συμπαγής) δομή. Οι σπόνδυλοι και τα πλατιά οστά της πυελικής ζώνης αποτελούνται από σπογγώδη ιστό, αλλά επιφανειακά καλύπτονται από φλοιώδη ιστό. Τα μικρότερα οστά αποτελούνται κυρίως από φλοιώδη ιστό, ενώ στο κεντρικό των επιφύσεων τους υπάρχει μικρό ποσοστό δοκιδώδους ιστού. Το πορώδες του φλοιώδους μέρους του οστού κυμαίνεται από 5-10% ενώ το σπογγώδες μέρος από 75-95%. Η εξωτερική πλευρά του οστού περιβάλλεται από το περίοστεο και η επιφάνεια που το χωρίζει από τα εξωτερικά όργανα καλείται περιοστεϊκή μεμβράνη. Σε μεγαλύτερο βάθος στο οστό βρίσκεται το συμπαγές οστόν, το οποίο σχηματίζεται από πετάλια και τα συστήματα Havers. Τέλος, προς το εσωτερικό του οστού υπάρχει ένα πλέγμα, που καλείται δοκίδες, στο οποίο προέρχεται ο μυελός των οστών (Εικ. 1.4.2.). (i) (xi)



Εικ. 1.4.2. Σχηματική απεικόνιση της δομής του οστού ^{xiii}

Εκτός από τα βασικά δομικά συστατικά του οστού (βιοαπατίτης-κολλαγόνο) υπάρχει ένας σημαντικός αριθμός κυττάρων, τα οποία ρυθμίζουν το οστικό μεταβολισμό. Τα κύτταρα αυτά είναι τριών ειδών, οι οστεοβλάστες, οι οστεοκλάστες και τα οστεοκύτταρα (Εικ. 1.4.3.). Αυτοί οι τρεις τύποι κυττάρων προέρχονται από δυο διαφορετικές γενεαλογίες βλαστικών κυττάρων, τα μεσοδερματικά και τα αιμοποιητικά, υπογραμμίζοντας τη μοναδικότητα της διαδικασίας ομοιόστασης του οστού και της στενής σχέσης που το συνδέει με το ανοσοποιητικό σύστημα.



Εικ. 1.4.3. Σχηματική απεικόνιση τύπων κυττάρων του οστού^{xxxv}

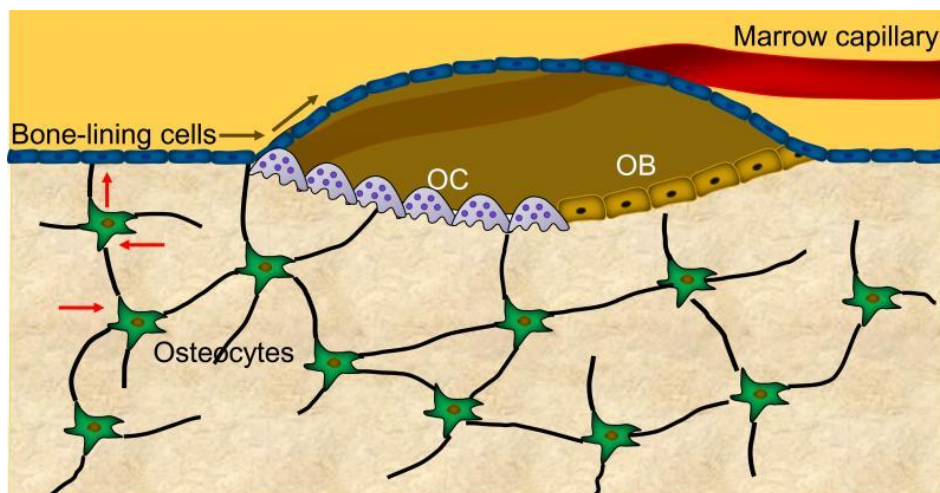
Σχετικά με τους οστεοβλάστες, αποτελούν κύτταρα μεγέθους 20-30 μm , τα οποία είναι υπεύθυνα για την απόθεση της οργανικής εξωκυττάριας μήτρας και της ασβεστοποίησής της, καθώς και παρατηρούνται συνήθως σε περιοχές που συμβαίνει η ασβεστοποίηση. Χαρακτηρίζονται από δομή που περιλαμβάνει εκτεταμένο ενδοπλασματικό δίκτυο και κυτταρικά χαρακτηριστικά που συμβάλλουν στην πρωτεϊνική σύνθεση και στην έκκριση πρωτεϊνών.

Οι οστεοκλάστες προέρχονται από αιμοποιητικά βλαστικά κύτταρα και δημιουργούνται από τη διαίρεση ενός μονοπυρηνικού πρόγονου κυττάρου. Τα μορφολογικά τους χαρακτηριστικά είναι παρόμοια των άλλων φαγοκυττάρων και το μέγεθός τους αυξημένο με όγκο που ξεπερνά τα $2 \times 10^5 \mu\text{m}^3$, ενώ διαθέτουν πάνω από 100 πυρήνες. Τα κύτταρα αυτά απορροφούν και αποικοδομούν το ήδη σχηματισμένο οστό, καθώς πραγματοποιείται έκκριση ινωδών πρωτεϊνών που προκαλούν την αποικοδόμηση.

Το τρίτο βασικό είδος οστικών κυττάρων, τα λεγόμενα οστεοκύτταρα είναι ουσιαστικά παράγωγα των οστεοβλαστών, οι οποίοι μετά τη διαδικασία σχηματισμού του οστού παρέμειναν σε κοιλότητες του νεοσχηματισθέντος οστού. Επομένως, πρόκειται για αποτέλεσμα μιας διαδικασίας «αυτό-ενταφιασμού» των οστεοβλαστών εξαιτίας της ίδιας της λειτουργίας, της έκκρισης οργανικής μήτρας, που επιτελούν. Ο κύριος ρόλος τους είναι να συντελούν στη μεταφορά υλικών από το υγρό περιβάλλον του ιστού στο οστό και αντιστρόφως.

Όπως προαναφέρθηκε, οι οστεοβλάστες είναι συντελούν άμεσα στο σχηματισμό των οστών, ενώ οι οστεοκλάστες τον αποδομούν. Αυτή είναι μια διαδικασία μοναδική για τον οργανισμό, καθώς ο οστικός ιστός δύναται να σχηματιστεί και αποικοδομηθεί ακολουθώντας μια κυκλική διαδικασία ανάλογη του κύκλου ζωής του. Η διαδικασία αυτή, η οποία δεν παρατηρείται σε άλλους ασβεστοποιημένους ιστούς (τένοντες, δόντια) καλείται οστική ανακατασκευή (bone remodeling). Η οστική ανακατασκευή (Εικ. 1.4.4.) είναι ένα περιοδικό φαινόμενο, το οποίο βασίζεται στη συνδυασμένη λειτουργία οστεοβλαστών και οστεοκλαστών εντός χρονικού διαστήματος των 3-6 μηνών. Σε αυτό το χρόνο οι οστεοκλάστες συγκεντρώνονται στην περιοχή της αποικοδόμησης, εκκρίνοντας H^+ πιθανότατα υπό τη μορφή γαλα-

κτικού οξέος, έτσι ώστε να δημιουργήσουν όξινο περιβάλλον και πρωτεάσες όπως είναι η πρωτεογλυκανάση και η κολλαγενάση. Αυτό το όξινο περιβάλλον μαζί με την παρουσία των συγκεκριμένων ενζύμων προκαλούν τόσο τη διάλυση του βιοαπατίτη όσο και την αποσύνθεση των πρωτεϊνών του οστού. Μετά την αποικοδόμηση της συγκεκριμένης περιοχής οι οστεοκλάστες εξαφανίζονται και σ' αυτή την περιοχή εμφανίζονται οι οστεοβλάστες, οι οποίοι δρουν σαν εκκινητές της διαδικασίας σύνθεσης του νέου οστού. Συγκεκριμένα, αποθέτουν την εξωκυτταρική μήτρα (κολλαγόνο I) και ελέγχουν την ασβεστοποίησή της εκκρίνοντας αυξητικούς παράγοντες. (xiv)(xv)



Εικ.1.4.4. Σχηματική απεικόνιση οστικής ανακατασκευής^{xvi}

Μια κρίσιμη παράμετρος της οστικής ανακατασκευής αποτελεί η σύζευξη (coupling) των οστεοβλαστών και οστεοκλαστών. Απαραίτητη προϋπόθεση για την εύρυθμη λειτουργία της διαδικασίας είναι η ισόποση αποικοδόμηση μάζας του οστού με την μάζα ανασχηματισμού του οστού. Σε διαφορετική περίπτωση, εμφανίζονται ανωμαλίες και ασθένειες όπως για παράδειγμα η οστεοπόρωση και η οστεοπέτρωση. Ο τρόπος με τον οποίο επιτυγχάνεται η άρτια συνεργασία μεταξύ των δύο κυττάρων είναι μέσω της έκφρασης από τους οστεοβλάστες των κυτταροκινών που ρυθμίζουν την κυτταρική διαίρεση των οστεοκλαστών, όπως είναι οι κυτταροκίνες M-CSF, RANKL και OPG. (xvii)

Η διαδικασία της οστικής ανακατασκευής χωρίζεται σε 5 φάσεις. Το πρώτο στάδιο περιλαμβάνει την ενεργοποίηση (activation) της διαδικασίας. Στο στάδιο αυτό δίνεται σήμα στους οστεοκλάστες να μεταβούν στο σημείο το οποίο πρόκειται να υποστεί ανακατασκευή. Στη συνέχεια ακολουθεί το στάδιο της απορρόφησης, όπου λαμβάνει χώρα η αποικοδόμηση της οργανικής και της ανόργανης φάσης από τους οστεοκλάστες. Μετά την ολοκλήρωση της αποικοδόμησης η διαδικασία αντιστρέφεται, συνιστώντας το στάδιο της αντιστροφής (reversal), κατά το οποίο το κολλαγόνο εναποτίθεται στην αποικοδομημένη από τους οστεοβλάστες περιοχή. Ακολούθως, στο στάδιο του σχηματισμού (formation) πραγματοποιείται η ασβεστοποίηση του κολλαγόνου και η ολοκλήρωση της διαδικασίας σχηματισμού νέου οστού. Ακολουθεί

τέλος, το στάδιο της ηρεμίας (quiescence), όπου το οστό παραμένει σε ανενεργή φάση.(xviii)

Εκτός από τα βασικά είδη κυττάρων του οστού, υπάρχουν και άλλα κύτταρα τα οποία συνδράμουν στην δημιουργία οστικού ιστού, όπως τα μεσεγγυματικά βλαστικά κύτταρα (MSCs), οι ινοβλάστες και τα ινοκύτταρα. Τα MSCs είναι πολυδύναμα στρωματικά κύτταρα, τα οποία μπορούν να ταξινομηθούν σε άλλες υποκατηγορίες, συμπεριλαμβανομένων των οστεοβλαστών, χονδροκυττάρων, λιποκυττάρων και τους νευρώνες. Η διαφοροποίηση αυτή των μεσεγγυματικών κυττάρων αποτελεί μια διαδικασία που εξαρτάται από κυτταρικό μέγεθος, το σχήμα και τη διαφορετική λειτουργία τους, που έγκειται στην τοπογραφία τους και στις επακόλουθες τροποποιήσεις γονιδιακής έκφρασης. Στην περίπτωση των βλαστικών κυττάρων, απαιτείται ένα σήμα ενεργοποίησής τους, που προέρχεται από το εξωκυτταρικό μικροπεριβάλλον, όπως αυξητικοί παράγοντες ή φυσικοχημικά μεταβαλλόμενα ερεθίσματα. Ωστόσο, ο έλεγχος και καθορισμός της διαφοροποίησης των βλαστικών κυττάρων, ανάλογα με την επιθυμητή γενεαλογία, αποτελεί πρόκληση για την κλάδο της ιστομηχανικής. Σχετικά με τους ινοβλάστες, είναι τα κύτταρα που παράγουν την εξωκυτταρική μήτρα και το κολλαγόνο και τα ινοκύτταρα αποτελούν τα ανενεργά βλαστικά κύτταρα. Επιπρόσθετα, τα κύτταρα σαρκώματος αποτελούν μια άλλη κατηγορία δευτερογενών καρκινικών κυττάρων, τα οποία έχουν μεσεγγυματική προέλευση και δύνανται να εντοπιστούν στο οστό, χόνδρο, λίπος και στους μυείς. (xix)

Βασικές προϋποθέσεις, που πρέπει να πληρούνται για την σωστή λειτουργία του οστικού ιστού, είναι η επαρκής στήριξη της δομής του, η προστασία του από τα υπόλοιπα όργανα, η διατήρηση της ομοιόστασης του ανόργανου τμήματός του και η παροχή αιμοποιητικών αρχέγονων κυττάρων στον ιστό, ενεργώντας ως ορυκτό άλας ασβεστίου και τροφοδοτώντας με κύτταρα το οστό και τους άλλους ιστούς. Συνεπώς, το οστό ακολουθεί έναν συνεχή κύκλο λειτουργιών, συγκεκριμένα της απορρόφησης και ανανέωσής του, με συνεπαγόμενη την σταδιακή διαρθρωτική αναδιαμόρφωσή του και τη μεταβολή της χημικής σύστασής του, λόγω μηχανικών και ορμονικών απαιτήσεων. Σε περίπτωση διαφορετικής αναλογίας, όπου η λειτουργία των οστικών αλάτων υπερβαίνει την δομική λειτουργία του οστού, επέρχεται απώλεια της δομικής οστικής ακεραιότητας. Οποιαδήποτε διατάραξη του ορμονικού ρυθμιστικού οστικού συστήματος οδηγεί σε ασθένειες, όπως η οστεοπόρωση (οστική ανεπάρκεια) και η νόσος Paget (υπερπαραγωγή οστού). Επιπλέον, κύρια προϋπόθεση για την άρτια λειτουργία του σκελετικού συστήματος αποτελεί η διαρκής παροχή του με οξυγόνο και θρεπτικά συστατικά, ενώ όποια εκφύλιση της παροχής συνεπάγεται παθολογική νόσο (όπως ο καρκίνος). Ωστόσο, το οστό αναπτύσσει κάποιες λειτουργίες θεραπείας του.

Το οστό έχει ικανότητες αυτοϊασης μέχρι ένα καθορισμένο όριο διαταραχής. Στην περίπτωση ζημιών μικρού βαθμού, ο ιστός είναι σε θέση να αυτοθεραπευτεί μέσω δυναμικής αναδιαμόρφωσής του, όμως σε περίπτωση μεγάλης καταστροφής του ιστού, πάνω από το όριο αυτοϊασης, απαιτούνται μέθοδοι θεραπείας, επανακαθορισμός παραμέτρων ποιότητας, τα οποία ακολουθούν πλαίσια ιστομηχανικής προσέγγισης και νανοτεχνολογίας. Η χρήση νανοϋλικών με σκοπό την ιστομηχανική

διόρθωση, προσφέρει την δυνατότητα ελέγχου δομής και ιδιοτήτων των συστατικών από νάνο σε μάκρο κλίμακα. Ο καθορισμός των υλικών σε μοριακό επίπεδο προσδίδει ελεγχόμενη μικροδομή, που μιμείται την φυσική δομή του οστού και καθοδήγηση της συμπεριφοράς των οστικών κυττάρων. (i)

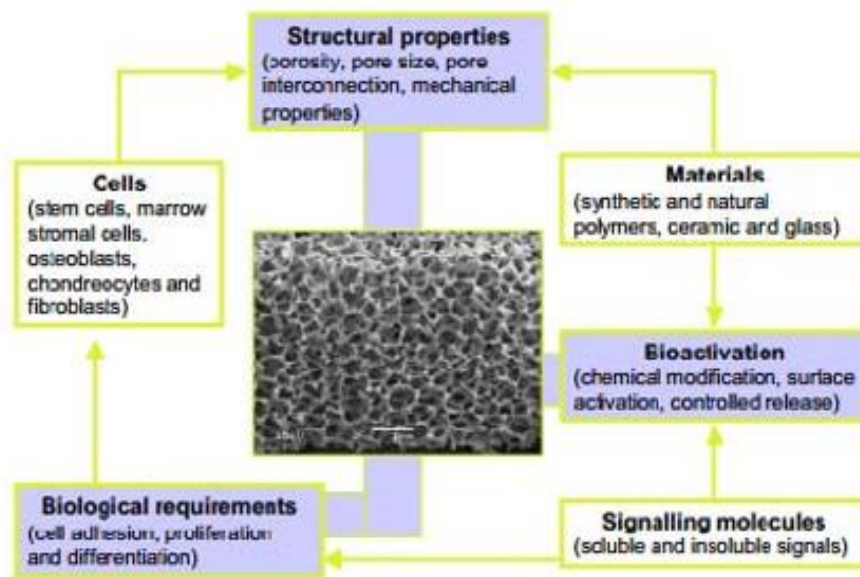
1.5. Ικρίωματα

Όσον αφορά στις ορθοπεδικές εφαρμογές, η ιστομηχανική αποτελεί ιδανικό τρόπο αντιμετώπισης ατελειών και ελαττωμάτων των οστών, συνδυάζοντας την ανάπτυξη οστεοκυττάρων και ένα βιοδιασπώμενο τρισδιάστατο ικρίωμα, προάγοντας την αναγέννηση του οστών και την επιδιόρθωση κατεστραμμένων ή ασθενικών οστών. Η επιτυχία αυτής της προσέγγισης εξαρτάται κυρίως από το μέγεθος του ελαττώματος το οποίο χρειάζεται επισκευή, εξαρτώμενο από την κατασκευή ολοκληρωμένου εσωτερικού καναλιού ελεγχόμενου διασυνδεδεμένου πορώδους, το οποίο προσδίδει ακαμψία στην περιβάλλουσα του νεοσχηματισμένου οστού, με σκοπό της αποφυγής μείωσης οστικής πυκνότητας (οστεοπενία), λόγω της αφαίρεσης των τυπικών τάσεων από το οστό μέσω ενός εμφυτεύματος. (xx)

Ένα τρισδιάστατο (3D) ικρίωμα αποτελεί το μέσο πάνω στο οποίο θα αναπτυχθεί το οστό, καθώς αποτελεί φορέα κυττάρων, ενεργοποιώντας την τεχνητή εξωκυτταρική μήτρα για κυτταρική προσκόλληση και πολλαπλασιασμό, μέσω της επιφάνειας και του πορώδους δικτύου τους. Τα βασικά κριτήρια που πρέπει να πληροί ένα ικρίωμα είναι τα εξής(xxi):

1. Βιοσυμβατότητα: η ικανότητα του ικριώματος να υποστηρίξει μια κυτταρική δραστηριότητα δίχως να επιφέρει μόνιμες ή και παροδικές τοξικές επιδράσεις στον ιστό. Επιπλέον, απαιτείται η ανάπτυξη μιας οστεοαγώγιμης επιφάνειας και πορώδους δικτύου, ώστε να προωθείται η προσκόλληση, πολλαπλασιασμός και προσανατολισμός των κυττάρων. Η οστεοεπαγωγή του ικριώματος αποτελεί βασική παράμετρο, όπου επάγεται ο σχηματισμός νέου οστού μέσω βιομοριακής σηματοδότησης και πρόσληψης προγονικών κυττάρων. Τέλος, η μικροδομή του ικριώματος πρέπει να προάγει την μεταφορά αιμοφόρων αγγείων και θρεπτικών συστατικών δια μέσου των πόρων, εντός λίγων εβδομάδων μετά την εμφύτευσή του.
2. Μηχανικές ιδιότητες: Οι μηχανικές ιδιότητες ενός ιδανικού οστικού ικριώματος θα πρέπει να συνάδουν με τις ιδιότητες των οστών υποδοχής και ποικίλλουν ευρέως ανάλογα με το είδος οστού (φλοιώδες, σπογγώδες). Το μέτρο Young του φλοιώδους οστού κυμαίνεται μεταξύ 15 και 20 GPa και του σπογγώδους οστού μεταξύ 0,1 και 2 GPa. Η αντοχή σε θλίψη κυμαίνεται μεταξύ 100 και 200 MPa για τον φλοιώδη ιστό, και μεταξύ 2 και 20 MPa για το σπογγώδη αντίστοιχα. Η μεγάλη διακύμανση των μηχανικών ιδιοτήτων του και η γεωμετρία του, καθιστά πρόκληση τον σχεδιασμό «ιδανικού οστικού ικριώματος».

3. Μέγεθος πόρων: η διασυνδεσιμότητα πορώδους δικτύου με μακροπορώδες μεγέθους 100 μm σε διάμετρο αποτελεί κύρια προϋπόθεση για την επιτυχή διάχυση των απαραίτητων θρεπτικών συστατικών και του οξυγόνου, ώστε να εξασφαλιστεί η κυτταρική επιβιωσιμότητα. Επιπλέον, η ύπαρξη πορώδους 200-350μm δρα συνεργιστικά στην ανάπτυξη του νέου οστού, ειδικότερα η ύπαρξη μικρο-μάκρο πορώδους. Ωστόσο, το πορώδες είναι ένα μέγεθος αντιστρόφως ανάλογο της μηχανικής αντοχής των ικριωμάτων. Επομένως, ο συνδυασμός μηχανικής αντοχής και βιολογικής απόκρισης μέσω επαρκούς πορώδους δικτύου είναι ένας δύσκολος ερευνητικός στόχος.
4. Βιοαπορροφησιμότητα: αποτελεί βασικό κριτήριο για την οστική αναγέννηση, κατά το οποίο το ικρίωμα θα πρέπει να αναπτύσσει παρόμοιες μηχανικές ιδιότητες με αυτές του ξενιστή ιστού και επίσης να είναι σε θέση να αποικοδομείται *in vivo*, κατά προτίμηση με ελεγχόμενο ρυθμό αναρρόφησης, μέχρι να δημιουργηθεί χώρος για οστική ανάπτυξη. Η αποικοδόμηση των ικριωμάτων διαφέρει ανάλογα με τις κλινικές εφαρμογές, καθώς χρειάζονται τουλάχιστον 9 μήνες για την αναγέννηση σπονδυλικής στήλης και 3-6 μήνες για την περίπτωση κρανιο-γναθοπροσωπικής.

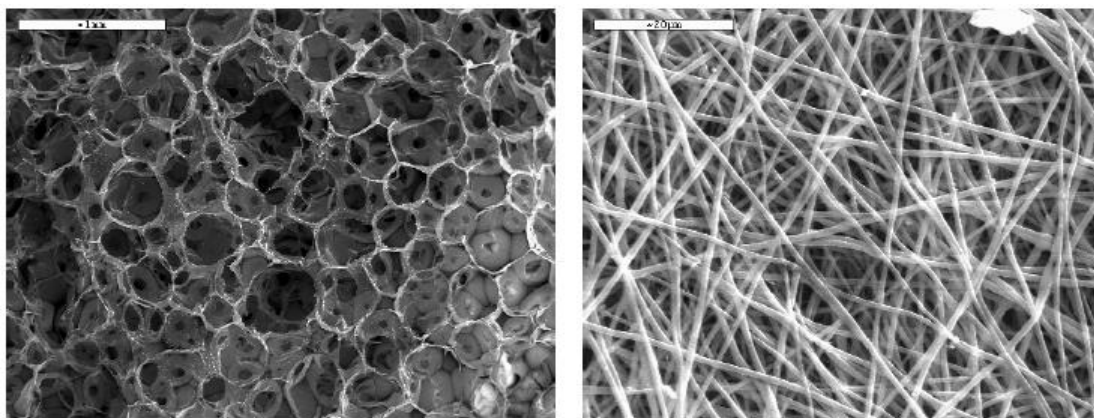


Εικ. 1.5.1. Σχηματική απεικόνιση των ιδιοτήτων των ικριωμάτων ^(xxii)

Σημαντική πρόοδος στην ιστομηχανική επιτυγχάνεται με ικρίωματα τρίτης γενιάς, τα οποία δρουν σαν φορείς μορίων, αυξητικών παραγόντων, γονιδίων και φαρμάκων. Τα βασικά βιομόρια είναι πρωτεΐνες, αυξητικοί παράγοντες, όπως το TGFb (Transforming growth factor-b), BMP (Bone morphogenetic protein), IGF (Insulin-like growth factor), FGF (Fibroblast growth factor) και VEGF (Vascular endothelial growth factor), τα οποία ελέγχουν την οστεογένεση και τον σχηματισμό εξωκυττάριας μήτρας (ECM) εκτελώντας τις αντίστοιχες αρμοδιότητές τους. Επιπλέον, η ενσωμάτωση κατάλληλων βιομορίων στα ικρίωματα μειώνει το χρόνο ανάρρωσης του ασθενή συντελώντας στην αμεσότερη θεραπεία. Σχετικά με τα φάρμακα που χρησιμοποιούνται σε ικρίωματα ιστομηχανικής, τα πιο συνηθισμένα

είναι η γενταμικίνη, η βανκομυκίνη, αλενδρονάτη, μεθοτρεξάτη, και το μπουπροφέν. Τα γονίδια που μεταφέρονται εντός των ικριωμάτων διευκολύνουν την οστεοεπαγωγμότητα, καθώς κωδικοποιούν την μεταφορά των αυξητικών παραγόντων σε συγκεκριμένα κύτταρα και κοινοποιούν την εξωγενή γονιδιακή και πρωτεϊνική έκφραση στους περιβάλλοντες ιστούς. Όσον αφορά στην αιμάτωση του προηγμένου ικριώματος, σε κατάσταση in vivo το σύστημα εφοδιάζεται με τα απαραίτητα θρεπτικά συστατικά και το οξυγόνο, ώστε να μην επέλθει νέκρωση του νέο-συντεθειμένου ιστού. Η αγγείωση λαμβάνει χώρα αυθόρμητα σε λίγες εβδομάδες μετά την εμφύτευση του ικριώματος.

Με βάση το ρυθμό αποδόμησης χαρακτηρίζονται σε προσωρινά και μόνιμα ικριώματα, όπου τα δεύτερα διατηρούν το σχήμα και την αντοχή τους κατά τη διάρκεια αναγέννησης ιστού σε αντίθεση με τα προσωρινά που διασπώνται σε απλούστερες δομές ή απορροφώνται. Σε σχέση με το κριτήριο σύνθεσης, διακρίνονται σε συνθετικά, φυσικής προέλευσης και σε συνδυασμό αυτών. Τα ευρύτερης χρήσεως συνθετικά ικριώματα είναι τα παράγωγα πολυλακτικού, πολυγαλακτικού οξέος, τα οποία ωστόσο προκαλούν φλεγμονές. Τα φυσικά ικριώματα παράγονται από κολλαγόνο, χιτοζάνη, χιτίνη, ζελατίνη, υαλουρονικό οξύ και παρουσιάζουν πλεονεκτήματα χρησιμοποιούμενα στην ιστομηχανική. Τα συστατικά των φυσικών τρισδιάστατης δομής ικριωμάτων πληρούν απαιτήσεις ακεραιότητας δομής, μη φλεγμονώδους, ανοσοποιητικής συμπεριφοράς, ωστόσο έχουν μικρές μηχανικές αντοχές, μεταβλητότητα σύνθεσης και μη καθορισμένο ρυθμό αποδόμησης. Με βάση τη δομή, σε εφαρμογές ανάπλασης οστίτη ιστού χρησιμοποιούνται πορώδη ικριώματα. (Εικ. 1.5.2.) Εν συνεχεία, τα υδροπηκτώματα χρησιμοποιούνται σε εφαρμογές ιστομηχανικής και αποτελούν κολλοειδείς διασπορές πολυμερών σε νερό. Ακολούθως, τα φυσικά ικριώματα εμφανίζουν ανάλογη δομή με την εξωκυττάρια ουσία στον οργανισμό και συνήθως αποτελούνται από κολλαγόνο I, ή II ή τα παράγωγά τους και γλυκοζοαμινογλυκάνες. Εμφανίζουν υψηλό πορώδες (μεγαλύτερο του 90%) και τα μεγέθη πόρων κυμαίνονται από 5-500μm. Άλλο ευρέως εφαρμοσμένο ικρίωμα φυσικής προέλευσης αποτελεί το ικρίωμα του πολυσακχαρίτη χιτίνης, καθώς και του παραγώγου του χιτοζάνης. Τα ικριώματα που αποτελούνται ή περιέχουν χιτοζάνη, εμφανίζουν αντικαρκινικές, αντιβακτηριακές, αντιμυκητιακές, αντιακές ιδιότητες, βιοσυμβατότητα, βιοαποδόμηση και αντιπηκτικές ιδιότητες. Ένα πολλά υποσχόμενο σύνθετο ικρίωμα για επιδιόρθωση οστών, αποτελεί ο συνδυασμός φυσικού πολυμερούς (χιτοζάνης ή κολλαγόνου) με υδροξυαπατίτη, ο οποίος ανήκει στην Α' κατηγορία βιοενεργότητας, λόγω της ικανότητάς του να συνδέεται με σκληρούς και μαλακούς ιστούς. (xxiii) (xxiv) (xxv) (xxvi)



Εικ. 1.5.2. Σχηματική απεικόνιση πορώδων και ινώδων ικριωμάτων ^{xxv}

Υπάρχουν πολλές τεχνικές κατασκευής ικριωμάτων, στις οποίες δύναται να βελτιωθεί η επιφάνειά τους, από την άποψη της τοπογραφίας και της χημικής τους δομής, καθιστώντας τα ικριώματα ιδανικά για ποικίλες εφαρμογές και για καθορισμένες ιδιότητες τόσο σε *in vitro* όσο και σε *vivo* συστήματα. Η εν λόγω σύνθεση τρισδιάστατων ικριωμάτων για ιστομηχανικές εφαρμογές αποτελεί μια σύνθετη τεχνική, καθιστώντας απαραίτητο τον έλεγχο σε κάθε στάδιο της μεθόδου παραγωγής και κρίσιμες τις τεχνικές ανάλυσης των αποτελεσμάτων. Όσον αφορά στις τεχνικές μετατροπής στερεών υλικών σε ικρίωμα, κατηγοριοποιούνται σε συμβατικές ή προηγμένες μεθόδους. Στις συμβατικές τεχνικές ανήκει η αεροποίηση, λυοφιλίωση, διαχωρισμός φάσεως, απομάκρυνση διαλύτη και σωματιδίων έκπλυσης, ρευστή χύτευση και στις προηγμένες η τρισδιάστατη εκτύπωση (3D printing), στερεολιθογραφία (SLA), electrospinning, αναστροφή φάσης, επιλεκτική πυροσυσσωμάτωση με laser (SLS) και εναπόθεση υγρής μοντελοποίησης (FDM). (xxvii)

1.6. Κεραμικά βιοϋλικά

Αρχικά, με τον όρο κεραμικά υλικά συμπεριλαμβάνονται τα ανόργανα υλικά αποτελούμενα από μεταλλικά και μη μεταλλικά συστατικά χημικά συνδεδεμένα μεταξύ τους. Μπορεί να είναι είτε κρυσταλλικά, είτε μη κρυσταλλικά, ενώ πολύ συχνή είναι η δομή στην οποία μια κρυσταλλική φάση είναι διεσπαρμένη σε μια μη κρυσταλλική. Το κύριο χαρακτηριστικό τους είναι η μεγάλη αντοχή τους σε υψηλές θερμοκρασίες, αλλά και η ψαθυρότητά τους. Βασικά χαρακτηριστικά τους είναι το χαμηλό βάρος τους, η υψηλή σκληρότητά τους, η μεγάλη αντοχή τους στη θερμότητα, στη φθορά και στη διάβρωση καθώς και η συνηθής μονωτική συμπεριφορά τους. Αναφορικά στην ευρεία περιοχή των κεραμικών, τα καρβίδια, νιτρίδια ή και οξειδία, βρίσκουν μια πληθώρα εφαρμογών ιδιαίτερα στον τομέα των υψηλών θερμοκρασιών και των ηλεκτρονικών απαιτήσεων. Οι τεχνικές παραγωγής κεραμικών κόνεων και τελικών προϊόντων συνεχώς εξελίσσονται με σκοπό να μειώσουν κάποια εγγενή μειονεκτήματα των κεραμικών, όπως η ευθραυστότητά τους. (xxviii)(xxix)

Τα κεραμικά που χρησιμοποιούνται για την επισκευή και ανακατασκευή ασθενικών ή κατεστραμμένων τμημάτων του μυο-σκελετικού συστήματος, ονομάζονται βιοκεραμικά. Τα βιοκεραμικά δύναται να είναι κρυσταλλικά (ζαφείρι), πολυκρυσταλλικά (αλουμίνα, υδροξυαπατίτης (HA)), ύαλοι (Bioglass), υαλοκεραμικά (Ceravital, A/W), ή και σύνθετα (ανοξείδωτος χάλυβας ενισχυμένος με ίνες Bioglass, πολυαιθυλενο-υδροξυαπατίτης (PE-HA)). Η χρήση τους στον κλάδο ιατρικής ποικίλει από γυαλιά, διαγνωστικά όργανα, χημικά προϊόντα, θερμομέτρα, φιάλες ιστοκαλλιέργειας, οπτικές ίνες ενδοσκόπησης κ.α. Επίσης, τα αδιάλυτα πορώδη γυαλιά βρίσκουν χρήση ως φορείς ενζύμων, αντιγόνων δεδομένου ότι παρουσιάζουν αυξημένη αντίσταση σε μικροβιακή προσβολή, μεταβολή του pH, των συνθηκών διάλυσης, της θερμοκρασίας, και παρέχουν δυνατότητα συσκευασίας τους υπό υψηλή πίεση.

Όσον αφορά στον κλάδο ορθοπαιδικής, τα προηγμένα βιοκεραμικά είναι τα κατάλληλα υλικά αντικατάστασης ισχύου, γοφών, γονάτων, δοντιών, τενόντων, συνδέσμων, επισκευής περιοδοντικής νόσου, ανακατασκευής γνάθου, αύξησης και σταθεροποίησης οστών της γνάθου, σπονδυλοδεσίας, και πληρωτικά οστού μετά μια επέμβαση όγκου. Στην οδοντιατρική, τα κεραμικά χρησιμοποιούνται ως υλικά αποκατάστασης, σαν πορσελάνινες κορώνες, ύαλοι ιονομερών τσιμέντων, σε οδοντοστοιχίες, κλπ.

Οι μηχανισμοί της διασύνδεσης βιοκεραμικών με τον ιστό δύναται να καθοριστούν με μεγάλη ακρίβεια, επιτρέποντας τον έλεγχό τους σε μοριακή κλίμακα, επομένως είναι εφικτή η διεπιφανειακή διασύνδεσή τους με τους σκληρούς και μαλακούς ιστούς. Επιπλέον, δύναται να αναπτυχθούν σύνθετα βιοκεραμικά μεγάλης σκληρότητας και μέτρου ελαστικότητας, συνδεδεμένα με το οστό. Η κλινική επιτυχία απαιτεί την επίτευξη μιας σταθερής διασύνδεσης με τον συνδετικό ιστό, καθώς και την κατάλληλη μηχανική συμπεριφορά του εμφυτεύματος.

Πορώδη βιοκεραμικά

Τα πορώδη βιοκεραμικά είναι αδρανή αυξημένης μηχανικής αντοχής, τα οποία ενδεικνύονται σαν κριώματα είτε δομικές γέφυρες μηχανικής οστών, καθώς υποβοηθούν το οστό να αναπτυχθεί διαμέσου του πορώδους δικτύου τους. Παρέχεται η δυνατότητα ανάπτυξης υλικών με μικροδομή παραπλήσια με αυτή των κοραλλιών, που να έχουν ελεγχόμενο μέγεθος πόρων. Για την δημιουργία πορώδων κεραμικών που να έχουν κοραλλοειδή μικροδομή ομοιόμορφου πορώδους και κατάλληλης διασυνδεσιμότητας, αναγκαία αρχική συνθήκη αποτελεί ο καθορισμός του σχήματος/μορφολογίας του υλικού σε μικροσκοπική κλίμακα. Παραδείγματα μίμησης αποτελούν τα κοράλλια *Porites* με μέγεθος πόρων από 140- 160 μm και τα κοράλλια *Goniopora* με αντίστοιχο μέγεθος 200-1000 μm, τα οποία αποτελούν μοτίβο σύνθεσης για την κατασκευή πορώδων υλικών όπως η α-αλουμίνα, φωσφορικό ασβέστιο, τιτάνια, σιλικόνη πολυουρεθάνης, PMMA και κράματα Co-Cr. Επιπλέον, είναι εφικτή η σύνθεση κεραμικών πορώδων επιφανειών μέσω πρόσμειξης διαλυτού μετάλλου είτε σωματιδίων αλάτων πάνω σε μια επιφάνεια, όπου το μέγεθος των πόρων και η μικροδομή πορώδους τους είναι ανάλογη του μεγέθους και σχήματος των σωματιδίων πρόσμειξης, τα οποία εν συνεχεία απομακρύνονται από την επιφάνεια.

νεια με χρήση κατάλληλου διαβρωτικού. Το πορώδες στρώμα που παράγεται μέσω αυτής της τεχνικής αποτελεί αναπόσπαστο μέρος της πυκνής κεραμικής φάσης του υλικού. Άλλη μέθοδος παρασκευής πορώδων υλικών, όπως αλουμίνας, αποτελεί η αφροποίηση, σύμφωνα με την οποία ένας παράγοντας αφρισμού δημιουργεί αέρια κατά την θέρμανση. Όσον αφορά στην παραγωγή πορώδων αργιλικών αλουμίνας και ασβεστίου, γίνεται ανάμιξη το κονιοποιημένου ανθρακικού ασβεστίου με λεπτή σκόνη αλουμίνας, έχοντας μέγεθος πόρου και κλάσμα όγκου ανάλογο του μεγέθους και της συγκεντρώσεως των σωματιδίων του αρχικού ανθρακικού ασβεστίου. Επομένως σε κάθε περίπτωση συνθέσεως πορώδων κεραμικών, οι αρχικές συνθήκες και υλικά είναι αλληλένδετα των προϊόντων, καθιστώντας τον έλεγχο της παραγωγικής διαδικασίας αναγκαίο και την επιλογή υλικών προϋπόθεση επίτευξης κατάλληλου πορώδες δικτύου.

Τα πορώδη υλικά έχουν μικρότερη αντοχή από τα αντίστοιχα συμπαγή, καθώς το πορώδες και η μηχανική αντοχή είναι μεγέθη αντιστρόφως ανάλογα σύμφωνα με την εξίσωση του Ryshkewitch:

$$\sigma = \sigma_0 e^{-cp}$$

όπου σ είναι η αντοχή σε θλίψη, σ_0 αντοχή σε θλίψη σε μηδενικό πορώδες, c σταθερά και p το πορώδες. Επιπλέον, στα πορώδη υλικά η επιφανειακή έκθεση είναι μεγαλύτερη από αυτή των συμπαγών υλικών και σαν αποτέλεσμα οι περιβαλλοντικές επιδράσεις που ευθύνονται για την μείωση της αντοχής του υλικού ασκούν πιο σημαντική επιρροή, συγκριτικά με τις δυσχερείς συνθήκες που επηρεάζουν την αντοχή μη πορώδων υλικών. (xxii)

Κεραμικά φωσφορικού ασβεστίου

Τα βιοκεραμικά φωσφορικού ασβεστίου προκαλούν εμφανίζουν σημαντική πρόοδο στον ιατρικό και οδοντιατρικό κλάδο τα τελευταία 20 χρόνια. Ορισμένες εφαρμογές αυτών είναι σε οδοντιατρικά εμφυτεύματα, διαδερμικές συσκευές, περιοδοντική θεραπεία, αύξηση της φατνιακής σειράς, ορθοπεδική, γναθοπροσωπική χειρουργική, ωτορινολαρυγγολογία, και χειρουργική επέμβαση νωτιαίου μυελού. Η κάθε εφαρμογή απαιτεί την χρήση είτε βιοενεργού είτε βιοαπορροφήσιμου φωσφορικού ασβεστίου, το οποίο αντιστοιχεί σε συγκεκριμένη φάση του κεραμικού (Πίνακας 1.6.1.).

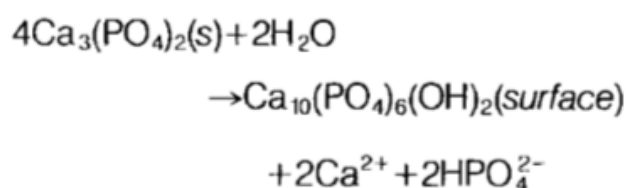
Πίνακας 1.6.1. Εφαρμογές βιοκεραμικών (xxii)

Ορθοπεδική	Αλούμινα, PE-HAρ, σταθεροποιημένη ζirkονία
Επιστρώσεις επικαλύψεων (ορθοπεδικά, οδοντιατρικά και γναθοπροσωπικά εμφυτεύματα)	HAρ, βιοενεργά γυαλιά, βιοενεργά υαλοκεραμικά
Οδοντιατρικά εμφυτεύματα	Αλούμινα, HAρ, βιοενεργά γυαλιά
Αύξηση της φατνιακής σειράς	Αλούμινα, HAρ, HAρ-PLA, HAρ-αυτογενές οστικό σύνθετο, βιοενεργά γυαλιά
Ωτολαρυγγολογία	HAρ, βιοενεργά γυαλιά, βιοενεργά υαλοκε-

	ραμικά, αλούμινα
Τεχνητός τένοντας, συνδέσμοι	Σύνθετα PLA-ανθρακονήματα
Τεχνητές αρτηριακές βαλβίδες	Πυρολυτικά επιχρίσματα άνθρακα
Επιστρώσεις για την ανάπτυξη ιστού (καρδιαγγειακά, ορθοπεδικά, οδοντιατρικά και γναθοπροσωπικά πρόσθετα)	Αλούμινα
Προσωρινά πληρωτικά οστού	TCP, άλατα ασβεστίου και φωσφόρου
Περιοδοντική επέμβαση	HAρ-PLA, HAρ, άλατα ασβεστίου και φωσφόρου, TCP, βιοενεργά γυαλιά
Γναθοπροσωπική ανακατασκευή	HAρ-PLA, HAρ, αλούμινα, βιοενεργά γυαλιά
Διαδερμική συσκευές	HAρ, βιοενεργά γυαλιά, βιοενεργά υαλοκεραμικά
Ορθοπεδικά πρόσθετα επιδιόρθωσης	Σύνθετα PLA- ίνες άνθρακα, PLA-ίνες υάλου φωσφορικού ασβεστίου
Χειρουργική σπονδυλικής στήλης	HAρ, βιοενεργά υαλοκεραμικά

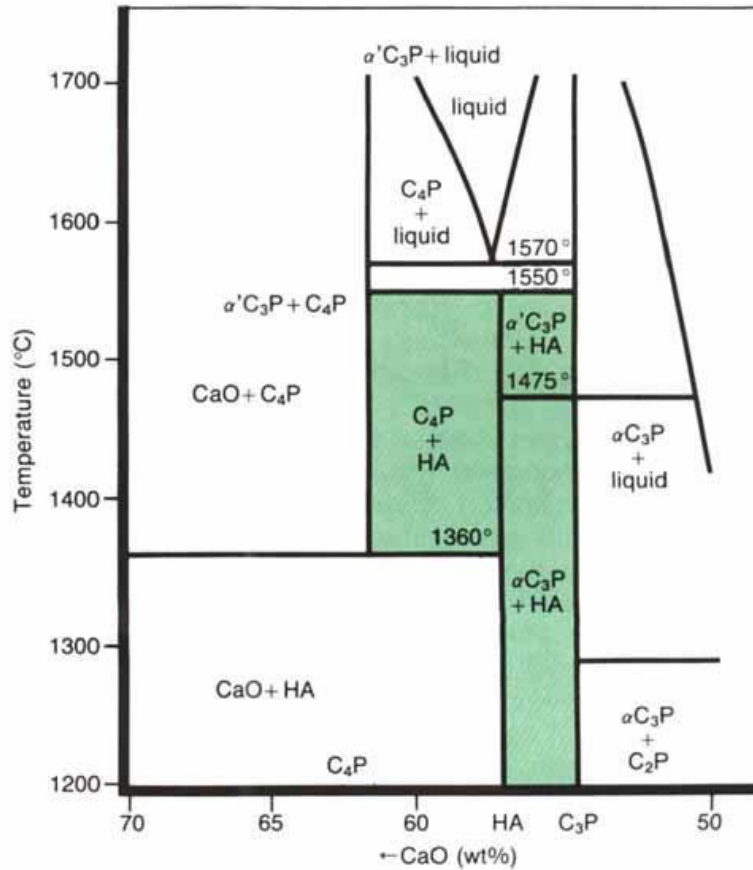
Οι σταθερές φάσεις κεραμικών φωσφορικού ασβεστίου εξαρτώνται σημαντικά από τη θερμοκρασία και την παρουσία ύδατος, είτε κατά τη διάρκεια της επεξεργασίας ή στο περιβάλλον χρήσης του. Σε θερμοκρασία σώματος είναι σταθερά μόνο δύο φωσφορικά άλατα ασβεστίου ερχόμενα σε επαφή με υδατικά μέσα (σωματικά υγρά): σε pH <4.2 η σταθερή φάση είναι το όξινο φωσφορικό διασβέστιο ή μπρουσίτης C₂P (CaHPO₄ 2H₂O), ενώ σε pH ≥ 4,2 η σταθερή φάση είναι ο υδροξυαπατίτης HA (Ca₁₀(PO₄)₆(OH)₂). Σε υψηλότερες θερμοκρασίες, οι φάσεις που ευνοούνται είναι το β-φωσφορικό τριασβέστιο C₃P ή TCP (Ca₃(PO₄)₂) και το φωσφορικό τετρασβέστιο (C₄P Ca₄P₂O₉).

Οι μη ενυδατωμένες φάσεις φωσφορικού ασβεστίου σε περιβάλλον υψηλής θερμοκρασίας αλληλοεπιδρούν με το νερό ή τα υγρά του σώματος, στους 37°C και σχηματίζουν υδροξυαπατίτη. Οι μορφές του υδροξυαπατίτη σε εκτεθειμένες επιφάνειες του το β-φωσφορικού τριασβέστιου ακολουθούν την παρακάτω αντίδραση:



Επομένως, η διαλυτότητα της επιφάνειας του β-φωσφορικού τριασβέστιου προσεγγίζει τη διαλυτότητα του υδροξυαπατίτη και μειώνει το pH του διαλύματος, το οποίο αυξάνει περαιτέρω τη διαλυτότητα του β-φωσφορικού τριασβέστιου και ενισχύει την απορρόφηση. Ο λόγος ασβεστίου/ φωσφόρου Ca/ P είναι κρίσιμος για τον προσδιορισμό της διαλυτότητας και της τάσεως απορρόφησης στο σώμα. Η παρουσία μικροπορώδους στο πυροσυσσωματωμένο κεραμικό υλικό δύναται να αυξήσει την διαλυτότητα αυτών των φάσεων και στην περίπτωση πυροσυσσωματωμένου φωσφορικού ασβεστίου η αντίδραση λαμβάνει χώρα στο θερμοκρασιακό εύρος (1000-1500)°C, όπου συμπιεσμένη κονία μετατρέπεται σε ένα συμπιεσμένο κεραμικό καθορισμένου σχήματος. Οι φάσεις που σχηματίζονται σε

υψηλή θερμοκρασία δεν εξαρτώνται μόνο από τη θερμοκρασία, αλλά και από την μερική πίεση του νερού στην ατμόσφαιρα συντήξεως. Σε υδατικό περιβάλλον ευνοείται ο σχηματισμός του υδροξυαπατίτη, ο οποίος αποτελεί σταθερή φάση έως τους 1360°C, ενώ σε μη υδατικό περιβάλλον οι αντίστοιχες σταθερές φάσεις είναι αυτές του φωσφορικού τετρασβεστίου και του β-φωσφορικού τριασβεστίου (όπως φαίνεται στο παρακάτω διάγραμμα του CaO, P₂O₅ με μερική πίεση νερού 66kPa):



Εικ. 1.6.1. Διαγραμματική απεικόνιση ισορροπίας φάσεων φωσφορικού ασβεστίου με 500 mmHg (-66-kPa) μερική πίεση του νερού, όπου οι σκιάσεις αντιπροσωπεύουν τα είδη υδροξυαπατίτη (HA) που περιέχουν τα εμφυτεύματα^(xxii)

Το θερμοκρασιακό εύρος για τη σταθερή φάση του υδροξυαπατίτη αυξάνεται με τη μερική πίεση του νερού, καθώς και το ποσοστό των μεταβάσεων φάσης του φωσφορικού τετρασβεστίου και του β-φωσφορικού τριασβεστίου σε υδροξυαπατίτη. Λόγω εμποδίων στην κινητική προσέγγιση, επηρεάζεται το ποσοστό σχηματισμού σταθερής φάσεως φωσφορικού ασβεστίου και καθίσταται ασαφής ο προσδιορισμός του ακριβούς κλάσματος όγκου των φάσεων υψηλού θερμοκρασιακού εύρους κατά την διάρκεια πυροσυσσωμάτωσης και η εύρεση της σχετικής σταθερότητας των φάσεων όταν ψύχονται σε θερμοκρασία δωματίου. Τα κεραμικά φωσφορικού ασβεστίου χρησιμοποιούνται ως εμφυτεύματα μόνο εφόσον έχουν επαρκή μηχανική αντοχή, όπως αντοχή σε εφελκυσμό, κόπωση και συμπίεση, μεγέθη που εξαρτώνται έντονα από το συνολικό όγκο πορώδους. Το πορώδες δύναται να είναι σε μορφή μικροπορώδους (<1 μm σε διάμετρο, λόγω ατελούς πυροσυσσωμάτωσης) ή

μακροπορώδους (>100 μm σε διάμετρο, ενδείκνυται για ανάπτυξη οστού). Η εξάρτηση της αντοχής σε θλίψη (σ_c) από τον συνολικό όγκο πορώδους (V_p) ακολουθεί την παρακάτω σχέση:

$$\sigma_c = 700 \exp(-5V_p) \text{ MPa}$$

όπου το εύρος του συνολικού όγκου πορώδους V_p εκτείνεται από 0 μέχρι 0.5. Ομοίως, αντοχή σε εφελκυσμό σ_t εξαρτάται από τον κλάσμα όγκου του μικροπορώδους V_m σύμφωνα με την ακόλουθη σχέση:

$$\sigma_t = 220 \exp(-20V_m) \text{ MPa}$$

Όσον αφορά στον συντελεστή Weibull (n), πρόκειται για μια στατιστική θεωρία που χρησιμοποιείται σε συνδυασμό με πειραματικά δεδομένα, για να εκτιμηθεί ο κίνδυνος θραύσης ενός κεραμικού. Ο συντελεστής υπολογίζεται από την κλίση της καμπύλης Weibull και εκφράζει το εύρος διασποράς των τιμών αντοχής. Άρα, το μέγεθος αυτό αποτελεί ένα μέτρο διακύμανσης της αντοχής ενός υλικού. Οι υψηλές τιμές του συντελεστή αποτελούν ένδειξη περιορισμένης διακύμανσης της αντοχής και επομένως προσδίδουν μεγαλύτερη αξιοπιστία ποιότητας του υλικού. Ο συντελεστής Weibull (n) των εμφυτευμάτων υδροξυαπατίτη παρουσιάζεται χαμηλός σε φυσιολογικά διαλύματα ($n=12$), επομένως υποδεικνύει χαμηλή αξιοπιστία υπό φορτία εφελκυσμού. Κατά συνέπεια, σε κλινικές εφαρμογές τα βιοκεραμικά φωσφορικού ασβεστίου χρησιμοποιούνται ως (1) σκόνες, (2) μικρά εμφυτεύματα, (3), οδοντικά εμφυτεύματα ενισχυμένα με μεταλλικά στηρίγματα (4) επιχρίσματα σε μεταλλικά εμφυτεύματα, (5) χαμηλής- φόρτισης πορώδη εμφυτεύματα, όπου η ανάπτυξη των οστών δρα ως ενισχυτικό φάσης, (6), βιοδραστικά φάσεως σε σύνθετα πολυμερούς-βιοενεργού κεραμικού.

Σχετικά με την διασύνδεση εμφυτευμάτων υδροξυαπατίτη με το οστό, στην επιφάνεια του υδροξυαπατίτη εμφανίζεται μια κυτταρική οστική μήτρα από διαφοροποιημένους οστεοβλάστες, παράγοντας μια στενή άμορφη πυκνή ηλεκτρονιακή ζώνη εύρους 3 έως 5 μm, όπου και αναπτύσσονται εν συνεχεία οι οστικοί κρυσταλλίτες. Στην περιοχή μεταξύ της ηλεκτρονιακής ζώνης και των κυττάρων παρατηρείται εμφάνιση ινών κολλαγόνου (σύμπλεγμα πολλών λεπτότερων ινών κολλαγόνου). Καθώς η περιοχή ωριμάζει, η ζώνη συνδέσεως συρρικνώνεται από 0,05 έως 0,2 μm σε βάθος και σαν επακόλουθο το οστό του οργανισμού συνδέεται επιταξιακά μέσω του λεπτού στρώματος διασύνδεσης με το μεγαλύτερο μέρος του εμφυτεύματος υδροξυαπατίτη. Η σημασία του λεπτότατου πάχους στρώματος διασύνδεσεως οστού με τα εμφυτεύματα υδροξυαπατίτη, έγκειται στο γεγονός ότι το μέτρο ελαστικότητας αυτής περίπτωσης είναι πολύ αυξημένο συγκριτικά με το αντίστοιχο που παρατηρείται σε εμφυτεύματα βιοενεργών υαλοκεραμικών και βιοενεργών γυαλιών.

Σύνθετα βιοκεραμικά

Με τον όρο σύνθετα υλικά αναφερόμαστε σε εκείνα τα υλικά, τα οποία είναι ετερογενή σε μακροκλίμακα και κατασκευάζονται από δύο ή περισσότερα υλικά,

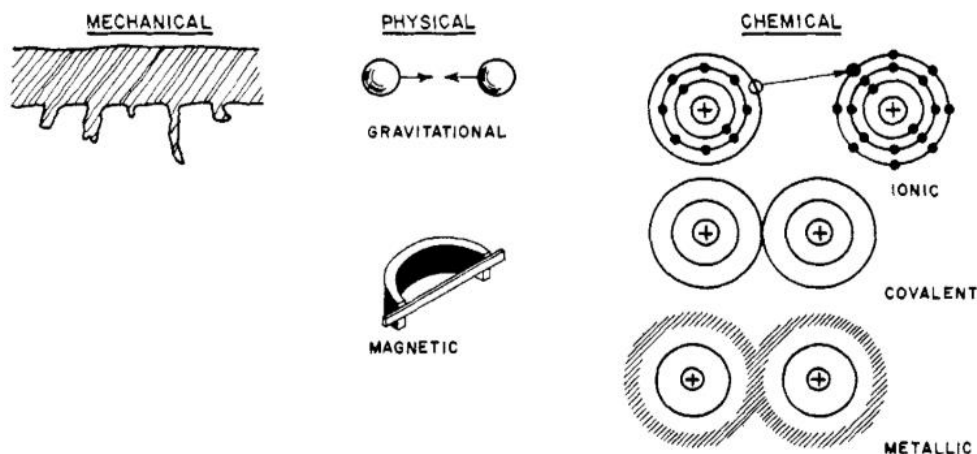
χωρίς να αναπτύσσουν μεταξύ τους χημικό δεσμό. Τα σύνθετα κεραμικά υλικά, τα οποία χρησιμοποιούνται σε κλινικές εφαρμογές, πέραν βιοσυμβατότητας πρέπει να επιδεικνύουν κατάλληλες μηχανικές αντοχές, ωστόσο η μηχανική συμπεριφορά τους αποτελεί προβληματική περιοχή κάτω από συνθήκες έντονων τάσεων. Τα βιοκεραμικά παρουσιάζουν ψαθυρότητα, εμφανίζουν ρωγμές ή/και κυκλική κόπωση, φαινόμενα που πρέπει να περιοριστούν. Η χρήση βιοκεραμικών επικαλύψεων και η ανάπτυξη συνθέτων κεραμικών αποτελούν κατάλληλες προσεγγίσεις επίλυσης των προαναφερθέντων περιορισμών. Το είδος κεραμικού που θα χρησιμοποιηθεί, όπως αδρανές, απορροφήσιμο, βιοενεργό, ποικίλει ανάλογα με την επιθυμητή συμπεριφορά που απαιτεί κάθε εφαρμογή. Στις περισσότερες περιπτώσεις αναγκαιότητα αποτελεί η αύξηση αντοχής σε κάμψη, η μείωση του μέτρου ελαστικότητας και η αποφυγή αστοχίας υλικού.

Σχετικά με την μηχανική αναδόμηση οστού, το συμπαγές μέρος του οστού παρουσιάζει ανισότροπη παραμόρφωση και συγκεκριμένη αντοχή σε θραύση, τα οποία χαρακτηριστικά προκύπτουν από την σύνθετη σύστασή του (ινίδια κολλαγόνου και εύθραυστα κρύσταλλα ανθρακικού υδροξυαπατίτη). Συγκεκριμένα, το μέτρο ελαστικότητας του φλοιώδους μέρους του οστού κυμαίνεται από 7 έως 25 Gpa, το κρίσιμο όριο αντοχής σε εφελκυσμό αυξάνεται με εύρος από 600 Jm^{-2} μέχρι 5000 Jm^{-2} , μεγέθη ανάλογα της ηλικίας, του προσανατολισμού του οστού και των συνθηκών τάσεων. Μια πληθώρα βιοκεραμικών κατέχουν μεγαλύτερη σκληρότητα από τα οστά, ωστόσο αρκετά παρουσιάζουν μικρή αντοχή σε θραύση.

Συνεπώς, μια μέθοδος εξασφάλισης βιομιμητικών ιδιοτήτων επέρχεται με την ανάπτυξη βιοσυμβατών σύνθετων πολυμερών, όπως πολυαιθυλενίου, με δεύτερη φάση ένα κεραμικό υψηλότερου συντελεστή μηχανικής αντοχής, όπως σκόνη υδροξυαπατίτη. Το σύνθετο υλικό υδροξυαπατίτη-πολυαιθυλενίου παρουσιάζει ιδιότητες παραπλήσιες με αυτές του οστού και σε συνθήκες αύξησης κλάσματος όγκου του υδροξυαπατίτη σε 0,5 αποκτά αυξημένο μέτρο ελαστικότητας (1-8) Gpa και πολύ μειωμένη πιθανότητα αστοχίας από >90% σε 3%. Η μετάβαση από όλκιμη σε ψαθυρή συμπεριφορά προκύπτει για κλάσμα όγκου του υδροξυαπατίτη που κυμαίνεται μεταξύ 0,4 και 0,45. Επιπλέον, το σύνθετο βιοκεραμικό αποκτά αντοχή σε εφελκυσμό (22-26) Mpa και αυξημένη αντοχή σε θραύση, για κλάσμα όγκου υδροξυαπατίτη <0.4, λόγω της παραμόρφωσης που σχετίζεται με τη διάδοση ρωγμών. (xxii)

1.7. Διεπιφανειακοί δεσμοί μεταξύ οστού και πρόσθετου μέλους

Οι τρεις βασικοί τύποι διεπιφανειακού δεσμού (Εικ. 1.7.1) είναι: 1) οι μηχανικοί δεσμοί, 2) δεσμοί μέσω φυσικών δυνάμεων και 3) οι χημικοί δεσμοί. Οι μηχανικοί δεσμοί είναι φαινόμενο που έγκειται στην τάσης αντίστασης στην αδράνεια με επακόλουθη την ανάπτυξη συγκεκριμένης διεπιφανειακής δομής. Αυτή η διασύνδεση αποτελεί βάση για πορώδη πρόσθετα μέλη και για παραδοσιακές μεθόδους επανόρθωσης οστών μέσω προσθέτων όπως βίδες, λάμες και καρφιά. (xxx)

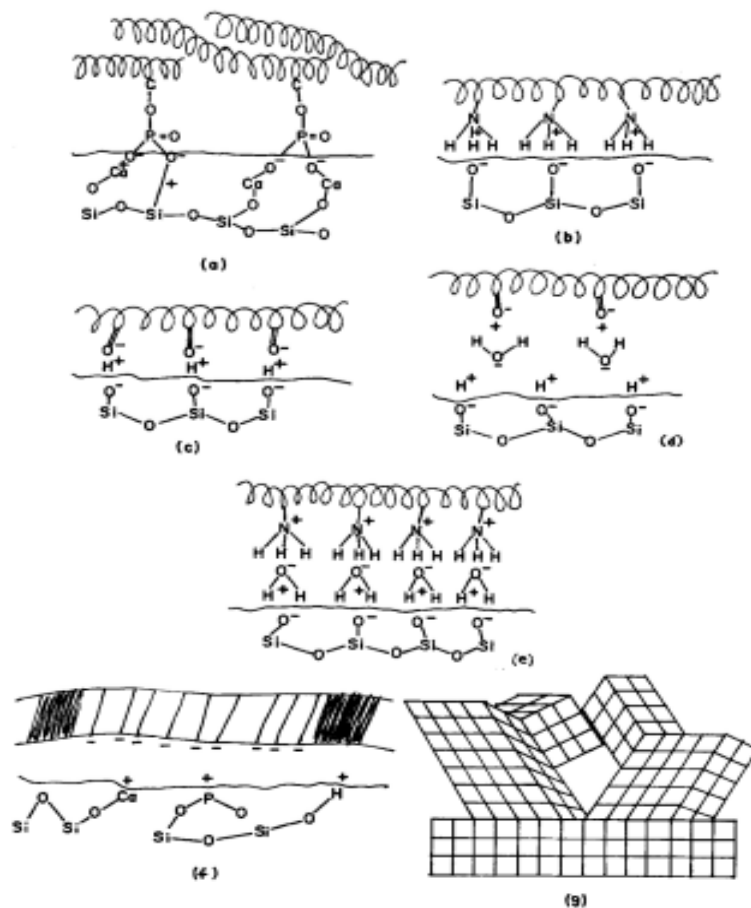


Εικ. 1.7.1. Σχηματική απεικόνιση των τριών διαφορετικών διεπιφανειακών δεσμών^{xxx}

Η εσωτερική ανάπτυξη οστού μέσα στους πόρους ενός βιοϋλικού δύναται να παρέχει μια συγκεκριμένη και μόνιμη στήριξη. Ωστόσο, οι μηχανικές αντοχές, οι οποίες καθορίζονται από τον μηχανικό δεσμό με το οστό, αποτελούν μια προβληματική περιοχή. Ο επί τοις εκατό όγκος των πόρων που καταλαμβάνεται από την εσωτερική οστική ανάπτυξη δεν είναι σχεδόν ποτέ 100% και ως εκ τούτου η αντοχή μειώνεται από το μη κατειλημμένο κλάσμα όγκου. Η οστεοποίηση λαμβάνει χώρα μέσα στους πόρους μόνο εάν οι πόροι είναι της τάξεως των περίπου 150μm, επομένως μόνο αν το κλάσμα μεγέθους των πόρων είναι μικρότερο από το κρίσιμο μέγεθος. Κατά συνέπεια, η διεπιφανειακή αντοχή μειώνεται περαιτέρω από το ποσοστό των μη οστεοποιημένων πόρων. Μια επιπρόσθετη παράμετρος, η οποία μειώνει τις αντοχές μηχανικής διεπιφανειακής διασύνδεσης μεταξύ πορώδων βιοϋλικών και οστού, αποτελεί η μείωση της αντοχής του πορώδους υλικού, το οποίο είναι ανάλογο του μεγέθους πόρων και του όγκου κλάσματος πόρων. Σύμφωνα με το προαναφερθέν, συμπεραίνεται ότι ο μηχανικός διεπιφανειακός δεσμός μέσα σε μια πορώδη δομή θα προκύπτει 0.1-0.3 φορές της αντοχής δεσμού ενός στερεού υλικού, εφόσον η οστεοποίηση ξεκινά πάνω και ενδιάμεσου των πόρων. Στην περίπτωση που προκύπτει μερική ή πλήρης αναστολή δημιουργίας οστού σε περιοχές της πορώδους διεπιφάνειας με τον ταυτόχρονο σχηματισμό ινώδους στρώματος, τότε η αντοχή του οστού στην διεπιφάνεια τείνει να μειωθεί σε 0.1-0.5 της αντοχής του κανονικού οστού. Οι συμβατικές μέθοδοι επανάκτησης σκελετικού ιστού, οι οποίες συμπεριλαμβάνουν βίδες, σύρματα κ.α. παρουσιάζουν μειονεκτήματα λόγω των περιοχών χαμηλής διατομής που φέρουν ισχυρό φορτίο και της ύπαρξης ινώδων μεμβρανών που μειώνουν την σταθερότητα του διεπιφανειακού δεσμού. Σε ορισμένες περιπτώσεις, η αποκατάσταση πραγματοποιείται μέσω περισσότερων από μια πλακών και η διασύνδεσή τους με το οστό εξαρτάται από τη θέση της πλάκας και την ποιότητα της σύνδεσης. Για την επίτευξη της βέλτιστης αντοχής και ακαμψίας, οι ορθοπεδικές πλάκες πρέπει να τοποθετούνται με τέτοιο τρόπο, ώστε το κανονικό μοτίβο φόρτισης να φέρει εφελκυστικό φορτίο επί της κάθε πλάκας. Επίσης η ακαμψία της οστεοσύνθεσης αποτελεί ένα παροδικό φαινόμενο ανάλογο της απορρόφησης του οστού γύρω από τα σπειρώματα. Συγκεκριμένα, η ανισοτροπία της

οστεοσύνδεσης μειώνεται με την παρέμβαση των δύο πλακών αποκαθιστώντας υψηλά επίπεδα αντοχής και ακαμψίας της στερέωσης, ωστόσο δεν εξαλείφεται πλήρως ο σχηματισμός μεμβράνης και το πρόβλημα απορρόφησης. Συνεπώς, ο μηχανικός δεσμός παρουσιάζει σημαντικούς περιορισμούς με συνεπακόλουθη την μη-μόνιμη αποκατάσταση του σκελετικού ιστού.

Όσον αφορά στους φυσικούς δεσμούς, οι οποίοι ενεργοποιούνται μέσω φυσικών ερεθισμάτων όπως μαγνητικές ή βαρυτικές δυνάμεις, δεν ενδεικνύται ως αποτελεσματική τεχνική αποκατάστασης οστού και μέσω εις άτοπο επαγωγής οι χημικοί δεσμοί αποτελούν τον πιο λυσιτελή τρόπο διασύνδεσης. Στην παρακάτω σχηματική απεικόνιση αναπαρίστανται οι τύποι χημικών διεπιφανειακών δεσμών μεταξύ βιολιλικού και ιστού (Εικ. 1.7.2.). Στην αναπαράσταση 1.7.2.a. αναπαρίσταται ο άμεσος ομοιοπολικός-ιοντικός δεσμός της ομάδας PO_4^{3-} συνδεδεμένης ταυτόχρονα με ένα οργανικό συστατικό του οστού και ένα κατιόν ή ιόν οξυγόνου μιας κεραμικής επιφάνειας. Στο 1.7.2.b. παρουσιάζεται ο ηλεκτροστατικός χημικός δεσμός μεταξύ μιας θετικά φορτισμένης αμινομάδας (όπως οργανικής λυσίνης, αργινίνης, υδροξυλυσίνης) με μια αρνητικά φορτισμένη οξυγονούχα ομάδα της επιφάνειας κεραμικού. Σχετικά με τους πιο ασθενείς δευτερεύοντες χημικούς δεσμούς, στο !c εικονίζονται οι δεσμοί υδρογόνου μεταξύ μιας υδροξυλιωμένης επιφάνειας και μιας καρβοξυλικής ομάδας ενός αμινοξέος. Στα 1.7.2.d., 1.7.2.e. αναπαρίστανται οι δεσμοί Van der Waals μιας αρνητικά φορτισμένης επιφάνειας με μια άκαμπτη υδρόσφαιρα, η οποία δύναται να διασυνδέσει διάφορες ομάδες οργανικών συστατικών. Ακολουθεί ένας πιο πολύπλοκος τρόπος διασύνδεσης ενός συνθέτου ιοντικού δεσμού/δεσμού van der Waals /δεσμού υδρογόνου μεταξύ μιας επιφάνειας και οι ηλεκτροστατικές φορτίσεις σε δευτερεύουσες θέσεις πρόσδεσης του κολλαγόνου (1.7.2.f). Ένας άλλος πιθανός τρόπος διασύνδεσης αποτελεί ο ιοντικός-ομοιοπολικός δεσμός μιας διεπιφανειακής επιταξιακής κρυσταλλικής ανάπτυξης μεταξύ επιφάνειας βιολιλικού και κρυστάλλων υδροξυαπατίτη, οι οποίοι περιέχονται στην οστική μάζα. Αναφορικά, μία επιταξιακή διεπιφάνεια παρέχει έναν ιοντικό-ομοιοπολικό δεσμό αντοχής ισοδύναμο με εκείνο του μέσου όρου των δύο υλικών που περιλαμβάνει τη διεπαφή.



Εικ. 1.7.2: Σχηματική απεικόνιση των τύπων χημικών διεπιφανειακών δεσμών μεταξύ οστού-κεραμικού βιουλκικού-α) άμεσος ιοντικός-ομοιοπολικός δεσμός, b) ηλεκτροστατικός ιοντικός δεσμός, c) δεσμός υδρογόνου, d, e) δεσμός Van der Waals, f) σύνθετος δεσμός μέσω φορτίσεων σε ζώνες κολλαγόνου, g) επιταξιακή κρυσταλλική ανάπτυξη κρυστάλλων υδροξυαπατίτη πάνω σε υπόστρωμα ^{xxx}

Ο μηχανισμός διασύνδεσης μεταξύ βιοκεραμικού και ιστού εξαρτάται από το είδος του υλικού που θα χρησιμοποιηθεί για την οστική αποκατάσταση: 1) για τοξικό εμφύτευμα η περιβάλλουσα του ιστού νεκρώνει, 2) το μη τοξικό, βιοαδρανές υλικό οδηγεί στο σχηματισμό μιας ινώδους μεμβράνης πάνω στον ιστό, 3) το μη τοξικό, βιοενεργό υλικό αναπτύσσει διεπιφανειακούς δεσμούς με τον ιστό και 4) το μη τοξικό και διαλυτό υλικό αντικαταστάται από τον ιστό. Στον Πίνακα 1.7.1. καταγράφονται τα είδη διεπιφανειακής διασύνδεσης συναρτήσει του είδους των βιοκεραμικών. Στην περίπτωση των αδρανών, μικροπορώδων βιοκεραμικών, όπως είναι τα επιχρίσματα υδροξυαπατίτη και αλούμινας, η ανάπτυξη ιστού λαμβάνει χώρα μέσω των επιφανειακών πόρων ή διαμέσου του εμφυτεύματος. Στην περίπτωση που η κινητικότητα στο περιβάλλον ενός πορώδους εμφυτεύματος δεν είναι ικανοποιητική, ο ιστός τείνει να καταστραφεί, η παροχή αίματος σταματά οδηγώντας στην νέκρωση του ιστού είτε σε φλεγμονή και επέρχεται κατάρρευση της διεπιφανειακής σταθερότητας μεταξύ ιστού και εμφυτεύματος. Συνεπώς, η προσέγγιση ανοιχτού πορώδους με καθορισμένο μέγεθος πόρων επιλύει προβληματικές περιοχές στην περίπτωση πληρωτικών /προσθετικών εμφυτευμάτων, αλλά και σε βιοκεραμικές

επικαλύψεις μετάλλων (στρώμα υδροξυαπατίτη πάνω σε πορώδη μεταλλική επιφάνεια τιτανίου).

Όσον αφορά την κατηγορία απορροφήσιμων βιοκεραμικών (περίπτωση 4), τα υλικά απορροφούνται σταδιακά εντός συγκεκριμένου χρονικού διαστήματος και αντικαθίστανται από τον φυσικό ιστό. Το πάχος της διεπιφανειακής διασύνδεσης των εν λόγω βιοκεραμικών με τον ανθρώπινο ιστό είναι πολύ λεπτό ή μηδαμινό. Τα απορροφήσιμα βιοκεραμικά αποτελούν ιδανική βιοσυμβατή μέθοδο σε θέματα ιστομηχανικής, ωστόσο παρουσιάζουν κάποιες προβληματικές περιοχές. Οι επιπλοκές στην ανάπτυξη επαναρροφήσιμων βιοκεραμικών προξενούνται από το γεγονός ότι (1) η διατήρηση της αντοχής και η σταθερότητα της διασύνδεσης κατά τη διάρκεια της περιόδου αποδόμησης και αντικατάστασης δεν είναι δεδομένη και (2) τα ποσοστά απορρόφησης διαφέρουν σημαντικά από τα ποσοστά που απαιτούνται για την επισκευή των ιστών του σώματος, 3) μερικά βιολικά διαλύονται πολύ γρήγορα είτε πάρα πολύ αργά. Επιπλέον, επειδή μεγάλη ποσότητα βιοϋλικού δύναται να αντικατασταθεί, κρίνεται απαραίτητο ότι το βιοαπορροφήσιμο εμφύτευμα αποτελείται μόνο από μεταβολικά αποδεκτές, μη τοξικές ουσίες. Το κριτήριο αυτό θέτει σημαντικούς περιορισμούς σχετικά με την σύνθεση απορροφήσιμων βιοϋλικών.

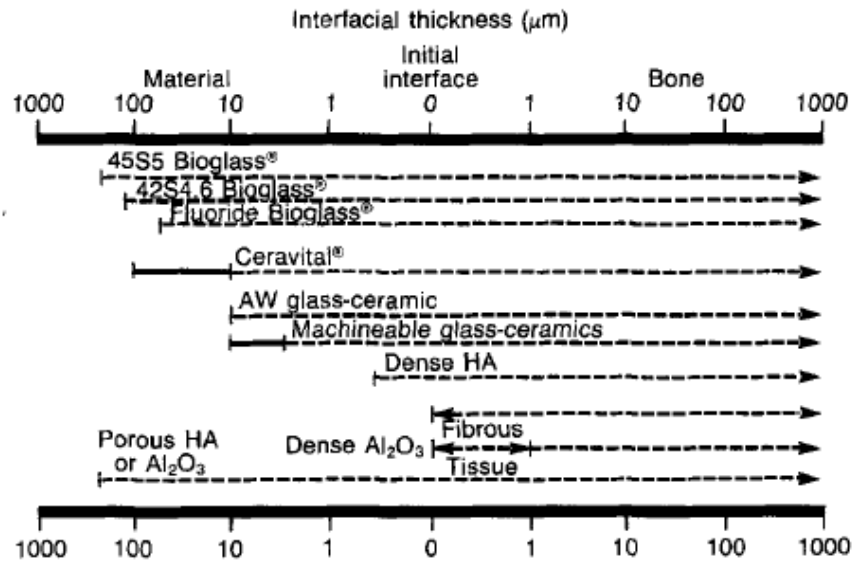
Όσον αφορά στα βιοενεργά υλικά (περίπτωση 3), είναι βιοδραστικά και απορροφήσιμα που προκαλούν βιολογική απόκριση στην διεπιφάνεια του υλικού σχηματίζοντας διεπιφανειακό δεσμό με τον ιστό. Η χρονική εξάρτηση της συγκόλλησης, η αντοχή του δεσμού, ο μηχανισμός της συγκόλλησης, και το πάχος της ζώνης διασύνδεσης διαφέρουν ανάλογα με το βιοενεργό υλικό που χρησιμοποιείται.

Πίνακας 1.7.1. Είδη Κεραμικών, Σύνδεση με τον Ιστό, Βιοκεραμική Ταξινόμηση^{xxxi}

<u>Τύπος διασύνδεσης</u>	<u>Κεραμικό (παράδειγμα)</u>
1) Μορφολογική διασύνδεση (οστική ανάπτυξη μέσω επιφανειακών ατελειών)	Πυκνά, μη πορώδη, μερικώς αδρανή κεραμικά (μονοκρυσταλλική, πολυκρυσταλλική Al ₂ O ₃)
2) Βιολογική διασύνδεση (οστική ανάπτυξη μέσω μηχανικών δεσμών με το εμφύτευμα)	Πορώδη αδρανή εμφυτεύματα (πολυκρυσταλλικό πορώδες Al ₂ O ₃ , επικαλύψεις υδροξυαπατίτη σε πορώδη μέταλλα)
3) Βιοενεργή διασύνδεση (άμεση οστική σύνδεση μέσω χημικών δεσμών)	Πυκνά, επιφανειοενεργά, μη πορώδη κεραμικά, ύαλοι, υαλοκεραμικά (βιοενεργά γυαλιά, υδροξυαπατίτης, βιοενεργά υαλοκεραμικά)
4) Σταδιακή οστική αντικατάσταση εμφυτεύματος	Πυκνά, πορώδη/ μη πορώδη, απορροφήσιμα κεραμικά (θειικό ασβέστιο, φωσφορικό τριασβέστιο, άλατα φωσφορικού ασβεστίου)

Ο βαθμός δραστηριότητας ενός εμφυτεύματος εξαρτάται από το πάχος της διεπιφανειακής ζώνης /στρώματος μεταξύ υλικού και ιστού. Στην περίπτωση που ένα βιοϋλικό είναι σχεδόν αδρανές και η διεπιφάνεια δεν είναι χημικά ή βιολογικά συνδεδεμένη, τότε υπάρχει σχετική κίνηση και προοδευτική ανάπτυξη μιας μη

προσκολλημένης ινώδους μεμβράνης πάνω στον μαλακό ή σκληρό ιστό. Η προαναφερθείσα κίνηση στην διασύνδεση του βιοϋλικού-ιστού τελικά οδηγεί σε επιδείνωση της λειτουργίας του εμφυτεύματος, στην αλλοίωση του ιστού ή στην καταστροφή της μεταξύ τους διεπαφής. Το πάχος της αναπτυσσόμενης ινώδους μεμβράνης, η οποία δημιουργείται από την αντίδραση του οργανισμού στο εμφύτευμα, ποικίλλει σε μεγάλο βαθμό ανάλογα με το υλικό και την έκταση της σχετικής κίνησης (Εικ. 1.7.3).

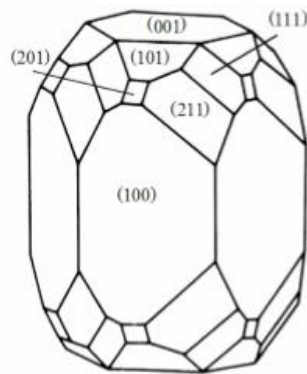


Εικ. 1.7.3: Σχηματική απεικόνιση σύγκρισης πάχους διεπιφάνειας στρώματος αντιδράσεως με το βιοδραστικό εμφύτευμα ή του ινώδους ιστού των ανενεργών βιοκεραμικών πάνω στο οστό
xxxii

1.8. Υδροξυαπατίτης

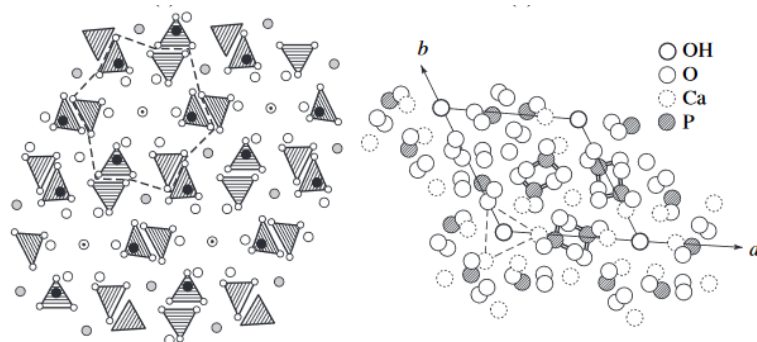
Οι απατίτες αποτελούν ανόργανες ενώσεις με γενικό τύπο $Ca_5(PO_4)_3X_2$, όπου X μπορεί να είναι ιόντα φθορίου (φθοροαπατίτες, FAp), ιόντα χλωρίου (χλωροαπατίτες, ClAp) ή ιόντα υδροξυλίου (υδροξυαπατίτες, OHAp). Ο υδροξυαπατίτης $Ca_{10}(PO_4)_6(OH)_2$ είναι το βασικό δομικό ανόργανο συστατικό των οστών και δοντιών και είναι κατά κανόνα μικρής κρυσταλλικότητας ή στοιχειομετρικός, ο οποίος αποτελείται από 39,68% Ca, 18,45% P, Ca/P 2,152 wt και Ca/P 1,667 molar. Ο λόγος Ca/P του φυσικού υδροξυαπατίτη είναι 1,5 molar και 1,67 molar του συνθετικού αντίστοιχα. Αποτελεί το λιγότερο διαλυτό και πιο σταθερό άλας του ασβεστίου. Η οστική ουσία αν και παρόμοια του υδροξυαπατίτη, περιέχει επιπλέον χλώριο, μαγνήσιο, νάτριο και άλλες ιοντικές προσμίξεις. Ο βιολογικός υδροξυαπατίτης περιέχει 4% κατά βάρος ανθρακικά άλατα και είναι σταθερός σε pH 9-12. (xxxii)

Δομή Υδροξυαπατίτη



Εικ. 1.8.1. Σχηματική απεικόνιση εξαγωνικής μορφής κρυστάλλου υδροξυαπατίτη ^{xxxii}

Σχετικά με την δομή του υδροξυαπατίτη (Εικ. 1.8.1.), οι κρυσταλλίτες του έχουν τη μορφή λεπτών πλακών ή βελόνων με διαστάσεις 10-100 nm. Λαμβάνοντας υπ' όψη τις παραμέτρους πλέγματος του υδροξυαπατίτη ($a = 0.942$ nm, $c = 0.687$ nm) και την συμμετρία του (εξαγωνική, S.G. P63/m) πιθανότερος προσανατολισμός ανάπτυξης των μοναδιαίων κρυσταλλιτών είναι κατά μήκος του άξονα c . Τα άτομα ασβεστίου του διαμένονται σε δύο θέσεις: έξι άτομα ανά μοναδιαία κυψελίδα είναι στη θέση Ca (II) και τέσσερα άτομα ανά μοναδιαία κυψελίδα είναι σε θέση Ca (I). Τα άτομα στη θέση Ca (I) βρίσκονται πάνω στον τριπλό άξονα και περιβάλλονται από εννέα άτομα οξυγόνου των φωσφορικών ομάδων. Τα άτομα ασβεστίου της θέσης Ca (II) σχηματίζουν ισόπλευρα τρίγωνα, όπου στο κέντρο του εξαγωνικού τους άξονα βρίσκεται ένα άτομο φθορίου, και στις έκκεντρες θέσεις υπάρχουν υδροξυλομάδες. Αυτός ο προτιμητέος προσανατολισμός είναι κατά πάσαν πιθανότητα υπεύθυνος για την βελονοειδή του μορφολογία, η οποία καθορίζει τις τελικές ιδιότητες του οστού. Ο στοιχειομετρικός ή βιολογικός υδροξυαπατίτης παρουσιάζει είτε δομικές ατέλειες (π.χ. κρυσταλλικά κενά) είτε αντικαταστάσεις των ιόντων Ca^{2+} , PO_4^{3-} και OH^- από ξένα ιόντα, για παράδειγμα αντικατάσταση υδροξυλιόντων από ανθρακικά ιόντα. Οι υποκαταστάσεις ιόντων συντελούν στην σταθεροποίηση της εξαγωνικής δομής, ενώ η προσκόλληση οργανικών σωματιδίων σε κρυσταλλικές φάσεις (π.χ. αμινοξέα) δύναται να αναστέλλει ή εμποδίζει τον σχηματισμό εξαγωνικής δομής.



Εικ.1.8.2.Δεξιά απεικονίζεται η ατομική δομή ΗΑρ και αριστερά η προβολή του στον άξονα

^{c xxxiii}

Οι βελονοειδείς νανοκρύσταλλοι υδροξυαπατίτη ευθυγραμμίζονται κατά μήκος των ινών κολλαγόνου του οστού προσδίδοντας στο σύνθετο αυξημένες μηχανικές αντοχές. Ωστόσο, η πλειονότητα των κρυσταλλιτών υδροξυαπατίτη περιέχουν διδυμίες και σφάλματα επιστοιβαξης, με συνέπεια οι υποκρυσταλλίτες να έχουν την μορφή κυλίνδρων ή βελονών. Επιπλέον, τα σωματίδια επιμηκών νανοκρυσταλλιτών υδροξυαπατίτη δεν εμφανίζουν πόρους, παρουσιάζοντας ανισοτροπική κρυσταλλική ανάπτυξη με μέσο μήκος κρυσταλλίτη 40-60 nm, 20nm πλάτος και 1,5-5nm πάχος. Ως νανοσωματίδια, διαθέτουν υψηλό λόγο επιφάνειας προς όγκου, το οποίο προσφέρεται για έλεγχο πρωτεϊνικής αντίδρασης, όπως απορρόφησης, διαμόρφωσης και βιοενεργότητας αυτών με σκοπό την επακόλουθη οστεοβλαστική προσκόλληση. (xxvii) (xxviii)

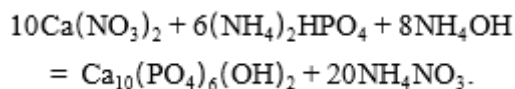
Ιδιότητες υδροξυαπατίτη

Από άποψη αντοχής, ο καθαρός υδροξυαπατίτης είναι ένα σκληρό και εύθραυστο κεραμικό με μέτρο ελαστικότητας 130 GPa, τιμή μέγιστης παραμόρφωσης 0.001 και μέγιστη αντοχή 100 MPa. Τα στοιχεία αυτά μεταβάλλονται όταν πρόκειται για βιοκεραμικό, το οποίο συνδυάζεται με άλλα υλικά (κράματα, πολυμερή κ.α.). Αποτελεί μια θερμικά ασταθής ένωση, καθώς αποσυντίθεται σε θερμοκρασία 800-1200°C ανάλογα με τη στοιχειομετρία του, ενώ η πυκνή μορφή του υδροξυαπατίτη δεν διατηρείται για μεγάλο χρονικό διάστημα σε περιβάλλοντα όπου ασκούνται μεγάλες πιέσεις και τριβές, διατηρώντας ωστόσο την βιοσυμβατότητά του. Ο συνθετικός υδροξυαπατίτης παρουσιάζει άριστη βιοσυμβατότητα με τον ανθρώπινο οργανισμό, φαινομενικά σχηματίζοντας άμεσο χημικό δεσμό με τους ιστούς, είναι βιοαπορροφήσιμος, οστεοαγώγιμος και παρουσιάζει μη τοξική/φλεγμονώδη /ανοσογόνα συμπεριφορά. Τα νανοσωματίδια υδροξυαπατίτη ή το πορώδες δίκτυο υδροξυαπατίτη κατά την ενσωμάτωση στο σκελετικό σύστημα, σχηματίζουν νέα δικτυωτά οστικά πολυστρώματα εντός χρονικού διαστήματος 4 έως 8 εβδομάδων. (xxviii) (xxix) (xxx) (xxxi)

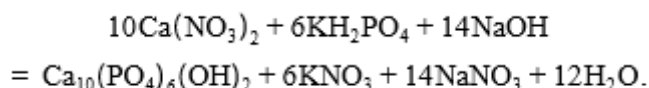
Τρόποι σύνθεσης υδροξυαπατίτη

Η σκόνη υδροξυαπατίτη δύναται να παρασκευαστεί με *υγρές χημικές μεθόδους*, όπως με αντιδράσεις στερεάς κατάστασης και υδροθερμικές κατεργασίες. Η κατάλληλη προετοιμασία σύνθεσης επηρεάζει σημαντικά την μορφολογία, την ειδική επιφάνεια, τη στοιχειομετρία και την κρυσταλλικότητα του προϊόντος. Κατά τις υγρές χημικές διαδικασίες πραγματοποιείται καταβύθιση του υδροξυαπατίτη μέσω ανάμειξης υδατικών διαλυμάτων που περιέχουν Ca^{2+} και ιόντα σε $\text{pH} > 7$, και εν συνεχεία παραλαμβάνεται το ίζημα υπό κατάλληλες συνθήκες. Οι πιο συχνά χρησιμοποιούμενες πηγές κατιόντων ασβεστίου (Ca^{2+}) είναι το CaCl_2 , $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$, $\text{Ca}(\text{OH})_2$, $(\text{CH}_3\text{COO})_2\text{Ca}$, CaCO_3 και $\text{CaSO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$. Οι αντίστοιχες πηγές ιόντων φωσφόρου περιλαμβάνουν το H_3PO_4 , $\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$, $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$, Na_3PO_4 και K_3PO_4 . Η ρύθμιση του pH επιτυγχάνεται με αέριο αζώτου, είτε με προσθήκη βάσεων, όπως το NaOH και NH_4OH . Στο αρχικό στάδιο της διαδικασίας, το ίζημα που παραλαμβάνεται διαφέρει από τον υδροξυαπατίτη, καθώς υπό συνθήκες διαφύλαξης του ιζήματος φωσφορικού ασβεστίου αναμένεται αύξηση της αναλογίας Ca:P, με επακόλουθη την κρυστάλλωση

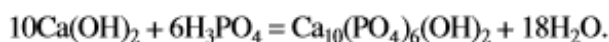
του υδροξυαπατίτη. Η προαναφερθείσα διαδικασία εξαρτάται από πολλούς παράγοντες, συμπεριλαμβανομένων των συγκεντρώσεων των αρχικών αλάτων, της αλληλουχίας και του ρυθμού ανάμειξης, του pH και τέλος της θερμοκρασία και του χρόνου αντίδρασης. Με τον έλεγχο των παραμέτρων της σύνθεσης καθορίζονται τα χαρακτηριστικά του τελικού υδροξυαπατίτη. Ένα παράδειγμα διαδικασίας υγρής χημικής μεθόδου με πηγή ασβεστίου το $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$ είναι η ακόλουθη(xxxvi):



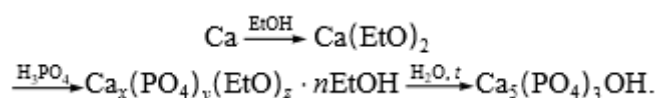
Μια παραλλαγή της παραπάνω αντίδρασης ακολουθεί(xxxvii):



Μετά την σταδιακή ανάπτυξη των κρυστάλλων υδροξυαπατατίτη συλλέγεται το ίζημά του, ακολουθούν πλύσεις με νερό και αιθανόλη, και ξήρανση στους 40-50° C. Άλλη μια κλασική σύνθεση υγρής χημικής μεθόδου βασίζεται στην αντίδραση (xxxviii):



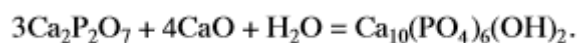
Η παραπάνω σύνθεση συναντάται με παραλλαγές αντιδραστηρίων, όπως η στοιχειομετρική ανάμειξη $\text{Ca}(\text{OH})_2$, $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$, $(\text{NH}_4)_3\text{PO}_4$, H_3PO_4 και ανάδευση αυτών σε λουτρό υπερήχων^(xxxix). Επιπλέον, δύναται να παραχθεί σκόνη υδροξυαπατατίτη^(xl) με την προσθήκη $\text{Ca}(\text{OH})_2$ σε υδατικό εναιώρημα που περιέχει $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$, σε συνθήκες αδρανούς ατμόσφαιρας και εύρους θερμοκρασιών 5-100°C. Στην συνέχεια το pH ρυθμίζεται στην τιμή 10 μέσω προσθήκης $\text{Ca}(\text{OH})_2$, μέχρις ότου η αναλογία Ca:P να φτάσει την τιμή 1,6 και η αντίδραση διεξάγεται έως ότου ο λόγος Ca:P να φτάσει το 1,67 μέσω ρύθμισης του pH στο 7-11. Μια περαιτέρω μελέτη (xli) πάνω στη σύνθεση υδροξυαπατίτη παραγόμενου από CaCl_2 , $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$ και υγρής αμμωνίας κατέδειξε ότι το προϊόν εξαρτάται σημαντικά από τις συνθήκες καταβύθισης, όπως η αρχική σύνθεση και το pH του διαλύματος. Κλασική τεχνική υγρής-χημικές παρασκευής υδροξυαπατίτη αποτελεί η αντίδραση (xlii) μεταξύ CaCO_3 και υδατικού H_3PO_4 με ακόλουθη πύρωση σε 800-1300°C για 0,5-10 ώρες, ακολουθούμενη από ψύξη του CaO σε θερμοκρασία χαμηλότερη από 500°C και σε συνθήκες αδρανούς ατμόσφαιρας. Οι Turova και Yanovskaya (xliii) ανέφεραν τη σύνθεση υδροξυαπατίτη μέσω σχηματισμού ενός διαλύματος αιθοξειδίου του ασβεστίου, $\text{Ca}(\text{EtO})_2$, ακολουθούμενη από αντίδραση αυτού με φωσφορικό οξύ και ανόπτηση του προϊόντος στον αέρα:



Συμπεραίνεται από τα ανωτέρω παραδείγματα ότι οι υγρές χημικές τεχνικές σύνθεσης υδροξυαπατίτη εμπλέκουν πολλές μεταβλητές (pH, θερμοκρασία, χρόνο αντίδρασης), γεγονός που καθιστά δύσκολη τη διατήρηση της στοιχειομετρικής αναλογίας Ca:P κατά τη διάρκεια της σύνθεσης και τον έλεγχο των χημικών και φυσικών χαρακτηριστικών του παραγόμενου υλικού.

Η σύνθεση υδροξυαπατίτη επιτυγχάνεται επιπλέον με *ξηρές μεθόδους*, οι οποίες περιλαμβάνουν διάχυση στερεάς κατάστασης κατά την πύρωση των μειγμάτων, τα οποία περιέχουν κατάλληλες ποσότητες Ca^{2+} και ιόντα, σε θερμοκρασιακές συνθήκες 1000-1300°C. Οι υδρατμοί χρησιμοποιούνται σε αυτή την περίπτωση ως πηγή υδροξυλικών ομάδων. Παράδειγμα^(xliiv) ξηρής μεθόδου αποτελεί η παρασκευή μέσω ασβεστοποίησης των μιγμάτων $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ και CaCO_3 , CaP_2O_7 και CaCO_3 , ή $\text{CaHPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ και CaO σε 900 και 1300°C παρουσίας υδρατμών. Οι διαδικασίες αυτές εξασφαλίζουν τον σχηματισμό στοιχειομετρικού υδροξυαπατίτη (Ca:P= 1,67), ωστόσο απαιτούν υψηλή κατανάλωση ενέργειας, στερούνται ομοιογένειας και είναι χρονοβόρες διαδικασίες.

Στην περίπτωση *υδροθερμικής διαδικασίας* (xlv), αντιδραστήρια εκκίνησης αποτελούν το φωσφορικό αμμώνιο, CaCO_3 , $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$, $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$ σε υγρή αμμωνία. Βασική προϋπόθεση της διαδικασίας αυτής αποτελεί η συνθήκη υψηλών θερμοκρασιών και η χρήση ακριβούς εξοπλισμού. Τα αρχικά αντιδραστήρια και το νερό πρέπει να καταλαμβάνουν το 50-60% του συνολικού όγκου, ο οποίος είναι ανάλογος της θερμοκρασίας. Σύμφωνα με μια άλλη έρευνα (xlvi), ο υδροξυαπατίτης δύναται να παρασκευαστεί ως ακολούθως:



Εκτός από τις τρεις βασικές μεθόδους σύνθεσης υδροξυαπατίτη, πιο εναλλακτική διαδικασία αποτελεί η υδρόλυση, ηλεκτροαπόθεση, βιομιμητική απόθεση και τα τελευταία χρόνια η πολλά υποσχόμενη τεχνική μέσω λυοφιλίωσης. Η σύνθεση υδροξυαπατίτη μέσω λυοφιλίωσης προσφέρει τη δυνατότητα παρασκευής λεπτόκοκκου υδροξυαπατίτη, μεγέθους νανοκλίμακας και ταυτόχρονη ύπαρξη πορώδους μικροδομής.

Μορφές υδροξυαπατίτη

Κεραμικά καθαρού πυκνού υδροξυαπατίτη

Η παρασκευή κεραμικών καθαρού πυκνού υδροξυαπατίτη με ανώτερες μηχανικές ιδιότητες είναι δυνατή μόνο εφόσον η αρχική σκόνη του υδροξυαπατίτη είναι στοιχειομετρική. Αν η τιμή της μοριακής αναλογίας Ca/P υπερβαίνει το 1,67, τότε κατά τη διαδικασία της πυροσυσσωμάτωσης σχηματίζεται οξείδιο του ασβεστίου (CaO), το οποίο φαίνεται ότι μειώνει την αντοχή του υλικού και διαταράσσει τη συνοχή του, εξαιτίας μιας σειράς αντιδράσεων. Κάποιες πούδρες υδροξυαπατίτη μπορεί να υποστούν πυροσυσσωμάτωση χωρίς πίεση μέχρι κάποια θεωρητική

πυκνότητα σε θερμοκρασίες 1.000-1.200 °C. Με θερμή πίεση (hot pressing (HP)) ή θερμή ισοστατική πίεση (hot isostatic pressing (HIP)) μπορεί να μειωθεί η θερμοκρασία συμύκνωσης, το μέγεθος των κόκκων και να επιτευχθούν υψηλότερες πυκνότητες. Κατ' επέκταση, αποκτώνται κεραμικά με λεπτότερες μικροδομές, υψηλότερη θερμική σταθερότητα και καλύτερες μηχανικές ιδιότητες. Αυξανόμενου του λόγου Ca/P, η αντοχή αυξάνεται φτάνοντας τη μέγιστη τιμή για τιμή του λόγου ~1,67, ενώ μετά από αυτή την τιμή μειώνεται. Η αντοχή μειώνεται εκθετικά με την αύξηση του πορώδους. Το μέτρο Weibull ανήκει στο εύρος τιμών 5-18, το οποίο υποδηλώνει ότι ο υδροξυαπατίτης συμπεριφέρεται σαν τυπικό ψαθυρό κεραμικό, ενώ μέτρο Young κυμαίνεται μεταξύ 35 και 120 MPa. Οι χαμηλές αντοχές σε συνδυασμό με την ευαισθησία σε αργή ανάπτυξη ρωγμών (ειδικά υπό υγρές συνθήκες) τεκμηριώνουν τη χαμηλή αξιοπιστία των εμφυτευμάτων πυκνού υδροξυαπατίτη, όσον αφορά τα φορτία. Ως εκ τούτου, οι εφαρμογές τους περιορίζονται στην οδοντιατρική, για αφόρτιστα υποκατάστατα ριζών δοντιών.

Επιστρώσεις υδροξυαπατίτη

Μία από τις πλέον διαδεδομένες κλινικές εφαρμογές αποτελεί η χρήση του υδροξυαπατίτη ως επίστρωση σε μεταλλικά ορθοπεδικά και οδοντιατρικά εμφυτεύματα, συνδυάζοντας τα πλεονεκτήματα των μεταλλικών υλικών σε μηχανικές ιδιότητες, με την άριστη βιοσυμβατότητα και βιοδραστικότητα του υδροξυαπατίτη. Τα ακάλυπτα μεταλλικά εμφυτεύματα δεν ενοποιούνται με το οστό και, όπως όλα τα βιοαδρανή υλικά, περιβάλλονται από πυκνό ινώδη ιστό που αποτρέπει την επιθυμητή διανομή των τάσεων με πιθανό αποτέλεσμα χαλάρωση του εμφυτεύματος. Στην περίπτωση, όμως, των επικαλυμμένων εμφυτευμάτων το οστό ενοποιείται εξ' ολοκλήρου με το εμφύτευμα ακόμη και κατά τις πρώτες λειτουργικές φορτίσεις.

Οι επιστρώσεις υδροξυαπατίτη επιτελούν αρκετές λειτουργίες. Κατ' αρχήν, διασφαλίζουν τη δημιουργία σταθερής συνένωσης του εμφυτεύματος με το οστό και ελαχιστοποιούν ανεπιθύμητες αντιδράσεις του ανοσοποιητικού συστήματος. Επιπλέον, μειώνουν την αποδέσμευση μεταλλικών ιόντων προς τον οργανισμό και προστατεύουν τη μεταλλική επιφάνεια από το βιολογικό περιβάλλον. Στην περίπτωση των πορωδών μεταλλικών εμφυτευμάτων, ενθαρρύνουν την ανάπτυξη του οστού εντός των πόρων. Τέλος, η επικάλυψη ενός εμφυτεύματος με υδροξυαπατίτη βελτιώνει και την αιμοσυμβατότητα του. Κατά την εμφύτευση ενός εμφυτεύματος εμφανίζεται η τάση να προσκολλάται πάνω στα 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. Η πιο δημοφιλής μέθοδος παρασκευής επιστρώσεων HAρ είναι η τεχνική ψεκασμού πλάσματος σε ατμοσφαιρική πίεση (APS) και υπό κενό (VPS), όμως εφαρμόζονται και άλλες όπως ενδεικτικά είναι: η θερμή ισοστατική πίεση, ο ψεκασμός χρώματος και η ηλεκτροχημική απόθεση. Οι επιστρώσεις δεν εφαρμόζονται μόνο σε μέταλλα (κράματα Ti και Ca-Cr-Mo), αλλά και σε υποκατάστατα σύνθετα υλικά ινών γραφίτη,

σε πυροσυσσωματωμένα κεραμικά (ZrO_2 και Al_2O_3) ή ακόμη και σε πολυμερή (PMMA).

Σημαντική παράμετρος είναι να μην υπάρχουν άλλες μορφές φωσφορικού ασβεστίου στις επιστρώσεις, καθώς μπορεί να μειώσουν τη χημική σταθερότητα των εμφυτευμάτων και να προκαλέσουν την αποικοδόμησή τους. Ο φυσικός υδροξυαπατίτης που χρησιμοποιείται για τις επικαλύψεις προέρχεται από τα οστά κάποιου ζώου, συνήθως βοοειδούς, ή είναι πτωματικός, ενώ πλέον χρησιμοποιείται και συνθετικός.

Πορώδη κεραμικά υδροξυαπατίτη

Τα κεραμικά υδροξυαπατίτη σε πορώδη μορφή έχουν ευρέως χρησιμοποιηθεί ως οστικά υποκατάστατα, καθώς ο πορώδης υδροξυαπατίτης επιτρέπει την επαφή με το οστό και οι πόροι παρέχουν μία σταθερή μήτρα για την προσκόλληση κυττάρων και οστεογενετικών παραγόντων. Ο οστίτης ιστός αναπτύσσεται εντός των πόρων αυξάνοντας την αντοχή του εμφυτεύματος. Ο συνήθης τρόπος για την παρασκευή πορωδών κεραμικών υδροξυαπατίτη (μεγέθους πόρων 100-600 μm) είναι μέσω της διαδικασίας πυροσυσσωμάτωσης σκόνης με κατάλληλα προσθετικά, όπως παραφίνη, ναφθαλίνη και υπεροξείδιο του υδρογόνου, που επιτρέπουν τη δημιουργία πόρων μέσω των αερίων που ελευθερώνουν σε ανυψωμένες θερμοκρασίες.

Αυξανόμενου του πορώδους, η αντοχή και η αντοχή σε θραύση μειώνονται δραματικά. Αξιοσημείωτο είναι το γεγονός ότι τα πορώδη κεραμικά υδροξυαπατίτη είναι λιγότερο ανθεκτικά στην κόπωση από τα κεραμικά πυκνού υδροξυαπατίτη. Τα εμφυτεύματα πορωδών κεραμικών υφίστανται βιοαποικοδόμηση, που σημαίνει ότι σταδιακά αντικαθίστανται από το οστό, με ρυθμό λίγων εκατοστιαίων μονάδων ετησίως. Πορώδη κεραμικά με βελτιωμένες ιδιότητες μπορούν να δημιουργηθούν με τη χρήση ινών υδροξυαπατίτη ή μονοκρυσταλλικών ινών. Στις εφαρμογές τους συγκαταλέγονται πλήρωση ατελειών σε οστά, συστήματα απελευθέρωσης φαρμάκων, αύξηση της φατνιακής ζώνης και ορθογναθική αναδόμηση.

Οστικά τσιμέντα φωσφορικού ασβεστίου

Τα οστικά τσιμέντα φωσφορικού ασβεστίου προτάθηκαν για πρώτη φορά τη δεκαετία του 80. Τέσσερις δεκαετίες αργότερα, το ενδιαφέρον για αυτά τα βιοϋλικά παραμένει ακόμα αυξημένο. Με τον όρο οστικό τσιμέντο φωσφορικού ασβεστίου περιγράφεται μια κατηγορία βιοϋλικών που περιλαμβάνουν συγγενή υλικά ως προς τη δομή, τη χρήση και τις ιδιότητες και έχουν τελική δομή απατίτη ή μπρουσίτη. Βασικό συστατικό είναι το φωσφορικό ασβέστιο, αλλά σε κάθε υλικό οι επιμέρους περιεκτικότητες του φωσφορικού διαφέρουν. Η συμβατότητα των αλάτων του φωσφορικού ασβεστίου με τους βιολογικούς απατίτες τα καθιστούν ιδανικά υλικά για την ανάπτυξη του οστικού τσιμέντου. Προκύπτουν με την ανάμειξη ορθοφωσφορικού ασβεστίου με υγρό μονομερές. Από την αντίδραση προκύπτει υλικό με παρόμοια χημική σύσταση με αυτή του υδροξυαπατίτη με χαμηλή κρυσταλλικότητα, υψηλή (30-50%) πορώδη σύσταση (με μεγέθη πόρων στη μικρο ή νάνο-κλίμακα). Συνήθως δημιουργούνται από σκόνες, όπως $CaHPO_4 \cdot 2H_2O$, $Ca_4(PO_4)_2O$, $CaHPO_4$,

$\text{Ca}_8\text{H}_2(\text{PO}_4)_6 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$, $\text{Ca}(\text{H}_2\text{PO}_4)_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$ ή TCP και νερό ή άλλο υγρό, όπως φωσφορικό οξύ (H_3PO_4) ή ένυδρο φωσφορικό άλας του νατρίου (Na_2HPO_4). Το μίγμα μετασχηματίζεται σε υδροξυαπατίτη με πήξη, δημιουργώντας ένα πορώδες σώμα ακόμη και στους 37 °C και ο χρόνος πήξης περιορίζεται σε μερικά λεπτά. Με προσθήκη αλγινικού νατρίου μπορεί να αποτραπεί η αλλοίωση του υλικού που συνήθως προκαλείται μετά την επαφή του με τα υγρά του σώματος. Δυνατή, επίσης, είναι η προσθήκη ενισχυτικών και βιοδραστικών μέσων (βιοδραστικοί ύαλοι, πολυμερή και άλλα). Οι μηχανικές ιδιότητες και οι ιδιότητες ροής μπορούν να τροποποιηθούν με την μεταβολή της επί τις εκατό περιεκτικότητας των συστατικών ή την μεταβολή του μεγέθους των κόκκων της στερεάς φάσης. Πλεονέκτημα των υλικών αυτών είναι η ικανότητα τους να ενσωματώνουν διαφορετικές χημικές ουσίες και να τις αποδίδουν σταδιακά στο μικροπεριβάλλον τους. Επιπλέον, εμφανίζουν υψηλή βιοσυμβατότητα, βιοδραστικότητα και επαγωγή της οστεοσύνθεσης και προάγουν την αναγέννηση του οστίτη ιστού, ενώ το σημαντικότερο μειονέκτημά τους είναι η σχετικά μικρή μηχανική αντοχή. Η εύκολη μορφοποίησή τους τα καθιστά ικανά να πληρούν τις ατέλειες στα οστά καλύτερα από τα συμπαγή στερεά μπλοκ υδροξυαπατίτη και από τους κόκκους/σκόρες υδροξυαπατίτη. Τα υλικά αυτά μετά από χρονικό διάστημα 6 μηνών ή και περισσότερο ενσωματώνονται πλήρως στον σπογγώδη οστίτη ιστό. Ωστόσο, τα τσιμέντα φωσφορικού ασβεστίου έχουν επίσης ορισμένα μειονεκτήματα, που σχετίζονται κυρίως με την κακή μηχανική απόδοση τους, η οποία έχει περιορισμένη έως και καθόλου εφαρμογή σε σχέση με τα αμιγώς κεραμικά υλικά. (xlvii)

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 σημαντικό 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.

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 την δραστικότητα (δραστική συγκέντρωση) των ιόντων συστατικών στο διάλυμα σε ισορροπία με τη στερεή φάση. Οι θερμοδυναμικοί υπολογισμοί της κρυσταλλοποίησης πρέπει να συμπεριλάβουν και τους κινητικούς παράγοντες που αφορούν το 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 έπεται από μια 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 υπάρχοντων φάσεων. Η ύπαρξη προσθέτων, που δρουν σαν σημεία εκκίνησης του σχηματισμού πυρήνων, μειώνει επίσης την ενέργεια που απαιτείται για την κρυσταλλοποίηση, διευκολύνοντας έτσι την ανάπτυξη κρυστάλλων προς συγκεκριμένες κατευθύνσεις.

Η ανάπτυξη των κρυστάλλων εξαρτάται από τη διαθεσιμότητα των ιόντων στο διάλυμα. Καθώς ο υπερκορεσμός είναι εντονότερος από τη 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 προσρόφιση τους στην επιφάνεια του αναπτυσσόμενου κρυστάλλου, μπλοκάροντας έτσι την ανάπτυξη του. Εάν τα πρόσθετα προσροφούνται επιλεκτικά σε συγκεκριμένες κρυσταλλικές επιφάνειες, τότε η ανάπτυξη θα παρεμποδιστεί κατά τη συγκεκριμένη μόνο κατεύθυνση, τροποποιώντας με αυτό τον τρόπο τη μορφολογία του κρυστάλλου. (xlvii)

Εφαρμογές υδροξυαπατίτη

Ο συνθετικός υδροξυαπατίτης έχει χρησιμοποιηθεί σε διάφορες κλινικές εφαρμογές: σαν πληρωτικό ελαττώματος ενός οστού, σαν αποστάτης οστών, σαν υποκατάστατο οστικού μοσχεύματος καθώς και σαν επικάλυψη του μετάλλου

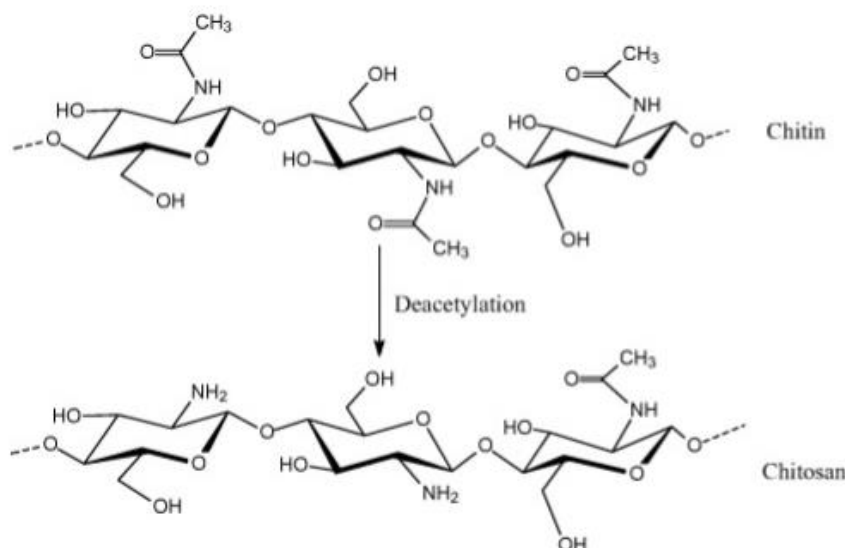
μηριαίου στελέχους σε ολική αρθροπλαστική ισχύου. Ο στόχος της επικάλυψης υδροξυαπατίτη είναι η βελτίωση της διεπαφής του μετάλλου με το οστό. Επιπλέον, η βιοενεργότητα του υδροξυαπατίτη τον καθιστά ικανό να χρησιμοποιηθεί ως μεταφορέας φαρμάκων στον οργανισμό και επομένως ενδείκνυται για την απελευθέρωση καρκινικών παραγόντων ή αντιβιοτικών. Εξαιτίας της εξαιρετικής βιοσυμβατότητας και βιοδραστικότητάς του, ο υδροξυαπατίτης έχει προσελκύσει το ενδιαφέρον των ερευνητικών προσπαθειών τα τελευταία 20 χρόνια και χρησιμοποιείται ευρέως για την παραγωγή πορωδών δομών στην μηχανική των ιστών (tissue engineering). Το κύριο μειονέκτημα του νανουδροξυαπατίτη στη μηχανική των ιστών είναι η ανεπαρκής μηχανική αντοχή του και ευθραυστότητα του, που καθιστούν αναγκαία την χρήση του ως τμήμα συνθέτου βιολογικού. Συγκεκριμένα, η υβριδοποίησή του με ενισχυτικά υλικά οδηγούν στην αύξηση της μηχανικής αντοχής και για στη βελτίωση της φέρουσας ικανότητας του.(xlviii)(xlix)(l)(li)

1.9. Χιτοζάνη

Η χιτοζάνη αποτελεί ένα γραμμικό πολυσακχαρίτη που προκύπτει μετά τη μερική αποακετυλίωση της χιτίνης (Εικ. 1.9.1.). Ένας πολυσακχαρίτης (polysaccharide) (lii), αποτελεί ένα μεγάλο μόριο υδατάνθρακα, δηλαδή ένα πολλαπλό σάκχαρο με δομή σαν αλυσίδα ή διακλαδωμένη από πολλές μονάδες μονοσακχαριτών και που ενώνονται μεταξύ τους με αντιδράσεις συμπύκνωσης. Αν και οι περισσότεροι πολυσακχαρίτες έχουν ένα τερματικό μονομερές ως σάκχαρο αναγωγής, αυτό σχηματίζει ένα μικρό μόνο τμήμα του όλου μορίου, με συνέπεια, οι περισσότεροι εξ αυτών να μην ενεργούν ως ζάχαρη αναγωγής. Οι φυσικοί σακχαρίτες αποτελούνται από απλούς υδατάνθρακες και ονομάζονται μονοσακχαρίτες με γενικό τύπο $(\text{CH}_2\text{O})_n$, όπου το $n \geq 3$. Παραδείγματα μονοσακχαριτών είναι η γλυκόζη, φρουκτόζη, και γλυκεραλδεΐδη. Οι πολυσακχαρίτες, έχουν γενικό τύπο $\text{C}_x (\text{H}_2\text{O})_y$ όπου το $x \in [200, 2500]$, είναι αδιάλυτοι και άγλυκοι και θεωρούνται σημαντικοί είτε ως μόρια αποθήκευσης, είτε ως υλικά ενίσχυσης. Σημαντικότεροι πολυσακχαρίτες είναι το άμυλο, η ινουλίνη και το γλυκογόνο, και η κυτταρίνη (στα φυτά), και η χιτίνη (στα κελύφη των καρκινωδών). Ειδικότερα παρά το ότι και οι τρεις κύριοι πολυσακχαρίτες: άμυλο, γλυκογόνο και κυτταρίνη δομούνται από το ίδιο μονομερές τη γλυκόζη, διαφέρουν ως προς το μέγεθος, τη μορφή τους στο χώρο, και το βιολογικό τους ρόλο. Η Κυτταρίνη για παράδειγμα σχηματίζει ευθεία αλυσίδα, το άμυλο μια σπειροειδή αλυσίδα, και το γλυκογόνο μια διακλαδωμένη αλυσίδα. Η κυτταρίνη και το άμυλο απαντώνται μόνο στα φυτικά κύτταρα, το πρώτο ως δομικό υλικό και το δεύτερο ως αποταμιευτική ουσία. Αντίθετα το γλυκογόνο απαντάται στα ζωικά κύτταρα και στα κύτταρα των μυκήτων, ομοίως ως αποταμιευτική ουσία.

Η χιτίνη, πολυ(β -(1 \rightarrow 4)-N-ακετυλο-D-γλυκοζαμίνη, αποτελεί ένα φυσικό βιοπολυμερή πολυσακχαρίτη, 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 κρυσταλ-

λικών μικροϊνών, αποτελώντας δομικό συστατικό των κελυφών των αρθρόποδων και των οστρακοειδών, καθώς και των κυτταρικών τοιχωμάτων μυκήτων και ζυμών. 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. (liii)



Εικ. 1.9.1. Σχηματική απεικόνιση αποακετυλίωσης της χιτίνης προς το σχηματισμό χιτοζάνης ^{liii}

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 αποακετυλίωσης της, όσο και από το μοριακό της βάρος. Σύμφωνα με διαδικασία παραγωγής της το μοριακό της βάρος μπορεί να εκτείνεται σε εύρος από 300 μέχρι 1000kD και ποσοστό απακυλίωσης από 30% μέχρι 95%. Στην κρυσταλλική της μορφή η χιτοζάνη είναι αδιάλυτη σε υδατικά διαλύματα $\text{pH} > 7$, ενώ σε διαλυμένη σε οξέα (υδατικά διαλύματα με $\text{pH} < 6$) οι ελεύθερες αμινικές ομάδες στην γλυκοζαμίνη διευκολύνουν την διάλυση του μορίου.(liv)(xlvii) Η επίδραση της θερμοκρασίας και του οξέος στην δομή της χιτοζάνης είναι που οδηγεί σε ανιχνεύσιμη μεταβολή των ιδιοτήτων της χιτοζάνης. Οι παράμετροι επιλογής οξέος και θερμοκρασίας μπορούν να αξιοποιηθούν για την βελτιστοποίηση των συνθηκών της αντίδρασης δημιουργίας σταυροδεσμών στην χιτοζάνη. Ο σχηματισμός πολυμερικών σταυροδεσμών χιτοζάνης οδηγεί στον σχηματισμό μόνιμου ομοιοπολικού δικτύου το οποίο επιτρέπει την διάχυση νερού ή βιοενεργών υλικών, ταυτόχρονα ενισχύοντας τις μηχανικές ιδιότητες του πολυμερους.(lv). Σχετικά με τη παρούσα πειραματική πορεία και με προηγούμενες μελέτες, συμπεραίνεται ότι η υδρόλυση της χιτοζάνης σε φωσφορικό οξύ 85% παράγει χιτοζάνη χαμηλού μοριακού βάρους και η θερμοκρασία με το μοριακό

βάρος, για ίσους χρόνους υδρόλυσης, προέκυψαν αντιστρόφως ανάλογα μεγέθη. (xlvii)



Εικ.1.9.2. Σχηματική απεικόνιση σκόνης χιτοζάνης

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, καθώς και η διαλυτότητα της σε υδατικό μέσο την καθιστούν ένα πολύ καλό βιοϋλικό με ποικίλες εφαρμογές στους τομείς της βιοϊατρικής, ιστικομηχανικής, φαρμακευτικής και της προσωπικής υγείας και φροντίδας. Στους ακόλουθους Πίνακες 1.9.1, 1.9.2. συνοψίζονται οι ιδιότητες της χιτοζάνης σε αντιστοιχία με πιθανές βιοϊατρικές και υπόλοιπες εφαρμογές της.

Πίνακας 1.9.1. Γενικές εφαρμογές της χιτοζάνης ^{liii}

Τομέας	Εφαρμογές
Γεωργία	αμυντικός μηχανισμός φυτών, ερέθισμα ανάπτυξης φυτών, επικάλυψη σπόρων, αντιπαγετική προστασία μέσω χρονικής αποδέσμευσης λιπασμάτων, θρεπτικά συστατικά χώματος
Επεξεργασία ύδατος και αποβλήτων	κροκιδωτικό καθαρισμού ύδατος, απομάκρυνση μεταλλικών ιόντων, οικολογικό πολυμερές, μείωση οσμών
Τρόφιμα και ποτά	δietetικές ίνες, σύνδεση λιπιδίων (μείωση χοληστερόλης), συντηρητικό, μέσο πύκνωσης και σταθεροποίησης για σάλτσες, προστατευτική, μυκητοστατική και αντιβακτηριακή επικάλυψη για φρούτα
Καλλυντικά & προϊόντα περιποίησης	ενυδατικές κρέμες, προϊόντα κατά της ακμής, θεραπευτικά σαμπουάν, προϊόν κατά του φριζαρίσματος, μαυριστικό, οδοντοκρέμες, τσίχλες
Βιοφαρμακευτική	ανοσολογικά, αντικαρκινικά, αιμοστατικά, αντιπηκτικά, βακτηριοστατικά

Πίνακας 1.9.2. Βασικές βιοεφαρμογές της χιτοζάνης ανάλογες των ιδιοτήτων της ^{liii}

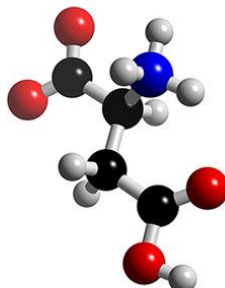
Βιοιατρικές Εφαρμογές	Ιδιότητες
Χειρουργικά ράμματα	βιοσυμβατότητα
Οδοντικά εμφυτεύματα	βιοδιάσπαση
Τεχνητό δέρμα	δυνατότητα αναγέννησης
Ανακατασκευή οστού	διαμόρφωση υμενίου
Κερατοειδείς φακοί επαφής	μέσο ενυδάτωσης
Χρονική αποδέσμευση φαρμάκου	μη τοξικότητα, βιολογική ανοχή
Υλικό ενθυλάκωσης	υδρόλυση με λυσίνη, θεραπευτικές ικανότητες, καταπολέμηση βακτηρίων, ιών, μυκήτων

Όσον αφορά την ιστομηχανική σκελετικού συστήματος, παρατηρείται πώς η χρήση της χιτοζάνης προάγει την ανάπτυξη μήτρας εναποτιθέμενων αλάτων σε κυτταροκαλλιέργειες, προσδίδοντας στο τελικό σύνθετο βιολικό την σκληρότητα και αντοχή του άλατος και την δυσθραυστότητα και ελαστικότητα του πολυμερούς (δηλαδή της χιτοζάνης, η οποία αντικαθιστά το φυσικό πολυμερές κολλαγόνο). Επιπλέον, η χιτίνη και τα παράγωγά της, λόγω βιοσυμβατότητας και δυνατότητα βιοαποδόμησης, καθιστούν κατάλληλα βιοπολυμερή για την οστική αναγέννηση. Ωστόσο, η χιτοζάνη αποκτά την απαραίτητη οστεοαγωγιμότητα μόνο σε συνδυασμό με κεραμικά υλικά, όπως ο υδροξυαπατίτης. Σχετικά με την μηχανική αντοχή που συνεπάγεται μέσω συνθέτων χιτοζάνης, η παράλληλα διατεταγμένες πολυμερικές αλυσίδες της χιτοζάνης μέσω δεσμών υδρογόνου ευθύνονται για την σταθερότητα και αντοχή του σύνθετου υλικού (Iv). Σύμφωνα με έρευνα που πραγματοποιήθηκε πάνω στην βιομηχανική ανάπτυξη υδροξυαπατίτη παρουσίας βιομορίων, αποδείχτηκε ότι η χιτοζάνη επιδρά συνεργιστικά στην κρυστάλλωση υδροξυαπατίτη διευκολύνοντας την πυρήνωσή του.(xlvii)

1.10. L-Αργινίνη

Η L-Αργινίνη αποτελεί ένα από τα 20 απαραίτητα από τους οργανισμούς αμινοξέα για τη φυσιολογική λειτουργία τους. Ο όρος αμινοξέα αναφέρεται σε μια ομάδα μορίων με μεγάλη ποικιλία, της οποίας τα μέλη έχουν μια καθοριστική ιδιότητα: συγκεκριμένα, όλα τα αμινοξέα αποτελούνται από μια όξινη καρβοξυλική ομάδα και μια αμινομάδα, οι οποίες συνδέονται με το ίδιο άτομο άνθρακα (α-άνθρακας). Η διαφοροποίηση των αμινοξέων έγκειται στην πλευρική ομάδα, που επίσης συνδέεται με τον α-άνθρακα, και η κύρια αρμοδιότητά τους είναι η σύνθεση πρωτεϊνών, πεπτιδίων και λιπιδίων, η μεταφορά νευρικών σημάτων και η συμβολή τους σε διαδικασίες βιοσύνθεσης. Οι πρωτεΐνες είναι συνοπτικώς πολυμερή αμινοξέων, τα οποία συνδέονται μεταξύ τους με μια αλυσίδα, η οποία αναδιπλώνεται σε μια μοναδική τρισδιάστατη δομή. Ο ομοιοπολικός δεσμός ανάμεσα σε δυο γειτονικά αμινοξέα μιας πρωτεϊνικής αλυσίδας αποκαλείται πεπτιδικός δεσμός και η αλυσίδα αμινοξέων πολυπεπτίδιο. Οι πεπτιδικοί δεσμοί σχηματίζονται με αντιδράσεις συμπύκνωσης που συνδέουν το ένα αμινοξύ με το επόμενο του πολυπεπτιδίου.

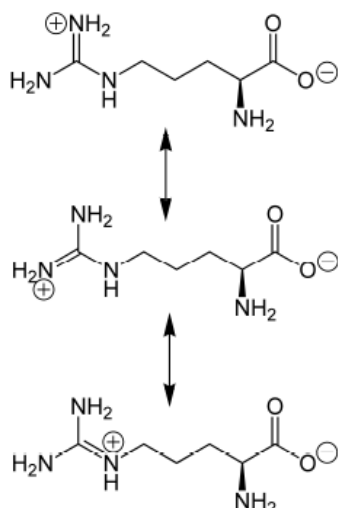
Ανεξάρτητα από τα ειδικά αμινοξέα από τα οποία αποτελείται, το πολυπεπτίδιο έχει στο ένα άκρο του μια αμινομάδα (αμινοτελικό άκρο $-NH_2$) και στο άλλο μια καρβοξυλομάδα (καρβοξυτελικό άκρο $-RCOOH$), η οποία διάταξη προσδίδει στο μόριο ένα συγκεκριμένο προσανατολισμό και μια δομική πολικότητα. (Ivi)



Εικ.1.10.1. Σχηματική απεικόνιση μορίου αμινοξέος

Στις πρωτεΐνες συνήθως υπάρχουν 20 είδη αμινοξέων (ομάδα που κατέληξε να επιλεγεί και οριστικοποιήθηκε), το ένα με διαφορετική πλευρική αλυσίδα συνδεδεμένη με τον α -άνθρακα. Τα ίδια 20 αμινοξέα υπάρχουν καθ' επανάληψη σε όλες τις πρωτεΐνες, ανεξάρτητα από το αν προέρχονται από βακτήρια, φυτά ή ζώα. Όπως και τα σάκχαρα, τα αμινοξέα εκτός γλυκίνης υπάρχουν ως οπτικά ισομερή σε D- και L- μορφή, από τα οποία μόνο τα L- βρίσκονται στις πρωτεΐνες ενώ τα D- στο κυτταρικό τοίχωμα βακτηρίων και ορισμένων αντιβιοτικών. Από τα 20 αμινοξέα τα 5 έχουν πλευρικές αλυσίδες ικανές προς σχηματισμό ιόντων, όταν εκτεθούν σε ένα διάλυμα, επομένως φέρουν φορτίο. Τέλος, ορισμένα αμινοξέα είναι υδρόφιλα και πολικά είτε μη πολικά και υδρόφοβα. Η L-αργινίνη, η λυσίνη και ιστιδίνη αποτελούν τα 3 από τα 20 πρωτεϊνογενετικά αμινοξέα τα οποία εμφανίζουν βασικό pH σε υδατικό διάλυμα και χαρακτηρίζονται ως βασικά, με την L-αργινίνη να εμφανίζει θετικό φορτίο σε pH ~ 7 λόγω ομάδας $Pka = 12,48$ (Ivii).

Η Αργινίνη (Arg ή S-2-Amino-5-guanidinopentanoic acid IUPAC) έχει μοριακό τύπο $C_6H_{14}N_4O_2$ και μοριακή μάζα 174,2 g/mol. Η L μορφή της αποτελεί φυσικό αμινοξύ και η δομή της χτίζεται από μια αλειφατική ευθεία αλυσίδα 4 ανθράκων με τελικό άκρο μια σύνθετη γουανιδιομάδα. Λόγω κλίσης διπλού δεσμού και μεμονωμένων δεσμών αζώτου (N), το θετικό φορτίο είναι απεντοπισμένο και σαν επακόλουθο δύναται να σχηματίσει δεσμούς υδρογόνου, επομένως να συνδεθεί με αρνητικά φορτισμένες ομάδες (Εικ. 1.10.2.). Η γουανιδιομάδα είναι θετικά φορτισμένη λόγω Pka σε ουδέτερα, όξινα και βασικά περιβάλλοντα καθιστώντας το αμινοξύ βασικό και ισχυρά πολικό, καθώς οι πολικές πλευρικές ομάδες της γουανιδίνης είναι πλήρως ιοντισμένες. (Iviii)



Εικ. 1.10.2. Σχηματική απεικόνιση αργινίνης και δυνατότητα μεταφοράς θετικού φορτίου κατά μήκος της αλυσίδας της ^{lviii}

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. Έρευνες έχουν δείξει ότι διαβητικοί ασθενείς εμφανίζουν μειωμένη περιεκτικότητα L-αργινίνης στον οργανισμό τους, γεγονός που βασίζεται ότι σχετίζεται άμεσα με διάφορα συμπτώματα της ασθένειας όπως για παράδειγμα η οστεοπόρωση. (lix)

Γενικές αρμοδιότητες της L-Αργινίνης είναι η σύνθεση πρωτεϊνών και η ενεργοποίηση κυτταρικής ανάπτυξης, μέσω παραγωγής μονοξειδίου του αζώτου και μεταβολίζοντας την ορνιθίνη και άλλες πολυαμίνες. Λόγω των ιδιοτήτων της αποτελεί μέσω επούλωσης τραυμάτων, βελτίωσης ανοσοποιητικής αντίδρασης, σαν συμπλήρωμα διατροφής και στην καταπολέμηση της οστεοπόρωσης. (lx).

Όσον αφορά στην σύνθεση τρισδιάστατων ικριωμάτων νανουδροξυαπατίτη για ορθοπεδικές εφαρμογές, σε έρευνα που έχει πραγματοποιηθεί αποδείχτηκε ότι η L-Αργινίνη διευρύνει τη βιοδραστικότητα των νανοσωματιδίων με επιφανειακή τροποποίηση και καθορίζει το σχήμα και μέγεθος κρυστάλλων υδροξυαπατίτη, καθώς με την απορρόφηση του αμινοξέος παρεμποδίζεται η ανάπτυξη των νανοκρυστάλλων σε αρχικό στάδιο, κυρίως πάνω στις επιφάνειες πλούσιες σε ασβέστιο. Φάνηκε επίσης, ότι η αύξηση ποσότητας αργινίνης κατά την σύνθεση οδήγησε σε ανάπτυξη άμορφου προϊόντος. (lxi) Εν γέννη, οι επιλεκτικές ηλεκτροστατικές αλληλεπιδράσεις εύκαμπτων, ισχυρά φορτισμένων οργανικών ενώσεων μικρού ή μεγάλου μοριακού βάρους ή επιφανειοδραστικών ουσιών χαμηλών συγκεντρώσεων επιδρούν στην ανάπτυξη κρυστάλλων άλατος. Σε διαλύματα υψηλών συγκεντρώσεων επιφανειοδραστικών ουσιών η αυτοοργάνωση των οργανικών μορίων (αμινοξέα) ξεκινά από ηλεκτροστατικές αλληλεπιδράσεις μεταξύ επιφανειοδραστικών-κρυστάλλων και επιδρούν έντονα στην ανάπτυξη του τελικού υλικού σε μια σύνθεση. (xlvii) Επομένως, στα πλαίσια αυτής της έρευνας, το αμινοξύ αυτό εξασφαλίζει την κολλοειδή σταθερο-

ποίηση μέσω ηλεκτροστατικής απόσεως μεταξύ επιφανειακών αμινοξέων, με επακόλουθη τη δημιουργία sol μονοδιεσπαρμένων λειτουργικών νανοσωματιδίων υδροξυαπατίτη. Επιπρόσθετα συμπεράσματα, καθιστούν την αργινίνη υπεύθυνη διαμόρφωσης και ιξώδους των νανοσωματιδίων και πηκτωμάτων.

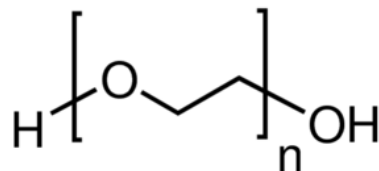
1.11. Πολυαιθυλενογλυκόλη/ Οξείδιο του Πολυαιθυλενίου

Το οξείδιο του πολυαιθυλενίου (poly(ethylene oxide) (PEO)) ή πολυαιθυλενογλυκόλη (poly(ethylene glycol) (PEG)) ή πολυοξυαιθυλένιο (poly(oxyethylene)) αποτελεί ένα θερμοπλαστικό, μη ιονικό πολυμερές γραμμικής πολυμερικής αλυσίδας, το οποίο ενδείκνυται για πολλές βιοιατρικές και φαρμακευτικές εφαρμογές, λόγω της απλότητας του μονομερούς του $-(CH_2CH_2O)-$ και εξαιρετικών ιδιοτήτων του. Πρόκειται για ένα μη φορτισμένο πολυαιθέρα με χημικό τύπο $H-(OCH_2CH_2)_n-OH$, ο οποίος αποτελεί την πιο απλή υδατοδιαλυτή μορφή πολυμερούς. Η συμπεριφορά του πολυμερούς είναι ανάλογη της αμφίφιλης δομής και του πολυμερικού βάρους του (Πίνακας 1.11.α), το οποίο ποικίλει από 200 έως 8000000. Ο παράγοντας του μοριακού βάρους έχει καθορίσει πλέον την ονομασία του πολυμερούς, συγκεκριμένα για μικρά μοριακά βάρη και μήκος αλυσίδας περίπου 150 καλείται PEG, ενώ PEO για μεγάλα μοριακά βάρη (από 10000 έως 8000000). (Ixi)(iii)

Πίνακας 1.11. α. Ιδιότητες PEO διαφορετικού μοριακού βάρους^{Ixi}

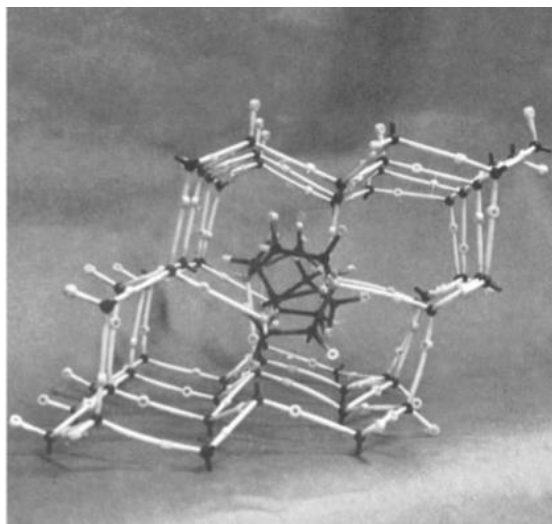
Properties	Number-average molecular weight						
	200	400	600	1000	4000	6000	20,000
Specific gravity (20/20°C)	1.125	1.130	1.130	-	1.204	-	-
Melting point (°C)	-	4-8	20-25	37-40	53-56	60-63	50-55
Viscosity (cst, 100°C)	4.3	7.3	10.5	17.4	75-85	700-900	-
Heat of fusion (J/g)	-	151	146	155	180	192	172
Refractive index (n_D , 25°C)	1.460	1.467	1.469	-	-	-	-
Surface tension (dyn/cm)	44.5	44.5	44.5	-	-	-	-

Το PEO κρυσταλλώνεται στο νερό σε θερμοκρασίες κατώτερες των 66° C και σε συγκεντρώσεις μικρότερες του 50% (iii), αποκτώντας μια ελικοειδή διαμόρφωση. Η μοναδιαία κυψελίδα του κρυστάλλου του περιέχει τέσσερις μοριακές αλυσίδες και μονοκλινές κρυσταλλικό πλέγμα με $a= 8,16 \text{ \AA}$, $b= 12,99 \text{ \AA}$, $c= 19,3 \text{ \AA}$ και $b' = 126^\circ 5'$. Ωστόσο, η λεπτομερής δομή του δεν δύναται να καθοριστεί μόνο από ανάλυση περίθλασης ακτίνων X (XRD), καθιστώντας αναγκαία την περαιτέρω χημική του ανάλυση μέσω φασματοσκοπίας (Raman), υπερύθρου (IR) και πυρηνικού μαγνητικού συντονισμού (NMR).



Εικ. 1.11.1. Σχηματική απεικόνιση δομής πολυαιθυλενίου με μοριακό βάρος 100,000^{lxiii}

Σχετικά με την δομή του PEO (Εικ. 11.1), το οξυγόνο μεταβάλλει ρυζικά τις αλληλεπιδράσεις και τις θερμοδυναμικές ιδιότητές του. Το μονομερές του αποτελείται από έναν εποξειδικό δακτύλιο, στον οποίο τα δύο άκρα του μορίου συνδέονται με CH₂ και το τρίτο άκρο του με οξυγόνο. Με την παρουσία κατάλληλου καταλύτη το μονομερές σχηματίζει μια επαναλαμβανόμενη αλυσίδα -CH₂-CH₂-O-(x1). Οι ομάδες CH₂CH₂ των μονομερών είναι υδρόφοβες δημιουργώντας επάλληλα υδρόφοβα στρώματα από μόρια νερού γύρω από την αντίστοιχη ομάδα κάθε μονομερούς. Το πρώτο στρώμα δημιουργείται από 2-3 μόρια νερού γύρω από την μονομερική επιφάνεια.



Εικ. 1.11.2: Σχηματική απεικόνιση πιθανής δομής H₂O-PEO^{lix}

Αξιοσημείωτη είναι η δυνατότητα του πολυμερούς να διαλύεται στο νερό σε ένα μεγάλο εύρος συγκεντρώσεων και θερμοκρασιών (ελαφρώς κάτω των 100°C). Το φαινόμενο υδατικής διαλυτότητάς του, σε αντίθεση με τα περισσότερα υδρόφοβα πολυμερή, έγκειται στην δομή του μονομερούς του. Στη δομή αυτή οι διατομικές αποστάσεις των ατόμων οξυγόνου είναι παραπλήσιες με αυτές των ατόμων οξυγόνου της δομής του καθαρού νερού, δίνοντας στο PEO τη δυνατότητα να εισχωρήσει μέσα στο τετραγωνικό κρυσταλλικό πλέγμα του νερού, έτσι ώστε όλα τα σημείων πλέγματος να καταλαμβάνονται, είτε με νερό ή με ένα αιθέρα οξυγόνου (Εικ. 1.11.2.). Επομένως, τα άκρα οξυγόνου των μονομερών του PEO έχουν υδρόφιλη φύση και δεσμεύουν τα μόρια του νερού. (Ixiv) Εν συνεχεία, καταγράφονται οι ιδιότητες του PEO σε αντίθεση με αυτές δομικά παρόμοιων πολυαιθέρων(Ixv):

Πίνακα 1.11.β. Διαλυτότητα ορισμένων πολυμερών στο νερό ^{x1}

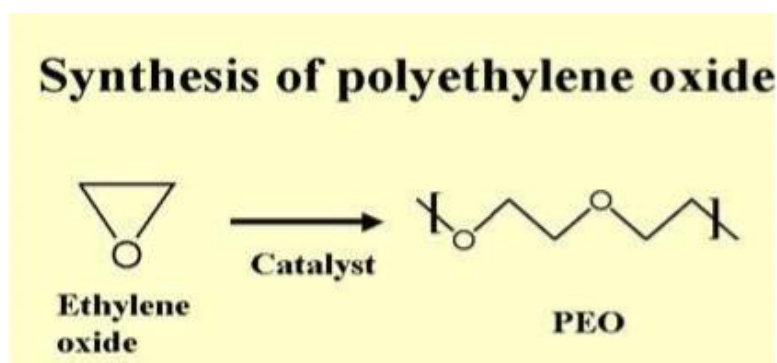
polymer	formula	soluble (s)/ insoluble (i) in water
poly(methylene oxide); (PMO)	$(-\text{O}-\text{CH}_2-)_m$	i
poly(acetaldehyde)	$(-\text{O}-\text{CH}-)_m$	i
poly(ethylene oxide); (PEO)	$(-\text{O}-\text{CH}_2-\text{CH}_2-)_m$	s
poly(propylene oxide); (PPO)	$(-\text{O}-\text{CH}_2-\text{CH}-)_m$ CH ₃	i
poly(trimethylene oxide)	$(-\text{O}-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{CH}_2-)_m$	i
poly(tetrahydrofuran)	$[-\text{O}-(\text{CH}_2)_4-]_m$	i

Σχετικά με τη θερμοκρασιακά εξαρτώμενη διαλυτότητα του πολυμερούς, κατά την αύξηση τη θερμοκρασίας, επέρχεται διάλυση του κελύφους ενυδάτωσης του PEO λόγω θερμικών κινήσεων. Το εν λόγω κέλυφος ενυδάτωσης είναι ένα υδατικό στρώμα υψηλού προσανατολισμού που περιβάλλει το πολυμερές σε συνθήκες χαμηλών θερμοκρασιακών ευρών, όταν αυτό βρίσκεται μέσα σε υδατικό διάλυμα. Το κέλυφος ενυδάτωσης έχει μικρότερη εντροπία και ενθαλπία από το μεγαλύτερο μέρος του νερού. Έτσι, ο σχηματισμός μιας τέτοιας δομής είναι εντροπικά δυσμενής, αλλά η δυσμενής αυτή συμβολή στην ελεύθερη ενέργεια υπερνικάτε από τη μείωση της ενθαλπίας κατά την σύνδεση του ύδατος και με το πολυοξαιθυλένιο. Ο διαχωρισμός της δομής υδατικού κελύφους-πολυμερούς δεν είναι ραγδαίος και η θερμοκρασία διαχωρισμού φάσης ή καθίζησης εξαρτάται από τη συγκέντρωση του πολυμερούς. Συγκεκριμένα, για πολύ αραιά πολυμερικά διαλύματα (<0,2%) η καθίζηση έχει τη μορφή νεφελώματος, για μεγαλύτερες συγκεντρώσεις πολυμερούς (>=0,5%) το πολυμερές καθιζάνει υπό μορφή gel. Σε ακόμα υψηλότερες θερμοκρασίες, όταν η δομή έχει διαλυθεί σε μεγάλο βαθμό, η δυσμενής συμβολή εντροπίας μειώνεται. Το σύστημα γίνεται πλήρως αναμείξιμο, αρκεί η θερμοκρασία να ξεπερνά ένα κρίσιμο όριο μη-διαλυτότητας και μην είναι αρκετά υψηλή, ώστε να μην προκαλέσει καταστροφή του πολυμερούς. (Ixii)

Από κινητική σκοπιά, παρατηρείται ότι οι δυναμικές ιδιότητες ενός πολυμερούς εξαρτώνται από τις πιθανές διαμορφώσεις του και από τις πιθανότητες μετάβασής του. Η παρουσία ογκωδών ομάδων που συνδέονται με τον πολυμερικό σκελετό αποτελούν στερεοχημικά εμπόδια και οδηγούν στη μείωση της κινητικότητας των πολυμερικών τμημάτων. Στην περίπτωση του PEO, η απουσία ογκώδων πλευρικών ομάδων το καθιστά πολύ ευέλικτο συγκριτικά με άλλα πολυμερή και πολυηλεκτρολύτες. Από μελέτες διηλεκτρικής συμπεριφοράς του PEO, βρέθηκε ότι το πολυμερές έχει μεγάλο βαθμό ελευθερίας, ο οποίος πιθανότητα οφείλεται στους δεσμούς οξυγόνου-άνθρακα. Για τον καθορισμό μοριακών κινήσεων συναρτήσε του χρόνου (10^{-12} - 10^{-6} sec) μέσω NMR, παρατηρήθηκε η εξάρτηση του ρυθμού χαλάρωσης του PEO από το μήκος της πολυμερικής αλυσίδας και από το μοριακό

βάρος. Οι αναλύσεις κατέδειξαν ότι δεν υπάρχει εξάρτηση της χαλάρωσης από το μοριακό βάρος, όταν το μήκος της αλυσίδας του PEO είναι μεγαλύτερο από περίπου 100. Επιπλέον, η εξάρτηση των δυναμικών ιδιοτήτων από την συγκέντρωση πολυμερούς προκαλείται λόγω αλληλεπιδράσεων πολυμερούς-πολυμερούς, ενώ σε περίπτωση ανεξαρτησίας από τη συγκέντρωση καθορίζονται κυρίως ενδομοριακώς και μέσω αλληλεπιδράσεων διαλύτη-πολυμερούς. (Ixii)

Όσον αφορά στην παρασκευή υψηλού μοριακού βάρους πολυαιθυλενογλυκόλης (PEO), η σύνθεση γίνεται μέσω διαδικασίας πολυμερισμού αιωρήματος. Κατά τη διαδικασία πολυσυμπυκνώσεως, είναι απαραίτητη η διατήρηση την αυξανόμενης πολυεδρικής αλυσίδας εντός διαλύματος. Η αντίδραση καταλύεται από ενώσεις μαγνησίου, αργιλίου, ή ασβεστίου με οργανικά στοιχεία. Για να αποφευχθεί η πήξη των πολυμερικών αλυσίδων, χρησιμοποιούνται χημικά πρόσθετα όπως διμεθυλογλυοξίμη (Σχήμα 1.11.3.). (Ixvi)



Σχήμα 1.11.3: Σύνθεση PEO μέσω καταλύτη ^{Ixvi}

Η πολυαιθυλενογλυκόλη (PEG) παράγεται από την αλληλεπίδραση του οξειδίου του αιθυλενίου είτε νερό, είτε με αιθυλενογλυκόλη, είτε με oligομερή αιθυλενογλυκόλης και καταλύεται από όξινους ή βασικούς καταλύτες. Η αιθυλενογλυκόλη και τα oligομερή της προσφέρονται ως υλικά έναρξης της αντίδρασης παραγωγής του PEG, 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 δύναται να είναι κατιονικός ή ανιονικός (εξώθερμη αντίδραση). Ο ανιονικός μηχανισμός είναι προτιμότερος, επειδή επιτρέπει την παραγωγή PEG με χαμηλή πολυδιασκορπισιμότητα. Πρέπει να αναφερθεί ότι σε περίπτωση υπερθέρμανσης ή μόλυνσης του οξειδίου του αιθυλενίου με αλκάλια ή οξείδια μετάλλων δύναται να πραγματοποιηθεί ανεξέλεγκτος πολυμερισμός, οδηγούμενος ακόμα και σε έκρηξη.

Στην εμπορική του μορφή το πολυμερές PEO έχει τη μορφή λευκής κρυσταλλικής σκόνης με μέσο μέγεθος σωματιδίων 150 nm και τα διαλύματά του εμφανίζουν ελαφρά βασικό pH. Το προϊόν δεν είναι τοξικό για τον ανθρώπινο οργανισμό και για το λόγο αυτό χρησιμοποιείται στους τομείς της φαρμακευτικής και βιοϊατρικής για την παραγωγή φαρμακευτικών δισκίων ως συνδέτης είτε ως υλικό

επικάλυψης, πυκνωτικός παράγοντας, βιοσυγκολλητικό υλικό για βλεννογόνους αδένες, ως υποστηρικτής χρωματογραφίας, ως καθετήρας, μέσο παραγωγής υδρογελών για βιολογικές εφαρμογές, χρήση 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.^(lxvii)

Εν γένει, συνδέτες(xliii) σαν το PEO, προστίθενται στους πολφούς για να προσδώσουν αντοχή στα ωμά δοκίμια που παράγονται με τις υγρές μεθόδους μορφοποίησης, έτσι ώστε να είναι εύκολο να τα χειριστούμε εύκολα και να τα αποθηκεύσουμε. Ακόμη προσδίδουν στην προς μορφοποίηση μάζα τις απαιτούμενες ελαστικές ιδιότητες ώστε να υποβοηθηθεί η σχηματοποίηση. Κατά την ξήρανση ενός υλικού, ο συνδέτης παραμένει στο δοκίμιο ακόμα και όταν ο διαλύτης έχει εξατμιστεί. Η προσθήκη του στο πολφό συνοδεύεται από μια σειρά αλλαγών στην μορφή του πολφού. Έτσι με την προσθήκη του αυξάνεται η ικανότητα διαβροχής των σωματιδίων, καθυστερεί η καταβύθιση τους και αυξάνεται το ιξώδες του πολφού. Οι προϋποθέσεις για την σωστή επιλογή του συνδέτη βασίζονται στις παρακάτω παρατηρήσεις:

- Πρέπει το κόστος του να είναι τέτοιο ώστε να συμφέρει η προσθήκη του για την παραγωγή κάποιου συγκεκριμένου προϊόντος.
- Επίσης πρέπει να είναι γνωστές οι ιξωδοελαστικές ιδιότητες που προσδίδει ο συγκεκριμένος συνδέτης για να κριθεί αν μπορεί να χρησιμοποιηθεί στην δεδομένη μέθοδο μορφοποίησης.
- Ακόμη είναι αναγκαία η γνώση της περιοχής θερμοκρασιών που μπορεί να δουλέψει ο συγκεκριμένος συνδέτης.
- Τέλος πρέπει να ερευνηθεί η συμβατότητα του με την συγκεκριμένη σκόνη που θα αναμιχθεί ώστε να ληφθούν τα βέλτιστα αποτελέσματα στο τελικό προϊόν.

Στην περίπτωση μοσχευμάτων, που περιέχουν PEO είτε στο εσωτερικό είτε στην επιφάνειά τους, εμφανίζεται καλή βιοσυμβατότητα, η οποία διατηρείται ακόμα και κάτω από συνθήκες έντονης τριβής και διάβρωσης. Ωστόσο, μια προβληματική περιοχή του PEO είναι η ανεπαρκής μηχανική αντοχή του πολυμερικού δικτύου του, η οποία ενδέχεται να αυξηθεί σημαντικά αν ακινητοποιηθεί σε κάποιο πολυμερικό υπόστρωμα μεγαλύτερης αντοχής, με μεθόδους όπως η φυσική προσρόφηση, η ομοιοπολική μεταμόσχευση, και ο συμπολυμερισμός. (lxii)

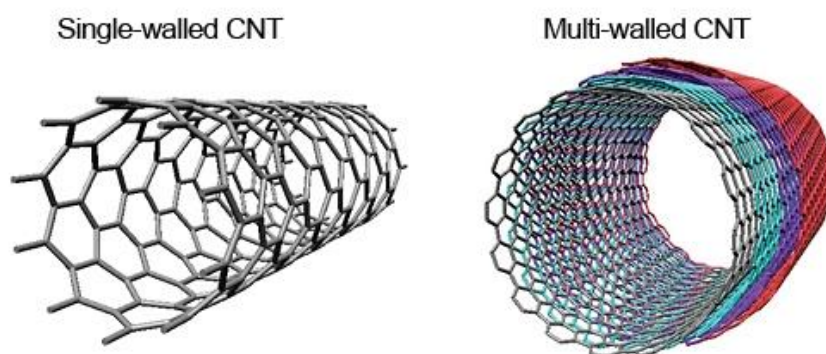
Η βασικότερη εφαρμογή του PEO είναι η χρήση του σε ελεγχόμενη αποδέσμευση φαρμάκων, καθώς αυτό αποικοδομείται συναρτήσει του μοριακού του βάρους. Για το λόγο αυτό δύναται να χρησιμοποιηθεί στην παρασκευή αυτοιάσιμων ικριωμάτων. Τα πολυμερή με μικρότερο σχετικά μοριακό βάρος (PEG) αποβάλλονται αρκετά 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 αποικοδόμησής του από τον οργανισμό. Τέλος, το υδρόφιλο PEO επιδρά

δραστικά όντας σε ένα βιοσύστημα, καθώς δύναται να παγιδεύει πρωτεΐνες και να τις αποδεσμεύσει επιλεκτικά, λειτουργώντας σαν φορέας. Συγκεκριμένα, η κινητικότητα των ενυδατωμένων αλυσίδων του αυξάνει με το μήκος της αλυσίδας, επομένως το PEO μεγαλύτερου μοριακού βάρους καταστέλλει την προσρόφιση πρωτεϊνών αποτελεσματικότερα από το PEO μικρότερης πολυμερικής αλυσίδας. (Ixii) (Ikviii)

1.12. Νανოსωλήνες άνθρακα (CNTs)

Το 1991 ο Iijima(Ixix) ανακάλυψε ότι η εναπόθεση άνθρακα στην κάθοδο κατά τη διάρκεια της διαδικασίας κατασκευής φουλερένιων από την αιθάλη, σε ένα τόξο συνεχούς ρεύματος έχει ως αποτέλεσμα την δημιουργία σωλήνων, οι οποίοι έχουν δομή όπως αυτή του γραφίτη. Η ανακάλυψη αυτή έχει δώσει μεγάλη ώθηση στον τομέα της έρευνας των φουλερενίων. Οι νανოსωλήνες, ως αλλοτροπική μορφή άνθρακα, περιλαμβάνουν ομόκεντρα φύλλα του γραφίτη σε μορφή κυλινδρικού σωλήνα με διάμετρο μερικών νανομέτρων και μήκος λίγων μικρομέτρων. Ως νανοϋλικά προσφέρουν μεγάλη ενεργή επιφάνεια, δυνατότητες χημικής επιφανειακής τροποποίησής τους και ελεγχόμενη δομή.

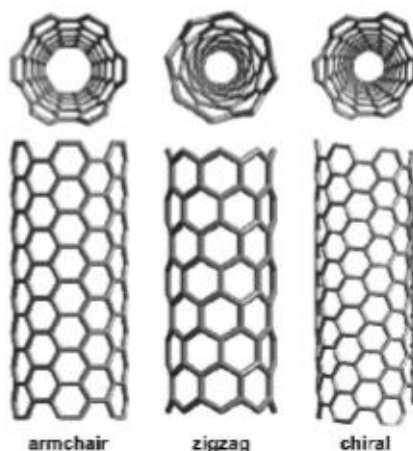
Υπάρχουν δύο κύριοι τύποι νανοςωλήνων: οι νανοςωλήνες μονού τοιχώματος (Single-Walled Carbon Nanotubes, SWCNTs), ο οποίος αποτελείται από ένα μόνο τυλιγμένο στρώμα γραφενίου και οι νανοςωλήνες πολλαπλών τοιχωμάτων (Multi Walled Carbon Nanotubes, MWCNTs), οι οποίοι αποτελούνται από πολλά ομόκεντρα στρώματα γραφενίου με αύξουσες διαμέτρους, με απόσταση μεταξύ των στρωμάτων 0,34nm (Εικ. 1.12.1). Όσον αφορά στα γεωμετρικά χαρακτηριστικά τους, η διάμετρος των SWCNTs είναι περίπου 1 nm και το πάχος τους της τάξης των τουλάχιστον 10 nm, ενώ των MWCNTs μπορεί να μεταβάλλεται από 1 έως πάνω από 100 nm. Το μήκος των CNTs έχει ένα ευρύ φάσμα μεγέθους, το οποίο κυμαίνεται από μερικά nm έως πάνω από 1 mm και ο λόγος μήκους ως προς τη διάμετρο δύναται να ξεπερνά την τάξη των 10^{-6} (xix).



Εικ. 1.12.1. Σχηματική απεικόνιση τύπων νανοςωλήνων άνθρακα^{lx}

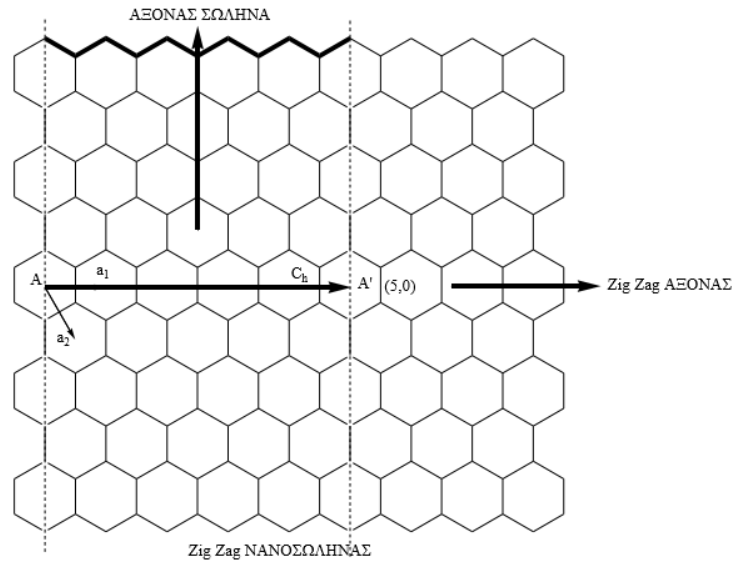
Οι κυλινδρικοί δακτύλιοι των CNTs είναι εξαγωνικοί, ενώ τα άκρα τους κλείνουν με τη συμμετοχή πενταγώνων. Σε ορισμένες περιπτώσεις, τα άκρα έχουν ημισφαιρικό σχήμα, σαν το μισό μόριο φουλερενίου. Συνήθως οι νανοςωλήνες άνθρακα έχουν επίπεδη μορφή, με ένα δακτύλιο από πεντάγωνα στο όριο μετάβασης

προς το κυλινδρικό τμήμα του μορίου. Οι πολλαπλοί τρόποι αναδίπλωσης του γραφιτικού φύλλου προς το σχηματισμό κυλινδρικού τμήματος του σωλήνα προσδίδουν στον εκάστοτε νανοσωλήνα διαφορετικές ιδιότητες (Εικ. 1.12.2).

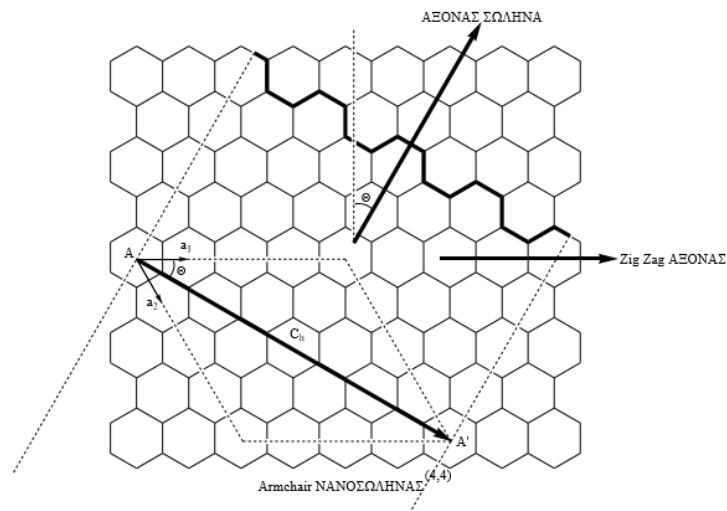


Εικ. 1.12.2. Σχηματική απεικόνιση τριών δυνατών δομών νανοσωλήνων άνθρακα απλού τοιχώματος

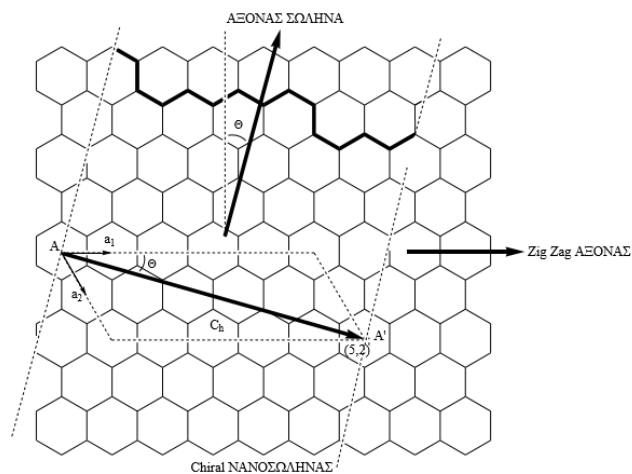
Η δομή ενός νανοσωλήνα απλού τοιχώματος (SWCNTs) μπορεί να εξηγηθεί χρησιμοποιώντας το χειρικό διάνυσμα C_h , το οποίο δίνεται από τη σχέση $C_h = na_1 + ma_2$, και ορίζεται ως το διάνυσμα πάνω σε ένα γραφιτικό φύλλο για το σχηματισμό κυλίνδρου (όπου n , m οι δείκτες του νανοσωλήνα και a_1 , a_2 τα διανύσματα του εξαγωνικού πλέγματος του γραφιτικού φύλλου). Όταν η γωνία μεταξύ χειρικού διανύσματος C_h και του zig zag άξονα του γραφιτικού φύλλου είναι 0° [$(m, n) = (p, 0)$, όπου ο p ακέραιος], τότε οι νανοσωλήνες έχουν zig zag δομή (Εικ. 1.12.4). Όταν η γωνία μεταξύ χειρικού διανύσματος C_h και του zig zag άξονα του γραφιτικού φύλλου είναι $\pm 30^\circ$ [$(m, n) = (p, p)$, όπου ο p ακέραιος], τότε οι νανοσωλήνες έχουν armchair δομή (Εικ. 1.12.5). Σε κάθε άλλη περίπτωση, $0^\circ < \theta < 30^\circ$ [$(m, n) = (p, i)$, όπου p, i ακέραιοι], τότε οι νανοσωλήνες έχουν chiral δομή (Εικ. 1.12.6).



Εικ. 1.12.4. Σχηματική αναπαράσταση νανοσωλήνα zig zag (5,0), η οποία δείχνει τα δυο σημεία ένωσης κατά την αναδίπλωση του γραφιτικού φύλλου ^{lxix}



Εικ. 1.12.5. Σχηματική αναπαράσταση νανοσωλήνα armchair (4,4), η οποία δείχνει τα δυο σημεία ένωσης κατά την αναδίπλωση του γραφιτικού φύλλου ^{lxix}



Εικ. 1.12.6. Σχηματική αναπαράσταση νανοσωλήνα chiral (5,2), η οποία δείχνει τα δυο σημεία ένωσης κατά την αναδίπλωση του γραφιτικού φύλλου ^{lxix}

Όπως προαναφέρθηκε, οι ιδιότητες των CNTs εξαρτώνται από τη δομή τους (χειρικό διάνυσμα, διάμετρο). Μελέτες κατέδειξαν ότι οι όλοι οι armchair SWCNTs είναι μεταλλικοί, οι zig zag, chiral είναι μεταλλικοί αν $(n-m)/3$ είναι ακέραιος, αλλιώς είναι ημιαγωγοί. Επομένως, ελέγχοντας και καθορίζοντας τη δομή τους, οι CNTs αποκτούν συγκεκριμένες ηλεκτρονικές ιδιότητες. Επιπλέον, οι CNTs παρουσιάζουν καλές μηχανικές ιδιότητες, όπως μεγάλη αντοχή σε κάμψη, κόπωση, εφελκυσμό, χαμηλό βάρος, σταθερότητα, μεγάλο εμβαδον επιφάνειας, υψηλή θερμική αγωγιμότητα και εμφανίζουν ελαστικότητα. Το μέτρο ελαστικότητας τόσο για τους MWCTNs όσο και τους SWCNTs σωλήνες είναι άνω του 1 TPa και μειώνεται, καθώς η διάμετρος αυξάνει. Οι φορτίσεις μέχρι και 30 GPa δε καταστρέφουν τη βασική δομή του νανοσωλήνα και η πυκνότητα εξαρτάται από την ακριβή δομή του. Ενδεικτικά, η πυκνότητα ενός zig-zag (17,0) νανοσωλήνα υπολογίζεται $1,34 \text{ gr/cm}^3$. (lxix) Ακολουθεί Πίνακας 1.12.1. με ιδιότητες νανοσωλήνων άνθρακα ανάλογων της δομής τους.(lxix)

Πίνακας 1.12.1. Ιδιότητες CNTs ανάλογες δομής τους^{lxix}:

	<i>L/D</i>	Young's modulus (TPa)	<i>A</i> (TPa)	<i>B</i> (TPa)	Proportional strength (MPa)	Yield strength (MPa)	Tensile strength (MPa)	Proportional strain limit	Elastic strain limit	Maximum strain
Single-walled CNT of (10,10)	4.5	1.043	-2.625	1.211	6.103×10^4	1.369×10^5	1.404×10^5	0.0585	0.231	0.280
	9.1	1.031	-2.522	1.190	6.271×10^4	1.421×10^5	1.485×10^5	0.0594	0.236	0.279
Two-walled CNT of (5,5) and (10,10)	4.5	1.161	-2.543	1.259	7.231×10^4	1.614×10^5	1.624×10^5	0.0627	0.247	0.279
	9.1	1.175	-2.810	1.362	7.287×10^4	1.633×10^5	1.684×10^5	0.0621	0.242	0.281
Three-walled CNT of (5,5), (10,10) and (15,15)	4.5	1.000	-2.358	1.160	6.068×10^4	1.430×10^5	1.434×10^5	0.0605	0.238	0.281
	9.1	0.972	-2.275	1.120	5.645×10^4	1.381×10^5	1.414×10^5	0.0611	0.246	0.282
Four-walled CNT of (5,5), (10,10), (15,15) and (20,20)	4.5	0.932	-2.234	1.103	6.075×10^4	1.343×10^5	1.382×10^5	0.0654	0.235	0.281
	9.1	0.872	-2.132	1.023	5.784×10^4	1.278×10^5	1.327×10^5	0.0633	0.241	0.280

Οι CNTs παρουσιάζουν εξαιρετικά χρήσιμες δομικές, ηλεκτρικές, θερμικές (π.χ. θερμική σταθερότητα), και χημικές ιδιότητες και τα ποικίλα προϊόντα τους είναι ελαφρύτερα, ισχυρότερα, φτηνότερα, καθαρότερα και αποδοτικότερα.

Σχετικά με τον κλάδο της ιστομηχανικής, οι βιοσυμβατοί νανοσωλήνες άνθρακα αποτελούν ένα κατάλληλο υπόστρωμα οστικής αναγέννησης, στο οποίο προάγεται η ανάπτυξη και ο πολλαπλασιασμός οστικών κυττάρων, με ταυτόχρονη παροχή επιπρόσθετης μηχανικής αντοχής. Η μονοδιάστατη δομή τους τα καθιστά κατάλληλα υλικά συνθέτων. Επίσης, δύναται να αποτελέσουν ενισχυτικό μέσο οστικών τσιμέντων (π.χ. PMMA) παρέχοντας αυξημένες αντοχές σε κόπωση, εφελκυσμό και δυσθραυστότητα και υλικά σύνθετων επικαλύψεων με ενισχυμένες αντοχές. Σε

έρευνες που έχουν διεξαχθεί πάνω σε μοσχεύματα με επικαλύψεις υδροξυαπατίτη, η ενίσχυσή τους με CNTs τους προσέδωσε αυξημένη τραχύτητα, η οποία λειτουργεί συνεργιστικά στην προσκόλληση κυττάρων, μέσω ευνοημένων επιφανειακών αλληλεπιδράσεων με πρωτεΐνες.^(lxvii) Στην περίπτωση ικριωμάτων νανουδροξυαπατίτη, ο οποίος έχει όμοια δομή με το φυσικό οστό όντας όμως ψαθυρός, παρατηρείται βελτίωση της μηχανικής και βιολογικής απόκρισής του, μέσω προσθήκης CNTs. Συγκεκριμένα, συγκριτικά με τις ιδιότητες ικριωμάτων χωρίς νανοσωλήνες άνθρακα, τα σύνθετα CNTs-HAp ικριώματα παρουσιάζουν μεγάλη αντοχή σε κάμψη, αυξημένη σκληρότητα, προάγουσα κρυσταλλικότητα και οστεοαγωγίμες, οστεοεπαγωγικές, οστεογονικές ιδιότητες κοντά στην επιφάνεια των CNTs, καθώς και ικανότητα μεταφοράς φαρμάκων. Βέλτιστες ιδιότητες συνθέτου ικριώματος CNTs-HAp επιτεύχθηκαν με χρήση χημικά τροποποιημένων νανοσωλήνων άνθρακα, λόγω ισχυρότερης διασύνδεσής τους με τη μήτρα ικριώματος. (lxviii)

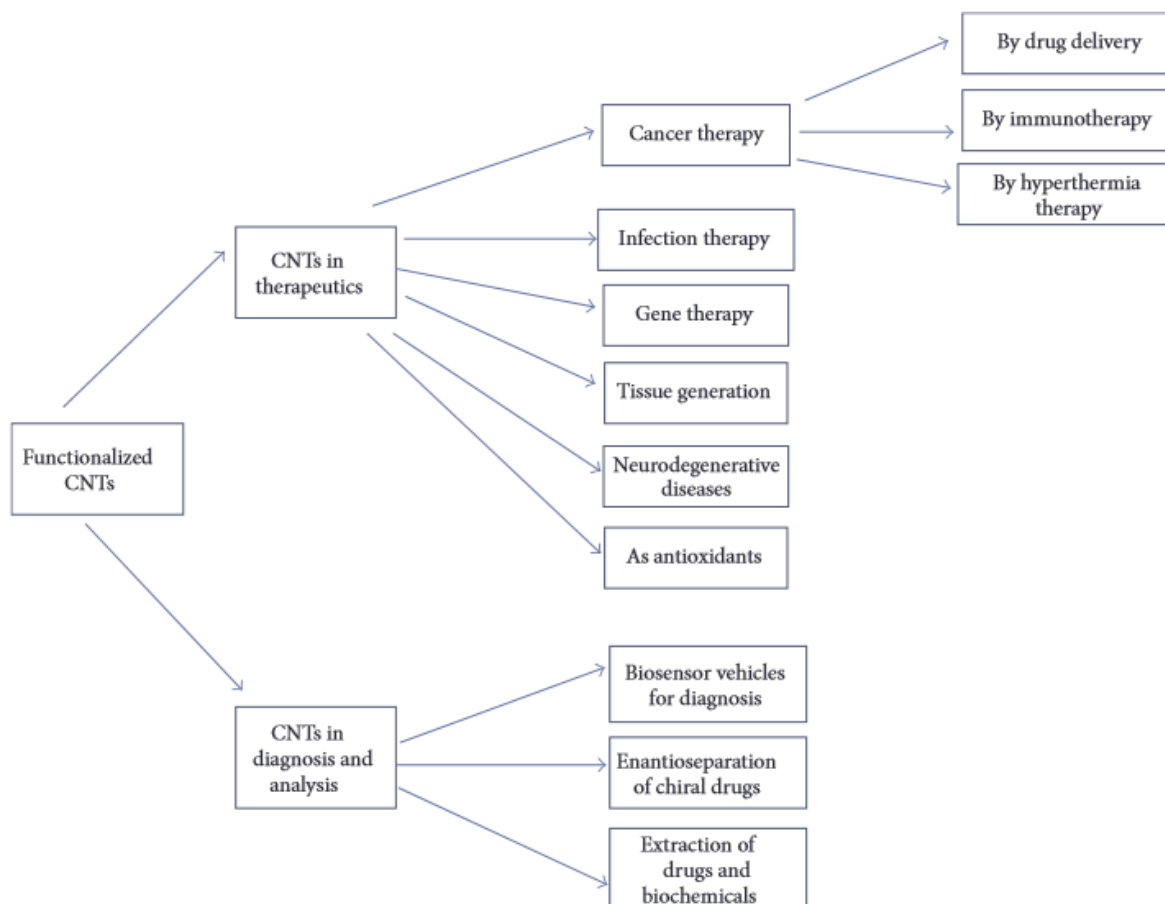
Ωστόσο, προϋπόθεση σύνθεσης σύνθετων οστικών ικριωμάτων με CNTs, είναι η δημιουργία καλής διεπιφάνειας μεταξύ των νανοσωλήνων και της πολυμερικής μήτρας, καθώς και η μη τοξικότητα των CNTs. Αναγκαίο βήμα της άρτιας παραγωγής του βιοϋλικού αποτελεί η καλή διασπορά των CNTs, ώστε να σπάσουν τα τυχόν συσσωματώματα, να αναδευτούν ή να σχηματίσουν σταυροδεσμούς με τα βιοπολυμερή του ικριώματος (cross-linking), με σκοπό να αποφευχθεί η ολίσθησή τους.

Επιπρόσθετοι παράγοντες που πρέπει να ληφθούν υπόψη στην σύνθετη δομή του βιο-ικριώματος είναι το μήκος, πάχος, τραχύτητα, διάμετρος, ηλεκτροστατικό φορτίο, η επιφανειακή ενέργεια των CNTs, η ύπαρξη λειτουργικών ομάδων, καθώς επιδρούν άμεσα στη μορφολογία, πρόσφυση, οστεοεπαγωγή, οστεοενσωμάτωση των εν λόγω ικριωμάτων. (lxix)(lxviii)

Η σύνθεση των νανοσωλήνων γίνεται με διάφορες μεθόδους, οι κυριότερες των οποίων είναι με καταλυτική χημική εξάχνωση και εναπόθεση, με εκκένωση τόξου, πυρόλυση υδρογονανθράκων (CVD) 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 των αριθμών 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. (lxix)

Οι CNTs έχουν ποικίλες εφαρμογές στη σύγχρονη τεχνολογία, μερικές απ' τις οποίες είναι η χρήση τους σαν μεμβράνες ανάπτυξης οστικών κυττάρων και μοριακών διαχωρισμών, στα οστικά ικριώματα, σαν ακίδες μικροσκοπιών AFM, STM, σαν ηλεκτροχημικοί υπερπυκνωτές, τρανζίστορ, αισθητήρες, ηλεκτροχημικοί ενεργοποιητές, μικροσκοπικοί χημικοί ανιχνευτές, σαν μέσο αποθήκευσης ενέργειας και υδρογόνου, στην εμβολή λιθίου, σε μοριακά ηλεκτρονικά, σε συσκευές εκπομπής πεδίου (FEDs) και γενικά σε διαστημικό, βιοατρικό, στρατιωτικό, ηλεκτρονικό

τομέα. Επίσης, χρησιμοποιούνται σαν υλικά ενίσχυσης και πλήρωσης σε σύνθετα υλικά προσφέροντας περαιτέρω μηχανικές, θερμικές, υδροφοβικές, ηλεκτροχημικές, ηλεκτρικές, οπτικές, ακόμα και φωτοβολταϊκές ιδιότητες.(Ixxiv) Οι χρήσεις των χημικά τροποποιημένων CNTs στον ιατρικό κλάδο αναπαρίστανται στην ακόλουθη σχηματική αναπαράσταση (Εικ. 12.7.).



Εικ. 1.12.7. Οι εφαρμογές τροποποιημένων CNTs στην θεραπεία και διάγνωση ^{Ixxv}

1.13. Πορώδες ικριωμάτων

Το πορώδες δίκτυο των οστικών ικριωμάτων αποτελεί βασικό κριτήριο επίτευξης της οστικής αναγέννησης, καθώς επιτρέπει την μετακίνηση κυττάρων και την παροχή αίματος και θρεπτικών συστατικών διαμέσου των πόρων του. Η απαραίτητη ύπαρξη ανοιχτού πορώδους, τόσο επιφανειακά όσο και εσωτερικά της δομής του ικριώματος, προάγει την κυτταρική προσκόλληση. (Ixxvi) Σε έρευνες που έχουν διεξαχθεί, ο συνδυασμός κατάλληλης διαπερατότητας και μεγέθους των πόρων οδηγεί σε βέλτιστη οστεοαγωγιμότητα, καθιστώντας την δυνατότητα προσαρμογής τους αναγκαίο τμήμα ιστομηχανικής. Επιπλέον, ελέγχοντας το πορώδες του ικριώματος ρυθμίζονται ταυτόχρονα και οι μηχανικές αντοχές του. (Ixxvii) Επομένως, η ανάπτυξη και διατήρηση του ιδανικού πορώδους δικτύου κρίνεται αναγκαία.

Σχετικά με το μέγεθος πόρων, το μακροπορώδες (>50μm) επιδρά συνεργιστικά στην οστεογένεση διευκολύνοντας την ιοντική και κυτταρική κίνηση, ενώ το μικροπορώδες (<20μm) υποβοηθά την διαδικασία αναγέννησης αυξάνοντας την ειδική επιφάνεια, πάνω στην οποία προσροφώνται πρωτεΐνες, προάγοντας την ιοντική διαλυτότητα και παρέχοντας σημεία προσάρτησης για τους οστεοβλάστες. Επιπρόσθετα, το μικροπορώδες συνδράμει στην επαρκή κατακράτηση αυξητικών παραγόντων και δεν επηρεάζει τόσο άμεσα τις μηχανικές αντοχές του ικριώματος. Σύμφωνα με προηγούμενες μελέτες οστικών ικριωμάτων (Ixxviii), παρουσιάζεται μια αντικρουόμενη σχέση εξάρτησης των ικριωμάτων με το πορώδες σε κατάσταση *in vitro* και *in vivo*. Σχετικά με την *in vitro* προσέγγιση, το χαμηλότερο πορώδες προωθεί την οστεογένεση, καθώς καταστέλλει τον πολλαπλασιασμό των κυττάρων και επιβάλλει την συσσωμάτωση αυτών. Φαίνεται ότι η *in vitro* οστεογένεση δεν επηρεάζεται από το μέγεθος των πόρων και ενισχύεται από το χαμηλότερο πορώδες, ωστόσο, ότι οι διαστάσεις των πόρων πρέπει να είναι μία τάξη μεγέθους χαμηλότερες από την ελάχιστη απαίτηση για οστεογένεση *in vivo*. Σε αντίθεση με το *in vitro* περιβάλλον, *in vivo* η αύξηση του πορώδους και του μεγέθους των πόρων οδηγεί σε μεγαλύτερη ανάπτυξη οστού εσωτερικά της μικροδομής, φαινόμενο το οποίο παρατηρήθηκε κατόπιν εμφύτευσης του ικριώματος. Ακολουθως, η παράμετρος της διαπερατότητας έχει δείξει ότι επηρεάζει θετικά τον ρυθμό οστικής απόθεσης και το βάθος της διείσδυσης *in vitro* και *in vivo*. Οι διασυνδεδεμένοι πόροι δημιουργούν ένα δρόμο για το αγγειακό σύστημα, που απαιτείται για να θρέψει το νεοσυντεθειμένο οστό και να αποβάλλει τυχόν απόβλητα. (Ixxvii) Πέραν του μεγέθους του μάκρο-, μικροπορώδους και της διασυνδεσιμότητας πορώδους δικτύου, υπάρχουν επιπλέον παράμετροι που καθορίζουν το ρυθμό και την ποιότητα οστεοενσωμάτωσης, όπως το κλάσμα όγκου του πορώδους, η πυκνότητα διασύνδεσης, η γεωμετρία των πόρων, η τραχύτητα της πορώδους δομής και η μικροδομή των ράβδων/καναλιών του πορώδους δικτύου. Οι παράγοντες αυτοί εξαρτώνται από τη χημική σύσταση του ικριώματος, ωστόσο υπάρχει μια κατευθυντήρια γραμμή, κατά την οποία το ποσοστό του συνολικού πορώδους είναι τουλάχιστον 50-60%, το ελάχιστο μέγεθος καναλιών διασύνδεσης κυμαίνεται από 50μm έως 100 μm και το μικροπορώδες αποτελεί τουλάχιστον το 20% της μικροδομής.(Ixxix) Επιπρόσθετα, σε προηγούμενες έρευνες (Ixxviii) έχει αποδειχθεί πως η αύξηση τραχύτητας της πορώδους επιφάνειας οδηγεί σε υψηλότερη συνολική οστεοενσωμάτωση, καθώς ενισχύεται η προσκόλληση, διαφοροποίηση και ο πολλαπλασιασμός των κυττάρων.

Το μέγεθος των πόρων και το πορώδες επηρεάζουν άμεσα τις μηχανικές ιδιότητες του βιουλικού. Η οστική αναγέννηση δύναται να προαχθεί με την αύξηση πορώδους, ωστόσο η μηχανική αντοχή προβλέπεται να μειωθεί σημαντικά. Στην περίπτωση αύξησης της αναλογίας βάρους πολυμερούς/κεραμικού, σημειώνεται ενίσχυση πορώδους με επακόλουθη αύξηση μεσαίου μεγέθους πόρων, αναστολή του ποσοστού νανο-πόρων και ταυτόχρονη μείωση της αντοχής σε θλίψη και του συντελεστή Weibull. Όσον αφορά στο πορώδες, υπάρχει ένα κρίσιμο σημείο, όπου για τιμές μικρού ποσοστού πορώδους συνεπάγεται ανεπαρκής διασυνδεσιμότητα, ενώ για μεγάλα ποσοστά επέρχεται μείωση μηχανικής αντοχής. Το όριο συσχέτισης

μηχανικών ιδιοτήτων και πορώδους μικροδομής υπακούει στην ακόλουθη σχέση (Ixxvii):

$$E = E_0[1 - (P + V_{GP})]^n$$

όπου E_0 είναι το μέτρο ελαστικότητας του στερεού συνθέτου, P ο λόγος πορώδους, V_{GP} ο λόγος προσμίξεων ύαλου στο πορώδες και n μια σταθερά που εξαρτάται από τη μικροδομή. Ορισμένοι παράγοντες που επιδρούν στην αλλαγή της παραπάνω συσχέτισης είναι το μοριακό βάρος του πολυμερικού συνδέτη και η ύπαρξη πορογόνων ή άλλων ουσιών, καθιστώντας δυνατό τον έλεγχο των μηχανικών ιδιοτήτων μέσω της διαδικασίας σύνθεσης.

Για τον καθορισμό του πορώδους υπάρχουν αρκετές τεχνικές ανάλυσης, όπως η ηλεκτρονική μικροσκοπία σάρωσης (SEM), η ποροσιμετρία υδραργύρου, η σταθμική και στατιστική ανάλυση, η μέθοδος υγρής μετατόπισης και η μικροτομογραφία μέσω υπολογιστή (CT-scan). Μέσω ηλεκτρονικής μικροσκοπίας σάρωσης και ποροσιμετρίας υδραργύρου παρατηρείται το μέγεθος πόρων και η πορώδης μικροδομή, η σταθμική ανάλυση δείχνει το συνολικό πορώδες, η στατιστική ανάλυση παρουσιάζει την κατανομή μεγεθών των πόρων της μικροδομής, η μέθοδος υγρής μετατόπισης προσδιορίζει το ανοιχτό πορώδες και η τομογραφία σάρωσης εμφανίζει την τρισδιάστατη πορώδη μικροδομή και το μέγεθος πόρων αυτής. (Ixxviii)

Η σύνθεση πορώδων δομών πραγματοποιείται με μια πληθώρα τεχνικών, όπως η λυοφιλίωση, η χύτευση ολίσθησης και γέλης, η συμπίεση ινών, ο αφρισμός αερίων, η έκπλυση άλατος και ο διαχωρισμός φάσεων. Στο παράδειγμα της λυοφιλίωσης (ή κρυοξηράνσης) λαμβάνει χώρα ταχεία ψύξη ενός σταθερού κολλοειδούς αιωρήματος (νανουδραξυαπατίτη), το οποίο χυτεύεται μέσα σε ένα μη πορώδες καλούπι και ακολουθεί η εξάχνωση του παγωμένου διαλύτη υπό χαμηλές θερμοκρασίες σε κενό. (Ixxvi)(Ixxviii)

1.14. Μηχανικές ιδιότητες

Τα κεραμικά υλικά, είναι ψαθυρά υλικά με μεγάλο μέτρο ελαστικότητας, το οποίο αποτελεί μέτρο της δυσκαμψίας του υλικού. Ένα δύσκαμπτο υλικό διατηρεί το μέγεθος και το σχήμα του ακόμα και υπό την επιβολή ισχυρού φορτίου. Σε αντίθεση με το διάγραμμα τάσης-παραμόρφωσης των μεταλλικών υλικών, τα κεραμικά δεν παρουσιάζουν την περιοχή της πλαστικής παραμόρφωσης. Δεδομένου ότι η αντοχή σε εφελκυσμό των κεραμικών είναι πολύ μικρή, η δοκιμή εφελκυσμού χρησιμοποιείται ελάχιστα για τον χαρακτηρισμό των κεραμικών και αντικαθίσταται από τη δοκιμή θλίψης και τη δοκιμή κάμψης. (xxix)

Σχετικά με την θλίψη, τα κεραμικά με μικρορωγμές αν και αστοχούν σε εφελκυστικά φορτία, επιδεικνύουν μεγάλη αντοχή σε θλιπτικά φορτία, καθώς οι κάθετες στην διεύθυνση θλίψης ρωγμές κλείνουν. Η ενδεχόμενη θραύση δεν προκαλείται από την γρήγορη διάδοση μια ρωγμής, αλλά από την αργή συνένωση πολλών ρωγμών που δημιουργούν μια ζώνη θραύσης. Η ψαθυρότητα των κεραμικών

σε θερμοκρασία περιβάλλοντος είναι συνέπεια των ισχυρών ομοιοπολικών δεσμών που υπάρχουν σε πολλά κεραμικά ή της έλλειψης ενός ικανοποιητικού αριθμού ανεξάρτητων συστημάτων ολίσθησης για την κίνηση των διαταραχών, έτσι ώστε να παρέχεται πλαστικότητα. Σε μέσες θερμοκρασίες μερικά οξείδια μπορεί να έχουν κάποια ολκιμότητα, όμως κεραμικά ομοιοπολικού δεσμού (π.χ. καρβίδιο του πυριτίου, το νιτρίδιο του πυριτίου) έχουν ασήμαντη κινητικότητα των διαταραχών μέχρι και σε πολύ υψηλές θερμοκρασίες.(xxix)

Η ευκολία κίνησης των διαταραχών στο κρυσταλλικό πλέγμα είναι θεμελιώδους σημασίας για τον καθορισμό των μηχανικών ιδιοτήτων των υλικών - από αυτήν εξαρτώνται τόσο η αντοχή σε εφελκυσμό όσο και η σκληρότητα. Στα κεραμικά οι ισχυροί ιοντικοί και ομοιοπολικοί δεσμοί προσδίδουν στο πλέγμα μεγάλη αντίσταση έναντι της κίνησης των διαταραχών. Μάλιστα στα κεραμικά με ομοιοπολικούς δεσμούς τα ηλεκτρόνια που συγκεντρώνονται στην περιοχή μεταξύ των ατόμων παρεμποδίζουν την κίνηση των διαταραχών. Μια διαταραχή για να μετακινηθεί μέσα σε μια τέτοια δομή πρέπει να σπάσει πολύ ισχυρούς δεσμούς. Στην περίπτωση των ιοντικών δεσμών, η κίνηση των διαταραχών δεν συναντά την ίδια δυσκολία σε όλες τις διευθύνσεις. Οι διαταραχές που οδηγούν σε προσέγγιση ομόνυμων ιόντων συναντούν εμπόδια λόγω απωστικών δυνάμεων μεταξύ των φορτίων, ενώ οι διαταραχές που κινούνται σε γωνία 45° , ακολουθούν προσέγγιση ετερόνυμων ιόντων, κατά την οποία αναπτύσσονται ελκτικές δυνάμεις διευκολύνοντας την κίνησή τους. (xxix)

Η ψαθυρή θραύση των κεραμικών συνίσταται στο σχηματισμό και διάδοση ρωγμών μέσα στο υλικό κάθετα προς την διεύθυνση του εφαρμοζόμενου φορτίου. Η διάδοση της ρωγμής στα πολυκρυσταλλικά υλικά πραγματοποιείται μέσα από τους κόκκους (διακρυσταλλική) και κατά μήκος ειδικών κρυσταλλογραφικών επιπέδων με υψηλή πυκνότητα ατόμων (επίπεδα σχισμού). Επιπλέον, οι αντοχές θραύσης των κεραμικών υλικών είναι σημαντικά χαμηλότερες από αυτές που θεωρητικά προβλέπονται από τους δεσμούς μεταξύ των ατόμων. Το φαινόμενο αυτό οφείλεται στην ύπαρξη πολύ μικρών ατελειών μέσα στο υλικό, που λειτουργούν ως ενισχυτές τάσεων, δηλαδή σημεία όπου το μέγεθος μιας εφαρμοζόμενης εφελκυστικής τάσης ενισχύεται σημαντικά. Ενισχυτές τάσεων μπορούν να είναι επιφανειακές ή εσωτερικές ρωγμές (μικρορωγμές), εσωτερικοί πόροι και γωνίες κόκκων, τα οποία αποτελούν αναπόσπαστα και ανεξέλεκτα σημεία δομής. Ο βαθμός ενίσχυσης των τάσεων εξαρτάται από το μήκος της ατέλειας και την ακτίνα καμπυλότητας του άκρου της και είναι μεγαλύτερος για επιμήκεις και με οξέα άκρα μικρορωγμές. Η συγκέντρωση τάσεων στο άκρο μιας ατέλειας δύναται να προκαλέσει το σχηματισμό ρωγμής η οποία μπορεί να διαδοθεί και να μεγαλώσει μέχρι την αστοχία του υλικού. Ακόμη, πολλά πολυκρυσταλλικά κεραμικά έχουν στο εσωτερικό τους παραμένον πορώδες, το οποίο εξαρτάται πλήρως από την μέθοδο σύνθεσής τους και έχει τη μορφή μικρών σχεδόν σφαιρικών απομονωμένων πόρων. (xxix)

Όσον αφορά στην αντοχή σε κάμψη των κεραμικών, αποτελεί μέτρηση του ορίου θραύσης και του μέτρου ελαστικότητας και κατηγοριοποιείται σε κάμψη 3 ή 4

σημείων. Το σημαντικότερο μειονέκτημα της δοκιμής σε κάμψη είναι η ανομοιομορφία των τάσεων καθώς όπως είδαμε η μία πλευρά του δοκιμίου υπόκειται σε εφελκυστικές τάσεις και η άλλη σε θλιπτικές. Επιπλέον, υπάρχει διαβάθμιση των τάσεων, καθώς μόνο ένα μικρό τμήμα του δοκιμίου εκτίθεται σε υψηλές εφελκυστικές τάσεις. Ωστόσο, η τεχνική αυτή παρουσιάζει πολλά πλεονεκτήματα, όπως η δυνατότητα μέτρησης μικρών δοκιμίων με απλή γεωμετρία, ο απλός σχεδιασμός των απαραίτητων εξαρτημάτων, η δυνατότητα εκτέλεσης της δοκιμής σε ευρεία γκάμα μηχανών, η ευκολία προσαρμογής για δοκιμές σε υψηλές θερμοκρασίες, η απευθείας μέτρηση του βέλους κάμψης και η δυνατότητα μελέτης όχι μόνο της αντοχής στη θραύση, αλλά επιπλέον και των ιδιοτήτων ερπυσμού και κυκλικής κόπωσης. (xxix) Ο υπολογισμός της αντοχής σε κάμψη γίνεται με τη βοήθεια του γνωστού τύπου από τη βασική θεωρία των υλικών σε κάμψη:

$$T.R.S.=3*P_f*\Delta s/2*b*d^2, \text{ όπου}$$

P_f είναι το φορτίο θραύσης Δs η διαφορά μεταξύ των σημείων εφαρμογής του φορτίου και b και d είναι οι διαστάσεις του δοκιμίου. Για τη μέτρηση, τα δοκίμια τοποθετούνται στη συσκευή κάμψης τεσσάρων σημείων η οποία τους επιβάλλει φορτίο με ένα συγκεκριμένο ρυθμό (mm/min) μέχρι θραύσης, μετά την οποία εμφανίζεται στη συσκευή η τιμή του φορτίου για το οποίο επήλθε η θραύση. Κατόπιν, γίνεται μέτρηση της διαμέτρου του δοκιμίου στην επιφάνεια θραύσης του και η τιμή αυτή εισάγεται στον ηλεκτρονικό υπολογιστή του οργάνου, όπου με τη βοήθεια του αντίστοιχου λογισμικού υπολογίζονται οι παράμετροι που είναι απαραίτητες για την ανάλυση των συνθηκών της θραύσης. Για τη σωστή μέτρηση απαιτείται η θραύση 5-6 δοκιμίων για την κάθε εξεταζόμενη περίπτωση. Επιπρόσθετα, τα εξεταζόμενα δοκίμια πρέπει να είναι απολύτως ευθύγραμμα, και να μην παρουσιάζουν επιφανειακές ανωμαλίες. Η παρατήρηση αυτή είναι ιδιαίτερα σημαντική καθώς σε αντίθετη περίπτωση ευνοείται η συγκέντρωση τάσεων και διαταραχών με αποτέλεσμα τα ανακριβή και αναληθή εξαγόμενα αποτελέσματα και συμπεράσματα.(xxix)

Σύμφωνα με το πρότυπο του οστού, οι βιολογικές και μηχανικές του ιδιότητες εξαρτώνται πλήρως από τη σύσταση και τη δομή του, επομένως τα πορώδη οστικά κριώματα πρέπει να αποτελούν αντίγραφα του οστού, παρουσιάζοντας παρόμοια κρυσταλλικότητα, χημική σύσταση, κρυσταλλογραφική υφή και μικροδομή. Παρατηρώντας τις μηχανικές ιδιότητες του φυσικού οστού, αρχικά δείχνει μια βισκοελαστική συμπεριφορά και αργότερα γίνεται εύθραυστο με ελάχιστες ενδείξεις πλαστικότητας (μόνιμη ροή). Η ενυδάτωση του οστού δρα συνεργιστικά, υποβοηθώντας την ολκιμότητα της ινιδικής του μήτρας, μέσω της οποίας αυξάνεται η σκληρότητα. Επιπλέον, οι οστικοί κρυσταλλίτες απατίτη ευθυγραμμίζονται με τον c-άξονα της οστικής δοκίδας οδηγώντας σε ανισοτροπία. Λόγω σύνθετης χημικής του σύστασης, το κολλαγόνο του προσδίδει δυσθραυστότητα και οι προσανατολισμένοι κρυσταλλίτες απατίτη κατά μήκος ινών κολλαγόνου το καθιστούν άκαμπτο. (lxxx)(lxxxi) Τα βιοκεραμικά που χρησιμοποιούνται συνήθως σαν οστικά εμφυτεύματα παραθέτονται στον παρακάτω

Πίνακα, με ταυτόχρονη καταγραφή των μέσων μηχανικών ιδιοτήτων τους, συγκρίσει με εκείνων του φυσικού οστού(Ixxxii):

Πίνακας 1.14.1. Μηχανικές ιδιότητες βιοκεραμικών και οστού

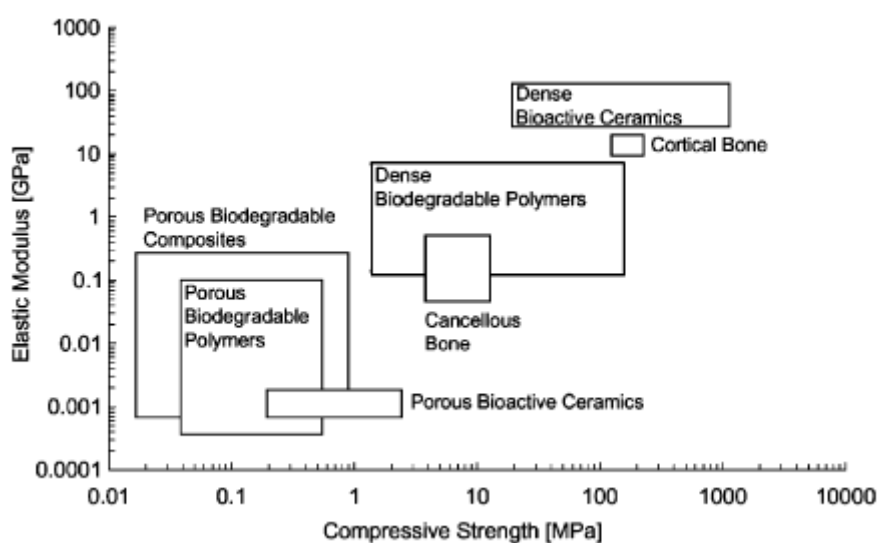
Ceramics	Compressive strength (MPa)	Tensile strength (MPa)	Elastic modulus (GPa)	Fracture toughness (Mpa \sqrt{m})
Hydroxyapatite (HA)	> 400	~40	~100	~1.0
45S5 Bioglass [®]	~500	42	35	0.5-1
Glass-ceramic A/W	1080	215	118	2.0
Porous bioactive glass 70S30C (82%)	2.25	—	—	—
Porous Bioglass [®] -derived glass-ceramic (>90%)	0.2-0.4	—	—	—
Porous HA I (82-86%)	0.21-0.41	—	$0.83-1.6 \times 10^{-3}$	—
Cortical bone	130-180	50-151	12-18	6-8
Cancellous bone	4-12	—	0.1-0.5	—

Όπως παρατηρείται από τα παραπάνω δεδομένα, το διασυνδεδεμένο υψηλό πορώδες μπορεί να αποδυναμώσει σημαντικά τις μηχανικές αντοχές, για το λόγο αυτό η προετοιμασία διασυνδεδεμένων πορώδων ικριωμάτων με καλές μηχανικές ιδιότητες παραμένει μια πρόκληση στην ιστομηχανική. Ο υδροξυαπατίτης αποτελεί την πιο σταθερή μορφή φωσφορικών αλάτων ασβεστίου και συνήθως προτιμάται έναντι των άλλων αλάτων ασβεστίου, όπως και το βιοενεργό γυαλί, που μαζί αποτελούν την πιο ελπιδοφόρα εναλλακτική βιοκεραμικών εμφυτευμάτων. Σχετικά με τα συνθετικά φωσφορικά άλατα ασβεστίου, παρατηρείται μείωση της μηχανικής αντοχής τους όταν αυξάνεται η άμορφη φάση, το μικροπορώδες και το μέγεθος των κόκκων. Αντιθέτως, η υψηλή κρυσταλλικότητα, το χαμηλό πορώδες και το μικρό μέγεθος κόκκων οδηγεί σε υψηλότερη ακαμψία, αντοχή σε θλίψη και εφελκυσμό, και μεγαλύτερη αντοχή σε θραύση. Έχει αποδειχθεί ότι η αντοχή σε κάμψη και η σκληρότητα του συμπαγούς υδροξυαπατίτη είναι χαμηλότερες τιμές στην ξηρή του κατάσταση από ό, τι στην υγρή κατάσταση. Εν γένει, στην περίπτωση του πορώδους ή συμπαγούς υδροξυαπατίτη (Ixxxiii), οι παράμετροι που επηρεάζουν τις μηχανικές του αντοχές είναι το μέγεθος πόρων, ο λόγος πορώδους του, καθώς και η καθαρότητα του αρχικού υλικού, η θερμοκρασία- χρόνος πυροσυσσωμάτωσης, οι υπάρχουσες φάσεις και τέλος ο συνολικός όγκος του.

Σύμφωνα με κάποιες πειραματικές μελέτες υβριδικών ικριωμάτων υδροξυαπατίτη (Ixxxiii), λαμβάνονται δυο σημαντικές αρχές. Κατά την πρώτη θεώρηση, τα ικριώματα διασπώνται εντός ενός συγκεκριμένου χρονικού διαστήματος μετά την εμφύτευσή τους, όπου και αναπτύσσουν σταδιακά μεγαλύτερη αντοχή και ακαμψία συνδεδεμένα με το φυσικό ιστό. Δεύτερον, η μέθοδος σύνθεσής τους δύναται να καθορίσει σε μεγάλο βαθμό τις μηχανικές τους ιδιότητες, αποκτώντας βέλτιστες

αντοχές κατά την υβριδοποίησή τους με πολυμερικά υλικά ή πληρωτικά μέσα, καθορίζοντας κατάλληλα την μικροδομή και γεωμετρία πορώδους και μειώνοντας το μικροπορώδες, σύμφωνα με έρευνες (U.S., 2009).

Όσον αφορά στο μέτρο ελαστικότητας και τη αντοχή σε θλίψη διαφορετικών οστικών εμφυτευμάτων, παρατηρείται μεγαλύτερη αντοχή στην περίπτωση συμπαγών υλικών, όπως αναμένεται. Στο παρακάτω γράφημα καταγράφεται η μηχανική απόκριση πυκνών και πορώδων βιοδραστικών κεραμικών και βιοαποικοδομήσιμων πολυμερών, τα οποία συγκρίνονται με το σπογγώδες και φλοιώδες οστό. Σύμφωνα με το γράφημα, τα πυκνά πολυμερή εμφανίζουν παραπλήσια αντοχή με το σπογγώδες οστό, ενώ πλησιάζουν τις ιδιότητες του φλοιώδες οστού, όπως και τα βιοδραστικά κεραμικά. Τα πορώδη ικρίσματα ωστόσο παρουσιάζουν τουλάχιστον μία τάξη μεγέθους ασθενέστερες αντοχές από αυτές του σπογγώδους οστού και πολλές τάξεις μεγέθους ασθενέστερες από του φλοιώδες οστού. Για την βελτίωση των αντοχών τους, τα πορώδη ικρίσματα υβριδοποιούνται σε σύνθετα πορώδη, η διεπιφανειακή πρόσδεση των οποίων πραγματοποιείται συχνά με χρήση επιφανειοδραστικών νανοσωματιδίων, αποκτώντας καλύτερες συνολικές μηχανικές ιδιότητες.



Εικ. 1.14.1. Διαγραμματική απεικόνιση του μέτρου ελαστικότητας έναντι αντοχής σε θλίψη βιοαποικοδομήσιμων πολυμερών, βιοδραστικών κεραμικών και σύνθετων υλικών^{lxxxii}

1.15. Μέθοδος προσομοίωσης σωματικών υγρών (SBF)

Στην τεχνική αυτή παρασκευάζονται μετασταθή συνθετικά σωματικά υγρά (simulated body fluid, SBF) προσομοιώνοντας την χημική σύσταση των ανθρώπινων σωματικών υγρών, όπου οι ιοντικές τους συγκεντρώσεις είναι σχεδόν όμοιες με αυτές των ανόργανων συστατικών του πλάσματος αίματος. Καθώς ενεργοποιούν την ανάπτυξη και πυρήνωση ανθρακούχου βιομιμητικού νανουδροξυαπατίτη, χρησιμο-

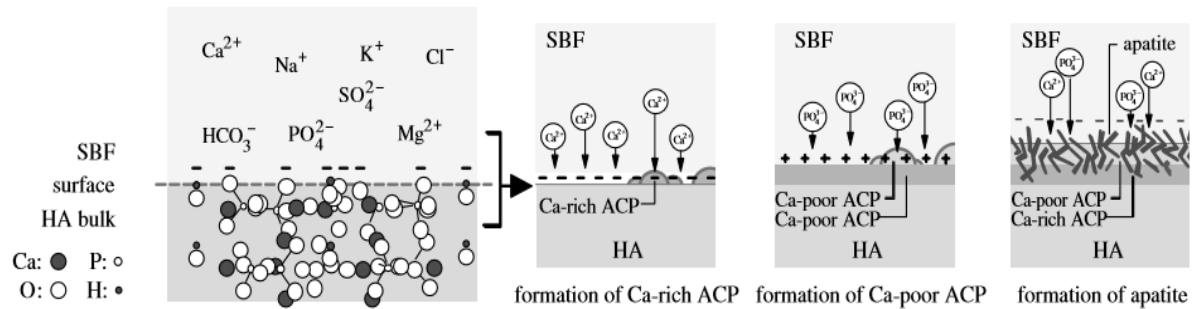
ποιούνται ευρέως σε ορθοπεδικά και οδοντιατρικά βιοϋλικά, υπό συνθήκες ουδέτερου pH και ήπιων θερμοκρασιών. Ο σχηματισμός του στρώματος του απατίτη μέσω βιομιμητικής απόθεσης, έχει αποδειχτεί ότι προωθεί την *in vitro* κυτταρική διαφοροποίηση με αποτέλεσμα την δημιουργία ισχυρής σύνδεσης οστού και σύνθετης μήτρας. Επομένως, ο σχηματισμός επικάλυψης απατίτη πάνω σε υποστρώματα βιολογικών οστικής αποκατάστασης προβλέπει την *in vivo* βιοενεργότητα και βιοσυμβατότητα του υλικού, μειώνοντας την χρήση πειραμάτων σε ζώα. Με την βιομιμητική αυτή μέθοδο, δύναται να επικαλυφθούν πορώδη εμφυτεύματα, τα οποία προάγουν την διαδικασία επανασηματισμού του οστού μέσω κατάλληλης μικροδομής, ρυθμού διάλυσης και περαιτέρω αλληλεπιδράσεων με τα σωματικά υγρά. Ακολούθως, παρουσιάζονται διαλύματα SBF διαφορετικών ιοντικών συγκεντρώσεων, συγκριτικά με τις ιοντικές συγκεντρώσεις του πλάσματος αίματος. (Ixxxiv) (Ixxxv)

Πίνακας 1.15. Διαλύματα SBF διαφορετικών συγκεντρώσεων

	Ion concentration (mM)							
	Na ⁺	K ⁺	Mg ²⁺	Ca ²⁺	Cl ⁻	HCO ₃ ⁻	HPO ₄ ²⁻	SO ₄ ²⁻
Human blood plasma [15]	142.0	5.0	1.5	2.5	103.0	27.0	1.0	0.5
Original SBF	142.0	5.0	1.5	2.5	148.8	4.2	1.0	0
Corrected SBF (c-SBF)	142.0	5.0	1.5	2.5	147.8	4.2	1.0	0.5
Revised SBF (r-SBF)	142.0	5.0	1.5	2.5	103.0	27.0	1.0	0.5
Newly improved SBF (n-SBF)	142.0	5.0	1.5	2.5	103.0	4.2	1.0	0.5

Ο σχηματισμός επιστρώματος ανθρακικού απατίτη στο υπόστρωμα υδροξυαπατίτη λαμβάνει χώρα κατά την βύθιση και διαβροχή του υδροξυαπατίτη (HA) στο διάλυμα SBF (Εικ. 1.16.1). Στην αρχική διαβροχή του υδροξυαπατίτη παρατηρείται μεταβολή του λόγου Ca/P συναρτήσει του χρόνου εμποτισμού. Σύμφωνα με αυτή τη μεταβολή, ο σχηματισμός των άμορφο φωσφορικό ασβέστιο (ACP) με περίσσεια ασβεστίου (Ca-*poor*) θεωρείται επακόλουθο της αλληλεπίδρασης της επιφάνειας του υδροξυαπατίτη με τα ιόντα ασβεστίου στο SBF και ο σχηματισμός των άμορφο φωσφορικό ασβέστιο (ACP) με έλλειμα ασβεστίου με τα αντίστοιχα ιόντα φωσφόρου. Αρχικά, δημιουργείται άμορφο φωσφορικό ασβέστιο (ACP) πλούσιο σε ασβέστιο (Ca-*rich*) και στο τελικό στάδιο της αντίδρασης δημιουργείται άμορφο φωσφορικό ασβέστιο (ACP) με έλλειμα ασβεστίου (Ca-*poor*). Ο σχηματισμός των πρόδρομων ενώσεων άμορφου φωσφορικού ασβεστίου με περίσσεια και έλλειμα ασβεστίου αποτελεί επακόλουθο των ηλεκτροστατικών αλληλεπιδράσεων της επιφάνειας του υδροξυαπατίτη με τα ιόντα ασβεστίου και φωσφόρου του διαλύματος SBF. Συγκεκριμένα, κατά την έκθεση του υποστρώματος στο διάλυμα SBF η επιφάνειά του φέρει αρνητικό φορτίο, επομένως αλληλεπιδρά με τα θετικά φορτισμένα ιόντα ασβεστίου του υγρού SBF με επακόλουθη την ανάπτυξη άμορφου φωσφορικού ασβεστίου πλούσιου σε ασβέστιο. Εν συνεχεία, το πλέον θετικά φορτισμένο άμορφο φωσφορικό ασβέστιο της επιφάνειας υδροξυαπατίτη αλληλεπιδρά με τα ιόντα φωσφόρου, τα οποία αιωρούνται στο SBF υγρό, δημιουργώντας ένα αρνητικά φορτισμένο άμορφο

φωσφορικό ασβέστιο φτωχό σε ασβέστιο. Το άμορφο φωσφορικό ασβέστιο με έλλειμα ασβεστίου που προκύπτει κρυσταλλώνεται σε οστικό-απατίτη. (Ixxxvi)



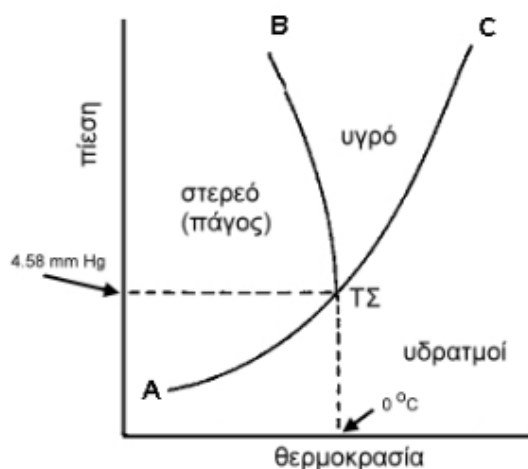
Εικ. 1.16.1. Σχηματική απεικόνιση της προέλευσης αρνητικού φορτίου επί της επιφάνειας του HA (στην περίπτωση της (100) κρυσταλλικής δομής), και διαδικασία σχηματισμού απατίτη σε επιφάνεια οστού^{Ixxxvi}

1.16. Τεχνική λυοφιλίωσης

Η τεχνική λυοφιλίωσης χρησιμοποιείται ευρέως στον κλάδο της ιστομηχανικής, φαρμακευτικής, βιολογίας και βιομηχανίας τροφίμων, καθώς αποτελεί μια εύκολη διαδικασία παραγωγής πορώδων υλικών. Η λυοφιλίωση (ή κρυοξήρανση ή freeze drying) συγκριτικά με άλλες τεχνικές σύνθεσης πορώδων υλικών, όπως η τρισδιάστατη εκτύπωση, ηλεκτροχημεία, διαχωρισμός φάσεως, έκπλυση σωματιδίων κ.α., εμφανίζει αρκετά πλεονεκτήματα, καθώς είναι δυνατή η χρήση υδατικού διαλύτη, οι πιθανότητες μόλυνσης είναι μειωμένες και παράγονται υλικά ποικίλης μορφολογίας και μικροδομής. Τα τελευταία χρόνια, η τεχνική αυτή χρησιμοποιείται στη σύνθεση προηγμένων προϊόντων μέσω ελεγχόμενης παραμετροποίησης, όπως οργανικά διαλύματα για βιοσυμβατά ικρίωματα, γαλακτώματα για πορώδη υλικά, αιωρήματα και αραιά πολυμερικά διαλύματα για νανοσωματίδια και νανοίνες. (Ixxxvii)

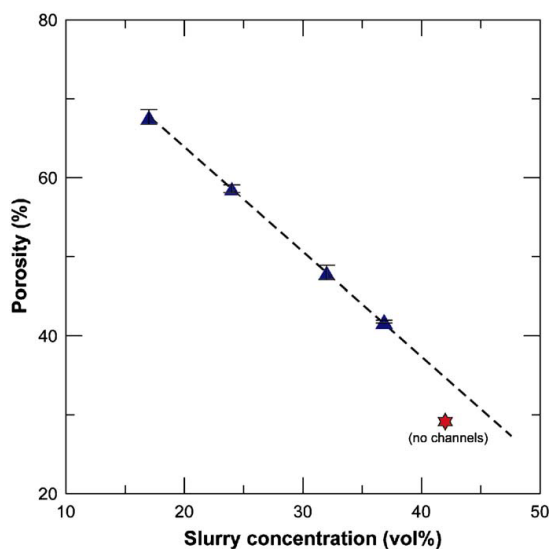
Κατά τη διαδικασία της λυοφιλίωσης, ένα διάλυμα καταψύχεται σε ένα ψυχρό λουτρό και, στη συνέχεια, η κατεψυγμένη φάση του απομακρύνεται μέσω εξάχνωσης υπό κενό, οδηγώντας στο σχηματισμό πορώδων δομών. Κατά τη διάρκεια της τεχνικής, το παγωμένο δοκίμιο διατηρείται σε θερμοκρασία μικρότερη της θερμοκρασίας υαλώδους μετάπτωσης ή αλλιώς κάτω από το σημείο τήξεως (Εικ. 1.16.1) και εν συνεχεία ο παγωμένος διαλύτης απομακρύνεται υπό κενό. Οι πορώδεις δομές σχηματίζονται από τα κενά που άφησε η απομάκρυνση του διαλύτη, ο οποίος δρα ως πορογόνος παράγοντας. Εν γένει, οι παγωμένοι κρύσταλλοι του υδατικού διαλύτη μεταβαίνουν κατευθείαν από την στερεά στην αέρια φάση, δηλαδή εξαχνώνονται. Η εξάχνωση ξεκινά από την επιφάνεια του δοκιμίου και φτάνει στο εσωτερικό της δομής του. Κατά τη διάρκεια του πρώτου σταδίου της ξήρανσης, περίπου το 95% του νερού απομακρύνεται από το προϊόν. Επομένως, η κρυοξήρανση πραγματοποιείται σε δύο στάδια, εκ των οποίων στη πρώτη φάση το «ελεύθερο» νερό παγώνει και απομακρύνεται (φάση ψύξης), ενώ σε δεύτερη φάση γίνεται ελαφριά θέρμανση υπό

υψηλή υποπίεση και απομακρύνεται το «δεσμευμένο» ή κρυσταλλικό νερό (φάση εξάχνωσης).



Εικ. 1.16.1. Διαγραμματική απεικόνιση τριπλού σημείου του νερού ^{lxxxix}

Σχετικά με το πρώτο στάδιο, η θερμοκρασία ψύξης, η συγκέντρωση και τύπος διαλύματος και η κατεύθυνση ψύξης επιδρούν έντονα πάνω στη μικροδομή του υλικού. Παρατηρείται ότι η μέση διάμετρος πόρων αυξάνεται για μεγάλες θερμοκρασίες ψύξης και για αργό ρυθμό κατάψυξης, καθώς σχηματίζονται μεγάλοι κρύσταλλοι πάγου. Αντιθέτως, για γρήγορο ρυθμό κατάψυξης, σχηματίζονται μικρότεροι κρύσταλλοι πάγου, οι οποίοι είναι προτιμητέοι, επειδή δεν καταστρέφουν την ομοιογένεια και δομή υλικού. Εκτός από τον παράγοντα ρυθμού ψύξης, ο οποίος οδηγεί σε συγκεκριμένη μικροδομή άρα και σε μηχανικές ιδιότητες, οι οποίες είναι αντιστρόφως ανάλογες του πορώδους, ο παράγοντας συγκέντρωσης του διαλύτη αποτελεί κύρια παράμετρο καθορισμού μεγέθους, μορφολογίας πορώδους και μηχανικής συμπεριφοράς του υλικού. Το ποσοστό του πορώδους, το οποίο συνδέεται με τη μορφολογία πορώδους και τις μηχανικές ιδιότητες, αυξάνεται για μικρές συγκεντρώσεις διαλύματος (Εικ. 1.16.2.). Σε μεγάλο ποσοστό πορώδους εμφανίζεται κυτταρική (cellular) μικροδομή αυξημένης ομοιογένειας πάχους, ενώ για μικρότερα ποσοστά πορώδους (47%) εμφανίζεται ανομοιογένεια πάχους του δοκιμίου και δυσκολία εξάχνωσης κρυσταλλιτών πάγου. Σχετικά με το ποσοστό πορώδους και την επίδρασή του σε μηχανικές αντοχές, το αυξημένο ποσοστό πορώδους (60%) οδηγεί σε μείωση της μηχανικής αντοχής του δοκιμίου. (lxxxviii)



Εικ. 1.16.2. Διαγραμματική απεικόνιση της εξάρτησης του πορώδους από τη συγκέντρωση διαλύματος^{lxxxviii}

Σχετικά με το δεύτερο και πιο χρονοβόρο στάδιο λυοφιλίωσης, αυτό της εξάχνωσης, η τιμή της πίεσης καθορίζει τη μικροδομή του υλικού και το ποσοστό σχηματισμένου πορώδους, που έχει προαναφερθεί. Ο ρυθμός εξάχνωσης του πάγου καθορίζεται από παράγοντες όπως το επίπεδο κενού, η θερμοκρασία των ραφιών, ο όγκο του και η εκτεθειμένη περιοχή επιφάνειας του δείγματος, και η αντίσταση του προϊόντος σε εξάχνωση. Το ποσοστό εξάχνωσης, συναρτήσει συγκεντρώσεως του διαλύματος, οδηγεί σε ελεγχόμενη μικροδομή. Σε υψηλές συγκεντρώσεις, παρεμποδίζεται η εξάχνωση μεγάλου ποσοστού κρυσταλλινών πάγου σαν επακόλουθο την μειωμένη διασυνδεσιμότητα πορώδους δικτύου και ανοιχτού πορώδους εν γένει. Η κρίσιμη τιμή επιτρεπτής συγκεντρώσεως είναι αλληλένδετη του μεγέθους σωματιδίων του υλικού. Παρατηρούνται βέλτιστα αποτελέσματα λυοφιλίωσης για νανοσωματιδιακής φύσεως υλικά, καθώς τα νανοσωματίδια δύναται να κινηθούν με μεγαλύτερο βαθμό ελευθερίας, αφήνοντας πίσω τους κενά προς σχηματισμό πόρων. Σε ορισμένες περιπτώσεις πραγματοποιείται, δευτερογενής ξήρανση για την εκρόφιση του μη κατεψυγμένου διαλύτη, ο οποίος είναι συνδεδεμένος με πολυμερικό συνδέτη (binder).

Για την κατανόηση της αρχής λειτουργίας της κρυοξήρανσης (freeze-drying) απαιτείται η εισαγωγή σε φυσικούς νόμους (lxxxvii). Όπως έχει προαναφερθεί, το υλικό μεταβαίνει άμεσα από στερεή σε αέρια φάση κάτω από το τριπλό σημείο (T,P) νερού και σε υψηλή υποπίεση, όπου η θερμοκρασία τριπλού σημείου νερού είναι 0°C και η πίεση 610,5Pa (4,58mm Hg). Συγκεκριμένα, κατά την ψύξη ενός υδατικού διαλύματος, παρουσιάζεται αύξηση του μεγέθους των κρυσταλλινών πάγου με ταυτόχρονη απομάκρυνση των μορίων διαλυμένης ουσίας από τους εν λόγω κρυσταλλίτες. Οι ακαθαρσίες που πιθανότατα βρίσκονται στο διάλυμα έχουν μικρότερη διαλυτότητα στον πάγο, με επακόλουθο τον σχηματισμό μιας διαβαθμισμένης συγκέντρωσης της διαλυμένης ουσίας με ταυτόχρονη αύξηση της συγκέντρωσής της, η οποία βρίσκεται εμπρός του πάγου. Αυτή η αύξηση συγκέντρωσης συνεπάγεται την μείωση του σημείου τήξεως του διαλύματος και οδηγεί στο σχηματισμό μιας

ζώνης υπέρψυξης, στην οποία το επίπεδο διασύνδεσης σπάει και αναπτύσσονται οι πυρήνες πάγου. Το προαναφερθέν φαινόμενο καλείται αστάθεια Mullins-Sekerka, κατά το οποίο η πρωτοταγής πρότυπη δομή πάγου εξαρτάται από την βαθμίδα διεπιφανειακής συγκέντρωσης της αποσταθεροποιημένης διαλυμένης ουσίας και από την επιφανειακή ενέργεια σχηματισμού πυρήνων πάγου. Στην ακόλουθη εξίσωση λαμβάνεται η γραμμική σχέση ευστάθειας για το ρυθμό ανάπτυξης διαταραχής του επιπέδου διεπιφάνειας δ ως προς το δ' , συναρτήσει της αστάθειας:

$$\frac{\dot{\delta}}{\delta} = \frac{V\omega \left\{ \begin{array}{l} -2Tm\Gamma\omega^2 \left[\omega^* - \frac{V}{D}(1-k) \right] - 2G \left[\omega^* - \frac{V}{D}(1-k) \right] \\ + 2mG_c \left[\omega^* - \frac{V}{D} \right] \end{array} \right\}}{2G \left(\frac{k_s - k_l}{k_s + k_l} \right) \left[\omega^* - \frac{V}{D}(1-k) \right] + 2\omega mG_c}$$

$$\omega^* = \frac{V}{2D} + \left[\left(\frac{V}{2D} \right)^2 + \omega^2 \right]^{1/2}$$

όπου το ω^* είναι η συχνότητα, m η κλίση της γραμμής υγροποίησης του διαγράμματος φάσεως, V η ταχύτητα σχηματισμού, T_m το σημείο ισορροπίας τήξεως, Γ ο λόγος επιφανειακής ενέργειας προς λανθάνουσα θερμοκρασία τήξης, D ο συντελεστής διάχυσης, k ο συντελεστής κατανομής, G η θερμοκρασιακή κλίση, G_c η βαθμιαία συγκέντρωση διαλυμένης ουσίας στη διαχωριστική επιφάνεια, K_S και K_L οι θερμικές αγωγιμότητες των φάσεων του πάγου και διαλύματος αντιστοίχως. Η παραπάνω εξίσωση δύναται να προβλέψει τις αποστάσεις μεταξύ πόρων μιας πολυμερικής δομής.

Για ένα σύστημα πολλαπλών συστατικών, συμπεριλαμβανομένων μορίων και κολλοειδών, η παραπάνω ανάλυση είναι πολύ πιο περίπλοκη και χρησιμοποιείται το μοντέλο λυοφιλίσωσης εναιωρήματος σκληρών σφαιρών. Αρχικά καθορίζονται οι κρίσιμες ταχύτητες διασύνδεσης, σηματοδοτώντας την μετάβαση μεταξύ άπωσης και παγίδευσης σφαιρικών σωματιδίων σε μια διεπιφάνεια πάγου-υγρού. Στην περίπτωση που ένα σωματίδιο κινείται πολύ κοντά στο μέτωπο κατάψυξης, η δύναμη απώθησης (F_σ) μεταξύ σωματιδίου και παγωμένης φάσης προκύπτει ως:

$$F_\sigma = 2\pi R\Delta\sigma \left(\frac{a_0}{d} \right)^n$$

όπου R είναι η ακτίνα σωματιδίου, a_0 η μέση διαμοριακή απόσταση, d η απόσταση μεταξύ σωματιδίου και επιπόσθιου πάγου, n μια παράμετρος που κυμαίνεται από 1 έως 4, $\Delta\sigma$ ισορροπία των επιφανειακών δυνάμεων στο όριο πάγου / διαλύματος / σωματιδίου. Ο λόγος $(a_0/d)^n$ είναι ένας διορθωτικός όρος της δυνάμεως αποσύνδεσης που ασκείται πάνω στο σωματίδιο. Η ελκτική δύναμη (F_n) μεταξύ σωματιδίου και επρόσθιου πάγου λαμβάνεται μέσω της παρακάτω εξίσωσης:

$$F_n = \frac{6\pi\eta\nu R^2}{d}$$

όπου n είναι το ιξώδες του υγρού εναιωρήματος και v η ταχύτητα ανάπτυξης πάγου. Σε συνθήκες ισορροπίας δυνάμεων έλξης και άπωσης, η κρίσιμη ταχύτητα ανάπτυξης πυρήνων πάγου (v_c), κατά την οποία τα σωματίδια θεωρητικά απορρίπτονται ή εγκλείονται μέσα στον πάγο, δίνεται από την παρακάτω σχέση:

$$v_c = \frac{\Delta\sigma d}{3\eta r} \left(\frac{a_0}{d}\right)^n$$

Σχετικές έρευνες που έχουν διεξαχθεί πάνω σε κολλοειδή εναιωρήματα, κατέδειξαν ότι οι κρίσιμες ταχύτητες σχηματισμού πυρήνων πάγου κυμαίνονται μεταξύ (0.1-1) $\mu\text{m/s}$ και ισορροπούν μέσω διάχυσης Brown.

Όσον αφορά στον σχηματισμό οργανικών πορώδων υλικών, τα πολυμερή θα έχουν υδρόφιλο χαρακτήρα (π.χ. PEO) ή και φυσική προέλευση (π.χ. κολλαγόνο, chitosan) δημιουργώντας μικροδομές υψηλού προσανατολισμού. Αυτές οι πολυμερικές ουσίες είναι υδατοδιαλυτές σε συνθήκες περιβάλλοντος είτε σε διαφορετικές θερμοκρασίες και τιμές pH. Δύναται να σχηματιστούν πορώδη ανόργανα ή σύνθετα υλικά μέσω λυοφιλίωσης ανόργανων και πολυμερικών κολλοειδών εναιωρημάτων, τα οποία χρησιμοποιούνται ως δομικά στοιχεία. Σε ένα τέτοιο σύστημα, ο πολυμερικός διασπορέας απαιτείται για τη σταθεροποίηση των κολλοειδών αιωρημάτων και δύναται να δράσει επιπλέον σαν κατευθυντήριο παράγοντας λυοφιλίωσης, προσανατολίζοντας την ανάπτυξη κρυστάλλων πάγου. Άλλη μια περίπτωση πορώδων δομών μέσω freeze drying αποτελεί η σύνθεση κεραμικών κόνεων μέσω υδατικών κεραμικών αιωρημάτων. Η περιεκτικότητα σε ανόργανη ύλη καθορίζει την ποιότητα του τελικού προϊόντος, καθώς και η ποσότητα νερού και οι συνθήκες λυοφιλίωσης. Απαραίτητη προϋπόθεση στην παρασκευή κεραμικών υλικών αποτελεί η χρήση πολυμερικού διασπορέα, ώστε να σταθεροποιηθούν τα κεραμικά σωματίδια και να επιτευχθεί επαρκής σωματιδιακή διασύνδεση του υλικού. (Ixxxvii)

Τα βασικά πλεονεκτήματα της λυοφιλίωσης συμπεριλαμβάνουν: 1) διατήρηση των μορφολογικών, βιοχημικών και γενετικών χαρακτηριστικών των κυττάρων, 2) δυνατότητα ξήρανσης μεγάλων ποσοτήτων, 3) συντήρηση της βιωσιμότητας των μικροοργανισμών και της δραστηκότητας των πρωτεϊνών, των πεπτιδίων και των φαρμακευτικών ενεργών ουσιών, 4) ηπιότερες συνθήκες ξήρανσης σε σχέση με άλλες μεθόδους, 5) μικρές πιθανότητες μόλυνσης του δείγματος λόγω της απομάκρυνσης έως και 98% της υγρασίας, 6) δυνατότητα γρήγορης και τέλει επανυδάτωσης του δείγματος. Ωστόσο, η μέθοδος λυοφιλίωσης παρουσιάζει μειονεκτήματα, όπως το υψηλό κόστος εγκατάστασης και εξοπλισμού, η κατανάλωση μεγάλων ποσών ενέργειας, η πολυπλοκότητα και ο σχετικά μεγάλος χρόνος της διεργασίας. Τα χαρακτηριστικά του freeze drying το καθιστούν κατάλληλο σε μία πληθώρα εφαρμογών, όπως στην κατασκευή πορώδων υλικών, όπως ικριωμάτων για βιοιατρικές εφαρμογές, σαν φαρμακευτικά παρασκευάσματα, στην τεχνολογία τροφίμων ως μέσο συντήρησης τροφίμων, στο βιολογικό τομέα ως μέσο διατήρησης οργανισμών, σε αρχαιολογικό και αρχαιολογικό τομέα για τη διατήρηση αρχείων και κειμηλίων. (Ixxxix)

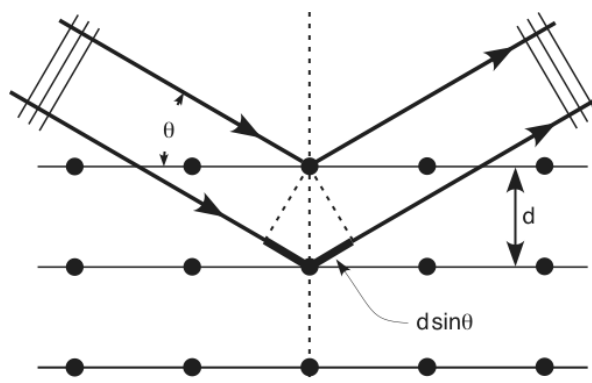
2.1. Περιθλασομετρία Ακτίνων X (XRD)

Η συγκεκριμένη τεχνική ανάλυσης αποτελεί μια από τις κυριότερες μεθόδους δομικού χαρακτηρισμού των υλικών και βασίζεται στο φαινόμενο της περίθλασης. Δύναται να προσδιορίσει με ακρίβεια τόσο ποιοτικά όσο και ποσοτικά την κρυσταλλική δομή των στερεών, καθώς και τις φάσεις-μικρογραφικά συστατικά που στοιχειοθετούν των μικρογραφικό ιστό. Σε συνδυασμό με την στοιχειακή ανάλυση και την ηλεκτρονική μικροσκοπία σάρωσης, μπορεί να αποδώσει ολοκληρωμένα αποτελέσματα χαρακτηρισμού τόσο σε ερευνητικό όσο και σε βιομηχανικό επίπεδο. Το πεδίο εφαρμογής της μεθόδου χαρακτηρίζεται από μεγάλη εμβέλεια καθώς αυτή μπορεί να χρησιμοποιηθεί για τον προσδιορισμό της ύπαρξης ή μη και του βαθμού κρυσταλλικότητας πολυμερικών, κεραμικών, μεταλλικών υλικών, καθώς και ταχέως στερεοποιούμενων μετάλλων (μεταλλικά γυαλιά), όπως και για τη μελέτη κρυσταλλογραφικών παραμορφώσεων λόγω μικροεντατικών πεδίων.

Η αρχή της μεθόδου XRD βασίζεται στη περίθλαση μονοχρωματικής δέσμης ακτίνων X δεδομένου μήκους κύματος, πάνω στα επίπεδα του κρυσταλλικού πλέγματος του εκάστοτε υλικού. Κατά την πρόσπτωση ακτίνων X συγκεκριμένου μήκους κύματος για ένα κρυσταλλικό στερεό παράλληλων επιπέδων ανάπτυξης, η πρωτογενής δέσμη σκεδάζεται από τα άτομα του κρυστάλλου, ενώ οι παραχθείσες δευτερογενείς δέσμες για κάποιες δεδομένες διευθύνσεις μέσα στον όγκο του στερεού, μπορούν να συμβάλλουν και να υπερτίθενται ενισχυτικά. Προϋπόθεση για να συμβούν τα ανωτέρω αποτελεί η αναγκαιότητα για αλληλεπίδραση της ηλεκτρομαγνητικής ακτινοβολίας με τα άτομα του στερεού, που διατάσσονται περιοδικά, καθώς και η προσέγγιση του μήκους κύματος της ακτινοβολίας ως προς την τάξη μεγέθους με τις αποστάσεις μεταξύ ατομικών επιπέδων. Με βάση το νόμο του Bragg, αποδείχτηκε ότι η περιγραφή αυτού του φαινομένου είναι δυνατή με τη βοήθεια της γεωμετρίας της ανάκλασης, παρά το γεγονός ότι δεν συμβαίνει πραγματική ανάκλαση ακτινοβολίας στους κρυστάλλους. Η απλοποιημένη αυτή θεώρηση του φαινομένου υποθέτει ότι τα κρυσταλλογραφικά επίπεδα συμπεριφέρονται ως ημιδιαφανή κάτοπτρα κατά την πρόσπτωση της ακτινοβολίας. Η παραπάνω θεώρηση έχει ως αποτέλεσμα την ανάκλαση ενός μέρους της ακτινοβολίας από ένα κρυσταλλικό επίπεδο, ενώ η υπόλοιπη διέρχεται μέσω αυτού του επιπέδου και ανακλάται από τα επόμενα διαδοχικά επίπεδα. Σύμφωνα με το νόμο του Bragg, μια μονοχρωματική ακτινοβολία που προσπίπτει σε μια οικογένεια επιπέδων, τα οποία χαρακτηρίζονται από την πλεγματική απόσταση d , παρουσιάζει συμβολή όταν ικανοποιείται η παρακάτω συνθήκη:

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

όπου n : η τάξη περίθλασης, λ : το μήκος κύματος της ακτινοβολίας, θ : η γωνία ανάκλασης και d : η πλεγματική απόσταση των επιπέδων ανάκλασης του κρυστάλλου.



Εικ. 2.1.1. Σχηματική απεικόνιση περίθλασης μιας μονοχρωματικής δέσμης ακτίνων X από παράλληλα επίπεδα ατόμων ισαπέχοντα κατά d ^{xc}

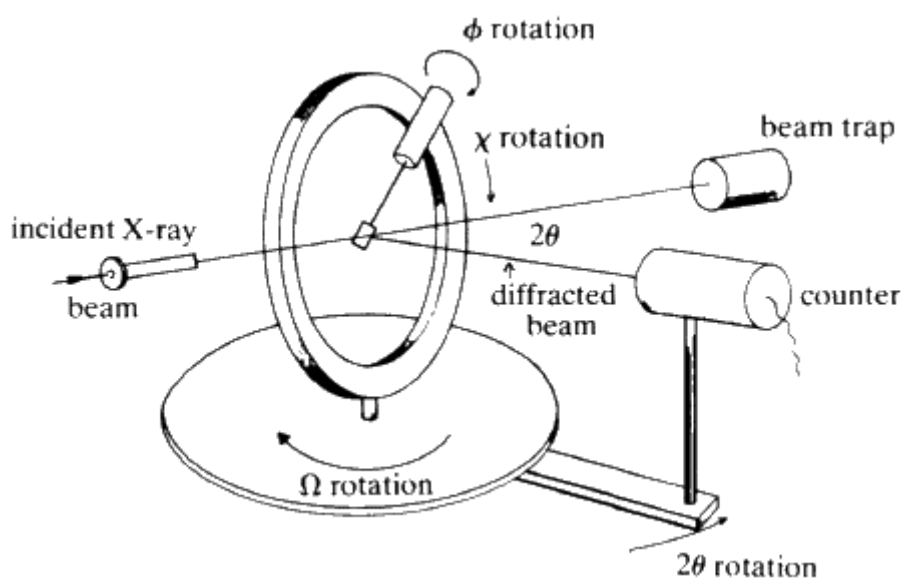
Μια μονοχρωματική δέσμη συμφασικών ακτίνων X και μήκους κύματος λ , περιθλάται από μια ορισμένη οικογένεια επιπέδων όταν η γωνία πρόσπτωσης θ ικανοποιεί το νόμο του Bragg για το συγκεκριμένο λ (Εικ. 2.1.1.) Έτσι καθίσταται δυνατός ο υπολογισμός της απόστασης d , η οποία είναι χαρακτηριστική αι μονοσήμαντη για το κάθε κρυσταλλικό πλέγμα. Η απόσταση d μεταξύ δύο παράλληλων και διαδοχικών επιπέδων, με κοινούς δείκτες Miller (h,k,l) για τρισσορθόγωνιο σύστημα αξόνων δίνεται από την ακόλουθη σχέση:

$$d_{hkl} = 1 / (h^2/a^2 + k^2/b^2 + l^2/c^2)^{1/2}$$

όπου h, k, l : δείκτες Miller και a, b, c : οι κρυσταλλογραφικές παράμετροι. Οι δείκτες Miller αναπαριστούν την θέση μιας έδρας του κρυστάλλου ως προς τους τρεις άξονες συμμετρίας και αποτελούν ένα σύστημα συμβολισμού των επιπέδων στον κρύσταλλο, με ιδιαίτερο ρόλο ως προς την μαθηματική προσέγγιση για την ανάλυση της τεχνικής αυτής. στον παρακάτω πίνακα δίνονται εκφράσεις των διαπλεγματικών σταθερών για τα κρυσταλλογραφικά συστήματα Bravais. Η πλεγματική απόσταση d που προσδιορίζεται αποτελεί χαρακτηριστικό μέγεθος για κάθε υλικό, καθώς η γωνία ανάκλασης θ εξαρτάται εξολοκλήρου από το σχήμα και το μέγεθος της μοναδιαίας κυψελίδας του υλικού. Μέσω του προσδιορισμού της απόστασης d των κρυσταλλογραφικών επιπέδων πραγματοποιείται η ποιοτική ανάλυση, η ταυτοποίηση φάσεων και ο δομικός χαρακτηρισμός. Σε ότι αφορά στη μέτρηση της έντασης της περιθλώμενης ακτινοβολίας για μια επιλεγμένη γωνία θ , αυτή συμβάλλει στην ποσοτική ανάλυση της εκάστοτε κρυσταλλικής ένωσης. Η ένταση της ακτινοβολίας είναι μέγεθος ευθέως ανάλογο του αριθμού των ατόμων που διεγείρονται και κατά συνέπεια της ποσότητας της υπό εξέταση ουσίας.

Αρχική προϋπόθεση για την αναλυτική μελέτη περίθλασης μιας κρυσταλλικής ένωσης, είναι η προετοιμασία του δείγματος (κονιοποιημένο ή πολυκρυσταλλικό υλικό τυχαίου προσανατολισμού), το οποίο θα εκτεθεί στη μονοχρωματική ακτινοβολία X. Το εκάστοτε δείγμα λειοτριβείται μέχρι να αποκτήσει μορφή λεπτής σκόνης, μορφή η οποία αποτελείται από πολλούς μικροκρυσταλλίτες προσανα-

τολισμού κάθε δυνατής κατεύθυνσης. Συνεπαγόμενα, όταν μια δέσμη ακτίνων X διαπεράσει το δείγμα σκόνης αναμένεται ότι ένα σημαντικό πλήθος σωματιδίων θα έχει προσανατολισθεί έτσι ώστε να ικανοποιείται η συνθήκη του Bragg, για κάθε περίπτωση ανάκλασης από κάθε δυνατή διαπλεγματική απόσταση d . Τα δείγματα, ακολούθως τοποθετούνται σε λεπτότοιχες βάσεις (από ύαλο). Σε ότι αφορά στα πολυκρυσταλλικά δείγματα που δεν τοποθετούνται υπό τη μορφή σκόνης, η διαδικασία προετοιμασίας αποτελείται καθ'ολοκληρία από τα διαδοχικά στάδια της λείανσης με σκοπό την επίτευξη πλήρους επιπεδότητας της επιφάνειας. Στη περίπτωση αυτή τοποθέτηση εντός του οργάνου πραγματοποιείται σε ειδική πολυμερική άμορφη βάση (Εικ. 2.1.2.). (xc)



Εικ. 2.1.2. Σχηματική αναπαράσταση διαθλασόμετρου 4 κύκλων ^{xc}

Σχετικά με την οργανολογία, η πηγή των ακτίνων X είναι μία καθοδική λυχνία (συνήθως λυχνία Cu) συνοδευόμενη από φίλτρο (συνήθως από κρυσταλλικό γραφίτη), ώστε η ακτινοβολία να είναι αυστηρά μονοχρωματική (CuK α), η οποία διέρχεται από διάφορες διατάξεις εστιασμού και ευθυγράμμισης της δέσμης πριν πέσει στο δείγμα. Η επιλογή του μήκους κύματος γίνεται με τέτοιο τρόπο ώστε να αποφευχθεί το φαινόμενο του φθορισμού. Το δείγμα είναι κονιοποιημένο σε λεπτή και ομοιογενή σκόνη (κοκκομετρία κάτω από 25 μm) και ο υποδοχέας του δείγματος έχει τη δυνατότητα να περιστρέφεται με σκοπό τη δημιουργία τυχαίων προσανατολισμών των κρυστάλλων. Έτσι, όταν η δέσμη ακτίνων X διέλθει μέσω του δείγματος, αναμένεται ότι ένας σημαντικός αριθμός των κρυσταλλιτών θα είναι προσανατολισμένος, έτσι ώστε να ικανοποιούν τη συνθήκη του Bragg, για ανάκλαση από κάθε δυνατή απόσταση μεταξύ των κρυσταλλικών επιπέδων. Η περιθλώμενη ακτινοβολία μετά την ευθυγράμμιση της πέφτει πάνω στον ανιχνευτή, ο οποίος περιστρέφεται σε σχέση με το δείγμα με τη διπλή γωνιακή ταχύτητα 2θ . Ο ανιχνευτής είναι συνήθως ένας απαριθμητής σπινθηρισμού ή ανιχνευτής στερεάς κατάστασης. Τα ακτινογραφήματα που προκύπτουν από τη μέθοδο αυτή έχουν ως τεταγμένη την ένταση των κορυφών σε παλμούς ανά δευτερόλεπτο (cps) και ως τεταγμένη τη γωνία

2θ του γωνιομέτρου, ενώ σε κάθε κορυφή αναγράφεται και η κρυσταλλική απόσταση d. Η ένταση των κορυφών κανονικοποιείται ως προς την ένταση της μεγαλύτερης κορυφής στο φάσμα.(xlvii)

Στην περίπτωση υδροξυαπατίτη, μέσω περιθλασιμετρίας ακτίνων X προσδιορίστηκαν οι παρούσες φάσεις και το μέγεθος των κρυσταλλιτών του, καθώς και η διατήρηση της κρυσταλλικής φάσης των ικριωμάτων υδροξυαπατίτη παρουσίας νανοσωλήνων άνθρακα (CNTs).

Χρησιμοποιήθηκε περιθλασίμετρο ακτίνων X Bruker D8 Focus, το οποίο χρησιμοποιεί καθοδική λυχνία χαλκού με φίλτρο νικελίου ώστε να προκύπτει μονοχρωματική ακτινοβολία CuKα1. Η περιστρεφόμενη άνοδος είναι τύπου Rigaku και λειτουργεί με τάση 40 kV και 40 mA συνεχές ρεύμα, παράγοντας ακτίνες X με μήκος κύματος 1,54056 Å.

2.2. Ηλεκτρονική μικροσκοπία σάρωσης (SEM)

Σε πολλούς τομείς της επιστήμης είναι απαραίτητη η γνώση της φυσικής κατάστασης της επιφάνειας των στερεών. Για την μελέτη αυτή χρησιμοποιήθηκε αρχικά η οπτική μικροσκοπία, όπου χαρακτηρίζεται σαν τεχνική χαμηλής διακρισιμότητας, όπου φαινόμενα περίθλασης συντελούνται σε διαστάσεις παραπλήσιες με αυτές του μήκους κύματος του φωτός. Συνεπώς, σε περιπτώσεις που απαιτείται μεγάλη διακριτική ικανότητα, η οπτική μικροσκοπία έχει αντικατασταθεί από τεχνικές όπως η ηλεκτρονική μικροσκοπία σάρωσης (Scanning Electron Microscopy, SEM). Σύμφωνα με τη θεωρία De Broglie, το μήκος κύματος λ των ηλεκτρονίων υπολογίζεται από τον τύπο:

$$\lambda = 0.1 \frac{150}{V}$$

όπου V είναι η τάση επιτάχυνσης των σωματιδίων σε Volts και λ το μήκος κύματος των επιταχυνόμενων ηλεκτρονίων. Η διακριτική ικανότητα, d, ορίζεται ως:

$$d = 0.61 \frac{\lambda}{A}$$

όπου A είναι το αριθμητικό άνοιγμα του φακού. Επομένως, για μια τάση επιτάχυνσης 80 kV το μήκος κύματος λ γίνεται λ=0.004 nm και η διακριτική ικανότητα γίνεται περίπου 0.15 nm.

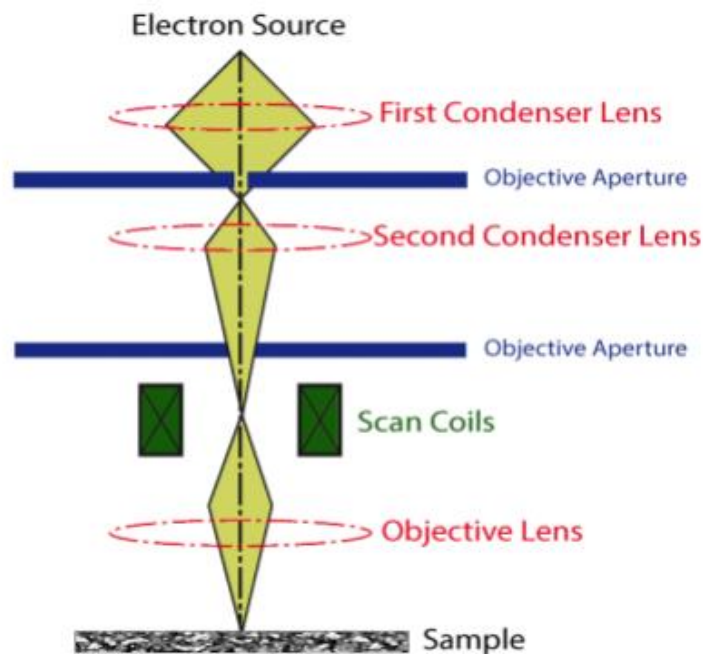
Η βασική αρχή λειτουργίας ενός μικροσκοπίου SEM περιλαμβάνει την ακτινοβολήση του δείγματος με μια καλά εστιασμένη δέσμη επιταχυνόμενων ηλεκτρονίων. Τα ενεργητικά ηλεκτρόνια της δέσμης αλληλεπιδρούν με τα επιφανειακά στρώματα του στερεού εναποθέτοντας ενέργεια. Αυτές οι περιοχές εναπόθεσης ενέργειας ονομάζονται όγκος αλληλεπίδρασης και παράγουν τις παρατηρούμενες μορφές δευτερεύουσας ακτινοβολίας. Η ικανότητα διείσδυσης της

δέσμης στο δείγμα καθορίζεται από επιμέρους παράγοντες, όπως το ρεύμα εκπομπής (καθορίζει πόσα ηλεκτρόνια έχουμε στην δέσμη), την διάμετρο σημείου, το δυναμικό επιτάχυνσης (καθορίζει την ταχύτητα / ενέργεια των ηλεκτρονίων) και το είδος του δείγματος (ο μέσος ατομικός αριθμός των ατόμων του). Κατά την διείσδυση της δέσμης στο δείγμα, οι αλληλεπιδράσεις που συντελούνται ανάμεσα στο δείγμα και τα ηλεκτρόνια της δέσμης περιλαμβάνουν:

- ✓ Φόρτιση (Charging) - περιγράφει την συσσώρευση φορτίου ηλεκτρονίων στο δείγμα. Για να μην παρατηρείται αυτό το φαινόμενο το δείγμα θα πρέπει να είναι αγώγιμο και συνδεδεμένο με γείωση ή να χρησιμοποιείται χαμηλό δυναμικό επιτάχυνσης.
- ✓ Ελαστική σκέδαση ηλεκτρονίων (Μεγαλύτερη γωνία, μικρότερη απώλεια ενέργειας) - περιλαμβάνει τα ελαστικά σκεδαζόμενα ηλεκτρόνια δέσμης (Elastically scattered primary electrons), τα οποία δεν ανιχνεύονται από το σύστημα και τα οπισθοσκεδαζόμενα ηλεκτρόνια (Backscattered electrons, BSE). Τα ηλεκτρόνια της δέσμης, τα οποία φέρουν ενέργεια συγκεκριμένου ποσού έστω 30 keV, όταν φθάσουν στην επιφάνεια του δείγματος διεισδύουν σε βάθος που εξαρτάται από τον ατομικό αριθμό. Μέσα στο δείγμα τα ηλεκτρόνια ταξιδεύουν προς τυχαίες κατευθύνσεις και συγκρούονται με τα άτομα του δείγματος που συναντούν στην διαδρομή τους. Αυτή η σύγκρουση συντελείται ελαστικά με τον πυρήνα του ατόμου, ειδικά σε μεγάλα άτομα, με αποτέλεσμα τα ηλεκτρόνια να σκεδάζονται προς οποιαδήποτε κατεύθυνση χωρίς σημαντική απώλεια της ενέργειάς τους. Συγκεκριμένα, συγκρατούν περίπου το 50–80 % της αρχικής τους ενέργειας. Εκείνα τα ηλεκτρόνια που σκεδάζονται προς τα πίσω με γωνία 180ο λέγονται οπισθοσκεδαζόμενα, έχουν μεγαλύτερη ενέργεια και εκπέμπονται από μεγαλύτερο βάθος διείσδυσης. Το ποσοστό των οπισθοσκεδαζόμενων ηλεκτρονίων εξαρτάται από τον ατομικό αριθμό του ατόμου του δείγματος με το οποίο συντελείται η σύγκρουση. Το ποσοστό αυτό, για τα ελαφρά στοιχεία είναι ~6% ενώ για τα βαρύτερα φτάνει περίπου το 50%. Συνεπώς, η μεταβολή στο ποσοστό των BSE ανάλογα με τον ατομικό αριθμό, μπορεί να διαφοροποιήσει την οπτική εικόνα με αποτέλεσμα βαρύτερες φάσεις να παρέχουν πιο φωτεινά είδωλα από ότι ελαφρύτερες. Κατά αυτόν τον τρόπο, παρέχονται πληροφορίες για την σύσταση ενός δείγματος.
- ✓ Η μη ελαστική σκέδαση ηλεκτρονίων (Μικρότερη γωνία, μεγαλύτερη απώλεια ενέργειας) - περιλαμβάνει τα μη ελαστικά σκεδαζόμενα ηλεκτρόνια (Inelastically scattered electrons), τα οποία δεν ανιχνεύονται από το σύστημα και τα δευτερογενή ηλεκτρόνια (Secondary electrons, SE). Κατά την σύγκρουση των ηλεκτρονίων της δέσμης με τα ηλεκτρόνια του ατόμου μερικά από τα χαλαρά συγκρατούμενα ηλεκτρόνια μπορεί να διαφύγουν από το άτομο. Τα ηλεκτρόνια αυτά, ονομάζονται δευτερογενή. Ουσιαστικά, κάθε ηλεκτρόνιο που διαφεύγει από το άτομο μετά από μια σύγκρουση με άλλο υψηλής ενέργειας είναι θεωρητικά ένα δευτερογενές ηλεκτρόνιο. Συνεπώς,

κάθε προσπίπτον ηλεκτρόνιο είναι ικανό να παράγει αρκετά δευτερογενή. Τα δευτερογενή ηλεκτρόνια αποτελούν χαμηλής ενέργειας ηλεκτρόνια (περίπου 50eV) και εκπέμπονται από επιφανειακά στρώματα του δείγματος, αφού τα SE που εκπέμπονται από μεγαλύτερο βάθος απορροφούνται εύκολα από την μάζα του δείγματος. Τα SE παράγονται είτε καθώς η δέσμη εισέρχεται στην επιφάνεια είτε καθώς η οπισθοσκεδαζόμενη δέσμη εξέρχεται από αυτήν, μηχανισμός ο οποίος είναι περίπου δέκα φορές πιο πιθανός από τον πρώτο. Επομένως, είναι αναμενόμενο να παρατηρείται μεγαλύτερη εκπομπή δευτερογενών ηλεκτρονίων εκεί που είναι μεγάλη και η εκπομπή οπισθοσκεδαζόμενων. Συμπεραίνουμε ότι, τα δευτερογενή ηλεκτρόνια είναι χρήσιμα για την απεικόνιση της επιφάνειας του δείγματος αλλά οι εικόνες των SE και των BSE δεν διαφέρουν σημαντικά.

- ✓ Ακτίνες-X- Οι χαρακτηριστικές ακτίνες-X δημιουργούνται με έναν τελείως διαφορετικό μηχανισμό. Όταν φεύγει ένα ηλεκτρόνιο από εσωτερική στοιβάδα, τότε ένα ηλεκτρόνιο από υψηλότερη ενεργειακή στοιβάδα καλύπτει το κενό. Η μετάπτωση στην χαμηλότερη στοιβάδα συνοδεύεται με εκπομπή διαφοράς ενεργείας (ακτίνες-X). Η ενέργεια αυτών των ακτινών είναι χαρακτηριστική της μετάπτωσης και κατά συνέπεια του ατόμου.
- ✓ Ηλεκτρόνια Auger - παράγονται όταν οι εκπεμπόμενες από το δείγμα ακτίνες-X εκδιώξουν ηλεκτρόνια από άλλη στοιβάδα κατά την έξοδό τους από το δείγμα.
- ✓ Θέρμανση του δείγματος.



Εικ. 2.2.1. Σχηματική απεικόνιση της διάταξης ενός ηλεκτρονικού μικροσκοπίου σάρωσης ^{xcii}

Στην παραπάνω σχηματική απεικόνιση (Εικ. 2.2.1.) παρουσιάζεται το διάγραμμα ενός ηλεκτρονικού μικροσκοπίου σάρωσης καθώς και τα επιμέρους τμήματα από τα οποία αποτελείται. Το μαγνητικό σύστημα εστίασης αποτελείται από τον συγκεντρωτικό και τον αντικειμενικό φακό και χρησιμεύει στην σμίκρυνση του ειδώλου σε τελικό μέγεθος κουκκίδας με διαστάσεις που κυμαίνονται από 5 - 200 nm πάνω στο δείγμα. Κάθε φακός έχει κυλινδρικό σχήμα ύψους 10 - 15 cm. Ο συγκεντρωτικός φακός μπορεί να αποτελείται από έναν ή περισσότερους φακούς και ο ρόλος του είναι να ρυθμίζει τη διάδοση της ηλεκτρονικής δέσμης που φτάνει στον αντικειμενικό φακό. Στην συνέχεια, στον αντικειμενικό φακό ρυθμίζεται το εύρος της ηλεκτρονικής δέσμης που προσπίπτει στο δείγμα. Τα δύο ζεύγη ηλεκτρομαγνητικών πηνίων που βρίσκονται στον αντικειμενικό φακό χρησιμεύουν στη σάρωση της επιφάνειας του δείγματος. Συγκεκριμένα, το ένα ζεύγος εκτρέπει την ακτίνα κατά μήκος του δείγματος και το άλλο κάθετα σε αυτό. Για να επιτευχθεί η σάρωση θα πρέπει να εφαρμοστεί ηλεκτρικό σήμα στο ένα από τα δύο ζεύγη πηνίων. Στην συνέχεια, η ηλεκτρονική δέσμη χτυπάει το δείγμα στο ένα άκρο του κεντρικού άξονα του συστήματος των φακών και ακολουθεί η κίνηση της δέσμης σε ευθεία γραμμή κατά μήκος του δείγματος. Τελικά, η δέσμη επιστρέφει στην αρχική της θέση. Κατά την διάρκεια της κίνησης της ηλεκτρονικής δέσμης, το ηλεκτρικό σήμα που εφαρμόζεται στο ένα ζεύγος πηνίων μεταβάλλεται χρονικά. Μετά από τη συμπλήρωση αυτής της γραμμής σάρωσης το δεύτερο ζεύγος πηνίων εκτρέπει ελαφρά τη δέσμη και επαναλαμβάνεται η κίνησή της. Κατά αυτόν τον τρόπο, επιτυγχάνεται η ακτινοβολήση όλης της επιφάνειας του δείγματος με τη δέσμη ηλεκτρονίων. Η διαδρομή του ηλεκτρονικής δέσμης που περιεγράφηκε παραπάνω, χρησιμοποιείται για να οδηγηθούν οι οριζόντιες και κάθετες σαρώσεις ενός σωλήνα καθοδικών ακτινών. Η απεικόνιση του δείγματος πραγματοποιείται χρησιμοποιώντας την έξοδο ενός ανιχνευτή για την ρύθμιση της έντασης φωτισμού της κουκκίδας στο σωλήνα καθοδικών ακτινών. Επομένως, η σάρωση παράγει ένα χάρτη του δείγματος στον οποίο υπάρχει ακριβής συσχέτιση μεταξύ του σήματος που παράγεται σε μια συγκεκριμένη θέση της επιφάνειας του δείγματος και του αντίστοιχου σημείου της οθόνης του σωλήνα καθοδικών ακτινών. Οι θάλαμοι του δείγματος είναι σχεδιασμένοι κατά τρόπο ώστε να επιτρέπουν την ταχεία αλλαγή των δειγμάτων. Επειδή τα ηλεκτρόνια δεν κινούνται στον αέρα, το μικροσκόπιο θα πρέπει να βρίσκεται σε υψηλό κενό της τάξης των 10^{-4} Torr, τουλάχιστον. Η υποδοχή του δείγματος ονομάζεται έδρανο και στα περισσότερα όργανα μπορεί να συγκρατήσει δείγματα αρκετών εκατοστών.

Ένα δείγμα για να παρατηρηθεί με το κλασσικό ηλεκτρονικό μικροσκόπιο σάρωσης θα πρέπει να έχει κάποιες ιδιότητες όπως (α) να αντέχει στο υψηλό κενό, (β) να αντέχει στο βομβαρδισμό ηλεκτρονίων και (γ) να είναι αγωγίμο. Συνεπώς, το προς εξέταση δείγμα θα επικαλυφθεί με ένα λεπτό στρώμα χρυσού (επιχρύσωση) προκειμένου να καταστεί αγωγίμη η επιφάνειά του και έπειτα τοποθετείται στο θάλαμο όπου υπάρχει υψηλό κενό, βομβαρδίζεται με μια δέσμη ηλεκτρονίων και λαμβάνεται η εικόνα με την βοήθεια της οποίας γίνονται οι οπτικές παρατηρήσεις του δείγματος.

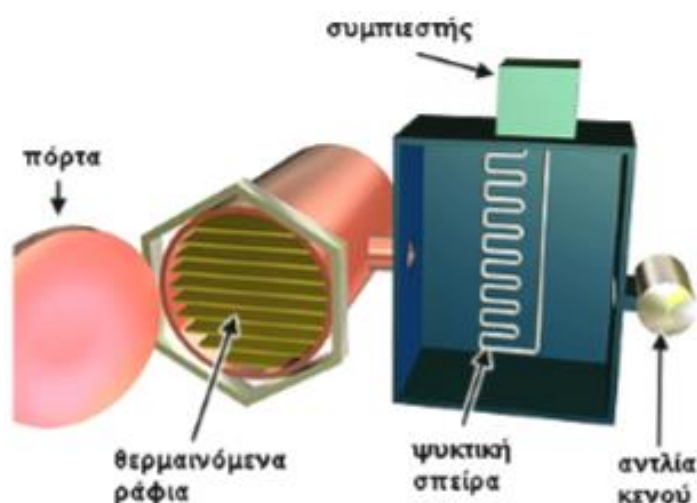
Για τη χημική ανάλυση το ηλεκτρονικό μικροσκόπιο σάρωσης συνήθως συμπληρώνεται με σύστημα στοιχειακής μικροανάλυσης διαχεόμενης ενέργειας (EDS) ακτίνων-X που είναι εφοδιασμένο με ανιχνευτή των εκπεμπόμενων ακτίνων X, και το οποίο κατά κανόνα έχει τη δυνατότητα ανάλυσης ελαφρών στοιχείων μέχρι και Βόριο, τη δυνατότητα ταχύτατης δημιουργίας χαρτών εικόνας ακτίνων-X και ποσοτικής χαρτογράφησης του δείγματος για πολλά στοιχεία ταυτόχρονα. Εκτός από το σύστημα στοιχειακής μικροανάλυσης διαχεόμενης ενέργειας ακτίνων-X, το ηλεκτρονικό μικροσκόπιο σάρωσης συμπληρώνεται και από το σύστημα εξάχνωσης /επιμετάλλωσης.

Σχετικά με τα ιστομηχανική, οι μικροσκοπικές μέθοδοι ανάλυσης παρουσιάζουν την μικροδομή οστικών μοσχευμάτων, καθώς και του ίδιου του οστού και προσδιορίζουν τυχόν επιστρώσεις και διεπιφανειακές αλληλεπιδράσεις σε μοριακό επίπεδο. Μέσω ηλεκτρονιακής μικροσκοπίας σάρωσης παρέχεται η δυνατότητα μελέτης μικρο και νάνο κλίμακας βιολογικών ιστών και δειγμάτων, τα οποία βρίσκονται σε συνθήκες παραπλήσιες των βιολογικών, με την προϋπόθεση ότι έχουν υποστεί κάποια κατεργασία. (xciii)

Τα οστικά τρισδιάστατα ικριώματα εξετάζονται μέσω SEM για να προσδιοριστεί η βιοσυμβατότητα, βιοαποικοδόμηση, επαναληψιμότητά και η επιφανειακή μικροδομή, όπως το πορώδες και η ομοιογένειά τους. Χρησιμοποιήθηκε το ηλεκτρονικό μικροσκόπιο τύπου JEOL JSM 6380LV (JEOL, USA).

2.3. Διάταξη λυοφιλίωσης (Freeze drying)

Στην παρακάτω σχηματική απεικόνιση (Εικ.2.3.1.) παρουσιάζεται η χαρακτηριστική σχηματική διάταξη της κρυοξήρανσης (freeze-drying) (xciv), που περιλαμβάνει τον κύριο θάλαμο, την ψυχόμενη ατμοπαγίδα με την ψυκτική μονάδα και την αντλία κενού.



Εικ. 2.3.1. Σχηματική απεικόνιση διάταξης λυοφιλίωσης

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

Συμπυκνωτής: Ο ψυχόμενος συμπυκνωτής πρέπει αφενός να βρίσκεται σε κατάλληλη θέση, ώστε να διέρχονται από αυτόν οι υδρατμοί, και αφετέρου να έχει τη δυνατότητα «απόψυξης», ώστε να απομακρύνεται ο σχηματιζόμενος πάγος, ενδεχομένως χωρίς διακοπή της διεργασίας. Στις συσκευές μικρής κλίμακας οι θάλαμοι είναι ξεχωριστοί και προσαρτώνται στον ψυκτικό θάλαμο με ειδικές βαλβίδες, που επιτρέπουν την απομόνωση των θαλάμων, έτσι ώστε να είναι δυνατή η απομάκρυνση του σχηματιζόμενου πάγου, χωρίς να διακόπτεται το κενό στους θαλάμους.

Αντλία κενού: Η απομάκρυνση των υδρατμών από τον χώρο της κρυοξήρανσης επιταχύνει τον ρυθμό της διεργασίας. Η απομάκρυνση αυτή επιτυγχάνεται με μια αντλία κενού. Η αντλία κενού πρέπει να μπορεί να διατηρεί την πίεση μέσα στον θάλαμο κάτω από τα 533.2 Pa ($= 4 \text{ mm Hg}$). Συνήθως, συνιστάται η πίεση στον θάλαμο να διατηρείται μεταξύ 4 Pa και 40 Pa ($0.03 < P < 0.3 \text{ mm Hg}$).

Ψυκτικό σύστημα: Το ψυκτικό σύστημα συνήθως παρέχει δύο επίπεδα ψύξης (με δύο διαφορετικά κυκλώματα): ένα σε θερμοκρασία κάτω των $-5 \text{ }^\circ\text{C}$ (για το υλικό) και το άλλο σε πολύ χαμηλότερη θερμοκρασία (από $-40 \text{ }^\circ\text{C}$ έως $-60 \text{ }^\circ\text{C}$) για την απομάκρυνση των υδρατμών. Σημειώνεται επίσης ότι στην αρχή της διεργασίας πολλά υλικά έχουν την τάση να σχηματίζουν αφρό ή να φτάνουν σε σημείο βρασμού. Επομένως, είναι προτιμητέα η πρόψυξη του υλικού πριν τοποθετηθεί στον θάλαμο της συσκευής κρυοξήρανσης.

Θερμαινόμενα ράφια: Για να εξαχρωθεί μια ποσότητα νερού, πρέπει να απορροφήσει ορισμένη ενέργεια, που αντιστοιχεί στη λανθάνουσα θερμότητα εξάχνωσης. Για μικρές ποσότητες υλικού, όπως αναφέρθηκε παραπάνω, η απαιτούμενη ενέργεια παραλαμβάνεται είτε από το ίδιο το υλικό, το οποίο έτσι ψύχεται, είτε από το περιβάλλον μέσα από τα τοιχώματα της συσκευής. Για μεγάλες ποσότητες υλικού είναι αναγκαία η θέρμανσή του με άλλα μέσα, αλλιώς μειώνεται σταδιακά ο ρυθμός της κρυοξήρανσης. Συνήθως, η παροχή της απαιτούμενης ενέργειας εξασφαλίζεται με θέρμανση του χώρου με ηλεκτρικές αντιστάσεις, που είναι συχνά ενσωματωμένες στα ράφια. Τα περισσότερα δοχεία, μέσα στα οποία τοποθετείται το υλικό μέσα στον θάλαμο, είναι γυάλινα, κι επειδή το γυαλί έχει χαμηλό συντελεστή θερμικής αγωγιμότητας, η θέρμανση του υλικού και η εξάχνωση προχωρούν αργά. Για να επιταχυνθεί η διαδικασία, σε ορισμένες συσκευές κυκλοφορεί εσωτερικά θερμό αδρανές αέριο (π.χ. άζωτο) με αποτέλεσμα να αυξηθεί ο ρυθμός μετάδοσης θερμότητας και συνεπώς και της διεργασίας. Σημειώνεται ότι σε τέτοια περίπτωση πρέπει να ελέγχεται η πίεση μέσα στον θάλαμο, ώστε να παραμένει κάτω από την τάση ατμών του πάγου.

Στην παρούσα μεταπτυχιακή εργασία ανάπτυξης 3D ικριωμάτων νανουδροξυ-απατίτη-βιοπολυμερών παρουσίας ή μη νανοσωλήνων άνθρακα, χρησιμοποιήθηκε

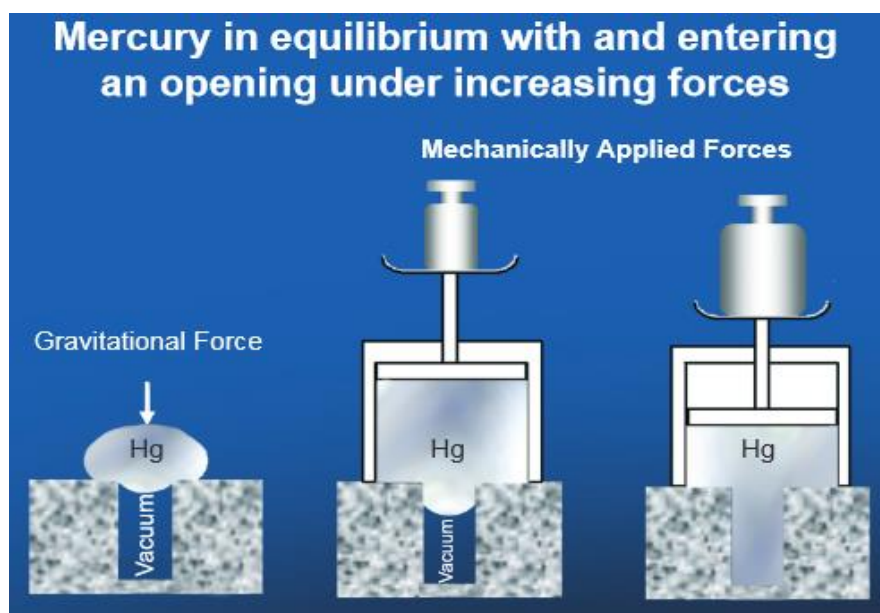
freeze dryer της εταιρείας Telstar, τύπου LyoQuest, με παραμέτρους λειτουργίας - 55°C (θερμοκρασία κατάψυξης) και 0,350 mbar (συνθήκες κενού).

2.4. Ποροσιμετρία υδραργύρου (MIP)

Η ποροσιμετρία υδραργύρου Mercury Intrusion Porosimetry (MIP) αποτελεί μια τεχνική χαρακτηρισμού πορώδους, το οποίο περιέχει πόρους μεγέθους μικροκλίμακας. Κατά την τεχνική αυτή υπολογίζεται η περιοχή μεγαλύτερου μεγέθους πόρων συγκριτικά με την ποροσιμετρία αζώτου και εφαρμόζεται περισσότερο για το χαρακτηρισμό των κεραμικών αντικειμένων μετά την έψησή τους παρά για τον χαρακτηρισμό κόνεων, καθώς αυτές έχουν πολύ μικρό μέσο μέγεθος πόρων. Επιπλέον, η ποροσιμετρία προσδίδει πληροφορίες τόσο για την κατανομή μεγέθους πόρων όσο και για το συνολικό % πορώδες και την πυκνότητα του υλικού. Το μέσο που εισχωρεί στους πόρους του δείγματος είναι ο υδράργυρος (xxix). Ωστόσο, ο υδράργυρος δεν διαβρέχει τα περισσότερα στερεά και απαιτείται εφαρμογή υψηλής πίεσης, ανάλογης του μεγέθους των πόρων, προκειμένου να εισχωρήσει μέσα στους πόρους του στερεού. Η εξίσωση που συσχετίζει την εφαρμοζόμενη πίεση ΔP με την ακτίνα r των πόρων, θεωρώντας ότι οι πόροι είναι κυλινδρικοί, είναι η εξίσωση Washburn:

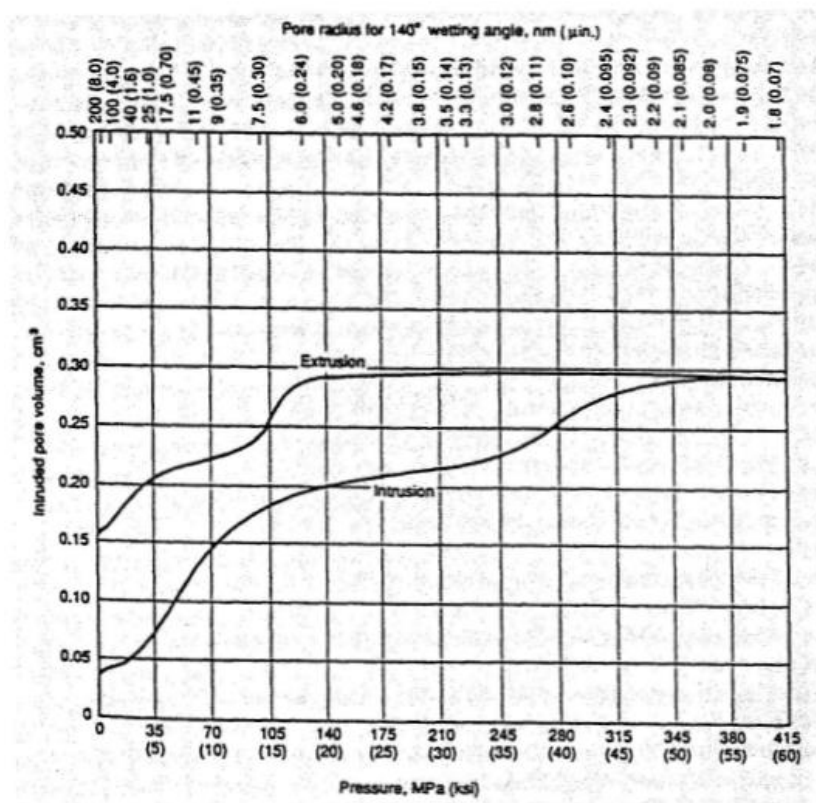
$$\Delta P = \frac{2\gamma \cos \theta}{r}$$

όπου γ η επιφανειακή τάση του υδραργύρου, και θ η γωνία διαβροχής του υδραργύρου με το δείγμα, που λαμβάνεται ίση με 140° για τα περισσότερα στερεά υλικά.



Εικ. 2.4.1. Σχηματική απεικόνιση ασκήσης εξωτερικής πίεσης για την εισχώρηση του υδραργύρου στο υλικό^{xcv}

Η διαδικασία μέτρησης της πορώδους δομής με τη μέθοδο αυτή απαιτεί αρχικά την δημιουργία κενού, ώστε να απομακρυνθεί ο αέρας από τους πόρους και κατόπιν την εφαρμογή πίεσης ώστε να εισέλθει ο υδράργυρος στους πόρους. Το όργανο καταγράφει συνεχώς τον όγκο του υδραργύρου που διεισδύει στους πόρους, συναρτήσει της εφαρμοζόμενης πίεσης. Ο όγκο του υδραργύρου που εισχωρεί στο υλικό αντιστοιχεί στον όγκο των πόρων. Με βάση την αντιστοιχία πίεσης – μεγέθους πόρων (εξίσωση Washburn) στην συγκεκριμένη τιμή πίεσης, κατασκευάζεται το διάγραμμα όγκου ως προς πίεση ή ακτίνα πόρων, από το οποίο λαμβάνεται η κατάνομή μεγέθους πόρων του δείγματος (Εικ. 2.4.2.).



Εικ. 2.4.2.: Διαγραμματική απεικόνιση πρωτογενούς αποτελέσματος ποροσιμετρίας υδραργύρου, που καταγράφει τον όγκο του υδραργύρου που εισέρχεται στους πόρους ως συνάρτηση της εφαρμοζόμενης πίεσης^{xxix}

Από την παραπάνω διαγραμματική απεικόνιση, παρατηρείται υστέρηση κατά την αποσυμπίεση του υδραργύρου, η οποία οφείλεται στις διασυνδέσεις των πόρων. Κατά το φαινόμενο αυτό, ο υδράργυρος αποσύρεται πρώτα από τους μικρούς πόρους κατά την αποσυμπίεση, αλλά αν στην πορεία του συναντήσει ένα μεγαλύτερο πόρο τότε θα καθυστερήσει η έξοδός του με επακόλουθο την επιπρόσθετη μείωση της πίεσης, ώστε να εκκενωθεί ο πόρος μεγάλου μεγέθους. Στην περίπτωση αυτή, επέρχεται λύση της συνέχειας του υδραργύρου κατά την απόσυρσή του και παγίδευσή του μέσα σε κάποιους πόρους, με αποτέλεσμα να ενισχύεται η υστέρηση. Επομένως, η τιμή του όγκου του υδραργύρου έχει αποσυρθεί κατά το τέλος του πειράματος αποσυμπίεσης, γεγονός που υποδεικνύει τον εγκλωβισμό του μέσα στη δομή.

Πέραν του πορώδους και της κατανομής μεγέθους των πόρων, η ποροσιμετρία υδραργύρου μπορεί να εφαρμοστεί για τη μέτρηση της φαινόμενης πυκνότητας του υλικού. Στην περίπτωση οστικών ικριωμάτων, ο καθορισμός του πορώδους αποτελεί προαπαιτήση, καθώς επιδρά στην προσρόφηση, διαπερατότητα, αντοχή και πυκνότητα του βιοϋλικού.(xcv) Χρησιμοποιήθηκε ο αυτόματος αναλυτής ποροσιμετρίας Pore Master της εταιρείας Quantachrome.



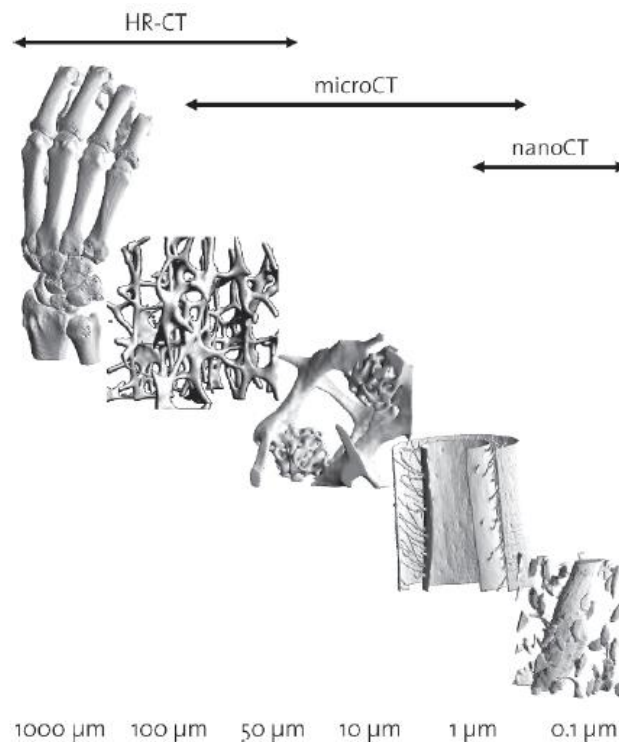
The automatic PoreMaster® mercury intrusion porosimeter.

Εικ. 2.4.3. Σχηματική απεικόνιση του οργάνου ποροσιμετρίας υδραργύρου

2.5. Υπολογιστική μικροτομογραφία ακτίνων X (micro-CT)

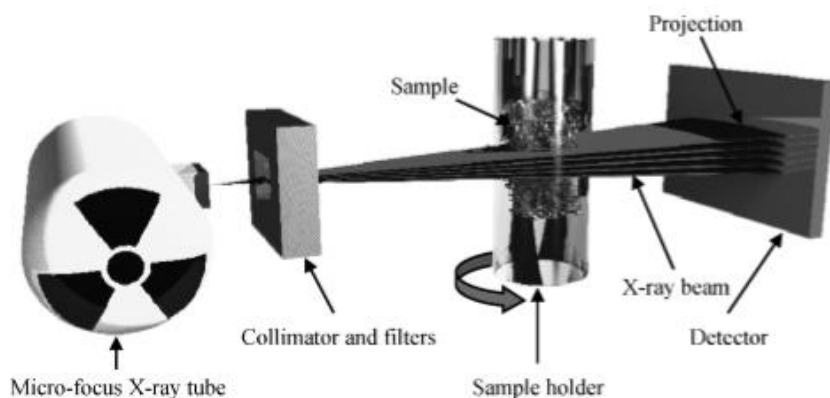
Η Υπολογιστική Τομογραφία (computed tomography, CT) είναι ένα είδος μη καταστρεπτικής απεικονιστικής μεθόδου που χρησιμοποιεί ακτίνες X για την εσωτερική αναπαράσταση του αντικειμένου. Η εσωτερική αναπαράσταση ή αλλιώς ανακατασκευή της εσωτερικής μορφολογίας πραγματοποιείται χωρίς να είναι αναγκαίος ο επιμέρους τεμαχισμός του δοκιμίου, μέσω σύνθεσης πολλαπλών προβολών των εγκάρσιων τομών του. Η χρήση της υπολογιστικής τομογραφίας σε διάφορους επιστημονικούς χώρους, την καθιστούν ένα γενικευμένο εργαλείο τρισδιάστατης (3D) απεικόνισης, μη-επεμβατικής και μη-καταστρεπτικής μεθόδου, ιατρικής διάγνωσης και ελέγχου της εσωτερικής δομής υλικών. Η μικροτομογραφία (computed microtomography, micro-CT) αποτελεί παραλλαγή της κλασσικής υπολογιστικής τομογραφίας στη μικροκλίμακα, όπου ένας μικροτομογράφος προσδίδει εικόνες καλύτερης ποιότητας και ανάλυσης από έναν αντίστοιχο υπολογιστικό αξονικό τομογράφο. Συγκεκριμένα, η ανάλυση εικόνων μικροτομογραφίας είναι της τάξεως των 5 μm ή/και μικρότερη, κυρίως λόγω του μικρού μεγέθους εστίασης της πηγής (5-

10 μm). Η τεχνική μπορεί να χρησιμοποιηθεί σε πολύ ευρεία κλίμακα για διαφορετικές αναλύσεις, ενώ πάντα ακολουθεί τις ίδιες φυσικές αρχές (Εικ. 2.5.1.).



Εικ. 2.5.1. Σχηματική ιεραρχική απεικόνιση μέσω υπολογιστικής τομογραφίας (CT) ^{xcvi}

Η αρχή λειτουργίας της υπολογιστικής (μικρο)τομογραφίας βασίζεται στην αλληλεπίδραση της ιονίζουσας ακτινοβολίας (ακτίνες X ή ακτινοβολία synchrotron) με την ύλη, όπου, στο ενεργειακό φάσμα που χρησιμοποιείται, η φωτογραφία κατασκευάζει τον κύριο μηχανισμό αλληλεπίδρασης. Τα αποτελέσματα απεικόνισης εξασθενεί τα φωτόνια, τα οποία είναι ανάλογα προς την τρίτη δύναμη του αριθμού τάξη των στοιχείων και αντιστρόφως ανάλογα προς την τρίτη δύναμη της ενέργειας φωτονίων. Έτσι, η πραγματική εξασθένηση εξαρτάται από το υλικό, αλλά και από το ενεργειακό φάσμα της πηγής ακτίνων X. Καθώς η δέσμη ακτίνων X διαπερνά ένα αντικείμενο εξασθενεί εκθετικά σύμφωνα με το μήκος διαδρομής του. Η ενεργειακά εξαρτώμενη σταθερά υλικού καλείται γραμμικός συντελεστής εξασθένησης και εκφράζει το ποσό της ακτινοβολίας που μειώνεται εντός μιας απείρως μικρής απόστασης, στην οποία η τελική εξασθένηση αντικατοπτρίζει το άθροισμα όλων των τοπικών γραμμικών συντελεστών εξασθένησης κατά μήκος της δέσμης ακτίνων X. Για να παραχθεί μια τρισδιάστατη εικόνα CT απαιτείται ένα ολόκληρο σύνολο δυσδιάστατων προβολών.



Εικ. 2.5.2. Σχηματική απεικόνιση ενός σαρωτή μCT^{xcvi}

Οι μCT προβολές λαμβάνονται μέσω μιας εγκατάστασης, στην οποία η πηγή και ο ανιχνευτής βρίσκονται σε μια σταθερή θέση και το αντικείμενο περιστρέφεται γύρω από τον επιμήκη άξονά του. Οι προβολικές αυτές απεικονίσεις συλλέγονται περιστρέφοντας το ζεύγος πηγής ακτίνων X-ανιχνευτή γύρω από το αντικείμενο που εξετάζεται, το οποίο προκαλεί μηχανικές δονήσεις λόγω βάρους και όγκου του. Το αντικείμενο προς εξέταση τοποθετείται σε μικρή περιστρεφόμενη πλατφόρμα, η οποία οδηγείται από βηματικό κινητήρα, εξαλείφοντας έτσι τις μηχανικές δονήσεις και ενισχύοντας την ποιότητα και την ανάλυση της εικόνας. Το πεδίο μετρήσεων στη μικροτομογραφία κωνικής δέσμης είναι της τάξεως των μερικών κυβικών εκατοστών ($2-10 \text{ cm}^3$). Συγκεκριμένα, κατά την λειτουργία ενός σαρωτή μικροτομογραφίας, ένας σωλήνας μικροεστίασης ακτίνων X εκπέμπει ακτίνες X παραλληλισμένες και φιλτραρισμένες σε ένα καθορισμένο φάσμα ενέργειας. Οι ακτίνες X διέρχονται μέσω του αντικειμένου και καταγράφονται από μια κάμερα συζευγμένου φορτίου (CCD). Μια πλήρης σάρωση περιλαμβάνει μια σειρά από προβολές, οι οποίες αντιστοιχούν στις διαφορετικές περιστροφές του αντικειμένου. Το αντικείμενο που εξετάζεται αφού προετοιμάζεται σε καθορισμένο μέγεθος και κατάσταση, τοποθετείται κατάλληλα στο όργανο σάρωσης και σκανάρεται υπό συγκεκριμένες διευθύνσεις.(xcvi)

Η μικροτομογραφία χρησιμοποιείται κυρίως στην ανάλυση και τον έλεγχο αστοχίας ποίκιλων υλικών, προσδίδοντας εκτιμήσεις υψηλής ανάλυσης πυκνότητας, γεωμετρίας και 3D μικρο-μορφολογίας τους, τόσο *in vitro* όσο και *in vivo*. Στον κλάδο ιστομηχανικής, δύναται να αναλυθούν ανοργανοποιημένοι ιστοί, όπως οστά και δόντια, μαλακοί ιστοί και εν γένει βιοϊλικά. Κάποιες προηγμένες εφαρμογές της μικροτομογραφίας περιλαμβάνουν την εκτίμηση ποιότητας νεοσυστατων οστών και σκελετικών φαινοτύπων, την τμηματική επισκευή ελαττωματικών οστών και την επούλωση καταγμάτων, καθώς και επιδράσεις σχετιζόμενες με την ηλικία του οστού, τον εκφυλισμό αρθρώσεων, την αγγειακή αναδιαμόρφωση, αναπτυξιακή βιολογία, και μικροδομή οστικών ικρνωμάτων. Αναλύοντας την μικροδομή οστών, η τεχνική πλεονεκτεί καθώς η μορφολογία παρουσιάζεται με επαναληψιμότητα και ακρίβεια, δίνεται άμεση τρισδιάστατη μέτρηση του πάχους και του πορώδους δικτύου του, εκτιμάται η ανοργανοποίηση του οστικού ιστού συγκρίσει προτύπων υδροξυαπατίτη

και πρόκειται για μια μη καταστροφική μέθοδο χαρακτηρισμού. Ωστόσο, υπάρχουν περιορισμοί στην ανάλυση της οστικής μικροδομής, οι κυριότεροι των οποίων οφείλονται στην έλλειψη στερεολογικών μοντέλων και στην ανεπαρκή ανάλυση του μεγέθους οστικών δοκίδων. Επομένως, εξάγονται ποσοτικά δεδομένα μορφολογίας και πυκνότητας σε συνδυασμό τη δυνατότητα τρισδιάστατης απεικόνισης των υλικών. (xcvii) (xcviii) Για τον χαρακτηρισμό ικριωμάτων στην παρούσα πειραματική έρευνα, χρησιμοποιήθηκε σαρωτής μCT μοντέλου 1172.



Εικ. 2.5.3. CT-scan 1172, της εταιρείας Brucker

2.6. Μηχανικές δοκιμές

Τα βιοαπορροφήσιμα ικρίωματα πρέπει να επιδεικνύουν μηχανική αντοχή, η οποία θα τα προστατεύει από παραμόρφωση της (μικρο)δομής τους κατά την *in vivo* εμφύτευση, έως ότου το νεοσυντεθημένο οστό να τα αντικαταστήσει. Εν γένει, τα σύνθετα βιοκεραμικά ικρίωματα (xcix) είναι πολύ εύθραυστα και καθίσταται δύσκολη η κατασκευή επιθυμητής γεωμετρίας, που απαιτείται για το μηχανικό χαρακτηρισμό τους. Συμβατικές μέθοδοι μηχανικού χαρακτηρισμού, όπως διαζονική, εφελκυστική και κρουστική δοκιμή, δεν εφαρμόζεται για πορώδη ικρίωματα. Αντί αυτού, εξετάζονται ως προς την μηχανική αντοχή τους μέσω κάμψης τριών ή τεσσάρων σημείων και μέσω δοκιμής σε θλίψη. Στην παρούσα ερευνητική πορεία, τα σύνθετα ικρίωματα υδροξυαπατίτη-βιοπολυμερών με ή χωρίς νανοσωλήνες άνθρακα υποβάλλονται σε δοκιμή θλίψης, ειδικότερα μονοαξονικής συμπίεσης.

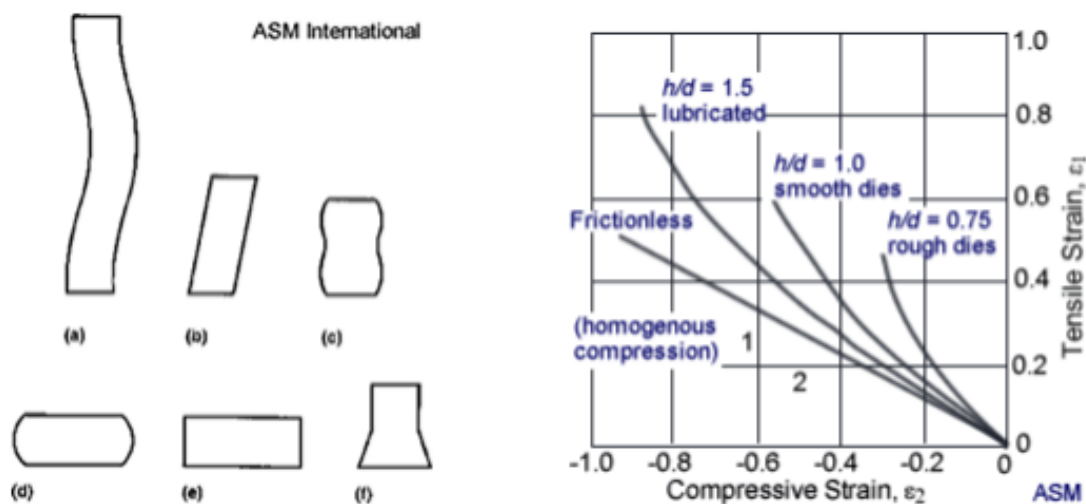
Όπως και σε κάθε περίπτωση αξονικής καταπόνησης ενός υλικού, όταν η επιβαλλόμενη τάση είναι μικρότερη από την τάση ελαστικότητας (*young stress*) που αντιστοιχεί στο όριο ελαστικότητας του υλικού, το υλικό παραμορφώνεται ελαστικά, υπό θερμοκρασίες περιβάλλοντος. Στην περίπτωση της ελαστικής παραμόρφωσης (βράχυνσης) και μέχρι το όριο αναλογίας του διαγράμματος σ - ϵ , ισχύει ο νόμος του

Hooke ($\sigma = E \cdot \epsilon$) για τις ορθές μηχανικές τάσεις. Οι παραδοχές ισχύος του Νόμου του Hooke για τις ορθές μηχανικές τάσεις μπορούν να συμπτυχθούν στις ακόλουθες:

- Η επιβαλλόμενη δύναμη δρα στη διεύθυνση του κύριου άξονα της ράβδου και το σημείο εφαρμογής της είναι το κέντρο βάρους της διατομής.
- Ο κύριος άξονας της ράβδου είναι απολύτως ευθύγραμμος.
- Οι αναπτυσσόμενες ορθές τάσεις κατανέμονται ομοιόμορφα στη διατομή.
- Στα θλιβόμενα μέρη δεν υπάρχει κίνδυνος λυγισμού.
- Όλες οι κατά μήκος ίνες της ράβδου επιμηκύνονται ή συμπιέζονται ακριβώς το ίδιο.
- Οι διατομές που αρχικά είναι επίπεδες και κάθετες στον άξονα της ράβδου, παραμένουν έτσι και μετά την παραμόρφωση.
- Οι αναπτυσσόμενες ορθές τάσεις είναι πάντα μικρότερες από την τάση αναλογίας σ_A του υλικού.

Σημαντική παρατήρηση για τις δοκιμές θλίψεως αποτελεί το γεγονός ότι γενικά αποφεύγεται η χρήση δοκιμίων με μεγάλη αναλογία μήκους/ διαμέτρου (L/D), προς αποφυγή φαινομένων λυγισμού. Γενικά, για τα δοκίμια που πρόκειται να υποβληθούν σε δοκιμή θλίψεως ισχύουν οι εξής περιορισμοί στο λόγο L/D :

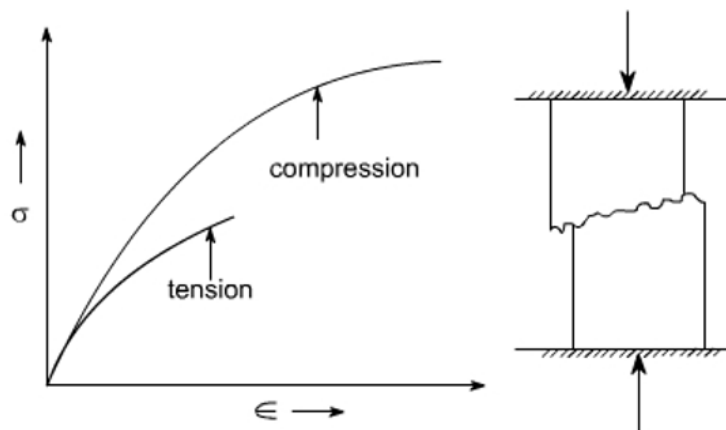
- $2 \leq L/D \leq 4$, για όλκιμα υλικά
- $2 \leq L/D \leq 10$, για ψαθυρά υλικά
-



Εικ. 2.6.1. Σχηματική αναπαράσταση τύπων παραμόρφωσης υπό θλιπτικές τάσεις καθώς και συγκριτικού διαγράμματος σ - ϵ για διάφορους τύπους L/D . (a) Buckling, when $L/D > 5$. (b) Shearing, when $L/D > 2.5$. (c) Double barreling, when $L/D > 2.0$ and friction is present at the contact surfaces. (d) Barreling, when $L/D < 2.0$ and friction is present at the contact surfaces.

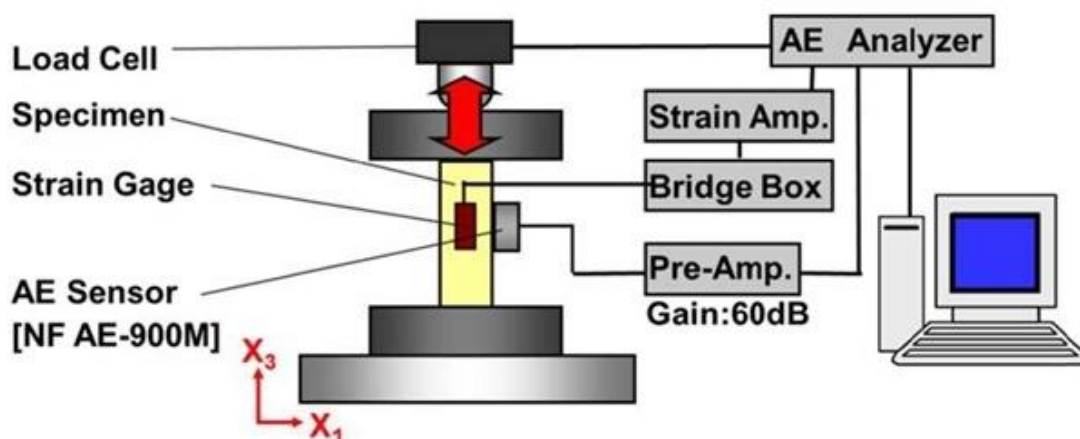
(e) Homogenous compression, when $L/D < 2.0$ and no friction is present at the contact surfaces. (f) Compressive instability due to worksoftening material.^{xix}

Στη παρακάτω διαγραμματική απεικόνιση (Εικ. 2.6.2.) παρουσιάζεται η μηχανική συμπεριφορά ενός ψαθυρού υλικού (σε κανονική θερμοκρασία) κατά την δοκιμή του μονοαξονικού εφελκυσμού και της μονοαξονικής θλίψεως. Όπως παρατηρείται, το μέτρο του Young παραμένει σταθερό (ως φυσική ιδιότητα) ενώ το αξιοσημείωτο είναι ότι στην περίπτωση της θλιπτικής καταπόνησης το ψαθυρό υλικό εμφανίζει μία παραμόρφωση, η οποία και προηγείται της θραύσεως του, πράγμα που σε καμία περίπτωση δεν εμφανίζεται στην περίπτωση της εφελκυστικής δοκιμής.



Εικ. 2.6.2. Διαγραμματική απεικόνιση τάσης- ανηγμένης παραμόρφωσης για ψαθυρό υλικό, (υπό θερμοκρασία περιβάλλοντος), υποβαλλόμενο σε δοκιμή εφελκυσμού (tension) και θλίψεως (compression) ^{xciix}

Μια επίσης πολύ σημαντική παρατήρηση που προκύπτει από το ανωτέρω διάγραμμα είναι το γεγονός ότι το ψαθυρό υλικό εμφανίζει μεγαλύτερη μέγιστη αντοχή σε θλίψη από την αντίστοιχη σε εφελκυσμό. Γενικά, τα ψαθυρά υλικά, όπως τα κεραμικά, έχουν μεγαλύτερες τιμές αντοχής σε θλιπτικά φορτία σε σχέση με τα αντίστοιχα εφελκυστικά, υπό τις ίδιες συνθήκες φόρτισης.



Εικ. 2.6.3. Σχηματική απεικόνιση μηχανικού συστήματος στατικής αντοχής σε θλίψη και σε δυναμική αντοχή σε κόπωση

Κατά τη διάρκεια της μηχανικής ανάλυσης, μερτάται η διαμηκής καταπόνηση μέσω δείκτη απευθείας προσαρτημένου στο δοκίμιο. Για την ανίχνευση αστοχίας των υλικών χρησιμοποιούνται συστήματα Ακουστικής Εκπομπής (ΑΕ). Ένας αισθητήρας ΑΕ ευρείας ζώνης (NF, ΑΕ-900M) προσαρτήθηκε στο δείγμα. Τα ανιχνευθέντα σήματα ΑΕ ενισχύονται από έναν προενισχυτή (κέρδος 60 dB) μέσω φίλτρου διέλευσης ζώνης και ενός τερματικού προενισχυτή. Τα ενισχυμένα σήματα ΑΕ, το φορτίο και η καταπόνηση καταγράφονται στη συνέχεια από έναν αναλυτή ΑΕ (AMSY-5·Vallen). Ο μηχανικός θόρυβος μεταξύ του δείγματος και της πλάκας φόρτωσης περιορίζεται χρησιμοποιώντας φύλλα τεφλόν στις πλάκες. Χρησιμοποιήθηκε το Instron 8832, μοντέλο της Universal Testing Machine.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3^ο: ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

3.1. Αντιδραστήρια και ερευνητικά όργανα

Για την ανάπτυξη υβριδικών τρισδιάστατων ικριωμάτων νανοϋδροξυαπατίτη (HAp)-βιοπολυμερών χιτοζάνης (Chit), πολυαιθυλενικού οξέος (PEO) σε βιομιμητικό περιβάλλον αμινοξέος L-Αργινίνης, με ή χωρίς την προσθήκη και νανοσωλήνων άνθρακα (CNTs), χρησιμοποιήθηκαν τα ακόλουθα αντιδραστήρια:

- οξικό οξύ (glacial CH₃COOH)
- χιτοζάνη μεγάλου μοριακού βάρους (C₁₂H₂₄N₂O₉)
- L-Αργινίνη (C₆H₁₄N₄O₂) από την εταιρεία AppliChem GmbH
- Poly(ethylene oxide) (PEO) με μοριακά βάρη Mw= 600000, 900000, 2000000 από την εταιρεία Sigma-Aldrich.
- υδροξείδιο του ασβεστίου (Ca(OH)₂) από την Neolab Migge Laborbedarf-Vertriebs GmbH
- βιοσυμβατοί νανοσωλήνες άνθρακα (NTX3) από την εταιρεία NanothinX
- για το διάλυμα SBF: NaCl, NaHCO₃, KCl, Na₂HPO₄ και Na₂SO₄ της εταιρείας Merck KGaA, MgCl₂·6H₂O από την εταιρεία neoLab Migge LaborbedarfVertriebs GmbH, CaCl₂·2H₂O από την SigmaAldrich, 35% HCl από την Fisher Chemical και ρυθμιστικό διάλυμα (PATris(tris(hydroxymethyl)aminomethane) υψηλού βαθμού καθαρότητας από την εταιρεία MP Bio-medicals LLC

Τα εργαστηριακά όργανα και εργαλεία, μέσω των οποίων πραγματοποιήθηκε η σύνθεση, είναι :

- μηχανικός διασπορέας τύπου T25 digital ULTRA-TURRAX της εταιρείας IKA
- μαγνητικός θερμαινόμενος αναδευτήρας με θερμοστοιχείο WiseStir MSH-55D και WiseStir MSH-20D της εταιρείας Witeg

- μαγνητικός θερμαινόμενος αναδευτήρας Bibby Stuart RET Basic IKAMAG της εταιρείας IKA
- θερμόμετρο
- ηλεκτρονικό πεχάμετρο PH300 Extech instruments (USA) με ηλεκτρόδιο καλομέλιανα
- φυγόκεντρος τύπου Z326 της εταιρείας HERMLE
- ζυγός ακριβείας ALS 220-4N (KERN & Sohn GmbH)
- πυριαντήριο Vaciotem-T της εταιρείας Selecta (Spain) με εύρος θερμοκρασιών 35 - 200 °C.
- Θερμαινόμενο λουτρό memmert WNB / WNE / WPE
- καλούπια διαστάσεων 5x5x20 mm, 1x5x20 mm και 15x20x5 mm
- πιπέτες Pasteur της εταιρείας Brand
- πιπέτα DE-M 15(Germany) των 10-100μl της εταιρείας Witeg

3.2. Σύνθεση ικριωμάτων νανοϋδροξυαπατίτη-βιοπολυμερών

Για την βιομηχανική σύνθεση τρισδιάστατων ικριωμάτων νανοϋδροξυαπατίτη-βιοπολυμερών χιτοζάνης και πολυαιθυλενικού οξέος παρουσίας αμινοξέος L-Αργινίνης, ακολουθεί η παρακάτω πειραματική πορεία:

1. Σε 29ml H₂O προστίθενται 0,3ml H₃PO₄ και υποβάλλονται σε μαγνητική ανάδευση. Στο διάλυμα προστίθενται 0,316g χιτοζάνης και ακολουθεί μηχανική ανάδευση στις ~7000rpm για 30'.
2. Σε 29ml H₂O προστίθενται 0,5439ml Ca(OH)₂ και το αιώρημα αναδεύεται στις ~ 5000rpm
3. Σε ποτήρι ζέσεως των 150ml, 1,2786g L-Arginine προστίθενται σε 14,65 ml H₂O και αναδεύονται μαγνητικά μέσα σε υδατόλουτρο, το οποίο τοποθετείται σε θερμαινόμενο μαγνητικό αναδευτήρα. Η αρχική θερμοκρασία του αντιδραστηρίου ρυθμίζεται στους 35,5°C, έως ότου η θερμοκρασία αγγίξει τους 40°C.
4. Η αντίδραση ξεκινά τη στιγμή που η θερμοκρασία του υδατόλουτρου αγγίζει τους 40°C, όπου το αιώρημα υδροξειδίου του ασβεστίου και το διάλυμα χιτοζάνης, το οποίο αναδεύεται μαγνητικά κατά την πειραματική διαδικασία, προστίθενται στάγδην στο διάλυμα αργινίνης. Προσοχή δόθηκε ώστε η θερμοκρασία του υδατόλουτρου να μην ξεπεράσει τους 42°C. Η θερμοκρασία του υδατόλουτρου εξεταζόταν με επιπρόσθετο θερμόμετρο, εκτός του θερμοστοιχείου.
5. Ακολουθεί ομογενοποίηση του αιωρήματος για τουλάχιστον 30'.
6. Το αιώρημα φυγοκεντρείται (15', 11.000 rpm).

7. Το ίζημα ξηραίνεται με λυοφιλίωση, όπου καταψύχεται στους -55°C για 3ώρες και έπειτα εξαχνώνεται εντός 24 ωρών με σταθερή υποπίεση των 0,350 mbar.
8. Το προετοιμασμένο δείγμα αποκτά τη μορφή κόνεως, καθώς κονιορτοποιείται σε γουδί από αχάτι και πραγματοποιείται χημική διασύνδεσή του (cross linking) με το πολυμερές οξειδίου του πολυαιθυλενίου (PEO).
9. Το δείγμα υπο μορφή πάστας τοποθετείται σε καλούπια διαστάσεων 5x5x20 mm και ξηραίνεται με λυοφιλίωση (στις συνθήκες -55°C , 0,350 mbar) καταλήγοντας σε ικρίωμα.

Οι αναλογίες σύνθεσης των αιωρημάτων βασίζονται σε προηγούμενες έρευνες που πραγματοποιήθηκαν στο εργαστήριο Μεταλλογνωσίας της Σχολής Μηχανικών Μεταλλείων Μεταλλουργών (xlvii), όπου η μοριακή αναλογία $\text{Ca/P}=10:6$, η κατά βάρος αναλογία $\text{HAp/Chit}=70:30$, η στοιχειομετρική αναλογία $\text{Ca}^{2+}/\text{L-αργινίνη}=1:2$ και η συγκέντρωση διαλύματος ορθοφωσφορικού οξέος $\text{H}_3\text{PO}_4 = 0,06 \text{ M}$.

Σχετικά με την σύνθεση του πολυμερικού συνδέτη PEO (M_w : 600000, 900000 ή 2000000), έγινε σταδιακή προσθήκη σκόνης 0,316g PEO σε 10mL οξικού οξέος 0,5M (CH_3COOH). Η μαγνητική ανάδευση διαρκεί για 24h σε ήπιες συνθήκες (300rpm, 40°C), ώστε να μην σπάσουν οι πολυμερικές αλυσίδες του PEO.

Αναλυτικότερα, μετά την παραγωγή σκόνης νανουδροξυαπατίτη ξεκινά η διαδικασία διασύνδεσής της (cross-linking), για τη βελτίωση της μηχανικής συμπεριφοράς των παραγόμενων ικριωμάτων και αντοχής τους σε υδατικό περιβάλλον. Εξετάστηκε η σταυροδιασύνδεση σκόνης υδροξυαπατίτη με το πολυαιθυλενικό οξύ, σε διαφορετικές αναλογίες πολυαιθυλενικού οξέος:χιτοζάνης (PEO:Chit). Οι αναλογίες PEO:Chit που επιλέχθηκαν είναι 1:2,5 (0,316 g PEO 0,5M) και 1:5 (0,158 g PEO 0,5M). Επιλέγοντας την βέλτιστη αναλογία, ακολούθησε αλλαγή παραμέτρου, όπου εξετάστηκαν ικρίωματα με συνδέτη PEO διαφορετικών μοριακών βαρών 600000, 900000 και 2000000, ώστε να μελετηθεί η μηχανική αντοχή και το πορώδες τους. Έπειτα, κρατώντας σταθερή την παράμετρο του μοριακού βάρους και της αναλογίας PEO:Chit, εξετάστηκαν ικρίωματα διασυνδεδεμένα με PEO διαφορετικής διάρκειας πολυμερισμού, συγκεκριμένα με PEO που πολυμερίστηκε μια, δύο και τρεις μέρες.

Κατά την διαδικασία crosslinking, προστίθενται στην κονιορτοποιημένη σκόνη HAp 4ml από τα 10ml του πολυμερικού διαλύματος (δηλαδή σε αναλογία 1:2,5 PEO:Chit) και αφού ομογενοποιηθεί το μείγμα, τοποθετείται μέσα σε ειδικά σχεδιασμένο καλούπι 5x5x20 mm (είτε σε καλούπι 15x5x20mm για ανάλυση θλίψεως και 1x520mm για έκθεση σε κυτταροκαλλιέργεια). Το καλούπι ξηραίνεται μέσω λυοφιλίωσης και συντίθεται το ικρίωμα υδροξυαπατίτη-βιοπολυμερών.

Πραγματοποιήθηκε επιπλέον μια σύνθεση ικριωμάτων υδροξυαπατίτη απουσίας συνδέτη PEO. Επίσης, προσδιορίστηκαν οι ιδιότητες ικριωμάτων, τα οποία τοποθετήθηκαν σε κατάψυξη στους -4°C πριν την λυοφιλίωση, επομένως είχαν διαφορετική συνθήκη ψύξης.



Εικ. 3.2.1. Σχηματική απεικόνιση καλουπώματος (5x5x20mm)

3.3. Σύνθεση ικριωμάτων νανοϋδροξυαπατίτη-βιοπολυμερών ενισχυμένων με νανοσωλήνες άνθρακα

Στην περίπτωση σύνθετων ικριωμάτων νανοϋδροξυαπατίτη ενισχυμένων με νανοσωλήνες άνθρακα πολλαπλών τοιχωμάτων MWCNTs, πραγματοποιείται σχεδόν η ίδια πειραματική διαδικασία. Οι βιοσυμβατοί CNTs έχουν εξωτερική διάμετρο 20-40 nm, μήκος ≥ 10 μm και καθαρότητα 98,5%. Η διαφορά στην πειραματική πορεία παραγωγής ικριωμάτων υδροξυαπατίτη-νανοσωλήνων άνθρακα έγκειται στην προσθήκη CNTs ~1% w/w του συνολικού αιωρήματος.



Εικ. 3.3.2. Δεξιά απεικονίζεται η σύνθεση αιωρήματος με CNTs και αριστερά η ομογενοποίησή του μέσω disperser

Πραγματοποιήθηκαν δύο διαφορετικές τεχνικές προσθήκης. Κατά την πρώτη μέθοδο, 0,025g CNTs διασπείρονται στο αρχικό αιώρημα χιτοζάνης (Chit-CNTs), το οποίο αναδεύεται μηχανικά για 30' και ακολουθεί η ίδια πειραματική πορεία με τα στάδια παρασκευής αιωρημάτων υδροξυαπατίτη-βιοπολυμερών (Κεφάλαιο 3.2.). Στην δεύτερη μέθοδο, 0,025g CNTs προστίθενται στο τελικό αιώρημα υδροξυαπατίτη (CNTs-Hap) με τελική ομογενοποίηση στις 4000 rpm για 1.30 ώρα. Το σύνθετο αιώρημα που παραλαμβάνεται ξηραίνεται με λυοφιλίωση και αποκτά μορφή λεπτόκοκκης κόνεος, με τη βοήθεια γουδιού από αχάτι. Έπειτα η κονιορτοποιημένη σκόνη αναμειγνύεται με 4 ml πολυμερικού συνδέτη (PEO), καλουπώνεται και ξηραίνεται με λυοφιλίωση σε συνθήκες -55°C και 0,350 mbar.



Εικ. 3.3.1. Κονιορτοποιημένη σκόνη νανοϋδροξυαπατίτη-CNTs

Σε μια άλλη πειραματική σύνθεση, έγινε προσπάθεια ανάμειξης 0,025g νανοσωλήνων άνθρακα στο πολυμερικό διάλυμα PEO, δίχως ωστόσο να επιτευχθεί διασπορά των νανοσωλήνων. Μελετήθηκε η δομή και ιδιότητες των υβριδικών κριωμάτων υδροξυαπατίτη ενισχυμένων με νανοσωλήνες άνθρακα, αλλάζοντας τις παραμέτρους μοριακού βάρους PEO και χρόνου πολυμερισμού του PEO και εν συνεχεία συγκρίθηκαν μεταξύ τους και με τα κριώματα απουσίας νανοσωλήνων άνθρακα ίδιας παραμετροποίησης.

Η σειρά πειραμάτων που πραγματοποιήθηκε, καταγράφεται κωδικοποιημένα στον παρακάτω Πίνακα 3.2.1, όπου:

- N ⇔ Neat δοκίμια (χωρίς νανοσωλήνες άνθρακα).
- NC ⇔ δοκίμια με νανοσωλήνες άνθρακα, οι οποίοι προστέθηκαν στο τελικό στάδιο σύνθεσης, δηλαδή στο αιώρημα υδροξυαπατίτη.
- CC ⇔ δοκίμια με νανοσωλήνες άνθρακα, οι οποίοι προστέθηκαν στο αρχικό στάδιο σύνθεσης, δηλαδή στο αιώρημα χιτοζάνης.
- Το PEO μοριακού βάρους 600000, 900000, 2000000 κωδικοποιείται σε P6, P9, P2M αντιστοίχως.

- Ο χρόνος πολυμερισμού του πολυμερικού συνδέτη PEO 1ημέρας, 2 ημέρας και 3 ημέρας κωδικοποιείται σε 1D, 2D, 3D αντιστοίχως.
- Η αναλογία PEO:Chit 1:5, κωδικοποιείται σε -S.

Πίνακας 3.2.1. Σειρά πειραμάτων:

ΚΩΔΙΚΟΣ	CNTs	PEO	DAYS OF POLYMERIZATION	PEO:CHIT
NP61D	x	600000	1 day	1:2.5
NP62D	x	600000	2 days	1:2.5
NP63D	x	600000	3 days	1:2.5
NP61D-S	x	600000	1 day	1: 5
NP62D-S	x	600000	2 days	1: 5
NP91D	x	900000	1 day	1:2.5
NP92D	x	900000	2 days	1:2.5
NP93D	x	900000	3 days	1:2.5
NP2M1D	x	2000000	1 day	1:2.5
NP2M1D-S	x	2000000	1 day	1: 5
NP2M2D	x	2000000	2 days	1:2.5
NP2M3D	x	2000000	3 days	1:2.5
CCP61D	CNTs-Chit	600000	1 day	1:2.5
CCP62D	CNTs-Chit	600000	2 days	1:2.5
CCP63D	CNTs-Chit	600000	3 days	1:2.5
CCP91D	CNTs-Chit	900000	1 day	1:2.5
CCP92D	CNTs-Chit	900000	2 days	1:2.5
CCP93D	CNTs-Chit	900000	3 days	1:2.5
CCP2M1D	CNTs-Chit	2000000	1 day	1:2.5
CCP2M2D	CNTs-Chit	2000000	2 days	1:2.5
CCP2M3D	CNTs-Chit	2000000	3 days	1:2.5
NCP61D-S	CNTs-Hap	600000	1 day	1: 5
NCP61D	CNTs-Hap	600000	1 day	1:2.5
NCP62D	CNTs-Hap	600000	2 days	1:2.5
NCP63D	CNTs-Hap	600000	3 days	1:2.5
NCP91D	CNTs-Hap	900000	1 day	1:2.5
NCP92D	CNTs-Hap	900000	2 days	1:2.5
NCP93D	CNTs-Hap	900000	3 days	1:2.5
NCP2M1D	CNTs-Hap	2000000	1 day	1:2.5
NCP2M2D	CNTs-Hap	2000000	2 days	1:2.5
NCP2M3D	CNTs-Hap	2000000	3 days	1:2.5

Τα παραπάνω δοκίμια αναλύθηκαν ως προς το πορώδες, τη διασυνδεσιμότητα του πορώδους δικτύου τους, την απόκρισή τους σε υδατικά μέσα (νερό, αιθανόλη, SBF), ενώ τα βέλτιστα εξ' αυτών μελετήθηκαν ως προς την μηχανική τους αντοχή (θλίψη).

3.4. Σύνθεση προσομοιωμένων σωματικών υγρών (SBF)

Η σύνθεση προσομοιωμένων σωματικών Υγρών (SBF) πραγματοποιείται *in vitro* και εφαρμόζεται στα επιλεγμένα νανοδομημένα πολυκρυσταλλικά ικρίωματα υδροξυ-απατίτη-βιοπολυμερών ενισχυμένων ή μη με νανοσωλήνες άνθρακα. Το *in vitro* διάλυμα του SBF ρυθμίζεται σε Ρη 7,4 και αποκτά ιοντικές συγκεντρώσεις σχεδόν ίσες προς με εκείνες του ανθρωπίνου πλάσματος αίματος (Na^+ 142,0, K^+ 5.0, Mg^{2+} 1,5, Ca^{2+} 2.5, Cl^- 147.8, HCO_3^- 3 4.2, HPO_4^{2-} 1.0, SO_4^{2-} 0.5 mM).

Κατά την παρασκευή του διαλύματος, διαλύονται σε αποσταγμένο νερό και buffer καθορισμένες ποσότητες αντιδραστηρίων NaCl, NaHCO₃, KCl, Na₂HPO₄, MgCl₂ · 6H₂O, HCl(1M), CaCl₂·2H₂O, Na₂SO₄, τα οποία προστίθενται ανά 10 min με τη σειρά που παρουσιάζεται στον ακόλουθο Πίνακα 3.4. Οι τιμές του pH καταγράφονται καθ' όλη την διάρκεια προς αντίδρασης μέσω pH-μετρου και ρυθμίζονται μέσω προσθήκης τρις(υδροξυμεθυλ)αμινομεθανίου ((CH₂OH)₃CNH₂) και 1.0 M υδροχλωρικού οξέος (HCl), όπου οι τιμές αυξάνονται με την προσθήκη Tris (~8,7,9) και τελικά μειώνονται στην επιθυμητή τιμή 7,4 με την ύστερη προσθήκη HCl (1M). Η καθαρότητα του εργαστηριακού εξοπλισμού κρίθηκε απαραίτητη, καθώς οποιαδήποτε ακαθαρσία επιφέρει μεταβολές στη σύσταση του SBF.

Πίνακας 3.4. Ποσότητες αντιδρώντων SBF

1.	NaCl	9,8184 g
2.	NaHCO ₃	3,4023 g
3.	KCl	0,5591 g
4.	Na ₂ HPO ₄	0,2129 g
5.	MgCl ₂ · 6H ₂ O	0,4574 g
6.	HCl (1M)	15 ml
7.	CaCl ₂ · 2H ₂ O	0,5531 g
8.	Na ₂ SO ₄	0,1065 g
9.	Tris	9,0855 g
10.	HCl (1M)	50 ml

Μετά την σύνθεση SBF, τα επιλεγμένα δοκίμια [NP2M1D, NCP62D, CCP92D, NCP91D] βυθίζονται σε δοχεία ζέσεως των 100ml συμπληρωμένων με SBF και διατηρούνται σε θερμαινόμενο υδατόλουτρο στους περίπου 40°C για το χρονικό διάστημα 1, 3, 5 και 7 ημερών. Κάθε 48 ώρες συμπληρώνεται επιπλέον διάλυμα SBF σε κάθε δοχείο, καθώς και νερό, ώστε να διατηρούνται αναλλοίωτες οι ιδιότητες του διαλύματος. Μετά το πέρας του χρόνου παραμονής 1, 3, 5, 7 ημερών, τα δοκίμια αφαιρούνται από το SBF και τοποθετούνται σε πυριαντήριο στην ίδια θερμοκρασία (40°C), ώστε να αποβάλλουν την περιττή υγρασία.

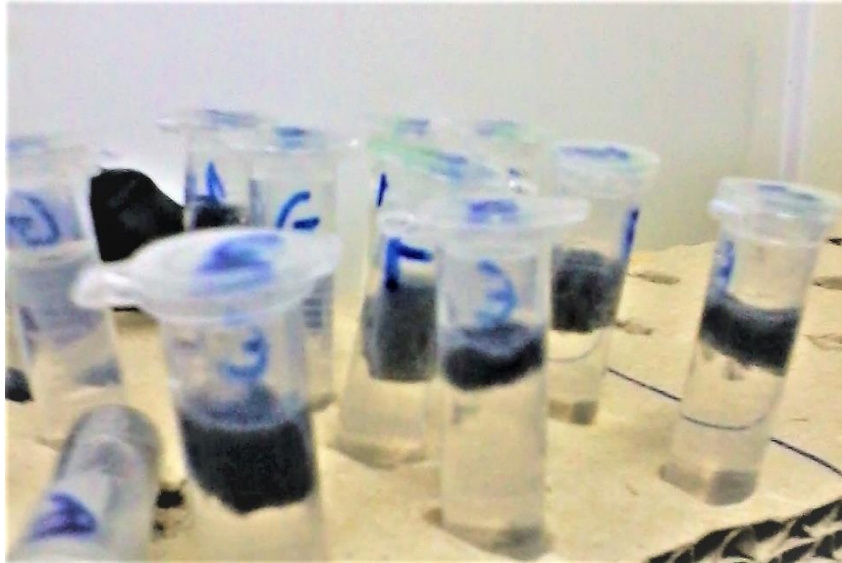


Εικ. 3.4. Δεξιά απεικονίζεται ο σταδιακός έλεγχος του pH και αριστερά η βύθιση των δοκιμίων στο διάλυμα SBF

Η μορφολογία και μικροδομή των τελικών δοκιμίων εκτεθειμένων σε SBF, μελετήθηκε μέσω ηλεκτρονικής μικροσκοπίας σάρωσης (SEM) σε συνδυασμό με φασματομετρία ενεργειακής διασποράς ακτίνων X (EDS).

3.5. Μελέτη υδατικής προσρόφησης και αντοχής σε υδατικό περιβάλλον

Τα ικρίωματα που εξετάστηκαν ως προς την υδατική τους αντοχή, κόπηκαν σε πάχος ~2mm ανά εξάδες και βυθίστηκαν σε erpendorf με απιονισμένο νερό, τα οποία τοποθετήθηκαν σε πυραντήριο στους 35°C για 10 ημέρες. Όσα δοκίμια έδειξαν αυξημένη αντοχή σε νερό, στραγγίστηκαν με διηθητικό χαρτί, ώστε να αποβάλλουν την περίσσεια νερού και βυθίστηκαν σε αιθανόλη 70% στους 35 °C (πυριαντήριο). Κάθε 1-2 ημέρες τα φιαλίδια συμπληρώνονται με αιθανόλη, λόγω εξάτμισης. Τέλος, πραγματοποιήθηκε ανάδευση δια χειρός των δοκιμίων στην αιθανόλη και παρατηρήθηκε η συμπεριφορά τους.



Εικ. 3.5.1. Σχηματική απεικόνιση ικριωμάτων βυθισμένων σε απιονισμένο νερό

Σχετικά με την υδατική προσρόφηση των επιλεγμένων δοκιμίων, εξάδες από το έκαστο ικρίωμα κόπηκαν σε πάχος $\sim 2\text{mm}$ και ζυγίστηκαν (W_{dry}). Έπειτα βυθίστηκαν σε φιαλίδια με απιονισμένο νερό για 2-3 ημέρες. Μετά το πέρας του χρονικού διαστήματος παραμονής τους, στραγγίστηκαν ώστε να απομακρυνθεί η περίσσεια υγρασίας και ζυγίστηκε το νέο βάρος τους (W_{wet}). Η μέση υδατική τους προσρόφηση υπολογίστηκε από τη διαφορά βάρους εκάστου δοκιμίου πριν και μετά την καταβύθισή του στο νερό.

3.6. Μελέτη Πορώδους Δομής

Τα υβριδικά ικρίωματα υδροξυαπαταίτη και υδροξυαπατίτη ενισχυμένα με νανοσωλήνες άνθρακα εξετάζονται ως προς την μικροδομή και μορφολογία τους, μέσω ηλεκτρονικής μικροσκοπίας σάρωσης. Συγκεκριμένα, με αναλύσεις ηλεκτρονικής μικροσκοπίας σάρωσης (SEM) προσδιορίζεται το μέγεθος και η κατανομή πόρων, καθώς και η χημική σύσταση του ικριώματος με ταυτόχρονη ανάλυση EDS. Ωστόσο, στην περίπτωση ικριωμάτων με ενισχυτικό μέσο νανοσωλήνων άνθρακα (CNTs), η EDS ανάλυση αποδεικνύει μόνο την ύπαρξη υδροξυαπατίτη. Σε περαιτέρω ανάλυση ηλεκτρονικής μικροσκοπίας, μελετάται η διατήρηση της μικροδομής των ικριωμάτων, όπου τα δοκίμια βυθίζονται σε διάλυμα προσομοίωσης σωματικών υγρών (SBF) για χρονικό διάστημα 1, 3, 5 και 7 ημερών και παρακολουθείται η αντοχή τους. Πριν από την παρατήρηση των δειγμάτων στο ηλεκτρονικό μικροσκόπιο σάρωσης, απαιτείται προετοιμασία των δοκιμίων. Τα δείγματα τοποθετούνται σε συσκευή επιχρυσώσης, όπου καλύπτονται με λεπτή επίστρωση χρυσού, ώστε να καταστεί η επιφάνεια τους αγωγίμη και να είναι δυνατή η παρατήρησή τους στο ηλεκτρονικό μικροσκόπιο σάρωσης. Σχετικά με τη διασυνδεσιμότητα πορώδους δικτύου, την κατανομή μεγέθους πόρων, τη γεωμετρία και ομοιογένεια πορώδους,

πραγματοποιούνται μετρήσεις ποροσιμετρίας υδραργύρου (MIP) και υπολογιστικής μικροτομογραφίας σάρωσης ακτίνων X (Ct-scan).

3.7. Μελέτη μηχανικής αντοχής

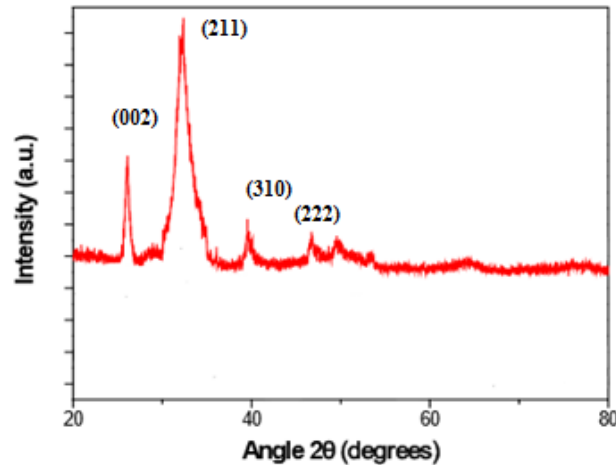
Τα επιλεγμένα σύνθετα κριώματα υποβάλλονται σε δοκιμή μονοαξονικής θλίψεως (Uniaxial compression test), όπου φορτίζονται υπό την επίδραση δυο δυνάμεων, ίσου μέτρου, ίδιας διεύθυνσεως και αντίθετης φοράς, ώστε να προκαλείται συμπίεσή τους. Τα δοκίμια που εξετάστηκαν είναι κυλινδρικά με διαστάσεις πάχους 10 mm και διαμέτρου 15 mm. Η αντοχή σε θλίψη υπολογίστηκε από το μέγιστο σημείο του γραφήματος τάσης / παραμόρφωσης, το οποίο αντιπροσωπεύει την στιγμή που εμφανίστηκε η πρώτη ρωγμή στα κριώματα. Η αντοχή σε θλίψη των νανοσύνθετων κριωμάτων διεξήχθη μέσω μηχανήματος INSTRON 8832. Οι συνθήκες του πειράματος ήταν ταχύτητα κεφαλής 1 mm / λεπτό μέχρι το σημείο θραύσης του δοκίμιου και θερμοκρασία περιβάλλοντος. Πραγματοποιήθηκαν πέντε μετρήσεις (5 δείγματα) για το έκαστο δοκίμιο.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 4^ο: ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ- ΣΥΖΗΤΗΣΗ

4.1. Σύσταση κριωμάτων

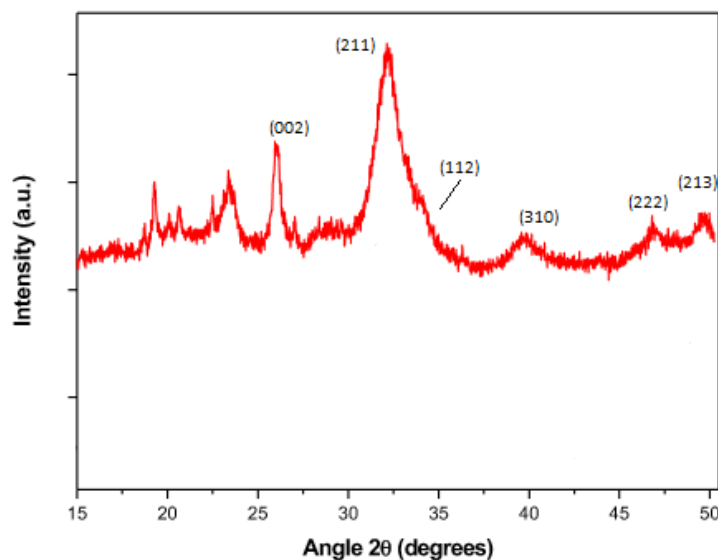
Η ανάλυση των κρυσταλλικών φάσεων και ο προσδιορισμός των χαρακτηριστικών κορυφών των δοκιμίων, μελετώνται χρησιμοποιώντας περιθλασιμετρία ακτίνων X (XRD). Πραγματοποιήθηκαν ενδεικτικές μετρήσεις για σκόνη υδροξυαπατίτη και σκόνη υδροξυαπατίτη-νανοσωλήνων άνθρακα, όπου οι νανοσωλήνες άνθρακα έχουν προστεθεί σε αιώρημα χιτοζάνης (CC) και σε αιώρημα υδροξυαπατίτη (NC). Η ανάλυση σκόνης υδροξυαπατίτη, καθώς και οι αναλύσεις των κόνεων CC, NC απέδειξαν την ύπαρξη κρυσταλλικής φάσης υδροξυαπατίτη εξαγωνικής δομής.

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 (Εικ.4.1.).



Εικ. 4.1. Διαγραμματική απεικόνιση του φάσματος XRD για αιωρήματα ΗΑρ με ΗΑρ/Chit = 70/30, Ca²⁺:Arg = 1:1 και Ca/P = 10/6.

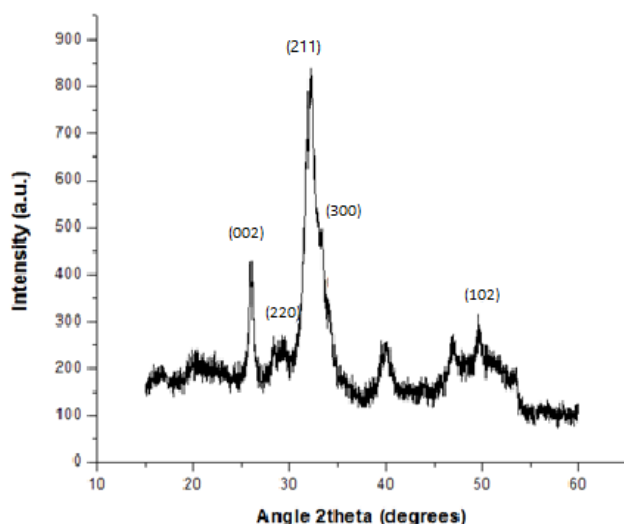
Στο ακόλουθο φασματογράφημα (Εικ. 4.2.), απεικονίζονται οι χαρακτηριστικές κορυφές για υβριδικό ικρίωμα υδροξυαπατίτη διασυνδεδεμένου με 4mL πολυαιθυλενικού οξέος, το οποίο διαλύθηκε σε οξικό οξύ 0,5 M. Όπως καταγράφεται στο ακόλουθο σχήμα, οι κορυφές στις γωνίες $2\theta = 26^\circ, 32^\circ, 33,8^\circ, 39,8^\circ, 46,8^\circ$ 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 ΡΕΟ στις γωνίες $2\theta = 19,3^\circ$ και $23,4^\circ$. Το πολυαιθυλενικό οξύ φάνηκε να συνδράμει συνεργιστικά στη κρυστάλλωση του υδροξυαπατίτη, καθώς συναντώνται εντονότερες κορυφές.



Εικ.4.2. Διαγραμματική απεικόνιση φάσματος XRD για το αιωρήμα ΗΑρ/Chit/ΡΕΟ

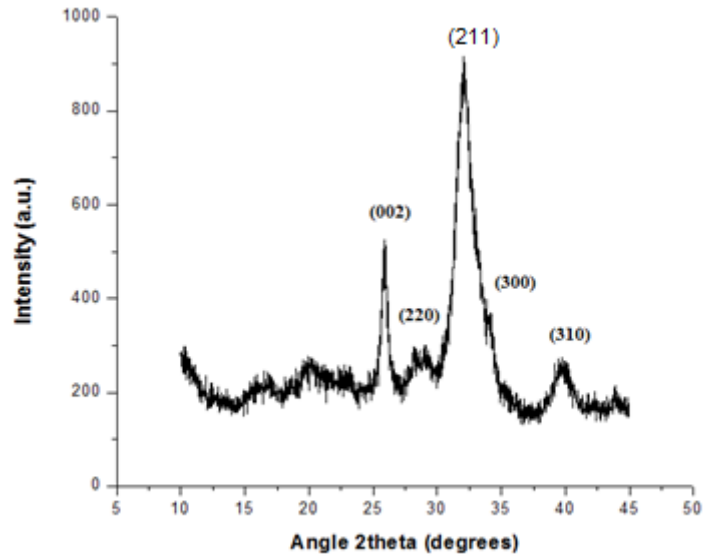
Ακολουθεί η απεικόνιση (Εικ. 4.3.) των κρυσταλλικών κορυφών του σύνθετου ικρίωματος υδροξυαπατίτη ενισχυμένου με νανοσωλήνες άνθρακα, οι οποίοι έχουν

προσθεθεί στο αιώρημα της χιτοζάνης (CC). Όπως παρατηρείται από το φασματογράφημα, οι νανοςωλήνες άνθρακα δεν αλλοιώνουν την σύσταση του υλικού, όπως αποδεικνύεται από τις χαρακτηριστικές κορυφές. Όπως καταγράφεται στο ακόλουθο σχήμα, οι κορυφές στις γωνίες $2\theta=26,7^\circ, 32,17^\circ, 33,4^\circ$ αντιστοιχούν στα κρυσταλλικά επίπεδα (002), (211), (300) του ανθρακικού εξαγωνικού υδροξυαπατίτη. Επίσης παρατηρούνται οι χαρακτηριστικές κορυφές του γραφίτη στις γωνίες $2\theta=26^\circ, 22^\circ, 44,3^\circ$ και 50° .



Εικ. 4.3. Διαγραμματική απεικόνιση φάσματος XRD για σκόνη HAp/Chit/PEO/CNTs, με 1% CNTs σε αιώρημα χιτοζάνης.

Ακολουθεί η απεικόνιση (Εικ. 4.4.) των κρυσταλλικών κορυφών του σύνθετου ικρίωματος υδροξυαπατίτη ενισχυμένου με νανοςωλήνες άνθρακα, οι οποίοι έχουν προσθεθεί στο αιώρημα της υδροξυαπατίτη (NC). Όπως παρατηρείται από το φασματογράφημα, οι νανοςωλήνες άνθρακα δεν οδηγούν στην εμφάνιση επιπλέον φάσεων υδροξυαπατίτη, όπως αποδεικνύεται από την ύπαρξη των χαρακτηριστικών κορυφών του υδροξυαπατίτη εξαγωνικής δομής. Όπως καταγράφεται στο ακόλουθο σχήμα, οι κορυφές στις γωνίες $2\theta=26,7^\circ, 32,17^\circ, 33,4^\circ, 39,8^\circ$ αντιστοιχούν στα κρυσταλλικά επίπεδα (002), (211), (220), (300), (310) του ανθρακικού εξαγωνικού υδροξυαπατίτη.



Εικ.4.4. Διαγραμματική απεικόνιση φάσματος XRD για σκόνη HAp/Chit/PEO/CNTs, με 1% CNTs σε αιώρημα υδροξυαπατίτη.

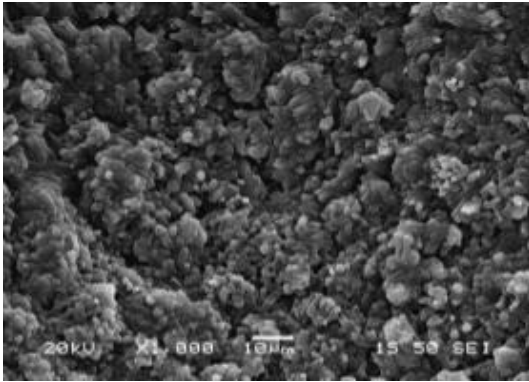
Η σύγκριση των παραπάνω δειγμάτων έγινε σε αντιπαραβολή με οστικό και οδοντικό υδροξυαπατίτη της βάσης δεδομένων Crystal Diffraction Open Database 2011 (COD 2011).

4.2.Πορώδες ικριωμάτων

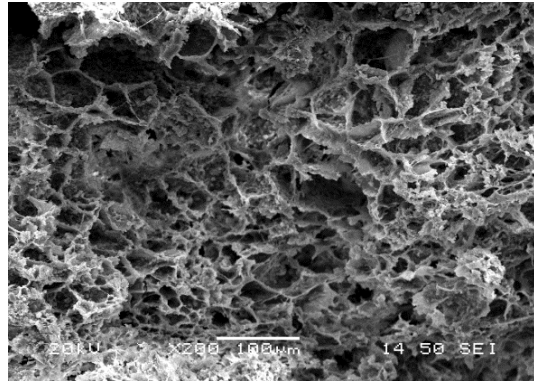
Μέσω αναλύσεων ηλεκτρονικής μικροσκοπίας σάρωσης (SEM) των εξετασθέντων δειγμάτων αποδεικνύεται ότι ο όγκος των ικριωμάτων χαρακτηρίζεται από μια εξαιρετικά πορώδη μικροδομή, η οποία αποτελείται από διασυνδεδεμένα ανοικτά δίκτυα. Μέσω αναλύσεων φασματοσκοπίας ακτίνων X ενεργειακής διασποράς (EDS), παρατηρείται η χημική σύσταση των ικριωμάτων υδροξυαπατίτη, η οποία αντιπροσωπεύεται από ασβέστιο, φώσφορο, άνθρακα και οξυγόνο.

Οι τρόποι και μηχανισμοί προσθήκης νανοσωλήνων άνθρακα, καθώς και οι διακυμαινόμενες παράμετροι επιλογής πολυμερισμού του συνδέτη πολυαιθυλενικού οξέος (PEO), που αφορούν στο διαφορετικό του μοριακό βάρος συναρτήσει του χρόνου πολυμερισμού του, οδήγησαν σε ποκίλες μικροδομές, οι οποίες αναπαριστώνται μέσω **SEM** ακολούθως.

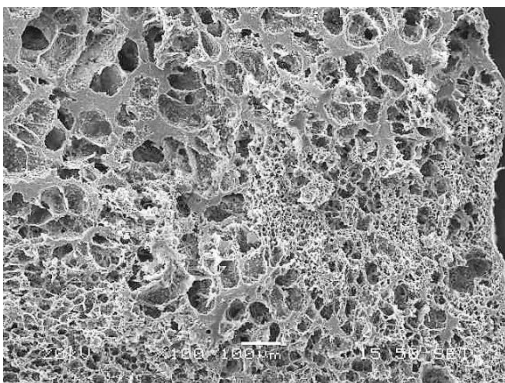
Ικρίωματα υδροξυαπατίτη χωρίς νανοσωλήνες άνθρακα:



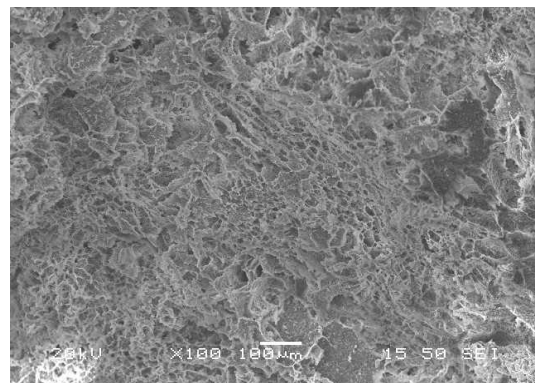
NP61D



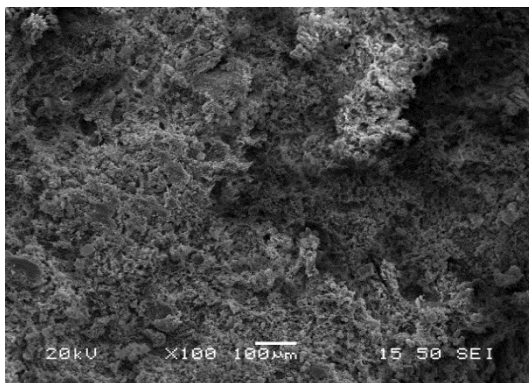
NP62D



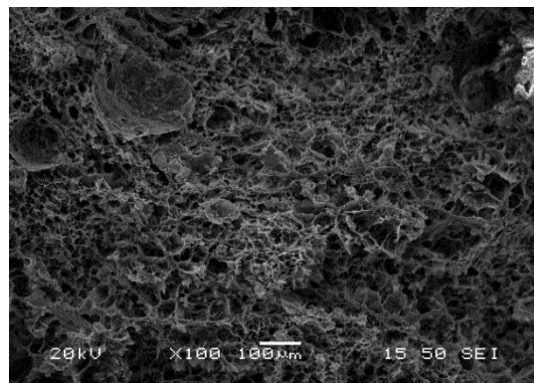
NP62D-S (PEO: Chit -1:5)



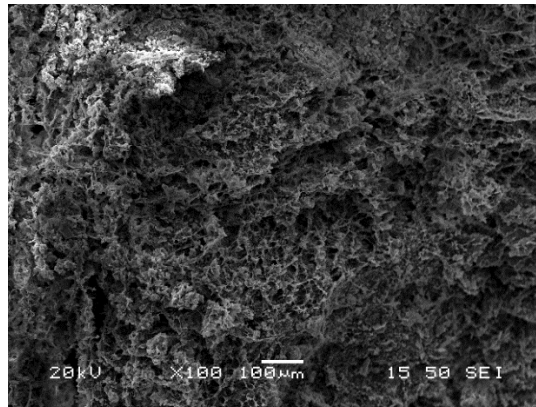
NP63D



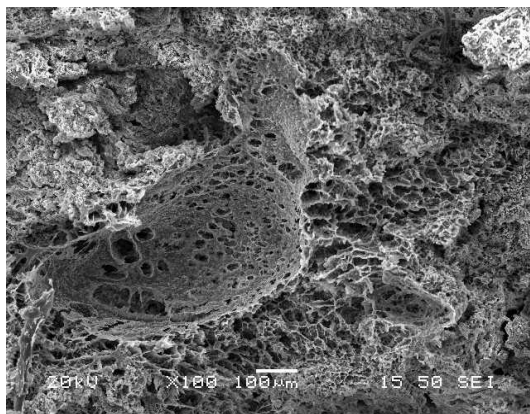
NP91D



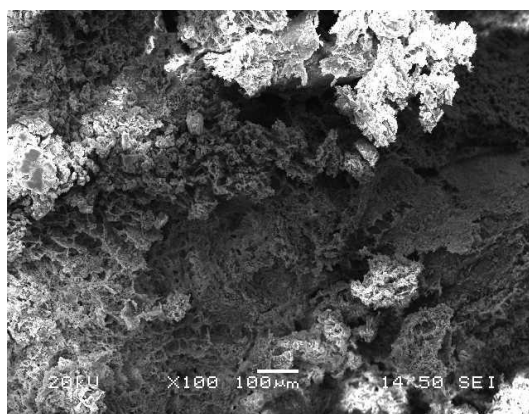
NP92D



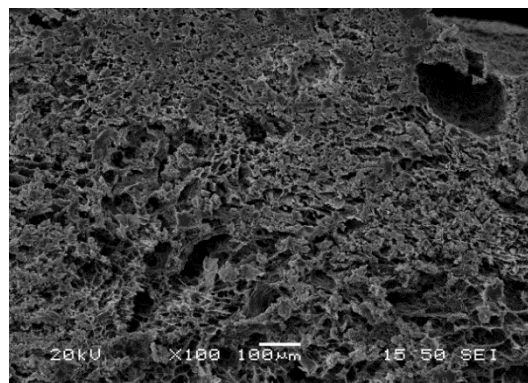
NP93D



NP2M1D



NP2M2D



NP2M3D

Εικ.4.5. Σχηματικές απεικονίσεις μικροδομής ικριωμάτων νανουδροξυαπατίτη-βιοπολυμερών (N), ανάλογα με το πολυμερικό βάρος του συνδέτη και τον χρόνο πολυμερισμού του

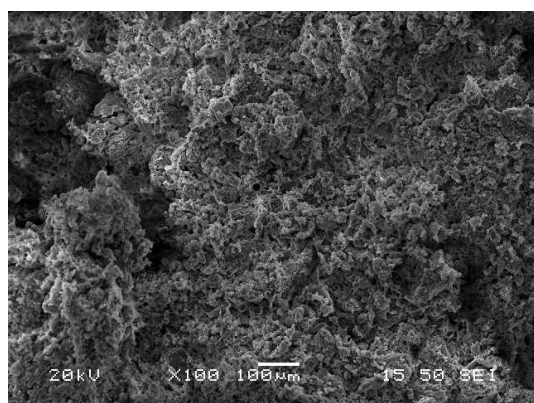
Παρατηρείται από τις παραπάνω απεικονίσεις μικροδομής, ότι τα δοκίμια που έχουν διασυνδεθεί με PEO 600000 (P6) προσδίδουν μορφολογίες μεγαλύτερου πορώδους, συγκριτικά με την επιλογή PEO 900000 (P9) και 2000000 (P2M), με εξαίρεση το δοκίμιο NP2M1D, το οποίο επιδεικνύει πιθανή διασυνδεσιμότητα και επαρκές πορώδες δίκτυο. Διασαφηνίζεται ότι ο χρόνος πολυμερισμού 2 ημερών (2D) οδηγεί σε μεγαλύτερο πορώδες, καθώς το PEO έχει πολυμεριστεί επαρκώς, αποκτώντας κατάλληλο ιξώδες για το σχηματισμό ικριωμάτων, ενώ για μεγαλύτερο χρόνο πολυ-

μερισμού (3D) φαίνεται να λειτουργεί ανασταλτικά στον σχηματισμό ανοιχτού πορώδες δικτύου. Στην περίπτωση PEO μεγάλου μοριακού βάρους (P2M), ο καταλληλότερος χρόνος πολυμερισμού κρίνεται μιας ημέρας (1D) έχοντας ήδη πολυμεριστεί επαρκώς, καθώς σε μεγαλύτερο χρόνο πολυμερισμού το πορώδες κλείνει και εμφανίζεται αυξημένη ανομοιογένεια. Όσον αφορά στην παράμετρο διαφορετικής αναλογίας PEO:Chit (1:5), η οποία εφαρμόστηκε στα δοκίμια επαρκούς πορώδους ~100 μm (NP62D και NP2M1D), συνεπάγεται μεγάλη ανομοιογένεια πορώδους (δοκίμιο NP62D-S), λόγω μεγάλης ρευστότητας του πολυμερικού συνδέτη και έντονη ψαθυρότητα (δοκίμιο NP2M1D-S), λόγω περιορισμένου κλάσματος όγκου συμμετοχής πολυμερούς. Το ιξώδες του πολυμερικού συνδέτη, μέγεθος εξαρτώμενο από το μοριακό βάρος και το χρόνο πολυμερισμού, φάνηκε να αλληλεπιδρά φυσικοχημικά με το μηχανισμό σχηματισμού πορώδους δομής των ικριωμάτων. Τα βέλτιστα δοκίμια χωρίς την παρένθεση νανοσωλήνων άνθρακα είναι το **NP2M1D** με μέγεθος πόρων που κυμαίνεται από 14-80 μm και το NP62D με μέγεθος πόρων 18-90 μm .

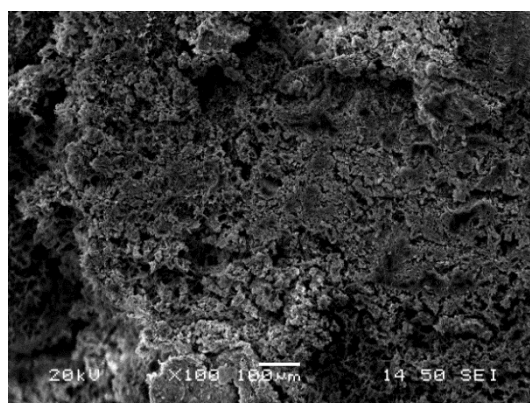
Ικριώματα υδροξυαπατίτη ενισχυμένα με νανοσωλήνες άνθρακα:

Πρέπει να τονιστεί, ότι η εισαγωγή ενισχυτικού μέσου (νανοσωλήνων άνθρακα) στα ικριώματα υδροξυαπατίτη έλαβε χώρα κατά την διαδικασία σύνθεσης του αιωρήματος υδροξυαπατίτη και πραγματοποιήθηκε με δύο τρόπους. Στην σύνθεση αποκαλούμενη ως NC, οι νανοσωλήνες άνθρακα προστίθενται στο τελικό αιώρημα υδροξυαπατίτη, ενώ στις συνθέσεις CC, οι CNTs ενσωματώθηκαν στο αιώρημα χιτοζάνης (Chit).

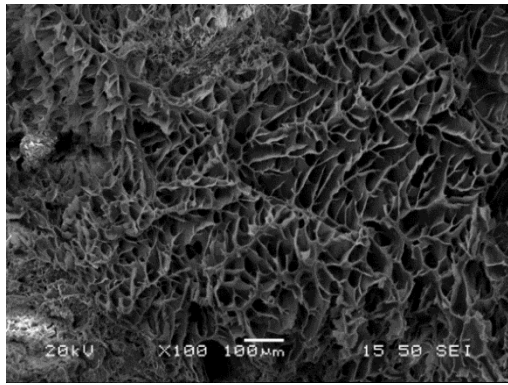
Δοκίμια NC:



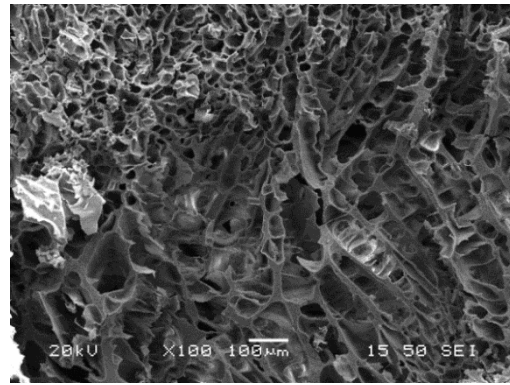
NCP61D



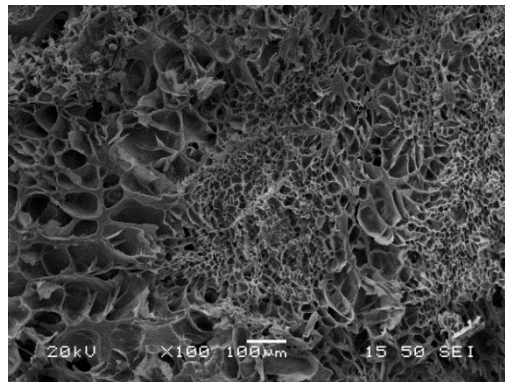
NCP61D-S (PEO:Chit -1:5)



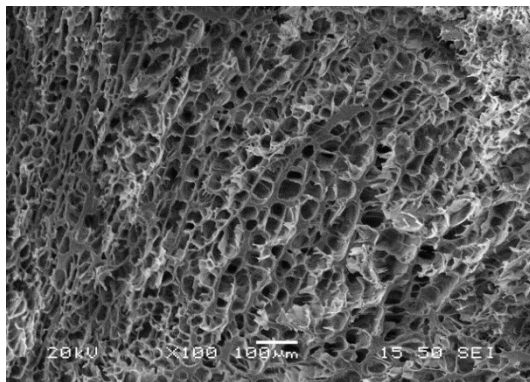
NCP62D



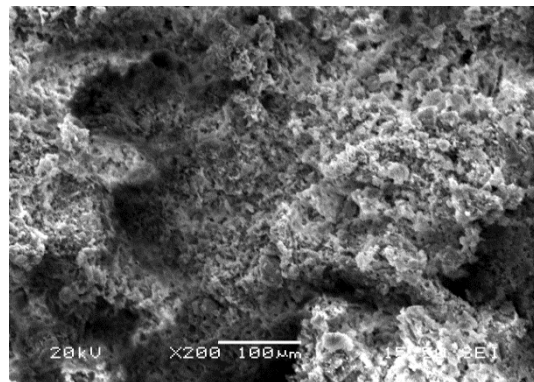
NCP62D- πυριαντηρίου



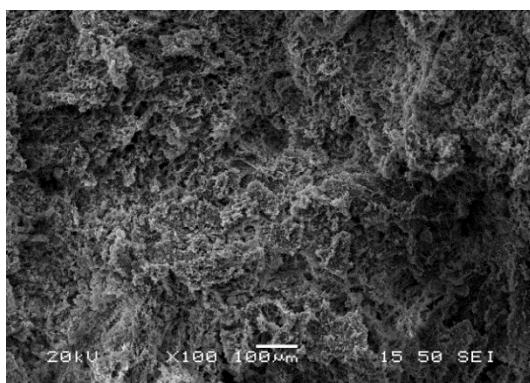
NCP63D



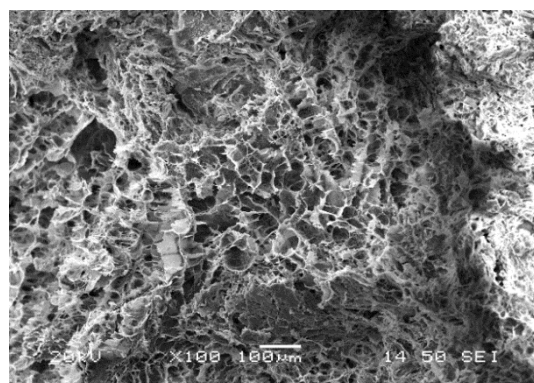
NCP91D



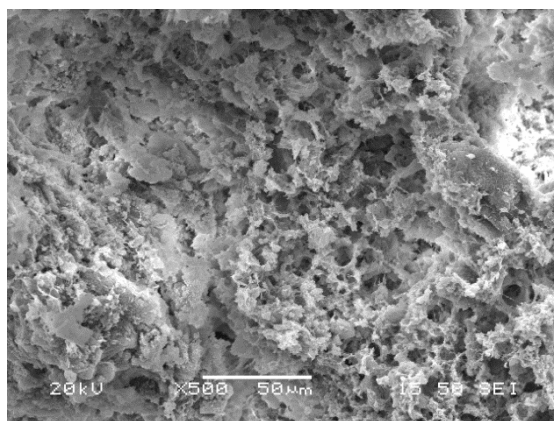
NCP92D



NCP2M1D



NCP2M2D



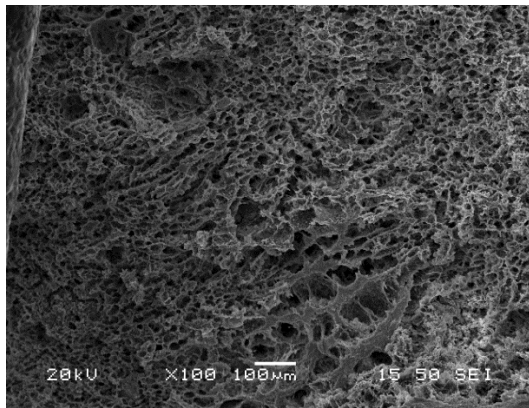
NCP2M3D

Εικ 4.6. Σχηματικές απεικονίσεις μικροδομής ικριωμάτων νανουδροξυαπατίτη-βιοπολυμερών-νανοσωλήνων άνθρακα (NC), ανάλογα με το πολυμερικό βάρος του συνδέτη και τον χρόνο πολυμερισμού του

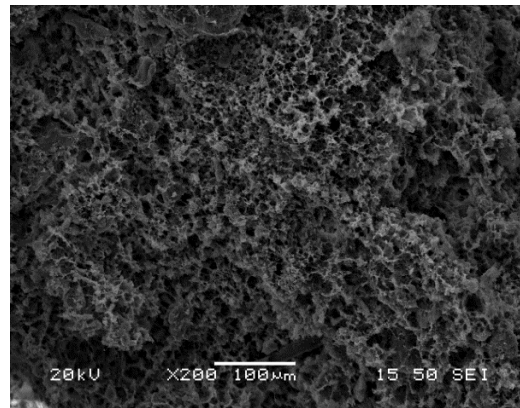
Από τις παραπάνω απεικονίσεις πορώδους, παρατηρείται ότι ο χρόνος πολυμερισμού μιας ημέρας (1D) προσέδωσε συμπαγείς μικροδομές, με εξαίρεση το δοκίμιο επαρκούς πορώδους NCP91D. Επίσης, ο χρόνος πολυμερισμού τριών ημερών έδωσε ανομοιογενή δείγματα (NCP63D) ή δοκίμια κλειστού πορώδους (NCP2M3D), φαινόμενο το οποίο επαληθεύεται στη σειρά πειραμάτων χωρίς ενισχυτικό μέσο CNTs. Για χρόνο πολυμερισμού δύο ημερών, ο οποίος δίνει συχνά ανοιχτό πορώδες δίκτυο μεγάλου μεγέθους πόρων, παρατηρείται αυξημένο πορώδες (δοκίμια NCP62D, NCP2M2D) με μέγεθος πόρων που προσεγγίζει τα 100 µm. Το δοκίμιο NCP62D έχει μικροδομή παραπλήσια με αυτήν του οστού και μελετάται περαιτέρω! Σχετικά με την αλλαγή επιπλέον παραμέτρων του βέλτιστου δοκιμίου NCP62D, όπως διαφορετική αναλογία PEO:Chit (1:5) και παραμονή της σκόνης NC σε πυριαντήριο πριν το στάδιο λυοφιλίωσης, παρατηρείται αυξημένη ανομοιογένεια πορώδους, οπότε και προτείνεται αναλογία 1:2,5 και συνθήκες περιβάλλοντος πριν το στάδιο λυοφιλίωσης.

Συγκρίνοντας τα δοκίμια NC με τα δοκίμια απουσίας νανοσωλήνων άνθρακα (N), αποδεικνύεται ότι η προσθήκη νανοσωλήνων άνθρακα στα ικρίωματα οδηγούν εν γένει σε αύξηση πορώδους. Επίσης, τα ενισχυμένα δοκίμια εμφανίζουν μικροδομή διαφορετικής γεωμετρίας πόρων (όπως το NCP62D συγκρίσει με το NP62D). Τα βέλτιστα δοκίμια της σειράς είναι το **NCP62D**, **NCP91D** και **NCP2M2D** με μέγεθος πόρων 14-70 µm, 15-60 µm και 12- 60 µm αντιστοίχως.

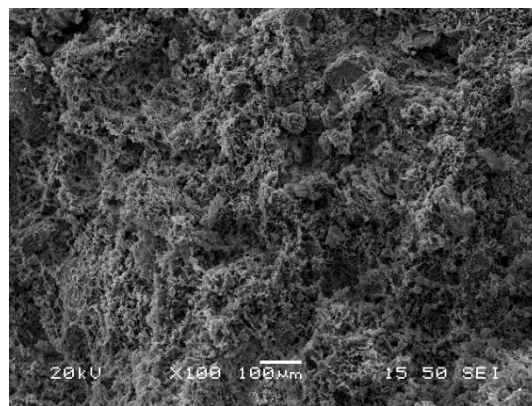
Δοκίμα CC:



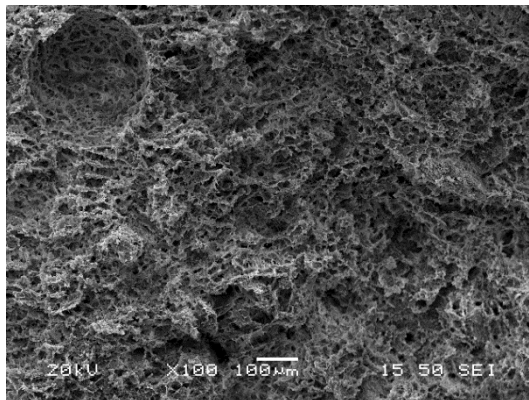
CCP61D



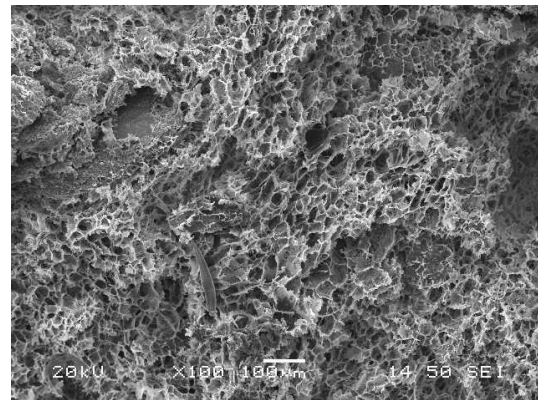
CCP62D



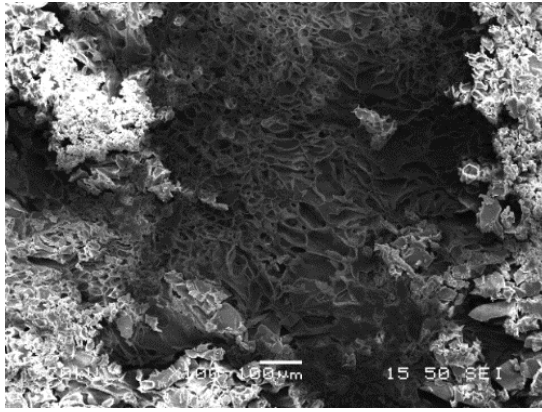
CCP63D



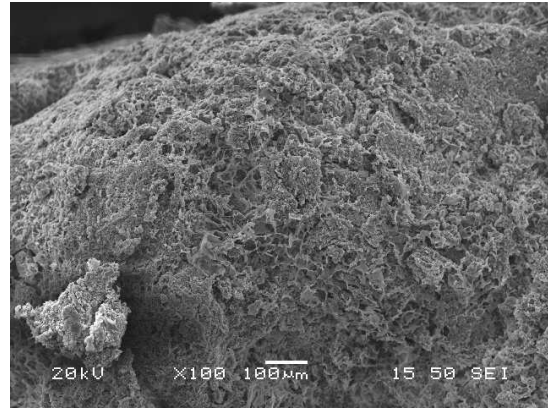
CCP91D



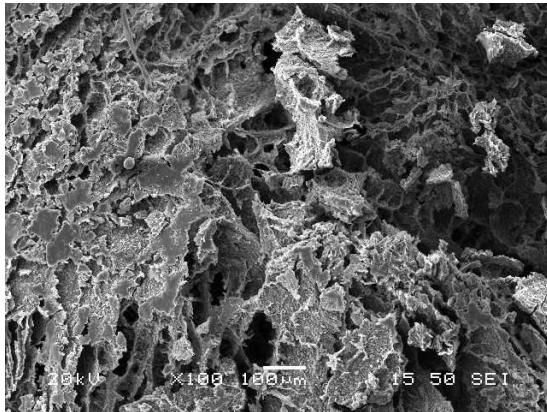
CCP92D



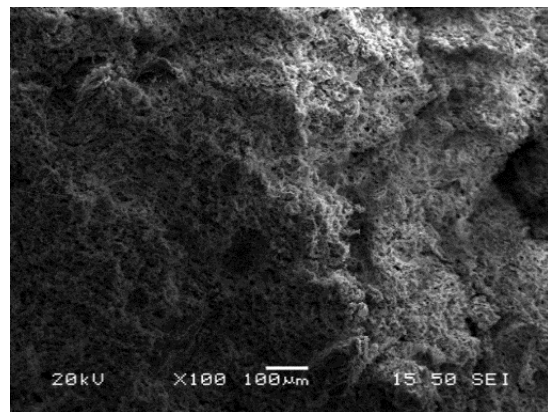
CCP92D- πυριαντηρίου



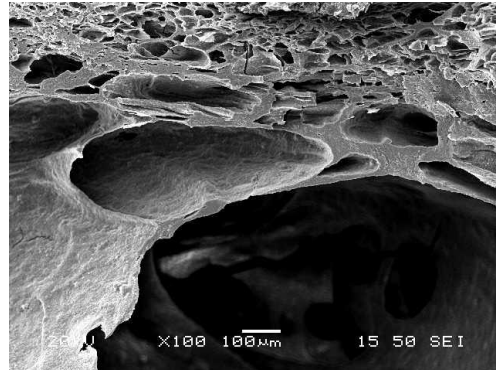
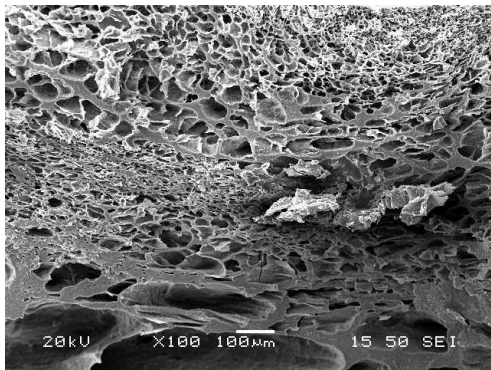
CCP93D



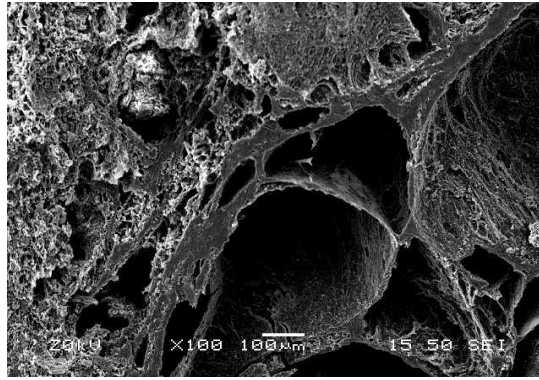
CCP2M1D



CCP2M2D



CCP2M2D

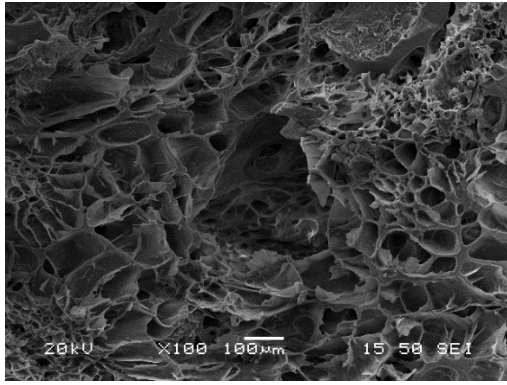


CCP2M3D

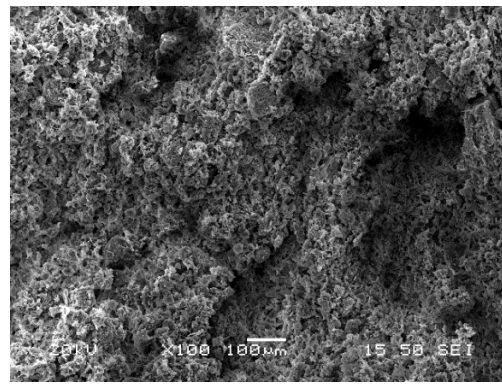
Εικ.4.7. Σχηματικές απεικονίσεις μικροδομής ικριωμάτων νανουδροξυαπατίτη-βιοπολυμερών-νανοσωλήνων άνθρακα (CC), ανάλογα με το πολυμερικό βάρος του συνδέτη και τον χρόνο πολυμερισμού του

Όπως φαίνεται από τις παραπάνω απεικονίσεις μικροδομής, τα περισσότερα δοκίμια εμφανίζουν μικρό πορώδες με αυξημένη ανομοιογένεια, με εξαίρεση το δοκίμιο CCP92D που εμφανίζει δομή παραπλήσια του (βέλτιστου) δοκιμίου NCP62D. Η παράμετρος παραμονής σε πυριαντήριο εμφάνισε για άλλη μια φορά ανομοιογένεια και απορρίπτεται. Το πολυμερικό βάρος φαίνεται να επιδρά αρκετά στη μορφολογία των ικριωμάτων. Συγκεκριμένα το PEO 900000 και λιγότερο το 600000 κρίνονται καταλληλότερα (NCP6, NP6 καλύτερου πορώδους), ενώ το 20000000 δημιούργησε τα πιο ανομοιογενή δοκίμια, ειδικά στις περιπτώσεις μεγάλου χρόνου πολυμερισμού. Το φαινόμενο αυτό πιθανόν οφείλεται στο πολύ μεγάλο ιζώδες του πολυμερικού συνδέτη, ειδικά για χρόνο πολυμερισμού δύο (2D) και τριών ημερών (3D), καθιστώντας το δύσκολο στο χειρισμό και επιτρέποντας σε φυσαλίδες αέρα να εισχωρήσουν στην σύνθετη πάστα κατά τη διάρκεια του καλουπώματος, οδηγώντας σε αστοχία του τελικού ικριώματος (CCP2M2D-3D). Ο χρόνος πολυμερισμού δύο ημερών κρίθηκε για άλλη μια φορά αποδοτικότερος. Το βέλτιστο ικρίωμα αποτελεί το **CCP92D**, όμοιο με NCP62D, με μέγεθος πόρων 17-80 μm.

Σχετικά με το **ρυθμό ψύξης της λυοφιλίωσης**, ο αργός ρυθμός οδηγεί σε πιθανή καταστροφή της μικροδομής του ικριώματος, καθώς εισέρχονται μεγάλου μεγέθους κρύσταλλοι πάγου στα τοιχώματα του πορώδους. Στην παρούσα πειραματική πορεία, προσομοιάστηκε ο διαφορετικός ρυθμός ψύξεως των δοκιμίων μέσω πρώιμης κατάψυξης τους στους -4°C (κατάψυξη) και έπειτα στους -55°C . Ακολουθεί σύγκριση πορώδους μικροδομής ενός ενδεικτικού δοκιμίου (NCP63D), το οποίο έχει καταψυχθεί αρχικά στους -4°C , και του αντίστοιχου δοκιμίου που έχει ακολουθήσει ταχύτερη και σταθερότερη ψύξη στους -55°C . Από τις παρακάτω συγκριτικές απεικονίσεις μικροδομής (SEM), παρατηρείται σημαντική μείωση πορώδους του προκατεργασμένου στους -4°C δοκιμίου. Επομένως, προτείνεται ως καταλληλότερη η αρχική κατάψυξη στους -55°C .



NCP63D λυοφιλίωσης (-55°C)



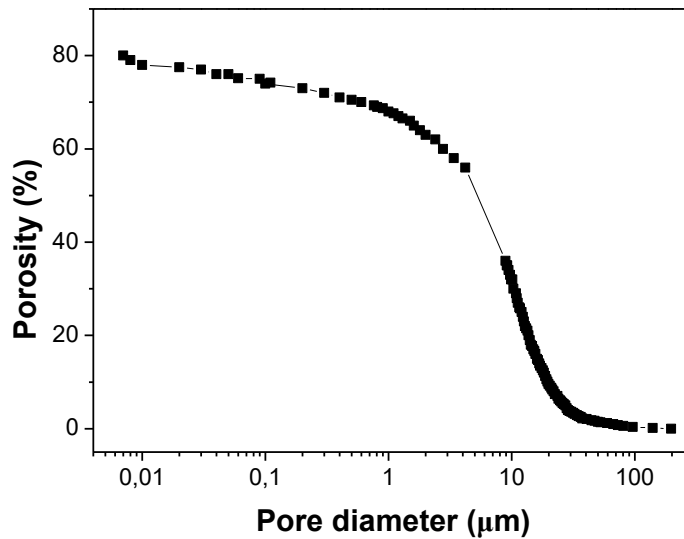
NCP63D αρχικής κατάψυξης (-4°C)

Εικ.4.8. Σχηματικές απεικονίσεις μικροδομής ικριωμάτων νανουδροξυαπατίτη-βιοπολυμερών-νανοσωλήνων άνθρακα (NC), με πολυμερικό βάρος συνδέτη 600000 και χρόνο πολυμερισμού 3 ημερών, για διαφορετικές συνθήκες ψύξης

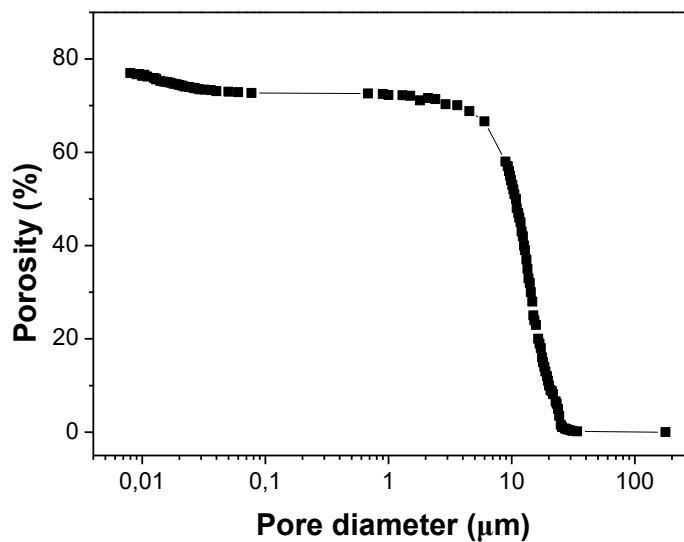
Όσον αφορά στο **ποσοστό πορώδους**, έγινε προσπάθεια ποσοτικοποίησης πορώδους μέσω διαφορετικού χρωματισμού με τη βοήθεια υπολογιστικού προγράμματος Image-Pro. Ωστόσο, η επιφάνεια των δοκιμίων δεν ενδείκνυται για χαρακτηρισμό πορώδους λόγω αυξημένης επιφανειακής τραχύτητας. Δοκιμάστηκε λείανση των δοκιμίων με γυαλόχαρτο 2000grit, ώστε να χαρακτηριστούν ως προς το ποσοστό πορώδους τους μέσω ηλεκτρονικής μικροσκοπίας σάρωσης. Η λείανση του τοπογραφικού αναγλύφου των δοκιμίων οδήγησε σε κλείσιμο του πορώδους, καθιστώντας αδύνατο τον χαρακτηρισμό τους. Καταλληλότερος τρόπος ποσοτικοποίησης πορώδους υπολογίζεται μέσω ποροσιμετρίας υδραργύρου.

Πραγματοποιήθηκε ανάλυση **ποροσιμετρίας υδραργύρου (MIP)** σε δύο κατάλληλα δοκίμια (**NCP62D, NP2M1D**) ώστε να υπολογιστεί η μέση διάμετρος πόρων, το συνολικό πορώδες και η κατανομή πορώδους. Τα δοκίμια που επιλέχτηκαν ήταν με και χωρίς προσθήκη νανοσωλήνων άνθρακα, ώστε να συγκριθούν ως προς το πορώδες τους. Για τους υπολογισμούς της κατανομής μεγέθους πόρων και της ειδικής επιφάνειας θεωρήθηκε ότι η επιφανειακή τάση υδραργύρου είναι $0,48 \text{ N/m}^2$ και η γωνία επαφής 140°C . Με βάση αυτά, η ειδική επιφάνεια του δοκιμίου NP2M1D, υπολογίστηκε στα $27,5 \text{ m}^2/\text{g}$ και το πορώδες 80 %. Παρόμοια δομή παρουσιάζει το δείγμα NCP62D, του οποίου η ειδική επιφάνεια υπολογίστηκε στα $29,7 \text{ m}^2/\text{g}$ και το πορώδες 77%. Η κατανομή μεγέθους πόρων στο δοκίμιο NP2M1D κυμαίνεται ανάμεσα στα 190 μm και περίπου 1 μm , με την παράγωγο να εμφανίζει κορυφή στην περιοχή των 20 και των 3 μm . Ακόμη, παρατηρείται μια δεύτερη κατανομή μεγέθους πόρων γύρω από την περιοχή των 0,05 μm . Ενδεχομένως, το δείγμα παρουσιάζει δύο είδη πόρων, τους μεγάλους που είναι χρήσιμοι για την ανάπτυξη των κυττάρων και τους μικρότερους για την τροφοδοσία των ικριωμάτων με τα θρεπτικά συστατικά. Πρέπει πάντως να επισημανθεί ότι η αξιοπιστία της μέτρησης στην περιοχή της δεύτερης κατανομής είναι μικρή, γιατί η πίεση που εφαρμόζεται από το όργανο ξεπερνάει τις μηχανικές αντοχές του υλικού, όπως θα δούμε στο κεφάλαιο των

μηχανικών αντοχών (4.7.). Παρόμοια συμπεράματα μπορούμε να εξάγουμε και για το δοκίμιο NCP62D. Σε αυτό η πρώτη κατανομή μεγέθους πόρων κυμαίνεται ανάμεσα στα 177 μm και περίπου 3 μm , με την κορυφή στο διάγραμμα παραγώγου να βρίσκεται στην περιοχή των 30 μm και 5 μm . Το δείγμα επίσης εμφανίζει τη δεύτερη κατανομή στην περιοχή των μικρών πόρων της τάξεως του 0,02 μm .



Εικ.4.9. Διαγραμματική απεικόνιση ποσοστού κατανομής μεγέθους του δοκιμίου NP2M1D



Εικ.4.10. Διαγραμματική απεικόνιση ποσοστού κατανομής μεγέθους πόρων του δοκιμίου NCP62D

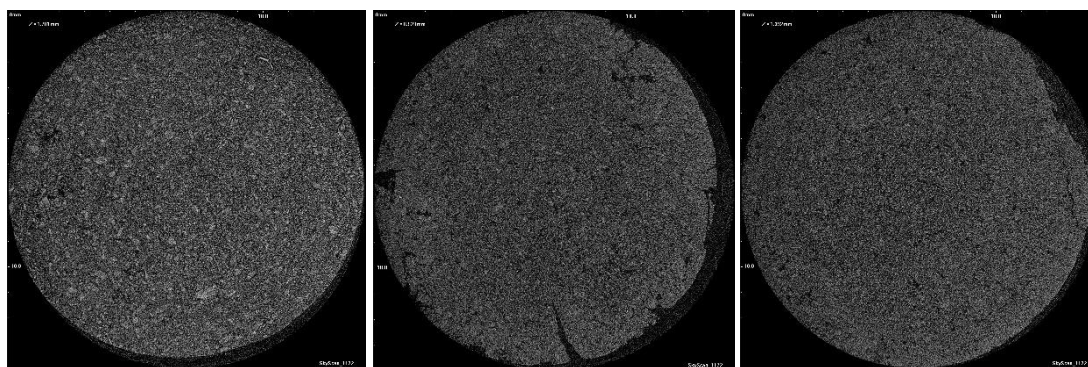
Σύμφωνα με βιβλιογραφική ανασκόπηση, το ποσοστό πορώδους των σύνθετων ικριωμάτων τείνει στο 80% και το μέγεθος πόρων περίπου 100 μm, αποτελέσματα τα οποία συμπίπτουν με αυτά της παρούσας ερευνητικής πορείας. Το πορώδες του σπογγώδους οστού κυμαίνεται από 50-90%, οπότε η τιμή 80% κρίνεται βέλτιστη σύμφωνα με τον Kuboki και συν. (c). Σε έρευνες πορωδών ικριωμάτων CNTs-HAp-alginate με τη μέθοδο freeze drying, κατά τον Rajendiran Rajesh και Dominic Ravichandran, το πορώδες βρέθηκε 93% μέσω μεθόδου υγρής μετατόπισης, με μέγεθος 130-170 μm μέσω SEM analysis (ci), ποσοστά παραπλήσια της παρούσας εργαστηριακής έρευνας. Επιπρόσθετα, ο Zhao F και οι συν.(cii) μελέτησαν ικριώματα HAp-Chitosan-gelatin μέσω freeze-drying και υπολόγισαν ότι το πορώδες ~90% με μέγεθος 300-500 μm μέσω αναλύσεων SEM, στην οποία μέθοδο η σκόνη υδροξυαπατίτη διασπείρεται μέσα στο πολυμερικό δίκτυο δημιουργώντας το σύνθετο ικρίωμα. Οι Kim HW, Knowles JC και Kim HE παρασκεύασαν σύνθετα ικριώματα HAp-poly(ε-caprolactone) μέσω πυροσυσσωμάτωσης και βρήκαν πορώδες 87% μεγέθους πόρων 150-200 μm, μέσω αναλύσεων SEM (ciii). Σε άλλη έρευνα των Lickorish D και συν. (civ), συντέθηκαν ικριώματα HAp-collagen μέσω freeze drying, που προσέδωσαν διασυνδεδεμένο πορώδες δίκτυο 85% μεγέθους πόρων 30-100 μm, μέσω αναλύσεων SEM, αποτελέσματα όμοια με τα ικριώματα HAp-Chitosan-PEO-CNTs. Σχετικά με την προσθήκη CNTs στα ικριώματα και την επίδρασή τους στο πορώδες ο Jayachandran και οι συν. (cv), παρασκευάστηκαν CNTs-grafted-chitosan-Natural HA ικριώματα, τα οποία είχαν διασυνδεδεμένο πορώδες 86% (liquid displacement Method), καθώς αποδείχτηκε πως η προσθήκη CNTs και HAp στο πολυμερικό δίκτυο χιτοζάνης οδήγησαν σε βελτίωση πορώδους. Επομένως, η μέθοδος freeze drying αποδεικνύεται κατάλληλη για το σχηματισμό επαρκούς πορώδους, όπως επίσης και η επιλογή αντιδραστηρίων που χρησιμοποιήθηκαν.

Για την επιβεβαίωση της διασυνδεσιμότητας πορώδους των ικριωμάτων και για εκτιμήσεις υψηλής ανάλυσης πυκνότητας, γεωμετρίας και τρισδιάστατης μικρομορφολογίας τους, πραγματοποιήθηκαν **σαρώσεις υπολογιστικής μικροτομογραφίας (μCT)**. Οι συνθήκες μέτρησης που πραγματοποιήθηκαν στα κυλινδρικά δοκίμια **NCP62D, CCP92D, NP2M1D** διαμέτρου 15mm καθορίστηκαν ως εξής: ανίχνευση λεπτομέρειας των 7μm, πηγή ακτινών X 80kV/10mA, παράθυρο Al, βήματα συχνότητας 0,5 mm, σε περιβάλλον σταθερής θερμοκρασίας 23°C. Τα δοκίμια τυλίγονται με ένα νωπό χαρτί και εφαρμόζονται σε ειδικό πλαστικό (ημι)σωλήνα διαμέτρου των 20mm, το οποίο και τοποθετείται στο σαρωτή.



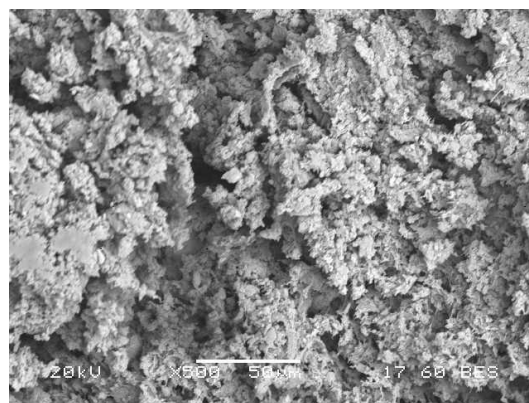
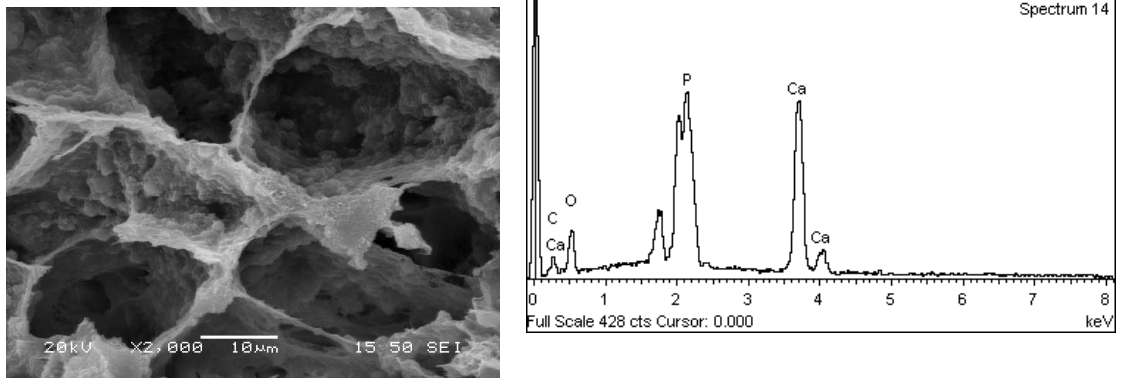
Εικ.4.11. Σχηματική απεικόνιση κυλινδρικών δοκιμίων NP2M1D, CCP92D, NCP62D

Οι τομές και η τρισδιάστατη απεικόνιση της μικροδομής των δοκιμίων πραγματοποιήθηκαν στο Εργαστήριο Βιοϋλικών της οδοντιατρικής σχολής ΕΚΠΑ. Ακολουθούν οι απεικονίσεις των τομών και της τρισδιάστατης μορφολογίας των δοκιμίων NCP62D, CCP92D, NP2M1D, όπου προσδιορίζεται το συνολικό πορώδες και η διασυνδεσιμότητα πόρων.



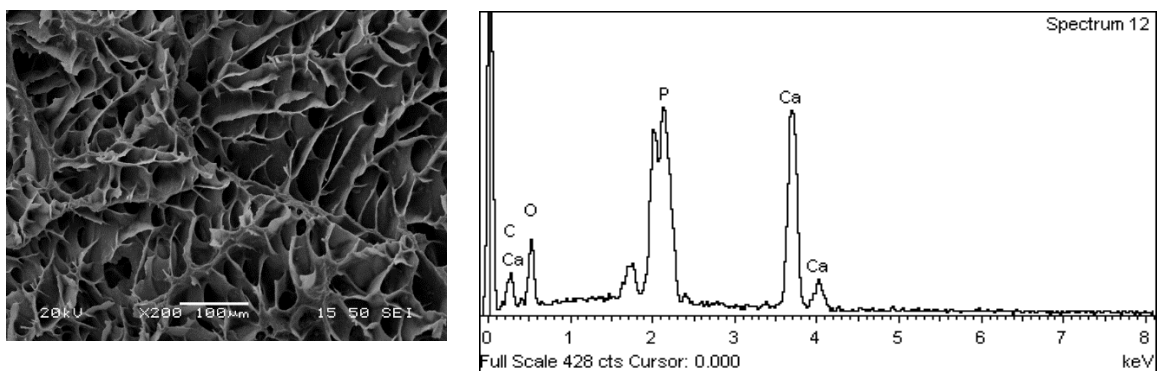
Εικ. 4.12. Σχηματική απεικόνιση 2D τομών των δοκιμίων NP2M1D, NCP62D και CCP92D, αντίστοιχα.

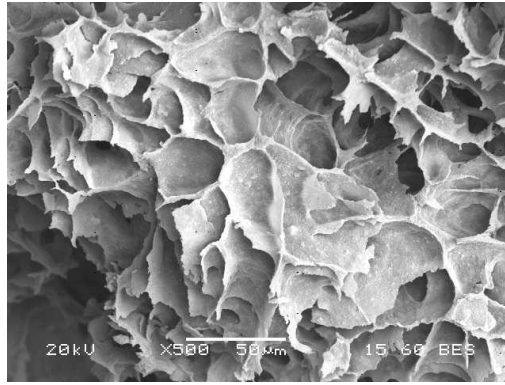
EDS δοκιμίου NP2M1D:



Εικ.4.13. Σχηματική απεικόνιση ηλεκτρονικής μικροσκοπίας σάρωσης οπισθοσκεδαζόμενων ηλεκτρονίων (BES) του δοκιμίου NP2M1D

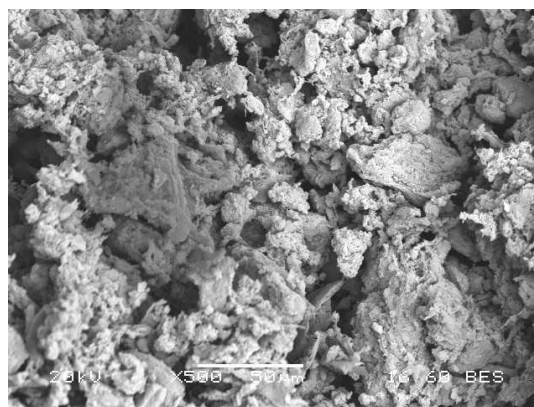
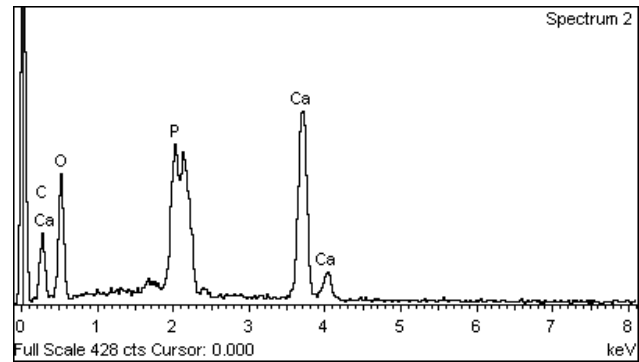
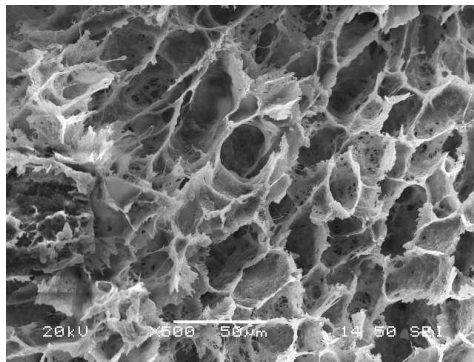
EDS δοκιμίου NCP62D:





Εικ.4.14. Σχηματική απεικόνιση ηλεκτρονικής μικροσκοπίας σάρωσης οπισθοσκεδαζόμενων ηλεκτρονίων (BES) του δοκιμίου NCP62D

EDS δοκιμίου CCP92D:



Εικ.4.15. Σχηματική απεικόνιση ηλεκτρονικής μικροσκοπίας σάρωσης οπισθοσκεδαζόμενων ηλεκτρονίων (BES) του δοκιμίου CCP92D

Μέσω αναλύσεων EDS και απεικονίσεων SEM οπισθοσκεδαζόμενων ηλεκτρονίων (BES), αποδεικνύεται η ύπαρξη υδροξυαπατίτη και άνθρακα. Ακολουθούν οι 3D απεικονίσεις των κυλινδρικών κριωμάτων:

Δοκίμιο NP2M1D



Δοκίμιο NCP62D



Δοκίμιο CCP92D



Εικ. 4.16. Σχηματικές 3D απεικονίσεις των κυλινδρικών κριωμάτων NP2M1D, NCP62D, CCP92D, αντίστοιχα

Συγκρίνοντας τα παραπάνω δοκίμια, παρατηρείται μεγαλύτερο πορώδες στο ικρίωμα NCP62D, όπως και αναμένεται από τις αναλύσεις ηλεκτρονικής μικροσκοπίας σάρωσης, το οποίο έδειξε μεγάλο πορώδες δίκτυο και ποροσιμετρίας υδραργύρου (συνολικό πορώδες 80%). Το δοκίμιο CCP92D εμφάνισε πολύ ομοιόμορφα κατανεμημένο πορώδες, με ποσοστό πορώδους μικρότερο του δοκιμίου NCP62D. Σχετικά με το δοκίμιο NP2M1D, εμφανίζεται σημαντικά μικρότερο πορώδες, καθώς και ανομοιογενώς κατανεμημένο. Η κατανομή των πόρων φαίνεται να παρουσιάζει αυξημένη συγκέντρωση σε συγκεκριμένη περιοχή. Πιθανώς, το μεγάλο μοριακό βάρος του δοκιμίου NP2M1D δυσχεραίνει το καλούπωμα και την σταυροσύνδεση, οδηγώντας σε ανομοιογενή λυοφιλίωση.

Συμπεραίνεται από τις αναλύσεις μικροτομογραφίας, ότι η προσθήκη νανοσωλήνων άνθρακα επιδρά ενισχυτικά ως προς το σχηματισμό πορώδους των ικριωμάτων. Το PEO μοριακού βάρους 600000 κρίνεται καταλληλότερο από το PEO 900000. Σύμφωνα με έρευνες, μCT πάνω σε τρισδιάστατα ικρίωματα, ο Itoh M. και συν.(cvi), παρασκεύασαν μέσω freeze drying ικρίωματα ανθρακικού HAp/κολλαγόνου και υπολόγισαν πορώδες 49%, 73% και 79%, ποσοστό ανάλογο του λόγου HAp/κολλαγόνου, αποδεικνύοντας πως η παραμετροποίηση είναι καθοριστικής σημασίας για το τελικό προϊόν.

4.3. Σύγκριση μεθόδων ενσωμάτωσης των CNTs

Συγκριτικά με την μέθοδο προσθήκης νανοσωλήνων άνθρακα, παρατηρώντας τη μικροδομή μέσω ηλεκτρονικής μικροσκοπίας σάρωσης, ποροσιμετρίας υδραργύρου και μCT-SCAN, τα δοκίμια NC εμφανίζουν καλύτερο πορώδες, με εξαίρεση ένα και μόνον δοκίμιο (CCP92D), επομένως η μέθοδος αυτή προτιμάται. Στην περίπτωση προσθήκης νανοσωλήνων άνθρακα (CNTs) στο τελικό αιώρημα του υδροξυαπατίτη (NC), οι CNTs δεν αντιδρούν χημικά με καμία από τις φάσεις του αιωρήματος, αλλά παγιδεύονται εντός των πολυμερικών αλυσίδων της χιτοζάνης. Η ενσωμάτωσή τους μετά τη διαδικασία διασποράς τους είναι πλήρης, καθώς με μετέπειτα φυγοκεντρήσεις του αιωρήματος δεν παρατηρείται απώλεια νανοσωλήνων στο υπερκείμενο νερό που αφαιρείται.

Στην περίπτωση ενσωμάτωσης CNTs σε χιτοζάνη (CC), η σύζευξή τους με αυτήν είναι θερμοδυναμικά ευνοημένη, μέσω ασθενών ηλεκτροστατικών αλληλεπιδράσεων και επιπλέον δεν εμφανίζονται διαφορετικές φάσεις HAp, σύμφωνα με ανάλυση περιθλασιμετρίας ακτίνων X (XRD). Ωστόσο, σε περίπτωση μη χημικής τροποποίησης των CNTs, ένα μέρος τους μένει χημικά αδρανές κατά την προσθήκη και δεν αντιδρά με το αιώρημα. Προϋπόθεση άρτιας σύνθεσης υβριδικού αιωρήματος αποτελεί η καλή διασπορά των νανοσωλήνων άνθρακα μέσα σε αιώρημα χιτοζάνης, ώστε να εξασφαλιστεί η σταθερότητα αυτού. Προτάσεις βελτίωσης της διασποράς νανοσωλήνων άνθρακα στο πολυμερικό αιώρημα περιλαμβάνουν τη μείωση προστιθέμενων νανοσωλήνων άνθρακα στη χιτοζάνη και τη χημική τροποποίησή τους, ώστε να αποκτήσουν καρβοξυλομάδες είτε υδροξυλομάδες, οι οποίες και θα συνδεθούν ισχυρότερα με το μόριο της χιτοζάνης.

Η προσπάθεια ανάμειξης νανοσωλήνων άνθρακα σε πολυμερικό διάλυμα PEO-οξικού οξέος απορρίπτεται, καθώς δεν επιτυγχάνεται διασπορά των CNTs, αλλά συσσωμάτωση αυτών με επακόλουθο τον σχηματισμό ιζήματος CNTs, όπως αποδεικνύεται στην παρακάτω απεικόνιση (Εικ. 4.17.).



Εικ. 4.17. Σχηματική απεικόνιση μη επιτυχούς διασποράς CNTs σε πολυμερικό διάλυμα PEO

Σύμφωνα με ένα αριθμό αναφορών, οι νανοσωλήνες άνθρακα κρίνονται τοξικοί σε πολλές κυτταρικές σειρές, φαινόμενο που μπορεί να περιοριστεί με κατάλληλη χημική τροποποίησή τους. Ο Bin Zhao και συν. (cvii) υποστηρίζουν ότι χημικά ενεργοποιημένοι με φωσφονικά-πολυ(αμινοβενζολοσουλφονικό οξύ) (PABS) νανοσωλήνες άνθρακα (SWCNTs) επάγουν την κρυστάλλωση υδροξυαπατίτη στην επιφάνεια των SWNTs, καθώς οι αρνητικά φορτισμένες λειτουργικές ομάδες σε SWNTs συνδέονται με τα κατιόντα ασβεστίου. Σε άλλη έρευνα (cviii), παρασκευάστηκαν σύνθετα ικρίσματα υδροξυαπατίτη με 85%wt τροποποιημένους με νιτρικό οξύ MWCNTs και 15 %wt χιτοζάνη μέσω κρυογενικής μεθόδου, όπου οι κρύσταλλοι υδροξυαπατίτη διασπείρονται ομοιογενώς στη δομή και το ικρίωμα καθίσταται βιοσυμβατό.

Η προσθήκη CNTs σε βιοσυμβατά ικρίσματα νανοϋδροξυαπατίτη επιτυγχάνεται με ποικίλους τρόπους κατά την βιβλιογραφική ανασκόπηση. Για παράδειγμα, αναμειγνύονται στο πολυμερικό τμήμα του νανοςύνθετου με ανάμειξη διαλυμάτων, με πολυμερισμό *in situ*, με μέθοδο latex, ώστε να διασπαρθούν ομοιογενώς στη μήτρα και να σχηματίσουν δεσμούς, αποτελώντας σταθερά κολλοειδή υβριδικά συστήματα κατά τον Wei Wang και συν.(cix). Μια ελπιδοφόρα μέθοδος επίτευξης σταθερού κολλοειδούς, αποτελεί η χημική τροποποίηση των CNTs, ώστε να σχηματιστεί σύνθετο ικρίωμα βέλτιστων ιδιοτήτων. Στην περίπτωση χρήσης χιτοζάνης, μέσω τροποποίησης των νανοσωλήνων άνθρακα με ομάδες καρβοξυλίου και υδροξυλίου, επιτυγχάνεται ισχυρή χημική διασύνδεση αυτών με το αμφίφιλο πολυμερές λόγω των λειτουργικών ομάδων του, οδηγώντας σε σταθερό αιώρημα κατά τον J. Venkatesan και τον Se-Kwon Kim (cx). Σε άλλες πειραματικές έρευνες, οι CNTs

διασκορπίστηκαν στην πολυμερική μήτρα χιτοζάνης, μέσω ελεγχόμενης επιφανειακής εναπόθεσης και διασταυρούμενης σύνδεσης-cross-linking (cx*i*), μέσω απλής μεθόδου εξατμίσεως διαλύματος (cx*ii*), μέσω θερμικά επαγόμενου διαχωρισμού φάσης με ακόλουθο freeze drying (cx*iii*), μέσω ηλεκτροδιάθεσης (cx*iv*), με τεχνική επίστρωσης (cx*v*), με pH-μετρική και ηλεκτρική ενεργοποίηση (cx*vi*), καθώς και μέσω wet spinning (cx*vii*).

4.4.Υδατική προσρόφηση ικριωμάτων

Τα βέλτιστα δοκίμια, τα οποία επέδειξαν καλό πορώδες δίκτυο μέσω αναλύσεων μικροσκοπίας ηλεκτρονικής σάρωσης, μελετήθηκαν ως προς την υδατική τους προσρόφηση. Τα δοκίμια που εξετάστηκαν είναι τα **NCP62D**, **NCP91D**, **CCP92D**, **NP2M1D**, **NCP63D**, **NCP2M2D**, **CCP2M1D**, **NP62D**.

Κατά την διαδικασία υπολογισμού υδατικής προσρόφησης, κόπηκαν εξάδες ή τετράδες από κάθε δοκίμιο σε πάχος ~2mm, ώστε να υπάρχει επαναληψιμότητα. Έπειτα ζυγίστηκε το αρχικό και το τελικό βάρος τους, το οποίο λήφθηκε μετά την βύθισή τους σε νερό.

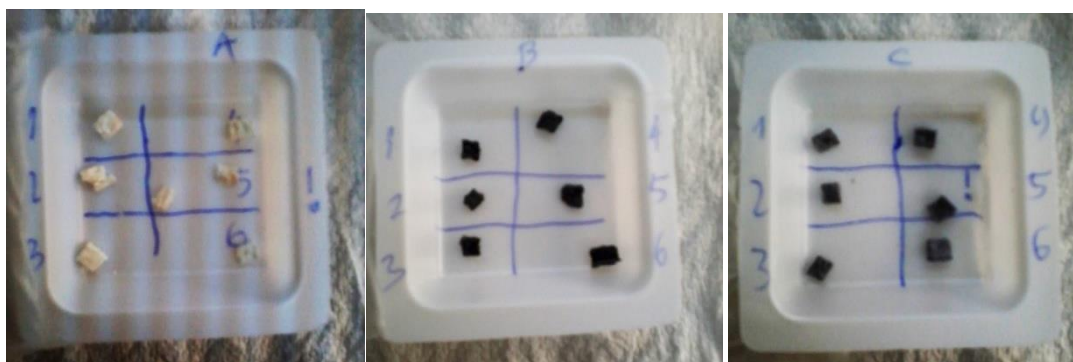
Πίνακας 4.1. Απόκριση δοκιμίων σε υδατικό μέσο:

<i>Δοκίμιο</i>	<i>Μέσο αρχικό βάρος (g)</i>	<i>Μέσο τελικό βάρος (g)</i>	<i>Μέση κατακράτηση νερού (g)</i>
NCP62D	0,021	0,143	0,121
NP62D	0,027	0,332	0,3044
NCP63D	0,023	0,142	0,1184
NP2M1D	0,019	0,05	0,03
NCP2M2D	0,0206	0,0606	0,04
CCP2M1D	-	-	-
CCP92D	0,022	0,076	0,055

Από τα ανωτέρω δεδομένα, τα ικρίωματα NP91D και CCP2M1D διαλύθηκαν κατά τη διαδικασία προσρόφησης, οπότε απορρίπτονται. Η μεγαλύτερη υδατική προσρόφηση κατά αύξουσα σειρά εμφανίστηκε στα δοκίμια NP62D, NCP62D, NCP63D, CCP92D, NCP2M2D και τέλος στο δοκίμιο NP2M1D. Σύμφωνα με τα αποτελέσματα, το μοριακό βάρος και ο χρόνος πολυμερισμού αποτέλεσε βασική παράμετρο. Παρατηρείται πώς τα ικρίωματα με πολυμερικό συνδέτη PEO 2000000 εμποδίζουν την κατακράτηση νερού σε σύγκριση με τα ικρίωματα Har-CNTs-PEO 600000 και

900000. Το φαινόμενο αυτό οφείλεται κυρίως στην αμφίφιλη δομή του PEO, εξαρτώμενη από το μήκος μακροαλυσίδων του. Όπως αναμένεται, το PEO μικρότερου μοριακού βάρους (600000, 900000) διαθέτει ασθενέστερη μακροαλυσίδα, η οποία διευκολύνει την διάχυση των μορίων του νερού, σε αντίθεση με το PEO 2000000 μεγάλου μοριακού βάρους. Τα δοκίμια με PEO 600000 εμφάνισαν την μεγαλύτερη υδατική προσρόφηση με βέλτιστη των δύο ημερών πολυμερισμού. Συγκριτικά με τα δοκίμια μεγαλύτερης προσρόφησης NCP62D και NP62D, όπου και τα δυο έχουν μεγάλο πορώδες δίκτυο, το δοκίμιο χωρίς CNTs προσροφά την μεγαλύτερη ποσότητα νερού, καθώς το NCP62D περιέχει υδρόφοβους νανοσωλήνες, οι οποίοι δημιουργούν εμπόδιο στην εισχώρηση υδατικού μέσου.

Σε επιπρόσθετο υπολογισμό υδατικής προσρόφησης των ικριωμάτων, τα δείγματα βυθίστηκαν κατευθείαν σε απιονισμένο νερό για 3 ημέρες και έπειτα υπολογίστηκε το βάρος τους με προσθήκη νερού. Για τον υπολογισμό υδατικής προσρόφησης, τα ικριώματα τοποθετήθηκαν σε πυριαντήριο στους 40°C, ώστε να απομακρυνθεί η υγρασία τους και να μετρηθεί το στεγνό βάρος τους. Ωστόσο, παρουσιάστηκε έντονη συρρίκνωση των δοκιμίων με πιθανή υποβάθμιση του πολυμερικού συνδέτη PEO, λόγω έντονων συνθηκών πυριαντηρίου (40°C για 3ημέρες παραμονής). Σαν επακόλουθο η μέθοδος προσδιορισμού προσρόφησης μέσω πυριαντηρίου κρίθηκε ακατάλληλη, καθώς οδήγησε σε αστοχία των ικριωμάτων.



Εικ.4.18. Σχηματική απεικόνιση δοκιμίων NP2M1D, NCP62D, CCP92D που παρουσίασαν συρρίκνωση δομής

4.5.Δομική ακεραιότητα ικριωμάτων σε νερό και αιθανόλη

Τα βέλτιστα δοκίμια, τα οποία επέδειξαν καλό πορώδες δίκτυο μέσω αναλύσεων μικροσκοπίας ηλεκτρονικής σάρωσης, μελετήθηκαν ως προς την ακεραιότητα δομής τους σε νερό και αιθανόλη 70%. Σχετικά με την αντοχή τους σε υδατικά μέσα, τα δοκίμια κόπηκαν σε 4δες ή 6δες σε πάχος περίπου 2mm και βυθίστηκαν σε απιονισμένο νερό για 10 ημέρες, στους 35°C, θερμοκρασία παραπλήσια με τη βιομημητική θερμοκρασία. Τα δοκίμια που εξετάστηκαν είναι τα NCP62D, NCP91D, CCP92D, NP2M1D, NCP63D, NCP2M2D, CCP2M1D, NP62D.

Σύμφωνα με τα αποτελέσματα αντοχής σε υδατικό περιβάλλον, όλα τα δείγματα των δοκιμίων NCP62D, CCP92D, NCP2M2D, NP62D, NCP63D και 5/6 δείγματα του NP2M1D άντεξαν. Να σημειωθεί ότι τα δοκίμια NCP63D παρουσίασαν μικρή διόγκωση, ενώ τα δοκίμια CCP2M1D και NCP91D διαλύθηκαν στις 3 ημέρες, οπότε απορρίπτονται για περαιτέρω αναλύσεις.

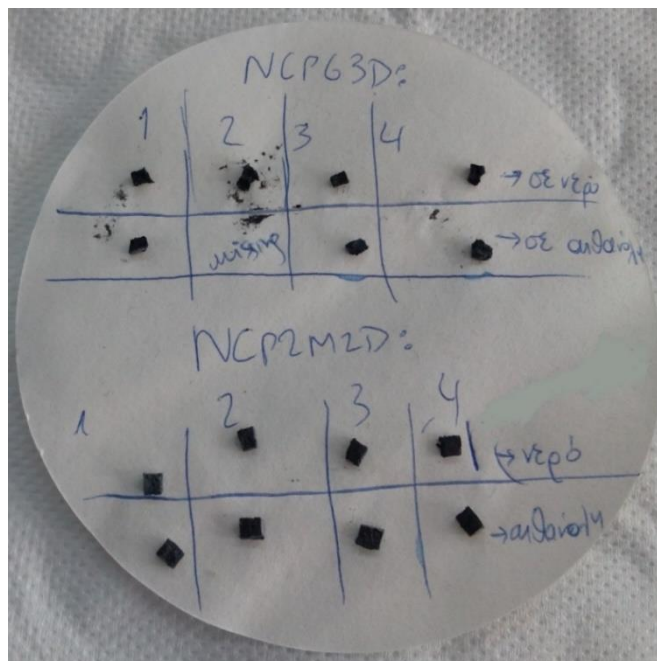


Εικ. 4.19. Σχηματική απεικόνιση διάλυσης των CCP2M1D, NCP91D, συγκριτικά με τα NCP2M2D, NCP63D που έδειξαν αυξημένη αντοχή

Τα δοκίμια που επιβίωσαν, δηλαδή τα NCP62D, CCP92D, NCP2M2D, NCP63D και NP2M1D, NP62D στραγγίστηκαν μέσω διηθητικού χαρτιού και τοποθετήθηκαν σε φιαλίδια με αιθανόλη 70% στους 35°C (3ημέρες). Από τα αποτελέσματα αποδείχτηκε πως τα δοκίμια NCP62D, CCP92D, NCP2M2D, NCP63D, NP2M1D, NP62D παρουσίασαν καλή αντοχή μετά το χρονικό διάστημα 3-4 ημερών, ακόμα και υπό ανάδευση. Στην παρακάτω απεικόνιση, παρατηρείται πως τα δοκίμια NCP2M2D διατηρούν σε μεγάλο βαθμό τη δομή τους έχοντας αυξημένη αντοχή και συνεκτικότητα, ενώ τα NP6D3 παρουσίασαν κάποια μερική μεταβολή της αρχικής δομής τους με επακόλουθο την αλλοίωση αυτής.

Σημειώνεται στο σημείο αυτό, ότι ο χρόνος πολυμερισμού αποτελεί μια σημαντική παράμετρο επίδρασης ως προς την διατήρηση της δομικής ακεραιότητας, καθώς παρατηρείται εν γένει ότι η μικρή διάρκεια πολυμερισμού (1ημέρας) παρεμποδίζει κινητικά την εκπλήρωση του μηχανισμού της κρυστάλλωσης του PEO, ενώ μεγαλύτερες χρονικές διάρκειες πολυμερισμού (3 ημερών) οδηγούν σε σχετική διόγκωση και απόκλιση από τον διαστατικό σχεδιασμό των δειγμάτων. Εξάιρεση, αποτελεί το

δοκίμιο NP2M1D, το οποίο παρόλο που έχει υποστεί μικρότερη διάρκεια πολυμερισμού εμφανίζει επαρκή δομική ακεραιότητα. Το γεγονός αυτό, οδηγεί στο συμπέρασμα ότι η εισαγωγή της ενισχυτικής φάσης νανοσωλήνων άνθρακα συνεπάγεται άμεσα την απαίτηση για μεγαλύτερους χρόνους πολυμερισμού, καθώς παρεμποδίζεται χημικοκινητικά ο μηχανισμός του πολυμερισμού.



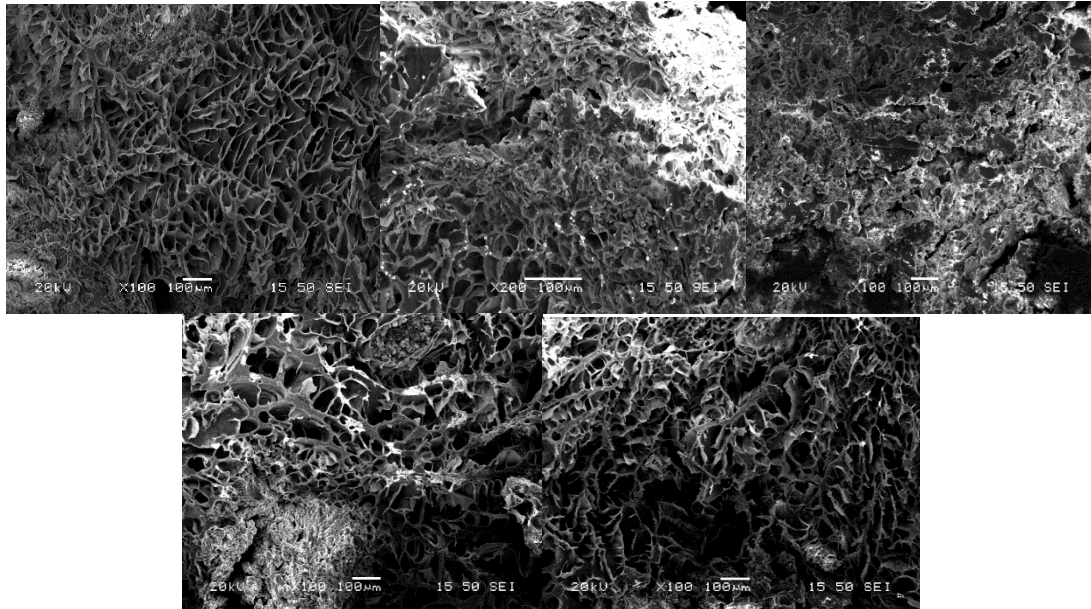
Εικ.4.20. Σχηματική απεικόνιση της απόκρισης δοκιμίων NCP63D, NCP2M2D σε νερό και αιθανόλη.

Προτιμητέα δοκίμια κρίθηκαν τα NCP62D, CCP92D, NP2M1D και μελετήθηκαν περαιτέρω. Το pH των δοκιμίων NCP62D, CCP92D, NP2M1D που βυθίστηκαν σε 70% αιθανόλη είναι 7,25, 7,35 και 7,4, αντίστοιχα. Τα NCP2M2D, NP62D αποτελούν λιγότερο κατάλληλα δοκίμια, τα οποία θα μελετηθούν μελλοντικά, ενώ το NCP63D εμφάνισε καλή αντοχή σχετικά, αλλά λόγω ανομοιογενούς μικροδομής του απορρίπτεται.

4.6. Ανάλυση προσομοιωμένων σωματικών υγρών (SBF)

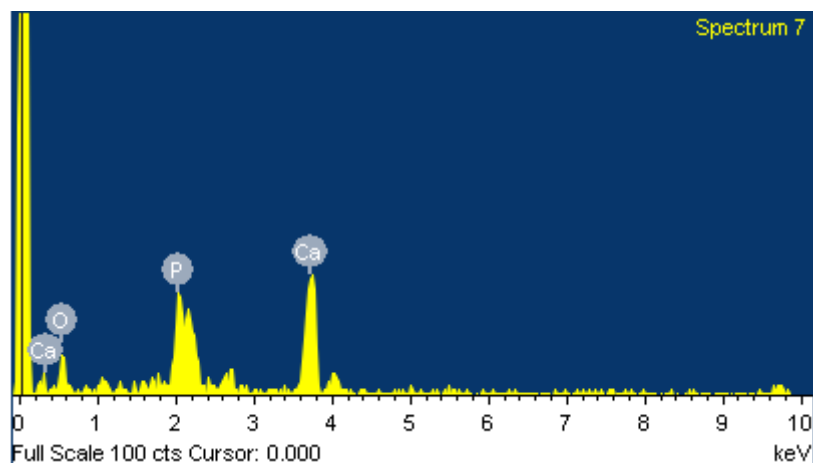
Πραγματοποιήθηκε χρονοεξαρτώμενη ανάλυση SBF χρονικού διαστήματος 1, 3, 5 και 7 ημερών στα δοκίμια NCP62D, CCP92D, NP2M1D. Μέσω ηλεκτρονικού μικροσκοπίου σάρωσης (SEM) παρατηρήθηκε η μικροδομή των παραπάνω σύνθετων δοκιμίων υδροξυαπατίτη σε σύγκριση με την αντίστοιχη χωρίς εμφάνιση σε SBF. Η πληροφορία που λαμβάνεται από τα αποτελέσματα προσδιορίζει τη διατήρηση ή μη της μικροδομής των ικρνωμάτων, ως επακόλουθο της αντοχής τους σε περιβάλλον σώματος. Η πορώδης δομή των ικρνωμάτων σε συνδυασμό με το μικρό χρόνο παραμονής τους στο διάλυμα SBF, δεν ενδείκνυται για την επικάλυψή τους με ανθρακικό υδροξυαπατίτη, γεγονός που δεν λαμβάνεται υπόψη καθώς η σύσταση των δοκιμίων υδροξυαπατίτη είναι ήδη βιοσυμβατή.

NCP62D: Το δοκίμιο παρουσίασε μικρή αλλαγή μικροδομής, συγκεκριμένα στις 5, 7 ημέρες η μικροδομή ήταν παρόμοια με την αρχική του, ενώ σε 1, 3 ημέρες η μικροδομή είχε κλείσει σε αρκετό βαθμό, φαινόμενο που προσδίδεται σε πειραματική απόκλιση. Η αντοχή των δειγμάτων στο διάλυμα κρίθηκε αυξημένη.



Εικ.4.21. Σχηματική απεικόνιση μικροδομής δοκιμίου NCP62D και NCP62D 1ημέρας, 3ημέρας, 5ημέρας και 7ημέρας αντιστοίχως

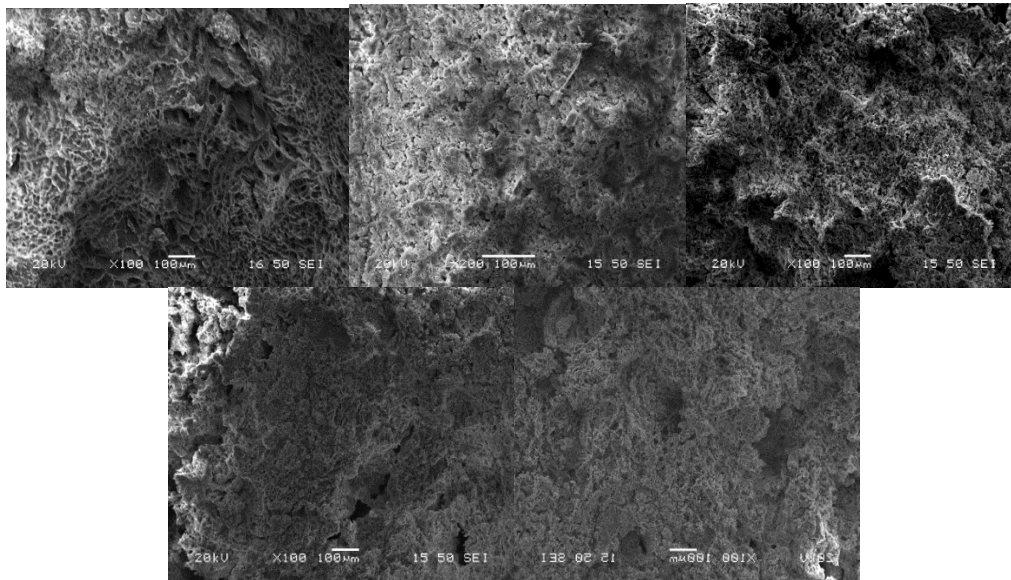
Σε αναλύσεις EDS εμφανίζεται Ca, P, O υποδεικνύοντας την ύπαρξη υδροξυαπατίτη, που είναι βέβαια το κύριο συστατικό του υλικού:



Element	Weight%	Atomic%	Compd%	Formula
P K	0.35	10.48	0.81	P2O5
Ca K	1.38	31.66	1.93	CaO
O	1.00	57.86		
Totals	2.73			

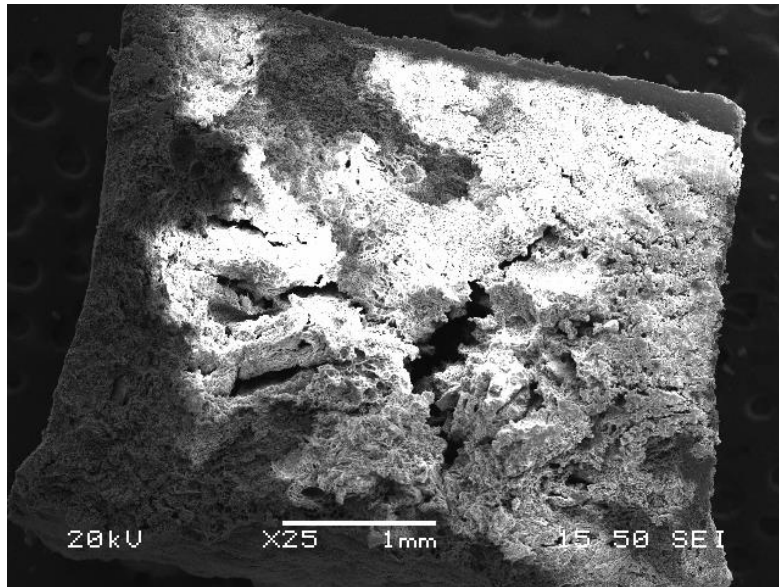
Εικ. 4.22. Σχηματική απεικόνιση ανάλυσης της σύστασης του δοκιμίου NCP62D, μέσω EDS

CCP92D: Τα δείγματα του δοκιμίου επέδειξαν καλή αντοχή στο διάλυμα SBF, ωστόσο εμφάνισαν μικρότερο πορώδες, άρα μερική αλλοίωση της μικροδομής τους.

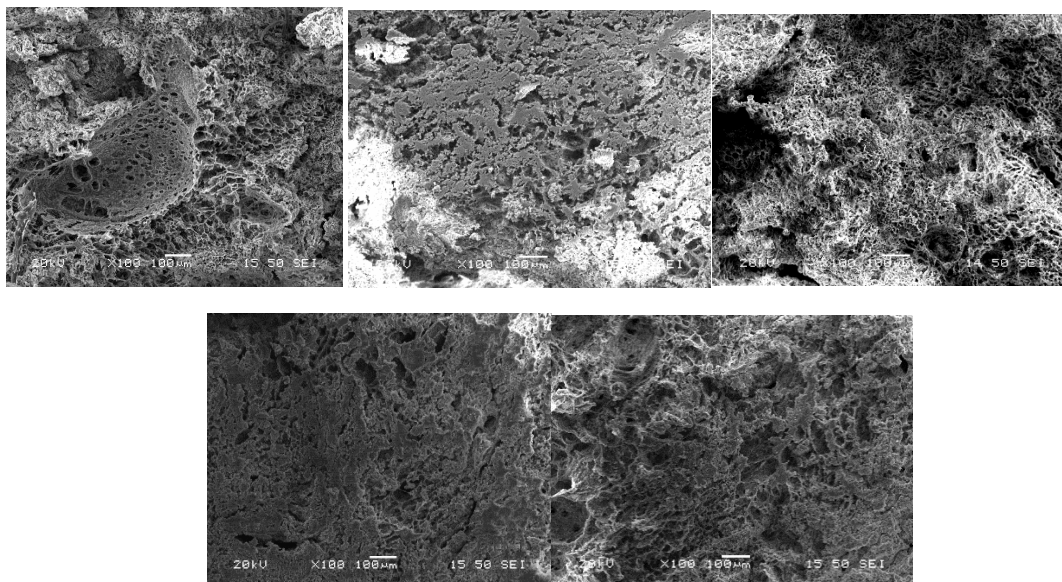


Εικ.4.23. Σχηματική απεικόνιση μικροδομής δοκιμίου CCP92D και CCP92D 1ημέρας, 3ημέρας, 5ημέρας και 7ημέρας αντιστοίχως

NP2M1D: Τα δείγματα του ικρίωματος εμφάνισαν μικροδομή παραπλήσιου πορώδους δικτύου μετά την εμφάνισή τους, υποδεικνύοντας καλή διατήρηση της μικροδομής τους σε σωματικά υγρά. Ωστόσο, σε ένα από τα τέσσερα δείγματα εμφανίστηκαν ρωγμές με συνεπαγόμενη την προβληματική αντοχή του δοκιμίου. Οι ρωγμές δύναται να είναι απόρροια καταπόνησης του δοκιμίου κατά τη διαδικασία κοπής.



Εικ.4.24. Σχηματική απεικόνιση ρωγμών δοκιμίου NP2M1D, το οποίο παρέμεινε 3 ημέρες σε SBF



Εικ. 4.25. Σχηματική απεικόνιση μικροδομής δοκιμίου NP2M1D και NP2M1D 1ημέρας, 3ημέρας, 5ημέρας και 7ημέρας αντιστοίχως

Συμπεραίνεται ότι καλύτερη αντοχή σε διάλυμα SBF έδειξε το δοκίμιο NCP62D, το οποίο εμφάνισε όμοια μικροδομή με το ανεπεξέργαστο δοκίμιο του. Το δοκίμιο NP2M1D εμφάνισε παραπλήσια δομή, ωστόσο επέδειξε μικρότερη αντοχή από το δοκίμιο NCP62D και τέλος το CCP92D εμφάνισε δομική ακεραιότητα αλλά έχει μικρότερο πορώδες συγκριτικά με άλλα δοκίμια.

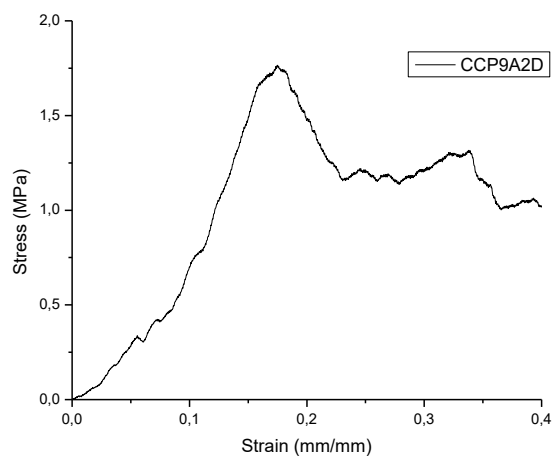
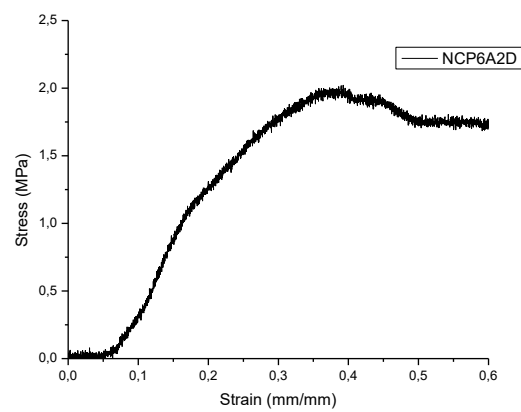
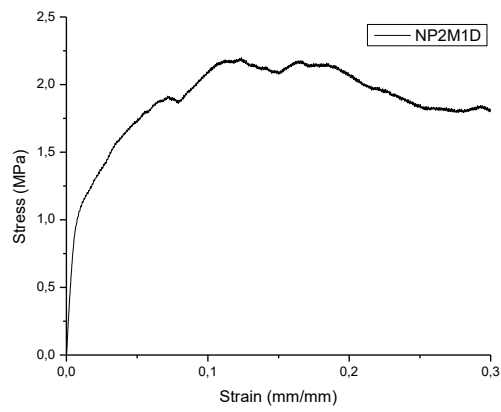
4.7.Μηχανικές αντοχές ικριωμάτων

Τα δοκίμια που μελετήθηκαν ως προς την αντοχή τους σε θλίψη, παρουσιάζουν τις αντίστοιχες καμπύλες τάσεις παραμόρφωσης, και τα αποτελέσματα αντοχής καταγράφονται στον ακόλουθο Πίνακα.4.2.

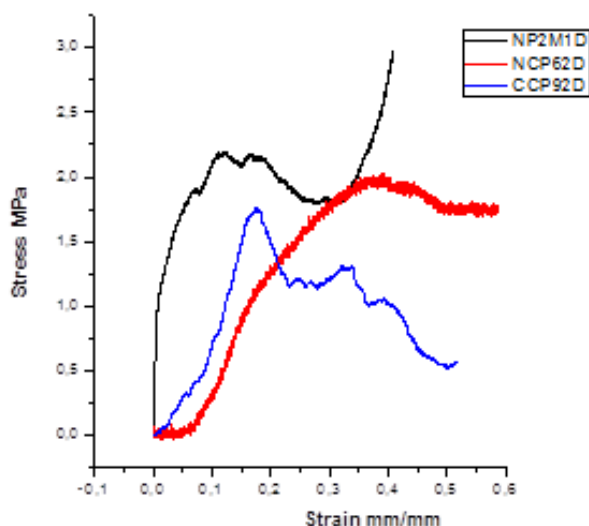
Πίνακας 4.2. Σχετικές τιμές αντοχής σε θλίψη των ικριωμάτων

ΙΚΡΙΩΜΑΤΑ	ΑΝΤΟΧΗ ΣΕ ΘΛΙΨΗ (MPa)
NP2M1D	2.08 ± 0.24
NCP62D	1.94 ± 0.07
CCP92D	1.50 ± 0.27

Τα σύνθετα αυτά ικριώματα εμφανίζουν μεγαλύτερη αντοχή από τα πορώδη ικριώματα υδροξυαπατίτη, τα οποία σύμφωνα με βιβλιογραφική ανασκόπηση έχουν μέτρο αντοχής σε θλίψη 0,21-0,41 MPa. Το γεγονός ότι σε αυτή την περίπτωση πρόκειται για σύνθετο υλικό νανϋδροξυαπατίτη σε μήτρα χιτοζάνης και PEO, επιτρέπει να υποθέσουμε ότι αυτός ο συνδυασμός βοηθάει στη βελτίωση της συμπεριφοράς τους. Ειδικά στα ικριώματα που είναι ενσωματωμένοι νανοσωλήνες άνθρακα φαίνεται ότι υπάρχει επαύξηση της ελαστικής περιοχής, αυτό όμως εξαρτάται από τη διασπορά των νανοσωλήνων, όπως πιθανόν συνάγεται από τη διαφορά στην καμπύλη τάσης παραμόρφωσης που υπάρχει ανάμεσα στα δοκίμια που φέρουν νανοσωλήνες (συγκριτικά τα δοκίμια CCP92D και NCP62D, Εικ. 4.27.). Πιθανόν στα ενισχυμένα ικριώματα, όταν η ρωγμή συναντά το μέσο (CNTs) εκτρέπεται, κάνοντας έτσι την πορεία διάδοσής της πιο περίπλοκη. Πάντως, η παρουσία ανομοιογενειών, ατελειών, διαφορετικού πορώδους ή μεγέθους πόρων οδηγούν σε σημαντικές αποκλίσεις. Αξιοσημείωτες αποκλίσεις εμφάνισε το δοκίμιο CCP92D, καθώς η συνάφεια ενισχυτικού μέσου (CNTs) και μήτρας δεν είναι επαρκής. Επομένως, εμφανίζονται φαινόμενα ολίσθησης στην οριακή επιφάνεια, η οποία πλέον επιτρέπει την μεταφορά μικρότερων δυνάμεων αναλογικά με εκείνες της περιπτώσεως πλήρους συνάφειας (ημισυνεκτική ή μη-συνεκτική διασυνδετική συναρμογή).



Εικ.4.26. Διαγραμματικές απεικονίσεις καμπυλών τάσης- παραμόρφωσης
 Ακολουθεί συγκριτικό διάγραμμα καμπυλών τάσης- παραμόρφωσης για τα τρία
 ικρίωματα.



Εικ. 4.27. Διαγραμματική απεικόνιση συγκριτικού γραφήματος τάσης-παραμόρφωσης μετά από αντοχή σε θλίψη των δοκιμίων NP2M1D, NCP62D, CCP92D.

Όπως φαίνεται από τα αποτελέσματα στατικών μετρήσεων μονοαξονικής συμπίεσης, τα δοκίμια παρουσιάζουν παραπλήσιες αντοχές με ελαφρά χαμηλότερες αντοχές να εμφανίζονται στο δοκίμιο CCP92D. Αξίζει όμως να παρατηρηθεί ότι το δοκίμιο NCP62D παρουσίασε τη μικρότερη τιμή τυπικής απόκλισης, πιθανόν ένδειξη της υψηλής ομοιογένειάς του. Λαμβάνοντας υπόψη τα συνολικά αποτελέσματα, το τελευταίο δοκίμιο, NCP62D, (μικρού μοριακού βάρους (600000 PEO)) ξεχώρισε και διακρίθηκε έναντι των άλλων δύο δοκιμίων διότι παρά την ύπαρξη μεγάλου πορώδους δικτύου (μετά από αναλύσεις ποροσιμετρίας, μCT και SEM) παρουσίασε αξιοσημείωτη μηχανική αντοχή.

Συγκρίνοντας το μέτρο αντοχής σε θλίψη των σύνθετων πορωδών ικριωμάτων υδροξυαπατίτη-βιοπολυμερών-CNTs με τα πορώδη ικρίωματα υδροξυαπατίτη, παρατηρείται αύξηση της αντοχής κατά μια τάξη μεγέθους από 0,21-0,41 MPa σε 2MPa, μέγεθος που πλησιάζει την αντοχή του σπογγώδους οστού 4-12 MPa κατά τον K.Rezwan και συν (Ixxxii). Σε άλλη πειραματική έρευνα του F. Gervaso και συν. (cxviii), μεγάλου πορώδους (500 μm , 90%) ικρίωματα υδροξυαπατίτη με τη μέθοδο διαμόρφωσης πολυμερικού πορώδους σπόγγου έδωσαν αντοχή σε θλίψη 0,51 MPa, αποδεικνύοντας ότι τα σύνθετα ικρίωματα υδροξυαπατίτη-βιοπολυμερών (NP2M1D) αυτής της εργασίας (πορώδους 80%, μεγέθους πόρων μέχρι 100 μm) έχουν καλύτερη μηχανική απόκριση. Οι νανοσωλήνες άνθρακα (MWCNTs) σε μικροποσότητες (0,2%) προστιθέμενοι κατά τη σύνθεση (robocasting) αποτέλεσαν ενισχυτικό μέσο αντοχής σύνθετων ικριωμάτων PCL-HAp-imCNT από 1,5–2,0 MPa σε 5,5 MPa, συγκριτικά με το PLC-HAp ικρίωμα κατά τον B. Dorj και συν.(cxix). Η μηχανική αντοχή φάνηκε να ενισχύεται και με την ύπαρξη υδροξυαπατίτη, συγκρίνοντας πορώδη ικρίωματα χιτοζάνης μέσω λυοφιλίωσης (μεγέθους πόρων 100-500 μm), τα οποία έχουν αντοχή σε θλίψη 1.74 MPa, για μέγιστη συγκέντρωση χιτοζάνης 12 wt%,

όπως ισχυρίζονται ο S.Jana και συν.(cxx). Κατά τους H. Kim, J. C. Knowles και H. E. Kim (cxxi) επικαλύψεις HAp-PCL (dipping-drying) πάνω σε πορώδη ικρίωματα υδροξυαπατίτη (πορώδους 85%) έδειξαν αυξημένη αντοχή ~2 MPa ανάλογη με το λόγο συγκέντρωσης HAp/PCL, μέγεθος ίδιο με τη παρούσα πειραματική μελέτη. Ικρίωματα fMWCNT–alginate–HAp μέσω λυοφιλίωσης, πορώδους 94% και μεγέθους πόρων 130-170 μm εμφάνισαν αντοχή σε θλίψη 0,72 MPa, δηλαδή σημαντικά μικρότερη αντοχή από τα σύνθετα ικρίωματα της παρούσας έρευνας, υποδεικνύοντας καθοριστική την ύπαρξη βιοπολυμερών κατά την υβριδοποίηση (ci).

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 5^ο: ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

Στη συγκεκριμένη in vitro μελέτη, αναπτύχθηκαν σύνθετα ικρίωματα νανοϋδροξυαπατίτη-βιοπολυμερών, τα οποία ενισχύθηκαν με νανοσωματίδια βιοσυμβατών νανοσωλήνων άνθρακα, με την απλή μέθοδο του freeze drying. Στόχος της ερευνητικής αυτής μελέτης ήταν η παρασκευή υποκατάστατων οστικής αναγέννησης, τα οποία προσομοιάζουν στη φυσικοχημική και μηχανική συμπεριφορά του υγιούς οστού. Αρχικά έγινε διερεύνηση της βέλτιστης σύστασης των ικριωμάτων με αλλαγή των παραμέτρων και σύγκριση των ιδιοτήτων τους μετά την προσθήκη νανοσωλήνων άνθρακα. Οι παράμετροι που εξετάστηκαν περιλαμβάνουν τη χρήση πολυμερικού συνδέτη διαφορετικών μοριακών βαρών και επιπλέον μελέτη του χρόνου πολυμερισμού αυτού κατά τη σύνθεση. Επιπρόσθετα, μελετήθηκε η επίδραση των συνθηκών λυοφιλίωσης και των διαφορετικών αναλογιών της σύνθεσης. Τέλος, παρασκευάστηκε σειρά ικριωμάτων ίδιας παραμετροποίησης με νανοσωλήνες άνθρακα, οι οποίοι είχαν διασπαρεί σε δυο διαφορετικούς χρονισμούς της προπαρασκευαστικής διαδικασίας. Τα προαναφερθέντα δοκίμια μετά το πέρας της διαδικασίας σύνθεσης, χαρακτηρίστηκαν ως προς την πορώδη μικροδομή τους και τη μηχανική τους αντοχή, ώστε να δύνανται να αποτελέσουν κατάλληλα ικρίωματα για αναγέννηση οστού. Από την εκπόνηση της μεταπτυχιακής αυτής εργασίας, προέκυψαν τα ακόλουθα συμπεράσματα:

1. Η βιομιμητική σύνθεση τρισδιάστατων ικριωμάτων επαρκούς πορώδους μικροδομής και ταυτόχρονης μηχανικής επάρκειας, εξαρτάται από την καταλληλότητα επιλογής πολυμερικού συνδέτη, από τις διαφορετικές αναλογίες πολυαιθυλενικού οξέος/χιτοζάνης, από τις συνθήκες της ξήρανσης και ειδικότερα από την προσθήκη ενισχυτικών μέσων (CNTs).
2. Το βέλτιστο ικρίωμα περιείχε 1% CNTs, οι οποίοι είχαν ενσωματωθεί στο αιώρημα νανοϋδροξυαπατίτη κατά τη διαδικασία σύνθεσης, ενώ εν συνεχεία η σκόνη σταυροσυνδέθηκε με πολυαιθυλενικό οξύ M.B. 600000. Το πολυμερικό διάλυμα πολυμερίστηκε εντός δύο ημερών (NCP62D) και

ξηράνθηκε απευθείας στους -55°C . Η αναλογία πολυαιθυλενικού οξέος/χιτοζάνης του δοκιμίου επιλέχθηκε ίση με 1:2,5.

3. Συγκρίνοντας τις δύο μεθόδους προσθήκης CNTs, κρίνεται προτιμητέα η ενσωμάτωση των CNTs στο τελικό αιώρημα HAp, καθώς η διασπορά τους είναι ομοιογενής και δεν παρατηρείται απώλεια νανοσωλήνων στο υπερκείμενο νερό που αφαιρείται. Η ενσωμάτωση 1% CNTs δεν επέδρασε στον σχηματισμό δευτερευουσών φάσεων και το κρυσταλλικό πλέγμα του υδροξυαπατίτη δεν υπέστη κάποια σημαντική τροποποίηση. Το μικρό ποσοστό βιοσυμβατών CNTs δεν καθίσταται τοξικό σύμφωνα με βιβλιογραφική ανασκόπηση, ερευνητική θέση η οποία πρόκειται να τεκμηριωθεί μελλοντικά μέσω έκθεσης των ικριωμάτων σε κυτταροκαλλιέργειες.
4. Όσον αφορά στην επιλογή πολυμερικού συνδέτη, αποδεικνύεται ότι οι μηχανικές αντοχές και η συνεκτικότητα του ικριώματος αυξάνονται σε αντίθεση με τα ικριώματα χωρίς την προσθήκη συνδέτη. Το φαινόμενο αυτό οφείλεται στους ισχυρούς δεσμούς του PEO με τα βιομόρια και τα αμινοξέα που συμμετέχουν στη σύνθεση των κρυστάλλων του υδροξυαπατίτη προσδίδοντας έτσι στο τελικό ικρίωμα πιο σταθερή δομή με μεγαλύτερη ελαστικότητα, σκληρότητα και βελτιωμένες ιδιότητες διαβροχής. Το PEO μικρότερου M.W. φάνηκε να αντιδρά καλύτερα με τα αντιδραστήρια, έχοντας ειδικότερα πολυμεριστεί δυο ημέρες με επακόλουθο το ιδανικό του ιζώδες.
5. Εν γένει, τα ρεολογικά χαρακτηριστικά, τα οποία εξαρτώνται από την επιλογή συνδέτη και η προσθήκη CNTs στα ικριώματα νανοϋδροξυαπατίτη-βιοπολυμερών αποτέλεσαν βασικά κριτήρια σχηματισμού πορωδών δομών. Συγκεκριμένα, οι ενισχυτικοί CNTs φάνηκαν να οδηγούν στη βελτίωση της πορώδους μικροδομής και της μηχανικής απόκρισης. Επίσης, το ιζώδες κρίθηκε καταλληλότερο για PEO 600000 δύο ημερών πολυμερισμού. Η στερεοτακτική διάταξη των CNTs ενδείκνυται για τη βέλτιστη εισχώρηση του πολυμερικού συνδέτη εντός της μικροδομής, επομένως το προπαρασκευασμα του νανოსύνθετου υπό μορφή πολφού σταυροσυνδέεται επαρκώς κατά την διάρκεια του καλουπώματος. Επίσης, η μεγάλη ειδική επιφάνεια των CNTs προσδίδει την απαιτούμενη διεπιφανειακή ενεργότητα για την διατήρηση της διασυνδεσιμότητας αυτών με την μητρική φάση κατά την διάρκεια του καλουπώματος. Επιπλέον, η ίδια φυσικοχημική παράμετρος αποτελεί καθοριστικό παράγοντα ως προς την επιτυχή αγκύστρωση και ανεμπόδιστη ανάπτυξη των κυττάρων, τα οποία βρίσκονται υπο μελέτη και εξέλιξη.
6. Επίσης, ο χρόνος πολυμερισμού αποτελεί μια σημαντική παράμετρο επίδρασης ως προς την διατήρηση της δομικής ακεραιότητας, καθώς παρατηρείται εν γένει ότι η μικρή διάρκεια πολυμερισμού (1ημέρας) παρεμποδίζει κινητικά την εκπλήρωση του μηχανισμού της κρυστάλλωσης του PEO, ενώ μεγαλύτερες χρονικές διάρκειες πολυμερισμού (3 ημερών) οδηγούν σε σχετική διόγκωση και απόκλιση από των διαστατικό σχεδιασμό των δειγμάτων. Εξαιρεση, αποτελεί το δοκίμιο NP2M1D, το οποίο παρόλο που έχει υποστεί μικρότερη διάρκεια πολυμερισμού εμφανίζει επαρκή δομική ακεραιότητα. Το γεγονός αυτό, οδηγεί στο συμπέρασμα ότι η εισαγωγή της

ενισχυτικής φάσης νανοσωλήνων άνθρακα συνεπάγεται άμεσα την απαίτηση για μεγαλύτερους χρόνους πολυμερισμού, καθώς παρεμποδίζεται χημικο-κινητικά ο μηχανισμός του πολυμερισμού.

7. Τα βέλτιστα κριώματα NP2M1D, NCP62D (SEM) έχουν συνολικό πορώδες 80%, μέγεθος πόρων έως 130 μm (MIP) και αυξημένη 3D διασυνδεσιμότητα (μCT). Οι μηχανικές αντοχές τους τείνουν στα 2 MPa, οι οποίες αντιστοιχούν στις κατώτατες βαθμίδες θλιπτικής αντοχής του σπογγώδους οστού. Όταν η συνάφεια ενισχυτικού μέσου (CNTs) και μήτρας δεν είναι πολύ καλή (CCP92D), τότε εμφανίζονται φαινόμενα ολίσθησης στην οριακή επιφάνεια, η οποία πλέον επιτρέπει την μεταφορά μικρότερων δυνάμεων αναλογικά με εκείνες της περιπτώσεως πλήρους συνάφειας (ημισυνεκτική ή μη-συνεκτική διασυνδετική συναρμογή), με αποτέλεσμα η πλαστική περιοχή της καμπύλης τάσης-παραμόρφωσης να παρουσιάζει συνεχείς και βαθμιδωτές απομειώσεις.

Επομένως, μέσω της τεχνικής λυοφιλίωσης και βιομιμητικής προσέγγισης, επιτεύχθηκε ανάπτυξη τρισδιάστατων νανოსύνθετων κριωμάτων επαρκούς πορώδους δικτύου και μηχανικής αντοχής, με μικροδομή που διατηρείται σε υδατικά μέσα (in vitro).

ΠΡΟΤΑΣΕΙΣ ΓΙΑ ΜΕΛΛΟΝΤΙΚΗ ΕΡΕΥΝΑ

- Μελέτη των κριωμάτων NP62D, NCP2M2D ως προς τη διασυνδεσιμότητα και μηχανική αντοχή τους και συγκρισή τους με τα βέλτιστα κριώματα NCP62D, NP2M1D.
- Περαιτέρω έρευνα βιολογικής απόκρισης των κριωμάτων. Τα πειράματα κυτταροκαλλιιεργειών των βέλτιστων δοκιμίων NCP62D, CCP92D, NP2M1D με Mg-63 cell type βρίσκονται σε εξέλιξη μέχρι το Σεπτέμβριο 2017.
- Παρατήρηση των κριωμάτων στο ηλεκτρονικό μικροσκόπιο διέλευσης (TEM) για μελέτη της διασποράς των νανοσωλήνων και των κρυστάλλων του υδροξυαπατίτη.
- Ως προς την ενσωμάτωση νανοσωλήνων άνθρακα στα κριώματα, προτείνονται νέες μέθοδοι ανάλογα με το τρόπο προσθήκης τους (NC ή CC type). Συγκεκριμένα, χημική τροποποίηση των CNTs και μείωση ποσότητας προσθήκης τους σε υποδιπλάσια για τα τύπου CC κριώματα και 0,020g (από

0,025g) για τα τύπου NC ικρίωματα. Τα αιωρήματα αυτών θα εξεταστούν ως προς την κολλοειδή σταθερότητά τους μέσω αναλύσεων Z-Potential και DLS.

- Στα καλύτερα ικρίωματα με CNTs ή μη, προτείνεται αντικατάσταση του μορίου χιτοζάνης με κολλαγόνο και περαιτέρω ανάλυση αυτών.
- Σχετικά με τη γεωμετρία των ικριωμάτων, προτείνεται χύτευση των βέλτιστων αιωρημάτων μέσω εξώθησης, με ταυτόχρονη παρακολούθηση των ιξωδοελαστικών χαρακτηριστικών τους, σε ειδικά καλούπια τύπου honeycomb και επιπρόσθετη λυοφιλίωση των καλουπιών σε συνθήκες -55°C , 0,350 mbar.

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

ⁱ N. Μπουρόπουλος, Σημειώσεις Προηγμένων Βιολογικών, Πανεπιστήμιο Πατρών, 2010.

ⁱⁱ E. E. Silva, H. H. M. D. Colleta, A. S. Ferlauto, R. L. Moreira, R. R. Resende, S. Oliveira, G. T. Kitten, R. G. Lacerda, L. O. Ladeira, 'Nanostructured 3-D Collagen /Nanotube Biocomposites for Future Bone Regeneration Scaffolds', *Nano Res*, 2: 462-473, 2009.

ⁱⁱⁱ M. N. Hassana, M. M. Mahmoud, A. A. El-Fattaha, S. Kandila, 'Microwave-assisted preparation of Nano-hydroxyapatite for bone substitutes', *Science Direct*, 2015

^{iv} C. Gao, Y. Deng, P. Feng, Z. Mao, P. Li, B. Yang, J. Deng, Y. Cao, C. Shuai, S. Peng, 'Current Progress in Bioactive Ceramic Scaffolds for Bone Repair and Regeneration', *Int. J. Mol. Sci.*, 15, 4714-4732, 2014.

^v T. Dvir, B. P. Timko, D. S. Kohane, R. Langer, 'Nanotechnological strategies for engineering complex tissues', *Nature Nanotechnology*, VOL 6, 2011.

^{vi} B. Starly, 'Biomimetic design and fabrication of tissue engineered scaffolds using computer aided tissue engineering', thesis in Drexel University, 2006.

^{vii} J. P. Vacanti, R. Langer, 'Tissue engineering: the design and fabrication of living replacement devices for surgical reconstruction and transplantation', *Molecular Medicine* 354, 32 – 34, 1999.

^{viii} W. Sun, P. Lal, 'Recent development on computer aided tissue engineering - a review', *Computer Methods and Programs in Biomedicine* 67, 85 – 103, 2002.

^{ix} J. J. Marler, J. Upton, R. Langer, J. P. Vacanti, 'Transplantation of cells in matrices for tissue regeneration', *Advanced Drug Delivery Reviews* 33, 165 – 182, 1998.

^x B. G. Sengers, M. Taylor, C. P. Please, R. O. C. Oreffo, 'Review – Computational modeling of cell spreading and tissue regeneration in porous scaffolds', *Biomaterials* 28, 2007.

^{xi} K. A. Hing, 'Bioceramic Bone Graft Substitutes: Influence of Porosity and Chemistry', *Int. J. Appl. Ceram. Technol.*, 2 [3] 184–199 (2005)

^{xii} H. Peng, X. Liu, R. Wang, F. Jia, L. Dong, Q. Wang, 'Emerging nanostructured materials for musculoskeletal tissue engineering', *J. Mater. Chem. B*, 2, 6435, 2014

^{xiii} Wikipedia, File: Bone cross-section.svg

^{xiv} G. Vaes, 'Cellular biology and biochemical mechanism of bone resorption. A review of recent developments on the formation, activation, and mode of action of osteoclasts', *Clinical Orthopaedics and Related Research*, 239-271, 1988.

^{xv} J.C. Stevenson, M.C. Marsh, 'An atlas of osteoporosis', 3rd Edition, Informa Healthcare, 9-13, 2007.

^{xvi} T. Okman-Kilic, 'Advances in Osteoporosis', Intech book, Chapter 2, 2015.

^{xvii} T. Wada, T. Nakashima, N. Hiroshi, J.M. Penninger, 'RANKL -RANK signaling in osteoclastogenesis and bone disease', *Trends Mol.Med*, 12:17-25, 2006.

^{xviii} J. Behari, 'Biophysical Bone Behaviour-Principals and Applications', John Wiley & Sons, 38-50, 2009.

^{xix} Z. Jun Han, A. E. Rider, M. Ishaq, S. Kumar, A. Kondyurin, M. M. M. Bilek, I. Levchenkoab, K. Ostrikov, 'Carbon nanostructures for hard tissue engineering', The Royal Society of Chemistry, 2012

^{xx} S. Dey, S. Pal 'Evaluation of Collagen-hydroxyapatite Scaffold for Bone Tissue Engineering', *IFMBE Proceedings Vol. 23*, 1267–1270, 2009

^{xxi} S. Bose, M. Roy, A. Bandyopadhyay, 'Recent advances in bone tissue engineering scaffolds', *Trends in Biotechnology*, Vol. 30, No. 10, 2012.

^{xxii} J. Wosek 'Fabrication of composite polyurethane/hydroxyapatite scaffolds using solvent-casting salt leaching technique', DOI: 10.1515/adms, 2015

^{xxiii} P. K. Yarlagadda, M. Chandrasekharan, J. Y. Shyan, 'Recent advances and current developments in tissue scaffolding', *Biomed. Mater. Eng.*, 15:159-77, 2005.

^{xxiv} P. M. Bartold, C. A. McCulloch, A. S. Nayaranan, S. Pitaru, 'Tissue Engineering: a new paradigm for periodontal regeneration based on molecular and cell biology', *Periodontol*, 24: 253-69, 2000.

^{xxv} J. M. Taboas, R. D. Maddox, R. H. Krebsbach, S. J. Hollister, 'Indirect solid free form fabrication of local and global porous, biomimetic and composite 3D polymer-ceramic scaffolds', *Biomaterials*, 24:181-194, 2003.

^{xxvi} T. Ehrenfreund-Kleinman, J. Golenser, A.J. Domb, 'Scaffolding in tissue engineering', Edited by P. X. Ma, J. Eliseeff, New York, 2006.

-
- ^{xxvii} S. M. Zo, D. Singh, A. Kumar, Y. W. Cho, T. H. Oh, S. S. Han^{1,2}, 'Chitosan–hydroxyapatite macroporous matrix for bone tissue engineering', *Current Science*, Vol. 103, No. 12, 2012.
- ^{xxviii} Larry L. Hench*, 'Bioceramics: From Concept to Clinic', Department of Materials Science and Engineering, University of Florida, *J. Am. Ceram. Soc.* 74 [7] 1487-510(1991)
- ^{xxix} Α. Τσετσεκου, Σημειώσεις Μαθήματος 8^{ου} Εξαμήνου Μηχ. Μεταλλείων Μεταλλουργών 'Κεραμικά', Αθήνα 2006
- ^{xxx} L. L. Hench, R. J. Splinster, and W. C. Allen, T. K. GREENLEE, 'Bonding Mechanisms at the Interface of Ceramic Prosthetic Materials', *I. BIOMED. MATER. RES. SYMPOSIUM, NO. 2 (Part 1)*, 117/ 141, 1971.
- ^{xxxi} Larry L. Hench, 'Bioceramics: From Concept to Clinic', Department of Materials Science and Engineering, University of Florida, *J. Am. Ceram. Soc.* 74, 1487-510, 1991.
- ^{xxxii} H. Ghomi, M. H. Fathi, H. Edris, 'Preparation of nanostructure hydroxyapatite scaffold for tissue engineering applications', DOI 10.1007/s10971-011-2439-2, *Sol-Gel Sci Technol*, 2011.
- ^{xxxiii} V. P. Orlovskii, V. S. Komlev, S. M. Barinov, 'Hydroxyapatite and Hydroxyapatite-Based Ceramics', *Inorganic Materials*, Vol. 38, No. 10, 973–984, 2002
- ^{xxxiv} R. Rajesh, Y. D. Ravichandran, 'Development of a new carbon nanotube–alginate–hydroxyapatite tricomponent composite scaffold for application in bone tissue engineering', *International Journal of Nanomedicine (Suppl 1: Challenges in biomaterials research)* 7–15, 2015.
- ^{xxxv} Η. Νικόλιτς, 'Ανάπτυξη τρισδιάστατων κριωμάτων βιομορίων-υδροξυαπατίτη', *Μεταπτυχιακή Εργασία*, 2016.
- ^{xxxvi} S.M. Barinov, V.S. Komlev, 'Hydroxyapatite-Base Granules for Targeted and Time-Controlled Drug Delivery', *Book of Lectures Presented at the 3rd Course on Biomaterials.*, Ancona, 2001
- ^{xxxvii} N.G. Klyuchnikov, 'A Guide to Inorganic Synthesis', Moscow: Khimiya, 1965.
- ^{xxxviii} V.P. Orlovskii, S.M. Barinov, 'Hydroxyapatite and Hydroxyapatite-Matrix Ceramics: A Survey', *Russ. J. Inorg. Chem.*, Vol. 46, no. 2, 2001
- ^{xxxix} M. Aizawa, T. Hanazawa, K. Itatani, 'Characterization of Hydroxyapatite Powders Prepared by Ultrasonic Spray-Pyrolysis Technique', *J. Mater. Sci.*, vol. 34, no. 12, 1999
- ^{xl} T. Kokubo, 'Potential of Ceramics as Biomaterials', *Ceramics and Society*, R.J. Brook, Ed. Faenza: Techna, 1995.
- ^{xli} V.P. Orlovskii, Zh. A. Ezhova, G.V. Rodicheva, 'Hydroxyapatite Phase Relations in the System $\text{CaCl}_2\text{--}(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4\text{--NH}_4\text{OH--H}_2\text{O}$ (25°C)', vol. 37, no. 4, 1992
- ^{xliv} V.P. Orlovskii, G.E. Sukhanova, Zh.A. Ezhova, G.V. Rodicheva, 'Hydroxyapatite Bioceramics', vol. 36, no. 6, 1991
- ^{xlvi} N.Ya. Turova, M.I. Yanovskaya, 'Synthesis of Hydroxyapatite Crystals', vol. 19, no. 5, 1983

-
- ^{xliv} L.L Hench, ‘Bioceramics and the Future’, Ceramics and Society, Faenza: Techna, 1995.
- ^{xlv} L. Feenstra, K. de Groot, ‘Bioceramics of Calcium Phosphate’, Boca Raton: CRC, 1983.
- ^{xlvi} L. Yubao, K.de Groot, J. de Wijn, ‘Morphology and Composition of Nanograde Calcium Phosphate Needle-like Crystals Formed by Simple Hydrothermal Treatment’, J. Mater. Sci.: Mater. Med., vol. 5, 1994
- ^{xlvii} Δ. Βάου, ‘Βιομμητική ανάπτυξη σύνθετων βιοκεραμικών νανουδροξυαπατίτη-Βιοπολυμερών με ελεγχόμενες ιδιότητες για βιολογικές εφαρμογές’, Διδακτορική Διατριβή, 2015
- ^{xlviii} W. Suchanek, M. Yoshimura, ‘Processing and properties of hydroxyapatite-based biomaterials for use as hard tissue replacement implants’, J. Mater. Res. 13, 94–117, 1998
- ^{xlix} K.A. Hing, S.M Best, E. Tanner, W. Bonfield, P. Revell, ‘Mediation of bone ingrowth in porous hydroxyapatite bone graft substitutes’, J. Biomed. Mater. Res. 68A, 187–200, 2004
- ^l R.Z. LeGeros, P.W. Brown, B. Constantz, ‘Biological and Synthetic Apatites In Hydroxyapatite and Related Materials’, CRC Press, Boca Raton, pp. 3–28, 1994
- ⁱⁱ J.G. Bradley, C.M. Andrews, K. Lee, C.A. Scott, D. Shaw, ‘Furlong Hydroxyapatite-Coated Hip Prosthesis vs the Charnley Cemented Hip Prosthesis’, Key Eng. Mater. 192, 1013–1020, 2000.
- ^{lii} Wikipedia Polysaccharide: <https://en.wikipedia.org/wiki/Polysaccharide>
- ^{liii} M. Rinaudo, ‘Chitin and chitosan: Properties and applications’, Prog. Polym. Sci. 31 603–632, 2006.
- ^{liv} A. D. Martino, M. Sittinger, M. V. Risbuda ‘Chitosan: A versatile biopolymer for orthopaedic tissue-engineering’, Biomaterials, 26 5983–599, 2005.
- ^{lv} K.V.H. Prashanth, N. Tharanathan, ‘Crosslinked Chitosan preparation and Characterization’ J. Carbohydrate Research, 341, 169-173, 2006.
- ^{lvi} B. Alberts, D. Bray, K. Hopkin, A. Johnson, J. Lewis, M. Raff, K. Roberts, P. Walter, ‘Βασικές Αρχές Κυτταρικής Βιολογίας’, Δεύτερη Έκδοση, Τόμος Ι, Κεφάλαιο 2
- ^{lvii} D. Nelson, M. C. Lehninger, ‘Principles of Biochemistry’, Freeman and Company, 2005
- ^{lviii} Wikipedia arginine: <http://en.wikipedia.org/wiki/Arginine>
- ^{lix} S. A. El-Maraghy, N. A. Mehana, ‘Modulatory effects of l-arginine and soy enriched diet on bone homeostasis abnormalities in streptozotocin -induced diabetic rats’, 2015
- ^{lx} M.B. Witte, A. Barbul, ‘Arginine Physiology and its implications for wound healing’, Wound Repair Regen, 11(6) 419-23, 2003
- ^{lxi} Μ. Καμμένου, ‘Σύνθεση και χαρακτηρισμός νανοσύνθετων βιολογικών Υδροξυαπατίτη – Βιοπολυμερών’, Διπλωματική εργασία, Αθήνα 2008

-
- ^{lxii} J. H. Lee, H. B. Lee, J. D. Andrade, 'Blood Compatibility of Polyethylene Oxide Surfaces', *Prog. Polym. Sci.*, Vol. 20, 1043-1079, 1995.
- ^{lxiii} SIGMA-ALDRICH, Poly (ethylene oxide):
http://www.sigmaaldrich.com/Graphics/COFAInfo/SigmaSAPQM/SPEC/18/181986/181986-BULK_____ALDRICH_.pdf
- ^{lxiv} B. Hammouda, D. L. Ho, S. Kline, 'Insight into Clustering in Poly (ethylene oxide) Solutions', *Macromolecules* 37, 6932-6937, 2004.
- ^{lxv} R. Kjellander, E. Florin, 'Water Structure and Changes in Thermal Stability of the System Poly (ethylene oxide)-Water', *J. Chem. SOC*, 77, 2053-2077, 1981.
- ^{lxvi} Mini-Encyclopedia of Papermaking Wet-End Chemistry, Polyethylene Oxide (PEO), Additives and Ingredients, their Composition, Functions, Strategies for Use.
- ^{lxvii} M. Efentakis, M. Vlachou, 'Evaluation of high molecular weight polyoxyethylene polymer', *Pharmaceutical Development and Technology*, Vol. 5, Issue 3, July 2000.
- ^{lxviii} P. Calvo, C. Remunan-Lopez, J. L. Vila-Jato, M. J. Alonso, 'Novel Hydrophilic Chitosan-Polyethylene Oxide Nanoparticles as Protein Carriers', *Journal of Applied Polymer Science*, Vol. 63, 125-132, 1997.
- ^{lxix} Κ. Κορδάτος, 'Άλλοτροπικές Μορφές Άνθρακα, Φουλερένια και Νανοσωλήνες Άνθρακα', ΕΜΠ, 2014.
- ^{lxx} N. T. Nguyen, S. A. M. Shaegh, N. Kashaninejad, D. T. Phan, 'Design, fabrication and characterization of drug delivery systems based on lab-on-a-chip technology', *Volume 65, Issues 11-12, 1403-1419, 2013.*
- ^{lxxi} K.M. Liew, X.Q. He, C.H. Wong, 'On the study of elastic and plastic properties of multi-walled carbon nanotubes under axial tension using molecular dynamics simulation', *K.M. Liew et al. / Acta Materialia* 52, 2521-2527, 2004.
- ^{lxxii} G. Balasundaram, M. Sato, T. J Webster, 'Using hydroxyapatite nanoparticles and decreased crystallinity to promote osteoblast adhesion similar to functionalizing with RGD', *Biomaterials*; 27:2798-805, 2006.
- ^{lxxiii} K. P. A. Saffar, A. R. Arshi, N. JamilPour, A. R. Najafi, G. Rouhi, L. Sudak, 'A cross-linking model for estimating Young's modulus of artificial bone tissue grown on carbon nanotube scaffold, *Journal of Biomedical Materials Research*, Vol 94A, Issue 2, 2010
- ^{lxxiv} J. Robertson, 'Realistic applications of CNTs', *Volume 7, Issue 10, Pages 46-52, 2004.*
- ^{lxxv} H. He, L. A. Huy, P. Dramou, D. Xiao, P. Zuo, C. Pham-Huy, 'Carbon Nanotubes: Applications in Pharmacy and Medicine', *Hindawi Publishing Corporation BioMed Research International Volume 2013, Article ID 578290, 2013.*
- ^{lxxvi} G. Tripathi, B. Basu, 'A porous hydroxyapatite scaffold for bone tissue engineering: Physico-mechanical and biological evaluations', *Ceramics International* 38, 341-349, 2012.

-
- ^{lxxvii} J. R. Woodarda, A. J. Hildorea, S. K. Lan, C.J. Park, A. W. Morgan, J. A. C. Eurell, S. G. Clark, M. B. Wheeler, R. D. Jamison, A. J. W. Johnson, 'The mechanical properties and osteoconductivity of hydroxyapatite bone scaffolds with multi-scale porosity', *Biomaterials* 28, 45–54, 2007.
- ^{lxxviii} V. Karageorgiou, D. Kaplan, 'Porosity of 3D biomaterial scaffolds and osteogenesis', *Biomaterials* 26, 5474–5491, 2005.
- ^{lxxix} K. A. Hing, 'Bioceramic Bone Graft Substitutes: Influence of Porosity and Chemistry', *Int. J. Appl. Ceram. Technol.*, 184–199, 2005.
- ^{lxxx} Y. P. Guo, J. J. Guan, J. Yang, Y. Wang, C.Q. Zhang, Q.F. Ke, 'Hybrid Nanostructured Hydroxyapatite/Chitosan Composite Scaffold: Bioinspired Fabrication, Mechanical Property and Biological Property', *Journal of Materials Chemistry B*, Accepted Manuscript
- ^{lxxxi} P. Zioupos, 'Recent developments in the study of failure of solid biomaterials and bone: 'fracture' and 'pre-fracture' toughness', *Material Science and Engineering*, C6, 33-40, 1998.
- ^{lxxxii} K. Rezwani, Q.Z. Chen, J.J. Blaker, A. R. Boccaccini, 'Biodegradable and bioactive porous polymer/inorganic composite scaffolds for bone tissue engineering', *Biomaterials* 27, 3413–3431, 2006.
- ^{lxxxiii} J. M. Cordell, M. L. Vogl, A. J. W. Johnson, 'The influence of micropore size on the mechanical properties of bulk hydroxyapatite and hydroxyapatite scaffolds', *Journal of the Mechanical Behaviour of Biomedical Materials* 2, 560-570, 2009.
- ^{lxxxiv} A. Bigi, E. Boanini, B. Bracci, A. Facchini, S. Panzavolta, F. Segatti, L. Sturba. Nanocrystalline hydroxyapatite coatings on titanium: a new fast biomimetic method, *Biomaterials* 26, 4085-4089, 2005.
- ^{lxxxv} T. Kokubo, H. Takadama, 'How useful is SBF in predicting in vivo bone bioactivity?', *Biomaterials* 27, 907–2915, 2006.
- ^{lxxxvi} H. M. Kim, T. Himeno, M. Kawashita, T. Kokubo, T. Nakamura, 'The mechanism of biomineralization of bone-like apatite on synthetic hydroxyapatite: an in vitro assessment', *J. R. Soc. Interface*, 1, 17–22, 2004.
- ^{lxxxvii} L. Qian, H. Zhang, 'Controlled freezing and freeze drying: a versatile route for porous and micro-/nano-structured materials', *J Chem Technol Biotechnol*, 86: 172–184, 2011
- ^{lxxxviii} S. Deville, E. Saiz, A. P. Tomsia, 'Freeze casting of hydroxyapatite scaffolds for bone tissue engineering', *Biomaterials* 27, 5480–5489, 2006
- ^{lxxxix} Εργαστηριακή Άσκηση, 'Παρασκευή πορώδων κριωμάτων για βιολογικές εφαρμογές με την τεχνική της λυοφιλίωσης (freeze drying)', Δ.Π.Μ.Σ. Επιστημής και Τεχνολογίας Υλικών, 2016-2017
- ^{xc} Η. Καρυοφύλλης, Ε.Α. Κυριακοπούλου, Μ Πάνου, Π.Π Παπαγεωργίου, 'Ακτινανάλυση με Ακτίνες Χ (XRD)', Εργαστηριακή άσκηση, Δ.Π.Μ.Σ. Επιστημής και Τεχνολογίας Υλικών, 2016.

^{xci}Christine M. Clark, Barbara L. Dutrow,' Single-crystal X-ray Diffraction', Geochemical Instrumentation and Analysis

^{xcii}nanoScience Instruments-SEM: <http://www.nanoscience.com/technology/sem-technology/how-sem-works/>

^{xciii} M. P. Gashti, F. Alimohammadi, J. Hulliger, M. Burgener, H. O. Aboulfad, G. L. Bowlin,' Microscopic methods to study the structure of scaffolds in bone tissue Engineering: a brief review', Formatex, 2012.

^{xciv} R.H. Harris, 'Freeze-Drying Biological Specimens: A Laboratory Manual', Smithsonian Institution Press, DC, pp. 19-2, 1979

^{xcv} Micromeritics, Mercury Intrusion Porosimetry Theory:
http://www.micromeritics.com/Repository/Files/Mercury_Porosemity_Theory_poster.pdf

^{xcvi} M. Stauber, R. Müller,' Micro-Computed Tomography: A Method for the Non-Destructive Evaluation of the Three-Dimensional Structure of Biological Specimens', Methods in Molecular Biology, Chapter 19, 2008.

^{xcvii} M.L. Bouxsein, S.K. Boyd, B.A. Christiansen, R.E. Guldberg, K.J. Jepsen, R. Muller, 'Guidelines for Assessment of Bone Microstructure in Rodents Using Micro-Computed Tomography', Journal of Bone and Mineral Research, 25, 1468–1486, 2010.

^{xcviii} G.R. Davis, F.S. Wong,' X-ray microtomography of bones and teeth', Physiological Measurement, 17, 121-146,1996.

^{xcix} Κωνσταντίνος Ι.Γιαννακόπουλος, Σημειώσεις: Μονοαξονική Θλίψη, Πειραματική Αντοχή Υλικών, ΕΛΛΗΝΙΚΗ ΔΗΜΟΚΡΑΤΙΑ Ανώτατο Εκπαιδευτικό Ίδρυμα Πειραιά Τεχνολογικού Τομέα, 2010.

^c Y. Kuboki, H. Takita, D. Kobayashi, E. Tsuruga, M. Inoue, M. Murata,' BMP-induced osteogenesis on the surface of hydroxyapatite with geometrically feasible and nonfeasible structures: topology of osteogenesis', J Biomed Mater Res. 1998 Feb;39(2):190-9.

^{ci} Rajendiran R., Dominic R.,' Development of a new carbon nanotube– alginate–hydroxyapatite tricomponent composite scaffold for application in bone tissue engineering', International Journal of Nanomedicine 2015:10, 7–1

^{cii} Z. hao F, Yin Y, Lu WW, Leong JC, Zhang W, Zhang J, Zhang M, Yao K. 'Preparation and histological evaluation of biomimetic three-dimensional hydroxyapatite/chitosan-gelatin network composite scaffolds', Biomaterials. 2002 Aug;23(15):3227-34.

^{ciii} HW Kim , Knowles JC, Kim HE,' Hydroxyapatite/poly(epsilon-caprolactone) composite coatings on hydroxyapatite porous bone scaffold for drug delivery', Biomaterials. 2004 Mar-Apr;25(7-8):1279-87.

^{civ} Lickorish D, Ramshaw JA, Werkmeister JA, Glattauer V, Howlett CR, 'Collagen-hydroxyapatite composite prepared by biomimetic process', *J Biomed Mater Res A*. 2004 Jan 1;68(1):19-27.

^{cv}V. Jayachandran, Q. Zhong-Ji, R BoM, A.K. Nanjundan, K. Se-Kwon, 'Preparation and characterization of carbon nanotube-grafted-chitosan – Natural hydroxyapatite composite for bone tissue engineering', *J. Venkatesan et al. / Carbohydrate Polymers* 83 (2011) 569–57.

^{cvi} M. Itoh, A. Shimazu, I. Hirata, Y. Yoshida, H. Shintani, M. Okazaki, 'Characterization of CO₃Ap-collagen sponges using X-ray high-resolution microtomography', *M. Itoh et al. / Biomaterials* 25 (2004) 2577–2583.

^{cvi} B. Zhao, H. Hu, S. K. Mandal, R. C. Haddon, 'A Bone Mimic Based on the Self-Assembly of Hydroxyapatite on Chemically Functionalized Single-Walled Carbon Nanotubes', *Chem. Mater.* 2005, 17, 3235-3241.

^{cvi} M J. Hortiguela, M. C. Gutierrez, I. Aranaz, M. Jobbagy, A. Abarategi, C. Moreno-Vicente, A. Civantos, V.Ramos, J. L. Lopez-Lacomba, M.L. Ferrer, F. Monte, 'Urea assisted hydroxyapatite mineralization on MWCNT/CHI scaffolds', *J. Mater. Chem.*, 2008, 18, 5933–5940.

^{cix}W.Wang, S.Liao, M.Liu, Q.Zhao, Y.Zhu, 'Polymer Composites Reinforced by Nanotubes as Scaffolds for Tissue Engineering', *Hindawi Publishing Corporation International Journal of Polymer Science Volume* 2014.

^{cx} J. Venkatesan, S-K. Kim, 'Chitosan Composites for Bone Tissue Engineering—An Overview', *Mar. Drugs* 2010, 8, 2252-2266.

^{cx}Y. Liu, J. Tang, X. Chen, J.H. Xin, 'Decoration of carbon nanotubes with chitosan', *Y. Liu et al. / Carbon* 43 (2005) 3178–3180.

^{cx}S.F. Wang, L Shen, W. Zhang, Y.J. Ton, 'Preparation and Mechanical Properties of Chitosan/Carbon Nanotubes Composites', *Biomacromolecules* 2005, 6, 3067-3072.

^{cx}C. Lau, M. J. Cooney, 'Conductive macroporous composite chitosan carbon nanotube scaffolds', *Langmuir* 2008, 24, 7004–7010.

^{cx}J.D Qiu, H.Y Xie, R.P. Liang, 'Preparation of porous chitosan/carbon nanotubes film modified electrode for biosensor application.', *Microchim. Acta* 2008, 162, 57–64. 69.

^{cx}B. Kumar, J.-F Feller, M. J. Castro, 'Conductive bio polymer nano composites (CPC): Chitosan carbon nanotube transducers assembled via spray layer by layer for volatile organic compound sensing', *Talanta* 2010, 81, 908–915.

^{cx}S. Ozarkar, M. Jassal, A. Agrawal A, 'pH and electrical actuation of single walled carbon nanotube/chitosan composite fibers', *Smart Mater. Struct.* 2008, 17, 055016.

^{cx}G.M. Spinks, S.R. Shin, G.G. Wallace, P.G. Whitten, S.I. Kim, S.J. Kim, 'Mechanical properties of chitosan/ CNT microfibers obtained with improved dispersion', *Sens. Actuat. B: Chem.* 2006, 115, 678–684.

^{cxviii} F. Gervaso, F. Scalera, S. K. Padmanabhan, A. Licciulli, DanieDeponi, Alessia Di Giancamillo, Cinzia Domeneghini, Giuseppe M. Peretti, Alessandro Sannino, 'Development and mechanical characterization of a collagen/hydroxyapatite bilayered scaffold for osteochondral defect replacement', *Key Engineering Materials*, Vols. 493-494, pp. 890-895, 2012.

^{cxix} B. Dorj, J.E. Won, J.H. Kim, S.J. Choi, U. S. Shin, H.W Kim, 'Robocasting nanocomposite scaffolds of poly(caprolactone)/ hydroxyapatite incorporating modified carbon nanotubes for hard tissue reconstruction', *Journal of Biomedical Materials research A*, 2012, Vol 00A

^{cxx} S. Jana, S. J. Florczyk, M. Leung, M. Zhang, 'High-strength pristine porous chitosan scaffolds for tissue engineering ', *Journal of Material Chemistry*, Issue 13, 2012.

^{cxxi} H. Kim, J. C. Knowles, H. Kim, 'Hydroxyapatite/poly(e-caprolactone) composite coatings on hydroxyapatite porous bone scaffold for drug delivery', *Biomaterials* 25 (2004) 1279-1287.