



ΕΘΝΙΚΟ ΜΕΤΣΟΒΙΟ ΠΟΛΥΤΕΧΝΕΙΟ

ΣΧΟΛΗ ΜΗΧΑΝΙΚΩΝ ΜΕΤΑΛΛΕΙΩΝ ΜΕΤΑΛΛΟΥΡΓΩΝ

ΤΟΜΕΑΣ ΜΕΤΑΛΛΟΥΡΓΙΑΣ & ΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ ΥΛΙΚΩΝ

Διπλωματική Εργασία

Ανάπτυξη και χαρακτηρισμός
τρισδιάστατων ικριωμάτων
υδροξυαπατίτη-βιομορίων

Επιβλέπουσα καθηγήτρια: Αθηνά Τσετσέκου

Όνοματεπώνυμο: Κατσαρός Ιωάννης-Ζήσης

Αθήνα ,2018



ΕΘΝΙΚΟ ΜΕΤΣΟΒΙΟ ΠΟΛΥΤΕΧΝΕΙΟ
ΣΧΟΛΗ ΜΗΧΑΝΙΚΩΝ ΜΕΤΑΛΛΕΙΩΝ ΜΕΤΑΛΛΟΥΡΓΩΝ
ΤΟΜΕΑΣ ΜΕΤΑΛΛΟΥΡΓΙΑΣ & ΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ ΥΛΙΚΩΝ

Ανάπτυξη και χαρακτηρισμός τρισδιάστατων ικριωμάτων υδροξυαπατίτη-βιομορίων

ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ

ΚΑΤΣΑΡΟΣ ΙΩΑΝΝΗΣ-ΖΗΣΗΣ

ΤΡΙΜΕΛΗΣ ΕΠΙΤΡΟΠΗ:

Κα. Αθηνά Τσετσέκου

Κα. Ηλιάνα Χαλικιά

Κος. Πάνιας Δημήτριος

Αθήνα ,2018

Περίληψη

Η ιστοική μηχανική έχει εξελιχθεί σε μια ελπιδοφόρα προσέγγιση όσον αφορά την οστική ανακατασκευή σε περιπτώσεις τραυματισμένων οστών. Η χρήση ικριωμάτων για τον σκοπό αυτό είναι μια τεχνική η οποία μελετάται παγκοσμίως. Τα ικριώματα είναι δομές οι οποίες λειτουργούν ως ερείσματα βοηθώντας και ,κατά περίπτωση, επιταχύνοντας τις κυτταρικές λειτουργίες που οδηγούν στην οστική ανακατασκευή. Σήμερα στις περιπτώσεις τραυματισμένων οστών χρησιμοποιούνται μοσχεύματα από άλλα σημεία του ίδιου οργανισμού (αυτόγραφα) , από άτομα του ίδιου είδους (αλλόγραφα) , από άλλους ζωικούς οργανισμούς (ξενόγραφα) ή εμφυτεύματα βιολικών με χαρακτηριστικό παράδειγμα τις λάμες τιτανίου. Η χρήση ικριωμάτων υπερτερεί αυτών των μεθόδων λόγω της αφθονίας συνθετικών βιολικών, του μικρού χρόνου παραγωγής τους, τον μειωμένο κίνδυνο ανοσολογικής απόρριψης και του γεγονότος πως δεν χρειάζεται δεύτερη εγχείρηση για την αποβολή τους από τον οργανισμό μετά την αναδόμηση του οστού. Ως αποτέλεσμα, τα βιοδιασπώμενα βιολικά τα οποία προωθούν την ανάπτυξη οστού παρέχοντας παράλληλα την επιθυμητή μηχανική υποστήριξη έχουν αναχθεί σε υλικά παγκόσμιου επιστημονικού ενδιαφέροντος. Σε αυτήν την εργασία σκόνη υδροξυαπατίτη/χιτοζάνης/L-αργινίνης δισυνδέθηκε χημικά με την βοήθεια οξειδίου του πολυαιθυλενίου πριν χρησιμοποιηθεί για την παραγωγή τρισδιάστατων ικριωμάτων μέσω λυοφιλίωσης. Επιπλέον, χρησιμοποιήθηκαν νανοσωλήνες άνθρακα ώστε να εξεταστεί η επίδραση τους τόσο στην μηχανική όσο και στην βιολογική συμπεριφορά των ικριωμάτων. Το βασικό ζητούμενο της εργασίας ήταν ο προσδιορισμός των βέλτιστων παραμέτρων σύνθεσης οι οποίες θα οδηγούσαν σε ικριώματα με το επιθυμητό πορώδες (από πλευράς μεγέθους αλλά και

διασυνδεσιμότητας), μηχανική συμπεριφορά αντίστοιχη με αυτή του φυσικού οστού, τα οποία θα ήταν βιοαποικοδομήσιμα. Οι διαφορετικές παράμετροι σύνθεσης αφορούσαν το μοριακό βάρος του οξειδίου του πολυαιθυλενίου, τις ημέρες πολυμερισμού του, την ύπαρξη ή μη νανοσωλήνων άνθρακα αλλά και το στάδιο ενσωμάτωσής τους.

Η δομή και η συμπεριφορά των ικριωμάτων εξετάστηκε εκτενέστατα. Το μέγεθος, η διαδυνδεσιμότητα και η διασπορά του εσωτερικού πορώδους του υλικού εξετάστηκε μέσω Ηλεκτρονική Μικροσκοπία Σάρωσης, και Υπολογιστική Μικροτομογραφία Ακτίνων Χ. Η χημική σύσταση και ο σχηματισμός υδροξυαπατίτη εξετάστηκε μέσω Φασματοσκοπία Περίθλασης Ακτίνων Χ. Η μηχανική τους συμπεριφορά μελετήθηκε μέσω δοκιμών συμπίεσης και αντοχής σε υδατικά περιβάλλοντα. Τέλος, στο εσωτερικό των ικριωμάτων έγινε καλλιέργεια καρκινικών κυττάρων της σειράς MG-63 έτσι ώστε να επιβεβαιωθεί η βιοσυμβατότητα τους και να συγκριθούν μεταξύ τους όσον αφορά την προώθηση της ανάπτυξης του κυτταρικού πλυθισμού.

Abstract

Bone tissue engineering has emerged as a promising approach for bone repair. Scaffolding outclasses common procedures (autograft ,allograft) because of the abundance of materials, lower risk of immune rejection and the elimination of a second surgery to harvest the bone implant. As a result, biodegradable nanomaterials that can promote bone growth while providing mechanical support have become of the utmost importance. In this work 3D scaffolds consisting of hydroxyapatite (HA), chitosan (chit) and polyethylene oxide (PEO) were produced by freeze-drying. The HA/chit powder was produced using a biomimetic method and cross-linked with PEO in a molar ratio of PEO/chit 1/ 2.5 before being freeze-dried. The optimal molecular weight of the polymer and the parameters of freeze-drying were investigated in order to produce a scaffold with the desired mean pore size, pore interconnectivity, mechanical behaviour and biodegradability. The artificial scaffolds structure as well as their biological and mechanical behaviour were closely examined. Pore size and interconnection were examined through Scanning Electron Microscopy and CT microscan. In terms of other physicochemical properties X-Ray Diffraction was conducted. As far as mechanical properties are concerned, the scaffolds were put through compression tests. Finally, attachment and cell viability assays were conducted on osteoblasts of the MG63 cell line.

Ευχαριστίες

Ευχαριστώ θερμά την Καθηγήτρια του τμήματος Μηχανικών Μεταλλείων Μεταλλουργών κ. Τσετσέκου Αθηνά για την συνεχή της βοήθεια και καθοδήγηση αλλά και την εμπιστοσύνη που μου έδειξε καθ' όλη την διάρκεια της παρούσας εργασίας. Χωρίς την συμβολή της η διεκπεραίωση ενός τόσο απαιτητικού εγχειρήματος θα ήταν αδύνατη.

Επιπλέον, ευχαριστώ τον Καθηγητή της σχολής Μηχανολόγων Μηχανικών κ. Αλεξόπουλο Λεωνίδα και τα μέλη του εργαστηρίου Εμβιομηχανικής και Συστημικής Βιολογίας για την εκμάθηση των τεχνικών καλλιέργειας κυττάρων αλλά και άλλων βιολογικών δοκιμών η πραγματοποίηση των οποίων θα ήταν ανέφικτη χωρίς την αρωγή τους.

Στην συνέχεια θα ήθελα να ευχαριστήσω τον κ, Παπαδόπουλο Τριαντάφυλλο Καθηγητή της Οδοντιατρικής Σχολής για το ενδιαφέρον που έδειξε για την εργασία μου και την συμβολή του σε πολλές από τις δοκιμές που πραγματοποιήθηκαν σε αυτήν.

Ειδική μνεία αρμόζει στην μεταπτυχιακή φοιτήτρια Μαριάννα Πάνου η οποία με εκπαίδευσε στις εργαστηριακές πρακτικές της εργασίας και ήταν άψογη συνεργάτις σε όλη την πορεία της εργασίας μου.

Τέλος θα ήθελα να ευχαριστήσω την οικογένεια και όλα τα κοντινά μου πρόσωπα για την ηθική τους στήριξη στην πορεία των φοιτητικών μου χρόνων.

Περιεχόμενα

Ευρετήριο εικόνων	9
Ευρετήριο πινάκων.....	11
ΘΕΩΡΗΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ.....	13
1. Βιοϋλικά	13
1.1 Κατηγορίες βιοϋλικών.....	13
1.2 Μηχανική Ιστών	17
2. Το οστό.....	20
2.1 Ο οστίτης ιστός.....	20
2.2 Τα δομικά συστατικά του οστού	20
2.3 Τύποι οστού.....	28
2.4 Μηχανισμός οστικής ανακατασκευής.....	30
2.5 Οι Μηχανικές ιδιότητες του οστού.....	34
3. Τα υλικά	35
3.1 Υδροξυαπατίτης	35
3.2 Νανοσωλήνες άνθρακα (Carbon nanotubes – CNT).....	39
3.3 Χιτοζάνη.....	42
3.4 L-αργινίνη.....	45
3.5 Οξείδιο του πολυαιθυλενίου (PEO)	46
ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ.....	49
1. Πειραματική διαδικασία.....	49
1.1. Εργαστηριακός εξοπλισμός και αντιδραστήρια	49
1.2 Παρασκευή σκόνης υδροξυαπατίτη/ χιτοζάνης/ L-αργινίνης	50
1.3 Διαδικασία χημικής διασύνδεσης σκόνης και Poly(ethyleneoxide) (PEO).....	55
1.4 Ενσωμάτωση νανοσωλήνων άνθρακα.....	56
1.5 Κωδικοποίηση ικριωμάτων	57
2. Δοκιμές με σκοπό τον καθορισμό των βέλτιστων παραμέτρων σύνθεσης των ικριωμάτων	58
2.1. Ηλεκτρονική μικροσκοπία (SEM).....	58
2.2 Περιθλασιμετρία Ακτίνων X (XRD).....	65
2.3 Δοκιμή αντοχής σε υδατικό περιβάλλον	70
2.4 Υπολογιστική Μικροτομογραφία Ακτίνων X (micro - CT).....	71
3. Βιολογική και μηχανική συμπεριφορά.....	73
3.1 Υπολογισμός προσρόφησης νερού και διόγκωσης	73
3.2 Κυτταροκαλλιέργεια.....	74

3.3. Μηχανικές ιδιότητες.....	81
Αποτελέσματα και συζήτηση	83
Περιθλασιμετρία ακτίνων Χ.....	83
Ηλεκτρονική μικροσκοπία σάρωσης.....	86
Υπολογιστική Μικροτομογραφία Ακτίνων Χ (micro - CT).....	91
Δοκιμή αντοχής σε υδατικά περιβάλλοντα	96
Υπολογισμός προσρόφησης νερού και διόγκωσης	97
Έλεγχος κυτταρικής βιωσιμότητας-Resazurin assays	99
Παρατήρηση των κυτταροκαλλιιεργειών στο SEM	101
Δοκιμή μονοαξονικής θλίψης.....	104
Συμπεράσματα.....	107
Βιβλιογραφία.....	110

Ευρετήριο εικόνων

Εικόνα 1 Σημεία του σώματος η λειτουργία των οποίων βελτιώνεται μέσω των βιοϋλικών	15
Εικόνα 2 Τρόπος εφαρμογής των βιοϋλικών στην ιστική αναγέννηση	17
Εικόνα 3 Σχηματική απεικόνιση της διαδικασίας ανάπλασης του οστίτη ιστού.....	18
Εικόνα 4 Τα δομικά τμήματα του οστού.....	21
Εικόνα 5 Η μορφή των κυττάρων του οστίτη ιστού.....	23
Εικόνα 6 Η δομή του οστού	29
Εικόνα 7 Τα στάδια οστικής αναδόμησης.....	32
Εικόνα 8 Η κρυσταλλική δομή του υδροξυαπατίτη	36
Εικόνα 9 Πορώδες ικρίωμα υδροξυαπατίτη.....	38
Εικόνα 10 Οι ιδιότητες των νανοσωλήνων άνθρακα και οι ιδιότητες στις οποίες αυτές μεταφράζονται.....	40
Εικόνα 11 Δομή και ιδιότητες της χιτοζάνης	42
Εικόνα 12 Ο πολυμερισμός του οξειδίου του αιθυλενίου	46
Εικόνα 13 Το διάγραμμα φάσεων του νερού	53
Εικόνα 14 Φαινόμενα αλληλεπίδραση δέσμης ηλεκτρονίων - δείγματος.....	61
Εικόνα 15 Βασικά τμήματα Ηλεκτρονικού Μικροσκοπίου Σάρωσης.....	64
Εικόνα 16 Σχηματική απεικόνιση του νόμου του Bragg.....	67
Εικόνα 17 Το περιθλασιόμετρο ακτίνων Χ.....	70
Εικόνα 18 Η αναγωγή της ρεσαζουρίνης σε ρεσορουφίνη	79
Εικόνα 19 Η οργανολογία του μηχανήματος μονοαξονικής θλίψης.....	81
Εικόνα 20 Χαρακτηριστικό φάσμα XRD τρισδιάστατα ικρίωματα Hap/Chit/L-arg/PEO χωρίς προσθήκη CNT.....	83
Εικόνα 21 Χαρακτηριστικό φάσμα XRD τρισδιάστατα ικρίωματα Hap/Chit/L-arg/PEO με προσθήκη CNT στο τελικό αιώρημα.....	84
Εικόνα 22 Χαρακτηριστικό φάσμα XRD τρισδιάστατα ικρίωματα Hap/Chit/L-arg/PEO με προσθήκη CNT στο αιώρημα χιτοζάνης	84
Εικόνα 23 Εικόνες SEM της εσωτερικής πορώδους δομής ικριωμάτων τύπου NP2MA1D	87
Εικόνα 24 Εικόνες SEM της εσωτερικής πορώδους δομής ικριωμάτων τύπου NP2MA1D (2)...	87
Εικόνα 25 Εικόνα SEM της εσωτερικής πορώδους δομής ικριωμάτων τύπου NP2MA1D (3)....	87
Εικόνα 26 Εικόνες SEM της εσωτερικής πορώδους δομής ικριωμάτων τύπου NCP6A2D	88
Εικόνα 27 Εικόνες SEM της εσωτερικής πορώδους δομής ικριωμάτων τύπου NCP6A2D (2)....	88
Εικόνα 28 Εικόνες SEM της εσωτερικής πορώδους δομής ικριωμάτων τύπου NCP6A2D (3)....	88
Εικόνα 29 Εικόνες SEM της εσωτερικής πορώδους δομής ικριωμάτων τύπου NC9A1D.....	89
Εικόνα 30 Εικόνες SEM της εσωτερικής πορώδους δομής ικριωμάτων τύπου NC9A1D (2).....	89
Εικόνα 31 Εικόνες SEM της εσωτερικής πορώδους δομής ικριωμάτων τύπου NC9A1D (3).....	89
Εικόνα 32 Εικόνες SEM της εσωτερικής πορώδους δομής ικριωμάτων τύπου CCP9A2D.....	90
Εικόνα 33 Εικόνες SEM της εσωτερικής πορώδους δομής ικριωμάτων τύπου CCP9A2D (2)....	90
Εικόνα 34 Εικόνες SEM της εσωτερικής πορώδους δομής ικριωμάτων τύπου CCP9A2D (3)....	90
Εικόνα 35 Οι εγκάρσιες τομές των ικριωμάτων: a)NP2MA1D, b)CC9A2D, c)NC6A2D	91
Εικόνα 36 Τρισδιάστατη αναπαράσταση του ικριωματος NP2MA1D.....	93
Εικόνα 37 Τρισδιάστατη αναπαράσταση του ικριωματος CCP9A2D	94
Εικόνα 38 Τρισδιάστατη αναπαράσταση του ικριωματος NCP6A2D	95
Εικόνα 39 Τα αποτελέσματα της μελέτης κυτταροτοξικότητας	100

Εικόνα 40: Εικόνα SEM κυττάρου εντός του ικριώματος CCP9A2D	103
Εικόνα 41 Εικόνα SEM κυττάρου εντός του ικριώματος NP2MA1D	103
Εικόνα 42 Εικόνα SEM όπου φαίνονται τα χαρακτηριστικά φιλοπόδια εντός του ικριώματος NCP6A2D	104
Εικόνα 43 Οι καμπύλες τάσης-παραμόρφωσης των τριών ειδών ικριωμάτων	105

Ευρετήριο πινάκων

Πίνακας 1 Παραδείγματα βιοϋλικών.....	15
Πίνακας 2 Οι μηχανικές ιδιότητες του φλοιώδους οστού	34
Πίνακας 3 Ο ρόλος που διαδραματίζει το ΡΕΟ στις εκάστοτε εφαρμογές του.....	48
Πίνακας 4 Τα αποτελέσματα της δοκιμής προσρόφησης νερού και διόγκωσης των ικριωμάτων NR2MA1D.....	97
Πίνακας 5 Τα αποτελέσματα της δοκιμής προσρόφησης νερού και διόγκωσης των ικριωμάτων NCP6A2D	98
Πίνακας 6 Τα αποτελέσματα της δοκιμής προσρόφησης νερού και διόγκωσης των ικριωμάτων CCP9A2D.....	98
Πίνακας 7 Η θλιπτική αντοχή των ικριωμάτων.....	106

ΘΕΩΡΗΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

1. Βιοϋλικά

Ο πιο αποδεκτός ορισμός για τα βιοϋλικά έχει διατυπωθεί από το Εθνικό Ινστιτούτο Υγείας των ΗΠΑ και ορίζει ως βιοϋλικό κάθε ουσία ή συνδυασμό ουσιών, φυσικής ή συνθετικής προέλευσης, η οποία μπορεί να χρησιμοποιηθεί για μερική ή ολική αντικατάσταση και βελτίωση της λειτουργίας οποιουδήποτε ιστού ή οργάνου ζωντανών οργανισμών. Η επιστήμη των βιοϋλικών αποσκοπεί στην βελτίωση της ποιότητας ζωής των οργανισμών και είναι ένα αμάλγαμα πλειάδας επιστημών. Πιο συγκεκριμένα, συνδυάζει αρχές Ιατρικής, Βιολογίας, Χημείας, Ιστικής Μηχανικής και Επιστήμης Υλικών. [1]

Το τέλειο βιοϋλικό οφείλει να πληροί τις παρακάτω προϋποθέσεις:

1. Βιοσυμβατότητα
2. Μηχανική συμπεριφορά ανάλογη με τον ιστό ή το όργανο που θα αντικαταστήσουν
3. Μεγάλη αντοχή στην κόπωση (fatigue life)
4. Κατάλληλο βάρος και πυκνότητα
5. Χαμηλό κόστος και αναπαραγωγισιμότητα κατασκευής [2]

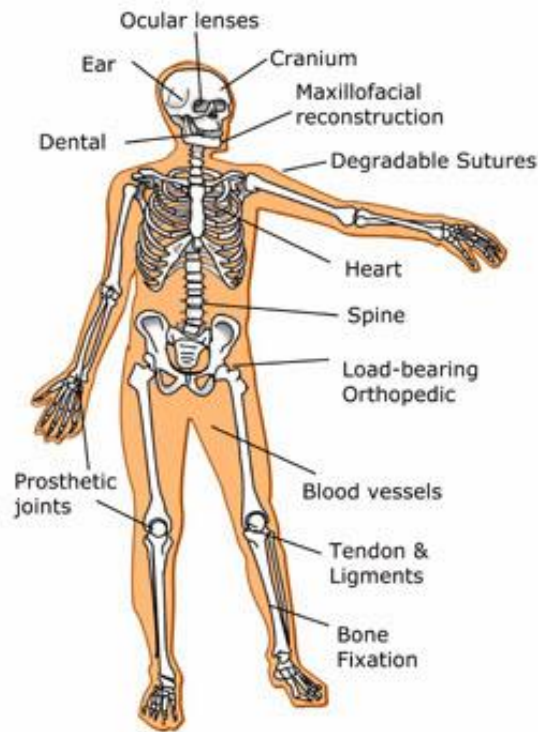
1.1 Κατηγορίες βιοϋλικών

Τα βιοϋλικά κατατάσσονται σε κατηγορίες ανάλογα με το υλικό κατασκευής αλλά και τον τρόπο αλληλεπίδρασης με τους ζωντανούς οργανισμούς. Παρακάτω παρατίθενται οι κατηγορίες με γνώμονα την πρώτη ειδοποιό διαφορά.

- **Μεταλλικά βιοϋλικά:** τέτοιου είδους υλικά χρησιμοποιούνται κυρίως ως παθητικά υποκατάστατα σκληρών ιστών, όπως ο οστικός, κυρίως λόγω των καλών μηχανικών τους ιδιοτήτων αλλά και της αντοχής τους στη διάβρωση. Πολλά μεταλλικά στοιχεία δεν είναι τοξικά για τον οργανισμό σε ορισμένες περιπτώσεις. Εκεί ελλοχεύει κίνδυνος από προϊόντα διάβρωσης μεταλλικών εμφυτευμάτων τόσο λόγω τοξικότητας αλλά και λόγω της πιθανότητας τραυματισμού ιστών και οργάνων. Τα μεταλλικά βιοϋλικά βρίσκουν εφαρμογή ως οστικές πλάκες και βίδες, σε κατάγματα γόνατος και ισχίου και σε οδοντικά εμφυτεύματα. [3]
- **Κεραμικά βιοϋλικά:** Τα τελευταία 100 χρόνια έχουν ανακαλυφθεί καινοτόμες μέθοδοι παρασκευής κεραμικών υλικών. Έτσι, τα προβλήματα ψαθυρότητας και χαμηλής εφελκυστικής αντοχής τους έχουν ξεπεραστεί, διευρύνοντας το πεδίο χρήσης σε προηγμένες εφαρμογές. Τα βιοκεραμικά βρίσκουν εφαρμογή, κυρίως, ως υποκατάστατα οστού και σε οδοντικές κορώνες λόγω του συνδυασμού βιοσυμβατότητας, αντοχής σε διάβρωση και θλιπτικών φορτίων και της εξαιρετικής αισθητικής τους εμφάνισης. [4]
- **Πολυμερή βιοϋλικά:** Η μακροσκελής αλυσίδα επαναλαμβανόμενων μονομερών οδηγεί σε υλικά με σύνθετες ιδιότητες. Στην επιστήμη των βιοϋλικών χρησιμοποιούνται περισσότερο σύνθετα παρά φυσικά πολυμερή λόγω της δυνατότητας επιλεκτικής πρόσδοσης ιδιοτήτων (π,χ, υδροφοβία) στο τελικό υλικό. Τα πολυμερή χρησιμοποιούνται σε υλικά στοχευμένα σε οστικές, οδοντικές και καρδιακές εφαρμογές. [5]
- **Σύνθετα βιοϋλικά:** είναι βιοϋλικά που προκύπτουν από συνδυασμό 2 ή περισσότερων από τις παραπάνω κατηγορίες.

Πίνακας 1 Παραδείγματα βιοϋλικών

Μεταλλικά βιοϋλικά	Ανοξειδωτοι χάλυβες, κράματα τιτανίου και κοβαλτίου, χρυσός
Κεραμικά βιοϋλικά	Αλούμινα, ζirkονία, βιοενεργά γυαλιά, υδροξυαπατίτης
Πολυμερή βιοϋλικά	Κολλαγόνο, ηπαρίνη, πολυπροπυλένιο, PEG/PEO



Εικόνα 1 Σημεία του σώματος η λειτουργία των οποίων βελτιώνεται μέσω των βιοϋλικών

Επιπλέον κατηγοριοποίηση των βιοϋλικών γίνεται με βάση τον τρόπο με τον οποίο αλληλεπιδρούν με τον οργανισμό στον οποίο εισέρχονται, ως εξής:

- **Βιοαδρανή** ονομάζονται τα υλικά που διατηρούν τις φυσικοχημικές και μηχανικές τους ιδιότητες καθ' όλη τη διάρκεια της εμφύτευσης τους στον οργανισμό.

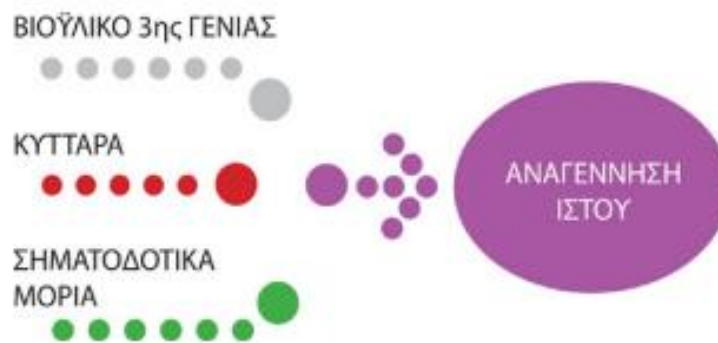
Αλληλεπιδρούν ελάχιστα με ιστούς και όργανα, έτσι χρησιμοποιούνται ως εμφυτεύματα υποστήριξης.

- **Βιοενεργά** ονομάζονται τα υλικά που μετά την εμφύτευση σχηματίζουν ισχυρούς δεσμούς με τους περιβάλλοντες ιστούς εξ ου και βρίσκουν εφαρμογή σε επικαλύψεις.
- **Βιοαποικοδομήσιμα** ονομάζονται τα υλικά που μετά την εμφύτευση αποικοδομούνται ενόσω υποκαθίστανται από ενδογενείς ιστούς.

Η ανάπτυξη της τεχνολογίας των βιοϋλικών διέπεται από τρία χαρακτηριστικά στάδια. Στην «πρώτη γενιά», η οποία χρονολογείται στα μέσα του 20^{ου} αιώνα, χρησιμοποιήθηκαν υλικά τα οποία ήταν ευρέως διαθέσιμα και δεν είχαν φτιαχτεί αποκλειστικά για ιατρικές εφαρμογές. Επιλέγονταν λόγω του συνδυασμού των επιθυμητών μηχανικών ιδιοτήτων και της βιοαδράνειας τους. Χαρακτηριστικά παραδείγματα βιοϋλικών αυτής της γενιάς είναι η χρήση ελαστομερών και πυρολυτικού άνθρακα ως υλικά επικαλύψεων.

Στην συνέχεια, η ανάπτυξη της τεχνολογίας σε συνδυασμό με την ύπαρξη συγκεκριμένων δυνατικών εφαρμογών οδήγησε στην δημιουργία της «δεύτερης γενιάς» βιοϋλικών η οποία αποσκοπούσε στην ελεγχόμενη αλληλεπίδραση με τους ιστούς στους οποίους θα εμφυτεύονταν. Τα πρώτα βιοενεργά υλικά -ύαλοι και κεραμικά- ήταν σε κλινική χρήση σε ορθοπεδικές και οδοντιατρικές εφαρμογές, αλλά και σε εφαρμογές ελεγχόμενης απελευθέρωσης φαρμακευτικών ουσιών. Η δεύτερη γενιά βιοϋλικών εμπεριείχε και τα πρώτα βιοδιασπώμενα υλικά με ρυθμούς αποδόμησης ανάλογους με την εκάστοτε εφαρμογή.

Η «τρίτη γενιά» βιοϋλικών χαρακτηρίζεται από πολύ εξελιγμένη τεχνολογία που επιτρέπει την παραγωγή εξατομικευμένων υλικών για τον εκάστοτε ασθενή. Αυτά στοχεύουν σε πολύ ακριβείς αντιδράσεις με πρωτεΐνες και κύτταρα σε μοριακό επίπεδο. Χαρακτηριστικό παράδειγμα αποτελεί η ανάπτυξη ικριωμάτων που μπορούν να εμβολιαστούν με κύτταρα *in vitro* πριν την εμφύτευσή τους, δίνοντας έτσι την ευκαιρία ελεγχόμενης αναγέννησης του ιστού. [6] [2]

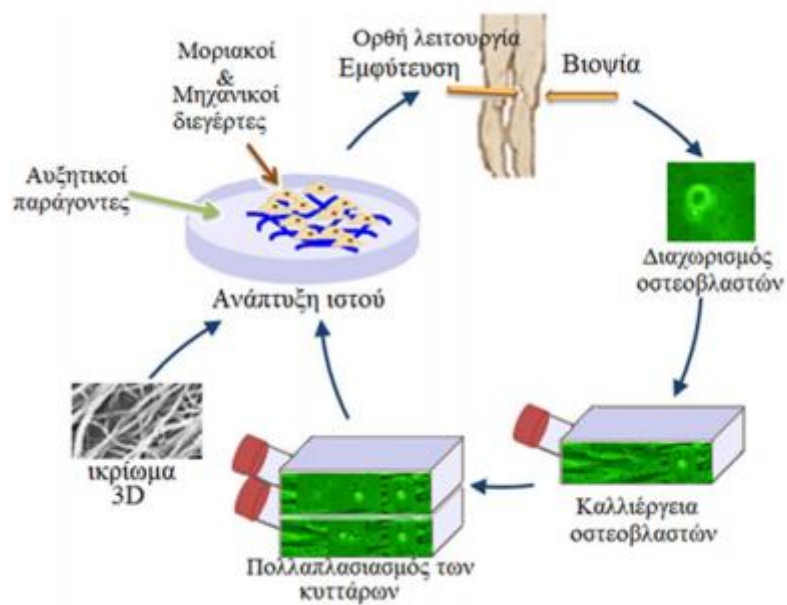


Εικόνα 2 Τρόπος εφαρμογής των βιοϋλικών στην ιστική αναγέννηση

1.2 Μηχανική Ιστών

Ως μηχανική ιστών έχει οριστεί ένας διεπιστημονικός τομέας που εφαρμόζει τις αρχές της μηχανικής και των επιστημών υγείας για την αποκατάσταση του ανθρώπινου μυοσκελετικού ιστού. Στην ανάπτυξη ιστών και οργάνων, τα βιοϋλικά χρησιμοποιούνται ως μόνιμα ή απορροφήσιμα ικριώματα (scaffolds), για την ανάπτυξη κυττάρων (ανάπτυξη χόνδρου) ή ως συσκευές μεταφοράς φαρμάκων (drug-delivery devices). Χαρακτηριστικό παράδειγμα μέσω του οποίου επεξηγείται το *modus operandi* της ιστικής μηχανικής είναι η παραγωγή ικριωμάτων από διάφορα υλικά σε κατάλληλα σχήματα και μορφολογίες για την βελτίωση της λειτουργίας ή την πλήρη αποκατάσταση συγκεκριμένων ιστών και οργάνων.

Η πρώτη φάση του σχεδιασμού είναι η *in vitro* καλλιέργεια κυττάρων και ο εμβολιασμός τους εντός του ικριώματος, παρουσία του κατάλληλου θρεπτικού υλικού και κατά περίπτωση παραγόντων που ευνοούν την ανάπτυξη του κυτταρικού πληθυσμού. Σκοπός των ερευνητών σε αυτό το στάδιο είναι ο πολλαπλασιασμός και η διαφοροποίηση των κυττάρων και η εναπόθεση εξωκυττάριας θεμέλιας ουσίας από αυτά ενώ παράλληλα το ικρίωμα αποδομείται με τον ίδιο ρυθμό.



Εικόνα 3 Σχηματική απεικόνιση της διαδικασίας ανάπλασης του οστίτη ιστού

Η παραπάνω μέθοδος εφαρμόζεται στον κλάδο της Ιστικής Μηχανικής για την κατασκευή οστικών ικριωμάτων και κατά συνέπεια μοςχευμάτων οστών. Ένα οστικό μόσχευμα θα πρέπει όχι μόνο να έχει κατάλληλο μάκρο και μικρο-πορώδες και να είναι βιοαποικοδομήσιμο, αλλά να πληροί ταυτόχρονα και τους επιμέρους παράγοντες της οστεοαγωγιμότητας, της οστεοεπαγωγικότητας και της οστεογενετικότητας, έτσι ώστε να επιτυγχάνεται όσο το δυνατόν καλύτερη οστεοενσωμάτωση, δηλαδή σύνδεση μεταξύ της φυσικής οστικής μήτρας και της σύνθετης μήτρας του εμφυτεύματος.

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

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

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

Τέλος, βασική προϋπόθεση για ένα οστικό εμφυτεύματα είναι να παρουσιάζει μηχανικές ιδιότητες παρόμοιες με αυτές του φυσικού οστού έτσι ώστε να μπορεί να αντέξει τα σύνθετα φορτία στα οποία θα υπόκειται. Η αντοχή των οστών βέβαια εξαρτάται από πολλούς παράγοντες, όπως την τοποθεσία και τον ρόλο τους αλλά και αν πρόκειται για συμπαγή ή δοκιδώδη οστά. Συνεπώς το εκάστοτε οστικό ικρίωμα πρέπει να σχεδιάζεται έχοντας ως σημείο αναφοράς το τμήμα του οστού το οποίο θα αντικαταστήσει. [7]

2. Το οστό

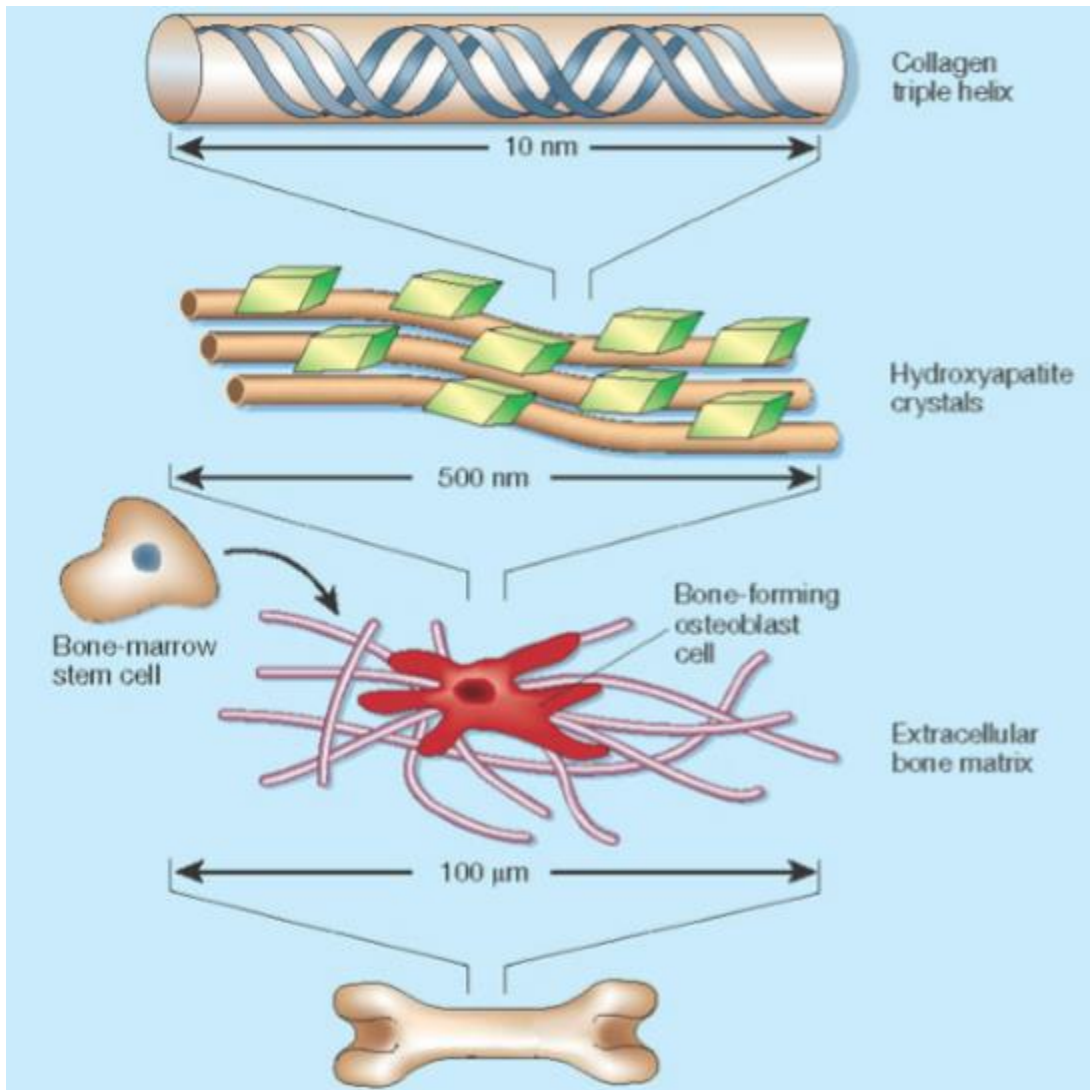
2.1 Ο οστίτης ιστός

Ο συνδετικός αυτός ιστός διαδραματίζει εξαιρετικά σημαντικό και πολυσύνθετο ρόλο στους ζωντανούς οργανισμούς. Αρχικά αναλαμβάνει την μηχανική στήριξη του σκελετού και πάνω σε αυτόν προσδένονται οι μύες και οι τένοντες, μέσω των οποίων επιτυγχάνεται η κίνηση. Επιπλέον, λόγω της -συγκριτικά- υψηλής του σκληρότητας λειτουργεί προστατεύοντας τα όργανα. Χαρακτηριστικό παράδειγμα αποτελούν τα οστά της καρδιακής και κρανιακής κοιλότητας τα οποία προστατεύουν, αντίστοιχα, την καρδιά και τον εγκέφαλο. Το ίδιο σημαντική είναι η συμβολή των οστών στην διατήρηση της ομοιόστασης του οργανισμού. Τα οστά μπορούν να λειτουργήσουν ως «δεξαμενή στοιχείων» δίνοντας ιόντα, κυρίως ανθρακικά και φωσφορικά, σε άλλους ιστούς και όργανα που πιθανώς έχουν ανάγκη. Τέλος, στα διάκενα των οστών φυλάσσεται ο μυελός όπου παράγονται τα περισσότερα κύτταρα του αίματος.

2.2 Τα δομικά συστατικά του οστού

Το φυσικό οστό μπορεί να χαρακτηριστεί ως ένα σύνθετο υλικό που αποτελείται από τρεις διαφορετικές φάσεις που δημιουργούν ένα σύμπλεγμα. Η οργανική φάση που συνθέτει το 20-30% κ.β. της συνολικής οστικής μάζας, αποτελείται κυρίως από κολλαγόνο τύπου I και λιγότερο από ένα σύνολο μη κολλαγονούχων πρωτεϊνών, κυττάρων και μυελού. Η ανόργανη φάση συνιστά το 60-70% κ.β. της μάζας του οστού και αποτελείται από ένα άλας του φωσφόρου το οποίο προσομοιάζει εξαιρετικά τόσο χημικά όσο και δομικά τον

γεωλογικό υδροξυαπατίτη $[Ca_{10}(PO_4)_6(OH)_2, HAP]$ και γι' αυτό το λόγο ονομάζεται συνήθως ως βιοαπατίτης. Τέλος, το υπόλοιπο κατά βάρος ποσοστό του οστού συμπληρώνεται από νερό, η ποσότητα του οποίου καθορίζει την μηχανική συμπεριφορά του εκάστοτε οστού. Οι παραπάνω φάσεις περιγράφονται αναλυτικά στη συνέχεια. [8]



Εικόνα 4 Τα δομικά τμήματα του οστού

i. Η οργανική φάση

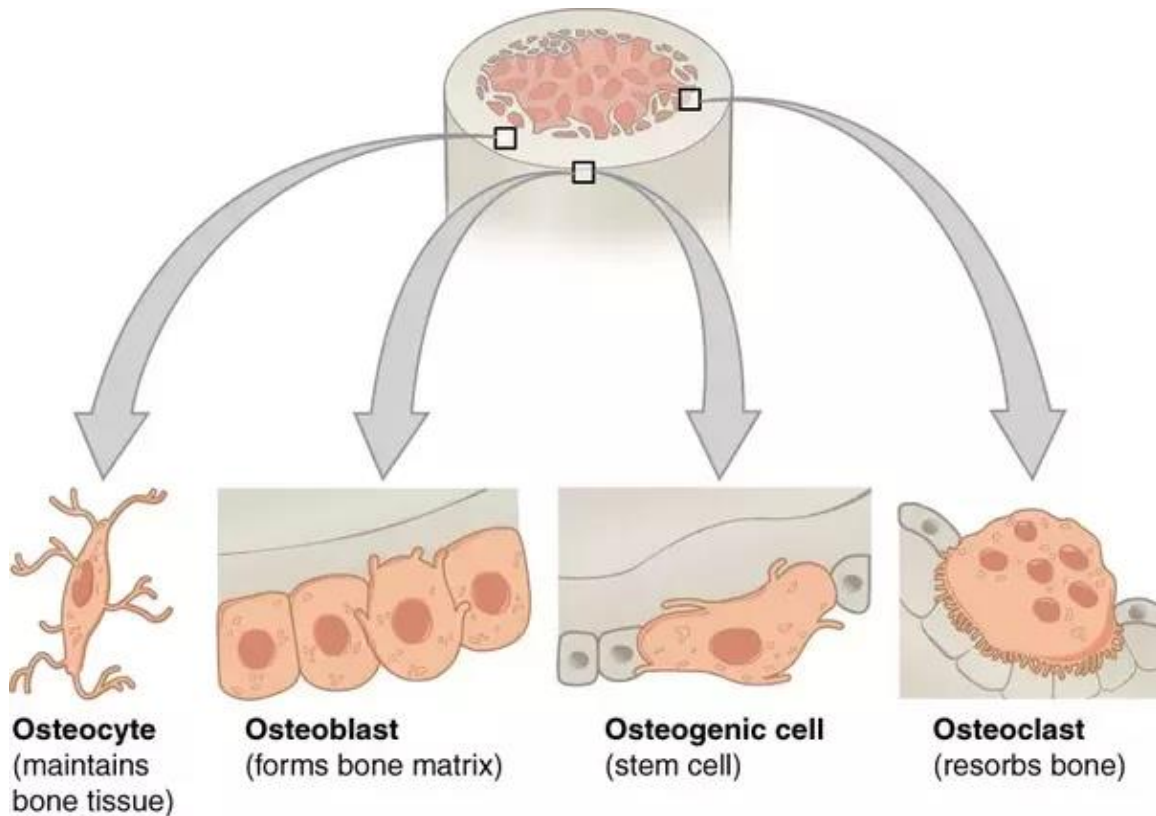
Η οργανική φάση είναι αυτή που καθορίζει κυρίως τις βιοχημικές ιδιότητες του οστού μέσω των πρωτεϊνών και του **κολλαγόνου τύπου I** από τα οποία αποτελείται. Το κολλαγόνο είναι η πιο συχνά απαντώμενη πρωτεΐνη στον ανθρώπινο οργανισμό και το μεγαλύτερο μέρος του εμφανίζεται στα οστά. Το κολλαγόνο απαντάται σε 19 διαφορετικές μορφές στο ανθρώπινο σώμα, αλλά μόνο ο τύπος I του κολλαγόνου υπάρχει στα οστά. Η σύνθεση του κολλαγόνου πραγματοποιείται στο εσωτερικό των κυττάρων, με τη μορφή ενός μορίου που ονομάζεται προκολλαγόνο. Ακολούθως, το προκολλαγόνο οδηγείται εκτός κυττάρου, υδρολύεται, ενώ μειώνεται και το μήκος του με την απομάκρυνση κάποιων αμινοξέων του από τα άκρα και έτσι μετατρέπεται σε κολλαγόνο.

Μελέτες στα μέσα του 20^{ου} αιώνα μας έδωσαν πληροφορίες σχετικά με την δομή του κολλαγόνου. Πρόκειται για μία μεγάλη πρωτεΐνη με μήκος 300 nm, πλάτος 1,5 nm και μάζα 300 kDa. Το μόριο του κολλαγόνου αποτελείται από 3 αλυσίδες (οι δύο εκ των οποίων είναι όμοιες) που σχηματίζουν μια τρισδιάστατη δεξιόστροφη έλικα και ενώνονται μεταξύ τους με δεσμούς υδρογόνου. Οι τρεις αλυσίδες αποτελούνται από 1014 αμινοξέα έκαστη. Το βασικό χαρακτηριστικό των αλληλουχιών αμινοξέων σε αυτές τις αλυσίδες είναι πως το αμινοξύ γλυκίνη (Gly) επαναλαμβάνεται ανά 3 αμινοξέα.

Πέρα από το κολλαγόνο στην οργανική φάση του οστού συνθέτουν περί τις 200 **μη κολλαγονούχες πρωτεΐνες**. Μια τέτοια είναι και η οστεοκαλσίνη που χρησιμοποιείται και στην μηχανική ιστών ως δείκτης οστεοσύνθεσης. Αυτή λειτουργεί ως σημείο πρόσδεσης ιόντων ασβεστίου, συμβάλλοντας στην ασβεστοποίηση του κολλαγόνου. Επιπλέον, συμβάλλει στον καθορισμό του ρυθμού σύνθεσης νέου οστού. Μερικές από τις υπόλοιπες πρωτεΐνες που συναντώνται στο οστό είναι οι ιντεγκρίνες που έχουν την ικανότητα να

ανοίγουν την κυτταρική μεμβράνη και να συνδέουν το εξωκυττάριο περιβάλλον με τον κυτταροσκελετό.

Σημαντικό κομμάτι της οργανικής φάσης αποτελούν τα **κύτταρα του οστίτη ιστού** τα οποία παρουσιάζονται παρακάτω.



Εικόνα 5 Η μορφή των κυττάρων του οστίτη ιστού

- **Οστεοβλάστες:** Πρόκειται για κύτταρα μεγέθους γύρω στα 20-30 μm τα οποία είναι υπεύθυνα για την απόθεση της οργανικής εξωκυττάριας μήτρας και της ασβεστοποίησής της. Γι' αυτό το λόγο παρατηρούνται συνήθως σε περιοχές που συμβαίνει ασβεστοποίηση. Χαρακτηρίζονται από δομή που περιλαμβάνει

εκτεταμένο ενδοπλασματικό δίκτυο και άλλα κυτταρικά χαρακτηριστικά τα οποία είναι σύμφωνα με το ρόλο τους ως κύτταρα πρωτεϊνικής σύνθεσης και έκκρισης πρωτεϊνών. Βρίσκονται πάνω στις ελεύθερες οστικές επιφάνειες και όταν διεγερθούν μεταβάλλουν το σχήμα τους σε στρογγυλό, ελλειψοειδές ή πολυεδρικό. Παρουσιάζουν κυτταροπλασματικές προεκβολές που επεκτείνονται μέσα στην θεμέλιο ουσία και φέρουν σε επικοινωνία τους οστεοβλάστες με τα οστεοκύτταρα.

- **Οστεοκλάστες:** Προέρχονται από αιμοποιητικά βλαστικά κύτταρα και δημιουργούνται από τη διαίρεση ενός μονοπύρηνου πρόγονου κυττάρου. Συνιστούν μεγάλα, ανώμαλου σχήματος κύτταρα με πολλούς πυρήνες, ενώ το κυτταρόπλασμά τους περιέχει πολλά μιτοχόνδρια που δίνουν στους οστεοκλάστες την απαραίτητη ενέργεια για την απορρόφηση (αποικοδόμηση) του ήδη σχηματισμένου οστού. Σε περιπτώσεις ελλείμματος ασβεστίου του οργανισμού ενεργοποιούνται οι οστεοκλάστες, απελευθερώνοντας τοπικά ένζυμα που αυξάνουν τη διαλυτότητα των κρυστάλλων του υδροξυαπατίτη αντλώντας την απαραίτητη ποσότητα ασβεστίου για τον οργανισμό. Είναι σχετικά μεγάλου μεγέθους (όγκου πάνω από $2 \times 10^5 \mu\text{m}^3$) ενώ διαθέτουν πάνω από 100 πυρήνες. Αφού επιτελέσουν το απορροφητικό έργο τους, οι οστεοκλάστες είτε μετακινούνται σε άλλη οστική επιφάνεια είτε διαιρούνται.

- **Οστεοκύτταρα:** Τα οστεοκύτταρα είναι ουσιαστικά απόγονοι των οστεοβλαστών. Πρόκειται για οστεοβλάστες οι οποίοι μετά τη διαδικασία σχηματισμού του οστού παρέμειναν σε κοιλότητες του νεοσχηματισθέντος οστού. Είναι δηλαδή, 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. Αποτελούν την συντριπτική πλειοψηφία των κυττάρων του σκελετού. Μέσω της πλειάδας των κυτταροπλασματικών προεκβολών τους, μπορούν να επικοινωνούν με άλλα οστεοκύτταρα και οστεοβλάστες. Είναι συνεπώς πολύ σημαντικά ομοιοστατικά όργανα σε περιπτώσεις αλλαγής του περιβάλλοντος του οστού επειδή μπορούν να μεταφέρουν «μηνύματα» σε γειτονικά κύτταρα. Ο κύριος ρόλος τους είναι η συντήρηση της δομής και της σύστασης της εξωκυττάριας ουσίας, ενώ ο μεταβολικός τους ρυθμός και η παραγωγή τους υστερεί σε σχέση με των οστεοβλαστών.

Τέλος, σημαντικό κομμάτι της οργανικής φάσης των οστών αποτελεί ο **μυελός των οστών**. Είναι ένας μαλακός πολτώδης ιστός ο οποίος αποτελείται από ένα αραιό στρώμα ελεύθερων αιμοκυττάρων και αγγεία που συμπληρώνουν τα διάκενά του. Η σύνθεση του διαφέρει στα διάφορα οστά και στις διάφορες ηλικίες και εμφανίζεται σε δύο μορφές, τον ωχρο ή λιπώδη και τον ερυθρό μυελό. Κατά την εμβρυική ηλικία σ' όλο τον σκελετό υπάρχει ερυθρός μυελός του οποίου η χροιά οφείλεται στην αφθονία των αγγείων και των ερυθροκυττάρων. Μετά το πέμπτο έτος περίπου της ηλικίας του ανθρώπου ο ερυθρός

μυελός αντικαθίσταται σταδιακά από τον ανενεργό, σε σχέση με την αιμοποίηση, ωχρό μυελό. Από το εικοστό έως το εικοστό πέμπτο έτος της ηλικίας του ανθρώπου, ο ερυθρός μυελός παραμένει μόνο στους σπονδύλους, το στέρνο, τα πλευρά, στα οστά του ισχίου, του κρανίου και στο άνω άκρο του μηριαίου και του βραχιόνιου οστού. Στα υπόλοιπα τμήματα του σκελετού κυριαρχεί ο ωχρός (υποκίτρινος) ή λιπόδης μυελός, η χρωματική χροιά του οποίου οφείλεται στην παρουσία των πολυπληθών λιπωδών κυττάρων που αποτελούν το κύριο συστατικό του. Μέρος των αγγείων του είναι τριχοειδούς μεγέθους, το τοίχωμα των οποίων επιτρέπει την ελεύθερη δίοδο κυττάρων του ιστού μέσα στο αίμα.

[8]

ii. Η ανόργανη φάση

Η ανόργανη φάση του οστού αποτελείται τον βιοαπατίτη (BAP), ένα χημικό και δομικό ανάλογο του φυσικά σχηματιζόμενου ορυκτού άλατος υδροξυαπατίτη. Σύμφωνα με κάποιους ερευνητές ο όρος «απατίτης» προέρχεται από την ελληνική λέξη «απατώ». Ο χαρακτηρισμός αυτός οφείλεται στο γεγονός ότι τα συγκεκριμένα υλικά παρουσιάζουν περίεργη χημική σύσταση, μια και είναι πολύ συνηθισμένες οι χημικές αντικαταστάσεις των ιόντων τους, που καθιστούν δύσκολη την ταυτοποίηση της χημικής τους σύστασης και μπορεί να οδηγήσουν σε παρερμηνείες. [9] Ο υδροξυαπατίτης (Hap) με χημική σύνθεση $Ca_{10}(PO_4)_6(OH)_2$ είναι το λιγότερο διαλυτό και πιο σταθερό άλας του ασβεστίου και εξαιτίας της πολύ καλής βιοσυμβατότητας, βιοδραστικότητας και οστεοεπαγωγικότητας που εμφανίζει, χρησιμοποιείται ευρέως για την κατασκευή βιοκεραμικών και σύνθετων βιοϋλικών εμφυτευμάτων για ορθοπεδικές και οδοντιατρικές εφαρμογές. Στα βιολογικά συστήματα δεν υπάρχει καθαρός υδροξυαπατίτης, καθώς είναι

ιδιαίτερα δύσκολο να αποφευχθεί η ισόμορφη υποκατάσταση των ιόντων στο πλέγμα του, η οποία και πραγματοποιείται ώστε να σταθεροποιηθεί στην εξαγωνική κρυσταλλική δομή. Οι συνήθεις πλεγματικές υποκαταστάσεις που υφίστανται τα μόρια του υδροξυαπατίτη είναι των ιόντων Ca^{2+} από ιόντα Sr^{2+} και ιόντων PO_4^{3-} από ιόντα CO_3^{2-} και SO_4^{2-} , καθώς και η πιθανότητα δημιουργίας πλεγματικών κενών στις θέσεις των ιόντων Ca^{2+} και OH^- . Η αναλογία Ca/P στον φυσικό υδροξυαπατίτη είναι της τάξης του 1,5, ενώ στον συνθετικό της τάξης του 1,67. Ο υδροξυαπατίτης αποτελεί μια θερμικά ασταθή ένωση και εξαιτίας της παραπάνω ποικιλίας στην στοιχειομετρία του λόγω των υποκαταστάσεων που υφίσταται, το εύρος αποσύνθεσής του ορίζεται σε θερμοκρασίες από 800 °C έως 1200 °C. Αποτελεί ένα κεραμικό βιοϋλικό με πολύ χαμηλές μηχανικές ιδιότητες (σκληρότητα, αντοχή) και στην πυκνή μορφή του δεν διατηρείται για μεγάλα χρονικά διαστήματα σε συνθήκες έντονων φορτίων και τριβών. Εξαιτίας όμως της άριστης βιοσυμβατότητάς του και της ικανότητάς του να σχηματίζει άμεσους δεσμούς με τους σκληρούς ιστούς προωθώντας έτσι την ιστική αναδόμηση, χρησιμοποιείται πολύ συχνά από τον κλάδο της Ιστικής Μηχανικής σε συνδυασμό και με άλλα βιοϋλικά με σκοπό την κατασκευή σύνθετων εμφυτευμάτων και επικαλύψεων με άριστες βιολογικές και μηχανικές ιδιότητες. Ενδεικτικά η εμφύτευση σωματιδίων καθώς και πορωδών ικριωμάτων υδροξυαπατίτη σε οστικούς ιστούς έχει αποδειχτεί ότι μπορεί να οδηγήσει στο σχηματισμό νέων δικτυωτών οστικών πολυστρωμάτων σε διάστημα 4-8 εβδομάδων.

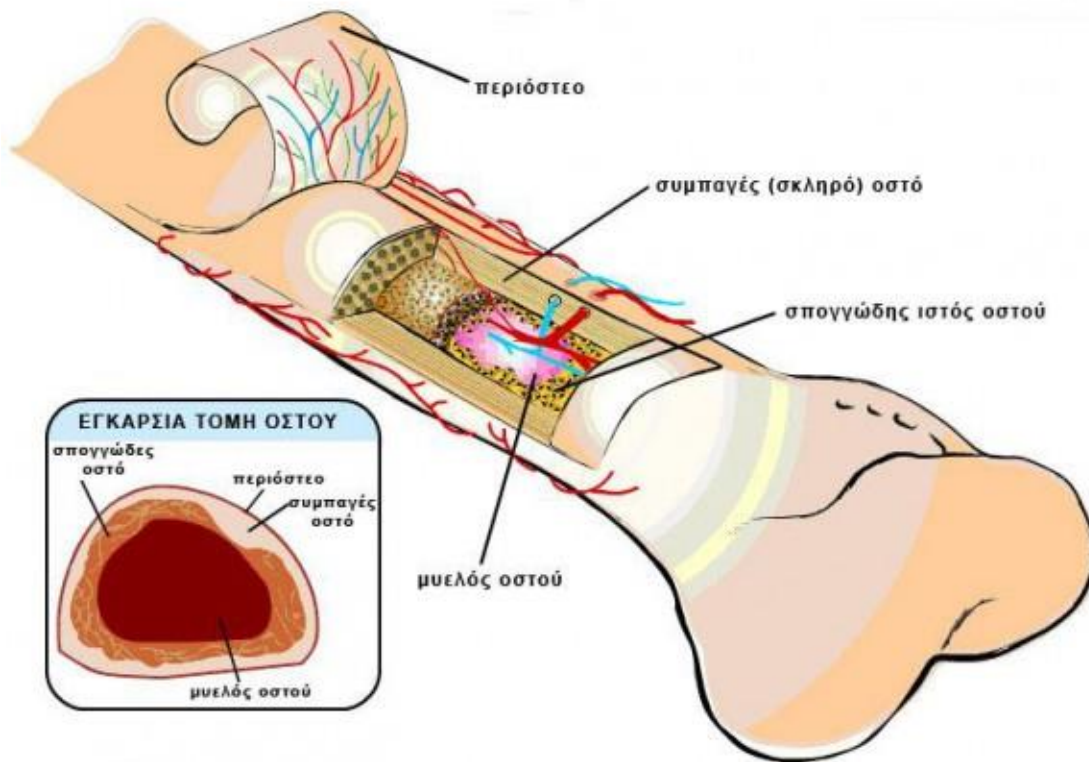
Αν και ο βιοαπατίτης και ο συνθετικός υδροξυαπατίτης εμφανίζουν πάρα πολλές ομοιότητες ως προς την δομή και την σύσταση τους, παρουσιάζουν και ορισμένες διαφορές, μικροσκοπικές και κρυσταλλογραφικές. Βασική διαφορά αποτελεί το μέγεθος κρυσταλλιτών. Ο ΒΑΡ έχει κρυσταλλίτες μεγέθους μερικών νανομέτρων ενώ ο ΗΑΡ έχει

πλακοειδείς κρυσταλλίτες με διαστάσεις 50×25 nm –όπου η πλευρά με το μεγαλύτερο μήκος αντιστοιχεί στην c-κρυσταλλογραφική διεύθυνση και η άλλη στην a– και εξαιρετικά μικρό πάχος που κυμαίνεται γύρω στα 2-4 nm [10] . Επιπλέον, οι κρυσταλλίτες του ΒΑΡ είναι ασύμμετροι μεταξύ τους σε αντίθεση με αυτούς του ΗΑΡ.

2.3 Τύποι οστού

Μακροσκοπικά, μια σημαντική διαφοροποίηση όσον αφορά τους τύπους οστού είναι αυτή μεταξύ σπογγώδους ή δοκιδώδους και συμπαγούς οστού. Το φλοιώδες οστό βρίσκεται στην επιφάνεια του οστού και είναι συμπαγές με ελάχιστα διάκενα τα οποία καταλαμβάνονται από οστεοκύτταρα και αιμοφόρα αγγεία, ενώ το σπογγώδες έχει πολύ έντονη πορώδη δομή και βρίσκεται στο εσωτερικό του οστού. Το συμπαγές αποτελεί περίπου το 80% του ανθρώπινου σκελετού ενώ το υπόλοιπο 20% είναι σπογγώδες. Το σπογγώδες οστό έχει πορώδες της τάξης του 75-85% και πόρους μεγέθους 200-400 μm [11] όπου και φιλοξενείται ο μυελός των οστών. Αντίθετα το συμπαγές οστό έχει πολύ μικρό ποσοστό πορώδους 5-20% το οποίο οφείλεται σε δομές του οστού που ονομάζονται Αβέρσεια κελιά. Αν και η βασική διαφορά μεταξύ των δύο ειδών οστού έγκειται στο ποσοστό της πορώδους δομής υπάρχουν και άλλες με σημαντικότερη μεταξύ αυτών τον λόγο Ca/P. Αυτός είναι μεγαλύτερος στο συμπαγές, ενώ στο σπογγώδες αυξάνεται με την πάροδο των χρόνων. Μια ακόμα παράμετρος η οποία διαφοροποιεί τα δύο είδη οστών είναι η μορφολογία των κρυστάλλων του βιοαπατίτη. Μελέτες με τη χρήση XRD κατέδειξαν ότι το συμπαγές χαρακτηρίζεται από μεγαλύτερους σε μέγεθος κρυστάλλους σε σχέση με το σπογγώδες. Τέλος, το σπογγώδες οστό συχνά έχει υψηλότερο ρυθμό μεταβολικής δραστηριότητας και φαίνεται να ανταποκρίνεται καλύτερα στις μεταβολές των μηχανικών φορτίσεων. Το φλοιώδες οστό σχηματίζει ένα άκαμπτο εξωτερικό

περίβλημα ικανό να αντιστέκεται σε δυνάμεις παραμόρφωσης, ενώ η εσωτερική δοκιδώδης ζώνη ισχυροποιεί το οστό καθώς λειτουργεί σαν ένα πολύπλοκο σύστημα εσωτερικών στηριγμάτων. Η αναλογία μεταξύ συμπαγούς και δοκιδώδους οστού εξαρτάται από τον τύπο οστού και τα φορτία τα οποία αυτό έχει να υποστεί. Είναι προφανές πως από την σκοπιά του μηχανικού υλικών το συμπαγές οστό αντέχει μεγαλύτερα φορτία και παρουσιάζει μικρότερη ελαστικότητα, ενώ αντίθετα το δοκιδώδες οστό παρουσιάζει μεγαλύτερη ελαστικότητα αλλά μικρότερη μηχανική αντοχή λόγω της έντονης πορώδους δομής του.



Εικόνα 6 Η δομή του οστού

Τέλος, οι τύποι των οστών διαφοροποιούνται και ως προς την ωριμότητά τους σε άμορφο και σε πεταλώδες. Το **άμορφο ή δικτυωτό οστό** εμφανίζεται στον εμβρυακό σκελετό και

σε παιδιά έως το τέταρτο έτος της ηλικίας τους. Επιπλέον απαντάται σε περιπτώσεις που υπάρχει έντονος μεταβολισμός του οστού, όπως σε κατάγματα και παθήσεις του οστού. Είναι πρωτογενές οστό που χαρακτηρίζεται από τυχαία διάταξη των ινών κολλαγόνου και των φωσφορικών αλάτων του ασβεστίου. Το **πεταλώδες οστό** αντικαθιστά το πρωτογενές και είναι ώριμο οστό στο οποίο παρατηρείται πλήρης διάταξη και ανάπτυξη των ινών κολλαγόνου και των φωσφορικών αλάτων του ασβεστίου. Το πεταλώδες οστό παρουσιάζει μεγαλύτερη μηχανική αντοχή σε σχέση με το δικτυωτό. [8]

2.4 Μηχανισμός οστικής ανακατασκευής

Βασικό χαρακτηριστικό του οστίτη ιστού είναι η ικανότητα συνεχούς αναδόμησής του. Τα οστά στην διάρκεια της ζωής ενός οργανισμού υπόκεινται σε μια πληθώρα μεταβολών στο περιβάλλον του, είτε λόγω των μεταβαλλόμενων φορτίων είτε στην προσπάθεια διατήρησης της ομοιόστασης του οργανισμού. Για να είναι δυνατή η διατήρηση της οστικής μάζας και η δομική ακεραιότητα των οστών, η διαδικασία της οστικής ανακατασκευής κρίνεται απαραίτητη. Μέσα από αυτήν καθίσταται δυνατή η επιδιόρθωση μικρορωγμών και καταγμάτων, η ικανότητα των οστών να λειτουργούν ως «πηγές ιόντων» αλλά και η προσαρμογή της δομής των οστών στα εκάστοτε μηχανικά φορτία που έχουν να υποστούν.

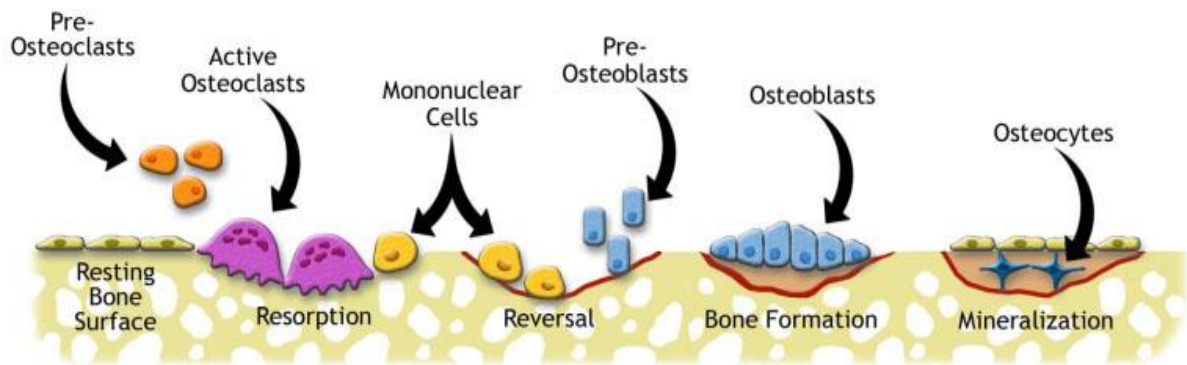
Σε συνθήκες φυσιολογικής λειτουργίας του οργανισμού ο ρυθμός απορρόφησης του οστού από τους οστεοκλάστες ισούται με αυτόν της παραγωγής οστού από τους οστεοβλάστες, επιτυγχάνοντας έτσι μια δυναμική ισορροπία. Η εξισορρόπηση αυτή των λειτουργιών των οστεοβλαστών και των οστεοκλαστών ονομάζεται σύζευξη και συνεπάγεται λειτουργία του οστίτη ιστού. Χαρακτηριστική ασθένεια που οφείλεται στην αποσύζευξη είναι η

οστεοπόρωση στην οποία οστική μάζα απορροφάται γρηγορότερα από ό,τι συντίθεται. Η οστική ανακατασκευή λαμβάνει χώρα σε περιοχές τόσο του δοκιδώδους όσο και του φλοιώδους οστού οι οποίες ονομάζονται βασικές πολυκυτταρικές μονάδες.

Η οστική ανακατασκευή παρουσιάζει θετικό ισοζύγιο οστικής μάζας μέχρι την τρίτη δεκαετία της ζωής στον άνθρωπο και διατηρείται σε υψηλά επίπεδα με μικρές διακυμάνσεις μέχρι την ηλικία των 50 ετών. Σε μεγαλύτερες ηλικίες η οστική απορρόφηση κυριαρχεί και η οστική μάζα αρχίζει να ελαττώνεται. Ο μέσος χρόνος ζωής κάθε ανακατασκευαστικής μονάδας στον άνθρωπο είναι 2 ως 8 μήνες, με το μεγαλύτερο χρονικό διάστημα να καταλαμβάνεται από τη διαδικασία της οστικής παραγωγής. Έχουν υπολογιστεί 35 εκατομμύρια ανακατασκευαστικές μονάδες στον ανθρώπινο σκελετό, εκ των οποίων 3 ως 4 εκατομμύρια ενεργοποιούνται κάθε χρόνο, με αποτέλεσμα ολόκληρος ο σκελετός να ανανεώνεται κάθε 10 χρόνια. [12]

Όπως γίνεται εύκολα κατανοητό η οστική ανακατασκευή είναι, σε μοριακό επίπεδο, μια πολυσύνθετη διαδικασία η οποία πραγματοποιείται σε επάλληλα στάδια. Τα έξι αυτά στάδια παρουσιάζονται παρακάτω.

Bone Remodeling Cycle



Εικόνα 7 Τα στάδια οστικής αναδόμησης

1. Φάση ηρεμίας

Είναι η φάση κατά την οποία οι οστεοβλαστικές και οι οστεοκλαστικές λειτουργίες ταυτίζονται. Η ελεύθερη οστική επιφάνεια επιστρώνεται από άφθονα αποπλατυσμένα επενδυματικά κύτταρα τα οποία σε αυτή την φάση είναι ανενεργά.

2. Φάση ενεργοποίησης

Η φάση αυτή διαρκεί 5-7 ημέρες και αφορά την ενεργοποίηση της οστικής επιφάνειας μέσω της απομάκρυνσης των επενδυματικών κυττάρων και την πέψη της μεμβράνης του ενδόστεου. Συγχρόνως οι πρόδρομοι οστεοκλάστες ενεργοποιούνται και δημιουργούν πολυπύρηννα συσσωματώματα, τους ώριμους οστεοκλάστες, τα οποία συγκεντρώνονται στην επιφάνεια του οστού.

3. Φάση απορρόφησης

Η φάση αυτή διαρκεί 10 μέρες στο σπογγώδες οστό και 6 με 10 εβδομάδες στο συμπαγές. Σε αυτήν οι ενεργοποιημένοι οστεοκλάστες που έχουν προσκολληθεί στην οστική επιφάνεια ξεκινούν την οστική αποδόμηση. Μέσω της δράσης τους, οι οστεοκλάστες δημιουργούν κοιλότητες οι οποίες ονομάζονται βοθρία Howship.

4. Φάση κυτταρικής αναστροφής

Οι πρώιμοι οστεοκλάστες αποκολλούνται από τον πάτο των βοθρίων Howship λόγω κορεσμού από ιόντα ασβεστίου ή υπόκεινται σε κυτταρική απόπτωση. Την θέση τους παίρνουν πρώιμοι οστεοβλάστες που ετοιμάζονται για την οστεοσύνθεση.

5. Φάση οστικής παραγωγής

Η φάση αυτή διαρκεί περίπου 3 μήνες. Οι πρώιμοι οστεοβλάστες διαφοροποιούνται σε ώριμους οστεοβλάστες οι οποίοι συνθέτουν και εναποθέτουν προοδευτικά θεμέλια ουσία (κυρίως κολλαγόνου τύπου I, που είναι ο μόνος τύπος κολλαγόνου που μπορεί να υποστεί μετάλλωση) που δεν έχει επιμεταλλωθεί ακόμα (οστεοειδές). Το νεοσυντιθέμενο οστόν είναι ισόποσο εκείνου που απορροφήθηκε στις προηγούμενες φάσεις.

6. Φάση επιμετάλλωσης οστεοειδούς

Η μεταβολική μονάδα του οστού αδρανοποιείται, επιστρώνεται ξανά από επενδυματικά κύτταρα και λειτουργεί σαν μικροκατασκευαστική μονάδα του οστού. Η φάση της επιμετάλλωσης, όπου ενσωματώνεται υδροξυαπατίτης στο οστεοειδές, ξεκινά 30 ημέρες μετά την απόθεση του οστεοειδούς και σταματά την 90^η ημέρα για το σπογγώδες οστό και την 130^η ημέρα για το φλοιώδες οστό. [13]

2.5 Οι Μηχανικές ιδιότητες του οστού

Το οστό είναι ένα σύνθετο υλικό που αποτελείται από διαφορετικούς τύπους ιστών. Μήτρα αυτού του υλικού αποτελεί η αποτιτανωμένη θεμέλια ουσία η οποία ενισχύεται με ίνες κολλαγόνου, προσομοιάζοντας την δομή του πλέξιγκλας. Η μηχανική συμπεριφορά του οστού εξαρτάται κυρίως από την οστική μάζα, την οστική πυκνότητα και το μέγεθος του εκάστοτε οστού. Στον ανθρώπινο οργανισμό τα οστά υπόκεινται σε έναν συνδυασμό συμπιεστικών, στρεπτικών και εφελκυστικών φορτίσεων. Η συνύπαρξη υδροξυαπατίτη και κολλαγόνου προσδίδει στα οστά έναν συνδυασμό σκληρότητας και ελαστικότητας. Οι μέγιστες τιμές των μηχανικών ιδιοτήτων του φλοιώδους οστού παρουσιάζονται στον παρακάτω πίνακα.

Πίνακας 2 Οι μηχανικές ιδιότητες του φλοιώδους οστού

Ιδιότητα	Τιμή
Αντοχή σε συμπίεση	200 MPa
Αντοχή σε εφελκυσμό	135 MPa
Αντοχή σε διάτμηση	70 MPa
Μέτρο ελαστικότητας	32 GPa
Αντοχή σε κάμψη	300 MPa
Αποροφούμενο έργο μέχρι το κάταγμα	7000 Jm ⁻²

Με την πάροδο των χρόνων, οι μηχανικές ιδιότητες των οστών μπορούν να υποβαθμιστούν εξαιτίας μείωσης ή αύξησης της επιμετάλλωσης και συσσώρευσης πολλών μικροβλαβών.

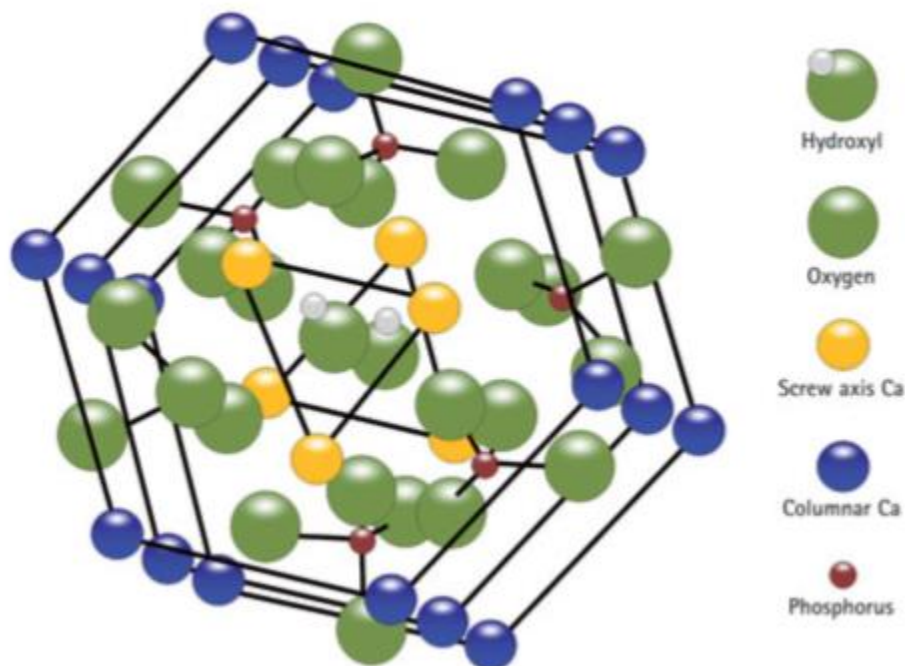
Γενικότερα, μείωση της οστικής πυκνότητας συνεπάγεται χειρότερη μηχανική συμπεριφορά. [14] [15]

Οι μηχανικές ιδιότητες του σπογγώδους οστού είναι αρκετά δυσκολότερες ως προς τον προσδιορισμό τους λόγω της ανισοτροπίας του ιστού αλλά και της εν γένει δομής του ως πορώδες υλικό. Επιπλέον, εξαρτώνται στενά από την ηλικία και το είδος του οργανισμού αλλά και την τοποθεσία του εκάστοτε οστού. Παρόλα αυτά ένα χαρακτηριστικό εύρος για την θλιπτική αντοχή και το μέτρο ελαστικότητας είναι 2-6 MPa και 0.1-0.8 GPa, αντίστοιχα. [16] [17]

3. Τα υλικά

3.1 Υδροξυαπατίτης

Όπως προαναφέρθηκε, ο υδροξυαπατίτης (HAp), $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$ είναι το πιο σταθερό και λιγότερο διαλυτό από τα φωσφορικά άλατα του ασβεστίου. Ο βιολογικός υδροξυαπατίτης είναι ένα από τα κύρια συστατικά του ανόργανου τμήματος των σκληρών ανθρώπινων ιστών. Για αυτόν τον λόγο μελετάται εκτενέστατα ως βιοϋλικό για την αποκατάσταση οστών και δοντιών στην επιστήμη της μηχανικής των ιστών. Τα εμφυτεύματα υδροξυαπατίτη παρουσιάζουν βιοδραστικότητα, αυξημένη οστεοεπαγωγικότητα, αποικοδομούνται εύκολα και δεν εμφανίζουν καθόλου τοξικότητα ή ανοσολογική αντίδραση του οργανισμού όταν έρθουν σε επαφή με τους φυσικούς ιστούς.



Εικόνα 8 Η κρυσταλλική δομή του υδροξυαπατίτη

Στα βιολογικά συστήματα δεν εντοπίζεται καθαρός υδροξυαπατίτης, καθώς είναι ιδιαίτερα δύσκολο να αποφευχθεί η ισόμορφη υποκατάσταση των ιόντων στο πλέγμα του, η οποία και πραγματοποιείται ώστε να σταθεροποιηθεί στην εξαγωνική κρυσταλλική δομή. Οι υποκαταστάσεις μπορεί να περιλαμβάνουν την υποκατάσταση των ιόντων ασβεστίου (Ca^{2+}) από ιόντα στροντίου (Sr^{2+}), των ιόντων νατρίου (Na^+) από ιόντα μαγνησίου (Mg^{2+}), των ιόντων υδροξυλίου (OH^-) από ιόντα φθορίου (F^-) και χλωρίου (Cl^-) και των φωσφορικών ιόντων (PO_4^{3-}) από ανθρακικά (CO_3^{2-}) και θειικά ιόντα (SO_4^{2-}), καθώς επίσης υπάρχει και το ενδεχόμενο σχηματισμού πλεγματικών κενών στη θέση των Ca^{2+} και του OH^- . [18] Ο βιολογικός υδροξυαπατίτης περιέχει 4% κατά βάρος ανθρακικά άλατα και είναι σταθερός σε pH 9-12. Αποτελεί μία θερμικά ασταθή ένωση και αναλόγως της ακριβούς στοιχειομετρίας της, αποσυντίθεται σε θερμοκρασίες μεταξύ των 800 και 1200 °C.

Αξιοσημείωτος είναι ο τρόπος με τον οποίο ο υδροξυαπατίτης -και συνεπώς τα ικριώματα του- αλληλεπιδρά με τους ιστούς στους οποίους εμφυτεύεται. Όταν ένα ξένο σώμα εμφυτεύεται στον ανθρώπινο οργανισμό ,ανάλογα με την σύστασή του, μπορεί να προκαλέσει ανοσολογική αντίδραση, φλεγμονή και άλλες αντιδράσεις που καταδεικνύουν τοξικότητα. Ικριώματα υδροξυαπατίτη όχι μόνο δεν προκαλούν τα παραπάνω αλλά αντιδρούν με τον οστίτη ιστό έχοντας οστεογενετική δράση. Εμφυτεύματα από υδροξυαπατίτη εμφανίζουν ταχύτερο ρυθμό ανάπτυξης του οστού από ό,τι τα οστικά μοσχεύματα, ενώ παρόμοιες μελέτες έχουν αποδείξει ότι και οι χόνδροι μπορούν να αναπτυχθούν σε πορώδη εμφυτεύματα υδροξυαπατίτη. [19]. Μεταξύ του εμφυτεύματος και του οστού σχηματίζεται ένας χημικός δεσμός χωρίς να μεσολαβεί ινώδης ιστός και αυτή η πρόσδεση του εμφυτεύματος στο οστό αναφέρεται ως οστεοενσωμάτωση.

Πρόκειται για ένα κεραμικό βιοϋλικό με πολύ χαμηλή σκληρότητα και αντοχή το οποίο δεν μπορεί να διατηρηθεί σε συνθήκες έντονων τριβών ή φορτίσεων για μεγάλα χρονικά διαστήματα. Εξαιτίας της άριστης βιοσυμβατότητάς του και της ικανότητάς του να σχηματίζει άμεσους δεσμούς με τους σκληρούς ιστούς προωθώντας έτσι την ιστική αναδόμηση, χρησιμοποιείται πολύ συχνά από τον κλάδο της Ιστικής Μηχανικής σε συνδυασμό και με άλλα βιοϋλικά με σκοπό την κατασκευή σύνθετων εμφυτευμάτων και επικαλύψεων με άριστες βιολογικές και μηχανικές ιδιότητες. Ενδεικτικά, η εμφύτευση σωματιδίων καθώς και πορωδών ικριωμάτων υδροξυαπατίτη σε οστικούς ιστούς έχει αποδειχτεί ότι μπορεί να οδηγήσει στο σχηματισμό νέων δικτυωτών οστικών πολυστρωμάτων σε διάστημα 4-8 εβδομάδων.

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



Εικόνα 9 Πορώδες ικρίωμα υδροξυαπατίτη

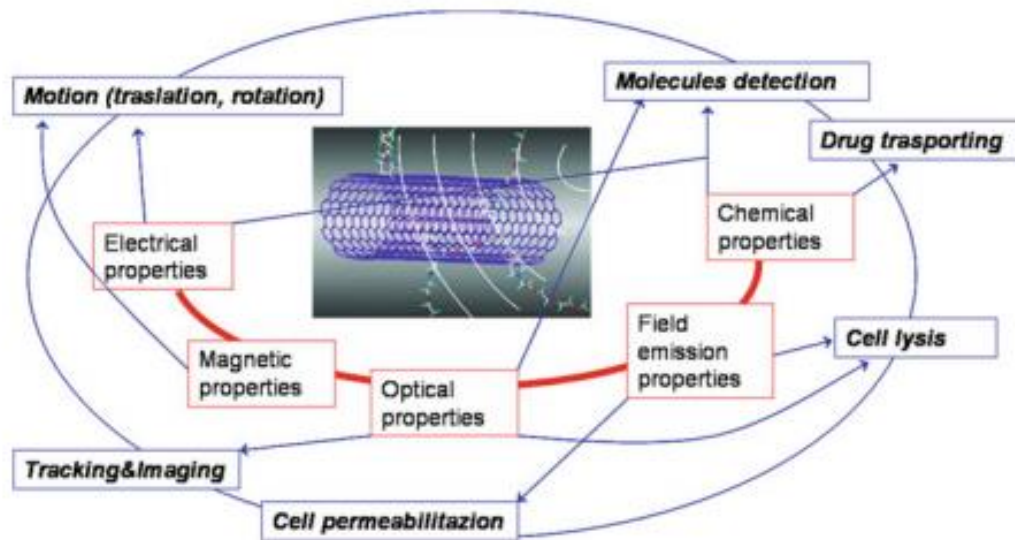
Πειραματικά, ο συνθετικός υδροξυαπατίτης μπορεί να παρασκευασθεί με πολλές μεθόδους. Σε κάθε μια από αυτές υπάρχουν παράμετροι (pH, θερμοκρασία, πίεση) οι οποίες έχουν άμεση επίδραση στις ιδιότητες και κατ' επέκταση στην συμπεριφορά του τελικού προϊόντος. Στην τεχνική **καταβύθισης πρόδρομων αντιδραστηρίων**, ενώσεις που λειτουργούν ως πηγές φωσφορικών και ανθρακικών ιόντων αντιδρούν κάτω από κατάλληλες συνθήκες για την παρασκευή υδροξυαπατίτη. Η μέθοδος **sol-gel** θεωρείται πολύ αποτελεσματική για τη σύνθεση νανουδροξυαπατίτη, γιατί παρέχει την δυνατότητα ελέγχου των παραμέτρων της διαδικασίας. Έχει παρατηρηθεί ότι τα δείγματα υδροξυαπατίτη που παράγονται με αυτή τη μέθοδο οδηγούν σε ενισχυμένο δεσμό μεταξύ φυσικού και συνθετικού οστού. Η **υδροθερμική** μέθοδος χρησιμοποιεί συνθήκες υψηλής θερμοκρασίας και πίεσης στοχεύοντας στην άμεση κρυστάλλωση του υδροξυαπατίτη και καλύτερη ρύθμιση του λόγου ασβεστίου/φωσφόρου στην παραγόμενη ένωση. Τέλος, στην μέθοδο **βιομιμητικής απόθεσης**, μετασταθή συνθετικά σωματικά υγρά (SBF) αντιδρούν με την επιφάνεια βιοϋλικών εναποθέτοντας φωσφορικά άλατα του ασβεστίου σε μια διαδικασία η οποία έχει αποδειχτεί πως οδηγεί σε βελτιωμένη βιολογική συμπεριφορά.

3.2 Νανοσωλήνες άνθρακα (Carbon nanotubes – CNT)

Οι νανοσωλήνες άνθρακα (CNT) είναι αλλότροπα του άνθρακα, κατασκευασμένα από γραφίτη με τη μορφή κυλινδρικών σωλήνων με ένα ή πολλαπλά τοιχώματα, μικρή διάμετρο (στην νανοκλίμακα) και, συγκριτικά, μεγάλο μήκος. Παρουσιάζουν αυστηρά διατεταγμένη δομή ατόμων άνθρακα οι οποίοι συνδέονται με δεσμούς του τροχιακού sp^2 για αυτό και αποτελούν υλικά με πολύ ελκυστικές μηχανικές ιδιότητες, όπως υψηλή

εφελκυστική αντοχή. Επιπλέον, παρουσιάζουν πολύ καλή ηλεκτρική και θερμική αγωγιμότητα. Η διάμετρος των νανοσωλήνων εξαρτάται από τον τύπο τους, αν δηλαδή είναι ενός ή πολλαπλών τοιχωμάτων. Οι μεν έχουν διάμετρο 0.8-2 nm, ενώ οι δε 2-100 nm. Το μήκος τους ανάλογα με την εκάστοτε εφαρμογή μπορεί να κυμαίνεται από 100 νανόμετρα έως μερικές δεκάδες μικρόμετρα. Οι CNT χρησιμοποιούνται σε σύνθετα υλικά, όπως ικρίωματα, καθώς έχει βρεθεί πως βελτιώνουν και τις μηχανικές ιδιότητες τους.

Χάρη στις πολύ καλές ηλεκτρονικές, οπτικές, μηχανικές, θερμικές και ηλεκτροχημικές τους ιδιότητες, οι νανοσωλήνες άνθρακα χρησιμοποιούνται σε εφαρμογές όπως για την κατασκευή υπεραγωγών, σε κυψέλες καυσίμων, σε μπαταρίες, σε βιοκαύσιμα, σε φωτοκαταλύτες, σε φωτοβολταϊκά, σε βιοαισθητήρες, σε χημικούς αισθητήρες, σε αισθητήρες αερίων, σε συσκευές LED, σε οπτικούς αισθητήρες, σε τρανζίστορ πεδίου και λεπτού υμενίου, σε χημικές κλινικές εφαρμογές, στην βιοϊατρική κ.ά.



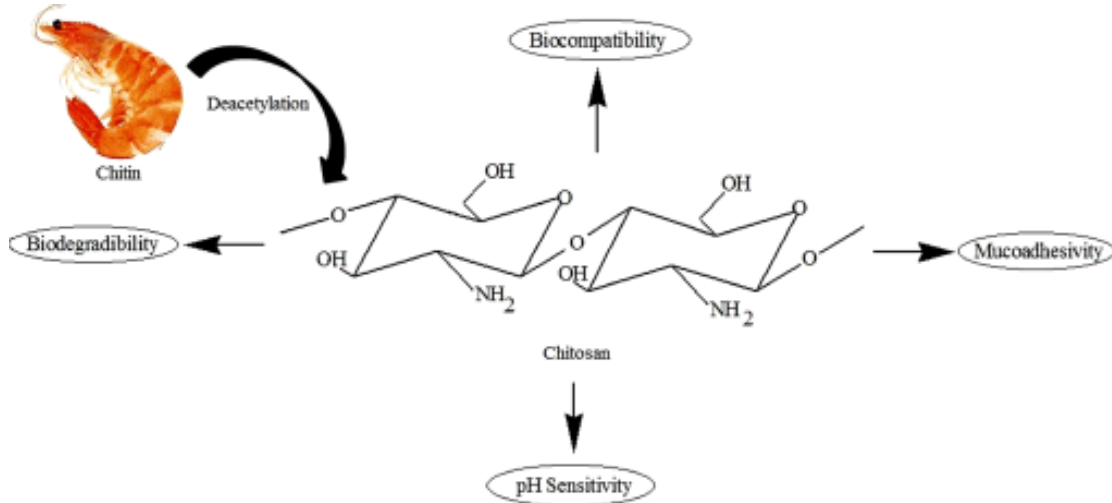
Εικόνα 10 Οι ιδιότητες των νανοσωλήνων άνθρακα και οι ιδιότητες στις οποίες αυτές μεταφράζονται

Τα μηχανικά και χημικά σταθερά αυτά περιβλήματα μπορούν να φέρουν άλλες ενεργές χημικές ουσίες τόσο στο εσωτερικό όσο και στο περίβλημα τους χωρίς να χάνουν την δομική τους ακεραιότητα με μία διαδικασία που ονομάζεται πρόσδοση λειτουργικότητας (functionalization). Παραδείγματος χάριν, οι νανοσωλήνες άνθρακα μπορούν να ενισχυθούν λειτουργικά -μεταξύ άλλων- με μέταλλα, ημιαγωγούς, άλατα και οργανικές ενώσεις. Μάλιστα ταυτόχρονη ενεργοποίηση της επιφάνειας τους μπορεί να προσδώσει στους νανοσωλήνες έναν συνδυασμό ιδιοτήτων, κάνοντας τους ελκυστικούς για εφαρμογές όπως η μεταφορά φαρμακευτικών ουσιών. Επιπλέον έχει βρεθεί πως αποτελούν ιδανικό υπόστρωμα για την επιτυχή προσκόλληση κυττάρων. [20]

Ένα βασικό χαρακτηριστικό των CNT το οποίο τους καθιστά υλικά ενδιαφέροντος στην βιοιατρική τεχνολογία είναι η ικανότητα τους να διαπερνούν βιολογικά όρια, όπως η κυτταρική μεμβράνη και να διεισδύουν στο εσωτερικό του κυττάρου. Χαρακτηριστικό παράδειγμα αποτελεί μελέτη στην οποία μονοφλοιικοί νανοσωλήνες άνθρακα (SWCNT) περιβαλλόμενοι από DNA εγκολπίστηκαν από καρκινικά κύτταρα και απελευθέρωσαν ακτινοβολία σκοτώνοντας τα.

Η βιοσυμβατότητα των νανοσωλήνων άνθρακα έχει αποτελέσει το αντικείμενο πολλών μελετών με τα αποτελέσματα να μην βρίσκονται απόλυτα σε συμφωνία. Αυτό συμβαίνει επειδή η κυτταροτοξικότητά τους εξαρτάται από μια πλειάδα παραγόντων όπως το σχήμα, η διάμετρος, το μήκος και ο αριθμός τοιχωμάτων. Έτσι, η πιο ασφαλής επιλογή για ιατρικές εφαρμογές είναι νανοσωλήνες των οποίων οι παράμετροι σύνθεσης έχουν ορισθεί έτσι ώστε να εξασφαλίζουν την βιοσυμβατότητα τους. [21]

3.3 Χιτοζάνη



Εικόνα 11 Δομή και ιδιότητες της χιτοζάνης

Η χιτοζάνη είναι ένα φυσικό πολυμερές το οποίο έχει προσελκύσει μεγάλο ενδιαφέρον στη μηχανική ιστών λόγω της βιοσυμβατότητας, βιοαποικοδομησιμότητας και αντιβακτηριακής δράσης της.

Πρόκειται για ένα παράγωγο του πολυμερούς χιτίνης το οποίο ανακαλύφθηκε στα μέσα του 19^{ου} αιώνα. Η χιτίνη είναι δομικό συστατικό του εξωσκελετού των εντόμων και απαντάται σε ορισμένους μύκητες, στα φύκη και ορισμένους ζυμομύκητες. Από αυτή προκύπτει η χιτοζάνη μέσω της αποακετυλίωσης. Το μόριο της χιτοζάνης είναι ένας γραμμικός ημι-κρυσταλλικός πολυσακχαρίτης, αποτελούμενος από γλυκοζαμίνη και N-ακετυλογλυκοζαμίνη συνδεδεμένες κατά έναν $\beta(1-4)$ δεσμό που προκύπτει έπειτα από μερική αποακετυλίωση της χιτίνης.

Ο βαθμός αποακετυλίωσης της χιτοζάνης έχει σημαντική επίπτωση στις φυσικές, χημικές και βιολογικές ιδιότητες του υλικού. Όσο λιγότερες μονάδες ακετυλογλυκοζαμίνης περιέχει η χιτοζάνη τόσο μεγαλύτερη ικανότητα έχει για χημική τροποποίηση μέσω των διαθέσιμων αμινομάδων. Αντίστοιχα, χαμηλός βαθμός αποακετυλίωσης αυξάνει τον ρυθμό αποικοδόμησης της χιτοζάνης.

Όσον αφορά την βιολογική της συμπεριφορά, η χιτοζάνη έχει βρεθεί πως επιδρά, ενισχύοντας την δράση των μακροφάγων. Έτσι εκτός από την αντιμικροβιακή της δράση η χιτοζάνη βοηθά στην επούλωση πληγών και την αποφυγή φλεγμονών. Τέλος, μελέτες έχουν δείξει πως όταν η χιτοζάνη χρησιμοποιείται σε οστικά ικρίωματα, βοηθά στην δημιουργία αγγείων (vascularization) μετά την εμφύτευση.

Παρά την αφθονία στη φύση, ο κύριος ανασταλτικός παράγοντας για τη χρήση της μέχρι πρόσφατα, ήταν η έλλειψη ικανοποιητικών τεχνικών καθαρισμού μετά την απομόνωσή της από τους φυσικούς οργανισμούς, έτσι ώστε να προκύψει ένα άχρωμο προϊόν απαλλαγμένο από κάθε είδους επιμολύνσεις ώστε να μπορεί να χρησιμοποιηθεί ως βιοϋλικό. Σήμερα έχουν ήδη υιοθετηθεί χημικές τεχνικές για την εξαγωγή της από τα κελύφη των εντόμων, όπως επίσης και για τον καθαρισμό και τον αποχρωματισμό της.

Η οικογένεια των χιτοζανών μπορεί να καταταχθεί σε τρεις κατηγορίες: σε χιτοζάνες που προέρχονται από χιτίνη με αποακετυλίωση κάτω από ετερογενείς συνθήκες, σε χιτοζάνες που προέρχονται από χιτίνη με αποακετυλίωση κάτω από ομοιογενείς συνθήκες, και τέλος σε χιτοζάνες που προέρχονται από χιτίνη με N-ακετυλίωση κάτω από ομοιογενείς συνθήκες. [22]

Η χιτοζάνη λόγω των ιδιοτήτων της βρίσκει πολυποίκιλες εφαρμογές σε διάφορους τομείς. Μπορεί επίσης να διαμορφωθεί σε μορφή διαλύματος, σκόνης, γέλης, μεμβρανών και ινών, πράγμα το οποίο την καθιστά ένα πολλά υποσχόμενο υλικό. Τα πεδία εφαρμογής της παρουσιάζονται παρακάτω:

- Κοσμετολογία

Ως κατιονικός πολυσακχαρίτης μπορεί να απορροφά την ακτινοβολία. Έχει αντιοξειδωτικές, αντιαλλεργικές και αντιφλεγμονώδεις ιδιότητες και χάρη στον αντιμηκυτιακό της χαρακτήρα, τα παράγωγά της χρησιμοποιούνται στα καλλυντικά που σχετίζονται με την προστασία των μαλλιών, του δέρματος και του στόματος.

- Ύδρευση

Η χιτοζάνη χρησιμοποιείται για την απολύμανση του νερού από διάφορα λύματα και βαρέα μέταλλα. Επιπλέον βοηθά στην απομάκρυνση οσμών από το πόσιμο νερό

- Γεωργία

Έχει τη δυνατότητα ενίσχυσης και επιτάχυνσης της ανάπτυξης των σπόρων και λόγω του αντιμικροβιακού χαρακτήρα της μειώνει την πιθανότητα εμφάνισης παρασίτων και μυκήτων.

- Τεχνολογία τροφίμων

Λόγω της μη τοξικότητάς της, η μικροκρυσταλλική χιτοζάνη χρησιμοποιείται στα τρόφιμα ως γαλακτωματοποιητής, αυξητικός παράγοντας, σταθεροποιητής τροφίμων, διατροφικό συμπλήρωμα και έχει επιλύσει αρκετά προβλήματα που παρουσιάζουν οι ίνες των τροφών σχετικά με τη γεύση, το χρώμα, τη διάρκεια ζωής.

- ο Ιατρική

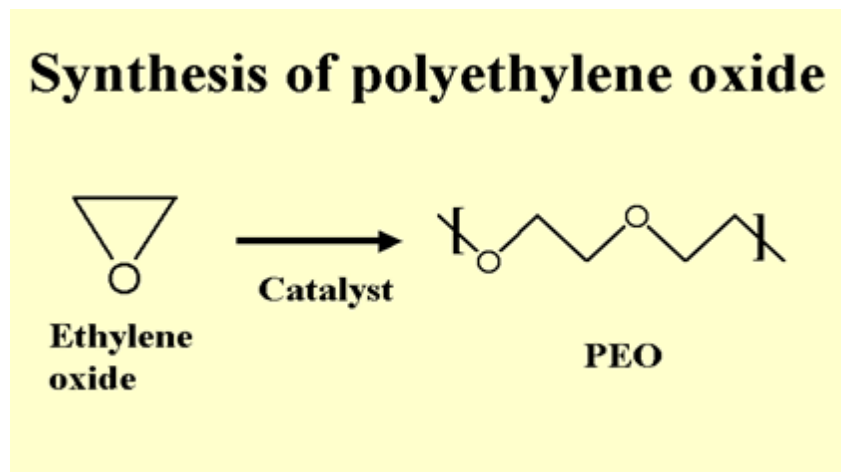
Χρησιμοποιείται σε οδοντιατρικά εμφυτεύματα και πειραματικά σε ορθοπεδικά ικρίσματα. Αρκετά ενδιαφέρουσα εφαρμογή αποτελεί η σύνθεση τεχνητού δέρματος από χιτοζάνη. Τέλος υπάρχουν ορισμένες εφαρμογές της ως υλικό μεταφοράς φαρμακευτικών ουσιών (drug delivery). [23]

3.4 L-αργινίνη

Τα αμινοξέα είναι χημικές βιολογικές ενώσεις, οι οποίες περιέχουν τουλάχιστον ένα ενεργό άκρο αμινομάδας ($-NH_2$) και ένα ενεργό άκρο καρβονυλικού οξέος ($-RCOOH$). Είναι τα μονομερή δομικά συστατικά των πεπτιδίων, των πρωτεϊνών και των λιπιδίων ενώ αρκετά από αυτά συμμετέχουν και στις μεταβολικές δραστηριότητες. Από τα αμινοξέα που υπάρχουν συνολικά στην φύση, μόνο τα 20 από αυτά, που περιέχονται στον γενετικό κώδικα, καλούνται πρωτεϊνογενετικά α-αμινοξέα. Ονομάζονται α-αμινοξέα γιατί, με εξαίρεση την προλίνη, όλα έχουν μία βασική αμινομάδα και μία καρβοξυλομάδα, υποκαταστάτες στο ίδιο άτομο άνθρακα. Στον ανθρώπινο οργανισμό υπάρχουν 20 αμινοξέα τα οποία συμβάλλουν στην πρωτεϊνοσύνθεση. Από αυτά, τα 8 ονομάζονται απαραίτητα καθώς δεν συντίθενται από τον οργανισμό και πρέπει να λαμβάνονται μέσω της τροφής. Άλλα τέσσερα αμινοξέα ονομάζονται ημι-απαραίτητα καθώς συντίθενται στους ενήλικες οργανισμούς αλλά όχι στα παιδιά. Τέλος οκτώ από τα 20 αμινοξέα μπορούν και συντίθενται από τον οργανισμό μέσω μεταβολικών οδών. Πολλά αμινοξέα συντίθενται από άλλα αμινοξέα με μια διαδικασία που λέγεται διαμίνωση ή τρανσαμίνωση, αν και οι περισσότεροι οργανισμοί λαμβάνουν τα απαραίτητα αμινοξέα με την τροφή.

Η L-αργινίνη (L-arg) είναι ένα αμινοξύ με μοριακό τύπο $C_6H_{14}N_4O_2$ και μοριακή μάζα $174,2 \text{ g mol}^{-1}$. Η L-arg λόγω της γεωμετρίας του μορίου της και της ικανότητας της να δημιουργεί δεσμούς υδρογόνου έχει την ικανότητα να δεσμεύει αρνητικά φορτισμένες ομάδες. Η L-αργινίνη είναι ένα ημι-απαραίτητο αμινοξύ το οποίο συμμετέχει στην σύνθεση των πρωτεϊνών, στην ενεργοποίηση της κυτταρικής ανάπτυξης, μέσα από την παραγωγή μονοξειδίου του αζώτου (ή νιτρικό οξείδιο, NO) και μέσα από τον μεταβολισμό της σε ορνιθίνη και άλλες πολυαμίνες. Επιπλέον, τα νιτρικά αυτά οξείδια διαδραματίζουν σημαντικό ρόλο αμινοξέος στην καλή αγγειακή λειτουργία και την αποκατάσταση μυϊκών και ιδιαίτερα οστικών ιστών. Ως ημι-απαραίτητο αμινοξύ η παραγωγή της από τον οργανισμό πρέπει να συμπληρώνεται από διατροφικές πηγές. Τα ελάχιστα όρια πρόσληψης για την κάλυψη των αναγκών του οργανισμού από πλευράς πρωτεϊνοσύνθεσης και ιστικής αποκατάστασης είναι 2,5-5g . Χαρακτηριστικά παραδείγματα διατροφικών πηγών L-Arg είναι τα γαλακτοκομικά προϊόντα, το κρέας, τα πουλερικά, τα θαλασσινά όπως και διάφορες διατροφικές πηγές. [24] [25]

3.5 Οξείδιο του πολυαιθυλενίου (PEO)



Εικόνα 12 Ο πολυμερισμός του οξειδίου του αιθυλενίου

Το οξείδιο του πολυαιθυλενίου (PEO), ή αλλιώς πολυαιθυλενογλυκόλη (PEG) ή πολυοξυαιθυλένιο είναι ένα συνθετικό, μη ιονικό, γραμμικό πολυμερές και θεωρείται ένα από τα εκτενέστερα ερευνηθέντα πολυμερή στη σύγχρονη Φαρμακευτική. Οι διαφοροποιήσεις στην ονομασία του πολυμερούς οφείλονται στο εύρος των μοριακών βαρών στα οποία είναι διαθέσιμο. Όταν το πολυμερές έχει μοριακό βάρος 100.000 αναφέρεται ως PEG, ενώ για εύρος μοριακών βαρών από 100.000 έως και 8.000.000 αναφέρεται ως PEO.

Το βασικό μονομερές του είναι το $-(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O})-$ στο οποίο οφείλει της ιδιότητες του. Πρόκειται για ένα άχρωμο, άοσμο και υδατοδιαλυτό πολυμερές. Επιπλέον, διατηρεί την δομή του ανεξαρτήτως θερμοκρασίας, είναι χημικά αδρανές και μη τοξικό, ιδιότητες που το καθιστούν ιδανικό για χρήση στην βιοιατρική. Μάλιστα έχει βρεθεί πως το PEO μπορεί να αποτρέψει εμφυτεύματα από το να προκαλούν ανοσολογική απόκριση μετά την είσοδο τους στον οργανισμό.

Οι ομάδες $-\text{CH}_2\text{CH}_2-$ των μονομερών εμφανίζουν υδρόφοβο χαρακτήρα και προκαλούν τη δημιουργία επάλληλων υδρόφοβων στρωμάτων από μόρια νερού γύρω από την αντίστοιχη ομάδα κάθε μονομερούς. Το πρώτο στρώμα δημιουργείται από 2-3 μόρια νερού γύρω από την επιφάνεια του μονομερούς. Αντίθετα, οι διατομικές αποστάσεις των ατόμων οξυγόνου των μονομερών, είναι παρόμοιες με αυτές των ατόμων οξυγόνου της δομής του καθαρού νερού, με αποτέλεσμα τα άκρα οξυγόνου των μονομερών να είναι υδρόφιλα και να δεσμεύουν τα μόρια του νερού. Αυτή είναι και η κύρια αιτία που το πολυμερές PEO είναι διαλυτό στο νερό για μεγάλο εύρος θερμοκρασιών και συγκεντρώσεων. Επίσης το PEO

κρυσταλλώνεται στο νερό μόνο σε θερμοκρασίες κατώτερες των 66° C και σε συγκεντρώσεις μικρότερες του 50%.

Ορισμένες από τις -μη βιολογικές- εφαρμογές του PEO παρουσιάζονται στον παρακάτω πίνακα μαζί με τον ρόλο που αυτό διαδραματίζει. [26]

Πίνακας 3 Ο ρόλος που διαδραματίζει το PEO στις εκάστοτε εφαρμογές του

Ρόλος	Εφαρμογή
Συγκολλητικό	Οδοντιατρική – Τεχνητές οδοντοστοιχίες
Κροκίδωση	Απομάκρυνση κολλοειδών σωματιδίων από το νερό
Πηκτικός παράγοντας	Μπογιές, καλλυντικά
Συνδέτης	Τεχνολογία κεραμικών υλικών
Λιπαντικό	Σαπούνια και προϊόντα προσωπικής φροντίδας

Επιπλέον, το PEO λόγω των ιδιοτήτων του εφαρμόζεται ευρέως στην βιοιατρική. Χαρακτηριστικό παράδειγμα αποτελεί η χρήση του στην τεχνολογία ελεγχόμενης μεταφοράς φαρμακευτικών ουσιών λόγω της ικανότητας του να δημιουργεί σύμπλοκα με φαρμακευτικές ουσίες, αυξάνοντας έτσι την αποτελεσματικότητα πρόσληψης του από τον ανθρώπινο οργανισμό. Τέλος, ο ρυθμός αποικοδόμησης του PEO μπορεί να ελεγχθεί καθώς βρίσκεται σε αναλογία με το μοριακό του βάρος. Επειδή μάλιστα το πολυμερές αυτό είναι διαθέσιμο σε μια πληθώρα μοριακών βαρών, ο ρυθμός αποικοδόμησης ενός βιολογικού μπορεί να καθοριστεί επακριβώς σύμφωνα με τις ανάγκες της εφαρμογής. [26]

ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

Στην προσπάθεια επίτευξης του σκοπού αυτής της διπλωματικής εργασίας το πειραματικό μέρος διαιρέθηκε στα παρακάτω στάδια:

1.Σύνθεση τρισδιάστατων ικριωμάτων υδροξυαπατίτη/χιτοζάνης/οξειδίου του πολυαιθυλενίου και- κατά περίπτωση- νανοσωλήνων άνθρακα παρουσία L-αργινίνης.

2. Δοκιμές με σκοπό τον καθορισμό των βέλτιστων παραμέτρων σύνθεσης των ικριωμάτων.

3.Διερεύνηση της μηχανικής και βιολογικής συμπεριφοράς των ικριωμάτων που παράχθηκαν χρησιμοποιώντας τις βέλτιστες συνθήκες.

1.Πειραματική διαδικασία

1.1. Εργαστηριακός εξοπλισμός και αντιδραστήρια

Για την παραγωγή των τρισδιάστατων ικριωμάτων χρησιμοποιήθηκαν: διάλυμα ορθοφωσφορικού οξέος H_3PO_4 περιεκτικότητας 85% v/v (Sigma-Aldrich, ΗΠΑ) , σκόνη υδροξειδίου του ασβεστίου $Ca(OH)_2$ (neoLab, Γερμανία), σκόνη χιτοζάνης $C_{12}H_{24}N_2O_9$ (Sigma-Aldrich, ΗΠΑ) , σκόνες Poly(ethyleneoxide) (με μοριακά βάρη 600.000, 900.000, 2.000.000) (Sigma-Aldrich, ΗΠΑ) και σκόνη L-αργινίνης (Sigma-Aldrich, ΗΠΑ). Τέλος, για ορισμένα ικρίωματα χρησιμοποιήθηκε σκόνη νανοσωλήνων άνθρακα NTX3 για ιατρικές εφαρμογές (NanothinX, Ελλάδα).

Όσον αφορά τον εργαστηριακό εξοπλισμό, αρχικά χρησιμοποιήθηκε μηχανικός διασπορέας T25 digitalULTRA-TURRAX (IKA, HB) για την δημιουργία ομογενών διαλυμάτων κατά την ανάμειξη σκονών με διαλύτες αλλά και μεταξύ πρόδρομων διαλυμάτων όπως θα αναλυθεί αργότερα. Επιπλέον χρησιμοποιήθηκαν μαγνητικοί

αναδευτήρες με θερμαινόμενες πλάκες WiseStir (Wisd, Ireland) Τέλος χρησιμοποιήθηκε συσκευή φυγοκέντρησης Z236 (Hermle.Γερμανία) και λυοφιλιωτής Lyoquest (Telstar, Ισπανία).

1.2 Παρασκευή σκόνης υδροξυαπατίτη/ χιτοζάνης/ L-αργινίνης

Για την παρασκευή του υδροξυαπατίτη ακολουθήθηκε πρωτόκολλο βιομηχανικής αντίδρασης που προέκυψε από βιβλιογραφική ανασκόπηση παρόμοιων εργασιών. [27] [28] Σύμφωνα με αυτό, η σύνθεση διέπεται από συγκεκριμένες αναλογίες οι οποίες εξασφαλίζουν την βέλτιστη βιολογική και μηχανική συμπεριφορά των τρισδιάστατων κριωμάτων και παρουσιάζονται παρακάτω:

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

Με βάση τις παραπάνω αναλογίες και την στοιχειομετρία των αντιδράσεων που θα λάβουν χώρα, υπολογίσθηκαν τα αρχικά βάρη των πρόδρομων αντιδραστηρίων.

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

Στο πρώτο στάδιο της βιομιμητικής σύνθεσης υδροξυαπατίτη, σε ποτήρι ζέσης 50 ml (A) τοποθετούνται 29 ml απιονισμένου νερού και 0.3 ml ορθοφωσφορικού οξέος. Στη συνέχεια το ποτήρι ζέσεως τοποθετείται σε μαγνητικό αναδευτήρα για 3-5 λεπτά. Μετά την πάροδο αυτού του χρόνου, στο διάλυμα προστίθενται 0,316 g χιτοζάνης και το ποτήρι ζέσης τοποθετείται σε μηχανικό διασπορέα που λειτουργεί στις 6000 στροφές/λεπτό για 30 λεπτά, εξασφαλίζοντας έτσι την πλήρη διάλυση της χιτοζάνης. Τέλος, το διάλυμα αυτό καλύπτεται με προστατευτική ταινία έτσι ώστε να προστατευτεί από προσμίξεις, έως ότου να χρησιμοποιηθεί ξανά.

Το δεύτερο στάδιο της σύνθεσης είναι η παραγωγή του αιωρήματος υδροξειδίου του ασβεστίου. Σε νέο ποτήρι ζέσης 50 ml(B) τοποθετούνται 29,3 ml απιονισμένου νερού και 0,5439 g υδροξειδίου του ασβεστίου. Το ποτήρι αυτό οδηγείται προς μηχανική ανάδευση στις 3200 στροφές/λεπτό έως ότου να μην παρατηρούνται συσσωματώματα της σκόνης μέσα στον διαλύτη (περίπου 10 λεπτά).

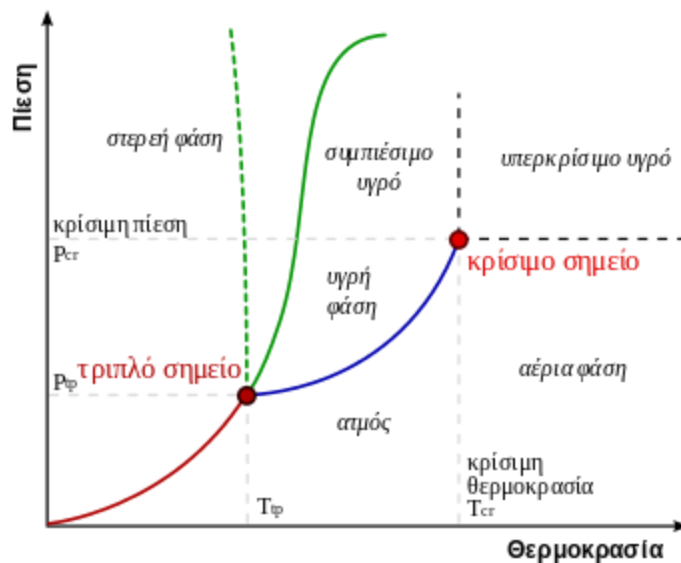
Έπειτα, σε τρίτο ποτήρι ζέσης 150 ml τοποθετούνται 14,65 ml απιονισμένου νερού και 1,2786 g L-αργινίνης. Το ποτήρι αυτό τοποθετείται σε αυτοσχέδιο λουτρό και μαζί τοποθετούνται σε μαγνητικό αναδευτήρα με θερμαινόμενη πλάκα. Εκεί με την βοήθεια θερμοστοιχείου το λουτρό διατηρείται σε σταθερή θερμοκρασία 40° κελσίου. Όταν το διάλυμα της L-αργινίνης φτάσει την ίδια θερμοκρασία, ξεκινά η ταυτόχρονη στάγδην προσθήκη των διαλυμάτων των δοχείων A και B. Η προσθήκη γίνεται στάγδην ώστε να εξασφαλιστεί ο σχηματισμός σωματιδίων υδροξυαπατίτη μικρού μεγέθους που οδηγούν σε τελικά ικρίωματα με καλύτερη μηχανική συμπεριφορά. Μετά την ολοκλήρωση της

προσθήκης των αιωρημάτων το τελικό αιώρημα οδηγείται προς μηχανική ανάδευση για 45 λεπτά στις 4000 στροφές/λεπτό.

Σε αυτό το στάδιο είναι απαραίτητος ο διαχωρισμός στερεής και υγρής φάσης πριν την πλήρη απομάκρυνση της υγρασίας κατά την λυοφιλίωση που θα ακολουθήσει. Αυτή επιτυγχάνεται μέσω φυγοκέντρησης. Το αιώρημα υδροξυαπατίτη/χιτοζάνης/L-αργινίνης τοποθετείται σε δοχεία τύπου falcon τα οποία τοποθετούνται αντιδιαμετρικά στην συσκευή φυγοκέντρησης και φυγοκεντρούνται για 5 λεπτά στις 11000 στροφές/λεπτό. Μετά το τέλος της φυγοκέντρησης το μεγαλύτερο ποσοστό της υγρασίας απομακρύνεται με την βοήθεια πιπέτας. Για την πλήρη απομάκρυνση των υγρών φάσεων από την σκόνη τα δοχεία falcon που περιέχουν την σκόνη οδηγούνται προς λυοφιλίωση.

1.2.1 Λυοφιλίωση

Η λυοφιλίωση ή αλλιώς κρυοξήρανση είναι μια διεργασία η οποία βασιζόμενη στην εξάχνωση επιτυγχάνει την διατήρηση ευπαθών υλικών αλλά και την δημιουργία τρισδιάστατων δομών με εσωτερικό πορώδες δίκτυο. Για να περιγραφεί η αρχή λειτουργίας της κρίνεται σκόπιμο να γίνει αναφορά στο τριπλό σημείο στο διάγραμμα φάσεων του νερού.



Εικόνα 13 Το διάγραμμα φάσεων του νερού

Το τριπλό σημείο του νερού έχει $P=6,1 \text{ mbar}$ και $\theta=0^\circ\text{C}$. Στο παραπάνω διάγραμμα παρατηρείται πως για συνδυασμούς θερμοκρασίας και πίεσης που οδηγούν κάτω από το τριπλό σημείο επιτυγχάνεται απευθείας μετάβαση από την στερεή φάση (πάγος) στην αέρια (ατμός), δηλαδή εξάχνωση. Πρακτικά η εξάχνωση αυτή επιτυγχάνεται σε 2 στάδια. Αρχικά με την πτώση της θερμοκρασίας στους 0°C το νερό που υπάρχει εντός του υλικού περνά στη στερεή φάση. Στην συνέχεια με τη δημιουργία κενού ο πάγος εξαχνώνεται και το υλικό είτε ξηραίνεται πλήρως ή σχηματίζει πορώδες δίκτυο, ανάλογα με την εφαρμογή χωρίς να αλλοιώνεται η δομή και η σύσταση του. Η εξάχνωση ξεκινά από τα εξωτερικά στρώματα του υλικού και σταδιακά διεισδύει στο εσωτερικό του. Οι περισσότεροι εργαστηριακοί λυοφιλιωτές αποτελούνται από ένα θάλαμο κατάψυξης, έναν ψυχόμενο συμπυκνωτή μέσω του οποίου απομακρύνονται οι ατμοί χωρίς να διαταράσσεται το κενό και μια αντλία κενού.

Οι παράμετροι που επηρεάζουν την δομή του τελικού τρισδιάστατου προϊόντος είναι ο ρυθμός ψύξης και αυτός της εξάχνωσης. Όσον αφορά τον πρώτο, όταν είναι γρήγορος δημιουργούνται μικροί κρύσταλλοι που συνεπάγονται μικρούς πόρους μετά την εξάχνωση. Ο βραδύς ρυθμός επιφέρει αντίθετο αποτέλεσμα στο τελικό υλικό. Παρομοίως, ο ρυθμός εξάχνωσης επηρεάζει τόσο το ποσοστό πορώδους όσο και το μέγεθος των πόρων.

Η λυοφιλίωση βρίσκει εφαρμογή σε πληθώρα τομέων όπως η φαρμακευτική, η τεχνολογία τροφίμων και η βιοϊατρική μηχανική λόγω της πλειάδας πλεονεκτημάτων που έχει να προσφέρει. Αρχικά, είναι μια τεχνική αποδοτική από πλευράς χρόνου και ποσότητας ξήρανσης η οποία δίνει ικανότητα πλήρους επανυδάτωσης του δείγματος. Επιπλέον, σε σύγκριση με άλλες μεθόδους, η ξήρανση γίνεται ηπιότερα και έτσι δεν επηρεάζεται το υλικό. Τέλος, δίνει την δυνατότητα διατήρησης της δραστηριότητας πρωτεϊνών, πεπτιδίων και φαρμακευτικά ενεργών ουσιών.

Η λυοφιλίωση είναι μια τεχνική που χρησιμοποιούνταν εμπειρικά από τον 15^ο αιώνα. Πιο συγκεκριμένα οι Ίνκας χρησιμοποιούσαν μια τεχνική βασιζόμενη στις ίδιες αρχές με την λυοφιλίωση έτσι ώστε να διατηρούν μεγάλες ποσότητες πατάτας για μεγάλα χρονικά διαστήματα. Λόγω της ελαττωμένης ατμοσφαιρικής πίεσης και των χαμηλών θερμοκρασιών που επικρατούσαν τις νύχτες στις Άνδεις, κατάφερναν να δημιουργούν μια σκόνη πατάτας η οποία μπορούσε να επανυδατωθεί και να είναι βρώσιμη ανά πάσα στιγμή. Ένας κύκλος λυοφιλίωσης αποτελείται από τρία διαδοχικά στάδια: κατάψυξη, πρώτο στάδιο ξήρανσης και δεύτερο στάδιο ξήρανσης. Κατά τη διάρκεια της κατάψυξης, τα ράφια είναι παγωμένα και το μεγαλύτερο μέρος του νερού στα δείγματα κρυσταλλώνεται σε πάγο, συγκεντρώνοντας έτσι τις διαλυτές ουσίες μεταξύ των κρυστάλλων του πάγου.

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

Στην παρούσα εργασία, το υλικό υπέστη ένα κύκλο ψύξης στους -55°C για 3 ώρες και στην συνέχεια ξεκίνησε η διαδικασία εξάχνωσης με εφαρμογή κενού υπό πίεση 0.350 mbar.

1.3 Διαδικασία χημικής διασύνδεσης σκόνης και Poly(ethyleneoxide) (PEO)

Το PEO που χρησιμοποιήθηκε στην πειραματική διαδικασία ήταν σε μορφή υδατοδιαλυτής ξηρής σκόνης, 0,316g της οποίας αναμείχθηκαν με 10 mL διαλύματος

οξικού οξέος (CH_3COOH) συγκέντρωσης 0,5M. Για τον προσδιορισμό των βέλτιστων παραμέτρων σύνθεσης χρησιμοποιήθηκε σκόνη μοριακού βάρους 600000, 900000, 2000000. Στην συνέχεια το διάλυμα οδηγήθηκε προς μαγνητική ανάδευση υπό σταθερή θερμοκρασία 40°C για χρόνους πολυμερισμού 24h, 48h , 72h. Στην συνέχεια, το διάλυμα αναμειγνύεται σταδιακά με την λειοτριμμένη σκόνη υδροξυαπατίτη.

Τέλος, η πάστα που προκύπτει τοποθετήθηκε σε κυλινδρικά καλούπια διαστάσεων 5x5x20 mmτα οποία τοποθετήθηκαν στον λυοφιλιωτή. Εκεί επαναλήφθηκε ο κύκλος λυοφιλίωσης που προαναφέρθηκε, στο τέλος του οποίου τα τελικά ικρίωματα είχαν παραχθεί.

1.4 Ενσωμάτωση νανοσωλήνων άνθρακα

Στα ικρίωματα στα οποία έγινε προσθήκη νανοσωλήνων άνθρακα, η διαδικασία σύνθεσης ήταν ως επί το πλείστον παρόμοια. Βιβλιογραφικά προκύπτει πως για να μπορέσει ένα ικρίωμα να ωφεληθεί από την παρουσία των νανοσωλήνων χωρίς να μειωθεί η βιοσυμβατότητα του, η ποσότητα τους πρέπει να κυμαίνεται μεταξύ 1 και 5 % του ολικού βάρους του ικρίωματος.

Στην παρούσα εργασία χρησιμοποιήθηκαν νανοσωλήνες άνθρακα πολλαπλών στρωμάτων (MWCNTs), σε μορφή ξηρής σκόνης, καθαρότητας $\leq 98,5\%$ και με διαστάσεις εξωτερικής διαμέτρου 20-40 nm και μήκος $\geq 10 \mu\text{m}$. Ο συγκεκριμένος τύπος νανοσωλήνων συνίσταται για βιοϊατρικές εφαρμογές. Εφόσον θα ακολουθήσει μελέτη βιοσυμβατότητας επιλέχθηκε το ελάχιστο βάρος 1% που μεταφράζεται σε 0,0025 g. Η ενσωμάτωση έγινε σε δύο στάδια της σύνθεσης. Αρχικά, στο αιώρημα χιτοζάνης/ H_3PO_4 ή εναλλακτικά έγινε προσθήκη στο αιώρημα υδροξυαπατίτη/χιτοζάνης/L-αργινίνης. Μετά την προσθήκη

ακολούθησε ένα στάδιο ομογενοποίησης στον μηχανικό διασπορέα διάρκειας 90 λεπτών στις 4000 στροφές/λεπτό.

1.5 Κωδικοποίηση ικριωμάτων

Η κωδικοποίηση των ικριωμάτων έχει ως σκοπό τον προσδιορισμό των παραμέτρων σύνθεσης του εκάστοτε δείγματος. Συνεπώς η κωδικοποίηση αφορά την παρουσία νανοσωλήνων άνθρακα, το στάδιο ενσωμάτωσής τους, το μοριακό βάρος του PEO και τις ημέρες πολυμερισμού του. Έτσι, η επεξήγηση της κωδικοποίησης θα γίνει σε τρία κομμάτια, όπως αυτά παρουσιάζονται παρακάτω:

1. Παρουσία και στάδιο ενσωμάτωσης CNTs

Το πρόθεμα της κωδικοποίησης προδίδει τη συγκεκριμένη παράμετρο. Για τα ικρίωματα στα οποία δεν χρησιμοποιήθηκαν CNTs καθορίστηκε το πρόθεμα **NP**. Το πρόθεμα **CC** δηλώνει πως ενσωματώθηκαν νανοσωλήνες άνθρακα στο πρόδρομο αιώρημα χιτοζάνης, ενώ με **NC** προσδιορίζονται τα τρισδιάστατα ικρίωματα στα οποία οι CNTs προστέθηκαν στο τελικό αιώρημα υδροξυαπατίτη/χιτοζάνης/L-αργινίνης.

2. Μοριακό βάρος PEO

Για αυτήν την παράμετρο χρησιμοποιήθηκαν απλούστερες κωδικοποιήσεις. Για μοριακό βάρος του Poly(Ethylene) Oxide 600.000 χρησιμοποιήθηκε ο κωδικός 6A. Αντίστοιχα, τα μοριακά βάρη 900.000 και 2.000.000 κωδικοποιήθηκαν ως 9A και 2M.

3. Ημέρες πολυμερισμού PEO

Τέλος οι ημέρες πολυμερισμού του Poly(Ethylene) Oxide φανερώνονται από τις καταλήξεις 1,2 και 3D για μια, δυο και τρεις μέρες πολυμερισμού, αντίστοιχα.

2. Δοκιμές με σκοπό τον καθορισμό των βέλτιστων παραμέτρων σύνθεσης των ικριωμάτων

2.1. Ηλεκτρονική μικροσκοπία (SEM)

Η Ηλεκτρονική Μικροσκοπία Σάρωσης (Scanning Electron Microscopy, SEM) είναι μία από τις σύγχρονες και ευέλικτες μεθόδους ανάλυσης της μικροδομής μεγάλου αριθμού υλικών. Η ικανότητα των οπτικών μικροσκοπίων περιορίζεται λόγω της φύσης του φωτός σε επίπεδα μεγεθύνσεων έως 1000x και σε διακριτική ικανότητα έως 0.2 μm . Στις αρχές της δεκαετίας του '30 υπήρχε ήδη η ανάγκη για εξέταση του εσωτερικού του κυττάρου (πυρήνας, μιτοχόνδρια κλπ.) που απαιτούσε μεγεθύνσεις μεγαλύτερες του 10,000 x. Η απαίτηση αυτή οδήγησε στην ανακάλυψη και εφαρμογή των ηλεκτρονικών μικροσκοπίων. Το ηλεκτρονικό μικροσκόπιο διέλευσης ή διαπερατότητας (TEM, Transmission Electron Microscope) ήταν το πρώτο είδος ηλεκτρονικού μικροσκοπίου και στη συνέχεια ακολούθησε το ηλεκτρονικό μικροσκόπιο σάρωσης (SEM, Scanning Electron Microscope). Το ηλεκτρονικό μικροσκόπιο σάρωσης είναι ένα όργανο που λειτουργεί όπως περίπου και ένα οπτικό μικροσκόπιο μόνο που χρησιμοποιεί δέσμη ηλεκτρονίων υψηλής ενέργειας αντί για φως, για να εξετάσει αντικείμενα σε λεπτομερή κλίμακα. Τα ηλεκτρόνια λόγω της κυματικής τους φύσης μπορούν να εστιαστούν όπως και τα φωτεινά κύματα αλλά σε πολύ μικρότερη επιφάνεια (π.χ. κόκκος υλικού). Η δέσμη ηλεκτρονίων

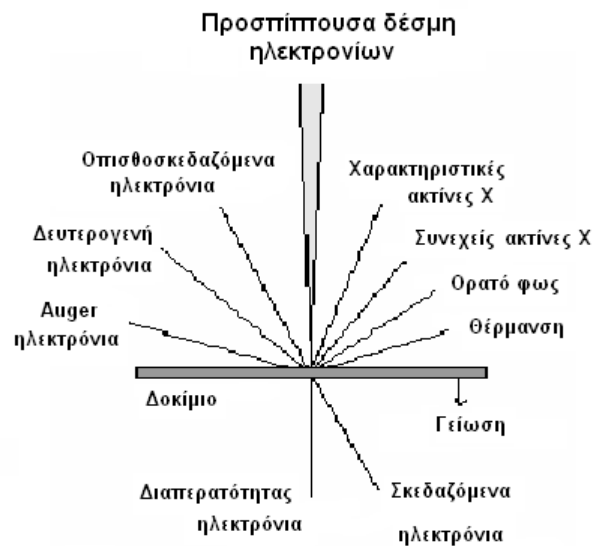
σαρώνει την επιφάνεια του δείγματος με το οποίο αλληλεπιδρά. Από την αλληλεπίδραση αυτή προκύπτουν πληροφορίες σε σχέση με τα άτομα των στοιχείων που απαρτίζουν το εξεταζόμενο υλικό. Από τα άτομα των στοιχείων εκπέμπονται κυρίως δευτερογενή (secondary) και οπισθοσκεδαζόμενα (backscattered) ηλεκτρόνια καθώς και ακτίνες X. Η ένταση των εκπεμπομένων ηλεκτρονίων επηρεάζεται από τα χαρακτηριστικά της επιφάνειας. Έτσι, το SEM δίνει πληροφορίες που αφορούν κυρίως στη μορφολογία και στη σύσταση της επιφανείας. Εφαρμόζοντας ένα σύστημα ανίχνευσης της διασποράς των ενεργειών των ακτίνων X που δημιουργούνται στην επιφάνεια από την προσπίπτουσα δέσμη, μπορεί να γίνει ημιποσοτική στοιχειακή ανάλυση του υλικού.

Τα προς εξέταση δείγματα τοποθετούνται σε θάλαμο όπου υπάρχει υψηλό κενό και η επιφάνεια του δοκιμίου σαρώνεται με μια δέσμη ηλεκτρονίων. Τα δευτερογενή ηλεκτρόνια είναι αυτά που διεγείρονται από την επιφάνεια του δείγματος και έχουν χαρακτηριστικό μήκος κύματος. Αυτά συλλέγονται μέσω ανιχνευτή δευτερογενών ηλεκτρονίων που υπάρχει στο μικροσκόπιο. Είναι πολύ χρήσιμα γιατί δίνουν τη δυνατότητα σχηματισμού εικόνων που παρέχουν πληροφορίες για την τοπογραφία (ανάγλυφο) του εκάστοτε δοκιμίου. Από την πρόσπτωση των πρωτογενών ηλεκτρονίων σε κάποιο βάθος από την επιφάνεια του δοκιμίου λαμβάνεται σήμα από τα οπισθοσκεδαζόμενα ηλεκτρόνια. Τα οπισθοσκεδαζόμενα ηλεκτρόνια μειονεκτούν γιατί, προερχόμενα από το βάθος του δοκιμίου, απορροφώνται από τη μάζα επειδή είναι χαμηλής ενέργειας. Για τον λόγο αυτό συλλέγονται με άλλο ανιχνευτή, ο οποίος τοποθετείται όσο πιο κοντά γίνεται στην επιφάνεια του δοκιμίου και ονομάζεται ανιχνευτής οπισθοσκεδαζόμενων ηλεκτρονίων. Είναι σημαντικά γιατί πληροφορούν για το μέσο ατομικό αριθμό της περιοχής από την οποία προέρχονται. Ο μέσος ατομικός αριθμός που

είναι το ημιάθροισμα δύο στοιχείων, δίνει πληροφορίες για τη μέση σύσταση ανάλογα με την αναμενόμενη χημική σύσταση της περιοχής. Στη συνέχεια, η ανακλώμενη ή οπισθοσκεδαζόμενη δέσμη ηλεκτρονίων συλλέγεται και ύστερα εμφανίζεται με τον ίδιο ρυθμό σάρωσης σε ένα σωλήνα καθοδικών ακτίνων. Η εικόνα που εμφανίζεται στην οθόνη αναπαριστά τα επιφανειακά χαρακτηριστικά της μορφολογίας του δοκιμίου και μπορεί να αξιολογηθεί καλύτερα καθώς υπάρχει η δυνατότητα φωτογράφησής της. Η επιφάνεια είναι δυνατό να γυαλιστεί ή να υποστεί χημική επεξεργασία, κάτι που δεν είναι κρίσιμο για τη μέθοδο, όσο το να είναι αυτή ηλεκτρικά αγωγίμη. Για το λόγο αυτό κατά την εξέταση μη αγωγίμων υλικών επιβάλλεται κατά την προετοιμασία των δειγμάτων η εναπόθεση ενός πολύ λεπτού μεταλλικού επιχρίσματος. Με τη συγκεκριμένη μέθοδο μπορούν να επιτευχθούν μεγεθύνσεις που κυμαίνονται από 10 ή/και άνω των 50000 διαμέτρων. Οι εικόνες που παράγονται από τα οπισθοσκεδαζόμενα ηλεκτρόνια, παρουσιάζουν αντίθεση εικόνας η οποία οφείλεται στο μέσο ατομικό αριθμό. Όσο μικρότερος ο ατομικός αριθμός, τόσο σκουρόχρωμη η αντίθεση, ενώ όσο μεγαλύτερος τόσο ανοιχτόχρωμη αντίθεση.

Εφαρμόζοντας ένα σύστημα ανίχνευσης της διασποράς των ενεργειών των ακτίνων X που δημιουργούνται στην επιφάνεια από την προσπίπτουσα δέσμη, μπορεί να γίνει ημιποσοτική στοιχειακή ανάλυση του υλικού. Πιο αναλυτικά, η βασική αρχή λειτουργίας περιλαμβάνει την ακτινοβολία του δείγματος με μια καλά εστιασμένη δέσμη ηλεκτρονίων. Η περιοχή όπου ενεργητικά ηλεκτρόνια αλληλεπιδρούν με το στερεό, εναποθέτοντας ενέργεια και παράγοντας εκείνες τις μορφές δευτερεύουσας ακτινοβολίας που μετράται ονομάζεται όγκος αλληλεπίδρασης, ο οποίος εξαρτάται από τον ατομικό αριθμό και το δυναμικό επιτάχυνσης. Καθώς η δέσμη σαρώνει το δείγμα, ηλεκτρόνια ανακρούονται από αυτό και συγκεντρώνονται σε μια άνοδο συλλογής, που διατηρείται σε

δυναμικό μερικές εκατοντάδες volt θετικότερο ως προς το δείγμα. Το ρεύμα στην άνοδο συλλογής ενισχύεται και χρησιμοποιείται για να διαμορφώσει τη δέσμη ηλεκτρονίων σε καθοδικό σωλήνα, ο οποίος σαρώνεται σε συγχρονισμό με τη δέσμη του μικροσκοπίου. Ο καθοδικός σωλήνας παρουσιάζει έτσι ένα πολύ μεγεθυσμένο είδωλο του αντικειμένου. Η δέσμη των ηλεκτρονίων παράγεται από τη θερμιονική εκπομπή ενός νήματος βολφραμίου και επιταχύνεται από ένα ηλεκτρικό πεδίο με τάση από 5-30 kV. Καθώς η δέσμη προσπίπτει στην επιφάνεια του δοκιμίου και εισχωρεί σε ένα βάθος της τάξεως του 1 μm προκαλεί την εκπομπή νέων ηλεκτρονίων, αλλά και ακτίνων X από το δείγμα.



Εικόνα 14 Φαινόμενα αλληλεπίδραση δέσμης ηλεκτρονίων - δείγματος.

Η διείσδυση της δέσμης στο δείγμα καθορίζεται από τις παρακάτω τέσσερις παραμέτρους και κυρίως τις δύο τελευταίες:

- Τον αριθμό των ηλεκτρονίων που υπάρχουν στη δέσμη (emission current).

- Τη διάμετρο της δέσμης (spot size).
- Την ταχύτητα/ενέργεια των ηλεκτρονίων (accelerating voltage).
- Το είδος του δείγματος (Μέσος ατομικός αριθμός του δείγματος).

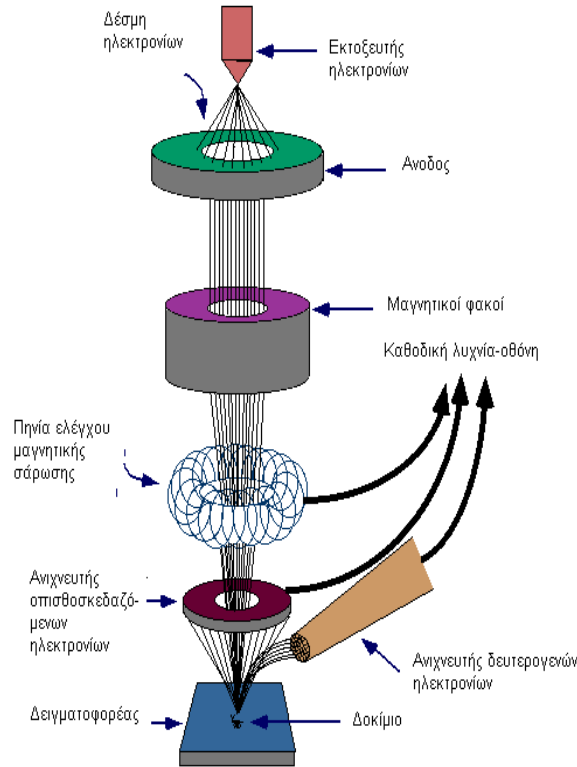
Οι αλληλεπιδράσεις που λαμβάνουν χώρα ανάμεσα στο δείγμα και τα ηλεκτρόνια της δέσμης περιλαμβάνουν: φόρτιση, δηλαδή συσσώρευση φορτίου ηλεκτρονίων στο δείγμα, ελαστική σκέδαση ηλεκτρονίων, μη ελαστική σκέδαση ηλεκτρονίων, και θέρμανση του δείγματος.

2.1.1 Οργανολογία Ηλεκτρονικού Μικροσκοπίου Σάρωσης

Τα βασικά τμήματα ενός ηλεκτρονικού μικροσκοπίου σάρωσης είναι το σύστημα παραγωγής δέσμης ηλεκτρονίων, το σύστημα κατεύθυνσης της δέσμης, το σύστημα πληροφοριών και τέλος το σύστημα κενού (Εικόνα 15). Η λειτουργία ενός ηλεκτρονικού μικροσκοπίου σάρωσης περιγράφεται από τα ακόλουθα στάδια:

- Σχηματισμός μίας δέσμης ηλεκτρονίων από την πηγή η οποία επιταχύνεται προς το δείγμα μέσω ενός θετικού ηλεκτρικού δυναμικού.
- Επίτευξη μέσω μεταλλικών ανοιγμάτων, ηλεκτρομαγνητικών φακών και πηνίων σάρωσης μιας λεπτής εστιασμένης μονοχρωματικής δέσμης, η οποία σαρώνει την επιφάνεια του δείγματος.
- Καταγραφή των αλληλεπιδράσεων δέσμης και δείγματος και μετατροπής τους σε εικόνα

Πηγή ηλεκτρονίων: Τα ηλεκτρόνια παράγονται από νήμα βολφραμίου το οποίο λειτουργεί σαν κάθοδος και διαρρέεται από ηλεκτρικό ρεύμα (filament current). Η αύξηση της έντασης του ρεύματος οδηγεί στην εκπομπή ηλεκτρονίων που κατευθύνονται προς την άνοδο, στην οποία εφαρμόζεται δυναμικό ίσο με 1-30 kV (accelerating voltage). Η άνοδος δημιουργεί ισχυρές ελκτικές δυνάμεις στα ηλεκτρόνια, με αποτέλεσμα να τα κατευθύνει και να τα επιταχύνει. Η αύξηση της έντασης του ρεύματος πάνω από μια κρίσιμη τιμή σηματοδοτεί και την παύση της εκπομπής περισσοτέρων ηλεκτρονίων. Η κατάσταση αυτή ονομάζεται κορεσμός του νήματος (filament saturation). Αν η ένταση του ηλεκτρικού ρεύματος αυξηθεί περαιτέρω, συμβαίνει υπερθέρμανση και εξάχνωση του βολφραμίου, δηλαδή καύση του νήματος. Ο αριθμός ηλεκτρονίων στη δέσμη ορίζεται σαν ρεύμα εκπομπής (emission current). Καθορίζεται από την απόσταση μεταξύ της άκρης του νήματος (filament tip) και του ανοίγματος που υπάρχει στο καπάκι (Wehnelt cap aperture). Όσο πιο μικρή είναι αυτή η απόσταση, τόσο περισσότερα ηλεκτρόνια έλκονται, με αποτέλεσμα να αυξάνεται η ένταση του ρεύματος εκπομπής. Τα ηλεκτρόνια επιταχύνονται από την άνοδο και διέρχονται μέσω ενός ηλεκτρομαγνητικού φακού συμπύκνωσης (condenser lens) που τα μετατρέπει σε δέσμη. Η ισχύς αυτού του φακού καθορίζει την διάμετρο της δέσμης (spot size).



Εικόνα 15 Βασικά τμήματα Ηλεκτρονικού Μικροσκοπίου Σάρωσης.

Σύστημα Κενού: Κατά τη χρήση του SEM, η στήλη πρέπει να βρίσκεται υπό κενό για να μπορεί να παραχθεί και διατηρηθεί σταθερή η ακτίνα των ηλεκτρονίων. Διαφορετικά, τα ηλεκτρόνια συγκρούονται με τα μόρια του αέρα και απορροφώνται. Το κενό επιτυγχάνεται με τη χρήση δύο αντλιών και είναι της τάξης των $<10^3$ Pa.

Σύστημα Πληροφοριών: Περιλαμβάνει τους διάφορους αιχνευτές που δέχονται τα σήματα που παράγονται από την αλληλεπίδραση της δέσμης ηλεκτρονίων με το δείγμα και το σύστημα παρουσίασης (μεγέθυνση-παρουσίαση-καταγραφή). Οι αιχνευτές που χρησιμοποιούνται συνήθως είναι αιχνευτές δευτερογενών ηλεκτρονίων όπως ο αιχνευτής Everhart – Thornley (ETD), ο αιχνευτής ευρέως πεδίου (Large Field Detector, LFD), ο αιχνευτής σε ατμοσφαιρική πίεση (Gaseous Electron Detector GED), ο αιχνευτής διόδου στερεάς φάσης (Solid State Electron Detector, SSED) για τα οπισθοσκεδαζόμενα

ηλεκτρόνια (BSE), καθώς και ο ανιχνευτής διόδου λιθίου - πυριτίου (SiLi), με τον οποίο ανιχνεύουμε ενεργειακή διασπορά ακτίνων - X (Energy Dispersive Spetrometer, EDS). Στην παρούσα διπλωματική εργασία χρησιμοποιήθηκε συσκευή SEM της εταιρείας JEOL και τύπου JSM-6380LV και στήλη EDS εταιρείας OXFORD INSTRUMENTS, τύπου INCA x-sight της σχολής Μηχανικών Μεταλλείων-Μεταλλουργών. Οι παράμετροι λειτουργίας που ορίστηκαν στο SEM για την παρατήρηση και ανάλυση των δειγμάτων ήταν:

- ταχύτητα των ηλεκτρονίων: 20Kv
- Working distance: 15mm

2.2 Περιθλασιμετρία Ακτίνων X (XRD)

Η ανάλυση με περίθλαση ακτίνων X δίνει πληροφορίες για την τρισδιάστατη διάταξη των ατόμων ή μορίων ενός κρυσταλλικού υλικού. Με την ανάλυση ακτίνων X προκύπτει η κρυσταλλική δομή των υλικών, η οποία συμπληρώνει τη στοιχειομετρική ανάλυση στην ταυτοποίηση μιας ουσίας. Επιπλέον, είναι δυνατή η επακριβής μέτρηση των ενδοατομικών αποστάσεων στο κρυσταλλικό πλέγμα, καθώς και ο προσδιορισμός της πλεγματικής δομής σύνθετων κρυστάλλων αυξημένης δομικής πολυπλοκότητας. Όταν ακτίνες X διέρχονται από ένα κρύσταλλο, τότε μέρος της ενέργειάς τους απορροφάται από αυτόν. Η ενέργεια αυτή εκπέμπεται από τον κρύσταλλο, καθώς οι δομικές μονάδες του κρυστάλλου καθίστανται δευτερογενείς πηγές ηλεκτρομαγνητικής ακτινοβολίας . Οι δευτερογενείς ακτίνες X, που οφείλονται στην περίθλαση της πρωτογενούς ακτινοβολίας, είναι είτε σε

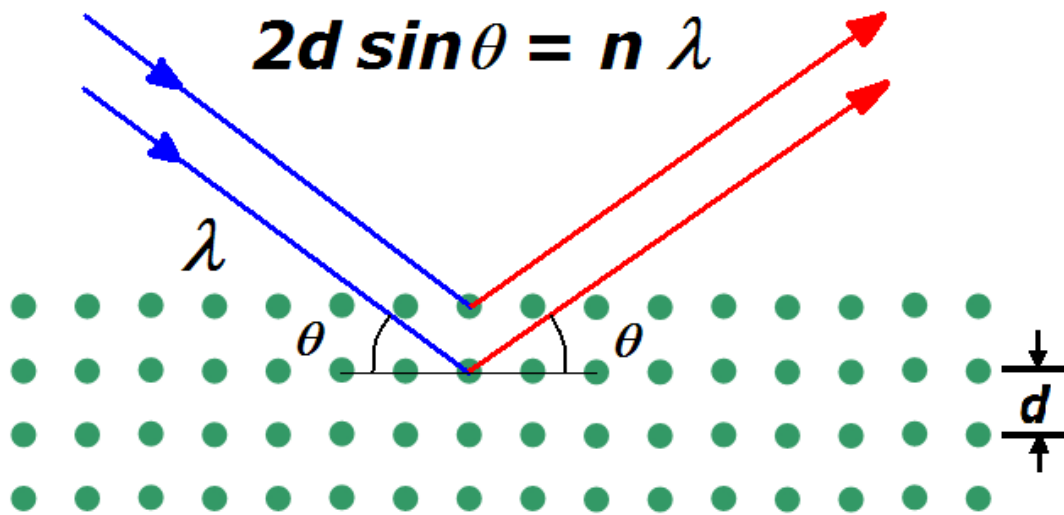
φάση και συμβάλλουν δημιουργικά στην ενίσχυση της ακτινοβολίας, είτε σε αντίθετη φάση και συμβάλλουν στην απόσβεση της ακτινοβολίας. Λόγω συμμετρίας, το κρυσταλλικό πλέγμα συγκροτείται από παράλληλα επίπεδα, τα κρυσταλλικά επίπεδα, που περιέχουν το ίδιο είδος δομικών μονάδων. Στον κρύσταλλο υπάρχουν πολλές τέτοιες ομάδες κρυσταλλικών επιπέδων, καθεμία από τις οποίες χαρακτηρίζεται από την απόσταση, d , ανάμεσα σε δύο διαδοχικά παράλληλα επίπεδα. Κατά την περίθλαση των ακτίνων X από τον κρύσταλλο, ανάλογα με τη γωνία πρόσπτωσης ως προς μια ομάδα παραλλήλων επιπέδων, είναι δυνατό να συμβεί ενίσχυση ή απόσβεση των δευτερογενών κυμάνσεων. Η διαδρομή της ακτινοβολίας, που προσκρούει στο πρώτο στρώμα των δομικών μονάδων είναι μικρότερη από αυτήν που διασχίζει η ακτινοβολία που προσκρούει στο δεύτερο στρώμα. Προκειμένου οι δευτερογενείς ακτινοβολίες που εκπέμπονται από τον κρύσταλλο να είναι σε φάση μεταξύ τους, θα πρέπει η διαφορά των διαδρομών τους να είναι ακέραιο πολλαπλάσιο του μήκους κύματος της ακτινοβολίας, δηλαδή:

$$n \cdot \lambda = 2 \cdot d \cdot \eta \mu \theta$$

όπου:

- $n=1, 2, 3, \dots$ και αναφέρεται στα διαδοχικά παράλληλα νοητά κρυσταλλικά επίπεδα, που παράγουν ενισχυτική συμβολή.
- λ = το μήκος κύματος της δέσμης των ακτίνων X που είναι γνωστό και εξαρτάται από το στοιχείο της καθόδου
- d = οι αποστάσεις των κρυσταλλικών επιπέδων
- θ = είναι η γωνία πρόσπτωσης ή ανάκλασης της ακτίνας X σε σχέση με τα κρυσταλλικά επίπεδα

Η εξίσωση αυτή είναι γνωστή ως νόμος σκέδασης ή συνθήκη του Bragg και συνδέει το μήκος κύματος λ της ακτινοβολίας, τη γωνία περίθλασης θ , και την πλεγματική απόσταση d μεταξύ των ατόμων σε ένα κρύσταλλο. Οι αποστάσεις d μεταξύ των διαδοχικών κρυσταλλικών επιπέδων αποτελούν χαρακτηριστικές σταθερές, με βάση τις οποίες μπορεί να γίνει ταυτοποίηση του κρυστάλλου.



Εικόνα 16 Σχηματική απεικόνιση του νόμου του Bragg

Το XRD εντάσσεται στις μη καταστρεπτικές μεθόδους, δίνει γρήγορα και αξιόπιστα αποτελέσματα και μπορεί να χρησιμοποιηθεί επιτόπου, in situ. Μετρήσεις μπορούν να ληφθούν από κρυστάλλους μερικών μικρών μέχρι σύνολα από κρυστάλλους, παρόλο που το μέγεθος της περιοχής του δείγματος που θα εξετασθεί σπάνια υπερβαίνει 1 cm^2 . Οι κορυφές ενός φάσματος XRD χαρακτηρίζονται από καθορισμένη θέση σε αυτό, χαρακτηριστική ένταση ανάλογα το υλικό και διαφορετικό σχήμα. Οι εντάσεις των κορυφών σχετίζονται με τον τύπο των ατόμων, τη διεύθυνση τους στον κρύσταλλο και μπορούν επίσης να ποσοτικοποιηθούν και να δώσουν ακριβείς πληροφορίες για το υλικό.

Το σχήμα των κορυφών στο φάσμα είναι μια ένδειξη της τελειότητας ενός κρυστάλλου. Ένα κρυσταλλικό υλικό με τη μορφή κόνεως είναι το σύνολο ενός μεγάλου αριθμού κρυστάλλων. Κάθε κρύσταλλος σχηματίζεται από την επαναλαμβανόμενη διευθέτηση στο χώρο της μοναδιαίας κυψελίδας, η οποία αποτελεί το ελάχιστο δομικό στοιχείο ενός κρυστάλλου. Η μοναδιαία κυψελίδα από την άλλη, προκύπτει από τη συμμετρική επανάληψη των ατόμων ή μορίων του υλικού και τα χαρακτηριστικά της είναι μοναδικά για κάθε υλικό. Για να προσδιοριστεί η κρυσταλλική δομή ενός υλικού είναι απαραίτητο να προσδιοριστούν τα χαρακτηριστικά της μοναδιαίας κυψελίδας του κρυστάλλου (διαστάσεις πλευρών και οι μεταξύ τους γωνίες). Για ένα δεδομένο κρυσταλλικό πλέγμα, οι γωνίες περίθλασης των ακτίνων X είναι ίδιες ανεξάρτητα από το περιεχόμενο της μοναδιαίας κυψελίδας, τα άτομα ή τα μόρια δηλαδή από τα οποία αποτελείται και εξαρτώνται μόνο από το σχήμα αυτής. Οι γωνίες περίθλασής λοιπόν δίνουν πληροφορίες σχετικά με τα χαρακτηριστικά της κυψελίδας και του κρυσταλλικού πλέγματος γενικότερα. Εκτός από τον προσδιορισμό της κρυσταλλικής δομής, η εν λόγω μέθοδος δίνει πληροφορίες και για τις ενώσεις που υπάρχουν σε ένα υλικό και τις μορφές τους. Πραγματοποιείται δηλαδή και ποιοτική ανάλυση. Μεγάλος αριθμός κρυσταλλογραφικών δεδομένων για τις γνωστές κρυσταλλικές δομές έχουν καταγραφεί σε βάσεις δεδομένων (JCPDS - Powder Diffraction File), και χρησιμοποιούνται ως μέτρο σύγκρισης για τα λαμβανόμενα φάσματα από το υπό εξέταση υλικό. Καταγράφεται η γωνία θ και η σχετική ένταση των ισχυρότερων κορυφών και πραγματοποιείται σύγκριση με αυτές τις πιθανές φάσεις, για να προσδιοριστεί η δομή του δείγματος. Παράλληλα με την ποιοτική ανάλυση, πραγματοποιείται και ποσοτική ανάλυση, καθώς η σχετική ένταση των ανακλάσεων δύο

ή περισσότερων φάσεων στο ίδιο διάγραμμα εξαρτάται από τη συγκέντρωσή τους στο υλικό, οπότε και είναι δυνατό να υπολογιστεί το ποσοστό κάθε φάσης. [29]

2.2.1 Οργανολογία Περιθλασίμετρου Ακτίνων Χ

Η πηγή των ακτίνων Χ είναι μία καθοδική λυχνία συνοδευόμενη από φίλτρο, ώστε η ακτινοβολία να είναι αυστηρά μονοχρωματική, 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 Χ 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.



Εικόνα 17 Το περιθλασιόμετρο ακτίνων X

Στην παρούσα διπλωματική εργασία χρησιμοποιήθηκε περιθλασιόμετρο ακτίνων X Bruker D8 Focus, το οποίο χρησιμοποιεί καθοδική λυχνία χαλκού με φίλτρο νικελίου ώστε να προκύπτει μονοχρωματική ακτινοβολία $\text{CuK}\alpha_1$. 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. [29]

2.3 Δοκιμή αντοχής σε υδατικό περιβάλλον

Τα ικρίωματα που παράχθηκαν προορίζονται για χρήση στον ανθρώπινο οργανισμό, δηλαδή σε ένα περιβάλλον δυναμικής ισορροπίας. Για αυτόν τον λόγο, βασικό ρόλο στην επιλογή των καλύτερων ικριωμάτων διαδραμάτισε η δυνατότητα τους να διατηρούν την δομική τους ακεραιότητα σε υδατικά περιβάλλοντα. Τα ικρίωματα τα οποία προκρίθηκαν

έπειτα από τις προηγούμενες δοκιμές υπέστησαν αυτήν την δοκιμή, η οποία θα έκρινε αν είναι κατάλληλα για περαιτέρω μελέτη.

Για αυτήν την δοκιμή χρησιμοποιήθηκαν 6 κομμάτια μέσου πάχους 3mm για την κάθε ομάδα κριωμάτων. Τα κριώματα τοποθετήθηκαν σε φιαλίδια erendorff τα οποία περιείχαν από 2 ml Phosphate-buffered Saline (PBS). Το PBS είναι ένα ουδέτερο διάλυμα το οποίο χρησιμοποιείται συχνά σε βιολογικές μελέτες καθώς έχει την ίδια ιοντική συγκέντρωση με τα υγρά του ανθρώπινου οργανισμού. Τα φιαλίδια τοποθετήθηκαν σε πυριαντήριο με σταθερή θερμοκρασία 36,6°C ώστε οι συνθήκες να προσομοιάζουν αυτές του ανθρώπινου σώματος. Μετά την πάροδο 10 ημερών η δομική ακεραιότητα των δοκιμίων εξετάστηκε. Τα δοκίμια που διατήρησαν την δομή τους τοποθετήθηκαν σε σωλήνες falcon με 50 ml διαλύματος αιθανόλης 70% v/v για άλλες 10 μέρες. Η αντοχή στο περιβάλλον της αιθανόλης είναι κρίσιμη για το στάδιο απολύμανσης που θα προηγηθεί των κυτταροκαλλιιεργιών.

2.4 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, ενώ άλλα είδη τομογραφίας συνδυάζουν υπερήχους ή μικροκύματα. Η υπολογιστική τομογραφία έχει επικρατήσει τα τελευταία χρόνια ως μία απαραίτητη απεικονιστική μέθοδος στην κλινική πράξη, καθώς παρέχει εικόνες σημαντικά υψηλότερης αντίθεσης σε σχέση με την κλασσική ακτινογραφία, στην οποία οι διάφορες δομές επικαλύπτονται. Με τον όρο τομογραφία εννοείται η απεικόνιση ενός αντικειμένου από εγκάρσιες τομές με δεδομένα που έχουν προκύψει είτε από μετάδοση είτε από

ανάκλαση. Τα δεδομένα αυτά έχουν συλλεχθεί συνήθως υποβάλλοντας το αντικείμενο σε ακτινοβολία κατά μήκος διαφορετικών κατευθύνσεων.

Η Μικροτομογραφία (computed microtomography, micro-CT) αποτελεί παραλλαγή της κλασσικής υπολογιστικής τομογραφίας αλλά στη μικροκλίμακα. Πρόκειται δηλαδή ουσιαστικά, για έναν μικροσχεδιασμό των υπολογιστικών τομογράφων κωνικής δέσμης. Πρακτικά, οι σημαντικές τεχνικές διαφορές ενός μικροτομογράφου σε σχέση με ένα υπολογιστικό αξονικό τομογράφο είναι δύο και αποτελούν τον λόγο για τον οποίο επιτυγχάνεται καλύτερη ποιότητα και ανάλυση στις προβολικές εικόνες με τον μικροτομογράφο. Η πρώτη αφορά την αυξημένη ανάλυση σε επίπεδο pixel, η οποία είναι της τάξεως των 5 μm ή/και μικρότερη, κυρίως λόγω του μικρού μεγέθους εστίασης της πηγής (5-10 μm). Κλινικοί τομογράφοι διαθέτουν τυπικά ανάλυση περίπου 0,5 mm λόγω του μεγαλύτερου μεγέθους εστίασης (μερικά mm). Η δεύτερη διαφορά σχετίζεται με το γεγονός ότι οι προβολές στην υπολογιστική τομογραφία συλλέγονται περιστρέφοντας το ζεύγος πηγής ακτίνων X - ανιχνευτή γύρω από το αντικείμενο που εξετάζεται, το οποίο προκαλεί μηχανικές δονήσεις λόγω βάρους και όγκου. Στη μικροτομογραφία το αντικείμενο προς εξέταση συνήθως 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.

2.4.1 Οργανολογία της μCT

Ο υπολογιστικός τομογράφος, αντίθετα με την απλή ακτινογραφία όπου διοχετεύει μία δέσμη μονής ακτίνας X διαμέσου του αντικειμένου που εξετάζεται, εκπέμπει στην περίπτωση αυτή ταυτόχρονα διάφορες δέσμες ακτίνων X, από διαφορετικές γωνίες του

επιμήκη άξονα του δείγματος, έτσι ώστε να ακτινοβολείται μια νοητή «φέτα» του υλικού. Οι δέσμες των ακτίνων X, μετά τη δίοδό τους δια μέσου του αντικειμένου, ανιχνεύονται και στη συνέχεια υπολογίζεται η έντασή τους, δηλαδή ο βαθμός απορρόφησης τους. Οι ανιχνευτές πρέπει να έχουν υψηλή συνολική απόδοση ώστε να ελαχιστοποιείται η δόση ακτινοβολίας προς το εξεταζόμενο αντικείμενο, ιδίως στην περίπτωση εφαρμογών της ιατρικής, ενώ επίσης δε θα πρέπει να επηρεάζεται η λειτουργία τους από μεταβολές της θερμοκρασίας. Έπειτα, με τη βοήθεια ηλεκτρονικού υπολογιστή, μπορεί να υπολογιστεί η σχετική πυκνότητα των υλικών που εξετάστηκαν. Κάθε μέτρηση που πραγματοποιείται από τον υπολογιστικό τομογράφο, είναι στην ουσία το αποτέλεσμα μιας διαδρομής κατά μήκος του αντικειμένου που εξετάζεται. Τα επεξεργασμένα αποτελέσματα εκτίθενται υπό τη μορφή δισδιάστατης ή τρισδιάστατης εικόνας επί της οθόνης.

Στην παρούσα εργασία, δοκίμια τα οποία επέδειξαν την επιθυμητή δομή και συμπεριφορά επιλέχθηκαν ώστε να αναλυθεί η διασυνδεσιμότητα του εσωτερικού πορώδους δικτύου τους. Τα δοκίμια έπρεπε να έχουν κυλινδρικό σχήμα με διάμετρο 20mm και πάχος 5mm. Οι αναλύσεις έγιναν στο Ερευνητικό Κέντρο Βιοϊατρικών Επιστημών "Αλέξανδρος Φλέμινγκ" σε μικροτομογράφο τύπου Skyscan 1172 (Skyscan, Βέλγιο). Οι λειτουργικές παράμετροι της πηγής ακτίνων X ορίστηκαν στα 100 kV και 98 μ A, ενώ η ανάλυση (pixel size) στα 6.03 μ m.

3. Βιολογική και μηχανική συμπεριφορά

3.1 Υπολογισμός προσρόφησης νερού και διόγκωσης

Όταν ένα πορώδες υλικό καταβυθίζεται σε ένα διάλυμα, λόγω οσμωτικής πίεσης οι πόροι του διογκώνονται και προσλαμβάνουν υγρά έως ότου να επικρατήσει μια κατάσταση

ισορροπίας. Έχει βρεθεί πως τόσο η ποσότητα αίματος που διατηρεί ένα κριώμα, όσο και το ποσοστό διόγκωσης της εσωτερικής πορώδους δομής του επηρεάζουν την οστεοεπαγωγικότητα του. [30] Για αυτόν τον λόγο 6 ορθογώνια δοκίμια διαστάσεων 2mm×0,5mm×0,5mm κόπηκαν, ζυγίστηκαν και βυθίστηκαν σε απιονισμένο νερό για 48 ώρες. Η διάρκεια για την οποία βυθίστηκαν τα δοκίμια υπερβαίνει την χρονική περίοδο στην οποία έχει βρεθεί πως επέρχεται η κατάσταση ισορροπίας για παρόμοια βιοπολυμερή. [31] Μετά από 48 ώρες τα δοκίμια βγήκαν από το νερό, απομακρύνθηκε το επιφανειακό νερό, και ζυγίστηκαν ώστε να υπολογιστεί η μέγιστη προσρόφηση νερού αλλά και το ποσοστό διόγκωσης σύμφωνα με τον παρακάτω τύπο:

$$\text{Διόγκωση}\% = \frac{\text{Βάρος(υγρό)} - \text{Βάρος(ξηρό)}}{\text{Βάρος(ξηρό)}} \times 100$$

Η ικανότητα των κριωμάτων να διατηρούν σημαντικές ποσότητες υγρών φάσεων μεταφράζεται σε βελτιωμένη δυνατότητα προσκόλλησης, πολλαπλασιασμού και διαφοροποίησης των κυττάρων εντός του κριώματος.

3.2Κυτταροκαλλιέργεια

Όλα τα πειράματα τα οποία αφορούσαν τη βιολογική συμπεριφορά των κριωμάτων έλαβαν χώρα στο Εργαστήριο Εμβιομηχανικής και Συστημικής Βιολογίας της Σχολής Μηχανολόγων Μηχανικών του ΕΜΠ. Τα πειράματα που ακολουθούν πραγματοποιήθηκαν σε θάλαμο νηματικής ροής υπό συνθήκες πλήρους αποστείρωσης. Τα κύτταρα κατά τη διάρκεια της καλλιέργειας τους, είτε σε φλάσκες είτε εντός των κριωμάτων, τοποθετούνταν σε επωαστή υπό κανονικές συνθήκες, 36,6°C και 5 % CO₂. Κύτταρα της κυτταρικής σειράς MG-63 καλλιεργήθηκαν σε θρεπτικό υλικό Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) χαμηλής γλυκόζης σε συνδυασμό με 10% ορού νεογέννητου βοός

(FBS) και ένα αντιβιοτικό διάλυμα πενικιλίνης/στρεπτομυκίνης 1% (Thermofisher Scientific, ΗΠΑ) . Τα κύτταρα της σειράς αυτής είναι καρκινικά (οστεοσάρκωμα), έχει αποδειχθεί πως παρουσιάζουν συμπεριφορά αντίστοιχη με τους πρώιμους οστεοβλάστες και χρησιμοποιούνται κατά κόρον σε μελέτες βιοσυμβατότητας. [32] Παρακάτω θα παρουσιαστούν τα πρωτόκολλα που ακολουθήθηκαν για την συγκριτική μελέτη κυτταροτοξικότητας και βιωσιμότητας των ικριωμάτων.

3.2.1 Μέτρηση των κυττάρων

Για την συνέχεια των πειραμάτων κρίθηκε απαραίτητη η ικανότητα μέτρησης των κυττάρων που βρίσκονται σε κάποιο εναιώρημα θρεπτικού υλικού. Επειδή ο ακριβής προσδιορισμός του συνολικού αριθμού των κυττάρων ενός πληθυσμού είναι μια εργασία εξοντωτική, ο αριθμός των κυττάρων μπορεί να υπολογιστεί προσεγγιστικά με την βοήθεια αιμοκυτταρόμετρων. Τα αιμοκυτταρόμετρα είναι ειδικές αντικειμενοφόρες πλάκες που περιέχουν έως δύο πλέγματα μέτρησης κυττάρων. Κάθε μια από αυτές έχει ένα τετράγωνο πλέγμα, το οποίο αποτελείται από 9 κύρια τετράγωνα με μήκος πλευράς 1 mm κάθε ένα από τα οποία έχει επιπλέον διαβαθμίσεις που διευκολύνουν την μέτρηση των κυττάρων. Το επίπεδο κάθε πλέγματος είναι 0,1 mm χαμηλότερα απ' ό,τι το επίπεδο στήριξης της καλυπτρίδας (εικ. 1Α). Επομένως μεταξύ πλέγματος και καλυπτρίδας δημιουργείται ένας χώρος, ύψους 0,1 mm, στον οποίο εισέρχεται το εναιώρημα των κυττάρων. Για το πείραμα μας, 100 μl εναιωρήματος θρεπτικού υλικού/κυττάρων αναμείχθηκαν με 100 μl trypan blue 0,5%. Η χρωστική trypan blue είναι μια χρωστική που βάφει μπλε μόνο τα νεκρά κύτταρα και αυτό γιατί δεν μπορεί να διαπεράσει τη μεμβράνη των ζωντανών κυττάρων. Στην συνέχεια 20 μl μεταφέρονται στο αιμοκυτταρόμετρο (Neubauer) με την βοήθεια πιπέτας. Έπειτα σε μικροσκόπιο μετριοούνται τα ζωντανά κύτταρα στα 4 τετράγωνα

περιμετρικά του κεντρικού «σταυρού» (1,2,3,4 του σχήματος). Ο προσεγγιστικός αριθμός του πληθυσμού των κυττάρων δίνεται από τον τύπο παρακάτω τύπο:

$$\frac{\text{Αριθμός ζωντανών κυττάρων}}{4} \times \Sigma \times 10^4 \text{ κύτταρα/mL}$$

όπου: $\Sigma = \frac{\text{Vτελικό}}{\text{Vαρχικό}}$

3.2.2 Ανακαλλιέργεια

Τα καρκινικά κύτταρα της σειράς MG-63 καλλιεργούνται προσφύόμενα στον πάτο της φλάσκας καλλιέργειας. Κατά την καλλιέργεια αφήνονται να αναπτυχθούν έως ότου να καλύψουν περίπου το 80% της επιφάνειας της φλάσκας. Έχει βρεθεί πειραματικά πως σε πολλές κυτταρικές σειρές η έλλειψη χώρου μπορεί να αναστείλει τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό και να διαταράξει τις μεταβολικές διαδικασίες των κυττάρων. Για αυτόν τον λόγο τα κύτταρα πρέπει να ανακαλλιεργούνται ανά τακτά χρονικά διαστήματα ανάλογα με τα χαρακτηριστικά της κυτταρικής σειράς. Επειδή τα κύτταρα MG-63 είναι καρκινικά, αναπτύσσονται γρήγορα και έτσι ήταν απαραίτητο να ανακαλλιεργούνται ανά 2-3 ημέρες. Παρακάτω παρουσιάζεται το πρωτόκολλο της απαραίτητης για την διατήρηση της υγείας των κυττάρων και συνεπώς αξιοπιστίας των αποτελεσμάτων ανακαλλιέργειας.

- Μεταφορά της φλάσκας σε θάλαμο νηματικής ροής για επίτευξη εργασίας σε στείρες συνθήκες για αποφυγή μολύνσεων.
- Απομάκρυνση του θρεπτικού υλικού με χρήση πιπέτας Παστέρ υπό κενό.
- Ξέπλυμα των κυττάρων με 5ml PBS εις διπλούν.

- Προσθήκη 2 ml τρυψίνης και τοποθέτηση στον επωαστή για 1-2 λεπτά. Η τρυψίνη δρα ενζυμικά, διασπώντας τους δεσμούς των κυττάρων μεταξύ τους και με το υπόστρωμα.
- Προσθήκη 5 ml θρεπτικού υλικού για αναστολή της δράσης της τρυψίνης.
- Μεταφορά του εναιωρήματος σε αποστειρωμένο σωληνάριο των 15 ml και φυγοκέντρωση του.
- Απομάκρυνση του υπερκείμενου θρεπτικού υλικού και επαναπροσθήκη 6 ml νέου θρεπτικού υλικού και μίξη μέχρι να απαλειφθούν τα ορατά συσσωματώματα κυττάρων.
- Τοποθέτηση 3 ml σε 2 φλάσκες στις οποίες έχει ήδη τοποθετηθεί φρέσκο θρεπτικό υλικό.

3.2.3 Προετοιμασία ικριωμάτων

Η μελέτη κυτταροτοξικότητας θα πραγματοποιηθεί σε τρυβλίο καλλιέργειας από πολυστυρένιο 96 πηγαδιών. Έτσι, πρέπει τα δείγματα να μπορούν να εφαρμόζουν τέλεια στον πάτο των πηγαδιών χωρίς να αφήνουν κενό χώρο. Παρακάτω παρατίθενται τα βήματα που ακολουθήθηκαν για την προετοιμασία των ικριωμάτων για την καλλιέργεια κυττάρων εντός τους.

- Τα ικριώματα κόβονται σε ορθογώνια με διαστάσεις 25mm×5mm×5mm (πάχος×μήκος×πλάτος).
- Με τη βοήθεια λαβής βιοψίας τα δοκίμια κόβονται σε δισκία διαμέτρου 6 mm εξασφαλίζοντας την πλήρη εφαρμογή στα πηγάδια της πλάκας καλλιέργειας.

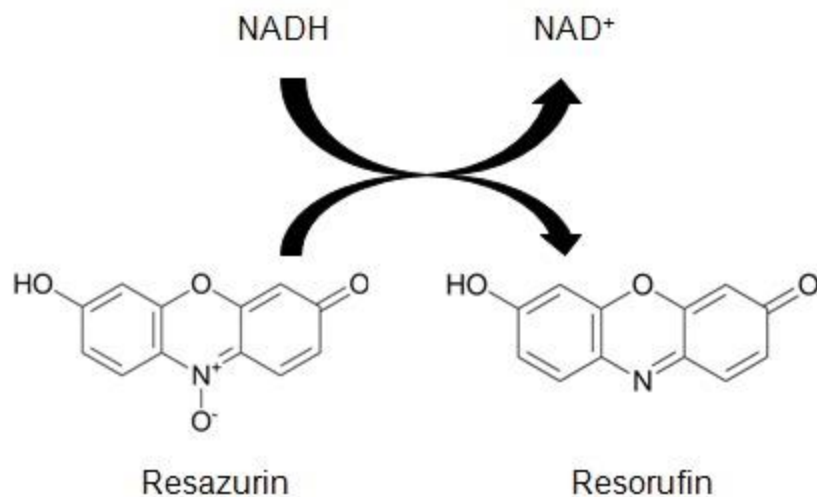
- Για την απολύμανσή τους, αρχικά, τα ικριώματα εκτίθενται σε υπεριώδη ακτινοβολία για 20 λεπτά εντός του θαλάμου νηματικής ροής.
- Τα ικριώματα εμβαπτίζονται σε διάλυμα αιθανόλης 70% v/v για 1 ώρα, μετά την οποία πλένονται τρεις φορές με PBS.
- Τέλος, τα ικριώματα προεμβαπτίζονται σε θρεπτικό υλικό και τοποθετούνται στον επωαστή για 24 ώρες

3.2.4. Εμβολιασμός των κυττάρων στα ικριώματα

Μετά την πάροδο του χρόνου προεμβάπτισης, τα ικριώματα μεταφέρονται σε νέα πλάκα καλλιέργειας 96 πηγαδιών. Για κάθε μια από τις 3 κατηγορίες ικριωμάτων (NP2MA1D, NC6A2D, CC9A2D) χρησιμοποιήθηκαν 3 ικριώματα. Επιπλέον, ως control χρησιμοποιήθηκαν πηγάδια της πλάκας όπου τα κύτταρα αναπτύσσονταν απουσία ικριωμάτων. Σε κάθε ένα από τα πηγάδια τοποθετήθηκαν 20000 κύτταρα διαλυμένα σε 20μl θρεπτικού υλικού. Τέλος, σε κάθε πηγάδι συμπληρώθηκαν 80 μl θρεπτικού υλικού. Η πλάκα ανακαλλιέργειας τοποθετήθηκε στον επωαστή και, για τις πρώτες τρεις ώρες επώασης, θρεπτικό υλικό συμπληρώθηκε όπου αυτό κρίθηκε απαραίτητο για να αποφευχθεί η ξήρανση των ικριωμάτων.

3.2.5. Δοκιμή κυτταροτοξικότητας

Η ρεσαζουρίνη είναι ένας μη τοξικός δείκτης αναγωγής, που μπορεί να διαπεράσει την κυτταρική μεμβράνη. Μπορεί να διαλυθεί σε φυσιολογικούς διαλύτες και να προστεθεί σε μια κυτταροκαλλιέργεια. Το διάλυμα αυτό έχει ένα βαθύ μπλε χρώμα. Τα κύτταρα με υγιή μεταβολισμό ανάγουν την ρεσαζουρίνη σε ρεσορουφίνη με τη βοήθεια του ενζύμου αφυδρογενάση, μετατρέποντας το χρώμα του διαλύματος σε ένα φθορίζον ροζ.



Εικόνα 18 Η αναγωγή της ρεσαζουρίνης σε ρεσορουφίνη

Συνεπώς, η ποσότητα ρεσορουφίνης στο διάλυμα είναι ανάλογη με τον αριθμό ζωντανών κυττάρων. Με άλλα λόγια όσο πιο φθορίζον είναι το υπερκείμενο της κυτταροκαλλιέργειας διάλυμα τόσο μεγαλύτερος είναι ο κυτταρικός πληθυσμός. Η ποσότητα της ρεσορουφίνης πειραματικά υπολογίστηκε με την βοήθεια φθοριόμετρου Varioskan™ LUX (ThermoScientific, ΗΠΑ) τα φίλτρα του οποίου είχαν ρυθμιστεί στα 560 nm excitation / 590 nm emission. Παρακάτω παρατίθενται τα βήματα που ακολουθήθηκαν για την πραγματοποίηση του πειράματος.

- Διάλυση ενός αρχικού διαλύματος ρεσαζουρίνης, σε θρεπτικό υλικό, μέχρι να επιτευχθεί η επιθυμητή συγκέντρωση των 60μg/ml.
- Προσθήκη 20μl του παραχθέντος διαλύματος σε κάθε πηγάδι της πλάκας που περιέχει κύτταρα και 100 μl θρεπτικού υλικού.
- Ελαφρά ανακίνηση και επιθεώρηση της πλάκας έτσι ώστε να επιτευχθεί ομοιόμορφη διάχυση του διαλύματος ρεσαζουρίνης.

- Επώαση της πλάκας καλλιέργειας για 2 ώρες, χρόνο αρκετό για την αναγωγή της ρεσαζουρίνης σε ρεσορουφίνη από τα ζωντανά κύτταρα.
- Μετά το πέρας των 2 ωρών η πλάκα τοποθετείται στο φθοριόμετρο και λαμβάνονται τα τελικά αποτελέσματα.
- Το πείραμα επαναλήφθηκε μετά από μία, δύο και πέντε ημέρες καλλιέργειας. [33]

3.2.6 Μονιμοποίηση κυττάρων

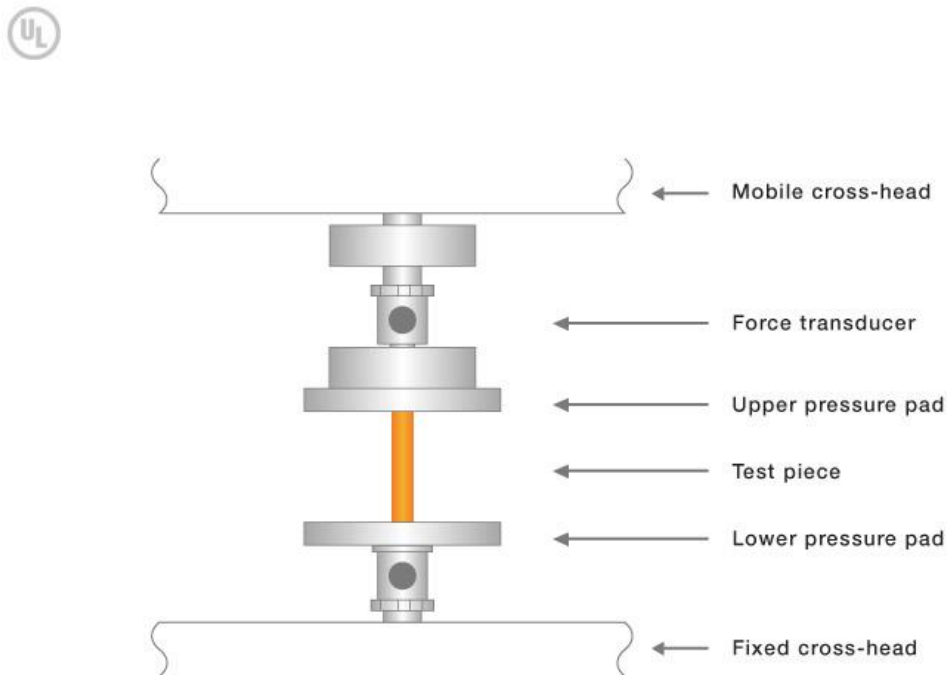
Τελευταίο στάδιο της βιολογικής μελέτης αποτέλεσε η μονιμοποίηση των κυττάρων εντός των ικριωμάτων, μέσω ηλεκτρονικής μικροσκοπίας σάρωσης. Σκοπός αυτής της μελέτης είναι η παρατήρηση της εξάπλωσης και του τρόπου προσκόλλησης των κυττάρων στο εσωτερικό των ικριωμάτων. Το πρωτόκολλο που ακολουθήθηκε για την μονιμοποίηση παρουσιάζεται παρακάτω.

- Εντός απαγωγού, 4 mg παραφορμαλδεύδης (PFA) διαλύονται σε 10ml PBS.
- Για την ομογενοποίηση του, το μείγμα τοποθετείται υπό μαγνητική ανάδευση σε σταθερή θερμοκρασία 86°C έως ότου να γίνει διαυγές.
- Το θρεπτικό υλικό απομακρύνεται με πιπέτα Παστέρ υπό πίεση από τα πηγάδια που περιέχουν τα ικρίωματα.
- Τα ίδια πηγάδια ξεπλένονται εις τριπλούν με PBS και έπειτα προστίθενται 100 ml PFA στο καθένα.
- Μετά την πάροδο 20 λεπτών η παραφορμαλδεύδη απομακρύνεται, τα ικρίωματα ξαναπλένονται με PBS και είναι πλέον έτοιμα για παρατήρηση στο SEM.

3.3. Μηχανικές ιδιότητες

3.3.1 Δοκιμή μονοαξονικής θλίψης

Η δοκιμή της μονοαξονικής θλίψεως (compression test) αποτελεί μια δοκιμή κατά την οποία το δοκίμιο φορτίζεται υπό την επίδραση δυο δυνάμεων, ίσου μέτρου, ίδιας διεύθυνσεως, αντίθετης όμως φοράς, τέτοιας ώστε να προκαλείται συμπίεση του υλικού.



Εικόνα 19 Η οργανολογία του μηχανήματος μονοαξονικής θλίψης

Δεδομένης της ακριβώς αντίθετης διαδικασίας (κατ' αποτέλεσμα) από την αντίστοιχη του εφελκυσμού, τα διαγράμματα δύναμης-παραμόρφωσης ή ορθής τάσεως- ανηγμένης παραμορφώσεως εΐθισται να σχεδιάζονται στο 3ο τεταρτημόριο όπου τα αντίστοιχα μεγέθη έχουν αρνητικά πρόσημα, σε σχέση με τα αντίστοιχα του εφελκυσμού. Όπως και

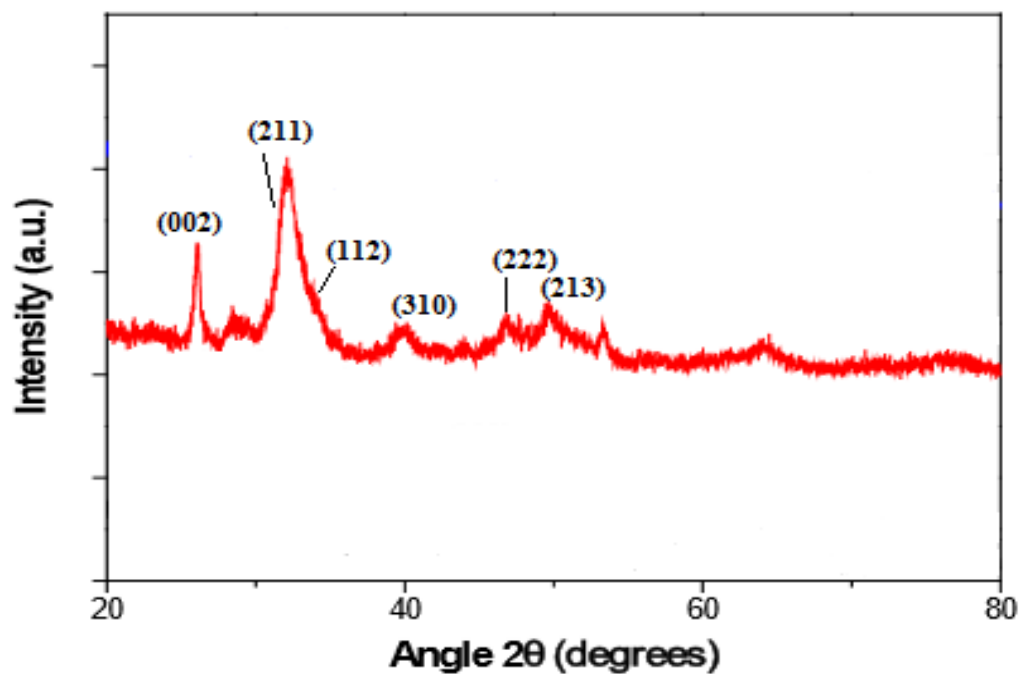
σε κάθε περίπτωση αξονικής καταπόνησης ενός υλικού, όταν η επιβαλλόμενη τάση είναι μικρότερη από την τάση ελαστικότητας που αντιστοιχεί στο όριο ελαστικότητας του υλικού, το υλικό παραμορφώνεται ελαστικά, υπό θερμοκρασίες περιβάλλοντος. Στην περίπτωση της ελαστικής παραμόρφωσης και μέχρι το όριο αναλογίας του διαγράμματος τάσης-παραμόρφωσης, ισχύει ο νόμος του Hooke για τις ορθές μηχανικές τάσεις.

Στην παρούσα διπλωματική εργασία, δέκα κυλινδρικά δοκίμια διαστάσεων 20mmx 5mm από τις τρεις προτιμητέες κατηγορίες δοκιμίων χρησιμοποιήθηκαν για την δοκιμή στο ΤΕΙ Λάρισας υπό την επιμέλεια του κ. Ζαούτσου. Οι κεφαλές συμπίεσης της μηχανής τύπου 8832 Universal (Instron, H.B.) κινούνταν με ταχύτητα 1mm/min. Από την συγκεκριμένη δοκιμή κατασκευάστηκαν οι καμπύλες τάσης-παραμόρφωσης για τα 3 υλικά αλλά και προσδιορίστηκε η μέγιστη θλιπτική τους αντοχή.

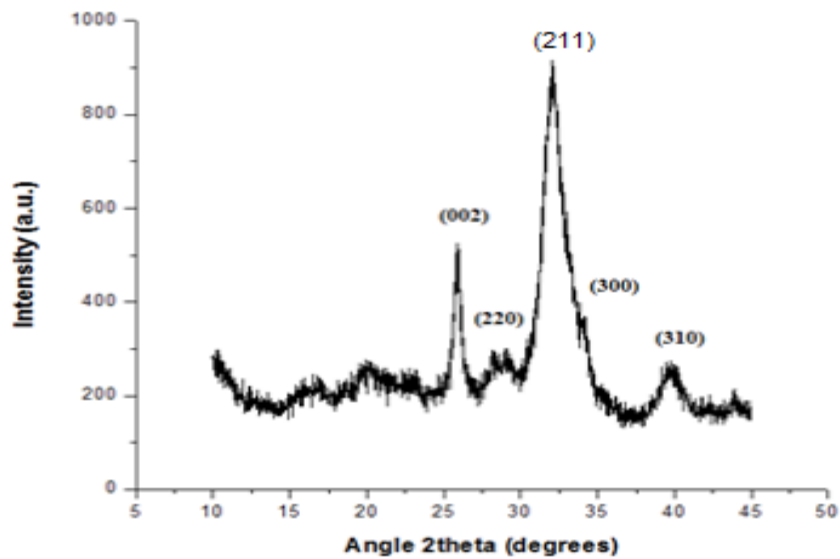
Αποτελέσματα και συζήτηση

Περιθλασιμετρία ακτίνων Χ

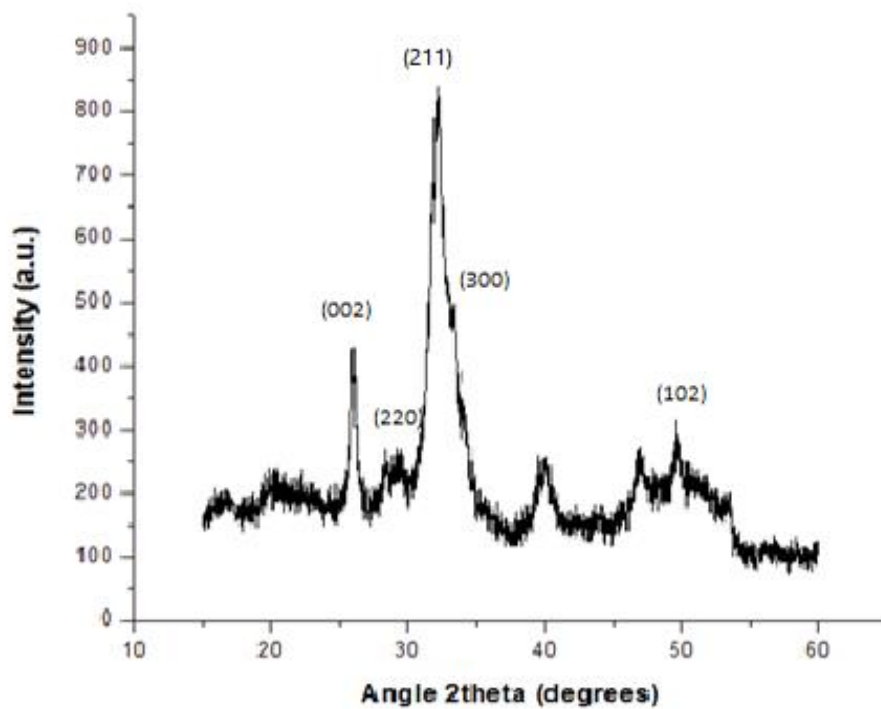
Όλα τα ικρίσματα που παράχθηκαν οδηγήθηκαν για μελέτη στο XRD. Μέσω αυτής της δοκιμής θα μπορούσε να διερευνηθεί αν έχει επιτευχθεί ο σχηματισμός του κρυσταλλικού υδροξυαπατίτη αλλά και να ανιχνευτούν τυχούσες δευτερεύουσες φάσεις. Η ταυτοποίηση φάσεων πραγματοποιήθηκε συγκρίνοντας τις κορυφές των διαγραμμάτων που προέκυψαν από την ανάλυση με ακτίνες Χ με αυτές του καθαρού υδροξυαπατίτη (JCPDS 09-0432).



Εικόνα 20 Χαρακτηριστικό φάσμα XRD τρισιδιάστατα ικρίσματα Har/Chit/L-arg/PEO χωρίς προσθήκη CNT



Εικόνα 21 Χαρακτηριστικό φάσμα XRD τρισεδιάστατα ικρίώματα Nan/Chit/L-arg/PEO με προσθήκη CNT στο τελικό αιώρημα



Εικόνα 22 Χαρακτηριστικό φάσμα XRD τρισεδιάστατα ικρίώματα Nan/Chit/L-arg/PEO με προσθήκη CNT στο αιώρημα χιτοζάνης

Τα αποτελέσματα επιβεβαίωσαν πλήρως την αρχική υπόθεση πως κρυσταλλικός, εξαγωνικός υδροξυαπατίτης σχηματίστηκε σε όλα τα δείγματα. Τα διαγράμματα δείχνουν ξεκάθαρα τις χαρακτηριστικές κορυφές (002), (211), (112), (310), (222) και (213) του εξαγωνικού υδροξυαπατίτη στις αντίστοιχες γωνίες $2\theta=26^\circ$, 32° , $33,8^\circ$, $39,8^\circ$, $46,8^\circ$ και $49,5^\circ$. Επιπλέον, στις γωνίες $2\theta=19,3^\circ$ και $23,4^\circ$ μπορούν να παρατηρηθούν οι χαρακτηριστικές κορυφές του PEO. Όσον αφορά τα ικρίωματα στα οποία έγινε προσθήκη νανοσωλήνων άνθρακα, θα ήταν αναμενόμενο να είναι ορατή η κύρια κορυφή (002) του γραφίτη. Πιθανή εξήγηση για το φαινόμενο αυτό μπορεί να δώσει το ότι στο υλικό γίνεται προσθήκη πολύ μικρής ποσότητας νανοσωλήνων άνθρακα η οποία διαφεύγει από το όριο της διακριτικής ικανότητας του οργάνου αλλά και επειδή οι κύριες κορυφές υδροξυαπατίτη και CNT συμπίπτουν για γωνία $2\theta=26,6^\circ$

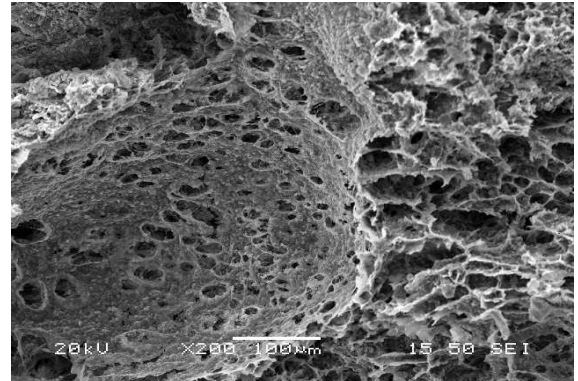
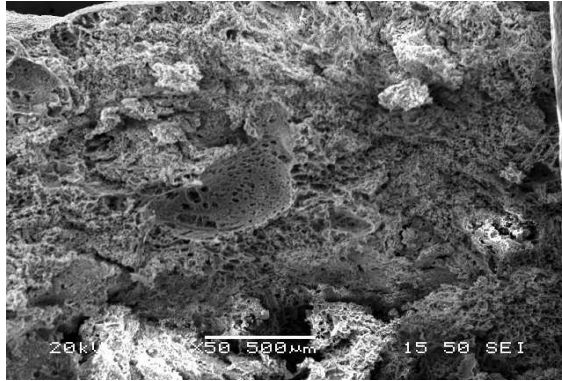
Ηλεκτρονική μικροσκοπία σάρωσης

Η εσωτερική πορώδης δομή των τρισδιάστατων κριωμάτων είναι πάρα πολύ σημαντική έτσι ώστε αυτά να προωθούν την προσκόλληση, ανάπτυξη και διαφοροποίηση κυττάρων.

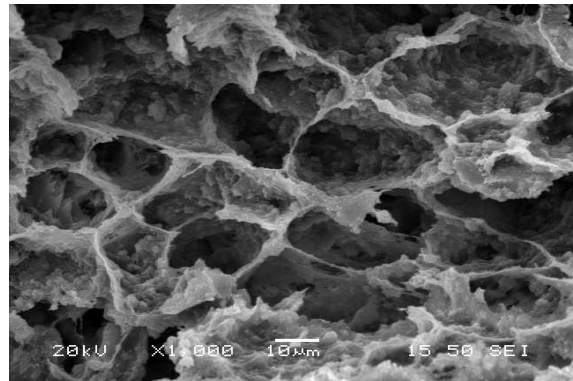
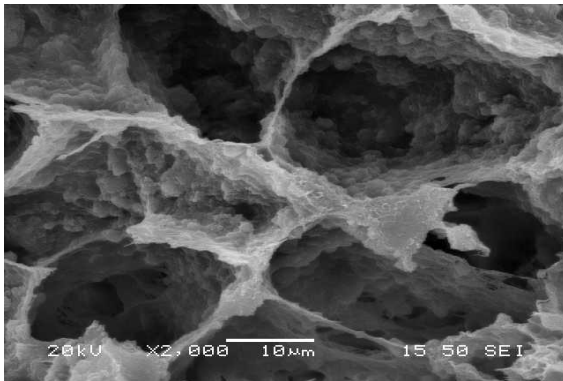
Ο σχεδιασμός της εσωτερικής δομής των κριωμάτων έγινε με τρόπο τέτοιο ώστε να προσομοιάζεται η δομή του ανθρώπινου δοκιδώδους οστού. Πιο συγκεκριμένα είναι απαραίτητο το υλικό μας να συνδυάζει μικρούς πόρους με μέσο μέγεθος της τάξης των 10 μm και μεγαλύτερους πόρους μέσου μεγέθους 100 μm . Επίσης οι πόροι θα πρέπει να είναι διασυνδεδεμένοι μεταξύ τους. Παρ' όλα αυτά θα πρέπει να γίνει ένας συμβιβαστικός συνδυασμός για το μέγεθος των πόρων καθώς υπερβολικά μεγάλη τιμή μέσου πορώδους επιδρά αρνητικά τόσο στην μηχανική συμπεριφορά του κριώματος όσο και στην οστεοεπαγωγικότητα του.

Τα δοκίμια που πληρούσαν τα παραπάνω κριτήρια στην πλειοψηφία των δειγμάτων τους, σύμφωνα με τις εικόνες από το SEM, προκρίθηκαν για περαιτέρω δοκιμές. Οι εικόνες αυτές (Εικόνα 23 - Εικόνα 34) παρατίθενται παρακάτω συνοδευόμενες από την κωδική ονομασία των επιλεγμένων δοκιμίων.

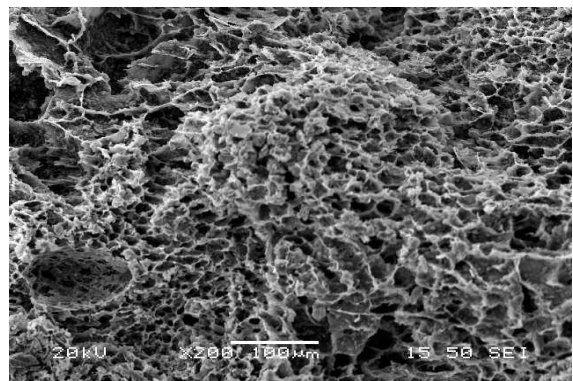
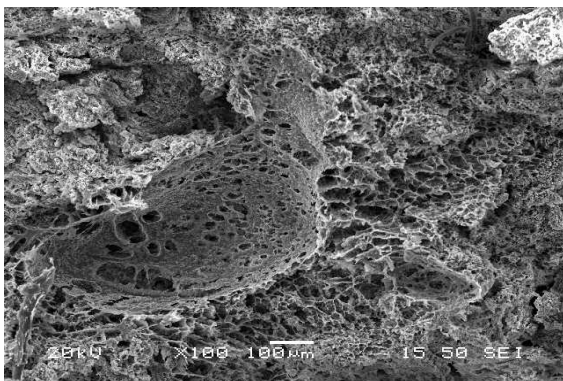
NP2MA1D



Εικόνα 23 Εικόνες SEM της εσωτερικής πορώδους δομής ικριωμάτων τύπου NP2MA1D

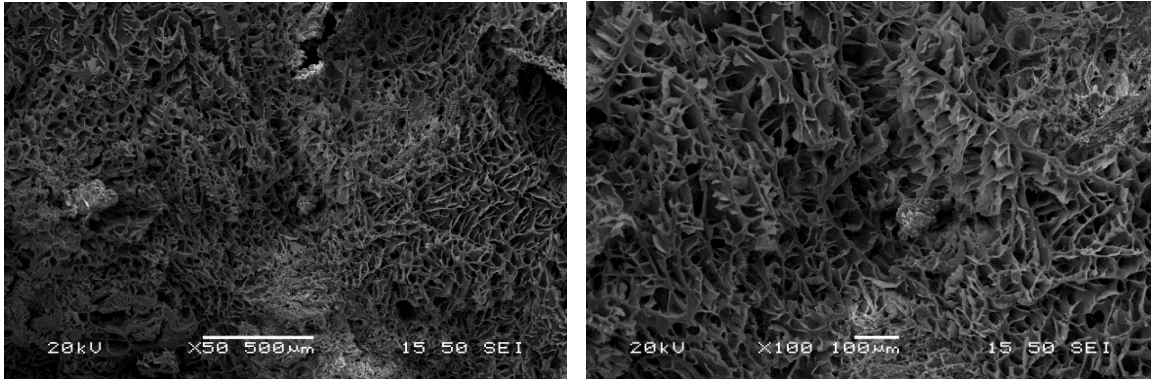


Εικόνα 24 Εικόνες SEM της εσωτερικής πορώδους δομής ικριωμάτων τύπου NP2MA1D (2)

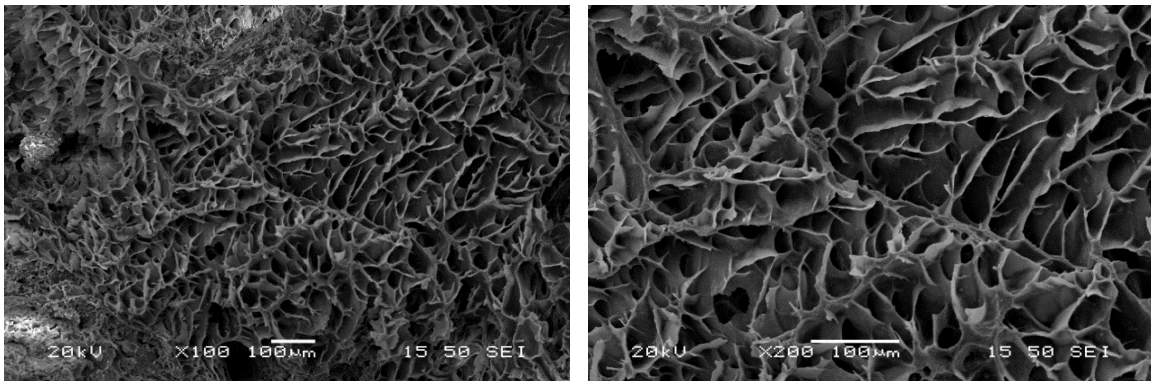


Εικόνα 25 Εικόνα SEM της εσωτερικής πορώδους δομής ικριωμάτων τύπου NP2MA1D (3)

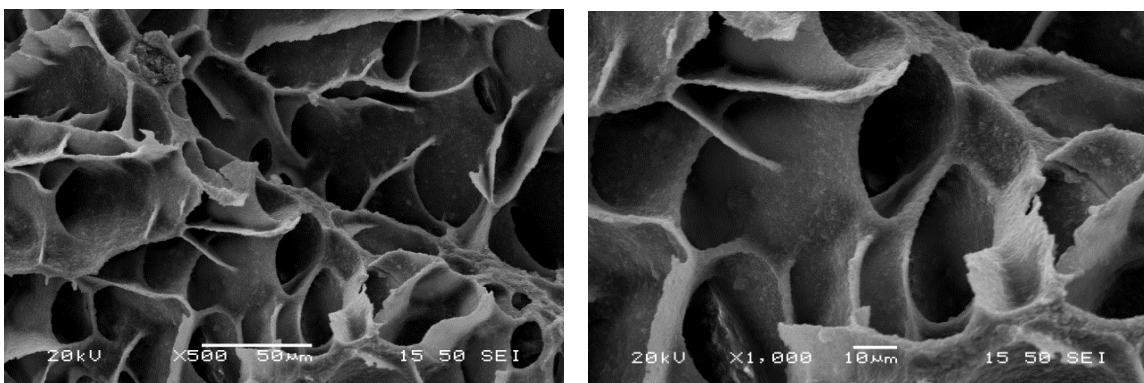
NCP6A2D



Εικόνα 26 Εικόνες SEM της εσωτερικής πορώδους δομής ικριωμάτων τύπου NCP6A2D

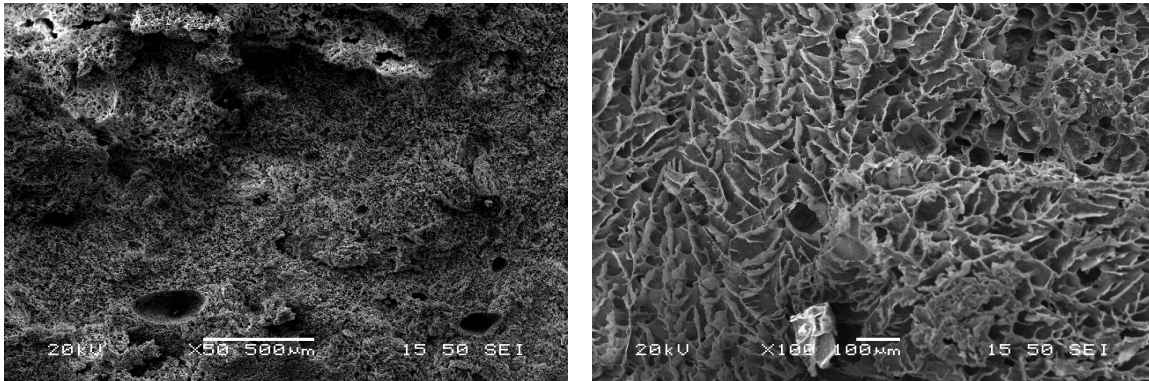


Εικόνα 27 Εικόνες SEM της εσωτερικής πορώδους δομής ικριωμάτων τύπου NCP6A2D (2)

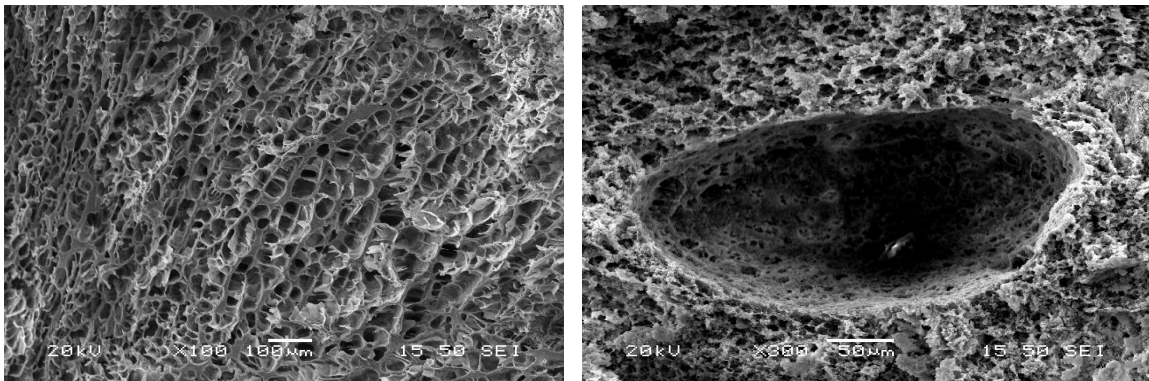


Εικόνα 28 Εικόνες SEM της εσωτερικής πορώδους δομής ικριωμάτων τύπου NCP6A2D (3)

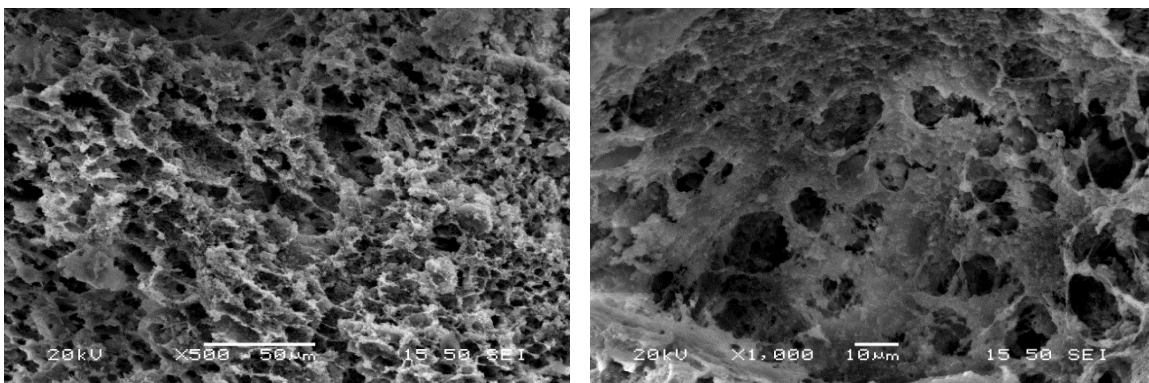
NC9A1D



Εικόνα 29 Εικόνες SEM της εσωτερικής πορώδους δομής ικριωμάτων τύπου NC9A1D

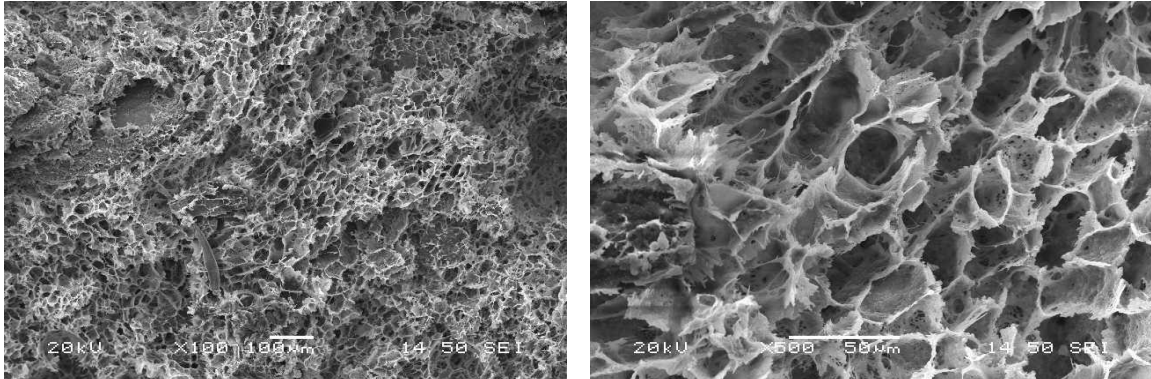


Εικόνα 30 Εικόνες SEM της εσωτερικής πορώδους δομής ικριωμάτων τύπου NC9A1D (2)

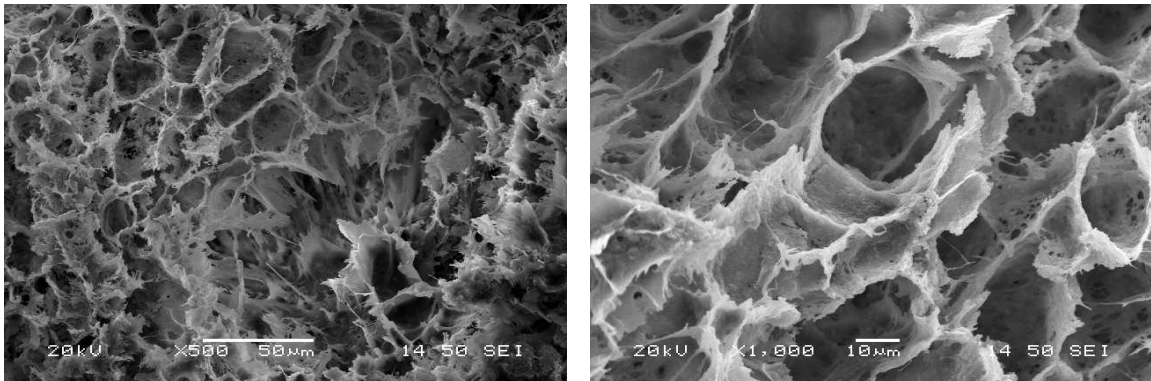


Εικόνα 31 Εικόνες SEM της εσωτερικής πορώδους δομής ικριωμάτων τύπου NC9A1D (3)

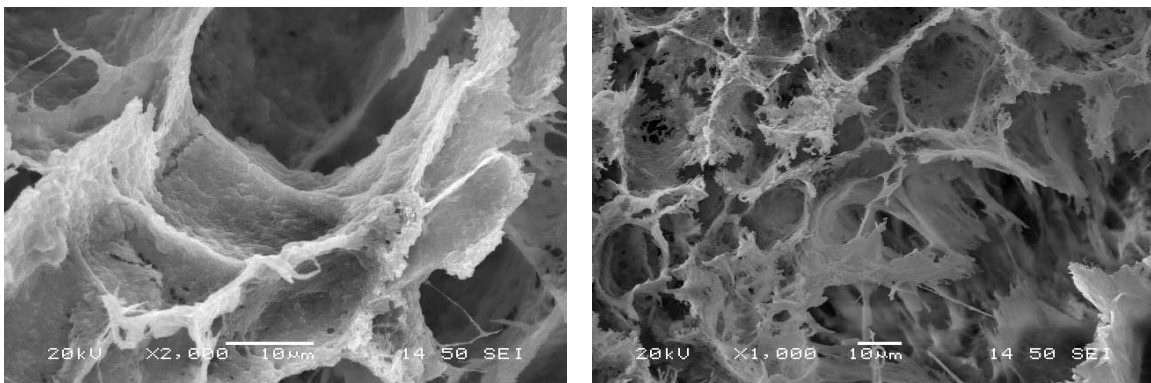
CCP9A2D



Εικόνα 32 Εικόνες SEM της εσωτερικής πορώδους δομής ικριωμάτων τύπου CCP9A2D



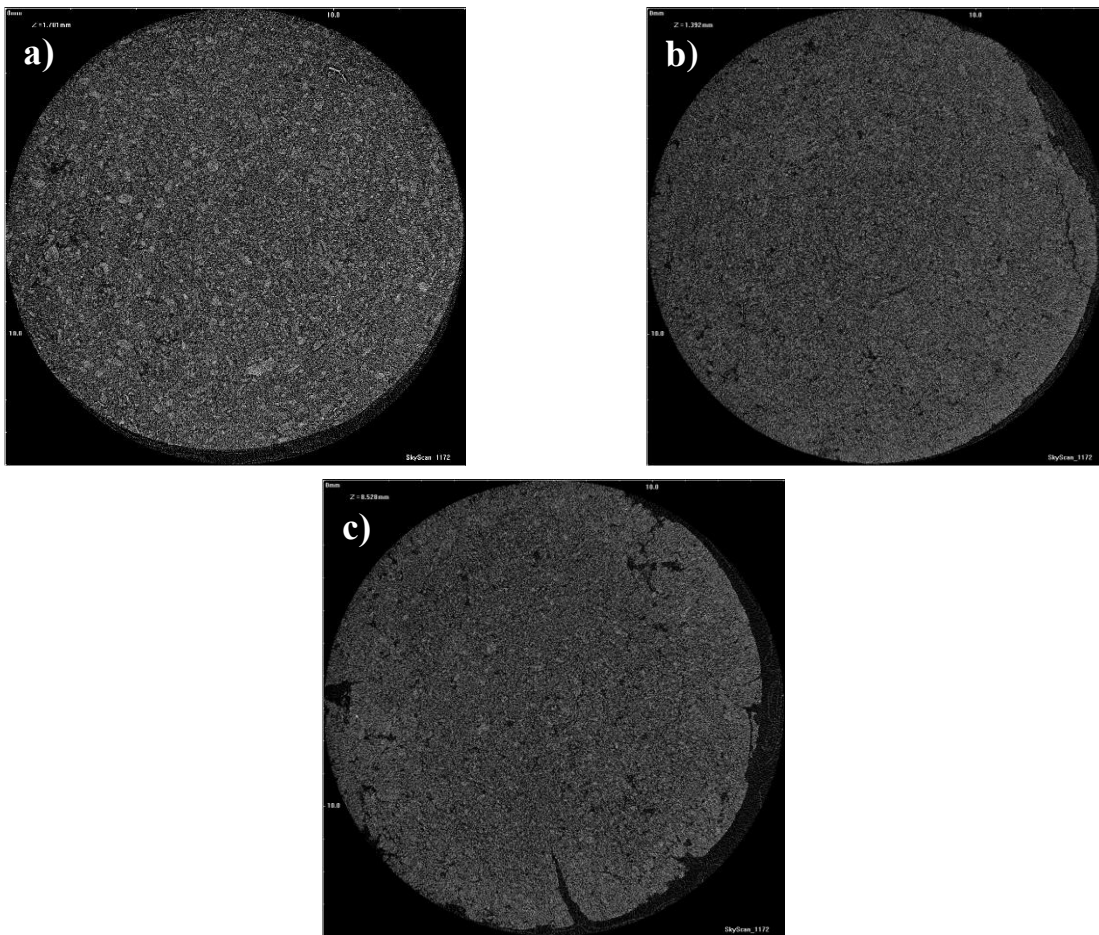
Εικόνα 33 Εικόνες SEM της εσωτερικής πορώδους δομής ικριωμάτων τύπου CCP9A2D (2)



Εικόνα 34 Εικόνες SEM της εσωτερικής πορώδους δομής ικριωμάτων τύπου CCP9A2D (3)

Υπολογιστική Μικροτομογραφία Ακτίνων Χ (micro - CT)

Η τεχνική της υπολογιστικής μικροτομογραφίας ακτίνων Χ χρησιμοποιήθηκε για την καταγραφή της συνολικής εικόνας της εσωτερικής δομής των υβριδικών ικριωμάτων του υδροξυαπατίτη. Το εκάστοτε ικρίωμα σαρώνεται σε όλο το μήκος του, αποτυπώνονται εικόνες από πολλαπλές εγκάρσιες τομές του και τέλος παρέχεται η εικόνα της συνολικής εσωτερικής του μορφολογίας συνθέτοντας τις προβολές των εγκάρσιων τομών αλλά και ένα τρισδιάστατο μοντέλο. Στην εικόνα 35 φαίνονται οι εγκάρσιες τομές των τριών ικριωμάτων που αναλύθηκαν. Σε αυτές το υλικό παρουσιάζεται λευκό ενώ οι πόροι με μαύρο χρώμα.



Εικόνα 35 Οι εγκάρσιες τομές των ικριωμάτων: a)NP2MA1D, b)CC9A2D, c)NC6A2D

Οι εγκάρσιες τομές και των τριών ικριωμάτων προδίδουν ομοιογένεια όσον αφορά την εσωτερική πορώδη δομή τους. Παρ' όλα αυτά το ικρίωμα που δημιουργήθηκε απουσία νανοσωλήνων άνθρακα παρουσίασε μικρότερο αριθμό ορατών μεγάλων πόρων, γεγονός μη επιθυμητό. Επειδή όμως πρόκειται για τυχαίες -αν και χαρακτηριστικές- τομές κρίθηκε απαραίτητη και η μελέτη των τρισδιάστατων μοντέλων για να ληφθούν περισσότερες πληροφορίες σε σχέση με την διασυνδεσιμότητα των πόρων. Η διασυνδεσιμότητα των πόρων είναι ιδιαίτερα σημαντική παράμετρος για την ανάπτυξη κυτταρικών καλλιέργειών σε ένα τρισδιάστατο ικρίωμα. Οι πόροι είναι απαραίτητο να σχηματίζουν «κανάλια» κατά μήκος του ικριώματος, καθώς σε δυναμικές *in vitro* καλλιέργειες ή σε *in vivo* εφαρμογές, η βιωσιμότητα των κυττάρων εξαρτάται από την ικανότητα των θρεπτικών τους συστατικών και του οξυγόνου να διαχέονται στο εσωτερικό του ικριώματος. Σε δυναμικές συνθήκες καλλιέργειας τα κύτταρα προσκολλώνται στο εσωτερικό πορώδες δίκτυο του ικριώματος και η έλλειψη θρεπτικών συστατικών ή οξυγόνου οδηγεί στην κυτταρική απόπτωση. Στις παρακάτω εικόνες (Εικόνα 36-38) φαίνονται οι προσομοιώσεις των τριών ικριωμάτων που προέκυψαν από τις επιμέρους τομές.



Εικόνα 36 Τρισδιάστατη αναπαράσταση του ικρίωματος NP2MA1D

Όσον αφορά τα ικρίωματα NP2MA1D, η εικόνα της προσομοίωσης δεν είναι ιδανική. Αν και παρατηρείται έντονο πορώδες δίκτυο με επαρκή διασυνδεσιμότητα πόρων, αυτοί δεν εμφανίζονται ομοιόμορφα σε όλη την έκταση του υλικού. Οι πόροι φαίνονται να είναι συγκεντρωμένοι στο πάνω μέρος του ικρίωματος, γεγονός που υποδηλώνει πως το υλικό δεν θα παρουσιάζει την ίδια συμπεριφορά σε όλη την έκταση του.



Εικόνα 37 Τρισδιάστατη αναπαράσταση του ικρίωματος CCP9A2D

Τα ικρίωματα του τύπου CC9A2D παρουσιάζουν μια καλύτερη εικόνα. Οι πόροι φαίνονται να είναι ομοιόμορφα κατανεμημένοι στην έκταση του ικρίωματος, γεγονός θετικό. Ο παράγοντας της διασυνδεσιμότητας όμως δεν ήταν στο επιθυμητό επίπεδο καθώς οι πόροι σχημάτιζαν «κανάλια» μόνο τοπικά και όχι στο σύνολο της έκτασης του ικρίωματος.



Εικόνα 38 Τρισδιάστατη αναπαράσταση του ικριώματος NCP6A2D

Τέλος, την βέλτιστη δομή φαίνεται πως έχουν τα ικριώματα του τύπου NC6A2D. Αυτά εμφάνιζαν έντονα πορώδη δομή διάσπαρτα κατανεμημένη στο σύνολο του υλικού με πόρους πλήρως διασυνδεδεμένους μεταξύ τους.

Δοκιμή αντοχής σε υδατικά περιβάλλοντα

Τα ικρίωματα των τεσσάρων κατηγοριών που προκρίθηκαν από τις προηγούμενες δοκιμές εξετάστηκαν ως προς την αντοχή τους σε PBS και διάλυμα αιθανόλης περιεκτικότητας 70% v/v. Τα δείγματα NCP6A2D, CCP9A2D και NP2MA1D έδειξαν σε γενικές γραμμές πολύ καλή συμπεριφορά και στα δύο περιβάλλοντα. Σχεδόν όλα τα δείγματα διατήρησαν την ελαστικότητα και την δομική τους ακεραιότητα και μπορούσαν να μετακινηθούν με λαβίδα χωρίς να αστοχούν ή να θρυμματίζονται. Επιπλέον παρατηρήθηκε επαρκής διόγκωση και κατακράτηση υγρών, ο βαθμός των οποίων μελετήθηκε επακριβώς σε επόμενες δοκιμές, σε επαρκές επίπεδο. Μικρός αριθμός δειγμάτων αστόχησε, όμως με τρόπο μη ανησυχητικό. Κατά την κοπή ορισμένων δειγμάτων είχαν παρατηρηθεί εγκάρσιες εσωτερικές ρωγματώσεις, οι οποίες μετά την 10ήμερη παραμονή τους σε PBS οδήγησαν στον διαχωρισμό τους σε μικρότερα τμήματα τα οποία όμως διατήρησαν την δομική τους ακεραιότητα. Έτσι, αυτές οι αστοχίες δεν φανέρωσαν μη αντοχή των ικριωμάτων σε υδατικά περιβάλλοντα.

Αντίθετα, τα ικρίωματα της κατηγορίας NCP9A1D έδειξαν πως δεν είναι ανθεκτικά σε υδατικά περιβάλλοντα και έτσι η χρήση τους ως βιοϋλικά σε βιολογικά πειράματα κρίθηκε ακατάλληλη. Πιο συγκεκριμένα, όλα τα δείγματα αυτής της κατηγορίας παρουσίασαν αλλοιωμένη δομή. Ουσιαστικά τα ικρίωματα είχαν διαλυθεί πλήρως στο PBS δημιουργώντας ένα σκούρο διάλυμα. Μια πιθανή εξήγηση αυτού του φαινομένου μπορεί να είναι πως το σχετικά μικρό μήκος της πολυμερικής αλυσίδας σε συνδυασμό με τον ελάχιστο χρόνο πολυμερισμού είχαν αρνητική επίδραση στην ικανότητα διασύνδεσης της σκόνης του υλικού.

Υπολογισμός προσρόφησης νερού και διόγκωσης

Όπως έχει αναφερθεί και παραπάνω, η ικανότητα ενός οστικού ικρίωματος να διογκώνεται προσροφώντας αίμα είναι καθοριστικός παράγοντας για την οστεοαγωγιμότητα και οστεοεπαγωγικότητα του. Μέσω του αίματος μεταφέρονται στα κύτταρα που βρίσκονται στο εσωτερικό ενός ικρίωματος θρεπτικές ουσίες και οξυγόνο, η απουσία των οποίων θα οδηγούσε σε κυτταρική απόπτωση. Συνεπώς, το ιδανικό ικρίωμα θα μπορεί να απορροφά αρκετή ποσότητα υδατικής φάσης και να διογκώνεται διατηρώντας τις μηχανικές ιδιότητές του. Τέλος, μεγάλα ποσοστά διόγκωσης έχει βρεθεί πειραματικά πως δηλώνουν την ύπαρξη ενός διασυνδεδεμένου εσωτερικού πορώδους δικτύου, κατάλληλου για την προσκόλληση, ανάπτυξη και διαφοροποίηση κυττάρων. Τα αποτελέσματα των δοκιμών αυτών παρουσιάζονται στους παρακάτω πίνακες.

Πίνακας 4 Τα αποτελέσματα της δοκιμής προσρόφησης νερού και διόγκωσης των ικριωμάτων NP2MA1D

	Βάρος ξηρό(g)	Βάρος υγρό (g)	Διαφορά (g)	Πάχος (mm)	Εκτίμηση για πάχος 1mm	Διόγκωση
NP2MA1D						
A1	0.0246	0.0671	0.0425	2.0	0.0213	172.7642
A2	0.0123	0.0336	0.0213	1.5	0.0142	173.1707
A3	0.0206	0.039	0.0184	2.0	0.0092	89.3204
A4	0.0182	0.0512	0.0330	1.5	0.0220	181.3187
A5	0.0269	0.0663	0.0394	2.5	0.0158	146.4684
A6	0.017	0.0467	0.0297	2.5	0.0119	174.7059
	Μέσο αρχικό βάρος	Μέσο τελικό βάρος	Μέση κατακράτηση νερού (μL)	Μέσο πάχος δοκιμών	Μέση κατακράτηση σε πάχος 1mm (μL)	Μέση Διόγκωση %
	0.0199	0.0507	30.7167	2.0	15.7150	156.2914

Πίνακας 5 Τα αποτελέσματα της δοκιμής προσρόφησης νερού και διόγκωσης των ικριωμάτων NCP6A2D

	Βάρος πριν(g)	Βάρος μετά (g)	Διαφορά (g)	Πάχος (mm)	Εκτίμηση για πάχος 1mm	Διόγκωση
NCP6A2D						
B1	0.0166	0.1154	0.0988	1.5	0.0659	595.1807
B2	0.0207	0.1506	0.1299	2.5	0.0520	627.5362
B3	0.0243	0.1455	0.1212	3.0	0.0404	498.7654
B4	0.0196	0.1179	0.0983	2.5	0.0393	501.5306
0B5	0.0200	0.1416	0.1216	2.0	0.0608	608.0000
B6	0.0272	0.1847	0.1575	3.0	0.0525	579.0441
	Μέσο αρχικό βάρος	Μέσο τελικό βάρος	Μέση κατακράτηση νερού (μL)	Μέσο πάχος δοκιμίων	Μέση κατακράτηση σε πάχος 1mm (μL)	Μέση Διόγκωση %
	0.0214	0.1426	121.2167	2.4	51.8078	568.3429

Πίνακας 6 Τα αποτελέσματα της δοκιμής προσρόφησης νερού και διόγκωσης των ικριωμάτων CCP9A2D

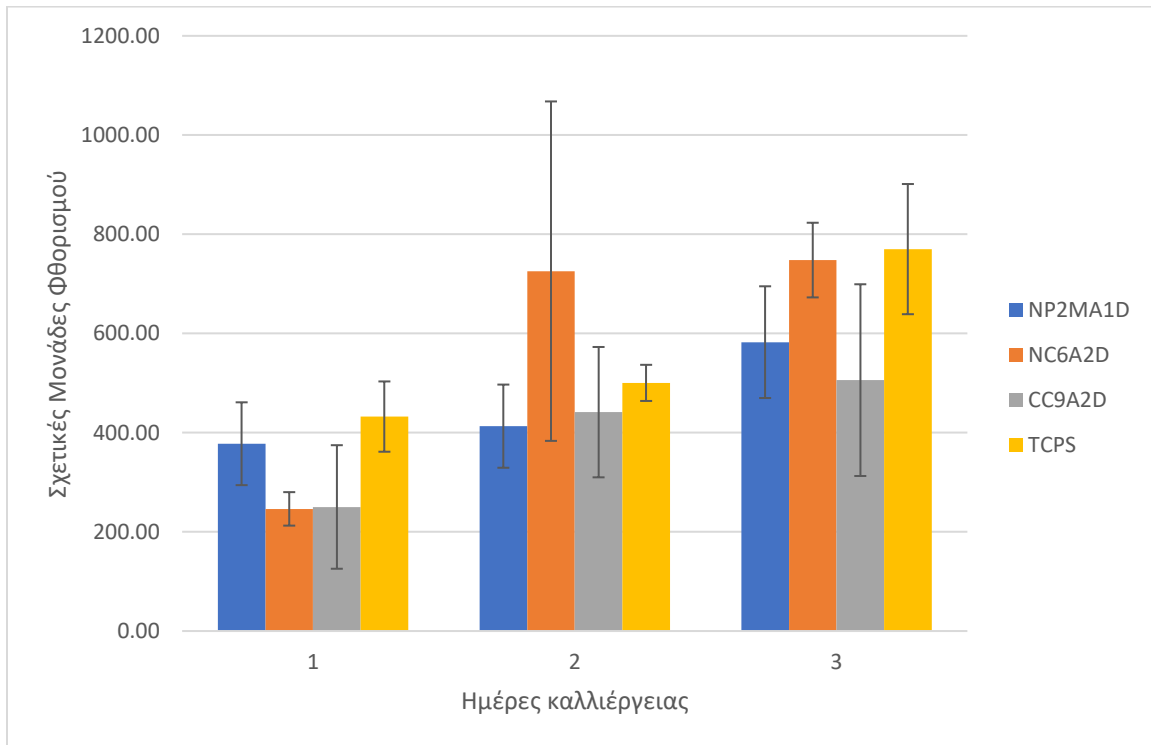
	Βάρος πριν(g)	Βάρος μετά (g)	Διαφορά (g)	Πάχος (mm)	Εκτίμηση για πάχος 1mm	Διόγκωση
CCP9A2D						
C1	0.0197	0.0901	0.0704	2.0	0.0352	357.3604
C2	0.0246	0.0838	0.0592	3.5	0.0169	240.6504
C3	0.0180	0.0882	0.0702	1.0	0.0702	390.0000
C4	0.0258	0.0635	0.0377	2.0	0.0189	146.1240
C5	0.0246	0.0614	0.0368	3.0	0.0123	149.5935
C6	0.0179	0.0711	0.0532	1.5	0.0355	297.2067
	Μέσο αρχικό βάρος	Μέσο τελικό βάρος	Μέση κατακράτηση νερού (μL)	Μέσο πάχος δοκιμίων	Μέση κατακράτηση σε πάχος 1mm (μL)	Μέση Διόγκωση %
	0.0218	0.0764	54.5833	2.2	31.4829	263.4892

Τα αποτελέσματα αυτών των δοκιμών μπορούν να βοηθήσουν στην πρόβλεψη της βιολογικής συμπεριφοράς των ικριωμάτων. Φαίνεται πως στα ικριώματα στα οποία έγινε προσθήκη νανοσωλήνων άνθρακα, η διάχυση και κατακράτηση υγρών φάσεων μπορεί να γίνει ευκολότερα και σε ευρύτερη κλίμακα σε σύγκριση με τα ικριώματα NP2MA1D και CCP9A2D. Πιο συγκεκριμένα, τα ικριώματα NCP6A2D με μέση κατακράτηση 51,34 μl και μέση διόγκωση της τάξης του 568,34% φαίνονται να έχουν σχηματίσει στο εσωτερικό τους τα επιθυμητά κανάλια μέσω των οποίων η διάχυση κυττάρων και θρεπτικών συστατικών θα διευκολύνεται και έτσι αναμένεται να προκαλέσουν την μεγαλύτερη ανάπτυξη του κυτταρικού πληθυσμού από τα τρία είδη ικριωμάτων.

Έλεγχος κυτταρικής βιωσιμότητας-Resazurin assays

Για να θεωρηθούν τα ικριώματα που αναπτύχθηκαν βιοσυμβατά υλικά, ικανά να αποτελέσουν την τρισδιάστατη μήτρα πάνω στην οποία τα κύτταρα θα προσκολληθούν, θα πολλαπλασιαστούν και στη συνέχεια θα διαφοροποιηθούν προς οστεοκύτταρα με απώτερο στόχο την ανάπτυξη νέου ιστού, θα πρέπει τα κύτταρα που καλλιεργούνται σε αυτά να είναι μεταβολικώς ενεργά. Η μεταβολική δραστηριότητα των οστεοβλαστικής δομής καρκινικών κυττάρων MG-63 καταγράφεται μέσω της διαφοράς φθορισμού μεταξύ του μπλέ διαλύματος ρεσαζουρίνης και του ρόζ της ρεσορουφίνης. Άρα περισσότερες σχετικές μονάδες φθορισμού (ΣΜΦ) συνεπάγονται μεγαλύτερο αριθμό κυττάρων με υγιή μεταβολισμό. Η ικανότητα αυτή των κυττάρων να πολλαπλασιάζονται επάνω στα υβριδικά ικριώματα του υδροξυαπατίτη επηρεάζεται από τη χημική σύσταση του ικριώματος. Επιπλέον, η βιωσιμότητα των κυττάρων επηρεάζεται και από την εσωτερική δομή των ικριωμάτων που αναπτύχθηκαν. Για τον λόγο αυτό η μελέτη του κυτταρικού

πολλαπλασιασμού εφαρμόστηκε σε κυτταροκαλλιέργειες στα τριών ειδών ικρίωματα του υδροξυαπατίτη για χρονικό διάστημα από 1 έως 5 ημέρες.



Εικόνα 39 Τα αποτελέσματα της μελέτης κυτταροτοξικότητας

Τα αποτελέσματα της συγκεκριμένης δοκιμής επιβεβαίωσαν την αρχική υπόθεση που είχε γίνει όσον αφορά την τοξικότητα των συστατικών του ικρίωματος. Πράγματι, όπως έχει βρεθεί σε παρόμοιες δημοσιευμένες εργασίες, τα συγκεκριμένα υλικά είναι βιοσυμβατά και για αυτόν τον λόγο οι πληθυσμοί των κυττάρων στα τρία διαφορετικά ικρίωματα ακολουθούν ανοδική πορεία. Πιο συγκεκριμένα, στα ικρίωματα που περιείχαν νανοσωλήνες άνθρακα παρατηρείται μια αρκετά ραγδαία αύξηση του κυτταρικού πληθυσμού. Ένας λόγος για αυτό το φαινόμενο είναι πως η δομή των νανοσωλήνων άνθρακα τους κάνει ιδανικό υπόστρωμα για τα κύτταρα. Ο μεγαλύτερος πολλαπλασιασμός

των κυττάρων παρατηρείται στα κριώματα NC6A2D κάτι το οποίο ήταν αναμενόμενο από την μελέτη διόγκωσης. Τα κριώματα αυτά είχαν τη δυνατότητα να διατηρούν στο εσωτερικό τους σημαντικά μεγαλύτερες ποσότητες υγρών φάσεων όπως είναι το θρεπτικό υλικό που χρησιμοποιήθηκε για τις καλλιέργειες, δημιουργώντας έτσι ένα πολύ ευνοϊκότερο κλίμα για τον πολλαπλασιασμό των κυττάρων. Τέλος, επιβεβαιώνεται το γεγονός πως οι νανοσωλήνες πολλαπλών στρωμάτων μπορούν λόγω της δομής τους να αποτελέσουν ικανό υπόστρωμα για την ανάπτυξη κυττάρων στην επιφάνεια τους.

Παρ' όλα αυτά η οστεοεπαγωγικότητα των κριωμάτων δεν ήταν η ιδανική, αν συγκριθεί με παρόμοιες δημοσιευμένες εργασίες. Για να θεωρηθεί ένα υλικό εκτός από βιοσυμβατό και οστεοεπαγωγικό θα πρέπει να προωθεί την ανάπτυξη των κυττάρων εντός του με ταχύτερο ρυθμό από αυτόν με τον οποίον θα αναπτύσσονταν σε τρυβλίο καλλιέργειας. Κάτι τέτοιο δεν συμβαίνει (παρά μόνο στιγμιαία την δεύτερη μέρα καλλιέργειας των NC6A2D) για τα κριώματα που μελετήθηκαν σε αυτήν την εργασία. Η βελτίωση της οστεοεπαγωγικότητας των κριωμάτων προτείνεται ως ένα απαραίτητο βήμα για μελλοντικές μελέτες στο συγκεκριμένο αντικείμενο.

Παρατήρηση των κυτταροκαλλιιεργειών στο SEM

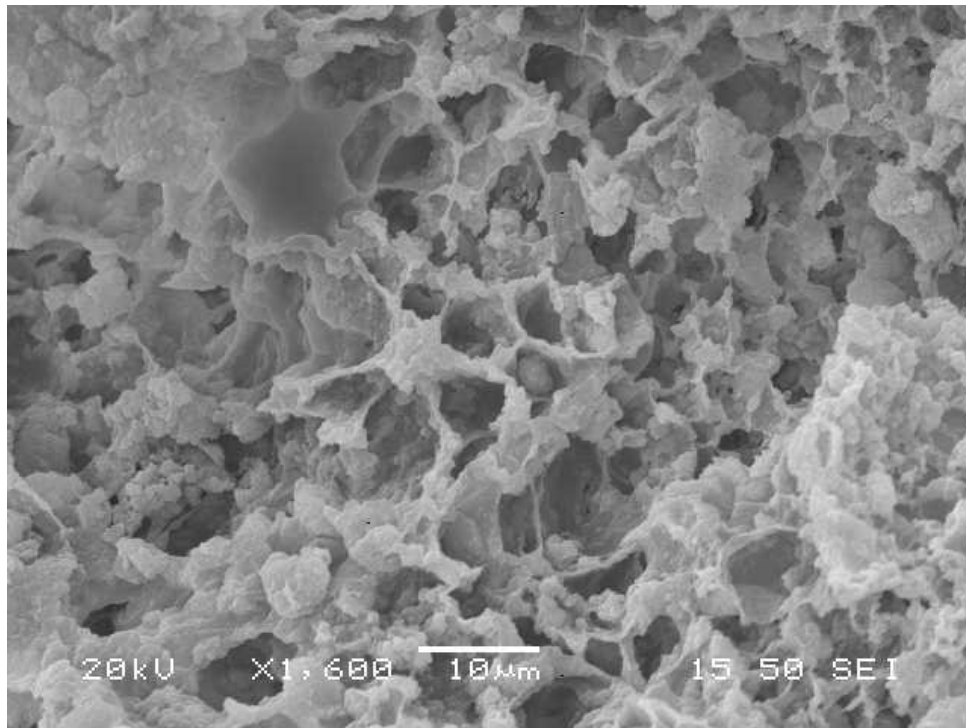
Στη συνέχεια με την ηλεκτρονική μικροσκοπία σάρωσης πραγματοποιήθηκε οπτική παρατήρηση των οστεοβλαστών που καλλιεργήθηκαν στα υβριδικά κριώματα του υδροξυαπατίτη για χρονικό διάστημα 5 ημερών. Οι πληροφορίες που λαμβάνονται με την τεχνική αυτή αφορούν την προσκόλληση των κυττάρων στην επιφάνεια των κριωμάτων καθώς και την εξάπλωση τους στο εσωτερικό του πορώδους δικτύου των κριωμάτων.

Επιπλέον, παρατηρείται η μορφολογία των οστεοβλαστών κατά την προσπάθεια τους να αποικήσουν τα υβριδικά κριώματα.

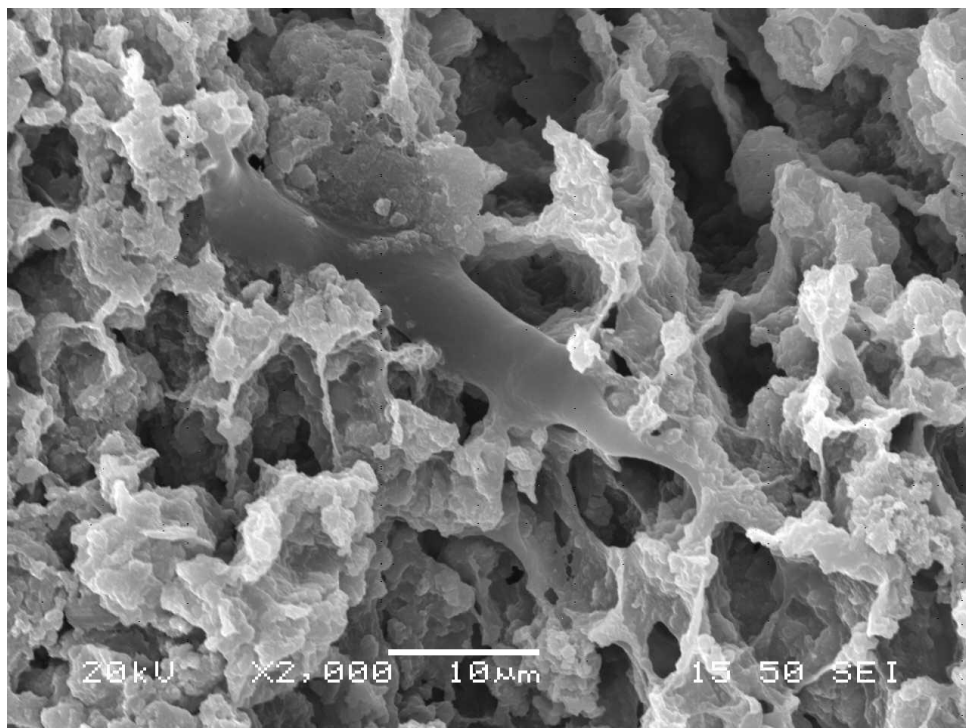
Αρχικά, η διαφορά στους κυτταρικούς πληθυσμούς ήταν πρόδηλη και κατά την μελέτη της επιφάνειας των κριωμάτων. Δηλαδή η ανίχνευση κυττάρων ήταν ευκολότερη στα κριώματα NCP6A2D και ακολουθούσαν τα CCP9A2D και τέλος τα NP2MA1D. Ένα ακόμα ενθαρρυντικό στοιχείο που αποκαλύφθηκε σε αυτήν την μελέτη ήταν πως τα κύτταρα δεν φάνηκαν να περιορίζονται τοπικά αλλά να εξαπλώνονται σε όλη την εσωτερική πορώδη δομή των κριωμάτων. Αυτό μπορεί να μεταφραστεί σε καλύτερη in vivo συμπεριφορά και ομοιόμορφη οστεοσύνθεση από τα οστικά κύτταρα.

Ιδιαίτερο ενδιαφέρον επέδειξε ο τρόπος με τον οποίον τα οστεοβλαστικού τύπου κύτταρα προσκολλήθηκαν στα κριώματα. Όπως φαίνεται στις παρακάτω εικόνες (Εικόνα 40-42) τα κύτταρα της σειράς MG-63 φάνηκε πως δένονταν χρησιμοποιώντας τα φιλοπόδια τους εκατέρωθεν των σχηματιζόμενων πόρων. Μάλιστα, όπως φαίνεται στην Εικόνα 42 πολλές φορές λόγω της διείσδυσης τους, οι πυρήνες των κυττάρων δεν ήταν ορατοί αλλά τα φιλοπόδια που είχαν διασυνδεθεί με τμήματα του υλικού ήταν.

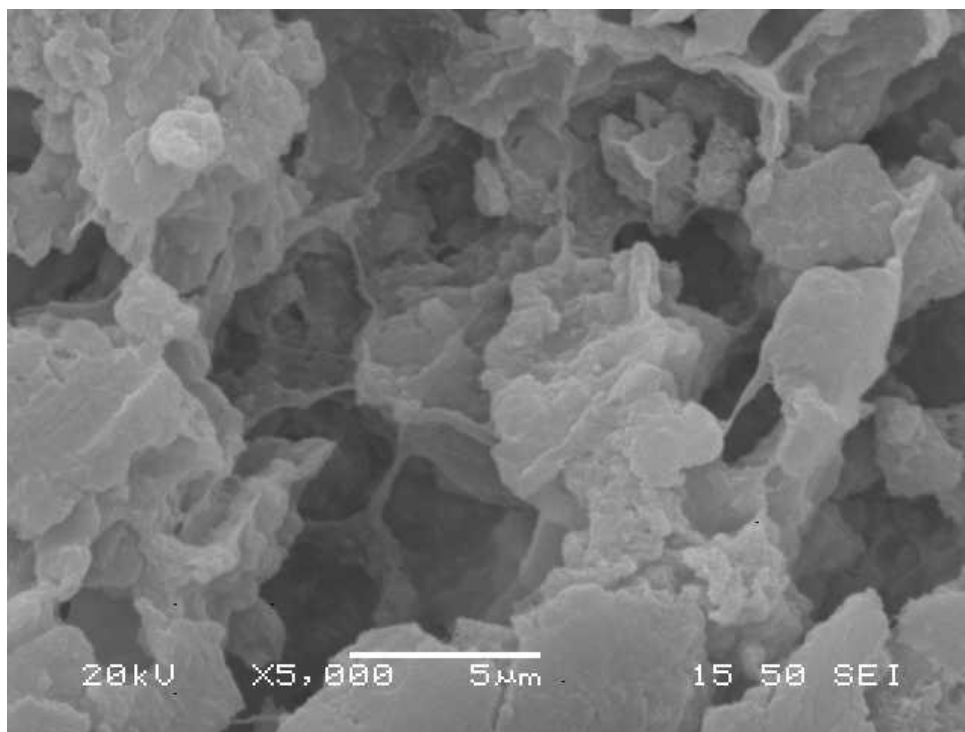
Τέλος, απ' όσο φάνηκε κατά την σάρωση των κριωμάτων, τα κύτταρα που είχαν προσκολληθεί και αναπτύσσονταν εντός του κριώματος είχαν διατηρήσει την χαρακτηριστική ιστοειδική δομή τους, γεγονός το οποίο επιβεβαιώνει την βιοσυμβατότητα των κριωμάτων.



Εικόνα 40: Εικόνα SEM κυτάρου εντός του ικρίώματος CCP9A2D



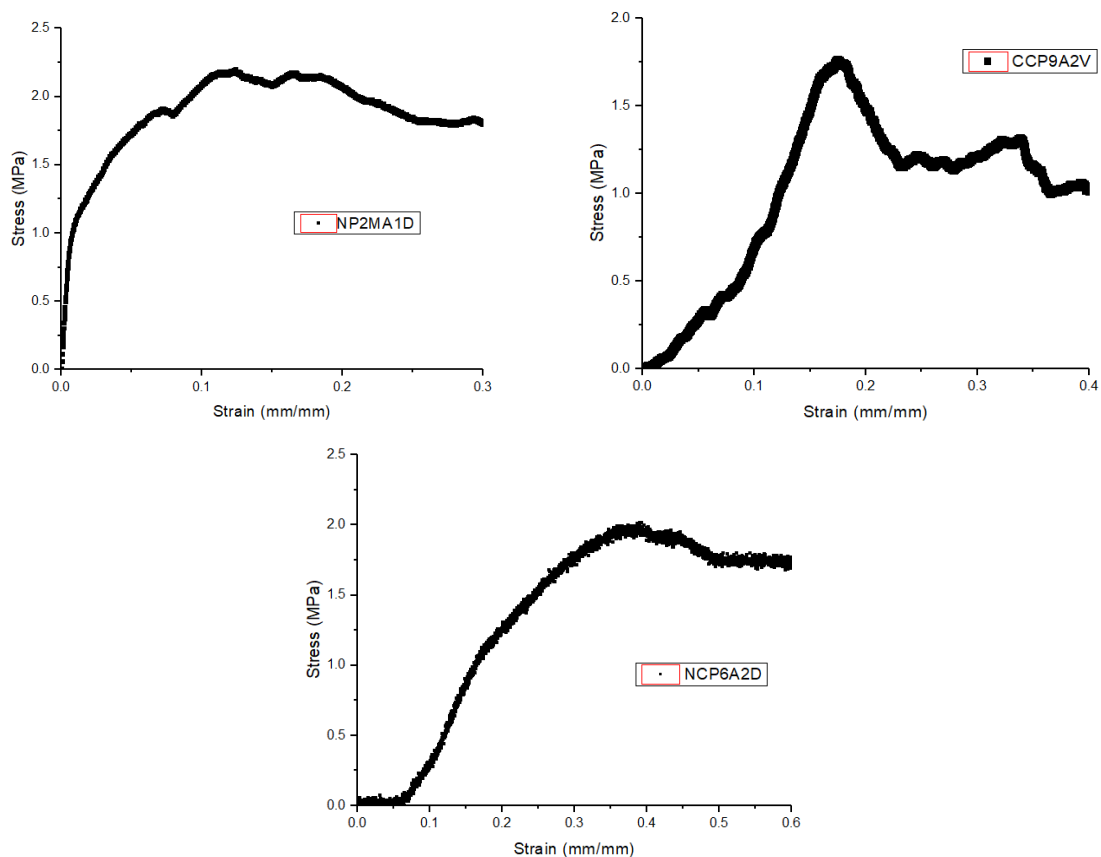
Εικόνα 41 Εικόνα SEM κυτάρου εντός του ικρίώματος NP2MA1D



Εικόνα 42 Εικόνα SEM όπου φαίνονται τα χαρακτηριστικά φιλοπόδια εντός του ικριώματος NCP6A2D

Δοκιμή μονοαξονικής θλίψης

Μέσω της συγκεκριμένης δοκιμής μπόρεσαν να υπολογιστούν οι μέγιστες θλιπτικές αντοχές των τριών ειδών ικριωμάτων αλλά και να σχηματιστούν οι καμπύλες τάσης-παραμόρφωσης τους. Η συγκεκριμένη δοκιμή είναι η ενδεδειγμένη για τον καθορισμό των μηχανικών ιδιοτήτων του φυσικού οστού. Η ερμηνεία των αποτελεσμάτων έγκειται στην σύγκριση τόσο με τις αντίστοιχες τιμές του φυσικού οστού όσο και στη σύγκριση με τα αποτελέσματα παρόμοιων εργασιών στη διεθνή βιβλιογραφία. Στην εικόνα 43 παρατίθενται οι καμπύλες τάσης-παραμόρφωσης για τα τρία είδη ικριωμάτων ενώ στον πίνακα παρουσιάζεται η μέγιστη θλιπτική τους αντοχή.



Εικόνα 43 Οι καμπύλες τάσης-παραμόρφωσης των τριών ειδών ικριωμάτων

In vivo τα οστά δέχονται θλιπτικά φορτία από τους μύες, την βαρύτητα αλλά και από εξωτερικά φορτία. Οστά του σώματος από διαφορετικές προελεύσεις μπορούν να επιδεικνύουν διαφορετική μηχανική συμπεριφορά, ανάλογα με τα φορτία τα οποία καλούνται να δεχτούν. Έτσι στη διεθνή βιβλιογραφία, η θλιπτική αντοχή των οστών παρουσιάζεται σε μορφή εύρους. Συγκρίνοντας τις τιμές της μέγιστης θλιπτικής με αυτές των φυσικών οστών, τις βρίσκουμε σε γενικές γραμμές σε αντιστοιχία με αυτές του δοκιδώδους οστού. Η μέγιστη θλιπτική αντοχή του δοκιδώδους οστού κυμαίνεται σε τιμές από 2 MPa (σπονδυλικό δοκιδώδες οστό) έως 10 MPa (δοκιδώδες οστό γόνατος). Οι

νανοσωλήνες άνθρακα δεν φάνηκε να ενισχύουν την αντοχή των ικριωμάτων όπως είχε υποτεθεί σε προηγούμενες εργασίες που έλαβαν χώρα στο εργαστήριο Μεταλλουργίας της σχολής Μηχανικών Μεταλλείων-Μεταλλουργών. Παρ' όλα αυτά αξίζει να σημειωθεί πως αυτό ίσως εξηγείται λόγω της εντονότερης πορώδους δομής την οποία επέδειξαν τα δείγματα με νανοσωλήνες άνθρακα. Αντίθετα, τα ικριώματα υδροξυαπατίτη/ L-αργινίνης/ χιτοζάνης/ PEO, απουσία νανοσωλήνων, επέδειξαν την μεγαλύτερη θλιπτική αντοχή.

Πίνακας 7 Η θλιπτική αντοχή των ικριωμάτων

Ονομασία ικριώματος	Θλιπτική αντοχή(MPa)	Τυπική απόκλιση(MPa)
NP2MA1D	2.1	0.2
NCP6A2D	1.9	0.1
CCP9A2D	1.5	0.3

Συνοψίζοντας, βασική προϋπόθεση ώστε να χρησιμοποιηθεί ένα υλικό σαν βιοϋλικό είναι να συμπεριφέρεται μηχανικά και βιολογικά ακριβώς όπως ο ιστός ή το όργανο που αντικαθιστά. Έτσι, λαμβάνοντας υπ' όψιν τις αντοχές τόσο των φυσικών όσο και αντίστοιχων ικριωμάτων που έχουν παραχθεί και μελετηθεί από διεθνείς ερευνητικές ομάδες, συμπεραίνουμε πως βασικό άξονα περαιτέρω μελέτης πρέπει να αποτελέσει η ενίσχυση της μηχανικής συμπεριφοράς των ικριωμάτων.

Συμπεράσματα

Στόχο της παρούσας εργασίας αποτέλεσε η βελτιστοποίηση της παραγωγικής μεθόδου οστικών ικριωμάτων και η λεπτομερής αξιολόγηση τους με απώτερο σκοπό την *in vivo* χρήση τους ως οστικά υποκατάστατα. Βασικό ζητούμενο από τα ικριώματα ήταν η βιοσυμβατότητα και η οστεογενετικότητα σε συνδυασμό με μηχανικές ιδιότητες που προσομοιάζουν αυτές του φυσικού οστού. Η βιομιμητική σύνθεση του υδροξυαπατίτη έγινε με τη μέθοδο της καταβύθισης πρόδρομων αντιδραστηρίων: διαλύματος φωσφορικού οξέος και αιωρήματος υδροξειδίου το ασβεστίου, παρουσία του αμινοξέος L-αργινίνη, με μοριακή αναλογία ασβεστίου προς φώσφορο 10/6 και αναλογία ασβεστίου προς L-αργινίνη 1:2 προκειμένου να σχηματιστούν κρύσταλλοι υδροξυαπατίτη με δομή και σύνθεση παρόμοια με τους κρυστάλλους που απαντώνται στον υδροξυαπατίτη του φυσικού οστού. Η σύνθεση έγινε παρουσία του πολυμερούς χιτοζάνη σε αναλογία υδροξυαπατίτη προς χιτοζάνη 70/30 για τη δημιουργία πολυμερικής μήτρας που θα βελτιώσει την αντοχή και τη βιολογική συμπεριφορά του υλικού. Η σκόνη που παράχθηκε από τα παραπάνω υλικά διασυνδέθηκε χημικά με την χρήση του πολυμερούς Poly(ethylene)oxide. Κατά τις συνθέσεις χρησιμοποιήθηκαν τρεις διαφορετικοί χρόνοι πολυμερισμού και τρία διαφορετικά μοριακά βάρη PEO. Επιπλέον, αποσκοπώντας στην βελτίωση της ελαστικότητας, αντοχής και δυνατότητας προσκόλλησης των κυττάρων στα ικριώματα, έγινε προσθήκη 1% w/w νανοσωλήνων άνθρακα για βιοϊατρικές εφαρμογές:

- a) Στο πρόδρομο αιώρημα χιτοζάνης/ορθοφωσφορικού οξέος.
- b) Στο τελικό αιώρημα υδροξυαπατίτη/χιτοζάνης/ L-αργινίνης.

Τα βασικά ερωτήματα που έπρεπε λοιπόν να απαντηθούν από αυτήν την εργασία ήταν τα εξής:

- 1) Κατά πόσο βοηθά η προσθήκη CNT την τελική συμπεριφορά των ικριωμάτων;
- 2) Ποιο είναι το προτιμητέο στάδιο ενσωμάτωσης τους;
- 3) Ποιοι είναι οι κατάλληλοι συνδυασμοί ημερών πολυμερισμού και μοριακού βάρους PEO;

Μέσα από μια πληθώρα αλληπάληλων δοκιμών, η κάθε μια εξαρτώμενη από την προηγούμενη, επιτεύχθηκε η επιλογή των καλύτερων παραμέτρων σύνθεσης της κάθε κατηγορίας αλλά και συνολικά του ικριώματος με την καλύτερη συμπεριφορά.

Αρχικά, μέσω της εικόνας του εσωτερικού πορώδους των ικριωμάτων κατέστη εφικτή η κατανόηση της σημασίας της χρήσης βέλτιστων παραμέτρων πολυμερισμού. Το ζητούμενο ήταν να επιτευχθεί ένα συμβιβαστικός συνδυασμός συνεκτικότητας και επαρκούς για την βιολογική εφαρμογή πορώδους δικτύου. Βρέθηκε πως η χρήση PEO μοριακού βάρους 2.000.000 σε συνδυασμό με χρονικά διαστήματα πολυμερισμού μεγαλύτερα των 24 ωρών οδηγούσε σε δομές πολύ συμπαγείς χωρίς το απαραίτητο πορώδες, λόγω του μήκους της πολυμερικής αλυσίδας. Αντίθετα, όταν χρησιμοποιούνταν πολυμερή με μοριακά βάρη 600.000 και 900.000, χρόνοι πολυμερισμού μικρότεροι των 2 ημερών είχαν ως αποτέλεσμα χαμηλή συνεκτικότητα και μη ανθεκτικότητα σε δυναμικά υδατικά περιβάλλοντα. Μέσα από μια διαδικασία δοκιμής και λάθους βρέθηκε πως τα βέλτιστα δείγματα ήταν τα NP2MA1D, NCP6A2D, CCP9A2D.

Στην συνέχεια, τα τριών ειδών ικριώματα (ένα από κάθε παραγωγική διαδικασία) δοκιμάστηκαν ως προς την βιολογική και μηχανική συμπεριφορά τους έτσι ώστε να

προσδιοριστεί ποιο από τα τρία επιδεικνύει την καλύτερη συμπεριφορά. Συνολικά οι μελέτες οδήγησαν στα παρακάτω συμπεράσματα:

- Τα ικριώματα NCP6A2D ευνοούν την προσκόλληση, διαφοροποίηση και ανάπτυξη κυτταρικών πληθυσμών περισσότερο από τα υπόλοιπα ικριώματα
- Οι νανοσωλήνες άνθρακα βελτιώνουν την βιολογική συμπεριφορά των ικριωμάτων αλλά και την ελαστικότητά τους. Αντίθετα, δεν φάνηκε να επηρεάζουν την αντοχή τους σε θλιπτικά φορτία
- Η μηχανική συμπεριφορά των ικριωμάτων φάνηκε πως επηρεάζεται άμεσα από το μοριακό βάρος και τις μέρες πολυμερισμού του PEO. Τα ικριώματα χωρίς νανοσωλήνες επέδειξαν τη μεγαλύτερη (και πιο κοντινή στο φυσικό οστό) θλιπτική αντοχή, κάτι που οφείλεται στο αρκετά μεγαλύτερο μήκος της πολυμερικής αλυσίδας (2M) το οποίο επιλέχθηκε.
- Όλα τα ικριώματα αποδείχθηκαν μη κυτταροτοξικά αφού μετά από καλλιέργεια κυττάρων οστεοβλαστικού τύπου, κανένας κυτταρικός πληθυσμός δεν οδηγήθηκε σε απόπτωση. Παρ' όλα αυτά βασικό ζητούμενο σε περαιτέρω μελέτες θα πρέπει να αποτελέσει η ενίσχυση της οστεοεπαγωγικότητας του υλικού, αφού καμία καλλιέργεια δεν ξεπέρασε τους πληθυσμούς που χρησιμοποιήθηκαν ως συστήματα αναφοράς (controls)
- Τέλος, η αντοχή των ικριωμάτων σε θλιπτικά φορτία αγγίζει το κατώτερο όριο του φυσικού σπογγώδους οστού σε όλες τις περιπτώσεις. Έτσι, η χρήση παραγόντων ενίσχυσης της μηχανικής συμπεριφοράς θα πρέπει να είναι στο επίκεντρο μελλοντικών ερευνών.

Βιβλιογραφία

- [1] S. A. C.P. Bergmann, *Dental Ceramics*, 2013 : p9-14.
- [2] A. H. B.D. Ratner, «Biomaterials science: an introduction to materials in medicine,» 1996, pp. 107-115.
- [3] Y. K. J.B. Park, «Metallic Biomaterials,» σε *Biomaterials Science and application*, 2002, pp. 1-21.
- [4] W. Billotte, «Ceramic Biomaterials,» σε *Biomaterials Science and application*, 2002, pp. 21-55.
- [5] G. K. H.B. Lee, «Polymeric Biomaterials,» σε *Biomaterials Science and application*, 2002, pp. 79-95.
- [6] Β. Θ. Δ. Υ. Κ. Υ. Ι. Αναστασοπούλου, Βιολικά-Εφαρμογές.
- [7] Β. Θ. Δ. Υ. Κ. Υ. Ι. Αναστασοπούλου, «Βιοϋλικά-Εφαρμογές,» pp. 136-141.
- [8] Ι. Καραμπάς, «Ανάπτυξη αναλυτικής μεθοδολογίας για την εκτίμηση της ποιότητας των οστών,» 2011.
- [9] P. D. T.S.B. Narasaraju, «Some physico-chemical aspects of hydroxylapatite,» *Journal of Materials Science* , pp. 1-21, 1996.
- [10] P. P. S. Weiner, «Dissagregation of bone into crystals,» *Calcified Tissue International*, pp. 365-375, 1986.
- [11] M. P. S. W. G. L. P. C. E. N. A. T. A. A. M. M. J. M. S. Lee, «Potential Bone Replacement Materials Prepared by Two Methods».
- [12] G. F. T.G, « Physiological bases of bone regeneration II. The remodeling process,» *Med Oral Patol Oral Cir Bucal*, 2006.
- [13] Α. Νίτη, «Μελέτη του παθογενετικού ρόλου της κυτταροκίνης RANKL σε διαγονιδιακά ζωικά πρότυπα,» 2015.
- [14] A. D. Bankoff, «Biomechanical Characteristics of the Bone,» σε *Human Musculoskeletal Biomechanics*, 2012.
- [15] Χ. Γιαννακόπουλος, «Αρχές Εμβιομηχανικής των οστών,» *Οστων*, pp. 11-17, 2007.
- [16] Z. P. R.B. Cook, «The fracture toughness of cancellous bone.,» *Journal of Biomechanics*, 2009.

- [17] S. Goldstein, «The mechanical properties of trabecular bone: dependence on anatomic location and function,» *Journal of biomechanics*, pp. 1055-1061, 1987.
- [18] B. C. P.W. Brown, *Hydroxyapatite and related materials*, 1994.
- [19] V. L. Q. D. e. a. X.Z. Zhou, «Mesenchymal stem cell-based repair of articular cartilage with polyglycolic acidhydroxyapatite biphasic scaffold,» *International Journal of Artificial Organs*, pp. 480-489, 2008.
- [20] O. V. C. R. G. C. A. C. V. Raffa, «Physical Properties of Carbon Nanotubes,» σε *Carbon Nanotubes for Biomedical Applications*, 2010, pp. 3-27.
- [21] A. C. G. L. D. M. S.K Smart, «The biocompatibility of carbon nanotubes,» *Carbon*, pp. 1034-1047, 2006.
- [22] J. B. J.A Jennings, «Chitosan Based Biomaterials,» 2017, pp. 44-49.
- [23] Ο. Μπούρα-Θεοδωρίδου, «Χαρακτηρισμός νανοσύνθετων υλικών χιτοζάνης με ZnO και διαφορετικούς τύπους πλαστικοποιητών,» 2017.
- [24] W. Visek, «Arginine needs, physiological state and usual diets:A re-evaluation,» *Journal of Nutrition*, pp. 36-46, 1986.
- [25] S. M. G. Wu, «Arginine metabolism in mammals,» σε *Metabolic and Therapeutic Aspects of Amino Acids in Clinical Nutrition* , 2004, pp. 153-167.
- [26] J. Fink, «Poly(ethylene oxide),» σε *Handbook of Engineering and Speciality Thermoplastics*, 2011, pp. 1-37.
- [27] Δ. Μπρασινίκα, «Βιομηχανική ανάπτυξη σύνθετω βιοκεραμικών νανουδροξυαπατίτη-βιοπολυμερών με ελεγχόμενες ιδιότητες για βιολογικές εφαρμογές,» 2015.
- [28] Γ. Στεγίου, «Σύνθεση κόνεως υδροξυαπατίτη παρουσία του βιοπολυμερούς χιτοζάνη και αμινοξέων,» 2012.
- [29] B. Cullity, *Elements of X-ray diffraction*, 1978.
- [30] K. S. R. J. S. N. K. C. S. Soumya, «Development of a phytochemical scaffold for bone tissue engineering using *Cissus quadrangularis*,» *Carbohydrate Polymers*, pp. 1787-1795, 2012.
- [31] S. S.-S. S.-S. S Abd-Khorsand, «Development of nanocomposite scaffolds based on TiO₂ doped in grafted chitosan/hydroxyapatite by freeze drying method and evaluation of biocompatibility.,» *International Journal of biological Macromolecules*, pp. 51-58, 2017.
- [32] M. J.Clover, «Are MG-63 and HOS TE85 human osteosarcoma cell lines representative models of the osteoblastic phenotype?,» *Bone*, pp. 585-591, 1994.

[33] R. M. B. A. N. T.L Riss, «Cell Viability Assays,» *Assay Guidance Manual*, 2013.

[34] J. B. J.B. Park, *Biomaterials: Principles and applications*.