ΕΘΝΙΚΟ ΜΕΤΣΟΒΙΟ ΠΟΛΥΤΕΧΝΕΙΟ

ΣΧΟΛΗ ΜΗΧΑΝΙΚΩΝ ΜΕΤΑΛΛΕΙΩΝ – ΜΕΤΑΛΛΟΥΡΓΩΝ

ΤΟΜΕΑΣ ΜΕΤΑΛΛΟΥΡΓΙΑΣ ΚΑΙ ΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ ΥΛΙΚΩΝ

ΑΝΑΠΤΥΞΗ ΣΥΝΘΕΤΩΝ ΥΒΡΙΔΙΚΩΝ ΕΠΙΚΑΛΥΨΕΩΝ ΝΑΝΟ-ΥΔΡΟΞΥΑΠΑΤΙΤΗ ΣΕ ΔΟΚΙΜΙΑ ΤΙΤΑΝΙΟΥ ΚΑΙ ΒΙΟΛΟΓΙΚΗ ΤΟΥΣ ΑΞΙΟΛΟΓΗΣΗ

ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ

του

ANTONION KORCARI

Επιβλέπουσα: Αθηνά Τσετσέκου

ΑΘΗΝΑ 2016

«ΑΝΑΠΤΥΞΗ ΣΥΝΘΕΤΩΝ ΥΒΡΙΔΙΚΩΝ ΕΠΙΚΑΛΥΨΕΩΝ ΝΑΝΟ-ΥΔΡΟΞΥΑΠΑΤΙΤΗ ΣΕ ΔΟΚΙΜΙΑ ΤΙΤΑΝΙΟΥ ΚΑΙ Η ΒΙΟΛΟΓΙΚΗ ΜΕΛΕΤΗ ΤΟΥΣ»

ΕΘΝΙΚΟ ΜΕΤΣΟΒΙΟ ΠΟΛΥΤΕΧΝΕΙΟ
ΣΧΟΛΗ ΜΗΧΑΝΙΚΩΝ ΜΕΤΑΛΛΕΙΩΝ–ΜΕΤΑΛΛΟΥΡΓΩΝ
ΤΟΜΕΑΣ ΜΕΤΑΛΛΟΥΡΓΙΑΣ ΚΑΙ ΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ ΥΛΙΚΩΝ

ΑΝΑΠΤΥΞΗ ΣΥΝΘΕΤΩΝ ΥΒΡΙΔΙΚΩΝ ΕΠΙΚΑΛΥΨΕΩΝ ΝΑΝΟ-ΥΔΡΟΞΥΑΠΑΤΙΤΗ ΣΕ ΔΟΚΙΜΙΑ ΤΙΤΑΝΙΟΥ ΚΑΙ ΒΙΟΛΟΓΙΚΗ ΤΟΥΣ ΑΞΙΟΛΟΓΗΣΗ

ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ

του

ANTONION KORCARI

Επιβλέπουσα: Αθηνά Τσετσέκου, Καθηγήτρια ΕΜΠ

Δημήτριος Πάνιας, Αναπληρωτής Καθηγητής ΕΜΠ, …… (Υπογραφή)

Αθηνά Τσετσέκου, Καθηγήτρια ΕΜΠ, …… (Υπογραφή)

Ηλιάνα Χαλικιά, Καθηγήτρια ΕΜΠ, …… (Υπογραφή)

ΑΘΗΝΑ, ΙΟΥΛΙΟΣ 2016

Copyright © **Antonion Korcari, 2016**
Με επιφύλαξη κάθε δικαιώματος. All rights reserved.

Αφιερώνεται με βαθύτατη εκτίμηση

και σεβασμό στον Γιώργο

και στην Ελένη Κασιμάτη

ΠΡΟΛΟΓΟΣ

Η παρούσα διπλωματική εργασία εκπονήθηκε στο Εργαστήριο Μεταλλογνωσίας του τομέα Μεταλλουργίας και Τεχνολογίας Υλικών της Σχολής Μηχανικών Μεταλλείων - Μεταλλουργών του ΕΜΠ, στο εργαστήριο Συστημικής Βιολογίας και Εμβιομηχανικής του τομέα Μηχανολογικών Κατασκευών και Αυτομάτου Ελέγχου της Σχολής Μηχανολόγων Μηχανικών του ΕΜΠ και στην εταιρία Protatonce Ltd του ΕΚΕΦΕ Δημόκριτος κατά το χρονικό διάστημα Ιανουάριος-Ιούλιος 2016.

Ολοκληρώνοντας τις προπτυχιακές μου σπουδές, θα ήθελα να εκφράσω τις θερμές ευχαριστίες μου σε όλους όσους συνέβαλαν στην επιτυχή ολοκλήρωση της ερευνητικής αυτής εργασίας. Αρχικά, θα ήθελα να ευχαριστήσω την επιβλέπουσα καθηγήτριά μου κα Αθηνά Τσετσέκου, Καθηγήτρια ΕΜΠ, για την επίβλεψη και την υποστήριξη της διπλωματικής μου εργασίας. Την ευχαριστώ θερμά για την ευκαιρία που μου προσέφερε, αναθέτοντάς μου ένα τόσο ενδιαφέρον θέμα. Η πολύ καλή συνεργασία καθώς και η εμπιστοσύνη που μου έδειξε ήταν καθοριστικός παράγοντας για την επιτυχή ολοκλήρωση της συγκεκριμένης ερευνητικής εργασίας.

Θα ήθελα να ευχαριστήσω θερμά τον κο Λεωνίδα Αλεξόπουλο, Επίκουρο Καθηγητή ΕΜΠ που δέχτηκε από την πρώτη στιγμή που του ζήτησα να με βοηθήσει στην εκπόνηση της διπλωματικής μου εργασίας και με ενέταξε αμέσως ως μέλος της ερευνητικής του ομάδας στο εργαστήριο που διευθύνει. Τον ευχαριστώ βαθύτατα διότι όχι απλά με βοήθησε στην εκπόνηση μιας ολοκληρωμένης ερευνητικής εργασίας στον τομέα της βιοϊατρικής, αλλά μου έδωσε και την ευκαιρία μέσω των trainings κυτταρικών καλλιεργειών και βιολογικών πειραματικών μετρήσεων να αποκτήσω ολοκληρωμένες γνώσεις βιολογίας ώστε να μπορώ να διεκπαιρεώνω επιτυχώς βιολογικά πειράματα. Οι εύστοχες παρατηρήσεις καθώς και η εξαιρετική συνεργασία υπήρξαν καθοριστικές στην απόκτηση του βραβείου πρώτης θέσης για την καλύτερη παρουσίαση αναρτημένης ανακοίνωσης προπτυχιακού φοιτητή στο 7° Πανελλήνιο Συνέδριο Εμβιομηχανικής της Ελληνικής Εταιρίας Εμβιομηχανικής που έγινε στο Νοσκοκομείο «Μητέρα» την περίοδο 24-26 Ιουνίου 2016. Επιπλέον, ευχαριστώ ιδιαίτερα την ομάδα του εργαστηρίου του καθώς επίσης και τα μέλη της εταιρίας του, που από την πρώτη στιγμή με δέχτηκαν με μεγάλη εκτίμηση και συνεργάστηκαν μαζί μου άριστα σε επιστημονικό και προσωπικό επίπεδο.

Στη συνέχεια θα ήθελα να ευχαριστήσω τους κ. Δημήτριο Πάνια, Αν. Καθηγητή ΕΜΠ και Ηλιάνα Χαλικιά, καθηγήτρια ΕΜΠ, για την προθυμία τους να συμμετάσχουν στην

αξιολόγηση της διπλωματικής μου εργασίας και να με τιμήσουν ιδιαίτερα με τη παρουσία τους κατά τη διάρκεια της παρουσίασής της.

Ιδιαίτερα, θα ήθελα να ευχαριστήσω τους Υποψήφιους Διδάκτορες Γεώργιο Στεργίου από το εργαστήριο Μεταλλογνωσίας της σχολής Μηχανικών Μεταλλείων-Μεταλλουργών και Jan Rozanc απο την εταιρία Protatonce στο ΕΚΕΦΕ Δημόκριτος, για τις πολύτιμες γνώσεις και πειραματικές τεχνικές που μου μετέδωσαν, ο πρώτος στο κομμάτι του σχεδιασμού και της κατασκευής των υλικών και ο δεύτερος στις κυτταρικές καλλιέργειες και στις βιολογικές μετρήσεις. Χωρίς τη πραγματοποίηση και των δύο διαφορετικών κατηγοριών των παραπάνω πειραμάτων, τα αποτελέσματα θα ήταν ελλιπή.

Επιπλέον, θα ήθελα να ευχαριστήσω τη Διδάκτορα Ελένη Ρούσση, οι υποδείξεις της οποίας αποτέλεσαν τον ακρογωνιαίο λίθο της επιτυχούς ολοκλήρωσης της εργασίας στην ενότητα των επικαλύψεων των βιοϋλικών.

Ακόμη, θα ήθελα να ευχαριστήσω τις υποψηφίους Διδάκτορες Ιωάννα Κίτσου και Φωτεινή Πετρακλή για τις εύστοχες παρατηρήσεις τους και για το χρόνο που μου διέθεσαν κατά τη διαδικασία χρήσης των μικροσκοπίων για την λήψη των διαφόρων αποτελεσμάτων.

Ένα μεγάλο ευχαριστώ θέλω να δώσω και στον συμφοιτητή μου Καραγιάννη Παναγιώτη για την άριστη συνεργασία μας κατά τη διεξαγωγή των πειραμάτων. Οι αμοιβαίες συζητήσεις που είχαμε και οι απόψεις που ανταλλάζαμε καθ’όλη τη διάρκεια της περιόδου εκπόνησης της διπλωματικής μου εργασίας αποτέλεσαν σημαντικό παράγοντα για την επίτευξη των ζητούμενων αποτελεσμάτων.

Φυσικά, θα ήθελα να ευχαριστήσω θερμά και να εκφράσω τη βαθύτατη εκτίμησή μου στους Γιώργο και Ελένη Κασιμάτη, οι οποίοι με δίδαξαν από πολύ μικρή ηλικία την αξία του ανθρωπισμού και της αλληλεγγύης. Η συμβολή και των δύο ήταν καθοριστική όχι μόνο για την επιτυχή ολοκλήρωση των σπουδών μου, αλλά και για την επιτυχή εισαγωγή μου στην τριτοβάθμια εκπαίδευση, ενώ η γενικότερη στάση τους και οι εύστοχες συμβουλές τους είχαν μία εξαιρετικά θετική επίδραση στην ανάπτυξη του χαρακτήρα και της προσωπικότητάς μου.

Ένα μεγάλο ευχαριστώ θα ήθελα να πω στον πολύ καλό μου φίλο ή καλύτερα στον αδερφό μου Αντρέα Γεωργίου, ο οποίος σε κάθε δύσκολη και αναγκαία στιγμή ήταν δίπλα μου ανεξαρτήτως ώρας και ημέρας. Οι πραγματικοί φίλοι στις δύσκολες περιόδους φαίνονται και ο Αντρέας Γεωργίου σε αυτές τις περιόδους ήταν πάντα εκεί για μένα.

Τέλος, θα ήθελα να ευχαριστήσω την οικογένειά μου που με υποστήριξε και με εμπιστεύτηκε όλα αυτά τα χρόνια. Χωρίς αυτούς, δεν θα ήμουν έδω που έχω φτάσει σήμερα.

"Move out of your comfort zone. You can only grow if you are willing to feel awkward and uncomfortable when you try something new."

Brian Tracy

Περίληψη

Στην παρούσα διπλωματική εργασία πραγματοποιήθηκε ανάπτυξη σύνθετων επικαλύψεων από νάνο-υδροξυαπατίτη καθώς και από συνδυασμό του νάνο-υδροξυαπατίτη με άλλα πολύ υποσχόμενα βιοϋλικά. Πιο συγκεκριμένα, τέσσερις διαφορετικές κατηγορίες βιοϋλικών παρήχθησαν. Η πρώτη κατηγορία ήταν καθαρό εμπορικά τιτάνιο με σχετικά τραχεία (μηχανικά επεξεργασμένη) και χημικά ενεργοποιημένη (χημική αντίδραση με διάλυμα καυστικού νατρίου 5M) επιφάνεια. Προηγούμενες έρευνες στον τομέα των μεταλλικών εμφυτευμάτων έχουν αποδείξει πως η επιφάνεια τιτάνιου με συγκεκριμένη τραχύτητα αυξάνει το ποσοστό προσκόλλησης των οστεοβλαστών (οστικά κύτταρα) καθώς και το ποσοστό πολλαπλασιασμού. Η δεύτερη κατηγορία ήταν η επίστρωση του τιτανίου (αφού είχε επεξεργαστεί μηχανικά και χημικά) με αιώρημα νάνο-υδροξυαπατίτη. Το αιώρημα του νάνο-υδροξυαπατίτη προετοιμάστηκε με βιομιμητική μέθοδο, η οποία χρησιμοποιεί τη χιτοζάνη σε συνδυασμό με την συνεργιστική δράση του αμινοξέος L-Αργινίνη σαν μήτρα για την ανάπτυξη νανοκρυστάλλων υδροξυαπατίτη σε θερμοκρασία 40° C, η οποία είχε αναπτυχθεί σε προηγούμενες μελέτες του εργαστηρίου μας, αναπτύσσοντας έτσι κρυστάλλους υδροξυαπατίτη με μορφολογία παρόμοια με τον απατίτη του φυσικού οστού. Το βιοπολυμερές χιτοζάνη χρησιμοποιήθηκε με σκοπό τη ρύθμιση της διεργασίας πυρήνωσης και ανάπτυξης κρυστάλλων υδροξυαπατίτη. Ωστόσο, η κινητική της κρυσταλλικής ανάπτυξης επηρεάζεται από την παρεμποδιστική δράση που ασκούν τα αμινοξέα. Για το παραπάνω λόγο επιλέχθηκε η L-Αργινίνη, η οποία ενισχύει την ανάπτυξη του υδροξυαπατίτη αλλά παράλληλα δρα παρεμποδιστικά στη μεγένθυση των κρυστάλλων του. Ως τρίτη κατηγορία επιλέχθηκε η επίστρωση των δοκιμίων τιτανίου με συνδυασμό του παραπάνω αιωρήματος νάνο-κρυσταλλικού υδροξυαπατίτη με νανοσωλήνες άνθρακα πολλαπλών στρωμάτων. Από προηγούμενες ερευνητικές εργασίες, έχει βρεθεί ότι οι νανοσωλήνες άνθρακα είναι ένα αρκετά υποσχόμενο βιοϋλικό και από πλευράς μηχανικών ιδιοτήτων, αλλά και από πλευράς βιολογικών ιδιοτήτων. Έτσι λοιπόν επιλέχθηκε να χρησιμοποιηθούν οι νανοσωλήνες άνθρακα για να δούμε κατά πόσο βελτιώνουν μηχανικά και βιολογικά το όλο βιοϋλικό. Τέλος, ως τέταρτη κατηγορία επιλέχθηκε η επίστρωση του τιτανίου με ένα σύνθετο υλικό αποτελούμενο από το παραπάνω υδροξυαπατίτη και οξείδιο του πολυαιθυλενίου (Polyethylene oxide PEO), ένα αρκετά υποσχόμενο βιοπολυμερές βιοϋλικό.

Οι κρυσταλλικές φάσεις και οι ιδιότητες των παραπάνω βιοϋλικών μελετήθηκαν με Φασματοσκοπία Περίθλασης ακτίνων Χ (XRD). Η αρχιτεκτονική της επιφάνειας κάθε κατηγορίας μελετήθηκε με τη χρήση ηλεκτρονικού μικροσκοπίου σάρωσης (SEM). Η τελική μορφολογία των κρυστάλλων του υδροξυαπατίτη καθώς και η αντίδραση των παραπάνω

νάνο-κρυστάλων υδροξυαπατίτη με τους νανοσωλήνες άνθρακα εξετάστηκαν με ηλεκτρονικό μικροσκόπιο διέλευσης (TEM). Η βιολογική συμπεριφορά των διαφόρων κατηγοριών των βιοϋλικών εξετάστηκε με την ανάπτυξη κυτταρικών καλλιεργειών. Ο έλεγχος βιοσυμβατότητας των βιοϋλικών έγινε με τη μέτρηση του Housekeeping γονιδίου GAPDH των κυττάρων μετά από καλλιέργεια 1, 3 και 7 ημερών επάνω στις διαφορετικές κατηγορίες των βιοϋλικών.

Τελικώς, αναπτύχθηκαν τέσσερις διαφορετικές κατηγορίες βιοϋλικών με υποσχόμενες μηχανικές και βιολογικές ιδιότητες. Μετά από τα βιολογικά αποτελέσματα, όλες οι κατηγορίες ήταν αρκετά βιοσυμβατές και παρέχουν ένα αρκετά φιλικό περιβάλλον στα κύτταρα, με τη κατηγορία όπου συνδυάζει υδροξυαπατίτη και νανοσωλήνες άνθρακα ως υλικό επίστρωσης, να είναι ελαφρά πιο βιοσυμβατή σε σχέση με τις άλλες κατηγορίες.

Abstract

The aim of this present research work is the development of hybrid nanostructured materials consisted of hydroxyapatite, carbon nanotubes and polyethylene oxide, used as coatings on titanium substrates in order to enhance the bioactivity and biofunctionality of the whole biomaterial.

The titanium substrates initially underwent mechanical treatment of their surface by grinding (220-1200 grit). Afterwards, they were chemically treated with 5 M sodium hydroxide (NaOH) solution at 60oC for 24 h. The next step was the coating of Ti surface using a HAp suspension prepared biomimetically in the presence of chitosan and L-arginine according to our previous studies. Four different categories of coatings were developed. The first one included coating of Ti with the as-produced HAp suspension, the second one concerned coating with the HAp suspension after the addition of poly-ethylene oxide (PEO) with MW 600.000 (Aldrich), the third one coating with the HAp suspension after the addition of multi-walled carbon nanotubes (MWCNT) (Nanothinx). The final category was titanium substrates without any coating material. The coating surfaces were examined by Scanning Electron Microscope (SEM) and Transmission Electron Microscope (TEM). The biological behavior of the resulting test pieces was investigated with neoplastic osteoblast-like cells (Cell line MG-63). Cell growth was quantified with the GAPDH (Housekeeping protein assay) by measuring MFI (median fluorescence intensity) with ELISA–based Luminex xMAP Technology.

The treatment of Ti surface and the optimization of deposition parameters proved suitable to create well adhered and homogeneous coatings without any microcracks. In the case of pure hybrid HAp coating, a thin film of HAp was formed which covered the whole surface. Only, some small agglomerates could be noticed, which, however, cannot affect negatively the coating performance. In the second case, when PEO was added, a rough and porous thick layer was created which could be beneficial on the grounds that rough surface coatings enhance bone formation. Finally, when MWCNTs were included, the hybrid nano-HAp and the MWCNTs were mixed successfully leading again to a homogeneous film. Cell cultures showed good cell proliferation properties.

Πίνακας περιεχομένων

Εισαγωγή.....5

Ι. Θεωρητικό μέρος.....7

1. Οστό.....7

1.1 Μορφολογία και ιστολογία.....7

1.2 Βασική δομή των οστών.....11

1.3 Εξειδικευμένα στηρικτικά κύτταρα οστών.....13

1.4 Ασβεστοποίηση οστεοειδούς.....17

1.5 Οστική επιδιόρθωση.....18

2. Βιοϋλικά.....20

2.1 Ορισμός βιοϋλικών 20

2.2 Ιδιότητες βιοϋλικών.....21

2.2.1 Βιοσυμβατότητα.....21

2.2.2 Μηχανικές ιδιότητες.....23

2.2.3 Οστεοενσωμάτωση.....23

2.2.4 Υψηλή αντίσταση στη διάβρωση.....24

2.3 Κατηγορίες βιοϋλικών.....24

2.3.1 Μεταλλικά υλικά.....25

2.3.2 Κεραμικά υλικά.....26

2.3.3 Πολυμερή υλικά.....28

2.4 Μαθήματα από τη φύση για το σχεδιασμό και την επιλογή βιοϋλικών.....32

2.4.1 Επισκόπηση της φυσικής δόμησης των ιστών.....32

2.4.2 Τα κύτταρα χτίζουν ιστό.....33

2.4.3 Η εξωκυττάρια μήτρα.....35

2.5 Αλληλεπιδράσεις ιστού-βιοϋλικού.....36

2.5.1 Αλληλεπιδράσεις με αίμα και πρωτεΐνες.....36

2.6 Ιστική ανάπλαση με τη χρήση βίο-εμπνευσμένων βιοϋλικών.....36

2.6.1 Τροποποίηση επιφανειακής χημείας.....36

2.6.2 Τοπογραφία επιφάνειας.....37

3. Τιτάνιο.....39

3.1 Γενικές πληροφορίες.....39

3.2 Εξαγωγή τιτανίου.....39

3.3 Ταξινόμηση κραμάτων τιτανίου.....40

3.4 Ο ρόλος των κραματικών στοιχείων.....42

3.5 Ιδιότητες τιτανίου.....43

4. Υδροξυαπατίτης.....45

4.1 Ορισμός υδροξυαπατίτη.....45

4.2 Μηχανισμός κρυστάλλωσης.....47

4.3 Τεχνικές παρασκευής υδροξυαπατίτη.....48

4.3.1 Μέθοδος Sol-Gel.....48

4.3.2 Μέθοδος καταβύθισης.....49

4.3.3 Υδροθερμική μέθοδος.....50

4.3.4 Μέθοδος ηλεκτροαπόθεσης.....51

4.3.5 Τεχνική βιομιμητικής απόθεσης.....52

4.4 Εφαρμογές υδροξυαπατίτη.....52

4.4.1 Καθαρός πυκνός υδροξυαπατίτης.....52

4.4.2 Επιστρώσεις υδροξυαπατίτη.....53

4.4.3 Πορώδης υδροξυαπατίτης.....53

4.4.4 Οστικά τσιμέντα φωσφορικού ασβεστίου.....54

5. Βιοπολυμερή.....55

5.1 Χιτοζάνη.....55

5.1.1 Δομή και σύνθεση.....55

5.1.2 Χρήσεις και εφαρμογές ως βιοϋλικό.....57

5.2 Αμινοξέα-Βασικές αρχές.....58

5.2.1 L-Αργινίνη – Δομή και ιδιότητες.....59

5.3 Οξείδιο του πολυαιθυλενίου.....60

6. Νανοσωλήνες άνθρακα.....63

7. Βιολογία κυττάρου.....66

7.1 Εισαγωγή.....66

7.1.1 Πυρήνας....67

7.1.2 Μιτοχόνδρια....68

7.1.3 Ενδοπλασματικό δίκτυο....69

7.1.4 Συσκευή Golgi....71

7.1.5 Λυσοσώματα....72

7.1.6 Κυτταρική μεμβράνη....72

7.2 Τεχνικές κυτταρικών καλλιεργειών....73

7.2.1 Ασηπτική εργασία....74

7.2.2 Απόψυξη κυττάρων....74

7.2.3 Ανακαλλιέργεια κυττάρων (cell splitting)....79

7.2.4 Μέτρηση κυττάρων με αιματοκυτταρόμετρο Neubauer....81

7.2.5 Πάγωμα κυττάρων....83

7.2.6 Λύση κυττάρων....83

8. Τεχνικές χαρακτηρισμού....84

8.1 XRD Περιθλασιμετρία ακτίνων Χ....84

8.2 SEM Ηλεκτρονικό μικροσκόπιο σάρωσης....90

8.3 TEM Ηλεκτρονικό μικροσκόπιο διέλευσης....98

8.4 Λυοφιλίωση....100

8.5 ELISA (Enzyme-Linked Immuno Sorbent Assay)....105

ΙΙ. Πειραματικό μέρος....113

9. Επεξεργασία δοκιμίων τιτανίου....113

9.1 Εγκοπή δοκιμίων τιτανίου....113

9.2 Μηχανική επεξεργασία δοκιμίων τιτανίου....113

9.3 Έκπλυση δοκιμίων τιτανίου σε λουτρό υπερήχων....113

9.4 Χημική επεξεργασία δοκιμίων τιτανίου....114

10. Παρασκευή αιωρήματος υδροξυαπατίτη....115

10.1 Αντιδραστήρια και εξοπλισμός....115

10.2 Παρασκευή 1^{ης} κατηγορίας επικαλύψεων....116

10.3 Παρασκευή 2^{ης} κατηγορίας επικαλύψεων....123

10.4 Παρασκευή 3^{ης} κατηγορίας επικαλύψεων....124

11. Μέθοδοι επικάλυψης των δοκιμίων τιτανίου.....127

11.1 Επικάλυψη με αιώρημα υδροξυαπατίτη.....127

11.2 Επικάλυψη με αιώρημα υδροξυαπατίτη και νανοσωλήνες άνθρακα.....130

11.3 Επικάλυψη με υδροξυαπατίτη και οξείδιο του πολυαιθυλενίου.....133

12. Καλλιέργεια οστεοβλαστών και σχεδιασμός της πειραματικής διαδικασίας για τον έλεγχο βιοσυμβατότητας των διαφορετικών κατηγοριών επικαλύψεων.....133

12.1 Εύρεση βέλτιστης συγκέντρωσης κυττάρων για τοποθέτηση στα βιοϋλικά.....134

12.2 Κυτταρική καλλιέργεια και υπολογισμός κυτταρικής βιωσιμότητας στα βιοϋλικά..144

ΙΙΙ. Αποτελέσματα και συζήτηση αποτελεσμάτων.....150

13. Αποτελέσματα περίθλασης ακτίνων-x.....150

13.1 Αποτελέσματα περίθλασης ακτίνων-x για τη πρώτη κατηγορία.....150

13.2 Αποτελέσματα περίθλασης ακτίνων-x για τη δεύτερη κατηγορία.....151

13.3 Αποτελέσματα περίθλασης ακτίνων-x για τη τρίτη κατηγορία.....151

14. Αποτελέσματα SEM των διαφόρων κατηγοριών επικάλυψης πριν καθώς και μετά τις αντίστοιχες αραιώσεις.....153

14.1 Επίστρωση δοκιμίων τιτανίου με αιώρημα υδροξυαπατίτη.....153

14.2 Επίστρωση δοκιμίων τιτανίου με αιώρημα υδροξυαπατίτη (μέθοδος εμβάπτισης) με αραιωμένο αιώρημα υδροξυαπατίτη (H_2O:Hap = 4:2).....155

14.3 Επίστρωση δοκιμίων τιτανίου με αιώρημα υδροξυαπατίτη και νανοσωλήνες άνθρακα πολλαπλών στρωμάτων.....159

14.4 Επίστρωση δοκιμίων τιτανίου με αιώρημα υδροξυαπατίτη και νανοσωλήνες άνθρακα (αραίωση H_2O : (Hap+CNT) = 2:2).....162

14.5 Επίστρωση δοκιμίων τιτανίου με υδροξυαπατίτη και οξείδιο πολυαιθυλενίου.....165

15. Αποτελέσματα TEM των επικαλύψεων.....166

15.1 Αποτελέσματα TEM υβριδικού νάνο-υδροξυαπατίτη.....166

15.2 Αποτελέσματα TEM υβριδικού νάνο-υδροξυαπατίτη σε συνδυασμό με νανοσωλήνες άνθρακα πολλαπλών στρωμάτων.....168

16. Αποτελέσματα από το πρώτο βιολογικό πείραμα.....170

17. Αποτελέσματα από το δεύτερο βιολογικό πείραμα(μελέτη βιοσυμβατότητας των διαφορετικών κατηγοριών βιοϋλικών).....182

IV. Συμπεράσματα.....186

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ.....189

Εισαγωγή

Το τιτάνιο αποτελεί τη πρώτη επιλογή στον τομέα της οδοντιατρικής για την παραγωγή οδοντικών εμφυτευμάτων, καθώς και στο τομέα της ορθοπεδικής ιατρικής για χρήση ως οστικό εμφύτευμα (αρθροπλαστική, αντικατάσταση ισχίου). Καταρχήν, έχει τη μεγαλύτερη βιοσυμβατότητα από οποιοδήποτε άλλο μεταλλικό υλικό. Ακόμη, έχει αρκετά υψηλή αντοχή σε κόπωση, γεγονός που το καθιστά ειδανικό για τέτοιου είδους εφαρμογές. Τέλος, η αντοχή του τιτανίου στη διάβρωση είναι πολύ υψηλή λόγω του στρώματος παθητικοποίησης (TiO_2) που δημιουργεί αυθόρμητα το συγκεκριμένο μέταλλο όταν έρθει σε επαφή με οξυγόνο. Παρ'όλα αυτά όμως, το τιτάνιο έχει και κάποια μειονεκτήματα. Καταρχήν, είναι ένα βιοαδρανές υλικό, που σημαίνει ότι ο οργανισμός δεν το αναγνωρίζει και γι'αυτό το λόγο το περιβάλλει σε έναν ινώδη ιστό και προσπαθεί να το αποβάλλει. Ακόμη, μετά από μακροχρόνια παραμονή στον ανθρώπινο οργανισμό, επιπλοκές λόγω διάβρωσης καθώς και λόγω τριβής έχουν ως αποτέλεσμα τη χαλάρωση και τελικώς την αστοχία του τιτανίου. Για να αποφευχθούν τα παραπάνω μειονεκτήματα, βιοενεργά υλικά θα πρέπει να συνδυάζονται (ως επίστρωση) με το τιτάνιο. Προηγούμενες ερευνητικές μελέτες έχουν δείξει ότι κάποια κεραμικά υλικά μπορούν και δημιουργούν ένα στρώμα αρκετά όμοιο με τον οστικό απατίτη, ικανοποιώντας έτσι την ανάγκη για όστεοενσωμάτωση. Ο υδροξυαπατίτης είναι ένα από τα πιο επιτυχημένα βιοενεργά υλικά που χρησιμοποιούνται ως επίστρωση, κυρίως σε εμφυτεύματα τιτανίου. Είναι το πιο ευρέως διαδεδομένο υλικό για χρήση στην ιστική (οστική) επιδιόρθωση και αντικατάσταση λόγω του ότι έχει πολύ μεγάλη χημική συγγένεια με το βιολογικό ανθρώπινο απατίτη παρέχοντας έτσι άριστη βιοσυμβατότητα, βιοενεργότητα, οστεοενσωμάτωση και μη τοξικότητα. Διάφορες μέθοδοι παραγωγής υδροξυαπατίτη έχουν αναπτυχθεί (Sol-Gel, Plasma Spraying). Όλες οι παραπάνω μέθοδοι όμως παράγουν ένα όχι τόσο καλό ποιοτικά υδροξυαπατίτη για χρήση ως υλικό επίστρωσης. Καταρχάς, το υλικό της επίστρωσης δεν εξαπλώνεται σε όλη τη μεταλλική επιφάνεια ομοιογενώς, έχοντας ως αποτέλεσμα τη συσσώρευση τάσεων λόγω ανομοιογένειας και την αποτυχία του εμφυτεύματος. Άλλο πρόβλημα είναι η παραγωγή υδροξυαπατίτη όχι τόσο καλά κρυσταλλωμένου (νάνο κρύσταλλοι όμοιοι με το φυσικό απατίτη) υδροξυαπατίτη με αποτέλεσμα να μην γίνεται επαρκής οστεοενσωμάτωση και τελικώς το εμφύτευμα να ξεκολλάει και οδηγείται σε αστοχία. Για την περαιτέρω βελτίωση του όλου βιοϋλικού, μεγάλη προσοχή έχει δωθεί στη δημιουργία βιοϋλικών με πολύ αυξημένες βιολογικές ιδιότητες. Πιο συγκεκριμένα, η δημιουργία νάνο-κρυσταλλικού υδροξυαπατίτη έχει αυξήσει σε σημαντικό βαθμό τη βιοσυμβατότητα και τη βιολειτουργικότητα του βιοϋλικού λόγω του ότι τα κύτταρα (οστεοβλάστες) το αναγνωρίζουν ως μια άριστη εξωκυττάρια μήτρα. Έτσι λοιπόν, στόχος της

συγκεκριμένης εργασίας είναι η παραγωγή βιοϋλικών νανοτεχνολογίας για την όσο το δυνατόν μεγαλύτερη βιοσυμβατότητα.

Η εργασία είναι χωρισμένη σε τέσσερα μέρη. Στο πρώτο μέρος δίνεται όλο το θεωρητικό μέρος στο οποίο στηρίχτηκε το δεύτερο μέρος της εργασίας που είναι το πειραματικό μέρος. Στη συνέχεια στο τρίτο μέρος δίνονται και εξηγούνται αναλυτικά τα αποτελέσματα των πειραμάτων των υλικών καθώς και των βιολογικών πειραμάτων και τέλος στο τέταρτο μέρος ανάφερονται τα τελικά συμπεράσματα της ερευνητικής αυτής εργασίας.

Ι. ΘΕΩΡΗΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

1. ΟΣΤΟ

1.1 Μορφολογία και ιστολογία

Το οστό αποτελεί έναν στηρικτικό ιστό υψηλής εξειδίκευσης με ακαμψία, ιδιαίτερα σκληρής σύστασης αλλά μικρού βαθμού ελαστικότητας. Οι κυριότερες λειτουργίες του διαχωριζόνται σε μηχανικές και φυσιολογικές.

Μηχανικές λειτουργίες:

Το οστό παρέχει μηχανική υποστήριξη στο σώμα είτε σε ακινησία είτε εν κινήσει καθώς επίσης προστατεύει εσωτερικά όργανα. Πιο συγκεκριμένα, το οστό προσφέρει μηχανικά:

- Υποστήριξη του σώματος από διάφορες εξωτερικές δυνάμεις, π.χ βαρύτητα
- Λειτουργεία ως σύστημα μεταφοράς διαφόρων δυνάμεων, π.χ μυϊκές δυνάμεις
- Προστασία απαραίτητων εσωτερικών οργάνων, πχ. εγκέφαλος

Φυσιολογικές λειτουργίες:

Το οστό συνεισφέρει στη λειτουργία των μεταβολικών οδών που έχουν να κάνουν με την ομοιόσταση αλάτων. Πιο συγκεκριμένα, οι φυσιολογικές λειτουργίες του οστού είναι:

- Σχηματισμός κυττάρων αίματος (αιμοποίηση)
- Αποθήκευση ασβεστίου

Υποστήριξη:

Το συμπαγές και το δοκιδώδες οστό παρέχουν υποστήριξη στο ανθρώπινο σώμα καθώς και διαμορφώνουν το σχήμα του.

Μεταφορικό σύστημα:

Τα οστά παρέχουν σημεία προσκόλλησης-συνένωσης μυών-τενόντων. Τα οστά και οι μύες λειτουργούν μαζί για να μεταφέρουν δυνάμεις μέσω των μυϊκών ενώσεων.

Προστασία:

Τα πλατέα οστά του σκελετικού συστήματος, είναι σχηματισμένα από ένα στρώμα δοκιδώδους οστού. Βρίσκονται μεταξύ δύο συμπαγών πλακών και είναι σε μεγάλο βαθμό

υπεύθυνα για τη προστασία ευαίσθητων οργάνων όπως για παράδειγμα τη καρδιά, τα πνευμόνια και τον εγκέφαλο.

Αιμοποίηση

Η αιμοποίηση είναι η διαδικασία παραγωγής κυττάρων του αίματος. Λαμβάνει χώρα στον ερυθρό μυελό των οστών. Στους ενήλικες, ο ερυθρός μυελός των οστών βρίσκεται σε οστικές περιοχές που αποτελούνται κατα πλειοψηφία από δοκιδώδες οστό. Σε αυτές τις περιοχές, ερυθροκύτταρα, λευκοκύτταρα καθώς και θρομβοκύτταρα παράγονται. Σε αντίθεση με τον ερυθρό μυελό των οστών, ο ωχρός μυελός των οστών (ή λιπαρός μυελός) βρίσκεται κυρίως σε οστικές περιοχές που αποτελούνται κυρίως από συμπαγές οστό.

Ομοιόσταση αλάτων

Τα οστά είναι η μεγαλύτερη 'αποθήκη' ασβεστίου, με το 99% του ασβεστίου σε ολόκληρο το σώμα να αποθηκεύεται στο σκελετό. Επίσης, στα οστά αποθηκεύονται και άλλα στοιχεία όπως φώσφορος, νάτριο, κάλιο, ψευδάργυρος και μαγνήσιο.

Το οστό αποτελείται από:

- Στηρικτικά κύτταρα (οστεοβλάστες, οστεοκύτταρα)
- Οργανική εξωκυττάρια ουσία από κολλαγόνο και γλυκοζαμινογλυκάνες (οστεοειδές)
- Ανόργανα άλατα
- Οστεοκλάστες (κύτταρα αποδόμησης οστού)

Το οστό βρίσκεται σε δυναμική κατάσταση. Πιο συγκεκριμένα, γίνεται σύνθεση καθώς και αποδόμησή του υπό τον έλεγχο ορμονικών και φυσικών παραγόντων. Έτσι επιτρέπεται η ανακατασκευή του. Χαρακτηριστικά, σε ένα φυσιολογικό μέσο ενήλικα, κάθε χρόνο ανακατασκευάζεται περίπου το 8 με 10% των οστών του. Έτσι, μετά το πέρας 10 ετών, θα έχει γίνει αποδομή και σύνθεση όλων των οστών στο σώμα του ενήλικα.

Ο ρυθμός ανακατασκευής είναι μεταβλητός με διάφορες παραμέτρους όπως για παράδειγμα την ηλικία, τη παθολογική κατάσταση του ανθρώπου καθώς και το τραυματισμό του οστού (κάταγμα). Πιο συγκεκριμένα, σε ώριμους ενήλικες, ο ρυθμός ανακατασκευής των

οστών διατηρείται συνήθως χαμηλός. Αντιθέτως, ο ρυθμός αυτός είναι έντονος σε βρέφη, σε παιδιά και σε ενήλικες σε αποκατάσταση κατάγματος [1].

Εικόνα 1. Αποσυνδεδεμένος ανθρώπινος σκελετός [2].

Οστεοειδές

Το οστεοειδές αποτελεί το οργανικό τμήμα της εξωκυττάριας θεμέλιας ουσίας του οστίτη ιστού. Αποτελείται από κολλαγόνο τύπου Ι και γλυκοζαμινογλυκάνες όπως η οστεοκαλσίνη, η οστεονεκτίνη και οι σιαλοπρωτεΐνες, με ιδιότητες δέσμευσης Ca και συνεπώς αύξησης της μηχανικής αντοχής του οστού [3].

Δικτυωτή και Πεταλιώδης μορφή οστίτη ιστού

Ανάλογα με το τρόπο διάταξης των ινών κολλαγόνου που σχηματίζουν το οστεοειδές, διακρίνονται 2 τύποι οστίτη ιστού:

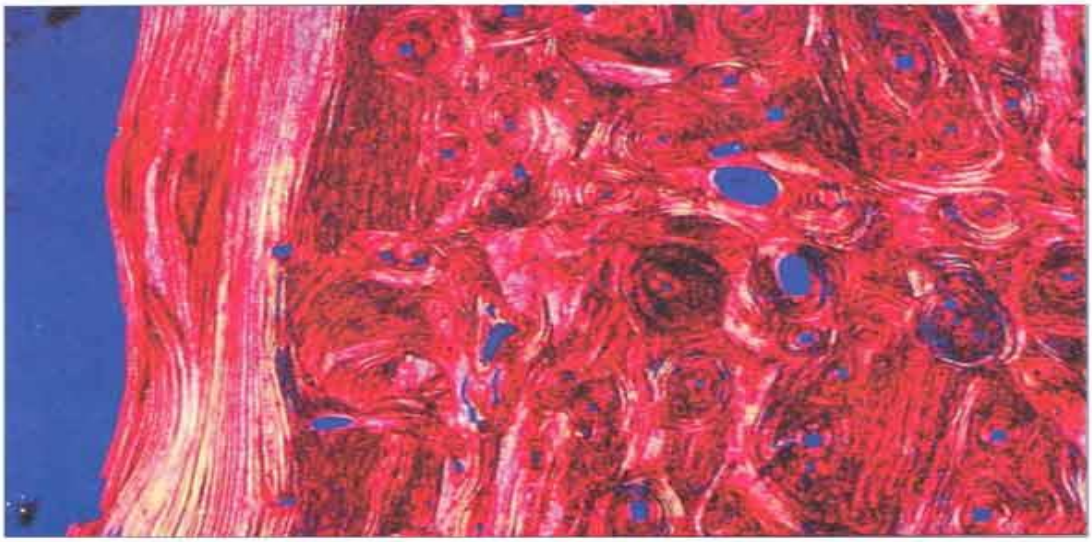
- ✓ **Δικτυωτή μορφή (πρωτογενές οστό):**

  Στη δικτυωτή μορφή, η διάταξη των ινών κολλαγόνου είναι τυχαία. Αυτός είναι και ο λόγος της μειωμένης μηχανικής αντοχής. Αυτή η μορφή σχηματίζεται κατά τη ταχεία παραγωγή οστεοειδούς. Πιο συγκεκριμένα, τα αρχικά οστά των εμβρύων έχουν δικτυωτή μορφή, στα οποία γίνεται σταδιακή αντικατάσταση από πεταλιώδη μορφή. Στους ενήλικες, ο δικτυωτός τύπος σχηματίζεται σε περιπτώσεις γρήγορης παραγωγής (κάταγμα) νέου οστού, όπου και σε αυτή τη περίπτωση έχουμε σταδιακή αντικατάσταση του δικτυωτού τύπου από πεταλιώδη [3].

Εικόνα 2. Δικτυωτό οστό (Δ) με τυχαία διάταξη και πεταλιώδες οστό (Π) με παράλληλη διάταξη των ινών κολλαγόνου. Μικροσκόπιο πολωμένου φωτός [3].

- ✓ **Πεταλιώδης μορφή (δευτερογενές οστό):**

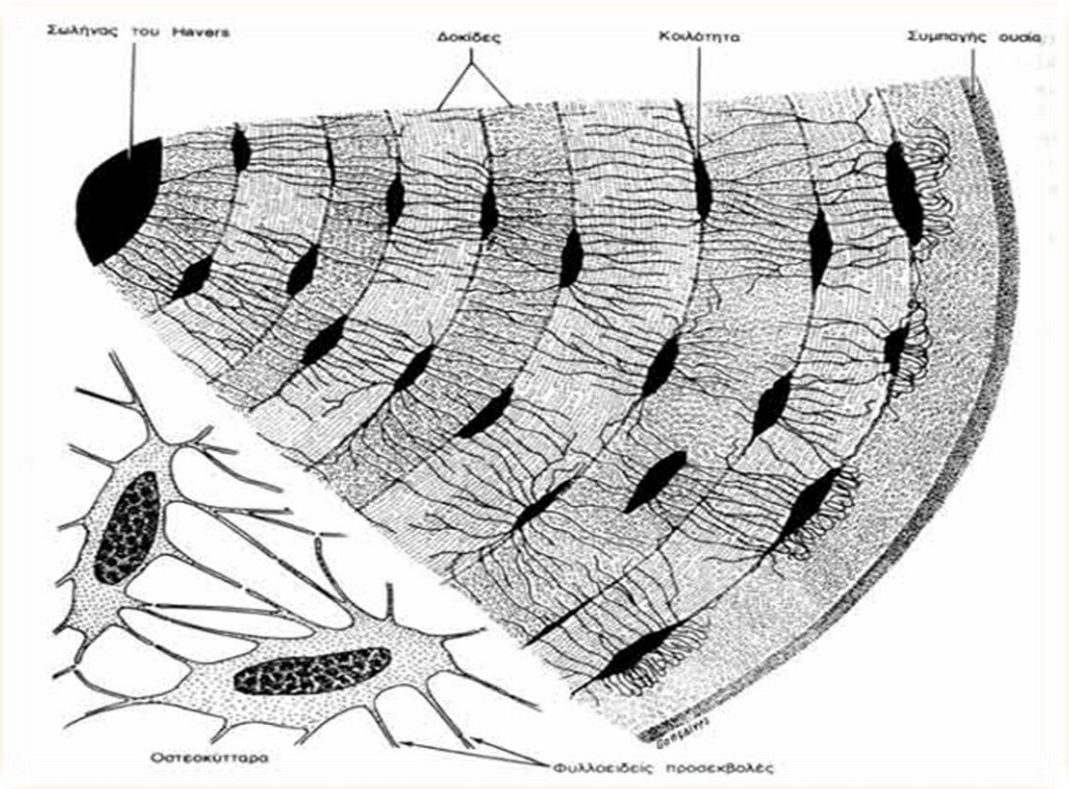
Η μορφή αυτή του οστίτη ιστού χαρακτηρίζεται από κανονική, παράλληλη διάταξη του κολλαγόνου σε λεπτότατες δεσμίδες (οστέινα πέταλα) και ονομάζεται **οστεώνας**, Η παραπάνω παράλληλη διάταξη του κολλαγόνου έχει ως αποτέλεσμα την αύξηση της μηχανικής αντοχής [3].



Εικόνα 3. Οι κολλαγόνες ίνες του πεταλιώδους οστού είναι ή παράλληλες μεταξύ τους, ή συγκεντρικά οργανωμένες γύρω από τους σωλήνες του Havers [3].

Ο **οστεώνας** αποτελείται από:

- ✓ Το κεντρικό σωλήνα του Havers με αιμοφόρα αγγεία, νεύρα και χαλαρό συνδετικό ιστό που περιβάλλεται από ομόκεντρα πετάλια οστίτη ιστού.



Εικόνα 4. Σχηματική παράσταση από τομή τμήματος οστεώνα, όπου αναγνωρίζονται ο κεντρικός σωλήνας του Havers και τα ομόκεντρα πετάλια πεταλιώδους οστού

1.2 Βασική δομή των οστών

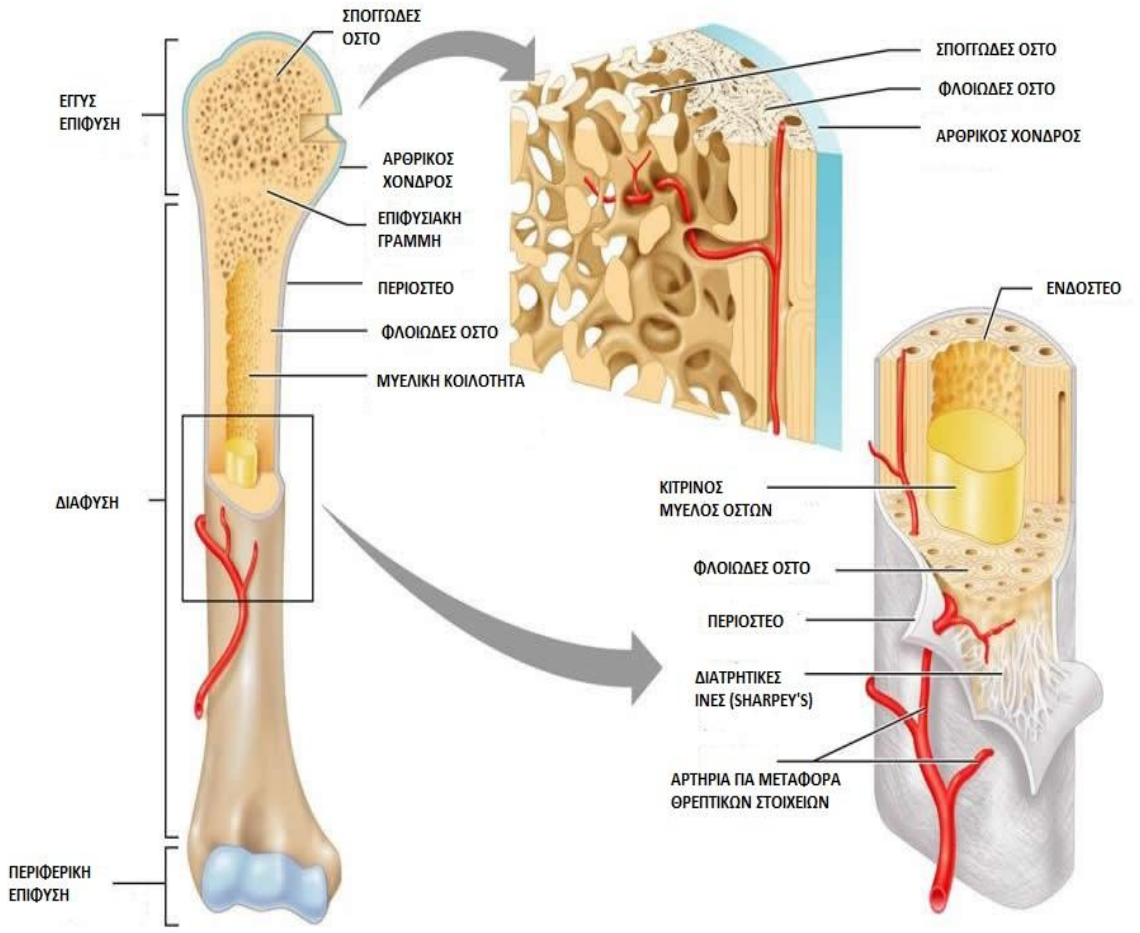
Το οστό αποτελείται από 2 ζώνες. Την εξωτερική φλοιώδη ή συμπαγή ζώνη και την εσωτερική δοκιδώδη ή αλλιώς σπογγώδη ζώνη [4].

Φλοιώδες οστό

Το φλοιώδες οστό σχηματίζει ένα άκαμπτο εξωτερικό περίβλημα που ανθίσταται στις δυνάμεις παραμόρφωσης [4].

Σπογγώδες οστό

Το σπογγώδες οστό ισχυροποιεί το οστό. Πιο συγκεκριμένα, λειτουργεί ως ένα πολύπλοκο σύστημα εσωτερικών στηριγμάτων. Οι χώροι ανάμεσα στις δοκίδες καταλαμβάνονται από μυελό των οστών [4].



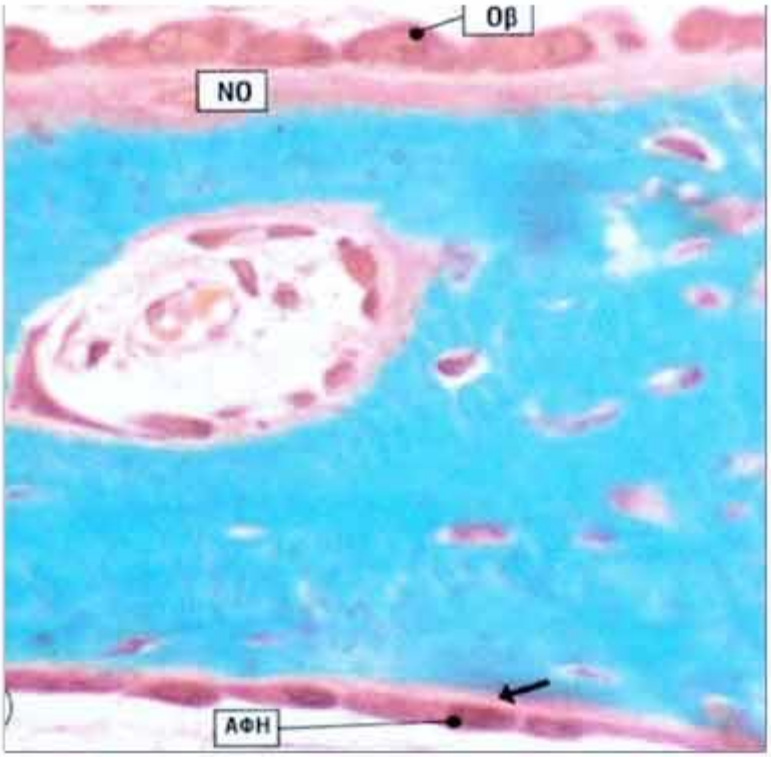
Εικόνα 5. Χαρακτηριστική εικόνα όπου διακρίνονται τα διαφορετικά μέλη από τα οποία αποτελείται το μηριαίο οστό.

1.3 Εξειδικευμένα στηρικτικά κύτταρα οστών

Τα εξειδικευμένα στηρικτικά κύτταρα των οστών είναι οι οστεοβλάστες, τα οστεοκύτταρα και οι οστεοκλάστες [5].

Οστεοβλάστες

Οι οστεοβλάστες είναι υπεύθυνοι για τη σύνθεση του οργανικού τμήματος της εξωκυττάριας θεμέλιας ουσίας του οστού, δηλαδή κολλαγόνο τύπου Ι, γλυκοζαμινογλυκάνες και πρωτεογλυκάνες. Στην ενεργή τους μορφή έχουν κυβοειδές ή πολυγωνικό σχήμα με βασεόφιλο κυτταρόπλασμα (αδρό ενδοπλασματικό δίκτυο). Οι οστεοβλάστες βρίσκονται στην επιφάνεια του δοκιδώδους οστού. Αρκετοί οστεοβλάστες εγκλωβίζονται μέσα στο οστεοειδές που έχουν συνθέσει και μεταβάλλονται σε οστεοκύτταρα [5].



Εικόνα 6. Ενεργοί οστεοβλάστες (Οβ) αναγνωρίζονται στη μία επιφάνεια της οστικής δοκίδας, σε επαφή με μη-ασβεστοποιημένο οστεοειδές (ΝΟ). Στην άλλη πλευρά της οστικής δοκίδας οι οστεοβλάστες είναι σε ανενεργή φάση ηρεμίας (ΑΦΗ) [7].

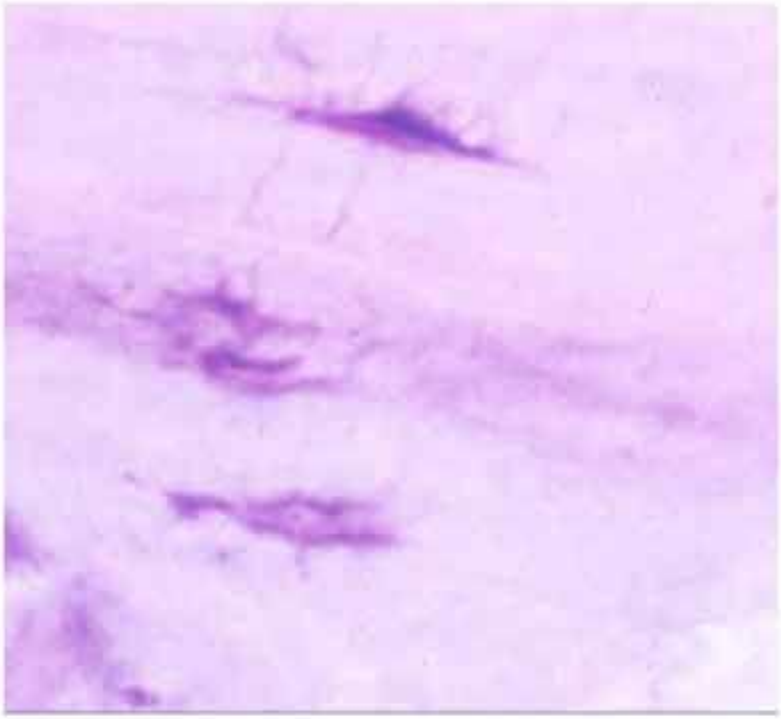
Εικόνα 7. Αναπαράσταση ανθρώπινου οστεοβλάστη [9].

Οστεοκύτταρα

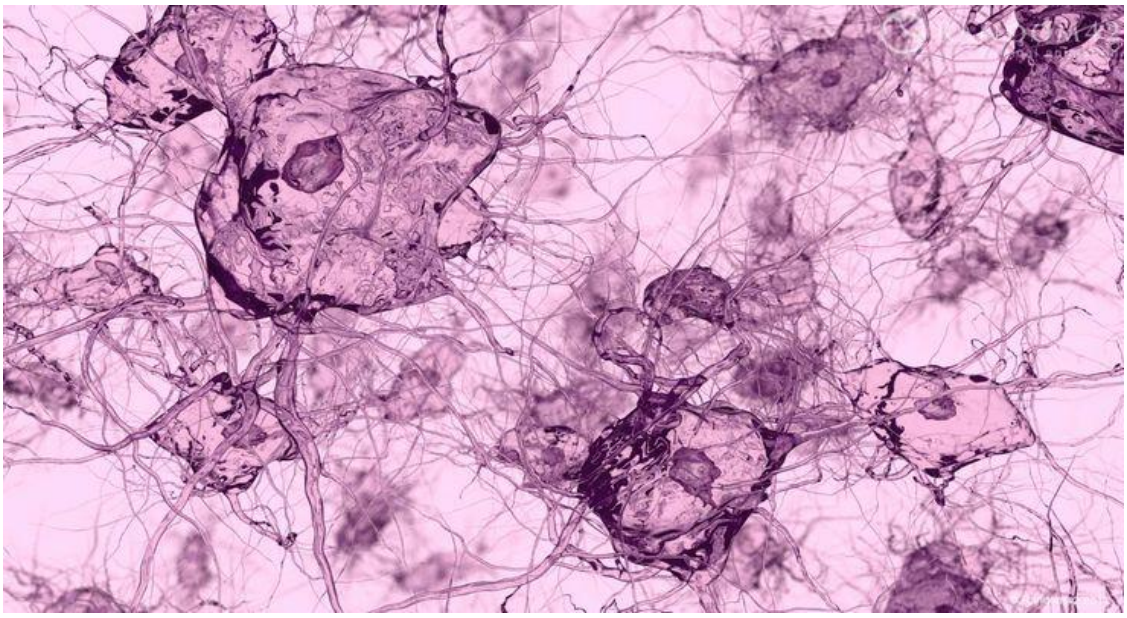
Όταν ολοκληρωθεί ο κύκλος παραγωγής του οστεοειδούς από τους οστεοβλάστες, τότε επιστρέφουν στην ανενεργό φάση, προσλαμβάνουν αποπλατυσμένο, ατρακτόμορφο σχήμα και μεταβάλλονται σε οστεοκύτταρα. Οι κυριότερες θέσεις που καταλαμβάνουν είναι:

- Στην ανενεργή οστική επιφάνεια
- Σε μικρές κοιλότητες του οστού

Με τη βοήθεια ενός συστήματος μικροσωληνίσκων και κυτταροπλασματικών αποφυάδων επικοινωνούν με τα αγγεία του περιόστεου και του σωλήνα του Havers με σκοπό τη θρέψη καθώς και την ανταλλαγή μηνυμάτων. Η χρωματίνη τους είναι πυκνώτερη και το αδρό ενδοπλασματικό δίκτυο ελαττωμένο. Ο ρόλος των οστεοκυττάρων είναι η διατήρηση της θεμέλιας ουσίας. Ο θάνατός τους προκαλεί την απορρόφηση της θεμέλιας ουσίας[5].



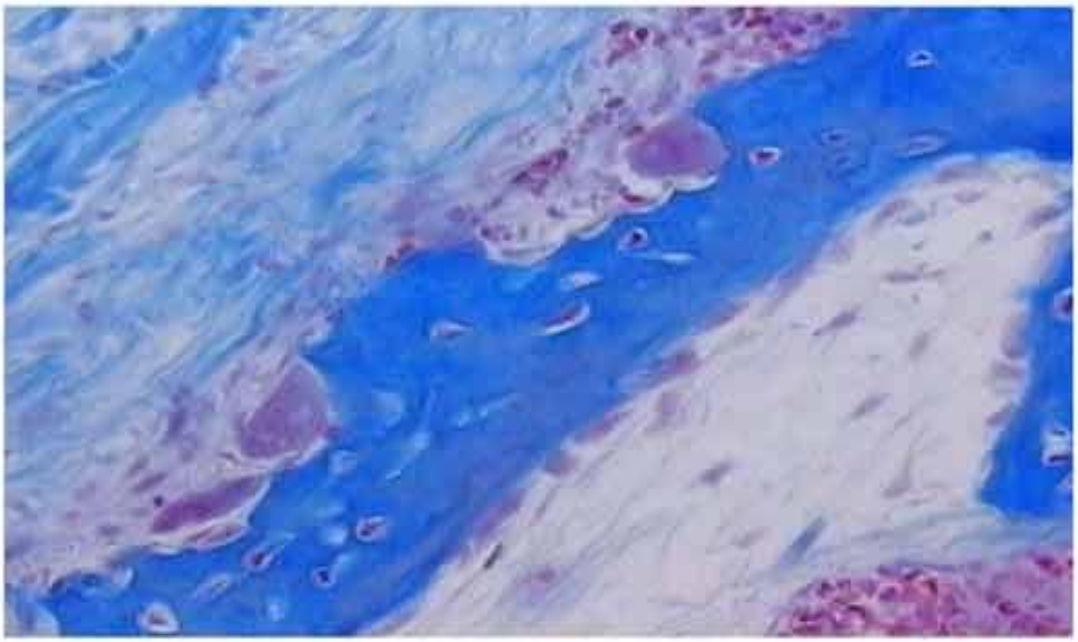
Εικόνα 8. Οστεοκύτταρα με εμφανείς κυτταροπλασματικές αποφυάδες εγκλωβισμένα μέσα σε ασβεστοποιημένη οστέινη ουσία [7] .



Εικόνα 9. Αναπαράσταση ανθρώπινων οστεοκυττάρων [10].

Οστεοκλάστες

Οι οστεοκλάστες είναι μεγάλα κύτταρα με πολλούς πυρήνες και άφθονο κυτταρόπλασμα. Προέρχονται από μονοκύτταρα του αίματος είτε με ένωση πολλών μονοκυττάρων, είτε με επαναλαμβανόμενη διαίρεση του πυρήνα του μονοκυττάρου. Οι οστεοκλάστες προσκολλόνται στην ελεύθερη επιφάνεια, σε θέσεις ενεργού απορρόφησης οστού μέσα σε σκαφοειδή κοιλώματα. Είναι υπεύθυνοι για τη παραγωγή, τη διατήρηση καθώς και την ανακατασκευή του οστεοειδούς [5].



Εικόνα 10. Οστεοκλάστες στην επιφάνεια οστικής δοκίδας [7].

Εικόνα 11. Αναπαράσταση ανθρώπινου οστεοκλάστη [9].

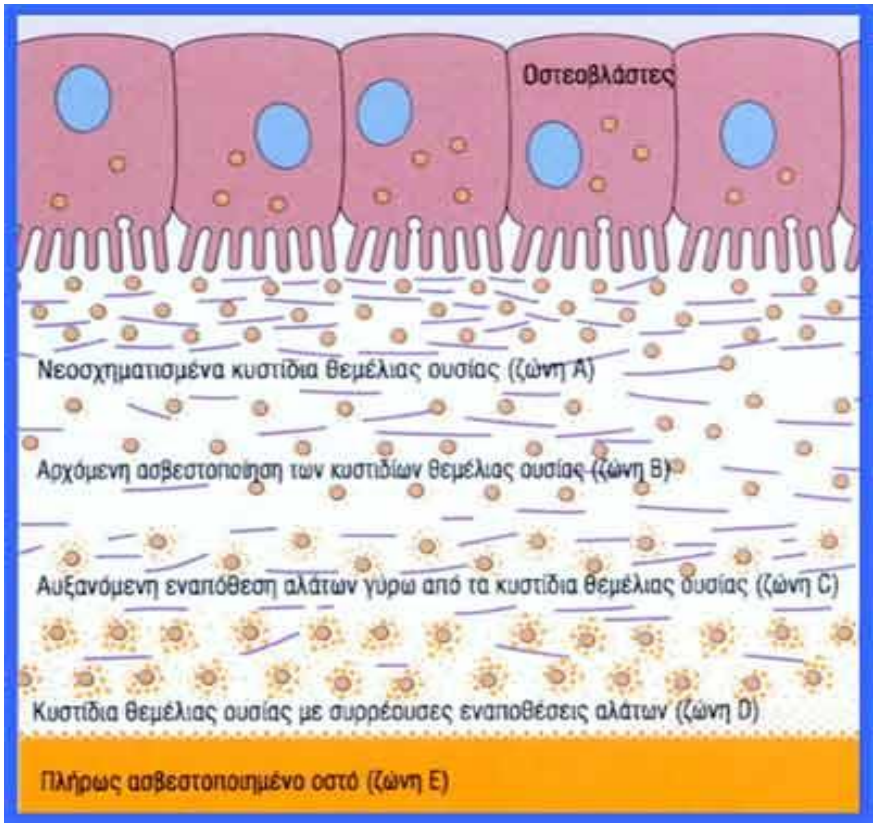
1.4 Ασβεστοποίηση οστεοειδούς

Η ασβεστοποίηση του οστεοειδούς πετυχαίνεται όταν οι οστεοβλάστες παράγουν κυστίδια θεμέλιας ουσίας τα οποία περιέχουν Ca, PO_4, ένζυμα, φωσφορυλάση και αλκαλική φωσφατάση, που δημιουργούν τους πυρήνες εναπόθεσης υδροξυαπατίτη [6].

Τα ανόργανα άλατα υδροξυαπατίτη στο οστεοειδές προσφέρουν σκληρότητα και ακαμψία στο οστό. Η τοπική συγκέντρωση σε Ca^{2+} και PO_{4-} αποτελεί αποτέλεσμα πολλών παραγόντων.

- Η αλκαλική φωσφατάση η οποία είναι άφθονη στους οστεοβλάστες, αυξάνει τη τοπική συγκέντρωση σε Ca^{2+} και PO_{4-}.
- Τα κυστίδια της θεμέλιας ουσίας μπορούν και συσσωρεύουν Ca^{2+} και PO_{4-} τα οποία είναι πλούσια σε αλκαλική φωσφατάση.
- Η οστεοκαλσίνη δεσμεύει τα εξωκυττάρια Ca^{2+} με αποτελέσμα την αύξηση της τοπικής συγκέντρωσης Ca^{2+}.

Στη περίπτωση όπου οι τοπικές συγκεντρώσεις σε Ca^{2+} και PO_{4-} είναι φυσιολογικές, τότε η εφαλάτωση συμβαίνει λίγο μετά το σχηματισμό του νέου οστεοειδούς [6].



Εικόνα 12. Οι οστεοβλάστες απελευθερώνουν κυστίδια θεμέλιας ουσίας (κίτρινοι κύκλοι) μεταξύ των ινών κολλαγόνου (μωβ γραμμούλες), γύρω από τα οποία εναποτίθενται άλατα υδροξυαπατίτη (κίτρινες τελείες). Οι εστίες ασβεστοποίησης συρρέουν και ενώνονται μεταξύ τους, έτσι στο τέλος η ασβεστοποίηση είναι πλήρης (κίτρινη ζώνη) [8].

1.5 Οστική επιδιόρθωση

Η οστική επιδιόρθωση εμφανίζεται με διάφορους μηχανισμούς σε επίπεδο μικροδομής και μακροδομής. Σε επίπεδο μικροδομής, η διαδικασία της αναδιαμόρφωσης είναι υπεύθυνη για τη συνεχή επιδιόρθωση μικροβλαβών. Η επιδιόρθωση μικρορωγμών είναι φυσιολογική και απαραίτητη διαδικασία στο σκελετό ενηλίκων. Εάν ο παραπάνω μηχανισμός σταματήσει, για παράδειγμα, με την εισαγωγή κάποιου φαρμακευτικού παράγοντα, οι μικρορωγμές μπορεί να συσσωρευτούν και στο τέλος να υπάρξει στο οστό θραύση λόγω κόπωσης.

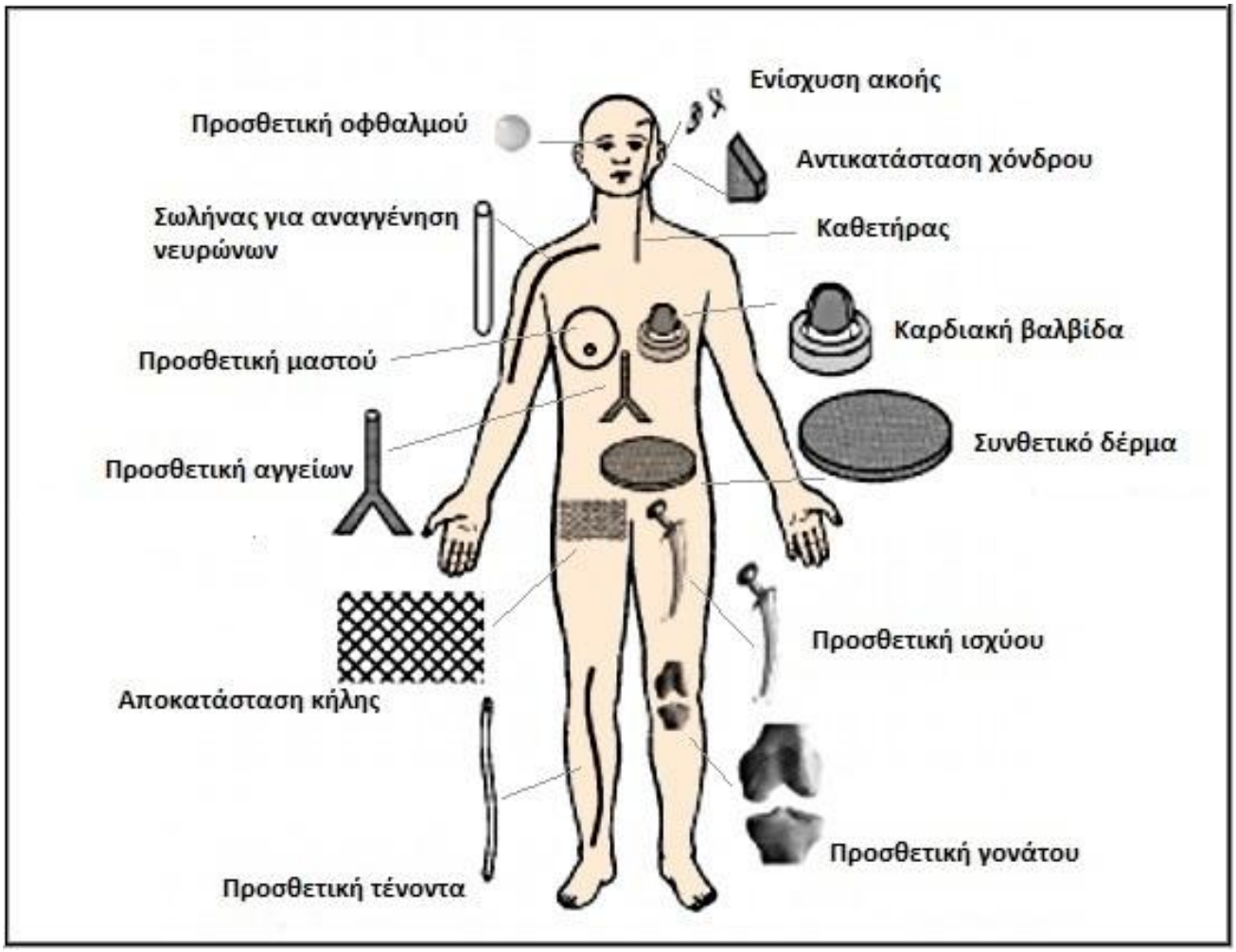
Η θραύση σε μακροσκοπικό επίπεδο είναι το αποτέλεσμα μη ομαλής ή παρατεταμένης φόρτισης, ή και των δύο. Η διαδικασία της επιδιόρθωσης ξεκινά με τη ροή αίματος στη θραυσμένη περιοχή που κανονικά πήζει για να σχηματίσει το αιμάτωμα. Το θραύσμα

διαρρηγνύει το περιόστεο βοηθώντας έτσι στο γρήγορο σχηματισμό κάλου. Έτσι παρέχει προσωρινή αντοχή και υποστήριξη για το θραυσμένο οστό. Η εναλάτωση του τελικού κάλου διαρκεί περίπου έξι εβδομάδες σε έναν ενήλικο άνθρωπο. Ύστερα επαδιαμορφώνται διαδοχικά για να παραγάγει πεταλοειδή οστό. Η τελική δομή του οστού στη θραυσμένη περιοχή εξαρτάται από το προσανατολισμό του σπασμένου οστού και τη φόρτιση που ασκήθηκε στη διαδικασία της επούλωσης.

2. ΒΙΟΫΛΙΚΑ

2.1 Ορισμός Βιοϋλικών

Ως βιοϋλικό ορίζεται οποιοδήποτε φυσικό ή τεχνητό υλικό το οποίο μπορεί να χρησιμοποιηθεί για τη κατασκευή τεχνητού οργάνου (τεχνητή καρδιά) καθώς και για τη δημιουργία εμφυτεύματος με σκοπό την αντικατάσταση ενός ή περισσότερων ιστών (δέρμα, οστό) του σώματος (εμφύτευμα για ολική αντικατάσταση γονάτου και ισχύου)[11]. Τα βιοϋλικά ξεχωρίζουν λόγω της ικανότητας τους να βρίσκονται σε άμεση ή έμμεση επαφή με τα όργανα και τους ιστούς με σκοπό τη βελτίωση, την επιδιόρθωση ή την αντικάτάσταση κάποιας συγκεκριμένης βλάβης του ανθρώπινου σώματος[12].



Εικόνα 13. Μερικές από τις εφαρμογές των βιοϋλικών στο ανθρώπινο σώμα

2.2 Ιδιότητες Βιοϋλικών

Προφανώς για να θεωρηθεί ένα υλικό βιοϋλικό, θα πρέπει να έχει κάποιες συγκεκριμένες ιδιότητες[13]. Η σημαντικότερη ιδιότητα ενός βιοϋλικού αποτελεί η βιοσυμβατότητά του, δηλαδή η μη πρόκληση ανεπιθύμητων αντιδράσεων όταν τοποθετηθεί σε λειτουργία. Φυσικά, οι καλές μηχανικές ιδιότητες, η οστεοενσωμάτωση(οστικά βιοϋλικά), και η υψηλή αντίσταση στη διάβρωση είναι εξίσου απαραίτητες [14-15].

2.2.1 Βιοσυμβατότητα

Τα βιοϋλικά αρχικά πρέπει να είναι μη τοξικά και να μην προκαλούν οποιαδήποτε ερεθιστική ή αλλεργική αντίδραση στο ανθρώπινο σώμα. Ο τρόπος αντίδρασης του ανθρώπινου σώματος με το βιοϋλικό μετράει τη βιοσυμβατότητα και αποτελεί τη κύρια παράμετρο επιτυχίας του συγκεκριμένου βιοϋλικού[16-17]. Η βιοσυμβατότητα επηρεάζεται κυρίως από δύο παράγοντες. Πρώτον, η απόκριση του ξενιστή που προκαλείται από το υλικό και δεύτερον, η αποικοδόμιση του υλικού στο περιβάλλον του σώματος (Σχήμα 1). Η βιοσυμβατότητα ενός ορθοπεδικού εμφυτεύματος έχει κατηγοριοποιηθεί σε τρεις κατηγορίες [18], ανάλογα με τα φαινόμενα αντίδρασης των ιστών:

1. Βιοανεκτικά (Biotolerant): όπου εμφανίζεται οστεογένεση από απόσταση (οστική δόμηση με έμμεση επαφή του υλικού).
2. Βιοαδρανή (Bioinert): όπου εμφανίζεται οστεογένεση εξ επαφής (οστική δόμηση σε άμεση επαφή με το υλικό).
3. Βιοενεργά (Bioactive): όπου εμφανίζεται συγκολλητική οστεογένεση (οστική δόμηση με χημική ή βιολογική σύνδεση με το υλικό).

Εικόνα 14. Βιολογικές επιδράσεις του βιοϋλικού

Η έκθεση ενός βιοϋλικού σε ανθρώπινους ιστούς και υγρά, έχει ως αποτέλεσμα τη δημιουργία διάφορων αντιδράσεων μεταξύ ξενιστή και βιοϋλικού και αυτές οι αντιδράσεις υπαγορεύουν την αποδοχή του υλικού στο ανθρώπινο σύστημα [19]. Δύο κυρίαρχα προβλήματα σχετικά με τη βιοσυμβατότητα ενός βιοϋλικού είναι:

1. Η θρόμβωση η οποία ουσιαστικά περιλαμβάνει τη πήξη του αίματος και τη προσκόλληση των αιμοπεταλίων στην επιφάνεια του βιοϋλικού.
2. Η ενθυλάκωση του βιοϋλικού από ινώδη ιστό.

2.2.2 Μηχανικές ιδιότητες

Οι μηχανικές ιδιότητες ενός βιοϋλικού είναι απαραίτητες για να μας βοηθήσουν στο να αποφασίσουμε τι είδος υλικού θα χρησιμοποιήσουμε. Οι πιο σημαντικές μηχανικές ιδιότητες είναι:

1. Η σκληρότητα
2. Η αντοχή σε εφελκυσμό
3. Το μέτρο του Young
4. Η επιμήκυνση

Η θραύση ενός βιοϋλικού-εμφυτεύματος αποτελεί συνέπεια της βιο-μηχανικής μη-συμβατότητάς του. Για το λόγο αυτό, είναι αναμενόμενο πως το υλικό το οποίο θα χρησιμοποιηθεί για να αντικαταστήσει ένα συγκεκριμένο οστό στη περίπτωση χρήσης ορθοπεδικού βιοϋλικού, θα έχει παρόμοιες μηχανικές ιδιότητες με το συγκεκριμένο οστό. Χαρακτηριστικά, το μέτρο Young των οστών κυμαίνεται από 4 έως 30 GPa ανάλογα πάντα με το τύπο του οστού καθώς και με τη κατεύθυνση της μέτρησης [20-21].

2.2.3 Οστεοενσωμάτωση

Η αδυναμία ενσωμάτωσης του εμφυτεύματος με τα γειτονικά οστά καθώς και με γειτονικούς ιστούς λόγω μικροκινήσεων, έχει ως συνέπεια την αποκόλληση του εμφυτεύματος [22]. Η αγαστή οστεοενσωμάτωση του εμφυτεύματος είναι απαραίτητη για να επιτευχθεί η ασφάλεια και η αποδοτικότητα του εμφυτεύματος. Από προηγούμενες μελέτες έχει αποδειχτεί ότι με την αύξηση της τραχύτητας ή με τη χημική επεξεργασία της επιφάνειας του εμφυτεύματος, υπήρξε βελτίωση της οστεοενσωμάτωσης [22-26] .

Εδώ αξίζει να σημειωθεί ότι ακόμα και αν η αρχική οστεοενσωμάτωση του εμφυτεύματος είναι πετυχημένη, είναι πιθανό το οστό να υποχωρήσει ή να απομονωθεί από το εμφύτευμα για διάφορους λόγους, όπως για παράδειγμα,

- Τοξικές αντιδράσεις του εμφυτεύματος [27]
- Πιθανή ζημιά ή τραυματισμός του οστού από το εμφύτευμα (κυρίως μεταλλικό) λόγω υψηλής μηχανικής φόρτισης από τον ασθενή
- Επιβολή μη ομαλών ή μη φυσιολογικών συνθηκών στο οστό, λόγω υψηλής πίεσης υγρών ή λόγω κίνησης ενάντια των εξαρτημάτων του εμφυτεύματος.

2.2.4 Υψηλή αντίσταση στη διάβρωση

Όλα τα μεταλλικά εμφυτεύματα διαβρώνονται ηλεκτροχημικά σε κάποιο βαθμό. Το παραπάνω γεγονός αποτελεί σημαντικό μειονέκτημα για δύο κυρίως λόγους. Πρώτον, η διεργασία της αποικοδόμησης μειώνει τη δομική ενσωμάτωση και δεύτερον, τα προϊόντα της αποικοδόμησης του βιοϋλικού είναι πιθανό να αντιδράσουν δυσχερώς με το ξενιστή. Η αποικοδόμηση των μεταλλικών εμφυτευμάτων έχει ως αποτέλεσμα την ηλεκτροχημική διάλυση και τριβή. Η διεργασία της ηλεκτροχημικής διάβρωσης επηρεάζει ολόκληρη την επιφάνεια του εμφυτεύματος καθώς και άλλες διάφορες τοπικές περιοχές των εξαρτημάτων του εμφυτεύματος.

Η διάβρωση των μεταλλικών εμφυτευμάτων μπορεί να ελεγχθεί και να περιοριστεί με δύο τρόπους. Πρώτον, με τον έλεγχο των θερμοδυναμικών κινητήριων δυνάμεων που προκαλούν διάβρωση (αντιδράσεις οξείδωσης ή αναγωγής) και δεύτερον με τη χρήση φυσικών εμποδίων τα οποία περιορίζουν τη κινητική της διάβρωσης.

Η αντίσταση των μεταλλικών εμφυτευμάτων σε διάβρωση αποτελεί μια πολύ σημαντική παράμετρο επιτυχίας από τη στιγμή που τα παραπάνω εμφυτεύματα θα βρίσκονται σε επαφή με ένα πολύ επιθετικό περιβάλλον όπως για παράδειγμα τα σωματικά υγρά, λόγω της παρουσίας ιόντων χλωρίου και πρωτεϊνών. Κατά τη διεργασία της διάβρωσης, τα μεταλλικά εμφυτεύματα οξειδώνονται στην ιοντική τους μορφή και το διαλελυμένο οξυγόνο ανάγεται προς ιόντα υδροξειλίου.

Το ποσοστό της διάβρωσης ενός μεταλλικού εμφυτεύματος επηρεάζεται σε μεγάλο βαθμό από το σχηματισμό ενος παθητικοποιημένου στρώματος οξειδίου στην επιφάνεια του μετάλλου (τιτάνιο, ανοξείδωτος χάλυβας) [28].

2.3 Κατηγορίες Βιοϋλικών

Τα βιοϋλικά διαχωρίζονται σε τρεις κατηγορίες:

- Μεταλλικά υλικά
- Κεραμικά υλικά
- Πολυμερή υλικά

2.3.1 Μεταλλικά υλικά

Οι λόγοι που επιλέγονται μεταλλικά υλικά ως βιοϋλικά είναι οι πολύ καλές έως και εξαιρετικές, ανάλογα με το μέταλλο που επιλέγεται, ηλεκτρικές θερμικές και μηχανικές ιδιότητες. Οι θερμικές και ηλεκτρικές ιδιότητες απορρέουν από τα αδέσμευτα ελεύθερα ηλεκτρόνια που γρήγορα μπορούν και μεταφέρουν ηλεκτρικό φορτίο και θερμική ενέργεια. Πιο συγκεκριμένα, τα παραπάνω ηλεκτρόνια συγκρατούν τα θετικά μεταλλικά ιόντα. Η παραπάνω δράση οδηγεί στο υψηλό ειδικό βάρος καθώς και στα υψηλά σημεία τήξεως των μετάλλων. Από τη στιγμή που ο μεταλλικός δεσμός δεν έχει κάποια κατεύθυνση, τα μεταλλικά ιόντα μπορούν και μεταβάλλουν τη θέση τους χωρίς να καταστρέφεται η κρυσταλλική δομή. Συνεπώς έτσι το μέταλλο παραμορφώνεται πλαστικά[29].

Περίπου το 85% όλων των μετάλλων έχει μια από τις τρεις παρακάτω κρυσταλλικές δομές:

- Εξαγωνική υψηλής πυκνότητας
- Εδροκεντρωμένη κυβική δομή
- Χωροκεντρωμένη κυβική δομή

Τα μεταλλικά βιοϋλικά βρίσκουν εφαρμογή ως υποστηρικτικά υλικά με σκοπό την επούλωση κατάγματος με τη μορφή οστεοσυνθετικών κοχλιών και πλακών, ως συσκευές συγκράτησης της σπονδυλικής στήλης, ως παθητικά υποκατάστατα σκληρών ιστών (οστά) όπως για παράδειγμα στην ολική αρθροπλαστική γόνατος και ισχίου και ακόμη ως οδοντικά εμφυτεύματα. Παρακάτω παρουσιάζονται διάφορα μέταλλα και κράματα καθώς και η εφαρμογή που έχουν ως βιοϋλικά[29]:

- Κράματα Co-Cr
  1. Τεχνητή καρδιακή βαλβίδα
  2. Οδοντικές προσθέσεις
  3. Ορθοπεδικές πλάκες στερέωσης
  4. Αγγειακά stents

- Ανοξείδωτοι χάλυβες
  1. Οδοντικές προσθέσεις
  2. Ορθοπεδικές πλάκες στερέωσης
  3. Αγγειακά stents

- Τιτάνιο και κράματα Ti
  1. Τεχνητές βαλβίδες καρδιάς
  2. Οδοντικά εμφυτεύματα

3. Εξαρτήματα τεχνητής άρθρωσης
4. Ορθοπεδικές βίδες
5. Αγγειακά stents

- Χρυσός, Πλατίνα — 1. Οδοντικές επικαλύψεις (γέμισμα)

- Κράματα Ag-Sn-Cu — 1. Οδοντικά αμαλγάματα

Εικόνα 15. Χαρακτηριστικό μεταλλικό βιοϋλικό για αντικατάσταση γόνατος

2.3.2 Κεραμικά υλικά

Ως κεραμικά εννοούμε ανόργανα υλικά αποτελούμενα από μη-κατευθυντικό ιοντικό ή ομοιοπολικό δεσμό. Τα κεραμικά υλικά σχηματίζονται σε υψηλές θερμοκρασίες. Τέτοια είναι η αλούμινα, η ζιρκονία, τα φωσφορικά άλατα ασβεστίου, οι βιοδραστικοί ύαλοι και οι κεραμικοί ύαλοι. Τα κεραμικά βιοϋλικά είναι πολύ σκληρά και έχουν μεγαλύτερη αντίσταση σε αποδόμηση από τα μέταλλα. Από την άλλη όμως, είναι πολύ εύθραστα λόγω της φύσης του ιοντικού δεσμού τους. Χρησιμοποιούνται αμιγώς ως ορθοπεδικά ή οδοντικά εμφυτεύματα λόγω της μεγάλης τους χημικής ομοιότητας με τα οστά. Τα περισσότερα κεραμικά βιοϋλικά χρησιμοποιούνται στον ανθρώπινο σκελετό, στις αρθρώσεις, στα οστά και στα δόντια.

Παρακάτω παρουσιάζονται τα πιο ευρέως χρησιμοποιούμενα μαζί με τις εφαρμογές τους ως βιοϋλικά [30]:

- Αλούμινα
  1. Ορθοπεδικά εμφυτεύματα
  2. Οδοντικά εμφυτεύματα
  3. Επικαλύψεις εμφυτευμάτων
- Ζιρκονία
  1. Ορθοπεδικά εμφυτεύματα
  2. Οδοντικά εμφυτεύματα
  3. Επικαλύψεις εμφυτευμάτων
- Φωσφορικά άλατα ασβεστίου
  1. Επικαλύψεις ορθοπεδικών εμφυτευμάτων
  2. Επικαλύψεις οδοντικών εμφυτευμάτων
  3. Υποκατάστατα οστικών μοσχευμάτων
- Βιοδραστικοί ύαλοι
  1. Επικαλύψεις ορθοπεδικών εμφυτευμάτων
  2. Επικαλύψεις οδοντικών εμφυτευμάτων
  3. Υποκατάστατα οστικών μοσχευμάτων
  4. Οστικό τσιμέντο

Εικόνα 16. Χαρακτηριστικό κεραμικό βιοϋλικό για χρήση ως οδοντικό εμφύτευμα

2.3.3 Πολυμερή υλικά

Σε αντίθεση με τις δύο παραπάνω κατηγορίες βιοσυμβατών υλικών, τα πολυμερή είναι οργανικά υλικά που διαθέτουν μακρές αλυσίδες με ένα μεγάλο αριθμό από μικρές επαναλαμβανόμενες μονάδες, τα μονομερή, οι οποίες είναι δεσμευμένες από κατευθυντήριους ομοιοπολικούς δεσμούς. Τα πολυμερή έχουν ευρεία χρήση σε βιοϊατρικές εφαρμογές λόγω της μεγάλης εμβέλειας των φυσικών και χημικών ιδιοτήτων τους. Κατασκευάζονται αρκετά εύκολα σε διάφορα σύνθετα σχήματα και δομές. Όσα προορίζονται για τη κατασκευή εμφυτευμάτων μπορούν να εξαχθούν είτε από φυσικές πηγές όπως για παράδειγμα πρωτεΐνες, είτε από συνθετικές πηγές. Κάποια από τα πιο κρίσιμα ζητήματα που είναι απαραίτητο να λαμβάνονται υπόψη όταν ένα πολυμερές επρόκειτο να χρησιμοποιηθεί ως βιοϋλικό είναι [31]:

- Τα πολυμερή έχουν τη τάση να απορροφούν εύκολα νερό και βιομόρια από το γύρω περιβάλλον και έτσι είναι αρκετά πιθανό να υπάρξει μεταβολή της επιφανειακής χημείας.

- Σε σχέση με τα μεταλλικά και τα κεραμικά υλικά, τα πολυμερή έχουν πολύ χαμηλότερες μηχανικές αντοχές.

Βάση της μοριακής δομής τα πολυμερή διακρίνονται σε τρεις κατηγορίες [31]:

1. **Θερμοσκληρυνόμενα:** Είναι μη γραμμικά πολυμερή με πλευρικές αλυσίδες μεταξύ των οποίων σχηματίζονται δεσμοί, δημιουργώντας μια σταθερή τρισδιάστατη δομή, η οποία όμως έπειτα από θέρμανση και ψύξη, δεν επανακτά την αρχική της ομοιομορφία εξ'αιτίας των διασταυρούμενων ενώσεων που σχηματίζονται. Συνέπως, πρόκειται για άμορφα, σκληρά, στερεά, άτηκτα που δεν επιδέχονται περαιτέρω κατεργασία.
2. **Θερμοπλαστικά:** Είναι πολυμερή με λίγες ή και χωρίς διακλαδώσεις, οι οποίες συγκρατούνται με δυνάμεις Van der Waals και δεσμούς υδρογόνου, με άλλα λόγια ασθενείς δυνάμεις. Αυτό σημαίνει ότι η συγκεκριμένη κατηγορία έχει μικρότερη ισχύ από τα θερμοσκληρυνόμενα. Λόγω της έλλειψης διασταυρούμενων δεσμών, μετά από θέρμανση και ψύξη, τα συγκεκριμένα πολυμερή δεν χάνουν τις αρχικές τους ιδιότητες. Με άλλα λόγια, είναι επαναμορφοποιήσιμα.
3. **Ελαστομερή:** Σε αυτή τη κατηγορία ανήκουν γραμμικά πολυμερή με διακλαδισμένες αλυσίδες. Αυτή η κατηγορία πολυμερών εμφανίζει την ιδιότητα της υπερπλαστικότητας, που σημαίνει ότι κατά τη διάρκεια του εφελκυσμού, επιδέχονται πολύ μεγάλη επιμήκυνση και κατά την αποφόρτιση, ταχύτατη πλήρη επαναφορά.

Βάση της μορφής και των φυσικοχημικών ιδιοτήτων τα πολυμερή διαχωρίζονται και πάλι σε τρεις κατηγορίες [31]:

1. **Βιοδιασπώμενα:** Σε αυτή τη κατηγορία βρίσκονται τα προσωρινά ικριώματα που έχουν εφαρμογή στο χώρο της Ιστικής Μηχανικής καθώς και διάφορες συσκευές αποδέσμευσης φαρμάκων. Τα βιοδιασπώμενα πολυμερή χρησιμοποιούνται σε περιπτώσεις όπου το εμφύτευμα δεν χρειάζεται να αφαιρεθεί με επέμβαση όταν δεν είναι πλέον απαραίτητο. Χαρακτηριστικά παραδείγματα τέτοιων περιπτώσεων είναι τα κατεστραμμένα αγγεία ή όργανα, οι φθορές που έχουν τα οστά μετά από κατάγματα καθώς και διάφορες πληγές στο στάδιο της ανάρρωσης. Οι συσκευές σταθεροποίησης των οστών (βίδες, πλάκες), τα stents (ενδοαγγειακοί διανοίκτες) καθώς και τα ικριώματα που

χρησιμοποιούνται στην ιστική μηχανική είναι μερικά από τα παραδείγματα όπου χρησιμοποιούνται βιοδιασπώμενα πολυμερή.

2. **Υδρογέλες:** Οι υδρογέλες ουσιαστικά είναι διασταυρούμενες πολυμερικές δομές που παράγονται από την αντίδραση ενός ή περισσοτέρων μονομερών ή από τους συνδυαστικούς δεσμούς, πχ ο δεσμός υδρογόνου και οι ισχυρές δυνάμεις Van der Waals μεταξύ των αλυσίδων. Ο σχηματισμός τους γίνεται με τη διόγκωση των διασταυρούμενων δομών σε νερό ή και βιολογικά υγρά τα οποία όμως περιέχουν μεγάλα ποσά νερού. Οι φυσικές ιδιότητές τους τις καθιστούν ικανοποιητικές για μια μεγάλη ποικιλία βιοϊατρικών και φαρμακευτικών εφαρμογών. Οι ιδιότητες που έχουν τις κάνουν ιδιαίτερα βιοσυμβατά υλικά. Μερικές από τις εφαρμογές όπου χρησιμοποιούνται είναι σε φακούς επαφής, ως υλικά τεχνητού τένοντα, σε αρθριτικούς χόνδρους, ως τεχνητό δέρμα, ως υλικά για αντικατάσταση φωνητικών χορδών καθώς και ως υλικά αντικατάστασης προσώπου και σιαγώνα.

3. **Φυσικά πολυμερή:** Τα φυσικά πολυμερή αποτελούν μια πολύ μεγάλη κατηγορία όπου περιλαμβάνονται υλικά όπως για παράδειγμα η κυτταρίνη, το άμυλο και το DNA. Ένα μεγάλο πλεονέκτημα που έχουν τα φυσικά πολυμερή είναι ότι εμφάνίζουν χημική ομοιότητα με τις μακρομοριακές ουσίες τις οποίες το βιολογικό περιβάλλον αναγνωρίζει και σχετίζεται μαζί τους μεταβολικά. Έτσι περιορίζεται το πρόβλημα της τοξικότητας και διέγερσης μιας μολυσματικής ή φλεγμονώδης αντίδρασης, η οποία συχνά μπορεί να προκληθεί από πολλά συνθετικά πολυμερή. Ένα ακόμη πλεονέκτημα που έχουν τα φυσικά πολυμερή είναι η δυνατότητα να αποικοδομούνται με φυσικό μεταβολικό τρόπο από τα φυσικά ένζυμα του οργανισμού. Έτσι μέσω του παραπάνω γεγονότος, το εμφύτευμα θα μπορέσει να μεταβολιστεί μέσω φυσιολογικών μηχανισμών. Τα περισσότερα φυσικά πολυμερή αποτελούν συστατικά της εξωκυττάριας μήτρας συνεκτικών ιστών όπως για παράδειγμα τα αγγεία του αίματος, τα οστά, οι τένοντες και το δέρμα. Οι παραπάνω ιστοί αποτελούν σύνθετα υλικά ενισχυμένα με ίνες, η κύρια λειτουργία των οποίων είναι η συντήρηση του ζωτικού οργάνου καθώς επίσης και του συνόλου του οργανισμού.

Παρακάτω παρουσιάζονται τα πιο ευρέως χρησιμοποιούμενα καθώς και η εφαρμογή τους ως βιοϋλικά [31]:

▪ Πολυμεθακρυλικό μεθύλιο	1. Ενδοφθάλμιοι φακοί
	2. Οστικό τσιμέντα
	3. Οδοντοστοιχίες
▪ Τερεφθαλικό πολυεθυλένιο	1. Αγγειακά μοσχεύματα
▪ Πολυδυμεθυλοσιλοξάνη	1. Πρόσθεση μαστού
▪ Πολυτετραφθωροαιθυλένιο	1. Αγγειακά μοσχεύματα
	2. Προσθετικά προσώπου
▪ Πολυαιθυλένιο	1. Αντικατάσταση ισχίου
▪ Πολυουρεθάνη	1. Προσθετικά προσώπου
	2.Διεπαφή αίματος/συσκευής

Εικόνα 17. Χαρακτηριστικό πολυμερές βιοϋλικό για χρήση ως κρανιακό εμφύτευμα

2.4 Μαθήματα από τη φύση για το σχεδιασμό και την επιλογή βιοϋλικών

2.4.1 Επισκόπηση της φυσική δόμισης των ιστών

Οι μηχανικοί οι οποίοι εργάζονται στο κλάδο της ιστικής μηχανικής καλούνται να σχεδιάσουν και να κατασκευάσουν ιατρικές συσκευές ή συστήματα τα οποία επιδιορθώνουν, παρακολουθούν ή βοηθάνε τη λειτουργία του ανθρώπινου σώματος. Οι προσεγγίσεις οι οποίες μιμούνται ή αντιγράφουν τις τεχνικές της φύσης, γνωστές ως βιομιμητικές, είναι συχνά το κλειδί για μια επιτυχημένη ιατρική συσκευή ή θεραπεία. Η αλήθεια είναι πως υπάρχει τρομερή πολυπλοκότητα στο κομμάτι της γέννεσης ενός φυσικού ιστού ή οργάνου. Ακόμη, η ακριβής λειτουργία κάθε είδους ιστού ή οργάνου δεν είναι εντελώς γνωστή. Για τους παραπάνω λόγους, είναι πολύ δύσκολη η θεωρητική σχεδίαση ιατρικών συσκευών. Ο τομέας αυτός βέβαια, έχει προχωρήσει αρκετά με τη χρήση της μεθόδου δοκιμή-σφάλμα.

Από τη μελέτη της δομικής βιολογίας, αρκετές γενικές θεωρίες έχουν προκύψει οι οποίες παρέχουν διάφορες στρατηγικές σχεδίασης στο κομμάτι της ιστικής αναγέννησης:

- Τα κύτταρα είναι προγραμματισμένα από το γενετικό τους κώδικα να ‘χτίζουν’ ιστούς και όργανα στο ανθρώπινο σώμα.

- Τα κύτραρα παράγουν πρωτεΐνες, πολυσακχαρίτες, γλυκοπρωτεΐνες και λιπίδια τα οποία συναθροίζονται σε σύνθετες εξωκυττάριες μήτρες η οποίες έχουν πολλαπλές δομές και ο ρόλος τους είναι να υποστηρίζουν την κυτταρική ανάπτυξη.
- Τα κύτταρα επικοινωνούν μέσω των διαφόρων αυξητικών παραγόντων.
- Τα αιμοφόρα αγγεία διετελούν σημαντικό παράγοντα στην ανάπτυξη των ιστών παρέχοντας διάφορα θρεπτικά συστατικά, λαμβάνοντας τις διάφορες ακαθαρσίες και προμηθεύοντας επιπρόσθετα κύτταρα για την υποστήριξη μεγαλύτερης ιστικής ανάπτυξης.
- Το νευρικό σύστημα είναι υπεύθυνο για τον έλεγχο όλων των λειτουργιών του ανθρώπινου σώματος.

Συνεπώς, ο σχεδιασμός των φυσικών ιστών ακολουθεί μια ιεραρχική δομή. Τα βιομιμητικά αυτά πρότυπα που έχουν προκύψει από τη μελέτη της βασικής δομικής και εξελεγκτικής βιολογίας παρέχουν λογικές κατευθυντήριες γραμμές για τη σχεδίαση και υλοποίηση βιοϋλικών.

2.4.2 Τα κύτταρα χτίζουν ιστό

Στο ανθρώπινο σώμα υπάρχουν παραπάνω από 200 διαφορετικά είδη κυττάρων και κατά προσέγγιση περίπου 100 τρισεκατομμύρια κύτταρα ανά άτομο. Πιο συγκεκριμένα, όπως έχει αναφερθεί μερικώς και προηγουμένως, ο οστίτης ιστός έχει από μόνος του παραπάνω από δέκα διαφορετικά είδη κυττάρων:

- Οστεοβλάστες οι οποίοι παράγουν οστό
- Οστεοκλάστες οι οποίοι διασπούν οστό
- Οστεοκύτταρα τα οποία διατηρούν το υπάρχον οστό
- Κύτταρα στα αιμοφόρα αγγεία τα οποία διατρέχουν το οστό [ερυθροκύτταρα και ανοσοκύτταρα (λεμφοκύτταρα, μονοκύτταρα, μακροφάγα, ουδετερόφιλα, ηωσινόφιλα)]
- Λιπαρά κύτταρα καθώς και μεσενγχυματικά βλαστοκύτταρα τα οποία δεν είναι διαφοροποιημένα σε κάποιο συγκεκριμένο είδος κυττάρου, και βρίσκονται στο μυελό των οστών.

Η ύπαρξη κυτταρικού πληθυσμού που έχει τη δυναμική να διαφοροποιηθεί σε ένα συγκεκριμένο τύπο ιστικών κυττάρων, αποτελεί τη κύρια σχεδιαστική στρατηγική που ακολουθεί το σώμα μας όταν επιδιορθώνει ένα συγκεκριμένο ιστό. Ακόμη και οι ενήλικες διατηρούν μια μικρή δυναμική στο να παράγουν νέο ιστό μέσω των βλαστοκυττάρων.

Τα βλαστοκύτταρα διαφοροποιούνται σε συγκεκριμένα είδη κυττάρων σε απόκριση με την επαφή τους με γειτονικά κύτταρα καθώς και το φυσικό και χημικό τους περιβάλλον, και από μηχανικές δυνάμεις οι οποίες μεταδίδονται από τη μήτρα υποστήριξής τους.

Τα κύτταρα, όχι μόνο κατασκευάζουν τα συστατικά των ιστών, αλλά επίσης διατηρούν τον ιστό και προσαρμόζουν τον ιστό σε μεταβαλλόμενα περιβάλλοντα. Τα κύρια στοιχεία στη συνέλευση των ιστών είναι:

- *Σηματοδότηση κυττάρου-κυττάρου:* Οι διάφορες κυτταρικές αλληλεπιδράσεις ελέγχονται από πολύπλοκες μοριακές επικοινωνίες μεταξύ των κυττάρων. Μοριακοί κυτταρικοί σηματοδότες είναι κυρίως πρωτεΐνες, γνωστές επίσης ως κυτοκίνες και χημειοκύνες. Οι κυτοκίνες προκαλούν κυτταρικό πολλαπλασιασμό και διαφοροποίηση. Η χημειοκύνες άγουν τη κυτταρική μετανάστευση. Τα κύτταρα προσδένονται μεταξύ τους με διάφορους τύπους πρόσδεσης. Αυτές οι διακυτταρικές συνδέσεις παρέχουν επιπρόσθετη μηχανική αντοχή στον ιστό και παρέχουν ημιδιαπερατά στρωματικά όρια τα οποία ρυθμίζουν τη μεταφορά κυττάρων, υγρών, ιόντων και πρωτεϊνών.
- *Απόπτωση:* Ως κομμάτι της συντονισμένης λειτουργίας για την ανάπτυξη ενός συγεκριμένου ιστού καθώς και για τη μορφογένεση, συγκεκριμένα κύτταρα είναι προγραμματισμένα να πεθάνουν σε μια διαδικασία γνωστή ως απόπτωση. Αξίζει εδώ να σημειωθεί ότι αυτή είναι ακόμη μια σχεδιαστική στρατηγική η οποία μπορεί να χρησιμοποιηθεί από το μηχανικό βιοϋλικών: η έναρξη ενός βιολογικού γεγονότος μπορεί να ελεγχθεί και υπάρχει μηχανισμός ο οποίος μπορεί να το σταματήσει.
- *Νέκρωση:* Σε αντίθεση με τη κυτταρική απόπτωση, η νέκρωση είναι μια άλλη μορφή κυτταρικού θανάτου, αυτή τη φορά όμως εξ΄αιτίας κάποιου τραύματος ή κάποιας τοξίνης.
- *Αγγειογένεση:* Τα κύτταρα δεν μπορούν να επιβιώσουν χωρίς να προμηθευτούν οξυγόνο και θρεπτικά συστατικά και χωρίς να αποβάλλουν τα διάφορα απόβλητα προϊόντα. Τα αιμοφόρα αγγεία παρέχουν τις παραπάνω λειτουργίες. Ο σχηματισμός ενός καινούργιου αιμοφόρου αγγείου πρέπει να λάβει χώρα

γρήγορα, κατα την ανάπτυξη του ιστού, διαφορετικά ο νέος σχηματισμένος ιστός θα πεθάνει. Αγγειογενετικοί παράγοντες απελευθερώνονται από τους γειτονικούς μακροφάγους, τα αιμοπετάλια ή την εξωκυττάρια μήτρα.

- *Νευρογένεση:* Το νευρικό σύστημα αποτελείται από συγκεκριμένα νευρικά κύτταρα τους νευρώνες, οι οποίοι άγουν ηλεκτρικό ερέθισμα (σήμα). Τα νευρογλοιακά κύτταρα προστατεύουν, υποστηρίζουν και καλλιεργούν τους νευρώνες ενώ τα κύτταρα Schwann παράγουν το λιπαρό μονωτικό υλικό το οποίο ονομάζεται έλυτρο μυελίνης. Οποιοδήποτε καινούργιο κομμάτι ιστού, για να μπορέσει να λειτουργήσει, θα πρέπει οπωσδήποτε να δημιουργήσει συνδέσεις με το νευρικό σύστημα.

2.4.3 Η εξωκυττάρια μήτρα

Η εξωκυττάρια μήτρα παρέχει φυσική και χημική υποστήριξη στα κύτταρα. Από τη σκοπιά των βιοϋλικών, αποτελεί ένα σύνθετο πολυμερές υλικό. Ουσιαστικά, παρέχει ένα μικροπεριβάλλον στα κύτταρα. Στην επιφάνειά του προσκολλώνται καθώς και μεταναστεύουν τα κύτταρα, προσκολλώνται πρωτεογλυκάνες και γίνεται έλεγχος των διαφόρων σηματοφόρων πρωτεϊνών. Ουσιαστικά, αποτελεί ένα ικρίωμα το οποίο διασυνδέει φυσικά και χημικά τα κύτταρα. Τα κύτταρα προσκολλώνται στην εξωκυττάρια μήτρα μέσω ειδικών επιφανειακών κυτταρικών αισθητήριων νεύρων όπου γίνεται πολλαπλασιασμός, διαφοροποίηση κυττάρων, καθώς και έκφραση πρωτεϊνών. Συνεπώς, το ποσοστό προσκόλλησης των κυττάρων επάνω στην εξωκυττάρια μήτρα αποτελεί μια πολύ σημαντική παράμετρο στο πεδίο της αναγεννησιακής μηχανικής.

Η εξωκυττάρια μήτρα είναι κατασκευασμένη από μια αυθόρμητη αναδίπλωση πρωτεϊνών που παράγονται από κύτταρα, τυπικά, διάφορες κολλαγονούχες πρωτεΐνες και μακρές γλυκοπρωτεΐνες. Είναι δυναμικό και σταθερά μεταβαλλόμενο από τα κύτταρα. Η αυθόρμητη δίπλωση των πεπτιδίων είναι γνωστή ως αυτο-συναρμολόγηση. Τα μοριακό κολλαγόνο αυτο-συναρμολογείται από τρία a-chains σε μια τριπλή έλικα. Μέσα σε αυτή τη τριπλή έλικα, η γλυκίνη θα πρέπει να υπάρχει ως τρίτο αμινοξύ και η προλίνη καθώς και η υδροξυπρολίνη καλούνται να σχηματίσουν και να σταθεροποιούν την τριπλή έλικα. Τα μόρια κολλαγόνου ύστερα αυτοσυναρμολογούνται, λίγα μόρια τη φορά, κατά ένα τέταρτο επικαλλυμένα , έτσι ώστε να σχηματίζεται μια κλιμακωτή γραμμική συστοιχία. Η γραμμικές συστοιχίες ύστερα συναθροίζονται σε γραμμικά συσσωματώματα. Ολόκληρες ζώνες

παραμένον κενές ύστερα μεταξύ των τερματικών ομάδων των κολλαγονούχων μορίων. Σε αυτά τα κενά, στο οστικό ECM, τοποθετούνται οι κρύσταλλοι του υδροξυαπατίτη.

2.5 Αλληλεπιδράσεις ιστού-βιοϋλικού

2.5.1 Αλληλεπιδράσεις με αίμα και πρωτεΐνες

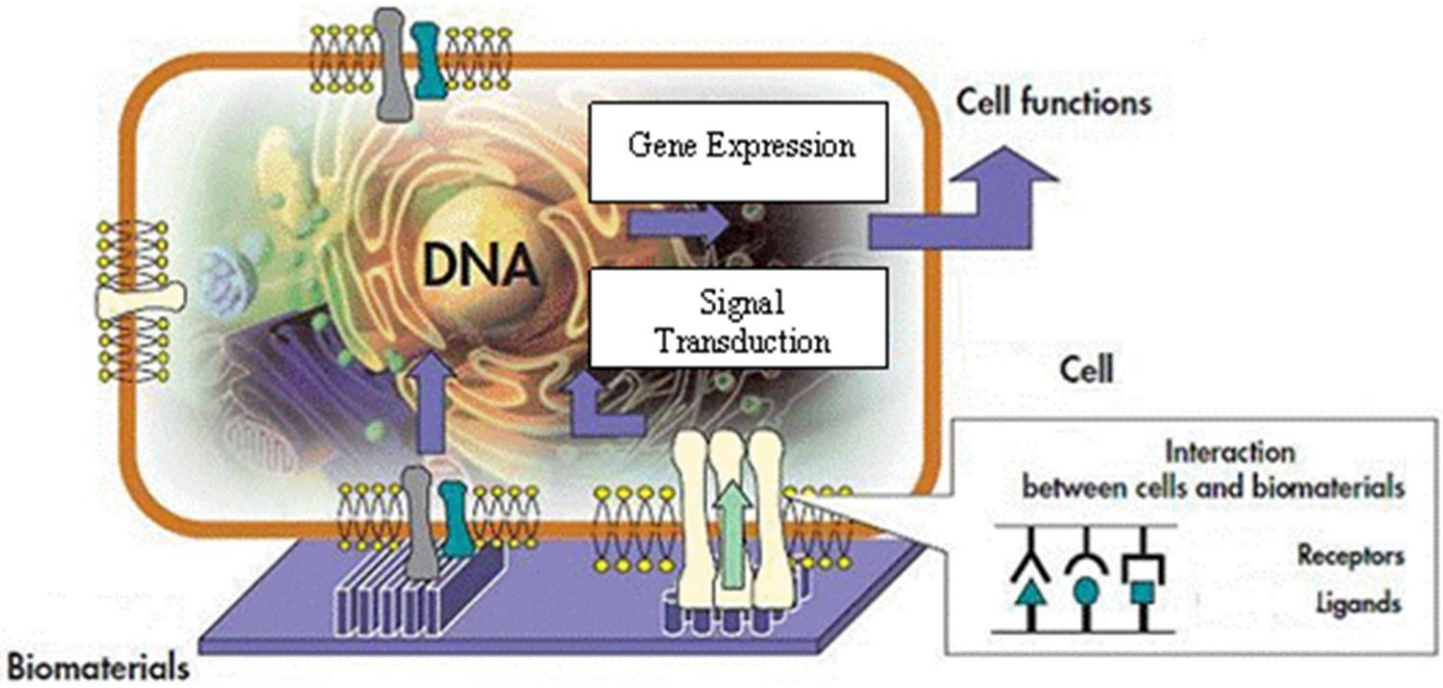
Η εμφύτευση ενός βιοϋλικού συχνά δημιουργεί τραύματα και ύστερα οι πληγές αυτές προκαλούν αιμοραγγία. Άρα το αίμα κάνει τη πρώτη επαφή με το εμφυτευμένο βιοϋλικό.Το αίμα, αποτελεί μια μίξη από νερό, διάφορα είδη κυττάρων, κομμάτια κυττάρων, άλατα και πρωτεΐνες. Οι πρωτεΐνες είναι η κύρια ομάδα μορίων, υπεύθυνες και απαραίτητες για τη ζωή. Επιτελούν αμέτρητες λειτουργίες στο ανθρώπινο σώμα. Μεταβολή στη ποσότητα των πρωτεϊνών μπορεί να οδηγήσει σε μεταβολή των λειτουργιών του ανθρώπινου σώματος και αυτό μπορεί να έχει αποτέλεσμα διάφορες νόσους.

2.6 Ιστική ανάπλαση με τη χρήση βιο-εμπνευσμένων βιοϋλικών

2.6.1 Τροποποίηση επιφανειακής χημείας

Η επιτυχής αλληλεπίδραση των κυττάρων και του ιστού με την επιφάνεια του βιοϋλικού είναι πολύ σημαντική για τη δημιουργία νέου ιστού και για μια υγιή ενσωμάτωση με τη γύρω εξωκυττάρια μήτρα. Όταν η επιφάνεια ενός βιοϋλικού έρχεται σε επαφή με τον ανθρώπινο οργανισμό, πολλές διαφορετικές σε μοριακό επίπεδο χημικές αντιδράσεις λαμβάνουν χώρα. Παραδείγματος χάρην, στην επιφάνεια ενός μεταλλικού εμφυτεύματος, διάφορα ιόντα μετάλλων και οξειδίων διαχέονται από την επιφάνεια του εμφυτεύματος, ενώ από την άλλη διάφορα βιολογικά ιόντα (Ca, P, Na, Cl) ενσωματώνονται.

Μια βιομιμητική προσέγγιση για τον έλεγχο αντίδρασης επιφάνειας-κυττάρου είναι η προαπορρόφηση πρωτεϊνών στην επιφάνεια του εμφυτεύματος οι οποίες μιμούνται εκείνες που λαμβάνουν χώρα όταν γίνεται η προσκόλληση κυττάρων. Η προσθήκη άλλων βιολογικών μορίων όπως για παράδειγμα αυξητικών παραγόντων στην επιφάνεια του εμφυτεύματος μπορεί επίσης να ελέγξει την αλληλεπίδραση ιστού-βιοϋλικού και να οδηγήσει σε βελτιωμένη κυτταρική δραστηριότητα και περισσότερη διαφοροποίηση.



Εικόνα 18. Χαρακτηριστικό σχήμα που δείχνει πως αλληλεπιδρά το κύτταρο με την επιφάνεια ενός βιοϋλικού.

2.6.2 Τοπογραφία επιφάνειας

Η επιφανειακή τοπογραφία ενός βιοϋλικού έχει αποδειχτεί ότι παρέχει ειδικά συνθήματα στα κύτταρα τα οποία εξάγουν ένα μεγάλο εύρος κυτταρικών αποκρίσεων, συμπεριλαμβανομένου του ελέγχου της κυτταρικής προσκόλλησης στο υλικό, της μορφολογίας του κυττάρου, της κυτταρικής απόπτωσης καθώς επίσης και την ρύθμιση διαφόρων γονιδίων. Η τροποποίηση της επιφάνειας ενός βιοϋλικού συνεπώς, μπορεί να επηρεάσει σε πολύ μεγάλο βαθμό την ανάπτυξη νέου ιστού.

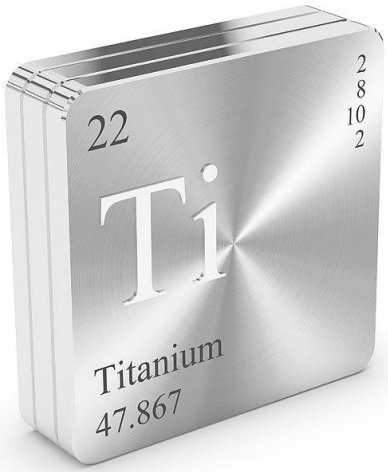
Παλαιότερα, σε βιοϋλικά για αντικατάσταση ισχίου ή γόνατος, η επιφάνεια του βιοϋλικού ήταν αρκετά λεία. Τα αποτελέσματα όμως δεν ήταν και πολύ ενθαρρυντικά. Έτσι πλέον τώρα προσθέτονται στις επιφάνειες των παραπάνω βιοϋλικών επιστρώσεις με κάποιο ποσοστό τραχύτητας, με πόρους έτσι ώστε να επιτευχθεί οστική προσκόλληση και ανάπτυξη επάνω στο βιοϋλικό. Ποσοστό τραχύτητας μπορεί να επιτευχθεί επάνω στο τιτάνιο μέσω λείανσης της επιφάνειας του, ενώ πόροι μπορούν να δημιουργηθούν μέσω επίστρωσης στο μέταλλο (τιτάνιο για παράδειγμα) υδροξυαπατίτη, ο οποίος όχι μόνο είναι απόλυτα βιοσυμβατός, αλλά επίσης έχει τη κατάλληλη διάμετρο πόρων, όπως στο φυσικό οστό. Οι πόροι καθώς επίσης και η τραχεία επιφάνεια φαίνεται να ενθαρρύνουν τα

οστικά κύτταρα (οστεοβλάστες, οστεοκλάστες, μεσενγχυματικά βλαστοκύτταρα) να μεταναστεύουν γύρω και μέσα στην επιφάνεια. Έχει παρατηρηθεί ότι, η άπλωση καθώς επίσης και η ευθυγράμμιση κυττάρων επάνω σε μια τραχεία με πόρους επιφάνεια έχει ως αποτέλεσμα την έναρξη εναπόθεσης οστού. Η παραπάνω εναπόθεση οδηγεί σε μια μηχανική διασύνδεση μεταξύ του οστίτη ιστού και του βιοϋλικού με αποτέλεσμα την αύξηση της αντοχής του δεσμού ιστού-βιοϋλικού.

3. ΤΙΤΑΝΙΟ

3.1 Γενικές πληροφορίες

Το τιτάνιο είναι το 9^{ο} πιο άφθονο στοιχείο και αποτελεί περίπου το 0.6% w/w του στερεού φλοιού της Γης [32]. Έχει ατομικό αριθμό 22 και σχετική ατομική μάζα 47,867. Ο χημικός συμβολισμός του είναι “Ti”, ανήκει στην ομάδα 4 του περιοδικού πίνακα, στη περίοδο 4, στο d-block και στη πρώτη κύρια σειρά των στοιχείων μετάπτωσης, με θερμοκρασία τήξης 1668° C και θερμοκρασία βρασμού 3287° C [33-34].



Εικόνα 19. Τιτάνιο

3.2 Εξαγωγή του Τιτανίου

Το τιτάνιο εξάγεται από δυο πετρώματα, το ρουτίλιο (TiO_2) και τον ιλμενίτη ($FeTiO_3$). Η εξαγωγή γίνεται με επεξεργασία των πετρωμάτων με αέριο χλώριο όπου παράγεται τετραχλωριούχο τιτάνιο (TiCl4) σύμφωνα με τη παρακάτω αντίδραση:

$$TiO_2 + 2Cl_2 + 2C \rightarrow TiCl_4 + 2CO$$

Ύστερα, ακολουθεί η αναγωγή του χλωριούχου τιτανίου με μαγνήσιο(Mg) ή νάτριο(Na) και στη συνέχεια γίνεται απόσταξη σε κενό για την απομάκρυνση μαγνησίου ή νατρίου που δεν έχει αντιδράσει. Πιο συγκεκριμένα:

$TiCl_4 + 2Mg \rightarrow Ti + 2MgCl_2$ (Μέθοδος Kroll)

$TiCl_4 + 2Na \rightarrow TiCl_2 + 2NaCl$ (Μέθοδος Hunter, ICI)

$TiCl_2 + 2Na \rightarrow Ti + 2NaCl$

Οι δύο παραπάνω μέθοδοι παράγουν σπόγγο τιτανίου, ο οποίος δεν μπορεί να τηχθεί και να χυτευθεί με συμβατικές μεθόδους. Για το λόγο αυτό, ο σπόγγος τιτανίου γίνεται ηλεκτρόδιο το οποίο τήκεται με τήξη τόξου σε υδρόψυκτο χωνευτήριο χαλκού σε κενό ή σε αδρανή ατμόσφαιρα. Στη συνέχεια το υγρό τιτάνιο εκχύεται σε καλούπι από γραφίτη, ξανά είτε σε κενό είτε σε αδρανή ατμόσφαιρα. Μέσω της συμπίεσης των διαφόρων κραματικών προσθηκών στο σπόγγο τιτανίου, κατά τη παρασκευή του ηλεκτροδίου, προκύπτουν τα διάφορα κράματα τιτανίου. Για να προκύψει μια ομοιογενής ράβδος μετάλλου ή κράματος, είναι απαραίτητες περισσότερες από μια τήξεις, συνήθως δύο με τρεις[35].

3.3 Ταξινόμηση Κραμάτων Τιτανίου

Το τιτάνιο, όπως και ο σίδηρος, είναι αλλοτροπιό μέταλλο. Με άλλα λόγια, η κρυσταλλική του δομή, μεταβάλλεται με μεταβολές της θερμοκρασίες. Πιο συγκεκριμένα,

Θερμοκρασία (^oC)	Φάση	Κρυσταλ. Δομή
>= 1668	Υγρή	-
1668-883	βTi	BCC
<= 883	αTi	HCP

Ο μετασχηματισμός BCC (χωροκεντρωμένη κυβική δομή) → HCP (εξαγωνική υψηλής πυκνότητας) δεν μπορεί να κατασταλεί με ταχεία απόψυξη. Συνεπώς, η ταχεία απόψυξη του καθαρού τιτανίου οδηγεί σε σχηματισμό της σταθερής φάσης α με μετασχηματισμό χωρίς διάχυση.

Στα κράματα όμως του τιτανίου, μαρτενσιτικός μετασχηματιμός της φάσης β μαρτενσίτη μπορεί να συμβεί. Ακόμη, τυχαία απόψυξη μπορεί απλά να οδηγήσει στη μετατροπή της φάσης β σε μετασταθή β και γιαυτό οι μικροδομές των κραμάτων τιτανίου συχνά περιέχουν τη φάση β στη θερμοκρασία περιβάλλοντος.

Διάφορα κραματικά στοιχεία σταθεροποιούν τη φάση β σε χαμηλές θερμοκρασίες και άλλα τη φάση α σε υψηλές θερμοκρασίες. Όταν κραματικά στοιχεία προστίθενται στο τιτάνιο,

η μετάβαση από τη φάση β στη φάση α, συμβαίνει σε ένα έυρος θερμοκρασιών όπου συνυπάρχουν και οι δυο φάσεις[35].

Τα **κράματα του τιτανίου** διακρίνονται σε τέσσερις κατηγορίες:

1. Εμπορικά **καθαρό τιτάνιο**, με κατά βάρος περιεκτικότητα σε τιτάνιο 99-99.5%.

2. **Κράματα τιτανίου α και σχεδόν α(near a).** Στη θερμοκρασία περιβάλλοντος κυριαρχεί η φάση α, λόγω ικανών περιεκτικοτήτων σταθεροποιητών α, όπως για παράδειγμα Al (κύριο κραματικό στοιχείο) και οξυγόνο (O). Τα κράματα α και σχεδόν α δεν υπόκεινται σε θερμικές κατεργασίες σκλήρυνσης αλλά μόνο σε ανοπτήσεις προς έλεγχο των μηχανικών ιδιοτήτων, όπως αντίσταση σε κόπωση, ερπυσμό, κλπ. Τα σχεδόν α κράματα περιέχουν φάση β σε ποσοστά μικρότερα του 2-3%.

3. **Κράματα τιτανίου α+β.** Τα κράματα αυτά περιέχουν και σταθεροποιητές α και σταθεροποιητές β σε κατάλληλες ποσότητες και αναλογίες, ώστε σε θερμοκρασία περιβάλλοντο (25 βαθμοί Κελσίου), η φάση β να κυμαίνεται από 10 έως 50%. Τα κράματα α+β υπόκεινται σε διάφορους τύπους ανοπτήσεων με σκοπό τον έλεγχο των μηχανικώ ιδιοτήτων μέσω των μικροδομών που προκύπτουν. Ακόμη, η συγκεκριμένη κραματική κατηγορία υπόκειται και σε θερμικές κατεργασίες σκλήρυνσης όπως για παράδειγμα:

    i. Μαρτενσιτική βαφή
    ii. Μαρτενσιτική επαναφορά
    iii. Υπερβαφή/Γήρανση,

    όπου τελικά παραλαμβάνονται φάση α ή φάση β με πολύ μικρά κατακρημνίσματα β ή α αντίστοιχα.

4. **Κράματα τιτανίου β (μετασταθή) και σχεδόν β (near b).** Η συγκεκριμένη κατηγορία περιέχει σταθεροποιητές β και α, σε τέτοια αναλογία, ώστε η μικροδομή όπου επικρατεί η φάση β να παραμένει με την απόψυξη, σε μετασταθή κατάσταση. Το ποσοστό της φάσης α στα σχεδόν β κράματα είναι μικρότερο από 2-3%. Τα κράματα β και σχεδόν β υπόκεινται σε ανοπτήσεις και σε θερμικές κατεργασίες σκλήρυνσης με γήρανση.

3.4 Ο ρόλος των κραματικών στοιχείων

Ο κύριος ρόλος των κραματκών προσθηκών στο τιτάνιο είναι η αύξηση της θερμοκρασίας μετασχηματισμού από τη φάση α στη φάση β, με άλλα λόγια η σταθεροποίηση της εξαγωνικής υψηλής πυκνότητας κρυσταλλικής δομής ή η μείωση της θερμοκρασίας μετασχηματισμού από τη φάση α στη φάση β, με άλλα λόγια η σταθεροποίηση της χωροκεντρωμένης κυβικής κρυσταλλικής δομής[36].

Κραματικό στοιχείο	**Φάση που σταθεροποιεί**	**Επίδραση στις ιδιότητες**
Al	α	• Αύξηση αντοχής • Αύξηση αντίστασης σε ερπυσμό • Al>6%, προώθηση σχηματισμού φάσης α_2, ψαθυρής φάσης • Αρνητική επίδραση στην αντίσταση σε διάβρωση και εργοδιάβρωση
O	α	• Το πιο σημαντικό στοιχείο για μείωση δυσθραυστότητας • Αύξηση μηχανικής αντοχής • Επιδεκτικότητα σε εργοδιάβρωση
Sn	β	• Αύξηση μηχανικής αντοχής σε συνδυασμό με Al • Μείωση δυσθραυστότητας • Καθυστερεί τη ταχύτητα μετασχηματισμού β→α
N	α	• Μείωση δυσθραυστότητας
Zr	β	• Αύξηση αντοχής σε χαμηλέ και μέτριες θερμοκρασίες • Zr>5-6%, μείωση ολκιμότητας και αντίστασης σε ερπυσμό • Καθυστέρηση ταχύτητας μετασχηματισμού β→α
Pd	β	• Αντίσταση σε αναγωγικά οξέα • Αντίσταση σε τοπική διάβρωση • Αντίσταση σε εργοδιάβρωση
Mo	β	• Βραχυπρόθεσμη αύξηση αντοχής σε υψηλές

		θερμοκρασίες • Μακροπρόθεσμα μείωση αντοχής σε υψηλές θερμικρασίες
Ni	β	• Αντίστση σε αναγωγικά οξέα • Αντίστση σε τοπική διάβρωση • Αντίσταση σε εργοδιάβρωση
V	β	• Αντίστση σε αναγωγικά οξέα • Αντίστση σε τοπική διάβρωση • Αντίσταση σε εργοδιάβρωση
Mn	β	• Επιδεκτικότητα σε εργοδιάβρωση
Cr	β	• Επιδεκτικότητα σε εργοδιάβρωση
Fe	β	• Αρνητική επίδραση στην αντίσταση σε ερπυσμό και διάβρωση
Nb	β	• Αύξηση αντίστασης σε οξείδωση υψηλών θερμοκρασιών

Πίνακας 1. Επίδραση κραματικών στοιχείων στις ιδιότητες των κραμάτων τιτανίου.

3.5 Ιδιότητες του τιτανίου

Το μικρό ειδικό βάρος του τιτανίου, 4.5 g/cm^3, το κάνει ένα αρκετά ανταγωνιστικό μέταλλο σε πολλές εφαρμογές, όπως για παράδειγμα στην αεροδιαστημική και την ιατρική.

Η άμεση παθητικοποίηση του τιτανίου κατά την έκθεση στον αέρα, σχηματίζοντας ένα στρώμα οξειδίου στην επιφάνεια του (πάχος <=10 nm), έχει ως αποτέλεσμα την υψηλή αντίσταση στη διάβρωση. Ακόμη, το συγκεκριμένο επιφανειακό στρώμα οξειδίου, όταν υποστεί κάποια ρωγμή επαναπλάθεται ξανά από το αποκαλυπτόμενο μέταλλο το οποίο αντιδρά αμέσως με το οξυγόνο ή την υγρασία (ακόμη και σε ποσότητες ppm). Λόγω της παραπάνω ιδιότητας, το τιτάνιο είναι αρκετά ανθεκτικό σε οργανικά οξέα, σε χλωριούχα άλατα διαφόρων μετάλλων καθώς και σε ανοξείδωτα ανόργανα οξέα, σε ένα ευρύ φάσμα θερμοκρασιών και συστάσεων. Αξίζει όμως να σημειωθεί ότι για θερμοκρασίες άνω των 535° C, το στρώμα οξειδίου καταρρέει.

Η ικανότητα μορφοποίησης του είναι υψηλή, παρά το γεγονός ότι κρυσταλλώνεται στο εξαγωνικό σύστημα υψηλής πυκνότητας, σε χαμηλές θερμοκρασίες. Σε θερμοκρασία περιβάλλοντος μπορεί να υποστεί έλαση εν ψυχρώ με μείωση πάχους έως και 90%.

Ο συντελεστής θερμικής διαστολής είναι χαμηλός, περίπου το 1/2 του ανοξείδωτου χάλυβα και του χαλκού και περίπου το 1/3 του αλουμινίου. Έτσι αποτελεί ένα αρκετά σταθερό υλικό το οποίο δεν ενδέχεται να εμφανίζει θερμικά σοκ.

Ο συντελεστής θερμικής αγωγιμότητας είναι πολύ χαμηλός, περίπου το 1/10 του αλουμινίου. Αυτό έχει ως αποτέλεσμα τη πολύ χαμηλή κατανάλωση ενέργειας του μετάλλου όταν χρησιμοποιηθεί σε κάποια εφαρμογή.

Από την άλλη όμως, το σημαντικότερο μειονεκτημα του τιτανίου είναι ότι σε θερμοκρασίες υψηλότερες από 535° C, διαλύει αμέσως το οξυγόνο, το άζωτο, το υδρογόνο και τον άνθρακα και ψαθυροποιείται.

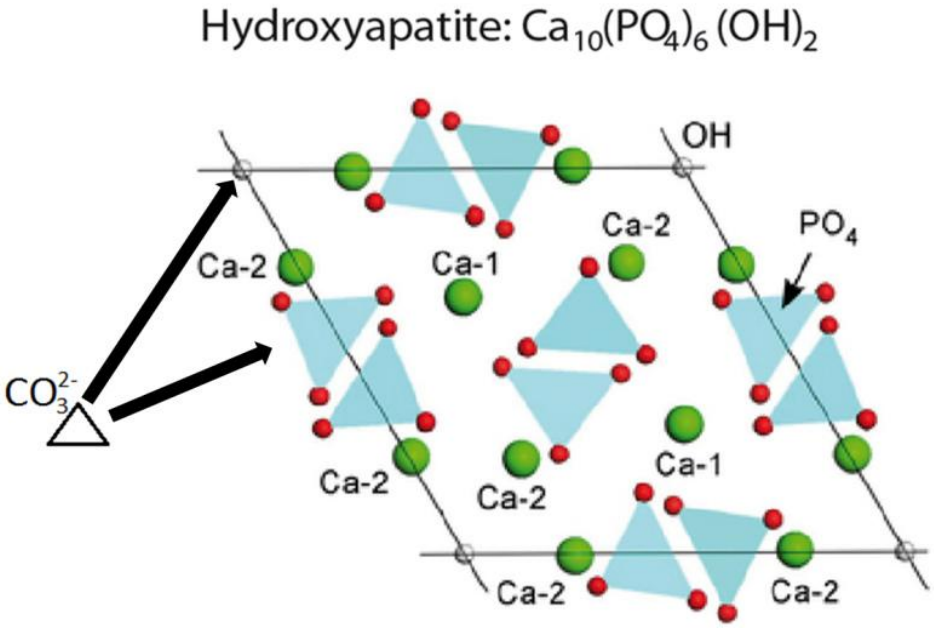
Ακόμη, λόγω της δύσκολης και πολύπλοκης μεταλλουργικής διαδικασίας για τη παραγωγή χυτού τιτανίου, το κόστος του είναι αρκετά υψηλό[35].

4. ΥΔΡΟΞΥΑΠΑΤΙΤΗΣ

4.1 Ορισμός υδροξυαπατίτη

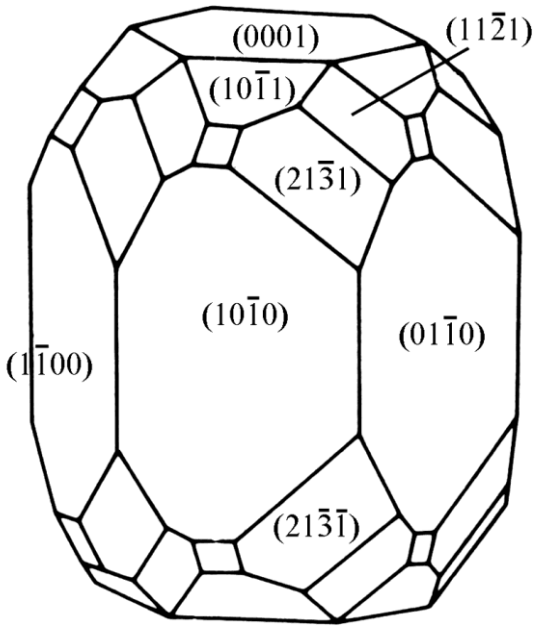
Ο υδροξυαπατίτης (HAp), $Ca_{10}(PO_4)_6(OH)_2$, αποτελεί το σταθερότερο και λιγότερο διαλυτό άλας από τα φωσφορικά άλατα του ασβεστίου. Είναι ένα από τα κύρια συστατικά του ανόργανου τμήματος στους σκληρούς ανθρώπινους ιστούς (δόντια και οστά) και πλέον, ένα από τα πιο χρησιμοποιούμενα βιοϋλικά στο κλάδο της ιστικής μηχανικής. Η αποφυγή της ισόμορφης υποκατάστασης των ιόντων του υδροξυαπατίτη στο πλέγμα του είναι πολύ δύσκολη, για το λόγο αυτό, δεν εντοπίζεται σε βιολογικά συστήματα καθαρός υδροξυαπατίτης. Οι διάφορες υποκαταστάσεις μπορεί να είναι υποκατάσταση ιόντων ασβεστίου (Ca^{2+}) από ιόντα στροντίου (Sr^{2+}), ιόντων νατρίου (Na^{2+}) από ιόντα μαγνησίου (Mg^{+}), 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-}). Τέλος, υπάρχει το ενδεχόμενο να σχηματιστούν πλεγματικά κενά στη θέση των Ca^{2+} και του OH^{-}[37].

Το ασβέστιο στο φυσικό υδροξυαπατίτη είναι σε έλλειμα διότι η μοριακή αναλογία ασβεστίου προς φώσφορο, (Ca/P) είναι 1,5 σε αντίθεση με την αντίστοιχη στοιχειομετρική αναλογία 1,67 όπου επιτυγχάνεται στο συνθετικό υδροξυαπατίτη. Ο βιολογικός υδροξυαπατίτης είναι μια θερμικά ασταθής ένωση και αποσυντίθεται σε θερμοκρασίες από 800-1200° C. Ακόμη, είναι σταθερός σε pH 9-12 και περιέχει 4% κατά βάρος ανθρακικάάλατα[38-39].



Εικόνα 20. Κρυσταλλική δομή του υδροξυαπατίτη

Και ο βιολογικός αλλά και ο συνθετικός υδροξυαπατίτης κρυσταλλώνονται στην εξαγωνικό κρυσταλλικό σύστημα, ανήκουν στην P63/m ομάδα με μοναδιαία κυψελίδα ρομβικού σχήματος και τιμές παραμέτρων a=b=9,432 Å και c=6,881 Å. Στη παρακάτω εικόνα παρατηρείται η εξαγωνική μορφολογία του υδροξυαπατίτη. Όμως, η μορφολογία του υδροξυαπατίτη είναι πολύ πιθανό να διαφέρει από τη παραπάνω είτε σε επιμήκη ραβδοειδή τμήματα παρεμποδίζοντας την ανάπτυξη της διεύθυνσης της έδρας (100) ή σε κρυστάλλους με μορφή δισκίου παρεμποδίζοντας την ανάπτυξη της διεύθυνσης της έδρας (001) [38-39].



Εικόνα 21: Μορφή του εξαγωνικού κρυστάλλου υδροξυαπατίτη

Από πλευρά μηχανική αντοχής ο καθαρός υδροξυαπατίτης αποτελεί ένα σκληρό και εύθραστο κεραμικό υλικό με μέτρο ελαστικότητας 130GPa, τιμή μέγιστης παραμόρφωσης 0,001 και μέγιστη αντοχή 100MPa. Προφανώς όταν και άλλα υλικά συνδυάζονται με το καθαρό υδροξυαπατίτη, οι παραπάνω τιμές μεταβάλλονται (κράματα, βιοπολυμερή).

Οι δυο κυριότεροι λόγοι όπου ο υδροξυαπατίτης χρησιμοποείται αρκετά στην ιστική μηχανική είναι[38-39]:

- Πρώτον, διότι έχει την ικανότητα να απορροφά πρωτεΐνες με μεγάλη αποτελεσματικότητα.
- Δεύτερον, η ευθυγράμμιση των νανο-κρυστάλλων του (10-100 nm) κατά μήκος των ινών κολλαγόνου μέσα στο οστό, δίνοντάς του έτσι τη δυνατότητα για απευθείας σύνδεσή του με το υποκατάστατο του σκληρού ιστού, παρέχοντας με αυτό το τρόπο τέλεια ταύτιση.

4.2 Μηχανισμός κρυστάλλωσης

Για το σχηματισμό του υδροξυαπατίτη, δηλαδή της πιο σταθερής θερμοδυναμικά φάσης των φωσφορικών αλάτων ασβεστίου, πραγματοποιείται μια σειρά από καθιζήσεις, διαλύσεις και επανακαθιζήσεις ενός αριθμού διαφόρων φάσεων μέχρι τη τελική φάση, τον υδροξυαπατίτη. Πιο συγκεκριμένα, όταν το pH βρίσκεται σε υψηλές τιμές, τότε παρατηρείται μια αρχική καθίζηση από άμορφο φωσφορικό ασβέστιο (ACP), ύστερα φωσφορικό οκτασβέστιο(OCP) και τελικός μετασχηματισμός σε υδροξυαπατίτη. Από την άλλη, για χαμηλές τιμές pH, εμφανίζονται φάσεις όπως για παράδειγμα το ένυδρο φωσφορικό διασβέστιο (DCPD).

Η διαδικασία κρυστάλλωσης ξεκινά από τη στιγμή που η συγκέντρωση των ιόντων στο διάλυμα ξεπεράσει τη σταθερά διαλυτότητας του προϊόντος για το συγκεκριμένο κρύσταλλο. Ένα άλλο κομμάτι που πρέπει να συμπεριληφθεί στη διαδικασία της κρυστάλλωσης αφορά τη διαδικασία σχηματισμού πυρήνων. Η συγκεκριμένη διαδικασία χωρίζεται σε δυο διαφορετικές κατηγορίες πυρήνων, τους ομογενείς πυρήνες, που δημιουργούνται αυθόρμητα, καθώς και τους ετερογενείς πυρήνες, οι οποίοι είναι ουσιαστικά ξένες ουσίες ή άλλοι διαφορετικοί κρύσταλλοι. Αναλυτικότερα, η ισορροπία μεταξύ της ελεύθερης ενέργειας που απαιτείται για το σχηματισμό μιας διεπιφάνειας στερεού-υγρού και της ενέργειας των ιόντων του διαλύματος καθορίζει ουσιαστικά τη διαδικασία της κρυστάλλωσης. Σε γενικές γραμμές, η ετερογενής πυρήνωση είναι θερμοδυναμικά πιο εφικτή διότι ήδη υπάρχει μια συγκεκριμένη επιφάνεια πάνω στην οποία είναι δυνατή η κρυσταλλική ανάπτυξη.

Ακόμη, η κρυσταλλική ανάπτυξη εξαρτάται και από τη δομή των αναπτυσσόμενων κρυστάλλων αλλά επίσης και από τη φάση η οποία καθιζάνει. Συνεπώς, εάν υπάρχει μεγάλος αριθμός επιφανειακών ατελειών, όπου η κρυστάλλωση δεν είναι θερμοδυναμικά εφικτή, τότε, η ανάπτυξη θα σταματήσει[40].

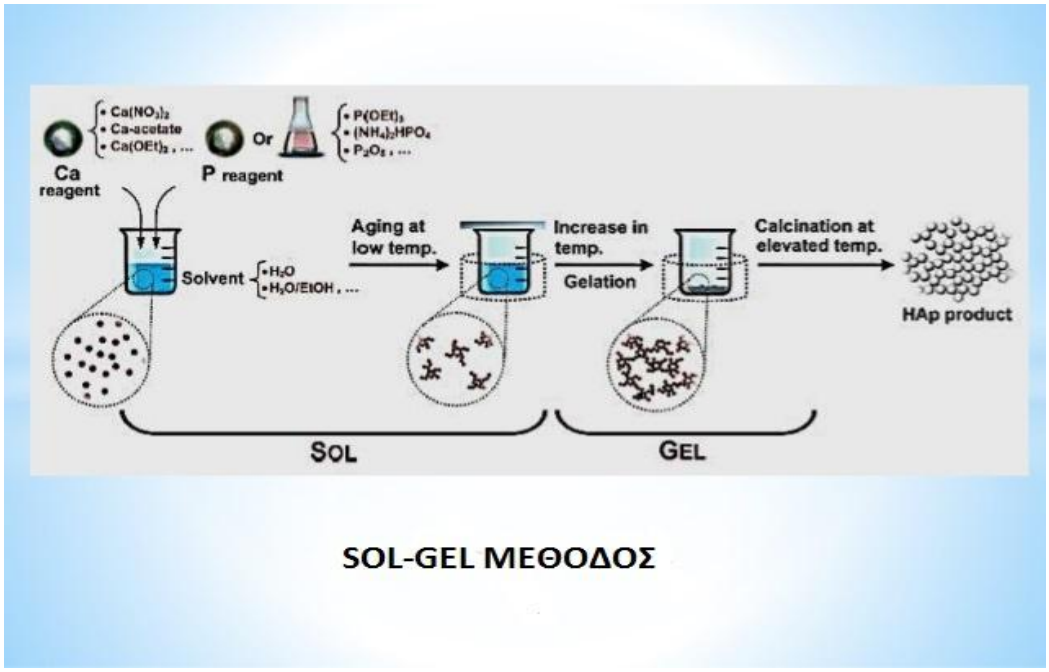
4.3 Τεχνικές παρασκευής υδροξυαπατίτη

Τις δύο τελευταίες δεκαετίες έχουν γίνει σημαντικές ερευνητικές προσπάθειες για τη σύνθεση διάφορων βιοκεραμικών υλικών. Μεγαλύτερη σημασία έχει δωθεί στον υδροξυαπατίτη διότι βρίσκει πολλές εφαρμογές στην ορθοπεδική και στην οδοντιατρική. Διάφορες μέθοδοι χρησιμοποιούνται για τη σύνθεση υδροξυαπατίτη. Οι κυριότερες είναι[40-41]:

- Sol-gel
- Καταβύθιση
- Υδροθερμική μέθοδος
- Ηλεκτραπόθεση
- Βιομιμητικά

4.3.1 Μέθοδος Sol-gel

Με τη μέθοδο sol-gel υπάρχει η δυνατότητα ελέγχου των παραμέτρων της διαδικασίας παραγωγής. Έτσι αποτελεί μια αποτελεσματική μέθοδο για τη σύνθεση νάνο-υδροξυαπατίτη. Σύμφωνα με προηγούμενες έρευνες, δείγματα υδροξυαπατίτη που έχουν παραχθεί με τη παραπάνω μέθοδο έχουν εμφανίσει βελτίωση καθώς και σταθερότητα στη διεπιφάνεια φυσικού-συνθετικού οστού σε in-vitro και in-vivo περιβάλλον[41].



Εικόνα 22. Χαρακτηριστική μέθοδος παραγωγής υδροξυαπατίτη με τη μέθοδο Sol-Gel.

4.3.2 Μέθοδος καταβύθισης

Η μέθοδος της καταβύθισης (χημική εναπόθεση) αποτελεί τη πιο διαδεδομένη μέθοδο για τη παραγωγή υδροξυαπατίτη. Σύμφωνα με τον Bouyer et al, δύο πρώτες ύλες αντιδρούν για τη παραγωγή υδροξυαπατίτη. Η πρώτη είναι το υδροξείδιο του ασβεστίου και η δεύτερη είναι το ορθοφοσφωρικό οξύ. Παραπροϊόν της αντίδρασης είναι μόνο το νερό. Συγκεκριμένα, η αντίδραση είναι η παρακάτω:

$$10Ca(OH)_2 + 6H_3PO_4 \rightarrow Ca10(PO4)_6(OH)_2 + 18H_2O$$

Οι σημαντικότερες παράμετροι για τη μορφή του παραγόμενου υδροξυαπατίτη είναι:

- Ο ρυθμός προσθήκης του οξέως
- Ο ρυθμός προσθήκης της θερμοκρασίας
- Η σωστή αναλογία προσθήκης αντιδραστηρίων
- Περιεχόμενη ποσότητα CO_2 στην ατμόσφαιρα

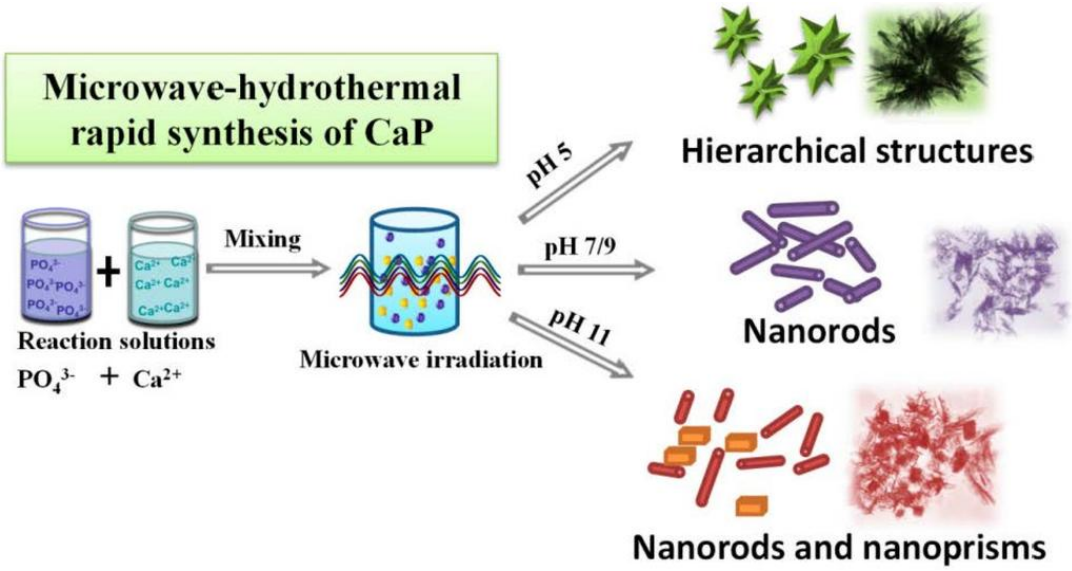
Κύριος στόχος αποτελεί η ομογενής κρυστάλλωση υδροξυαπατίτη σε διάλυμα κατάλληλου pH καθώς και θερμοκρασίας. Για το λόγο αυτό, διάφορα πρόδρομα συστατικά έχουν χρησιμοποιηθεί. Χαρακτηριστικό παράδειγμα αποτελεί η χρήση φωσφορικού αμμωνίου $(NH_4)_2.HPO_4$, και υδροξειδίου του ασβεστίου $Ca(OH)_2$.

Προφανώς, η μορφολογία καθώς και το μέγεθος του τελικού προϊόντος θα διαφέρει ανάλογα με τη διαδικασία παρασκευής[41-42].

Εικόνα 23. Παραγωγή αιωρήματος νάνο-υδροξυαπατίτη με τη μέθοδο της χημικής καταβύθισης (χαρακτηριστική εικόνα από αυτή τη διπλωματική εργασία).

4.3.3 Υδροθερμική μέθοδος

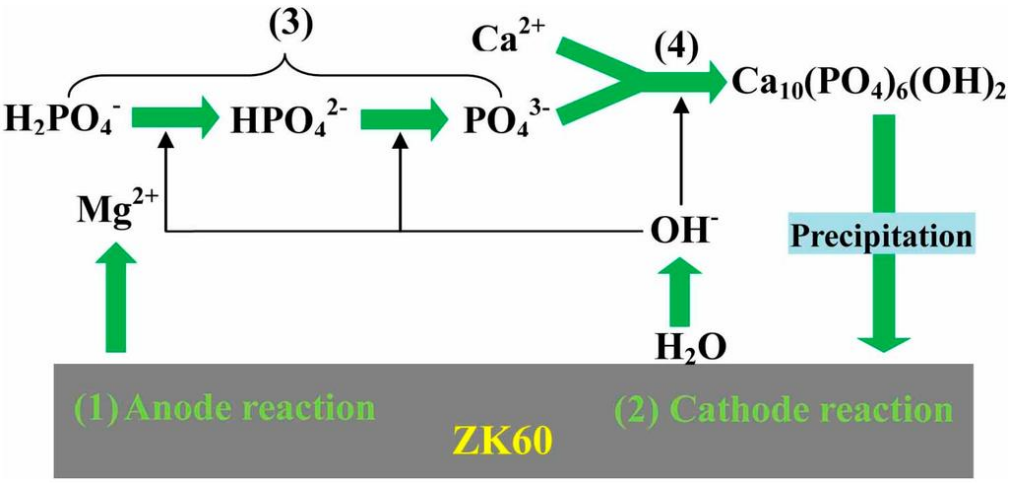
Η υδροθερμική μέθοδος εκμεταλλεύεται απλές αντιδράσεις ή αντιδράσεις ετερογενούς φάσης μέσα σε υδατικό διάλυμα με σχετικά αυξημένη θερμοκρασία ($T>25^{o}$ C) καθώς και πίεση (P>100kPa) με σκοπό την απευθείας κρυστάλλωση κεραμικών υλικών από το διάλυμα. Με τη παραπάνω μέθοδο υπάρχει βελτίωση του λόγου Ca/P είτε αυξάνοντας την υδροθερμική πίεση είτε τη θερμοκρασία[41-43].



Εικόνα 24. Παραπάνω φαίνεται η υδροθερμική μέθοδος με μικροκύματα για τη παραγωγή νάνο-υδροξυαπατίτη.

4.3.4 Μέθοδος ηλεκτροαπόθεσης

Η μέθοδος της ηλεκτροαπόθεσης δίνει τη δυνατότητα να σχηματιστούν υπέρλεπτες, νανοφασικές επικαλύψεις υδροξυαπατίτη επάνω σε μέταλλο (τιτάνιο) ή κεραμικό υλικό (ζιρκονία) με τη χρήση διαλυμάτων ηλεκτρολυτών τα οποία προφανώς περιέχουν τα επιθυμητά ιόντα ασβεστίου και φωσφόρου σε φυσιολογικές τιμές pH. Χαρακτηριστικό παράδειγμα της παραπάνω τεχνικής αποτελεί η χρήση των πρόδρομων αντιδραστηρίων νιτρικού ασβεστίου ($Ca(NO_3)_2$) και φωσφορικού αμμωνίου ($NH_4H_2PO_4$), με προσθήκη νιτρικού νατρίου ($NaNO_3$) στο διάλυμα με σκοπό τη βελτίωση της ιοντικής ισχύος των ηλετρολυτών[43-44].



Εικόνα 25. Χαρακτηριστική μέθοδος παραγωγής υδροξυαπατίτη με τη τεχνική της ηλεκτροαπόθεσης.

4.3.5 Τεχνική βιομιμητικής απόθεσης

Σκοπός της συγκεκριμένης μεθόδου-τεχνικής είναι η αυθόρμητη πυρήνωση και ανάπτυξη νανομεγέθους ανθρακούχου υδροξυαπατίτη ο οποίος 'μιμείται' το φυσιολογικό υδροξυαπατίτη. Η παραπάνω πυρήνωση διευκολύνεται με τη χρήση ενός μετασταθούς συνθετικού σωματικού υγρού (SBF) με συνθετικό οργανικό άλας σύστασης παρεμφερούς με αυτή του ανθρωπίνου οργανισμού.

Η παρασκευή των συνθετικών σωματικών υγρών γίνεται βασιζόμενη στη χημική σύσταση των ανθρώπινων σωματικών υγρών, με συγκεντρώσεις ποικίλων ιόντων, σχεδόν όμοιων με τα ανόργανα συστατικά του πλάσματος του ανθρώπινου αίματος. Αυτά τα μετασταθή συνθετικά σωματικά υγρά ουσιαστικά ενεργοποιούν την ανάπτυξη ανθρακούχου βιομιμητικού υδροξυαπατίτη σε βιοϋλικά που έχουν χρήση και στην οδοντιατρική αλλά και στην ορθοπεδική[43-45].

4.4 Εφαρμογές υδροξυαπατίτη

Ο υδροξυαπατίτης, ανάλογα και με τη μορφή με την οποία σχεδιάζεται και κατασκευάζεται(καθαρός πυκνός υδροξυαπατίτης, επιστρώσεις υδροξυαπατίτη, πορώδης υδροξυαπατίτης, οστικά τσιμέντα φωσφορικού ασβεστίου), βρίσκει διάφορες εφαρμογές στην ορθοπεδική και στην οδοντιατρική[44-45].

4.4.1 Καθαρός πυκνός υδροξυαπατίτης

Για τη παρασκευή καθαρού πυκνού υδροξυαπατίτη με καλές μηχανικές ιδιότητες είναι απαραίτητη η χρήση στοιχειομετρικής σκόνης. Αν η τιμή της μοριακής αναλογίας Ca/P ξεπερνάει το 1,67, τότε στη διαδικασία της πυροσυσσωμάτωσης υπάρχει σχηματισμός οξειδίου του ασβεστίου (CaO), το οποίο επιδρά αρνητικά στην αντοχή και στη συνοχή του υλικού. Με θερμή ισοστατική πίεση είναι δυνατή η μείωση της θερμοκρασίας συμπύκνωσης, του μεγέθους των κόκκων και η επίτευξη υψηλότερων πυκνοτήτων.

Με την αύξηση του λόγου Ca/P, αυξάνεται και η αντοχή του υλικού, με μέγιστη τιμή αντοχής για τιμή του λόγου Ca/P 1,67. Ύστερα η αντοχή αρχίζει και μειώνεται. Η αντοχή του υδροξυαπατίτη μειώνεται εκθετικά με αύξηση του πορώδους του. Ως ένα τυπικό ψαθυρό

κεραμικό, ο πυκνός υδροξυαπατίτης δεν ενδείκνυται για χρήση ως εμφύτευμα όσον αφορά εμφυτεύματα που πρόκειται να φέρουν φορτία[43-45].

4.4.2 Επιστρώσεις υδροξυαπατίτη

Η επίστρωση του υδροξυαπατίτη σε μεταλλικά ορθοπεδικά καθώς και οδοντιατρικά εμφυτεύματα αποτελεί μια αρκετά διαδεδομένη κλινική εφαρμογή στο χώρο της ιστικής μηχανικής. Με αυτό το τρόπο συνδυάζονται οι πολύ καλές μηχανικές ιδιότητες των μετάλλων, με την άριστη βιοσυμβατότητα και βιοενεργότητα του υδροξυαπατίτη. Όταν ένα μεταλλικό εμφύτευμα δεν καλύπτεται εξωτερικά και εισέρχεται στο ανθρώπινο σώμα, όσο βιοσυμβατό και να είναι, είναι αδύνατον να ενοποιηθεί με το οστό διότι κανένα μεταλλικό υλικό δεν είναι βιοενεργό. Αντιθέτως, με το πέρασμα το καιρού το μη επιστρωμένο μεταλλικό εμφύτευμα, σιγά σιγά θα καλυφθεί από ένα πυκνό ινώδη ιστό με σκοπό την απομόνωση του από το υπόλοιπο σώμα. Έτσι όμως, δεν είναι δυνατή η σωστή διανομή τάσεων με αποτέλεσμα τη χαλάρωση του εμφυτεύματος, τη δημιουργία θρόμβων και τελικώς την αποτυχία του.

Όταν όμως το μεταλλικό εμφύτευμα επικαλύπτεται με υδροξυαπατίτη, το τελικό βιοϋλικό βελτιώνεται αισθητά. Αρχικά, δημιουργείται μια σταθερή συνένωση του εμφυτεύματος με το οστό διότι ο υδροξυαπατίτης, όντας βιοενεργό υλικό, προσδένεται με το οστό. Ακόμη, η αποδέσμευση διαφόρων μεταλλικών ιόντων ελαχιστοποιείται, προστατεύοντας με αυτό το τρόπο την επιφάνεια του εμφυτεύματος από το βιολογικό περιβάλλον. Τέλος, η αιμοσυμβατότητα του εμφυτεύματος επίσης βελτιώνεται. Πιο συγκεκριμένα, τα αιμοπετάλια έχουν τη τάση να προσκολλώνται επάνω στο εμφύτευμα. Έτσι, κατά την εναπόθεση αιμοπεταλίων, σχηματίζεται ένα λεπτό στρώμα πρωτεϊνών το οποίο μεταβάλλει και διαφοροποιεί τις επιφανειακές ιδιότητες του εμφυτεύματος. Συνεπώς, χωρίς τον υδροξυαπατίτη, το λεπτό αυτό στρώμα είναι ατελές και αφού έρχεται σε επαφή με το αίμα και τα υγρά του σώματος, αυξάνει το κίνδυνο δημιουργίας θρόμβων[44-46].

4.4.3 Πορώδης υδροξυαπατίτης

Το υλικό υδροξυαπατίτης σε πορώδη μορφή έχει χρησιμοποιηθεί σε ευρεία κλίμακα με τη λογική ότι οι πόροι που διακατέχει επιτρέπουν την επαφή με το οστό και ακόμη παρέχουν μια σταθερή μήτρα για τη προσκόλληση κυττάρων καθώς και οστεογενετικών παραγόντων

Βέβαια, με την αύξηση του πορώδους, οι μηχανικές αντοχές του υλικού μειώνονται σε πολυ μεγάλο βαθμό. Εμφυτεύματα που έχουν πορώδη υδροξυαπατίτη υφίστανται

βιοαποικοδόμιση. Με άλλα λόγια, γίνεται αντικατάσταση του υλικού από το οστό με ρυθμό λίγων εκατοστιαίων μονάδων ετησίως[45-46].

4.4.4 Οστικά τσιμέντα φωσφορικού ασβεστίου

Τα οστικά τσιμέντα φωσφορικού ασβεστίου χρησιμοποιούνται για παραπάνω από 40 χρόνια. Παρ΄όλα αυτά, το ενδιαφέρον για τα συγκεκριμένα βιοϋλικά συνεχίζει να παραμένει μεγάλο.

Οι μηχανικές καθώς και οι ρεολογικές ιδιότητες των παραπάνω οστικών τσιμέντων μπορεί να διαφοροποιηθεί είτε με την επί τοις εκατό περιεκτικότητα των συστατικών ή με τη μεταβολή του μεγέθους των κόκκων της στερεάς φάσης. Εμφανίζουν υψηλή βιοσυμβατότητα και βιοενεργότητα καθώς επίσης και προάγουν την αναγγένηση του οστίτη ιστού. Με το πέρας 6 μηνών και άνω, ενσωματώνονται πλήρως στο σπογγώδη οστίτη ιστό. Μεγάλο μειονέκτημα των οστικών τσιμέντων είναι οι πολυ μικρές μηχανικές αντοχές τους[43-46].

5. Βιοπολυμερή

5.1 Χιτοζάνη

Εικόνα 26. Χαρακτηριστική ποσότητα χιτοζάνης η οποία χρησιμοποιήθηκε στη συγκεκριμένη διπλωματική για τη παραγωγή αιωρήματος υδροξυαπατίτη

5.1.1 Δομή και σύνθεση

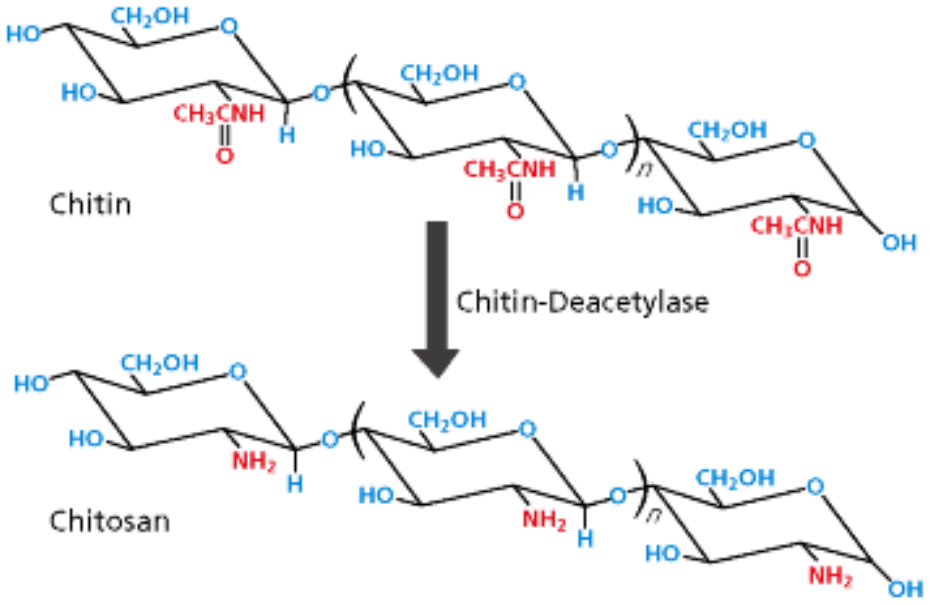
Η χιτοζάνη αποτελεί ένα φυσικό, βιοαποικοδομήσιμο, μη τοξικό, πολυκατιονικό πολυμερές (πολυηλεκτρολύτης). Πιο συγκεκριμένα, το μόριο της είναι ένας γραμμικός ημι-κρυσταλλικός πολυσακχαρίτης ο οποίος αποτελείται από γλυκοζαμίνη και N-ακετυλογλυκοζαμίνη συνδεδεμένες κατά έναν β(1-4) δεσμό, ύστερα από μερική αποακετυλίωση της χιτίνης.

Η χιτοζάνη, καθώς επίσης και η χιτίνη απομονώνονται από φυσικά απόβλητα όπως για παράδειγμα τα κελύφη οστρακοειδών. Ανάλογα με τη μέθοδο παραγωγής της χιτοζάνης, το μοριακό της βάρος μπορεί να εκτείνεται από 300 έως 1000 kDa ενώ το ποσοστό

αποακετυλίωσης από 30% έως 95%. Όταν βρίσκεται στη κρυσταλλική της μορφή, είναι αδιάλυτη σε υδατικά διαλύματα με pH>7. Αντιθέτως όμως, διαλύεται σε οξέα, δηλαδή σε υδατικά διαλύματα με pH<6 διότι οι ελεύθερες αμινικές ομάδες στη γλυκοζαμίνη διαυκολύνουν τη διάλυση του μορίου.

Πολλοι οργανισμοί περιέχουν τη χιτοζάνη, κυριότερα δε τα αρθρόποδα και τα οστρακοειδή, όπου στα οποία αποτελεί και το συστατικό του εξωσκελετού. Ακόμη, η χιτοζάνη εντοπίζεται και στους μύκητες και τις ζύμες, όπου και δομεί το κυτταρικό τους τοίχωμα. Χαρακτηρίζεται από αρκετά καλές και ενδιαφέρουσες ιδιότητες αφού είναι σκληρή και αδιάλυτη ενώ ταυτόχρονα παραμένει άκαμπτη. Στη φύση εμφανίζει αφθονία. Όμως, η έλλειψη ικανοποιητικών τεχνικών καθαρισμού αφού απομονωθεί από τους φυσικούς οργανισμούς αποτελεί ανασταλτικό παράγοντα χρήσης της σε ευρεία κλίμακα.

Η λήψη της χιτοζάνης γίνεται ύστερα από μερική αποακετυλίωση της χιτίνης σε στερεά κατάσταση, υπό αλκαλικές συνθήκες ή με ενζυματική υδρόλυση, παρουσία του ενζύμου χιτινική αποακετυλάση. Η χιτοζάνη που αποκτάται έχει ετερογενή κατανομή ακετυλομάδων κατά μήκος των αλυσίδων εξ΄αιτίας της ημι-κρυσταλλικής μορφολογίας της χιτίνης. Η οικογένεια των χιτοζανών μπορεί να καταταχθεί σε τρεις κατηγορίες. Η πρώτη είναι οι χιτοζάνες που προέρχονται από χιτίνη με αποακετυλίωση κάτω από ετερογενείς συνθήκες, η δεύτερη είναι οι χιτοζάνες που προέρχονται από χιτίνη με αποακετυλίωση κάτω από ομοιογενείες συνθήκες και τέλος η τρίτη είναι χιτοζάνες που προέρχονται από χιτίνη με N-ακετυλίωση κάτω από ομοιογενείς συνθήκες.



Εικόνα 27. Αποακετυλίωση της χιτίνης προς σχηματισμό χιτοζάνης.

5.1.2 Χρήσεις και εφαρμογές της ως βιοϋλικό

Στη βιοϊατρική τεχνολογία η χιτοζάνη επιλέγεται διότι θεωρείται πολύ αποτελεσματική στη θεραπεία εγκαυμάτων. Πιο αναλυτικά, εμφανίζει την ιδιότητα να δημιουργεί ισχυρές, απορροφητικές και εξαιρετικά βιοσυμβατές μεμβράνες με την εφαρμογή απ΄ευθείας στο έγκαυμα.

Άλλες ιδιότητες που καθιστούν τη χιτοζάνη ένα αποτελεσματικό βιοϋλικό είναι διαπερατότητά της από το οξυγόνο. Έτσι, επιτρέπει στο τραυματισμένο ιστό να αναπνέει. Ακόμη, η φυσική αποδόμησή της από διάφορα ένζυμα του οργανισμού έχει ως αποτέλεσμα να μην χρειάζεται να αφαιρεθεί από το τραυματισμένο ιστό μετά το πέρας της θεραπείας.

Ενδεικτικά οι κυριότερες εφαρμογές της χιτοζάνης,ανά κατηγορία, είναι οι εξής:

- Τρόφιμα: Συστατικό διαιτητικών ινών με σκοπό τη μείωση και απομάκρυνση λίπους και χοληστερίνης.

- Ύδρευση: Καθαρισμός υδάτων από βαρέα μέταλλα, για φιλτράρισμα του πόσιμου νερού και μείωση των οσμών.

- Φαρμακευτική: Σε φάρμακα θεραπείας ανοσολογικών και ογκολογικών νόσων, σε βακτηριακές μολύνσεις, αιμοστατικές παθήσεις και προβλήματα πήξης του αίματος.

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

Στη συγκεκριμένη ερευνητική εργασία, ο λόγος όπου χρησιμοποιήθηκε η χιτοζάνη είναι ότι προωθεί την ανάπτυξη πορώδους μήτρας πλούσιας σε εναποτιθέμενα άλατα, χρήσιμα για τη καλλιέργεια οστεοβλαστών. Σκοπός ήταν να αυξηθεί η βιοσυμβατότητα των βιοϋλικών που παρασκευάστηκαν έτσι ώστε να υπάρξει καλλιέργεια και πολλαπλασιασμών οστεοβλαστών που χρησιμοποιήθηκαν στα βιοϋλικά.

5.2 Αμινοξέα- Βασικές Αρχές

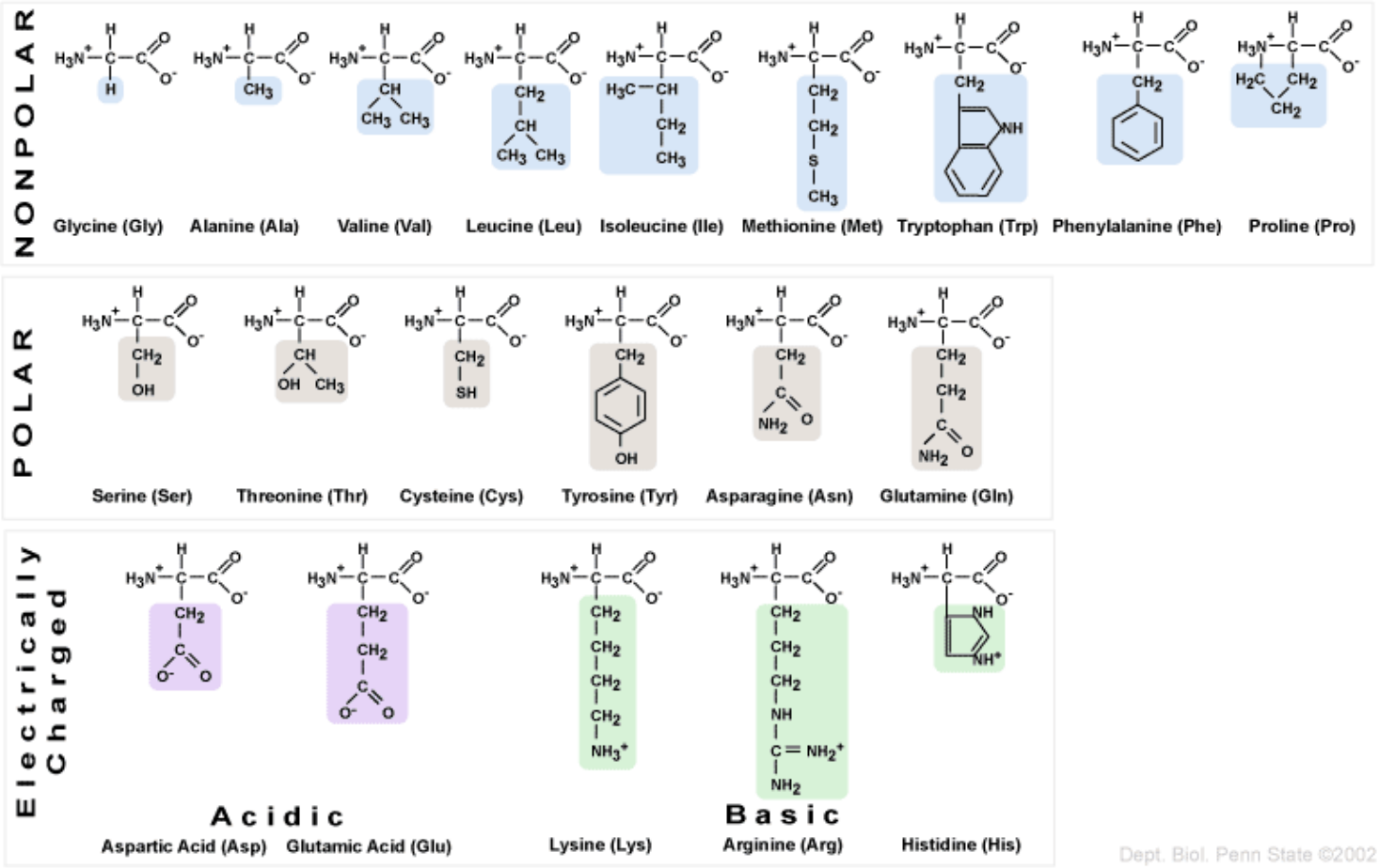
Τα αμινοξέα αποτελούν τα μονομερή δομικά συστατικά των πεπτιδίων, των πρωτεϊνών και των λιπιδίων, ενώ αρκετά από αυτά συμμετέχουν και στις μεταβολικές δραστηριότητες. Περιέχουν τουλάχιστον ένα ενεργό άκρο αμινομάδας ($-NH_2$) και ένα ενεργό άκρο καρβονικού οξέος (-RCOOH). Απ΄όλα τα αμινοξέα που υπάρχουν στη φύση, μόνο είκοσι από αυτά, που περιέχονται στο γενετικό κώδικα, καλούνται πρωτεϊνογενετικά α-αμινοξέα [47].

Στον ανθρώπινο οργανισμό, οκτώ από τα είκοσι πρωτεϊνογενετικά α-αμινοξέα δεν μπορούν να συντεθούν, συνεπώς πρέπει να λαμβάνονται από τη τροφή. Αυτά τα οκτώ θεωρούνται βασικά αμινοξέα. Τέσσερα από τα είκοσι δεν μπορούν να συντεθούν στα παιδιά και θεωρούνται ήμι-απαραίτητα. Τα υπόλοιπα μπορούν και συντίθεται μέσω διάφορων μεταβολικών οδών [48].

Όλα τα αμινοξέα κατηγοριοποιούνται σε τρεις διαφορετικές ομάδες ανάλογα με τη πολικότητα των πολικών τους αλυσίδων (ομάδες R), ξεκινώντας από την ομάδα στην οποία ανήκουν τα αμινοξέα με μη πολικές ομάδες R, την ομάδα με τα αμινοξέα που διαθέτουν μη φορτισμένες πολικές πλευρικές αλυσίδες και την ομάδα με φορτισμένες πλευρικές αλυσίδες[49].

Για τη κατανόηση της βιοχημείας και της λειτουργίας των αμινοξέων, είναι απαραίτητη η γνώση των χημικών τους ιδιοτήτων. Με σκοπό την απλούστευση, τα αμινοξέα μελετώνται ως προς τις ιδιότητές τους ομαδικά σύμφωνα με τη κατάταξή τους. Κάποια αμινοξέα έχουν τη δυνατότητα να λειτουργήσουν σαν οξέα και σαν βάσεις. Αφού διαλυθούν σε νερό, υπάρχουν

στο διάλυμα είτε ως διπολικά ιόντα είτε ως υβριδικά ιόντα. Ένα υβριδικό ιόν έχει τη δυνατότητα να λειτουργήσει είτε σαν οξύ, δηλαδή ως δότης προτωνίων, είτε σαν βάση, δηλαδή ως δέκτης προτωνίων[48].



Εικόνα 28. Τα 20 αμινοξέα

5.2.1 L-Αργινίνη –Δομή και ιδιότητες

Η Αργινίνη αποτελεί ένα αμινοξύ με μοριακό τύπο $C_6H_{14}N_4O_2$ και μοριακή μάζα 174,2 g mol^{-1}. Αποτελείται από μια αλειφατική αλυσίδα τεσσάρων ανθράκων, το τέλος της οποίας καλύπτεται από μια σύνθετη γουανιδινομάδα. Το θετικό της φορτίο είναι απεντοπισμένο λόγω της κλίσης μεταξύ του διπλού δεσμού και των απομονωμένων ζευγών αζώτου. Η γεωμετρία, η διασπορά του φορτίου και η ικανότητα να δημιουργεί δεσμούς υδρογόνου καθιστά την αργινίνη ιδανική περίπτωση για τη σύνδεση αρνητικά φορτισμένων ομάδων[49].

Η L-Αργινίνη αποτελεί ένα σημαντικό αμινοξύ το οποίο συμμετέχει σε πολλές βιοχημικές αντιδράσεις στο ζωντανό οργανισμό. Καταρχήν, συμμετέχει ενεργά στη σύνθεση

των πρωτεϊνών, βοηθάει στην ενεργοποίηση της κυτταρικής ανάπτυξης αφού παράγει μονοξείδιο του αζώτου (ή νιτρικό οξείδιο, NO) και μέσα από το μεταβολισμό της σε ορνιθίνη καθώς και άλλες πολυαμίνες. Αποτελεί ένα ημι-απαραίτητο αμινοξύ, πράμα που σημαίνει ότι οι συμπληρωματικές ποσότητες της L-αργινίνης αντλούνται από τη δίαιτα [50].

Παρόλο που η L-Αργινίνη συντίθεται στον οργανισμό φυσιολογικά σε επαρκείς ποσότητες, η χορήγησή της σε μερικές περιπτώσεις είναι επιβεβλημένη όπως για παράδειγμα:

- Υποσιτισμό σε πρωτεΐνη
- Υπερβολική παραγωγή αμμωνίας
- Υπερβολική λήψη λυσίνης
- Εγκαύματα
- Μολύνσεις
- Σύμφυτες διαταραχές στη σύνθεση της ουρίας

Επιπροσθέτως, η L-αργινίνη είναι απαραίτητη για τη σύνθεση της κρεατίνης και ακόμη μπορεί να χρησιμοποιηθεί για τη σύνθεση πολυαμινών, κιτρουλλίνης και γλουταμινικού οξέος. Το τελικό στάδιο της βιοσύνθεσης της L-Αργινίνης πραγματοποιείται στα σωληνάρια του νεφρού. Είναι ένα πολύ σημαντικό αμινοξύ. Ο ανθρώπινος οργανισμός όπως αναφέρθηκε και παραπάνω το μετατρέπει σε νιτρικό μονοξείδιο. Το νιτρικό μονοξείδιο με τη σειρά του βοηθά τα αιμοφόρα αγγεία στη χαλάρωση και στη διαστολή τους, ώστε να επιτρέπεται μεγαλύτερη ροή αίματος[51]. Η παρουσία της βελτιώνει την ανοσοποιητική λειτουργία του θύμου αδένα καθώς επίσης επιφέρει και τη γρήγορη επούλωση των τραυματισμών (κυρίως στα οστά) και επισπεύδει το χρόνο επιδιόρθωσης κατεστραμμένων ιστών [52]. Η ανεπάρκειά της προκαλεί μυϊκή αδυναμία. Έχει ευρεθεί επιστημονικά πως η παρουσία της αυξάνει τη μυϊκή μάζα και μειώνει το λιπώδη ιστό του σώματος.

5.3 Οξείδιο του πολυαιθυλενίου (PEO)

Το Poly (ethylene oxide) (PEO) ή poly (ethylene glycol) (PEG) αποτελεί ένα συνθετικό, μη ιονικό, γραμμικό πολυμερές το οποίο χρησιμοποιείται σε αρκετά ερευνητικά πειράματα στη σύγχρονη ιστική μηχανική και φαρμακευτική. Για μορικό βάρος M_w<10.000 αναφέρεται ως Poly (ethylene glycol) (PEG), ενώ για μοριακό βάρος M_w>10.000 αναφέρεται ως Poly (ethylene oxide) (PEO).

Η απλότητα του μονομερούς –(CH_2CH_2O)- καθώς και ο αμφίφυλος χαρακτήρας που παρουσιάζει με το νερό και τα διαλύματά του προσφέρουν στο παραπάνω πολυμερές πολλά πλεονεκτήματα για τη χρήση του ως βιοϋλικό. Τα άτομα οξυγόνου αλλάζουν εξ'ολοκλήρου τη φύση των αλληλεπιδράσεων και ως εκ τούτου, τις θερμοδυναμικές ιδιότητες του πολυμερούς όταν αυτό διαλύεται σε κάποιο διαλύτη.

Οι ομάδες CH_2CH_2 των μονομερών εμφανίζουν υδρόφοβο χαρακτήρα και δημιουργούν επάλληλα υδρόφοβα στρώματα από μόρια νερού γύρω από την αντίστοιχη μονάδα 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%.

Η πολυαιθυλενογλυκόλη (PEG) παράγεται από την αλληλεπίδραση του οξειδίου του αιθυλενίου είτε με νερό, είτε με αιθυλενογλυκόλη, είτε με ολιγομερή αιθυλενογλυκόλης. Η αντίδραση παραγωγής του PEG καταλύεται από όξινους ή βασικούς καταλύτες. Η αιθυλενογλυκόλη και τα ολιγομερή της είναι προτιμότερα ως ένα υλικό έναρξης της αντίδρασης παραγωγής του PEG, αντί του νερού, διότι επιτρέπουν τη δημιουργία πολυμερών με χαμηλή πολυδιασπορά (στενή κατανομή μοριακού βάρους). Το μήκος της αλυσίδας του πολυμερούς εξαρτάται από την αναλογία των αντιδρώντων. Ανάλογα με τον τύπο του καταλύτη, ο μηχανισμός του πολυμερισμού μπορεί να είναι κατιονικός ή ανιονικός. Ο ανιονικός μηχανισμός είναι προτιμότερος, επειδή επιτρέπει την παραγωγή PEG με χαμηλή πολυδιασκορπισιμότητα. Ο πολυμερισμός του οξειδίου του αιθυλενίου είναι μία εξώθερμη διαδικασία. Υπερθέρμανση ή μόλυνση του οξειδίου του αιθυλενίου με καταλύτες όπως αλκάλια ή οξείδια μετάλλων μπορεί να οδηγήσει σε ανεξέλεγκτο πολυμερισμό, προκαλώντας μέχρι και έκρηξη του υλικού μετά από μερικές ώρες.

Το οξείδιο του πολυαιθυλενίου (PEO) ή υψηλού μοριακού βάρους πολυαιθυλενογλυκόλη, συντίθεται μέσω διαδικασίας πολυμερισμού αιωρήματος. Κατά τη διάρκεια της διαδικασίας πολυσυμπυκνώσεως για τη σύνθεση του PEO,

είναι απαραίτητη η διατήρηση της αυξανόμενης πολυμερικής αλυσίδας εντός του διαλύματος. Η αντίδραση καταλύεται από ενώσεις μαγνησίου, αργιλίου, ή ασβεστίου με οργανικά στοιχεία. Για να αποφευχθεί η πήξη των πολυμερικών αλυσίδων από το διάλυμα, χρησιμοποιούνται χηλικά πρόσθετα όπως διμεθυλογλυοξίμη.

Στην εμπορική του μορφή το πολυμερές PEO είναι λευκή κρυσταλλική σκόνη με μέσο μέγεθος σωματιδίων 150 mm και τα διαλύματά του εμφανίζουν ελαφρά βασικό pH. Δεν είναι καθόλου τοξικό για τον ανθρώπινο οργανισμό και χρησιμοποιείται στους τομείς της Φαρμακευτικής και της Βιοϊατρικής:

- για την παραγωγή φαρμακευτικών δισκίων
- ως συνδέτης
- ως υλικό επικάλυψης
- ως πυκνωτικός παράγοντας
- ως βιοσυγκολλητικό υλικό για βλεννογόνους αδένες
- για την παραγωγή υδρογελών για βιολογικές εφαρμογές
- σε σύνθετα βιοϋλικά για πλήρωση ή αντικατάσταση οστικών χόνδρων,
- ως συνδέτης ή υλικό μήτρας για την παραγωγή βιοσυμβατών ικριωμάτων για σκληρούς και μαλακούς ιστούς

Ο σημαντικότερος τομέας εφαρμογής του πολυμερούς PEO όμως είναι στην τεχνολογία ελεγχόμενης μεταφοράς φαρμακευτικών ουσιών στον οργανισμό. Η ιδιότητα αυτή βασίζεται στην δυνατότητα και στο ρυθμό αποικοδόμησης του πολυμερούς από τον οργανισμό, συναρτήσει του μοριακού του βάρους. Πολυμερή με μικρότερο σχετικά μοριακό βάρος όπως το PEG αποβάλλονται αρκετά γρήγορα από τον οργανισμό χωρίς να έχουν υποστεί καμία μεταβολή στη δομή τους και χωρίς να επιβαρύνουν καθόλου τη λειτουργία και την υγεία του οργανισμού. Αντίθετα όσο αυξάνεται το μοριακό βάρος του πολυμερούς τόσο αυξάνεται και ο χρόνος αποικοδόμησής του από τον οργανισμό. Το παραπάνω χαρακτηριστικό σε συνδυασμό με το μεγάλο διαθέσιμο εύρος μοριακών βαρών τους, καθιστά τα πολυμερή της δεδομένης οικογένειας κατάλληλα για εφαρμογές θεραπειών με ελεγχόμενη και σταδιακή απελευθέρωση των φαρμακευτικών ουσιών στον πάσχοντα οργανισμό[53-55].

6. ΝΑΝΟΣΩΛΗΝΕΣ ΑΝΘΡΑΚΑ (CARBON NANOTUBES)

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

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

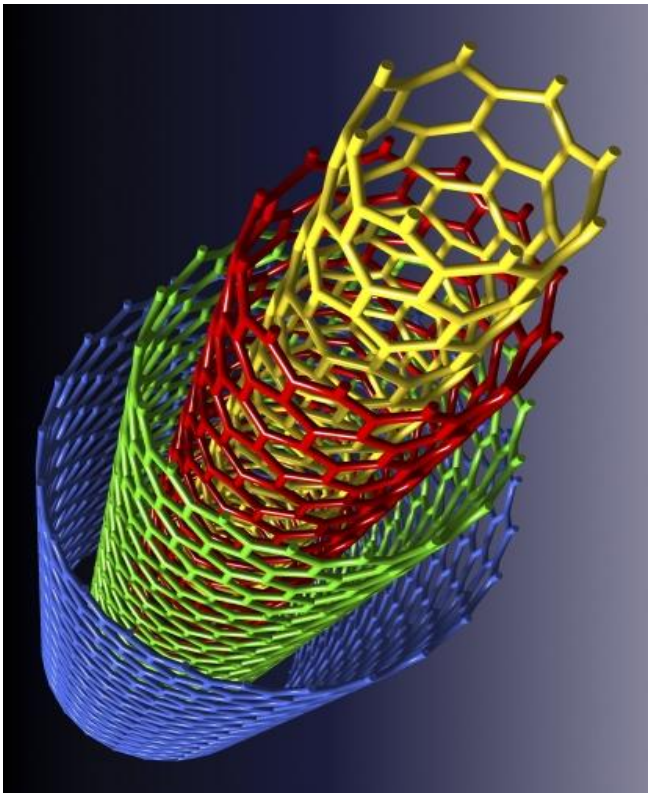
Η μελέτη και εισαγωγή των νανοσωλήνων άνθρακα στους κλάδους της Φαρμακευτικής, της Ιατρικής και της Ιστικής Μηχανικής έχει ξεκινήσει από τις αρχές του 21ου αιώνα. Η πλούσια ηλεκτρονιακή πολυαρωματική δομή τους, τους δίνει την ικανότητα να απορροφούν ή να συνδέονται με θεραπευτικά μόρια, όπως μόρια φαρμάκων,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

Η παραγωγή των νανοσωλήνων γίνεται σήμερα με διάφορες μεθόδους, οι κυριότερες των οποίων είναι με καταλυτική χημική εξάχνωση και εναπόθεση, με εκκένωση τόξου και με εκτομή με λέιζερ. Η τεχνική εκκένωσης τόξου αποτελεί την πιο κοινή μέθοδο σύνθεσης νανοσωλήνων άνθρακα, όμως δεν επιτρέπει εύκολα τον έλεγχο των διαστάσεων και τον αριθμό των στρωμάτων τους. Σε σύγκριση με τις άλλες δύο μεθόδους, η μέθοδος χημικής εναπόθεσης και εξάχνωσης αποτελεί την ευρύτερα χρησιμοποιούμενη τεχνική για την παραγωγή νανοσωλήνων, εξαιτίας του χαμηλού της κόστους, της υψηλής παραγωγικότητας και της ευκολίας αύξησης του όγκου παραγωγής της.

Υπάρχουν δύο κύριοι τύποι νανοσωλήνων:

- οι νανοσωλήνες μονού τοιχώματος (Single-Walled Carbon Nanotubes, SWCNTs), ο οποίοι αποτελούνται από ένα μόνο τυλιγμένο στρώμα γραφενίου
- οι νανοσωλήνες πολλαπλών τοιχωμάτων (Multi-Walled Carbon Nanotubes, MWCNTs), οι οποίοι αποτελούνται από πολλά ομόκεντρα στρώματα γραφενίου με αύξουσες διαμέτρους, με απόσταση μεταξύ των στρωμάτων 0,34 nm.

Στις μεθόδους παραγωγής υψηλής θερμοκρασίας (εκκένωση τόξου και εκτομή με λέιζερ), οι νανοσωλήνες πολλαπλών τοιχωμάτων μπορούν να παραχθούν με την εξάχνωση καθαρού άνθρακα, ενώ για τη σύνθεση μονοστρωματικών νανοσωλήνων απαιτείται η παρουσία μεταλλικού καταλύτη. Στη μέθοδο χημικής εξάχνωσης και εναπόθεσης η παρουσία καταλύτη είναι απαραίτητη για την σύνθεση και των δύο τύπων νανοσωλήνων, καθώς επίσης επιτρέπει και τη σύνθεση νανοϊνών άνθρακα. Για βιοϊατρικές εφαρμογές, όπως για παράδειγμα σε φαρμακευτικά σκευάσματα, βιοσυμβατές υδρογέλες και ικριώματα σκληρών και μαλακών ιστών, χρησιμοποιούνται οι νανοσωλήνες πολλαπλών τοιχωμάτων [56-64].



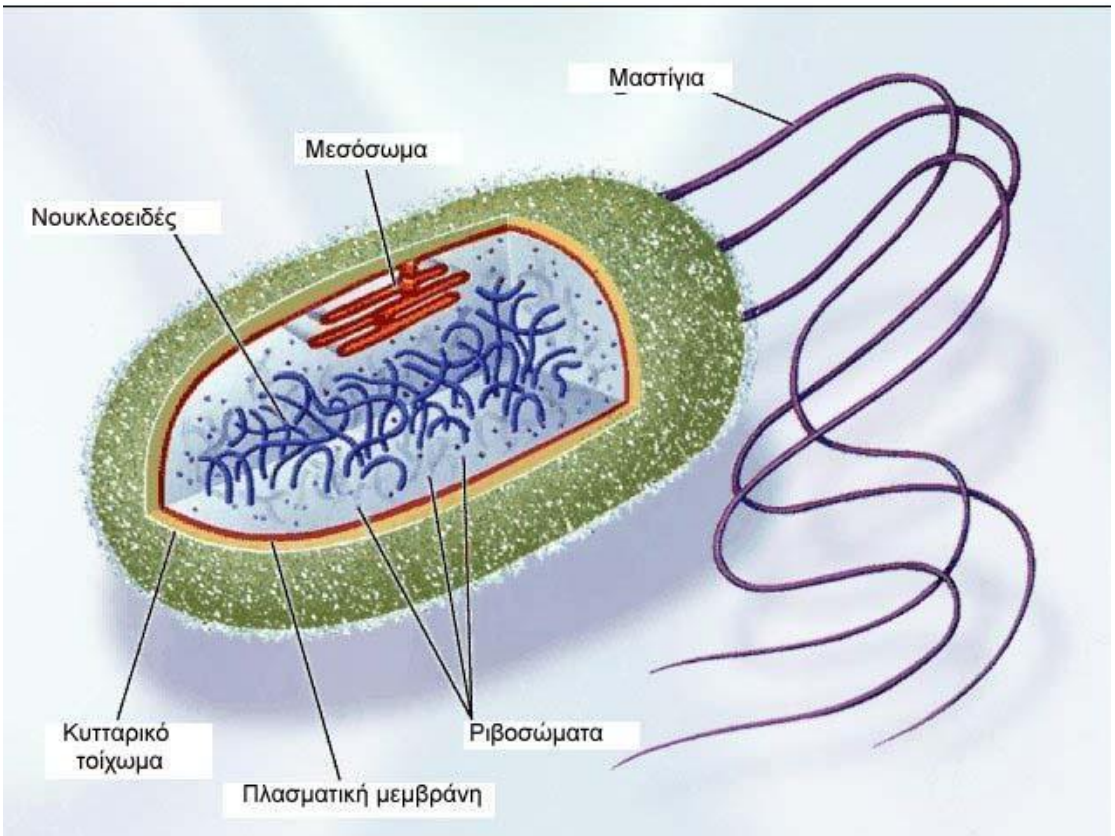
Εικόνα 29. Σχηματική απεικόνιση νανοσωλήνων άνθρακα

7. ΒΙΟΛΟΓΙΑ ΚΥΤΤΑΡΟΥ

7.1 Εισαγωγή

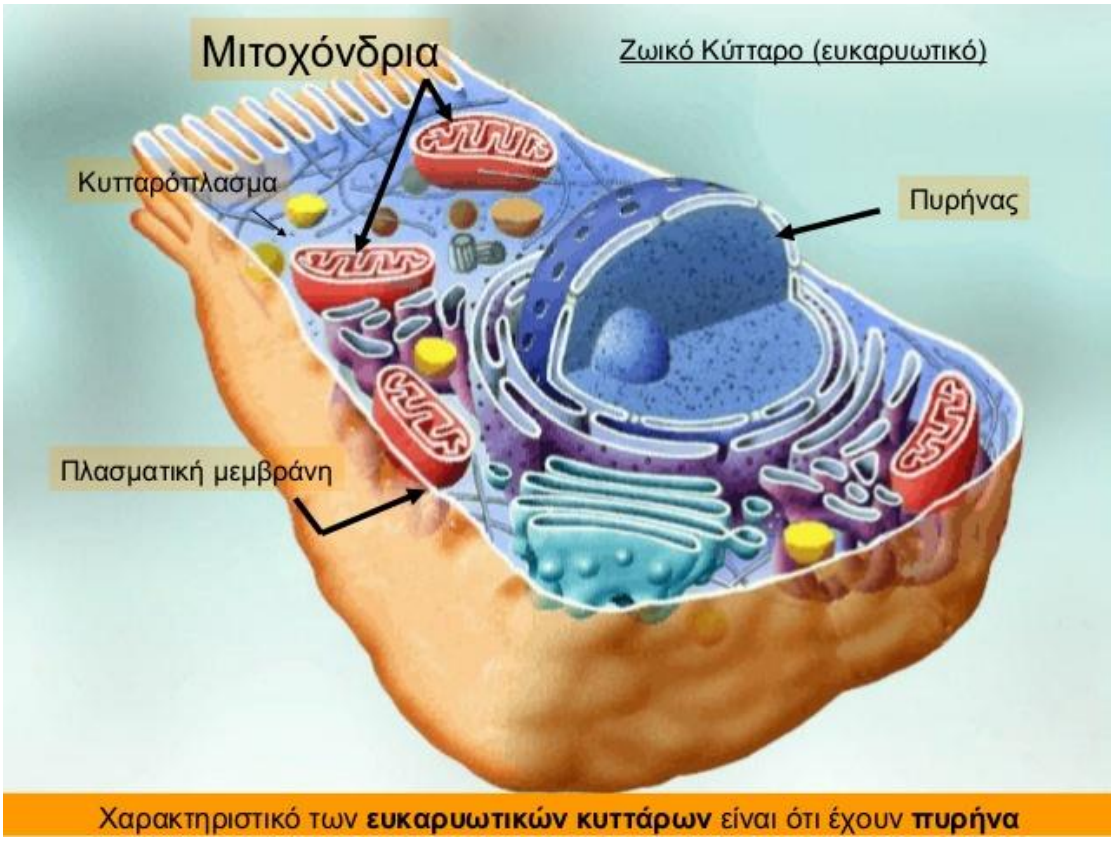
Το κύτταρο αποτελεί τη δομική και λειτουργική μονάδα κάθε ζωντανού οργανισμού. Έχει τη δυνατότητα να επιτελέσει όλες τις βασικές λειτουργίες της ζωής. Δύο βασικοί διαφορετικοί τύποι κυττάρων από δομική τουλάχιστον άποψη διακρίνονται. Ο πρώτος τύπος είναι τα προκαρυωτικά κύτταρα και ο δεύτερος τύπος είναι τα ευκαρυωτικά κύτταρα[65].

- **Προκαρυωτικό κύτταρο:** Κλασικό παράδειγμα προκαρυωτικού κυττάρου αποτελεί το βακτηρίδιο. Γενικότερα, τα προκαρυωτικά κύτταρα είναι πολύ μικρά (μήκος 1-5μm), μπορεί να έχουν κυτταρικό τοίχωμα έξω από τη κυτταρική μεμβράνη, αλλά δεν έχουν πυρηνικό περίβλημα το οποίο διαχωρίζει το γενετικό υλικό (DNA) από τα υπόλοιπα στοιχεία του κυττάρου.



Εικόνα 30. Δομή προκαρυωτικού κυττάρου

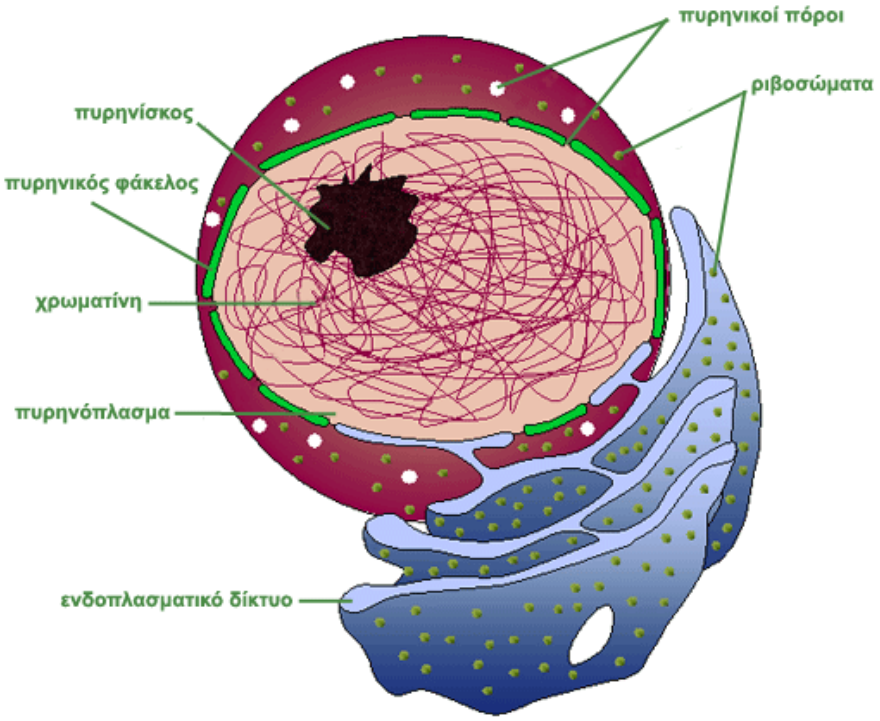
- **Ευκαρυωτικό κύτταρο:** Είναι μεγαλύτερα κύτταρα από τα προκαρυωτικά και διαθέτουν ευδιάκριτο πυρήνα ο οποίος περιβάλλεται από πυρηνικό περίβλημα. Μερικά διαβιούν αυτόνομα ως μονοκύτταροι οργανισμοί (πχ αμοιβάδα, ζυμομύκητας), ενώ άλλα διαβιούνσε πολυκύτταρα συναθροίσματα. Όλοι οι πιο σύνθετοι πολυκύτταροι οργανισμοί, συμπεριλαμβανομένων των φυτών, των ζώων και των μυκήτων, σχηματίζονται από ευκαρυωτικά κύτταρα.



Εικόνα 31. Δομή ευκαρυωτικού κυττάρου

7.1.1 Πυρήνας

Ο πυρήνας συνήθως είναι το πιο εμφανές οργανίδιο ενός ευκαρυωτικού κυττάρου. Περικλείεται από δύο ομόκεντρες μεμβράνες που συνιστούν το πυρηνικό περίβλημα και περιέχει μόρια DNA. Τα μόρια DNA είναι εξαιρετικά επιμήκη πολυμερή που κωδικοποιούν τη γενετική εξειδίκευση του οργανισμού. Αυτά τα γιγαντιαία μόρια γίνονται ορατά στο φωτονικό μικροσκόπιο με τη μορφή χρωμοσωμάτων όταν το κύτταρο προετοιμάζεται να διαιρεθεί σε δύο θυγατρικά κύτταρα, οπότε γίνονται πιο συμπαγή. Επομένως, ο πυρήνας ουσιαστικά λειτουργεί ως αποθήκη πληροφοριών του κυττάρου[65].



Εικόνα 32. Χαρακτηριστική εικόνα του πυρήνα ενός κυττάρου

7.1.2 Μιτοχόνδρια

Τα μιτοχόνδρια είναι ευδιάκριτα οργανίδια του κυτταροπλάσματος που υπάρχουν σε όλα, ουσιαστικά, τα ευκαρυωτικά κύτταρα. Κάθε μιτοχόνδριο έχει αλλαντοειδές ή σκωληκόμορφο σχήμα, το δε μήκος του κυμαίνεται από ένα έως πολλά μικρόμετρα. Περιβάλλεται από δύο ξεχωριστές μεμβράνες, με την εσωτερική να σχηματίζει πτυχές που προβάλλουν στο εσωτερικό του οργανιδίου. Περιέχουν το δικό τους DNA και αναπαράγονται διαιρούμενα στα δύο. Ουσιαστικά τα μιτοχόνδρια λειτουργούν ως γεννήτριες παραγωγής χημικής ενέργειας για τις ανάγκες του κυττάρου. Αξιοποιούν την ενέργεια που απελευθερώνεται κατά την οξείδωση μορίων της τροφής, όπως σάκχαρα, προκειμένου να παράγουν τριφωσφορική αδενοσίνη (ATP), το βασικό χημικό καύσιμο που συντηρεί τις περισσότερες δραστηριότητες του κυττάρου. Επειδή κατά τη διάρκεια της παραπάνω δραστηριότητας το μιτοχόνδριο καταναλώνει οξυγόνο και απελευθερώνει διοξείδιο του άνθρακα, η όλη διεργασία αποκαλείται κυτταρική αναπνοή[65].

Χωρίς τα μιτοχόνδρια, τα ζώα,οι μύκητες και τα φυτά δεν θα ήταν σε θέση να χρησιμοποιήσουν το οξυγόνο για ν΄αποσπάσουν τη μέγιστη δυνατή ποσότητα ενέργειας από

τα μόρια των τροφών. Το οξυγόνο θα ήταν ουσιαστικά δηλητήριο και όχι αναγκαία προϋπόθεση επιβίωσης[65].

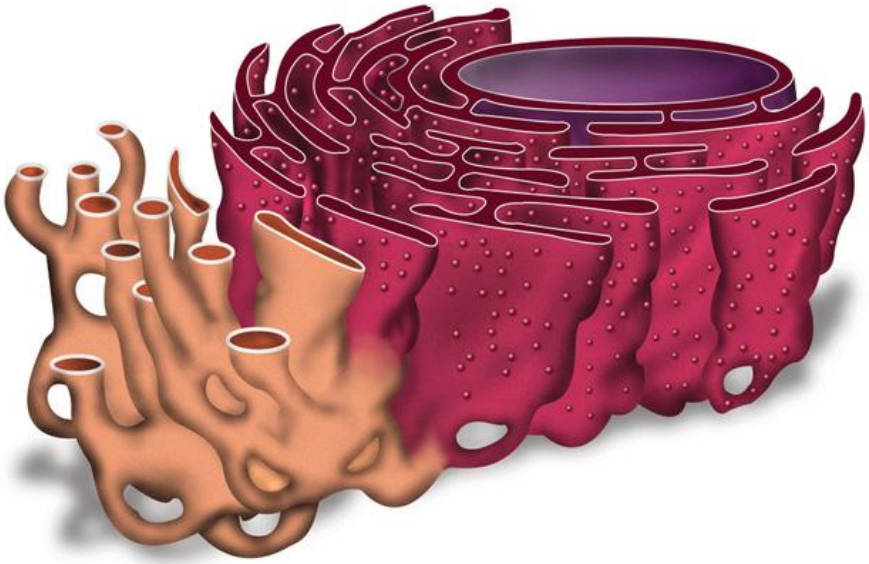
Εικόνα 33. Αναπαράσταση ενός μιτοχονδρίου

7.1.3 Ενδοπλασματικό δίκτυο

Το ενδοπλασματικό δίκτυο σχετίζεται με τη βιοσύνθεση καθώς και τη μεταφορά κυτταρικών πρωτεϊνών και λιπιδίων. Έχει τη μορφή δικτύου με πολυπτυχωτούς, αποπλατυσμένους μεμβρανικούς σχηματισμούς ή επιμήκεις σωλήνες. Η έκταση του είναι ανάλογη με τις απαιτήσεις του κυτταρικού μεταβολισμού. Πιο συγκεκριμένα, διακρίνεται σε αδρό(Α.Ε.Δ) και λείο(Λ.Ε.Δ) ενδοπλασματικό δίκτυο.

Το Α.Ε.Δ έχει κοκκώδη μορφή, λόγω των ριβοσωμάτων, δηλαδή τους τόπους παραγωγής των πολυπεπτιδίων τα οποία φέρει στην επιφάνειά του. Είναι πυκνότερο κοντά στο πυρήνα και στο σύμπλεγμα Golgi και είναι ιδιαίτερα αναπτυγμένο σε κύτταρα με έντονη πρωτεϊνοσυνθετική δραστηριότητα. Επιφέρει ποικίλες λειτουργίες. Καταρχήν το Α.Ε.Δ αποτελεί το τμήμα του Ε.Δ που σχετίζεται με τη παραγωγή, τη τροποποίηση και τη συσκευασία πρωτεϊνών, που είτε θα εκκριθούν από το κύτταρο, είτε θα συμμετάσχουν στη κατασκευή των μεμβρανών του.

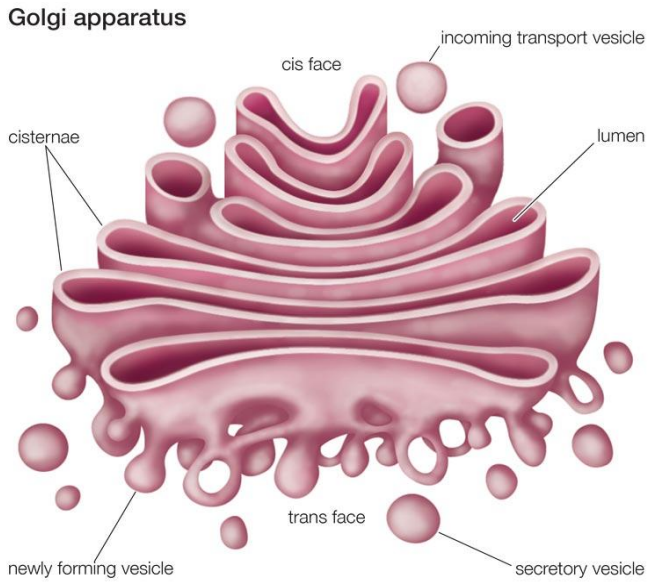
Το Λ.Ε.Δ δεν διαθέτει ριβοσώματα για το λόγο αυτό έχει και λεία εμφάνιση. Έχει περισσότερο σωληνοειδή παρά κυστοειδή μορφή απ΄ότι το Α.Ε.Δ και είναι ιδιαιτέρως αναπτυγμένο σε κύτταρα που παράγουν λιπίδια και στεροειδείς ορμόνες. Το Λ.Ε.Δ φέρει εις πέρας διάφορες μεταβολικές αντιδράσεις όπως για παράδειγμα το μεταβολισμό των υδατανθράκων, τη σύνθεση φωσφολιπιδίων, τη σύνθεση στεροειδών και τέλος την εξουδετέρωση και την αδρανοποίηση φαρμάκων και τοξικών ουσιών (ειδικά στα κύτταρα του ήπατος). Χαρακτηριστικά, το Λ.Ε.Δ των μυϊκών κυττάρων που ονομάζεται σαρκοπλασματικό δίκτυο, που αντιπροσωπεύει μια αποθήκη ιόντων ασβεστίου τα οποία αντλούνται από το κυτταρόπλασμα και επιστρέφουν σε αυτό, όταν τα μυϊκά κύτταρα διεγείρονται, προκειμένου να πυροδοτήσουν το μηχανισμό συστολής τους[66].



Εικόνα 34. Χαρακτηριστική αναπαράσταση Ε.Δ

7.1.4 Συσκευή Golgi

Το σύμπλεγμα Golgi αποτελεί το τμήμα του κυττάρου στο οποίο γίνεται τροποποίηση, συσκευασία και αποστολή (εντός ή εκτός του κυττάρου), προϊόντων του Ενδοπλασματικού δικτύου (κυρίως πρωτεϊνών).



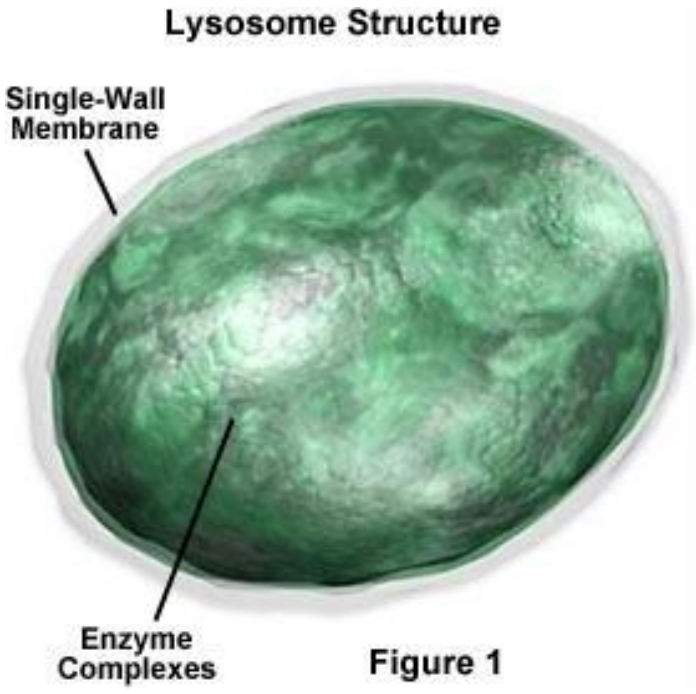
Εικόνα 35. Το σύμπλεγμα Golgi

Η cis πλευρά παραλαμβάνει σε μορφή κυστιδίων τα προϊόντα του Ε.Δ. Τα κυστίδια αφού αποκοπούν από το Ε.Δ, συντήκονται, μέσω της μεμβράνης τους με τη μεμβράνη της cis πλευράς, ώστε τόσο το περιεχόμενό τους, όσο και οι λιποπρωτεΐνες τους, να αποτελέσουν μέρος της. Έτσι τα προϊόντα που έχει εισαγάγει το Golgi από το Ε.Δ μεταφέρονται από τη cis πλευρά στο κεντρικό τμήμα του Golgi, στο οποίο θα υποστούν επεξεργασία, και από εκεί στη trans πλευρά, από την οποία θα αποσταλούν σε διαφορετικούς προορισμούς [66].

Στο κεντρικό τμήμα του συμπλέγματος Golgi γίνεται ενζυματική τροποποίηση των υδατανθράκων που είχαν προστεθεί στις πρωτεΐνες κατά τη διάρκεια της σύνθεσής τους. Η διαδικασία, δεν αφορά μόνο αφαίρεση σακχάρων, αλλά και προσθήκη νέων, έτσι ώστε να προκύπτει μια μεγάλη ποικιλία γλυκοπρωτεϊνών [66].

7.1.5 Λυσοσώματα

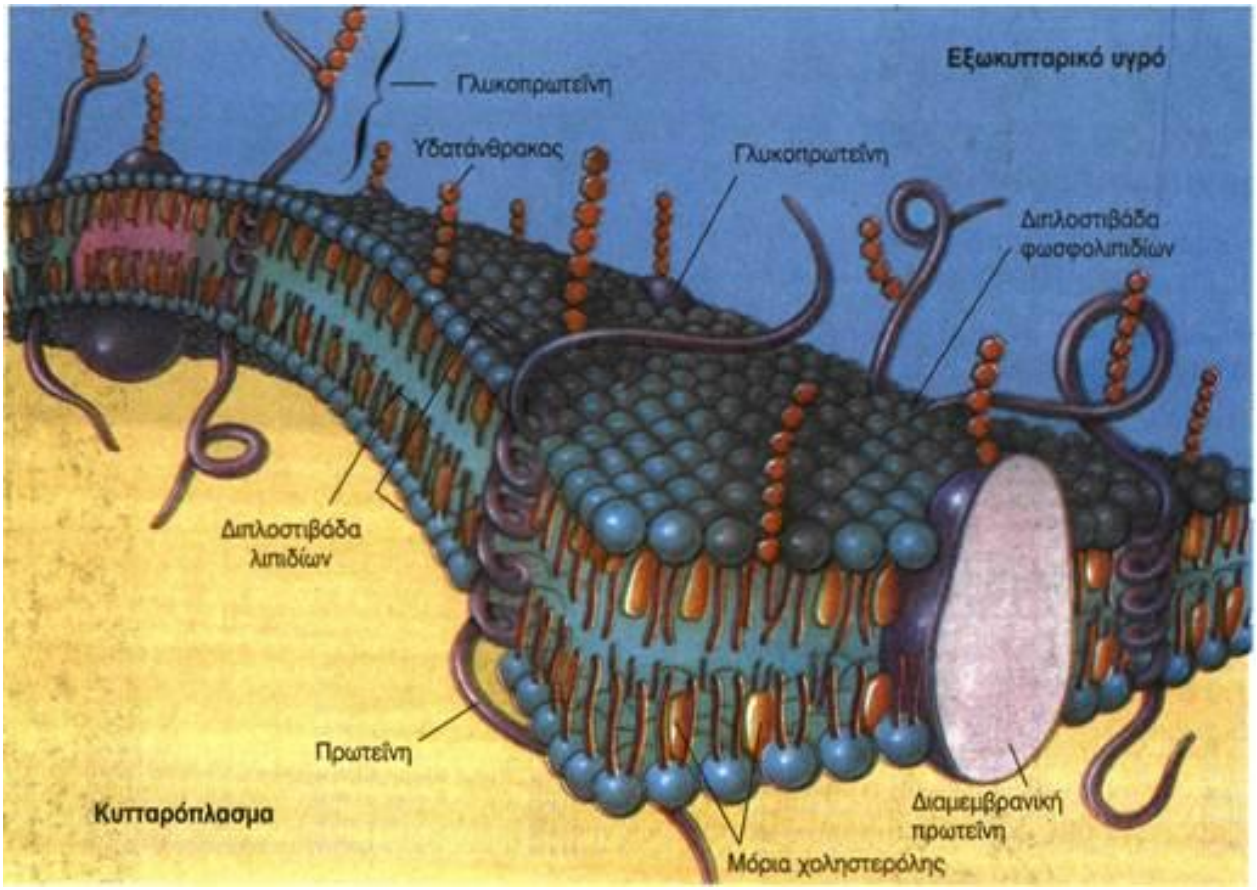
Τα λυσοσώματα είναι μεμβρινικά οργανίδια πλούσια σε υδρολυτικά ένζυμα τα οποία δρουν σε όξινο pH. Η λειτουργία τους περιλαμβάνει την αποδόμηση υλικού που προσλαμβάνεται από το κύτταρο καθώς και γερασμένων κυτταρικών στοιχείων [66].



Εικόνα 36. Χαρακτηριστική δομή ενίς λυσοσώματος

7.1.6 Κυτταρική μεμβράνη

Κυτταρική μεμβράνη ή αλλιώς πλασματική μεμβράνη είναι η εξωτερική μεμβράνη που περιβάλλει το κύτταρο και το ξεχωρίζει από το περιβάλλον του. Αποτελείται από ένα διπλό στρώμα φωσφολιπιδίων ενωμένα εκατερώθεν σε ενδιάμεσο στρώμα αποτελούμενο από πρωτεΐνες και σάκχαρα. Είναι ημιπερατή, που σημαίνει ότι επιτρέπει ορισμένες ουσίες να εισέρχονται και να εξέρχονται. Αυτό επιτυγχάνεται μέσω της ηλεκτροχημικής βαθμίδωσης που δημιουργείται στα άκρα της μεμβράνης, λόγω του ηλεκτρικού φορτίου που περιέχει αλλά και της διαφοράς της συγκέντρωσης του εξωτερικού από το εσωτερικό υγρό με συνέπεια να δημιουργείται διαφορά ωσμωτικών πιέσεων, δια των οποίων προσδιορίζεται ο συντελεστής διαβατότητας της κυτταρικής μεμβράνης [66].



Εικόνα 37. Κυτταρική ή πλασματική μεμβράνη

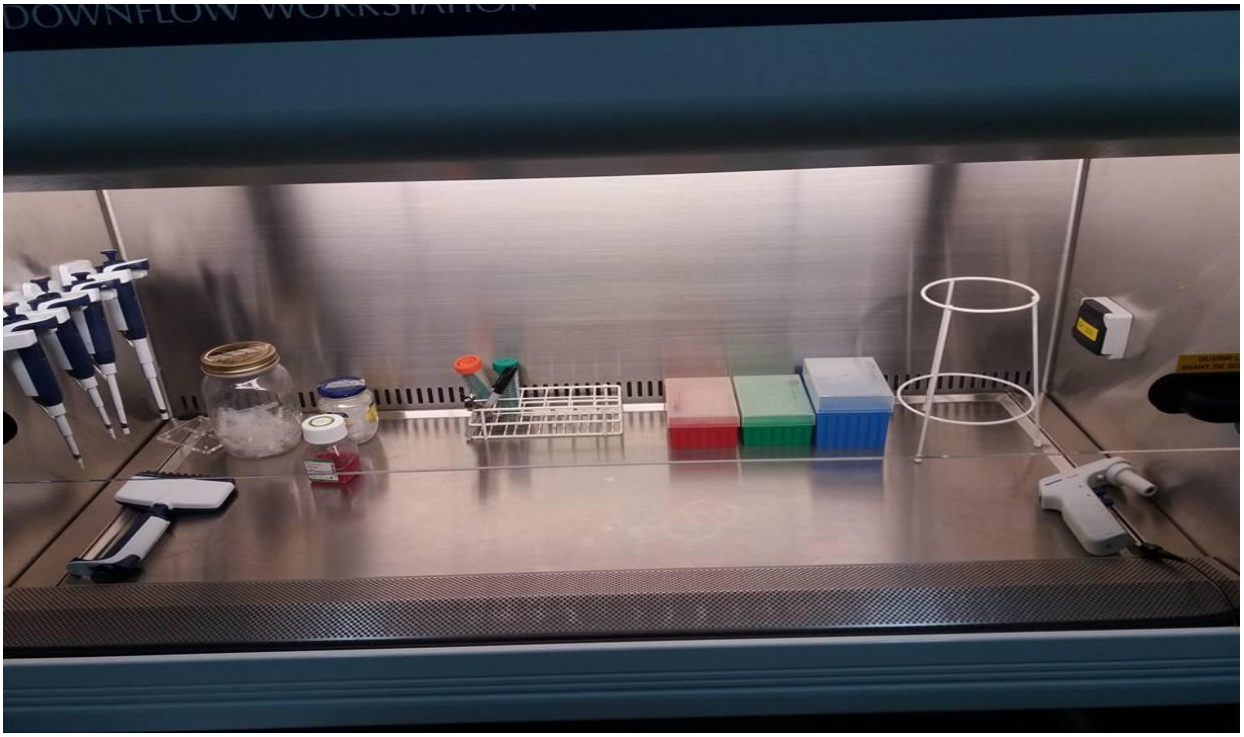
7.2 Τεχνικές κυτταρικών καλλιεργειών

Οι τεχνικές-βήματα που ακολουθούνται για τη προετοιμασία, τη καλλιέργεια και την επεξεργασία των κυττάρων για διάφορυς πειραματικούς σκοπούς είναι:

1. Ασηπτική εργασία
2. Κυτταρική απόψυξη
3. Ανακαλλιέργεια κυττάρων
4. Μέτρηση κυττάρων με χρήση αιμοκυτταρομέτρου Neubauer
5. Πάγωμα των κυττάρων που δεν πρόκειται να χρησιμοποιηθούν για το πείραμα.
6. Λύση κυττάρων

7.2.1 Ασηπτική εργασία

Το πρώτο βήμα καθώς και ένα από τα σημαντικότερα για την επιτυχή καλλιέργεια αποτελεί η ασηπτική εργασία. Αρχικά, αφού ενεργοποιηθεί το chemical hood, τοποθετούνται ακτίνες UV εσωτερικά για τουλάχιστον 15-20 λεπτά. Στη συνέχεια, γίνεται ψεκασμός σε όλο το εσωτερικό του chemical hood με αιθανόλη 70% . Υστέρα, οτιδήποτε εισέρχεται μέσα στο chemical hood θα πρέπει να ψεκάζεται καλά με αιθανόλη 70% και να σκουπίζεται με προσοχή. Τέλος, αφού τελειώσει το πειραματικό κομμάτι ή κάποια καλλιέργεια που γίνεται μέσα στο chemical hood, γίνεται ξανά ψεκασμός σε όλο το εσωτερικό του με αιθανόλη 70%, τοποθετείται ξανά UV για 20 λεπτά και μετά κλείνεται το chemical hood.



Εικόνα 38. Το Chemical Hood στο οποίο έγινε το βιολογικό κομμάτι της εργασίας

7.2.2 Απόψυξη κυττάρων

Τα κύτταρα έχουν τη δυνατότητα να διατηρούνται για αρκετά μεγάλο χρονικό διάστημα παγωμένα σε υγρό άζωτο σε θερμοκρασίες χαμηλότερες από -170 ^{o}C. Βέβαια, για να μπορέσουν να διατηρηθούν επιτυχώς, θα πρέπει να είναι σε καλή μεταβολική κατάσταση πριν από τη ψύξη τους. Για το λόγο αυτό, τα κύτταρα ψύχονται όταν έχουν καλύψει τουλάχιστον το 80% του τριβλίου (flask) στο οποίο έχουν τοποθετηθεί για καλλιέργεια. Τα κύτταρα για αρχή ψύχονται βαθμιαία μέχρι τους -80 ^{o}C με σκοπό την αποφυγή σχηματισμού πάγου στο

εσωτερικό τους καθώς και την ελαχιστοποίηση της απώλειας νερού. Για τη περαιτέρω προστασία από το πάγο, τα κύτταρα καταψύχονται παρουσία διμέθυλο-σουλφοξειδίου (DMSO). Αφού φτάσουν τους -80°C, τοποθετούνται με μεγάλη προσοχή μέσα στο υγρό άζωτο, όπου και μπορούν να διατηρηθούν, ανάλογα και με τη κυτταρική σειρά, για πολύ μεγάλο χρονικό διάστημα.

Κατά τη διάρκεια της απόψυξης των κυττάρων από το υγρό άζωτο, είναι απαραίτητο να γίνει καλλιέργεια. Οι συνθήκες κάτω από τις οποίες πραγματοποιείται η απόψυξη των κυττάρων είναι άσηπτες. Ένας ακόμη πολύ σημαντικός παράγοντας είναι ο χρόνος. Η απόψυξη θα πρέπει να γίνεται όσο το δυνατόν ταχύτερα έτσι ώστε να μειώθει όσο περισσότερο γίνεται χρονικά η έκθεση των κυττάρων στο DMSO, το οποίο είναι τοξικό για τα κύτταρα σε θερμοκρασία δωματίου.

ΥΛΙΚΑ:

- Culture media, Ethanol
- 1 μπλε πιπέττα των 1000μl
- 1 γυάλινη πιπέττα των 30 ή 50 ml
- 2 γυάλινες πιπέττες των 5 ml
- 2 conical tubes των 50 ml
- 1 πλαστική φλάσκα 75cm^2

ΔΙΑΔΙΚΑΣΙΑ:

- Warm up
- Ξεπάγωμα
- Αφαίρεση DMSO
- Culture (καλλιέργεια)
- Shut down

1. Μεταφέρω στο ένα conical tube 20 ml culture media και το ονομάζω ‘cells’. Το culture media είναι ουσιαστικά θρεπτικό υλικό χαμηλής περιεκτικότητας σε γλυκόζη DMEM(Dulbecco’s Modified Eagle Medium) συμπληρωμένο με 10 % v/v ορού αίματος βόειου εμβρύου FBS, με 50 U/ml πενικιλίνης, 50 μg/ml στρεπτομυκίνης και 1% L-

γλουταμίνης. Στο δεύτερο conical tube μεταφέρω 5 ml culture media και το ονομάζω 'media'. Αφού τελειώσω με το πρώτο βήμα τοποθετώ ξανά το culture media στο ψυγείο.

2. Παρατηρώ από το πίνακα που βρίσκεται στο υγρό άζωτο σε ποια θήκη βρίσκονται τα κύτταρα που θέλω να χρησιμοποιήσω.

3. Βγάζω τα cryovials με τα κύτταρα από το υγρό άζωτο και τα τοποθετώ σε υδατόλουτρο στους 37 ^{o}C.

4. Αμέσως μόλις αρχίσει να γίνεται υγρό το εσωτερικό στα cryovials, κι ας έχει ένα μικρό κομμάτι πάγου, το μεταφέρω με τη μπλε πιπέττα στο conical tube 'cells'.

5. Μεταφέρω λίγο culture media (με το ίδιο tip) από το 'cells' στο cryovials και κάνω up and downs μέχρι να πάρω όλα τα κύτταρα. Επιστρέφω όλο το υγρό στο 'cells'.

6. Φυγοκεντρίζω το 'cells' χρησιμοποιώντας σαν αντίβαρο ένα conical tube γεμισμένο με τα ίδια ml νερού. Η φυγοκέντριση γίνεται στις 1500 RPM (στροφές) για 5 λεπτά.

7. Αφαίρεση DMSO. Χρησιμοποιώντας το aspirator (κόκκινα tips) παίρνω όλο το υγρό από το 'cells' με προσοχή ώστε να μη ξεκολλήσουν τα κύτταρα που έχουν σχηματίσει pellet στο κάτω μέρος του conical tube.

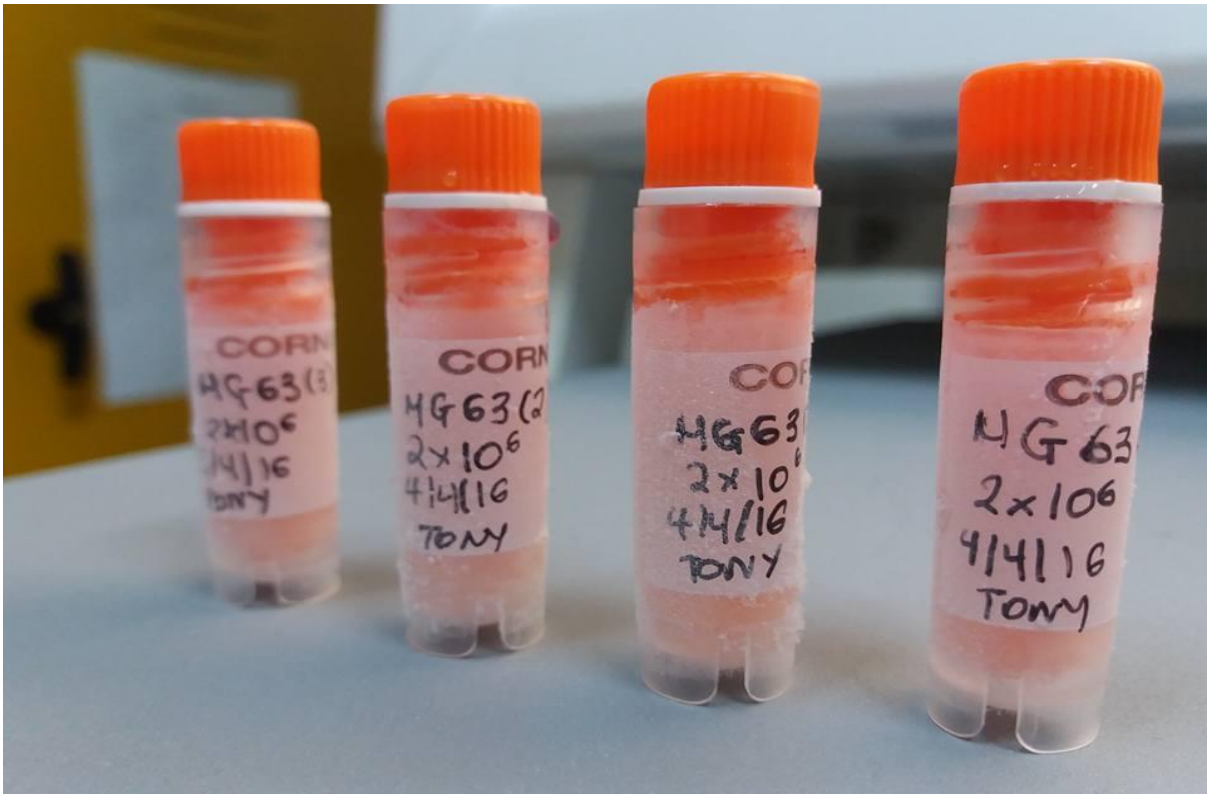
8. Μεταφέρω 4 ml θρεπτικό από το 'medium' στο 'cells'

9. Κάνω up and downs ΑΠΑΛΑ με τη μπλε πιπέττα για 1 λεπτό

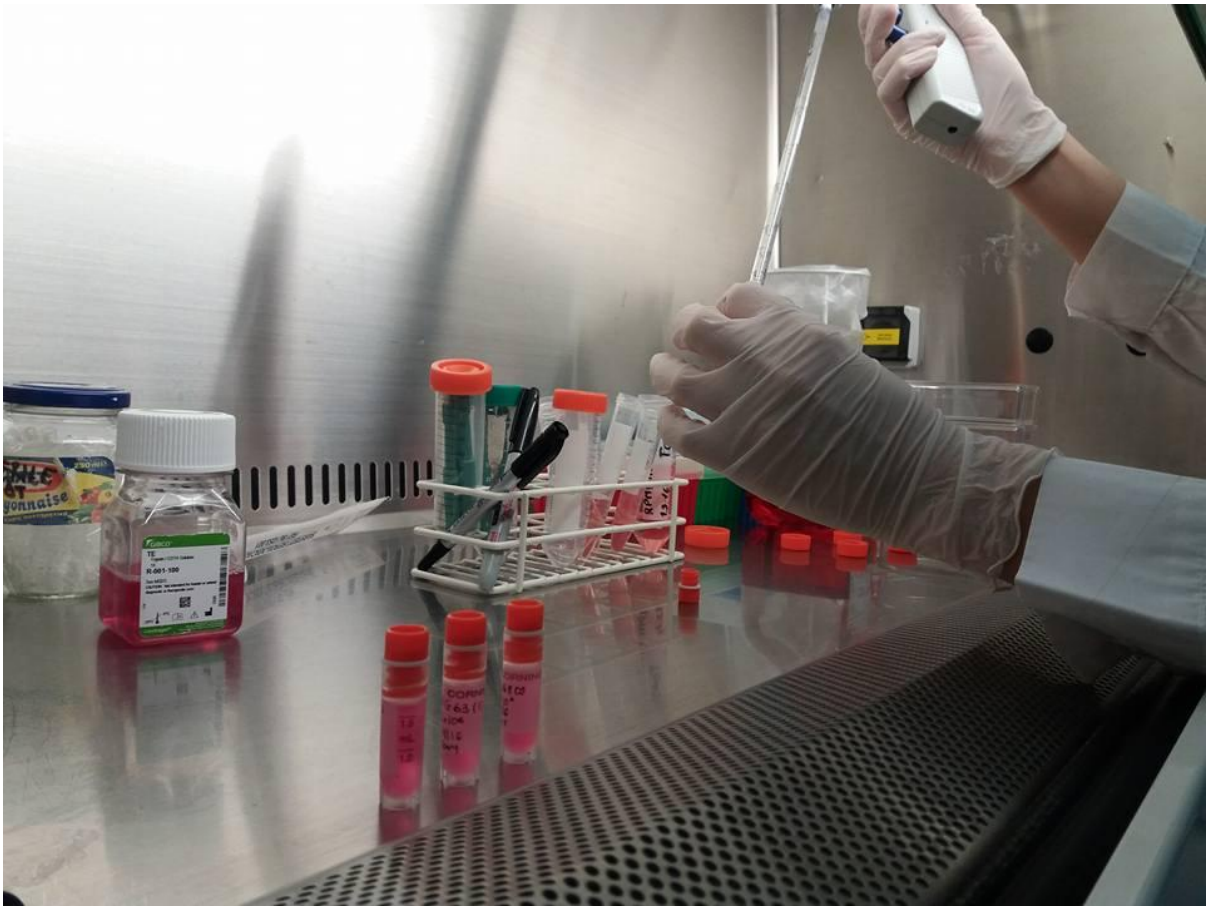
10. Μεταφέρω 4 ml από το 'cells' στη πλαστική φλάσκα των 75cm^2. Επάνω στη φλάσκα γράφω:
    - Ημερομηνία
    - Τύπο κυττάρων
    - Όνομα

Τέλος τοποθετώ τη φλάσκα μέσα στο incubator.

Εικόνα 39. Το υγρό άζωτο στο οποίο διατηρούνται τα κύτταρα (οστεοβλάστες)



Εικόνα 40. Τα κύτταρα έτοιμα για μεταφορά σε φλάσκες



Εικόνα 41. Μεταφορά των κυττάρων από τα cryovials στις φλάσκες

7.2.3 Ανακαλλιέργεια κυττάρων (Cell Splitting)

Για τη διατήρηση της ακεραιότητας της καλλιέργειας των κυττάρων καθώς επίσης και τη διατήρηση της εκθετικής τους ανάπτυξης, κρίνεται επιτακτική η ανάγκη για ανακαλλιέργειά τους σε τακτά χρονικά διαστήματα, ανάλογα πάντα και με το είδος της κυτταρικής σειράς. Η ανάπτυξη τους αφήνεται έως ότου έχουν καλύψει περίπου το 80-85% της επιφάνειας του τριβλίου-φλάσκας. Μέχρι το παραπάνω ποσοστό κάλυψης επιφάνειας η ανάπτυξή τους δεν επηρεάζεται από έλλειψη χώρου. Τα κύτταρα παρατηρούνται σε άναστροφο οπτικό μικροσκόπιο. Όσα κύτταρα είναι προσκολλημένα (attached) στο τρυβλίο-φλάσκα θεωρούνται υγιή, ενώ όσα επιπλέουν πιθανότατα νεκρά. Η αποκόλληση τους από το υπόστρωμα είναι δυνατή είτε με μηχανικό τρόπο είτε με ενζυμική δράση. Για αποκόλληση με ενζυμική δράση χρησιμοποιείται διάλυμα θρυψίνης, το οποίο διάλυμα ουσιαστικά διασπά τις συνδέσεις των κυττάρων μεταξύ τους καθώς και με το στερεό υπόστρωμα της φλάσκας.

ΥΛΙΚΑ:

- Trypsin
- Culture Media

- Ethanol
- 1 μπλε πιπέττα ρυθμισμένη στα 1000μl
- 2 γυλαλινες πιπέττες των 30 ml
- Φλάσκες καινούργιες για το νέο cell culture
- 2 Conical tubes των 50 ml

ΔΙΑΔΙΚΑΣΙΑ:

- Warm up
- Ξέπλυμα (wash)
- Trypsin
- Αφαίρεση Trypsin
- Split/Culture
- Shut down

1. Μεταφέρω σε ένα conical tube των 20 ml culture media και το ονομάζω ‘media’.

2. Αφαιρώ με τη χρήση aspirator το παλιό θρεπτικό-culture media από το Petri-dish(φλάσκα-τριβλίο) ακουμπώντας το tip στο σημείο μεταξύ πυθμένα και τοιχώματος και δίνω κλίση στη φλάσκα κατά την αφαίρεση. Είναι σημαντικό να αφαιρεθεί όλο το culture media, αλλά να μην αφήσω τα κύτταρα για αρκετό χρονικό διάστημα εκτεθειμένα.

3. Wash: Προσθέτω 1ml Trypsin και αφού το αφήσω για 10-15 δευτερόλεπτα, το αφαιρώ με το aspirator

4. Προσθέτω 2 ml Trypsin και τοποθετώ τη φλάσκα στο incubator για περίπου 5 λεπτά. Ταυτόχρονα τοποθετώ και το Trypsin στο ψυγείο.

5. Παρατηρώ στο μικροσκόπιο εάν έχουν αποκολληθεί όλα τα κύτταρα. Εάν όχι, βάζω ξανά τη φλάσκα στο incubator για λίγο.

6. Μεταφέρω από το ‘media’ στη φλάσκα 1-2 ml θρεπτικό υλικό με τη μπλε πιπέττα κάνοντας συνέχεια up and down. Ύστερα τραβάω όλο το θρεπτικό υλικό μαζί με τα κύτταρα από τη φλάσκα και το μεταφέρω στο ‘media’

7. Φυγοκεντρώ το 'media' χρησιμοποιώντας σαν αντίβαρο ένα conical tube γεμισμένο με τα ίδια ml νερού. Η φυγοκέντριση γίνεται στις 1500 RPM για 5 λεπτά.

8. Χρησιμοποιώντας το aspirator (κόκκινα tips), τραβάω όλο το υγρό από το 'media' προσέχωντας να μην ξεκολλήσουν τα κύτταρα που έχουν σχηματίσει pellet στο κάτω μέρος του conical tube.

9. Συμπληρώνω με όσο culture media χρειάζεται τη φλάσκα όπου έχω βάλει και τα κύτταρα. Συνολικά πρέπει να υπάρχουν 10ml culture media μαζί με κύτταρα μέσα στη καινούργια φλάσκα.

10 Επάνω στη φλάσκα γράφω:

- Ημερομηνία
- Τύπο κυττάρων
- Όνομα

Τέλος τοποθετώ τη φλάσκα μέσα στο incubator.

7.2.4 Μέτρηση κυττάρων με αιμοκυταρρόμετρο Neubauer

Για να υπολογίσουμε τον αριθμό των κυττάρων που περιέχει το εναιώρημα της καλλιέργειας, χρησιμοποιούμε το αιμοκυτταρόμετρο Neubauer. Ουσιαστικά το αιμοκυταρρόμετρο Neubauer είναι μια τροποποιημένη αντικειμενοφόρος πλάκα η οποία διαθέτει δύο κατάλληλα επεξεργασμένες λείες επιφάνειες. Η κάθε μια από αυτές έχει ένα τετράγωνο πλέγμα, το οποίο αποτελείται από 9 κύρια τετράγωνα με μήκος πλευράς 1mm. Το κάθε ένα από αυτά τα τετράγωνα ορίζεται από τρεις παράλληλες γραμμές που απέχουν μεταξύ τους 2,5 μm και χρησιμοποιούνται για να καθοριστεί εάν τα κύτταρα βρίσκονται μέσα ή έξω από το πλέγμα. Επίσης κάθε ένα από τα κύρια τετράγωνα παρουσιάζει επιπλέον διαβαθμίσεις για να διευκολύνεται η μέτρηση των κυττάρων. Το επίπεδο του πλέγματος βρίσκεται βρίσκεται 0,1 mm χαμηλότερα από δύο 'ράχες' στις οποίες στηρίζεται η καλυπτρίδα. Υπάρχει μια κοίλη επιφάνεια μεταξύ της εξωτερικής πλευράς κάθε τετραγωνισμένης λείας επιφάνειας και των σημείων που στηρίζεται η καλυπτρίδα.

Στη κοίλη αυτή επιφάνεια μεταφέρεται το κυτταρικό αιώρημα, το οποίο με τριχοειδή φαινόμετα απλώνεται στη τετραγωνισμένη επιφάνεια. Συγκεκριμένα, μεταφέρονται 10μl από

το εναιώρημα των κυττάρων. Με το τρόπο αυτό, καθίσταται δυνατή η μέτρηση του αριθμού των κυττάρων σε ένα συγκεκριμένο όγκο του εναιωρήματος και στη συνέχεια ο αριθμός αυτός ανάγεται στο συνολικό όγκο ώστε να υπολογιστεί ο συνολικός αριθμός των κυττάρων στο εναιώρημα.

ΥΛΙΚΑ:

- Ethanol
- Neubauer
- 1 pipette των 10ml (κόκκινη)

ΔΙΑΔΙΚΑΣΙΑ:

1. Καθαρίζω την αντικειμενοφόρο και τη καλυπτρίδα με Αιθανόλη (70%) και χαρτί, προσέχοντας να μη μείνουν κομμάτια χαρτιού πάνω τους.

2. Σε ένα μικρό tip προσθέτω 100 μl από το εναιώρημα με τα κύτταρα και 100μl από τη χρωστική Trypan Blue. Μετά από αρκετά up and downs (με μεγάλη προσοχή τα up and downs) παίρνω 10μl και τα τοποθετώ στην αντικειμενοφόρο ενώ είναι σκεπασμένη με τη καλυπτρίδα.

3. Μετράω πόσα κύτταρα/bead υπάρχουν σε κάθε υπάρχουν σε κάθε τεταρτημόριο. Και βγάζω το συνολικό άθροισμα απ΄όλα τα τατρτημόρια (έστω x το άθροισμα)

4. Τελικός αριθμός κυττάρων ανά ml= (x*2*10.000)/4, όπου x= το άθροισμα κυττάρων από τα 4 τετράγωνα.

5. Καθαρίζω το Neubauer και τη καλυπτρίδα με αιθανόλη (70%) και τα τοποθετώ στη θήκη τους.

7.2.5 Πάγωμα κυττάρων

Για το πάγωμα των κυττάρων χρησιμοποιώ ειδικά cryovials στα οποία συνήθως τοποθετώ συνολικά 1ml medium μαζί με κύτταρα. Αφού βγάλω τη φλάσκα με τα κύτταρα από το incubator, κάνω dettachment των κυττάρων, τα μαζεύω όλα σε ένα tube των 15 ml και ύστερα τα φυγοκεντρώ για 5 λεπτά στις 1500 στροφές το λεπτό. Επόμενο βήμα είναι η απομάκρυνση του υπερκείμενου medium αφού τα κύτταρα έχουν συσσωρευτεί ως ίζημα στο πυθμένα του conical tube. Στη συνέχεια υπολογίζεται ακριβώς η ποσότητα καθώς και το σύνολο των κυττάρων που θέλουμε να έχουμε μέσα στο συγκεκριμένο ποσό του freezing medium και στη συνέχεια να παγώσουμε.

Το freezing medium το οποίο αποτελείται από:

- DMEM
- 50 % FBS (Fetal Bovine Serum)
- 10% DMSO (Dimethyl Sulfoxide)

Τέλος, τοποθετείται συνολικά 1 ml freezing medium μαζί με τα κύτταρα μέσα στο κάθε cryovial και τοποθετείται στους -80°C και ύστερα σε υγρό άζωτο.

7.2.6 Λύση κυττάρων

Για τη λύση των κυττάρων, αρχικά προετοιμάζεται το διάλυμα για τη λύση. Πρέπει να προετοιμάζεται όχι περισσότερο από 5 λεπτά πριν τη λύση των κυττάρων. Το διάλυμα για τη λύση αποτελείται από:

- Lysis Buffer
- Protease Inhibitor
- PMSF

Αφού γίνει η προετοιμασία του Lysing Solution, απομακρύνται το Medium που βρίσκεται στο κάθε well προσεχτικά και ύστερα τοποθετούνται περίπου 200μl/well. Αφού τοποθετηθεί το Lysis Solution σε κάθε well, το well plate μεταφέρεται στους -80 ^{o}C έτσι ώστε να επισπευθεί η διαδικασία της λύσης και μετά λαμβάνει χώρα το πρωτόκκολο για τη συλλογή δείγματος και για τη μέτρηση (στο συγκεκριμένο βιολογικό πείραμα) του GAPDH γονιδίου.

8. ΤΕΧΝΙΚΕΣ ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΜΟΥ

8.1 XRD (X-RAY Diffraction)

Το μηχάνημα που χρησιμοποιήθηκε είναι το BRUKER D8 FOCUS με λάμπα χαλκού $Cu_{K\alpha}$ μήκους κύματος λ=1,5406μm και διαφοράς δυναμικού μεταξύ της ανόδου και της καθόδου ίσης με 40KV. Το ρεύμα στο βολφράμιο είναι 40mA.

Εικόνα 42. Χαρακτηριστική εικόνα ενός XRD

Η μέθοδος XRD είναι η μέθοδος με την οποία προσδιορίζεται η ατομική και μοριακή δομή ενός κρυστάλλου και βασίζεται στην περίθλαση των ακτινών Χ από τους κρυστάλλους αυτούς. Οι ακτίνες Χ που χρησιμοποιούνται είναι ηλεκτρομαγνητική ακτινοβολία μήκους κύματος 0,1-25 Å. Η περίθλαση είναι το φαινόμενο κατά το οποίο το διαδιδόμενο κύμα έχει μήκος κύματος ίδιας τάξης μεγέθους με τις διαστάσεις του εμποδίου ή της οπής από όπου διέρχεται. Η αρχή λειτουργίας της διάταξης βασίζεται στην ανάκλαση μιας δέσμης ακτινών Χ από διάφορα πλεγματικά επίπεδα (h,k,l) που συμβάλλουν ενισχυτικά για συγκεκριμένη γωνία πρόσπτωσης θ. Τα ηλεκτρόνια του ατόμου προκαλούν σκέδαση στις ακτίνες Χ και αυτά με τη σειρά τους εκπέμπουν κάποια ακτινοβολία. Αυτό το φαινόμενο καλείται ελαστική σκέδαση. Τα κύματα που παράγονται είτε έχουν αποσβεστική συμβολή είτε ενισχυτική. Τα κύματα που έχουν ενισχυτική συμβολή καθορίζονται απ τον νόμο του Bragg: $\boldsymbol{2d\sin\theta = n\lambda}$

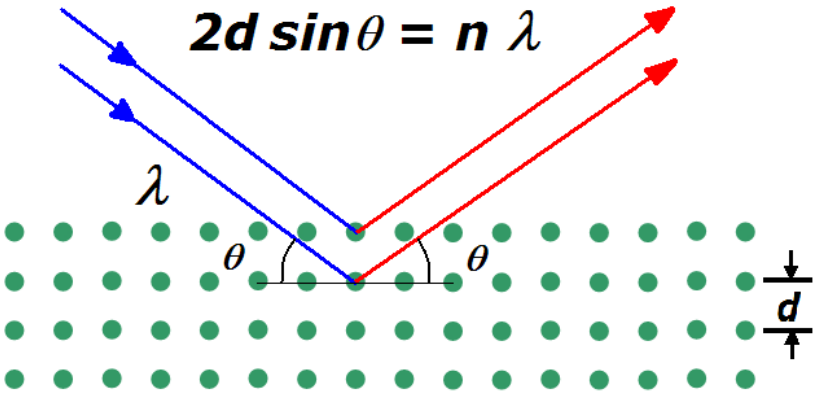
όπου:

d. η απόσταση μεταξύ των πλεγμάτων

θ, η γωνία σκέδασης

n, ακέραιος αριθμός και

λ, το μήκος κύματος της ακτινοβολίας



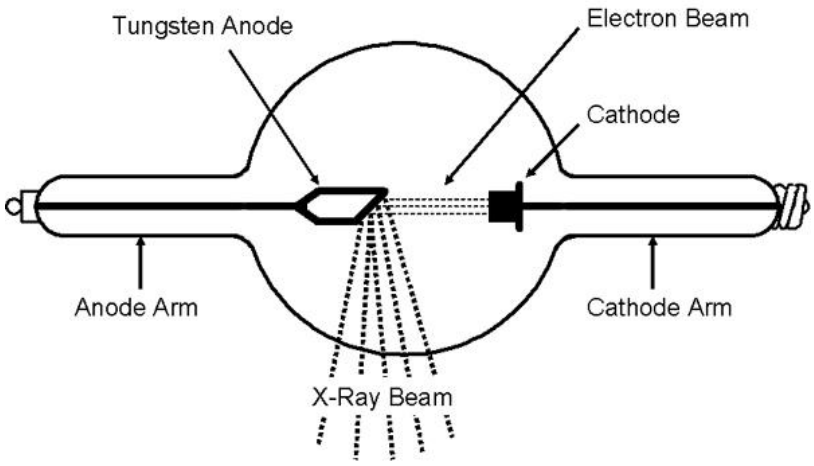
Εικόνα 43. Η λογική λειτουργίας του XRD

Η πηγή των ακτινών Χ προέρχεται από έναν θάλαμο που αποτελείται από ένα κεραμικό ή γυάλινο δοχείο υπό κενό που περιέχει ένα λαμπτήρα πυράκτωσης από βολφράμιο (λειτουργεί ως κάθοδος) και εκπέμπει ηλεκτρόνια και μία μεταλλική πλάκα που λειτουργεί ως άνοδος πάνω στην οποία προσκρούουν τα επιταχυνόμενα ηλεκτρόνια χάρη σε διαφορά δυναμικού 40.000Volts.

Αυτά τα ηλεκτρόνια επιβραδύνονται όταν προσκρούουν στα ηλεκτρόνια των εσωτερικών στιβάδων των ατόμων του στόχου. Τα ηλεκτρόνια των εσωτερικών στιβάδων απομακρύνονται και στη θέση τους δημιουργούνται οπές για πολύ μικρά χρονικά διαστήματα οι οποίες αναπληρώνονται από ηλεκτρόνια υψηλότερων ενεργειακών στιβάδων του ατόμου. Καθώς αυτά τα ηλεκτρόνια μεταπηδούν σε κατάσταση χαμηλότερης ενέργειας, εκπέμπουν συγκεκριμένη ακτινοβολία η οποία ανταποκρίνεται στα ενεργειακά επίπεδα του υλικού της ανόδου. Στο πείραμα η λάμπα πυρακτώσεως ήταν από χαλκό με μήκος κύματος K_{α}=1,5418710. Ο χαλκός χρησιμοποιείται στην πλειοψηφία των ανοδίων στα XRD αλλά πολλές φορές μπορεί το δείγμα να παρουσιάσει φαινόμενα φθορισμού και να εμφανιστεί θόρυβος που οφείλεται στην απορρόφηση και στην επανεκπομπή ακτινών Χ από το χάλκινο ανόδιο. Αυτό αντιμετωπίζεται με τη χρήση κοβάλτινων ανοδίων.

Η πηγή των ακτινών Χ προέρχεται από έναν θάλαμο που αποτελείται από ένα κεραμικό ή γυάλινο δοχείο υπό κενό που περιέχει ένα λαμπτήρα πυράκτωσης από βολφράμιο (λειτουργεί ως κάθοδος) και εκπέμπει ηλεκτρόνια και μία μεταλλική πλάκα που λειτουργεί ως άνοδος πάνω στην οποία προσκρούουν τα επιταχυνόμενα ηλεκτρόνια χάρη σε διαφορά δυναμικού 40.000Volts.

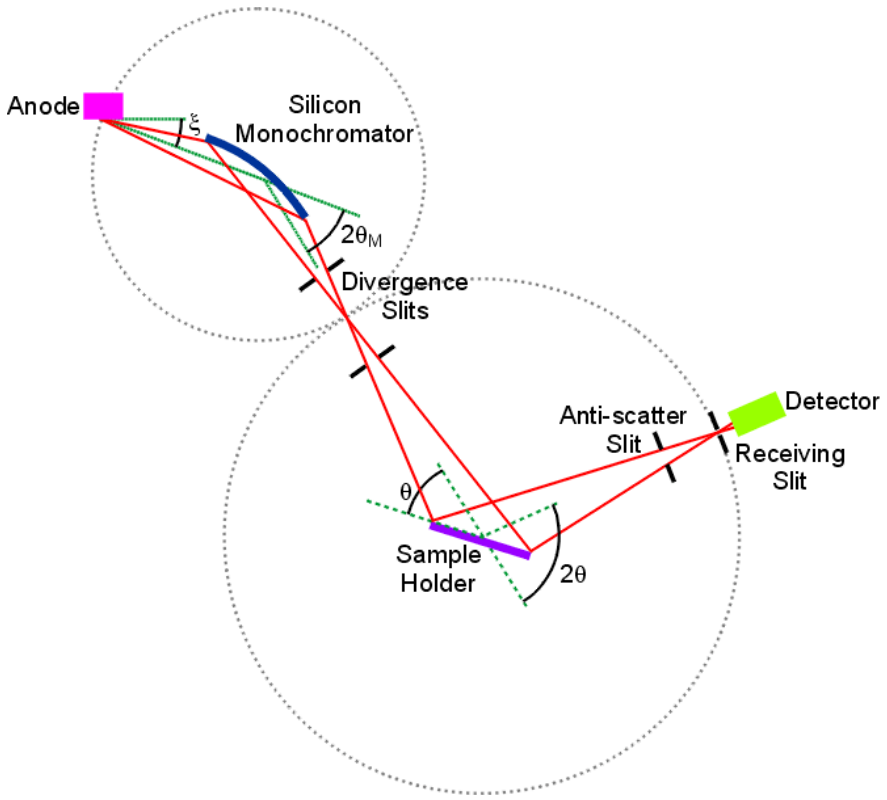
Αυτά τα ηλεκτρόνια επιβραδύνονται όταν προσκρούουν στα ηλεκτρόνια των εσωτερικών στιβάδων των ατόμων του στόχου. Τα ηλεκτρόνια των εσωτερικών στιβάδων απομακρύνονται και στη θέση τους δημιουργούνται οπές για πολύ μικρά χρονικά διαστήματα οι οποίες αναπληρώνονται από ηλεκτρόνια υψηλότερων ενεργειακών στιβάδων του ατόμου. Καθώς αυτά τα ηλεκτρόνια μεταπηδούν σε κατάσταση χαμηλότερης ενέργειας, εκπέμπουν συγκεκριμένη ακτινοβολία η οποία ανταποκρίνεται στα ενεργειακά επίπεδα του υλικού της ανόδου. Στο πείραμα η λάμπα πυρακτώσεως ήταν από χαλκό με μήκος κύματος K_{α}=1,5418710. Ο χαλκός χρησιμοποιείται στην πλειοψηφία των ανοδίων στα XRD αλλά πολλές φορές μπορεί το δείγμα να παρουσιάσει φαινόμενα φθορισμού και να εμφανιστεί θόρυβος που οφείλεται στην απορρόφηση και στην επανεκπομπή ακτινών Χ από το χάλκινο ανόδιο. Αυτό αντιμετωπίζεται με τη χρήση κοβάλτινων ανοδίων.



Εικόνα 44. Η δημιουργία των ακτίνων

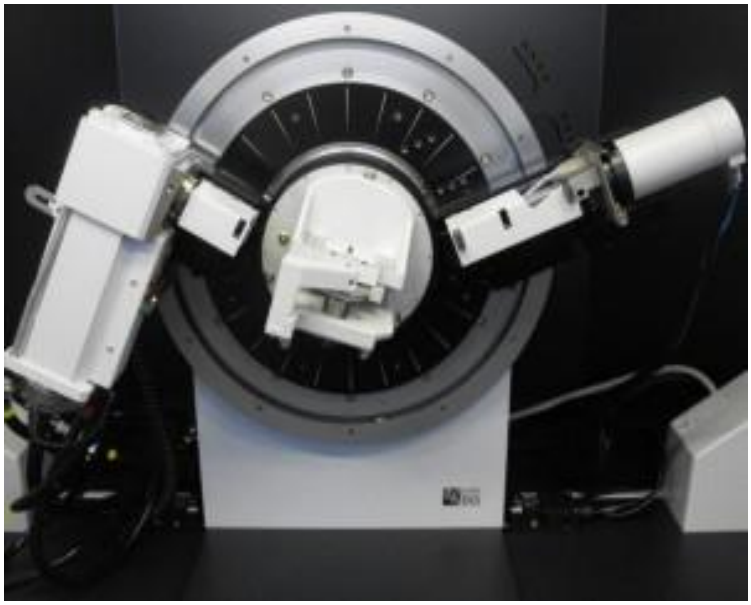
Μετά τη δημιουργία των ακτινών Χ από την πηγή, τα πρωτεύοντα οπτικά στοιχεία κατευθύνουν τις ακτίνες Χ απ την πηγή στο δείγμα. Αρχικά οι ακτίνες διέρχονται από δυο σχισμές. Η πρώτη μειώνει την αξονική απόκλιση της δέσμης έως και σε 2° με αποτέλεσμα μειωμένη ασυμμετρία στο διάγραμμα που προκύπτει. Η δεύτερη σχισμή μειώνει την απόκλιση καθ΄ύψος με αποτέλεσμα να στενεύει τις κορυφές και να αυξάνει την ανάλυση στο σήμα

εξόδου. Στη συνέχεια, η δέσμη διέρχεται απ τον μονοχρωμάτορα. Ο μονοχρωμάτορας είναι ένα φίλτρο που απορροφά το μεγαλύτερο μέρος τη K_b ακτινοβολίας.



Εικόνα 45. Η λογική περιστροφής για τη μέτρηση

Το δείγμα τοποθετείται σε περιστρεφόμενη τράπεζα και κινείται έτσι ώστε η δέσμη να "σαρώνει" όλη την επιφάνεια του δείγματος.



Εικόνα 46. Το XRD της σχολής μας

Τα δευτερεύοντα οπτικά στοιχεία συγκεντρώνουν τις περιθλώμενες από το δείγμα ακτίνες Χ. Αρχικά διέρχονται από μια αντι-σκεδαστική σχισμή που όχι μόνο ελαττώνει το ύψος της απόκλισης αλλά επίσης ελαττώνει σκεδασμένες ακτίνες Χ που διαχέονται λόγω άμορφων σημείων του δείγματος ή σκέδασης απ τον αέρα. Στη συνέχεια, διέρχονται από μια δεύτερη σχισμή που μειώνει την αξονική απόκλιση όπως και στα πρωτεύοντα οπτικά στοιχεία. Έπειτα, όπως φαίνεται στο σχήμα, η ακτίνα διέρχεται από μια σχισμή υποδοχής που βελτιώνει την ανάλυση του οργάνου αφαιρώντας τη σκεδασμένη ακτινοβολία και τέλος διέρχεται από ακόμη έναν μονοχρωμάτορα ο οποίος επιτρέπει μόνο στην K_α ακτινοβολία να εισέλθει στον ανιχνευτή και αφαιρεί τη φθορίζουσα ακτινοβολία που προέρχεται απ το δείγμα.

Τέλος, ο ανιχνευτής μετατρέπει τις ακτίνες Χ σε ορατό φώς, έπειτα σε φωτοηλεκτρόνια και το ενισχύει με έναν πολλαπλασιαστή. Αποτελείται από έναν σπινθηριστής ο οποίος είναι ένα υλικό που εκπέμπει ορατό φως όταν εκτίθεται σε ακτίνες Χ. Το ορατό φως διέρχεται από έναν φωτοπολλαπλασιαστή και υπολογίζεται από ηλεκτρονικό εξοπλισμό για να ποσοτικοποιήσει το σήμα.

Εικόνα 47. Ανιχνευτής BRUCKER

Η ποιότητα του διφρακτογράμματος εξαρτάται από το λόγο σήματος προς θόρυβο και από την ανάλυση. Το ένα εξαρτάται άμεσα απ το άλλο και πρέπει να γίνουν συμβιβασμοί για τα βέλτιστα αποτελέσματα στο εκάστοτε πείραμα. Το ιδανικό διφρακτόγραμμα έχει ψηλές και λεπτές κορυφές. Οι παράμετροι που έχουν σημασία για τη μέτρηση είναι:

- Η απόσταση των κορυφών και η θέση τους. Η απόσταση δίνει στοιχεία για την κρυσταλλική ομάδα στην οποία ανήκει το δείγμα. Η θέση των κορυφών περιγράφει το μέγεθος της μοναδιαίας κυψελίδας
- Οι τιμές της έντασης και τα σχήματα των κορυφών. Η ένταση δίνει πληροφορίες σχετικά με τα στοιχεία που υπάρχουν στον κρύσταλλο
- Η κατανομή της έντασης σε συνάρτηση με τη γωνία περίθλασης.

Αυτές οι παράμετροι συγκρίνονται με βάσεις δεδομένων αυτόματα και δίνονται οι ζητούμενες πληροφορίες.

Προτού γίνει η ανάλυση το δείγμα είχε λειανθεί και στιλβωθεί προκειμένου η επιφάνεια του να είναι κατάλληλη για τη μέτρηση.

8.2 SEM (Scanning Electron Microscopy)

Εικόνα 48. Το SEM της σχολής μας

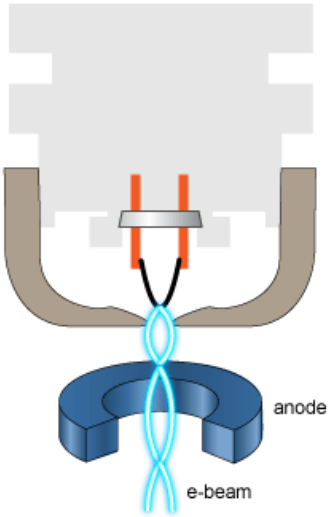
Το ηλεκτρονικό μικροσκόπιο σάρωσης που χρησιμοποιήθηκε είναι τύπου JEOL JSM 6380LV με ανιχνευτή INCA X-sight OXFORD INSTRUMENTS.

Ένα ηλεκτρονικό μικροσκόπιο σάρωσης είναι ένα μηχάνημα που αποτελείται από μία γεννήτρια ηλεκτρονίων που λέγεται electron gun, μια στήλη μέσα στην οποία ταξιδεύει η δέσμη ηλεκτρονίων, μια σειρά από φακούς που ο ρόλος τους είναι να κατευθύνουν τη δέσμη, ένα θάλαμο για το δείγμα στη βάση και κάποιες αντλίες που εξασφαλίζουν συνθήκες κενού. Η λειτουργία του βασίζεται στην αρχή ότι υπό ορισμένες συνθήκες, ταχέως κινούμενα ηλεκτρόνια μπορούν να συμπεριφερθούν σα φως πολύ μικρού μήκους κύματος.

Η εικόνα που δίνεται από το SEM είναι ηλεκτρονική και όχι η μεγέθυνση του δείγματος. Η δέσμη ηλεκτρονίων σαρώνει την επιφάνεια του δείγματος και ανάλογα με την τοπογραφία και τη σύσταση του δείγματος, η σκέδαση των ηλεκτρονίων δίνει πληροφορίες για το εκάστοτε σημείο του δείγματος. Η σάρωση των σημείων του δείγματος είναι συγχρονισμένη με τα αποτελέσματα που προκύπτουν στην οθόνη. Μεγέθυνση σε ένα σημείο

επιτυγχάνεται με επιλογή σάρωσης μικρότερης επιφάνειας. Το όριο της μεγέθυνσης καθορίζεται από τη σύνθεση και τη δομή του δείγματος. Για παράδειγμα μέταλλα με μεγάλο ατομικό αριθμό Z παράγουν μεγάλο αριθμό ηλεκτρονίων και επομένως δίνουν καλύτερη μεγέθυνση από αυτή που θα έδιναν δείγματα με μικρό ατομικό αριθμό όπως ο άνθρακας και το πλαστικό.

Το electron gun παράγει μια δέσμη ηλεκτρονίων. Τα πιο απλά και οικονομικά χρησιμοποιούν ένα θερμαινόμενο νήμα βολφραμίου ενώ σε πιο ακριβά χρησιμοποιούνται κρύσταλλοι (πχ λανθάνιο εξαβορίδιο LaB_6). Το νήμα φυλάσσεται μέσα σε έναν κύλινδρο (Wehnelt cylinder) ο οποίος έχει μία μικρή οπή στο κέντρο απ όπου εξέρχονται τα ηλεκτρόνια. Τα άκρα του ηλεκτροδίου προσεγγίζουν το νήμα μέσω ενός μονωμένου δίσκου και μεταφέρουν στο νήμα το ρεύμα. Κάτω από τον κύλινδρο βρίσκεται μία άνοδος η οποία έλκει τα ηλεκτρόνια από το νήμα.



Εικόνα 49. Electron gun

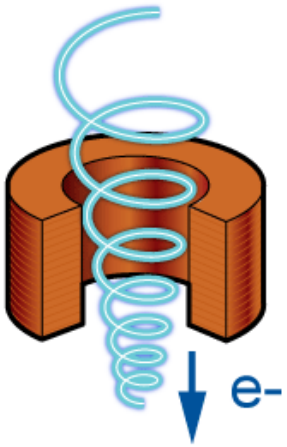
Όσο πιο μεγάλη είναι η παροχή του ρεύματος στο νήμα, τόσο πιο μεγάλος αριθμός ηλεκτρονίων παράγεται. Υπάρχει όμως μια οριακή τιμή κορεσμού μετά την οποία με αύξηση του ρεύματος, η παραγωγή ηλεκτρονίων δεν αυξάνεται. Αντίθετα, μειώνεται ο χρόνος ζωής του νήματος και μπορεί ακόμα και να σπάσει πρόωρα.

Για να αποφευχθεί σκέδαση της δέσμης ηλεκτρονίων προτού φτάσει στο δείγμα, απαιτείται να υπάρχουν συνθήκες υψηλού κενού. Αυτό είναι σημαντικό γιατί σκέδαση ή εξασθένηση της δέσμης συνεπάγεται αύξηση του μεγέθους της δέσμης και άρα μείωση της ανάλυσης. Το υψηλό κενό συμβάλλει και στην αποτελεσματική συλλογή ειδικά των δευτερευόντων ηλεκτρονίων. Αντίθετα, επειδή τα οπισθοσκεδαζόμενα ηλεκτρόνια και οι

ακτίνες Χ είναι υψηλότερης ενέργειας απ τα δευτερεύοντα, η ανίχνευσή τους δεν εξαρτάται απ το υψηλό κενό. Οι ανιχνευτές μπορούν να λειτουργήσουν σε χαμηλό κενό όπου επιτρέπεται σε μια μικρή ποσότητα αέρα να εισχωρήσει στο θάλαμο η οποία προκαλεί ιονισμό και μειώνει την επιφανειακή φόρτιση (συγκέντρωση ηλεκτρονίων της δέσμης στην επιφάνεια που μπορεί να προκαλέσει εκτροπή της δέσμης ή αποφόρτιση) των μη αγώγιμων δειγμάτων προσφέροντας έτσι πιο σταθερή εικόνα.

Προκειμένου να φτάσει στο δείγμα μια μικρή εστιασμένη δέσμη ηλεκτρονίων, πρέπει αυτή να διέλθει από μια σειρά ηλεκτρομαγνητικών φακών και διαφραγμάτων.

Ο ηλεκτρομαγνητικός φακός είναι ένα πηνίο απ το οποίο διέρχεται ρεύμα και δημιουργεί μαγνητικό πεδίο δεξιόστροφα σύμφωνα με το νόμο του Lorentz. Το πεδίο που δημιουργείται ωθεί τη δέσμη ηλεκτρονίων να διέλθει από την τρύπα του πηνίου χωρίς να αλλάξει τη σπειροειδή κίνηση της.

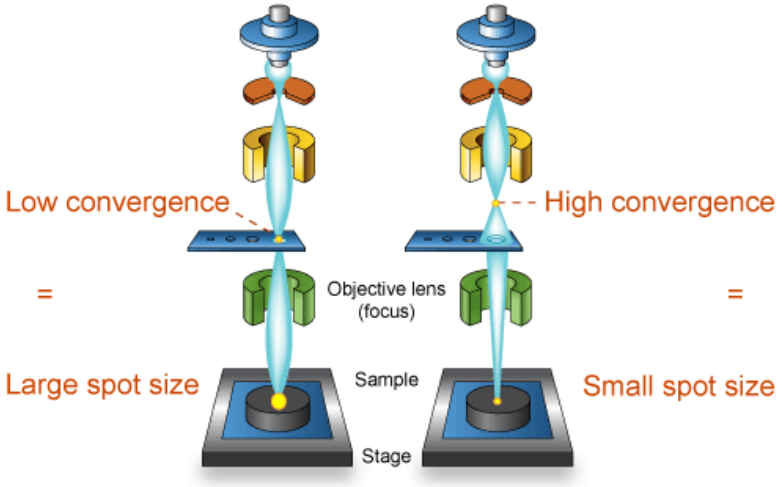


Εικόνα 50. Ηλεκτρομαγνητικός φακός

Ο ρόλος του φακού είναι να δώσει την επιθυμητή κατεύθυνση στις ακτίνες. Τα υλικά που χρησιμοποιούνται είναι γυαλί ή διαφανές πλαστικό. Στο SEM όμως δεν υπάρχουν ακτίνες φωτός αλλά δέσμες ηλεκτρονίου. Τα ηλεκτρόνια είναι φορτισμένα σωματίδια και η πορεία τους μπορεί να καμφθεί με μαγνητικό πεδίο επομένως χρησιμοποιούνται φερρομαγνητικά υλικά η σπείρες χάλκινων καλωδίων. Μεταβάλλοντας το ρεύμα που διέρχεται το πηνίο, μπορεί να αλλάξει και η κατεύθυνση της δέσμης. Αυτοί οι φακοί ονομάζονται ηλεκτρομαγνητικοί.

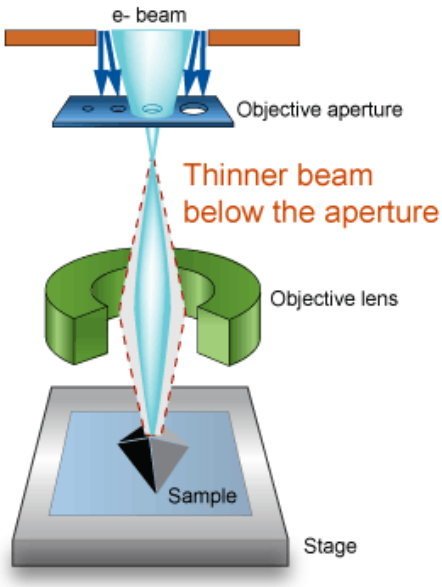
Υπάρχουν δυο σετ φακών. Ο συγκεντρωτικός που βρίσκεται αμέσως μετά το electron gun και συγκεντρώνει τη δέσμη ηλεκτρονίων που εκπέμπονται από τη νήμα βολφραμίου, και ο αντικειμενικός φακός που εστιάζει τη δέσμη σε συγκεκριμένο σημείο πάνω στην επιφάνεια

του δείγματος. Ο συγκεντρωτικός φακός συγκλίνει τον κώνο της δέσμης σε κάποιο σημείο και στη συνέχεια αυτό ξαναπλαταίνει και ξανασυγκλίνει στον αντικειμενικό φακό. Όσο πιο κοντά βρίσκεται η σύγκλιση στο φακό τόσο πιο μικρή είναι η σημειακή διάμετρος ενώ πλαταίνει όσο απομακρύνεται το σημείο σύγκλισης απ το φακό. Η διάμετρος του αρχικού σημείου σύγκλισης (cross-over point) επηρεάζει την τελική διάμετρο του cross over point πάνω στο δείγμα.



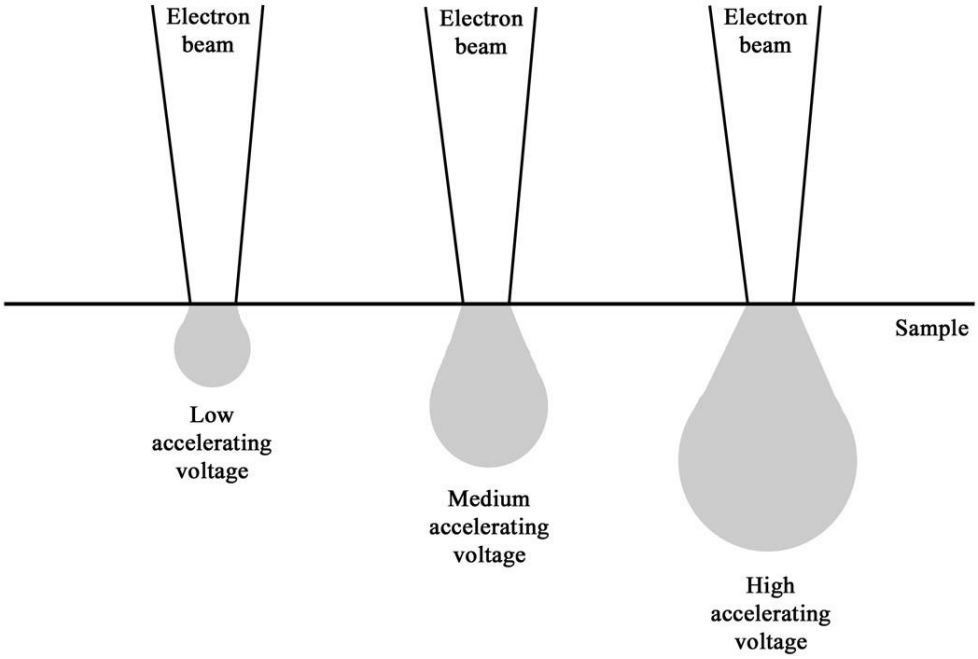
Εικόνα 51. Σύγκλιση δέσμης ηλεκτρονίων

Το διάφραγμα βρίσκεται πάνω απ τον αντικειμενικό φακό. Είναι μια μεταλλική ράβδος που φέρει μια λεπτή πλάκα με 4 οπές. Πάνω απ αυτή την πλάκα, εφαρμόζεται ένα πολύ πιο λεπτό παραλληλόγραμμο που έχει κι αυτό οπές διαφορετικής διαμέτρου. Μετακινώντας τη ράβδο, οπές διαφορετικής διαμέτρου μπορούν να ευθυγραμμιστούν και να βρεθούν στην πορεία της δέσμης ηλεκτρονίων. Με αυτόν τον τρόπο διακόπτεται η πορεία για τα ηλεκτρόνια που βρίσκονται εκτός του άξονα της δέσμης ή έχουν διαφορετική τιμή ενέργειας.



Εικόνα 52. Αντικειμενικός φακός

Θεωρητικά, με αύξηση επιταχυνόμενου δυναμικού δίνεται υψηλότερο σήμα και χαμηλότερος θόρυβος στην τελική εικόνα. Στην πραγματικότητα όμως, αυτή η αύξηση μπορεί να προκαλέσει μείωση στις δομικές λεπτομέρειες στην επιφάνεια του δείγματος, φόρτιση ηλεκτρονίων στην επιφάνεια των μη αγώγιμων υλικών και υπερθέρμανση του δείγματος ακόμα και καταστροφή του. Η αύξηση της τάσης εξασφαλίζει μεγαλύτερη διείσδυση στο δείγμα και ο όγκος επιρροής είναι επίσης μεγαλύτερος. Ο αυξημένος αριθμός των οπισθοσκεδαζόμενων ηλεκτρονίων δίνει φωτεινότερη εικόνα αλλά η ανάλυση είναι χειρότερη.



Εικόνα 53. Διείσδυση ηλεκτρονίων συναρτήσει της τάσης

Όσο μικρότερος είναι ο ατομικός αριθμός Z του δείγματος, τόσο μεγαλύτερη είναι η διείσδυση της δέσμης ηλεκτρονίων και αντίστροφα.

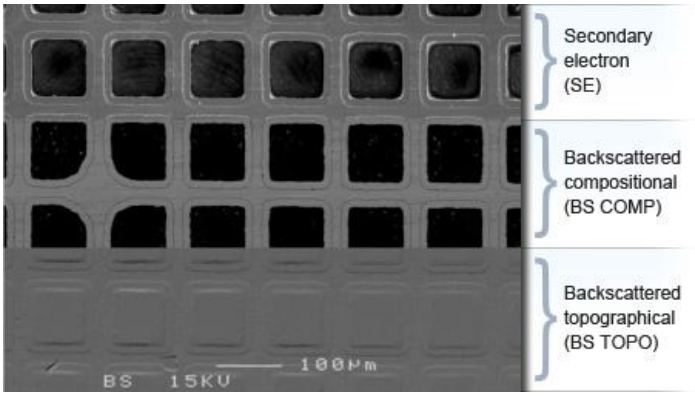
Η δημιουργία της εικόνας προέρχεται από τα δευτερεύοντα ηλεκτρόνια ή από τα οπισθοσκεδαζόμενα.

Τα δευτερεύοντα ηλεκτρόνια σχηματίζουν την εικόνα της επιφάνειας. Είναι ηλεκτρόνια χαμηλής ενέργειας (κάτω από 50eV) που προέρχονται από ανελαστική σκέδαση. Προέρχονται από ηλεκτρόνια του δείγματος που έχουν χαλαρό δεσμό με το άτομο. Η χαμηλή ενέργεια τους τα καθιστά εύκολα στη συλλογή τους με τη χρήση μιας θετικά φορτισμένης σχάρας η οποία έλκει τα αρνητικά ηλεκτρόνια και τα οδηγεί στον ανιχνευτή. Η παράμετρος που παίζει το βασικότερο ρόλο στην εικόνα του SEM είναι η τοπογραφία της επιφάνειας του δείγματος. Οι ακμές των στοιχείων του δείγματος φαίνονται πιο φωτεινές γιατί παράγουν περισσότερα ηλεκτρόνια. Πολλές φορές τα δείγματα επικαλύπτονται από ένα λεπτό φιλμ (10nm) κάποιου βαρέος μετάλλου προκειμένου να μειωθεί η επιφανειακή φόρτιση των μη αγώγιμων υλικών και για ενίσχυση της παραγωγής δευτερευόντων ηλεκτρονίων για τα δείγματα χαμηλού ατομικού αριθμού Z. Επειδή η ενέργεια των δευτερευόντων ηλεκτρονίων είναι πολύ χαμηλή, μόνο αυτά που παράγονται στην επιφάνεια του δείγματος μπορούν να ξεφύγουν και να συλλεχθούν από τον ανιχνευτή. Οι περιοχές του δείγματος που δεν ¨βλέπουν" προς τον ανιχνευτή ή εμποδίζονται από στοιχεία της τοπογραφίας της επιφάνειας του δείγματος

εμφανίζονται πιο σκοτεινά στην οθόνη σε σχέση με τις επιφάνειες που "βλέπουν" προς τον ανιχνευτή.

Τα οπισθοσκεδαζόμενα ηλεκτρόνια είναι ηλεκτρόνια υψηλής ενέργειας (>50eV) της δέσμης ηλεκτρονίων τα οποία όταν προσκρούουν στο δείγμα, αποβάλλονται. Προέρχονται δηλαδή από την ελαστική σκέδαση των ηλεκτρονίων της δέσμης με τα άτομα του δείγματος. Αυτά τα ηλεκτρόνια δίνουν διαφορετική εικόνα απ τα δευτερεύοντα που χρησιμοποιεί την αντίθεση λευκού-μαύρου για να δώσει πληροφορίες σχετικά με το μέσο ατομικό αριθμό του δείγματος. Όσο πιο μεγάλος είναι ο ατομικός αριθμός, τόσο πιο πολλά ηλεκτρόνια της δέσμης σκεδάζονται και δίνουν φωτεινότερη εικόνα. Τα οπισθοσκεδαζόμενα ηλεκτρόνια έχουν περίπου ίση ενέργεια με αυτή των ηλεκτρονίων της δέσμης με αποτέλεσμα να μπορούν να διεισδύσουν πιο βαθιά στο δείγμα απ ότι τα δευτερεύοντα δίνοντας έτσι περισσότερες πληροφορίες που δεν αφορούν μόνο την επιφάνεια. Απ την άλλη όμως δίνουν χειρότερη ανάλυση. Τα δείγματα πρέπει να μην είναι επικαλυμμένα με επιστρώσεις όταν ζητούνται πληροφορίες σχετικά με τη σύσταση του δείγματος. Για μη αγώγιμα δείγματα η κατάλληλη επικάλυψη είναι ο άνθρακας που έχει χαμηλό ατομικό αριθμό και ενισχύει την αγωγιμότητα χωρίς να επηρεάζει τη σύσταση κάτω απ την επικάλυψη.

Συνήθως οι ανιχνευτές των οπισθοσκεδαζόμενων ηλεκτρονίων είναι στερεάς κατάστασης και περιέχουν ένα πλακίδιο όπως αυτό της εικόνας από πυρίτιο που χωρίζεται σε τομείς που μπορούν που μεταβάλλονται ανάλογα με την εικόνα που ζητείται. Για τη σύσταση του δείγματος και για πληροφορίες σχετικά με τον μέσο ατομικό του αριθμό, χρησιμοποιείται το τυπικό σήμα από τα οπισθοσκεδαζόμενα ηλεκτρόνια και ονομάζεται COMP (compositional) ενώ για πληροφορίες σχετικά με την τοπογραφία της επιφάνειας χρησιμοποιείται η λειτουργεία TOPO.



Εικόνα 54. Πλακίδιο πυριτίου

Για την ακριβέστερη δυνατή λήψη δεδομένων είναι προτιμητέο να χρησιμοποιείται επίπεδο δείγμα αλλιώς η τοπογραφία της επιφάνειας θα αλλοιώσει το σήμα που φτάνει στον ανιχνευτή. Για στιλβωμένα δείγματα, τα πιο πυκνά υλικά δίνουν υψηλά-φωτεινά σήματα ενώ τα λιγότερο πυκνά δίνουν χαμηλότερο σήμα. Έτσι, τα οπισθοσκεδαζόμενα ηλεκτρόνια δίνουν πληροφορίες σχετικά με την ανομοιογένεια της σύστασης του δείγματος μέσω της αντίθεσης των ατομικών αριθμών. Οι διαβαθμίσεις του γκρι υποδεικνύουν το μέσο ατομικό αριθμό Z των φάσεων και έτσι να αναγνωριστούν και ταξινομηθούν οι φάσεις αλλά δε μπορούν να υποδείξουν τα στοιχεία που υπάρχουν στο δείγμα ούτε τις συγκεντρώσεις τους.

Η βασική λειτουργία του ανιχνευτή των δευτερευόντων ηλεκτρονίων είναι να έλκει τα δευτερεύοντα ηλεκτρόνια χαμηλής ενέργειας που προέρχονται απ τα πρώτα 15nm της επιφάνειας. Αν το SEM δεν ρυθμιστεί κατάλληλα, ώστε να απομονώσει τη συμβολή των οπισθοσκεδαζόμενων ηλεκτρονίων, η εικόνα που θα δώσει ο ανιχνευτής θα περιέχει πληροφορίες για την περιοχή κάτω απ την επιφάνεια που δίνονται από τα οπισθοσκεδαζόμενα ηλεκτρόνια υψηλότερης ενέργειας. Γενικότερα, όσο περισσότερα είναι τα kV, τόσο πιο πολλές πληροφορίες για την περιοχή κάτω απ την επιφάνεια συλλέγονται από τα οπισθοσκεδαζόμενα ηλεκτρόνια.

Η εικόνα που δίνει το SEM είναι μια απεικόνιση της επιφάνειας του δείγματος που αντιπροσωπεύει την ένταση των ηλεκτρονίων που σκεδάζονται από κάθε σημείο του δείγματος. Με τις κατάλληλες ρυθμίσεις μπορεί να ελεγχθεί η αντίθεση και η φωτεινότητα της εικόνας.

Η απόσταση από το δείγμα (working distance) είναι η απόσταση μεταξύ της βάσης της στήλης του SEM και του ανώτερου σημείου του δείγματος. Αυτή η απόσταση μπορεί να μεταβληθεί με κατακόρυφη μετακίνηση του θαλάμου που φέρει το δείγμα. Όσο πιο μικρή είναι η απόσταση τόσο πιο μικρή είναι η διάμετρος της δέσμης που πέφτει στην επιφάνεια του δείγματος. Η απόσταση στην οποία μελετήθηκαν τα δείγματα ήταν 15mm. Μικρή απόσταση δίνει υψηλή ανάλυση αλλά μικρό εστιακό βάθος.

Το δείγμα πριν εξεταστεί στοSEM, πρέπει να τοποθετηθεί στην ειδική βάση και να κολληθεί προκειμένου να είναι σταθερό κατά τη διαδικασία.

Πριν αρχίσει η διαδικασία, το δείγμα υποβάλλεται σε χημική προσβολή προκειμένου η επιφάνεια να διαβρωθεί και τα μικρογραφικά χαρακτηριστικά να γίνουν πιο έντονα άρα να δώσουν και πιο διακριτές εικόνες. Τα διαβρωτικά που χρησιμοποιούνται συνήθως είναι ακετόνη τολουόνη, ή αλκοόλη.

8.3 TEM (Transmission Electron Microscope)

Στο ηλεκτρονικό μικροσκόπιο διέλευσης, ΗΜΔ, η πηγή ηλεκτρονίων αποτελείται ένα νήμα βολφραμίου (ή ακίδα LaB_6) που με την πυράκτωσή, όταν περάσει από αυτό ηλεκτρικό ρεύμα, εκπέμπει ηλεκτρόνια. Μεταξύ του νήματος, που αποτελεί την κάθοδο, και της ανόδου, εφαρμόζεται μια διαφορά δυναμικού (συνήθως της τάξης των 60-100 kV) η οποία επιταχύνει τα ηλεκτρόνια. Η πορεία των ηλεκτρονίων, ρυθμίζεται από τους ηλεκτρομαγνητικούς φακούς στους οποίους αλλάζοντας την ένταση του ρεύματος που τους διαπερνάει, μπορούμε να μεταβάλλουμε την ένταση του μαγνητικού πεδίου τους (δηλαδή την εστιακή τους απόσταση) και επομένως να εστιάσουμε τη δέσμη των ηλεκτρονίων πάνω στο παρασκεύασμα.

Οι κύριες ρυθμίσεις σ' ένα ΗΜΔ επιτυγχάνονται με:

1. τον συγκεντρωτή φακό (condenser lens), εστίαση της δέσμης στο παρασκεύασμα.
2. τον αντικειμενικό φακό (objective lens), εστίαση της εικόνας στην οθόνη.

Η εικόνα σχηματίζεται πάνω σε μια οθόνη επικαλυμμένη με φωσφορίζουσα ουσία η οποία διεγείρεται από τα ηλεκτρόνια που πέφτουν επάνω της, αφού αυτά διαπεράσουν το παρασκεύασμα. Τα σημεία του παρασκευάσματος που δεν είναι διαπερατά από τα ηλεκτρόνια, μας δίνουνσκοτεινές περιοχές (ηλεκτρονιόφιλες, ηλεκτρονιακά πυκνές, electron dense) ενώ αντίθετα τα διαπερατά σημεία (ηλεκτρονιακά διαφανή, electron lucent) μας δίνουν φωτεινές περιοχές. Αυτή η διαφοροποίηση επιτυγχάνεται με την εκλεκτική «χρώση» του παρασκευάσματος.

Φυσικά αυτές τις εικόνες εκτός του ότι μπορούμε να τις παρατηρήσουμε απ' ευθείας στην οθόνη του μικροσκοπίου, μπορούμε και να τις απεικονίσουμε με τις ειδικές φωτογραφικές μηχανές που είναι πάντα ενσωματωμένες στα μικροσκόπια. Τα πιο σύγχρονα μικροσκόπια διαθέτουν ενσωματωμένη ψηφιακή κάμερα και μικροϋπολογιστή και έτσι μπορεί να γίνει απ’ εθείας ψηφιοποίηση και αποθήκευση της εικόνας

Επειδή τα ηλεκτρόνια δε μπορούν να ταξιδέψουν στον αέρα, το όλο σύστημα, πηγή ηλεκτρονίων, φακοί, παρασκεύασμα, οθόνη και σύστημα φωτογράφισης θα πρέπει να βρίσκονται σε υψηλό κενό της τάξης των 10^4 Torr τουλάχιστον.

Ο τρόπος που λειτουργεί το ηλεκτρονικό μικροσκόπιο, μας θέτει πολλούς περιορισμούς ως προς τη φύση των δειγμάτων που μπορούμε να παρατηρήσουμε.

Έτσι ένα δείγμα για να είναι δυνατό να παρατηρηθεί με το κλασσικό ΗΜΔ και με τις κλασσικές μεθόδους θα πρέπει να έχει τις παρακάτω ιδιότητες:

α. να αντέχει σε υψηλό κενό,

β. να είναι σταθερό στο βομβαρδισμό ηλεκτρονίων,

γ. να είναι αρκετά λεπτό για να μπορούν να το διαπερνούν τα ηλεκτρόνια,

δ. να επιτρέπει τη διαφορική σκέδαση των ηλεκτρονίων.

Αυτές οι ιδιότητες που πρέπει να έχει ένα παρασκεύασμα, μας περιορίζουν στο να μπορούμε να εξετάσουμε μόνο μονιμοποιημένα δείγματα (νεκρά), αφυδατωμένα, κομμένα σε πολύ λεπτές τομές (πάχος 50-100 nm) και «χρωματισμένα» με «χρωστικές» που περιέχουν βαριά μέταλλα, όπως για παράδειγμα είναι ο μόλυβδος και το ουράνιο.

Κλασσικές τεχνικές προετοιμασίας προετοιμασία βιολογικών δειγμάτων για παρατήρηση στο ΗΜΔ.

Ένα βιολογικό δείγμα για να αποκτήσει τις πιο πάνω ιδιότητες θα πρέπει να υποβληθεί στην πιο κάτω διαδικασία:

α. Μονιμοποίηση (στερέωση, καθήλωση, προσήλωση, fixation). Έχει ως σκοπό την ακινητοποίηση (νέκρωση) όλων των διαδικασιών του κυττάρου και μπορεί να επιτευχθεί με χημικούς και φυσικούς τρόπους. Οι χημικοί τρόποι, που είναι και οι πιο συνηθισμένοι) περιλαμβάνουν επεξεργασία του δείγματος με ουσίες όπως οι αλδεΰδες (φορμαλδεΰδη HCHO, παραφορμαλδεΰδη, γλουταρική αλδεΰδη $CHOCH_2CH_2CH_2CHO$ και μίγματά τους) ή άλλες ουσίες όπως η ακρολεΐνη CH_2CH_2CHO, το τετροξείδιο του οσμίου OsO_4, το υπερμαγγανικό κάλιο $KMnO_4$, κ.ά. διαλυμένα σε κατάλληλα ρυθμιστικά διαλύματα (φωσφορικά, κακοδυλικό νάτριο, veronal acetate, PIPES κλπ.) των οποίων η συγκέντρωση και το pH πρέπει να είναι ρυθμισμένα με μεγάλη ακρίβεια. Οι φυσικοί τρόποι μονιμοποίησης χρησιμοποιούν γρήγορη ψύξη του δείγματος, συνήθως με υγρό N_2 ή Freon σε θερμοκρασία υγρού N_2. Αυτές οι μέθοδοι είναι ιδιαίτερα χρήσιμες σε περιπτώσεις όπου χρειάζεται να διατηρηθεί η δραστικότητα ουσιών όπως τα νουκλεϊκά οξέα (DNA, RNA) ή οι πρωτεΐνες (ένζυμα).

β. Αφυδάτωση. Σ' αυτό το στάδιο γίνεται αντικατάσταση του νερού του μονιμοποιημένου δείγματος με αιθυλική αλκοόλη ή ακετόνη και στη συνεχεία με τον ενδιάμεσο διαλύτη 1,2-

εποξυπροπάνιο (προπυλενοξείδιο) που είναι διαλύτης των εποξικών ρητινών που χρησιμοποιούνται στο επόμενο στάδιο.

γ. Εμπότιση - έγκλειση. Για να μπορέσει να κοπεί ένα βιολογικό παρασκεύασμα σε λεπτές τομές θα πρέπει το μέσο αφυδάτωσης ν' αντικατασταθεί με το μέσο έγκλεισης που πριν πολυμεριστεί είναι υγρό και στερεοποιείται με πολυμερισμό όταν εκτεθεί σε υψηλή θερμοκρασία (περίπου 70°C) ή υπεριώδη ακτινοβολία. Τα μέσα έγκλεισης είναι συνήθως εποξικές ή άλλες ρητίνες με διάφορα εμπορικά ονόματα όπως Araldite,Spurr, LR-White κ.ά.

δ. Τμήση τομών Τα δείγματα κατόπιν κόβονται σε πολύ λεπτές τομές, πάχους 50-100 nm, με τον υπερμικροτόμο, και τοποθετούνται πάνω σε ειδικά πλέγματα, (grids, αντίστοιχα με τις αντικειμενοφόρους πλάκες) που τοποθετούνται στο ΗΜΔ.

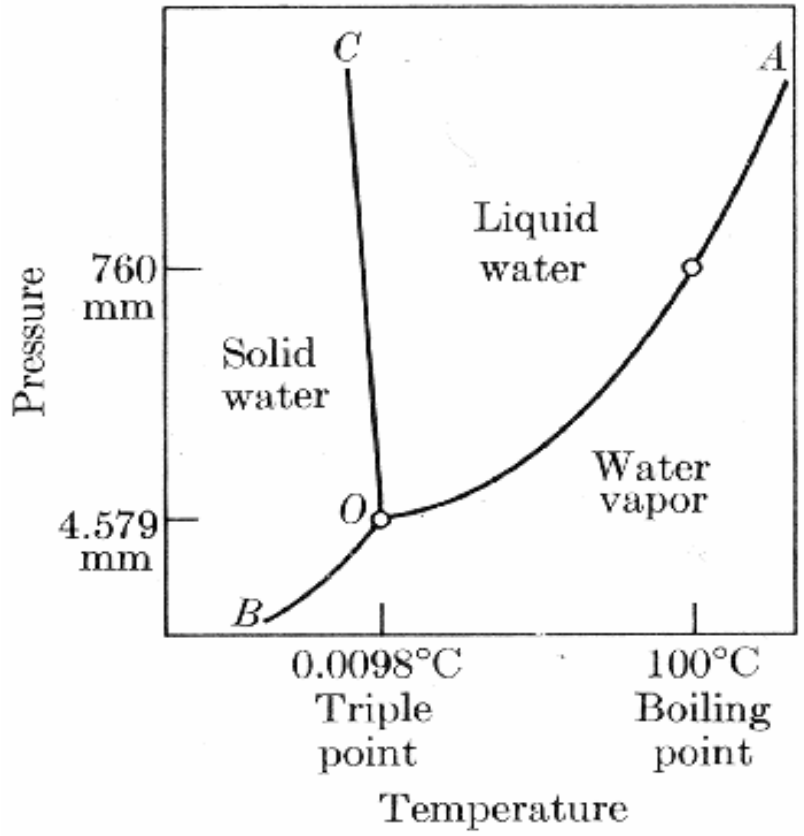
ε. Χρώση. Συνήθως τα βιολογικά δείγματα είναι τελείως διαπερατά από τα ηλεκτρόνια γιατί τα στοιχεία από τα οποία αποτελούνται (συνήθως C, H, O και N) είναι πολύ ελαφριά για να σκεδάσουν τα επιταχυνμένα ηλεκτρόνια και να δώσουν την απαιτούμενη αντίθεση (contrast). Για το λόγο αυτό χρειάζεται να τα «χρωματίσουμε» με χημικές ουσίες που δεσμεύονται εκλεκτικά από τα διάφορα συστατικά του κυττάρου, με αποτέλεσμα τη διαφορική σκέδαση των ηλεκτρονίων και το σχηματισμό της εικόνας. Οι πιο συνηθισμένες χρωστικές για τη χρώση τομών είναι το οξικό ουρανύλιο, ο κιτρικός μόλυβδος και το υπερμαγγανικό κάλιο.

8.4 ΛΥΟΦΙΛΙΩΣΗ

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

Η μέθοδος της λυοφιλίωσης έχει ευρεία εφαρμογή στη φαρμακευτική βιομηχανία καθώς και στη βιομηχανία τροφίμων. Ουσιαστικά, χρησιμοποιείται για να αφυδατώσει θερμοευαίσθητα τρόφιμα ή προϊόντα με υψηλή εμπορική αξία ή για ειδικές δραστηριότητες. Η λειτουργία της βασίζεται στην εξάχνωση, δηλαδή στη μετατροπή του νερού από πάγο σε ατμό χωρίς να περάσει από την υγρή φάση. Οι

συνθήκες θερμοκρασίας και πίεσης που είναι απαραίτητες για να συμβεί το φαινόμενο της εξάχνωσης προκύπτουν από το διάγραμμα φάσεων του νερού και σε συνθήκες χαμηλότερες του τριπλού σημείου του νερού. Αναλυτικότερα,
όταν η θερμοκρασία είναι χαμηλότερη από 0°C, σχηματίζεται καθαρός πάγος στο εσωτερικό του προς ξήρανση δείγματος, ο οποίος μπορεί να εξαχνωθεί με την εφαρμογή κατάλληλων συνθηκών κενού.

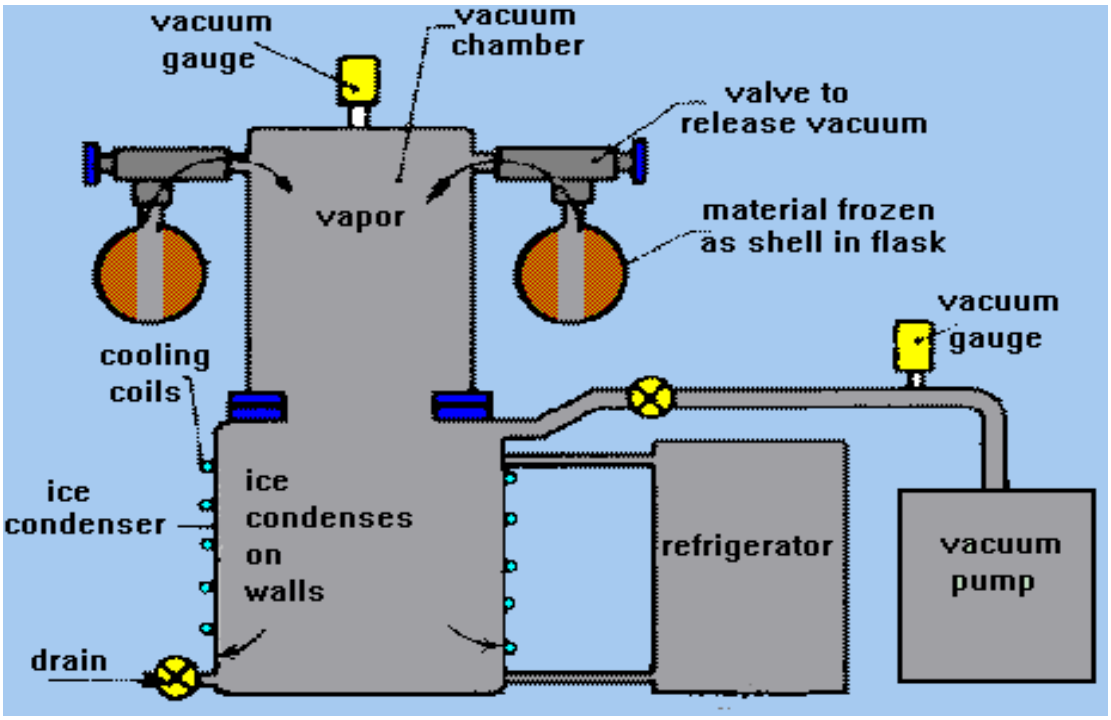


Εικόνα 55. Διάγραμμα πίεσης/θερμοκρασίας των φάσεων του νερού.

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

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

Ένας κύκλος λυοφιλίωσης αποτελείται από τρία διαδοχικά στάδια: κατάψυξη, πρώτοστάδιο 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 (Tg) της άμορφης μήτρας του. Το πρώτο στάδιο της ξήρανσης πραγματοποιείται με τη μείωση της πίεσης του θαλάμου και την αύξηση της θερμοκρασίας των ραφιών (με σκοπό την παροχή ενέργειας για την εξάχνωση), με αποτέλεσμα την απομάκρυνση των κρυστάλλων πάγου από το υλικό. Η εξάχνωση αρχικά πραγματοποιείται στην επιφάνεια των δειγμάτων και σταδιακά εξελίσσεται προς το εσωτερικό τους. Η διατήρηση της θερμοκρασίας των δειγμάτων κάτω από τη θερμοκρασία κατάρρευσής τους (Tc) 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.



Εικόνα 56. Σχηματικό διάγραμμα συσκευής λυοφιλίωσης

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

Η τεχνική της λυοφιλίωσης ήταν γνωστή αιώνες πριν από τους Ίνκας και τους Ινδιάνους οι οποίοι αποθήκευαν πατάτες, καθώς και άλλα γεωργικά προϊόντα σε μεγάλο υψόμετρο πάνω στα βουνά, όπου οι χαμηλές θερμοκρασίες λόγω του χιονιού και κατά τη διάρκεια της νύχτας, καθώς και η χαμηλή πίεση λόγω υψομέτρου, βοηθούσαν στη διατήρηση και στη μείωση του βάρους των τροφίμων τους. Στη σύγχρονη εποχή από το 1930 η τεχνική της λυοφιλίωσης άρχισε να έχει εμπορικήσημασία στην ξήρανση φαρμακευτικών και βιολογικών ουσιών (εμβόλια ένζυμα, αντιβιοτικά κ.ά.) και από το 1951 και μετά ξεκίνησε να χρησιμοποιείται και στον τομέα επεξεργασίας και διατήρησης τροφίμων.

Η συσκευή λυοφιλίωσης που χρησιμοποιήθηκε στο εργαστήριο ήταν της εταιρείας Telstar, τύπου LyoQuest.

Οι παράμετροι λειτουργίας της συσκευής είναι:

- Θερμοκρασία κατάψυξης: -55°C
- Συνθήκες κενού: 0,350 mbar

Εικόνα 57. Συσκευή λυοφιλίωσης του εργαστηρίου

8.5 ELISA (Enzyme –Linked Immuno Sorbent Assay)

Η ELISA αποτελεί μια ανοσοενζυμική δοκιμασία της αναλυτικής βιοχημείας για την ανίχνευση της παρουσίας μιας ουσίας, κυρίως αντιγόνου ή αντισώματος, σε ένα δείγμα (συνήθως υγρό διάλυμα). Η ELISA έχει χρησιμοποιηθεί ως ένα διαγνωστικό εργαλείο στην ιατρική και στη παθολογία των φυτών, καθώς και ως έλεγχος ποιότητας σε διάφορες βιομηχανίες. Τα αντιγόνα του δείγματος συνήθως προσκωλλόνται σε στερεή επιφάνεια και στη συνέχεια εφαρμόζεται ένα ειδικό αντίσωμα ώστε να προσδεθεί στο αντιγόνο. Αυτό το αντίσωμα είναι συνδεδεμένο με ένα ένζυμο του οποίου το υπόστρωμα προστίθεται στο τελικό στάδιο της διαδικασίας. Η αντίδραση που ακολουθεί παράγει ένα ανιχνεύσιμο σήμα, συνήθως μια αλλαγή χρώματος στο υπόστρωμα, το οποίο διαβάζεται από το κατάλληλο μηχάνημα και

παρέχει πληροφορίες κυρίως ποιοτικές αλλά και ποσοτικές για τη παρουσία της ζητούμενης ουσίας στο δείγμα.

Είδη ELISA:

- **Απλή/Άμεση ELISA**

Περιλαμβάνει τη σύνδεση ενός αντιγόνου στην στερεή φάση, διαδικασία ακολοθούμενη από την προσθήκη ενός αντισώματος σημασμένου με κατάλληλο ένζυμο (βλ. υπεροξειδάση, αλκαλική φωσφατάση, βιοτίνη κ.ο.κ.).

Αρχικά, σε μια άμεση δοκιμή ELISA, η οποία θεωρείται να είναι ο απλούστερος τύπος ELISA, το αντιγόνο προσροφάται σε μια πλαστική πλάκα. Τότε προστίθεται περίσσεια μίας άλλης πρωτεΐνης για να δεσμεύσει το σύνολο των άλλων θέσεων συνδέσεως που δεν μας ενδιαφέρουν. Ενώ ένα ένζυμο συνδέεται με ένα αντίσωμα σε μια ξεχωριστή αντίδραση, το σύμπλοκο ενζύμου-αντισώματος εφαρμόζεται για να προσροφηθεί στο αντιγόνο. Αφού η περίσσεια συμπλόκου ενζύμου-αντισώματος ξεπλένεται, απομένει το ένζυμο-αντίσωμα συνδεδεμένο προς το αντιγόνο. Με την προσθήκη στο υπόστρωμα του ενζύμου, το ένζυμο ανιχνεύεται και απεικονίζει το σήμα του αντιγόνου.

Σημαντικό μειονέκτημα: Κάθε πρωτογενές αντίσωμα πρέπει να επισημαίνεται ατομικά, διαδικασία η οποία μπορεί να είναι χρονοβόρα κατά την εκτέλεση πολλαπλών πειραμάτων. Επίσης, το σήμα ενισχύεται λιγότερο σε άμεση ELISA, το οποίο σημαίνει μια χαμηλότερη ευαισθησία και θα μπορούσε να θεωρηθεί ως ένα μειονέκτημα από μερικούς.

Σημαντικό πλεονέκτημα: Η διαδικασία σε αυτό το είδος ELISA είναι πολύ απλή και γρήγορη αφού απαιτεί μόνο ένα αντίσωμα και ολοκληρώνεται σε μία φάση προσθήκης ουσιών.

- **Έμμεση ELISA**

Περιλαμβάνει όπως και η άμεση την πρόσδεση του αντιγόνου σε στερεά φάση, αλλά σε αυτή την περίπτωση, το πρωτογενές αντίσωμα δεν είναι επισημασμένο. Ένα δευτερογενές αντίσωμα συζευγμένο με ένζυμο, που κατευθύνεται κατά του πρώτου αντισώματος , προστίθεται στη συνέχεια. Αυτή η μορφή χρησιμοποιείται πιο συχνά για την ανίχνευση

ειδικών αντισωμάτων σε ορούς και εμφανίζει πολύ μεγαλύτερη ευαισθησία σε σχέση με την άμεση ELISA.

Η έμμεση ELISA είναι μια δυο σταδίων ELISA, η οποία περιλαμβάνει δυο δεσμευτικές διαδικασίες του πρωτογενούς αντισώματος και του επισημασμένου δευτερογενούς αντισώματος. Το πρωτογενές αντίσωμα επωάζεται με το αντιγόνο και ακολουθεί η επώαση με το δευτερεύον αντίσωμα.

Σημαντικό μειονέκτημα: Μπορεί να οδηγήσει σε μη ειδικά σήματα λόγω της διασταυρούμενης αντίδρασης που μπορεί να επιφέρει το δευτερεύον αντίσωμα.

Σημαντικά πλεονεκτήματα: Παρουσιάζει υψηλή ευαισθησία, καθώς περισσότερα από ένα σημασμένο αντίσωμα δεσμεύεται ανά μόριο αντιγόνου.

- **<u>Ανταγωνιστική ELISA</u>**

Ο τρίτος τύπος ELISA είναι η ανταγωνιστική δοκιμασία, η οποία περιλαμβάνει την ταυτόχρονη προσθήκη των «ανταγωνιστών» αντισωμάτων ή πρωτεινών. Το σήμα που λαμβάνεται είναι αντιστρόφως ανάλογο της ποσότητας του προς ανίχνευση μορίου.

Βασικό ρόλο στην ανταγωνιστική ELISA έχει η ανταγωνιστική διαδικασία δέσμευσης που εκτελείται από το αρχικό αντιγόνο (αντιγόνο δείγματος) και το προστιθέμενο αντιγόνο. Οι διαδικασίες της ανταγωνιστικής ELISA είναι αρκετά διαφορετικές σε σχέση με τα άλλα είδη ELISA.

Σημαντικό μειονέκτημα: Για ανταγωνιστική ELISA, όσο υψηλότερη είναι η συγκέντρωση του αντιγόνου του δείγματος, τόσο ασθενέστερη είναι το τελικό σήμα (άρα έχουμε μειωμένη ακρίβεια στα δείγματα με υψηλές συγκεντρώσεις).

Σημαντικά πλεονεκτήματα: Εμφανίζει υψηλή ακρίβεια, δεδομένου ότι χρησιμοποιούνται δύο αντισώματα για την δέσμευση και ανίχνευση της ζητούμενης ουσίας. Αυτό το είδος ELISA είναι κατάλληλο για περίπλοκα δείγματα, δεδομένου ότι το αντιγόνο δεν απαιτεί καθαρισμό πριν από τη μέτρηση. Τέλος παρουσιάζει μεγάλη ευελιξία και ευαισθησία, δεδομένου ότι μπορούν να χρησιμοποιηθούν δύο μέθοδοι: άμεσης και έμμεσης

ανίχνευσης .

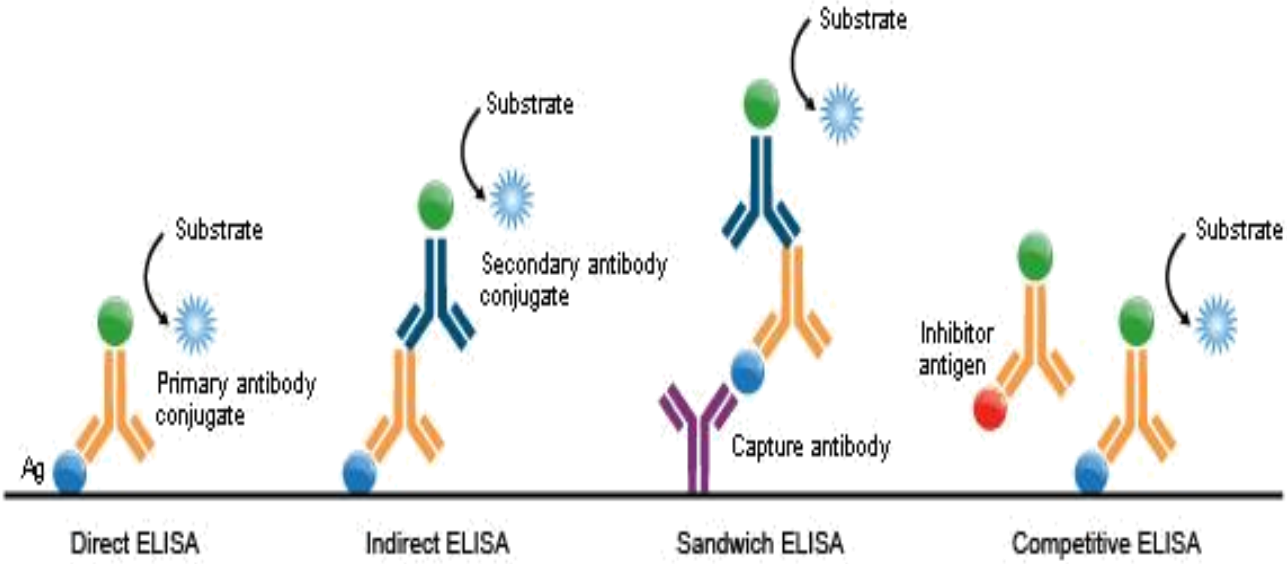
- **Sandwich ELISA**

Ο τελευταίος τύπος δοκιμασίας είναι η Sandwich ELISA και είναι η λιγότερο κοινή παραλλαγή της ELISA, αλλά είναι πολύ αποτελεσματική στην ανίχνευση αντιγόνου του δείγματος. Η Sandwich ELISA συνεπάγεται προσκόλληση των αντισωμάτων σύλληψης σε ένα υπόστρωμα στερεάς φάσης. Δείγματα που περιέχουν γνωστά ή άγνωστα αντιγόνα στη συνέχεια προστίθενται σε μία μήτρα ή σε ρυθμιστικό διάλυμα που θα ελαχιστοποιήσει την προσάρτηση στη στερεά φάση. Ένα αντίσωμα σημασμένο με ένζυμο προστίθεται στη συνέχεια για την ανίχνευση.

Η Sandwich ELISA πραγμοτοποιεί ποσοτικό προσδιορισμό αντιγόνων μεταξύ δύο στρωμάτων αντισωμάτων (δηλ. μεταξύ αντισώματος σύλληψης και αντισώματος ανίχνευσης). Το αντιγόνο που πρόκειται να μετρηθεί πρέπει να περιέχει τουλάχιστον δύο αντιγονικά επίτοπα ικανά για πρόσδεση με το αντίσωμα, αφού τουλάχιστον δύο αντισώματα δρουν στο σάντουιτς. Μονοκλωνικά ή πολυκλωνικά αντισώματα μπορούν να χρησιμοποιηθούν ως αντισώματα σύλληψης και ανίχνευσης σε συστήματα Sandwich ELISA. Τα μονόκλωνα αντισώματα αναγνωρίζουν ένα μόνο επίτοπο που επιτρέπει έτσι την λεπτή ανίχνευση και ποσοτικοποίηση των μικρών διαφορών σε ένα αντιγόνο, ενώ ένα πολυκλωνικό αντίσωμα χρησιμοποιείται συχνά ως το αντίσωμα σύλληψης για να τραβήξει προς τα κάτω τόσο του αντιγόνου όσο το δυνατόν.

Σημαντικό μειονέκτημα: Οι διαδικασίες Sandwich ELISA μπορεί να είναι δύσκολο να βελτιστοποιηθούν και θα πρέπει να χρησιμοποιείται ένα ζεύγος ελεγμένων αντισωμάτων. Αυτό εξασφαλίζει ότι τα αντισώματα ανίχνευσης θα έχουν διαφορετικούς επιτόπους επί της πρωτεΐνης-στόχου έτσι ώστε να μην αλληλεπιδρούν με το άλλο αντίσωμα.

Σημαντικά πλεονεκτήματα: Παρουσιάζει υψηλή ευαισθησία, καθώς περισσότερα από ένα σημασμένο αντίσωμα δεσμεύεται ανά μόριο αντιγόνου. Αυτό το είδος ELISA είναι κατάλληλο για περίπλοκα δείγματα, δεδομένου ότι το αντιγόνο δεν απαιτεί καθαρισμό πριν από τη μέτρηση. Τέλος και σε αυτό το είδος μπορούν να χρησιμοποιηθούν δύο μέθοδοι: άμεσης και έμμεσης ανίχνευσης .



Εικόνα 58. *Σχηματική αναπαράσταση των δοκιμασιών* www.abnova.com

Ορολογία:

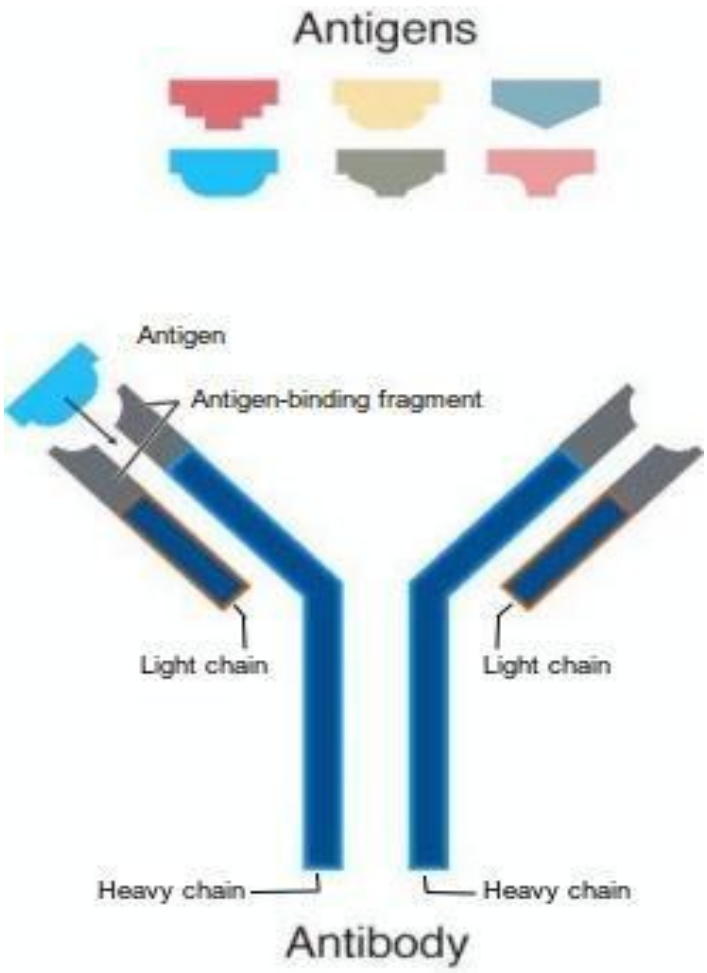
Αντιγόνο

Ένας πρωτεϊνικός ή ολιγοσακχαριδικός δείκτης που βρίσκεται στην επιφάνεια των κυττάρων με βάση τον οποίο αναγνωρίζεται το κύτταρο σαν ενδογενές ή εξωγενές αναγνωρίζεται η προέλευση του κυττάρου π.χ. δέρμα, νεφροί· ενεργοποιείται η παραγωγή αντισωμάτων, από τα Β λεμφοκύτταρα, τα οποία απενεργοποιούν ή καταστρέφουν το κύτταρο εάν είναι αναγκαίο· και ενεργοποιούν την κυτταροτοξική αντίδραση των κοκκιοκυττάρων, των μονοκυττάρων και των λεμφοκυττάρων. Τα αντιγόνα που βρίσκονται στην επιφάνεια των κυττάρων του οργανισμού ονομάζονται αυτοαντιγόνα. Τα αντιγόνα που βρίσκονται σε όλα τα άλλα κύτταρα ονομάζονται ξένα αντιγόνα. Η ταύτιση αρκετών τύπων ιστικών αντιγόνων είναι σημαντικό για την επιτυχή μεταμόσχευση κάποιου οργάνου. Φλεγμονή προκαλείται όταν τα ουδετερόφιλα, τα μονοκύτταρα και τα μακροφάγα εντοπίσουν κάποιο αντιγόνο οποιασδήποτε προέλευσης σε περίπτωση κάποιου τραυματισμού του σώματος. Το αντιγόνο μπορεί να είναι ξένο ή αυτοαντιγόνο, το οποίο έχει υποστεί κάποια εκφύλιση και για το λόγο αυτό αναγνωρίζεται σαν ξένο. Η αντίδραση των Β και Τ λεμφοκυττάρων σε κάποιο αντιγόνο αποτελεί τμήμα της ειδικής ανοσολογικής απάντησης. Υπάρχουν ακόμη αντιγόνα μικροβιακής προέλευσης αλλά και αντιγόνα που προέρχονται από τα τρόφιμα, την γύρη και άλλους φυσικούς παράγοντες.

Αντίσωμα

Μια ουσία σχήματος Υ, η οποία παράγεται από τα Β λεμφοκύτταρα σε απάντηση ενός και μοναδικού αντιγόνου. Κάθε μόριο Ab συνδέεται με ένα συγκεκριμένο αντιγόνο για να το

ελέγξει ή να το καταστρέψει. Όλα τα αντισώματα, παράγονται από τα Β λεμφοκύτταρα, τα οποία με τη σειρά τους ενεργοποιούνται από εξωγενή αντιγόνα, τα οποία κατά κανόνα είναι πρωτεΐνες, πολυσακχαρίτες ή νουκλεϊνικά οξέα.



Εικόνα 59. *Σχηματική αναπαράσταση της δομής του αντισώματος* biology.about.com

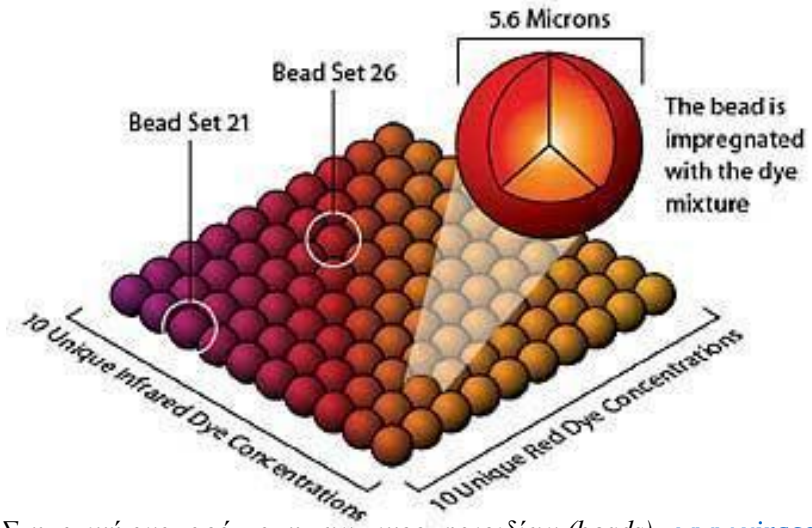
Assay Buffer

Πρόκειται για διαλύτη ο οποίος χρησιμοποιείται σε μεθόδους ανίχνευσης όπως είναι η ELISA, η Western blot και η ανοσοϊστοχημεία (IHC) κ.ά. και ρυθμίζει την δέσμευση των πρωτεϊνών αποκλείοντας τις περισσευούμενες θέσεις δέσμευσης. Συχνός ρυθμιστής είναι το BSA (διαλυμένος σε PBS)και τα ρυθμιστικά του διαλύματα συχνότερα αραιώνονται σε 1% BSA για την αρχική δοκιμή για να είναι επωφελή για συγκεκριμένα συστήματα. Ο ρυθμιστής BSA είναι συνήθως πιο αποτελεσματικός από άλλους επειδή περιέχει μία μόνο καθαρισμένη πρωτεΐνη που στερείται ενδογενή βιοτίνη.

Εικόνα 60: *Ρυθμιστής BSA* www.piercenet.com

Beads

Εσωτερικά χρωματισμένα μικροσφαιρίδια διαμέτρου 5.6μm. Χρησιμοποιούνται στη δοκιμασία bead-based sandwich ELISA ως επιφάνεια πρόσδεσης του πρώτου αντισώματος (capture antibody). Τα μικροσφαιρίδια είναι βαμμένα με δύο είδη βαφών (ερυθρή και υπέρυθρη) σε διάφορες συγκεντρώσεις δημιουργώντας έτσι έως και 100 ξεχωριστές κατηγορίες. Κάθε κατηγορία είναι συζευγμένη με ένα συγκεκριμένο στόχο ανάλυσης.



Εικόνα 61: *Σχηματική αναπαράσταση των μικροσφαιριδίων (beads).* www.viracorbit.com

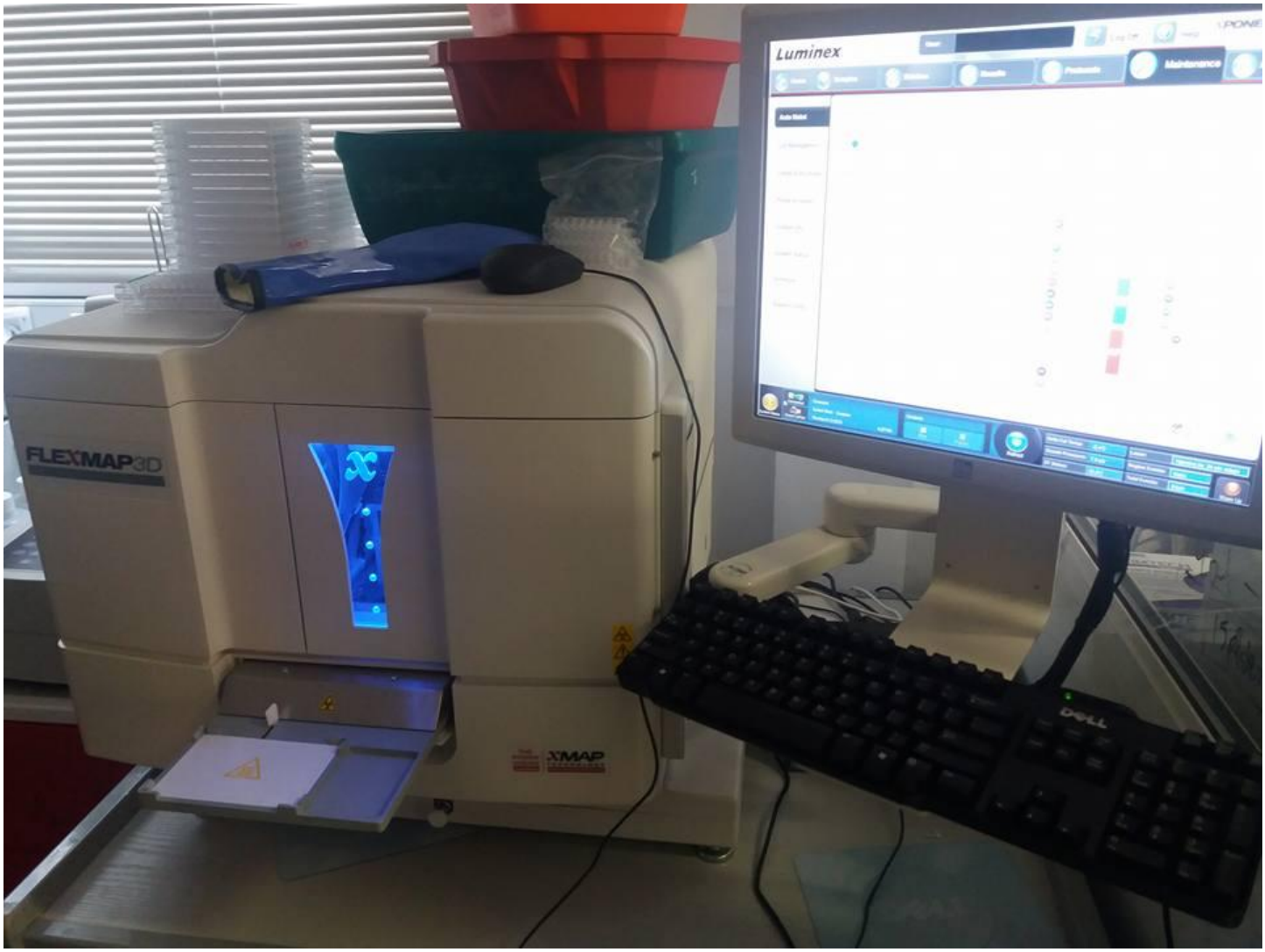
SAPE

Στρεπταβιδίνη φυκοερυθρίνης, επίσης γνωστή ως SA-PE ή K-PE στρεπταβιδίνη, χρησιμοποιείται τυπικά για κυτταρομετρία ροής, μικροσυστοιχίες, ELISA, και άλλες εφαρμογές που απαιτούν είτε υψηλή ευαισθησία είτε ταυτόχρονη πολύχρωμη ανίχνευση. Η

φυκοερυθρίνη είναι μέλος μιας οικογένειας πρωτεϊνών που ονομάζονται φυκοβιλιπρωτεΐνες, οι οποίες προέρχονται από κυανοβακτήρια και ευκαρυωτικά φύκη και εμφανίζουν εξαιρετικά φωτεινό φθορισμό και υψηλές αποδόσεις κβάντων.

Luminex

Το μηχάνημα Luminex εντοπίζει τα αντιγόνα ή τα αντισώματα στο προς εξέταση δείγμα. Αυτό επιτυγχάνεται μέσω της μέτρησης της έντασης φθορισμού που εκπέμπεται από κάθε well και αποτελεί το τελικό του Multiplexassay, μίας κατηγορίας δοκιμών στην οποία περιλαμβάνεται και το πείραμα που εκτελέσαμε.



Εικόνα 62. Το μηχάνημα Luminex με το οποίο έγιναν οι βιολογικές μετρήσεις.

ΙΙ. ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

9. Επεξεργασία δοκιμίων τιτανίου

9.1 Κοπή δοκιμίων τιτανίου

Συνολικά κόπηκαν με τη βοήθεια μικροτόμου 90 δοκίμια από μια εμπορικά καθαρή (99,9%) πλάκα τιτανίου. Οι διαστάσεις των δοκιμίων είναι 10x10 mm με σταθερό πάχος 1 mm.

9.2 Μηχανική επεξεργασία δοκιμίων τιτανίου

Αφού έγινε η κοπή, όλα τα δοκίμια λειάνθηκαν με τη βοήθεια λειαντικού μηχανήματος και λειαντικών χαρτιών από καρβίδιο του πυριτίου στις παρακάτω κοκκομετρικές αναλογίες:

- 220 grit
- 400 grit
- 600 grit
- 800 grit
- 1200 grit

Περαιτέρω λείανση δεν έγινε διότι σύμφωνα με προηγούμενες ερευνητικές μελέτες, όταν η επιφάνεια των δοκιμίων τιτανίου είναι ως ένα συγκεκριμένο ποσοστό τραχείες, η προσκόλληση του υδροξυαπατίτη είναι αρκετά πιο αποτελεσματική [67].

9.3 Έκπλυση δοκιμίων σε λουτρό υπερήχων

Μετά το πέρας της μηχανικής προεργασίας, τα δοκίμια τιτανίου τοποθετήθηκαν σε λουτρό υπερήχων με σκοπό την απομάκρυνση τυχόν υπολειμμάτων.

Η διαδικασία καθαρισμού με υπερήχους ήταν η εξής:

- 20 λεπτά σε απιονισμένο νερό
- 20 λεπτά σε ακετόνη
- 20 λεπτά σε αιθανόλη
- 10 λεπτά σε απιονισμένο νερό

9.4 Χημική επεξεργασία δοκιμίων τιτανίου

Τα δοκιμία αφού καθαρίστηκαν με υπερήχους, υπέστησαν χημική επεξεργασία με διάλυμα καυστικού νατρίου (NaOH) συγκέντρωσης 5M.

- Υπολογισμός ποσότητας καυστικού νατρίου

  C=5M, V=100 ml (H_2O)

  n=C*V= 5M*100*10^{-3} ml=0,5 moles

  n=M/Mr→ M=n*Mr=0,5*(23+16+1)=20 g

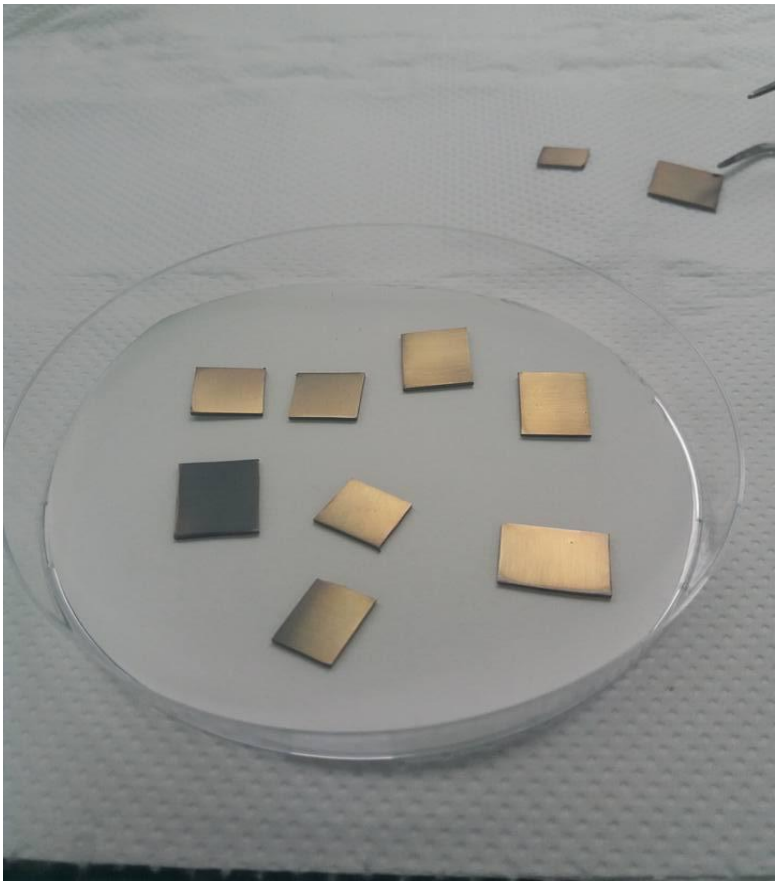
  όπου ατομικό βάρος νατρίου=23, οξυγόνου=16, υδρογόνου=1

  Συνεπώς, **για κάθε 100ml** νερού χρειάζονται **20g NaOH**

Ανά 30 δοκίμια, χρησιμοποιήθηκε ένα δοχείο των 500ml. Σε κάθε σειρά 30 δοκιμίων τοποθετήθηκαν 200 ml νερού, συνεπώς 40g NαOH. Συνολικά χρησιμοποιήθηκαν 3 δοχεία των 500ml για να επεξεργαστούν χημικά και τα 90 δοκίμια. Τα δοκίμια αφού τοποθετήθηκαν στα αντίστοιχα δοχεία με νερό και NaOH, μπήκαν σε πυριαντήριο για 24 ώρες στους 60 βαθμούς Κελσίου.

Σκοπός της χημικής επεξεργασίας είναι η δημιουργία επιφάνειας με κυψελοειδή μορφή, ή με άλλα λόγια η ανάπτυξη επιφανειακού πορώδους δικτύου. Το πορώδες δίκτυο είναι ουσιαστικά αποτέλεσμα της μερικής διάβρωσης που υφίστανται οι επιφάνειες των δοκιμίων τιτανίου λόγω των ιόντων OH^- του αλκαλικού διαλύματος. Η διάβρωση αυτή είναι επιθυμητή καθώς έτσι αυξάνεται η βιοενεργότητα της επιφάνειας και βελτιώνεται η πρόσφυση της επικάλυψης πάνω σε αυτή [68-69].

Με την ολοκλήρωση της χημικής επεξεργασίας τα δοκίμια ξεπλύθηκαν με απιονισμένο νερό και τοποθετήθηκαν σε πυριαντήριο για ξήρανση. Μετά τη ξήρανση, ξεκίνησε η επικάλυψη των δοκιμίων με τις τρεις διαφορετικές κατηγορίες υλικού.



Εικόνα 63. Χαρακτηριστική εικόνα η οποία δείχνει μερικά από τα δοκίμια τιτανίου μετά την ξήρανση και έτοιμα για επικάλυψη.

10. Παρασκευή αιωρήματος υδροξυαπατίτη

10.1 Αντιδραστήρια και εξοπλισμός

Τα αντιδραστήρια τα οποία χρησιμοποιήθηκαν για τη παρασκευή των 3 διαφορετικών κατηγοριών υδροξυαπατίτη για τις επικαλύψεις των δοκιμίων τιτανίου ήταν:

- Διάλυμα ορθοφωσφορικού οξέος H_3PO_4 85%
- Διάλυμα οξικού οξέος CH_3COOH glacial
- Χιτοζάνη μεγάλου μοριακού βάρους ($C_{12}H_{24}N_2O_9$)
- Σκόνη L-Αργινίνης ($C_6H_{14}N_4O_2$)
- Σκόνη Poly(ethylene oxide) Mw=600.000 από Sigma-Aldrich
- Σκόνη υδροξειδίου του ασβεστίου $Ca(OH)_2$ από Migge Laborbedarf- Vertribs GmbH
- Σκόνη νανοσωλήνων άνθρακα (NTX3) από την εταιρία Nanothinx

Ο εργαστηριακός εξοπλισμός ο οποίος χρησιμοποιήθηκε περιελάμβανε ένα μηχανικό διασπορέα της εταιρίας IKA, τύπου T25 digital ULTRA-TURRAX με τον οποίο έγινε η ανάμιξη των πρόδρομων διαλυμάτων φωσφορικού οξέος-χιτοζάνης και του υδατικού αιωρήματος υδροξειδίου του ασβεστίου καθώς επίσης και η διάσπαση των νανοσωλήνων άνθρακα στο αιώρημα του υδροξυαπατίτη. Η ανάδευση κατά τη διάρκεια της αντίδρασης των πρόδρομων διαλυμάτων έγινε σε αυτοσχέδιο λουτρό με τη χρήση μαγνητικού αναδευτήρα σε θερμαινόμενη επιφάνεια. Η παρακολούθηση της θερμοκρασίας στο λουτρό γινόταν με τη χρήση θερμοστοιχείου. Η διάλυση του PEO έγινε επίσης με τη χρήση μαγνητικού αναδευτήρα σε θερμαινόμενη επιφάνεια επαφής με το δοχείο του δείγματος. Τέλος για το διαχωρισμό των στερεών προϊόντων από το υπερκείμενο υγρό χρησιμοποιήθηκε συσκευή φυγοκέντρησης της εταιρίας HERMLE τύπου Z326.

10.2 Παρασκευή 1^{ης} κατηγορίας επικαλύψεων

Αιώρημα υδροξυαπατίτη παρουσία χιτοζάνης και L-αργινίνης

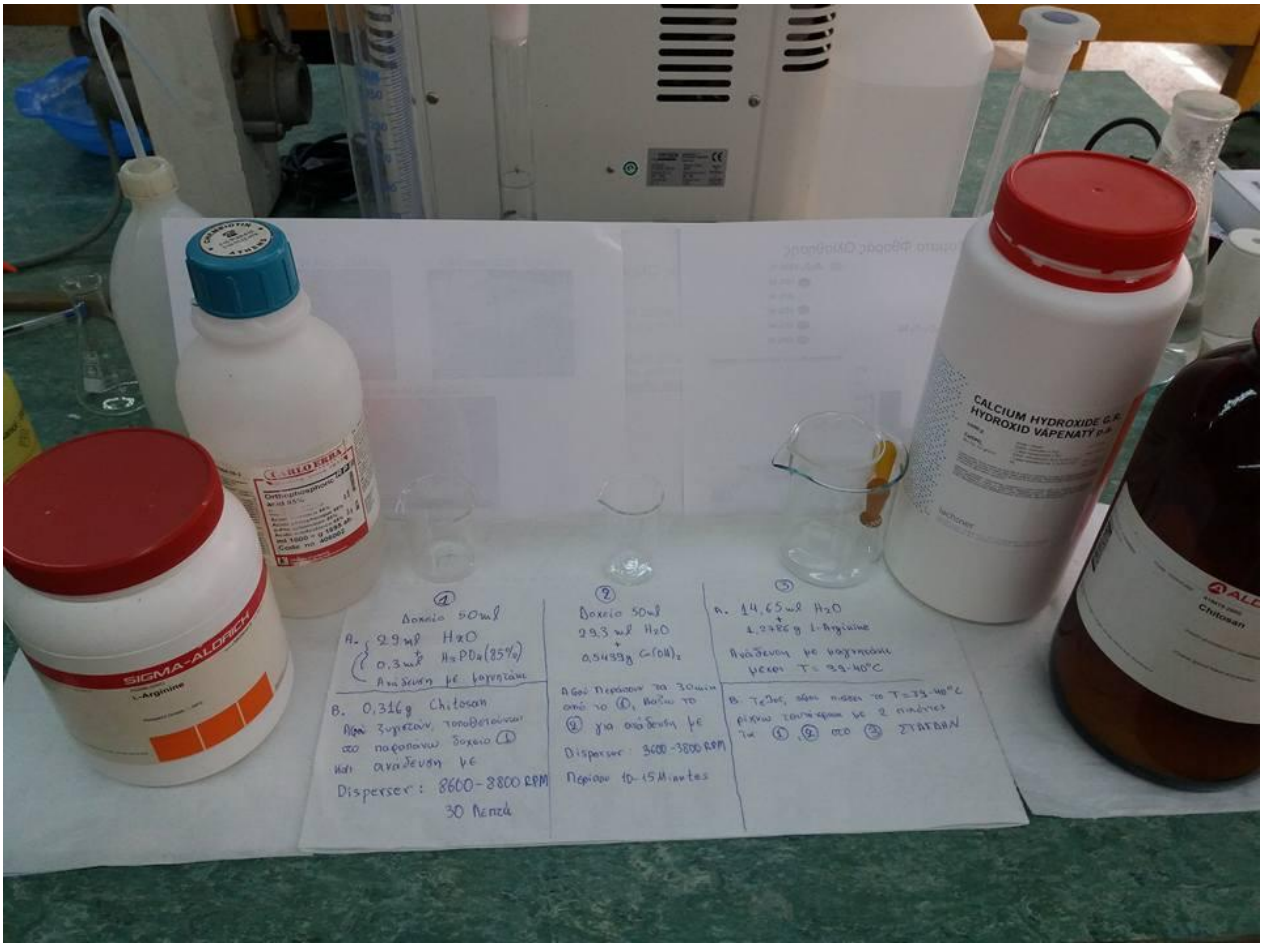
Στο εργαστήριο παρασκευάστηκε αρχικά αιώρημα υδροξυαπατίτη παρουσία του βιοπολυμερούς χιτοζάνης καθώς και του αμινοξέος L-αργινίνης, χρησιμοποιώντας βιομιμητική διαδικασία σύμφωνα με προηγούμενη δημοσιευμένη εργασία της ομάδας μας. Οι αναλογίες είναι οι παρακάτω:

- 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 H_3PO_4 = 0,06 M

Όλες οι παραπάνω αναλογίες για τη παρασκευή του αιωρήματος υδροξυαπατίτη έχουν προκύψει από διδακτορικές εργασίες και δημοσιεύσεις σε επιστημονικά περιοδικά που έχουν πραγματοποιηθεί από την ομάδα των κεραμικών του εργαστηρίου [70-74].

Αρχικά έγινε ο υπολογισμός των ποσοτήτων των αντιδραστηρίων σύμφωνα με τις παραπάνω αναλογίες (εικόνα 1). Πιο συγκεκριμένα:

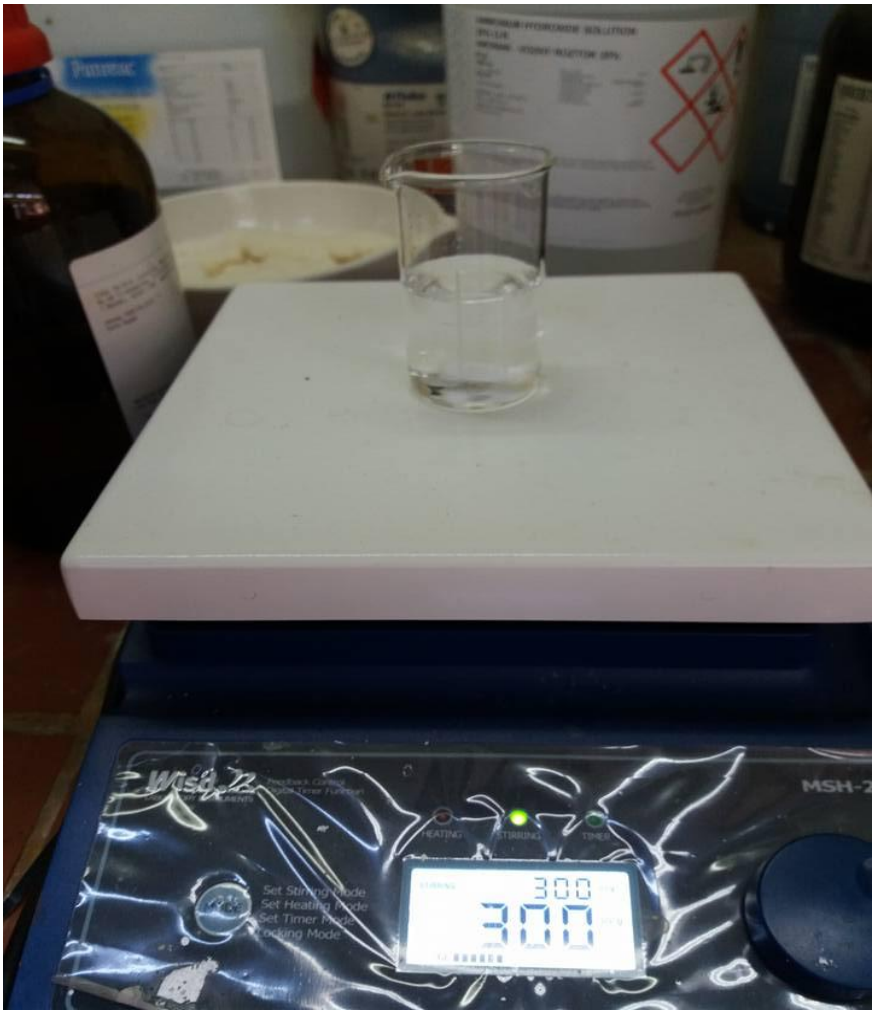
- Χιτοζάνη = 0,316 g
- Υδροξείδιο του ασβεστίου = 0,5439 g
- L-αργινίνη = 1,2786 g
- H_3PO_4 = 0,3ml



Εικόνα 64. Χαρακτηριστική εικόνα η οποία δείχνει τα αντιδραστήρια καθώς και τα βήματα για τη παρασκευή του αιωρήματος υδροξυαπατίτη

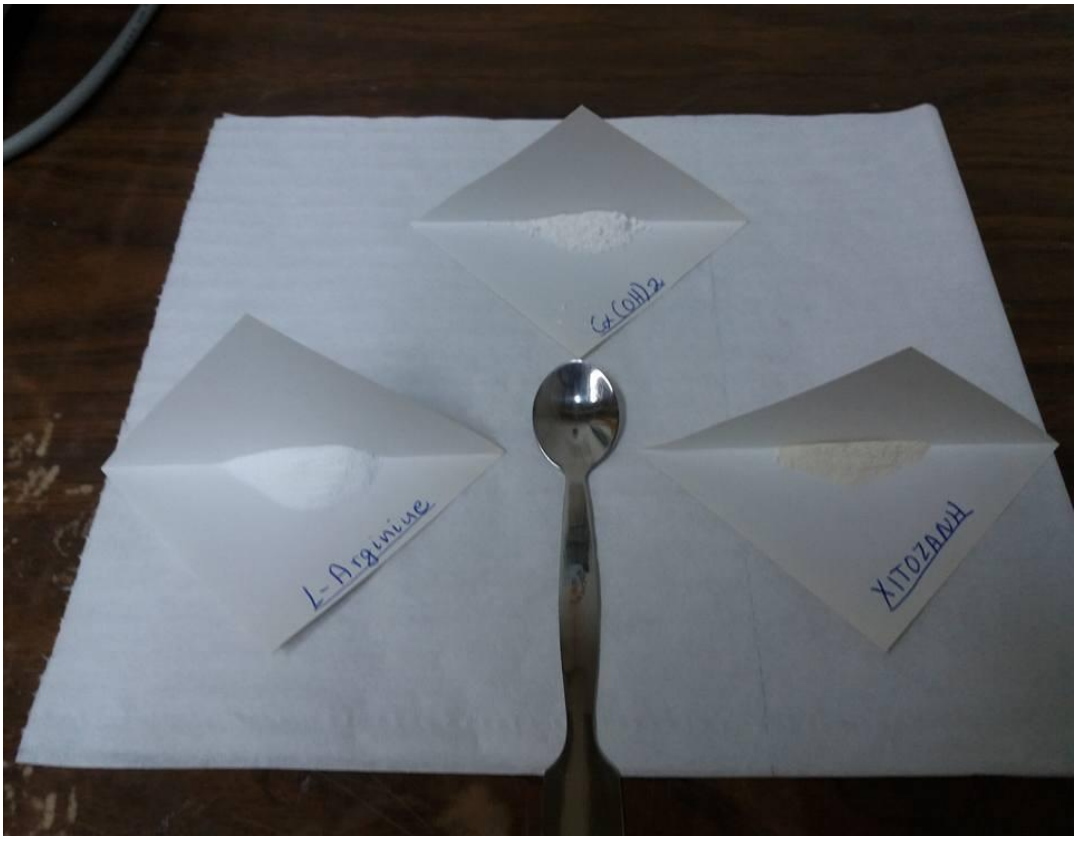
Για τη βιομιμητική σύνθεση του υδροξυαπατίτη, ακολουθήθηκε η παρακάτω διαδικασία:

Αρχικά ζυγίστηκαν οι σκόνες των στερεών αντιδραστηρίων. Σε δοχείο ζέσεως προστίθενται 29 ml νερό και 0,3 ml ορθοφωσφορικού οξέος. Το παραπάνω διάλυμα τοποθετείται σε ανάδευση με μαγνητικό αναδευτήρα για 3 λεπτά στα 300 RPM (εικόνα 59).



Εικόνα 65. Το διάλυμα νερού και H_3PO_4 το οποίο βρίσκεται υπό ανάδευση

Οι σκόνες οι οποίες χρησιμοποιήθηκαν στη παρασκευή του αιωρήματος φαίνονται ευδιάκριτα στην εικόνα 3.



Εικόνα 66. Η L-Αργινίνη, η χιτοζάνη και το υδοξείδιο του ασβεστίου αμέσως μετά τη ζύγιση για τη παρασκευή αιωρήματος υδροξυαπατίτη

Αφού περάσουν τα 3 λεπτά και τελειώσει η διαδικασία της ανάδευσης, προστίθεται στο δοχείο με το νερό και το ορθοφωσφορικό οξύ η συγκεκριμένη ποσότητα χιτοζάνης και τοποθετείται για ανάδευση με μηχανικό διασπορέα στις 8000-9000 στροφές/λεπτό για 30 λεπτά, μέχρι να διαλυθεί δηλαδή πλήρως όλη η σκόνη της χιτοζάνης (Εικόνες 61,62).

Εικόνα 67. Εισαγωγή της σκόνης χιτοζάνης στο διάλυμα νερού-ορθοφωσφορικού οξέος.

Εικόνα 68. Το διάλυμα H_2O + H_3PO_4 + Chitosan βρίσκεται υπό ανάδευση στο μηχανικό διασπορέα

Στη συνέχεια, σε ποτήρι ζέσεως προστίθενται 29,3 ml απιονισμένου νερού καθώς και η σκόνη από το $Ca(OH)_2$ αιώρημα αναδέυεται ξανά με μηχανικό διασπορέα στις 5000 στροφές/λεπτό για 10 με 15 λεπτά (εικόνα 6).

Εικόνα 69. Το αιώρημα H_2O + $Ca(OH)_2$ βρίσκεται υπό ανάδευση στο μηχανικό διασπορέα.

Ύστερα, στο τρίτο δοχείο ζέσεως τοποθετούνται 14,65 ml απιονισμένου νερού και η συγκεκριμένη ποσότητα σκόνης από L-αργινίνη. Το παραπάνω δοχείο τοποθετείται σε λουτρό σταθερής θερμοκρασίας 40 ^{o}C και τίθεται υπό ανάδευση με μαγνητικό αναδευτήρα (εικόνα 7).

Εικόνα 70. Το τρίτο δοχείο ζέσεως με απιονισμένο νερό + L-Αργινίνη

Τέλος, μόλις η θερμοκρασία στο διάλυμα της L-Αργινίνης φτάσει τους 40 βαθμούς Κελσίου, προστίθεται σε αυτό παράλληλα στάγδην, το διάλυμα της χιτοζάνης και το αιώρημα του υδροξειδίου του ασβεστίου, προς σχηματισμό του τελικού αιωρήματος του υδροξυαπατίτη, βάσει της μεθόδου καταβύθισης. Αφού η προσθήκη των δύο αντιδραστηρίων τελειώσει, το τελικό αιώρημα του νανο-υδροξυαπατίτη τοποθετείται για ομογενοποίηση σε μηχανικό αναδευτήρα στις 4500 στροφές/λεπτό.

Το παραπάνω αιώρημα ήταν η πρώτη ουσιαστικά κατηγορία επικαλύψεων για τα δοκίμια τιτανίου.

Στη συνέχεια, φτιάχτηκε ακριβώς με την ίδια παραπάνω μέθοδο ένα δεύτερο αιώρημα υβριδικού νάνο-υδροξυαπατίτη, το οποίο στη συνέχεια ακολούθησε τη διαδικασία απομάκρυνσης της υγρασίας.

Η απομάκρυνση της υγρασίας γίνεται με φυγοκέντριση των αιωρημάτων 1 φορά για 5 λεπτά στις 11.000 στροφές και 1 φορά για 3 λεπτά στις 10.000 στροφές με ενδιάμεση απομάκρυνση του υπερκείμενου νερού.

Το επόμενο βήμα ήταν η λυοφιλίωση του παραπάνω υδροξυαπατίτη. Αρχικά, ο υδροξυαπατίτης καταψύχθηκε για 3 ώρες στους -4°C. Μετά το πέρας των 3 ωρών, η θερμοκρασία έπεφτε στους -55°C και το υλικό παρέμεινε στη συγκεκριμένη θερμοκρασία για 24 ώρες.

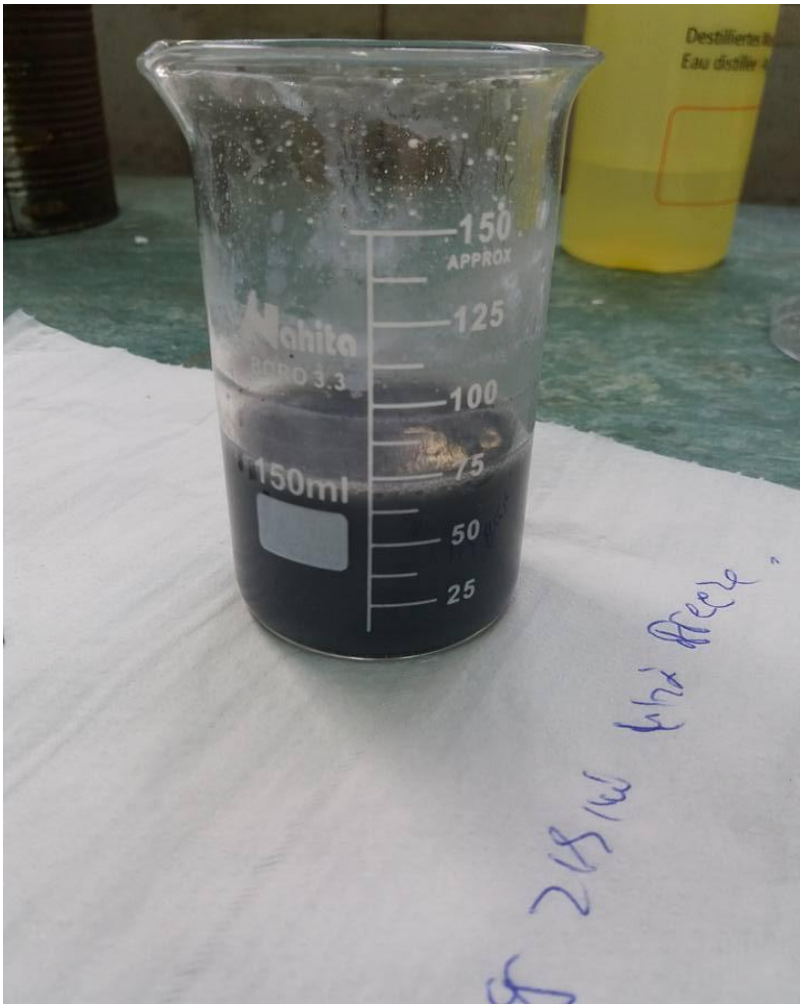
10.3 Παρασκευή 2^{ης} κατηγορίας επικαλύψεων

Προσθήκη νανοσωλήνων άνθρακα μέσα στο αιώρημα του υδροξυαπατίτη

Στη συγεκριμένη ερευνητική εργασία, χρησιμοποιήθηκαν νανοσωλήνες άνθρακα πολλαπλών στρωμάτων (MWCNT) σε ξηρή μορφή με τα ακόλουθα χαρακτηριστικά:

- Καθαρότητα <= 98,5%
- Εξωτερική διάμετρος = 20-40 nm
- Μήκος >= 10 μm

Οι συνήθεις τρόποι προσθήκης των νανοσωλήνων άνθρακα είναι είτε με ανάδευση μέσα σε αιώρημα ή διάλυμα, είτε με λειοτρίβηση σε σφαιρόμυλο (ball-milling). Στη συγκεκριμένη ερευνητική εργασία η διασπορά των νανοσωλήνων έγινε μέσω προσθήκης στο αιώρημα υδροξυαπατίτη 1% w/w MWCNT και ανάδευση με μηχανικό διασπορέα για 30 λεπτά στις 4000-6000 στροφές/λεπτό (εικόνα 8).



Εικόνα 71. Χαρακτηριστική εικόνα με αιώρημα HAP + MWCNT

10.4 Παρασκευή 3ης κατηγορίας επικαλύψεων

Εισαγωγή Poly(ethylene oxide)

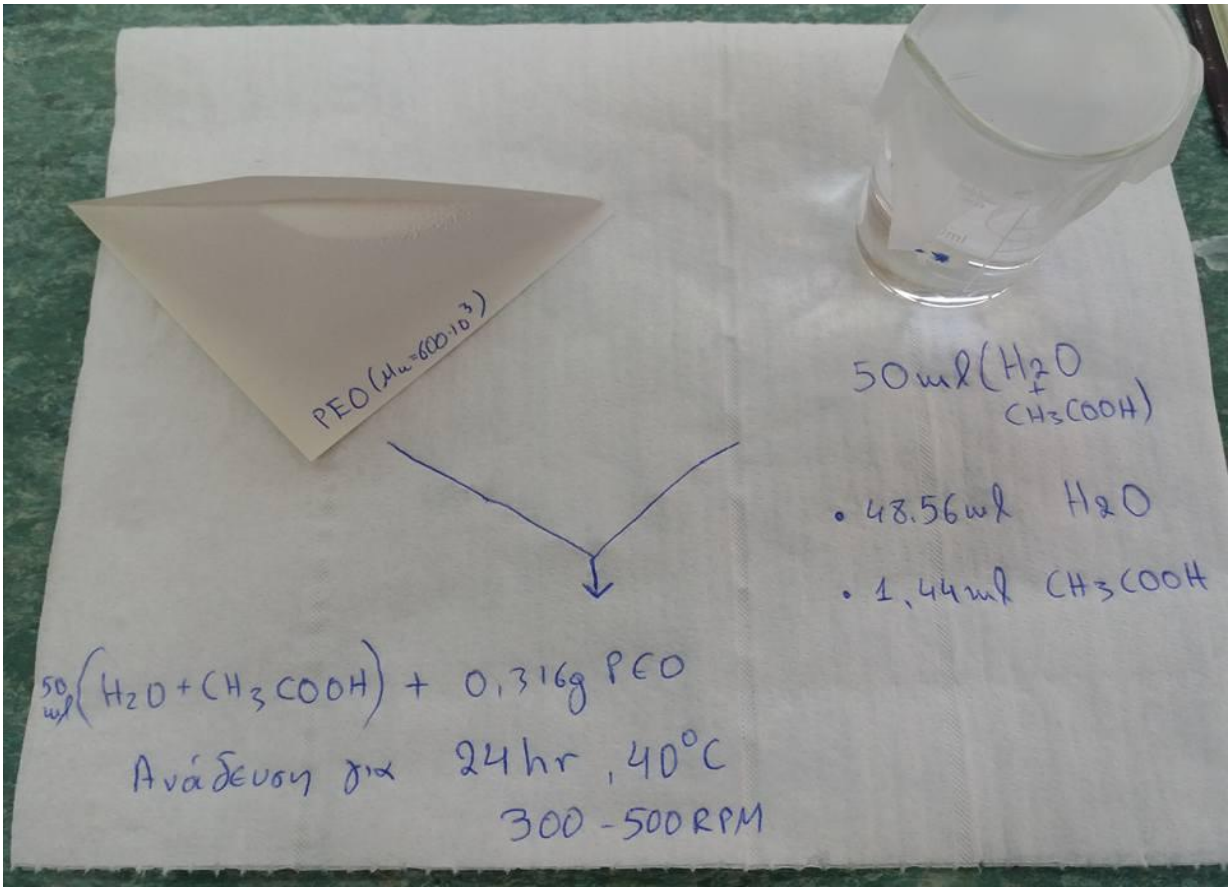
Το PEO το οποίο χρησιμοποιήθηκε στη πειραματική διαδικασία ήταν σε μορφή ξηρής σκόνης με Mw=600.000

Αρχικά, έγινε ανάδευση συνολικής ποσότητας 50 ml απιονισμένου νερού και οξικού οξέος. Συγκεκριμένα:

- 48,56 ml H_2O
- 1,44 ml CH_3COOH συγκέντρωσης 0,5M

Αφού ολοκληρώθηκε η παραπάνω αντίδραση, πραγματοποιήθηκε διάλυση της ξηρής σκόνης PEO στο παραπάνω διάλυμα υπό ανάδευση με μαγνητικό αναδευτήρα στις 300 στροφές/λεπτό, για 24 ώρες (1 ημέρα) σε θερμοκρασία 40 βαθμών Κελσίου.Συγκεκριμένα, εισήχθησαν 0,158 g PEO για κάθε 20 ml από το παραπάνω διάλυμα H_2O + CH_3COOH.

Μετά το πέρας των 24 ωρών, το διάλυμα του PEO-CH_3COOH αναμιγνύθηκε χειροκίνητα με τη ξηρή σκόνη Hap-Chit. Μετά από αρκετή ανάμιξη, το υλικό της τρίτης κατηγορίας επικαλύψεων ήταν έτοιμο.



Εικόνα 72. Τα 2 βασικά συστατικά, το PEO καθώς και το διάλυμα H_2O + CH_3COOH έτοιμα για ανάδευση για 24 ώρες.

Εικόνα 73. Υδροξυαπατίτης σε μορφή σκόνης έτοιμος για ανάδευση με PEO για τη παραγωγή της τρίτης κατηγορίας επικάλυψης.

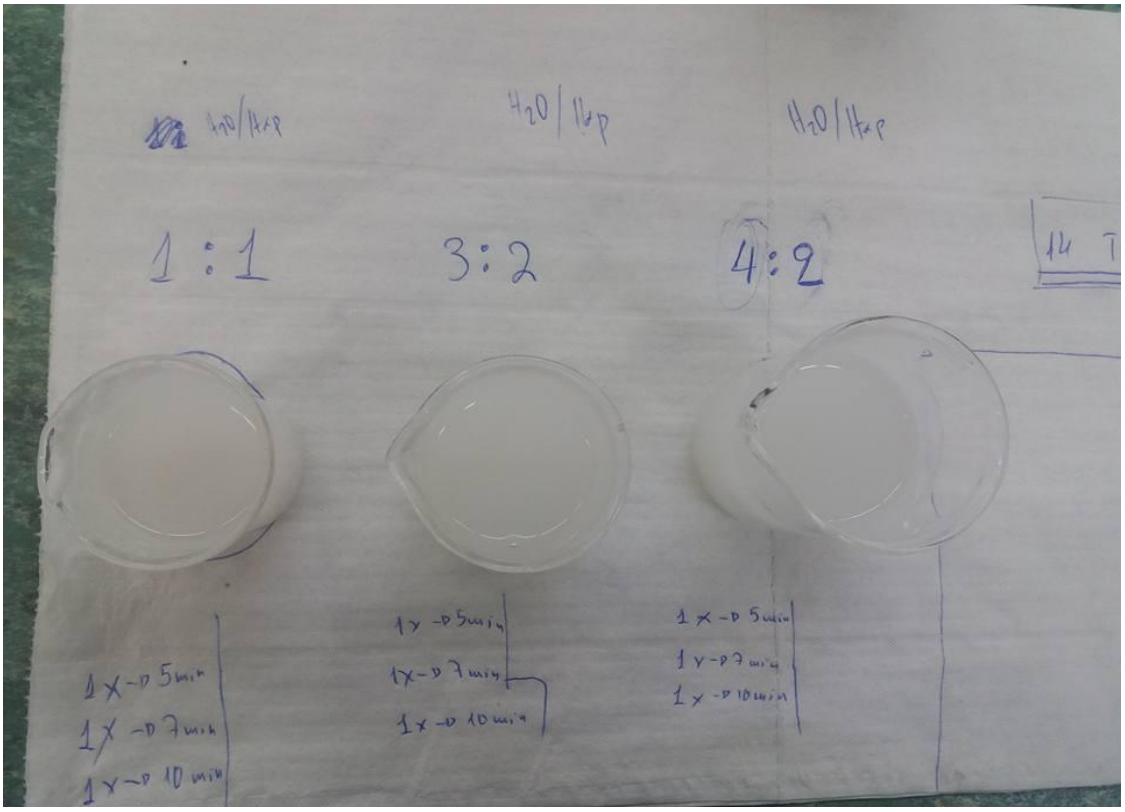
Εικόνα 74. Το τελικό αιώρημα υδροξυαπατίτη- PEO (3^{η} κατηγορία επικάλυψης)

11. Μέθοδοι επικάλυψης των δοκιμίων τιτανίου

Αρχικά, οι επικαλύψεις των δοκιμίων γίνονταν με τη μέθοδο της σταγόνας (dropwise). Όμως, λόγω επιφανειακών τάσεων και πάχους αιωρημάτων, εμφανίζονταν πολλά cracks στις επιφάνειες των δοκιμίων στις δύο πρώτες κατηγορίες. Έτσι λοιπόν, έγιναν αραιώσεις στα αιωρήματα σε διάφορα ποσοστά καθώς επίσης και δημιούργήθηκε ένας απλός μηχανισμός-πατέντα από τον φοιτητή με σκοπό να φέρει εις πέρας και τη μέθοδο της εμβάπτισης χωρίς όμως να γίνεται με το χέρι, διότι ήταν αδύνατο να παραμένει ακίνητο για συγκεκριμένα λεπτά και συνεπώς το αποτέλεσμα αλλοιωνόταν. Επομένως, στις δύο πρώτες κατηγορίες επικαλύψεων, έγινε προσπάθεια βελτιστοποίησης της ποιότητας επικάλυψης είτε μέσω αραιώσεων είτε με τη χρήση και των δύο μεθόδων επικάλυψης και την επιλογή της βέλτιστης.

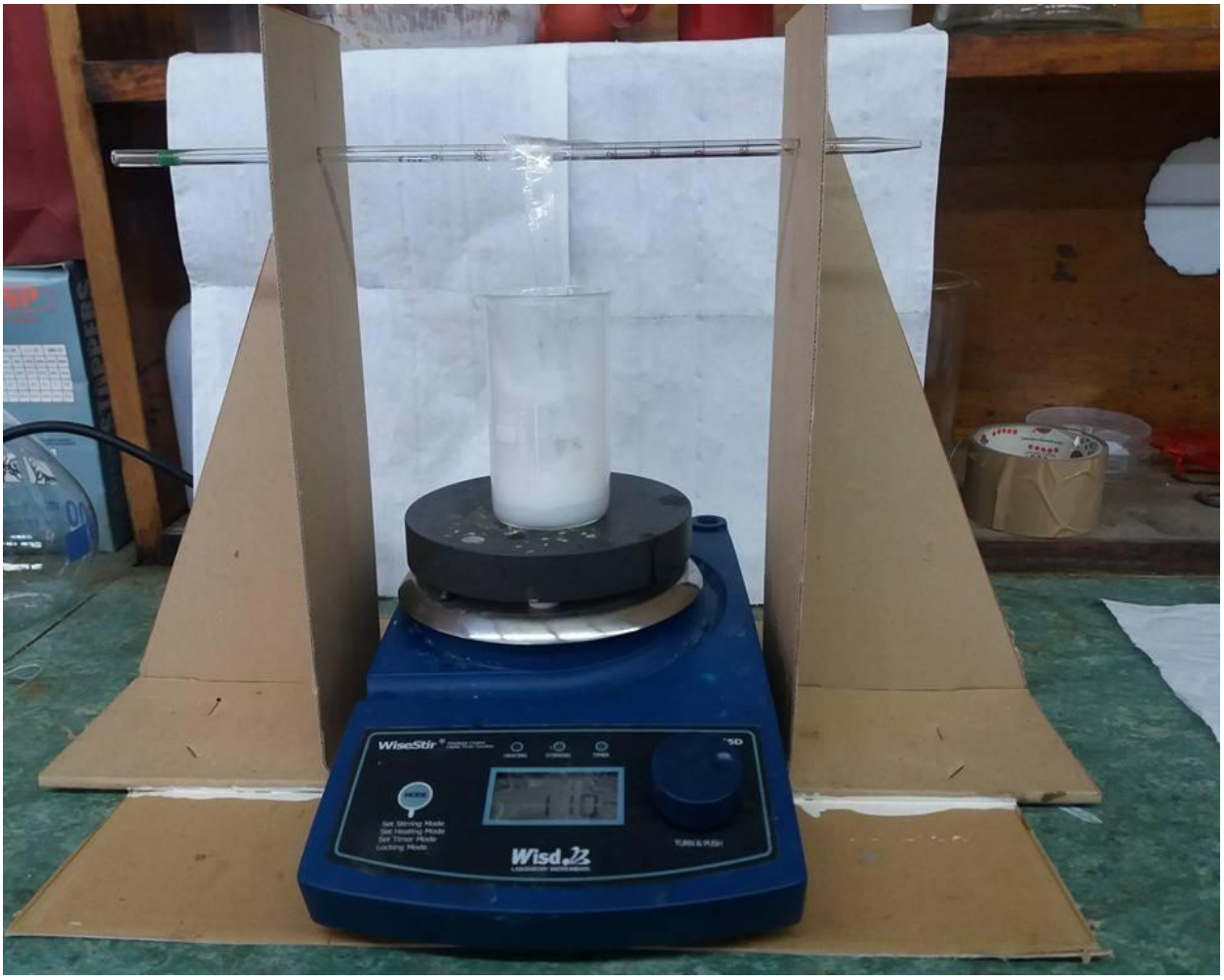
11.1 Επικάλυψη με αιώρημα υδροξυαπατίτη

Αρχικά, οι επικαλύψεις γίνονταν με το υλικό-αιώρημα ως έχει και με τη μέθοδο της σταγόνας. Όμως, τα αποτελέσματα δεν ήταν καθόλου αντιπροσωπεύσιμα διότι οι επιφάνειες επικάλυψης είχαν πολλά και μεγάλα σπασίματα (cracks). Έτσι λοιπόν έγιναν για αρχή διάφορες αραιώσεις του αιωρήματος με απιονισμένο νερό.



Εικόνα 75. Οι διάφορες αραιώσεις του αιωρήματος (H_2O/Υδροξυαπατίτη 2/2, 3/2. 4/2)

Αφού έγιναν οι αραιώσεις, κατασκευάστηκε και ο ειδικός μηχανισμός για την εφαρμογή της μεθόδου της εμβάπτισης όσο το δυνατόν πιο αντικειμενικά χωρίς να λαμβάνονται μεταβολές της ποιότητας της επικάλυψης από ανθρώπινο παράγοντα (αδυναμία πλήρης ακινητοποίησης χεριού για παραπάνω από 2-3 λεπτά).



Εικόνα 76. Ο απλός μηχανισμός που κατασκευάστηκε με σκοπό τη βελτιστοποίηση της μεθόδου της εμβάπτισης.

Με τη παραπάνω κατασκευή ήταν δυνατή η πλήρης εμβάπτιση δοκιμίων για όσα λεπτά ήθελε ο πειραματιστής, χωρίς να δρουν ανθρώπινοι παράγοντες αρνητικά στη διαδικασία του πειράματος.

Οι δύο στήλες έχουν ειδικό υπολογισμένο ύψος, πλάτος και μήκος έτσι ώστε να χωράει να μπει ενδιάμεσα αναδευτήρας για να αναδεύεται ταυτόχρονα το αιώρημα κατα τη διάρκεια της εμβάπτισης, έτσι ώστε να μην έχουμε φαινόμενο καθίζησης μέσα στο δοχείο, και συνεπώς αρνητικής επίπτωσης στην επικάλυψη.

Σε συγκεκριμένη απόσταση ψηλά στις δύο στήλες τοποθετήθηκε μια γυάλινη πιπέττα η οποία είχε τη δυνατότητα να περιστρέφεται καθώς βρισκόταν πάνω από το δοχείο με το αιώρημα.

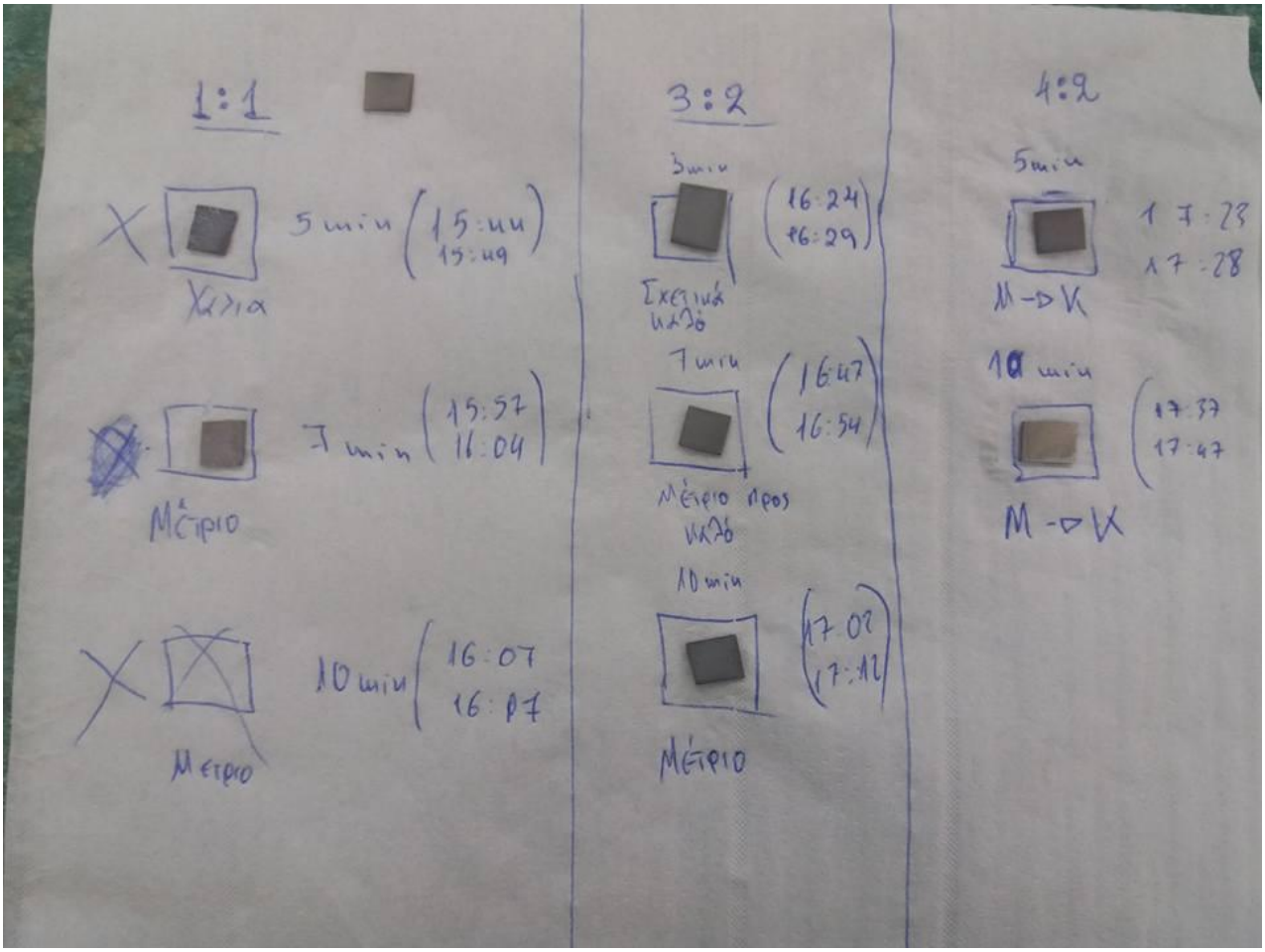
Στη μέση της γυάλινης πιπέττας, τοποθετήθηκαν δύο σπάγγοι παράλληλα και όχι ένας με σκοπό να μην περιστρέφεται το δοκίμιο καθώς θα εισέρχεται μέσα στο δοχείο για τη διεξαγωγή του πειράματος.

Οι δύο σπάγγοι επικολλήθηκαν με κολλητική διάφανη ταινία για να είναι σταθεροί και να μην 'κολλάει' ο ένας με τον άλλον, με αποτέλεσμα τη περιστροφή του δοκιμίου.

Τέλος, το δοκίμιο, χρησιμοποιώντας κολλητική ταινία πιανόταν στους δύο παράλληλους σπάγγους και με τη περιστροφή της γυάλινης πιπέττας 'βυθιζόταν' στο δοχείο με το αιώρημα.

Το μήκος των σπάγγων ήταν υπολογισμένο να φτάνει και να σταματάει όταν το δοκίμιο βρεθεί στο ενδιάμεσο του δοχείου.

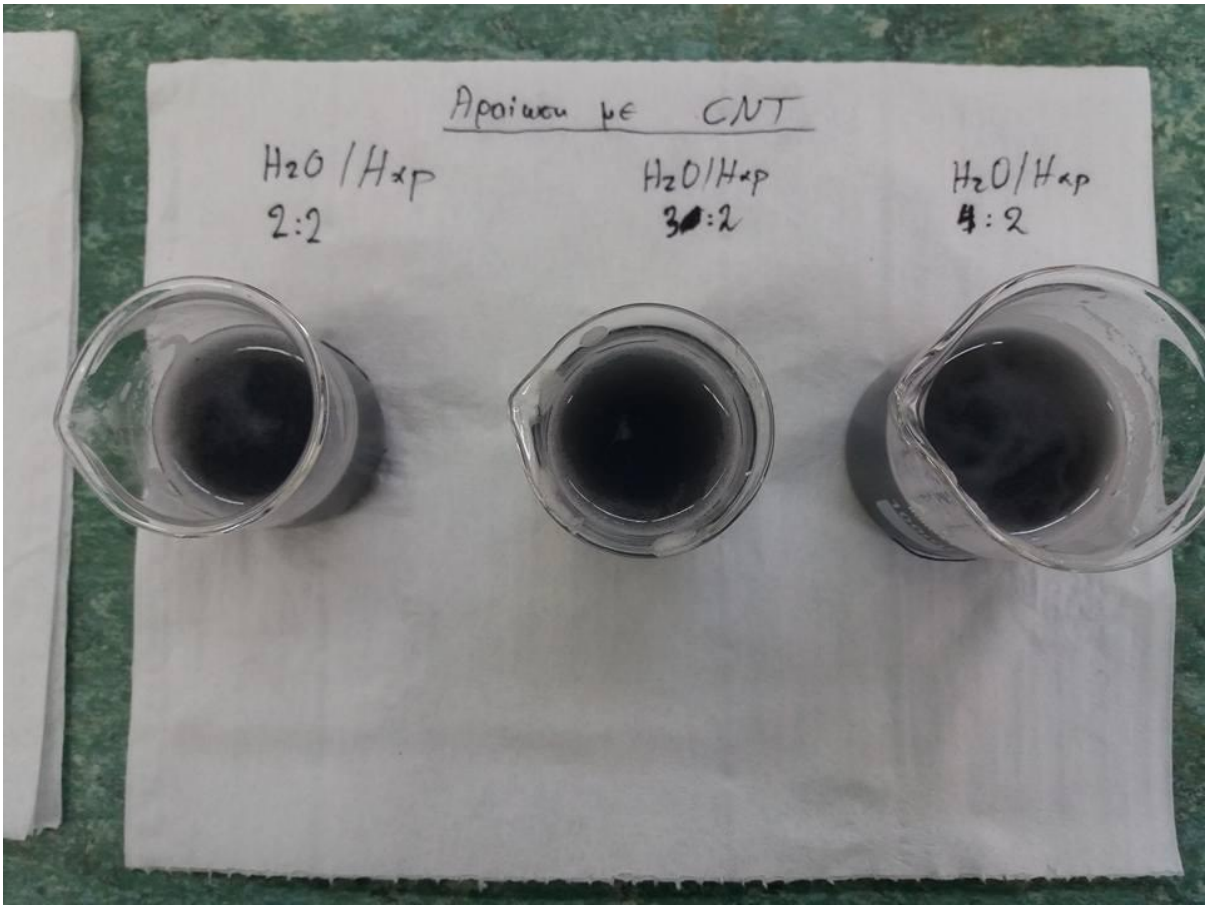
Τελικός σκοπός του παραπάνω μηχανισμού ήταν η όσο το δυνατόν μεγαλύτερη αποφυγή οποιασδήποτε άλλης κίνησης του δοκιμίου πέρα από το 'κατέβασμα', τη βύθιση του και τη παραμονή για όσο χρόνο χρειαζόταν, χωρίς να μεταβάλλεται τοπικά. Ο σκοπός αυτός επιτευχθηκε επιτυχώς μετά από κάποιες προσπάθειες.



Εικόνα 77. Παραστατικά το πειραματικό κομμάτι της εμβάπτισης (f(χρόνου, αραίωσης)).

11.2 Επικάλυψη με αιώρημα υδροξυαπατίτη και νανοσωλήνες άνθρακα

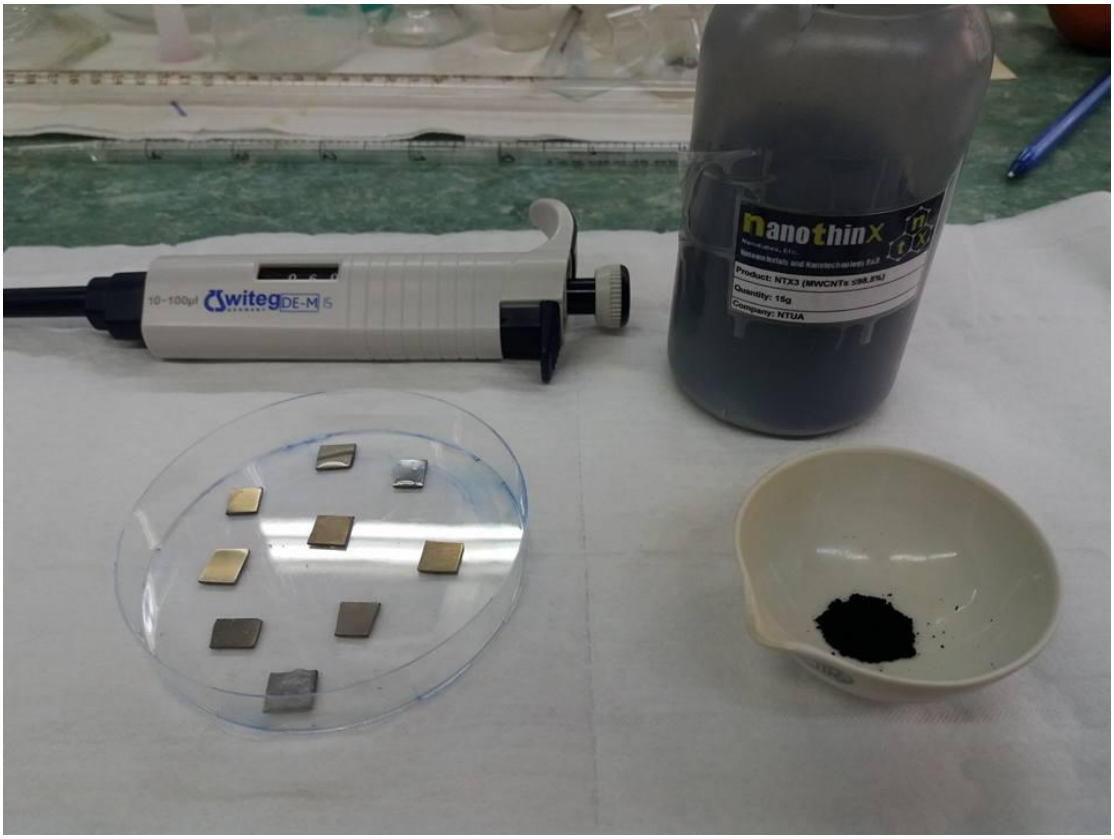
Στη δεύτερη κατηγορία επικάλυψης, έγινε επίσης αραίωση του αιωρήματος με νερό με σκοπό την εύρεση του κατάλληλου χρόνου καθώς και ποσοστού αραίωσης χρησιμοποιώντας τη μέθοδο της εμβάπτισης.



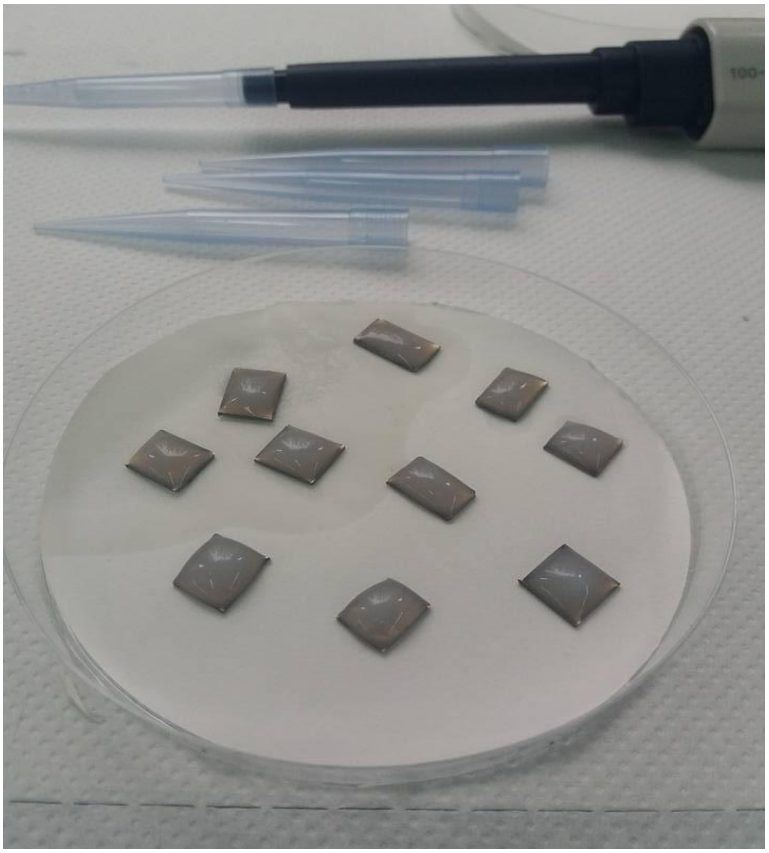
Εικόνα 78. Σταδιακές αραιώσεις του αιωρήματος Υδροξυαπατίτη σε συνδυασμό με νανοσωλήνες άνθρακα (H_2O / Υδροξυαπατίτης 2/2, 3/2, 4/2).

Σε αντίθεση με τη πρώτη κατηγορία επικαλύψεων, αυτή η κατηγορία δεν ήταν καθόλου καλή στη μέθοδο της εμβάπτισης. Για όση διάρκεια παραμονής του δοκιμίου μέσα στο δοχείο με το αιώρημα, όταν το δοκίμιο έβγαινε από το αιώρημα, το ποσοστό της επιφάνειας το οποίο είχε επικαλυφθεί ήταν πολύ μικρό.

Έτσι σε αυτή τη κατηγορία, έγινε επικάλυψη με τη μέθοδο της σταγόνας. Με τη χρήση αυτόματης πιπέττας, τοποθετήθηκαν πάνω στην επιφάνεια των δοκιμίων προσεχτικά 10μl από το αιώρημα. Ύστερα τα δοκίμια αφέθηκαν σε περιβάλλον δωματίου για να ξηρανθούν. Τα αποτελέσματα ήταν σαφώς βελτιωμένα.



Εικόνα 79. Τα δοκίμια έτοιμα για επικάλυψη με τη μέθοδο της σταγόνας.



Εικόνα 80. Τα δοκίμια επικαλλυμένα με τη μέθοδο της σταγόνας.

11.3 Επικάλυψη με αιώρημα υδροξυαπατίτη και οξείδιο του πολυαιθυλενίου

Στη τρίτη κατηγορία, η επικάλυψη έγινε με τη μέθοδο της σταγόνας. 10μl από το αιώρημα του υδροξυαπατίτη μαζί με το οξείδιο του πολυαιθυλενίου (PEO), τοποθετήθηκαν επάνω στο κάθε δοκίμιο. Ύστερα, τα δοκίμια παρέμειναν για 24 ώρες σε θερμοκρασία δωματίου.

12. Καλλιέργεια των Οστεοβλαστών και σχεδιασμός της πειραματικής διαδικασίας για τον έλεγχοβιοσυμβατότητας των διαφορετικών κατηγοριών των επικαλύψεων

Αρχικά, οι οστεοβλάστες μεταφέρθηκαν από το εργαστήριο Εμβιομηχανικής και Συστημικής Βιολογίας του τμήματος Μηχανολόγων Μηχανικών όπου και είχαν καλλιεργηθεί και είχαν παγώσει περίπου 15.000.000 κύτταρα δημιουργώντας μια κάβα κυττάρων. Τα κύτταρα, μεταφέρθηκαν με χρήση ξηρού πάγου από το παραπάνω εργαστήριο στο ΕΚΕΦΕ Δημόκριτος και ποιο συγκεκριμένα στη βιοτεχνολογική εταιρία Protatonce όπου και έγινε η προετοιμασία των κυττάρων(περαιτέρω καλλιέργεια, λύση) καθώς και τα βιολογικά πειράματα.

Εικόνα 81. Τα cryovials τα οποία μεταφέρθηκαν με ξηρό πάγο από το Πολυτεχνείο στο Δημόκριτο για τη διεξαγωγή των βιολογικών πειραμάτων.

Το βιολογικό πειραματικό μέρος έχει χωριστεί σε 2 επιμέρους πειράματα.

12.1 Εύρεση βέλτιστης συγκέντρωσης κυττάρων για τοποθέτηση στα βιοϋλικά

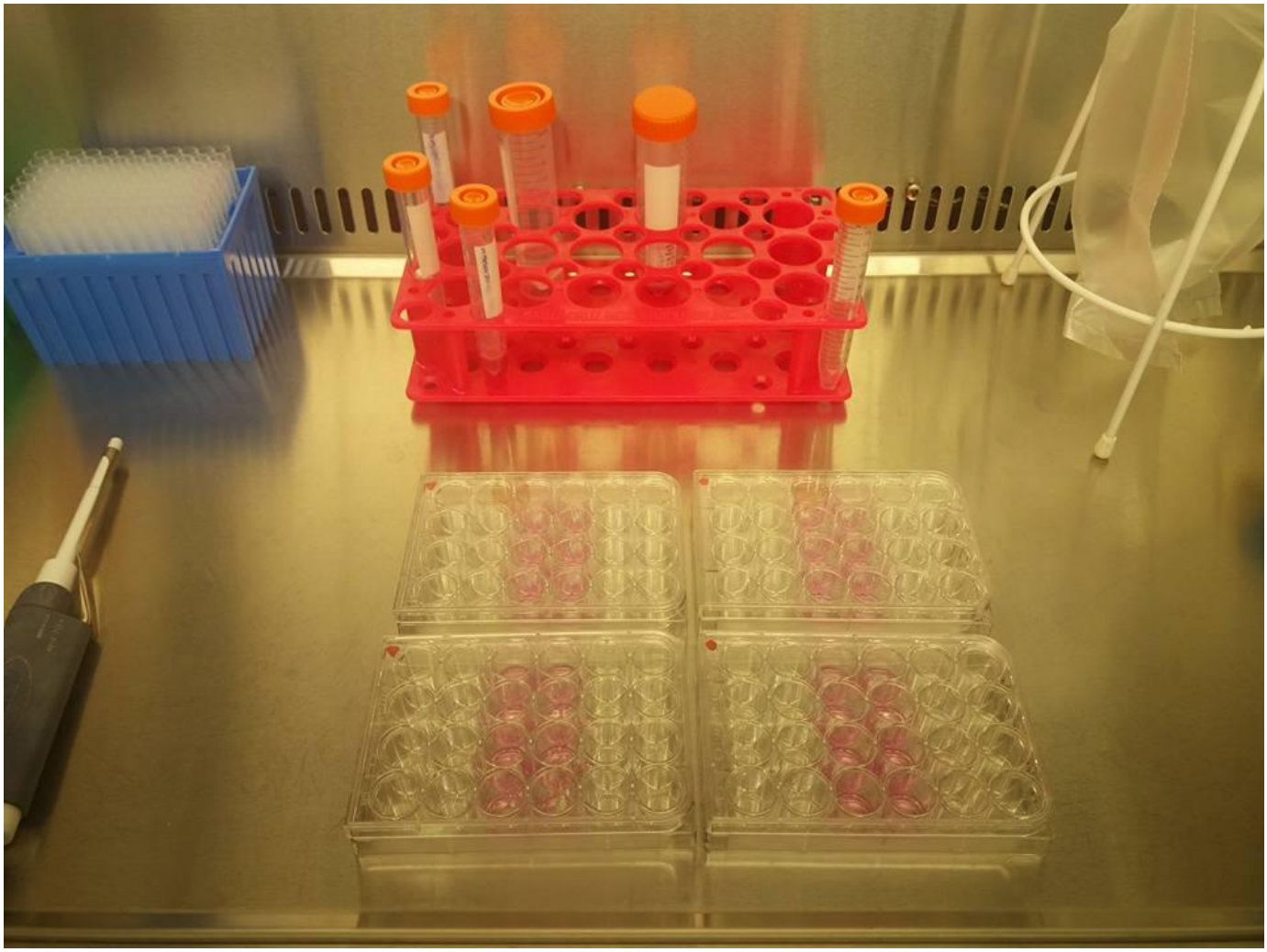
Στο πρώτο πείραμα, γίνεται ουσιαστικά μέτρηση του Housekeeping γονιδίου GAPDH με τη χρήση του ELISA SANDWICH σε κύτταρα τα οποία έχουν τοποθετηθεί σε 24 Well-Plates χωρίς όμως να τοποθετηθούν τα βιοϋλικά. Σκοπός είναι το optimization- εύρεση του κατάλληλου αριθμού κυττάρων τα οποία θα τοποθετηθούν τελικώς για τη διεξαγωγή του βιολογικού ελέγχου επάνω στα βιοϋλικά.

Πιο συγκεκριμένα, 4 διαφορετικά 24 Well-Plates το καθένα από τα οποία αποτελούταν απο 8 διαφορετικά ποσά κυττάρων παρήχθησαν. Κάθε 24άρι well-plate είχε 8 wells με κύτταρα. Πιο συγκεκριμένα, σε κάθε well είχε τοποθετηθεί:

- 1.000.000 κύτταρα
- 500.000 κύτταρα
- 250.000 κύτταρα
- 125.000 κύτταρα
- 62.500 κύτταρα
- 31.125 κύτταρα
- 15.563 κύτταρα
- 7.781 κύτταρα

Συνολικά, όπως αναφέρθηκε και παραπάνω, παρήχθησαν 4 διαφορετικά 24άρια well-plates για μέτρηση GAPDH σε συγκεκριμένα time-frames:

- 1 ημέρα
- 4 ημέρες
- 7 ημέρες
- 11 ημέρες



Εικόνα 82. Τα τέσσερα 24 well-plates με τα διαφορετικά ποσά κυττάρων σε κάθε well, έτοιμα για καλλιέργεια.

	1	2	3	4	5	6
A	**DAY 1**		1M	62.5K		
B			0.5M	31.125K		
C			250K	15.563K		
D			125K	7.781K		

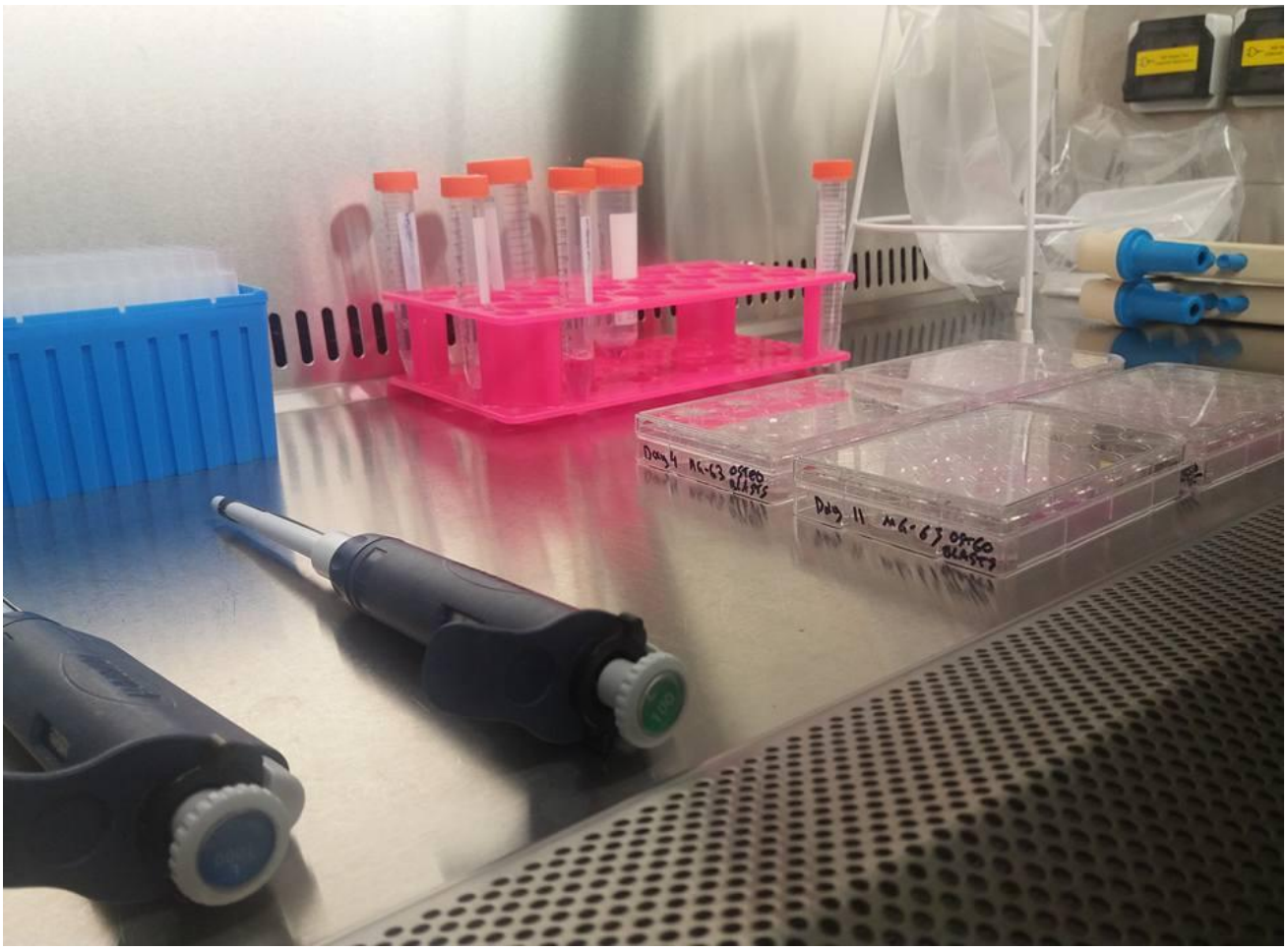
	1	2	3	4	5	6
A	**DAY 4**		1M	62.5K		
B			0.5M	31.125K		
C			250K	15.563K		
D			125K	7.781K		

1 2 3 4 5 6

A	**DAY 7**		1M	62.5K		
B			0.5M	31.125K		
C			250K	15.563K		
D			125K	7.781K		

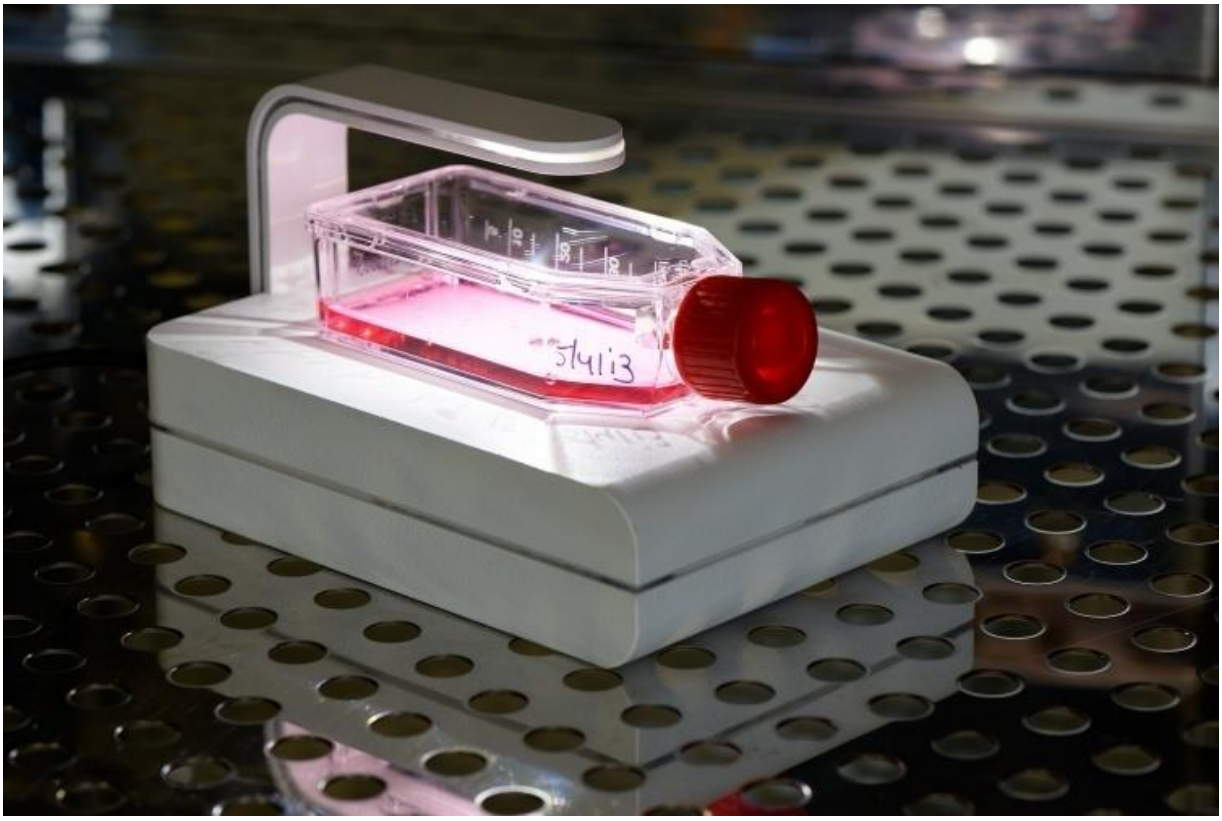
	1	2	3	4	5	6
A	**DAY 11**		1M	62.5K		
B			0.5M	31.125K		
C			250K	15.563K		
D			125K	7.781K		

Εικόνα 83. Ένα schematic της πρώτης πειραματική διαδικασίας.

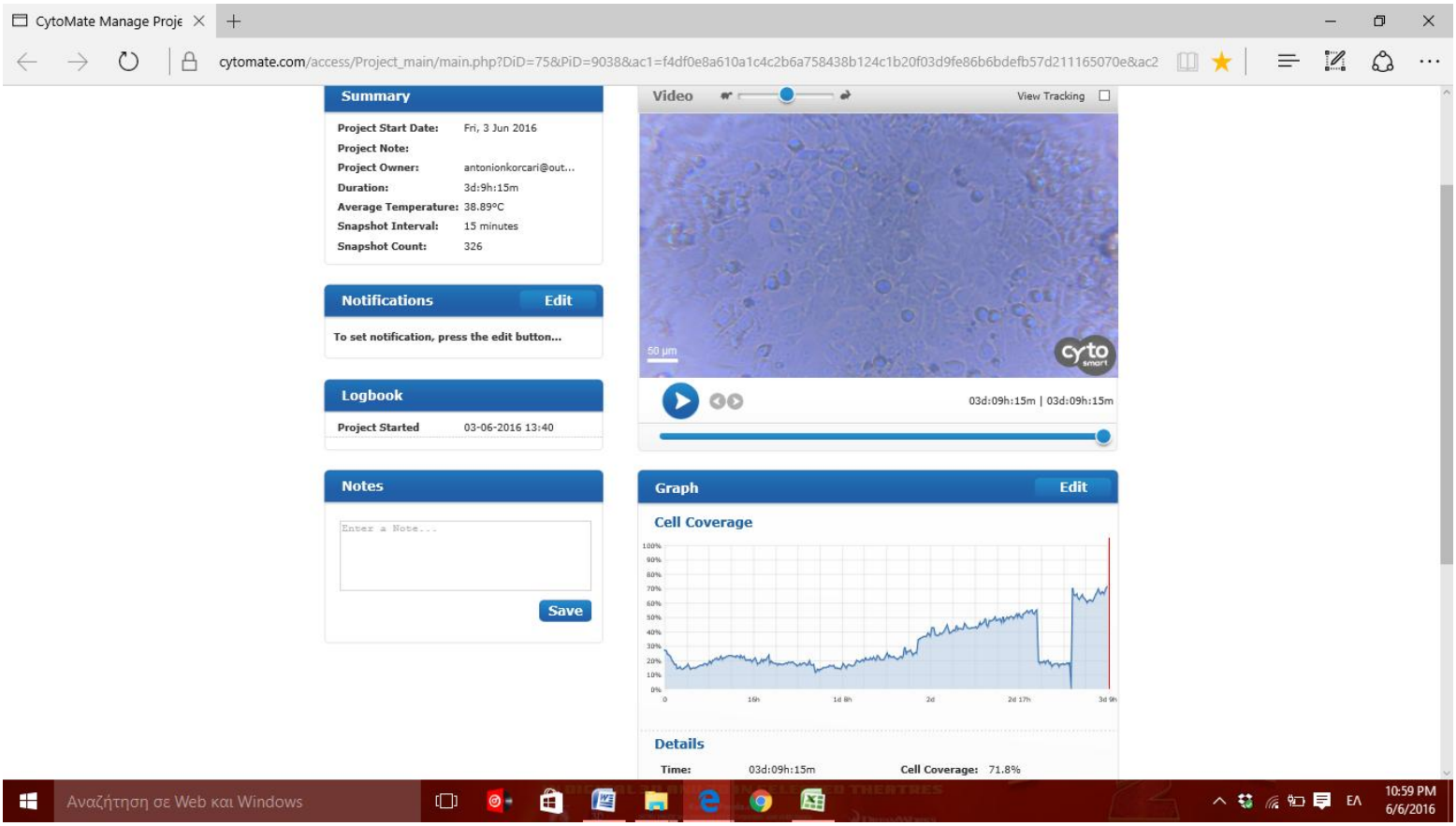


Εικόνα 84. Τα well-plates από άλλη οπτική γωνία έτοιμα για τη καλλιέργεια.

Αφού προετοιμάστηκαν τα τέσσερα well-plates, τοποθετήθηκαν στο incubator για τη καλλιέργια των κυττάρων. Ένα από τα well-plates, συνδέθηκε με ειδική κάμερα μέσα στο incubator, η οποία τράβαγε κάθε 15 λεπτά φωτογραφία και έτσι ήταν δυνατή η δημιουργία βίντεο με τη πρόοδο καλλιέργειας των κυττάρων. Η κάμερα ήταν συνδεδεμένη με tablet και με χρήση διαδικτύου από το tablet και την εισαγωγή στο tablet της διεύθυνσης email ήταν δυνατός ο έλεγχος των κυττάρων οποιαδήποτε στιγμή με εισαγωγή στο λογαριασμό του email.



Εικόνα 85. Η κάμερα με την οποία ήταν εφικτή η φωτογράφιση και η δημιουργία βίντεο των κυττάρων.



Εικόνα 86. Χαρακτηριστική εικόνα όπου δείχνει το πως γίνεται ο έλεγχος των κυττάρων με χρήση προσωπικού λογαριασμού ηλεκτρονικού ταχυδρομείου.

Την επόμενη μέρα, αφού έγινε έλεγχος και στα τέσσερα well-plates, έγινε λύση κυττάρων στο πρώτο από τα τέσερα well- plates. Το διάλυμα για τη λύση περιείχε:

- 1.920 µl Lysis Buffer
- 40µl Protease Inhibitor
- 40µl PMSF

Σε κάθε well, τοποθετήθηκαν 200µl Lysis Solution. Μετά, το well-plate καλύφθηκε με ειδικό αλουμίνιο κάλυμμα και τοποθετήθηκε στους -80 βαθμούς Κελσίου.

Η ίδια διαδικασία ακολουθήθηκε και στα υπόλοιπα τρία well-plates (4, 7 και 11 μέρες). Την επόμενη ημέρα έγινε η πειραματική μέτρηση του GAPDH.

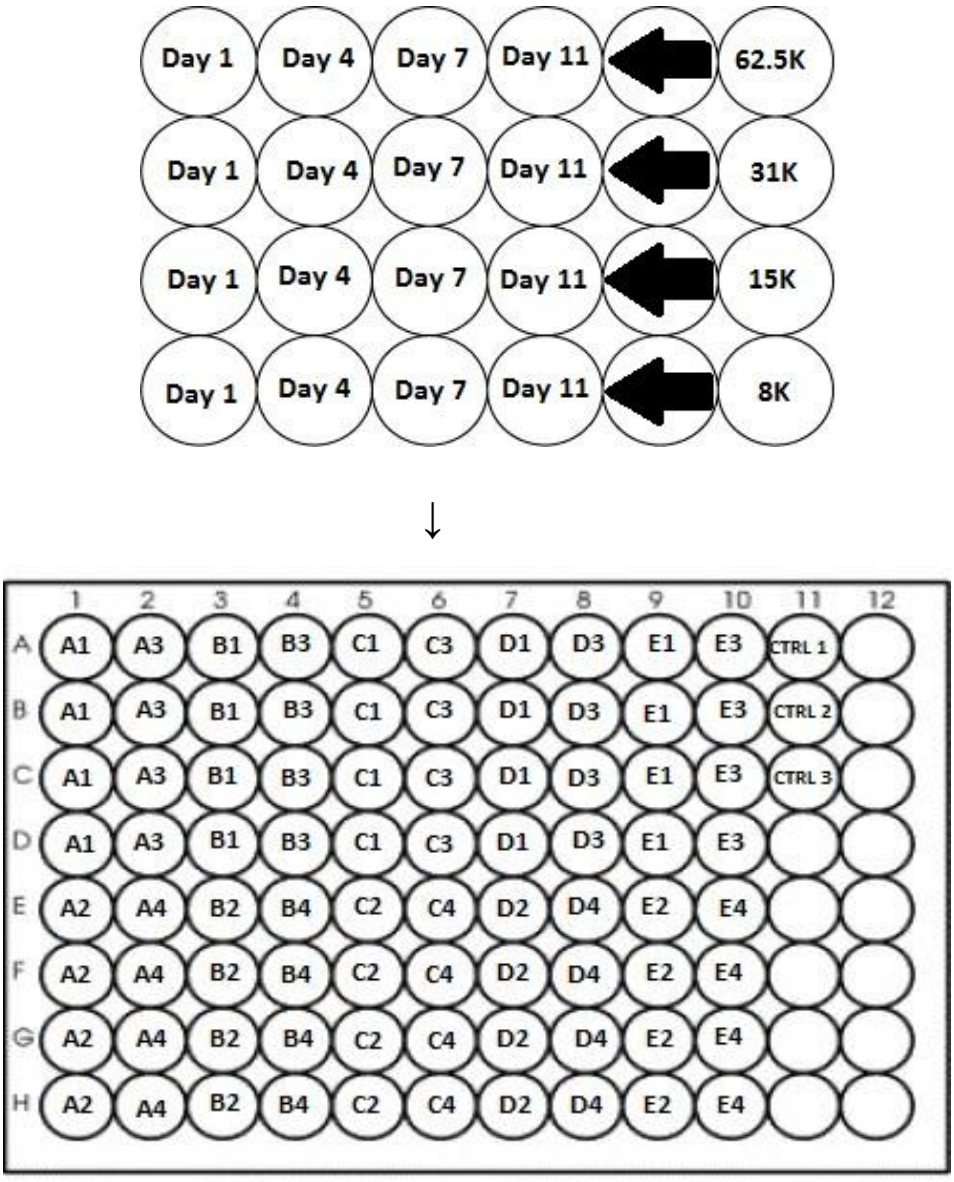
Ημέρα 1	Ημέρα 7	Ημέρα 1	Ημέρα 7	Ημέρα 1	Ημέρα 7	Ημέρα 1	Ημέρα 7	Ημέρα 1	Ημέρα 7
(Undiluted)		(Diluted 1:2)		(Diluted 1:10)		(Diluted 1:50)		(Diluted 1:100)	
Ημέρα 4	Ημέρα 11	Ημέρα 4	Ημέρα 11	Ημέρα 4	Ημέρα 11	Ημέρα 4	Ημέρα 11	Ημέρα 4	Ημέρα 11

Ημέρα1	Ημέρα 7	Ημέρα 1	Ημέρα 7	Ημέρα 1	Ημέρα 7	Ημέρα 1	Ημέρα 7	Ημέρα 1	Ημέρα 7
50μl Lyse+Cells	50 μl Lyse+Cells	25μl LC +25μl PBS	25μl LC +25μl PBS	5μl LC+45μl PBS	5μl LC+45μl PBS	1μl LC+49μl PBS	1μl LC+49μl PBS	0.5μl LC+49.5μl PBS	0.5μl LC+49.5μl PBS
50μl Lyse+Cells	50 μl Lyse+Cells	25μl LC +25μl PBS	25μl LC +25μl PBS	5μl LC+45μl PBS	5μl LC+45μl PBS	1μl LC+49μl PBS	1μl LC+49μl PBS	0.5μl LC+49.5μl PBS	0.5μl LC+49.5μl PBS
50μl Lyse+Cells	50 μl Lyse+Cells	25μl LC +25μl PBS	25μl LC +25μl PBS	5μl LC+45μl PBS	5μl LC+45μl PBS	1μl LC+49μl PBS	1μl LC+49μl PBS	0.5μl LC+49.5μl PBS	0.5μl LC+49.5μl PBS
50μl Lyse+Cells	50 μl Lyse+Cells	25μl LC +25μl PBS	25μl LC +25μl PBS	5μl LC+45μl PBS	5μl LC+45μl PBS	1μl LC+49μl PBS	1μl LC+49μl PBS	0.5μl LC+49.5μl PBS	0.5μl LC+49.5μl PBS
50 μl Lyse+Cells	50 μl Lyse+Cells	25μl LC +25μl PBS	25μl LC +25μl PBS	5μl LC+45μl PBS	5μl LC+45μl PBS	1μl LC+49μl PBS	1μl LC+49μl PBS	0.5μl LC+49.5μl PBS	0.5μl LC+49.5μl PBS

50 μl Lyse+Cells	50 μl Lyse+Cells	25μl LC +25μl PBS	25μl LC +25μl PBS	5μl LC+45μl PBS	5μl LC+45μl PBS	1μl LC+49μl PBS	1μl LC+49μl PBS	0.5μl LC+49.5μl PBS	0.5μl LC+49.5μl PBS
50 μl Lyse+Cells	50 μl Lyse+Cells	25μl LC +25μl PBS	25μl LC +25μl PBS	5μl LC+45μl PBS	5μl LC+45μl PBS	1μl LC+49μl PBS	1μl LC+49μl PBS	0.5μl LC+49.5μl PBS	0.5μl LC+49.5μl PBS
50 μl Lyse+Cells	50 μl Lyse+Cells	25μl LC +25μl PBS	25μl LC +25μl PBS	5μl LC+45μl PBS	5μl LC+45μl PBS	1μl LC+49μl PBS	1μl LC+49μl PBS	0.5μl LC+49.5μl PBS	0.5μl LC+49.5μl PBS
Ημέρα 4	Ημέρα11	Ημέρα 4	Ημέρα 11	Ημέρα 4	Ημέρα 11	Ημέρα 4	Ημέρα 11	Ημέρα 4	Ημέρα 11

Αφύ λοιπόν έγινε ο πειραματικός σχεδιασμός του πρώτου βιολογικού πειράματος, στη συνέχεια ακολουθήθηκε το πρωτόκολλο μέτρησης του γονιδίου GAPDH με τη χρήση του ELISA Sandwich.

Αρχικά έγινε μεταφορά των δειγμάτων από τα κύτταρα που είχαν υποστεί λύση, από τα 24 well-plates σε 96 well-plate για να γίνει η μέτρηση. Ακόμη, στην 96 well-plate, έγιναν διάφορες αραιώσεις (1:2, 1:10, 1:50, 1:100) των δειγμάτων μαζί με PBS όπως φαίνεται και παραπάνω στο πίνακα του πειραματικού σχεδιασμού, με σκοπό την εύρεση της κατάλληλης συγκέντρωσης κυττάρων καθώς και της κατάλληλης αραίωσης για την απόκτηση των καλύτερων αποτελεσμάτων.



Εικόνα 87. Σχηματικά η μεταφορά από την 24 στην 96 well-plate

Στην παραπάνω εικόνα, στο δεύτερο σχήμα, τα αρχικά σημαίνουν:

A1: 1^{H} μέρα, μη αραιωμένο, **A2**: $4^{η}$ μέρα, μη αραιωμένο, **A3**:$7^{η}$ μέρα, μη αραιωμένο **A4**: $11^{η}$ μέρα, μη αραιωμένο

B1: $1^{η}$ μέρα, 1:2 αραίωση, **B2**: $4^{η}$ μέρα, 1:2 αραίωση, **B3**: $7^{η}$ μέρα, 1:2 αραίωση **B4**:$11^{η}$ μέρα, 1:2 αραίωση

C1: $1^{η}$ μέρα, 1:10 αραίωση, **C2**: $4^{η}$ μέρα, 1:10 αραίωση, **C3**: $7^{η}$ μέρα, 1:10 αραίωση **C4**: $11^{η}$ μέρα, 1:10 αραίωση

D1: $1^{η}$ μέρα , 1:50 αραίωση, **D2**: $4^{η}$ μέρα, 1:50 αραίωση, **D3**: $7^{η}$ μέρα, 1:50 αραίωση **D4**: $11^{η}$ μέρα, 1:50 αραίωση

E1: $1^{η}$ μέρα, 1:100 αραίωση, **E2**: $4^{η}$ μέρα, 1:100 αραίωση, **E3**: $7^{η}$ μέρα, 1:100 αραίωση, **E4**: $11^{η}$ μέρα, 1:100 αραίωση.

Οι παραπάνω αραιώσεις έγιναν με PBS.

Τα **βήματα** του πρωτοκόλλου είναι:

1. Ξεπάγωμα των τεσσάρων well-plates από τους -80°C στους 37°C σε ειδικό υδάτινο λουτρό.
2. Τοποθέτηση των παραπάνω well-plates σε λουτρό υπερήχων για 20 δευτερόλεπτα.
3. Φυγοκέντρηση των παραπάνω well-plates για 20 λεπτά στα 2700RCF.
4. Επαναραίωση συνόλου των επιλεγμένων συνδεδεμένων μικροσφαιριδίων-αντισωμάτων (χρήση μηχανήματος στροβίλισης και κατεργασία με υπερήχους για 10 δευτερόλεπτα).
5. Ανάμιξη των συνδεδεμένων μικροσφαιριδίων (stock συγκέντρωση 5000 μικροσφαιρίδια/μl) σε μια τελική συγκέντρωση/μl χρησιμοποιώντας ως αραιωτικό Assay Buffer (PBS, BSA 1%).

   Υπολογισμός των μικοσφαιριδίων στόχου που θα τοποθετηθούν:

   100wells * 50 μl = 5000μl

   Μικροσφαιρίδια STOCK συγκέντρωση: 5000 μικροσφ/μl

   Μικροσφαιρίδια TARGET συγκέντρωση: 1500 μικροσφ/μl

   100 wells * 1500 μικροσφαιρίδια = 15.000

15000/5000 = 30 μl STOCK + 4970 μl ASSAY BUFFER

6. Μεταφορά 50μl από τα παραπάνω μικροσφαιρίδια σε κάθε well της 96 well-plate
7. Τοποθέτηση του well-plate σε μαγνητικό διαχωριστή, παραμονή για 1 λεπτό και απόρριψη υπερκείμενου.
8. Προσθήκη 100μl/ well ASSAY BUFFER
9. Τοποθέτηση του well-plate σε μαγνητικό διαχωριστή, παραμονή για 1 λεπτό και απόρριψη υπερκείμενου.
10. Μεταφορά 50 μl από το δείγμα (κύτταρα που έχουν υποστεί λύση) στα κατάλληλα wells.
11. Κάλυψη του well-plate με κάλυμμα και δόνηση στα 800RPM για 90 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου.
12. Τοποθέτηση του well-plate σε μαγνητικό διαχωριστή, παραμονή για 1 λεπτό και απόρριψη υπερκείμενου.
13. Προσθήκη 100 μl/well ASSAY BUFFER.
14. Τοποθέτηση του well-plate σε μαγνητικό διαχωριστή, παραμονή για 1 λεπτό και απόρριψη υπερκείμενου.
15. Επανάληψη βημάτων 8-9
16. Μεταφορά 20 μl αντισώματος ανίχνευσης σε κάθε well.
17. Κάλυψη του well-plate με κάλυμμα και δόνηση στα 800RPM για 60 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου.
18. Τοποθέτηση του well-plate στο μαγνητικό διαχωριστή, προσθήκη 100μl/well ASSAY BUFFER και απόρριψη υπερκείμενου.
19. Προσθήκη 100 μl/well ASSAY BUFFER.
20. Τοποθέτηση του well-plate σε μαγνητικό διαχωριστή, παραμονή για 1 λεπτό και απόρριψη υπερκείμενου.
21. Προετοιμασία μείγματος στρεπταβιδίνης φυκοεριθρίνης, αραίωση 1:200 το STOCK (1mg/ml) στο ASSAY BUFFER
22. Προσθήκη του φρέσκου προετοιμασμένου μείγματος στρεπταβιδίνης φυκοεριθρίνης μαζί με ASSAY BUFFER (50μl/well).
23. Κάλυψη του well-plate με κάλυμμα και δόνηση στα 800RPM για 15 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου.
24. Τοποθέτηση του well-plate σε μαγνητικό διαχωριστή, παραμονή για 1 λεπτό και απόρριψη υπερκείμενου.

25. Π ροσθήκη 100 μl/well ASSAY BUFFER.
26. Τοποθέτηση του well-plate σε μαγνητικό διαχωριστή, παραμονή για 1 λεπτό και απόρριψη υπερκείμενου.
27. Απομάκρυνση του well-plate από το μαγνητικό διαχωριστή και επαναραίωση των μικροσφαιριδίων σε 130 μl/well ASSAY BUFFER.
28. Κάλυψη του well-plate με κάλυμμα και δόνηση στα 800RPM για 1 λεπτό σε θερμοκρασία δωματίου.
29. Απομάκρυνση του καλύμματος, τοποθέτηση του well-plate στο μηχάνημα της Luminex για μέτρηση.
30. Ανάλυση 100μl στο μηχάνημα Luminex σύμφωνα με το ψηφιακό σύστημα του μηχανήματος.

12.2 Κυτταρική καλλιέργεια και υπολογισμός κυτταρικής βιωσιμότητας στα βιοϋλικά

Το δεύτερο βιολογικό πείραμα οσυσιαστικά είναι ο έλεγχος της κυτταρικής βιωσιμότητας επάνω στις διαφορετικές κατηγορίες των βιοϋλικών. Αφού βρέθηκε το ευνοϊκότερο εύρος συγκέντρωσης κυττάρων (μεταξύ 7 και 15 χιλιάδες κύτταρα/τετραγωνικό εκατοστό) από το πρώτο βιολογικό πείραμα, επιλέχθηκε τελικώς να τοποθετηθούν σε κάθε δοκίμιο 10.000 κύτταρα (νεοπλαστικοί καρκινικοί οστεοβλάστες από το μυελό των οστών).

Οι κατηγορίες βιοϋλικών στις οποίες θα γίνουν οι καλλιέργειες είναι:

1. **K_1**: Τιτάνιο λειασμένο μέχρι 1200 grit χωρίς επικάλυψη.
2. **K_2**: Τιτάνιο επικαλυμένο με αιώρημα υβριδικού νάνο-υδροξυαπατίτη (Μέθοδος εμβάπτισης).
3. **K_3**: Τιτάνιο επικαλυμένο με αιώρημα υβριδικού νάνο-υδροξυαπατίτη στο οποίο έχει προστεθεί συγκεκριμένο ποσοστό νανοσωλήνων άνθρακα (Μέθοδος σταγόνας).
4. **K_4**: Τιτάνιο επικαλυμένο με γέλη η οποία αποτελείται από ανάμιξη σκόνης υδροξυαπατίτη και του βιοπολυμερούς οξειδίου του πολυαιθυλενίου (Polyethylene oxide, PEO).

Οι κυτταρικές καλλιέργειες έγιναν σε τρια διαφορετικά time frames (1 μέρα, 3 μέρες και 7 μέρες), σε συνολικά τρία διαφορετικά well plates ανάλογα με τη μέτρηση. Παραστατικά,

Ημέρα 1η :

Ti	Ti	EMPTY	EMPTY	EMPTY	EMPTY
Ti+Hap	Ti+Hap	EMPTY	EMPTY	EMPTY	EMPTY
Ti+Hap+PEO	Ti+Hap+PEO	EMPTY	EMPTY	EMPTY	EMPTY
Ti+Hap+CNT	Ti+Hap+CNT	EMPTY	EMPTY	EMPTY	EMPTY

Ημέρα 3η :

Ti	Ti	EMPTY	EMPTY	EMPTY	EMPTY
Ti+Hap	Ti+Hap	EMPTY	EMPTY	EMPTY	EMPTY
Ti+Hap+PEO	Ti+Hap+PEO	EMPTY	EMPTY	EMPTY	EMPTY
Ti+Hap+CNT	Ti+Hap+CNT	EMPTY	EMPTY	EMPTY	EMPTY

Ημέρα 7η :

Ti	Ti	EMPTY	EMPTY	EMPTY	EMPTY
Ti+Hap	Ti+Hap	EMPTY	EMPTY	EMPTY	EMPTY
Ti+Hap+PEO	Ti+Hap+PEO	EMPTY	EMPTY	EMPTY	EMPTY
Ti+Hap+CNT	Ti+Hap+CNT	EMPTY	EMPTY	EMPTY	EMPTY

Τα βήματα τα οποία ακολουθήθηκαν για τη τοποθέτηση των κυττάρων επάνω στα βιοϋλικά είναι:

1. Τοποθέτηση των petri dishes με τα δοκίμια μέσα στο chemical hood, αφού ψεκαστεί εξωτερικά με αιθανόλη 70%.
2. Τα δοκίμια παραμένουν για 10 λεπτά ανά πλευρά σε υπεριώδεις ακτίνες (UV).
3. Τα petri dishes με τα δοκίμια γεμίζουν με αιθανόλη 70% και παραμένουν για 10 λεπτά.
4. Αφού αφαιρεθεί η αιθανόλη από τα petri dishes, τα δοκίμια μεταφέρονται στο αντίστοιχο well plate.
5. Το well plate γεμίζεται με αιθανόλη 70% και τα δοκίμια παραμένουν ξανά για 10 λεπτά στην αιθανόλη.
6. Αφού στεγνώσουν τα δοκίμια, ξεπλένονται με PBS τρεις φορές.
7. Στη συνέχεια, τοποθετούνται 50μl με medium μαζί με κύτταρα ακριβώς στο κέντρο του κάθε δοκιμίου. Τα 50μl περιέχουν ακριβώς 10.000 κύτταρα (Οι μαθηματικές πράξεις που έγιναν για να έχουμε στα 50 μικρά 10.000 κύτταρα παρουσιάζονται παρακάτω).
8. Τα δοκίμια τοποθετούνται μέσα στο incubator για 90 λεπτά έτσι ώστε τα κύτταρα να προσκολλήσουν επάνω στα δοκίμια.
9. Μετά το πέρας των 90 λεπτών, σε κάθε well προστίθεται 1 ml από Medium
10. Τέλος, τα τρία διαφορετικά well-plates τοποθετούνται στο incubator.

Η αλλαγή του θρεπτικού υλικού (Medium) γίνεται κάθε δύο ημέρες.

Για να έχουμε τελικώς στα 50 μl θρεπτικού 10.000 κύτταρα ακολουθήθηκε η παρακάτω διαδικασία:

Αρχικά, έγινε μέτρηση κυττάρων που βρίσκονταν σε φλάσκα και καλλιεργούνταν για το συγκεκριμένο πείραμα.

Στα 10ml → 3.150.000 κύτταρα

Στο 1ml → 315.000 κύτταρα

Για το πείραμα, θα πρέπει:

Στα 50μl → 10.000 κύτταρα

Άρα στα 1000μl → X_1=;

X_1= 200.000 κύτταρα

Συνεπώς, θα πρέπει να γίνει συγκεκριμένη αραίωση έτσι ώστε στο 1 ml θρεπτικού να έχω 200.000 κύτταρα.

Έστω, C_1, V_1 : η αρχική συγκέντρωση κυττάρων που έχω και ο αρχικός όγκος αντίστοιχα

και C_2, V_2 : η επιζητούμενη συγκέντρωση και ο επιζητούμενος όγκος, αντίστοιχα.

$$C_1 * V_1 = C_2 * \mathbf{V_2}$$

$$315.000 \text{ cells/ml} * 10 \text{ ml} = 200.000 \text{ cells/ml} * V_2$$

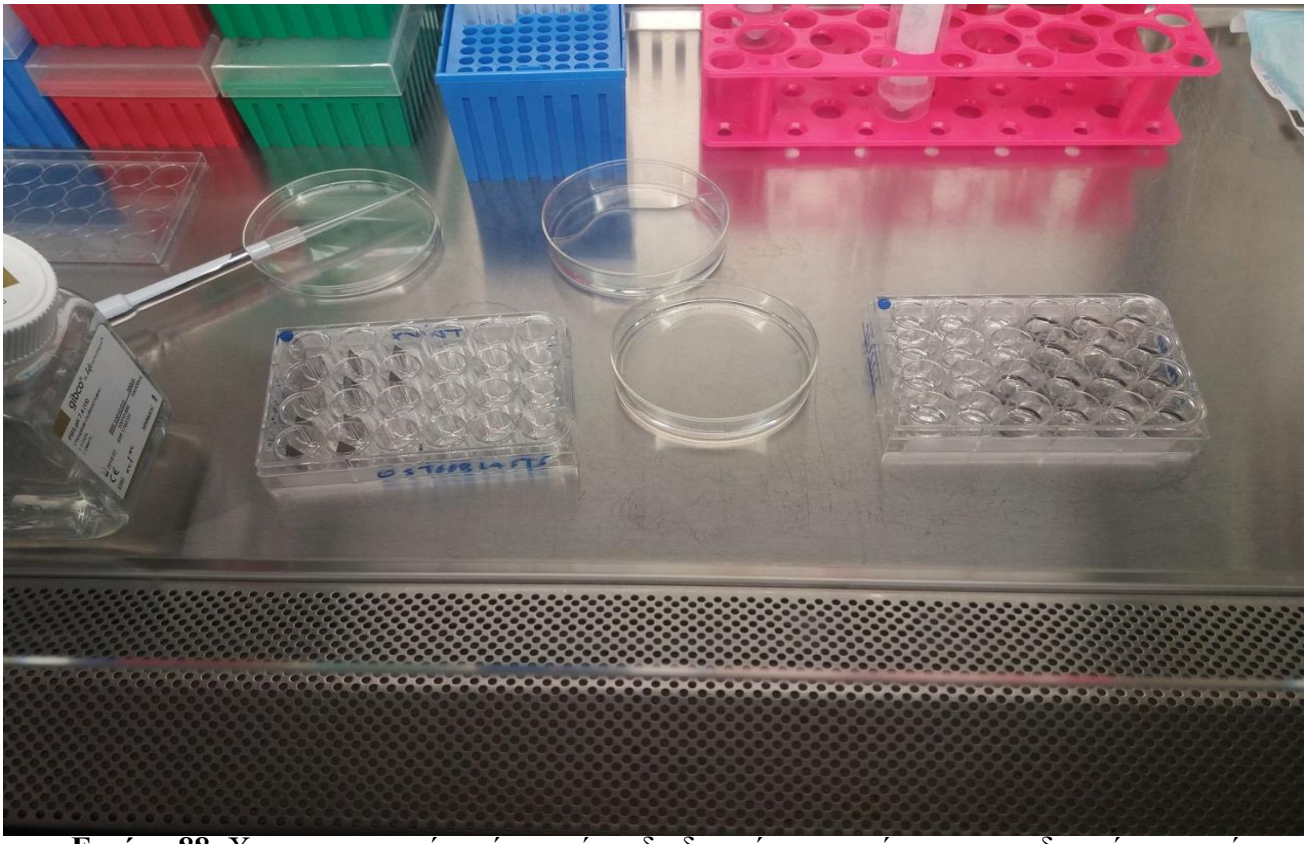
$$\mathbf{V_2 = 15.75 \text{ ml}}$$

Συνεπώς, για να έχω σε 1 ml θρεπτικού 200.000 κύτταρα ή με άλλα λόγια σε 50 μl θρεπτικού (ποσό που τοποθετήθηκε σε κάθε δοκίμιο) 10.000 κύτταρα, θα πρέπει ο τελικός όγκος θρεπτικού να είναι 15.75 ml.

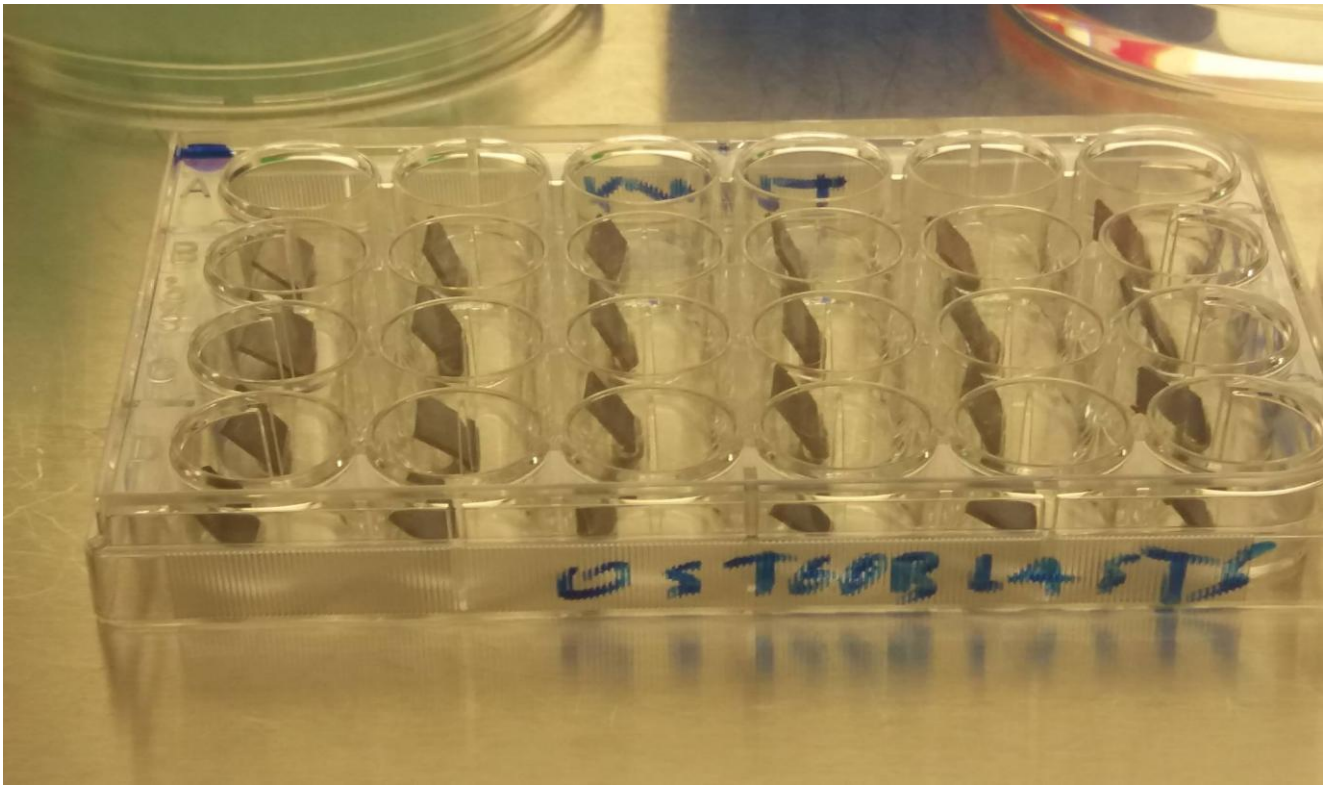
Άρα, για την επίτευξη του παραπάνω ζητούμενου, προστέθηκαν στα αρχικά 10 ml θρεπτικού, άλλα **5,75 ml** θρεπτικό.

Αφού τοποθετήθηκαν τα κύτταρα επάνω στα βιοϋλικά, παρέμειναν στο incubator για 90 λεπτά έτσι ώστε όλα τα κύτταρα να προσκολλήσουν επάνω στις επιφάνειες των βιοϋλικών.

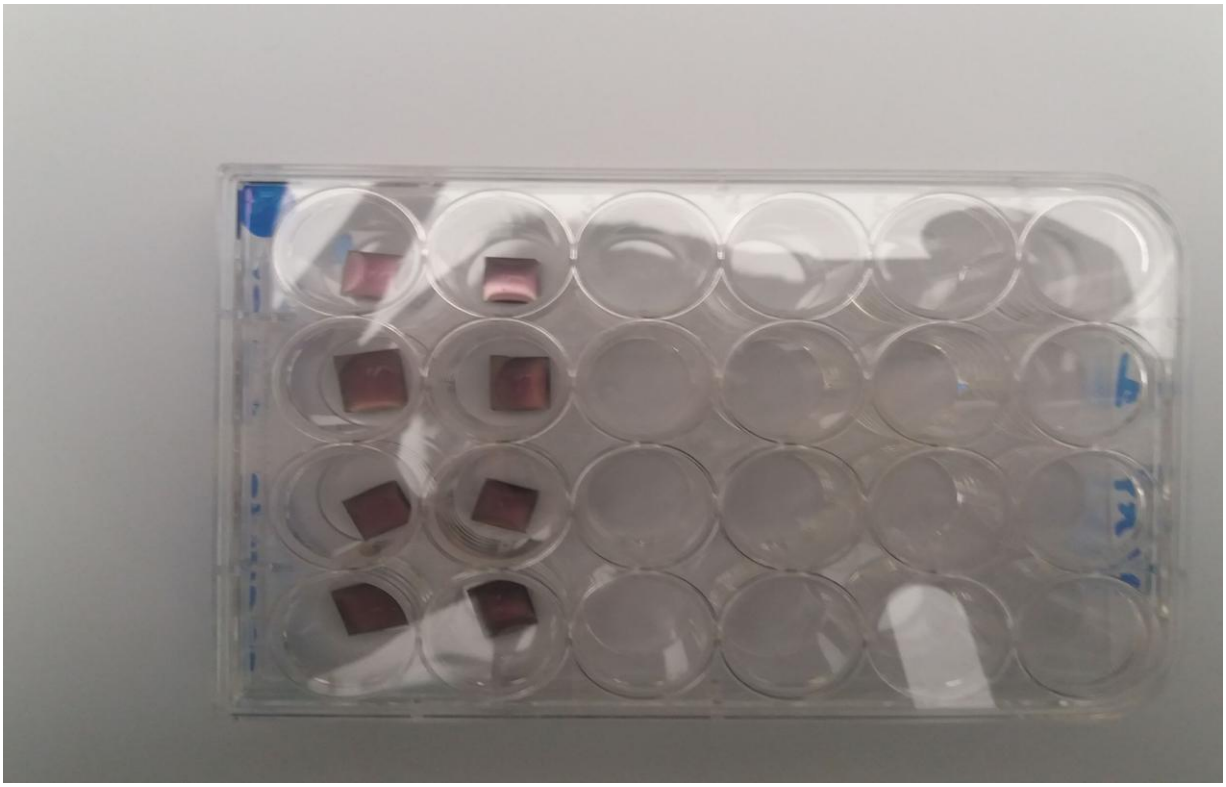
Μετά το πέρας των 90 λεπτών, όλα τα βιοϋλικά απομακρύνθηκαν από το incubator και 1 ml θρεπτικού υλικού προστέθηκε σε κάθε well (κάθε δοκίμιο κάθε κατηγορίας).



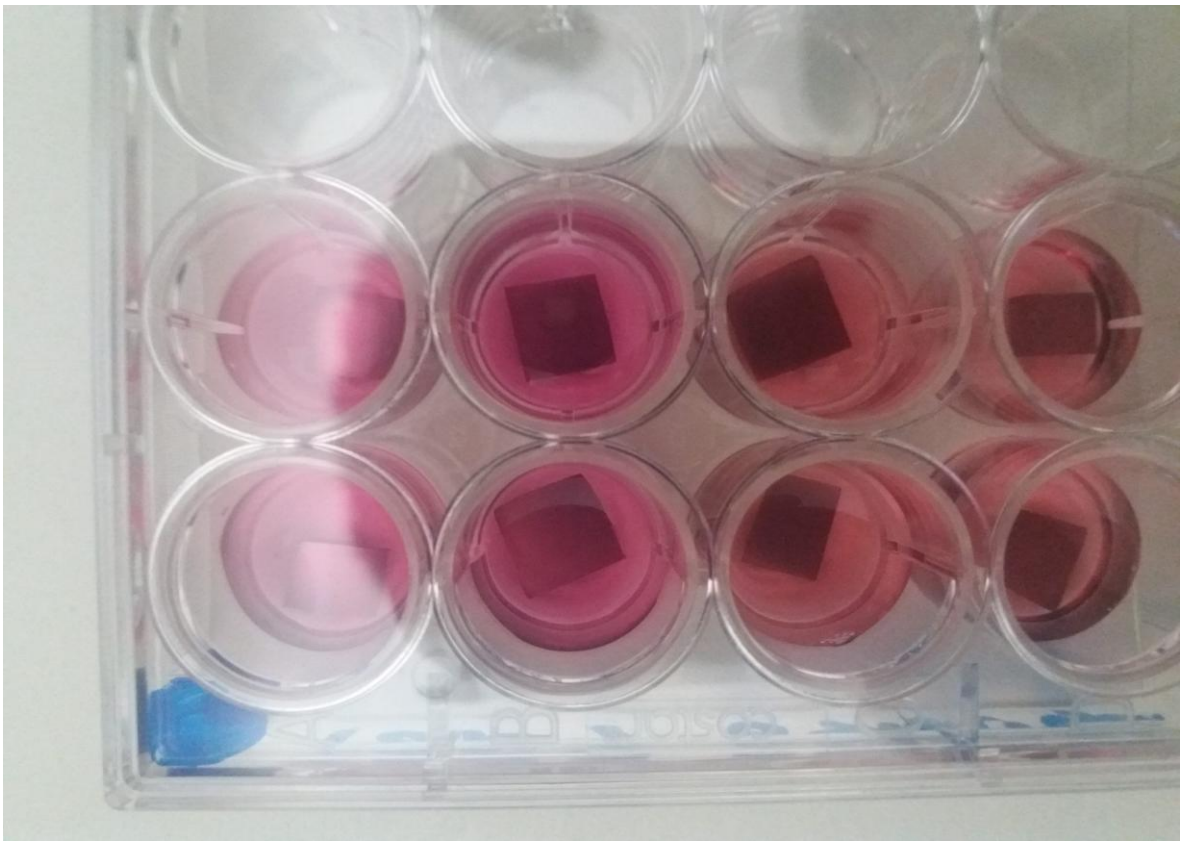
Εικόνα 88. Χαρακτηριστική εικόνα από τη διαδικασία αποστείρωσης των δοκιμίων τιτανίου καθώς και των επιστρώσεων.



Εικόνα 89. Εδώ τα δοκίμια αφού έχουν αποστειρωθεί, βρίσκονται στη διαδικασία ξήρανσης.



Εικόνα 90. Αφού ξηράνθηκαν τα αποστειρωμένα δοκίμια, 50μl από medium (10.000 κύτταρα) τοποθετήθηκαν με χρήση αυτόματης πιπέττας προσεχτικά στο κέντρο κάθε δοκιμίου.



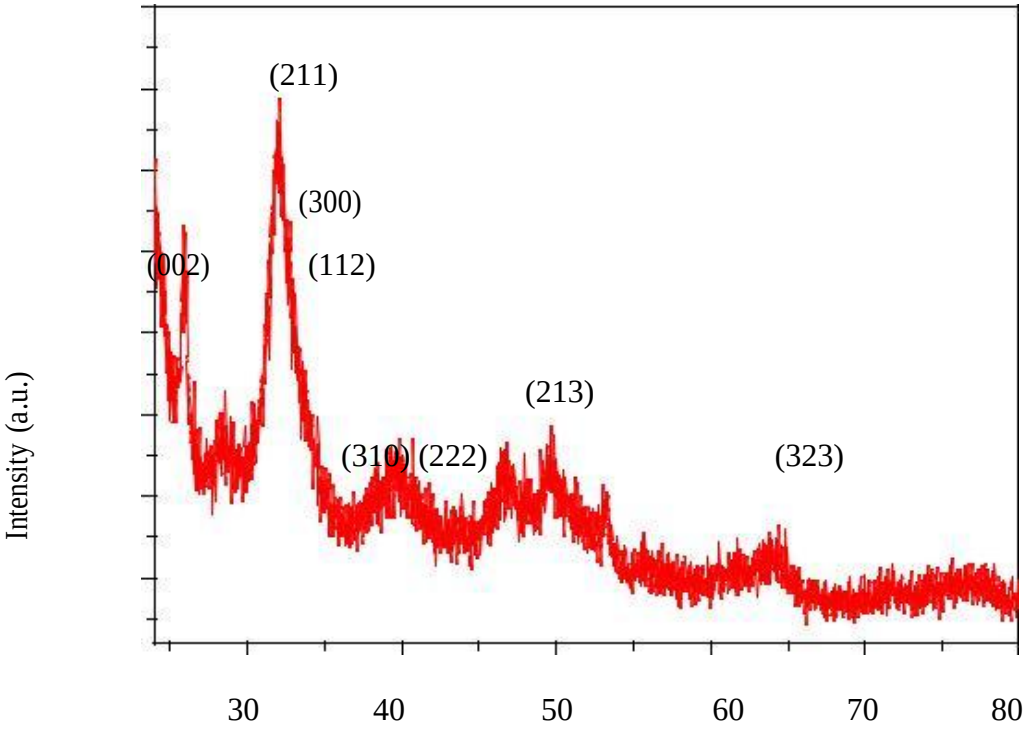
Εικόνα 91. Τα δοκίμια αφού έχει προστεθεί 1 ml θρεπτικού ανά well

III. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ ΚΑΙ ΣΥΖΗΤΗΣΗ ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΩΝ

13. Αποτελέσματα Περίθλασης ακτίνων Χ

13.1 Αποτελέσματα XRD για τη πρώτη κατηγορία επικαλύψεων (μόνο υδροξυαπατίτης)

Παρακάτω από τη μέτρηση XRD (σχήμα 1), παρατηρούνται οι χαρακτηριστικές κορυφές του εξαγωνικού υδροξυαπατίτη (002), (211), (112), (310), (222) και (213) που απαντώνται και στον οστικό απατίτη. Ακόμη, το εύρος των κορυφών μας υποδηλώνει το γεγονός ότι το υλικό είναι νανοκρυσταλλικό. Η σύγκριση έγινε σε αντιπαραβολή με τον καθαρό υδροξυαπατίτη (JCPDS 09-0432).



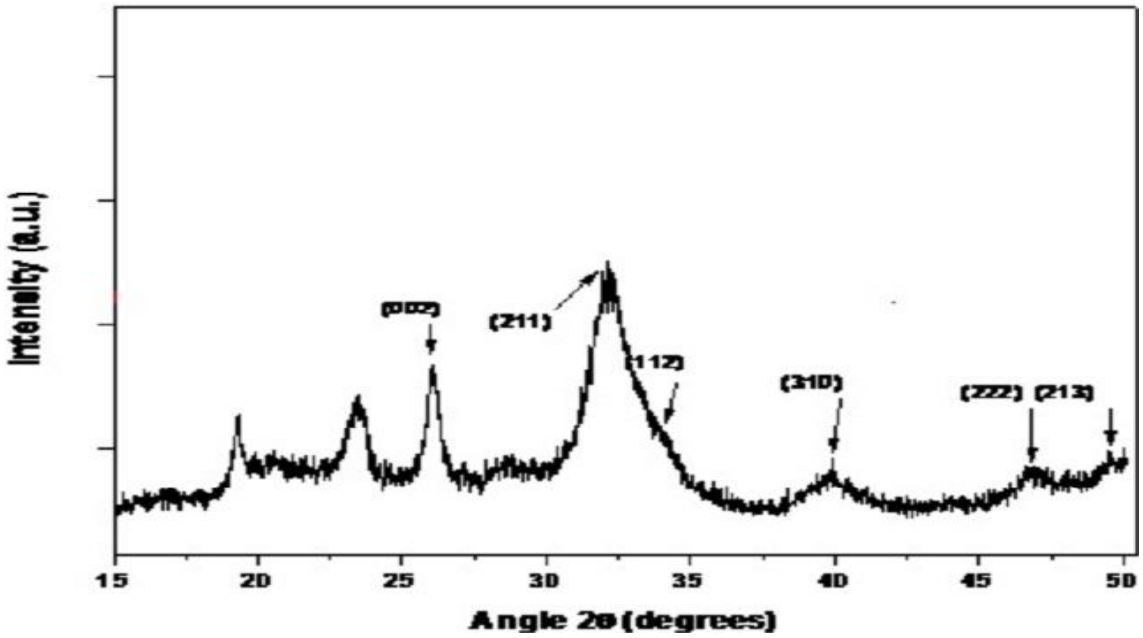
Σχήμα 1. XRD όπου δείχνει τις κορυφές του υδροξυαπατίτη

13.2 Αποτελέσματα XRD για τη δεύτερη κατηγορία επικαλύψεων (υδροξυαπατίτης και νανοσωλήνες άνθρακα)

Όταν έγινε το αντίστοιχο πείραμα για τον υδροξυαπατίτη και τους νανοσωλήνες άνθρακα, το διάγραμμα που λήφθηκε ήταν ακριβώς ίδιο με το διάγραμμα της πρώτης κατηγορίας. Η κύρια κορυφή του γραφίτη (002) των MWCNTs δεν παρατηρήθηκε. Αυτό συμβαίνει κυρίως επειδή η μικρή ποσότητα του CNT που χρησιμοποιείται ήταν δύσκολο να ανιχνευθεί εντός του ορίου ευαισθησίας του οργάνου, καθώς και γιατί η κύρια κορυφή του πέφτει πολύ κοντά με την έντονη κορυφή του υδροξυαπατίτη στις 26°.

13.3 Αποτελέσματα XRD για τη τρίτη κατηγορία επικαλύψεων (υδροξυαπατίτης και οξείδιο του πολυαιθυλενίου)

Παρατηρώντας το παρακάτω ακτινοδιάγραμμα (σχήμα 2), είναι εμφανείς οι χαρακτηριστικές κορυφές του εξαγωνικού υδροξυαπατίτη, οι οποίες είναι όμοιες με αυτές του υδροξυαπατίτη που απαντάται στον φυσικό οστικό ιστό. Συγκεκριμένα οι κορυφές στις γωνίες 2θ= 26°, 32°, 33,8°, 39,8°, 46,8° και 49,5° αντιστοιχούν στα κρυσταλλικά επίπεδα (002), (211), (112), (310), (222) και (213) του φυσικού εξαγωνικού υδροξυαπατίτη. Επίσης παρατηρούνται οι χαρακτηριστικές κορυφές του PEO στις γωνίες 2θ=19,3° και 23,4°.



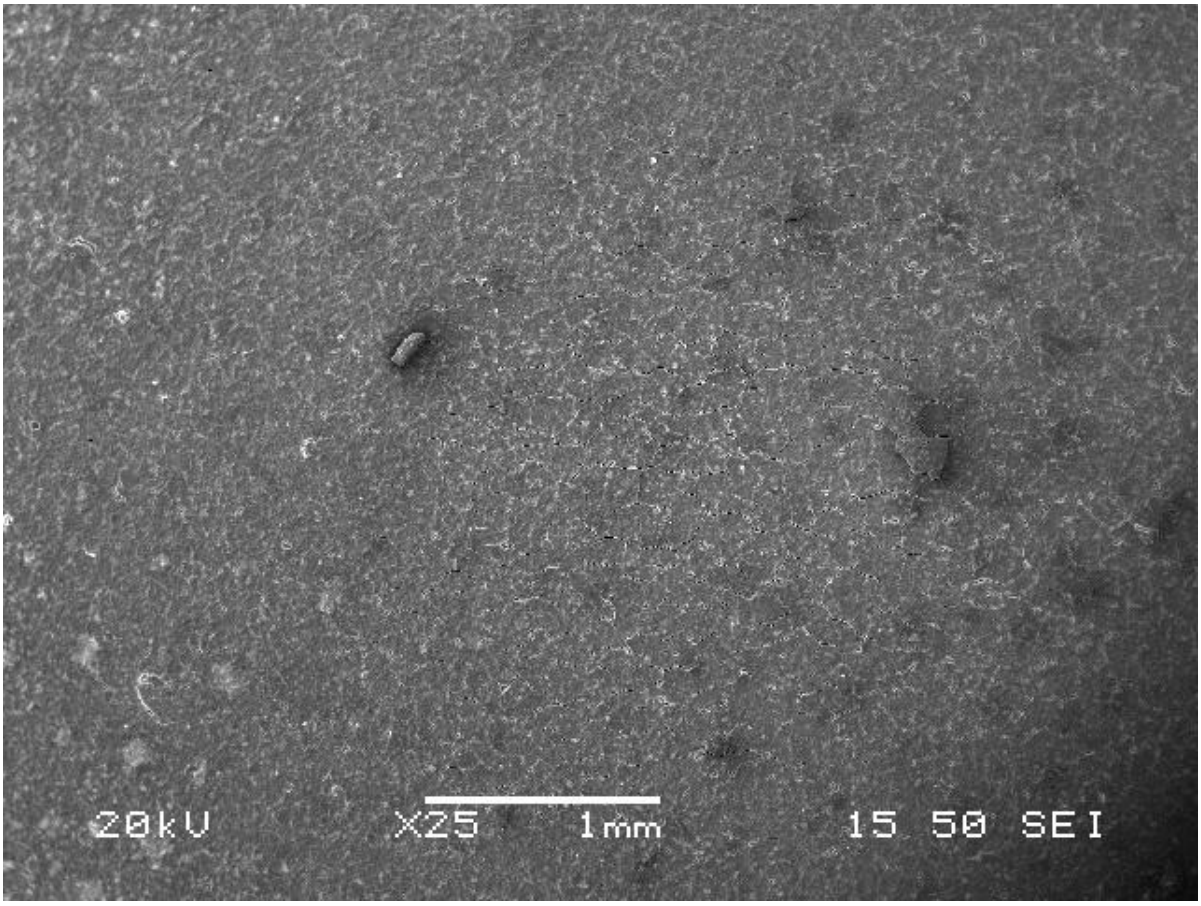
Σχήμα 2. Φάσμα XRD δείγματος υδροξυαπατίτη και οξειδίου του πολυαιθυλενίου.

14 Αποτελέσματα SEM των τριών κατηγοριών επίστρωσης πριν την αραίωση των αιωρημάτων

14.1 Επίστρωση δοκιμίων τιτανίου με αιώρημα υδροξυαπατίτη.

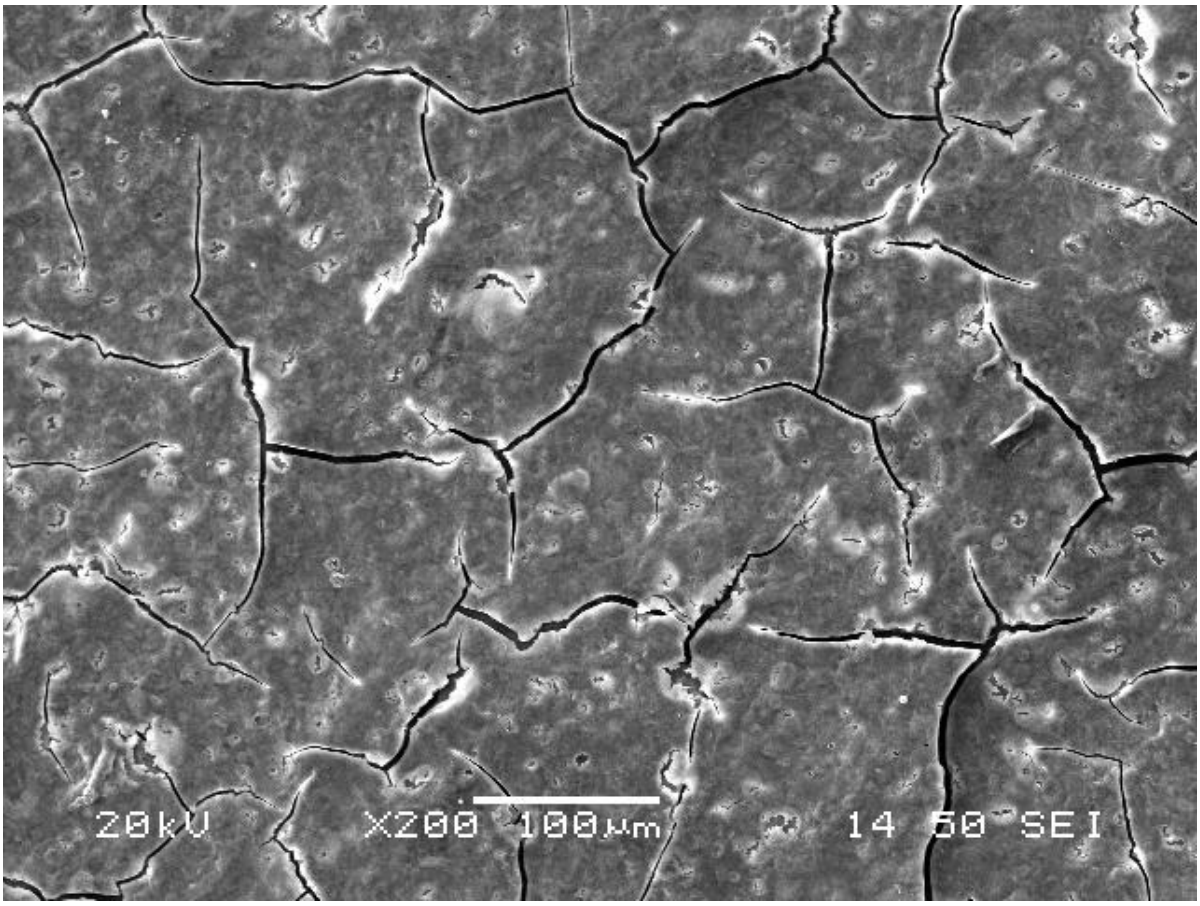
Σε αυτή την ενότητα παρατηρείται και ελέγχεται η ομοιογένεια που έχει η επίστρωση του υδροξυαπατίτη επάνω στα δοκίμια τιτανίου, πριν γίνουν οι διάφορες αραιώσεις καθώς και πριν δοκιμαστεί η δεύτερη μέθοδος επικάλυψης, η μέθοδος της εμβάπτισης.

Στο σχήμα 3, παρατηρείται ξεκάθαρα ότι η επιστρωμένη επιφάνεια δεν είναι σε καμία περίπτωση επιτυχημένη. Υπάρχουν όχι μόνο σε τοπικά σημεία, αλλά αντιθέτως σε όλο σχεδόν το δοκίμιο πολλές μικρορωγμές.



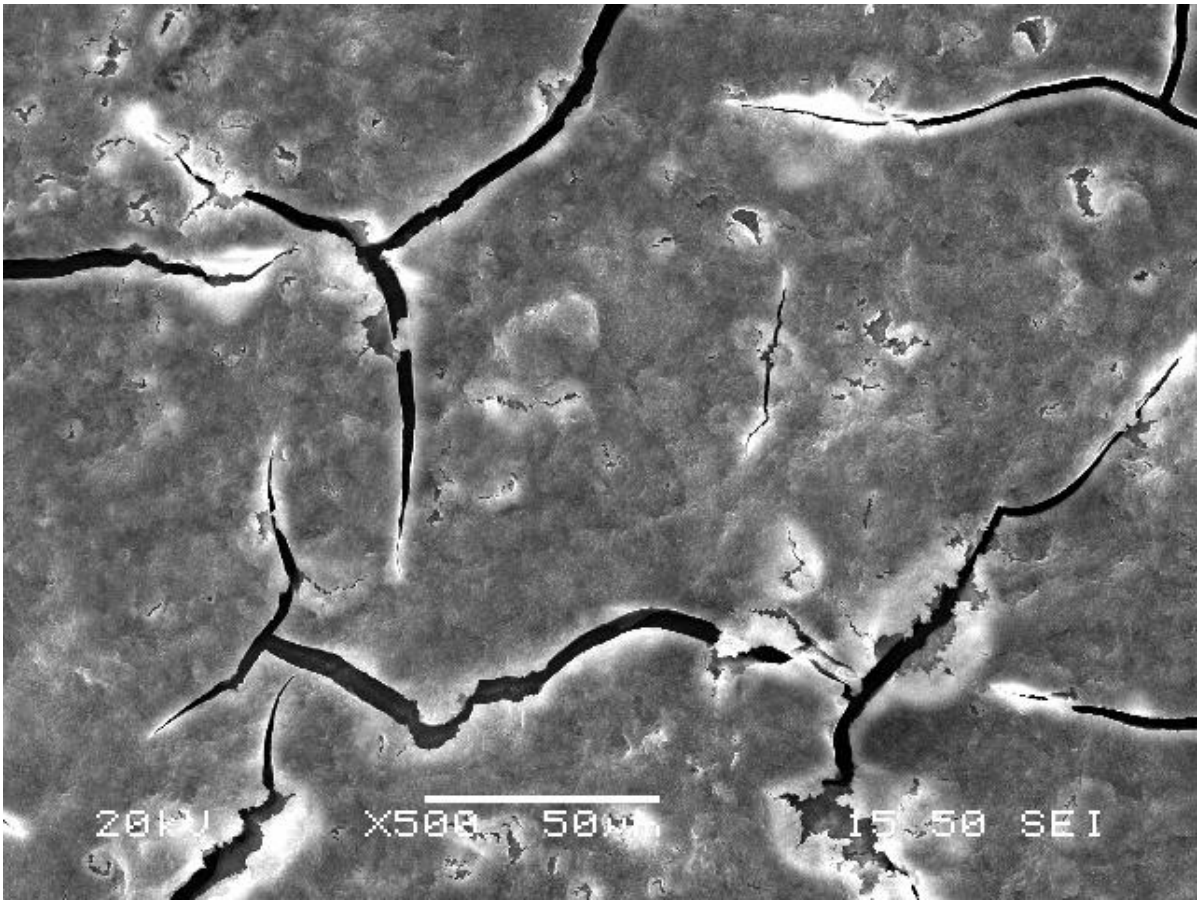
Σχήμα 3. X25 Μεγένθυση επιφάνειας υδροξυαπατίτη επάνω στο δοκίμιο τιτανίου.

Σε μεγαλύτερη μεγέθυνση (σχήμα 4), στην ίδια επικάλυψη, παρατηρούνται ακόμα πιο ξεκάθαρα οι μικρορωγμές που δημιουργήθηκαν επάνω στον υδροξυαπατίτη. Δύο είναι οι κύριες αιτίες για τη δημιουργία του φαινομένου: η παρουσία τάσεων στην επίστρωση και η δυσκολία απομάκρυνσης του νερού από το παχύ επιφανειακό στρώμα που έχει επιστρωθεί. Αποφασίστηκε συνεπώς να επιχειρηθούν δοκιμές χρησιμοποιώντας πιο λεπτόρευστα αιωρήματα με την κατάλληλη ρύθμιση ιξώδους μέσω αραίωσης.



Σχήμα 4. Χ100 Μεγένθυση επιφάνειας υδροξυαπατίτη σε δοκίμιο τιτανίου

Σε ακόμη μεγαλύτερη μεγέθυνση (σχήμα 5), είναι ευδιάκριτο και το πάχος των μικρορωγμών. Οι παραπάνω μικρορωγμές εκτός του ότι είναι πάρα πολλές σε όλο το μήκος και πλάτος του δοκιμίου, έχουν και σχετικά μεγάλο πάχος, γεγονός που κάνει τη συγκεκριμένη κατηγορία με τις συγκεκριμένες παραμέτρους παραγωγής του υλικού επίστρωσης, αποτυχία.



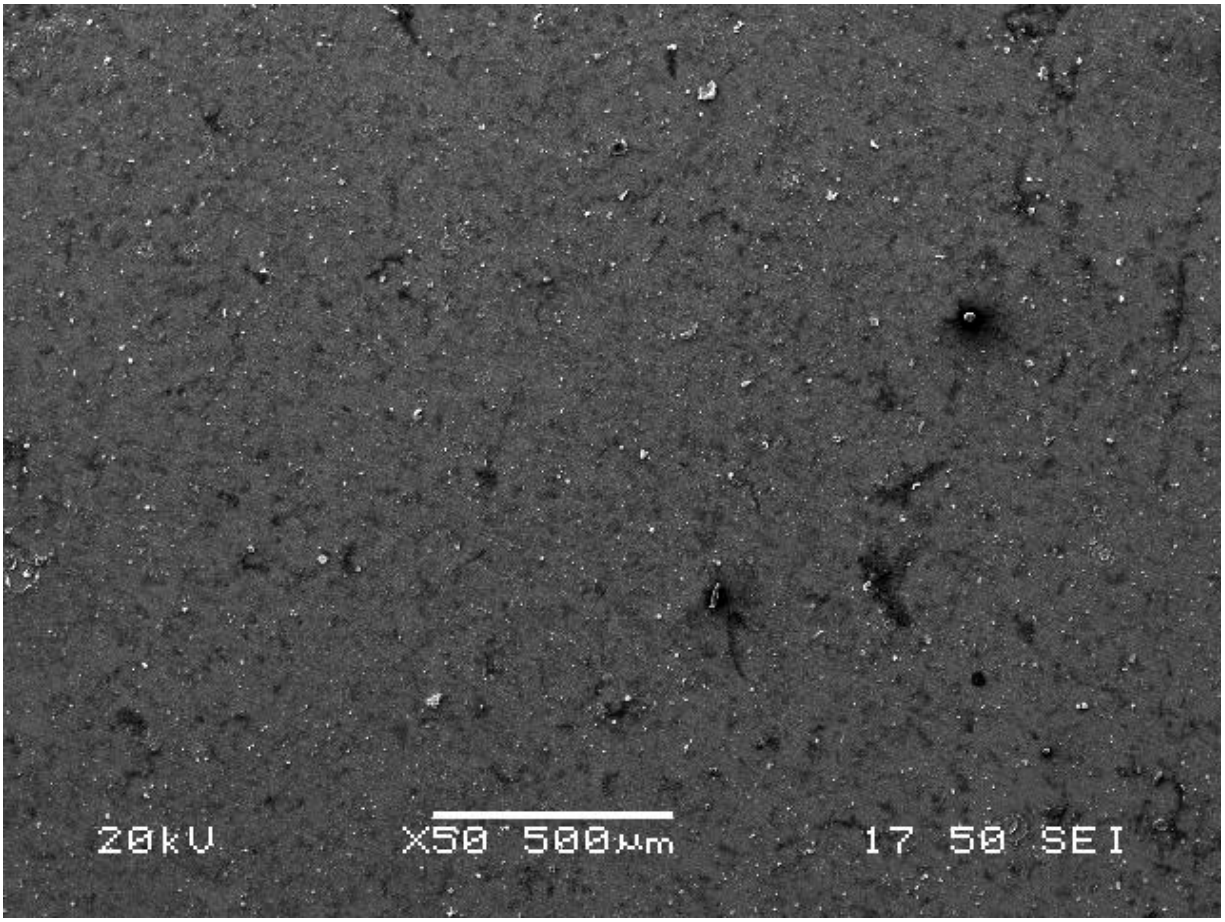
Σχήμα 5. X500 Μεγένθυση της επιφάνειας υδροξυαπατίτη σε δοκίμιο τιτανίου

14.2 Επίστρωση δοκιμίων (μέθοδος Εμβάπτισης) τιτανίου με αιώρημα υδροξυαπατίτη (αραιωμένο σε αναλογία H_2O:Hap=4:2)

Σε αυτή την ενότητα, θα εξετάσουμε την επιφάνεια των επιστρώσεων στη καλύτερη δυνατή αραίωση που έχει επιτευχθεί (H_2O:Hap = 4:2). Ακόμη, η μέθοδος επικάλυψης δεν ήταν η μέθοδος της σταγόνας αλλά η μέθοδος της εμβάπτισης.

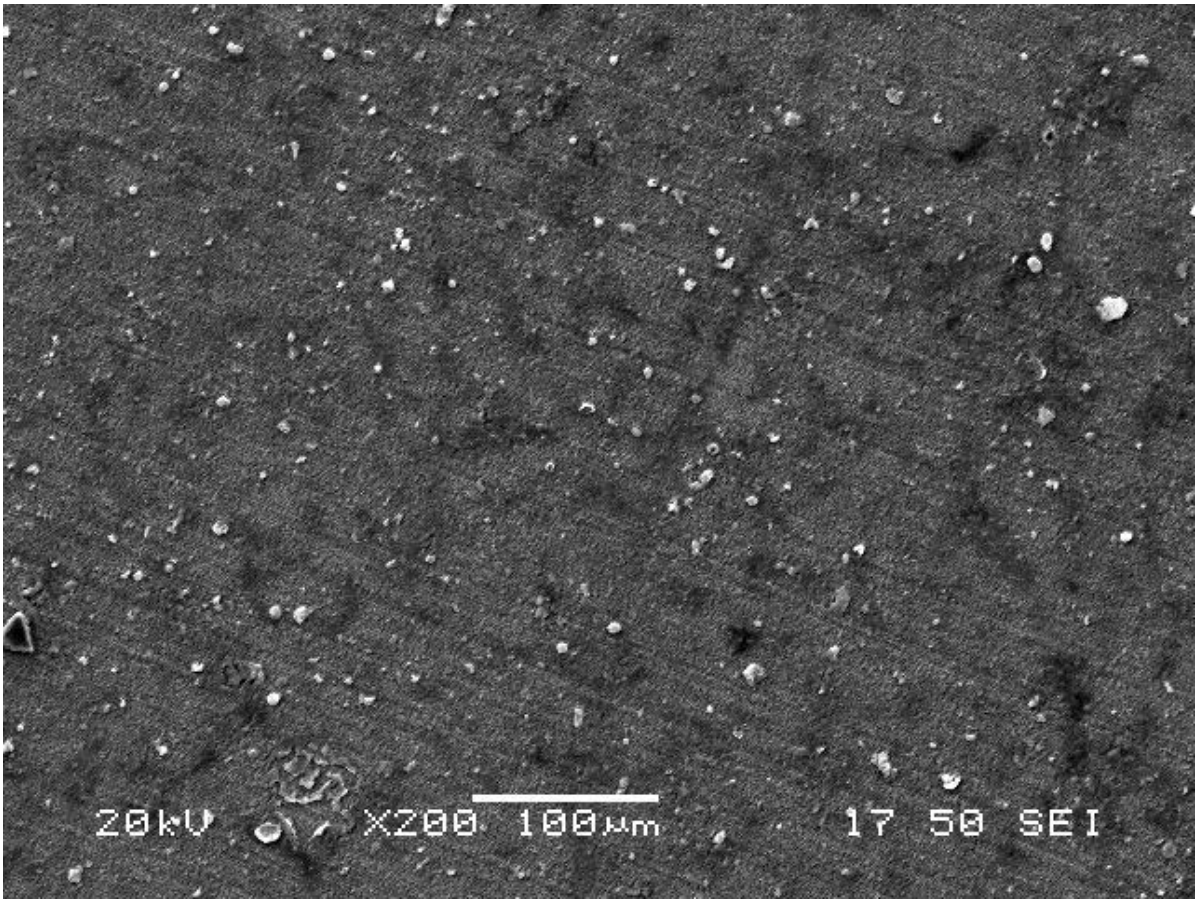
Η νέα μέθοδος επικάλυψης ήταν αρκετά βελτιωμένη και με καλή επαναληψιμότητα αφού σε αυτή τη περίπτωση έγινε χρήση του μηχανισμού που αναπτύχθηκε και αναλύθηκε στο πειραματικό μέρος.

Παρατηρώντας την παρακάτω επιφάνεια (σχήμα 6), μπορούμε να διακρίνουμε ότι δεν υπάρχουν καθόλου μικρορωγμές. Η επίστρωση όχι μόνο δεν έχει σπασίματα, αλλά επίσης είναι αρκετά ομοιογενής.



Σχήμα 6. Χ50 Μεγέθυνση της επίστρωσης από υδροξυαπατίτη αραιωμένο με τη μέθοδο της εμβάπτισης.

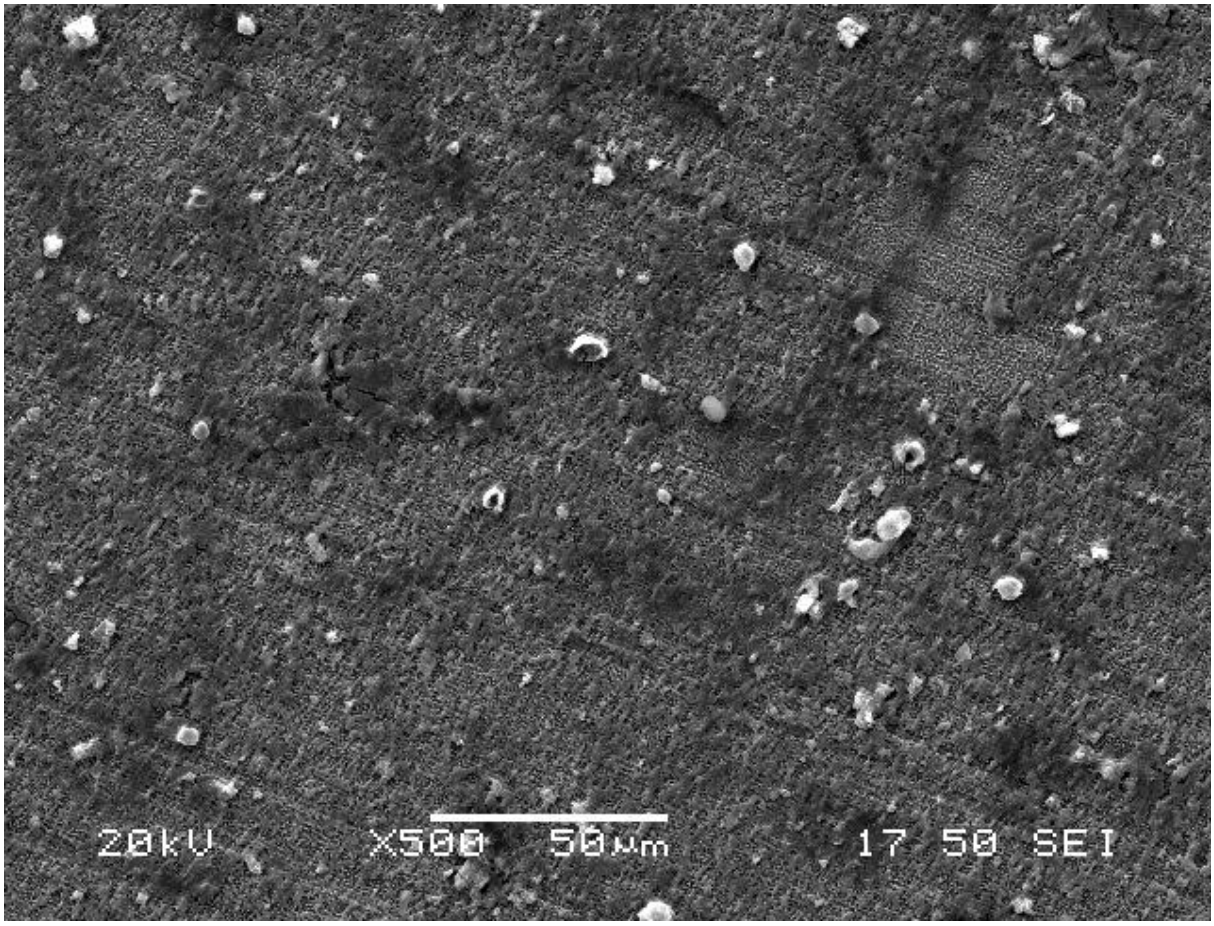
Σε μεγαλύτερη μεγέθυνση (σχήμα 7) μπορούμε να παρατηρήσουμε ότι επάνω στην επιφάνεια του τιτανίου έχει σχηματιστεί ένα πολύ λεπτό φιλμ από τον υδροξυαπατίτη. Σε κάποια σημεία (πιο σκούρα) το φιλμ έχει αρχίσει να αυξάνει σε πάχος. Περαιτέρω αραιώσεις και παραπάνω χρόνος παραμονής του δοκιμίου μέσα στο αιώρημα είχε ως αποτέλεσμα να δημιουργούνται σημεία επικαλυμένα με αρκετά μεγάλο πάχος και σημεία επικαλυμένα με λιγότερο πάχος. Οι παράμετροι στη παραπάνω επικάλυψη ήταν οι βέλτιστες για τη δημιουργία μιας ομοιογενούς επικάλυψης σχεδόν σε ολόκληρη την επιφάνεια. Οι βέλτιστες παράμετροι ήταν εμβάπτιση σε αραιωμένο αιώρημα H_2O:Hap = 4:2 όπως έχει αναφερθεί και παραπάνω, και χρόνος παραμονής 10 λεπτά.



Σχήμα 7. X200 Μεγέθυνση επίστρωσης υδροξυαπατίτη αραιωμένου με τη μέθοδο της εμβάπτισης.

Τέλος, σε ακόμη μεγαλύτερη μεγέθυνση (σχήμα 8), παρατηρούμε ότι η επιφάνεια είναι στη συντριπτική πλειοψηφία της επικαλυμμένη με τον υδροξυαπατίτη. Ακόμα και κάποια τοπικά σημεία, όπως για παράδειγμα στο σχήμα 8 πάνω δεξιά που υπάρχει ένα σχετικό 'κενό', κάνοντας χρήση στοιχειακής ανάλυσης EDS, το σημείο αυτό εμφάνιζε φώσφορο και ασβέστιο, τα κύρια συστατικά του υδροξυαπατίτη.

Επίσης, διακρίνονται κάποια συσσωματώματα (άσπρα κομμάτια) τα οποία δεν ήταν δυνατόν να εξαφανιστούν διότι το υλικό σαν υλικό από μόνο του δημιουργεί συσσωματώματα. Παρ'όλα αυτά, δεν επηρεάζουν αρνητικά την ποιότητα της επικάλυψης.



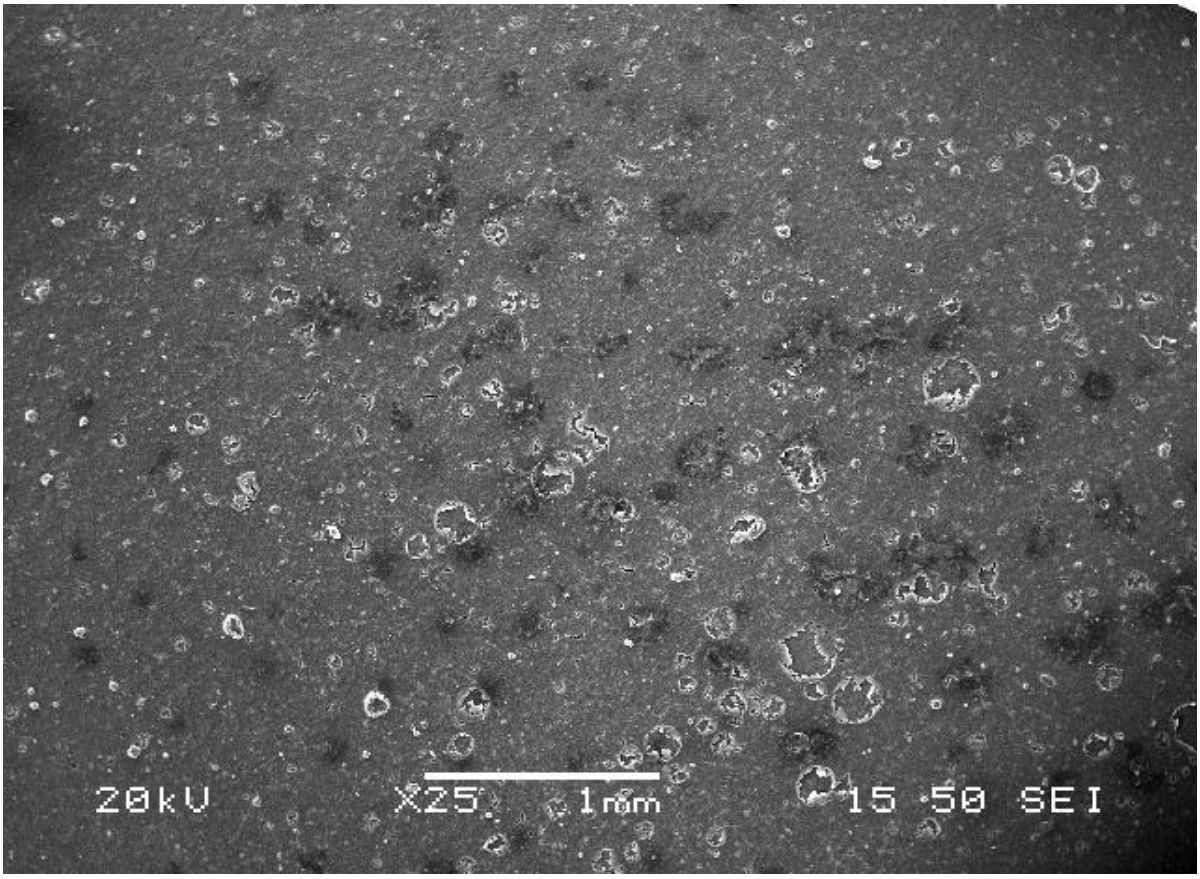
Σχήμα 8. X500 Μεγέθυνση της επίστρωσης από υδροξυαπατίτη αραιωμένο.

14.3 Επίστρωση δοκιμίων τιτανίου με αιώρημα υδροξυαπατίτη και νανοσωλήνες άνθρακα

Όπως έχει αναφερθεί και παραπάνω στο πειραματικό μέρος, η δεύτερη κατηγορία επιστρώσεων ήταν ο συνδυασμός υδροξυαπατίτη και νανοσωλήνων άνθρακα. Ο υδροξυαπατίτης και σε αυτήν την περίπτωση παρήχθη κανονικά όπως στη πρώτη κατηγορία και στη συνέχεια προστέθηκε συγκεκριμένη ποσότητα από νανοσωλήνες άνθρακα με σκοπό να μελετηθεί η μεταβολή των μηχανικών ιδιοτήτων σε σχέση με τη πρώτη κατηγορία καθώς επίσης και να ελεγχθεί το ποσοστό βιοσυμβατότητας ενός τέτοιου συνδυασμένου βιοϋλικού.

Στο σχήμα 9, σε σχετικά μικρή μεγέθυνση, είναι εμφανές το γεγονός ότι δεν εμφανίζονται τόσες πολλές ρωγμές όπως στη πρώτη κατηγορία. Φαίνεται ότι οι νανοσωλήνες άνθρακα ως πρόσθετη παράμετρος, βελτίωσαν τις μηχανικές ιδιότητες του όλου υλικού

επίστρωσης αποτρέποντας έτσι την εμφάνιση πολλών καθώς και με μεγάλο πάχος μικρορωγμών.

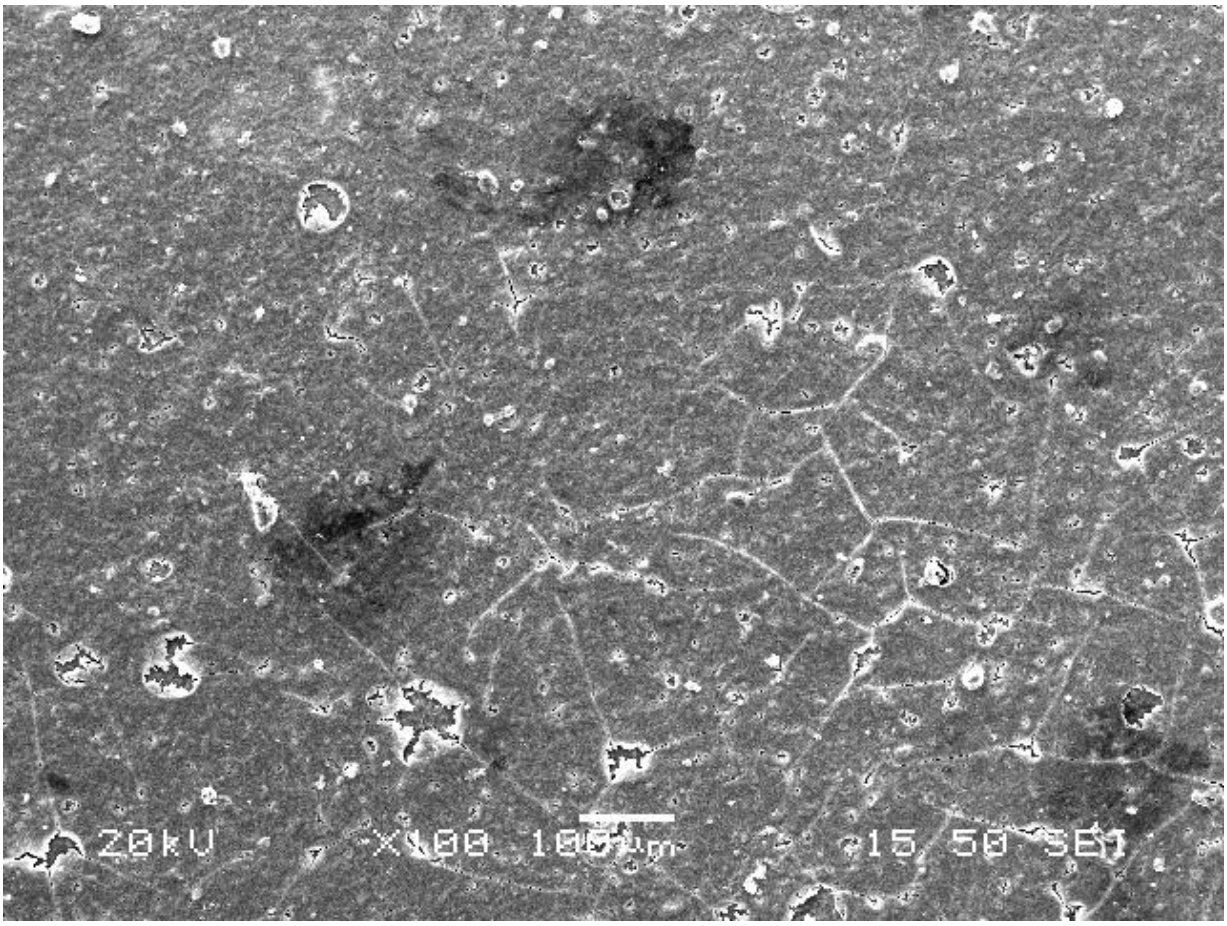


Σχήμα 9. Χ25 Μεγέθυνση της επίστρωσης υδροξυαπατίτη και νανοσωλήνων άνθρακα στο δοκίμιο τιτανίου.

Σε μεγαλύτερη μεγέθυνση (σχήμα 10), παρατηρείται ακόμα πιο ξεκάθαρα το γεγονός ότι οι μικρορωγμές, παρόλο που δεν έχουν εξαλειφθεί εντελώς, εντούτοις πλέον είναι πιο τοπικές (κυρίως στο κάτω και δεξί μέρος του σχήματος 10). Μια άλλη σημαντική παρατήρηση συγκριτικά και με τη πρώτη κατηγορία είναι ότι οι διάφορες μικρορωγμές που έχουν εμφανιστεί στην επίστρωση με υδροξυαπατίτη και νανοσωλήνες άνθρακα είναι πολύ μικρές και δεν έχουν σχεδόν καθόλου πάχος και πλάτος.

Συμπερασματικά, η επίδραση των νανοσωλήνων άνθρακα είναι εμφανώς θετική αφού οι μικρορωγμές ναι μεν υπάρχουν αλλά είναι αρκετά μικρότερες σε μήκος και πλάτος.

Ακόμη παρατηρούνται και κάποια κενά τα οποία οφείλονται σε φυσσαλίδες αέρος. Οι φυσσαλίδες ήταν θέμα παραγωγής υλικού και η εξαφάνισή τους ήταν απαραίτητη έτσι ώστε να δημιουργηθεί τελικώς ένα ομοιογενές επίστρωμα.



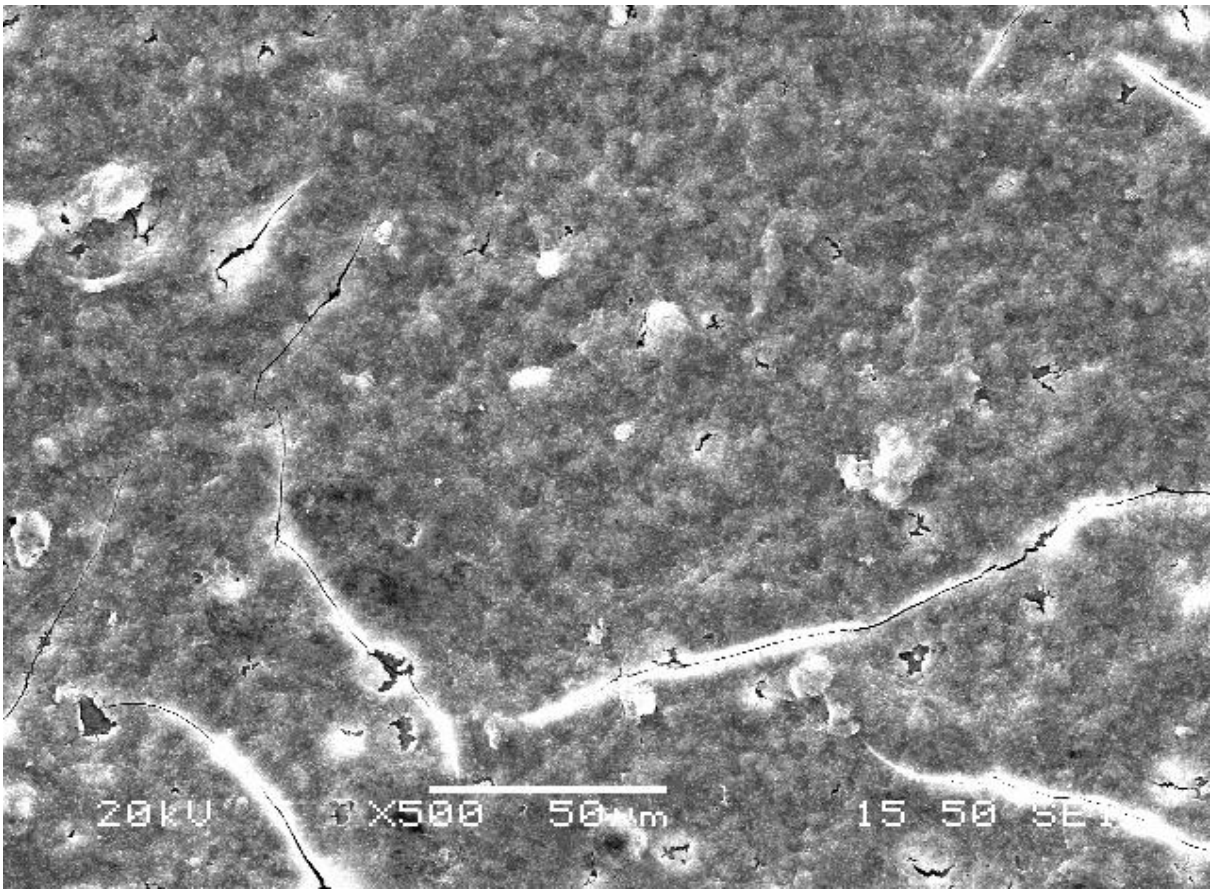
Σχήμα 10. Χ100 Μεγέθυνση της επίστρωσης υδροξυαπατίτη και νανοσωλήνων άνθρακα στο δοκίμιο τιτανίου.

Τέλος, σε μεγέθυνση x500 (σχήμα 11), μπορούμε να παρατηρήσουμε πλέον πολύ ευδιάκριτα ότι το φαινόμενο της δημιουργίας μικρορωγμών, ή καλύτερα σχισμών παρά μικρορωγμών, αφού το μήκος και το πλάτος είναι σχεδόν αμελητέο είναι τελείως τοπικό και περιορισμένο.

Ακόμη, εάν εξαιρέσουμε τις μικρορωγμές, μπορούμε να διακρίνουμε μια πολύ ομοιογενή επικάλυψη. Σίγουρα υπάρχουν κάποια μικρά συσσωματώματα, άλλα ως επί το πλείστον, η επικάλυψη είναι αρκετά ομοιογενής, με κάποιες τοπικές μικρορωγμές.

Προφανώς, σε σχέση με τη πρώτη κατηγορία, υπάρχει σαφής βελτίωση της επιφάνειας ως προς το κύριο πρόβλημα που ήταν οι μικρορωγμές.

Παρολ΄ αυτά, η επίστρωση της δεύτερης κατηγορίας χρήζει ακόμη περαιτέρω βελτίωσης διότι η επιφάνειά της δεν είναι τελείως ομοιογενής και καθαρή.



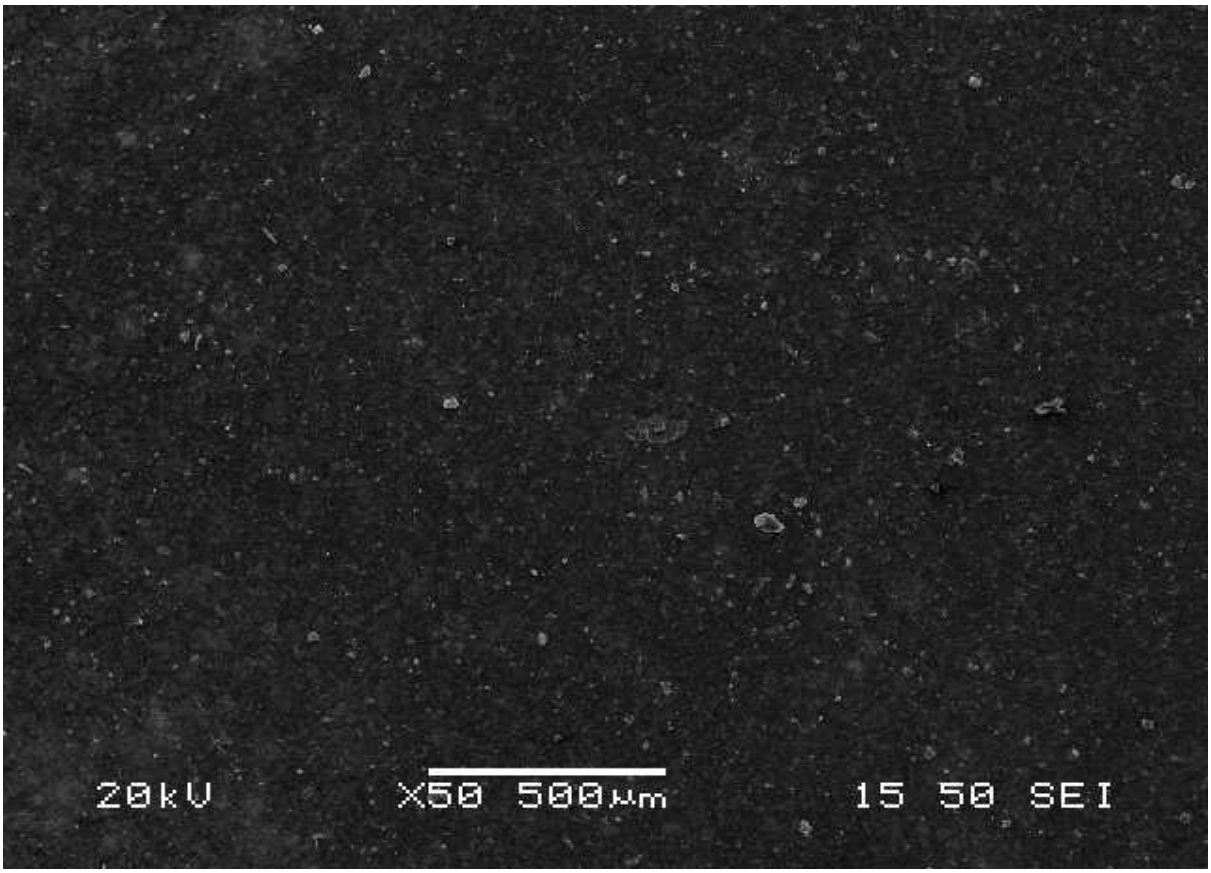
Σχήμα 11. X500 Μεγένθυση της επίστρωσης Υδροξυαπατίτη και νανοσωλήνων άνθρακα στο δοκίμιο τιτανίου.

14.4 Επίστρωση δοκιμίων τιτανίου με αιώρημα υδροξυαπατίτη συνδυασμένου με νανοσωλήνες άνθρακα (αραιωμένο αιώρημα H_2O:Hap+CNT = 2:2)

Στη συνέχεια, με σκοπό την όσο δυνατόν ελάττωση των μικρορωγμών από τη δεύτερη κατηγορία επικαλύψεων, έγινε αραίωση του αιωρήματος υδροξυαπατίτη και νανοσωλήνων άνθρακα. Η αραίωση με τα καλύτερα αποτελέσματα ήταν η αραίωση H_2O:Hap+CNT = 2:2.

Δοκιμάστηκαν και οι δύο μέθοδοι επίστρωσης (μέθοδος σταγόνας και μέθοδος εμβάπτισης) αλλά δεν υπήρχε κάποια ουσιαστική αλλαγή στη μέθοδο με την οποία γινόταν η επικάλυψη σε αυτή τη κατηγορία.

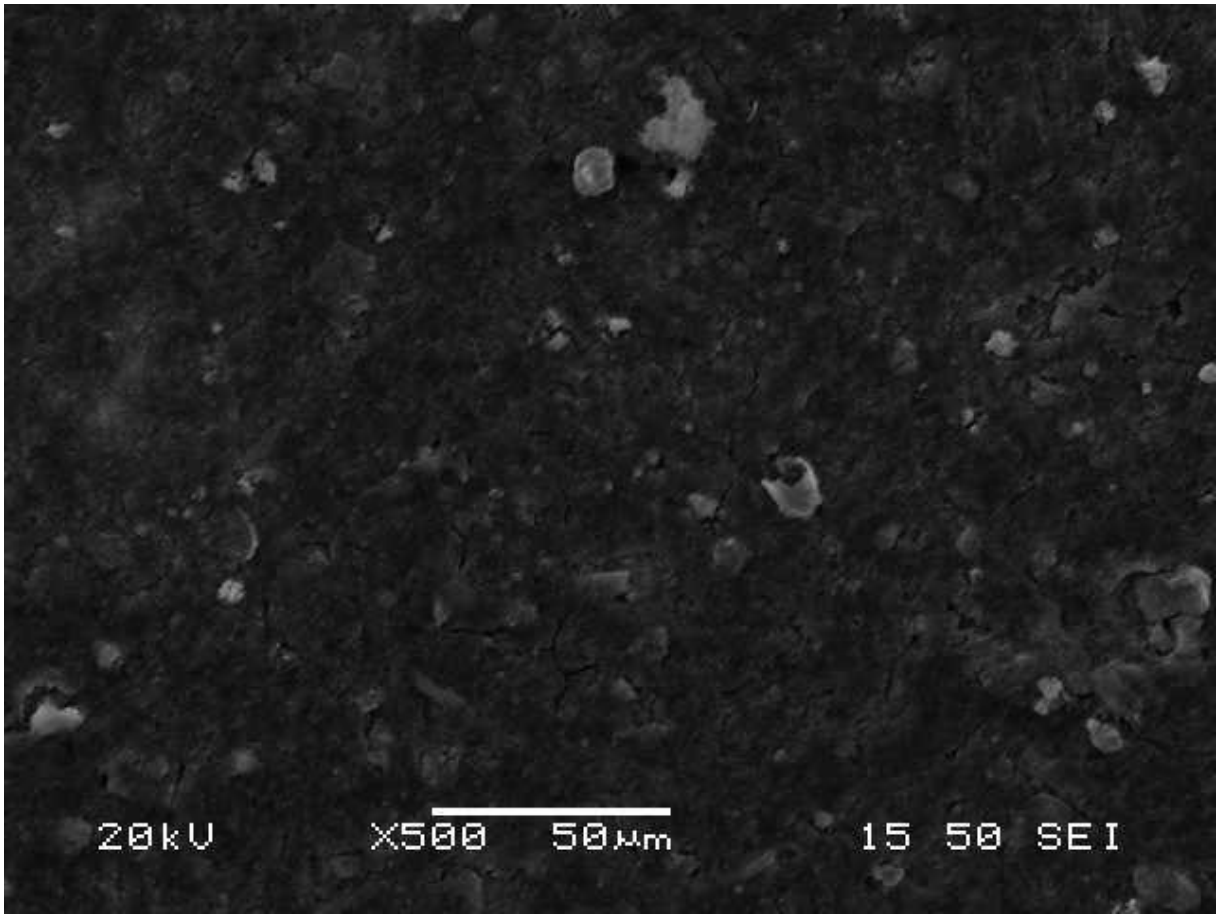
Αρχικά, στο σχήμα 12, παρατηρούμε ότι σε αντίθεση με την επίστρωση με το ίδιο υλικό χωρίς αραίωση, δεν υπάρχουν καθόλου κενά λόγω φυσσαλίδων αέρα. Η επικάλυψη είναι ομοιογενής.



Σχήμα 12. X50 Μεγέθυνση της επίστρωσης με υδροξυαπατίτη και νανοσωλήνες άνθρακα (αραίωση H_2O:Hap+CNT = 2:2).

Η επίστρωση που έχει δημιουργηθεί επάνω στο τιτάνιο μπορεί να χαρακτηριστεί αρκετά ομοιογενής και σαφώς πιο βελτιωμένη από την προηγούμενη αντίστοιχη. Τα κενά έχουν συρρικνωθεί σε πολύ μεγάλο βαθμό, που σημαίνει ότι η αραίωση του αιωρήματος αποτέλεσε μια επιτυχημένη στρατηγική.

Σίγουρα δεν έχουν εξαλειφθεί εντελώς οι μικρορωγμές και τα συσσωματώματα (σχήμα 13), αλλά η επιστρωμένη επιφάνεια έχει βελτιωθεί σε πολύ μεγάλο βαθμό.

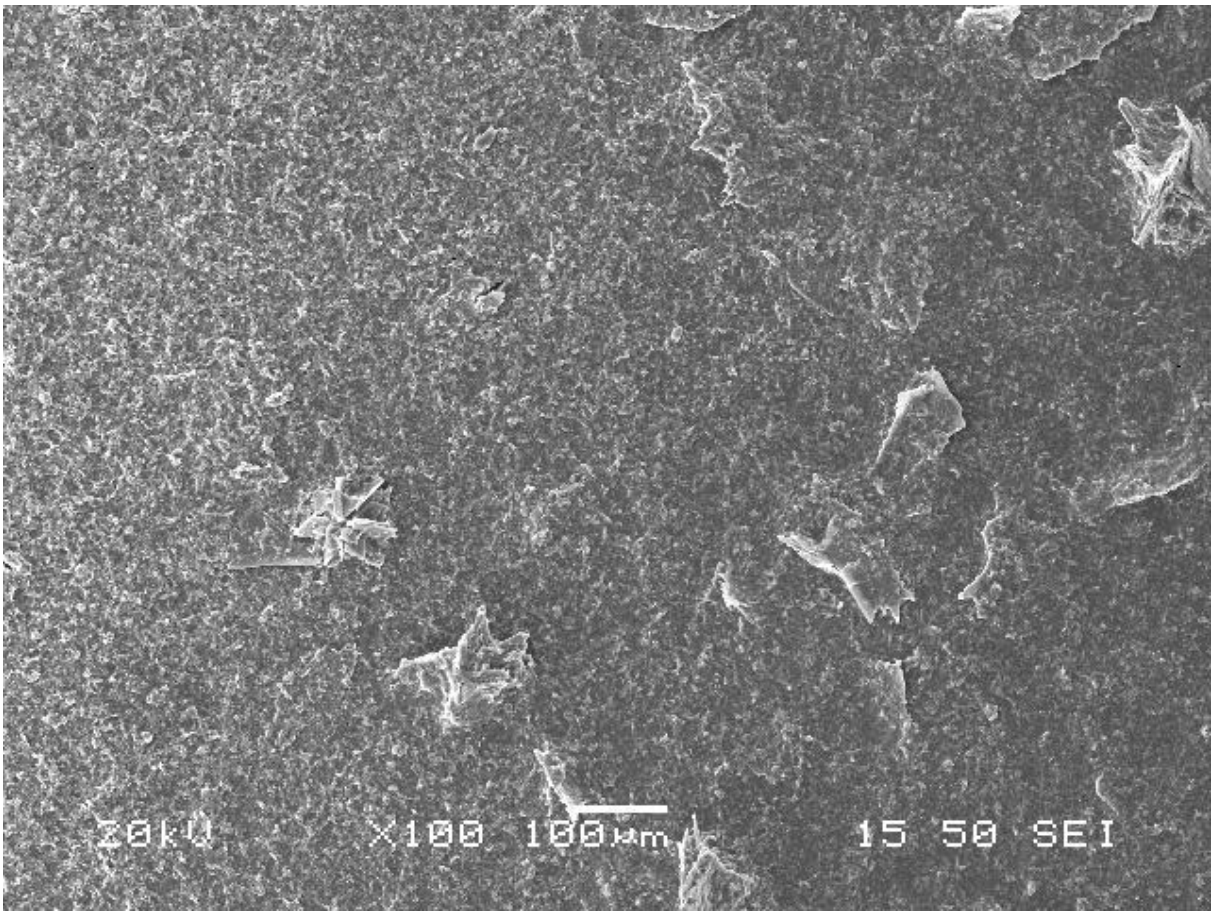


Σχήμα 13. X500 Μεγέθυνση της επίστρωσης με υδροξυαπατίτη και νανοσωλήνες άνθρακα (αραίωση H_2O:Hap+CNT = 2:2).

14.5 Επίστρωση δοκιμίων τιτανίου με συνδυασμό υδροξυαπατίτη και οξείδιου πολυαιθυλενίου (PEO)

Αφού παρήχθη αιώρημα υδροξυαπατίτη, στη συνέχεια πέρασε το στάδιο λυοφιλίωσης όπου μετατράπηκε σε σκόνη. Ύστερα έγινε ανάμιξη της σκόνης υδροξυαπατίτη με διάλυμα οξειδίου πολυαιθυλενίου και παρήχθη, σύμφωνα και με το πειραματικό μέρος, η τρίτη κατηγορία επίστρωσης.

Σύμφωνα με το σχήμα 14, παρατηρούμε ότι οι μικρορωγμές σε αυτή την κατηγορία έχουν κυριολεκτικά εξαφανιστεί. Ούτε σε τοπικό αλλά ούτε σε οποιοδήποτε σημείο της επικαλυμμένης επιφάνειας δεν παρατηρείται μικρορωγμή. Από την άλλη, υπάρχουν κάποια συσσωματώματα (agglomerates) σε τοπικά σημεία, αλλά αυτά δεν επηρεάζουν αρνητικά την επιφάνεια.

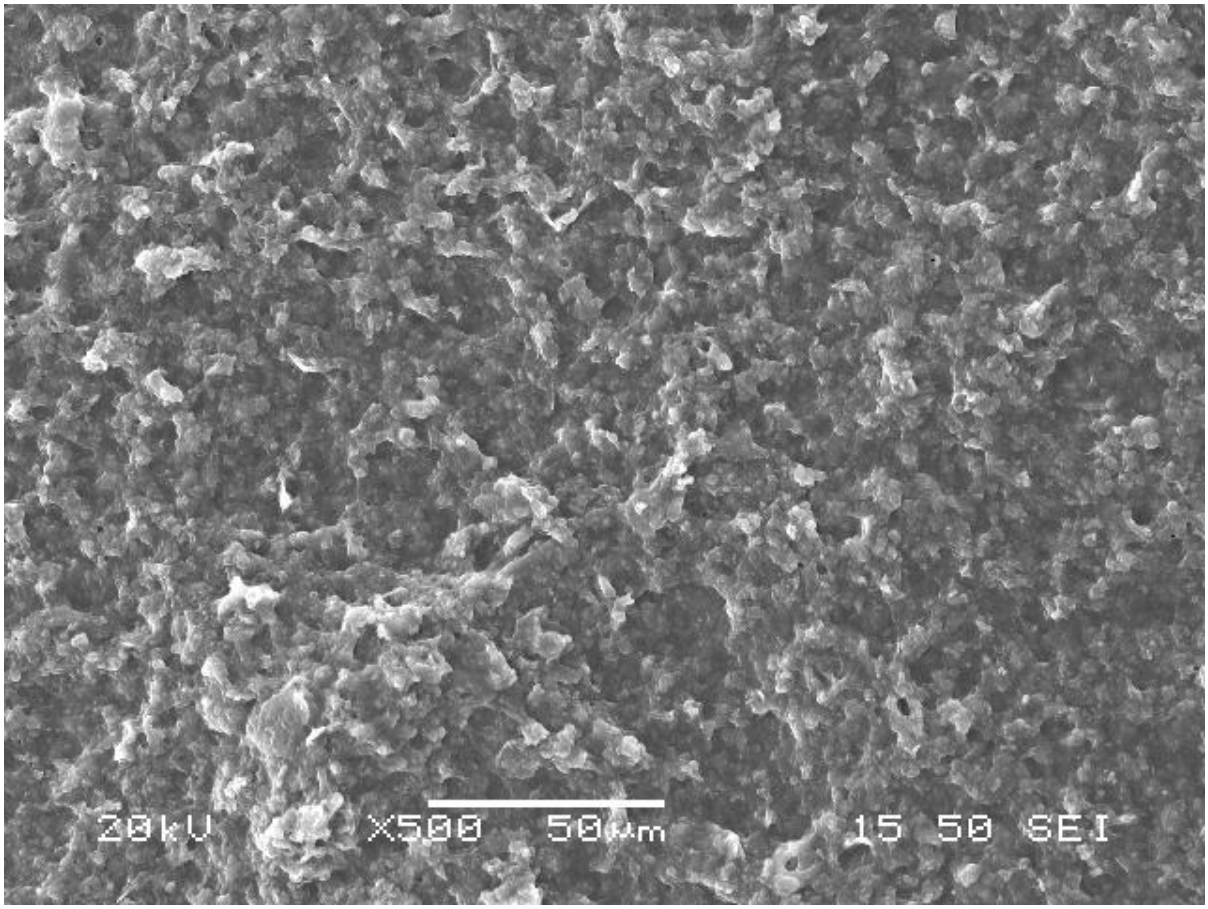


Σχήμα 14. Χ100 Μεγένθυση της επίστρωσης από υδροξυαπατίτη και οξείδιο του πολυαιθυλενίου

Σε μεγαλύτερη μεγέθυνση, (σχήμα 15) βλέπουμε ακόμη αναλυτικότερα την επιφάνεια που έχει δημιουργήσει ο υδροξυαπατίτης συνδυασμένος με το βιοπολυμερές οξείδιο του πολυαιθυλενίου.

Όπως αναφέρουν και προηγούμενες ερευνητικές μελέτες, το οξείδιο του πολυαιθυλενίου (PEO) λειτουργεί ως binder (συνδέτης) και γι΄αυτό το λόγο έχουν εξαφανιστεί και οι μικρορωγμές. Καθώς το παραπάνω βιοπολυμερές συνδυάζεται με τον υδροξυαπατίτη, παράγεται μια σύνθετη επίστρωση που έχει αρκετά καλύτερες μηχανικές

ιδιότητες. Με άλλα λόγια, το σύνθετο υλικό που παρασκευάστηκε, έχει βελτιωμένη τη μηχανική συμπεριφορά.



Σχήμα 15. X500 Μεγέθυνση επίστρωσης υδροξυαπατίτη και οξειδίου του πολυαιθυλενίου

15. Αποτελέσματα TEM των επικαλύψεων

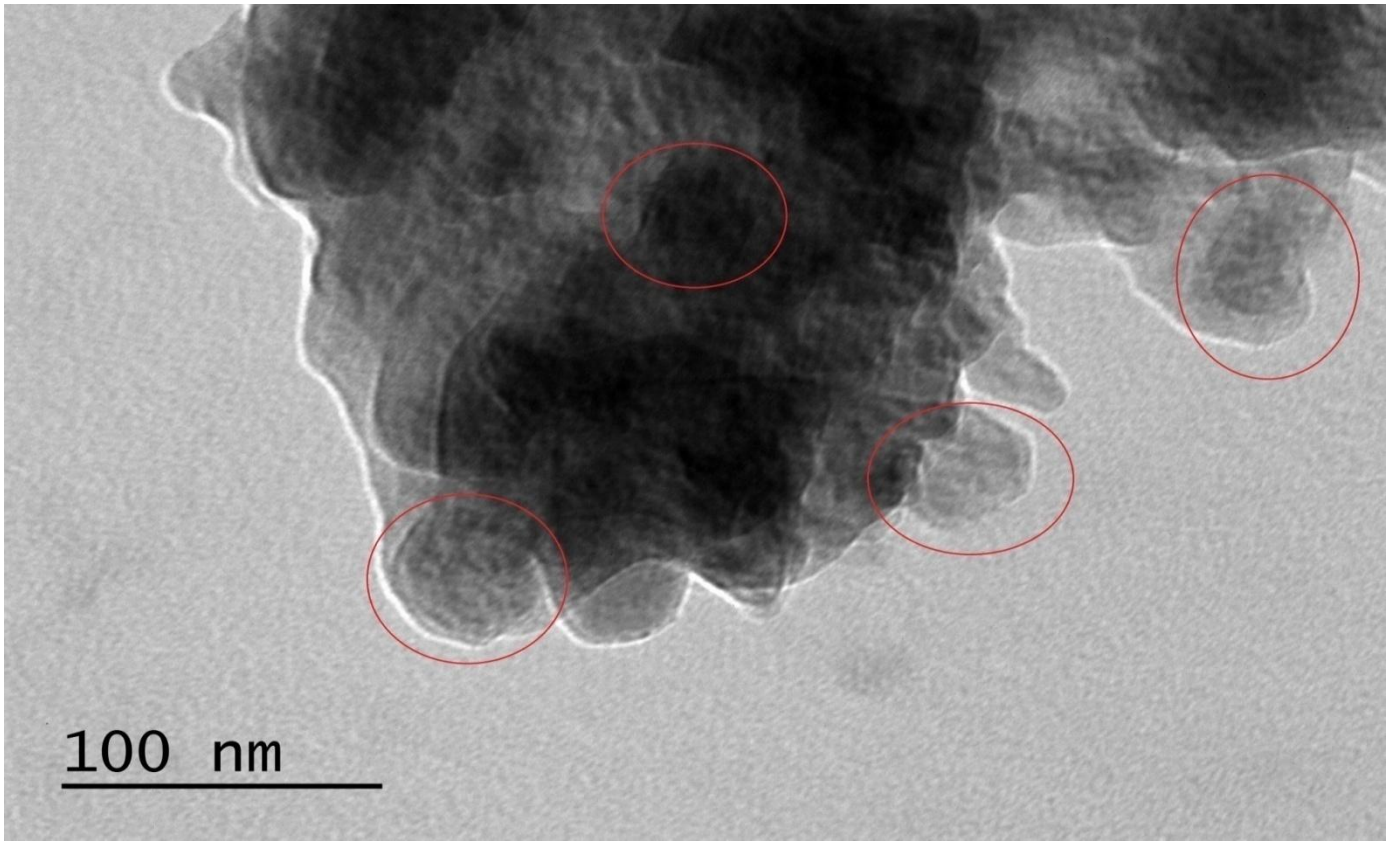
Με σκοπό να αποδειχθεί ότι τα υλικά της επίστρωσης (υδροξυαπατίτης, υδροξυαπατίτης και νανοσωλήνες άνθρακα) ήταν όντως νάνο-υλικά, έγιναν μελέτες με τη χρήση του ηλεκτρονικού μικροσκοπίου διέλευσης ηλεκτρονίων (TEM).

Οι μελέτες έγιναν στη πρώτη κατηγορία επίστρωσης (υβριδικός νάνο-υδροξυαπατίτης) καθώς και στη δεύτερη κατηγορία (συνδυασμός του παραπάνω υβριδικού νάνο υδροξυαπατίτη με νανοσωλήνες άνθρακα). Η τρίτη κατηγορία δεν μελετήθηκε με το παραπάνω ηλεκτρονικό μικροσκόπιο διότι το υλικό είχε συνδυαστεί με το οξείδιο του πολυαιθυλενίου και ήταν αδύνατον να υπάρξει καθαρή εικόνα λόγω του πολυμερούς υλικού που καλύπτει πλήρως όλο το υπόλοιπο υλικό.

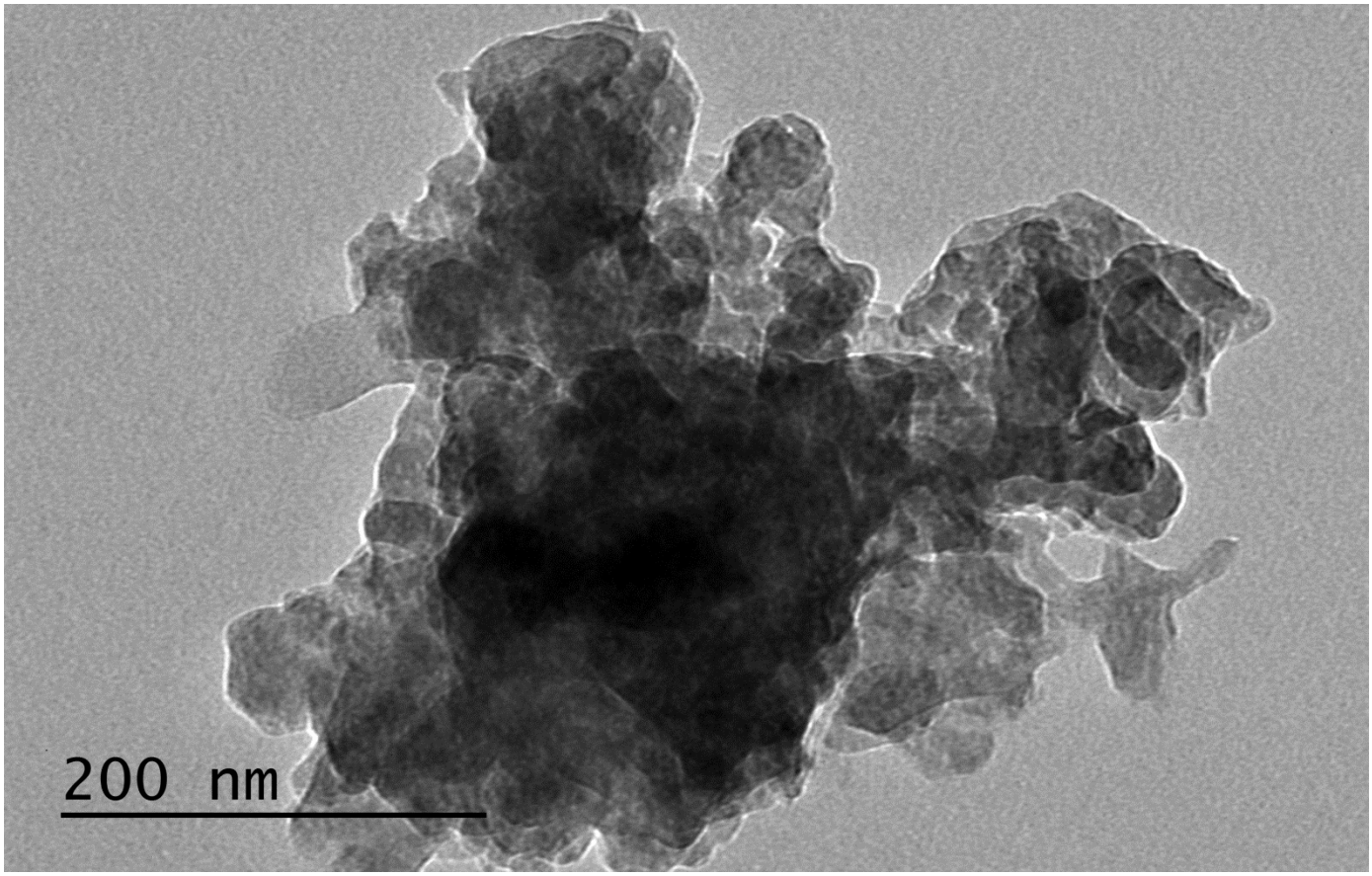
15.1 Εικόνες TEM υβριδικού νάνο-υδροξυαπατίτη

Στα δύο παρακάτω σχήματα παρατηρούμε ότι έχουμε νανοϋλικό με διαστάσεις σωματιδίων που κυμαίνονται ανάμεσα στα 10 και 40 nm .

Στη πρώτη (σχήμα 16) από τις δύο παρακάτω εικόνες, έχουν σημειωθεί μάλιστα κάποια από τα πιο ευδιάκριτα νανοσωματίδια τα οποία έχουν εξαγωνικό σχήμα. Στη δεύτερη (σχήμα 17) εικόνα, φαίνονται ακόμα περισσότεροι εξαγωνικοί νανοκρύσταλλοι υδροξυαπατίτη σε όλο το μήκος και πλάτος του δείγματος. Υπάρχουν αρκετοί μικρότεροι νανοκρύσταλλοι και άλλοι πιο μεγάλοι.



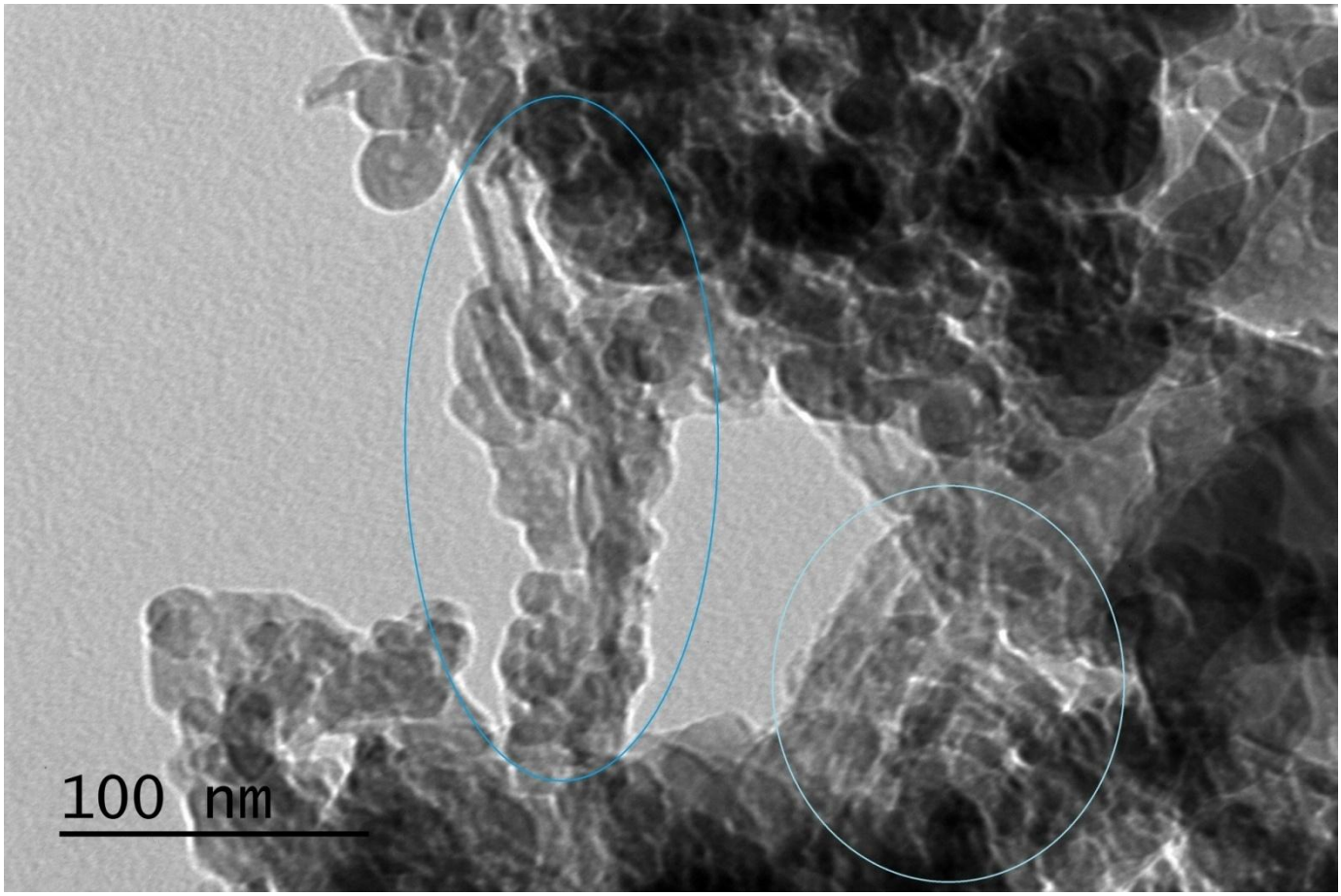
Σχήμα 16. Εικόνα TEM από υβριδικό νάνο υδροξυαπατίτη



Σχήμα 17. Εικόνα TEM από υβριδικό νάνο υδροξυαπατίτη

15.2 Εικόνες TEM υβριδικού νάνο-υδροξυαπατίτη μαζί με νανοσωλήνες άνθρακα

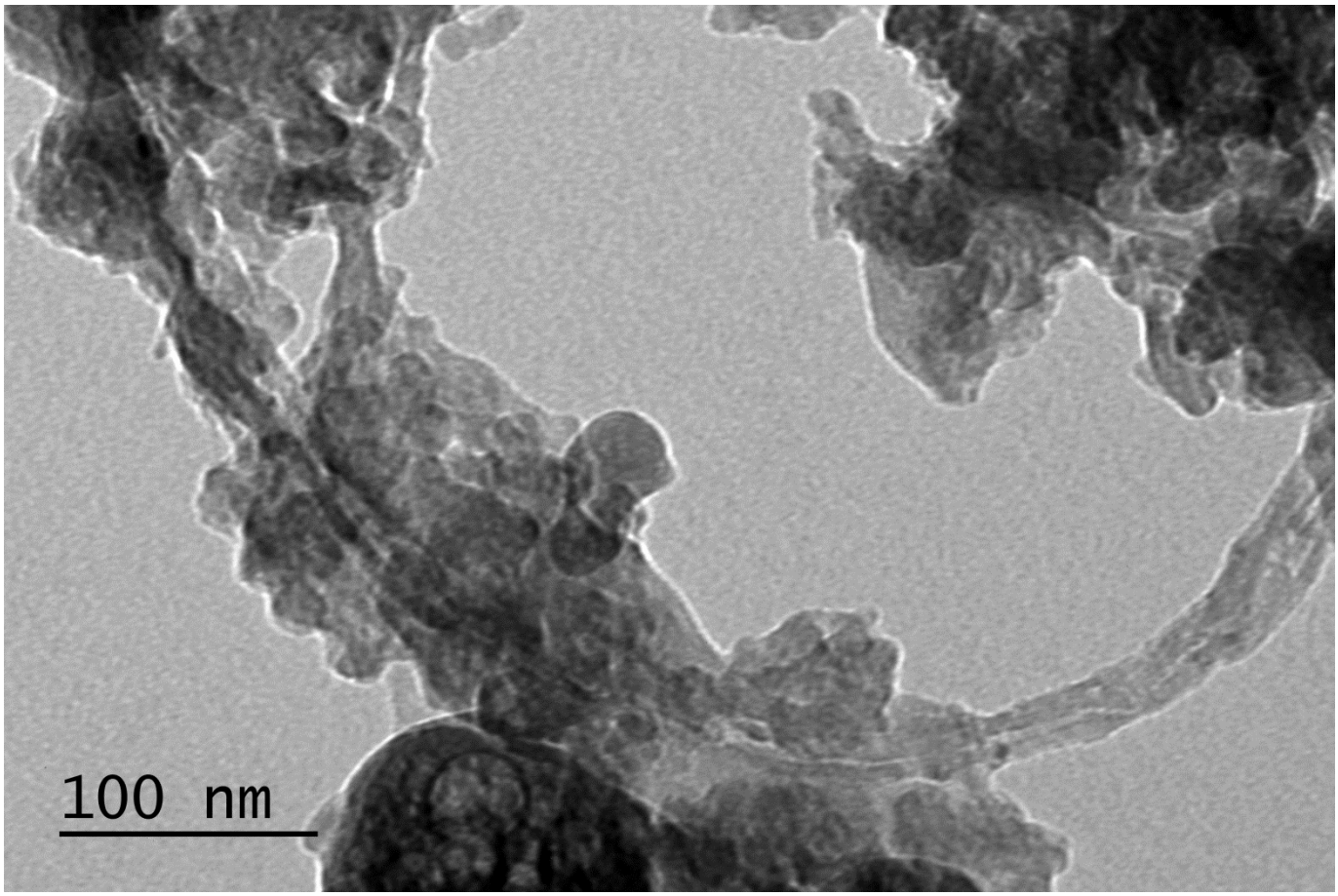
Ουσιαστικά στην παρακάτω εικόνα (σχήμα 18) παρατηρούμε και πολλούς κρυστάλλους εξαγωνικούς υδροξυαπατίτη καθώς και σωλήνες άνθρακα. Πιο συγκεκριμένα, στην αριστερή πλευρά της εικόνας (μπλε έλλειψη) μπορούμε να παρατηρήσουμε πως υπάρχουν νανοσωλήνες άνθρακα παράλληλοι μεταξύ τους. Ακόμη, μπορούμε να παρατηρήσουμε πως ακριβώς επάνω από τους νανοσωλήνες άνθρακα έχει κατακαθίσει πλήθος από εξαγωνικούς κρυστάλλους υδροξυαπατίτη. Η σύζευξη αυτή των κρυστάλλων νανοϋδροξυαπατίτη με τους νανοσωλήνες άνθρακα είναι και ο λόγος των βελτιωμένων μηχανικών ιδιοτήτων του συνδυασμένου αυτού υλικού σε σχέση με τον σκέτο υδροξυαπατίτη. Ακόμη, στη δεξιά πλευρά της παραπάνω εικόνας (γαλάζιος κύκλος), παρατηρούμε πως υπάρχουν πολλοί νανοσωλήνες άνθρακα και κάθετα αλλά και παράλληλα μεταξύ τους.



Σχήμα 18. Εδώ διακρίνονται νανοσωλήνες άνθρακα οι οποίοι έχουν απότι φαίνεται αντιδράσει με τους κρυστάλλους του υδροξυαπατίτη και ουσιαστικά οι κρύσταλλοι έχουν καλύψει όλο το μήκος του νανοσωλήνα.

Σε ακόμη μια εικόνα (σχήμα 19) παρατηρούμε ακόμη πιο ευδιάκριτα τους νανοσωλήνες άνθρακα οι οποίοι μάλιστα αποδεικνύουν από τη παραπάνω εικόνα ότι είναι ιδιαίτερα ελαστικοί. Και σε αυτή την εικόνα φαίνεται ευδιάκριτα ότι πολλοί νανοκρύσταλλοι υδροξυαπατίτη έχουν κατακαθίσει επάνω στους νανοσωλήνες άνθρακα.

Συνεπώς, η δεύτερη κατηγορία υλικού επίστρωσης (νανοκρυσταλλικός υδροξυαπατίτης και νανοσωλήνες άνθρακα) αποτελεί μια επιτυχημένη παραγωγή ενός νανο-υλικού το οποίο προσφέρει βελτίωση στις μηχανικές ιδιότητες όλου του τελικού υλικού ($2^{η}$ κατηγορία).



Σχήμα 19. Νανοσωλήνες άνθρακα ιδιαίτερα εμφανείς μαζί με πολλούς νανοκρυστάλλους υδροξυαπατίτη οι οποίοι έχουν κατακαθίσει κατά μήκος των νανοσωλήνων άνθρακα.

16. Αποτελέσματα από το πρώτο βιολογικό πείραμα

Όσον αφορά το βιολογικό κομμάτι της συγκεκριμένης ερευνητικής εργασίας, τα βιολογικά πειράματα χωρίστηκαν σε δύο επιμέρους πειράματα όπως έχει αναφερθεί και προηγουμένως.

Παρακάτω, δίνονται τα αποτελέσματα από το πρώτο βιολογικό πείραμα που έγινε με σκοπό τη βελτιστοποίηση των παραμέτρων (ημέρες καλλιέργειας, συγκέντρωση κυττάρων, ποσοστό αραίωσης) έτσι ώστε να ευρεθεί ο κατάλληλος αριθμός κυττάρων που θα καλλιεργούνταν επάνω στις διαφορετικές κατηγορίες των βιοϋλικών που κατασκευάστηκαν.

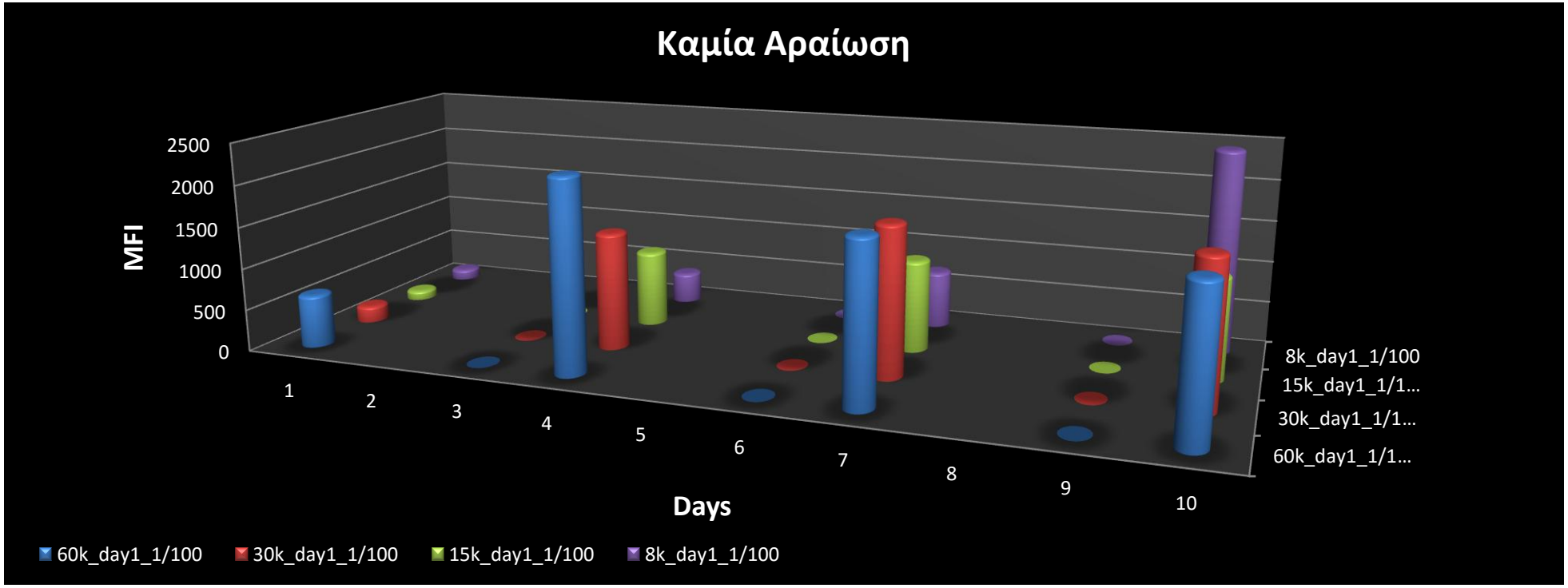
Για το πρώτο πείραμα, όπως έχει αναφερθεί και παραπάνω στο πειραματικό κομμάτι της εργασίας, χρησιμοποιήθηκαν τέσσερα διαφορετικά well-plates με συγκεκριμένη συγκέντρωση κυττάρων (1,4,7,11 μέρες καλλιέργειας κυττάρων) (σχήματα 20-23). Ύστερα, μετά από τις κατάλληλες μέρες παραμονής για καλλιέργεια και μετά τη λύση όλων των κυττάρων, ακολουθήθηκε το πρωτόκολλο για τη μέτρηση του γονιδίου GAPDH.

Κατηγορία 1η (Καμία Αραίωση)

Ημέρα1	Ημέρα 7
50μl Lyse+Cells	50 μl Lyse+Cells
50μl Lyse+Cells	50 μl Lyse+Cells
50μl Lyse+Cells	50 μl Lyse+Cells
50μl Lyse+Cells	50 μl Lyse+Cells
50 μl Lyse+Cells	50 μl Lyse+Cells
50 μl Lyse+Cells	50 μl Lyse+Cells
50 μl Lyse+Cells	50 μl Lyse+Cells
50 μl Lyse+Cells	50 μl Lyse+Cells

Ημέρα 4 Ημέρα11

60k_day1_Μη αραιωμένο	97294		60k_day4_Μη αραιωμένο	69865		60k_day7_Μη αραιωμένο	57717		60k_day11_Μη αραιωμένο	51886
30k_day1_Μη αραιωμένο	86449		30k_day4_Μη αραιωμένο	80998		30k_day7_Μη αραιωμένο	64517		30k_day11_Μη αραιωμένο	53199
15k_day1_Μη αραιωμένο	52646		15k_day4_Μη αραιωμένο	88616		15k_day7_Μη αραιωμένο	71133		15k_day11_Μη αραιωμένο	49304
8k_day1_Μη αραιωμένο	13863		8k_day4_Μη αραιωμένο	90114		8k_day7_Μη αραιωμένο	83291		8k_day11_Μη αραιωμένο	56887



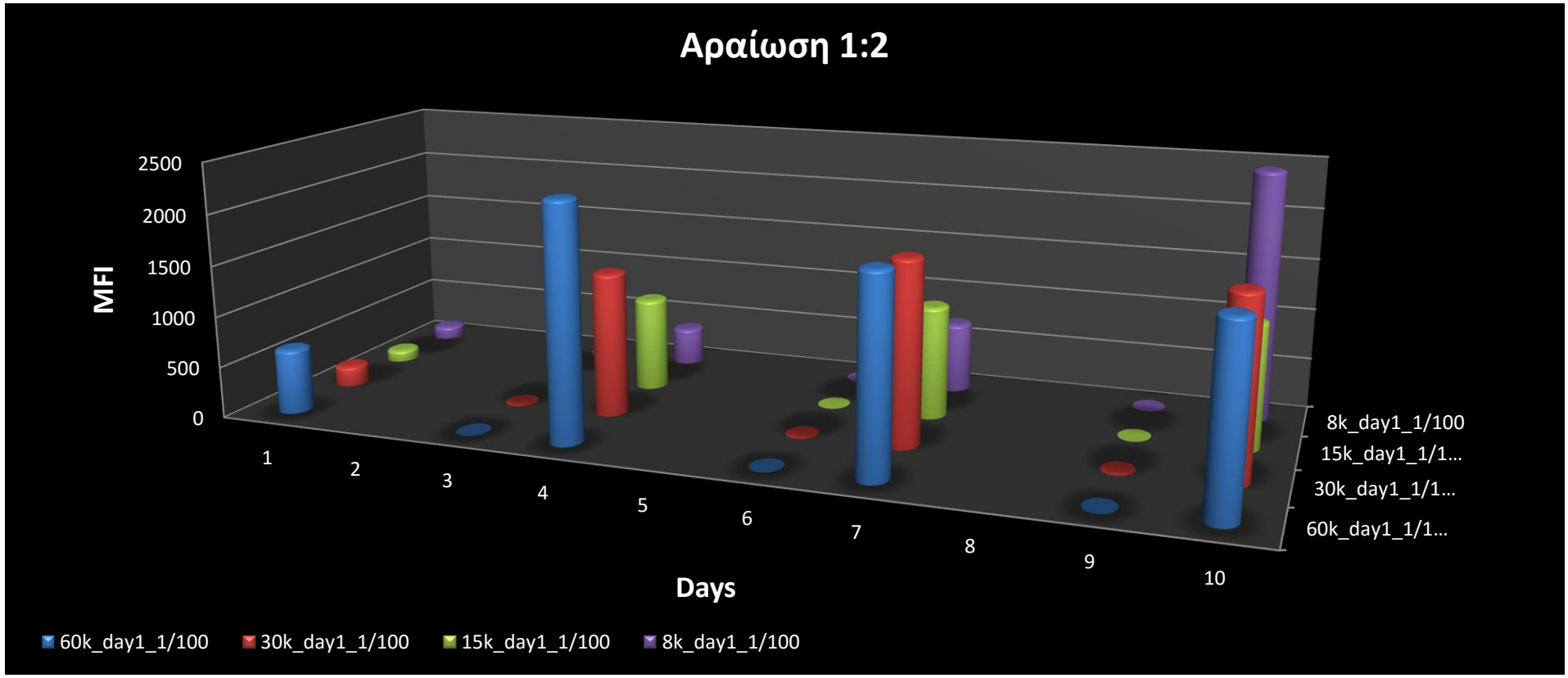
Τα αποτελέσματα από το παραπάνω διάγραμμα δεν είναι επιθυμητά. Παρατηρούμε πως για τις συγκεντρώσεις 60K και 30K (δηλαδή 60000 και 30000 κύτταρα αντίστοιχα), όσο αυξάνονται οι μέρες καλλιέργειας (άξονας χ) το σήμα (Median Fluorescence Intensity, MFI) (άξονας ψ) πέφτει. Αντιθέτως, θα έπρεπε να αυξάνεται. Ενώ για τις συγκεντρώσεις 15K και 8K, για καλλιέργεια μέχρι 4 μέρες, βλέπουμε το σήμα να αυξάνεται. Στη συνέχεια όμως, παρατηρούμε ότι τα σήματα πέφτουν. Συνεπώς, τα αποτελέσματα από τη πρώτη κατηγορία δεν είναι τα επιθυμητά.

Κατηγορία 2η (Αραίωση 1:2 με PBS) :

Ημέρα 1	Ημέρα 7
25μl LC +25μl PBS	25μl LC +25μl PBS
25μl LC +25μl PBS	25μl LC +25μl PBS
25μl LC +25μl PBS	25μl LC +25μl PBS
25μl LC +25μl PBS	25μl LC +25μl PBS
25μl LC +25μl PBS	25μl LC +25μl PBS
25μl LC +25μl PBS	25μl LC +25μl PBS
25μl LC +25μl PBS	25μl LC +25μl PBS
25μl LC +25μl PBS	25μl LC +25μl PBS

Ημέρα 4 Ημέρα 11

60k_day1_1/2 Αραίωση	78877		60k_day4_1/2Αραίωση	66753		60k_day7_1/2Αραίωση	61717		60k_day11_1/2Αραίωση	55401
30k_day1_1/2Αραίωση	52716		30k_day4_1/2Αραίωση	72424		30k_day7_1/2Αραίωση	61959		30k_day11_1/2Αραίωση	55620
15k_day1_1/2Αραίωση	19086		15k_day4_1/2Αραίωση	77160		15k_day7_1/2Αραίωση	64333		15k_day11_1/2Αραίωση	59584
8k_day1_1/2Αραίωση	304		8k_day4_1/2Αραίωση	70326		8k_day7_1/2Αραίωση	70798		8k_day11_1/2Αραίωση	59827



Επίσης, στη δεύτερη κατηγορία, παρατηρούμε περίπου τα ίδια αποτελέσματα με τη πρώτη κατηγορία. Η συγκέντρωση των 60K, όσο αυξάνονται οι μέρες καλλιέργειας μείωνεται. Οι υπόλοιπες συγκεντρώσεις, ενώ αυξάνονται στις 4 μέρες καλλιέργειας, ύστερα μειώνονται.

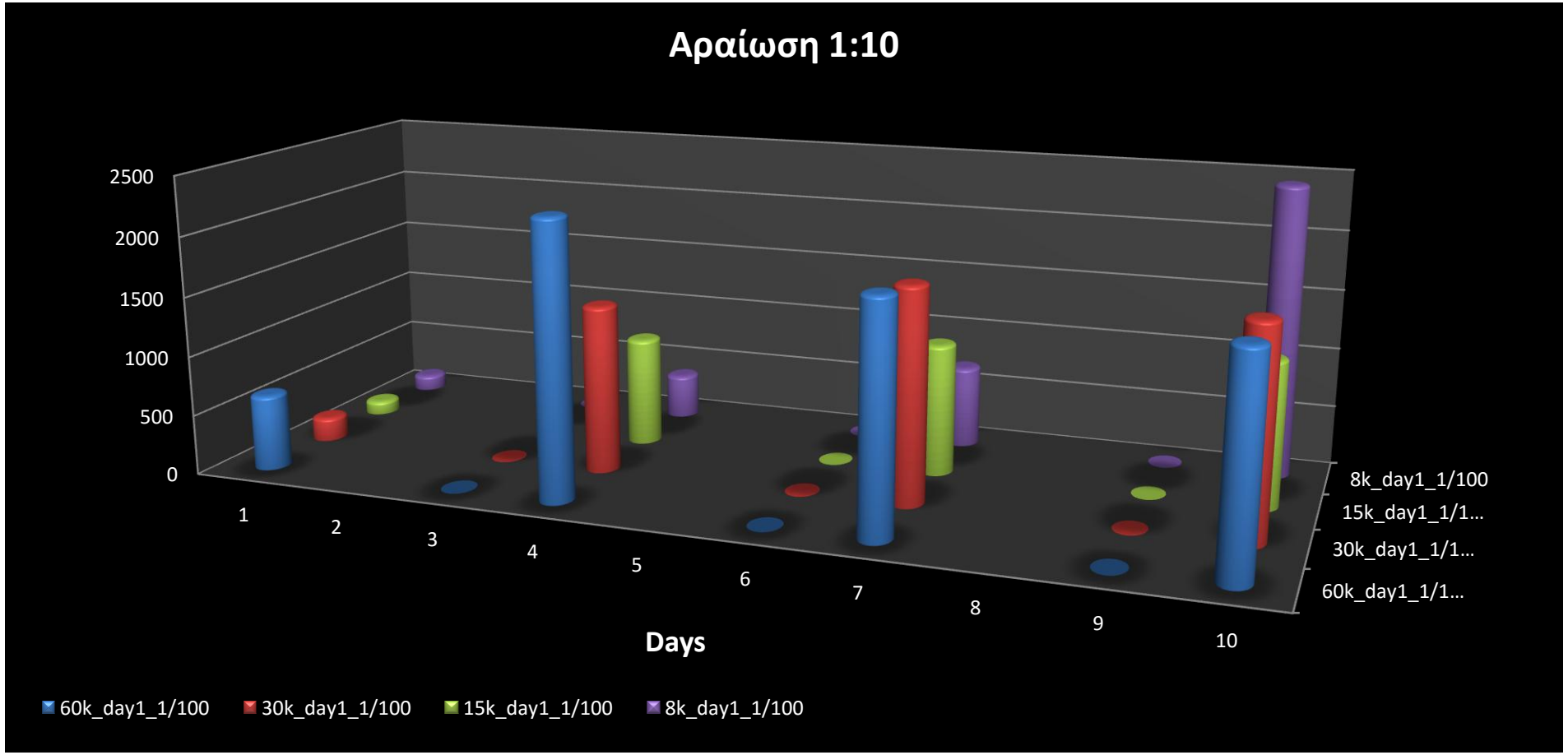
Συνεπώς, ούτε η δεύτερη κατηγορία δεν επιφέρει τα κατάλληλα αποτελέσματα.

3η Κατηγορία (Αραίωση 1:50):

Ημέρα 1	Ημέρα 7
5μl LC+45μl PBS	5μl LC+45μl PBS
5μl LC+45μl PBS	5μl LC+45μl PBS
5μl LC+45μl PBS	5μl LC+45μl PBS
5μl LC+45μl PBS	5μl LC+45μl PBS
5μl LC+45μl PBS	5μl LC+45μl PBS
5μl LC+45μl PBS	5μl LC+45μl PBS
5μl LC+45μl PBS	5μl LC+45μl PBS
5μl LC+45μl PBS	5μl LC+45μl PBS

Ημέρα 4 Ημέρα 11

60k_day1_1/10Αραίωση	13182		60k_day4_1/10Αραίωση	30876		60k_day7_1/10Αραίωση	31706		60k_day11_1/10Αραίωση	31083
30k_day1_1/10Αραίωση	3580		30k_day4_1/10Αραίωση	27107		30k_day7_1/10Αραίωση	28502		30k_day11_1/10Αραίωση	30749
15k_day1_1/10Αραίωση	625		15k_day4_1/10Αραίωση	19904		15k_day7_1/10Αραίωση	23269		15k_day11_1/10Αραίωση	30726
8k_day1_1/10Αραίωση	194		8k_day4_1/10Αραίωση	8298		8k_day7_1/10Αραίωση	14927		8k_day11_1/10Αραίωση	32697



Αντιθέτως, στη τρίτη κατηγορία, παρατηρούμε αμέσως πως όσο αυξάνονται οι μέρες καλλιέργειας των κυττάρων, αναλόγως αυξάνονται και οι αντίστοιχες τιμές συγκεντρώσεων.

Ποιο συγκεκριμένα,

- Η συγκέντρωση των 60K, στη πρώτη μέρα καλλιέργειας, έχει τιμή συγκέντρωσης 13.182.. Ύστερα, στις 4 μέρες καλλιέργειας, η τιμή φτάνει 30.876. Στις 7 μέρες καλλιέργειας, η τιμή της συγκέντρωσης είναι 31.706. Τέλος, στις 11 μέρες η τιμή της συγκέντρωσης είναι ελαφρά μικρότερη από τη τιμή των 7 ημερών, δλδ 31.083.
- Η συγκέντρωση των 30K, στη πρώτη μέρα καλλιέργειας, έχει τιμή συγκέντρωσης 3.580. Ύστερα, στις 4 μέρες καλλιέργειας, η τιμή φτάνει 27.107. Στις 7 μέρες καλλιέργειας, η τιμή της συγκέντρωσης είναι 28.502. Τέλος, στις 11 μέρες η τιμή της συγκέντρωσης είναι 30.749. **Προφανώς, αυτή η συγκέντρωση είναι από τις πιο κατάλληλες διότι όσο αυξάνονται οι μέρες καλλιέργειας, τόσο αυξάνεται και το σήμα.**

- Η συγκέντρωση των 15K, στη πρώτη μέρα καλλιέργειας, έχει τιμή συγκέντρωσης 625. Ύστερα, στις 4 μέρες καλλιέργειας, η τιμή φτάνει 19904. Στις 7 μέρες καλλιέργειας, η τιμή της συγκέντρωσης είναι 23.269. Τέλος, στις 11 μέρες η τιμή της συγκέντρωσης είναι 30.726. **Προφανώς, αυτή η συγκέντρωση είναι από τις πιο κατάλληλες διότι όσο αυξάνονται οι μέρες καλλιέργειας, τόσο αυξάνεται και το σήμα.**

- Η συγκέντρωση των 8K, στη πρώτη μέρα καλλιέργειας, έχει τιμή συγκέντρωσης 194. Ύστερα, στις 4 μέρες καλλιέργειας, η τιμή φτάνει 8298. Στις 7 μέρες καλλιέργειας, η τιμή της συγκέντρωσης είναι 14.927. Τέλος, στις 11 μέρες η τιμή της συγκέντρωσης είναι 32.697. **Προφανώς, αυτή η συγκέντρωση είναι από τις πιο κατάλληλες διότι όσο αυξάνονται οι μέρες καλλιέργειας, τόσο αυξάνεται και το σήμα.**

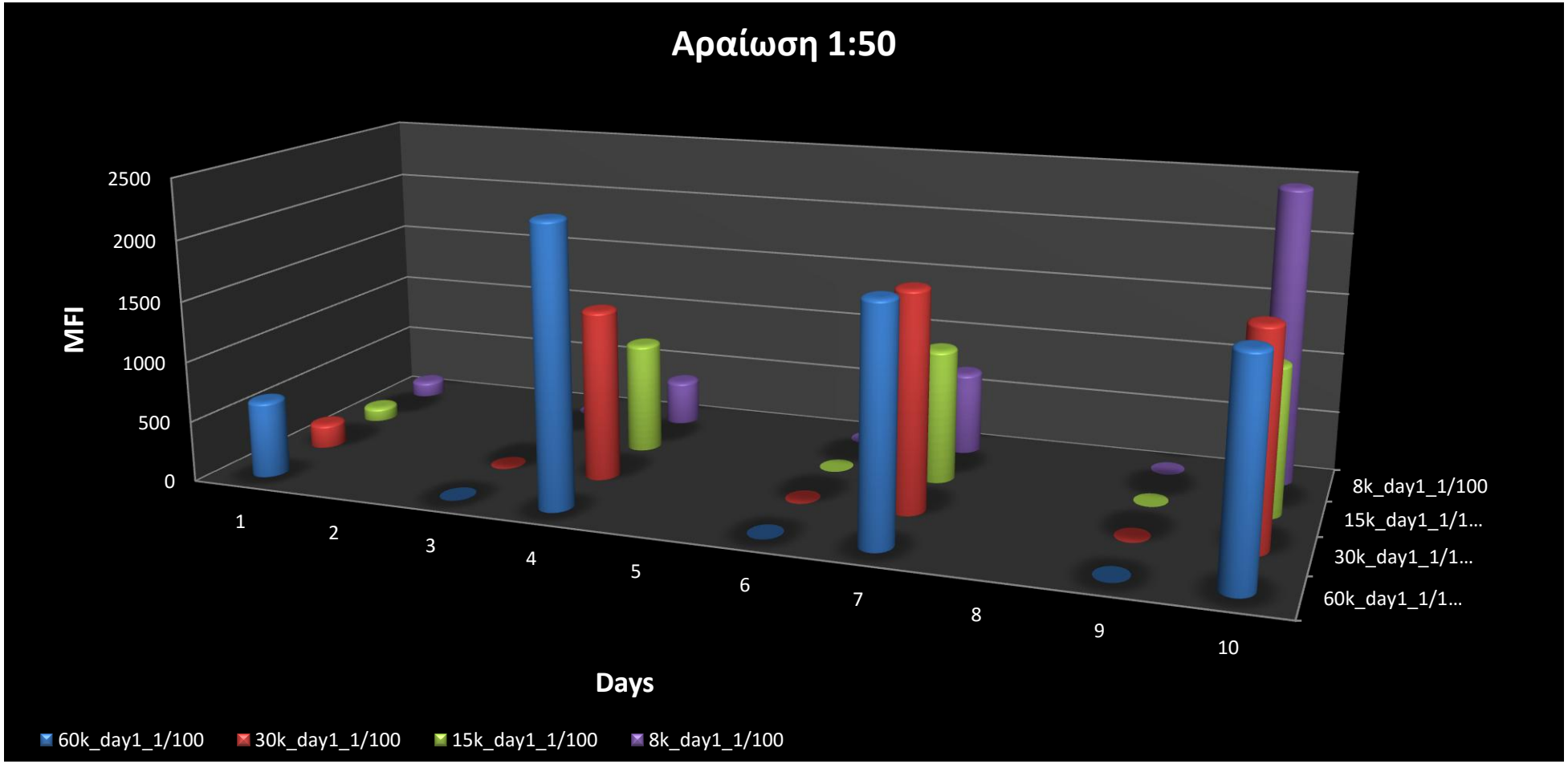
Επομένως, οι συγκεντρώσεις από 8K έως 30K επιφέρουν τα **καλύτερα και πιο επιθυμητά** αποτελέσματα.

4η Κατηγορία(1:50 αραίωση):

Ημέρα 1	Ημέρα 7
1μl LC+49μl PBS	1μl LC+49μl PBS
1μl LC+49μl PBS	1μl LC+49μl PBS
1μl LC+49μl PBS	1μl LC+49μl PBS
1μl LC+49μl PBS	1μl LC+49μl PBS
1μl LC+49μl PBS	1μl LC+49μl PBS
1μl LC+49μl PBS	1μl LC+49μl PBS
1μl LC+49μl PBS	1μl LC+49μl PBS
1μl LC+49μl PBS	1μl LC+49μl PBS

Ημέρα 4 Ημέρα 11

60k_day1_1/50	1037		60k_day4_1/50	5451		60k_day7_1/50	6318		60k_day11_1/50	6259
30k_day1_1/50	375		30k_day4_1/50	3669		30k_day7_1/50	4315		30k_day11_1/50	6260
15k_day1_1/50	168		15k_day4_1/50	2095		15k_day7_1/50	2536		15k_day11_1/50	2475
8k_day1_1/50	155		8k_day4_1/50	718		8k_day7_1/50	1145		8k_day11_1/50	4386



Επίσης, η 4η κατηγορία με αραίωση 1:50 εμφανίζει καλά αποτέλεσματα, κυρίως για τη συγκέντρωση των 7K, αλλά σε σύγκριση με τη προηγούμενη κατηγορία, έχει λιγότερο επιθυμητά αποτελέσματα.

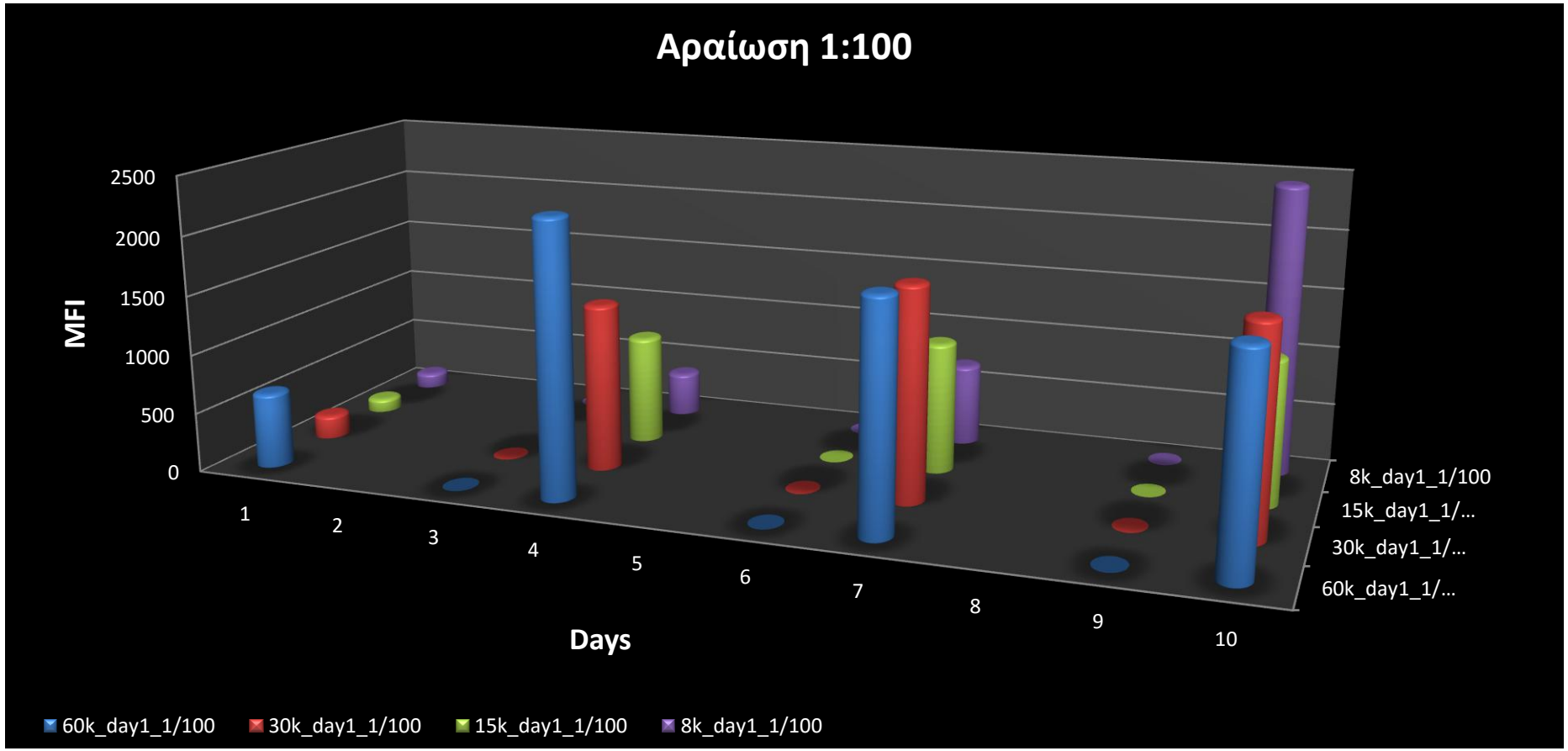
Συνεπώς, μέχρι τώρα η 3η κατηγορία με αραίωση 1:10 και πιο συγκεκριμένα για συγκεντρώσεις 8K-30K έχουμε τα πιο επιθυμητά αποτελέσματα.

5η Κατηγορία (Αραίωση 1:100):

Ημέρα 1	Ημέρα 7
0.5μl LC+49.5μl PBS	0.5μl LC+49.5μl PBS
0.5μl LC+49.5μl PBS	0.5μl LC+49.5μl PBS
0.5μl LC+49.5μl PBS	0.5μl LC+49.5μl PBS
0.5μl LC+49.5μl PBS	0.5μl LC+49.5μl PBS
0.5μl LC+49.5μl PBS	0.5μl LC+49.5μl PBS
0.5μl LC+49.5μl PBS	0.5μl LC+49.5μl PBS
0.5μl LC+49.5μl PBS	0.5μl LC+49.5μl PBS
0.5μl LC+49.5μl PBS	0.5μl LC+49.5μl PBS

Ημέρα 4	Ημέρα 11

60k_day1_1/100	638		60k_day4_1/100	2314		60k_day7_1/100	1911		60k_day11_1/100	1769
30k_day1_1/100	203		30k_day4_1/100	1414		30k_day7_1/100	1797		30k_day11_1/100	1741
15k_day1_1/100	118		15k_day4_1/100	925		15k_day7_1/100	1108		15k_day11_1/100	1220
8k_day1_1/100	135		8k_day4_1/100	377		8k_day7_1/100	692		8k_day11_1/100	2438



Επίσης, η 5^{η} κατηγορία με αραίωση 1:100 εμφανίζει καλά αποτέλεσματα, κυρίως για τη συγκέντρωση των 7K και 15K, αλλά σε σύγκριση με τη 3^{η} κατηγορία, έχει λιγότερο επιθυμητά αποτελέσματα.

Συνεπώς, μέχρι τώρα η 3^{η} κατηγορία με αραίωση 1:10 και πιο συγκεκριμένα για συγκεντρώσεις 8K-15K έχουμε τα πιο επιθυμητά αποτελέσματα.

Επομένως, από το παραπάνω πρώτο βιολογικό πείραμα βελτιστοποίησης συγκέντρωσης κυττάρων τα οποία θα χρησιμοποιηθούν ως εισαγωγή στις διαφορετικές κατηγορίες βιοϋλικών, τελικώς, οι πιο επιθυμητές παράμετροι είναι αποδείχθηκαν πως είναι:

1. **Χρήση αραιωμένων well κατά 1:10**
2. **Εισαγωγή συγκέντρωσης κυττάρων μεταξύ 8.000-15.000 ανά δείγμα**

17. Αποτελέσματα από το δεύτερο βιολογικό πείραμα (μελέτη βιοσυμβατότητας των διαφορετικών κατηγοριών βιοϋλικών).

Αφού πέρασαν τα συγκεκριμένα time frames (ημέρα 1, ημέρα 3, ημέρα 7), έγιναν οι μετρήσεις GAPDH για δύο λόγους. Πρώτον, εάν όντως τα υλικά που παρασκευάστηκαν είναι βιοσυμβατά (επιβιώνουν και πολλαπλασιάζονται κύτταρα) και δεύτερον, ποια κατηγορία αποτελεί τη πιο βιοσυμβατή.

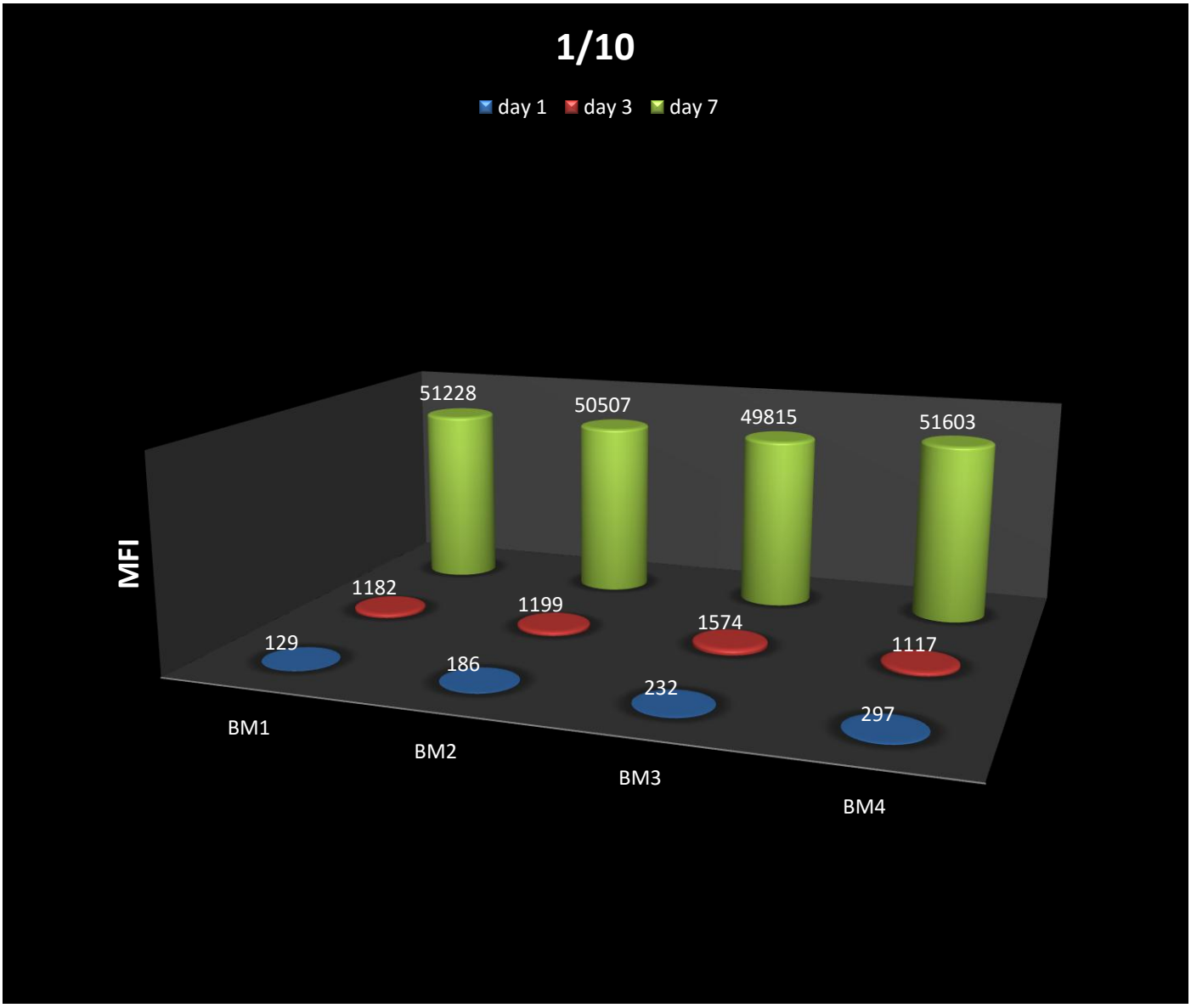
Καταρχάς, μεταφέρθηκαν από τα 24άρια well-plates τα περιεχόμενα μετά από τη λύση κυττάρων σε μια 96άρα well plate και έγιναν δύο διαφορετικές αραιώσεις (1/5 και 1/10).

1/10 Dilution				1/5 Dilution				
Day 1	Day 3	Day 7		Day 1	Day 3	Day 7		
Ti	Ti	Ti		Ti	Ti	Ti		
Ti+Hap	Ti+Hap	Ti+Hap		Ti+Hap	Ti+Hap	Ti+Hap		
Ti+Hap+PEO	Ti+Hap+PEO	Ti+Hap+PEO		Ti+Hap+PEO	Ti+Hap+PEO	Ti+Hap+PEO		
Ti+Hap+CNT	Ti+Hap+CNT	Ti+Hap+CNT		Ti+Hap+CNT	Ti+Hap+CNT	Ti+Hap+CNT		
Ti	Ti	Ti		Ti	Ti	Ti		
Ti+Hap	Ti+Hap	Ti+Hap		Ti+Hap	Ti+Hap	Ti+Hap		
Ti+Hap+PEO	Ti+Hap+PEO	Ti+Hap+PEO		Ti+Hap+PEO	Ti+Hap+PEO	Ti+Hap+PEO		
Ti+Hap+CNT	Ti+Hap+CNT	Ti+Hap+CNT		Ti+Hap+CNT	Ti+Hap+CNT	Ti+Hap+CNT		

Για αραίωση 1/10 τα αποτελέσματα είναι τα παρακάτω:

1//10

	day 1	**day 3**	**day 7**
BM1	**129**	**1182**	**51228**
BM2	**186**	**1199**	**50507**
BM3	**232**	**1574**	**49815**
BM4	**297**	**1117**	**51603**



BM1: Σκέτο τιτάνιο

BM2: Τιτάνιο με υδροξυαπατίτη

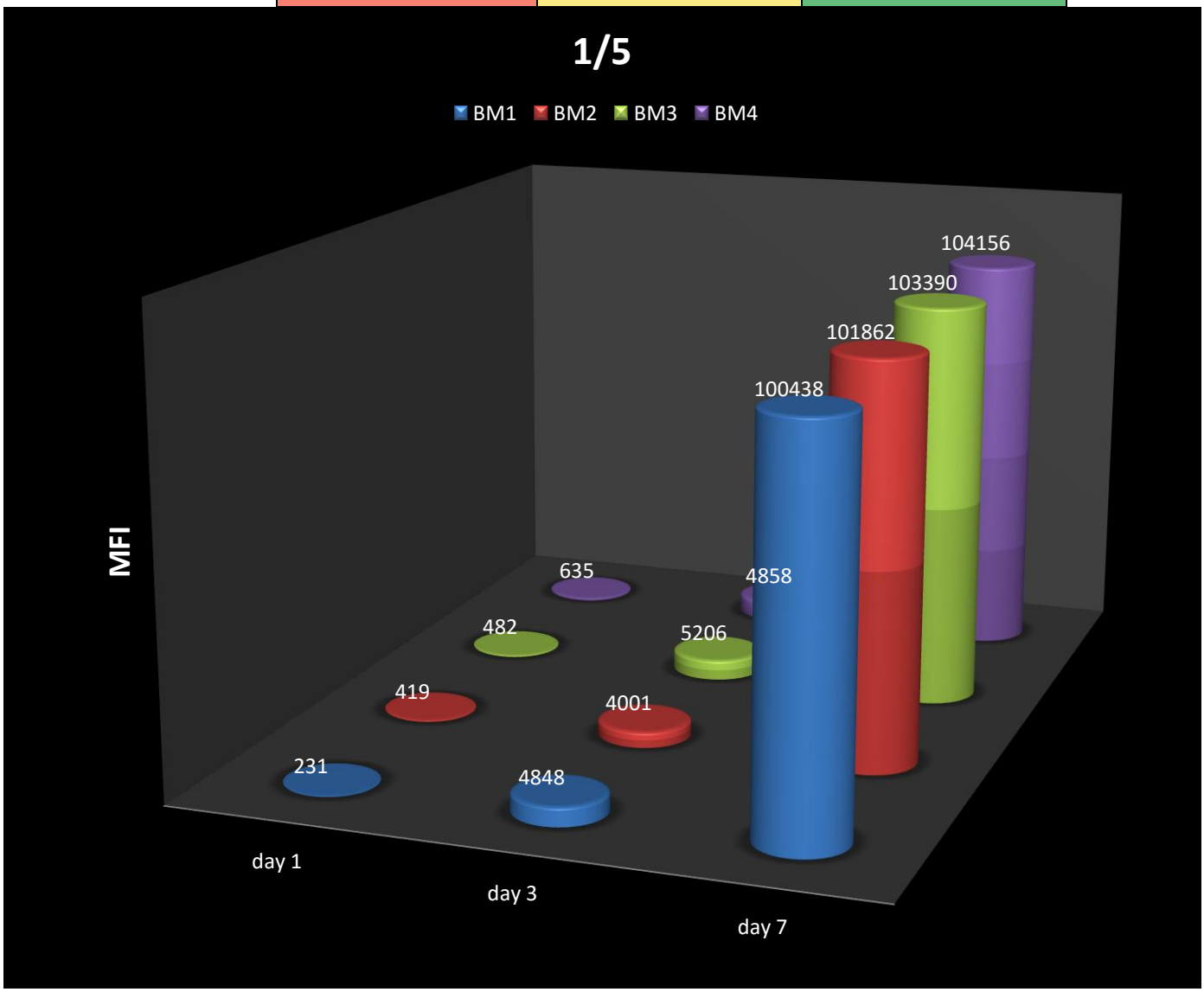
BM3: Τιτάνιο με υδροξυαπατίτη και οξείδο πολυαιθυλενίου

BM4: Τιτάνιο με υδροξυαπατίτη και νανοσωλήνες άνθρακα

Για αραίωση 1/5 τα αποτελέσματα είναι:

1//5

	day 1	**day 3**	**day 7**
BM1	**231**	**4848**	**100438**
BM2	**419**	**4001**	**101862**
BM3	**482**	**5206**	**103390**
BM4	**635**	**4858**	**104156**



BM1: Σκέτο τιτάνιο

BM2: Τιτάνιο με υδροξυαπατίτη

BM3: Τιτάνιο με υδροξυαπατίτη και οξείδο πολυαιθυλενίου

BM4: Τιτάνιο με υδροξυαπατίτη και νανοσωλήνες άνθρακα

Παρατηρώντας τα παραπάνω βιολογικά αποτελέσματα, και στις δύο διαφορετικές περιπτώσεις αραίωσης (1/5 και 1/10), μπορούμε να συμπεράνουμε ότι και οι τέσσερις κατηγορίες βιοϋλικών είναι βιοσυμβατές. Πιο συγκεκριμένα, από τα αποτελέσματα της πρώτης μέρας καλλιέργειας των κυττάρων επάνω στα βιοϋλικά, οι τιμές GAPDH, δείχνουν ότι τα κύτταρα πιθανότατα αρχίζουν να απλώνονται και να προσαρμόζονται στο χώρο. Στη συνέχεια, στη τρίτη μέρα καλλιέργειας, ο πολλαπλασιασμός των κυττάρων έχει ήδη αρχίσει, όχι σε πολύ μεγάλο βαθμό όμως, διότι πιθανότατα, τα κύτταρα ακόμη προσπαθούν να προσαρμοστούν πλήρως στις αντίστοιχες επιφάνειες. Τέλος, στις 7 μέρες καλλιέργειας, προφανώς τα κύτταρα έχουν προσαρμοστεί πλήρως στις αντίστοιχες επιφάνειες και έχουν πολλαπλασιαστεί σε πολύ μεγάλο βαθμό. Αξίζει να σημειωθεί ότι και οι τέσσερις κατηγορίες εμφανίζουν μεγάλη βιοσυμβατότητα. Σε μικρό βαθμό, απ' ό,τι φαίνεται έχει καλύτερη βιοσυμβατότητα η κατηγορία 4 που ήταν ο συνδυασμός υδροξυαπατίτη και νανοσωλήνων άνθρακα.

Προφανώς τα παραπάνω βιολογικά πειράματα δεν είναι τελείως αρκετά για να βγουν πλήρη συμπεράσματα σχετικά με τη βιολογική συμπεριφορά των βιοϋλικών, αλλά μπορούν να μας δώσουν μια πρώτη και αρκετά σαφή εικόνα για το πως συμπεριφέρονται τα κύτταρα επάνω στα βιοϋλικά.

Τελικώς, αποδεικνύεται ότι οι διαφορετικές κατηγορίες των βιοϋλικών είναι αρκετά υποσχόμενες από άποψη βιοσυμβατότητας.

IV. Συμπεράσματα

Κατηγορίες αιωρημάτων-επικαλύψεων

1. Αιώρημα υβριδικού υδροξυαπατίτη

Με τη βιομιμητική μέθοδο αναπτύχθηκαν νανοκρύσταλλοι υδροξυαπατίτη με μορφολογία παρόμοια με αυτή που συναντάται στον απατίτη του φυσικού οστού, σε θερμοκρασία 40° Κελσίου. Πιο συγκεκριμένα, αναπτύχθηκαν κρύσταλλοι εξαγωνικού σχήματος με μεγέθη στην περιοχή 10-40 nm. Η ρύθμιση της διεργασίας πυρήνωσης και ανάπτυξης των κρυστάλλων υδροξυαπατίτη επιτεύχθηκε χρησιμοποιώντας τη χιτοζάνη σε συνδυασμό με τη δράση του αμινοξέος L-αργίνινη, σαν βιομιμητική μήτρα, κατ'αντιστοιχία με το φυσικό περιβάλλον στο οποίο πραγματοποιείται η σύνθεση του υδροξυαπατίτη στον οργανισμό. Η επικάλυψη με το αιώρημα υδροξυαπατίτη ήταν ιδιαίτερα επιτυχημένη όταν το αιώρημα αραιώθηκε σε αντιστοιχία νερού προς υδροξυαπατίτη 4 προς 2 και όταν χρησιμοποιήθηκε η μέθοδος της εμβάπτισης.

2. Αιώρημα υδροξυαπατίτη και νανοσωλήνων άνθρακα

Όταν προστέθηκαν οι νανοσωλήνες άνθρακα, σύμφωνα και με τις εικόνες από το ηλεκτρονικό μικροσκόπιο διέλευσης, οι κρύσταλλοι του υδροξυαπατίτη εναποτίθονταν κατά μήκος και κατά πλάτος στους νανοσωλήνες άνθρακα. Η ποιότητα της επικάλυψης με το συγκεκριμένο υλικό (υδροξυαπατίτης και νανοσωλήνες άθρακα) σε σχέση με τη πρώτη κατηγορία είχαν αισθητή βελτίωση. Οι μικρορωγμές που εμφανίζονταν στη πρώτη κατηγορία επικάλυψης είχαν εξαλειφθεί όταν έγινε η προσθήκη νανοσωλήνων άνθρακα.

3. Αιώρημα υδροξυαπατίτη και οξειδίου του πολυαιθυλενίου

Αφού παρήχθη αιώρημα υδροξυαπατίτη, αυτό ξηράθηκε με τη μέθοδο της λυοφιλίωσης. Η σκόνη που ανακτήθηκε προστέθηκε σε ένα υδατικό αιώρημα οξείδιου του πολυαιθυλενίου στο οποίο είχε προστεθεί επίσης αραιό οξικό οξύ και ακολούθησε η επίστρωση των δειγμάτων τιτανίου. Η επικάλυψη που προέκυψε ήταν ιδιαιτέρως ομοιογενής χωρίς μικρορωγμές παρουσιάζοντας μια αρκετά πορώδη και τραχεία επιφάνεια.

Βιολογικά πειράματα

1. Εύρεση βέλτιστης συγκέντρωσης κυττάρων για τοποθέτηση στα βιοϋλικά.

Στόχος του πρώτου βιολογικού πειράματος ήταν η εύρεση της βέλτιστης συγκέντρωσης κυττάρων που θα τοποθετούνταν επάνω στα δοκίμια. Έτσι λοιπόν έγιναν καλλιέργειες οχτώ διαφορετικών συγκεντρώσεων κυττάρων σε τέσσερα διαφορετικά time frames (1, 4, 7 και 11 μέρες καλλιέργειας) και μετρήθηκε κάθε φορά το γονίδιο GAPDH. Βρέθηκε ότι το βέλτιστο εύρος συγκέντρωσης κυττάρων ήταν 8.000-15.000 κύτταρα. Τελικώς, επιλέχθηκε να τοποθετηθούν σε κάθε δοκίμιο 10.000 κύτταρα.

2. Έλεγχος βιοσυμβατότητας των βιοϋλικών

Αφού βρέθηκε ότι η βέλτιστη συγκέντρωση για κάθε δοκίμιο ήταν 10.000 κύτταρα, διερευνήθηκαν η συμπεριφορά τεσσάρων διαφορετικών κατηγοριών βιοϋλικών. Η πρώτη ήταν σκέτο τιτάνιο το οποίο είχε επεξεργαστεί μηχανικά με λείανση και χημικά με διάλυμα καυστικού νατρίου. Η δεύτερη κατηγορία ήταν τιτάνιο επικαλυμμένο με υδροξυαπατίτη, η τρίτη τιτάνιο με υδροξυαπατίτη και οξείδιο του πολυαιθυλενίου και τέλος η τέταρτη κατηγορία ήταν τιτάνιο με επικάλυψη από υδροξυαπατίτη και νανοσωλήνες άνθρακα. Σε κάθε δοκίμιο τοποθετήθηκαν 10.000 κύτταρα. Στη συνέχεια, έγιναν πρωτεϊνικές μετρήσεις GAPDH για 1, 3 και 7 μέρες. Στη πρώτη και τρίτη μέρα, τα κύτταρα δεν είχαν πολλαπλασιαστεί σε μεγάλο βαθμό. Πιθανότατα τις τρεις πρώτες μέρες τα κύτταρα προσαρμόζονται στο περιβάλλον του βιοϋλικού. Αφού προσαρμοστούν λοιπόν και πάρουν τα κατάλληλα σήματα ότι το περιβάλλον στο οποίο βρίσκονται είναι φιλικό για αυτά, τότε αρχίζουν και πολλαπλασιάζονται εκθετικά. Από τα ανωτέρω διαγράμματα, στην $7^{η}$ μέρα, τα κύτταρα έχουν πολλαπλασιαστεί σε πολύ μεγάλο βαθμό αποδεικνύοντας έτσι ότι όντως και οι τέσσερις κατηγορίες βιοϋλικών που σχεδιάστηκαν και κατασκευάστηκαν σε αυτή τη διπλωματική εργασία είναι όντως βιοσυμβατές. Χαρακτηριστικά, στη πρώτη κατηγορία, για αραίωση 1/10, η τιμή MFI που λήφθηκε την $7^{η}$ μέρα καλλιέργειας, σε σχέση με τη $1^{η}$ μέρα καλλιέργειας, ήταν 397 φορές μεγαλύτερη (από 129 έφτασε 51228). Στη δεύτερη κατηγορία, αντίστοιχα, η τιμή MFI ήταν 297 φορές μεγαλύτερη (από 186 έφτασε 50.507). Στη τρίτη κατηγορία, η αντίστοιχη τιμή ήταν περίπου 215 φορές μεγαλύτερη (από 232 έφτασε 49815) και τέλος στη τέταρτη κατηγορία, η τιμή

στη καλλιέργεια 7 ημερών ήταν 175 φορές μεγαλύτερη σε σχέση με τη τιμή στη καλλιέργεια 1 ημέρας.

Λαμβάνοντας υπόψη και τα δύο διαγράμματα (αραίωση 1/10 και 1/5) συμπεραίνεται ότι όντως όλες οι κατηγορίες είναι αρκετά βιοσυμβατές με σχετικά καλύτερη την τέταρτη κατηγορία (επικάλυψη με υδροξυαπατίτη και νανοσωλήνες άνθρακα).

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

[1]http://www.doitpoms.ac.uk/tlplib/bones/structure.php

[2]http://www.skullsunlimited.com/record_variant.php?id=7594

[3]http://emed.med.uoa.gr/application/syllabus_i/xondrikos_istos/ostitis/index.htm

[4]http://emed.med.uoa.gr/application/syllabus_i/xondrikos_istos/ostitis/4.htm

[5] http://www.doitpoms.ac.uk/tlplib/bones/formation.php

[6]http://emed.med.uoa.gr/application/syllabus_i/xondrikos_istos/ostitis/6.htm

[7]http://emed.med.uoa.gr/application/syllabus_i/xondrikos_istos/ostitis/2-1.htm

[8]http://emed.med.uoa.gr/application/syllabus_i/xondrikos_istos/ostitis/asvest.htm

[9] https://www.youtube.com/watch?v=P8OtBv775mQ

[10] https://www.pinterest.com/pin/333759022364949647/

[11] Ratner BD. Biomaterials science: an introduction to materials in medicine. In: Ratner BD, Hoffmann AS, Schoen FJ, Lemons JE, editors. An Interdisciplinary endeavour. San Diego: Academic Press; 1996. p. xi, 484 p.

[12] Temenoff JS, Mikos Antonios G. Biomaterials: the intersection of biology and materials science. Upper Saddle River, N.J.: Pearson/Prentice Hall; 2008.

[13] Williams DF (1987) Review: Tissue-biomaterial interactions. J. Mat. Sci. 22 (10): 3421-3445.

[14] Long, M. & Rack. H.J. Titanium alloys in total joint replacement – A materials science perspective. Biomaterials 1998;19 1621-1639.

[15] Wang, K. The use of titanium for medical applications in the USA. Materials Science and Engineering A - Structural Materials Properties Microstructure and Processing 1996; 213 134-137.

[16] Williams DF. Consensus and definitions in biomaterials. In: de Potter C, de Lange K, de Groot K, Lee AJC, editors. Advances in biomaterials. Amsterdam: Elsevier; 1987. p. 11–6.

[17] Ratner BD. A perspective on titanium biocompatibility. In: Brunette DM, Tengvall P, Textor M, Thomson P, editors. Titanium in medicine jmaterial science, surface science, engineering, biological responses and medical applications. Berlin: Springer; 2001. p. 2–12.

[18] Biomaterials Science - An Introduction to Materials in Medicine, Buddy D. Ratner and Allan S. Hoffman, 1996, San Diego, California, USA

[19] Biomaterials Science and Engineering, Rosario Pignatello, 2011, InTech, Rijeka, Croatia

[20] Black, J. & Hastings G.W. Handbook of biomaterials properties. London UK: Chapman and Hall; 1998.

[21] Lawrence Katz, J. Anisotropy of Young´s modulus of bone. Nature 1980;283 106-107.

[22] Viceconti, M., Muccini, R., Bernakiewicz, M., Baleani M. & Cristofolini, L. Large-sliding contact elements accurately predict levels of bone-implant micromotion relevant to osseointegration. Journal of Biomechanics 2000; 33 1611-1618.

[23] Calrsson, L.V., Macdonald, W., Magnus Jacobsson, C. &. Albrektsson T. Osseointegration Principles in Orthopedics: Basic Research and Clinical Applications. In: Michael J. Yaszemski; Debra J. Trantolo; Kai-Uwe Lewandrowski; Vasif Hasirci, David E. Altobelli & Donald L. Wise. (ed.) Biomaterials in Orthopedics. United States of America: Marcel Dekker, Inc.; 2004 p223-240.

[24] Junker, R., Dimakis, A., Thoneick, M. &. Jansen, J.A. Effects of implant surface coatings and composition on bone integration: a systematic review. Clinical Oral Implants Research 2009; 20 185-206.

[25] Kim, H.J., Kim, S.H., Kim, M.S., LeeJ, E.J., Oh, H.G., Oh, W.M., et al. Varying Ti-6Al-4V surface roughness induces different early morphologic and molecular responses in MG63 osteoblast-like cells. Journal of Biomedical Materials Research 2005, 74A 366-373.

[26] Vlacic-Zischke, J., Hamlet, S.M., Friis, T., Tonetti, M.S. & Ivanovski, S. The influence of surface microroughness and hydrophilicity of titanium on the up-regulation of TGFb/BMP signalling in osteoblasts. Biomaterials 2011;32 665-671.

[27] Montanaro, L., Campoccia, D. & Arciola, C.R. Nanostructured materials for inhibition of bacterial adhesion in orthopedic implants: a mini review. International Journal of Artificial Organs 2008; 31 771-776.

[28] H.K.D.H Bhadeshia. Titanium and its alloys, Part II Course C9

[29] Virginia Saenz de Viteri, Elena Fuentes, Titanium and Titanium Alloys as Biomaterials, Chapter 5

[30] Α. Τσετσέκου. Κεραμικά, Διδακτικές Σημειώσεις, ΕΜΠ 2006.

[31] Sangamesh G. Kumbar, Cato T. Laurencin, Meng Deng, Natural and Synthetic Biomedical Polymers, San Diego, CA, USA, 2014

[32] Titanium Statistical Compendium, U.S. Geological Survey, Minerals Information. 2007

[33] http://www.britannica.com/science/titanium

[34] W. Martienssen, H. Warlimont, Springer handbook of condensed matter and materials data, Berlin, 2005

[35] ASM INTERNATIONAL, Volume 2: Properties and Selection of NonFerrous Metals and Alloys, Rafael Nunes, Mitchell Ammons, Howard Avery, Robert Barnhurst, John Bean, et.al, Ohio, USA, 1990

[36] Bioscience and Bioengineering of Titanium Materials, Oshida, Professor Yoshiki, USA, 2012

[37] P.W. Brown, B. Constantz (Eds.). Hydroxyapatite and related materials, CRC Press, USA, 1994

[38] R.Z. LeGeros. Apatites in biological systems, Prog. Crystal Growth Charact. 4 (1981) 1-45

[39] R. Gonzalez-McQuire, A. Tsetsekou, Hydroxyapatite-biomolecule coatings onto titanium surfaces

[40] G.K Hunter, P.V. Hauschka, A.R. Pole, L.C Rosenberg, H.A Goldberg. Nucleation and inhibition of hydroxyapatite formation by mineralized tissue proteins, J. Biochem. 317 (1996) 59-64

[41] Lenka Jonasova, Frank Muller, Ales Helebrant, Jakub Strnad, Peter Greil, Biomimetic apatite formation on chemically treated titanium, Journal of Biomaterials, 2004, 1187-1194

[42] Katarzyna Suchanek, Amanda Bartkowiak, Agnieszka Gdowik, Marcin Perzanowski, Crystalline hydroxyapatite coatings synthesized under hydrothermal conditions on modified titanium substrates, Journal of Materials Science and Engineering C, 2015

[43] Y. Zhao, Y. Zhang, F. Ning, D. Guo, Z. Xu, Synthesis and cellular biocompatibility of two kinds of HAP with different nanocrystal morphology, J. Biomed. Mater. Res. B: Appl. Biomater. 83(2007) 121-126

[44] G.H Nancollas, M. Lore, L. Perez, C. Richardson, S.J Zawacki. Mineral Phases of calcium phosphate, The Anatomical Record 224 (1989) 234-241

[45] J. Gomez – Morales, J. Torrent-Burgues, T. Boix, J. Fraile, R. Rodriguez-Clemente. Precipitation of stoichiometric hydroxyapatite from Ca/citratr/phosphate solutions using microwave heating, Cryst. Res. Technol. 34 (1999) 757-762

[46] D. Tsiourvas, A. Tsetsekou, M. Arkas, S. Diplas, E. Mastrogianni. Covalent attachment of a bioactive hyperbranched polymeric layer to titanium surface for the biomimetic growth of calcium phosphates, J. Mater. Sci: Mater. Med. 22 (2011) 85-96

[47] G. Wu, amino acids, metabolism, functions and nutrition, Amino Acids 37 (2009) 1-17

[48] R. Elango, R.O Ball, P.B Pencharz, Amino Acid requirements in humans: with a special emphasis on the metabolic availability of amino acids, Amino acids 37 (2009) 19-27

[49] I. L. Karle, J. Karle. An application of the symbolic addition method to the structure of L-Arginine dehydrate, Acta Cryst. 17 (1964) 835-841

[50] R.M.J Palmer, D.D Rees, D.S Ashton, S. Moncada. L-Arginine is the physiological precursor for the formation of nitric oxide in endothelium dependent relaxation, Biochem. Biophys. Res. Commun. 153 (1988) 1251-1256

[51] C. Rose, V. Felipo. Limited Capacity for Ammonia Removal by Brain in Chronic Liver Failure: Potential Role of Nitric Oxide, Metabolic Brain Disease 20 (2005) 275-283.

[52] A. Barbul, S.A. Lazarou, D.T. Efron, H.L. Wasserkrug, G.Efron. Arginine enhances wound healing and lymphocyte immune responses in humans, Surgery 108 (1990) 336-337

[53] Boualem Hammouda, Derek L. Ho, Steve Kline, Insight into Clustering in Poly (ethylene oxide) Solutions, Macromolecules 2004 37, pp.6932-6937

[54] Apicella A., Cappello B., Del Nobile M.A., La Rotonda M.I., Mensitieri G., Nicolais L. Poly (ethylene oxide) (PEO) and different molecular weight PEO blends monolithic devices for drug release. Biomaterials 14, 1993

[55] Efentakis M., Vlachou M., July 2000. Evaluation of high molecular weight polyox polymer: Studies of flow properties and release rates of furosamide and captopril from controlled release hard gelatin capsules, Pharmaceutical Development and Technology, Vol. 5, Issue 3

[56] Abdulazeez T. Lawal, Synthesis and utilization of carbon nanotubes for fabrication of electrochemical biosensors, Materials Research Bulletin, 2016

[57] Burak Derkus,Kaan Cebesoy Emregul,Emel Emregul, Evaluation of protein immobilization capacity on various carbon nanotube embedded hydrogel biomaterials, Materials Science and Engineering: C, 2015

[58] Wei Wang, Susan Liao, Ming Liu, Qian Zhao, Yuhe Zhu, Polymer Composites Reinforced by Nanotubes as Scaffolds for Tissue Engineering, 2014

[59] Lorena Athie Goulart,Fernando Cruz de Moraes,Lucia Helena Mascaro, Influence of the different carbon nanotubes on the development of electrochemical sensors for bisphenol A, Materials Science and Engineering: C, 2016

[60] Hua He, Lien Ai Pham-Huy, Pierre Dramou, Deli Xiao, Pengli Zuo, Chuong Pham- Huy, Carbon Nanotubes: Applications in Pharmacy and Medicine, 2013

[61] S.P. Khanal,H. Mahfuz,A.J. Rondinone,Th. Leventouri, Improvement of the fracture toughness of hydroxyapatite (HAp) by incorporation of carboxyl functionalized single walled carbon nanotubes (CfSWCNTs) and nylon, Materials Science and Engineering: C, 2016

[62] Jia Yan,Tianhao Wu,Zezun Ding,Xiaokang Li, Preparation and characterization of carbon nanotubes/chitosan composite foam with enhanced elastic property, Carbohydrate Polymers, 2016

[63] Rui Yu,Maofei Ran,Jie Wen,Wenjing Sun,Wei Chu,Chengfa Jiang,Zhiwei He, The effect of hydroxylation on CNT to form Chitosan-CNT composites: A DFT study, Applied Surface Science, 2015

[64] Jayachandran Venkatesan,BoMi Ryu,P.N. Sudha,Se-Kwon Kim, Preparation and characterization of chitosan–carbon nanotube scaffolds for bone tissue engineering, International Journal of Biological Macromolecules, 2012

[65] Concepts of Biology, Rice University, 2013, Houston, Texas, USA

[66] Bruce Alberts, Alexander Johnson, Julian Lewis, Martin Raff, Keith Roberts, Peter Walter, Molecular Biology of the Cell, 2008, New York, USA

[67] D. Tsiourvas A. Tsetsekou M. Arkas, Covalent attachment of a bioactive hyperbranched polymeric layer to titanium surface for the biomimetic growth of calcium phosphates, J Mater Sci: Mater Med (2011) 22:85–96

[68] M.G Troia, G.E.P Henriques, M.F Mesquita, W.S Fragoso. The effect of surface modifications on titanium to enable titanium-porcelain bonding, Dent. Mater. 24 (2008) 28-33

[69] A. Rakngarm, Y. Miyashita, Y. Mutoh. Formation of hydroxyapatite layer on bioactive Ti and Ti-6Al-4V by simple chemical technique, J. Mater. Sci: Mater. Med. 19 (2008) 1953-1961.

[70] Στεργίου Γεώργιος, Διπλωματική Εργασία: «Σύνθεση κόνεως υδροξυαπατίτη παρουσία του βιοπολυμερούς χιτοζάνη και αμινοξέων», Ε.Μ.Π, Αθήνα, 2013

[71] Βάου Βασιλική, Μεταπτυχιακή Εργασία: «Μελέτη του μηχανισμού βιομιμητικής σύνθεσης υδροξυαπατίτη παρουσία βιομορίων», Ε.Μ.Π. Αθήνα, 2012

[72] Μπρασινίκα Δέσποινα, Διδακτορική Διατριβή: «Βιομιμητική ανάπτυξη σύνθετων βιοκεραμικών υδροξυαπατίτη-βιοπολυμερών με ελεγχόμενες ιδιότητες για βιολογικές εφαρμογές», Ε.Μ.Π. Αθήνα, 2015

[73] Tsetsekou A, Brasinika D, Vaou V, Chatzitheorides E, On the synthesis of tailored biomimetic hydroxyapatite nanoplates through a bioinspired approach in the presence of collagen or chitosan and L-arginine, Mater Sci Eng C 2014.