



ΑΡΙΣΤΟΤΕΛΕΙΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΟΝΙΚΗΣ

ΣΧΟΛΗ ΘΕΤΙΚΩΝ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ

ΤΜΗΜΑ ΦΥΣΙΚΗΣ

ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΛΕΠΤΩΝ ΥΜΕΝΙΩΝ, ΝΑΝΟΣΥΣΤΗΜΑΤΩΝ ΚΑΙ ΝΑΝΟΜΕΤΡΟΛΟΓΙΑΣ (LTFN)

ΔΙΑΤΜΗΜΑΤΙΚΟ ΔΙΕΠΙΣΤΗΜΟΝΙΚΟ ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΟ ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ ΣΠΟΥΔΩΝ 'ΝΑΝΟΕΠΙΣΤΗΜΕΣ ΚΑΙ  
ΝΑΝΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΕΣ'

ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ

**Νανοϊνώδη Ικρίώματα Πολυκαπρολακτόνης  
ενσωματωμένα με Νανοσωματίδια Αργύρου με την  
Electrospray Deposition (ESD) τεχνική**

ΣΦΑΚΙΑΝΟΥ ΠΑΝΑΓΙΩΤΑ

Επιβλέπων Καθηγητής: Καθηγητής, Διευθυντής ΔΠΜΣ

ΣΤΕΡΓΙΟΣ ΛΟΓΟΘΕΤΙΔΗΣ

Συνεπιβλέποντες: Dr ΠΑΡΑΣΚΕΥΗ ΚΑΒΑΤΖΙΚΙΔΟΥ

Dr ΧΟΛΗ – ΠΑΠΑΔΟΠΟΥΛΟΥ Δ.

ΘΕΣΣΑΛΟΝΙΚΗ 2014

## ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

*Η συγκεκριμένη διπλωματική εργασία πραγματοποιήθηκε στο «Εργαστήριο Λεπτών Υμενίων Νανοσυστημάτων και Νανομετρολογίας-LTFN».*

*Θα ήθελα, λοιπόν, να εκφράσω τις ευχαριστίες μου στον κ. Λογοθετίδη Στέργιο, Καθηγητή του Τμήματος Φυσικής του Αριστοτελείου Πανεπιστημίου Θεσσαλονίκης και διευθυντή του Διατμηματικού Προγράμματος Μεταπτυχιακών Σπουδών Νανοεπιστήμες & Νανοτεχνολογίες (ΔΤΜΣ Ν&Ν) για την εμπιστοσύνη που μου επέδειξε την ανάθεση του συγκεκριμένου θέματος. Θα ήθελα να τον ευχαριστήσω επίσης, για τις ερευνητικές και πειραματικές δυνατότητες που μου δόθηκαν κατά τη διάρκεια εργασίας μου στο “Εργαστήριο Λεπτών Υμενίων Νανοσυστημάτων και Νανομετρολογίας-LTFN”.*

*Πολλά και θερμά ευχαριστώ στην κ. Καβατζικίδου Παρασκευή, Μεταδιδακτορική ερευνήτρια στο LTFN, η οποία ήταν δίπλα μου καθ’ όλη τη διάρκεια της εκπόνησης της διπλωματικής μου εργασίας και χωρίς αυτήν η ολοκλήρωση της παρούσας εργασίας δεν θα ήταν εφικτή. Την ευχαριστώ για τις συμβουλές που μου έδωσε, για την εμπιστοσύνη που μου έδειξε και τις γνώσεις που μου μετέδωσε κατά την παραμονή μου στο εργαστήριο, ώστε να εκπαιδευτώ πάνω στην καλλιέργεια των κυττάρων και την ανάλυση του πολλαπλασιασμού τους, αλλά και στον συνδυασμό τεχνικών για τη μελέτη των υλικών. Η ίδια αποτέλεσε έμπνευση για μένα και το ευχάριστο κλίμα και η άριστη συνεργασία μας με βοήθησε να προχωρήσω και να εμπλουτίσω τις γνώσεις μου.*

*Επιπλέον, θα ήθελα να ευχαριστήσω τον Χριστόφορο Γραβαλίδη μεταδιδακτορικό ερευνητή του LTFN, για τις μετρήσεις Περύθλασης Ακτίνων Χ*

καθώς και στην πολύτιμη βοήθειά του στην Παρασκευή Νανοσωματιδίων Αργύρου, τον Σπύρο Κασσαβέτη μεταδιδακτορικό ερευνητή του LTFN για τις γνώσεις που μου μετέφερε και τις μετρήσεις των μηχανικών ιδιοτήτων με τη μέθοδο του Nanoindentation, τους Σεϊτανίδου Μαρία, Απόστολο Ιωακείμιδη και Θεοδώρα Κοτζιάμπαση, μεταπτυχιακούς φοιτητές, για τις μετρήσεις Ατομικής Μικροσκοπίας Δυνάμεων, τους Ελένη Γεωργαράκη, μέλος της ερευνητικής ομάδας νανοϊατρικής, και Θεοδώρα Κοτζιάμπαση, μεταπτυχιακή φοιτήτρια, για τη βοήθεια που μου προσέφεραν στα πρώτα βήματα μου στο εργαστήριο καθώς και για τις μετρήσεις γωνίας διαβροχής καθώς και όλα τα υπόλοιπα μέλη του εργαστηρίου για την άψογη συνεργασία. Δεν θα μπορούσα να παραλείψω στις ευχαριστίες μου την κ Θεοδώρα Χόλη-Παπαδοπούλου, καθηγήτρια στο Τμήμα Χημείας Α.Π.Θ. για τη χρήση του οργάνου μέτρησης απορρόφησης και την κ Ελένη Παυλίδου, αναπληρώτρια καθηγήτρια στο Τμήμα Φυσικής Α.Π.Θ. Επίσης, να ευχαριστήσω την ομάδα της Αναπληρώτριας Καθηγήτριας κ. Παυλίδου Ελένης του τμήματος Φυσικής του Α.Π.Θ. για τις μετρήσεις ηλεκτρονικής μικροσκοπίας SEM.

Τέλος, θα ήθελα να ευχαριστήσω ιδιαίτερα τη γιαγιά μου για τη συνεχή και διαρκή της στήριξη σε όλη αυτή την προσπάθεια και πορεία και γι' αυτό της αφιερώνω αυτή τη διπλωματική εργασία..

Θεσσαλονίκη, 2014, Σφακιανού Παναγιώτα

# ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Η παρούσα διπλωματική εργασία πραγματεύεται την ανάπτυξη νανοϊνώδων ικριωμάτων Πολυκαπρολακτόνης(PCL), με τη μέθοδο Electrospray Deposition, στα πλαίσια του πεδίου της Αναγεννητικής Ιατρικής (Regenerative Medicine) και συγκεκριμένα για ενίσχυση της μηχανικής συμπεριφοράς των φυσικών πολυμερικών ικριωμάτων για την αναγέννηση του χόνδρου.

Η Πολυκαπρολακτόνη είναι ένα σύνθετο βιοαποικοδομήσιμο πολυμερές, που ανήκει στην κατηγορία των αλειφατικών πολυεστέρων, κρυσταλλώνεται εύκολα είναι σκληρή και εύκαμπτη, με αργό ρυθμό βιοαποικοδόμησης. Επιπλέον, οι μηχανικές ιδιότητες του πολυμερούς αυτού μπορούν να ρυθμιστούν και να σχεδιαστούν ανάλογα με τα επιθυμητά χαρακτηριστικά, καθιστώντας την ένα πολλά υποσχόμενο υποψήφιο συνθετικό πολυμερές για την επιδιόρθωση και αναγέννηση ιστών, κυρίως σε ορθοπεδικές εφαρμογές. Τα Νανοσωματίδια Αργύρου επιλέχθηκαν για εμπλουτισμό των νανοϊνώδων ικριωμάτων, λόγω της αντιμικροβιακής τους ιδιότητας (αποτροπή σχηματισμού biofilm βακτηρίων στην επιφάνεια των ιατρικών εμφυτευμάτων). Επίσης αυξάνουν την τραχύτητα της επιφανείας, και κατά συνέπεια αυξάνουν την υδροφοβικότητά της, και επηρεάζουν έντονα την κυτταρική πρόσφυση, ανάλογα με το μέγεθος, τη μορφολογία, το σχήμα, το φορτίο, την αντιδραστικότητά τους, τη λειτουργικότητά τους και την δημιουργία ή μη συσσωματωμάτων.

Απώτερος σκοπός ήταν η δημιουργία ενός βιομιμητικού νανοϊνώδους περιβάλλοντος που να προσομοιάζει την Εξωκυττάρια Θεμέλια Ουσία (ECM) του αρθρικού χόνδρου κι επομένως να προάγει την πρόσφυση και πολλαπλασιασμό των χονδροκυττάρων και ουσιαστικά τη δημιουργία εκ νέου χονδρικού ιστού. Τα δομικά χαρακτηριστικά των ικριωμάτων στην ιστομηχανική, επηρεάζουν την κυτταρική συμπεριφορά και πρέπει να πληρούν συγκεκριμένες κατασκευαστικές προϋποθέσεις για να υποστηρίξουν την κυτταρική προσκόλληση, τον πολλαπλασιασμό και τη διαφοροποίηση. Το ικρίωμα ουσιαστικά ενεργεί ως μια προσωρινή συνθετική εξωκυττάρια μήτρα (ECM) που αλληλεπιδρά με τα κύτταρα προς σχηματισμό ενός νέου ιστού.

Η μέθοδος Ηλεκτροστατικής έναπόθεσης (Electrospinning), είναι η πιο κοινή μέθοδος για την κατασκευή των νανοϊνώδων ικριωμάτων. Το Electrospray Deposition, η μέθοδος που χρησιμοποιείται στην παρούσα εργασία, βασίζεται στην ίδια αρχή λειτουργίας με τη μέθοδο Ηλεκτροστατικής έναπόθεσης. Οι electrospun πολυμερικές νανοΐνες έχουν πολλές εξαιρετικές



ιδιότητες, συμπεριλαμβανομένων των μικρών διαμέτρων, τη μεγάλη ειδική επιφάνεια, ένα υψηλό βαθμό δομικής τελειότητας (high degree of structural perfection) και τις προκύπτουσες ανώτερες μηχανικές ιδιότητες. Επιπροσθέτως, οι nonwoven πολυμερείς δομές προσφέρουν μια μοναδική ικανότητα να ελέγχουν τα μεγέθη των πόρων μεταξύ των ινών.

Σε αυτή την εργασία, χρησιμοποιήθηκε η Πολύ-καπρολακτόνη (Poly-caprolactone, PCL), σε διάφορες συγκεντρώσεις (20%, 25% και 30%), με διάφορους διαλύτες (90% οξικό οξύ και χλωροφόρμιο/μεθανόλη σε αναλογία(3:1)), ώστε να βρεθεί ο βέλτιστος για το συγκεκριμένο πολυμερές. Η βελτιστοποίηση των συνθηκών ανάπτυξης των ικριωμάτων, αποδείχτηκε πως αφορά κυρίως τη συγκέντρωση του πολυμερούς, το είδος του διαλύτη (επιφανειακή τάση, πτητικότητα), την απόσταση βελόνας-συλλέκτη, την εφαρμοζόμενη τάση και το ρυθμό ροής. Ο χρόνος ανάπτυξης των ικριωμάτων έγινε για μια ώρα, για να μπορούν τα αποτελέσματα να είναι συγκρίσιμα μεταξύ τους.

Ο δομικός/μορφολογικός/τοπογραφικός χαρακτηρισμός των ικριωμάτων, έγινε με την Ηλεκτρονική Μικροσκοπία Σάρωσης (SEM) και την Σαρωτική Μικροσκοπία Ατομικών Δυνάμεων (AFM) και η αξιολόγηση της διαβροχής (wettability) τους με τη μέτρηση γωνίας διαβροχής (Contact Angle, CA). Η μηχανική αντοχή τους μελετήθηκε με τη μέθοδο του Nanoindentation. Τα ικρίωματα πολυκαπρολακτόνης παρουσίασαν υδρόφοβη συμπεριφορά, με αύξησή της με την προσθήκη των Νανοσωματιδίων Αργύρου. Το μέγεθος και η ταυτοποίηση των Νανοσωματιδίων Αργύρου έγινε με Περίθλαση ακτινών-Χ, η οποία επαλήθευσε την ύπαρξή τους. Τα ικρίωματα μελετήθηκαν, επίσης, ως προς την βιολογική απόκριση τους σε κυτταρικές σειρές. Ειδικότερα, η κυτταρική σειρά L929s (αθανатоποιημένη κυτταρική σειρά ινοβλαστών που απομονώνεται από ινοσάρκωμα (λιπώδης ιστός) ποντικού) καλλιεργήθηκε στην επιφάνεια των ικριωμάτων για δυο χρονικά διαστήματα (24hrs, 3 και 7 μέρες), κι έγινε ποσοτική εκτίμηση των κυττάρων που αναπτύχθηκαν με την εφαρμογή του MTT πρωτόκολλου. Για την ολοκλήρωση της κυτταρικής μελέτης ελήφθησαν εικόνες με την Ηλεκτρονική Μικροσκοπία Σάρωσης (SEM). Επιλέχθηκαν κάποια δείγματα ικριωμάτων σαν τα βέλτιστα, στα οποία έγινε καλλιέργεια με ανθρώπινα χονδροκυττάρα, με την ίδια διαδικασία που ακολουθήθηκε και για τα κύτταρα των ινοβλαστών. Η τελευταία αυτή κυτταρική μελέτη συμπληρώθηκε και πάλι με εικόνες με την Ηλεκτρονική Μικροσκοπία Σάρωσης (SEM). Στις ομάδες των δειγμάτων, τη μεγαλύτερη κυτταρική βιωσιμότητα παρουσίασε το 30% PCL in chloroform/methanol στην ελάχιστη απόσταση βελόνας-συλλέκτη (D200=5cm). Τα ικρίωματα με Νανοσωματίδια Αργύρου σημείωσαν μικρότερη βιωσιμότητα. Τα πολυμερικά νανοϊνώδη

ικριώματα, επιδεινώνουν μεγάλη βιοσυμβατότητα, καθότι αποτελούνται από δομικά στοιχεία που αναγνωρίζονται από τα κύτταρα. Δηλαδή, φαίνεται πως ο κύριος μηχανισμός κυτταρικής πρόσφυσης περιλαμβάνει τις απευθείας αλληλεπιδράσεις ινών-κυττάρων, λόγω της τραχύτητας και της αυξημένης διαθέσιμης περιοχής (αναλογία επιφάνειας/όγκου).

Συμπεραίνεται πως η χημική σύνθεση, η τραχύτητα, η διαβροχή και η τοπογραφία των επιφανειών είναι καθοριστικοί παράγοντες για τη βιοσυμβατότητα ενός πολυμερικού υλικού, καθότι καθορίζουν το μηχανισμό της κυτταρικής πρόσφυσης, κι επηρεάζουν την κυτταρική ανάπτυξη, τον πολλαπλασιασμό και τη μετανάστευση.

# ABSTRACT

This thesis deals with the development of Polycaprolactone (PCL) nanofibrous scaffolds, with Electro Spray Deposition Method, within the field of Regenerative Medicine and specifically to enhance the mechanical behavior of natural polymeric scaffolds for cartilage regeneration.

Polycaprolactone is a biodegradable polymer composite, which belongs to the class of aliphatic polyesters, is easily crystallized, tough and flexible, with slow biodegradation. Moreover, the mechanical properties of this polymer can be configured and designed according to the desired characteristics, making it a promising candidate synthetic polymer for tissue repair and regeneration, mostly in orthopedic applications. Silver nanoparticles were selected for enrichment of nanofibrous scaffolds because of their antimicrobial properties (prevention of bacterial biofilm formation on the surface of medical implants). Also they increase the surface roughness, and consequently increase the hydrophobicity, and strongly influence cell adhesion, depending on the size, morphology, shape, charge, reactivity, functionality and creating aggregates or not.

The ultimate objective was to create a biomimetic nanofibrous environment which simulates the extracellular matrix (ECM) of the articular cartilage and therefore promote the adhesion and proliferation of chondrocytes and essentially creating new cartilage tissue. The structural characteristics of the scaffolds in tissue engineering, affect cellular behavior and must have specific construction requirements to support cell attachment, proliferation and differentiation. The scaffold essentially acts as a temporary synthetic extracellular matrix (ECM) that interacts with the cells to form a new tissue.

The electrostatic deposition method (Electrospinning), is the most common method for the construction of nanofibrous scaffolds. The Electro Spray Deposition, the method used in this work, based on the same principle of operation with the electrostatic deposition method. The electrospun polymer nanofibers have many excellent properties, including small diameters, the large specific surface, a high degree of structural perfection and superior mechanical properties. Additionally, the nonwoven polymeric structures offer a unique ability to control pore sizes between the fibers.

In this work, polycaprolactone (Poly-caprolactone, PCL) was used, at various concentrations (20 %, 25 % and 30 %) in various solvents (90 % acetic acid and chloroform / methanol in the ratio (3:1) ) to find the optimum one for the particular polymer. The optimization of growth conditions of scaffolding, proved to essentially concern the polymer concentration, the type of solvent (surface tension, volatility) , the distance of needle - collector, the applied voltage and the flow rate. The development time of the scaffolds was for one hour, for the results to be comparable.

The structural/ morphological/ topographical characterization of scaffolds, made by Scanning Electron Microscopy (SEM) and Scanning Atomic Force Microscopy (AFM) and the evaluation of wettability by measuring the Contact Angle, CA. The mechanical strength was studied by the method of Nanoindentation. The polycaprolactone scaffolds showed hydrophobic behavior, increasing with the addition of silver nanoparticles . The size and identification of silver nanoparticles was done by X-ray diffraction, which revealed their existence. The scaffolds were studied also on the biological response in cell lines. Specifically, the cell line L929s ( immortalized fibroblast cell line isolated from fibrosarcoma (adipose tissue ) cells ) was cultured on the surface of scaffolds for two intervals (24hrs, 3 and 7 days ), and became a quantitative estimation of the cells grown with the application of MTT protocol. To complete the cellular study, images were taken by Scanning Electron Microscopy (SEM). Some samples were selected as optimal scaffolds, which was cultured with human chondrocytes, with the same procedure as with the fibroblast cells. The latter study cell filled again with images using Scanning Electron Microscopy (SEM). In the groups of samples, the largest cell viability showed the 30% PCL in chloroform / methanol to the minimum distance needle - collector (D200 = 5cm). Scaffolds with silver nanoparticles showed less viability. Polymeric nanofibrous scaffolds show high biocompatibility, as consisting of components that are recognized by the cells. That is, it seems that the main mechanism of cell adhesion involves direct interactions fiber - cells, due to roughness and increased the area available (ratio surface / volume).

Concluded that the chemical composition, roughness, wetting and surface topography are determining factors for the biocompatibility of a polymeric material, as they determine the mechanism of cell adhesion and influence cell growth, proliferation and migration.

## Συμμετοχές πειραματικής μελέτης-διακρίσεις

- ✓ 8<sup>η</sup> Διημερίδα Βιοϋλικών, Νοέμβριος 2013. Διοργάνωση της Ελληνικής Εταιρίας Βιοϋλικών, Αθήνα.
  - **Βραβείο για την καλύτερη προφορική παρουσίαση**
- ✓ Ομιλία στο 8<sup>th</sup> International Summer Schools N&N, Organic Electronics & Nanomedicine (ISSON 2014) & 11<sup>th</sup> International Conference on Nanosciences & Nanotechnologies (NN14), in Thessaloniki

# ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

| ΚΕΦΑΛΑΙΟ   | Σελ.   |
|--|--|
| <b>ΜΕΡΟΣ Α΄ ΘΕΩΡΗΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ</b>                                      |  |
| <b>ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1. Εισαγωγή στο κύτταρο και τη μεμβρανική μεταφορά</b>   |  |
| <b>1.1</b>   | Το κύτταρο 13  |
| <b>1.2</b>   | Η Μembrάνη 15  |
| 1.2.1  | Τα Λιπίδια 16  |
| 1.2.2  | Οι Πρωτεΐνες των μεμβρανών 18  |
| 1.2.3  | Διαμεμβρανική μεταφορά 19  |
| 1.2.4  | Δυναμικό Κυτταρικής Μembrάνης 27   |
| 1.2.5  | Δυναμικό ηρεμίας της Κυτταρικής Μembrάνης 28   |
| <b>1.3</b>   | ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ 33  |
| <b>ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2. Βιοϋλικά και Πολυμερή με εφαρμογή στη Νανοϊατρική</b> |  |
| <b>2.1</b>   | Εισαγωγή στην Νανοτεχνολογία και την Νανοϊατρική 34  |
| <b>2.2</b>   | Παράμετροι της επιφάνειας που ευνοούν ή όχι την προσκόλληση των κυττάρων 39                        |
| 2.2.1  | Γωνία Διαβροχής (wetting) 41   |
| 2.2.2  | Τραχύτητα και τοπογραφία της επιφάνειας 41   |
| 2.2.3  | φορτίο 41  |
| 2.2.4  | Μέτρο ελαστικότητας 42   |
| <b>2.3</b>   | Βιοδιασπώμενα Πολυμερή, κατάλληλα για την Ιστική Αναγέννηση 42                                     |
| 2.3.1  | Πολύ-ε-καπρολακτόνη (PCL) 55   |
| 2.3.2  | Ιστική Αναγέννηση (Tissue Engineering) 56  |
| 2.3.3  | Ο ρόλος των ινών στο ικρίωμα (Scaffold) 59   |
| 2.3.4  | Μέθοδος ηλεκτροστατικής Ινοποίησης (Electrospinning) για Κατασκευή Τρισδιάστατων Ικριωμάτων 61     |
| <b>2.4</b>   | ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ 70  |
| <b>ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3. Αρθρικός Χόνδρος και Βλάβες του</b>                   |  |
| <b>3.1</b>   | Αρθρικός Χόνδρος 76  |
| <b>3.2</b>   | Βλάβες του Αρθρικού Χόνδρου 86   |
| 3.2.1  | οστεοαρθρίτιδα 87  |
| <b>3.3</b>   | Θεραπεία των βλαβών του Αρθρικού Χόνδρου 92  |
| <b>3.4</b>   | ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ 101   |
| <b>ΚΕΦΑΛΑΙΟ 4. Biofilms και Νανοσωματίδια</b>                        |  |
| <b>4.1</b>   | Η έννοια της βιοαποικοδόμησης 103  |
| <b>4.2</b>   | Biofilm 105  |
| <b>4.3</b>   | Αλληλεπίδραση Νανοσωματιδίων με ζωντανά συστήματα – Βιοσυμβατότητα 107                             |
| <b>4.4</b>   | Η Βιοσυμβατότητα εξαρτάται από τα χαρακτηριστικά των νανοσωματιδίων και από βιολογικούς παράγοντες |
| <b>4.5</b>   | ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ 117   |

| <b>ΜΕΡΟΣ Β΄ ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ</b>   |            |
|---|------------|
| <b>ΚΕΦΑΛΑΙΟ 5. Παρασκευή Διαλυμάτων και Νανοσωματιδίων Αργύρου</b>  | <b>120</b> |
| <b>5.1</b> Παρασκευή διαλυμάτων   | 120        |
| <b>5.2</b> Παρασκευή Νανοσωματιδίων Αργύρου (AgNPs)   | 122        |
| <b>ΚΕΦΑΛΑΙΟ 6. Μέθοδος Ηλεκτροστατικού Ψεκασμού Ινών (Electrospray Deposition Method)</b>                                       | <b>126</b> |
| <b>ΚΕΦΑΛΑΙΟ 7. Μελέτη των Φυσικών και Μορφολογικών Ιδιοτήτων των Ικτριωμάτων</b>  | <b>134</b> |
| <b>7.1</b> Ηλεκτρονική Μικροσκοπία Σάρωσης (Scanning Electron Microscopy, SEM)  | 134        |
| <b>7.1.1</b> Πρωτόκολλο μονιμοποίησης κυττάρων στην επιφάνεια δειγμάτων   | 143        |
| <b>7.2</b> Σαρωτική Μικροσκοπία Ατομικών Δυνάμεων (AFM)   | 144        |
| <b>7.3</b> Γωνία Επαφής (Contact Angle, CA)   | 154        |
| <b>ΚΕΦΑΛΑΙΟ 8. Κυτταροσυμβατότητα Ικτριωμάτων</b>   | <b>169</b> |
| <b>8.1</b> Πρωτόκολλο Υποκαλλιέργειας (sub-culturing) L929 Κυττάρων και Ανθρώπινων Χονδροκυττάρων                               | 173        |
| <b>8.2</b> Πρωτόκολλο της Βιοχημικής Μεθόδου για την εκτίμηση της Κυτταροτοξικότητας –MTT και αποτελέσματα πειραματικής μεθόδου | 176        |
| <b>8.3</b> Σταθεροποίηση των ικτριωμάτων με κύτταρα, για μελέτη τους με SEM   | 181        |
| <b>ΚΕΦΑΛΑΙΟ 9. Degradation Study</b>  | <b>189</b> |
| <b>ΚΕΦΑΛΑΙΟ 10. Μελέτη των μηχανικών ιδιοτήτων των ικτριωμάτων της Πολυκαπρολακτόνης με τη μέθοδο του Nanoindentation</b>       | <b>194</b> |
| <b>10.1</b> 9.1.1 Νανοεγχάραξη: Ημιστατική και Δυναμική μέτρηση   | 195        |
| <b>10.2</b> 9.1.2 Νανοεγχάραξη και χρονοεξαρτόμενες παραμορφώσεις   | 201        |
| <b>10.3</b> 9.1.3 Πειραματικά αποτελέσματα  | 204        |
| <b>ΚΕΦΑΛΑΙΟ 11. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟΥ ΜΕΡΟΥΣ</b>  | <b>210</b> |
| <b>ΚΕΦΑΛΑΙΟ 12. Συμπεράσματα – Προτάσεις επέκτασης της συγκεκριμένης μελέτης</b>  | <b>211</b> |

**Α' ΜΕΡΟΣ**  
**ΘΕΩΡΗΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ**



## ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1. Εισαγωγή στο κύτταρο και τη μεμβρανική μεταφορά

### 1.1 Το Κύτταρο

Το **κύτταρο** αποτελεί τη θεμελιώδη μονάδα ζωής και μπορεί να οριστεί ως μια συστηματικά οργανωμένη ομάδα μορίων που βρίσκονται σε δυναμική αλληλεπίδραση. Τα κύτταρα περιέχουν μοριακά και βιοχημικά συστήματα υψηλού βαθμού οργάνωσης τα οποία έχουν την ικανότητα να αποθηκεύουν πληροφορίες, να μεταφράζουν τις πληροφορίες αυτές και να συνθέτουν κυτταρικά μεγαλομόρια. Για την επιτέλεση των λειτουργιών αυτών τα κύτταρα χρησιμοποιούν διάφορες ενεργειακές πηγές. Επίσης, τα κύτταρα μπορούν να μετακινηθούν και έχουν την ικανότητα να μεταβάλουν τις εσωτερικές βιοχημικές αντιδράσεις τους για να προσαρμοστούν σε περιβαλλοντικές αλλαγές. Τα κύτταρα αναδιπλασιάζονται και μεταβιβάζουν στα νέα κύτταρα τις γενετικές πληροφορίες, τα μοριακά και βιοχημικά συστήματά τους.<sup>4</sup>

Η σύγχρονη κυτταρική θεωρία αναφέρει ότι :

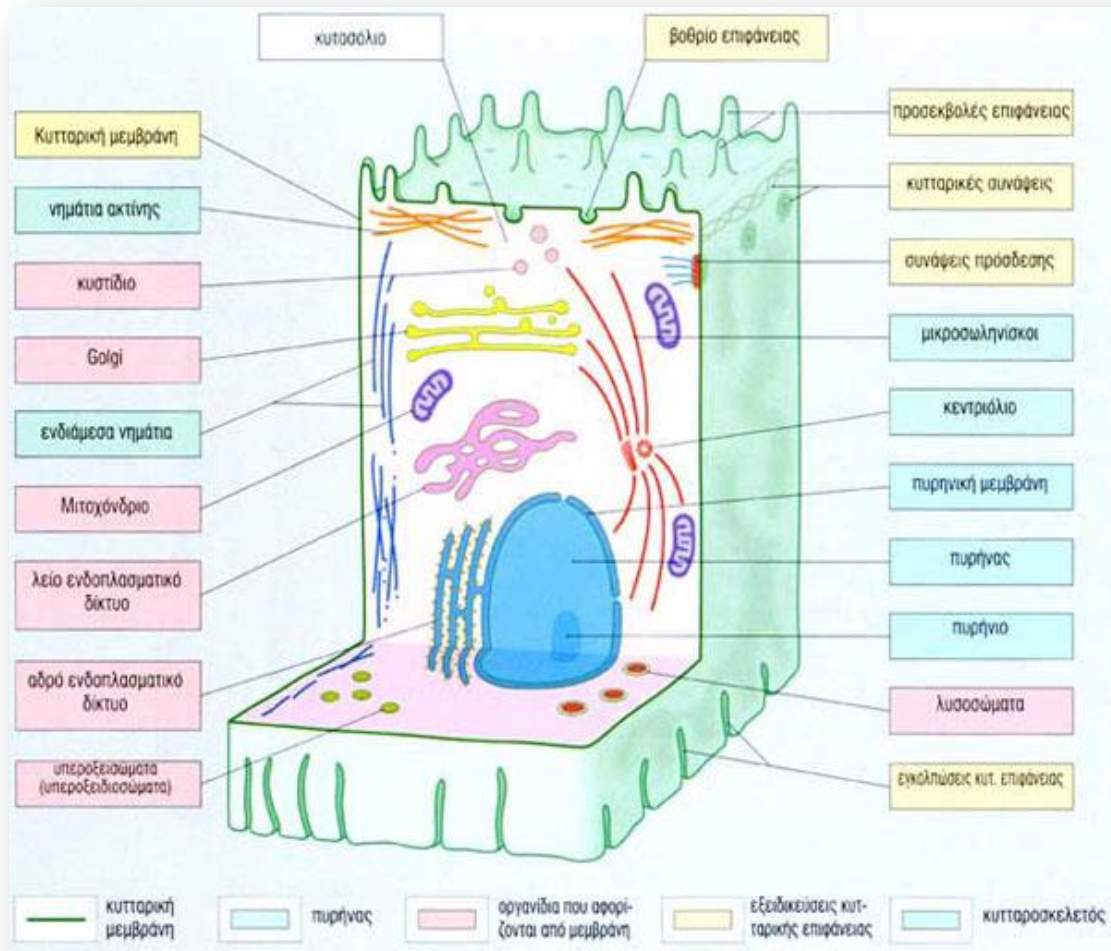
1. Όλοι οι ζωντανοί οργανισμοί αποτελούνται από κύτταρα και κυτταρικά παράγωγα.
2. Τα κύτταρα αποτελούν τις δομικές μονάδες της ζωής, δομούνται από τις ίδιες χημικές ενώσεις και εκδηλώνουν παρόμοιες μεταβολικές διεργασίες.
3. Η λειτουργία των οργανισμών είναι το αποτέλεσμα της συλλογικής δράσης και αλληλεπίδρασης των κυττάρων που τους αποτελούν.
4. Τα κύτταρα προκύπτουν από προϋπάρχοντα κύτταρα με διαίρεση.<sup>4</sup>

Οι διαστάσεις των κυττάρων ποικίλουν από τα βακτήρια, τα οποία έχουν μια μέση διάμετρο 0,5μm και είναι πολύ δύσκολο να παρατηρηθούν στο οπτικό μικροσκόπιο, μέχρι τα κύτταρα από τα αυγό μιας κότας, που έχουν διάμετρο μεταξύ 10 και 30 μm, ενώ στα φυτά η διάμετρος των κυττάρων κυμαίνεται από 10μm μέχρι μερικές εκατοντάδες μm. Ένα τυπικό ανθρώπινο π.χ. ηπατοκύτταρο έχει διάμετρο περίπου 20 μm, ενώ ένα κύτταρο από φύλλο καπνού έχει διάμετρο 30 – 40 μm.<sup>4</sup>

Τα κύτταρα έχουν κάποια κοινά χαρακτηριστικά :

- Την κυτταρική μεμβράνη (διαχωρίζει και προστατεύει τα χημικά συστατικά του κυττάρου από το εξωτερικό περιβάλλον & από τα άλλα κύτταρα)
- Τα διάλυμα πρωτεϊνών, ηλεκτρολυτών (κυτοσόλιο) & υδατανθράκων

- Το σχήμα και τη ρευστότητα, που καθορίζονται από τη διάταξη των ενδογενών νηματοειδών πρωτεϊνών που σχηματίζουν τον κυτταροσκελετό.<sup>2</sup>



Σχήμα 1.1. Δομή κυττάρου<sup>11</sup>

Το κυττασώλιο με τη βοήθεια του συστήματος εσωτερικών μεμβρανών διαίρεται σε εξειδικευμένες λειτουργικές περιοχές : τα οργανίδια, που είναι:

- **Πυρήνας** : περιέχει το DNA
- **Μιτοχόνδρια** : παράγουν ενέργεια
- **ΕΔ (ενδοπλασματικό δίκτυο)**: σύνθεση πρωτεϊνών & λιπιδίων
- **Σύστημα Golgi** : επεξεργασία προϊόντων (ενσωμάτωση ή απέκκριση)
- **Κυστίδια** : παροδικοί σχηματισμοί > συσσώρευσης & μεταφοράς υλικού
- **Λυσοσώματα** : πέψη μακρομορίων (περιέχουν υδρολυτικά ένζυμα)
- **Υπεροξειδώματα** : μεταβολισμό λιπαρών οξέων (αντίστοιχα ένζυμα)

## 1.2 Η Μεμβράνη

Η **Μεμβράνη** είναι ένα από τα σημαντικότερα δομικά στοιχεία του κυττάρου. Μια από τις βασικές λειτουργίες της κυτταρικής μεμβράνης είναι η ιδιότητά της να ρυθμίζει τη διέλευση μορίων και ιόντων από και προς το εσωτερικό του κυττάρου.<sup>1,9</sup> Τόσο η εξωτερική μεμβράνη του κυττάρου όσο & οι μεμβράνες των ενδοκυττάρων οργανιδίων έχουν κοινή βασική δομή, τη διπλοστιβάδα λιπιδίων, που περιέχει εξειδικευμένες πρωτεΐνες & επιφανειακούς υδατάνθρακες.<sup>2</sup> Το συνολικό πάχος της κυτταρικής μεμβράνης είναι περίπου 7,5 nm (δηλαδή περίπου 50 – 70 άτομα<sup>5</sup>). Ενώ το πάχος της διπλοστιβάδας των λιπιδίων είναι περίπου 3,5 nm.<sup>1</sup> Αν και η λειτουργία της είναι να εμποδίζει το περιεχόμενο του κυττάρου να διαφύγει και να αναμειχθεί με το περιβάλλον μέσο, η κυτταρική μεμβράνη επιτελεί πιο σημαντικές λειτουργίες. Θρεπτικά υλικά απαραίτητα για την σωστή λειτουργία του κυττάρου πρέπει να περάσουν στο εσωτερικό του, ενώ απόβλητα από μεταβολικές διεργασίες πρέπει να εξέλθουν. Έτσι, εξειδικευμένες δίοδοι και αντλίες που σχηματίζονται από πρωτεϊνικά μόρια διαπερνούν την κυτταρική μεμβράνη και επιτρέπουν σε συγκεκριμένα μόρια να εισέλθουν, ενώ άλλα να εξέλθουν. Ακόμη, οι μεμβρανικές πρωτεΐνες μπορούν να λειτουργήσουν και ως αισθητήρες σημάτων, έτσι ώστε το κύτταρο να ανταποκρίνεται σε αλλαγές του περιβάλλοντος. Επίσης, οι κυτταρικές μεμβράνες παρουσιάζουν σημαντικές μηχανικές ιδιότητες, χρήσιμες για την επιβίωσή των κυττάρων. Όταν ένα κύτταρο αυξάνει ή αλλάζει σχήμα, το ίδιο κάνει και η μεμβράνη, δηλαδή αυξάνει την επιφάνειά της, χωρίς να χάνει την συνοχή της και αλλάζει μορφή χωρίς να καταστρέφεται<sup>5</sup>.

### Λειτουργικές ιδιότητες μεμβράνης:

- Η μεμβράνη είναι ρευστό μέσο που επιτρέπει την πλευρική διάχυση μεμβρανικών πρωτεϊνών & διευκολύνει την κινητικότητα του κυττάρου.
- Η πολική σύνθεση των μορίων των λιπιδίων, οδηγεί σε ελεγχόμενη διαπερατότητα για τις διάφορες χημικές ουσίες.
- Ρήγματα & μικροελλείματα μεμβράνης, αυτόματα αποκαθίστανται, λόγω της πολικής φύσης των λιπιδίων.

Οι μεμβρανικές πρωτεΐνες, επιτελούν σημαντικό ρόλο, όπως η μεταφορά, η ενζυμική δραστηριότητα, η προσκόλληση των κυττάρων & η επικοινωνία των κυττάρων.

### 1.2.1 Τα λιπίδια

Τα λιπίδια είναι μια ομάδα βιολογικών μορίων που παίζουν σημαντικό βιολογικό ρόλο. Αρκετές βιταμίνες, ορμόνες καθώς και τα λίπη και έλαια ανήκουν στην κατηγορία αυτή.<sup>1</sup> Έχουν υδρόφιλο & υδρόφοβο άκρο & μπορούν να σχηματίσουν αυτόματα διπλοστιβάδα, με τα υδρόφοβα μέρη τους στραμμένα (όταν εισαχθούν στο νερό) το ένα προς το άλλο & τα υδρόφιλα προς την υδατική φάση.<sup>2</sup>

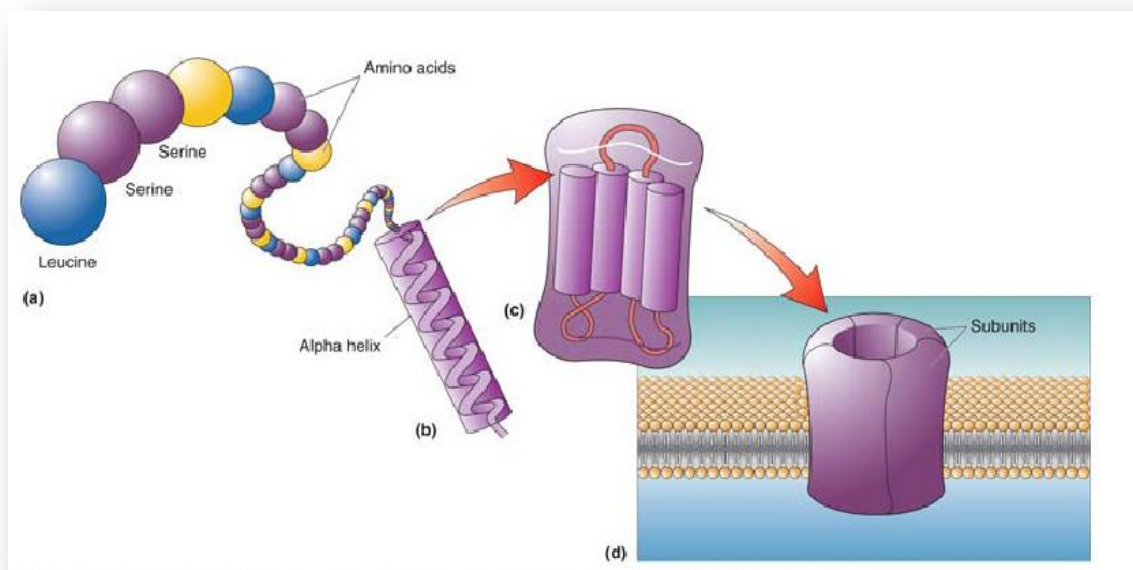
**Τα Λιπίδια** αποτελούν το 50% της μάζας των κυτταρικών μεμβρανών και είναι : τα φωσφολιπίδια, η χοληστερόλη και τα γλυκολιπίδια.<sup>3</sup> Το λιπιδικό τμήμα αποτελείται από αρκετά εκατομμύρια μόρια λιπιδίων, διατεταγμένα σε δύο φύλλα που σχηματίζουν τη λιπιδική διπλοστιβάδα. Τα λιπίδια των κυτταρικών μεμβρανών συνδυάζουν δύο πολύ διαφορετικές ιδιότητες στο ίδιο μόριο, καθώς έχουν μια υδρόφιλη κεφαλή (πολική) και μια ή δύο υδρόφοβες υδρογονανθρακικές ουρές (μη πολικές). Τα υδρόφιλα μόρια διαλύονται εύκολα στο νερό επειδή περιέχουν φορτισμένα άτομα ή πολικές ομάδες, οι οποίες δημιουργούν ηλεκτροστατικούς δεσμούς ή δεσμούς υδρογόνου με τα μόρια του νερού τα οποία είναι πολικά. Αντίθετα τα υδρόφοβα μόρια είναι αδιάλυτα στο νερό επειδή όλα ή σχεδόν όλα τα άτομά τους δεν έχουν φορτίο, είναι μη πολικά και επομένως δεν δημιουργούν δεσμούς με τα μόρια του νερού, αλλά αναγκάζουν τα γειτονικά μόρια του νερού να οργανωθούν ώστε να σχηματιστεί ένας κλωβός γύρω από το υδρόφοβο μόριο.<sup>5</sup>

- **Τα φωσφολιπίδια** αποτελούν το 50% μεμβρανικού λιπιδικού στοιχείου και είναι τα εξής: η φωσφατιδυλοχολίνη, η σφιγγομυελίνη, η φωσφατιδυλοσερίνη & η φωσφατιδυλεθανολαμίνη και περιβάλλουν τις μεμβρανικές πρωτεΐνες.
- **Η χοληστερόλη** περιορίζει την κίνηση των φωσφολιπιδίων, μειώνοντας έτσι τη ρευστότητα και αυξάνοντας τη σταθερότητα.<sup>2,3</sup>
- **Τα γλυκολιπίδια** βρίσκονται στην εξωτερική επιφάνεια και συμμετέχουν στην επικοινωνία των κυττάρων.

### 1.2.2 Οι Πρωτεΐνες των μεμβρανών

Οι πρωτεΐνες των μεμβρανών, οι οποίες συνθέτονται από τα ριβοσωμάτια, επιτελούν τις περισσότερες εξειδικευμένες λειτουργίες των κυτταρικών μεμβρανών και ποικίλλουν ανάλογα με το είδος του κυττάρου:

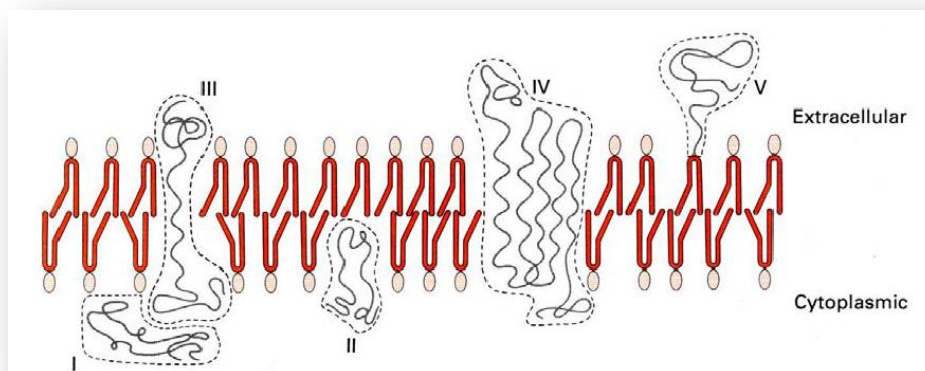
- Φέρουν σε επαφή νημάτια του κυτταροσκελετού με την κυτταρική μεμβράνη,
- Φέρουν σε επαφή κύτταρα με την εξωκυττάρια ουσία,
- Μεταφέρουν μόρια μέσα & έξω από τα κύτταρα, λειτουργούν ως μόρια κυτταρικής πρόσφυσης και σηματοδότησης,
- Λειτουργούν σαν υποδοχείς (Receptors) για τη λήψη σημάτων από άλλα κύτταρα, αναγνωρίζοντας συγκεκριμένα μόρια,
- Έχουν ενζυμική δραστηριότητα, καταλύοντας χημικές αντιδράσεις,
- Αποτελούν πολύ επιλεκτικούς διαύλους (Highly selective channels)
- Ενώνονται με εκκριτικά κυστίδια, είναι δηλαδή αποδέκτες δεικτών πρόσβασης (Docking marker acceptors).<sup>2,3</sup>



**Σχήμα 1.2.** Δομή πρωτεΐνης : (a) Πρωτοταγής (αλυσίδα με πεπτιδικούς δεσμούς μεταξύ των 20 αμινοξέων, προς σχηματισμό πολυπεπτιδίου), (b) Δευτεροταγής (αναδίπλωση αλυσίδας, έλικες), (c) Τριτοταγής (τριδιάστατες αναδιπλώσεις, τελική μορφή), (d) Τεταρτοταγής (συνδιασμός 2 ή περισσότερων αλυσίδων στο χώρο)<sup>3</sup>

Όλες οι μεμβρανικές πρωτεΐνες έχουν μία συγκεκριμένη επάνω-κάτω ή πλευρική προς την μεμβράνη διευθέτηση στην διλιπιδική στοιβάδα. Οι μεμβρανικές πρωτεΐνες ανάλογα με την θέση τους στη μεμβράνη χωρίζονται σε κατηγορίες.

- I. Περιφερειακές.
- II. Μερικά εισερχόμενες στην μεμβράνη.
- III. Διαμπερείς της μεμβράνης με ένα μεμβρανικό τμήμα.
- IV. Διαμπερείς της μεμβράνης με πολλά μεμβρανικά τμήματα.
- V. Περιφερειακές με σύνδεση με λιπίδια.<sup>7</sup>

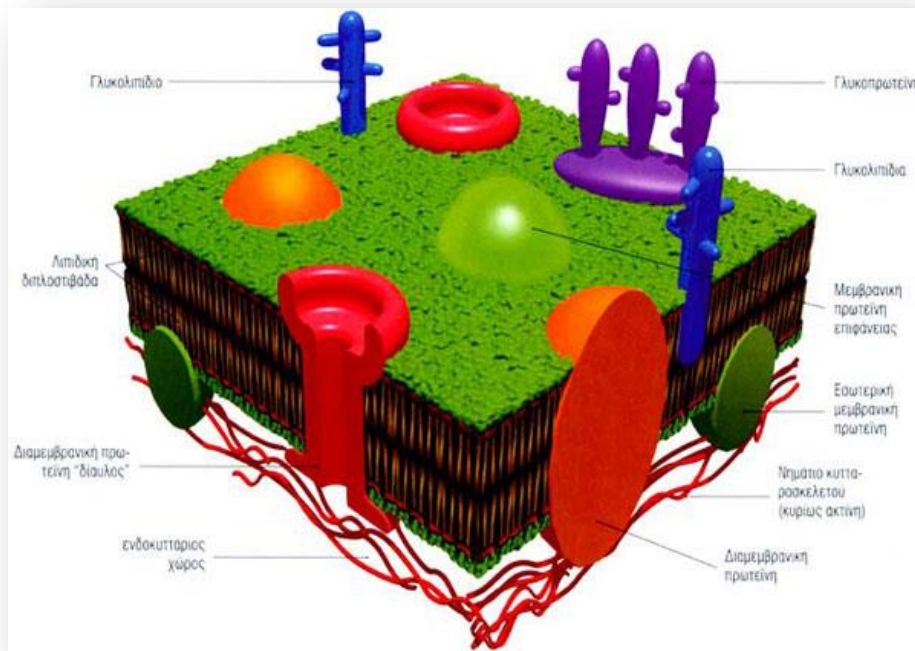


Σχήμα 1.3. Διευθέτηση πρωτεϊνών στην διλιπιδική στοιβάδα

Οι γλυκοπρωτεΐνες και τα γλυκολιπίδια, παρέχουν την δυνατότητα να αναγνωρίζονται τα κύτταρα ως ίδια, να αλληλεπιδρούν μεταξύ τους, καθώς επίσης, οριοθετούν την ανάπτυξη των ιστών.<sup>3</sup>

**Οι Υδατάνθρακες των μεμβρανών,** εντοπίζονται κυρίως στην ενδοαυλική πλευρά των ενδοκυττάρων μεμβρανικών συστημάτων, καθώς & πάνω στην εξωτερική πλευρά της μεμβράνης του κυττάρου. Μπορούν να γίνουν ορατοί με χρώση με λεκτίνες (φυτικές πρωτεΐνες).





Σχήμα 1.4. Η δομή της κυτταρικής μεμβράνης<sup>11</sup>

### 1.2.3 Διαμεμβρανική μεταφορά :

**Ενδοκυττάρωση ή Εξωκυττάρωση** γίνεται όταν υλικό από τον εξωκυττάριο χώρο & την έξω επιφάνεια της μεμβράνης μπορεί να ενσωματωθεί μέσα στο κύτταρο με εγκόλπωση στην επιφάνεια του κυττάρου. Με τον μηχανισμό της ενδοκυττάρωσης το τμήμα της μεμβράνης εγκολλούμενο, συνενώνεται στα δύο άκρα & δημιουργεί ένα **ενδοκυτταρικό κυστίδιο ή ενδόσωμα**.

**Πινοκυττάρωση** είναι ο όρος που χρησιμοποιείται για τη δέσμευση υγρού μέσα στο ενδόσωμα.

**Φαγοκυττάρωση** συμβαίνει όταν το υλικό της τροφής είναι μεγάλα σωματίδια.

**Εξωκυττάρωση** είναι η συνένωση κυστιδίου με την επιφάνεια της κυτταρικής μεμβράνης, με σκοπό την απέκκριση του περιεχομένου του στον εξωκυττάριο χώρο.

Τα μεμβρανικά τμήματα των κυστιδίων > προέρχονται από εξειδικευμένες περιοχές της εξωτερικής κυτταρικής μεμβράνης, που ονομάζεται **επίχριστο βοθρίο**.<sup>2</sup>

## 1. Επιλεκτική διαμεμβρανική περατότητα (Permeability) :

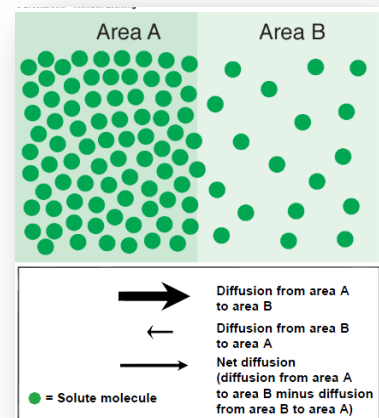
- Υψηλή σε λιποδιαλυτά μόρια (π.χ. κάποιες βιταμίνες)
- Υψηλή σε μικρά μόρια (O<sub>2</sub>, CO<sub>2</sub>, κτλ.)
- Καθόλου σε φορτισμένα, ιοντικά μόρια, πέραν κάποιων ενώσεων και ιόντων που μπορούν να περάσουν από εξειδικευμένους διαύλους και φορείς<sup>3</sup>

## 2. Μη-υποβοηθούμενη (unassisted) μεταφορά :

Περατά μόρια περνούν δια μέσου της μεμβράνης. Γίνεται λόγω της διαφοράς της συγκέντρωσης και της διαφοράς δυναμικού, με :

- **Διάχυση** λόγω διαφοράς πυκνότητας. Στην καθαρή διάχυση, υπάρχει καθαρή κίνηση των μορίων στην κατεύθυνση της χαμηλής συγκέντρωσης. Οι συγκεντρώσεις τείνουν να εξισωθούν προς μια σταθερή κατάσταση. Π.χ. το O<sub>2</sub> μεταφέρεται με διάχυση στους πνεύμονες, καθώς υπάρχει υψηλή συγκέντρωση στον αέρα και χαμηλή στο αίμα. Επίσης μεταφέρεται στους ιστούς, καθώς η συγκέντρωση σε αυτούς είναι χαμηλή και στο αίμα υψηλή.

Σχήμα 1.5. Διάχυση



Νόμος της διάχυσης του Fick: ο ρυθμός της καθαρής διάχυσης,

Q, είναι :

$$Q = \frac{\Delta C \cdot P \cdot A}{MW \cdot \Delta X}$$

όπου

$\Delta C$ : η διαφορά συγκέντρωσης,

P: η περατότητα της μεμβράνης για το υλικό,

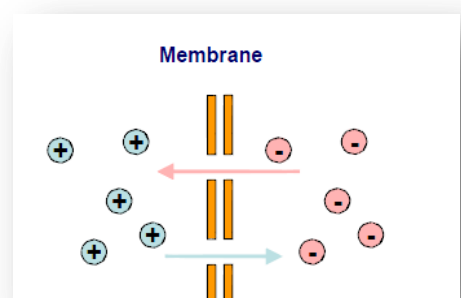
A: το εμβαδό της επιφάνειας της μεμβράνης

MW: το μοριακό βάρος του υλικού

$\Delta X$ : η απόσταση ή το πάχος.

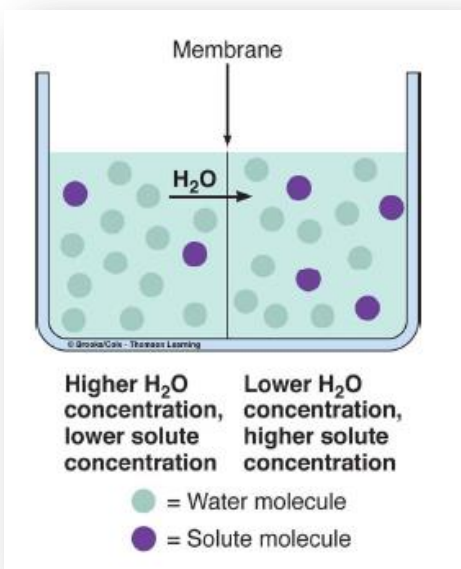
Υπάρχει περίπτωση η διάχυση να συμβεί και λόγω **διαφοράς δυναμικού**, με αποτέλεσμα την διάχυση των ιόντων προς το χαμηλότερο δυναμικό, δηλαδή προς το

Σχήμα 1.6. Διάχυση λόγω διαφοράς δυναμικού



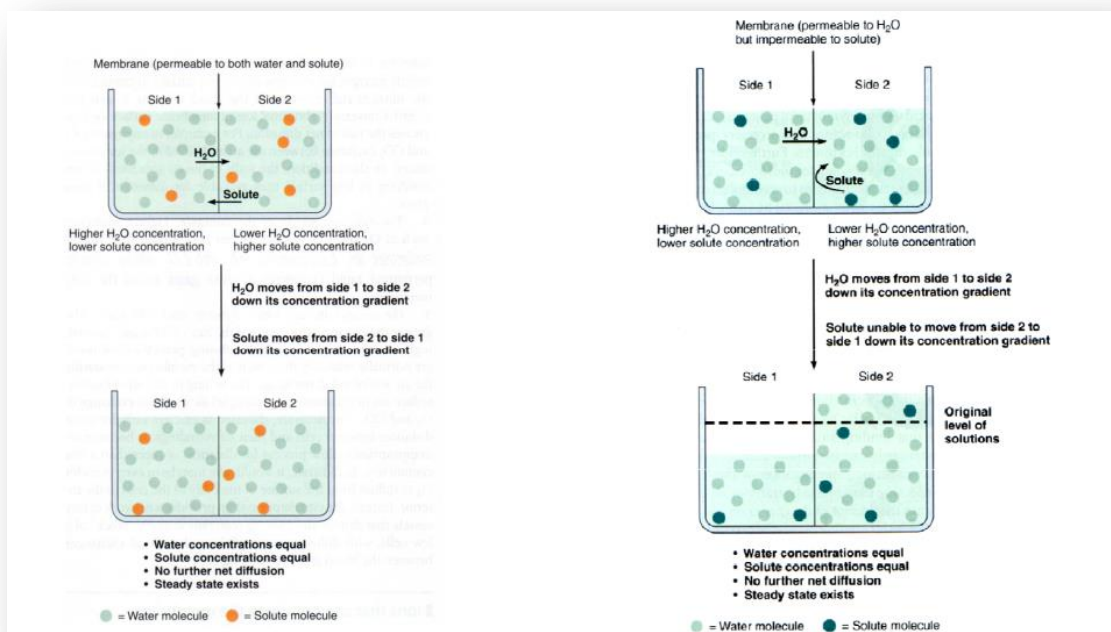


αντίθετο φορτίο. Αν υπάρχει διαφορά δυναμικού διαμέσου της μεμβράνης, τότε γίνεται παθητική διάχυση των περατών ιόντων.

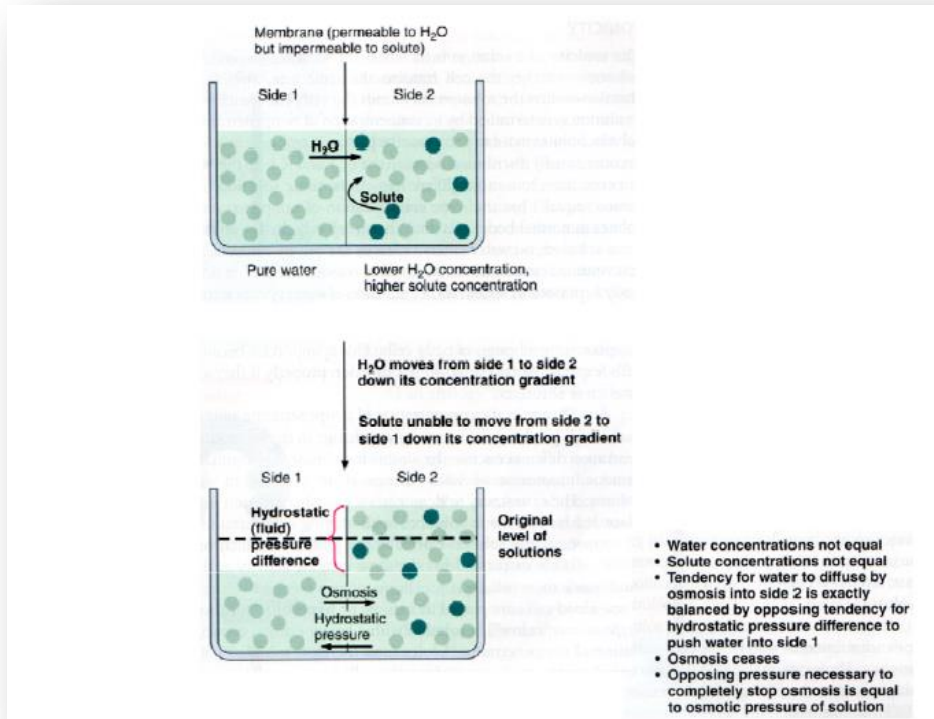


- **Όσμωση**, που είναι η καθαρή διάχυση του νερού (είτε διαμέσου της μεμβράνης, είτε διαμέσου των πόρων). Το νερό διαχέεται προς τις περιοχές με τη χαμηλότερη συγκέντρωση της διαλυτής ουσίας, η λεγόμενη οσμωτική πίεση, και τείνει να εξισώσει τις συγκεντρώσεις. Συμβαίνει όταν μια μεμβράνη διαχωρίζει άνισες συγκεντρώσεις μιας περατής ουσίας, ή άνισες συγκεντρώσεις μιας μη-περατής ουσίας, ή καθαρό νερό από μια μη-περατή ουσία.<sup>3,6</sup>

Σχήμα 1.7. Όσμωση



Σχήμα 1.8. Όσμωση σε : Αριστερά) Άνισες συγκεντρώσεις μιας περατής ουσίας, Δεξιά) Άνισες συγκεντρώσεις μιας μη-περατής ουσίας

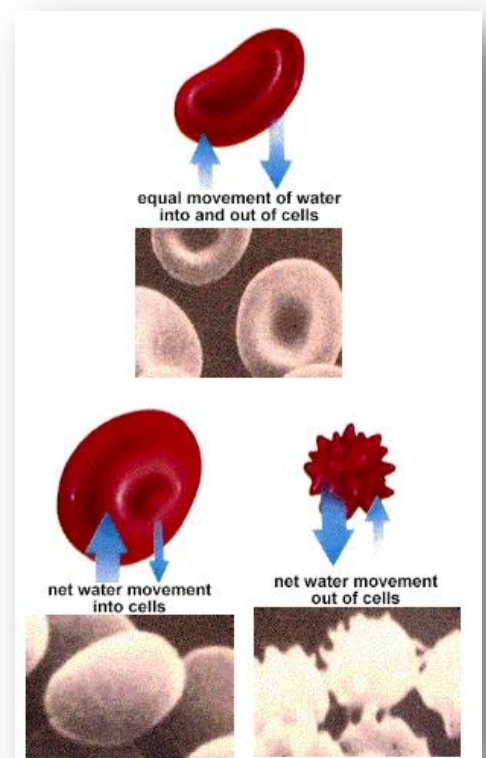


Σχήμα 1.9. Όσμωση σε καθαρό νερό από μια μη-περατή ουσία

• **Τονικότητα ενός διαλύματος :**

- **Ισοτονικό :** Η συγκέντρωση των μη-περατών μορίων είναι ίδια με αυτή του κυττάρου, δεν υπάρχει διάχυση νερού λόγω όσμωσης και ο όγκος του κυττάρου παραμένει ίδιος.
- **Υποτονικό :** Η συγκέντρωση των μη-περατών μορίων είναι χαμηλότερη, γίνεται διάχυση νερού μέσα στο κύτταρο και ο όγκος του κυττάρου αυξάνει.
- **Υπερτονικό:** Η συγκέντρωση των μη-περατών μορίων είναι υψηλότερη, η διάχυση του νερού γίνεται έξω από το κύτταρο και ο όγκος του κυττάρου μειώνεται.

Σχήμα 1.10. Ισοτονικό, Υποτονικό & Υπερτονικό διάλυμα



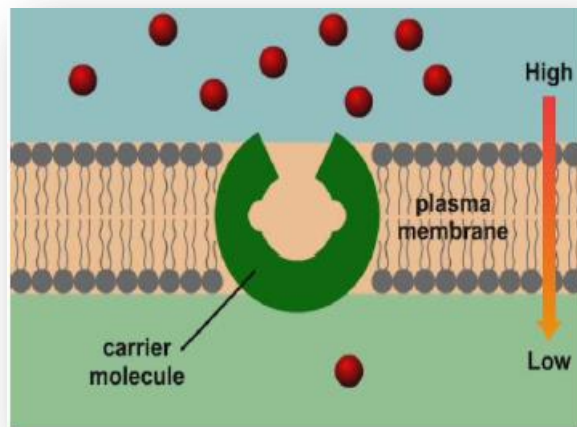
### 3. Υποβοηθούμενη (assisted) μεταφορά :

Περατά μόρια (συνήθως μεγάλα, όπως η γλυκόζη, τα αμινοξέα, απόβλητα, υποπροϊόντα, κτλ) περνούν τη μεμβράνη με τη βοήθεια άλλων πρωτεϊνών. Υπάρχουν δυο τύποι υποβοηθούμενης μεταφοράς :

- **Η μεταφορά με φορέα**, που μπορεί να είναι παθητική ή ενεργητική, και αφορά μικρά μόρια. Οι φορείς είναι πρωτεΐνες που διαπερνούν τη μεμβράνη και βοηθούν τα μόρια να περάσουν στην απέναντι πλευρά. Υπάρχουν τέσσερις κατηγορίες μεταφοράς με φορέα:

- **Η υποβοηθούμενη**

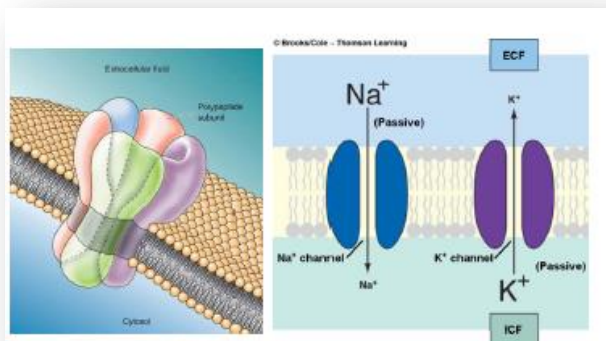
**διάχυση**, στην οποία δεν χρειάζεται ενέργεια και η διάχυση γίνεται προς τη χαμηλή συγκέντρωση. Γίνεται μεταφορά μορίων που δεν μπορούν να περάσουν μέσα από την μεμβράνη και τα μόρια δεσμεύονται και από τις δύο πλευρές της μεμβράνης. Αυτή η δέσμευση προκαλεί αλλαγή της διαμόρφωσης της μεμβράνης και εκφόρτωση των μορίων στην άλλη πλευρά.



Σχήμα 1.11. υποβοηθούμενη διάχυση

- **Η διάχυση μέσα από**

**διαύλους**, στην οποία οι πρωτεΐνες στην μεμβράνη δημιουργούν διαύλους, οπότε πόροι γεμάτοι με νερό διατρέχουν την μεμβράνη. Γίνεται διάχυση συγκεκριμένων

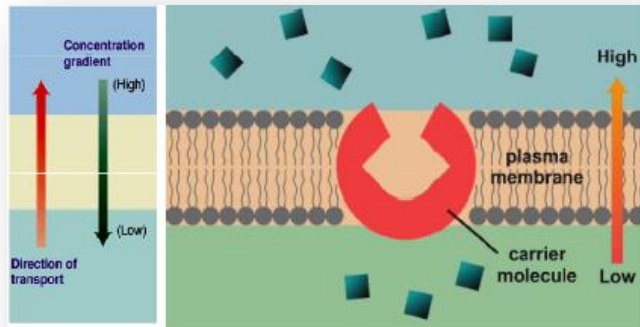


Σχήμα 1.12. Διάχυση μέσα από διαύλους

μορίων, με βάση την ηλεκτροχημική διαφορά (παθητική). Οι διαύλοι μπορεί να είναι ελεγχόμενοι (Τασεοελεγχόμενοι – Electrically gated / Χημειοελεγχόμενοι - Chemically gated), δηλαδή να ανοίγουν και να κλείνουν από εξωτερικά ερεθίσματα .

○ **Η ενεργητική μεταφορά,**

στην οποία γίνεται μεταφορά μορίων ενάντια στη διαφορά συγκέντρωσης.



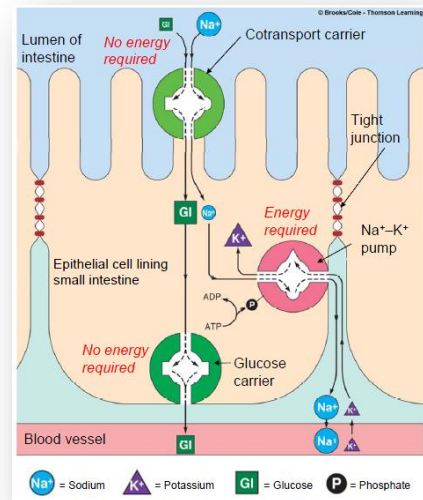
**Σχήμα 1.13. Ενεργητική μεταφορά**

Χρειάζεται ενέργεια. Από

την μεριά της χαμηλής συγκέντρωσης γίνεται φωσφορυλίωση ( $ATP \rightarrow ADP$ ), υπάρχουν οι περιοχές πρόσδεσης υψηλής συνάφειας, γίνεται η προσδεση των μορίων, γίνεται η αποφωσφορυλίωση, η αλλαγή της διαμόρφωσης της μεμβράνης και τέλος το άνοιγμα προς την αντίθετη πλευρά. Από την πλευρά της υψηλής συγκέντρωσης, υπάρχει χαμηλή συνάφεια, τα μόρια αποκολλούνται και εκφορτώνονται.

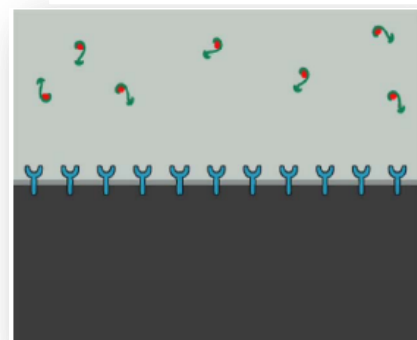
○ **Η δευτερογενής ενεργητική μεταφορά,** στην

οποία χρειάζεται ενέργεια για όλη τη μεταφορά. Στο γαστρεντερικό και ουροποιητικό σύστημα η μεταφορά της γλυκόζης γίνεται ενάντια στη διαφορά της συγκέντρωσης. Γίνεται παράλληλη μεταφορά γλυκόζης και  $Na^+$ . Ο φορέας χρησιμοποιεί τη διαφορά συγκέντρωσης του  $Na^+$  για να 'σπρώξει' τη γλυκόζη. Η αντλία  $Na^+ - K^+$  διατηρεί τη συγκέντρωση του  $Na^+$ , (με ATP και ενέργεια).



**Σχήμα 1.14. Δευτερογενής ενεργητική μεταφορά**

- **Η μεταφορά με κυστίδιο,** που είναι πάντοτε ενεργητική και αφορά πολύ μεγάλα μόρια (π.χ. ορμόνες) και σωματίδια (π.χ. βακτήρια). Γίνεται ενδοκυττάρωση (μόρια ενώνονται με τον



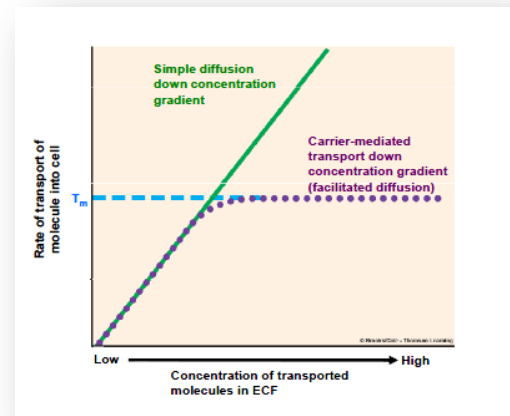
**Σχήμα 1.15. Μεταφορά με κυστίδιο**

κατάλληλο υποδοχέα, οι πρωτεΐνες του καλλύματος προσκολλούνται από την εσωτερική πλευρά, η μεμβράνη λυγίζει και δημιουργεί κυστίδιο και γίνεται η μεταφορά μέσα στο κύτταρο). Στην εξωκυττάρωση, (το αντίθετο της ενδοκυττάρωσης), το κυστίδιο ενώνεται με την μεμβράνη και αδειάζει το περιεχόμενο έξω από το κύτταρο. Είναι μια αργή διαδικασία.

3

Κάποια σημαντικά χαρακτηριστικά της υποβοηθούμενης μεταφοράς είναι :

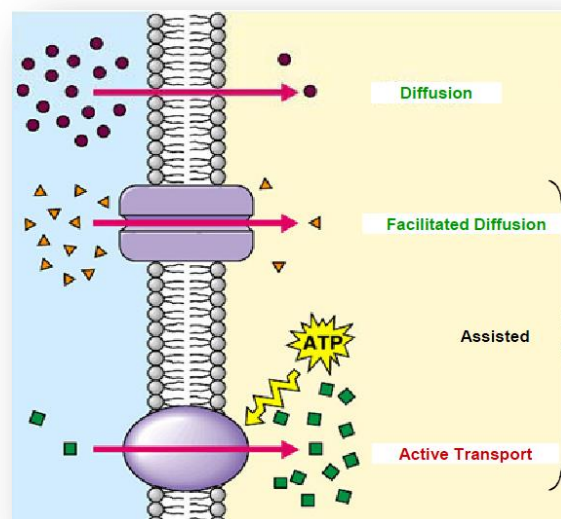
- Η ειδικότητα σε ένα ή μερικά μόνο μόρια. Επίσης δεν υπάρχει αλληλοεπικάλυψη μεταξύ τους.
- Ο κορεσμός. Υπάρχει μια μέγιστη ποσότητα που μπορεί να μεταφερθεί ανα χρόνο, το μέγιστο μεταφοράς (Transport Maximun,  $T_m$ ). Ο αριθμός των φορέων μπορεί μακροπρόθεσμα να αυξηθεί.
- Ο συναγωνισμός. Αν ο φορέας μπορεί να μεταφέρει περισσότερα από ένα μόρια, γίνεται συναγωνισμός μεταξύ των ειδών.



Σχήμα 1.16. Χαρακτηριστικά της υποβοηθούμενης μεταφοράς

#### Ενεργειακή δαπάνη (Energy expenditure):

- **Παθητική** (Passive) διαμεμβρανική μεταφορά : Από δυνάμεις οι οποίες δεν χρειάζονται ενέργεια. Μπορεί να είναι υποβοηθούμενη ή μη.
- **Ενεργητική** (Active) διαμεμβρανική μεταφορά : Χρειάζεται ενέργεια από το κύτταρο και είναι πάντα υποβοηθούμενη.



Σχήμα 1.17. Παθητική & Ενεργητική μεταφορά



**Πίνακας 1.1.** Μεταφορά ουσιών μέσω μεμβράνης<sup>8</sup>

|                                      | Μηχανισμός                             | Κατεύθυνση Κίνησης                       | Προϋπόθεση  | Παραδείγματα ουσιών                 |
|--------------------------------------|--|--|---|-------------------------------------|
| Π<br>Α<br>Θ<br>Η<br>Τ<br>Ι<br>Κ<br>Η | Απλή διάχυση                           | Προς μικρότερες συγκεντρώσεις της ουσίας | Διαβάθμιση στη συγκέντρωση της ουσίας                         | Νερό, λιποδιαλυτές ουσίες και αέρια |
|                                      | Απλή διάχυση μέσω Πρωτεϊνικών καναλιών | Προς μικρότερες συγκεντρώσεις της ουσίας | Διαβάθμιση στη συγκέντρωση της ουσίας, πρωτεϊνικό κανάλι      | Ιόντα, π.χ. $Ca^{++}$ , $Cl^-$      |
|                                      | Υποβοηθούμενη διάχυση                  | Προς μικρότερες συγκεντρώσεις της ουσίας | Διαβάθμιση στη συγκέντρωση της ουσίας. Πρωτεϊνικός μεταφορέας | Σάκχαρα, αμινοξέα και μερικά ιόντα  |
|                                      | Ώσμωση                                 | Προς μικρότερες συγκεντρώσεις του νερού  | Διαβάθμιση στην συγκέντρωση της διαλυμένης ουσίας             | Νερό                                |
|                                      |  |  |   |                                     |

|  |                               |   |                               |                             |
|--|-------------------------------|---|-------------------------------|-----------------------------|
| Ε<br>Ν<br>Ε<br>Ρ<br>Γ<br>Η<br>Τ<br>Ι<br>Κ<br>Α | Ενεργητική μεταφορά           | Προς τη μεγαλύτερη συγκέντρωση της ουσίας | Πρωτεϊνικές αντλίες, Ενέργεια | Σάκχαρα, αμινοξέα, ιόντα    |
|  | Φαγοκυττάρωση (Ενδοκυττάρωση) | Προς το εσωτερικό του κυττάρου            | Ψευδοπόδια, Ενέργεια          | Μικροοργανισμοί, μακρομόρια |
|  | Πινοκυττάρωση (Ενδοκυττάρωση) | Προς το εσωτερικό του κυττάρου            | Εγκόλπωση, ενέργεια           | Μακρομόρια                  |
|  | Εξωκυττάρωση                  | Προς το εξωτερικό του κυττάρου            | Κυστίδια, ενέργεια            | Μακρομόρια                  |

#### 1.2.4 Δυναμικο Κυτταρικής Μembrάνης

Τα **λιπίδια** έχουν λίγες φορτισμένες ομάδες και δεν μπορούν να μεταφέρουν ηλεκτρικό ρεύμα, επομένως συμπεριφέρονται σαν **μονωτές**, σε αντίθεση με το ενδοκυττάριο και εξωκυττάριο υγρό που περιέχουν πολλά ιόντα αλλά και πρωτεΐνες που έχουν μεγάλη πυκνότητα ηλεκτρονίων και επομένως μπορούν να άγουν το ηλεκτρικό ρεύμα. Επομένως το λιπιδικό στρώμα της κυτταρικής μεμβράνης είναι μια διάταξη υψηλής αντίστασης που χωρίζει δυο διαμερίσματα το ενδοκυττάριο και το εξωκυττάριο υγρό.

Σε όλα τα κύτταρα με συνθήκες ηρεμίας ανάμεσα στο εσωτερικό και στο εξωτερικό τοίχωμα της κυτταρικής μεμβράνης αναπτύσσεται διαφορά δυναμικού περίπου  $-70$  mV. Επειδή η ακτίνα του κυττάρου ( $\sim 1\mu\text{m}$ ) είναι πολύ μεγάλη σε σχέση με το πάχος της κυτταρικής μεμβράνης (7-15 nm) μπορούμε να θεωρήσουμε ότι ένα τμήμα κυτταρικής μεμβράνης είναι επίπεδο και ότι λειτουργεί σαν επίπεδος πυκνωτής.<sup>1</sup>

Από τον ηλεκτρισμό γνωρίζουμε για τον επίπεδο πυκνωτή ότι ισχύουν οι σχέσεις:

$$\alpha) \quad C = q / V \quad [1.1]$$

όπου C η χωρητικότητα του πυκνωτή q είναι το φορτίο του κάθε οπλισμού του πυκνωτή και V είναι η διαφορά δυναμικού μεταξύ των οπλισμών του

$$\beta) \quad C = \epsilon s / \ell \quad [1.2]$$

όπου S η επιφάνεια του οπλισμού,  $\ell$  η απόστασή μεταξύ των οπλισμών και  $\epsilon$  η διηλεκτρική σταθερά του μέσου.

$$\gamma) \quad E = V / \ell \quad [1.3]$$

όπου E η ένταση του ηλεκτρικού πεδίου μεταξύ των οπλισμών του πυκνωτού, κάθετη προς την επιφάνεια της μεμβράνης με κατεύθυνση προς το εσωτερικό του κυττάρου. Αν στη σχέση αυτή θέσουμε τις τιμές όπως μετρήθηκαν στον άνθρωπο

$$V = 70 \times 10^{-3} \text{ V} \quad \eta \quad \ell = 6 \times 10^{-9} \text{ m} \quad \text{τότε}$$

$$E = 70 \times 10^{-3} \text{ V} / 6 \times 10^{-9} \text{ m} = 11.7 \text{ MVm}^{-1} = 117 \text{ kV} / \text{m}$$

Επομένως οι κυτταρικές μεμβράνες διατηρούν ένα πολύ ισχυρό ηλεκτρικό πεδίο σε σχέση με το μικρό διατοιχωματικό δυναμικό της μεμβράνης.

### 1.2.5 Δυναμικό ηρεμίας της κυτταρικής μεμβράνης

Σε όλα τα κύτταρα σε συνθήκες ηρεμίας αναπτύσσεται μία διαφορά δυναμικού στις δύο επιφάνειες της κυτταρικής μεμβράνης. Οι διακυμάνσεις του δυναμικού χρησιμοποιούνται ως σήματα πληροφορίας, π.χ. μεταξύ νευρώνων ή μυών.<sup>3</sup>

Αν θεωρήσουμε το δυναμικό στο εξωκυττάριο χώρο ίσο με το μηδέν, τότε η διαφορά δυναμικού εκατέρωθεν της κυτταρικής μεμβράνης, ανάλογα με τον τύπο του κυττάρου παίρνει τιμές που κυμαίνονται από -9 έως 100mV. Η σταθερή αυτή διαφορά δυναμικού λέγεται **Δυναμικό ηρεμίας** της κυτταρικής μεμβράνης.

Οι πιο σημαντικές χημικές ουσίες στο εξωκυττάριο και ενδοκυττάριο υγρό (εκτός του νερού) μιας κυτταρικής μεμβράνης είναι τα ιόντα  $K^+$ ,  $Na^+$ ,  $Cl^-$ . Ένα κύτταρο για να μην καταστραφεί από ηλεκτρικές δυνάμεις, πρέπει να περιέχει έναν αριθμό θετικών φορτίων ο οποίος θα εξισορροπείται από έναν ίσο σχεδόν αριθμό αρνητικών φορτίων. Το ίδιο ισχύει για τα φορτία του



περιβάλλοντος υγρού. Ωστόσο, κοντά στην κυτταρική μεμβράνη επιτρέπεται να υπάρχει μια μικρή περίσσεια θετικού ή αρνητικού φορτίου. Η υψηλή συγκέντρωση του  $\text{Na}^+$ , στο εξωτερικό του κυττάρου εξισορροπείται κυρίως από το εξωκυττάριο  $\text{Cl}^-$ . Η υψηλή συγκέντρωση του  $\text{K}^+$  στο εσωτερικό εξισορροπείται από διάφορα ενδοκυττάρια αρνητικά φορτισμένα ιόντα.<sup>5</sup>

**Πίνακας 1.2.** Συγκέντρωση ιόντων<sup>3</sup>

| ION           | Extracellular Concentration (millimoles/liter) | Intracellular Concentration (millimoles/liter) | Relative Permeability |
|---------------|--|--|-----------------------|
| $\text{Na}^+$ | 150  | 15   | 1                     |
| $\text{K}^+$  | 5  | 150  | 50-75                 |
| $\text{A}^-$  | 0  | 65   | 0                     |

Υπάρχουν όμως και πολλά άλλα ιόντα όπως  $\text{Mg}^{2+}$ ,  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{H}^+$ ,  $\text{HCO}_3^-$ ,  $\text{HPO}_4^{2-}$ ,  $\text{SO}_4^{2-}$  αμινοξέα και πρωτεΐνες αρνητικά φορτισμένες και στα δύο διαμερίσματα. Από τα ιόντα που μπορούν να διαπερνούν τη μεμβράνη  $\text{K}^+$ ,  $\text{Na}^+$ ,  $\text{Cl}^-$  παρουσιάζουν τις υψηλότερες συγκεντρώσεις και επομένως παίζουν το σημαντικότερο ρόλο στη γένεση των δυναμικών ηρεμίας της μεμβράνης.

Όσο μεγαλύτερη είναι η διαπερατότητα σε ένα είδος ιόντος, τόσο μεγαλύτερη θα είναι η συνεισφορά του ιόντος αυτού στη δημιουργία του δυναμικού ηρεμίας της μεμβράνης. Για να γίνει κατανοητός ο μηχανισμός της δημιουργίας του δυναμικού ηρεμίας θεωρούμε ότι αρχικά δεν υπάρχει διαφορά δυναμικού στις δυο πλευρές της μεμβράνης δηλαδή και το εσωτερικό και το εξωτερικό του κυττάρου περιέχει ίσο αριθμό θετικών και αρνητικών ιόντων.

Η κυτταρική μεμβράνη, η οποία αποτελείται από στρώματα λιποπρωτεϊνών στην κατάσταση ηρεμίας δεν επιτρέπει την διέλευση των ενδοκυττάρια πρωτεϊνών και άλλων οργανικών ανιόντων ( $\text{A}^-$ ) ενώ παρουσιάζει διαύλους (πόρους) για το  $\text{Na}^+$  και περίπου 70 φορές περισσότερους για το  $\text{K}^+$  και λιγότερους για το  $\text{Cl}^-$ . Επομένως η συγκέντρωση των ιόντων  $\text{K}^+$  στο ενδοκυττάριο υγρό είναι μεγαλύτερη από ότι στο εξωκυττάριο. Για το λόγο αυτό και εξαιτίας της διαπερατότητας που παρουσιάζει η μεμβράνη στα ιόντα  $\text{K}^+$  διαχέονται αυτά λόγω της θερμικής τους κίνησης από την περιοχή υψηλής συγκέντρωσης προς την περιοχή χαμηλότερης συγκέντρωσης. Δημιουργείται επομένως ένα ρεύμα ιόντων  $\text{K}^+$ ,  $I_0$  με φορά από το εσωτερικό του κυττάρου προς τα έξω.

Η διάχυση των θετικών ιόντων  $K^+$  έχει σαν αποτέλεσμα να εμφανιστεί περίσσεια αρνητικού φορτίου στο εσωτερικό του κυττάρου και πλεόνασμα θετικού φορτίου στο εξωτερικό του κυττάρου. Αναπτύσσεται έτσι μια διαφορά δυναμικού εκατέρωθεν της μεμβράνης η οποία δημιουργεί ένα ρεύμα  $I_\delta$  αντίθετο προς το  $I_\sigma$  των ιόντων  $K^+$ .

Το συνολικό ρεύμα των ιόντων  $K^+$  σε μια χρονική στιγμή δίδεται από τη σχέση:

$$I_{\text{ολ } K^+} = I_\sigma - I_\delta \quad [1.4]$$

Όσο το  $I_\sigma$  παραμένει μεγαλύτερο από το  $I_\delta$  θα εξακολουθεί η διάχυση των ιόντων  $K^+$  από μέσα προς τα έξω του κυττάρου. Καθώς όμως αυξάνει η συγκέντρωση των ιόντων  $K^+$  στο εξωτερικό χώρο αυξάνει και η διαφορά δυναμικού εκατέρωθεν της μεμβράνης και επομένως και το  $I_\delta$ . Κάποια στιγμή όταν το  $I_\delta$  γίνει ίσο με το  $I_\sigma$  (δηλαδή  $I_{\text{ολ } K^+} = 0$ ) τότε η διαφορά δυναμικού εκατέρωθεν της μεμβράνης σταθεροποιείται και αυτή ονομάζεται δυναμικό ισορροπίας για τα ιόντα του  $K^+$

Ακριβώς τα ίδια συμβαίνουν με τα ιόντα  $Na^+$ . Επειδή η συγκέντρωση των ιόντων  $Na^+$  είναι μεγαλύτερη στο εξωτερικό της μεμβράνης δημιουργείται ένα ρεύμα  $I_\sigma$  από τα ιόντα  $Na^+$  προς το εσωτερικό της μεμβράνης, ενώ ένα ρεύμα  $I_\delta$  αντίθετου φοράς εμφανίζεται λόγω της αναπτυσσόμενης διαφοράς δυναμικού. Όταν

$$I_{\text{ολ } Na^+} = I_\sigma - I_\delta = 0 \quad [1.5]$$

τότε η διαφορά δυναμικού εκατέρωθεν της μεμβράνης σταθεροποιείται και αυτή ονομάζεται δυναμικό ισορροπίας για το  $Na^+$ .

Το δυναμικό ισορροπίας για κάθε ξεχωριστό ιόν, υπολογίζεται από την **εξίσωση του Nerst**, η οποία εξετάζει την κίνηση των ιόντων μέσα σε διάλυμα, σα να ήταν μόρια ιδανικού αερίου και ιόν εξαρτάται μόνο από τις συγκεντρώσεις του στις δύο πλευρές της μεμβράνης καθώς και τη θερμοκρασία:

$$E_{eq, K^+} = \frac{RT}{zF} \ln \frac{[K^+]_o}{[K^+]_i} \quad [1.6]$$

- όπου  $E_{eq, K^+}$  είναι το δυναμικό ισορροπίας για το κάλιο, μετρημένο σε Volts
- $R$  είναι η παγκόσμια σταθερά αερίων, ίση με  $8.314 \text{ joules} \cdot K^{-1} \cdot \text{mol}^{-1}$
- $T$  είναι η απόλυτη θερμοκρασία μετρημένη σε kelvin (=  $K = \text{degrees Celsius} + 273.15$ )

- $z$  είναι ο αριθμός του στοιχειώδους φορτίου του ιόντος
- $F$  η σταθερά Faraday constant, ίση με  $96,485 \text{ Coulombs}\cdot\text{mol}^{-1}$  or  $\text{J}\cdot\text{V}^{-1}\cdot\text{mol}^{-1}$
- $[K^+]_o$  είναι η εξωκυττάρια συγκέντρωση του καλίου, μετρημένη σε  $\text{mol}\cdot\text{m}^{-3}$  ή  $\text{mmol}\cdot\text{l}^{-1}$
- $[K^+]_i$  είναι η ενδοκυττάρια συγκέντρωση του καλίου<sup>10</sup>

Το δυναμικό ισορροπίας των ιόντων  $\text{Na}^+$  αν υπολογιστεί με την εξίσωση Nerst θα βρεθεί περίπου +60 mV και για τα ιόντα  $\text{K}^+$  περίπου -90mV. Η εξίσωση Nerst θεωρείται ότι αποτελεί καλή προσέγγιση του δυναμικού ηρεμίας της κυτταρικής μεμβράνης για ένα μεμονωμένο ιόν .

Μια πιο ακριβής έκφραση για το δυναμικό ισορροπίας, η οποία λαμβάνει υπόψη και την επίδραση και των άλλων ιόντων προτάθηκε από τον Goldman (1943) και τροποποιήθηκε από τους Hodgkin και Katz (1949) δίνεται από την **εξίσωση Goldman** :

$$V_m = \frac{RT}{F} \ln\left(\frac{p_K[K]_o + p_{Na}[Na]_o + p_{Cl}[Cl]_i}{p_K[K]_i + p_{Na}[Na]_i + p_{Cl}[Cl]_o}\right) \quad [1.7]$$

όπου  $V$ : το δυναμικό ισορροπίας

$R$ : η σταθερά των αερίων

$T$ : η απόλυτη θερμοκρασία

$F$ : σταθερά Faraday

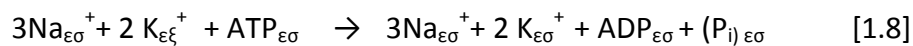
$P_K, P_{Na}, P_{Cl}$  η σταθερά διαπερατότητας της μεμβράνης των ιόντων  $\text{K}, \text{Na}, \text{Cl}$

$O_i, [Na^+], [K^+], [Cl^-]$  είναι οι συγκεντρώσεις των ιόντων  $\text{Na}, \text{K}, \text{Cl}$ .

Το μετρούμενο με πειραματική μέθοδο δυναμικό ηρεμίας (όπως αναφέρθηκε  $\sim -70\text{mV}$ ) δεν είναι το δυναμικό ισορροπίας ούτε του  $\text{K}^+$  ούτε του  $\text{Na}^+$ . Αυτό σημαίνει ότι εξακολουθεί να υπάρχει μια μετακίνηση ιόντων  $\text{K}^+$  προς το εξωτερικό της μεμβράνης και ιόντων  $\text{Na}^+$  προς το εσωτερικό. Λόγω του μηχανισμού που αναφέραμε θα περίμενε κανείς να συνεχίσει να μειώνεται η συγκέντρωση των ιόντων  $\text{Na}^+$  στον εξωκυττάριο χώρο και των ιόντων  $\text{K}^+$  στον εσωκυττάριο. Στην πραγματικότητα όμως οι συγκεντρώσεις του  $\text{Na}^+$  στον εξωτερικό χώρο και του  $\text{K}^+$  οφείλεται σε ένα μηχανισμό κυτταρικής μεμβράνης, ενεργού μεταφοράς ιόντων ( $\text{Na}^+$  προς το εξωκυττάριο χώρο και ιόντων  $\text{K}^+$  στον ενδοκυττάριο χώρο), που συνήθως αναφέρεται ως αντλία Νατρίου-Καλίου. Η ενέργεια για την λειτουργία της αντλίας αυτής προέρχεται από τον μεταβολισμό των τροφών

(πρωτεΐνες, λίπη, υδατάνθρακες) και βρίσκεται αποθηκευμένη στο μόριο του νουκλεοτιδίου, τριφωσφορική αδενοσίνη (ATP).

Η αντλία Νατρίου-Καλίου είναι πρωτεΐνη που δρώντας σαν ένζυμο διασπά το μόριο της ATP σε διφωσφορική αδενοσίνη (ADP) και μια ανόργανη φωσφορική ρίζα  $P_i$ . Έτσι εκλύεται ενέργεια ικανή για άντληση στο εξωτερικό  $Na^+$  και στο εσωτερικό  $K^+$  σε αναλογία 3/2. Σύμφωνα με την εξίσωση :



όπου οι δείκτες εσ και εξ σημαίνουν εσωτερικός και εξωτερικός χώρος της μεμβράνης.<sup>1</sup>

Θα μπορούσαμε να θεωρήσουμε τη μεμβράνη ως ένα μοντέλο, το οποίο ονομάζεται **ισοδύναμο κύκλωμα**, όπου όλες οι σημαντικές λειτουργικές ιδιότητες του νευρώνα αναπαριστούνται με ηλεκτρικό κύκλωμα το οποίο αποτελείται από αγωγούς ή αντιστάτες (αντιπροσωπεύοντας τους ιοντικούς διαύλους), μπαταρίες (βαθμίδα συγκέντρωσης των αντίστοιχων ιόντων) και πυκνωτές (η ικανότητα της μεμβράνης να αποθηκεύει φορτίο). Αυτά τα ισοδύναμα κυκλώματα μας δίνουν πληροφορία σχετικά με το πώς η ροή του ρεύματος εξαιτίας της κίνησης των ιόντων παράγει σήματα στα νευρικά κύτταρα.

### 1.3 ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

<sup>1</sup><http://www.google.gr/url?sa=t&rct=j&q=&esrc=s&source=web&cd=7&ved=0CEUQFjAG&url=http%3A%2F%2Fmedphys.med.uoa.gr%2Fdownloads%2F%2520kyttarik%2520membrani%2520me%2520s3c7mata.zip%2Fdownload%2Ffile&ei=O0tiUrapF-GQ0AX4p4H-QCg&usg=AFQjCNGw1OOrU4Rd7TRKLVlgZ6CFWRP-LA&bvm=bv.54934254,d.d2k>

<sup>2</sup> [http://histology.med.uoc.gr/arxeia/simeioseis/02\\_kyttaro.pdf](http://histology.med.uoc.gr/arxeia/simeioseis/02_kyttaro.pdf)

<sup>3</sup> University of Cyprus, Νευροφυσιολογία και Αισθήσεις

<sup>4</sup> Εισαγωγή στη κυτταρική βιολογία και γενετική, Σαράς παναγιώτης, Μοριακός βιολόγος, 2004

<sup>5</sup> Alberts Bruce, Dennis Bray, Hopkin Karen, Johnson Alexander, Julian Lewis, Martin Raff, Keith Roberts, Peter Walter, Βασικές αρχές κυτταρικής βιολογίας, Τόμος 1, Ιατρικές εκδόσεις Π.Χ. Πασχαλίδης, Δεύτερη έκδοση, Κεφ. 11-12

<sup>6</sup> Μηχανισμοί κυτταρικής μεταφοράς και διαπερατότητα :  
[http://www.experimentalphysiology.gr/UserFiles/Dialekseis/GF/GF\\_10-11/MixanismoikyttarikisMetaforas.pdf](http://www.experimentalphysiology.gr/UserFiles/Dialekseis/GF/GF_10-11/MixanismoikyttarikisMetaforas.pdf)

<sup>7</sup> Βιολογικές μεμβράνες και μεμβρανικές πρωτεΐνες  
[http://biotech.aua.gr/BSC\\_COURSES/molrec/Dialexeis\\_PPS\\_MolRec/Ch08\\_membr.pdf](http://biotech.aua.gr/BSC_COURSES/molrec/Dialexeis_PPS_MolRec/Ch08_membr.pdf)

<sup>8</sup> Βιολογικές μεμβράνες  
<http://www.google.gr/url?sa=t&rct=j&q=&esrc=s&source=web&cd=5&cad=rja&ved=0CEYQFjAE&url=http%3A%2F%2Fwww.geocities.com%2Ffloucasnicolaou%2Ffylladia3islykeiou%2Ffylladiomembranes.pdf&ei=qcJiUuVZoczRBYHSgZgB&usg=AFQjCNHrQYAipNhXwSluyKzVYsdVYdOgbA&bvm=bv.54934254,d.d2k>

<sup>9</sup> <http://panacea.med.uoa.gr/topic.aspx?id=733>

<sup>10</sup> [http://en.wikipedia.org/wiki/Resting\\_potential](http://en.wikipedia.org/wiki/Resting_potential)

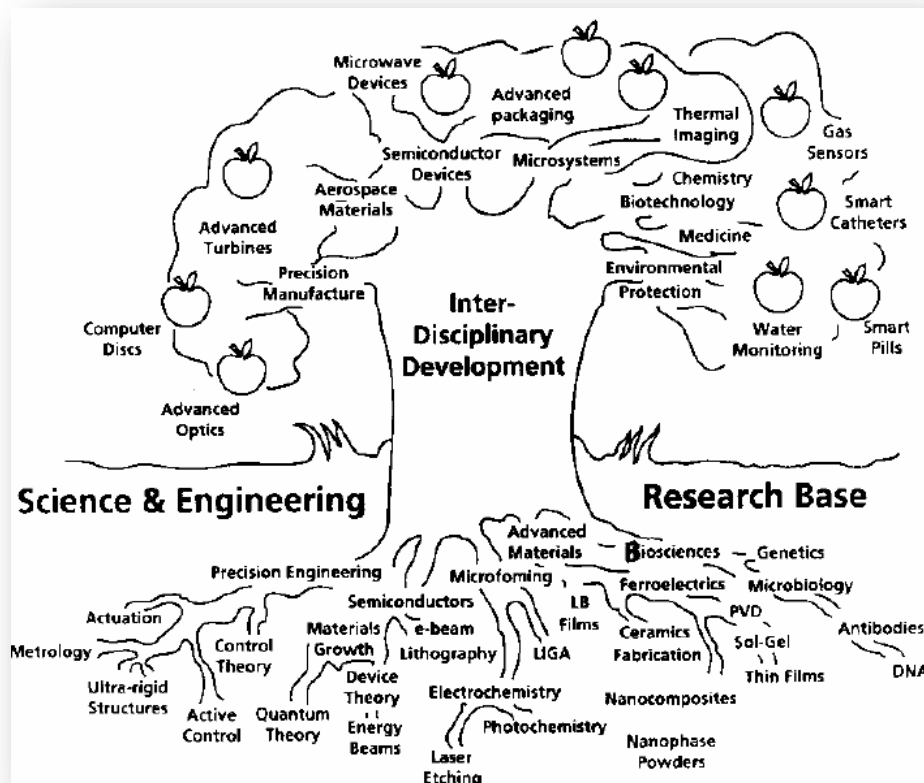
<sup>11</sup> Εξερευνώντας την κυτταρική μεμβράνη: Η περίπτωση των εισοσωμάτων. Παύλος Γεράνιος, Βίκυ Σοφιανοπούλου, Θερινό Σχολείο 2013, Ε.Κ.Ε.Φ.Ε. Δημόκριτος, Αθήνα 2013

## ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2. Βιοϋλικά και Πολυμερή με εφαρμογή στη Νανοϊατρική

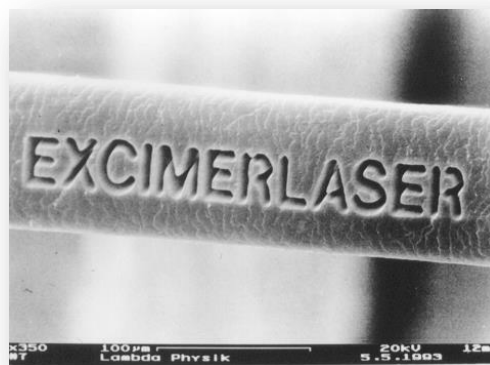
### 2.1 Εισαγωγή στην Νανοτεχνολογία και την Νανοϊατρική

Το 1959, ο Richard Feynman τιμήθηκε με βραβείο Νόμπελ, γιατί πρώτος έθεσε τη δημιουργική ιδέα της νανοτεχνολογίας, προτείνοντας την ανάπτυξη των μοριακών μηχανών. Από τότε, η επιστημονική κοινότητα ερευνά το ρόλο εκείνο, όπου η νανοτεχνολογία μπορεί να παίξει σε κάθε πτυχή της κοινωνίας. Το ενδιαφέρον της νανοτεχνολογίας προέρχεται από τη δυνατότητα να ελεγχθούν ιδιότητες της ύλης με τη συγκέντρωση υλικών σε νανοκλίμακα. Οι συντονισμένες ιδιότητες του υλικού που η νανοτεχνολογία μπορεί να προσφέρει, αναφέρεται σε μια δημοσίευση του Norio Taniguchi το 1974, όπου ο όρος «νανοτεχνολογία» χρησιμοποιήθηκε για πρώτη φορά σε μια επιστημονική δημοσίευση<sup>1,2</sup>. Η νανοτεχνολογία έχει σημειώσει τεράστια πρόοδο τις τελευταίες δεκαετίες και έχει γίνει ζωτικής σημασίας σε πολλούς τομείς. Οι κυριότερες κατηγορίες επιστημών που προσφέρουν υπερ-υψηλή ακρίβεια και ωθούν την εξέλιξη της τεχνολογίας είναι η ακριβής μηχανική, η μικρο-μηχανική, οι νανοεπιστήμες και νανοτεχνολογίες και όλα αυτά αποτελούν ένα συνεχές και αλληλοεξαρτώμενο σύνολο, που επιτρέπει τη δυνατότητα δημιουργίας προϊόντων που είναι πιο αξιόπιστα, αποτελεσματικά, ασφαλή, περιβαλλοντικά φιλικά και κερδοφόρα, ακόμη και τη δημιουργία προϊόντων που μόνο σε αυτή την κλίμακα είναι υπαρκτά.<sup>12</sup> Είναι σημαντικό να γίνει διάκριση μεταξύ των νανοεπιστημών και της τεχνολογίας. Οι νανοεπιστήμες ασχολούνται κυρίως με την κατανόηση των φαινομένων στην νανοκλίμακα. Είναι η συνάντηση των επιστημών της φυσικής, της χημείας, της βιολογίας και της μηχανικής. Για να καταστεί δυνατή, χρειάζεται η τεχνολογική πρόοδος που περιλαμβάνει:

- Την ανάπτυξη διαδικασιών υπερ-ακρίβειας, μηχανημάτων και συστημάτων ελέγχου που θα πετυχαίνουν όρια νανομέτρων και θα έχουν τελειώματα επιφάνειας νανομέτρων.
- Νέες τεχνικές ανάλυσης που θα μπορούν να παρατηρούν, να μετρούν και να παρέχουν τρισδιάστατες εικόνες των χαρακτηριστικών σε ατομικό επίπεδο, στη κλίμακα των νανομέτρων.
- Η ικανότητα εντοπισμού, χειραγώγησης και συγκέντρωσης μεμονωμένων μορίων και ατόμων.
- Η ανάπτυξη μαθηματικών υπολογιστικών μοντέλων, που μπορούν να σχεδιάσουν και να προβλέψουν με ακρίβεια τις μηχανικές, ηλεκτρικές, μαγνητικές, οπτικές και χημικές ιδιότητες των υλικών.



Σχήμα 2.1. Το δέντρο της νανοτεχνολογίας<sup>12</sup>



Σχήμα 2.2 Εικόνα ανθρώπινης τρίχας χωρίς να καταστραφεί, με excimer laser mask projection. (Courtesy of Exitech Ltd.,UK)<sup>12</sup>

Πρόσφατα, τα «**νανοϋλικά**», τα οποία είναι υλικά με βασικές δομικές μονάδες, grains, μόρια, ίνες ή άλλα συστατικά στοιχεία μικρότερα από 100nm τουλάχιστον σε μία διάσταση,<sup>3</sup> διαδραμάτισαν ένα σπουδαίο ρόλο στην βελτίωση της πρόληψης ασθενειών, τη διάγνωση, καθώς και τη θεραπεία

Ο όρος 'νανοϊατρική' εισάχθηκε από τα Εθνικά Ινστιτούτα Υγείας, και αφορά τις εφαρμογές της νανοτεχνολογίας για τη θεραπεία (drug delivery, drugs & therapy, Active implants, Biomaterials), τη διάγνωση (In vitro diagnostics), την παρακολούθηση (In vivo imaging) και τον έλεγχο των βιολογικών συστημάτων.<sup>10,11</sup> Η νανοϊατρική στηρίζεται στις βελτιωμένες και συχνά νέες φυσικές, χημικές και βιολογικές ιδιότητες των νανοδομημένων υλικών (νανοϋλικών). Το συγκρίσιμο μέγεθος των συνθετικών αυτών δομών με φυσικές λειτουργικές μονάδες (βιομόρια και κύτταρα) επιτρέπει την άμεση αλληλεπίδραση τους με τους ζωντανούς οργανισμούς. Στόχος της νανοϊατρικής είναι η βελτίωση τόσο της διαγνωστικής ιατρικής (έγκαιρη και έγκυρη διάγνωση) όσο και της θεραπευτικής ιατρικής (π.χ. βελτιωμένες φαρμακευτικές ουσίες, συστήματα ελεγχόμενης αποδέσμευσης φαρμάκων) καθώς και η ανάπτυξη μεθόδων για τη συστηματική ιατρική παρακολούθηση (π.χ. της εξέλιξης των ασθενειών, της αποτελεσματικότητας της φαρμακευτικής αγωγής).<sup>30</sup>

- **Διαγνωστική Ιατρική :** Η εφαρμογή της νανοτεχνολογίας στη διαγνωστική ιατρική έχει οδηγήσει στην ανάπτυξη μίας νέας γενιάς διαγνωστικών τα οποία έχουν μικρό μέγεθος, απαιτούν μικρή ποσότητα δείγματος και παρέχουν σε σύντομο χρονικό διάστημα ακριβή βιολογικά δεδομένα μέσω μίας απλής μέτρησης. Επιπλέον, η σύγκλιση της νανοτεχνολογίας και της ιατρικής απεικόνισης αναμένεται στο μέλλον να καταστήσει δυνατή την ανίχνευση ενός μόνο μορίου ή ενός κυττάρου μέσα σε ένα πολύπλοκο βιολογικό περιβάλλον.
- **Ελεγχόμενη αποδέσμευση φαρμάκων :** Η πρόοδος στην ελεγχόμενη αποδέσμευση των φαρμάκων σχετίζεται με την ανάπτυξη συνθετικών νανο-συστημάτων για τη στοχευμένη απόδοση περίπλοκων θεραπευτικών φαρμάκων και βιομορίων. Τα στοχευμένα συστήματα απόδοσης φαρμάκων έχουν πολλαπλές ιδιότητες, με πιο χαρακτηριστική την ικανότητα τους να αναγνωρίζουν συγκεκριμένα μόρια τα οποία μπορεί να βρίσκονται είτε στην εξωτερική μεμβράνη των προς στόχευση κυττάρων ή στο εσωτερικό τους. Οι κύριοι στόχοι της νανοϊατρικής στα πλαίσια της ελεγχόμενης αποδέσμευσης φαρμάκων είναι η μεγιστοποίηση της βιοδιαθεσιμότητας και της αποτελεσματικότητας των θεραπευτικών ουσιών, ο έλεγχος της φαρμακοκινητικής και της φαρμακοδυναμικής που εμφανίζουν, ο έλεγχος και η καταστολή της ανεπιθύμητης τοξικότητας και της ανοσογένειας που προκαλούν καθώς και η αποτελεσματική αντιμετώπιση περιορισμών χρήσης τους λόγω της χαμηλής διαλυτότητας τους, της γρήγορης αποικοδόμησης και απομάκρυνσης τους από τον ανθρώπινο οργανισμό, της σχετικά σύντομης βιολογικής δραστηριότητας τους και της



αδυναμίας τους να διαπεράσουν βιολογικά εμπόδια. Μία σημαντική πρόκληση για τη νανοϊατρική αποτελεί επίσης, η ανάπτυξη συστημάτων στοχευμένης απόδοσης πρωτεϊνικών/πεπτιδικών (Π/Π) φαρμάκων για εισπνεόμενη, ρινική ή στοματική χορήγηση. Οι παραπάνω στόχοι αναμένεται να επιτευχθούν μέσω της ανάπτυξης συστημάτων στοχευμένης απόδοσης τα οποία απελευθερώνουν επιλεκτικά το φάρμακο σε συγκεκριμένα σημεία στο ανθρώπινο σώμα. Δεδομένου όμως ότι τα χαρακτηριστικά των φαρμάκων διαφέρουν σημαντικά σε ότι αφορά τη σύσταση, το μοριακό μέγεθος, την υδροφιλικότητα, τη βιοδιαθεσιμότητα, τη βέλτιστη συγκέντρωση (σε υψηλότερες ή χαμηλότερες συγκεντρώσεις το φάρμακο μπορεί να είναι τοξικό ή να μην έχει θεραπευτική ικανότητα) κλπ., τα βασικά χαρακτηριστικά που καθορίζουν την αποτελεσματικότητα των συστημάτων στοχευμένης απόδοσης είναι ιδιαίτερα πολύπλοκα. Γι' αυτό, η ανάπτυξη τους θα πρέπει να είναι αποτέλεσμα συνεργασίας επιστημόνων διαφόρων ειδικοτήτων με βαθιά κατάρτιση στα ακόλουθα πεδία : ανόργανη και οργανική χημεία, πολυμερή, φαρμακοχημεία, φαρμακολογία, μοριακή βιολογία, τοξικολογία, κλπ.

- **Αναγεννητική ιατρική:** Η αναγεννητική ιατρική έχει τη δυνατότητα να επιφέρει μελλοντικά αλλαγές στον τρόπο αντιμετώπισης ορισμένων ασθενειών. Στηριζόμενη σε νέες τεχνικές κυτταροκαλλιέργειας και στο σχεδιασμό βιοαποικοδομήσιμων πολυμερών, η μηχανική ιστών εμφανίζεται στο προσκήνιο ως η πιο προηγμένη μέθοδος θεραπείας στην αναγεννητική ιατρική. Στους στόχους της μηχανικής ιστών συγκαταλλέγονται η αναγέννηση παθολογικών ιστών και η πρόληψη και θεραπεία χρόνιων διαταραχών που επιφέρουν ανικανότητα, όπως η οστεοαρθρίτιδα, και ασθενειών του καρδιαγγειακού και κεντρικού νευρικού συστήματος. Η μηχανική ιστών περιλαμβάνει τη χρήση κυττάρων για τη δημιουργία τεχνητών δομών με στόχο την αντικατάσταση προβληματικών ιστών και οργάνων του σώματος. Περιλαμβάνει την απόθεση/ανάπτυξη κυττάρων σε πορώδη, βιοαποικοδομήσιμα ικρίωματα, τα οποία στη συνέχεια διαφοροποιούνται αποκτώντας μορφή φυσικών ιστών ικανά να μιμηθούν τις λειτουργίες αυτών. Οι τεχνητές αυτές δομές εμφυτεύονται στη συνέχεια σε ασθενείς με στόχο την αντικατάσταση ασθενικών ή κατεστραμμένων ιστών. Με την πάροδο του χρόνου, τα ικρίωματα αφομοιώνονται από τον ανθρώπινο οργανισμό και στη θέση τους αναπτύσσονται ιστοί οι οποίοι φέρουν αιμοφόρα αγγεία και νεύρα. Μέχρι σήμερα, οι κλινικές εφαρμογές περιλαμβάνουν τη μηχανική δέρματος, **χόνδρων και οστών**. Πρόσφατες εξελίξεις στις θεραπευτικές στρατηγικές περιλαμβάνουν τη χρήση εμβρυονικών κυττάρων ως πηγή αναγεννητικών κυττάρων και τη

χρήση μορίων που άγουν συγκεκριμένες βιολογικές αποκρίσεις και διεγείρουν την ανάπτυξη ιστών σε μοριακό επίπεδο.<sup>30</sup>

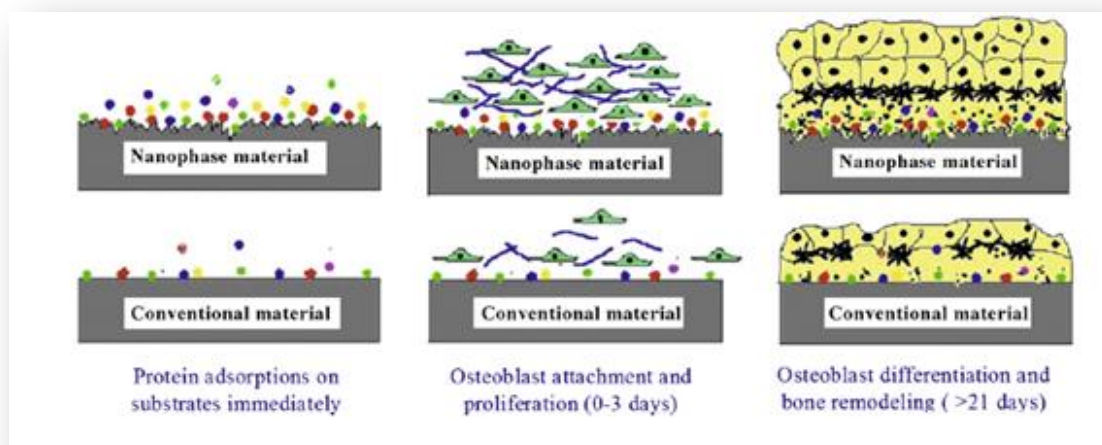
**Οι στόχοι της νανοτεχνολογίας** σε ότι αφορά τα έξυπνα βιοϋλικά για τα επόμενα χρόνια είναι οι εξής:

- i) Βιοαποικοδομήσιμα έξυπνα βιοϋλικά με βιοδραστικές επιφάνειες και ελεγχόμενους ρυθμούς αποικοδόμησης,
- ii) Βιοϋλικά που ενεργοποιούν γονίδια ειδικά σχεδιασμένα για συγκεκριμένες ασθένειες,
- iii) Έξυπνα ικρίωματα με ελεγχόμενη δομή για μηχανική ιστών,
- iv) Λειτουργικές βιομιμητικές μεμβράνες οι οποίες μιμούνται τις κυτταρικές μεμβράνες,
- v) Τεχνολογία αισθητήρων για την αποτίμηση της ενσωμάτωσης και λειτουργικότητας των εμφυτευμάτων,
- vi) Αισθητήρες για την ακριβή ενεργοποίηση γονιδίων και τον έλεγχο της ασυμβατότητας μεταξύ δότη και παραλήπτη, των μολύνσεων εξαιτίας των εμφυτευμάτων και της απόρριψης του εμφυτεύματος και
- vii) Νανο-οργάνωση βιοϋλικών που διεγείρουν την εξοκυστική μεμβράνη των ιστών.<sup>30</sup>

Το ενδιαφέρον για την έρευνα των νανοϋλικών όσον αφορά την **αναγεννησιακή ιατρική**, είναι ιδιαίτερα μεγάλο. Για παράδειγμα, τα νανοϋλικά μπορούν να είναι κατασκευασμένα από μέταλλα, κεραμικά, πολυμερή, οργανικά υλικά και τα σύνθετα τους, όπως ακριβώς τα συμβατικά ή τα μικρο-δομημένα υλικά. Τα νανοϋλικά, περιλαμβάνουν νανοσωματίδια (nanoparticles), νανοσυστάδες (nanoclusters), νανοκρυστάλλους, νανοσωλήνες, νανοϊνες, νανοςύρματα, nanorods (νανοράβδοι), nanofilms (νανοϋμένια), κλπ. Μέχρι σήμερα, πολλές top – down και bottom – up τεχνολογίες νανοκατασκευής υπάρχουν (όπως electrospinning, διαχωρισμός των φάσεων, διαδικασίες αυτό - οργάνωσης (self- assembly), εναπόθεση λεπτών υμενίων, χημική εναπόθεση ατμών, χημική χαρακτική (etching), νανο-αποτύπωση, φωτολιθογραφία, και δέσμη ηλεκτρονίων ή λιθογραφίες με nanosphere, είναι διαθέσιμες για τη σύνθεση νανοϋλικών με ταξινομημένες ή τυχαίες νανοτοπογραφίες<sup>4,5,6,12</sup>.

## 2.2 Παράμετροι της επιφάνειας που ευνοούν ή όχι την προσκόλληση των κυττάρων

Μελέτες έχουν δείξει ότι η νανοδομή των υλικών με ευνοϊκές επιφανειακές ιδιότητες για τα κύτταρα, ευνοούν την καλύτερη και αποδοτικότερη ειδική αλληλεπίδραση των πρωτεϊνών, με αποτέλεσμα μια πιο αποτελεσματική ανάπτυξη νέου οστού σε σύγκριση με συμβατικά υλικά<sup>7,8</sup> (σχήμα 2.3)



**Σχήμα 2.3:** Σχηματική απεικόνιση του μηχανισμού, μέσω του οποίου τα νανοϋλικά μπορούν να υπερέχουν σε σχέση με τα συμβατικά υλικά, στην ιστική αναγέννηση οστού. Οι βιο-ενεργές επιφάνειες των νανοϋλικών μιμούνται τις ιδιότητες αυτές των φυσικών οστών στην προώθηση μεγαλύτερων ποσών απορρόφησης πρωτεϊνών και μεγαλύτερη αποτελεσματικότητα στην δημιουργία νέου οστού, από ότι τα συμβατικά υλικά.<sup>3</sup>

Οι φυσικές παράμετροι της επιφάνειας που επηρεάζουν την κυτταρική βιολογία, μπορούν να κατηγοριοποιηθούν ως εξής:

### 2.2.1 Γωνία διαβροχής (wetting)

Η γωνία διαβροχής είναι ένα σύνθετο φαινόμενο που επηρεάζει αρχικά την προσρόφηση πρωτεϊνών επάνω σε μία επιφάνεια και στη συνέχεια τη κυτταρική προσκόλληση. Μια κοινή μέθοδος για τον προσδιορισμό της διαβρεξιμότητας μιας επιφάνειας μπορεί να μετρηθεί ως η γωνία επαφής μιας σταγόνας υγρού που αποτίθεται πάνω σε ένα στερεό.

Η διαβροχή ενός στερεού προσδιορίζεται από τις απομακρυσμένες χημικές ομάδες, όπου ιδιότητες, όπως η πολικότητα και το φορτίο είναι σημαντικοί και καθοριστικοί παράγοντες. Όταν το υγρό είναι ένα υδατικό διάλυμα, η επικρατούσα κατάσταση στα βιολογικά συστήματα, μια

πολική ή φορτισμένη επιφάνεια θα οδηγήσει σε υψηλότερο βαθμό διαβροχής σε σύγκριση σε μια μη-πολική επιφάνεια. Άλλες παράμετροι, όπως η τραχύτητα και η τοπογραφία, επηρεάζουν επίσης την διαβρεξιμότητα της επιφάνειας.<sup>13</sup> Ένα κλασικό παράδειγμα είναι το φαινόμενο όπου σταγονίδιο νερού τοποθετείται σε ένα φύλλο από το λουλούδι του λωτού. Η εγγενώς υδρόφοβη επιφάνεια γίνεται υπερυδρόφοβη χάρη στην επιφανειακή δομή από μm στην γκάμα των nm.

Είναι προφανές ότι πολλές παράμετροι, που ενεργούν σε συνδυασμό, καθορίζουν τα επιφανειακά χαρακτηριστικά, και κάνουν τη πρόσφυση των κυττάρων μια πολύπλοκη διαδικασία. Όταν τα κύτταρα καλλιεργούνται σε τρυβλίο κυτταρικής καλλιέργειας, το κάτω μέρος του πιάτου καλύπτεται από πρωτεΐνες του κυτταρικού θρεπτικού υλικού πριν τα κύτταρα προσκολληθούν στην επιφάνεια. Η **φιμπρονεκτίνη** (Fn), μια πρωτεΐνη τις εξωκυττάριας μήτρας, χρησιμοποιείται συνήθως ως πρωτεΐνη μοντέλο για μελέτες κυτταρικών αλληλεπιδράσεων πάνω σε επιφάνειες, δεδομένου ότι αυτή η πρωτεΐνη παρουσιάζει συγκεκριμένα μοτίβα που ενεργούν ως θέσεις σύνδεσης για τις κυτταρικές ιντεγκρίνες. Για τη μελέτη των μοριακών λεπτομερειών που διέπουν τη προσρόφηση Fn καθώς και τη προσκόλληση των κυττάρων, ο Garcia και οι συνεργάτες του χρησιμοποίησαν self-assembled monolayers (SAM) από αλκενοθειόλες, έχοντας -CH<sub>3</sub>, -OH, -COOH, -NH<sub>2</sub> ως τερματικές ομάδες.<sup>14,15,16</sup> Παρουσιάσεις από αυτά τα SAMs παράγουν επιφανειακά χαρακτηριστικά που κυμαίνονται από μη φορτισμένες, μη πολικές υδρόφοβες επιφάνειες (-CH<sub>3</sub>), αφόρτιστες πολικές υδρόφιλες επιφάνειες (-OH), αρνητικά φορτισμένες υδρόφιλες επιφάνειες (-COOH), και θετικά φορτισμένες μετρίως υδρόφιλες επιφάνειες (-NH<sub>2</sub>). Οι μη φορτισμένες υδρόφιλες επιφάνειες παρουσίαζαν χαμηλότερη προσρόφηση της (Fn), κάτι που επίσης επιβεβαιώνεται και από άλλες μελέτες.<sup>17,18</sup>

Εκτός από την προσρόφηση πρωτεΐνης, οι επιφανειακές ιδιότητες μπορούν επίσης να επηρεάσουν τη μορφολογική διάπλαση της πρωτεΐνης. Ο Garcia et al. χρησιμοποίησε μονοκλωνικά αντισώματα, τα οποία αντιτίθενται στην κεντρική θέση RGD πρόσδεσης των κυττάρων της Fn, για να εξετάσει την επίδραση των διαφόρων SAMs στην διάπλαση της Fn. Αυτή η μελέτη έδειξε ότι οι αφόρτιστες πολικές υδρόφιλες επιφάνειες (-OH) προωθούν αποτελεσματικά τη διάπλαση της Fn εκθέτοντας τη δέσμευση RGD-ιντεγκρίνης. Με cross linking των ιντεγκρινών σε αυτούς τους επιφανειακούς εξωκυττάριους προσδέτες, έδειξαν επίσης ότι, ενώ η δέσμευση του α5β1 ετεροδιμερούς της ιντεγκρίνης ακολούθησε τη τάση OH>COOH = NH<sub>2</sub>>CH<sub>3</sub>, το ετεροδιμερές της ιντεγκρίνης που περιλαμβάνει την α υπομονάδα ακολούθησε την τάση COOH »OH = NH<sub>2</sub> = CH<sub>3</sub>.<sup>9</sup>

### 2.2.2 Τραχύτητα και τοπογραφία της επιφάνειας

Η κυτταρική συμπεριφορά σε επιφάνειες με μεταβαλλόμενη τοπογραφία έχει εκτενώς μελετηθεί από διάφορες ομάδες. Τα κύτταρα προσαρμόζουν τη μορφολογία τους σύμφωνα με τις νανο-και μικρο-δομημένες επιφάνειες, γεγονός που επιβεβαιώνεται από την ευθυγράμμιση τους κατά το μήκος των δομών.<sup>19,20</sup> Μικρές υψομετρικές διαφορές στην περιοχή των νανομέτρων επηρεάζουν επίσης τις κυτταρικές αποκρίσεις, όπως είναι η αυξημένη ή μειωμένη παραγωγή κυτοκινών.<sup>21</sup> Η βιολογική σημασία αυτών των ευρημάτων είναι ενδιαφέρουσα, δεδομένου ότι το φυσικό υπόστρωμα για τα κύτταρα, το βασικό υμένιο, είναι πλούσιο σε τοπογραφικά χαρακτηριστικά στη κλίμακα των νανομέτρων. Έτσι, η λειτουργία των κυττάρων είναι αποτέλεσμα της μορφολογίας τόσο του υποστρώματος όσο και των χημικών ιδιοτήτων του βασικού υμενίου. Συγκριτικά πειράματα έχουν δείξει ότι η επιφανειακή ενέργεια, επηρεάζει τη κυτταρική προσκόλληση σε υψηλότερο βαθμό από ότι η τοπογραφία.<sup>22,23</sup> Η κυρίαρχη επίδραση αυτής της παραμέτρου απεικονίζεται με την αποτελεσματική χρήση υλικών με υψηλή επιφανειακή ενέργεια, όπως τιτάνιο, σε ορθοπεδικά εμφυτεύματα.<sup>9</sup>

### 2.2.3 Φορτίο

Αν και το επιφανειακό φορτίο είναι γνωστό ως ένας παράγοντας που συμβάλλει στην διαβρεξιμότητα μιας επιφάνειας, η επίδρασή του στην προσκόλληση του κυττάρου συχνά παραλείπεται. Αυτό διότι η συγκέντρωση ιόντων σε ένα φυσιολογικό ηλεκτρολύτη είναι μέγεθος συγκρίσιμο με το μήκος κύματος Debye του διπλού στρώματος, δηλαδή η αλληλεπίδραση του στρώματος που αποτελείται από επιφανειακά φορτία με ιόντα αντίθετου φορτίου στον ηλεκτρολύτη, θα είναι ελάχιστη. Το επιφανειακό φορτίο κατά συνέπεια, θα προστατεύεται από ιόντα του ηλεκτρολύτη, εμποδίζοντας έτσι την επιφάνεια να έχει μια άμεση επίδραση στην προσρόφηση πρωτεϊνών και στη προσκόλληση των κυττάρων.<sup>9</sup>

Αυτή η υπόθεση είναι, ωστόσο, αμφιλεγόμενη, δεδομένου ότι άλλοι ερευνητές αναφέρουν ότι η προσκόλληση των κυττάρων είναι αυξημένη σε αρνητικά φορτισμένες επιφάνειες (υδροξυαπατίτη) σε σύγκριση με ουδέτερα και θετικά φορτισμένες επιφάνειες.<sup>24,25</sup> Μια λογική εξήγηση αυτού του αποτελέσματος είναι ότι η πυκνότητα των δισθενών κατιόντων όπως το  $\text{Ca}^{2+}$  αυξάνεται στο διπλό στρώμα, και αυτά τα ιόντα είναι γνωστό ότι προωθούν τη κυτταρική πρόσφυση. Ωστόσο, τα αποτελέσματα είναι δύσκολο να ερμηνευθούν, αφού οι αλληλεπιδράσεις της κυτταρικής επιφάνειας είναι αποτελέσματα από τη συνδυασμένη επίδραση πολλών διαφορετικών παραμέτρων. Ο υδροξυαπατίτης, δεν είναι μόνο ένα αρνητικά φορτισμένο υλικό, αλλά επίσης και

ένα πορώδες υλικό με εγγενώς νανο-δομημένη επιφάνεια. Αυτό μπορεί από μόνο του να αυξήσει το μήκος Debye, κάνοντας το επιφανειακό φορτίο προσβάσιμο στα μόρια της κυτταρικής πρόσφυσης.<sup>9</sup>

#### 2.2.4 Μέτρο ελαστικότητας

Η ακαμψία μιας επιφάνειας αναφέρεται ως μέτρο Young. Τυπικά, υλικά όπως το PDMS και το πολυακρυλαμίδιο χρησιμοποιούνται για να μιμούνται το φυσιολογικό μέτρο ελαστικότητας μιας επιφάνειας. Η μετανάστευση (migration) των ινοβλαστών, των ενδοθηλιακών και των επιθηλιακών κυττάρων έχει φανεί ότι επηρεάζεται από το μέτρο ελαστικότητας του Young<sup>26,27</sup>, και η ελαστικότητα είναι επίσης γνωστή για τη ρύθμιση της μορφολογίας και της εσωτερικής ακαμψίας των ινοβλαστών<sup>28</sup>. Το ετεροδιμερές α5β1 της ιντεγκρίνης μπορεί να λειτουργήσει ως διακόπτης, επιδρώντας στο μέτρο ελαστικότητας του υποστρώματος της καλλιέργειας κυττάρων ή του εξωκυτταρικού πλέγματος, μεταφέροντας ενδοκυτταρική σηματοδότηση μέσω της φωσφορυλίωσης της τοπικής προσκόλλησης της κινάσης. Δεδομένου ότι το μέτρο ελαστικότητας έχει αποδειχθεί ότι ρυθμίζει και κατευθύνει τη κυτταρική διαφοροποίηση χωρίς τη συμμετοχή άλλων χημικών ή εξωτερικών ερεθισμάτων<sup>29</sup> η περιοχή αυτή είναι σήμερα ένα θέμα για εκτενή ερευνητική δραστηριότητα.<sup>9</sup>

### 2.3 Βιοδιασπώμενα Πολυμερή, κατάλληλα για την Ιστική Αναγέννηση

Τα αγώγιμα πολυμερή έχουν ηλεκτρικές και οπτικές ιδιότητες παρόμοιες με αυτές των μετάλλων\* και των ανόργανων ημιαγωγών, αλλά ωστόσο παρουσιάζουν και ελκυστικές ιδιότητες σχετικά με άλλα συμβατικά πολυμερή και τα κεραμικά,\*\* όπως η ευκολία σύνθεσής τους και επεξεργασίας τους.<sup>31</sup> Αυτός ο μοναδικός συνδυασμός των ιδιοτήτων τους έχει δώσει σ' αυτά τα πολυμερή ένα ευρύ φάσμα εφαρμογών στον τομέα της μικροηλεκτρονικής, όπως η τεχνολογία των μπαταριών, των φωτοβολταϊκών συστημάτων, οι δίοδοι εκπομπής φωτός,<sup>32</sup> και πιο πρόσφατα στο πεδίο των βιολογικών εφαρμογών.

\*χρησιμοποιούνται σχεδόν αποκλειστικά σε ορθοπεδικά εμφυτεύματα, όπως σε πρόσθεση ισχίου και γονάτου, σε σύρματα στερέωσης καταγμάτων, περόνες, κοχλίες, και πλάκες. Έχουν άριστη ηλεκτρική και θερμική αγωγιμότητα, είναι βιοσυμβατά, έχουν κατάλληλες μηχανικές ιδιότητες, αντοχή στη διάβρωση και λογικό κόστος

\*\*είναι πολυκρυσταλλικά υλικά. Τα κύρια χαρακτηριστικά τους είναι η σκληρότητα, η ευθραυστότητα, η μεγάλη αντοχή η ακαμψία, η αντοχή στη διάβρωση και τη φθορά, και τέλος η χαμηλή πυκνότητα. Έχουν υψηλή ανοχή στις δυνάμεις συμπίεσης, αντίθετα στις δυνάμεις έντασης, η συμπεριφορά τους είναι κακή. Τα περισσότερα κεραμικά διαθέτουν ηλεκτρική και θερμική μόνωση.<sup>46</sup> Κατατάσσονται σε βιοαδρανή, βιοενεργά και σε βιοαπορροφήσιμα.<sup>47,48</sup> Βρίσκουν εφαρμογές σε πολλούς διαφορετικούς τομείς, όπως η οδοντιατρική, η ορθοπεδική, και ως ιατρικοί αισθητήρες

## Αλληλεπίδραση Βιοϋλικών-Οργανισμού

Κάθε υλικό που προορίζεται για εμφύτευμα θα πρέπει να διαθέτει κάποιες ιδιότητες, ώστε να του επιτρέπουν μακροχρόνια χρήση στον οργανισμό χωρίς την απόρριψή του από αυτόν. Η απόκριση του ξενιστή, δηλαδή η απόκριση του οργανισμού, τοπική και συστημική, ως προς το βιοϋλικό παίζει πολύ σημαντικό ρόλο.<sup>49</sup>

Για να γίνει περισσότερο κατανοητή η χρήση των υλικών αυτών, οι ερευνητές έχουν εισάγει στο λεξιλόγιο τις λέξεις βιοϋλικό και βιοσυμβατότητα για να δείξουν τη βιολογική απόδοση των υλικών αυτών.<sup>50</sup> Τα υλικά τα οποία είναι βιοσυμβατά ονομάζονται βιοϋλικά, και η βιοσυμβατότητα είναι ένας περιγραφικός όρος που δείχνει την ικανότητα ενός υλικού να εκτελέσει με μία κατάλληλη απόκριση του ξενιστή, σε μια συγκεκριμένη εφαρμογή.<sup>51</sup> Με απλά λόγια αυτό σημαίνει συμβατότητα ή αρμονία των βιοϋλικών με τα συστήματα διαβίωσης. Επομένως, ως βιοσυμβατότητα ορίζεται η ικανότητα ενός υλικού να έρχεται σε επαφή με τους ιστούς του ανθρώπινου σώματος χωρίς να προκαλεί σημαντικό βαθμό της βλάβης στο σώμα. Με τον όρο βλάβη δεν αναφερόμαστε μόνο στην τοξικότητα, αλλά σε όλες τις αρνητικές επιπτώσεις ενός υλικού σε ένα βιολογικό σύστημα.<sup>52,53</sup>

Δηλαδή, δεν πρέπει να επηρεάζει δυσμενώς το τοπικό και συστηματικό περιβάλλον όπως τα οστά, τους μαλακούς ιστούς, την ιοντική σύνθεση του πλάσματος, καθώς και τα ενδο-και εξωκυτταρικά υγρά.<sup>54</sup> Συνοψίζοντας ένα υλικό για να θεωρείται βιοσυμβατό θα πρέπει να είναι μη-καρκινογόνο, μη πυρετογόνο, μη-τοξικό, μη-αλλεργιογόνο, αιμοσυμβατό, μη-φλεγμονώδες.<sup>46</sup>

Η βιολειτουργικότητα είναι μία ακόμη ιδιότητα που πρέπει να διαθέτουν τα βιοϋλικά. Τα φυσικά αλλά και τα μηχανικά χαρακτηριστικά των εμφυτευμάτων θα πρέπει να ανταποκρίνονται στις απαιτήσεις της εφαρμογής. Για παράδειγμα, όταν πρόκειται για εμφύτευση φακών θα πρέπει να επιτρέπεται η μετάδοση του φωτός. Με άλλα λόγια το βιοϋλικό οφείλει να είναι λειτουργικό στον οργανισμό για συγκεκριμένη εφαρμογή.<sup>46</sup> Εκτός της βιολειτουργικότητας, τα βιοϋλικά είναι σημαντικό να μην επηρεάζουν τη δομή των κυττάρων, των ιστών ή των οργάνων.

Επιπρόσθετα, ένα βιολογικό υλικό δεν θα πρέπει να είναι τοξικό. Πιο συγκεκριμένα, υποπροϊόντα της μάζας του υλικού δε θα πρέπει να διασπώνται από αυτό και να μεταναστεύουν μέσα στον οργανισμό προκαλώντας βλάβες, εκτός αν είναι ειδικά σχεδιασμένο για τέτοιες απαιτήσεις.<sup>55</sup>

Η έρευνα για τα αγώγιμα πολυμερή για βιοϊατρικές εφαρμογές επεκτάθηκε σε μεγάλο βαθμό με την ανακάλυψη στη δεκαετία του 1980 ότι αυτά τα υλικά ήταν συμβατά με πολλά βιολογικά

μόρια, όπως αυτά που χρησιμοποιούνται σε βιοαισθητήρες. Μέχρι τα μέσα της δεκαετίας του 1990 είχε φανεί, πως μέσω της ηλεκτρικής διέγερσης, μπορούν να ρυθμίζονται κυτταρικές δραστηριότητες, συμπεριλαμβανομένης της κυτταρικής προσκόλλησης, της κυτταρικής μετανάστευσης, της σύνθεσης του DNA, καθώς και της μετάφρασης πρωτεϊνών.<sup>33,34,35,36</sup>

Συγκεκριμένα, σε πολλές από αυτές τις μελέτες εμπλέκονται νευρικά, οστικά, μυϊκά και καρδιακά κύτταρα τα οποία ανταποκρίνονται σε ηλεκτρικά ερεθίσματα. Τα περισσότεροι αγώγιμα πολυμερή παρουσιάζουν μια σειρά από σημαντικά πλεονεκτήματα για βιοϊατρικές εφαρμογές, συμπεριλαμβανομένης της βιοσυμβατότητας, της ικανότητας να παγιδεύουν και ελεγχόμενα να απελευθερώνουν βιολογικά μόρια (δηλ., αναστρέψιμο ντόπινγκ), την ικανότητα να μεταφέρουν φορτίο από μια βιοχημική αντίδραση, καθώς και τη δυνατότητα να μεταβάλλουν εύκολα τις ηλεκτρικές, χημικές, φυσικές, και άλλες ιδιότητές τους για να ταιριάζουν καλύτερα στη φύση της συγκεκριμένης εφαρμογής.

Αυτά τα μοναδικά χαρακτηριστικά είναι χρήσιμα σε πολλές βιοϊατρικές εφαρμογές, όπως η δημιουργία βιοαισθητήρων, ικρίσματα για μηχανική ιστών, ανιχνευτές νευρωνικών σημάτων, drug delivery συστήματα, και βιο-ενεργοποιητές (Πίνακας 2.1).

Εκτός από τα αγώγιμα πολυμερή, έχουν χρησιμοποιηθεί και άλλα ηλεκτροενεργά υλικά σε βιολογικές εφαρμογές. Για παράδειγμα, οι electrets (υλικά με ένα σχεδόν μόνιμο επιφανειακό φορτίο που παρέχεται από παγιδευμένους φορείς φορτίου) και τα πιεζοηλεκτρικά υλικά (υλικά που δημιουργούν παροδικά ηλεκτρικά φορτία υπό μηχανική παραμόρφωση) έχουν χρησιμοποιηθεί στη μηχανική ιστών ως δίαυλοι αγωγοί νεύρων.<sup>37,38</sup>

Μέταλλα και ημιαγωγοί, όπως ο χρυσός, το ιρίδιο, και το πυρίτιο έχουν χρησιμοποιηθεί σε νευρωνικούς ανιχνευτές και αισθητήρες.<sup>39,40</sup> Ωστόσο, τα αγώγιμα πολυμερή εμφανίζουν πολλά πλεονεκτήματα σε σχέση με αυτά τα υλικά. Συγκρίνοντας τα, τα αγώγιμα πολυμερή είναι φθηνά, εύκολο να συντεθούν, και ευέλικτα, επειδή οι ιδιότητές τους μπορούν εύκολα να διαμορφώνονται από το ευρύ φάσμα των μορίων που μπορούν να παγιδεύουν ή να χρησιμοποιούν ως προσμίξεις (dopants). Άλλη σημαντική ιδιότητα των αγώγιμων πολυμερών είναι ότι μπορούν επίσης να προσαρμοστούν για τη δημιουργία υποστρωμάτων με μεγάλη επιφάνεια, ένα βασικό στοιχείο για την μείωση της αντίστασης στους νευρικούς ανιχνευτές. Ειδικότερα, μπορούν να έχουν έως και 50 φορές το εμβαδόν της επιφάνειας των ηλεκτροδίων ιριδίου.<sup>41</sup> Επιπλέον, τα αγώγιμα πολυμερή μπορούν με ακρίβεια να εναποτίθενται πάνω σε μεταλλικά ηλεκτρόδια για την δημιουργία



βιοαισθητήρων. Επίσης, μπορούν να συνδέονται με βιομόρια για ένα πιο αποτελεσματικό μηχανισμό μεταγωγής<sup>42</sup>

**Πίνακας 2.1:** Τα αγώγιμα πολυμερή και οι βιολογικές εφαρμογές τους

| Εφαρμογή              | Περιγραφή της εφαρμογής   | Πλεονεκτήματα αγώγιμων πολυμερών   | Μειονεκτήματα αγώγιμων πολυμερών  |
|-----------------------|---|--|---|
| Ιστική αναγέννηση     | Βιοσυμβατά, βιοδιασπώμενα ικρίωματα που περιέχουν ερεθίσματα για την ιστική αναγέννηση            | <ul style="list-style-type: none"> <li>➤ Βιοσυμβατότητα</li> <li>➤ Καλή αγωγιμότητα</li> <li>➤ Εφικτές τροποποιήσεις, έτσι ώστε να περιλαμβάνουν χημικά ερεθίσματα</li> </ul>  | <ul style="list-style-type: none"> <li>➤ όχι βιοδιασπώμενα</li> <li>➤ όχι μεγάλη πορωσιμότητα</li> <li>➤ Υδροφοβικότητα</li> </ul>    |
| Νευρωνικοί ανιχνευτές | Εμφυτεύσιμα ηλεκτρόδια καταγραφής ή ενεργοποίηση νευρώνων, κυρίως στον εγκέφαλο                   | <ul style="list-style-type: none"> <li>➤ Βιοσυμβατότητα</li> <li>➤ Καλή αγωγιμότητα</li> <li>➤ Καλή σταθερότητα</li> <li>➤ Ηλεκτροχημική σύνθεση σε μεταλλικά ηλεκτρόδια</li> <li>➤ Αυξημένη επιφανειακή περιοχή (μειωμένη αντίσταση)</li> </ul> | <ul style="list-style-type: none"> <li>➤ Μειωμένη ηλεκτρική επαφή στη διεπαφή</li> </ul>  |
|                       | Συσκευές που περιέχουν βιομόρια όπως στοιχεία ανίχνευσης, ενσωματωμένα με ηλεκτρικούς μετατροπείς | <ul style="list-style-type: none"> <li>➤ Βιοσυμβατότητα</li> <li>➤ Καλή αγωγιμότητα</li> <li>➤ Δυνατότητα να παγιδεύουν βιομόρια σε υμένια</li> <li>➤ Πιθανές επιφανειακές τροποποιήσεις</li> </ul>  | <ul style="list-style-type: none"> <li>➤ Η υδροφοβικότητα μπορεί να μετουσιώσει παγιδευμένες πρωτεΐνες</li> <li>➤ Φράγματα</li> </ul> |

|                  |   |  |  |
|------------------|---|--|--|
| Βιοαισθητήρες    |   | <ul style="list-style-type: none"> <li>➤ Αποδοτική ηλεκτρική μεταφορά φορτίου από βιοαντιδράσεις</li> <li>➤ Ηλεκτροχημική σύνθεση για μεταλλικά ηλεκτρόδια</li> </ul>                                      | διάχυσης για παγιδευμένα ένζυμα  |
| Drug Delivery    | Συσκευές αποθήκευσης και ελεγχόμενης απελευθέρωσης φαρμάκου   | <ul style="list-style-type: none"> <li>➤ Ικανότητα παγίδευσης βιομορίων</li> <li>➤ Ελεγχόμενη απελευθέρωση με την μείωσή τους</li> </ul>   | <ul style="list-style-type: none"> <li>➤ Η υδροφοβικότητα μπορεί να μετουσιώσει παγιδευμένες πρωτεΐνες</li> <li>➤ Γρήγορη απελευθέρωση</li> </ul>  |
| Βιοενεργοποιητές | Συσκευές που δημιουργούν μηχανική δύναμη η οποία θα μπορούσε να χρησιμοποιηθεί ως «τεχνητός μυς» -τύπου ενεργοποιητές | <ul style="list-style-type: none"> <li>➤ Μπορούν να ελέγξουν τη πρόσληψη / αποδέσμευση προσμίξεων (έλεγχος όγκου)</li> <li>➤ Ελαφρύ</li> <li>➤ Εργασία σε θερμοκρασία σώματος και σωματικά υγρά</li> </ul> | <ul style="list-style-type: none"> <li>➤ Όχι μεγάλης διάρκειας redox σταθερότητας</li> <li>➤ αποφλοιώση των αγώγιμων πολυμερικών υμενίων</li> <li>➤ Περιορισμένη απόκριση από την κινητικότητα των ιόντων</li> </ul> |

Υπάρχουν πολλοί τρόποι κατάταξης των πολυμερών. Ένας εύχρηστος τρόπος κατάταξής τους είναι ο ακόλουθος:

**Πίνακας 2.2.** Κατάταξη Πολυμερών

| Πολυμερή                       |                |                   |            |              |                   |
|--------------------------------|----------------|-------------------|------------|--------------|-------------------|
| Φυσικά                         |                |                   | Ελαστομερή | Συνθετικά    |                   |
| Πρωτεΐνες,<br>Πολυνουκλεοτίδια | πολυσακχαρίτες | Κόμια,<br>Ρητίνες |            | Θεροπλαστικά | θερμοσκληρυνόμενα |

Τα φυσικά πολυμερή έχουν κατά κανόνα, περισσότερο πολύπλοκες δομές από τα συνθετικά πολυμερή. Τα ελαστομερή μπορεί να είναι τόσο φυσικά όσο και συνθετικά και έτσι κατατάσσονται ως κοινή υποομάδα.<sup>43,44</sup>

Προκειμένου να θεωρείται ένα πολυμερές βιοαποικοδομήσιμο, θα πρέπει να καθορίζεται εκ των προτέρων ο χρόνος βιοδιάσπασής του. Ο βαθμός βιοδιάσπασης μετρείται με πιστοποιημένα τεστ και υπολογίζεται από την ποσότητα του άνθρακα που προκύπτει από τη βιοδιάσπαση, ενώ η τοξικότητα των προϊόντων της βιοδιάσπασης υπολογίζεται από δοκιμές τοξικότητας που χρησιμοποιούν φυτά και ζώα ευαίσθητα σε τοξικές ουσίες . Ο ρυθμός βιοδιάσπασης εξαρτάται άμεσα από τη γεωμετρία του προϊόντος, από την επιφάνειά του ανά όγκο και το πορώδες του. Όταν τα συνθετικά πολυμερή έχουν στην κύρια αλυσίδα τους μόνο άτομα άνθρακα (πολυμερή προσθήκης), δεν βιοαποικοδομούνται. Τα μόνα συνθετικά πολυμερή που μπορεί να βιοδιασπώνται είναι τα πολυμερή συμπύκνωσης. Τα συνθετικά πολυμερή συμπύκνωσης βιοδιασπώνται με ρυθμό που εξαρτάται από την ομάδα που περιλαμβάνουν στην αλυσίδα τους (εστέρες > αιθέρες > αμίδια ), τη μορφολογία (άμορφα > κρυσταλλικά), το μοριακό βάρος (χαμηλότερο > υψηλότερο) ενώ τα υδρόφιλα βιοαποικοδομούνται πιο γρήγορα από τα υδρόφοβα. Πιο αναλυτικά :

### **Μη-διασπώμενα πολυμερή**

Τα μη διασπώμενα πολυμερή διαθέτουν ένα ευρύ φάσμα ιατρικών εφαρμογών. Συγκεκριμένα, μπορούν να χρησιμοποιηθούν ως επικαλύψεις σε ιατρικά εμφυτεύματα βελτιώνοντας έτσι τη βιοσυμβατότητα του εμφυτεύματος, ως μεμβράνη και πορώδη ικρίσματα για την αναγεννητική ιστού, σε συστήματα ελεγχόμενης απελευθέρωσης φαρμάκου, σε αγγειακά μοσχεύματα, σε ορθοπεδικά εμφυτεύματα καθώς και σε καθετήρες και σωλήνες διαπίδυσης.<sup>56</sup> Η επιλογή του πολυμερούς βασίζεται σε διάφορες παραμέτρους, όπως η μηχανική αντοχή, η ευκολία της επεξεργασίας, η αδράνεια σε ένα βιολογικό περιβάλλον, η τριβή, η φθορά, η βιοσυμβατότητα, η προσφυτικότητα του ιστού όπως και η διαπερατότητα σε οξυγόνο. Ποια ιδιότητα θα κυριαρχήσει στην επιλογή εξαρτάται από την εφαρμογή για την οποία επρόκειτο να χρησιμοποιηθεί το πολυμερές.

Η ιδιότητα των πολυμερών εξαρτάται από τη φύση των χημικών δεσμών που αποτελούν την ραχοκοκκαλιά του πολυμερούς.<sup>57</sup> Σε γενικές γραμμές ένας δεσμός άνθρακα-άνθρακα είναι χημικώς και βιολογικά αρκετά αδρανής. Αυξάνοντας την οξειδωση του ανθρακικού σκελετού, βελτιώνεται η διαδικασία τήξης λόγω της μειωμένης κρυσταλλικότητας που επίσης ευνοεί την διάλυση των πολυμερών αυτών σε κοινούς οργανικούς διαλύτες. Αύξηση της κρυσταλλικότητας μπορεί να επιτευχθεί με υποκατάσταση των ατόμων του υδρογόνου, για παράδειγμα υποκατάσταση στο πολυαιθυλένιο του υδρογόνου με φθόριο ή μεθυλομάδα όπως στο Teflon και στο πολύ-προπυλένιο αντίστοιχα. Ακόμη, η διαδικασία αυτή οδηγεί σε πολυμερή τα οποία λόγω της υψηλής κρυσταλλικότητας είναι λιγότερο εύκαμπτα και επεξεργάζονται μόνο σε υψηλές θερμοκρασίες.<sup>58</sup>

### **Βιοδιασπώμενα Πολυμερή**

Με τον όρο βιοδιασπώμενα πολυμερή αναφερόμαστε στα πολυμερή εκείνα τα οποία είναι αποικοδομήσιμα σε βιολογικό περιβάλλον, είτε ενζυματικά είτε όχι, με την παραγωγή βιοσυμβατών ή μη τοξικών υποπροϊόντων.<sup>59</sup> Όταν η αποικοδόμηση του πολυμερούς γίνεται in vivo τα προϊόντα στα οποία μεταβολίζεται είναι φυσιολογικοί μεταβολίτες του οργανισμού, ή προϊόντα τα οποία μπορούν να εξαλειφθούν πλήρως από το σώμα, με ή χωρίς περαιτέρω μεταβολικούς μετασχηματισμούς, μέσω κανονικών φυσιολογικών διαδρομών. Τα βασικά κριτήρια επιλογής των βιοαποικοδομήσιμων πολυμερών ως βιοϋλικά είναι ότι προϊόντα αποδόμησης τους θα πρέπει να είναι μη τοξικά, και ότι τόσο ο ρυθμός αποικοδόμησης αλλά και οι μηχανικές ιδιότητες του υλικού

θα πρέπει να ταιριάζουν με το επιθυμητό αποτέλεσμα της εφαρμογής.<sup>60</sup> Η μηχανική συμπεριφορά των βιοδιασπώμενων υλικών εξαρτάται από την χημική σύνθεση τους, τη διαδικασία παραγωγής, την αποθήκευση, την επεξεργασία και τις συνθήκες εφαρμογής.<sup>59</sup>

Η αντικατάσταση των μη-βιοδιασπώμενων πολυμερών με τα βιοδιασπώμενα πολυμερή ήταν αναγκαία λόγω αρκετών περιορισμών κατά τη χρήση τους σε βραχυπρόθεσμες ιατρικές εφαρμογές. Πιο αναλυτικά, σε αρκετές περιπτώσεις ήταν απαραίτητη μία δεύτερη χειρουργική επέμβαση για την αφαίρεση του εμφυτεύματος, ενώ στα εμφυτεύματα από βιοαποικοδομήσιμα πολυμερή επιπλέον επέμβαση δεν υφίσταται. Επιπλέον, με τη χρήση των βιοδιασπώμενων πολυμερών αποφεύγεται το στρες θωράκισης (stress shielding)<sup>59</sup>

Τα βιοδιασπώμενα πολυμερή μπορούν να ταξινομηθούν ευρέως σε φυσικά και συνθετικά ,με βάση την προέλευσή τους.

Τα συνθετικά βιοδιασπώμενα πολυμερή χωρίζονται στα πολυμερή που προέρχονται από ανανεώσιμες πρώτες ύλες και στα πολυμερή που προέρχονται από πετροχημικές πρώτες ύλες. Τα βιοδιασπώμενα πολυμερή που παράγονται από τη φύση ή με φυσικές διαδικασίες κατατάσσονται στα φυσικά πολυμερή. Στα φυσικά βιοδιασπώμενα πολυμερή ανήκουν τα πολυμερή από πρωτεΐνες και πολυσακχαρίτες, όπως τα πολυμερή με βάση το άμυλο (starch-based polymers), το κολλαγόνο και τη χιτίνη, και τα πολυμερή που παράγονται από μικροοργανισμούς μέσω ζυμώσεων (PHAs).<sup>44</sup>

Τις τελευταίες δεκαετίες έχει γίνει σημαντική πρόοδος στην ανάπτυξη των βιοαποικοδομήσιμων (υδρολυτικά και ενζυματικά διασπώμενων) πολυμερών υλικών που είναι κατάλληλα για βιοϊατρικές εφαρμογές. Τα διασπώμενα πολυμερή βιοϋλικά είναι προτιμώμενα για την ανάπτυξη θεραπευτικών συσκευών, όπως οι προσωρινές προσθέσεις, οι τρισδιάστατες πορώδεις δομές ως ικρίσματα για τη μηχανική ιστών και ως ελεγχόμενες δομές μεταφοράς φαρμάκων. Κάθε μια από αυτές τις εφαρμογές απαιτεί υλικά με ειδικές φυσικές, χημικές, βιολογικές και μηχανικές ιδιότητες για την παροχή αποτελεσματικής θεραπείας. Σκοπός είναι οι μόνιμες προσθετικές συσκευές που χρησιμοποιούνται στην προσωρινή θεραπευτική να μπορέσουν να αντικατασταθούν από βιοδιασπώμενες συσκευές που θα μπορούσαν να βοηθήσουν το σώμα να επισκευάσει και να αναγεννήσει τους κατεστραμμένους ιστούς. Μπορεί οι βιοϊατρικές εφαρμογές των ενζυματικά διασπώμενων πολυμερών όπως το κολλαγόνο, να χρονολογείται χιλιάδες χρόνια πριν, αλλά η

εφαρμογή των συνθετικών βιοαποικοδομήσιμων πολυμερών ξεκίνησε μόλις το 1960. Μέσα σε αυτό το διάστημα αναπτύχθηκαν μια σειρά νέων συνθετικών και φυσικών βιοαποικοδομήσιμων πολυμερών που αναπτύχθηκαν ειδικά για βιοϊατρικές εφαρμογές. Η κινητήρια δύναμη είναι η ανάπτυξη νέων βιοϊατρικών τεχνολογιών όπως η μηχανική ιστών, η αναγεννητική ιατρική, η γονιδιακή θεραπεία, η ελεγχόμενη παράδοση φαρμάκων και η νανοβιοτεχνολογία, που απαιτούν βιοαποικοδομήσιμα υλικά για την περαιτέρω ανάπτυξή τους. Απαραίτητη προϋπόθεση για να χαρακτηριστεί ένα υλικό ως βιοϋλικό είναι η βιοσυμβατότητα, η οποία είναι η ικανότητα ενός υλικού να αποκριθεί με συγκεκριμένο τρόπο σε συγκεκριμένο ξενιστή. Για παράδειγμα, μπορούν να κατασκευαστούν ιστοί με την τοποθέτηση κυττάρων εντός ενός ικριώματος, το οποίο βοηθά στον κυτταρικό πολλαπλασιασμό, τη μεταφορά των θρεπτικών συστατικών και τη διαφοροποίηση. Η ανάπτυξη των κυττάρων σε τεχνητούς ιστούς σταματά σε ένα πάχος μόνο τεσσάρων έως επτά στρώματα κυττάρων. Σήμερα είναι δυνατή η ανάπτυξη τεχνητών ιστών σε διαστάσεις μακροκλίμακας, μικροκλίμακας και νανοκλίμακας, διαθέτοντας έτσι χαρακτηριστικά που ταιριάζουν με εκείνα των φυσικών ιστών.<sup>61</sup>

Οι φυσικές ιδιότητες του πολυμερούς συμβάλουν στην αποικοδόμησή του. Για παράδειγμα, η διαπερατότητα και η διαλυτότητα στο νερό αποτελούν μία αντανάκλαση του ελεύθερου όγκου του πολυμερούς και της υδροφιλικότητας του. Έτσι, καθορίζεται ο ρυθμός της υδρόλυσης και το είδος της αποδόμησης, δηλαδή εάν πρόκειται για επιφανειακή ή αποικοδόμηση από τη μάζα του πολυμερούς. Αυτοκατάλυση της διαδικασίας αποικοδόμησης είναι εφικτή, εάν παράγονται κατά τη διάσπαση όξινες ή βασικές ομάδες, όπως συμβαίνει στην περίπτωση των πολυεστέρων και των ορθοεστέρων. Μία άλλη φυσική παράμετρος είναι η κρυσταλλικότητα του πολυμερούς. Μόνο η άμορφη φάση του πολυμερούς είναι προσβάσιμη σε μόρια όπως το νερό ή το φάρμακο και δέχεται ενζυμική «επίθεση». Επιπλέον, το υαλώδες ή η ελαστική φύση του πολυμερούς καθορίζουν τη διαπερατότητα και την κινητικότητα της μοριακής αλυσίδας. Η κινητικότητα της αλυσίδας φαίνεται να είναι ένας σημαντικός παράγοντας στον καθορισμό της ευαισθησίας σε ενζυμική «επίθεση». Ακόμη, η ανικανότητα των διασπασμένων θραυσμάτων να διαχέονται έξω από ένα υαλώδες πολυμερές μεγεθύνει την αυτοκαταλυτική υδρολυτική διαδικασία. Τέλος, οι φυσικές διαστάσεις, όπως για παράδειγμα το μέγεθος και η αναλογία επιφάνειας/όγκου, φαίνεται να γίνονται σημαντικές σε πιο προχωρημένα στάδια της αποικοδόμησης, όταν μόρια όπως τα φαγοκύτταρα αρχίζουν να συμμετέχουν.<sup>59</sup>

Άλλοι παράγοντες που επηρεάζουν τη βιοαποικοδόμηση των πολυμερών είναι η χημική δομή, η χημική σύνθεση, η κατανομή των επαναλαμβανόμενων μονάδων, η παρουσία ιοντικών ομάδων,

το μοριακό βάρος, οι συνθήκες επεξεργασίας, η διαδικασία αποστείρωσης, οι συνθήκες αποθήκευσης, η θέση εμφύτευσης, οι φυσικοχημικοί παράγοντες, ο μηχανισμός υδρόλυσης κ.α.<sup>59</sup> Τα περισσότερα βιοαποικοδομήσιμα πολυμερή είναι σχεδιασμένα να αποικοδομούνται ως αποτέλεσμα υδρόλυσης των πολυμερικών αλυσίδων σε βιολογικά αποδεκτές και βαθμιαία μικρότερες ενώσεις. Για ορισμένα βιοαποικοδομήσιμα πολυμερή, κυρίως στους πολυανυδρίτες και τους πολυορθοεστέρες, η αποικοδόμηση λαμβάνει χώρα μόνο στην επιφάνεια του πολυμερούς, με αποτέλεσμα ο ρυθμός αποδέσμευσης να είναι ανάλογος προς το εμβαδόν επιφανείας του συστήματος παροχής.<sup>59</sup>

Ο τρόπος απόκρισης ενός ιστού σε ένα εμφύτευμα εξαρτάται από πολλούς παράγοντες, όπως τις χημικές, τις φυσικές και τις βιολογικές ιδιότητες των υλικών, καθώς και το σχήμα και τη δομή του εμφυτεύματος. Στην περίπτωση των βιοδιασπώμενων βιοϋλικών, η ενεργός βιοσυμβατότητά τους πρέπει να αποδειχθεί με την πάροδο του χρόνου. Οι χημικές, οι φυσικές, οι μηχανικές και οι βιολογικές ιδιότητες ενός βιοαποικοδομήσιμου υλικού ποικίλει με τον χρόνο και μπορούν να παραχθούν προϊόντα με διαφορετικά επίπεδα συμβατότητας με τον ιστό σε σχέση με το αρχικό υλικό. Μερικές από τις ιδιότητες ενός βιοαποικοδομήσιμου βιοϋλικού που είναι σημαντικές είναι οι εξής:

- Το υλικό θα πρέπει να έχει αποδεκτή διάρκεια ζωής.
- Ο χρόνος αποικοδόμησης του υλικού θα πρέπει να ταιριάζει με τη διαδικασία επούλωσης ή την αναγέννηση.
- Το υλικό θα πρέπει να έχει τις κατάλληλες μηχανικές ιδιότητες για την συγκεκριμένη εφαρμογή και την ενδεικνυόμενη μεταβολή των μηχανικών ιδιοτήτων με την υποβάθμισή του, η οποίες θα πρέπει να είναι συμβατές με την θεραπεία ή την διαδικασία της αναγέννησης.
- Τα προϊόντα της αποικοδόμησης θα πρέπει να είναι μη τοξικά, και να μεταβολίζονται και να αποβάλλονται από το σώμα.
- Το υλικό θα πρέπει να έχει την κατάλληλη διαπερατότητα και να υπάρχει δυνατότητα επεξεργασίας για την προβλεπόμενη εφαρμογή.

Μερικές από τις εγγενείς ιδιότητες των πολυμερικών βιοϋλικών που μπορούν να έχουν επίδραση στην βιοσυμβατότητα είναι: η χημεία του υλικού, το μοριακό βάρος, η διαλυτότητα, το σχήμα και η δομή του εμφυτεύματος, αν είναι υδρόφιλο ή υδρόφοβο, η επιφανειακή ενέργεια, η απορρόφηση του νερού, η αποικοδόμηση και ο μηχανισμός της διάβρωσης. Λόγω του εύρους των

εφαρμογών, δεν υπάρχει ένα πολυμερές σύστημα που θα μπορούσε να θεωρηθεί ως ιδανικό βιοϋλικό. Αυτός είναι και ο λόγος της ανάπτυξης ενός εύρους βιοαποικοδομήσιμων υλικών για εμφυτεύματα. Μερικές από τις τρέχουσες βιοϊατρικές εφαρμογές των βιοαποικοδομήσιμων πολυμερών υλικών είναι οι εξής:

- Μεγάλα εμφυτεύματα, όπως βίδες οστού, πλάκες οστών, κ.ά.
- Μικρά εμφυτεύματα, όπως συνδετήρες, ράμματα και νανο- ή μικρο- μεταφορείς φαρμάκων,
- Απλές μεμβράνες για ιστική αναγέννηση,
- Πορώδεις δομές για τη μηχανική ιστών.

Το βιοδιασπώμενο κατασκεύασμα συγκεντρώνει τα κύτταρα σε τρεις διαστάσεις για να εξελιχθούν τελικά σε λειτουργικό ιστό. Τα πολυμερή πρέπει να μιμούνται τις ιδιότητες των διαφόρων ιστών. Ανάλογα με τον τρόπο αποικοδόμησης του πολυμερικού βιοϋλικού, μπορούμε να τα ταξινομήσουμε σε **υδρολυτικά** διασπώμενα πολυμερή και **ενζυματικά** διασπώμενα πολυμερή. Τα περισσότερα από τα φυσικά πολυμερή υφίστανται ενζυματική αποικοδόμηση. Η χημική τροποποίηση αυτών των πολυμερών μπορεί να επηρεάσει σημαντικά το ρυθμό της αποικοδόμησης. Τα φυσικά πολυμερή έχουν πολλά πλεονεκτήματα, όπως η βιοδραστικότητα, η ικανότητα να παρουσιάσουν υποδοχείς δέσμησης με τα κύτταρα, η ευαισθησία στα κύτταρα – να προκαλέσουν πρωτεολυτική αποικοδόμηση και φυσική αναδιαμόρφωση. Έχουν όμως και μειονεκτήματα, όπως είναι η ισχυρή ανοσογόνοσ απόκριση, η πολυπλοκότητά τους και η δυνατότητα μετάδοσης της νόσου. Τα συνθετικά πολυμερή από την άλλη είναι βιολογικά αδρανή, έχουν πιο προβλέψιμες ιδιότητες, έχουν συγκεκριμένες προδιαγραφές και στερούνται πολλά από τα μειονεκτήματα των φυσικών πολυμερών.

Αν συνοψίσουμε τα βιοαποικοδομήσιμα συνθετικά και φυσικά πολυμερή που βρίσκουν βιοϊατρική εφαρμογή, έχουμε<sup>45</sup>:



Πίνακας 2.2. Συνθετικά και Φυσικά Βιοαποικοδομήσιμα Πολυμερή.

| Υδρολυτικά Διασπώμενα Πολυμερή ως Βιοϋλικά:        |  |
|--|--|
| Poly(a-esters):                                    | <ul style="list-style-type: none"> <li>✓ Poly(ahydroxy acid)s : poly(glycolic acid) &amp; poly(lactic acid)</li> <li>✓ Poly(a-hydroxy acids)</li> <li>✓ Polyglycolide</li> <li>✓ Polylactides : poly(L-lactide) (PLLA) - Poly(DL-lactide) (PDLLA)</li> <li>✓ Polydioxanone (PDS)</li> <li>✓ <b>Polycaprolactone (PCL)</b></li> <li>✓ Poly(trimethylene carbonate) (PTMC)</li> <li>✓ Bacterial polyesters: poly(3-hydroxybutyrate) (PHB)</li> </ul> |
| Biostable Polyurethanes and Poly(ether urethanes): | <ul style="list-style-type: none"> <li>✓ MDI,</li> <li>✓ TDI,</li> <li>✓ LDI,</li> <li>✓ BDI</li> </ul>  |
| Poly(ester amide):                                 | <ul style="list-style-type: none"> <li>✓ CAMEO</li> </ul>  |
| Poly(ortho esters):                                | <ul style="list-style-type: none"> <li>✓ POE I</li> <li>✓ POE II</li> <li>✓ POE III</li> <li>✓ POE IV</li> </ul>   |
| Polyanhydrides:                                    | <ul style="list-style-type: none"> <li>✓ Aliphatic homo-polyanhydrides : poly(sebacic anhydride) (PSA)</li> <li>✓ poly[(carboxy phenoxy propane)-(sebacic acid)] (PCPP-SA)</li> <li>✓ Aromatic co-monomers</li> <li>✓ Highly hydrophobic aliphatic linear fatty acid dimers (FAD)</li> </ul>   |
| Poly(anhydride-co-imide):                          | <ul style="list-style-type: none"> <li>✓ poly[pyromellitylimidoalanine- co-1,6-bis(p-carboxyphenoxy) hexane] (PMA ala:CPH)</li> </ul>  |
| Cross-linked polyanhydrides:                       | <ul style="list-style-type: none"> <li>✓ Poly(sebacic acid)(PSA)</li> <li>✓ Poly(1-3-bis(p-carboxyphenoxy) propane) (PCPP)</li> <li>✓ Poly(1-6-bis(p-carboxy phenoxoy)hexane) (PCPH)</li> </ul>  |
| Poly(propylene                                     |  |

|  |   |
|--|---|
| fumarate) PPF                                      |   |
| Pseudo poly(amino acid):                           | <ul style="list-style-type: none"> <li>✓ Tyrosine-derived poly(amino acids) using desaminotyrosyl-tyrosine alkyl esters as the building blocks</li> <li>✓ Tyrosine containing poly(DTR-PEG carbonate) and poly(DTR-PEG ether)</li> </ul>  |
| Poly (alkyl cyanoacrylate)s (PCA)                  |   |
| Poly(alkyl cyanoacrylate)s (PCA)                   |   |
| Polyphosphazenes:                                  | (More than 500 different types!)  |
| Polyphosphoesters                                  |   |
| <b>Ενζυματικά Διασπώμενα Πολυμερή ως Βιοϋλικά:</b> |   |
| Proteins and Poly(amino acids):                    | <ul style="list-style-type: none"> <li>✓ Collagen (πρωτεΐνη), ✓ Natural poly(amino acids) : as cyanophycin, poly(e-L-lysine) and poly-g-glutamic acid</li> <li>✓ Poly-g-glutamic acid (g-PGA)</li> <li>✓ Synthetic poly(amino acids) : : Poly (L-glutamic acid) (L-PGA), Poly(aspartic acid) (PAA)</li> <li>✓ Elastin,</li> <li>✓ Elastin-like polypeptides (ELP)</li> <li>✓ Fibrin</li> <li>✓ Albumin</li> </ul> |
| Polysaccharides:                                   | <ul style="list-style-type: none"> <li>✓ Polysaccharides of human origin : Hyaluronic acid (HA), Chondroitin sulfate.</li> <li>✓ Polysaccharides of non-human origin: Chitin and chitosan, Alginate acid.</li> </ul>  |

### 2.3.1. Πολύ-ε-καπρολακτόνη (PCL)

Η πολύ-ε-καπρολακτόνη (PCL) είναι ένα από τα παλαιότερα πολυμερή καθώς πρώτη φορά συντέθηκε από την ομάδα Carothers στις αρχές του 1930.<sup>62</sup> Η πολύ-ε-καπρολακτόνη (PCL) ανήκει στην κατηγορία των αλειφατικών πολυεστέρων. Είναι ένας σύνθετος γραμμικός πολυεστέρας με κρυσταλλικότητα σχεδόν 50%.<sup>63</sup> Σύνθεση της πολύ-ε-καπρολακτόνης γίνεται με πολυμερισμό ανοικτού δακτυλίου του 6-μέλους λακτόνης, ε-καπρολακτόνη (ε-CL), χρησιμοποιώντας οκταϊκό κασσίτερο ως καταλύτη παρουσία αζώτου.<sup>59,64</sup> Οι μηχανισμοί που χρησιμοποιούνται είναι ανιονικοί, κατιονικοί, συντονισμού ή πολυμερισμού. Πρόσφατα έχει αναφερθεί και ενζυμική κατάλυση του πολυμερισμού.<sup>59</sup>

Λόγω της δομής της η πολυκαπρολακτόνη κρυσταλλώνεται εύκολα είναι σκληρή και εύκαμπτη. Διαθέτει εξαιρετική ικανότητα να σχηματίζει μίγματα με μία ποικιλία πολυμερών καθώς και είναι ιδιαίτερα διαλυτή σε οργανικούς διαλύτες. Η θερμοκρασία τήξης της κυμαίνεται από 50 έως 61°C. Η θερμοκρασία υαλώδους μετάπτωσης (Tg) είναι αρκετά χαμηλή στους -60 °C. Έτσι, η πολυκαπρολακτόνη είναι ελαστική και παρουσιάζει υψηλή διαπερατότητα σε χαμηλά μοριακά βάρη στη θερμοκρασία σώματος. Ο ρυθμός βιοαποικοδόμησης της είναι αρκετά αργός. Επιπλέον, οι μηχανικές ιδιότητες του πολυμερούς αυτού μπορούν να ρυθμιστούν και να σχεδιαστούν ανάλογα με τα επιθυμητά χαρακτηριστικά. Επομένως, όλα όσα αναφέρθηκαν προηγουμένως σε συνδυασμό με την αποδεδειγμένη βιοσυμβατότητα, κάνουν την πολυκαπρολακτόνη ένα πολλά υποσχόμενο υποψήφιο συνθετικό πολυμερές για την επιδιόρθωση και αναγέννηση ιστών.<sup>59,65,66,67</sup>

Πιο αναλυτικά, ο ρυθμός της βιοαποικοδόμησης συνήθως φτάνει τους 24 μήνες.<sup>68</sup> Σε ορισμένες περιπτώσεις, κατάλληλη συνθετική διαδικασία μπορεί να οδηγήσει σε αύξηση του χρόνου αποικοδόμησης έως και τα 4 χρόνια.<sup>69</sup> Στους μικροοργανισμούς, όπως είναι οι μύκητες και τα βακτήρια η πολυκαπρολακτόνη αποικοδομείται σχετικά γρήγορα λόγω παρουσίας κατάλληλων ενζύμων. Όμως στα θηλαστικά δε συμβαίνει κάτι τέτοιο, καθώς τα ένζυμα αυτά απουσιάζουν με αποτέλεσμα η βιοαποικοδόμηση να γίνεται αποκλειστικά μέσω της υδρόλυσης των εστερικών δεσμών που είναι μια αρκετά αργή διαδικασία.<sup>70</sup> Η διαδικασία υδρόλυσης ξεκινά από την εξωτερική επιφάνεια του πολυμερούς με αποτέλεσμα σταδιακά το πολυμερικό στρώμα λεπταίνει και μειώνεται το συνολικό μοριακό βάρος.<sup>71</sup> Η αποικοδόμηση οφείλεται στη διείδυση μορίων νερού εντός της πολυμερικής μήτρας γεγονός που προκαλεί υδρόλυση των δεσμών που συγκρατούν την συνολική δομή. Αυτό οδηγεί σε ταυτόχρονη απελευθέρωση μορίων ακετυλο-CoA, τα οποία απομακρύνονται από τον οργανισμό μέσω του κύκλου του κιτρικού οξέος.<sup>72</sup>

Η πολυκαπρολακτόνη έχει χαμηλή αντοχή στον εφελκυσμό (περίπου 23MPa), αλλά μεγάλη επιμήκυνση (4700%). Λόγω της αργής αποικοδόμησης, της υψηλής διαπερατότητας σε πολλά φάρμακα, των μηχανικών της ιδιοτήτων και της μη τοξικότητάς της, η πολυκαπρολακτόνη αρχικά ερευνήθηκε ως υλικό για τη στοχευμένη μεταφορά φαρμάκων. Εκτός από τη χρήση σε πλατφόρμες μεταφοράς φαρμάκων, έχει χρησιμοποιηθεί σε διάφορες κλινικές μελέτες με ποικίλες μορφές, όπως μικροσφαίρες<sup>73,74</sup> και νανο-ίνες που συντίθεται με την τεχνική του electrospinning<sup>75,76,77,78</sup> αλλά και με τη μορφή νανοσωματιδίων στα οποία μπορούμε να ενσωματώσουμε διάφορα φάρμακα. Χάρη στην εξαιρετική βιοσυμβατότητά του, το PCL έχει επίσης ερευνηθεί εκτενώς ως ικρίωμα για την μηχανική ιστών, σε ορθοπεδικές εφαρμογές, καθώς και για την κατασκευή ραμμάτων.



**Σχήμα 2.4** Η δομή της πολυκαπρολακτόνης

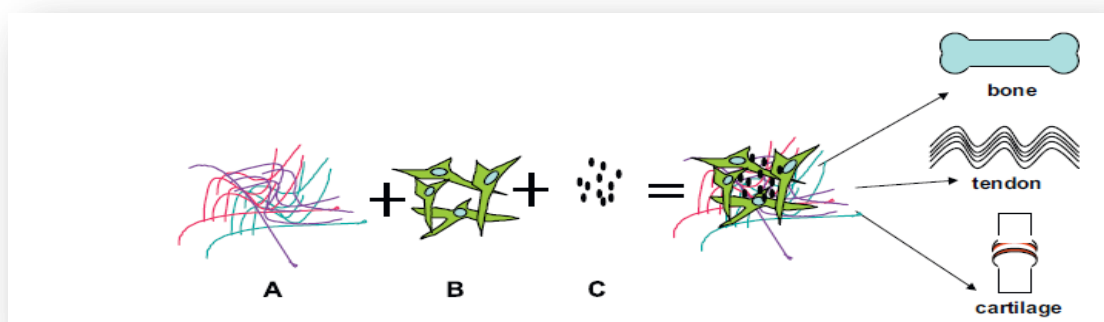
### 2.3.2. Ιστική Αναγέννηση (Tissue Engineering)

Ως μηχανική ιστού (tissue engineering) μπορούμε να ορίσουμε την εφαρμογή των φυσικών θεωριών και αρχών, για τον σχεδιασμό, την κατασκευή, την τροποποίηση, την ανάπτυξη και την διατήρηση των ζωντανών ιστών. Το πεδίο της ιστικής αναγέννησης θεωρείται ένα διεπιστημονικό πεδίο, καθώς πολλοί επιστήμονες διαφορετικού επιστημονικού υπόβαθρου συνεισφέρουν γνώση που προέρχεται από την ιατρική επιστήμη, την μοριακή βιολογία, την μηχανική, την επιστήμη των υλικών κ.α.

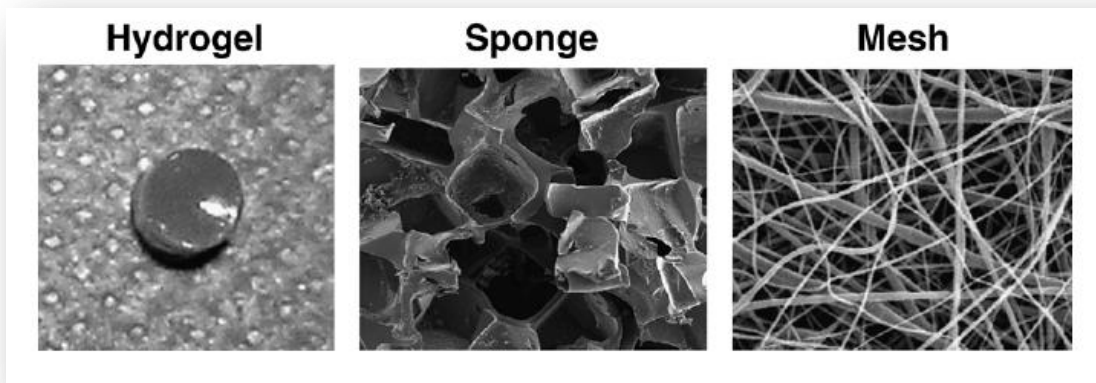
Ο κυριότερος στόχος της μηχανικής ιστού, είναι να βοηθήσει στην επιδιόρθωση και την αναγέννηση ιστών, in vivo, καθώς και την ανάπτυξη ιστών in vitro για τη χρήση τους ως μοντέλα, τόσο στις μελέτες για φυσιολογικές όσο και για παθολογικές καταστάσεις. Επίσης, στόχος της μηχανικής ιστού, είναι η παροχή αντικαταστάσιμων μελών για τον οργανισμό και το σώμα.<sup>79</sup> Μερικές φορές, οι ιστοί αυτοεπιδιορθώνονται, σχηματίζοντας ιστό, τις ουλές, ή ιστό που δεν παρουσιάζει κανονική λειτουργία ή εμφάνιση. Για παράδειγμα, οι μηχανικοί ιστού εμφυτεύουν πολυμερικούς νανοσωλήνες για την προώθηση της ανάπτυξης και της επανασύνδεσης των

κατεστραμμένων νεύρων, καθώς επίσης χρησιμοποιούν καλλιεργημένα μοσχεύματα δέρματος, για την κάλυψη βαθιών εγκαυμάτων. Ορισμένες φορές, η κανονική διαδικασία αναγέννησης ιστών, είναι πολύ αργή και συνεπώς είναι επιτακτική η ανάγκη για προσωρινή συμπληρωματική φροντίδα που πρέπει να λάβει ο ασθενής, για τον εφοδιασμό ζωτικής σημασίας λειτουργιών που λείπουν από τον ασθενή.

Η βασική αρχή της ιστικής αναγέννησης μπορεί να χωριστεί σε τρία βασικά τμήματα. Στο πρώτο κομμάτι, ανήκει η εύρεση του κατάλληλου **ικριώματος (scaffold)**, (βιοδιασπώμενο, ή όχι), το οποίο μπορεί να υποστηρίξει τον σχηματισμό του ιστού. Τα περισσότερα κύτταρα θηλαστικών πρέπει να προσκολληθούν στο κατάλληλο υπόστρωμα προκειμένου να πολλαπλασιαστούν και να λειτουργούν κατάλληλα. Το ιδανικό ικρίωμα πρέπει να είναι βιοσυμβατό, βιοδιασπώμενο, μη τοξικό, με καλές μηχανικές ιδιότητες και μεγάλη επιφάνεια σε σχέση με την αναλογία όγκου (κατάλληλο πορώδες), με απώτερο στόχο να προάγει τη κυτταρική προσκόλληση, τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό, καθώς και τη κυτταρική διαφοροποίηση<sup>80</sup>. Όσον αφορά τη μορφολογία του ικριώματος, υπάρχει ανάγκη για τρισδιάστατα ικρίωματα, καθώς πολλές έρευνες υποστηρίζουν ότι οι 3D δομές επιτρέπουν την κυτταρική ανάπτυξη και οργάνωση σε ένα χώρο που μοιάζει με τον μητρικό όσον αφορά τις συνθήκες ανάπτυξης των κυττάρων στους ιστούς *in vivo*<sup>81</sup>. Σήμερα, ένα μεγάλο εύρος υλικών μελετώνται για ικρίωματα, με διαφορετικές αρχιτεκτονικές, όπως: υδρογέλες (hydrogel), πλέγματα (mesh) σπόγγοι (sponge) κτλ. (σχήμα 2.6)



**Σχήμα 2.5** Η αρχή της μηχανικής ιστού. Η λογική περιλαμβάνεται στους τρεις σημαντικούς παράγοντες: Πρώτον ένα βιοσυμβατό βιοϋλικό (A), δεύτερον επαρκή κύτταρα, όπως τα βλαστικά κύτταρα (B) και τρίτον η προσθήκη εξειδικευμένων βιοενεργών ουσιών (C) συμβάλλοντας στη κατάλληλη διαφοροποίηση των κυττάρων και τον σχηματισμό του συγκεκριμένου ιστού, όπως οστό, τένοντας ή χόνδρος.<sup>82</sup>



**Σχήμα 2.6** Παραδείγματα διαφορετικών ικριωμάτων που χρησιμοποιούνται στη μηχανική ιστού

Ανάμεσα στις τεχνικές ανάπτυξης ικριωμάτων, ξεχωρίζουν:

- **Η μέθοδος διαχωρισμού φάσης (Phase separation):** Εργαστηριακή μέθοδος, εύκολη, με μικρή γκάμα στη χρήση πολυμερών και χαμηλή απόδοση.
- **Η αυτοοργάνωση (self-assembly):** Εργαστηριακή μέθοδος, δύσκολη, με δημιουργία ιών διαμέτρου 5 – 8 nm, με μικρή γκάμα στην χρήση πολυμερών και χαμηλή απόδοση.
- **Η ηλεκτροστατική ινοποίηση (electrospinning):** Εργαστηριακή και βιομηχανική μέθοδος, εύκολη, φθηνή, με μεγάλο αριθμό πολυμερών που μπορούν να χρησιμοποιηθούν και μεγάλο εύρος διαμέτρων των ιών από μερικά νανόμετρα έως μερικά μικρόμετρα, ανάλογα με τις ανάγκες του πειράματος.<sup>83</sup>

Με τις τεχνικές αυτές είναι εφικτή η δημιουργία πορώδους ικριώματος.

Το δεύτερο κομμάτι που αναφέρεται στην ιστική αναγέννηση περιλαμβάνει τους **υποψήφιους κυτταρικούς τύπους** που πρέπει να χρησιμοποιηθούν, έτσι ώστε να σχηματιστεί ο κατάλληλος ιστός. Αν και δεν είναι ακόμα ξεκάθαρο ποιος κυτταρικός τύπος είναι ο κατάλληλος, για *in vitro* εφαρμογές και *in vivo* μεταμόσχευση, ένας μεγάλος αριθμός μελετών έχει δείξει την επίδραση των ζωντανών κυττάρων στην αναγέννηση οστικού ιστού και χόνδρου.<sup>84,85,86,87</sup> Χονδροκύτταρα, ινοβλάστες, stem cells, καθώς επίσης γενετικά τροποποιημένα κύτταρα έχουν μελετηθεί με σκοπό να βρεθεί ο μηχανισμός δράσης τους, τόσο για *in vitro* όσο και *in vivo* χρήση τους, ως μια πιθανή πηγή κυττάρων για εμφυτεύματα χόνδρου. Ο απώτερος στόχος λοιπόν, είναι η εύρεση του κατάλληλου κυτταρικού τύπου ο οποίος εύκολα απομονώνεται και καλλιεργείται, παράγοντας μεγάλες ποσότητες κυττάρων διαθέσιμες για χρήση. Σε αυτή την κατεύθυνση, τα mesenchymal

stem cells παρουσιάζουν μεγάλο ενδιαφέρον για πιθανή οστεογένεση, δίνοντας ελπίδες σε αυτό το κομμάτι της ιστικής αναγέννησης.

Το τρίτο μέρος, το οποίο συμβάλλει επίσης στην αναγεννητική ιατρική, είναι η χρησιμότητα των **παραγόντων διέγερσης (stimulating factors)**. Σήμερα, ένα πλήθος τέτοιων παραγόντων υπάρχουν, που πρόκειται είτε να επιταχύνουν και / ή να ενισχύσουν τον σχηματισμό ιστού, ή να παρέχουν μηχανική σταθερότητα, διατηρώντας τη δομή του ικριώματος για το σωστό κυτταρικό πολλαπλασιασμό. Αυξητικοί παράγοντες συνήθως περιλαμβάνουν πρωτεΐνες, ορμόνες που είναι ζωτικής σημασίας, καθώς προτίθενται να ελέγχουν τη δραστηριότητα των εξειδικευμένων ιστικών κυττάρων, μέσω της ρύθμισης του μεταβολισμού καθώς της διαφοροποίησης, του πολλαπλασιασμού και την έκφραση των πρωτεϊνών της εξωκυττάριας μήτρας. Ωστόσο, είναι σημαντικό να τονιστεί ότι οι αυξητικοί παράγοντες δίνουν διαφορετικά αποτελέσματα ανάλογα με τον τύπο των κυττάρων και τις συνθήκες καλλιέργειας<sup>80</sup>. Όπως αναφέρεται παραπάνω, η μηχανική σταθερότητα παίζει το ρόλο της, ειδικά όταν σχετίζεται με ιστό οστού ή ιστό χόνδρου. Ένας άλλος στόχος των παραγόντων διέγερσης είναι η γονιδιακή θεραπεία. Η τεχνική της γονιδιακής θεραπείας χρησιμοποιείται στοχεύοντας στην καλύτερη αποτελεσματικότητα της μηχανικής ιστού. Η γονιδιακή θεραπεία είναι μια εναλλακτική μέθοδος που παρέχει την ικανότητα για εγκλεισμό βιοδραστικών μορίων σε ικριώματα και μέσω της έκφρασης συγκεκριμένων γονιδίων, η απελευθέρωση των πρωτεϊνών παρέχεται τοπικά μέσα στα κύτταρα ή/ και στους ιστούς.

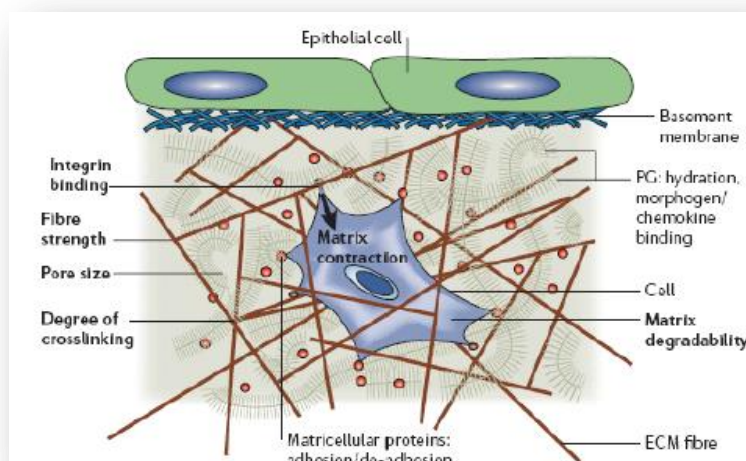
### **2.3.3. Ο Ρόλος των Ινών στο Ικρίωμα (Scaffold)**

Η εξωκυττάρια μήτρα ή εξωκυττάρια θεμέλια ουσία (ECM – Extracellular Matrix) είναι το μη κυτταρικό συστατικό που υπάρχει σε όλους τους ιστούς και όργανα, και δεν παρέχει μόνο τα βασικά κυτταρικά συστατικά για τα φυσικά ικριώματα, αλλά κινεί και ζωτικής σημασίας βιοχημικές και εμβιομηχανικές διεργασίες που απαιτούνται για τη μορφογένεση του ιστού, τη διαφοροποίηση και την ομοιόσταση.<sup>88</sup>

Η σημασία της ECM φαίνεται χαρακτηριστικά από το ευρύ φάσμα των συνδρόμων που προκύπτουν από γενετικές ανωμαλίες στις πρωτεΐνες της ECM και τα οποία μπορεί να είναι από ήπια έως σοβαρά. Παρά το γεγονός ότι ουσιαστικά, η ECM αποτελείται από νερό, πρωτεΐνες και πολυσακχαρίτες, κάθε ιστός έχει ECM με μια μοναδική σύνθεση και τοπολογία που παράγεται κατά τη διάρκεια της ανάπτυξης του ιστού μέσω ενός δυναμικού και αμοιβαίου διάλογου μεταξύ

βιοχημικών και βιοφυσικών διεργασιών μεταξύ των διάφορων κυτταρικών στοιχείων (π.χ. επιθηλιακά, ινοβλάστες, λιποκύτταρα, ενδοθηλιακά) καθώς και το πρωτεϊνικό μικροπεριβάλλον.<sup>89</sup>

Το εξωκυττάριο περιβάλλον συνίσταται από ένα δίκτυο στηρικτικών κυττάρων που παράγουν ένα οργανωμένο – άφθονο εξωκυττάριο δίκτυο ινιδικών πρωτεϊνών που αναπτύσσονται μέσα σε ενυδατομένη ζελατινοειδή δομή (σχήμα 2.7).



**Σχήμα 2.7** Οι μηχανικές ιδιότητες της ECM καθορίζονται από τη σύνθεση, την αρχιτεκτονική δομή και το cross linking των πρωτεϊνών.<sup>90</sup>

Η ECM αποτελείται από δύο κύριες κατηγορίες μακρομορίων: **τις πρωτεογλυκάνες** (PG\_proteoglycans) και **τις ινιδικές πρωτεΐνες** (fibrous proteins).

- **Πρωτεογλυκάνες:** μεγάλα μόρια, με χωροταξική οργάνωση και φορτίο, που στόχο έχουν να διευκολύνουν την εκλεκτική διάχυση διαφορετικών μορίων μέσω πόρων. Τέτοιες πρωτεογλυκάνες είναι τα: υαλουρονικό οξύ, θειϊκή χονδροϊτίνη, θειϊκή δερματάνη, θειϊκή ηπαράνη, ηπαρίνη και θειϊκή κερατάνη
- **Ινιδικές πρωτεΐνες:** Υπάρχουν 4 κύριες πρωτεΐνες που σχηματίζουν ινίδια στην εξωκυττάρια θεμέλια ουσία και είναι κολλαγόνο (ενίσχυση της αντοχής των ιστών με την δημιουργία κολλαγόνων ινών), ινιδίνη (αποτελεί κύριο συστατικό των εξωκυττάρων μικροϊνιδίων), ελαστίνη (υπεύθυνες για την ελαστικότητα των ιστών), ινονεκτίνη (λειτουργεί ως μεσολαβητική πρωτεΐνη για τη προσκόλληση κυττάρων στην εξωκυττάρια θεμέλια ουσία).



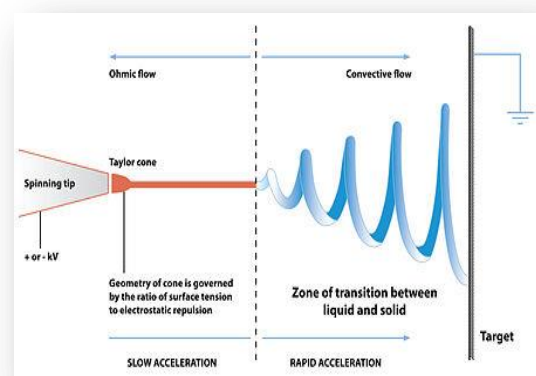
Όπως έχει αναφερθεί και παραπάνω, για την επιτυχή δημιουργία ιστού, απαιτούνται τεχνητά ικρίσματα που φέρουν παρόμοιες χημικές συνθέσεις, μορφολογίες, και επιφανειακές λειτουργικές ομάδες σε σχέση με τα φυσικά αντίστοιχά τους. Τα φυσικά ικρίσματα για την ανάπτυξη των ιστών είναι τρισδιάστατα (3D) δίκτυα ινών μεγέθους νανομέτρου και αποτελούνται από διάφορες ινδικές πρωτεΐνες (ECM). Για το λόγο αυτό, non - woven ινώδεις μεμβράνες προερχόμενες από ηλεκτροστατική ινοποίηση, χρησιμοποιούνται για την δημιουργία 3D πορώδων δομών, με σχετικά μεγάλες περιοχές επιφάνειας σε σχέση με τον όγκο τους. Το αποτέλεσμα είναι η δημιουργία μιας κατηγορίας πολλά υποσχόμενων υλικών-δομών, με στόχο να μιμούνται τη φυσική εξωκυττάρια μήτρα (ECM) που απαιτείται για την αναγέννηση των ιστών.<sup>91</sup>

Στο σημείο αυτό να αναφέρουμε, πως τα νανοσύνθετα τρισδιάστατα ικρίσματα, που αποτελούνται από βιοδιασπώμενα πολυμερή μπορούν να αναπτυχθούν με τη χρήση διαφόρων νανοδομών και μεθόδους επεξεργασίας, όπως:

- solvent casting,
- particulate leaching,
- gas foaming,
- emulsion freeze-drying,
- electrospinning,
- rapid prototyping &
- thermally induced phase separation.

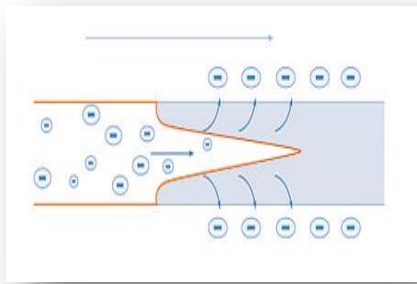
#### 2.3.4. Μέθοδος της Ηλεκτροστατικής Ινοποίησης (Electrospinning) για Κατασκευή Τρισδιάστατων Ινώδων Ικριωμάτων

Η διαδικασία χρησιμοποίησης ηλεκτροστατικών δυνάμεων για τον σχηματισμό συνθετικών ινών είναι γνωστή για πάνω από 100 χρόνια. Αυτή η διαδικασία, γνωστή ως ηλεκτροστατική ινοποίηση (electrospinning), χρησιμοποιεί μια πηγή υψηλής τάσης για την έγχυση φορτίου συγκεκριμένης πολικότητας στο πολυμερικό



**Σχήμα 2.8** Η κατανομή του φορτίου στην ίνα καθώς η ίνα στεγνώνει κατά τη διάρκεια της πτώσης

διάλυμα ή τήγμα, το οποίο στη συνέχεια επιταχύνεται ως προς ένα συλλέκτη αντίθετης



Σχήμα 2.9 Taylor cone

πολικότητας. Καθώς η ηλεκτροστατική έλξη μεταξύ του αντίθετα φορτισμένου υγρού και του συλλέκτη και οι ηλεκτροστατικές απώσεις μεταξύ των όμοιων φορτίων στο υγρό γίνονται ισχυρότερες από το πρόσθιο άκρο του διαλύματος, αλλάζει από ένα στρογγυλεμένο μηνίσκο σε ένα κώνο (Taylor cone). Ένας πίδακας ινών τελικά εκτοξεύεται από τον κώνο Taylor καθώς η δύναμη του

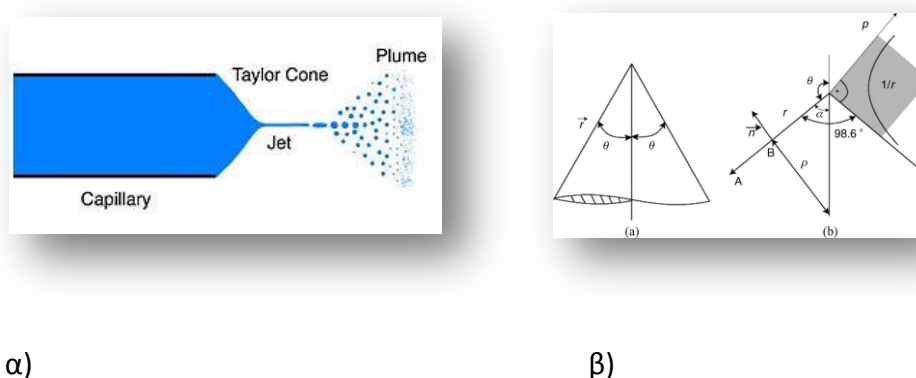
ηλεκτρικού πεδίου υπερβαίνει τις επιφανειακές τάσεις του υγρού (Σχήμα 2.8 & 2.9).

Ο πίδακας των ινών ταξιδεύει μέσω της ατμόσφαιρας επιτρέποντας τον διαλύτη να εξατμιστεί με αποτέλεσμα την εναπόθεση των στερεών πολυμερικών ινών πάνω στον συλλέκτη. Οι ίνες που παράγονται χρησιμοποιώντας αυτή τη διαδικασία τυπικά έχουν διαμέτρους τάξης μεγέθους από μερικά μικρά μέχρι κάποιες δεκάδες νανόμετρων. Η ικανότητα να παράγονται υλικά με ευκολία σε μεγέθη της κλίμακας των βιολογικών υλικών έχει δημιουργήσει ένα νέο ενδιαφέρον για την τεχνική electrospinning, ειδικά για εφαρμογές ιστικής αναγέννησης (tissue engineering) και στοχευμένης μεταφοράς φαρμάκου (drug delivery).

Ενώ η τεχνική του electrospinning έχει αποδείξει ότι είναι μια σχετικά απλή και ευέλικτη μέθοδος για σχηματισμό ινώδων στρωμάτων τυχαίου προσανατολισμού (non woven), ένας αριθμός παραμέτρων της τεχνικής αυτής, μπορεί να επηρεάσει σημαντικά τις ιδιότητες των παραγόμενων ινών. Αρχικά, οι τεχνικές δυσκολίες σχετικά με τον αριθμό αυτών των παραμέτρων ήταν αποτρεπτικές όσον αφορά την καθίδρυση της τεχνικής electrospinning ως μια εφικτή τεχνική για την δημιουργία πολυμερικών ινών μικρής διαμέτρου. Το 1934 ο Formhals πατεντάρισε μια διαδικασία και μια συσκευή η οποία χρησιμοποιούσε ηλεκτρικό φορτίο για την δημιουργία συνθετικών ινών, και έτσι η τεχνική electrospinning ήρθε στην επιφάνεια ως μια έγκυρη τεχνική για τη παραγωγή ινών μικρής διαμέτρου<sup>92</sup>.

Ακολουθώντας την δουλειά του Formhals, 30 χρόνια πριν δημοσιεύσει ο Taylor τη σχετική δουλειά για τη διαδικασία δημιουργίας του πίδακα, η εστίαση στράφηκε προς την ανάπτυξη της καλύτερης κατανόησης της διαδικασίας του electrospinning. Το 1969, ο Taylor δημοσίευσε τη δουλειά του, εξετάζοντας πώς η πολυμερική σταγόνα στο τέλος του τριχοειδούς συμπεριφέρεται όταν εφαρμόζεται ένα ηλεκτρικό πεδίο.<sup>93</sup> Στη μελέτη του βρήκε ότι η σταγόνα που κρέμεται

αναπτύσσεται σε κώνο (σήμερα ονομάζεται κώνος του Taylor) όταν οι επιφανειακές τάσεις εξισορροπούνται από τις ηλεκτροστατικές δυνάμεις (σχήμα 2.10). Επίσης βρήκε ότι ο πίδακας ινών εκπέμπεται από την κορυφή του κώνου, που είναι και ένας λόγος γιατί το electrospinning μπορεί να χρησιμοποιηθεί για την παραγωγή ινών με διαμέτρους σημαντικά μικρότερους από τη διάμετρο του τριχοειδούς από το οποίο εκτινάσσονται. Ο Taylor ακολούθως καθόρισε μετά από εξέταση διαφορετικών υγρών μεγάλου ιξώδους, ότι μια γωνία  $49.3^\circ$  σε σχέση με τον άξονα του κώνου στη κορυφή του κώνου (ή μια γωνία κώνου  $98.6^\circ$ ) είναι απαραίτητη προκειμένου να εξισορροπηθούν οι επιφανειακές τάσεις με τις ηλεκτροστατικές δυνάμεις (σχήμα 2.10).

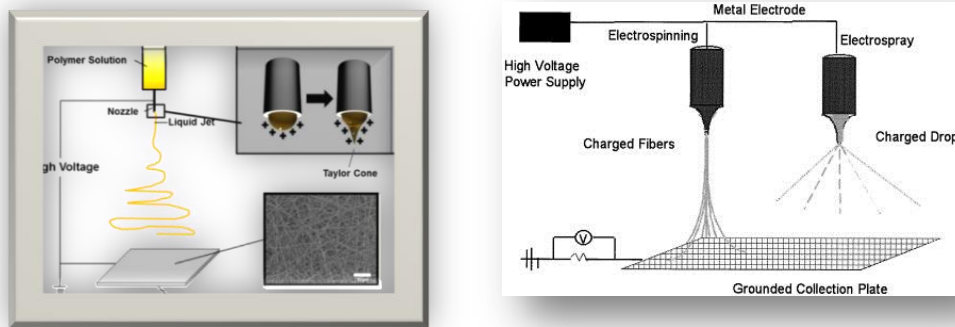


**Σχήμα 2.10** α) απεικόνιση του κώνου Taylor, του πίδακα, καθώς και του spray του υλικού<sup>94</sup> β) Χαρακτηριστικές γωνίες στον κώνο Taylor<sup>95</sup>

Η μέθοδος της ηλεκτροστατικής ινοποίησης, κυρίως χρησιμοποιώντας ηλεκτροστατικές δυνάμεις για την παραγωγή ινών πολυμερούς, έχει τις ρίζες του πίσω στη διαδικασία του electrospraying, στο οποίο στερεά σταγονίδια πολυμερούς σχηματίζονται παρά ίνες. Στην πραγματικότητα, ένας αριθμός παραμέτρων πρέπει να βελτιστοποιηθεί, ώστε να παράγονται ίνες, αντί για σταγονίδια, και μια τυπική συσκευή ηλεκτροστατικής ινοποίησης μπορεί να χρησιμοποιηθεί για τον σχηματισμό ινών, σταγονιδίων, ή δομών με 'beads' ανάλογα με τις διάφορες παραμέτρους επεξεργασίας, όπως π.χ. η απόσταση μεταξύ της πηγής και συλλέκτη. Μάλιστα, όπως επιβεβαιώνεται από πρόσφατες αναφορές, καλύτερη κατανόηση των παραμέτρων επεξεργασίας έχει οδηγήσει στο σχηματισμό ινών με διαμέτρους στην περιοχή των 100-500 nm, οι οποίες τυπικά αναφέρονται ως νανοΐνες<sup>96</sup>.

Μια τυπική εγκατάσταση electrospinning αποτελείται από ένα τριχοειδή σωλήνα μέσω του οποίου το υγρό ωθείται για να υποστεί ηλεκτροστατική ινοποίηση, μια υψηλή πηγή τάσης με θετική ή αρνητική πολικότητα, η οποία εγχέει φορτίο στο υγρό και ένα γειωμένο συλλέκτη (σχήμα 2.11).

Μία αντλία σύριγγας, οι βαρυτικές δυνάμεις, ή πεπιεσμένο αέριο χρησιμοποιείται συνήθως για να αναγκάσει το υγρό

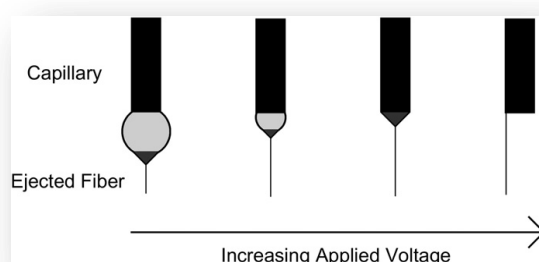


**Σχήμα 2.11** Τυπική διάταξη συσκευής electrospinning (αριστερά) και electrospraying (δεξιά)<sup>97</sup>

μέσω μιας μικρής διαμέτρου του τριχοειδούς να σχηματιστεί μια σταγόνα στην άκρη. Ένα ηλεκτρόδιο από την πηγή υψηλής τάσεως στη συνέχεια εμβαπτίζεται μέσα στο υγρό ή μπορεί να συνδέεται απευθείας με το τριχοειδή σωλήνα εάν χρησιμοποιείται μια μεταλλική βελόνα. Η πηγή τάσης τίθεται σε λειτουργία και η φόρτιση εγχέεται εντός του διαλύματος του πολυμερούς. Με την αύξηση της δύναμης του ηλεκτρικού πεδίου προκαλούνται απωστικές αλληλεπιδράσεις μεταξύ των όμοιων φορτίων στο υγρό και ελκτικές δυνάμεις μεταξύ των ετερόσημα φορτισμένων υγρού και συλλέκτη έτσι ώστε να αρχίσουν να ασκούνται δυνάμεις εφελκυσμού στο υγρό, επιμηκύνοντας την κρεμάμενη σταγόνα του υγρού στο άκρο του τριχοειδούς. Καθώς η δύναμη του ηλεκτρικού πεδίου αυξάνεται περεταίρω από ένα σημείο θα επιτευχθεί ισορροπία μεταξύ των ηλεκτροστατικών δυνάμεων και της επιφανειακής τάσης του υγρού οδηγώντας στην ανάπτυξη του κώνου του Taylor. Εάν η εφαρμοζόμενη τάση αυξάνεται πέραν αυτό το σημείο ένας πίδακας ινών αποβάλλεται από την κορυφή του κώνου για να επιταχυνθεί προς το γειωμένο συλλέκτη.<sup>94</sup>

Παρά την σχετική ευκολία της τεχνικής electrospinning υπάρχει ένας σημαντικός αριθμός παραμέτρων που μπορούν να επηρεάσουν τη δομή και τον σχηματισμό των ινών. Ομαδοποιώντας τις παραμέτρους με βάση των σχετικών επιπτώσεων της electrospinning διαδικασίας, αυτές οι παράμετροι είναι η εφαρμοζόμενη τάση, ο ρυθμός ροής του πολυμερούς (ταχύτητα), και η απόσταση τριχοειδούς-συλλέκτη. Επιπλέον, και οι τρεις παράμετροι μπορούν να επηρεάσουν το σχηματισμό beads στις παραγόμενες ίνες.

**Εφαρμοζόμενη τάση:** Η δύναμη του εφαρμοζόμενου ηλεκτρικού πεδίου ελέγχει τον σχηματισμό ινών διαμέτρου από μερικά μικρά έως κάποιες δεκάδες νανομέτρων. Μη βέλτιστη ηλεκτρική δύναμη πεδίου μπορεί να οδηγήσει σε ελαττωματικές ίνες με beads, ή ακόμα και αποτυχία σχηματισμού των ινών από τον πίδακα. Σε χαμηλές τιμές τάσεων μπορεί να σχηματίζεται ο κώνος Taylor στην άκρη του τριχοειδούς σωλήνα, ωστόσο όσο αυξάνεται η τάση που εφαρμόζεται, τόσο μειώνεται ο όγκος της σταγόνας, έως ότου ο κώνος Taylor που σχηματίστηκε στην άκρη του τριχοειδούς να σχετίζεται με μια αύξηση των ελαττωματικών ινών και με την εμφάνιση των beads<sup>85,86</sup>, όπως φαίνεται στο παρακάτω σχήμα, (σχήμα 2.12).



**Σχήμα 2.12** Επίδραση της εφαρμοζόμενης τάσης στον σχηματισμό του κώνου Taylor. Σε χαμηλές τιμές τάσης, η κρεμάμενη σταγόνα σχηματίζεται στο tip του τριχοειδούς σωλήνα. Καθώς όμως αυξάνεται η τάση (από αριστερά προς δεξιά) ο όγκος της κρεμάμενης σταγόνας μειώνεται μέχρι να σχηματιστεί ο κώνος Taylor. Περαιτέρω αύξηση της εφαρμοζόμενης τάσης έχει ως αποτέλεσμα να εκτοξεύεται ο πίδακας ινών από το εσωτερικό του τριχοειδούς, το οποίο συνδέεται με αύξηση των σφαιριδίων ελαττωμάτων (beads).<sup>94</sup>

**Ρυθμός ροής υγρού:** Ο ρυθμός ροής του πολυμερούς έχει επίσης αντίκτυπο στο μέγεθος των ινών, και επιπλέον, μπορούν να επηρεάσουν τόσο το πορώδες των ινών καθώς και το σχήμα των ινών. Ως αποτέλεσμα της δουλειάς του ο Taylor συνειδητοποίησε ότι το σχήμα κώνου στο άκρο του τριχοειδούς δεν μπορεί να διατηρηθεί αν η ροή του διαλύματος μέσω του τριχοειδούς είναι ανεπαρκής για να αντικαταστήσει το διάλυμα που εκτοξεύεται μέσω του πίδακα ινών.<sup>100</sup> Ο Egelski εξέτασε τις επιπτώσεις της ταχύτητας ροής για τη δημιουργία ινών από ένα διάλυμα πολυστυρενίου/τετραϋδροφουρανίου (THP). Στη μελέτη αυτή αποδείχθηκε ότι αυξήθηκε η διάμετρος των ινών καθώς και το μέγεθος των πόρων με την αύξηση του ποσοστού ροής. Επίσης, σε πολύ υψηλούς ρυθμούς ροής παρατηρήθηκαν σημαντικές ποσότητες σφαιριδίων beads στις ίνες (δημιουργία ινών με ατέλειες), λόγω της αδυναμίας των ινών να στεγνώσουν εντελώς πριν

φτάσουν τον συλλέκτη. Αυτή η ατελής ξήρανση των ινών οδηγεί επίσης στο σχηματισμό πεπλατυσμένων ινών σε σύγκριση με τις ίνες με κυκλική διατομή.

**Απόσταση μεταξύ τριχοειδούς σωλήνα και συλλέκτη ινών:** Ενώ παίζει πολύ μικρότερο ρόλο, η απόσταση μεταξύ της άκρης του τριχοειδούς και του συλλέκτη, μπορεί επίσης να επηρεάσει το μέγεθος των ινών από 1-2 τάξεις μεγέθους. Βέβαια, μεταβάλλοντας αυτήν την απόσταση δίνεται μια άλλη προσέγγιση τόσο στον έλεγχο των διαμέτρων των ινών όσο και στη μορφολογία τους.<sup>101</sup> Επιπλέον, η απόσταση αυτή μπορεί να υπαγορεύσει αν το τελικό αποτέλεσμα είναι δημιουργία ινών (electrospinning) ή σπρέι (electrospraying). Έχει βρεθεί ότι υπάρχει μια ελάχιστη απόσταση που δίνει επαρκή χρόνο στις ίνες να στεγνώσουν πριν φτάσουν στον συλλέκτη (collector).<sup>102</sup> Σε αποστάσεις που είτε είναι πολύ κοντά ή πολύ μακριά, παρατηρούνται σφαιρίδια (beads). Υπάρχουν υλικά ωστόσο για τα οποία δεν παρατηρήθηκε καμία σημαντική επίδραση της απόστασης μεταξύ του άκρου και συλλέκτη στο αποτέλεσμα των ινών.<sup>99</sup> Τέτοια υλικά είναι π.χ. τα εξής: PVA<sup>103</sup>, ζελατίνη<sup>104</sup>, χιτοζάνη.<sup>105</sup>

**Παράμετροι του διαλύματος:** Εκτός από τις παραμέτρους που μπορούμε να μεταβάλουμε στον ίδιο τον μηχανισμό του electrospinning, υπάρχει και ένας αριθμός παραμέτρων του ίδιου του διαλύματος που παίζει σημαντικό ρόλο στον σχηματισμό και τη δομή των ινών (πίνακας 2.3 και πίνακας 2.4). Σε σχετική σειρά ανάλογα με τις επιπτώσεις τους στην διαδικασία της ηλεκτροστατικής ινοποίησης, είναι η συγκέντρωση του πολυμερούς, η πητικότητα του διαλύτη καθώς και η αγωγιμότητα του διαλύτη.

**Πίνακας 2.3** Χαρακτηριστικές παράμετροι και τύπος υπολογισμού τους

| Παράμετρος                    | Μαθηματικός Τύπος                 |
|-------------------------------|-----------------------------------|
| Μήκος                         | $R_0$                             |
| Ταχύτητα                      | $u_0 = \frac{Q}{\pi R_0^2}$       |
| Ηλεκτρικό πεδίο               | $E_0 = \frac{I}{\pi R_0 K}$       |
| Επιφανειακή πυκνότητα φορτίου | $\sigma_o = \epsilon_{air} E_0$   |
| Τάση ιξώδους                  | $\tau_0 = \frac{\eta_0 u_0}{R_0}$ |

Όπου  $K$  είναι η αγωγιμότητα του διαλύματος,  $\sigma$  η επιφανειακή πυκνότητα φορτίου,  $\epsilon_{\text{air}}$  η διηλεκτρική σταθερά του αέρα,  $Q$  ο ρυθμός ροής του όγκου,  $\eta_0$  το ιξώδες του διαλύματος σε μηδενικό ρυθμό διάτμησης, ενώ  $u_0$  η ταχύτητα του πίδακα

**Πίνακας 2.4:** Χαρακτηριστικές παράμετροι και τρόπος επιρροής της μορφολογίας των ινών

| Παράμετρος                                 | Αποτελέσματα στην μορφολογία των ινών   |
|--|---|
| Ηλεκτρικό πεδίο ↑                          | Διάμετρος ινών αρχικά ↑ (όχι μονοτονικά)  |
| Ταχύτητα (ρυθμός ροής) ↑                   | Διάμετρος ινών ↑ (μορφολογίες με beads αν η ροή είναι πολύ υψηλή)                                 |
| Απόσταση μεταξύ τριχοειδούς και συλλέκτη ↑ | Διάμετρος ινών ↓ (μορφολογίες με beads αν η απόσταση είναι πολύ μικρή)                            |
| Συγκέντρωση του πολυμερούς (ιξώδες) ↑      | Διάμετρος ινών ↑ (με ένα βέλτιστο εύρος)  |
| Αγωγιμότητα του διαλύματος ↑               | Διάμετρος ινών ↓ (διευρυμένο εύρος διαμέτρων)   |
| Πτητικότητα του διαλύτη                    | Οι ίνες παρουσιάζουν μικροδομές (πόρους στην επιφάνεια, κάτι το οποίο αυξάνει την επιφάνειά τους) |

Μία από τις κύριες παραμέτρους που έχει επιπτώσεις στη διαδικασία του electrospinning είναι το ιξώδες του πολυμερούς διαλύματος, το οποίο εξαρτάται από τη συγκέντρωση του πολυμερούς και τον τύπο του διαλύτη. Και οι δύο αυτές ιδιότητες έχουν σημαντική επίδραση στη μορφολογία των ινών. Το ιξώδες αποτελεί βασική παράμετρο στο electrospinning γιατί συνδέεται με την έκταση της περιπλοκής της αλυσίδας των πολυμερών μορίων μέσα στο διάλυμα.<sup>106</sup> Το “μπλέξιμο” των πολυμερών είναι κρίσιμο για το σχηματισμό των ινών. Αν τα πολυμερή δεν είναι μπλεγμένα, εναποτίθενται σταγόνες αντί για ίνες πάνω στο δίσκο συλλογής. Λόγω αυτού, τα πολυμερή με υψηλότερο μοριακό βάρος (μεγαλύτερες αλυσίδες) και αυξημένες συγκεντρώσεις πολυμερών ευνοούν το σχηματισμό των ινών. Σε μίγματα πολυμερών, μία αύξηση του λόγου του πολυμερούς με τη χαμηλότερη κρίσιμη συγκέντρωση περιπλοκής μπορεί συχνά να επάγει το electrospinning.<sup>107</sup>

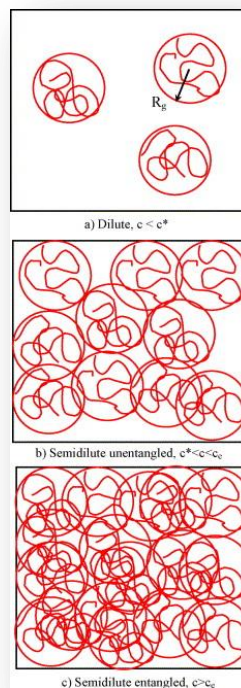


Η κρίσιμη συγκέντρωση επικάλυψης των αλυσίδων  $c^*$ , η οποία είναι η ενδιάμεση συγκέντρωση μεταξύ της διαλυμένης και της ημιδιαλυμένης συγκέντρωσης regimes θεωρείται μία κρίσιμη παράμετρος για το electrospinning (σχήμα 2.13).

Η συγκέντρωση επικάλυψης μπορεί να προσδιοριστεί από το εγγενές ιξώδες ως:<sup>108</sup>

$$c^* \sim [\eta]^{-1}$$

[4.3]



**Σχήμα 2.13** Επίδραση της συγκέντρωσης πολυμερούς στη μορφολογία των εναποθέσεων στο δίσκο συλλογής. (α) σε συγκεντρώσεις πολυμερούς κάτω από την κρίσιμη συγκέντρωση περιπλοκής: σχηματισμός νανοϊνών και σταγόνων (β) σε συγκεντρώσεις πολυμερούς πάνω από την κρίσιμη συγκέντρωση περιπλοκής: σχηματισμός νανοϊνών γ) ξήρανση του διαλύματος του πολυμερούς στην άκρη της βελόνας μπορεί να συμβεί και να οδηγήσει στο σχηματισμό ενός τοπικού gel και συνεπώς να εμποδίσει το σχηματισμό ενός κατάλληλου κώνου Taylor.<sup>109</sup>

Σε χαμηλότερα ιξώδη ο βαθμός του περιπλεξίματος των πολυμερών αλυσίδων είναι συνήθως χαμηλότερος. Γι' αυτό το λόγο, τα jets του πολυμερούς είναι πιο πιθανό να σπάσουν και να σχηματίσουν σταγόνες λόγω της μικρής ιξωδοελαστικής δύναμης, η οποία δεν αντισταθμίζει τις μεγαλύτερες δυνάμεις έκτασης Coulomb που προκαλούν την αποσταθεροποίηση του jet (πίδακα). Γενικώς, οι λεπτές ίνες μπορούν να αποκτηθούν μέσω της μείωσης της συγκέντρωσης του πολυμερούς, αλλά αυτό αυξάνει επίσης το ρίσκο της ανάπτυξης ανεπιθύμητων δομών που



περιέχονται στο στρώμα των ινών με αποτέλεσμα ένα μειωμένο λόγο επιφάνειας προς μάζα. Αυτό μπορεί να εξουδετερωθεί μερικές φορές με αύξηση της ηλεκτρικής αγωγιμότητας ή με μείωση της επιφανειακής τάσης. Η επιφανειακή τάση ενός διαλύματος είναι πιθανό να ευνοεί το σχηματισμό σταγόνων αντί για ίνες, ενώ οι ηλεκτροστατικές δυνάμεις λόγω των φορτίων μέσα στο jet έχουν την τάση να επιμηκύνουν και να διατηρούν το jet και να ευνοούν το σχηματισμό ινών. Οι παράγοντες που μεταβάλλουν την επιφανειακή τάση και/ή τις ηλεκτροστατικές δυνάμεις μπορούν άρα να επηρεάσουν τη διαδικασία του electrospinning. Για παράδειγμα, μία αύξηση στα φορτία μπορεί να αποκτηθεί με την προσθήκη ιοντικών αλάτων ή πολυηλεκτρολυτών. Σε αυτή την περίπτωση, μεταφέρονται περισσότερα φορτία στο jet, με αποτέλεσμα να δημιουργούνται ισχυρές δυνάμεις επιμήκυνσης λόγω της αμοιβαίας απόκρουσης μέσα στο jet. Συνεπώς, το jet εκτείνεται ακόμα περισσότερο, μειώνοντας τη διάμετρο των ινών και την ποσότητα των σταγόνων που σχηματίζονται. Γενικώς, τα διαλύματα πολυμερών πρέπει να έχουν:

- α) επιφανειακή τάση αρκετά χαμηλή για να κατανικηθεί από το ηλεκτρικό πεδίο,
- β) πυκνότητα φορτίων αρκετά υψηλή ώστε να μπορεί να ξεπεραστεί η επιφανειακή τάση
- γ) ιξώδες αρκετά υψηλό για να διασφαλιστεί επαρκής περιπλοκή των αλυσίδων για την πρόληψη της κατάρρευσης του jet σε σταγόνες πριν ο διαλύτης εξατμιστεί.

Η βελτίωση των αλληλεπιδράσεων στις αλυσίδες του πολυμερούς προκαλεί μία μεγαλύτερη αντίσταση στο ξέμπλεγμα ή στον προσανατολισμό με τις δυνάμεις έκτασης που εφαρμόζονται κατά την επιτάχυνση προς το γειωμένο στόχο και αυξάνεται η διάμετρος την ίνας. Ωστόσο, η αύξηση της συγκέντρωσης του πολυμερούς και άρα και του ιξώδους του διαλύματος στο σημείο όπου η ροή μέσω του τριχοειδούς παρεμποδίζεται, μπορεί πάλι να εμποδίσει το σχηματισμό ινών. Επιπλέον, στην περίπτωση υψηλών συγκεντρώσεων πολυμερούς, η ξήρανση του διαλύματος πολυμερούς στην άκρη της βελόνας μπορεί να συμβεί και να οδηγήσει στο σχηματισμό ενός τοπικού gel και συνεπώς να εμποδίσει το σχηματισμό ενός κατάλληλου κώνου Taylor. Τέλος, το σημείο ζέσεως του διαλύτη πρέπει να είναι αρκετά χαμηλό, έτσι ώστε η εξάτμιση του διαλύτη να λαμβάνει χώρα κάτω από συμβατικές ατμοσφαιρικές συνθήκες.

## 2.4 ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

- <sup>1</sup> N. Taniguchi, Proc. of International Conference on Precision Engineering (ICPE), Tokyo, Japan, 1974, pp. 18—23.
- <sup>2</sup> T.J. Webster, Int. J. Nanomed. 2 (2007) 1
- <sup>3</sup> R.W. Siegel, G.E. Fougere, Nanostruct. Mater. 6 (1995) 205
- <sup>4</sup> V.J. Chen, P.X. Ma, Biomaterials 25 (2004) 2065
- <sup>5</sup> J.R. Venugopal, S. Low, A.T. Choon, A.B. Kumar, S. Ramakrishna, Artif. Organs 32 (2008) 388
- <sup>6</sup> K. Hata, D.N. Futaba, K. Mizuno, T. Namai, M. Yumura, S. Iijima, Science 306 (2004) 1362
- <sup>7</sup> I. Degasne, M.F. Basli, V. Demais, G. Huri, M. Lesourd, B. Grolleau, et al., Calcified Tissue Int. 64 (1999) 499
- <sup>8</sup> T.J. Webster, C. Ergun, R.H. Doremus, R.W. Siegel, R. Bizios, J. Biomed. Mater. Res. 51 (2000) 475.
- <sup>9</sup> Lijie Zhang, Thomas J. Webster, Nanotechnology and nanomaterials: Promises for improved tissue regeneration, Nano Today (2009) 4, 66—80
- <sup>10</sup> Nanomedicine: current status and future prospects, S. Moein Moghimi, A. Christy Hunter, and J. Clifford Murray (2005)
- <sup>11</sup> The emerging nanomedicine landscape, Volker Wagner, Anwyn Dullaart, Anne-Katrin Bock & Axel Zweck (2006)
- <sup>12</sup> Nanotechnology: International Developments and Emerging Products, J. Corbett, P.A. McKeown, G.N. Peggs<sup>2</sup>, R. Whatmore, School of Industrial and Manufacturing Science Cranfield University
- <sup>13</sup> Karl Svennersten, Karin C. Larsson, Magnus Berggren, Agneta Richter-Dahlfors, Organic bioelectronics in nanomedicine, Biochimica et Biophysica Acta 1810 (2011) 276—285
- <sup>14</sup> B.G. Keselowsky, D.M. Collard, A.J. Garcia, Surface chemistry modulates fibronectin conformation and directs integrin binding and specificity to control cell adhesion, J. Biomed. Mater. Res. A 66 (2003) 247—259.
- <sup>15</sup> B.G. Keselowsky, D.M. Collard, A.J. Garcia, Surface chemistry modulates focal adhesion composition and signaling through changes in integrin binding, Biomaterials 25 (2004) 5947—5954.
- <sup>16</sup> B.G. Keselowsky, D.M. Collard, A.J. Garcia, Integrin binding specificity regulates biomaterial surface chemistry effects on cell differentiation, Proc. Natl Acad. Sci. USA 102 (2005) 5953—5957
- <sup>17</sup> G.B. Sigal, M. Mrksich, G.M. Whitesides, Effect of surface wettability on the adsorption of proteins and detergents, J. Am. Chem. Soc. 120 (1998) 3464—3473
- <sup>18</sup> F. Grinnell, M.K. Feld, Adsorption characteristics of plasma fibronectin in relationship to biological activity, J. Biomed. Mater. Res. 15 (1981) 363—381
- <sup>19</sup> R.G. Flemming, C.J. Murphy, G.A. Abrams, S.L. Goodman, P.F. Nealey, Effects of synthetic micro- and nano-structured surfaces on cell behavior, Biomaterials 20 (1999) 573—588.
- <sup>20</sup> A.I. Teixeira, G.A. Abrams, P.J. Bertics, C.J. Murphy, P.F. Nealey, Epithelial contact guidance on well-defined micro- and nanostructured substrates, J. Cell Sci. 116 (2003) 1881—1892
- <sup>21</sup> A.S. Andersson, F. Backhed, A. von Euler, A. Richter-Dahlfors, D. Sutherland, B. Kasemo, Nanoscale features influence epithelial cell morphology and cytokine production, Biomaterials 24 (2003) 3427—3436.
- <sup>22</sup> N.J. Hallab, K.J. Bundy, K. O'Connor, R.L. Moses, J.J. Jacobs, Evaluation of metallic and polymeric biomaterial surface energy and surface roughness characteristics for directed cell adhesion, Tissue Eng. 7 (2001) 55—71.
- <sup>23</sup> A. Ranella, M. Barberoglou, S. Bakogianni, C. Fotakis, E. Stratakis, Tuning cell adhesion by controlling the roughness and wettability of 3D micro/nano silicon structures, Acta Biomater. 6 (2010) 2711- 2720.

- <sup>24</sup> S. Bodhak, S. Bose, A. Bandyopadhyay, Electrically polarized HAp-coated Ti: in vitro bone cell-material interactions, *Acta Biomater.* 6 (2010) 641–651.
- <sup>25</sup> M. Ohgaki, T. Kizuki, M. Katsura, K. Yamashita, Manipulation of selective cell adhesion and growth by surface charges of electrically polarized hydroxyapatite, *J. Biomed. Mater. Res.* 57 (2001) 366–373.
- <sup>26</sup> D.S. Gray, J. Tien, C.S. Chen, Repositioning of cells by mechanotaxis on surfaces with micropatterned Young's modulus, *J. Biomed. Mater. Res. A* 66 (2003) 605–614
- <sup>27</sup> A. Saez, M. Ghibaudo, A. Buguin, P. Silberzan, B. Ladoux, Rigidity-driven growth and migration of epithelial cells on microstructured anisotropic substrates, *Proc. Natl Acad. Sci. USA* 104 (2007) 8281–8286
- <sup>28</sup> J. Solon, I. Levental, K. Sengupta, P.C. Georges, P.A. Janmey, Fibroblast adaptation and stiffness matching to soft elastic substrates, *Biophys. J.* 93 (2007) 4453–4461
- <sup>29</sup> A.J. Engler, S. Sen, H.L. Sweeney, D.E. Discher, Matrix elasticity directs stem cell lineage specification, *Cell* 126 (2006) 677–689
- <sup>30</sup> Εφαρμογές της Νανοτεχνολογίας στην ιατρική, των Κωνσταντίνου Κυππαρισίδη, Όλγα Καμμώνα, Σωτηρία Χαϊτίδου, 2008
- <sup>31</sup> Heeger AJ. (2002) Semiconducting and metallic polymers: the fourth generation of polymeric materials. *Synth Met*;125:23–42
- <sup>32</sup> Gurunathan K, Murugan AV, Marimuthu R, Mulik UP, Amalnerkar DP. Electrochemically synthesized conducting polymeric materials for applications towards technology in electronics, optoelectronics and energy storage devices. *Mater Chem Phys* 1999;61:173–91
- <sup>33</sup> Foulds NC, Lowe CR (1986). Enzyme entrapment in electrically conducting polymers. *J Chem Soc Faraday Trans* 82: 1259–64.
- <sup>34</sup> Umana M, Waller J. Protein modified electrodes: the glucose/oxidase/polypyrrole system. *Anal Chem* 1986;58: 2979–83
- <sup>35</sup> Wong JY, Langer R, Ingber DE. Electrically conducting polymers can noninvasively control the shape and growth of mammalian cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 1994;91:3201–4.
- <sup>36</sup> Shi G, Rouabhia M, Wang Z, Dao L H, Zhang Z. A novel electrically conductive and biodegradable composite made of polypyrrole nanoparticles and polylactide. *Biomaterials* 2004;25:2477–88
- <sup>37</sup> Aebischer P, Valentini RF, Dario P, Domenici C, Galletti PM. Piezoelectric guidance channels enhance regeneration in the mouse sciatic nerve after axotomy. *Brain Res* 1987;436:165–8.
- <sup>38</sup> Valentini RF, Sabatini AM, Dario O, Aebischer P. Polymer electrec guidance chanelns enhance peripheral nerve regeneration in mice. *Brain Res* 1989;480:300–4.
- <sup>39</sup> Turner JN, Shain W, Szarowski DH, Andersen M, Martins S, Isaacsin M, et al. Cerebral astrocyte response to micromachined silicon implants. *Exp Neurol* 1999;156: 33–49.
- <sup>40</sup> Weidland JD, Anderson DJ. Chronic neural stimulation with thin-film, iridium oxide electrode. *IEEE Trans Bio- Med Eng* 2000;47:911–8.
- <sup>41</sup> Cui X, Hetke JF, Wiler JA, Anderson DJ, Martin DC. Electrochemical deposition and characterization of conducting polymer polypyrrole/PSS on multichannel neural probes. *Sensors Actuators A* 2001;93:8–18

- <sup>42</sup> Gerard M, Chaubey A, Malhotra BD. Application of conducting polymers to biosensors. *Biosensors Bioelectron* 2002;17:345–59
- <sup>43</sup> Κ. Παναγιώτου, Θεσσαλονίκη 2000, *Επιστήμη και Τεχνολογία Πολυμερών*
- <sup>44</sup> ΒΙΟΔΙΑΣΠΩΜΕΝΑ ΠΟΛΥΜΕΡΗ ΕΦΑΡΜΟΓΕΣ ΚΑΙ ΘΕΡΜΟΜΗΧΑΝΙΚΕΣ ΙΔΙΟΤΗΤΕΣ, Γιώτη Ελένη, 2009
- <sup>45</sup> Biodegradable polymers as biomaterials, Lakshmi S. Naira, Cato T. Laurencin, 2007
- <sup>46</sup> Patel N.R., Gohil P.P., A review on biomaterials: Scope, Applications & Human Anatomy Significance, *International Journal of Emerging Technology and Advanced Engineering*, April 2012, Volume 2.
- <sup>47</sup> Dubok V.A., *Powder Metallurgy and Metal Ceramics*, 2000, 39(7-8), 381-394
- <sup>48</sup> Thamaraiselvi T.V., Rajesvari S., Biological evaluation of bioceramic Materials. 2004, *Trends. Biomater.Artif.Organs*, Vol 18 (1), pp 9-17.
- <sup>49</sup> Boretos, J.W., Eden M., *Contemporary Biomaterials, Material and Host Response, Clinical Applications, New Technology and Legal Aspects*. Noyes Publications, Park Ridge, NJ 1984, pp. 232–233.
- <sup>50</sup> Williams DF. Consensus and definitions in biomaterials. In; dePutter C, deLange K, de groot K, Lee AJC, editors. 1988, *Advances in biomaterials*. Elsevier Science: Amsterdam, . 11-16.
- <sup>51</sup> Black J, Hastings GW. 1988, *Handbook of biomaterials Properties*. London, UK; Chapman and Hall
- <sup>52</sup> Geetha, M., Ti based biomaterials, the ultimate choice for orthopaedic implants—A review. 2008, *Progress in Materials Science*,
- <sup>53</sup> Navarro, M., Biomaterials in orthopaedics. 2008, *Journal of The Royal Society Interface*, 5(27): 1137-1158.
- <sup>54</sup> Courtesy R. Zenz, Conference on Biomaterials WS2008, For Genomics and Bioinformatics
- <sup>55</sup> A textbook on Biomaterials, 1;9-10
- <sup>56</sup> Shastri V.P., Non-degradable biocompatible polymers in medicine: past, present and future, 2003, *Current Pharmaceutical Biotechnology*, Bentham Science Publishers Ltd; 4, 331-337
- <sup>57</sup> Odian, G., *Principles of Polymerization*, 1991, Third Edition, Wiley-Interscience, New York
- <sup>58</sup> March, J. *Advanced Organic Chemistry: Reactions, Mechanisms, and Structure*, 1986, Third Edition, John Wiley & Sons New York.
- <sup>59</sup> Joshi J.R., Patel R.P., Role of biodegradable polymers in drug delivery, 2012, *Int. Journal of Current Pharmaceutical Research*
- <sup>60</sup> Nair L.S., Laurecin C.T., *Polymers as Biomaterials for Tissue Engineering and Controlled Drug Delivery*, 2006, *Adv. Biochem. Engin./Biotechnol.* 102;47-90
- <sup>61</sup> Narayan, R. J., The next generation of biomaterial development, 2010, *Phil. Trans. R. Soc.* 360, 1831-1837
- <sup>62</sup> Van Natta FJ, Hill JW, Carruthers WH. Polymerization and ring formation, ε-caprolactone and its polymers. *J Am Chem Soc* 1934; 56: 455–9.
- <sup>63</sup> Nishida H., Tokiwa Y. Distribution of poly(β-hydroxybutyrate) and poly(ε-caprolactone) aerobic degrading microorganisms in different environments. 1993, *J Environ Polym Degrad.* 1, 227.
- <sup>64</sup> Bolge N., Menciloglu Y.Z., Acatay K., Vargel I., Piskin E., In vitro and in vivo degradation of nono-woven materials made of poly (ε-caprolactone) nanofibers prepared by electrospinning under different conditions, 2005, *J Biomat. Sci. Polymer Edn.*, 16:12, pp 1537-1555
- <sup>65</sup> Pitt C. G., in: *Biodegradable Polymers as Drug Delivery Systems*, M. Chasin and R. Langer (Eds), p. 71. Marcel Dekker, New York, NY (1990).
- <sup>66</sup> Hou Q. P., Grijpma D. W., Feijen J., 2003, *Biomaterials* 24, 1937
- <sup>67</sup> Aydın H., Çalimli A., Piskin E., 2004, *J. Biocomp. Bioact. Polym.* 19, 383

- <sup>68</sup> Armentano I, Dottori M, Fortunati E, Mattioli S, Kenny JM. Biodegradable polymer matrix nanocomposites for tissue engineering: A review. 2010, *Polym Degrad Stab*; 95: 2126-46.
- <sup>69</sup> Woodruff M, Hutmacher D. The return of a forgotten polymer – Polycaprolactone in the 21st century. 2010, *Progress in Polymer Science*.
- <sup>70</sup> Vert M. Degradable and bioresorbable polymers in surgery and in pharmacology: beliefs and facts. 2009, *J Mater Sci Mater Med*; 20:437–46.
- <sup>71</sup> <sup>1</sup> Ginde R, Gupta R. In vitro chemical degradation of poly(glycolic acid) pellets and fibers. 1987, *J Appl Polym Sci*; 33: 2411-29.
- <sup>72</sup> Lam CXF, Savalani MM, Teoh SH, Hutmacher DW. Dynamics of in vitro polymer degradation of polycaprolactone-based scaffolds: accelerated versus simulated physiological conditions. 2008, *Biomed Mater*; 3: 1–15.
- <sup>73</sup> Garkhal K, Verma S, Tikoo K, Kumar N. Surface modified poly (L-lactide-co-ε-caprolactone) microspheres as scaffold for tissue engineering. 2007, *J Biomed Mater Res A*; 82: 747-56.
- <sup>74</sup> Danhier F, Vroman B, Lecouturier N, Crockart N, Pourcelet V, Freichels H, Jerome C, Marchand-Brynaert J, Feron O, Preat V. Targeting of tumor endothelium by RGD-grafted PLGA-nanoparticles loaded with Paclitaxel. 2009, *J Control Release*; 140: 166-73
- <sup>75</sup> Li WJ, Cooper JA, Mauck RL, Tuan RS. Fabrication and characterization of six electrospun poly(α-hydroxy ester) based fibrous scaffolds for tissue engineering. 2006, *Acta Biomater*; 2: 377-85.
- <sup>76</sup> Luciani A, Coccoli V, Orsi S, Ambrosio L, Netti PA. PCL microspheres based functional scaffolds by bottom-up approach with predefined microstructural properties and release profiles, 2008, *Biomaterials*; 29(36): 4800-07.
- <sup>77</sup> Chung S, Ingle NP, Montero GA, Kim SH, King MW. Bioresorbable elastomeric vascular tissue engineering scaffolds via melt spinning and electrospinning. 2010, *Acta Biomater*; 6(6): 1958-67
- <sup>78</sup> Shenoy DB, Amiji MM. Poly(ethylene oxide)-modified poly(ε-caprolactone) nanoparticles for targeted delivery of tamoxifen in breast cancer. 2005, *Int J Pharm*; 293(1–2): 261-70.
- <sup>79</sup> Goki Matsumura, Narutoshi Hibino, Yoshito Ikada, Hiromi Kurosawa, Toshiharu Shin'oka, (2003) Successful application of tissue engineered vascular autografts: clinical experience. *Biomaterials* (24) 2303–2308
- <sup>80</sup> C. Liu, Z. Xia, J. T. Czernuszka, (2007) Design and development of three-dimensional scaffolds for tissue engineering. *Trans IChemE, Part A, Chemical Engineering Research and Design*, 85(A7), 1051–10
- <sup>81</sup> Cindy Chung, Jason A. Burdick, (2008) Engineering cartilage tissue. *Advanced Drug Delivery Reviews* (60), 243–262
- <sup>82</sup> C. Csaki, P.R.A. Schneider, M. Shakibaei, Mesenchymal stem cells as a potential pool for cartilage tissue engineering *Ann Anat* 190 (2008) 395—412
- <sup>83</sup> Barnes C. Sell S, Boland E., Simpson D. Bowlin G. Nanofiber Technology : Designing the new generation of tissue engineering scaffolds, *Advanced Drug Delivery Reviews* 59 (2007) pp. 1413-1433
- <sup>84</sup> Inga Drosse, Elias Volkmer, Rodolfo Capanna, Pietro De Biase, Wolf Mutschler, Matthias Schieker, (2008) Tissue engineering for bone defect healing: An update on a multi-component approach. *Injury, Int. J. Care Injured* (39S2), S9–S20
- <sup>85</sup> C. Csaki, P.R.A. Schneider, M. Shakibaei, (2008) Mesenchymal stem cells as a potential pool for cartilage tissue engineering. *Ann Anat* (190), 395—412
- <sup>86</sup> M. Doblar, J.M. Garcia, M.J. Gomez, (2004) Modelling bone tissue fracture and healing: a review. *Engineering Fracture Mechanics* (71), 1809–1840
- <sup>87</sup> T. J. Klein, B. L. Schumacher B.S., T. A. Schmidt, K. W. Li, M. S. Voegtline, K. Masuda, E. J.-M. A. Thonar and R. L. Sah, (2003) Tissue engineering of stratified articular cartilage from chondrocyte Subpopulations. *OsteoArthritis and Cartilage* (11), 595–602.

- <sup>88</sup> Christian Frantz, Kathleen M. Stewart , Valerie M. Weaver, (2010), The extracellular matrix at a glance, *Journal of Cell Science* 123, 4195-4200
- <sup>89</sup> Franco Berthiaume, Martin L. Yarmush, *Tissue Engineering*. 817-842
- <sup>90</sup> Griffith LG, Swartz MA. Capturing complex 3D tissue physiology in vitro. *Nature Rev Mol Cell Biol* 2006;7:211-224
- <sup>91</sup> Ping Lu1 and Bin Ding Applications of Electrospun Fibers, *Recent Patents on Nanotechnology* 2008, 2, 169-182
- <sup>92</sup> Formhals A, inventor. 1934 Process and apparatus for preparing artificial threads. US Patent No. 1,975,504
- <sup>93</sup> Taylor G., (1969) Electrically driven jets. *Proc Natl Acad Sci London*;A313(1515):453-75
- <sup>94</sup> [http://en.wikipedia.org/wiki/Taylor\\_cone](http://en.wikipedia.org/wiki/Taylor_cone)
- <sup>95</sup> D. Lukáš, A. Sarkar , L. Martinová , K. Vodsed'álková , D. Lubasová , J. Chaloupek , P. Pokorný , P. Mikeš , J. Chvojka & M. Komárek (2009): Physical principles of electrospinning (Electrospinning as a nano-scale technology of the twenty-first century), *Textile Progress*, 41:2, 59-140
- <sup>96</sup> Travis J. Sill, Horst A. von Recum,(2008) Electrospinning: Applications in drug delivery and tissue engineering *Biomaterials* 29,1989-2006
- <sup>97</sup> J.M Deitzel, J Kleinmeyer, D Harris, N.C Beck Tan (2001)The effect of processing variables on the morphology of electrospun nanofibers and textiles, Volume 42, Issue 1, Pages 261–272
- <sup>98</sup> Zong, X.H., Kim, K., Fang, D.F., Ran, S.F., Hsiao, B.S., and Chu, B. (2002) Structure and process relationship of electrospun bioabsorbable nanofiber membranes. *Polymer* 43, 4403
- <sup>99</sup> Deitzel, J.M., Kleinmeyer, J., Harris, D., and Tan, N.C.B. (2001) The effect of processing variables on the morphology of electrospun nanofibers and textiles. *Polymer* 42, 261
- <sup>100</sup> Taylor G. (1969) Electrically driven jets. *Proc Natl Acad Sci London* A313(1515):453-75
- <sup>101</sup> Quynh P., Upma, Antonios G. Mikos, (2006) Electrospinning of Polymeric Nanofibers for Tissue Engineering Applications: A Review *TISSUE ENGINEERING* Volume 12, Number 5, 1197-1211
- <sup>102</sup> Geng, X.Y., Kwon, O.H., and Jang, J.H. (2005) Electrospinning of chitosan dissolved in concentrated acetic acid solution. *Biomaterials* 26, 5427
- <sup>103</sup> Zhang, C.X., Yuan, X.Y., Wu, L.L., Han, Y., and Sheng, J. (2005) Study on morphology of electrospun poly(vinyl alcohol) mats. *Eur. Polym. J.* 41, 423
- <sup>104</sup> Ki, C.S., Baek, D.H., Gang, K.D., Lee, K.H., Um, I.C., and Park, Y.H. (2005) Characterization of gelatin nanofiber prepared from gelatin-formic acid solution. *Polymer* 46, 5094,
- <sup>105</sup> Geng, X.Y., Kwon, O.H., and Jang, J.H. 2005 Electrospinning of chitosan dissolved in concentrated
- <sup>106</sup> Ramakrishna, S. (2005) *An Introduction to Electrospinning and Nanofibers*, World Scientific, Singapore.
- <sup>107</sup> Zhang, L. F. and Hsieh, Y. L. Ultra-fine cellulose acetate/poly(ethyleneoxide) bicomponent fibers. *Carbohydrate Polymers*. 71(2): 196.
- <sup>108</sup> Gupta, P., Elkins, C., Long, T. E. and Wilkes, G. L. Electrospinning of linear homopolymers of poly(methyl methacrylate): exploring relationships between fiber formations, viscosity, molecular weight and concentration in a good solvent. *Polymer* 2005. 46(13): 4799

<sup>109</sup>[Pankaj Gupta](#), [Casey Elkins](#), [Timothy E. Long](#), [Garth L. Wilkes](#) Electrospinning of linear homopolymers of poly(methyl methacrylate): exploring relationships between fiber formation, viscosity, molecular weight and concentration in a good solvent, Volume 46, Issue 13, 17 June 2005, Pages 4799–4810

## ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3. Αρθρικός Χόνδρος και Βλάβες του

### 3.1 Αρθρικός χόνδρος

Ο φυσιολογικός αρθρικός χόνδρος, ή αλλιώς υαλώδης χόνδρος (hyaline cartilage) αποτελεί το πιο σημαντικό τμήμα μιας άρθρωσης. Τα κύρια συστατικά μιας άρθρωσης είναι το αρθρικό υγρό, ο αρθρικός θύλακας, ο αρθρικός χόνδρος και το υποχόνδριο οστό. Το αρθρικό υγρό είναι ένα υπερδιήθημα του πλάσματος, βασικό συστατικό του οποίου είναι το υαλουρονικό οξύ, το οποίο διευκολύνει την κίνηση και μεταφέρει θρεπτικά συστατικά στον αρθρικό χόνδρο. Ο αρθρικός θύλακας είναι ένα σύνολο από συνδέσμους και τένοντες και αποτελείται κύρια από ίνες κολλαγόνου.

Η κυριότερη λειτουργία του αρθρικού χόνδρου είναι η προστασία της αρθρικής επιφάνειας των οστών από δυνάμεις τριβής και παρέχει μια ομαλή επιφάνεια λίπανσης για τις κινήσεις της άρθρωσης. Επίσης, έχει την ικανότητα να αντέχει μεγάλες και επαναλαμβανόμενες δυνάμεις παραμόρφωσης και να κατανέμει ομοιόμορφα τα φορτία που ασκούνται κατά την κίνηση.

Η σύνθεση του φυσικού αρθρικού χόνδρου είναι αρκετά σύνθετη και πολύπλοκη βιολογικά, γεγονός που καθιστά την επιδιόρθωση και αντικατάστασή του σε περίπτωση βλάβης μεγάλη πρόκληση. Το πρωταρχικό τμήμα του αρθρικού χόνδρου, το οποίο υφίσταται επιδιόρθωση είναι ο ινώδης χόνδρος, ο οποίος είναι κατώτερος μηχανικά και βιοχημικά και πιο απλουστευμένος ως προς τη σύσταση σε σχέση με τον αρθρικό χόνδρο. Για το λόγο αυτό, οι χονδρικές βλάβες και κακώσεις έχουν ως αποτέλεσμα την επιδείνωση και οδηγούν σε οστεοαρθρίτιδα.<sup>1</sup>

Ο αρθρικός χόνδρος είναι ένας ιστός, ο οποίος καλύπτει τα άκρα των διαρθρώσεων. Μορφολογικά είναι σκληρός και ημιδιαφανής, παρουσιάζει ελαστικότητα και αποτελείται από εύκαμπτους ιστούς. Έχει χρώμα λευκό και η επιφάνειά του είναι λεία και υγρή. Σε άτομα μεγάλης ηλικίας αποκτά μια κιτρινόλευκη απόχρωση, καθώς παρατηρείται επικάθιση χρωστικών και διαφοροποιούνται τα πρωτεϊνικά μόρια.<sup>2</sup>

Η αρθρική επιφάνεια του αρθρικού χόνδρου καλύπτεται από μια πυκνή ινώδη μεμβράνη που ονομάζεται περιχόνδριο. Ο αρθρικός χόνδρος είναι ένας ιστός, όπου δεν υπάρχουν αγγεία και νεύρα, και αυτός είναι ο λόγος που η επούλωση και επιδιόρθωση των όποιων βλαβών συμβαίνουν εκεί είναι πολύ δύσκολη.<sup>2</sup>

Ο αρθρικός χόνδρος αποτελεί ένα βασικό ιστό υψηλής οργάνωσης και μοναδικής υφής που χρησιμεύει, λόγω της ελαστικότητάς του, στην κατανομή των φορτίων και βοηθά στην χωρίς τριβή κίνηση των οστών.<sup>3</sup>



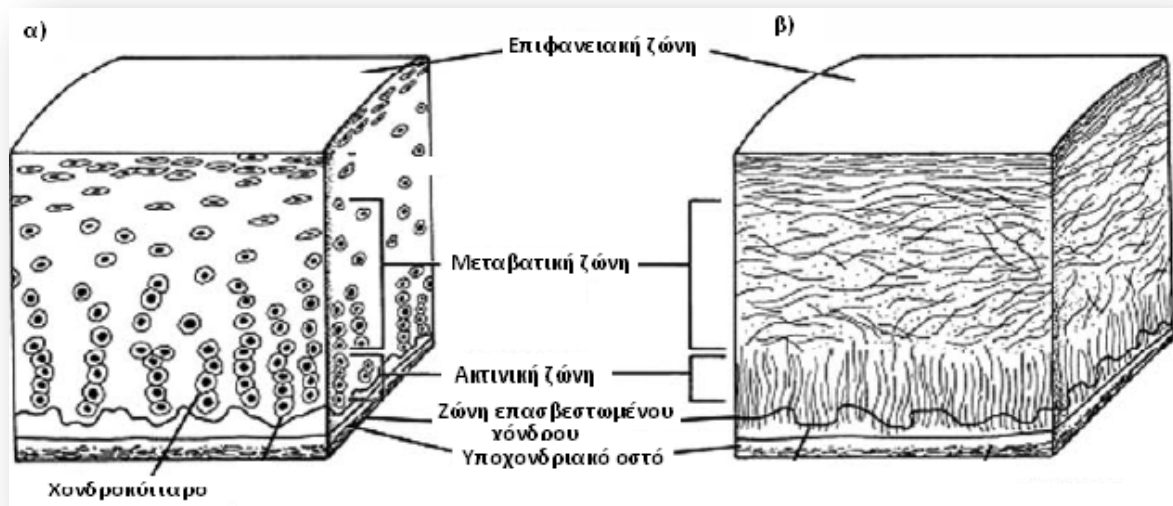
Το πάχος του αρθρικού χόνδρου κυμαίνεται μεταξύ 2 και 4 mm. Συντίθεται από μια πυκνή εξωκυττάρια μήτρα (extracellular matrix – ECM) στην οποία υπάρχουν αραιά κατανεμημένα χονδροκύτταρα. Η ECM αποτελείται κυρίως από νερό, κολλαγόνο και πρωτεογλυκάνες, όπως επίσης και από γλυκοπρωτεΐνες και άλλες μη κολλαγονούχες πρωτεΐνες σε μικρότερα ποσοστά.

Ο αρθρικός χόνδρος είναι χωρισμένος σε διάφορες ζώνες/στιβάδες, καθεμία από τις οποίες παίζει έναν διαφορετικό ρόλο στη λειτουργία του:

- **Επιφανειακή ή Εφαπτόμενη ζώνη (tangential layer):** Η επιφανειακή στιβάδα προστατεύει τα βαθύτερα στρώματα αρθρικού χόνδρου από τάσεις παραμόρφωσης και αποτελεί το 10-20% του πάχους του αρθρικού χόνδρου. Οι ίνες κολλαγόνου σε αυτή τη ζώνη είναι πακεταρισμένες κοντά η μια με την άλλη και προσανατολισμένες παράλληλα προς την επιφάνεια του χόνδρου. Τα χονδροκύτταρα στην επιφανειακή ζώνη βρίσκονται σε σχετικά μεγάλο αριθμό και είναι μικρά, πλατιά και παράλληλα με την επιφάνεια. Ο ρόλος αυτής της ζώνης είναι πολύ σημαντικός για την προστασία και τη διατήρηση των κατώτερων στιβάδων. Η επιφανειακή ζώνη βρίσκεται σε επαφή με το αρθρικό υγρό και καθορίζει τις ελαστικές ιδιότητες του αρθρικού χόνδρου, οι οποίες τον βοηθούν αντιστέκεται στις δυνάμεις τάσης, παραμόρφωσης και συμπίεσης κατά την κίνηση της άρθρωσης.
- **Μεταβατική ζώνη (transitional layer):** Η ζώνη αυτή αποτελεί μια ανατομική και λειτουργική γέφυρα μεταξύ της επιφανειακής και των κατώτερων στιβάδων. Αντιπροσωπεύει το 40-60% του συνολικού όγκου του αρθρικού χόνδρου και περιέχει πρωτεογλυκάνες και πιο παχιές ίνες κολλαγόνου. Σε αυτή τη ζώνη, οι ίνες κολλαγόνου είναι οργανωμένες διαγώνια και τα χονδροκύτταρα είναι λίγο μεγαλύτερα, σφαιρικά και σε χαμηλότερη πυκνότητα τόσο μεμονωμένα όσο και οργανωμένα σε ισογενείς (isogenous) ομάδες. Λειτουργικά, η μεταβατική ζώνη αποτελεί τη στιβάδα αντίστασης στις δυνάμεις συμπίεσης.
- **Ακτινική ζώνη (radial layer):** Η ακτινική ζώνη παρέχει τη μεγαλύτερη αντίσταση στις δυνάμεις συμπίεσης, δεδομένου ότι οι ίνες κολλαγόνου είναι οργανωμένες κάθετα προς την αρθρική επιφάνεια. Εδώ, οι ίνες κολλαγόνου έχουν μεγαλύτερη διάμετρο σε ακτινωτή διάταξη, οι πρωτεογλυκάνες βρίσκονται σε μεγαλύτερη συγκέντρωση, σε αντίθεση με το νερό, το οποίο βρίσκεται στη χαμηλότερη συγκέντρωσή του. Τα χονδροκύτταρα είναι οργανωμένα σε στήλες και προσανατολισμένα παράλληλα προς τις ίνες κολλαγόνου και

κάθετα προς την άρθρωση. Η ακτινική ζώνη αποτελεί περίπου το 30% του όγκου του αρθρικού χόνδρου.

- **Ζώνη επασβεστωμένου χόνδρου (calcified cartilage layer):** Η εν λόγω ζώνη παίζει κύριο ρόλο στην προστασία του οστού, καθώς οι ίνες κολλαγόνου οδηγούνται προς το υποχόνδριο οστό. Σε αυτή τη ζώνη, ο πληθυσμός των κυττάρων είναι πολύ αραιός και τα χονδροκύτταρα είναι υπερτροφικά.



**Σχήμα 3.1:** Σχηματική αναπαράσταση των ζωνών του αρθρικού χόνδρου. α) Οργάνωση χονδροκυττάρων. β) Οργάνωση ινών κολλαγόνου.

Η οργάνωση των ζωνών παίζει σημαντικό ρόλο στη λειτουργικότητα του αρθρικού χόνδρου. Επίσης, όπως αναφέρθηκε παραπάνω, τα χονδροκύτταρα διαφέρουν στις διάφορες στιβάδες, όχι μόνο ως προς το σχήμα, το μέγεθος και τον προσανατολισμό τους σε σχέση με την αρθρική επιφάνεια, αλλά και ως προς τη μεταβολική τους δραστηριότητα. Έχουν τη δυνατότητα να ανταποκρίνονται με διαφορετικό τρόπο στις μηχανικές φορτίσεις, επομένως, η ανάπτυξη και διατήρηση του φυσιολογικού χόνδρου εξαρτάται εν μέρει και από τη διαφοροποίηση των διαφορετικών φαινοτυπικά χονδροκυττάρων.<sup>5</sup>

Η κάθε ζώνη αρθρικού χόνδρου μπορεί με τη σειρά της να χωριστεί σε 3 επιμέρους περιοχές, την περικυτταρική (pericellular), την τοπική (territorial) και την ενδοτοπική (interterritorial) ανάλογα με την εγγύτητα των χονδροκυττάρων, τη σύσταση και τη διάμετρο και οργάνωση των ινών κολλαγόνου.<sup>4</sup>

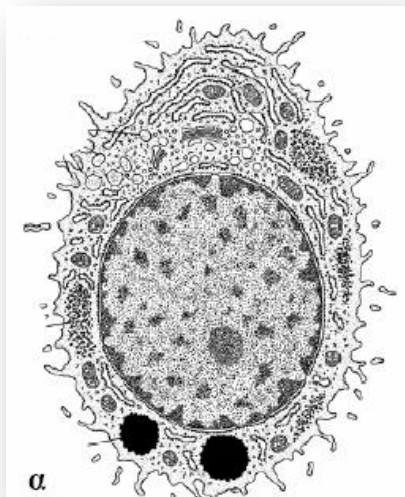
- **Περικυτταρική περιοχή (pericellular):** Η περικυτταρική περιοχή είναι ένα λεπτό στρώμα που βρίσκεται δίπλα στην κυτταρική μεμβράνη και περιβάλλει το χονδροκύτταρο. Περιέχει κυρίως πρωτεογλυκάνες και άλλες μη κολλαγονούχες πρωτεΐνες. Αυτή η περιοχή παίζει σημαντικό ρόλο στη μετάδοση σήματος διαμέσου του αρθρικού χόνδρου κατά την άσκηση φορτίου.
- **Τοπική περιοχή (territorial):** Η περιοχή αυτή περιβάλλει την περικυτταρική περιοχή και συντίθεται από ίνες κολλαγόνου, οι οποίες σχηματίζουν ένα πλέγμα γύρω από τα κύτταρα. Αυτή η περιοχή είναι πιο πυκνή από την προηγούμενη και προστατεύει τα αρθρικά κύτταρα από μηχανικές παραμορφώσεις. Επίσης, συμμετέχει στη διατήρηση της δομής του αρθρικού χόνδρου και στην αντοχή φορτίων.
- **Ενδοτοπική περιοχή (interterritorial):** Η εν λόγω περιοχή είναι μεγαλύτερη από τις προαναφερθείσες και καθορίζει τις βιοχημικές ιδιότητες του αρθρικού χόνδρου. Χαρακτηρίζεται από τυχαίο προσανατολισμό των ινών κολλαγόνου και είναι πλούσια σε πρωτεογλυκάνες.

Ο αρθρικός χόνδρος, όπως και κάθε άλλος ιστός, συντίθεται από κύτταρα και μια εξωκυττάρια μήτρα. Τα κύτταρα που αποτελούν τον αρθρικό χόνδρο είναι χονδρικά κύτταρα, όπως είναι τα χονδροκύτταρα (chondrocytes) και οι χονδροβλάστες (chondroblasts), τα οποία βρίσκονται σε ένα σύνθετο δίκτυο ινών κολλαγόνου και πρωτεϊνών, τα διάκενα του οποίου αποτελούνται από νερό. Όλο αυτό το δίκτυο αποτελεί την εξωκυττάρια μήτρα (extracellular matrix - ECM). Τα κύτταρα στον αρθρικό χόνδρο αποτελούν το 3-5% της συνολικής του μάζας. Περισσότερο από το 95% του αρθρικού όγκου συντίθεται από την ECM, η οποία αποτελεί και το πιο λειτουργικό στοιχείο του αρθρικού ιστού.<sup>6</sup>

Όπως δείχνει το ποσοστό των κυττάρων που αναφέρεται παραπάνω, τα χονδροκύτταρα είναι αραιά τοποθετημένα στον αρθρικό χόνδρο, ωστόσο είναι απολύτως απαραίτητα για την παραγωγή και τη διατήρηση της εξωκυττάριας μήτρας (ECM), η οποία συμπεριλαμβάνει το κολλαγόνο, τις γλυκοσαμινογλυκάνες (GAGs) και τις πρωτεογλυκάνες.<sup>1,7</sup> Οι πρωτεΐνες αυτές υπάρχουν είτε ως μεμονωμένα συστατικά είτε οργανωμένες σε συμπλέγματα, τα οποία ονομάζονται ισογενείς (isogenous) ομάδες. Τα συμπλέγματα αυτά αποτελούνται κυρίως από κύτταρα που μόλις έχουν διαιρεθεί.

## Χονδροκύτταρα

Τα χονδροκύτταρα είναι ένα εξαιρετικά εξειδικευμένο είδος κυττάρων, τα οποία, όπως έχει ήδη αναφερθεί, αποτελούν ένα πολύ μικρό ποσοστό του όγκου του χόνδρου στον ενήλικα άνθρωπο (η



Σχήμα 3.2 Χονδροκύτταρο

μικρότερη περιεκτικότητα σε κύτταρα έναντι οποιουδήποτε άλλου ιστού του ανθρώπινου σώματος).<sup>9</sup>

Κάθε χονδροκύτταρο περικλείεται από μια λεπτή μήτρα, η οποία παρέχει υδροδυναμική προστασία για το χονδροκύτταρο. Το σύμπλοκο αυτό κυττάρου-μήτρας είναι γνωστό ως χονδρώνας (chondron).<sup>1,10</sup> Ο κάθε χονδρώνας, δηλαδή, αποτελείται από ένα χονδροκύτταρο συνδεδεμένο με ένα υψηλής συγκέντρωσης σε πρωτεογλυκάνες περίβλημα, όπως επίσης και με άλλες γλυκοπρωτεΐνες της μήτρας.<sup>11</sup>

Χονδροκύτταρα από διαφορετικές στιβάδες του αρθρικού χόνδρου διαφέρουν στο σχήμα, στο μέγεθος και πιθανώς στη μεταβολική δραστηριότητα. Ωστόσο, χαρακτηρίζονται από κάποια γενικά χαρακτηριστικά. Πρόκειται για μεγάλα κύτταρα που περιέχουν ένα στρογγυλό ή ωοειδή πυρήνα που περικλείεται από πυρηνικό περίβλημα. Περιέχουν όλα τα κοινά οργανίδια, κυρίως όμως αυτά τα οποία είναι απαραίτητα για τη σύνθεση ή αποδόμηση της μεσοκυττάριας θεμέλιας ουσίας, όπως λείο και αδρό ενδοπλασματικό δίκτυο, σύστημα Golgi και λυσοσώματα. Επίσης, περιέχουν μιτοχόνδρια, ενδοκυτοπλασματικά ινίδια, λιπίδια, γλυκογόνο και εκκριτικά κυστίδια.<sup>5</sup>

Το κυτταρόπλασμα των χονδροκυττάρων ποικίλει ως προς την εικόνα που έχει, καθώς εξαρτάται από το επίπεδο της δραστηριότητας των κυττάρων αυτών.<sup>1,12</sup> Συγκεκριμένα, τα χονδροκύτταρα που έχουν πρόσφατα διαιρεθεί και συμμετέχουν ενεργά στην παραγωγή του υλικού της εξωκυττάριας μήτρας, παρουσιάζουν περιοχές όπου πραγματοποιείται η παραγωγή των πρωτεϊνών και καθαρές περιοχές στις οποίες υπάρχει έντονα ανεπτυγμένο σύστημα Golgi. Σε γηραιότερα χονδροκύτταρα, το σύστημα Golgi μειώνεται σε μέγεθος και οι καθαρές περιοχές του κυτταροπλάσματος εμφανίζουν αποσπασμένες σταγόνες λιπιδίων και αποθέματα γλυκογόνου.<sup>1</sup> Μειώνεται, λοιπόν, η κυτταρική πυκνότητα, γεγονός που οδηγεί σε χαμηλή μεταβολική δραστηριότητα. Επίσης, τα ώριμα χονδροκύτταρα ξεχωρίζουν από το σφαιρικό τους σχήμα και τη

σύνθεση κολλαγόνου τύπου II, μεγαλομοριακών πρωτεογλυκανών και ειδικών μη κολλαγονικών πρωτεϊνών.

Τα χονδροκύτταρα είναι απομονωμένα τις περισσότερες φορές χωρίς να έρχονται σε επαφή μεταξύ τους (cell-to-cell contact) και βρίσκονται μέσα σε κοιλότητες της μεσοκυττάριας ουσίας, αναπτύσσοντας ένα είδος μικρο-περιβάλλοντος, το οποίο δεν τους επιτρέπει να μεταφέρονται σε άλλες περιοχές του αρθρικού χόνδρου. Η έλλειψη άμεσης διακυτταρικής επικοινωνίας, οδηγεί στην ανάγκη τα χονδροκύτταρα να αντιλαμβάνονται τις μηχανικές αλλαγές στο περιβάλλον τους (αυξητικοί παράγοντες, μηχανικά φορτία, πιεζοηλεκτρικές δυνάμεις και υδροστατικές πιέσεις), κάτι το οποίο το καταφέρνουν αναπτύσσοντας βραχείες προσεκβολές, οι οποίες παίζουν το ρόλο ενός αισθητήριου μηχανισμού.<sup>4</sup>

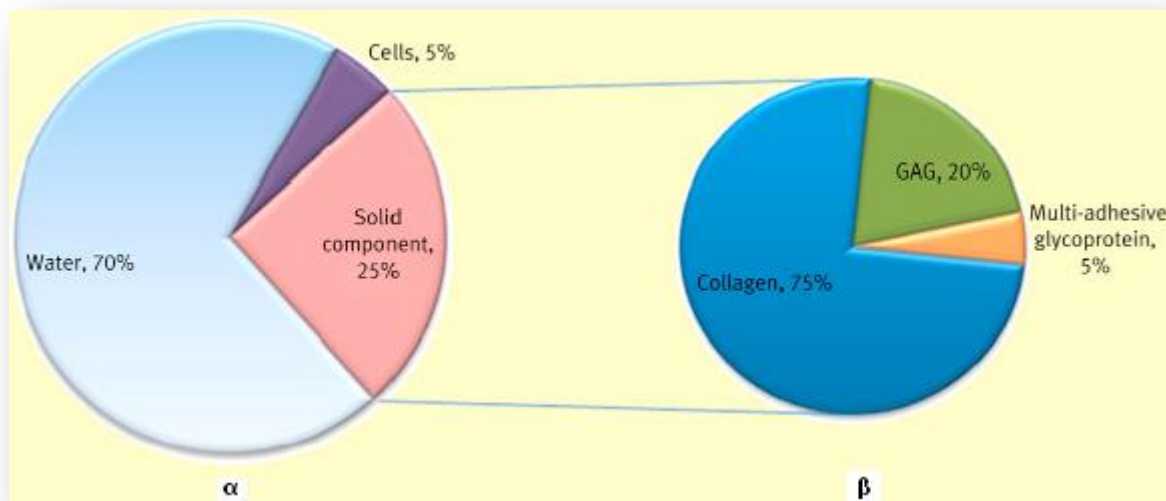
Λόγω της περιορισμένης δυνατότητας των χονδροκυττάρων να πολλαπλασιάζονται, σε συνδυασμό με την απουσία αιμοφόρων αγγείων, είναι πολύ δύσκολη η θεραπεία του αρθρικού χόνδρου σε περίπτωση βλάβης.

Η απουσία αιμοφόρων αγγείων, επίσης, ωθεί τα χονδροκύτταρα να αναπτύξουν διαφορετικούς μηχανισμούς για τη θρέψη τους. Έτσι, τα απαραίτητα θρεπτικά συστατικά για την ανάπτυξή τους τα κύτταρα τα αντλούν από το αρθρικό υγρό μέσα από ένα σύστημα διπλής διήθησης, πρώτα από τον αρθρικό υμένα και ύστερα από την εξωκυττάρια μήτρα. Η παραπάνω διαδικασία διευκολύνεται με την κίνηση της άρθρωσης.<sup>3</sup>

### **Εξωκυττάρια μήτρα (Extracellular matrix – ECM)**

Η εξωκυττάρια μήτρα (ECM) του αρθρικού χόνδρου έχει μηχανική και βιολογική δράση. Εξασφαλίζει ομοιομερή κατανομή των φορτίων της άρθρωσης σε όλη την έκταση του αρθρικού χόνδρου, προσφέρει στον αρθρικό χόνδρο στερεότητα, ευκαμψία και ελαστικότητα και επιτρέπει την ομαλή κίνηση αρθρικών επιφανειών με απίστευτα χαμηλό συντελεστή τριβής. Όσον αφορά τη βιολογική δράση, προστατεύει και υποστηρίζει τα χονδροκύτταρα, παρέχοντας τους τη δυνατότητα να επικοινωνούν με το υγρό περιβάλλον και να μεταβάλλουν τη λειτουργία τους ανάλογα με τις μεταβολές της.<sup>13</sup>

Το κυριότερο συστατικό της ECM του αρθρικού χόνδρου είναι το νερό (60-80%). Το υπόλοιπο οργανικό περιεχόμενο της αποτελείται κύρια από μόρια κολλαγόνου (περίπου 15%) και ειδικά κολλαγόνο τύπου II, από πρωτεογλυκάνες (10%) και άλλες γλυκοπρωτεΐνες (5%).<sup>1,14</sup> Ένα μικρότερο ποσοστό της ECM αποτελούν μη κολλαγονούχες πρωτεΐνες.



**Σχήμα 3.3:** α) Συστατικά του χόνδρου. β) Δομή του στερεού τμήματος της εξωκυττάριας μήτρας του αρθρικού χόνδρου.<sup>1</sup>

### Μεταβολισμός

Λόγω της μη ύπαρξης αγγείων, τα χονδροκύτταρα δεν μπορούν να παίρνουν τα απαραίτητα θρεπτικά συστατικά τους απευθείας από το περιβάλλον τους και ο μεταβολισμός τους πραγματοποιείται σε αναερόβιες συνθήκες.

Η βασική λειτουργία των χονδροκυττάρων είναι η ανάπτυξη, διατήρηση και επιδιόρθωση της ECM μέσω μιας ομάδας ενζύμων. Τα χονδροκύτταρα συνθέτουν μια μήτρα από πρωτεΐνες και αλυσίδες γλυκοσαμινογλυκανών. Η μεταβολική τους δραστηριότητα μπορεί να επηρεάζεται από χημικούς και μηχανικούς παράγοντες.

Τα χονδροκύτταρα προστατεύονται από πιθανές βλάβες λόγω βιοχημικών δυνάμεων με τη βοήθεια της ECM. Η ομοιόσταση του μεταβολισμού της ECM επιτρέπει μια κατάσταση ισορροπίας στην αποικοδόμηση διαφόρων μακρομορίων με τη σύνθεση νέων προϊόντων. Η αναδιοργάνωση των πρωτεογλυκανών μπορεί να κρατήσει μέχρι και 25 χρόνια, ενώ ο χρόνος ημιζωής του κολλαγόνου μπορεί να κυμαίνεται από κάποιες δεκαετίες μέχρι και 400 χρόνια.<sup>4,19</sup>

Σημαντικοί παράγοντες στη διατήρηση της φυσιολογικής δομής και λειτουργίας του αρθρικού χόνδρου είναι η κίνηση των αρθρώσεων και τα φορτία που ασκούνται σε αυτές. Μικρή δραστηριότητα της άρθρωσης μπορεί επίσης να οδηγήσει σε φθορά του χόνδρου. Ομαλή κίνηση της άρθρωσης και δυναμικά φορτία είναι σημαντικά για την υγιή διατήρηση του μεταβολισμού του αρθρικού χόνδρου. Η εμφάνιση ασθενειών, όπως η οστεοαρθρίτιδα, συνδέονται με



δραματικές αλλαγές στο μεταβολισμό του χόνδρου. Αυτό συμβαίνει όταν υπάρχει διαταραχή της ισορροπίας στη φθορά και σύνθεση από τα χονδροκύτταρα.<sup>4,20</sup>

### **Επίδραση της ηλικίας στην ανάπτυξη του αρθρικού χόνδρου**

Η ηλικία καθορίζει τη σύνθεση της ECM, όπως επίσης και την οργάνωση των χονδροκυττάρων και την απόκρισή τους σε εξωτερικούς παράγοντες. Με την αύξηση της ηλικίας, παρουσιάζονται αλλαγές στην κατανομή των χονδροκυττάρων στις διάφορες ζώνες του αρθρικού χόνδρου, ωστόσο, ο αριθμός τους παραμένει σταθερός. Τα χονδροκύτταρα υπάρχουν σε μικρότερο αριθμό στην επιφανειακή ζώνη, σε αντίθεση με τις ενδότερες ζώνες, όπου είναι περισσότερα.

Καθώς αυξάνεται η ηλικία του ατόμου, παρατηρείται μείωση της περιεχόμενης υγρασίας στη μήτρα, γεγονός που οδηγεί σε αύξηση της ακαμψίας του χόνδρου. Αυτό μπορεί να επηρεάσει το υποχόνδριο οστό, ο οποίος υφίσταται συμπιεστικές δυνάμεις καθώς ο χόνδρος χάνει την ικανότητά του να μετασχηματίζεται.

Ένα ακόμη αποτέλεσμα της αύξησης της ηλικίας είναι η μείωση του μεγέθους των πρωτεογλυκανών στην ECM. Αυτό μπορεί να οφείλεται στο γεγονός ότι δεν υπάρχουν διαθέσιμες θέσεις πρόσδεσης στην αλυσίδα του υαλουρονικού οξέος ή στην καταστροφή των πρωτεϊνών-συνδέσεων και των γλυκοσαμινογλυκανικών αλυσίδων. Η αλλαγή αυτή στις πρωτεογλυκάνες επηρεάζει το μέγεθος των πόρων και τη διαπερατότητα στη μήτρα, ενώ παρατηρείται αύξηση του περιεχομένου σε θειική κερατίνη έναντι της θειικής χονδροϊτίνης. Η συγκέντρωση του υαλουρονικού αυξάνει με την ηλικία.<sup>4,23</sup>

### **Απόκριση του αρθρικού χόνδρου σε περίπτωση βλάβης**

Το μέγεθος της βλάβης που υφίσταται ο χόνδρος εξαρτάται από το πόσο σοβαρή είναι η ζημιά που προκαλείται από τον τραυματισμό. Τα αποτελέσματα τραυματισμού στο χόνδρο μπορούν να ποικίλουν από ινιδισμό μέχρι την ανάπτυξη οστεοχονδρικής βλάβης. Έχει αναφερθεί ότι μικρής έκτασης βλάβες τραυματίζουν τα χονδροκύτταρα και επηρεάζουν τη μεταβολική τους δραστηριότητα ώστε να πετύχουν την επιδιόρθωση της βλάβης. Η εξέλιξη ενός τραυματισμού του αρθρικού χόνδρου μπορεί να περιγραφεί σε τρία στάδια.<sup>1,24</sup>

- 1) Αρχικά, παρατηρείται μείωση της συγκέντρωσης των πρωτεογλυκανών, αύξηση της ενυδάτωσης του χόνδρου και μεταβολή της οργάνωσης των ινών κολλαγόνου.
- 2) Όλες αυτές οι ενέργειες έχουν ως αποτέλεσμα ο χόνδρος να γίνεται πιο μαλακός, λόγω της αύξησης του περιεχομένου του σε νερό και αύξηση της διαπερατότητας.

3) Στο τρίτο στάδιο παρατηρείται αύξηση της μετάδοσης δυνάμεων στο υποχόνδριο οστό ενισχύοντας την ακαμψία του και άρα προκαλεί την αύξηση των φορτίων που υφίσταται ο τραυματισμένος χόνδρος.

### **Εμβιομηχανική λειτουργία**

Ο αρθρικός χόνδρος αποτελεί έναν εξειδικευμένο ιστό του ανθρώπινου οργανισμού, ο οποίος έχει μοναδικές ιξωδοελαστικές ιδιότητες. Η πρωταρχική λειτουργία του είναι να παρέχει μια ομαλή και λιπαντική επιφάνεια με χαμηλές δυνάμεις τριβής και να διευκολύνει τη μεταφορά των φορτίων στο υποχόνδριο οστό που βρίσκεται κάτω από αυτόν. Επίσης, ο αρθρικός χόνδρος έχει την ειδική ικανότητα να αντέχει υψηλά επαναλαμβανόμενα φορτία παρουσιάζοντας μικρές ή και μηδαμινές βλάβες.<sup>4,25</sup>

Η εμβιομηχανική συμπεριφορά του αρθρικού χόνδρου μπορεί να γίνει καλύτερα κατανοητή εάν ο αρθρικός χόνδρος θεωρηθεί ένα διφασικό μέσο. Όπως έχει αναφερθεί και σε προηγούμενες ενότητες, αποτελείται από δυο φάσεις, μια ρευστή και μια στερεή φάση. Το νερό είναι το κυρίαρχο συστατικό της ρευστής φάσης, καθώς αποτελεί το 80% του υγρού όγκου του ιστού. Σε αυτή τη φάση υπάρχουν και ανόργανα ιόντα, όπως νάτριο (Na), ασβέστιο (Ca), χλώριο (Cl) και κάλιο (K). Η στερεή φάση αποτελείται κυρίως από την ECM, η οποία είναι πορώδης και διαπερατή.<sup>4,26</sup> Η σχέση που υπάρχει μεταξύ των πρωτεογλυκανών και του ρευστού που ρέει στα διάκενα του ιστού προσδίδει στον αρθρικό χόνδρο αντοχή στις δυνάμεις συμπίεσης μέσω των αρνητικών ηλεκτροστατικών δυνάμεων άπωσης.<sup>4,27</sup>

Κατά την άσκηση των φορτίων στην άρθρωση αναπτύσσονται γρήγορα δυνάμεις, οι οποίες προκαλούν μια άμεση αύξηση της πίεσης στη ρευστή φάση. Η αύξηση αυτή έχει ως αποτέλεσμα το ρευστό να ρέει έξω από την ECM και να αναπτύσσει μια μεγάλη δύναμη τριβής στη μήτρα.<sup>4,27</sup> Όταν τα συμπιεστικά φορτία υποχωρήσουν, το ρευστό ρέει πίσω στο εσωτερικό του ιστού. Η χαμηλή διαπερατότητα του αρθρικού ιστού εμποδίζει το ρευστό να ρεύσει εντελώς έξω από τη μήτρα. Τα δύο οστά, που συμμετέχουν κατά την κίνηση μιας άρθρωσης και περικλείουν τον αρθρικό χόνδρο, τον περιορίζουν κάτω από την επιφάνεια επαφής, με τρόπο τέτοιο ώστε να αποφεύγεται η μηχανική παραμόρφωσή του.

Ο αρθρικός χόνδρος παρουσιάζει ιξωδοελαστική συμπεριφορά, ενώ ταυτόχρονα εξαρτάται και από το χρόνο όταν ασκείται συνεχές φορτίο ή παραμόρφωση. Αυτή η ιξωδοελαστική συμπεριφορά οφείλεται σε δύο ειδών μηχανισμούς, έναν εξαρτώμενο και έναν ανεξάρτητο από τη ροή. Ο μηχανισμός που εξαρτάται από τη ροή οφείλεται στο ρευστό των διακένων της μήτρας και

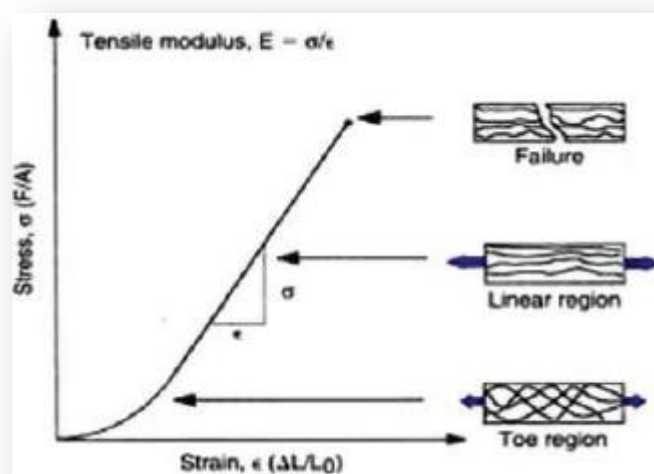


της δύναμης αντίστασης που σχετίζεται με αυτή τη ροή.<sup>26</sup> Η αντίσταση που προκύπτει από το ρευστό είναι γνωστή ως διφασική ιξωδοελαστική συμπεριφορά. Ο μηχανισμός που είναι ανεξάρτητος της ροής είναι το αποτέλεσμα της κίνησης των μακρομορίων και ειδικά της εσωτερικής ιξωδοελαστικής συμπεριφοράς του κολλαγόνου.

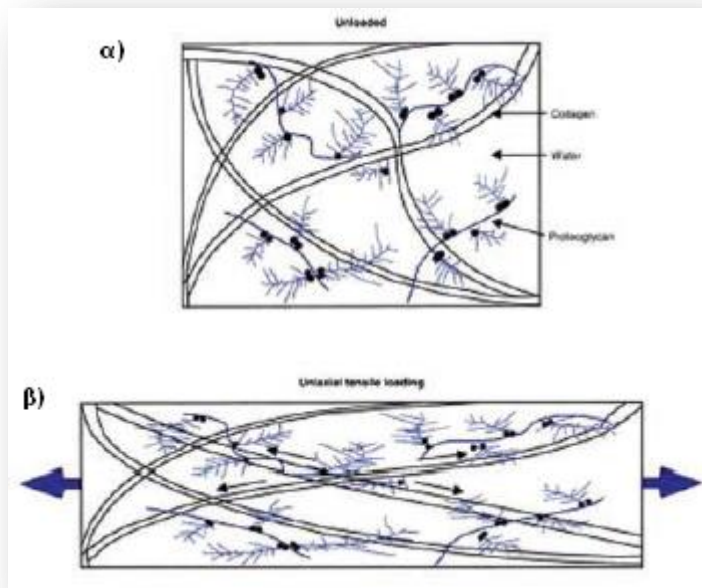
Η μηχανική συμπεριφορά του αρθρικού χόνδρου επίσης, παρουσιάζει ερπυσμό και μια παραμόρφωση χαλάρωσης. Όταν ο ιστός υφίσταται μια συνεχή παραμόρφωση συμπίεσης, η παραμόρφωσή του αυξάνεται με το χρόνο και οι δυνάμεις ερπυσμού και παραμόρφωσης θα συνεχίσουν να ασκούνται μέχρι να επιτευχθεί η ισορροπία. Παρόμοια, όταν ο αρθρικός χόνδρος παραμορφώνεται και διατηρείται σε μια διαρκή στρέψη, η παραμόρφωση φτάνει σε μια μέγιστη τιμή, η οποία ακολουθείται από μια αργή διαδικασία παραμόρφωσης-χαλάρωσης μέχρι να επιτευχθεί η ισορροπία. Καθώς η δύναμη στρέψης αυξάνεται, ο αρθρικός χόνδρος τείνει προς κατάσταση ακαμψίας κι επομένως, δεν είναι δυνατόν να περιγραφεί από ένα μέτρο του Young.<sup>4</sup>

Η πολυπλοκότητα στη σύνθεση και οργάνωση του αρθρικού χόνδρου στις διάφορες ζώνες παίζει πολύ σημαντικό ρόλο στην αντίσταση που αναπτύσσει έναντι στις δυνάμεις παραμόρφωσης που υφίσταται. Εάν ασκηθούν εκτατικές δυνάμεις (stretching) στις ίνες κολλαγόνου, οι οποίες είναι τυχαία διατεταγμένες, τότε φαίνεται η απόκριση του χόνδρου έναντι στις δυνάμεις παραμόρφωσης, όπως φαίνεται στην εικόνα παρακάτω.

Η αντίσταση στις δυνάμεις τάσης οφείλεται στη μοριακή διάταξη των ινών κολλαγόνου.<sup>28</sup>



**Σχήμα 3.4:** Διάγραμμα τάσης-παραμόρφωσης στον αρθρικό χόνδρου κατά την άσκηση φορτίου. Απεικόνιση προσανατολισμού ινών κολλαγόνου σε σχέση με το φορτίο.<sup>28</sup>



**Σχήμα 3.5:** Σχηματική αναπαράσταση των κυριότερων συστατικών του αρθρικού χόνδρου, όταν στον ιστό δεν ασκούνται φορτία (α) και όταν ασκούνται ελαστικά φορτία (β), όπου οι ίνες κολλαγόνου ευθυγραμμίζονται με τον άξονα τάσης.<sup>28</sup>

### 3.2 Βλάβες του Αρθρικού Χόνδρου

Στην προηγούμενη ενότητα, αναλύθηκε η δομή του αρθρικού χόνδρου, τα διάφορα συστατικά από τα οποία αποτελείται και ο ρόλος τους στη λειτουργία του, καθώς επίσης και οι ιδιότητες που χαρακτηρίζουν τον αρθρικό χόνδρο κατά τη λειτουργία του.

Όπως αναφέρθηκε, ο αρθρικός χόνδρος είναι ένας ιστός που χαρακτηρίζεται από χαμηλές δυνάμεις τριβής και μεγάλη αντοχή στη φθορά και λειτουργεί με τέτοιο τρόπο ώστε να κατανέμει ομοιόμορφα τα φορτία που ασκούνται κατά τη διάρκεια της κίνησης. Ο συνδυασμός της ρευστής και στερεής φάσης παρέχει στον αρθρικό χόνδρο τις κατάλληλες ιξωδοελαστικές και μηχανικές ιδιότητες προκειμένου να υπάρχει αποτελεσματική κατανομή των φορτίων. Ο αρθρικός χόνδρος αποτελεί έναν πολύ εξειδικευμένο ιστό με μοναδικές μηχανικές ιδιότητες, ωστόσο, δεν έχει την ικανότητα να αναγεννιέται σε περιπτώσεις βλάβης.

Η μεταβολική δραστηριότητα των χονδροκυττάρων είναι μικρή, ωστόσο είναι υπεύθυνα για τη διατήρηση και σταθεροποίηση της δομής και λειτουργίας της εξωκυττάριας μήτρας (ECM). Η υγιής διατήρηση ή μη της ECM μπορεί να γίνει καλύτερα κατανοητή αν θεωρηθεί ως διφασική δομή, η οποία αποτελείται από μια στερεή φάση (ίνες κολλαγόνου, πρωτεογλυκάνες) και μια ρευστή φάση (νερό, ανόργανα ιόντα). Η στερεή φάση παρουσιάζει χαμηλή διαπερατότητα λόγω της αυξημένης

αντίστασης τριβής στη ροή της ρευστής φάσης, γεγονός που προκαλεί αύξηση της πίεσης που υφίσταται το ρευστό στα διάκενα. Η συμπίεση του ρευστού παίζει πολύ σημαντικό ρόλο στη μεταφορά των φορτίων. Η χαμηλή διαπερατότητα της ECM και η αυξημένη πίεση του ρευστού καθορίζουν την ακαμψία και τις ιξωδοελαστικές ιδιότητες του αρθρικού χόνδρου.<sup>8</sup>

Η ισορροπία μεταξύ της διαδικασίας του αναβολισμού και αυτής του καταβολισμού της ECM είναι κυρίαρχης σημασίας της ομοιόστασης του αρθρικού χόνδρου. Οποιαδήποτε διαταραχή (βλάβη, τραυματισμός κτλ.) αυτής της ισορροπίας μπορεί να οδηγήσει σε βλάβη ή πάθηση του αρθρικού χόνδρου και ασθένειες, όπως είναι η αρθρίτιδα.

### **3.2.1 Οστεοαρθρίτιδα**

Η οστεοαρθρίτιδα είναι μία χρόνια πάθηση των αρθρώσεων, στην οποία παρατηρείται προοδευτική μαλάκυνση και αποδόμηση του αρθρικού χόνδρου, η οποία συνοδεύεται από ανάπτυξη νέου οστού και χόνδρου στις παρυφές των αρθρώσεων (οστεόφυτα), καθώς και από ίνωση του αρθρικού θυλάκου. Η οστεοαρθρίτιδα διαφέρει από την απλή φθορά, σε διάφορα σημεία: Έχει ασύμμετρη κατανομή και συχνά εντοπίζεται μόνο σε ένα διαμέρισμα μίας άρθρωσης. Συνήθως σχετίζεται με παθολογικά φορτία παρά σε φθορά από τριβή. Στην πιο συχνή της μορφή, δεν έχει καμία άλλη συστηματική εκδήλωση και παρά το γεγονός ότι ορισμένες φορές μπορεί να παρατηρηθούν σημεία φλεγμονής τοπικά, η ίδια η πάθηση δεν είναι φλεγμονώδους αιτιολογίας. Είναι μία δυναμική πάθηση η οποία παρουσιάζει στον ίδιο χρόνο χαρακτηριστικά τόσο καταστροφής όσο και επιδιόρθωσης.

Η οστεοαρθρίτιδα είναι η συχνότερη από όλες τις παθήσεις των αρθρώσεων. Είναι μια πραγματικά παγκόσμια πάθηση η οποία προσβάλλει άνδρες και γυναίκες όλων των φυλών. Οποιοσδήποτε ζήσει αρκετά χρόνια, θα αναπτύξει οστεοαρθρίτιδα κάποιου βαθμού σε κάποιο σημείο του σώματος του (Διάγραμμα 3.1).

**Διάγραμμα 3.1** Οστεοαρθρίτιδα, η συχνότερη πάθηση των αρθρώσεων



Οι αναφορές για την συχνότητα εμφάνισης ποικίλουν ανάλογα με τη μέθοδο εκτίμησης. Οι νεκροτομικές μελέτες έχουν δείξει ότι οι οστεοαρθρικές αλλοιώσεις υπάρχουν σε οποιονδήποτε μετά την ηλικία των 65 ετών. Οι ακτινολογικές μελέτες κάνουν την υπόθεση ότι η συχνότητα αυξάνει από 1% σε ηλικίες κάτω των 30 ετών σε πάνω από 50% σε ανθρώπους ηλικίας μεγαλύτερης των 60 ετών. Η οστεοαρθρίτιδα των αρθρώσεων των δακτύλων είναι ιδιαίτερα συχνή σε ηλικιωμένες γυναίκες και παρατηρείται σε ποσοστό περισσότερο του 70% σε γυναίκες μεγαλύτερες των 70 ετών.

Οι άνδρες και οι γυναίκες αναπτύσσουν οστεοαρθρίτιδα εξ ίσου αλλά στις γυναίκες προσβάλλονται περισσότερες αρθρώσεις από ότι στους άνδρες.

Η οστεοαρθρίτιδα είναι πολύ πιο συχνή σε ορισμένες αρθρώσεις (των δακτύλων, του ισχίου, του γόνατος και της σπονδυλικής στήλης) παρά σε άλλες (αγκώνας, καρπός, ποδοκνημική). Αυτή η παρατήρηση μπορεί απλά να αντανακλά το γεγονός ότι ορισμένες αρθρώσεις είναι περισσότερο ευαίσθητες σε προϋπάρχουσες διαταραχές από άλλες.

Διάφοροι **παράγοντες κινδύνου** φαίνεται να προδιαθέτουν στην εμφάνιση ή στην ταχύτερη εξέλιξη της οστεοαρθρίτιδας.

Παθήσεις όπως η συγγενής δυσπλασία της κοτύλης και η νόσος του Perthes, προδιαθέτουν για αυξημένη πιθανότητα ανάπτυξης οστεοαρθρίτιδας σε μεγαλύτερη ηλικία.

Ένα ενδοαρθρικό κάταγμα είναι προφανής προδιαθεσικός παράγοντας για ανάπτυξη δευτεροπαθούς οστεοαρθρίτιδας. Με τον ίδιο τρόπο είναι και κακώσεις μικρότερης βαρύτητας οι οποίες έχουν σαν αποτέλεσμα όμως αστάθεια της άρθρωσης.

Υπάρχουν αρκετές αποδείξεις της σχέσης μεταξύ οστεοαρθρίτιδας και ορισμένων επαγγελματιών τα οποία προκαλούν επαναλαμβανόμενες μικρές κακώσεις. Οι εργαζόμενοι οι οποίοι απαιτείται να γονατίζουν στη διάρκεια της εργασίας τους αναπτύσσουν οστεοαρθρίτιδα των γονάτων. Οι εργάτες που δουλεύουν με εργαλεία που έχουν ισχυρές ταλαντώσεις αναπτύσσουν οστεοαρθρίτιδα στα άνω άκρα. Η σχέση της οστεοαρθρίτιδας με τις διάφορες αθλητικές δραστηριότητες είναι ακόμη αντικείμενο μελέτης. Οι πυγμάχοι αναπτύσσουν συχνότερα οστεοαρθρίτιδα των χεριών αλλά αυτή μπορεί να οφείλεται και σε οξείς τραυματισμούς. Το ίδιο ισχύει και για τους ποδοσφαιριστές οι οποίοι αναπτύσσουν οστεοαρθρίτιδα των γονάτων και στους αθλητές του baseball οι οποίοι αναπτύσσουν οστεοαρθρίτιδα του ώμου. Πρόσφατα υπάρχουν και νέες μελέτες οι οποίες υποστηρίζουν την ανάπτυξη οστεοαρθρίτιδας και σε αθλητές.

Η παρατήρηση ότι οι γυναίκες με υποκεφαλικό κάταγμα του ισχίου σπάνια παρουσιάζουν ευρήματα οστεοαρθρίτιδας είναι πολύ παλαιά. Αυτή η παρατήρηση ενισχύεται και από τα αποτελέσματα μελετών έδειξαν μία αύξηση της οστικής πυκνότητας σε ανθρώπους που πάσχουν από οστεοαρθρίτιδα. Τα πράγματα όμως μπορεί να μην είναι τόσο απλά: Η οστική πυκνότητα καθορίζεται από μία ποικιλία γενετικών, ορμονικών και μεταβολικών παραγόντων οι οποίοι μπορούν επίσης να επηρεάζουν ανεξάρτητα και τον μεταβολισμό του χόνδρου.

Η απλή ιδέα ότι η αύξηση του σωματικού βάρους οδηγεί σε αυξημένη φόρτιση των αρθρώσεων και επομένως προδιαθέτει σε οστεοαρθρίτιδα μπορεί να είναι σωστή σε κάποιο ποσοστό τουλάχιστον για τη οστεοαρθρίτιδα των γονάτων. Η συσχέτιση αυτή είναι πιο εμφανής στις γυναίκες παρά στους άνδρες και έτσι μπορεί να είναι το αποτέλεσμα άλλων μηχανισμών (ενδοκρινών ή μεταβολικών) οι οποίοι οδηγούν στην ανάπτυξη οστεοαρθρίτιδας.

Το οικογενειακό ιστορικό φαίνεται να παίζει κι αυτό κάποιο ρόλο μιας και οι γυναίκες με οστεοαρθρίτιδα έχουν αυξημένη πιθανότητα να δουν τις κόρες τους να αναπτύσσουν την ίδια πάθηση. Το γονίδιο το οποίο είναι υπεύθυνο για αυτό το φαινόμενο δεν είναι γνωστό.

Οι ασθενείς με οστεοαρθρίτιδα συνήθως έχουν υπερβεί τη μέση ηλικία. Η προσβολή των αρθρώσεων μπορεί να ακολουθεί διάφορες μορφές π.χ.: συμπτώματα από μία ή δύο μεγάλες φορτιζόμενες αρθρώσεις (ισχίο ή γόνατο), από τις φαλαγγοφαλαγγικές αρθρώσεις (ιδίως σε γυναίκες), ή από οποιαδήποτε άλλη άρθρωση η οποία έχει υποστεί παλαιότερα κάποια βλάβη (π.χ. συγγενής δυσπλασία, οστεονέκρωση ή ενδαρθρικό κάταγμα). Η οικογενής προδιάθεση είναι συχνή σε ασθενείς με πολυαρθρική οστεοαρθρίτιδα.

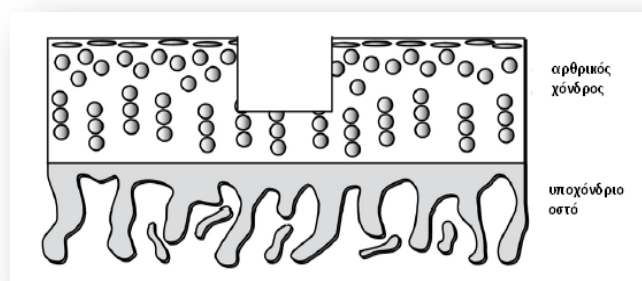
## ΑΠΕΙΚΟΝΙΣΤΙΚΟΣ ΕΛΕΓΧΟΣ

1. Απλή ακτινογραφία
2. Σπινθηρογράφημα των οστών με  $^{99m}\text{Tc-HDP}$ .
3. Μαγνητική τομογραφία (MRI).
4. Αρθροσκόπηση
5. CT scanogram.

Υπάρχουν τρεις βασικοί τύποι τραυματισμού του αρθρικού χόνδρου: διάσπαση της εξωκυττάριας μήτρας, ατέλειες μερικού πάχους (partial thickness defects) και ατέλειες ολικού πάχους (full thickness defects).

**Η διάσπαση της εξωκυττάριας μήτρας (ECM)** μπορεί να είναι το αποτέλεσμα άμεσου τραυματισμού. Η ECM καταστρέφεται, ωστόσο, αν το τραύμα δεν είναι πολύ σοβαρό, τα χονδροκύτταρα που έχουν επιβιώσει αυξάνουν τη συνθετική τους δραστηριότητα ώστε να επιδιορθώσουν τις όποιες βλάβες.

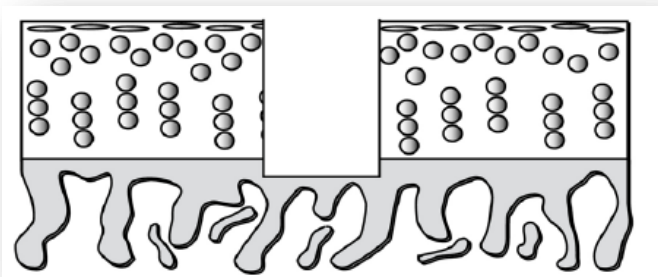
**Οι ατέλειες μερικού πάχους** συμβαίνουν μέσα στα όρια του αρθρικού χόνδρου, χωρίς να επεκτείνονται κάτω από τη ζώνη επασβεστωμένου χόνδρου και να εισχωρούν μέχρι το υποχόνδριο οστό. Επομένως, δεν είναι δυνατή η πρόσβαση κυττάρων και δε δημιουργείται ινώδης θρόμβος στην περιοχή της βλάβης. Οι κακώσεις μερικού πάχους δε θεραπεύονται<sup>15</sup> και η μορφή τους κάποιους μήνες μετά τον τραυματισμό παραμένει περίπου ίδια όπως ακριβώς μετά τον τραυματισμό. Η μορφή των κακώσεων αυτών είναι ανάλογη με τις σχισμές και τις ραγάδες που δημιουργούνται κατά τα πρώτα στάδια της οστεοαρθρίτιδας.<sup>15</sup> Στην περίπτωση που ο ιστός είναι ώριμος, τότε παρατηρείται



Σχήμα 3.6 Κάκωση μερικού πάχους

απόκριση του ιστού γειτονικά της βλάβης. Τα κύτταρα που βρίσκονται κοντά στα όρια της βλάβης πεθαίνουν. Μετά από 24 ώρες, ωστόσο, υπάρχει αύξηση στη διαδικασία πολλαπλασιασμού των κυττάρων και σχηματίζεται ένα σύμπλεγμα χονδροκυττάρων. Ταυτόχρονα με τον πολλαπλασιασμό των κυττάρων, παρατηρείται σύνθεση της ECM. Αυτή η απόκριση είναι σύντομη, ενώ η διαδικασία επιδιόρθωσης αποτυγχάνει. Κατά την προσπάθεια επιδιόρθωσης, κύτταρα που υπάρχουν στο υγρό της μεμβράνης του αρθρικού χόνδρου καθ' όλη την επιφάνειά του μετακινούνται προς το σημείο της βλάβης υπό την επίδραση διάφορων παραγόντων ανάπτυξης. Ωστόσο, λόγω της απώλειας ινώδους μήτρας, αυτά τα κύτταρα δε μπορούν να καλύψουν την ατέλεια που δημιουργείται. Αυτό οφείλεται εν μέρει στις πρωτεογλυκάνες, οι οποίες εμποδίζουν την προσρόφηση των κυττάρων σε συνδυασμό με κάποιους άλλους μηχανισμούς του οργανισμού.<sup>15,16</sup>

**Οι ατέλειες ολικού πάχους** προκύπτουν από τραυματισμούς οι οποίοι είναι κάθετοι στον αρθρικό χόνδρο, επεκτείνονται σε όλη την έκτασή του και εισχωρούν μέχρι το υποχόνδριο οστό. Επομένως, τα κύτταρα που βρίσκονται στο μυελό του οστού μπορούν να έχουν πρόσβαση στη βλάβη. Σε αυτή την περίπτωση, η ατέλεια καλύπτεται με έναν ινώδη θρόμβο και ακολουθεί η διαδικασία



**Σχήμα 3.7** Κάκωση ολικού πάχους

ιστός που δημιουργείται αποτελεί ένα χαμηλής ποιότητας υποκατάστατο για τον αρθρικό χόνδρο, καθώς υπάρχει αποσύνθεση αυτού όπως επίσης και του φυσικού αρθρικού χόνδρου. Σύμφωνα με μελέτη του Shapiro,<sup>18</sup> κατά τη διαδικασία αυτή ο ιστός στα όρια της κάκωσης νεκρώνεται και εκτός από το σχηματισμό του συμπλέγματος των χονδροκυττάρων, πραγματοποιείται ανακατασκευή του αρθρικού ιστού σε ελάχιστο ή και μη υπαρκτό βαθμό. Μεταξύ του φυσικού ιστού και του υποκατάστατου παρατηρείται ασυνέχεια και ο δεύτερος είναι λιγότερο άκαμπτος και περισσότερο διαπερατός σε σχέση με τον φυσιολογικό αρθρικό ιστό, γεγονός που μπορεί να οδηγήσει σε αποδόμησή του σε κάποιο χρονικό διάστημα.<sup>17</sup>

Η περιορισμένη ικανότητα του αρθρικού χόνδρου να αποκαταστήσει από μόνος του τις βλάβες που προκαλούνται σε περιπτώσεις τραυματισμών μπορεί να εξηγηθεί από διάφορους παράγοντες.

Τα χονδροκύτταρα δεν πρέπει να πολλαπλασιάζονται προκειμένου να διατηρηθεί ο αρθρικός χόνδρος όπως συμβαίνει με άλλους ιστούς του ανθρώπινου οργανισμού (π.χ. δέρμα) και τα ώριμα χονδροκύτταρα παρουσιάζουν χαμηλή μεταβολική δραστηριότητα.<sup>21</sup> Εκτός από την περίπτωση των ατελειών ολικού πάχους, δεν είναι δυνατή η πρόσβαση σε νεογέννητα κύτταρα και τα χονδροκύτταρα που επιβιώνουν από τον τραυματισμό δεν καλύπτουν την ατέλεια καθώς παρεμποδίζονται από την ECM. Επιπλέον, οι πρωτεογλυκάνες της ECM εμποδίζουν την προσρόφηση των κυττάρων δυσκολεύοντας περαιτέρω τη διαδικασία της επιδιόρθωσης.<sup>16,18</sup>

### **3.3 Θεραπεία των Βλαβών του Αρθρικού Χόνδρου**

Λόγω της έλλειψης αιμοφόρων αγγείων και νεύρων στον αρθρικό χόνδρο, όπως έχει αναφερθεί και σε προηγούμενη ενότητα, η επιδιόρθωση και επούλωση των βλαβών που υφίσταται ο αρθρικός χόνδρος έχει ως αποτέλεσμα να μην είναι δυνατή η θεραπεία του σε περιπτώσεις ασθένειας ή τραυματισμού με φυσικό τρόπο.<sup>17</sup>

Η αντιμετώπιση της οστεοαρθρίτιδας εξαρτάται από την άρθρωση (ή τις αρθρώσεις) που πάσχουν, από το στάδιο της πάθησης, από την ένταση των συμπτωμάτων, από την ηλικία του ασθενούς και από τις λειτουργικές του ανάγκες. Στον σχεδιασμό της θεραπείας θα πρέπει να λαμβάνονται υπ' όψη τρία σημεία:

1. Τα συμπτώματα έχουν εξάρσεις και υφέσεις που μερικές φορές διαρκούν μεγάλα χρονικά διαστήματα,
2. Μερικές μορφές οστεοαρθρίτιδας γίνονται λιγότερο επώδυνες με το πέρασμα του χρόνου και το μόνο που χρειάζεται ο ασθενής είναι η συνταγογράφηση κάποιων ήπιων αναλγητικών,
3. Η διαπίστωση (από διαδοχικές ακτινογραφίες) ότι ο ασθενής πάσχει από μία ταχέως καταστροφική μορφή οστεοαρθρίτιδας, δικαιολογεί μία πρόωγη απόφαση για επανορθωτικές επεμβάσεις, πριν η οστική απώλεια γίνει τόσο έντονη ώστε να επηρεαστεί αρνητικά το αποτέλεσμα οποιασδήποτε μελλοντικής εγχείρησης.

Στον παρακάτω πίνακα (Πίνακας 3.1) αναφέρονται οι θεραπείες, ανάλογα με το βαθμό κάκωσης του χόνδρου.



**Πίνακας 3.1** Θεραπείες ανάλογα με τον βαθμό κάκωσης του χόνδρου

|  |  |
|--|--|
| <p><b>Θεραπεία πρώιμου σταδίου:</b><br/> <b>ανακουφιστική και συμπτωματική. Οι βασικοί θεραπευτικοί άξονες είναι:</b></p> <ol style="list-style-type: none"> <li>1. Διατήρηση του εύρους κίνησης της άρθρωσης και της μυϊκής ισχύος,</li> <li>2. Προστασία της άρθρωσης από υπερφόρτιση,</li> <li>3. Αναλγησία,</li> <li>4. Τροποποίηση των καθημερινών δραστηριοτήτων.</li> </ol> | <ul style="list-style-type: none"> <li>✓ Φυσιοθεραπεία</li> <li>✓ Ομάδες αυτοβοήθειας και εκπαίδευση του ασθενούς</li> <li>✓ Αποφόρτιση της άρθρωσης</li> <li>✓ Αναλγητικά φάρμακα</li> <li>✓ Τοπικά φαρμακευτικά σκευάσματα</li> <li>✓ Θεϊκή κρυσταλλική γλυκοζαμίνη – χονδροϊτίνη</li> <li>✓ Ενδαρθρικές εγχύσεις υαλουρονικού-στεροειδών</li> </ul> |
| <p><b>Θεραπεία ενδιάμεσου σταδίου</b></p>  | <ul style="list-style-type: none"> <li>✓ Αρθροσκόπηση</li> <li>✓ Μεταμόσχευση αυτόλογων χονδροκυττάρων</li> <li>✓ Οστεοτομία</li> </ul>  |
| <p><b>Θεραπεία τελικού σταδίου</b></p>   | <ul style="list-style-type: none"> <li>✓ Αρθρόδεση</li> <li>✓ Μερική αρθροπλαστική</li> <li>✓ Ολική αρθροπλαστική</li> <li>✓ Ψηφιακά υποβοηθούμενη ολική αρθροπλαστική</li> </ul>  |

**Χειρισμός των συμπτωμάτων:** Εξαιτίας της δυσκολίας στην επιδιόρθωση των βλαβών του αρθρικού χόνδρου με φυσικό τρόπο, οι ειδικοί έχουν στραφεί σε άλλες μεθόδους προκειμένου να επαναφέρουν τη λειτουργικότητα της άρθρωσης που έχει υποστεί τη βλάβη. Σε περίπτωση που η βλάβη του αρθρικού χόνδρου είναι σοβαρή, τα συμπτώματα αντιμετωπίζονται με χειρουργική αφαίρεση του χόνδρου ή με άλλες χειρουργικές μεθόδους. Η χειρουργική αφαίρεση του αρθρικού χόνδρου ακολουθείται συνήθως με εμφύτευση κάποιου πρόσθετου υλικού στην άρθρωση. Επίσης,

ανακούφιση από τον πόνο μπορεί να γίνει με τη μέθοδο της οστεοτομής (osteotomy), με την οποία αφαιρείται ένα τμήμα των οστών στην αρθρική επιφάνεια ώστε να μειωθεί το φορτίο που ασκείται στην άρθρωση. Με τον τρόπο αυτό, ο ειδικός μπορεί να φέρει σε επαφή μεταξύ τους περιοχές της άρθρωσης στις οποίες υπάρχει αρθρικός χόνδρος. Τέτοιου είδους μέθοδοι χρησιμοποιούνται όταν άλλες τεχνικές έχουν αποτύχει.

**Αποκατάσταση του χόνδρου:** Σε ασθενείς με μικρότερου βαθμού τραυματισμούς και κακώσεις, οι ειδικοί έχουν χρησιμοποιήσει άλλες μεθόδους για την αποκατάσταση του αρθρικού χόνδρου στην επιφάνεια της άρθρωσης. Οι μέθοδοι αυτές περιλαμβάνουν εμφύτευση και αντικατάσταση μοσχεύματος του ιστού ή ενίσχυση της διαδικασίας επιδιόρθωσης με φυσικό τρόπο.

**Αναγέννηση του χόνδρου:** Η εύρεση κάποιου δωρητή μοσχεύματος αρθρικού χόνδρου, όπως επίσης και τα προβλήματα που μπορεί να δημιουργηθούν από τη χρήση εμφυτευμάτων είναι παράγοντες που δυσχεραίνουν την αποκατάσταση του αρθρικού χόνδρου. Για το λόγο αυτό, έχουν γίνει προσπάθειες θεραπείας και αναγέννησης του αρθρικού ιστού. Οι τεχνικές που έχουν χρησιμοποιηθεί για την αναγέννηση αρθρικού χόνδρου, αντί της αντικατάστασης αυτού επικεντρώνονται στην ενίσχυση των ιδιοτήτων του να αναγεννηθεί ο ιστός από μόνος του ή στην εμφύτευση επιπλέον χονδροκυττάρων προκειμένου να σχηματιστεί ο ιστός. Ωστόσο, κανένας από αυτούς τους τρόπους δεν ήταν αποτελεσματικός, ειδικά σε ασθενείς μεγάλης ηλικίας.

### Αρθροσκοπικές τεχνικές

Οι αρθροσκοπικές τεχνικές χρησιμοποιούνται για να καταπραΰνουν τον πόνο. Πολλές από αυτές τις τεχνικές εκμεταλλεύονται το πλεονέκτημα της φυσικής απόκρισης του οργανισμού στο σημείο της βλάβης, η οποία όπως προαναφέρθηκε συμβαίνει στις κακώσεις ολικού πάχους. Παραδείγματα τεχνικών που ανήκουν σ' αυτή την κατηγορία είναι:

- **το θεραπευτικό πλύσιμο** (therapeutic lavage): εξάγονται οι πρωτεογλυκάνες από την επιφανειακή ζώνη του αρθρικού χόνδρου, επιτρέποντας, έτσι, την είσοδο επιδιορθωτικών κυττάρων έστω και παροδικά,
- **η απόξεση** (shaving) : μηχανική απομάκρυνση του αρθρικού ιστού που πάσχει με τη χρήση κατάλληλων χειρουργικών εργαλείων
- **η χειρουργική αφαίρεση του αρθρικού ιστού** (debridement): πραγματοποιείται απομάκρυνση των τμημάτων του αρθρικού χόνδρου που έχουν υποστεί βλάβη και αποκόβονται τα οστεόφυτα.

- **η αρθροπλαστική απόξεση** (abrasion arthroplasty): επιτρέπει την πρόσβαση σε περιοχές στο μυελό των οστών με τη χρήση χειρουργικών εργαλείων. Ροή αίματος από το υποχόνδριο οστό και κατ' επέκταση το συνεχή σχηματισμό θρόμβου
- **η διάτρηση Pridie** (pridie drilling): οπών για θεραπευτικούς λόγους στο μυελό των οστών που βρίσκεται κάτω από περιοχές που έχουν υποστεί κάποια βλάβη. Με τη χρήση των κατάλληλων εργαλείων πραγματοποιείται διάτρηση του οστού και υπάρχει ροή αίματος από το εσωτερικό του οστού
- **η μικροθραύση** (microfracture): μια αρθροσκοπική «μύτη» χρησιμοποιείται για να δημιουργηθούν πολλαπλές τρύπες στην περιοχή τη βλάβης, οι οποίες απέχουν 3 – 4 mm η μια από την άλλη και αφήνουν το υποχόνδριο οστό ανέπαφο. Μετά από αυτή τη διαδικασία, η περιοχή της κάκωσης καλύπτεται με έναν έξτρα θρόμβο, όπως λέγεται ένα ιδανικό περιβάλλον στο μυελό των οστών, όπου τα κύτταρα μπορούν να διαφοροποιηθούν και να δημιουργηθεί πιο σταθερός ιστός.

Οι αρθροσκοπικές τεχνικές βασίζονται στο σχηματισμό θρόμβου αίματος, ο οποίος στη συνέχεια μετατρέπεται σε ινώδη επιδιορθωτικό ιστό. Το συμπέρασμα που προκύπτει από αυτές τις μεθόδους ποικίλει λόγω της φύσης του ιστού που σχηματίζεται, καθώς επίσης και λόγω ηλικίας και της δραστηριότητας των ασθενών.<sup>22</sup>

### **Οστεοτομή (osteotomy)**

Εάν τα συμπτώματα του ασθενούς επιδεινωθούν, τότε σε ορισμένες αρθρώσεις (ισχίο - γόνατο), μπορεί να γίνουν οστεοτομίες διόρθωσης του άξονα φόρτισης. Η οστεοτομία διαχωρίζει το οστόν και επανατοποθετεί τα κομμάτια με τέτοιο τρόπο ώστε να διορθώσει την υπάρχουσα παραμόρφωση και να βελτιώσει τη μηχανική φόρτιση της άρθρωσης. Επίσης είναι πιθανόν να ανακουφιστεί με αυτό τον τρόπο η φλεβική ενδοοστική συμφόρηση.

Για να είναι επιτυχείς οι οστεοτομίες, θα πρέπει να γίνουν όταν οι αρθρώσεις είναι ακόμη σταθερές, το εύρος κίνησης ικανοποιητικό και οι ακτινογραφίες να δείχνουν ότι ένα μεγάλο τμήμα του μεσάρθριου διαστήματος έχει ακόμη διατηρηθεί. Η ανακούφιση από τον πόνο είναι εντυπωσιακή και αποδίδεται:

- i. στην αγγειακή αποσυμφόρηση του υποχονδρίου οστού, και
- ii. στην ανακατανομή των φορτίων σε μη κατεστραμμένα τμήματα της άρθρωσης.

Οι ασθενείς που παραπέμπονται για οστετομία πρέπει να επιλέγονται προσεκτικά, γιατί η επέμβαση αυτή απαιτεί καλύτερη διανοητική και φυσική κατάσταση, σε σχέση με την αρθροπλαστική. Η επέμβαση αυτή πρέπει να γίνεται σε ασθενείς με έντονο πόνο και αυξημένη δραστηριότητα, στην ουσία ο ασθενής θα πρέπει να έχει ηλικία δραστηριότητας 60 ετών και λιγότερο. Στον πίνακα 3.2 αναφέρονται οι παράγοντες που αποκλείουν την οστετομία.

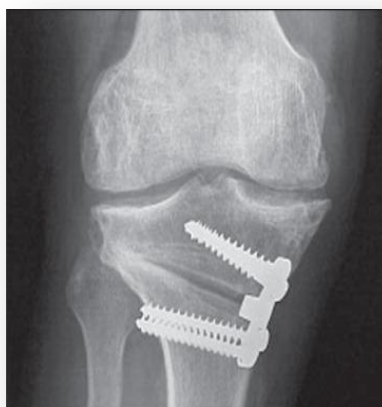
**Πίνακας 3.2** Παράγοντες που αποκλείουν την οστετομία

| <b>Παράγοντες που αποκλείουν την οστετομία</b> |
|--|
| <b>Σοβαρή επιγονατιδομηριαία νόσος</b>         |
| <b>Σοβαρή διαταραχή άξονα</b>                  |
| <b>Διανοητικά ή φυσικά εύθραυστοι ασθενείς</b> |
| <b>Πτωχή «ηλικία δραστηριότητας»</b>           |
| <b>Σοβαρά προχωρημένη νόσος</b>                |
| <b>Έντονη παχυσαρκία</b>                       |

Τα αποτελέσματα της οστετομίας δεν είναι τόσο καλά, όσο των ολικών αρθροπλαστικών. Τα ποσοστά των ωφέλιμων επιδράσεων της οστετομίας είναι περίπου 90% στον ένα χρόνο, ενώ μειώνονται στο 70% στα πέντε χρόνια και στα δέκα χρόνια έχουν πέσει στο 30% (Nilsdotter et al, 2002). Παράλληλα, η επούλωση από τη συγκεκριμένη επέμβαση χρειάζεται μεγαλύτερο χρονικό διάστημα, με αποτέλεσμα το μεγαλύτερο χρόνο νοσοκομειακής περίθαλψης. Το σημαντικό όμως είναι ότι μία οστετομία μπορεί να μετατραπεί σε αρθροπλαστική. Στα σχήματα 3.8 & 3.9 απεικονίζονται μερικά παραδείγματα οστετομίας.



**Σχήμα 3.8** Οστετομία ισχίου



**Σχήμα 3.9** Οστετομία γόνατος

## Μοσχεύματα μαλακού ιστού

Η χρήση μοσχευμάτων μαλακού ιστού σε περιπτώσεις κακώσεων του αρθρικού χόνδρου ολικού πάχους έχει πραγματοποιηθεί κυρίως σε ζώα για πειραματικούς σκοπούς, ενώ στον ανθρώπινο οργανισμό βρίσκεται σε στάδιο κλινικών δοκιμών. Τα μοσχεύματα αυτά βρίσκουν μεγάλη εφαρμογή με τη μεταμόσχευση μοσχευμάτων του περιόστεου (periosteum grafts) και του περιχονδρίου (perichondrium graft). Τα αποτελέσματα ποικίλουν ανάλογα με τη μορφή του ιστού που σχηματίζεται. Δεν έχει παρατηρηθεί μεγάλη διαφορά μεταξύ μοσχευμάτων του περιόστεου και του περιχονδρίου. Ωστόσο, αυτά που χρησιμοποιούνται με μεγαλύτερη συχνότητα είναι τα μοσχεύματα περιόστεου.<sup>22</sup>

## Αυτόλογα μοσχεύματα ιστού (autologous tissue transplantation)

Τα αυτόλογα μοσχεύματα αφορούν στα μοσχεύματα του περιόστεου και του περιχονδρίου, που αναφέρθηκαν παραπάνω. Η προοπτική αναγέννησης χόνδρου και οι ιδιότητες επιδιόρθωσης που έχει ο περιχόνδριος ιστός αρχικά αναγνωρίστηκαν από την επιστημονική ομάδα του Haebel<sup>30</sup> το 1925, ωστόσο, τα ευρήματά τους δεν επιβεβαιώθηκαν παρά μετά από 30 χρόνια. Παρ' όλα αυτά, ο περιόστεος και περιχόνδριος ιστός χρησιμοποιήθηκαν ως αυτομοσχεύματα για την επιδιόρθωση των κακώσεων του αρθρικού χόνδρου τη δεκαετία του '70. Από τότε κι έπειτα έχουν γίνει πολλές παραλλαγές στα πρωτόκολλα για τη θεραπεία βλαβών του αρθρικού χόνδρου.<sup>29</sup>

Η δυνατότητα αναγέννησης του χόνδρου από το περιόστεο οφείλεται στην ύπαρξη πρόδρομων χονδροκυττάρων στο στρώμα του μαλακού ιστού. Το περιόστεο αποτελεί το μαλακό φλοιό που υπάρχει δίπλα από το οστό. Μελέτες in vitro έχουν δείξει ότι η διαφοροποίηση των χονδροκυττάρων λαμβάνει χώρα στην περιοχή του μαλακού φλοιού κοντά στο οστό και εξελίσσεται προχωρώντας προς την ινώδη περιοχή του χόνδρου, χωρίς όμως ο ινώδης ιστός που σχηματίζεται να είναι και αρθρικός. Η σύνθεση του νέου αρθρικού ιστού παρατηρείται καθώς απομακρυνόμαστε από την ινώδη περιοχή, γεγονός το οποίο συνιστά την ύπαρξη των πρόδρομων χονδροκυττάρων στο ινώδες στρώμα του μαλακού φλοιού. Η χρήση του περιόστεου για την επιδιόρθωση κακώσεων ολικού πάχους περιλαμβάνει τη δημιουργία μιας ολικού πάχους κάκωσης διαμέτρου 4 mm και την απομάκρυνση 1-2 m υποχονδρίου οστού. Στη συνέχεια, το περιστεϊκό μόσχευμα εμφυτεύεται στο σημείο της βλάβης με το μαλακό φλοιό να είναι προσανατολισμένος προς την αρθρική επιφάνεια και το μόσχευμα σταθεροποιείται με τη βοήθεια ινώδους κόλλας. Το βάθος που θα έχει η βλάβη που θα δημιουργηθεί είναι πολύ σημαντικό, καθώς επηρεάζει το βαθμό ανάπτυξης της άρθρωσης του μαλακού φλοιού με την επιφάνεια του απέναντι οστού μέχρι

το σχηματισμό της μήτρας. Εκτός από τα πρόδρομα περιστεϊκά χονδροκύτταρα, ένα ακόμη είδος κυττάρων που μπορεί να συμμετέχουν στην ανάπτυξη του νέου αρθρικού ιστού είναι τα μεσεγχυματικά βλαστικά κύτταρα, τα οποία προέρχονται από το υποχόνδριο οστό.<sup>22</sup>

## **Οστεοχονδρική μεταμόσχευση / Μωσαϊκοπλαστική**

### **(osteochondral transplantation/mosaicplasty)**

Η οστεοχονδρική μεταμόσχευση αυτογενούς και αλλογενούς ιστού αποτελεί μια μέθοδο ευρέως χρησιμοποιούμενη για τη θεραπεία σοβαρών οστεοχονδρικών βλαβών. Αλλογενή υλικά που προέρχονται από πτώματα δωρητών έχουν χρησιμοποιηθεί για τη θεραπεία κακώσεων σημειώνοντας διαφορετικούς βαθμούς επιτυχίας. Από πειράματα έχει φανεί ότι η χρήση φρέσκου ιστού παρουσιάζει μεγαλύτερη επιτυχία σε σχέση με τη χρήση παγωμένου ιστού, κυρίως όσον αφορά στο θάνατο των κυττάρων και τη μηχανική σταθερότητα. Ένα πρόβλημα που συνεχίζει να υπάρχει στην εν λόγω μέθοδο θεραπείας είναι η ανοσοποιητική απόκριση του οργανισμού. Παρότι η εμφύτευση αλλογενών μοσχευμάτων έχει θετικά αποτελέσματα στην επιδιόρθωση μεγάλων οστεοχονδρικών βλαβών, η εμφύτευση αυτογενών μοσχευμάτων χρησιμοποιείται για τη θεραπεία μικρότερων κακώσεων ολικού πάχους. Τα αυτόλογα οστεοχονδρικά μοσχεύματα περιλαμβάνουν την απομάκρυνση κυλινδρικών στομίων οστεοχονδρικού ιστού από περιοχές του αρθρικού χόνδρου που υφίστανται χαμηλά φορτία και την εμφύτευσή τους στα σημεία της βλάβης. Αυτή η διαδικασία μπορεί να πραγματοποιηθεί είτε μέσω εγχείρισης είτε αρθροσκοπικά.<sup>22</sup>

Αποτελέσματα εξετάσεων μετά την εφαρμογή της μεθόδου έχουν δείξει ότι ο πόνος μειώνεται και βελτιώνεται η λειτουργικότητα της άρθρωσης, ενώ οι πιο επιτυχείς περιπτώσεις είναι αυτές των μικρών και μεσαίων σε έκταση βλαβών ολικού πάχους. Παρά τα θετικά που παρουσιάζει η συγκεκριμένη μέθοδος, εξακολουθούν να υπάρχουν ερωτήματα ως προς τη συμβατότητα των χονδροκυττάρων του δότη και την ανάπτυξη κάποιας μόλυνσης, όπως επίσης και για την αντοχή του ιστού, ο οποίος προέρχεται από μια περιοχή χαμηλών φορτίων, σε μεγάλες δυνάμεις που θα υφίσταται στη νέα θέση.<sup>22</sup>

Ο θάνατος των χονδροκυττάρων στα όρια του οστεοχονδρικού στομίου μπορεί να οδηγήσει σε αποδόμηση του ιστού και αποτυχία του μοσχεύματος. Τα κενά που δημιουργούνται αναπόφευκτα ανάμεσα στα μοσχεύματα και η απώλεια της βιωσιμότητας των κυττάρων στα όρια των μοσχευμάτων δηλώνουν την αποσύνθεση του μοσχεύματος και του παραλήπτη-ιστού με την πάροδο του χρόνου. Ένας σημαντικός παράγοντας που είναι απαραίτητο να εξεταστεί σε αυτή την

περίπτωση θεραπείας είναι η νοσηρότητα που μπορεί να προκληθεί από το δότη. Πρώτον, η συμβατότητα των χονδροκυττάρων που είναι γειτονικά των σημείων από όπου παραλαμβάνονται τα μοσχεύματα είναι πολύ σημαντική, καθώς ο θάνατος των κυττάρων στα όρια των μοσχευμάτων μπορεί να οδηγήσει σε αποδόμηση του ιστού, όπως αναφέρθηκε παραπάνω. Επίσης, θεωρητικά θα σχηματιστεί ένας αρθρικός επιδιορθωτικός ιστός στα διάκενα μεταξύ οπής και στομίου, ο οποίος στηρίζεται στο σχηματισμό θρόμβου αίματος που μετατρέπεται σε ινώδη ιστό, ο οποίος όμως δεν είναι δυνατόν να επαναπτυχθεί.<sup>22</sup>

### **Επιδιόρθωση βλαβών μέσω εμφύτευσης κυττάρων**

#### **Εμφύτευση αυτόλογων χονδροκυττάρων (autologous chondrocyte implantation - ACI)**

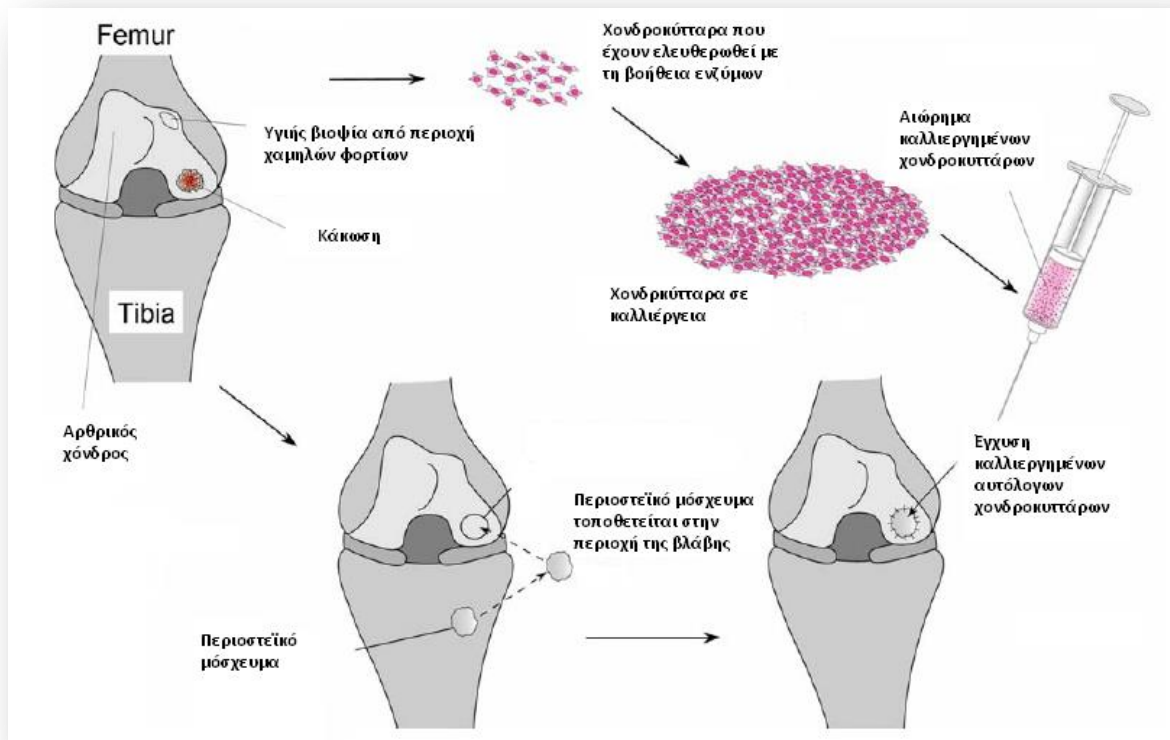
Η μέθοδος της εμφύτευσης αυτόλογων χονδροκυττάρων (ACI) (Σχήμα 3.10 & 3.11) περιγράφηκε αρχικά από την επιστημονική ομάδα του Brittberg.<sup>31</sup> Η διαδικασία της μεταμόσχευσης των χονδροκυττάρων περιλαμβάνει δύο στάδια:

- i. Αρθροσκοπική λήψη χονδροκυττάρων (200-500mg) από τον ίδιο τον ασθενή και αποστολή αυτών για καλλιέργεια σε εξειδικευμένο κέντρο. Η καλλιέργεια των χονδροκυττάρων γίνεται με ειδικές τεχνικές και χρειάζεται 4-5 εβδομάδες.
- ii. Αρθροσκοπική τοποθέτηση των καλλιεργημένων αυτομοσχευμάτων ή τοποθέτησή τους με διάνοιξη της άρθρωσης με μικρή τομή αναλόγως το σημείο του ελλείμματος και της έκτασης αυτού (mini open operation).

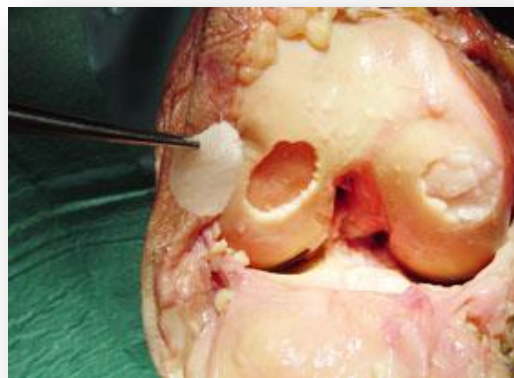
Μετά τη φάση αυτή ο ασθενής ακολουθεί πρόγραμμα αποκατάστασης της άρθρωσης που διαρκεί από 6-12 εβδομάδες. Μετά το πέρας 6-12 μηνών θα επέλθει η ωρίμανση του νέου χόνδρου και θα δώσει τη δυνατότητα πλέον στον ασθενή να επιστρέψει πλήρως στις δραστηριότητές του.

Τα κύτταρα που χρησιμοποιούνται στη μέθοδο της ACI μπορεί να προέρχονται από τρεις πηγές: τα εμφυτευμένα χονδροκύτταρα, τα πρόδρομα χονδροκύτταρα από το περιστεϊκό μόσχευμα και τα μεσεγχυματικά βλαστικά κύτταρα από το μυελό του υποχονδρίου οστού.<sup>22</sup>





Σχήμα 0.10: Μέθοδος εμφύτευσης αυτόλογων χονδροκυττάρων.<sup>22</sup>



Σχήμα 3.11 Μεταμόσχευση των χονδροκυττάρων στο χόνδρινο έλλειμμα



### 3.4 ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

1. <sup>1</sup> Kheir, E & Shaw, D 2009, 'Hyaline articular cartilage', *Orthopaedics and Trauma*, vol. 23, pp. 450-455.
2. <sup>2</sup> Διδακτορική διατριβή Μ.Η. Ιωσηφίδη, Ιατρική Σχολή ΑΠΘ, 2006: (39) Buckwalter, JA, Woo, SL, Goldberg, VM, Hadley, EC, Booth, F, Oegema, TR, et al 1993, 'Soft-tissue aging and musculoskeletal function', *Bone Joint Surg Am*, vol. 75, no. 10, pp. 1533-1548
3. <sup>3</sup> Διδακτορική διατριβή Μ.Η. Ιωσηφίδη, Ιατρική Σχολή ΑΠΘ, 2006: (40) Mankin, H & Radin, EL 1993, 'Structure and function of joints', In: McCarty D, Koopman WJ, ed. *Arthritis and allied conditions* 12th ed. Philadelphia, PA: Tea & Febiger, pp. 181-197.
4. <sup>4</sup> Fox, AJS, Bedi, A & Rodeo, S 2009, 'The Basic Science of Articular Cartilage: Structure, Composition and Function', *Orthopaedics*, vol. 1, no. 6, pp. 461-468.
5. <sup>5</sup> Διδακτορική διατριβή Μ.Η. Ιωσηφίδη, Ιατρική Σχολή ΑΠΘ, 2006: (49) Aydelotte, MB, Thonar, EJ, Mollenhauer, J & Flechtenmacher, J 1998, 'Culture of chondrocytes in alginate gel: variations in conditions of gelation influence the structure of the alginate gel, and the arrangement and morphology of proliferating chondrocytes', *In Vitro Cell Dev Biol Anim*, vol. 34, no. 2, pp. 123-130.
6. <sup>6</sup> Ιωσηφίδης, Μ 2006, 'Η αθλητική δραστηριότητα ως προδιαθεσικός παράγοντας για την ανάπτυξη δευτεροπαθούς οστεοαρθρίτιδας', Διδακτορική διατριβή, Αριστοτέλειο Πανεπιστήμιο Θεσσαλονίκης, Θεσσαλονίκη
7. <sup>7</sup> Stockwell, RA 1967, 'The cell density of human articular and costal cartilage', *Anat*, vol. 101, pp. 753-763.
8. <sup>8</sup> Pearle, AD, Warren, RF & Rodeo, SA 2005, 'Basic Science of Articular Cartilage and Osteoarthritis', *Clin Sports Med*, vol. 24, pp. 1-12.
9. <sup>9</sup> Buckwalter, JA, Mow, VC & Ratcliffe, A 1994, 'Restoration of injured or degenerated articular cartilage', *Am Acad Orthop Surg*, vol. 2, pp. 192-201.
10. <sup>10</sup> Poole, CA 1997, 'Articular cartilage chondrons: form, function and failure', *Anat*, vol. 191, pp. 1-13.
11. <sup>11</sup> Poole, CA, Flint, MH, Beaumont, BW 1987, 'Chondrons in cartilage: ultrastructural analysis of the pericellular microenvironment in adult human articular cartilages', *Orthop Res*, vol. 5, no. 4, pp. 509-522.
12. <sup>12</sup> Stockwell, RA 1971, 'The interrelationship of cell density and cartilage thickness in mammalian articular cartilage', *Anat*, vol. 109, pp. 411-421.
13. <sup>13</sup> Διδακτορική διατριβή Μ.Η. Ιωσηφίδη, Ιατρική Σχολή ΑΠΘ, 2006: (57) Martin, JA & Buckwalter, JA 2000, 'The role of chondrocyte-matrix interactions in maintaining and repairing articular cartilage', *Biorheology*, vol. 37, no. 1-2, pp. 129-140.
14. <sup>14</sup> Poole, AR, Pidoux, I, Reiner, A, Rosenberg, L 1982, 'An immunoelectron microscope study of the organization of proteoglycan monomer, link protein, and collagen in the matrix of articular cartilage', *Cell Biol*, vol. 93, no.3, pp. 921-937.
15. <sup>15</sup> Hunziker, EB 1999, 'Articular cartilage repair: are the intrinsic biological constraints undermining this process insuperable?', *Osteoarthr Cartil*, vol. 7, pp. 15-28.
16. <sup>16</sup> Buckwalter, JA 1998, 'Articular cartilage: injuries and potential for healing', *Orthop Sports Phys Ther*, vol. 28, pp. 192-202.
17. <sup>17</sup> Temenoff, JS & Mikos, AG 2000, 'Review: Tissue engineering for regeneration of articular cartilage;', *Biomaterials*, vol. 21, pp. 431-440.
18. <sup>18</sup> Shapiro, F, Koide, S & Glimcher MJ 1993, 'Cell origin and differentiation in the repair of full-thickness defects of articular cartilage', *Bone Joint Surg Am*, vol. 75, pp. 532-553.
19. <sup>19</sup> Eyre, DR, Weis, MA & Wu, JJ 2006, 'Articular cartilage collagen: an irreplaceable framework?', *Eur Cell Mater*, vol. 12, pp. 57-63.
20. <sup>20</sup> Torzilli, PA, Grigiene, R, Borrelli, J Jr & Helfet, DL 1999, 'Effect of impact load on articular cartilage: cell metabolism and viability, and matrix water content', *Biomech Eng*, vol. 121, pp. 433-441.
21. <sup>21</sup> Buckwalter, JA & Mankin, HJ 1998, 'Articular cartilage: tissue design and chondrocyte matrix interactions', *AAOS Inst Course Lect*, vol. 47, pp. 477-486.

22. <sup>22</sup> Redman, SN, Oldfield, SF & Archer, CW 2005, 'Current strategies for articular cartilage repair', *European Cells and Materials*, vol. 9, pp. 23-32.
23. <sup>23</sup> Martin, JA & Buckwalter, JA 2001, 'Telomere erosion and senescence in human articular cartilage chondrocytes', *Gerontol A Biol Sci Med Sci.*, vol. 56, pp. B172-B179
24. <sup>24</sup> Alford, JW & Cole, BJ 2005, 'Cartilage restoration, part 1: basic science, historical perspective, patient evaluation, and treatment options', *Am J Sports Med*, vol. 33, no. 2, pp. 295–306.
25. <sup>25</sup> Buckwalter, JA 1998, 'Articular cartilage: injuries and potential for healing', *Orthop Sports Phys Ther*, vol. 28, pp. 192-202.
26. <sup>26</sup> Ateshian, GA, Warden, WH, Kim, JJ, et al 1997, 'Finite deformation biphasic material properties of bovine articular cartilage from confined compression experiments', *Biomech*, vol. 30, pp. 1157-1164.
27. <sup>27</sup> Maroudas, A 1979, 'Physiochemical properties of articular cartilage', In: Freeman MAR, ed. *Adult Articular Cartilage*. Kent, United Kingdom: Cambridge University Press; pp. 215-290.
28. <sup>28</sup> Nordin, M & Frankel, VH 2001, 'Basic Biomechanics of the Musculoskeletal System', 3rd ed. New York, NY: Lippincott Williams & Wilkins.
29. <sup>29</sup> Hunziker, EB 2001, 'Articular cartilage repair: basic science and clinical progress. A review of the current status ad prospects', *Osteoarthr Cartil*, vol. 10, pp. 432-463.
30. <sup>30</sup> Haebler, C 1925, 'Experimentelle untersuchungen u"ber die regeneration des gelenkknorpels', *Klin Chir*, vol. 134, pp. 602–640.
31. <sup>31</sup> Brittberg, M, Lindahl, A, Nilsson, A, Ohlsson, C, Isaksson, O & Peterson, L 1994, 'Treatment of deep cartilage defects in the knee with autologous chondrocyte transplantation', *N Engl J Med*, vol. 331, pp. 889-895.
32. Smith, GD, Knutsen, G & Richardson, JB 2005, 'A clinical review of cartilage repari techniques', *Bone and Joint Surgery*, vol. 87B, no. 4, pp. 445-449.
33. Ασθενείς-διάγνωση και αντιμετώπιση Οστεοαρθρίτιδας μεγάλων αρθρώσεων στην Πρωτοβάθμια Φροντίδα Υγείας, Ιωάννης Συρίκας – Ειδικευόμενος Ιατρός Ορθοπεδικής, 2013

## ΚΕΦΑΛΑΙΟ 4. Biofilms και Νανοσωματίδια

### 4.1 Η έννοια της βιοαποικοδόμησης

Αρχικά η έννοια της βιοδιάσπασης για τα προϊόντα χρησιμοποιήθηκε λανθασμένα. Ένας λόγος για αυτό ήταν το ότι δεν υπήρχαν κανονισμοί και κατευθυντήριες γραμμές που να προσδιορίζουν με σαφήνεια τον ορισμό των βιοδιασπώμενων προϊόντων. Η σύγχυση γύρω από την έννοια είχε σαν αποτέλεσμα πολλά προϊόντα στο παρελθόν να χαρακτηριστούν ως βιοαποικοδομήσιμα ενώ στην πραγματικότητα δεν ήταν. Το φύλλο των δέντρων είναι ένα χαρακτηριστικό παράδειγμα βιοδιασπώμενου προϊόντος. Δημιουργείται την άνοιξη, χρησιμοποιείται από τα φυτά το καλοκαίρι για τη φωτοσύνθεση, πέφτει στο έδαφος το φθινόπωρο και απορροφάται από τη γη για να χρησιμοποιηθεί για τη δημιουργία ενός νέου φυτού. Το παράδειγμα της φύσης είναι ξεκάθαρο, όταν πρόκειται όμως για ένα προϊόν που κατασκευάζεται από τον άνθρωπο, τα πράγματα περιπλέκονται και κάποια θέματα χρειάζονται περαιτέρω επεξήγηση.

Το πρώτο θέμα που χρήζει επεξήγησης, είναι το αν ένα υλικό είναι βιοαποικοδομήσιμο ή όχι. Ένα άλλο θέμα που χρειάζεται εξήγηση είναι ο χρόνος που χρειάζεται ένα προϊόν για να ολοκληρώσει τη βιοδιάσπαση. Επιπλέον, χρειάζεται να καθοριστούν τα προϊόντα τα οποία προκύπτουν ως αποτέλεσμα της βιοδιάσπασης των υλικών, για το αν δηλαδή προκύπτουν τοξικά υλικά. Επίσης, τα χαρακτηριστικά του περιβάλλοντος στο οποίο βρίσκεται ένα προϊόν επηρεάζουν την ικανότητα βιοδιάσπασης.

Με τον όρο «βιοδιάσπαση» εννοούμε τη διάσπαση που πραγματοποιείται μέσω βιολογικών διεργασιών, κυρίως μέσω ζυμώσεων από μικροοργανισμούς όπως τα βακτήρια και οι μύκητες, και που έχει ως αποτέλεσμα συγκεκριμένες αλλαγές στη χημική δομή του υλικού καθώς και στις μηχανικές του ιδιότητες.

Η αερόβια διάσπαση προκύπτει παρουσία οξυγόνου, ενώ η αναερόβια απουσία οξυγόνου.<sup>1</sup>

Ο βαθμός βιοδιάσπασης μετριέται με πιστοποιημένα τεστ και υπολογίζεται από την ποσότητα του άνθρακα που προκύπτει από τη βιοδιάσπαση, ενώ η τοξικότητα των προϊόντων της βιοδιάσπασης υπολογίζεται από δοκιμές τοξικότητας που χρησιμοποιούν φυτά και ζώα ευαίσθητα σε τοξικές

ουσίες. Ο ρυθμός βιοδιάσπασης εξαρτάται άμεσα από τη γεωμετρία του προϊόντος, από την επιφάνειά του ανά όγκο και το πορώδες του.

Καταλήγοντας, μπορούμε να δώσουμε έναν **ορισμό για την βιοαποικοδόμηση**:

‘Διαδικασία βαθμιαίας ανοργανοποίησης της οργανικής ύλης, η οποία γίνεται με τη βοήθεια διαφόρων οργανισμών του οικοσυστήματος, των λεγόμενων αποικοδομητών. Οι οργανισμοί αυτοί είναι συνήθως μικροοργανισμοί (βακτήρια και μύκητες) οι οποίοι εξασφαλίζουν ενέργεια διασπώντας διαδοχικά τις οργανικές ενώσεις που περιέχονται στη νεκρή οργανική ύλη: αποικοδομούν δηλαδή τους νεκρούς οργανισμούς, τα νεκρά μέρη (φύλλα, καρποί) και τα απορρίμματά τους (ούρα, κόπρανα). Τα τελικά προϊόντα της βιοαποικοδόμησης είναι ανόργανες ενώσεις του άνθρακα, του φωσφόρου, του θείου κλπ., που προσλαμβάνονται στη συνέχεια από τους παραγωγούς του οικοσυστήματος, μετατρέπονται σε οργανικές, κυρίως με τη διαδικασία της φωτοσύνθεσης, και εισέρχονται πάλι στην τροφική αλυσίδα. Με τη βιοαποικοδόμηση εξασφαλίζεται η κυκλική ροή της ύλης μέσα στο οικοσύστημα και καθίσταται δυνατή η συνέχιση της ζωής.’

**Βιοαποικοδόμηση**, όπως είπαμε παραπάνω, είναι η διάσπαση μιας ουσίας από τους μικροοργανισμούς και αυτή μπορεί να είναι : ι) **πρωτοταγής**, όταν δηλαδή προκαλούνται αλλαγές στη χημική δομή της ουσίας έτσι ώστε εκείνη να χάνει μια ειδική της ιδιότητα, ιι) **περιβαλλοντικά αποδεκτή**, όταν δηλαδή η αποικοδόμηση μιας ουσίας γίνεται σε τέτοιο βαθμό ώστε να απομακρύνονται οι ανεπιθύμητες δράσεις της, και ιιι) **ολοκληρωτική**, όταν δηλαδή γίνεται πλήρης αποικοδόμηση μιας ουσίας, με αποτέλεσμα τη μετατροπή της από οργανική σε πλήρως οξειδωμένα, απλά μόρια όπως CO<sub>2</sub>, H<sub>2</sub>O, αμμωνία κτλ.

Υπάρχουν δύο τρόποι με τους οποίους μπορούν τα μικρόβια να διασπάσουν χημικές ουσίες: είτε να τις χρησιμοποιήσουν ως πηγές άνθρακα με αποτέλεσμα αυτές να διασπαστούν σε νερό, διοξείδιο του άνθρακα και άλατα, είτε αλλάζοντάς τους τη χημική δομή. Οι δυο αυτές διαδικασίες μπορεί να συμβαίνουν ξεχωριστά ή ταυτόχρονα, ενώ υπάρχουν μικρόβια που μπορούν να κάνουν τη μία ή και τις δύο.

### **Αποτοξικοποίηση**

Αποτοξίνωση είναι η φυσιολογική ή φαρμακευτική αφαίρεση των τοξικών ουσιών από έναν ζωντανό οργανισμό, συμπεριλαμβανομένου, αλλά δεν περιορίζεται σε αυτό, το ανθρώπινο σώμα και επιπρόσθετα μπορεί να αναφέρεται στην περίοδο της απόσυρσης κατά την οποία ένας οργανισμός επιστρέφει στην ομοιόσταση μετά από μακροχρόνια χρήση μιας εθιστικής ουσίας. Στην ιατρική, η αποτοξικοποίηση μπορεί να επιτευχθεί με την απολύμανση του φαρμάκου προς κατάποση και τη χρήση αντιδότη, καθώς και τεχνικές όπως η διάλυση υλικών σε διάλυμα (dialysis) και (σε έναν περιορισμένο αριθμό περιπτώσεων) η θεραπεία αποσιδήρωσης (chelation therapy).

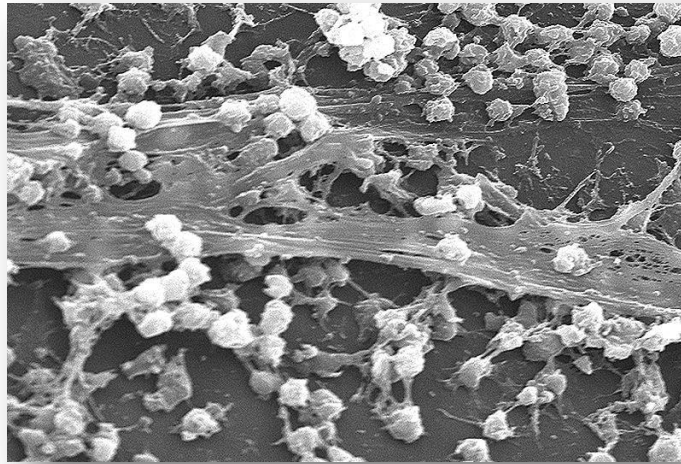
Πολλοί επαγγελματίες εναλλακτικής ιατρικής προωθούν διάφορα άλλα είδη της αποτοξικοποίησης, όπως η «διατροφή αποτοξικοποίησης" αλλά υπάρχουν λίγα στοιχεία που να αποδεικνύουν ότι οι δίαιτες αποτοξικοποίησης έχουν κάποια οφέλη για την υγεία.

#### 4.2 Biofilm

Ένα βιοφίλμ αποτελεί ένα σύνολο μικροοργανισμών στο οποίο προσκολλώνται τα κύτταρα μεταξύ τους σε σχηματισμό επιφάνειας. Αυτά τα προσκολλημένα κύτταρα ενσωματώνονται συχνά εντός μιας αυτο-παραχθέντας μήτρας από εξωκυτταρική πολυμερή ουσία (extracellular polymeric substrate : EPS). Το EPS βιοφίλμ, που αναφέρεται επίσης ως slime (αν και ότι περιγράφεται ως slime δεν είναι Biofilm), είναι ένα πολυμερές συνονθύλευμα που αποτελείται γενικά από εξωκυτταρικό DNA, πρωτεΐνες, και πολυσακχαρίτες. Τα biofilms μπορεί να σχηματιστούν επί ζωντανών ή μη ζωντανών επιφανειών και μπορεί να είναι διαδεδομένα σε εφαρμογές στο φυσικό, βιομηχανικό και νοσοκομειακό περιβάλλον. Τα μικροβιακά κύτταρα που αναπτύσσονται σε ένα βιοφίλμ είναι φυσιολογικά (physiologically) διακριτά από τα [planktonic](#) (swimming free) κύτταρα του ίδιου οργανισμού, τα οποία , είναι single-cells που μπορούν να επιπλέουν ή να κολυμπήσουν σε ένα υγρό μέσο.

Τα μικρόβια σχηματίζουν ένα βιοφίλμ σε απόκριση προς πολλούς παράγοντες, που μπορεί να περιλαμβάνουν κυτταρική αναγνώριση των ειδικών ή μη-ειδικών θέσεων συνδέσεων πάνω σε μία επιφάνεια, διατροφικά θέματα, ή σε ορισμένες περιπτώσεις, με έκθεση των planktonic cells σε υπο-ανασταλτικές συγκεντρώσεις των αντιβιοτικών. Όταν ένα κύτταρο μεταβαίνει στην κατάσταση

λειτουργίας της ανάπτυξης βιοφίλμ, υφίσταται μια φαινοτυπική αλλαγή στη συμπεριφορά κατά την οποία μεγάλες ομάδες γονιδίων ρυθμίζονται διαφορετικά.



**Σχήμα 4.1** *Staphylococcus aureus* biofilm on an indwelling catheter

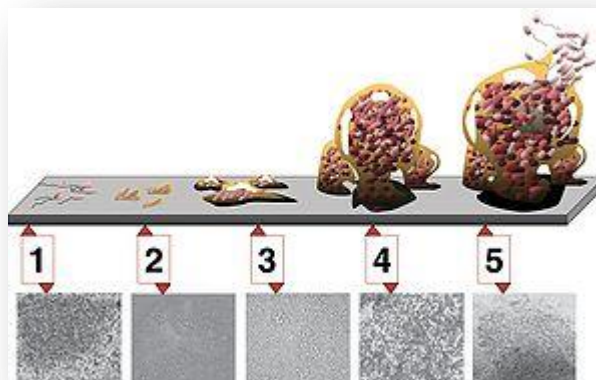
### Σχηματισμός

Ο σχηματισμός ενός βιοφίλμ αρχίζει με την προσκόλληση ελεύθερων μικροοργανισμών σε μια επιφάνεια. Οι πρώτοι άποικοι προσκολλώνται στην επιφάνεια αρχικά μέσω αδύναμης, αναστρέψιμης προσκόλλησης με δυνάμεις van der Waals. Αν οι άποικοι δεν διαχωριστούν αμέσως από την επιφάνεια, μπορούν να αγκυροβολήσουν πιο μόνιμα με τη χρήση δομών συνοχής του κυττάρου, όπως η pili. Μερικά είδη δεν είναι ικανά να προσδεθούν σε μια επιφάνεια από μόνα τους, αλλά είναι συχνά σε θέση να αγκυροβολήσουν στη μήτρα ή απευθείας σε προηγούμενες αποικίες. Κατά τη διάρκεια του αποικισμού τα κύτταρα είναι σε θέση να επικοινωνούν μέσω μιας απαρτίας αισθήσεων (quorum sensing) χρησιμοποιώντας προϊόντα όπως το AHL. Μόλις ο αποικισμός έχει αρχίσει, το βιοφίλμ αναπτύσσεται μέσω ενός συνδυασμού της κυτταρικής διαίρεσης και πρόσληψης. Το τελικό στάδιο του σχηματισμού του βιοφίλμ είναι γνωστό ως ανάπτυξη, και είναι το στάδιο στο οποίο το βιοφίλμ είναι εγκατεστημένο και μπορεί μόνο να αλλάξει σε σχήμα και μέγεθος. Η ανάπτυξη ενός βιοφίλμ μπορεί να επιτρέψει για μια συνολική αποικία κυττάρων (ή αποικίες) να είναι πολύ ανθεκτική στα αντιβιοτικά.

### Ανάπτυξη

Υπάρχουν πέντε στάδια της ανάπτυξης του βιοφίλμ :

1. Η αρχική σύνδεση:
2. Μη αναστρέψιμη σύνδεση:
3. Ωρίμανση I:
4. Ωρίμανση II:
5. Διασπορά:



**Σχήμα 4.2** Τα πέντε στάδια ανάπτυξης του βιοφίλμ : (1) Αρχική σύνδεση, (2) Μη αναστρέψιμη σύνδεση, (3) Ωρίμανση I, (4) Ωρίμανση II, και (5) Διασπορά.

Συνοψίζοντας, στις περισσότερες των περιπτώσεων, όταν αναφερόμαστε σε biofilm, εννοούμε προσκολλημένες κοινότητες βακτηρίων, που συνήθως περιβάλλονται από μια μήτρα εξωκυττάριου πολυμερούς υποστρώματος (extracellular polymeric substrate : EPS). Εκδηλώνουν έναν αλλαγμένο ρυθμό ανάπτυξης και μεταγράφουν γονίδια, που τα ελεύθερα βακτήρια (οι ελεύθεροι μικροοργανισμοί) δεν μεταγράφουν. Χαρακτηριστικό του biofilm είναι η εγγενής αντίστασή του σε αντιμικροβιακή θεραπεία, η έμφυτη αντίστασή του στη θανάτωση και η ανοσοαπόκρισή του. Τα ιατρικά εμφυτεύματα και οι ιατρικές συσκευές (καθετήρες) είναι ιδιαίτερα επιρρεπείς σε βακτηριακές αποικίες και στον σχηματισμό biofilm. Έχει υπολογιστεί ο αριθμός των λοιμώξεων των εμφυτευμάτων πλησιάζει το 1 εκατομ. δολάρια / έτος μόνο στη US και οι άμεσες ιατρικές δαπάνες υπερβαίνουν τα 3 δις δολάρια/έτος.<sup>8</sup> Σκοπός μας είναι να εξαλείψουμε ή να αποτρέψουμε την πιθανότητα δημιουργίας του, και ο πιο επιτυχής τρόπος φαίνεται να είναι με τη χρήση νανοσωματιδίων.

### 4.3 Αλληλεπίδραση Νανοσωματιδίων με ζωντανά συστήματα - Βιοσυμβατότητα

Πολλοί παράγοντες πρέπει να ληφθούν υπόψη για να προβλέψουμε πώς συγκεκριμένα νανοσωματίδια θα αντιδράσουν με ένα ζωντανό βιολογικό υλικό. Μεγάλη σημασία έχει η δομή των νανοσωματιδίων που θα πετύχει βιοσυμβατότητα και τις προβλέψιμες κυτταρικές αποκρίσεις. Μελέτες<sup>2</sup> αποδεικνύουν πώς οι αλληλεπιδράσεις των νανοσωματιδίων με βιολογικά κύτταρα και οργανισμούς απαιτούν την κατανόηση, όχι μόνο των

φυσικοχημικών χαρακτηριστικών και το αντιδραστικό-δυναμικό (reactive - potential) των νανοσωματιδίων, αλλά και τη γνώση σχετικά με βιολογικές διεργασίες και πώς διαφορετικά κύτταρα μπορούν να ανταποκριθούν σε ιδιαίτερα χαρακτηριστικά των νανοσωματιδίων. Πρέπει να λαμβάνονται υπόψη οι βιολογικές διαδικασίες και η δομή των κυττάρων όταν προσπαθούμε να ερμηνεύσουμε πληροφορίες για τη βιωσιμότητα μετά από έκθεση σε νανοσωματίδια, και την ενσωμάτωση και την κυτταρική μεταφορά των νανοσωματιδίων in vivo και in vitro, προκειμένου να ερμηνεύσουμε σωστά τη βιοσυμβατότητα. Παράγοντες όπως ο τύπος κυττάρου (μακροφάγοι του αίματος, επιθηλιακά κύτταρα, συνδετικά κύτταρα ιστού – connective tissue cells, νευρώνες, ιστιοκύτταρα, μυϊκά κύτταρα, κ.λ.π.), η λειτουργία των κυττάρων και ιστών, η ηλικία των κυττάρων (νεογνικά, γερασμένα και αποδιαφοροποιημένα κύτταρα αντιδρούν πολύ διαφορετικά), και οι αλληλεπιδράσεις των νανοσωματιδίων με τα κύτταρα / τους ιστούς δρα σε διαφορετικά φυσιολογικά τμήματα μέσω των οποίων το νανοσωματίδιο πρέπει να περάσει για να φθάσει στο όργανο-στόχο ή στα κύτταρα (αλληλεπιδράσεις με ενδοθηλιακά κύτταρα που καλύπτουν εσωτερικά τα αιμοφόρα αγγεία, το πέρασμα μέσω σχισμών και αγωγών στα νεφρά, και από τους πόρους και fenestrations στα τριχοειδή αγγεία, κλπ.) θα πρέπει όλα να θεωρηθούν και να ληφθούν υπόψη κατά την ερμηνεία των αποτελεσμάτων. Για να χρησιμοποιηθεί ένα σχεδιασμένο νανοσωματίδιο με επιτυχία σε μια βιοϊατρική εφαρμογή για διαγνωστική απεικόνιση, παροχή φαρμάκου ή για να διευκολύνει την ακτινοθεραπεία, πρέπει να εξεταστούν ειδικοί παράγοντες που είναι μοναδικοί όταν εργαζόμαστε με ζωντανά κύτταρα, όπως είναι:

(Α) Χαρακτηριστικά των στοχευόμενων κυττάρων,

(Β) Τύποι των κυττάρων και των ιστών που τα τεχνητά νανοσωματίδια θα συναντήσουν στην διαδρομή τους προς τα στοχευόμενα κύτταρα, και πώς θα αλληλεπιδρούν με τα νανοσωματίδια σε κάθε περιοχή,

(Γ) Απώλεια της υπολογισμένης δόσης νανοσωματιδίων στα στοχευόμενα κύτταρα, λόγω (i)της εγκόλπωσης των νανοσωματιδίων από τα μακροφάγα του αίματος,<sup>2</sup> της συσσώρευσης και αποθήκευσής τους από τα ιστιοκύτταρα (histiocytes : κύτταρα τύπου μακροφάγα που εντοπίζονται εντός συγκεκριμένων ιστών), ή <sup>3</sup> σύνδεσή τους με αντισώματα και / ή με συμπληρωματικές πρωτεΐνες προκαλώντας συσσώρευση και προσκόλληση των τεχνητών νανοσωματιδίων στα τοιχώματα των αιμοφόρων αγγείων και στους ινώδεις θρόμβους, και

(Δ) Μεταβολές στα φυσικοχημικά χαρακτηριστικά της επιφάνειας των νανοσωματιδίων in vivo και in vitro που οφείλονται στην προσρόφηση, στην κάλυψη (wrapping) ή την ένωση με υδατάνθρακες, πρωτεΐνες ή DNA (συμπεριλαμβανομένων βιομορίων, όπως πρωτεΐνες ορού



(serum), διαφορετικοί μυκοπολυσακχαρίτες της κυτταρικής επιφάνειας, πρωτεογλυκάνες), ή ενδοκυτταρική επίθεση από λυσοσωματικά ένζυμα και μικρο-περιβάλλοντα σε χαμηλό pH (όπως στα φαγοκυτταρικά κενοτόπια και κατά τη διάρκεια της λυσοσωματικής αποικοδόμησης στα ενδοσωματικά κυστίδια).

Μερικές φορές τα τεχνητά νανοσωματίδια δρουν όμορφα με τα προτεινόμενα κύτταρα στόχους, αλλά μπορεί να αλληλεπιδράσουν με τα κύτταρα του αίματος, τις πρωτεΐνες του αίματος, να δεσμευτούν φαγοκυτταρικά από ιστούς κυττάρων (histiocytes : ιστοκύτταρα), τα οποία αποτελούν μέρος του δικτυοενδοθηλιακού συστήματος (reticuloendothelial system : RES) που βρίσκεται στο ήπαρ (κύτταρα Kupffer), στον πνεύμονα (μακροφάγα του πνεύμονα), στο δέρμα (κύτταρα Langerhans), στον εγκέφαλο (Μικρόγλοια), και στα κύτταρα τύπου μακροφάγων εντός του σπλήνα, του θύμου αδένος και τους λεμφαδένες. Τα νανοσωματίδια συχνά εμπλέκονται ή επικαλύπτονται με βλέννα που παράγεται από επιθηλιακά κύτταρα, ή από εξωκυττάρια δομές στην επιφάνεια των κυττάρων που γειτνιάζουν με τα κύτταρα-στόχους, μειώνοντας τον αριθμό των νανοσωματιδίων που μπορεί να εντοπιστούν στην επιθυμητή θέση. Αυτές οι αλληλεπιδράσεις με φαγοκυτταρικά κύτταρα διευκολύνονται από την προσρόφηση των νανοσωματιδίων ή την επικάλυψή τους με βιολογικά επεξεργασμένα υλικά, καθώς και η συσσωμάτωση των νανοσωματιδίων, η οποία με τη σειρά της εκκινεί:

- Φαγοκυτταρική επίθεση και εγκόλπωση από τα κύτταρα του δικτυοενδοθηλιακού συστήματος (RES) ή μακροφάγα του αίματος που ακολουθούν τη δέσμευση σε αντισώματα / συμπληρωματικά (opsonization : οψωνινοποίηση).
- Στην περίπτωση των νανοσωματιδίων που είναι επικαλυμμένα με βιοϋλικό και δεσμεύονται στις επιφάνειες των κυττάρων μέσω των πρωτεϊνικών υποδοχέων, τα νανοσωματίδια μπορούν να μεταφερθούν μέσα στα κύτταρα με ενδοκυττάρωση, η οποία μπορεί να προκαλέσει αποικοδόμηση των νανοσωματιδίων, και την πιθανή κυτταρική βιοσυσσώρευση με ή χωρίς πιθανή κυτταροτοξικότητα.
- Η συμπληρωματική χορήγηση νανοσωματιδίων μπορεί να οδηγήσει σε ενεργοποίηση της κυτταρικής φλεγμονώδους απόκρισης, παρεμβολή στην πήξη του αίματος και τον επακόλουθο σχηματισμό θρόμβου στο αίμα (fibrin) και αναφυλαξία

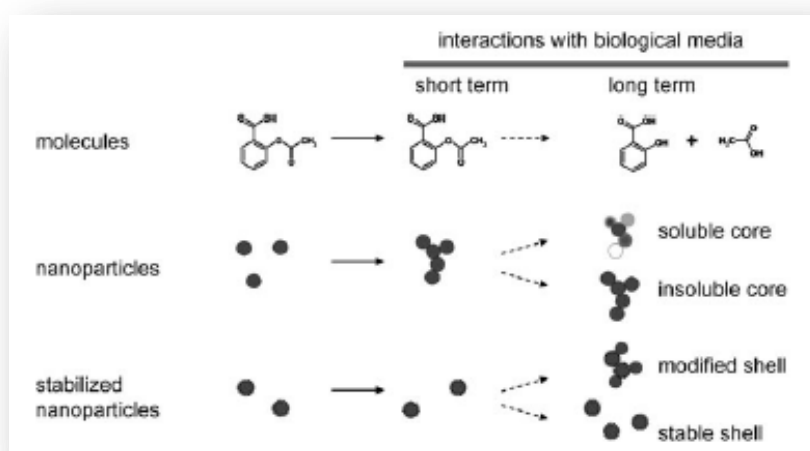
Στις μελέτες που γίνονται, γίνεται έκθεση ζωντανών βιολογικών συστημάτων σε διαφορετικούς

τύπους νανοσωματιδίων, και παρατηρείται πώς τόσο οι βιολογικοί παράγοντες, όσο και τα χαρακτηριστικά σύνθεσης των νανοσωματιδίων, η δόση, ο χρόνος έκθεσης και η αντιδραστικότητα της επιφάνειας των νανοσωματιδίων και η αντιδραστικότητα, δρουν αθροιστικά στην βιοσυμβατότητα.

#### 4.4 Η Βιοσυμβατότητα εξαρτάται από τα χαρακτηριστικά των νανοσωματιδίων και από βιολογικούς παράγοντες

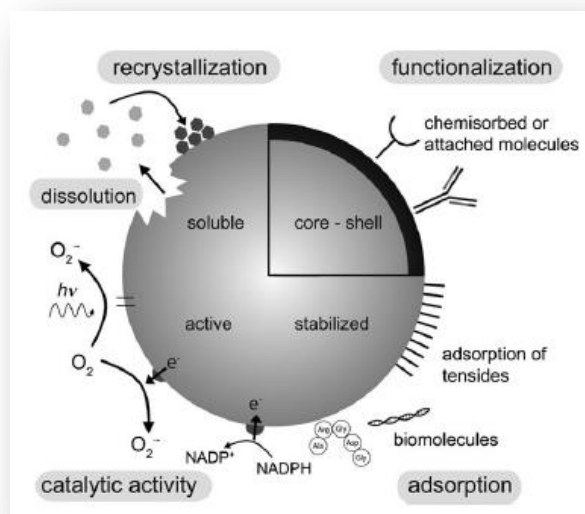
Σε γενικές γραμμές, οι κυτταρικές αλληλεπιδράσεις με τα τεχνητά νανοσωματίδια εξαρτώνται ισχυρά από τις μεταβλητές που ενυπάρχουν στα τεχνητά νανοσωματίδια. Τέτοιοι παράγοντες όπως το μέγεθος, η μορφολογία, το επιφανειακό φορτίο και η αντιδραστικότητα, ατέλειες στην επιφάνεια των νανοσωματιδίων, στοιχειακή σύνθεση (σύνθεση πυρήνα), και η λειτουργικότητα της επιφάνειας, είναι οι πιο προφανείς παράγοντες των νανοσωματιδίων που έχουν άμεση επίπτωση στη βιοσυμβατότητα.

Η χημική τύχη των μορίων μέσα σε ένα οργανισμό περιγράφεται μέσω της αποικοδόμησης και του μεταβολισμού. Για τα νανοσωματίδια, η συσσωμάτωση περιπλέκει τη συμπεριφορά τους *in vivo* και τροποποιεί σημαντικά την κινητικότητα, την βιοκατανομή, και την κάθαρση. Σταθεροποιημένα σωματίδια μπορούν να καθίστανται ασταθή μέσω χημικής τροποποίησης ή απώλειας της λειτουργικότητας της επιφάνειας<sup>15</sup>:



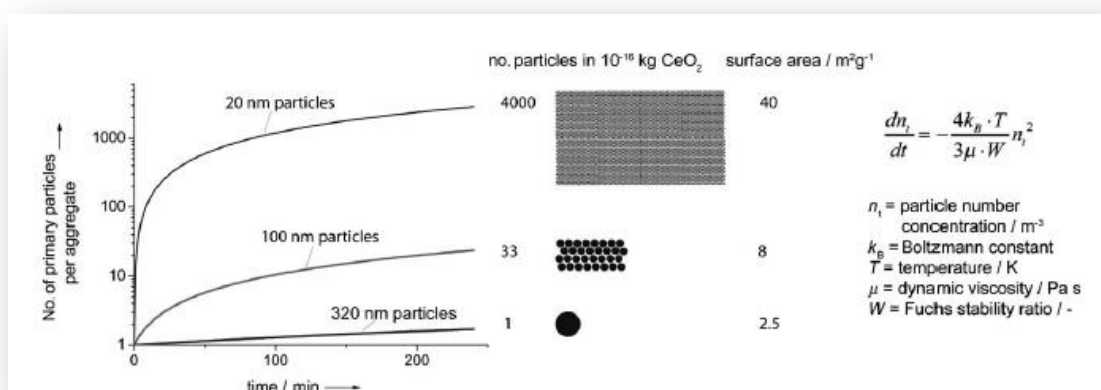
**Σχήμα 4.3** Αλληλεπίδραση με βιολογικό μέσο, μορίων, νανοσωματιδίων & σταθεροποιημένων νανοσωματιδίων

Τα νανοσωματίδια παίρνουν διάφορα σχήματα και διαφοροποιήσεις. Η επιφανειακή τροποποίηση επιτρέπει ελεγχόμενες μεταβολές των ιδιοτήτων διεπαφής και τροποποιεί τη διάλυση και την αποσύνθεση. Η σταθεροποίηση συνήθως γίνεται μέσω της προσρόφησης μακρομορίων. Η καταλυτική δραστηριότητα μεταβάλλει την αλληλεπίδραση των σωματιδίων με το περιβάλλον τους και μπορεί να κάνει χρήση του οξυγόνου, αναγωγικών μέσων, ή ακόμα και του φωτός. Τα αντιδραστικά υλικά διαλύονται και μπορεί να ανακρυσταλλωθούν, προσφέροντας έτσι επιπλέον επιφάνειες όπου τα μόρια μπορούν να επισυναφθούν ή να αντιδράσουν:



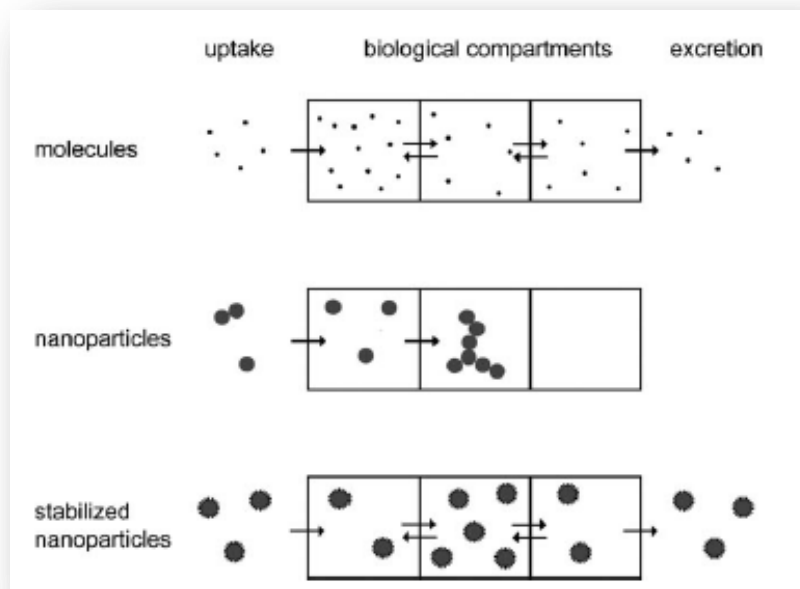
Σχήμα 4.4 Επιφάνεια νανοσωματιδίων

Η συσσωμάτωση εξαρτάται έντονα από τη συγκέντρωση των νανοσωματιδίων (σωματίδια ανά όγκο) :



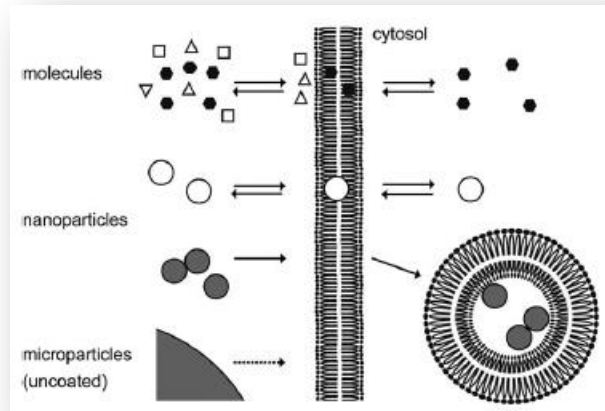
Σχήμα 4.5 συσχετισμός συγκέντρωσης νανοσωματιδίων & συσσωμάτωσής τους.

Η βιοκατανομή των μορίων και νανοσωματιδίων εξαρτάται από τις ιδιότητες της κινητικότητας, του μεγέθους και της επιφανείας. Ενώ τα μόρια διαχέονται μεταξύ των διαφορετικών διαμερισμάτων ενός οργανισμού, τα σωματίδια μπορούν να συσσωματωθούν σε μια συγκεκριμένη περιοχή (όργανο, ιστός):



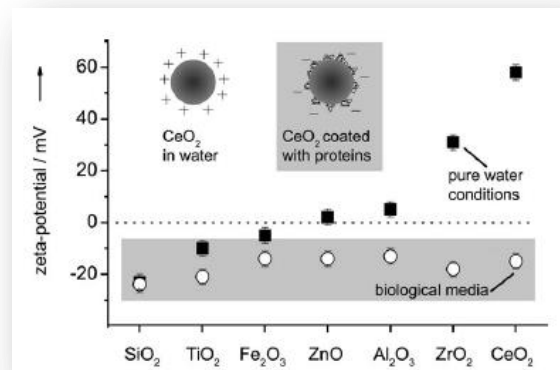
**Σχήμα 4.6** Βιοκατανομή μορίων και νανοσωματιδίων

Οι βιολογικές μεμβράνες είναι τα κυρίαρχα εμπόδια σε όλους τους οργανισμούς. Τα λιποφιλικά μόρια, διαχέονται μέσω των κλασικών λιπιδικών διπλοστοιβάδων και οι συγκεντρώσεις τους είναι συνάρτηση της θερμοδυναμικής. Ειδικά τα νανοσωματίδια μπορούν να εισέλθουν στις μεμβράνες και διαχέονται μέσα σε ένα κυττάρο ανάλογα με την επιφάνεια τους. Τα πιο υδρόφιλα (οξείδια) νανοσωματίδια δεσμεύονται στα κυστίδια στο εσωτερικό των κυττάρων :



**Σχήμα 4.7** Διάχυση μορίων και νανοσωματιδίων μέσω κυτταρικής μεμβράνης

Το φορτίο επηρεάζει σημαντικά τη σταθερότητα των κolloειδών και των διασπορών. Τα περισσότερα τεχνικά οξειδία νανοσωματίδια έχουν υψηλά ζήτα-δυναμικά σε καθαρό νερό και μπορούν να σχηματίσουν σταθερές διασπορές. Όταν έρθουν σε επαφή με βιολογικά μέσα (καλλιέργειες κυττάρων ή υγρά του σώματος), η ταχεία πρωτεϊνική προσρόφηση αλλάζει την κατανομή του επιφανειακού φορτίου σημαντικά και τα περισσότερα υλικά που έχουν ομοίως χαμηλή κolloειδή σταθερότητα. Ο σχηματισμός της λεγόμενης πρωτεϊνικής κορώνας μεταβάλλει σημαντικά την αλληλεπίδραση ενός οργανισμού με τα νανοσωματίδια (σχήμα 4.8).



**Σχήμα 4.8** Φορτίο νανοσωματιδίων

Στον παρακάτω πίνακα (Πίνακας 4.1) συγκεντρώνονται τα **Νανοσωματίδια** που αναφέρονται στην βιβλιογραφία μεταξύ 2010 – 2013 και απασχόλησαν για την βιοαποικοδόμησή τους, την τοξικότητά τους και την αλληλεπίδρασή τους με τα biofilms :

**ΠΙΝΑΚΑΣ 4.1** Νανοσωματίδια και δράσεις τους

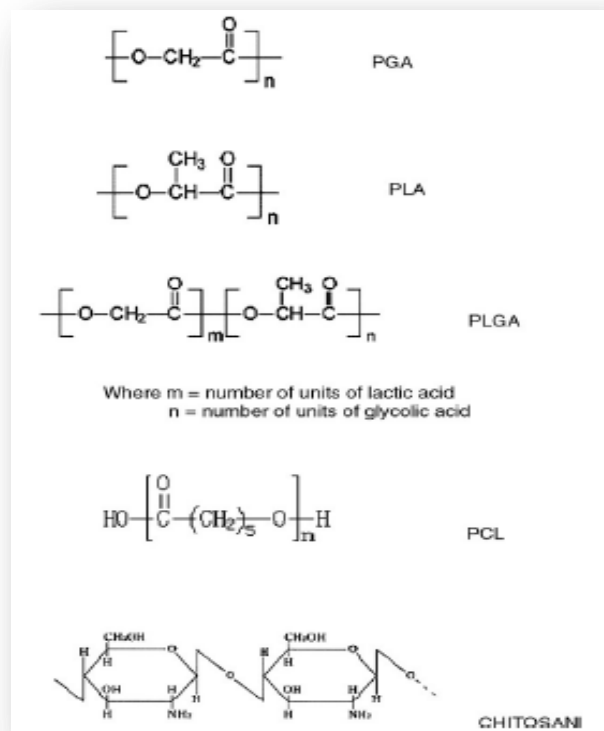
|  |  |
|--|--|
| <p><b>Silver Nanoparticles (AgNPs)</b></p>   | <p>Αναστέλουν την εναπόθεση και ανάπτυξη του biofilm πάνω από μια ανασταλτική συγκέντρωση, τόσο σε εναιωρήματα όσο και σε στερεό μέσο. Για μεγάλες συγκεντρώσεις καθίστανται τοξικά για ήδη ανεπτυγμένα biofilms. Αντιμικροβιακή χρήση σε μεμβράνες φίλτρων, καθετήρες, κ.α.<sup>3,16,19</sup></p>   |
| <p><b>Copper Nanoparticles (CuO)</b></p>   | <p>Τα χρησιμοποιούν και επικαλυμένα με PMMA και hydrogels (υδροπικές) Μια αντίστροφη σχέση μεταξύ του μεγέθους των νανοσωματιδίων και της αντιμικροβιακής τους δράσης έχει αποδειχθεί, όπου νανοσωματίδια στο εύρος μεγέθους από 1-10 nm έχει αποδειχθεί ότι έχουν την μεγαλύτερη βιοκτόνο δράση έναντι των βακτηρίων.<sup>19</sup></p>  |
| <p><b>Cysteine capped silver Nanoparticles (Cys-AgNPs)</b></p>   | <p>Αντιβακτηριακή και αντιμυκητιακή δράση, μη τοξικά, έχουν σταθερότητα σε κολλοειδές διάλυμα με σταθεροποιητικούς παράγοντες (αμίνες, καρβοξυλικό οξύ, κ.α.)<br/>Συνήθως για μεταφορά φαρμάκου<sup>11</sup></p>   |
| <p><b>Fullerene C<sub>60</sub> Nanoparticles</b></p>   | <p>Η απορρόφησή τους από biofilm σε πορώδες μέσο επηρεάζεται από παράγοντες όπως: η ταχύτητα του ρευστού, η χημεία του διαλύματος, οι φυσικοχημικές ιδιότητες των μακρομορίων (NOM), και ο τύπος του πορώδους. Η εναπόθεση αυξάνεται με την αύξηση της ιοντικής ισχύος του διαλύματος, την παρουσία πολυσακχαρίτη-τύπου οργανικής ύλης, και την μείωση της ταχύτητας ροής.<br/>Δεν βιοδιασπώνται.<sup>4,18</sup></p>   |
| <p><b>Nanoparticles with polyethylene glycol (PEG) arms</b><br/><br/><b>Or</b><br/><br/><b>PEGylated Nanoparticles</b></p>   | <p>Η επικάλυψη του NP με πολυμερές το καθιστά βιοσυμβατό και βιοαποικοδομήσιμο<sup>5,12</sup><br/><br/>Πολυμερές μικκύλιο. Συνήθως για μεταφορά φαρμάκου, γονιδίου και υδρόφοβων ουσιών. Προσδίδει ένα υδρόφιλο, μη ρυπαντικό, εξωτερικό περίβλημα μειώνοντας τις μη ειδικές αλληλεπιδράσεις με άλλες πρωτεΐνες. Όταν τα τοποθετούμε σε βιοϊατρικές συσκευές τις προσδίδουν βιοσυμβατότητα και μειώνουν την θρομβογεννητικότητά τους.</p>  |
| <p><b>Superparamagnetic particles of Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> (μαγνητίτης) in ferrofluid</b><br/><br/><b>&amp;</b><br/><br/><b>γ-Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub> (μαγκεμίτης)</b></p> | <p>Βιοαποικοδομήσιμα και μη τοξικά σε έρευνες στον εγκέφαλο (πρόβλημα: να περάσουν το blood-brain-barrier : BBB. Ο εγκέφαλος έχει 4 κατηγορίες υγρών : 1) το αίμα που ρέει μέσω όλων των εγκεφαλικών δομών, 2) το μεσοκυττάριο υγρό που περιβάλλει τους νευρώνες και τα νευρόγλια, 3) τα εγκεφαλονωτιαίο υγρό που κυκλοφορεί μεταξύ των εγκεφαλικών κοιλιών και του νωτιαίου μυελού, και 4) το ενδοκυττάριο υγρό εντός των εγκεφαλικών κυττάρων. Δεν υπάρχει φραγμός μεταξύ του μεσοκυττάριου υγρού και του εγκεφαλονωτιαίου υγρού και έτσι αν τα NPs μπουν σε ένα από αυτά τα υγρά, θα είναι ελεύθερα να φτάσουν σε οποιαδήποτε εγκεφαλική δομή. Έτσι μπορούμε να τα εγχύσουμε διακρανικά στο εγκεφαλονωτιαίο υγρό. Βιοδιασπάται και εκκαθαρίζεται τελείως σε 3 μήνες ποσότητα 3mg), το ήπαρ και τη σπλήνα αρουραίων (νανοσωματίδια μαγνητίτη σταθεροποιημένα με γλυκουρονικό οξύ εγχύθηκαν</p> |

|   |   |
|---|---|
|   | <p>ενδοφλεβίως μέσα στην φλέβα της ουράς και εντοπίστηκαν στο ήπαρ και τη σπλήνα)</p> <p>Παρατηρείται αύξηση της συγκέντρωσης iron-containing πρωτεϊνών στην περιοχή όπου πηγαίνουν τα NPs και αρχίζουν να αποικοδομούνται.<sup>6,7,17,13</sup></p>   |
| <p><b>ZnO Nanoparticles &amp; MgO Nanoparticles</b></p>   | <p>Αναστέλλουν τον σχηματισμό βακτηριακού biofilm και αυξάνουν την ευαισθησία των αντιβιοτικών (ενίσχυση της αντιβακτηριακής τους δράσης).</p> <p>Η αντιβακτηριακή δράση αυξάνεται αν τα ντοπάρω: 2% Ce-doped ZnO</p> <p>Βιομηχανικές εφαρμογές : σύστημα διανομής πόσιμου νερού, συσκευασία τροφίμων, απολυμαντικοί παράγοντες, δερματολογικές εφαρμογές (κρέμες, λοσιόν, αλοιφές : αντιμικροβιακή δράση).<sup>8,21</sup></p>  |
| <p><b>Logic Gate Nanoparticle : composed of a dual pH response random copolymer (poly-β aminoester ketal-2)</b></p> | <p>Για την μεταφορά γονιδίων (με σκοπό την αντιμετώπιση ασθενειών : πρόωρη γήρανση, κυστική ίνωση, Πάρκινσον, καρκίνος). Αντικατάσταση ενός μεταλλαγμένου ή ανύπαρκτου γονιδίου. Από μόνο του το DNA δεν μπορεί να διαπεράσει την κυτταρική μεμβράνη, να διαφύγει από το endosome και να εισέλθει στον πυρήνα λόγω του μεγέθους και του αρνητικού φορτίου του. Τα NPs προστατεύουν από την νουκλεάση και παρέχουν πλεονεκτήματα στόχευσης όταν συνδιαστούν με τα κατάλληλα πεπτίδια. Μια λύση θα ήταν η ενθυλάκωση του DNA σε NPs που αποτελούνται από συνθετικά πολυμερή όπως το poly(lactic-co-glycolic acid) (PLGA), που αποικοδομείται και απελευθερώνει το DNA πολύ αργά και επίσης έχει αρνητικό φορτίο και πρέπει να επεξεργαστεί κατάλληλα. Αντίθετα, τα Logic Gate NPs, είναι μοναδικό επειδή παραμένει υδροφοβικό σε φυσιολογικό PH (7,4) αλλά μετατρέπεται σε υδροφιλικό στο χαμηλό ενδοσωμικό PH, το οποίο ενεργοποιεί τον ταχύ κατακερματισμό του σε μικρά μόρια και άρα μια αποτελεσματική απελευθέρωση του περιεχομένου DNA.<sup>9</sup></p> |
| <p><b>Porous silicon nanoparticles (PSiNPs)</b></p>   | <p>Κυρίως για μεταφορά φαρμάκων (π.χ. για καρκίνο). Έχουν ενισχυμένη διαπερατότητα διατηρούν την ικανότητα μεταφοράς στον στόχο, καθώς επίσης έχουν κατάλληλο μέγεθος για να αποφύγουν την νεφρική κάθαρση. Το αρνητικό τους είναι η πολύ γρήγορη αποικοδόμησή τους, γ'αυτό χρησιμοποιούμε επικάλυψη πυριτίου που την επιβραδύνει στις 8 ώρες (η επιθυμητή κυκλοφορία στο αίμα είναι τουλάχιστον 12 ώρες). Χρήση σε βιοϊατρικές εφαρμογές, όπως οι οπτικοί αισθητήρες, εμφυτεύσιμες συσκευές , ορθοπεδική μηχανική ιστών, κτλ. Παρέχει μεγάλη αναλογία επιφάνεια προς όγκο για λειτουργία, καθώς και nanopsize πόρους για φόρτωση του φαρμάκου. Επιπροσθέτως, τα PSiNPs είναι εγγενώς φθορίζοντα, βιοσυμβατά, βιοαποικοδομήσιμα και μη τοξικά.<sup>10</sup></p>   |
| <p><b>Citratecapped Gold Nanospheres (AuNPs)</b></p>  | <p>Μέγεθος : 4 &amp; 18 nm</p> <p>Χρήση : σε biofilms<sup>16,22</sup></p>   |
| <p><b>Starch and Cellulose Nanocrystals / Nanoparticles (αμύλου και</b></p>   | <p>Βιοαποικοδομούνται ταχύτερα συγκριτικά με τα μακροσκοπικά ομολογά τους, αλλά όχι πλήρως ή αρκετά ικανοποιητικά : στο 60% μετά από 28 μέρες</p> <p>Μη τοξικά<sup>18</sup></p>   |

|   |  |
|---|--|
| κυτταρίνης)                                       |  |
| Carbon Nanotubes                                  | Μη βιοαποικοδομήσιμα<br>Μη τοξικά <sup>18</sup>                  |
| PLGA (poly D, L-lactid-co-glycolid) Nanoparticles | Βιοαποικοδομήσιμα<br>Συνήθως για μεταφορά φαρμάκου <sup>20</sup> |

Στην παρούσα εργασία παρασκευάσαμε Νανοσωματίδια Αργύρου (Silver Nanoparticles - AgNPs), σε δομή nanowires, με μέση διάμετρο 29nm, τα οποία σύμφωνα με τη βιβλιογραφία έχουν αντιμικροβιακές ιδιότητες και αποτρέπουν τον σχηματισμό των biofilms σε ιατρικά εμφυτεύματα.

Τέλος, παρακάτω φαίνεται η μορφή των κυριότερων **πολυμερών** που χρησιμοποιούμε ως επικαλύψεις των Νανοσωματιδίων. Εμείς ως πολυμερές χρησιμοποιήσαμε όπως έχει ήδη αναφερθεί, την Πολυκαπρολακτόνη (PCL):



Σχήμα 4.9 δομή κυριώτερων πολυμερών για βιολογικές δράσεις



## 4.5 ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

1. Βιοδιασπώμενα Πολυμερή Εφαρμογές και Θερμομηχανικές Ιδιότητες – Γιώτη Ελένη
2. Nanoparticle Interactions with Living Systems: In Vivo and In Vitro Biocompatibility Barbara J. Panessa-Warren, John B. Warren, Mathew M. Mayeand Wynne Schiffer
3. Interactions between silver nanoparticles and bacterial biofilms Lead Investigator: Stacy M. Pustulka PI: Robert Tilton Carnegie Mellon University
4. Influence of biofilm on the transport of fullerene (C60) nanoparticles in porous media Meiping Tong [a,b,\\*](#), Jiali Ding [a](#), Yun Shen [a](#), Pingting Zhu (2010)
5. Biodegradation of Nanoparticle Surface Coatings Teresa Kirschling, Patricia Golas, Kelvin Gregory, Robert Tilton, Gregory Lowry
6. Biodegradation of Magnetic Nanoparticles in Rat Brain Studied by Mössbauer Spectroscopy DmitryM. Polikarpov , Raul R. Gabbasov , ValeryM. Cherepanov , Mikhail A. Chuev , Victor A. Korshunov , Maxim P. Nikitin , Sergey M. Deyev , and Vladislav Y. Panchenko (2013)
7. Biodegradation of Magnetic Nanoparticles in Mouse Liver From Combined Analysis of Mössbauer and Magnetization Data Raul Gabbasov , Valery Cherepanov , Mikhail Chuev , Mikhail Polikarpov , Maxim Nikitin , Sergey Deyev , and Vladislav Panchenko (2013)
8. ZnO nanoparticle-coated surfaces inhibit bacterial biofilm formation and increase antibiotic susceptibility Guy Applerot,[a](#) Jonathan Lellouche,[ab](#) Nina Perkas,[a](#) Yeshayahu Nitzan,[b](#) Aharon Gedanken and Ehud Banin (2012)
9. Triggered Rapid Degradation of Nanoparticles for Gene Delivery Jos´eM. Morachis,[1](#) Enas A.Mahmoud,[1](#) Jagadis Sankaranarayanan,[1](#) and Adah Almutairi (2012)
10. Tailoring the biodegradability of porous silicon nanoparticles Nick K. Hon,[1](#) Zory Shaposhnik,[2](#) Eric D. Diebold,[1](#) Fuyuhiko Tamanoi,[2](#) Bahram Jalali (2012)
11. Synthesis of Cysteine Capped Silver Nanoparticles by Electrochemically Active Biofilm and their Antibacterial Activities Mohammad Mansoob Khan, Shafeer Kalathil, Jintae Lee, and Moo Hwan Cho (2012)
12. PEGylated nanoparticles for biological and pharmaceutical applications Hidenori Otsuka, Yukio Nagasaki , Kazunori Kataoka (2012)
13. Nanoparticles: a boon to drug delivery, therapeutics, diagnostics and imaging Suphiya Parveen, MS, Ranjita Misra, MS, Sanjeeb K. Sahoo, PhD (2012)
14. Use of silver nanoparticles to control biofilm formation in aqueous environment and UF membrane apparatus (2011)
15. Nanoparticles in Biological Systems Wendelin J. Stark (2011)
16. Morphological responses of Legionella pneumophila biofilm to nanoparticle exposure AMBER R. STOJAK, TARA RAFTERY, STEPHEN J. KLAINE, & TAMARA L. MCNEALY (2011)
17. Biodegradation of iron oxide nanoparticles in the organism M. Levy, Y. Javed, L. Lartigue, C. Pechoux, S. Chat, G. Wang, C. Wilhelm, C. Ricolleau, and F. Gazeau (2011)
18. Biodegradability of organic nanoparticles in the aqueous environment Klaus Kómmerner [a,†](#), Jakob Menz [a](#), Thomas Schubert [b](#), Wim Thielemans (2011)
19. The Use of Nanoparticles to Control Oral Biofilm Formation R.P. Allaker (2010)

20. Quantification of biodegradable PLGA nanoparticles for drug targeting Nadira Ibrišimović<sup>1</sup>, Haifa Al-Dubai<sup>1</sup>, Vera Kerleta<sup>2</sup>, Franz Gabor<sup>2</sup>, Fritz Pittner<sup>1</sup> (2010)
21. Preparation and characterization of antimicrobial Ce-doped ZnO nanoparticles for photocatalytic detoxification of cyanide Chockalingam Karunakaran\*, Paramasivan Gomathisankar, Govindasamy Manikandan (2010)
22. Nanoparticle factories: Biofilms hold the key to gold dispersion and nugget formation Frank Reith, Lintern Fairbrother, Gert Nolze, Oliver Wilhelmi, Peta L. Clode, Adrienne Gregg, John E. (2010)
23. Degradability of superparamagnetic nanoparticles in a model of intracellular environment: follow-up of magnetic, structural and chemical properties (<http://iopscience.iop.org/0957-4484/21/39/395103>) (2010)
24. Diffusion of Nanoparticles in Biofilms Is Hydrophobicity Altered by Bacterial Cell Wall Kulakauskas and Romain Briandet Fontaine-Aupart, Marie-Noëlle Bellon-Fontaine, Saulius Olivier Habimana , Karine Steenkeste, Marie-Pierre (2010)

# **Β' ΜΕΡΟΣ**

## **ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ**

## ΚΕΦΑΛΑΙΟ 5. Παρασκευή διαλυμάτων και Νανοσωματιδίων Αργύρου

### 5.1 Παρασκευή διαλυμάτων

Στην παρούσα διπλωματική χρησιμοποιήθηκε ως πολυμερές η πολυκαπρολακτόνη (PCL) για την παρασκευή διαλυμάτων με συγκεντρώσεις 20%w/v, 25%w/v και 30%w/v. Επιλέχθηκε η πολυκαπρολακτόνη, καθώς είναι ένα βιοσυμβατό και βιοδιασπώμενο πολυμερές, με καλές μηχανικές ιδιότητες, και αργό ρυθμό βιοδιάσπασης, που το καθιστά κατάλληλο για ορθοπεδικά εμφυτεύματα. Ως διαλύτες χρησιμοποιήθηκαν το οξικό οξύ (90% acetic acid in water) καθώς και το χλωροφόρμιο/μεθανόλη (chloroform/methanol) σε αναλογία 3:1. Στη συνέχεια εμπλουτίστηκαν τα παραπάνω διαλύματα με Νανοσωματίδια Αργύρου (AgNps) σε συγκέντρωση 3%w/v, μεγέθους 27nm και σχήματος nanowires, για να προσδοθούν στο ικρίωμα αντιμικροβιακές ιδιότητες. Όλα τα παραπάνω διαλύματα έγιναν για δυο διαφορετικά μοριακά βάρη της πολυκαπρολακτόνης, για PCL MW 45 KDa (Sigma Aldrich) και PCL MW 70 KDa (Sigma Aldrich).

Διαδικασία παρασκευής διαλυμάτων:

- ✓ Αρχικά υπολογίστηκε η ποσότητα του πολυμερούς σε γραμμάρια (gr) που αντιστοιχούσε στον αντίστοιχο όγκο του διαλύτη (ml), για την επίτευξη της επιθυμητής %w/v συγκέντρωσης.
- ✓ Στη συνέχεια προστέθηκε αυτή η ποσότητα σε κλειστό γυάλινο δοχείο (για αποφυγή της εξάτμισης), με τον αντίστοιχο διαλύτη. Για την πλήρη διάλυση του PCL, το διάλυμα αναδεύονταν στο magnetic stirrer για 24 ώρες περίπου, σε θερμοκρασία δωματίου και λίγο πριν την πειραματική διαδικασία αναδεύτηκε ξανά στο vortex για περίπου 15 λεπτά στην υψηλή ταχύτητα (24rpm). Στον Πίνακα 5.2 συγκεντρώνονται όλα τα διαλύματα που χρησιμοποιήθηκαν στην παρούσα διπλωματική.
- ✓ Στην περίπτωση της εισαγωγής νανοσωματιδίων, παρασκευάστηκε το αρχικό διάλυμα και ξεχωριστά τα νανοσωματίδια. Κατόπιν, προστέθηκαν τα νανοσωματίδια στο διάλυμα και αναδεύτηκαν στο vortex περίπου 24 ώρες σε θερμοκρασία δωματίου. Όλες οι μετρήσεις των ποσοτήτων έγιναν σε ζυγό ακριβείας.



**Σχήμα 5.1** α) Vortex, β) Magnetic stirrer, γ) ζυγός ακριβείας, του εργαστηρίου LTFN

### Πίνακας 5.1 Διαλύματα Πειράματος

| PCL : MW 45 kDa |     |                     |
|-----------------|-----|---------------------|
| AgNPs           | PCL | Solvent             |
| 1%              | 20% | 90% acetic acid     |
| 2%              | 20% | 90% acetic acid     |
| -               | 20% | Chloroform/methanol |
| 3%              | 20% | Chloroform/methanol |
| -               | 25% | 90% acetic acid     |
| 3%              | 25% | 90% acetic acid     |
| -               | 25% | Chloroform/methanol |
| 3%              | 25% | Chloroform/methanol |
|                 | 30% | Chloroform/methanol |
| 3%              | 30% | Chloroform/methanol |
| PCL : MW 70 kDa |     |                     |
| AgNPs           | PCL | Solvent             |
| -               | 20% | Chloroform/methanol |
| 3%              | 20% | Chloroform/methanol |
| -               | 25% | Chloroform/methanol |
| 3%              | 25% | Chloroform/methanol |
| -               | 30% | Chloroform/methanol |
| 3%              | 30% | Chloroform/methanol |

## 5.2 Παρασκευή Νανοσωματιδίων Αργύρου (AgNPs)

Το ασήμι (Ag) είναι γνωστό ότι έχει απολυμαντική δράση και έχει βρει εφαρμογές σε παραδοσιακά φάρμακα. Πολλά άλατα αργύρου και παράγωγά τους χρησιμοποιούνται στο εμπόριο ως αντιβιοτικοί παράγοντες. Έτσι, τα AgNPs εύστοχα ερευνώνται για την αντιβακτηριδιακή δράση τους. Έχουν γίνει αξιόλογες προσπάθειες εξέτασης αυτής της ιδιότητας με τη χρήση του ηλεκτρονικού μικροσκοπίου, η οποία αποκάλυψε πως η αλληλεπίδραση των AgNPs με τα βακτήρια εξαρτάται από το μέγεθος των νανοσωματιδίων (size-dependent). Τα AgNPs έχουν ιδιαίτερο ενδιαφέρον λόγω της ικανότητάς τους να απελευθερώνουν ιόντα αργύρου με ελεγχόμενο τρόπο, που με τη σειρά του οδηγεί σε μια ισχυρή αντιβακτηριδιακή δραστηριότητα έναντι μεγάλου αριθμού βακτηρίων.

Έχει αποδειχθεί ότι η χρήση νανοδομημένων υλικών αργύρου ενισχύει την ανασταλτική ικανότητα, πιθανότατα επειδή τα νανοδομημένα υλικά έχουν μεγάλη επιφάνεια επαφής. Ωστόσο, η χρήση τους περιορίζεται από τις δυσκολίες που σχετίζονται με το χειρισμό και την επεξεργασία τους. Στην πραγματικότητα, συναθροίζονται (aggregated) εύκολα, λόγω της υψηλής επιφανειακής τους ελεύθερης ενέργειας, και μπορούν να οξειδωθούν ή να μολυνθούν στον αέρα. Η συσσωμάτωση των nanoparticulated μετάλλων στις βιοδιασπώμενες πολυμερικές μήτρες είναι μια αξιόλογη λύση στο πρόβλημα της σταθεροποίησης, και επιτρέπει μια ελεγχόμενη αντιβακτηριδιακή δράση. Επιπλέον, οι χαμηλές συγκεντρώσεις των AgNPs είναι σε θέση να επάγουν μορφολογικές αλλαγές στην επιφάνεια του πολυμερικού ικρίωματος και να επηρεάσουν την επιφανειακή διαβρεξιμότητα του νανოსύνθετου, αλλά και την τραχύτητα. Επίσης, όλες αυτές οι πτυχές επηρεάζουν τη διαδικασία της βακτηριακής προσκόλλησης στην επιφάνεια του νανოსύνθετου. Τέλος, να αναφέρουμε ότι παρατηρήθηκε τοξικότητα του Αργύρου, η οποία σχετίζεται με τη μορφή των νανοσωματιδίων και την πιθανή συσσωμάτωσή τους κατά την απελευθέρωσή τους στο κυτταρικό περιβάλλον.<sup>22</sup>

Παρακάτω περιγράφεται ο τρόπος παρασκευής νανοσωματιδίων Αργύρου.

#### Υλικά :

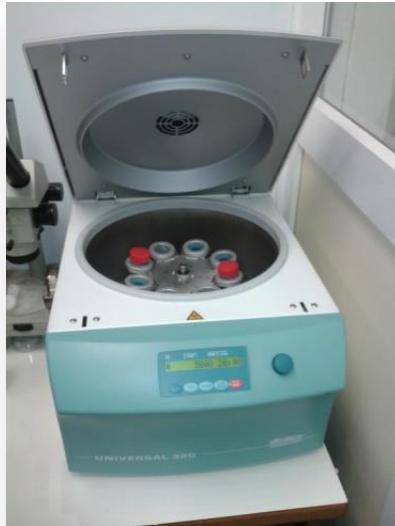
- **AgNO<sub>3</sub>** : Silver Nitrate 99,8 – 100,5 % / M.W. 169,87g/mol / D: 4,35g/cm<sup>3</sup>
- **PVP** : Polyvinylpyrrolidone / average mol wt 10.000
- **EG** : Ethylene Glycol / Mr 62,07
- **Disalol**

#### Ποσότητα :

- [AgNO<sub>3</sub>] = 0,085 M
- $n_{PVP}/n_{AgNO_3} = 1,5$
- [PVP] = 0,1275 M
- V = 20 ml EG (: αιθυλενογλυκόλη)
- $m_{AgNO_3} = 288,78\text{mg}$
- $m_{PVP} = 283,407\text{mg}$
- 30 ml Αιθανόλη

#### Διαδικασία:

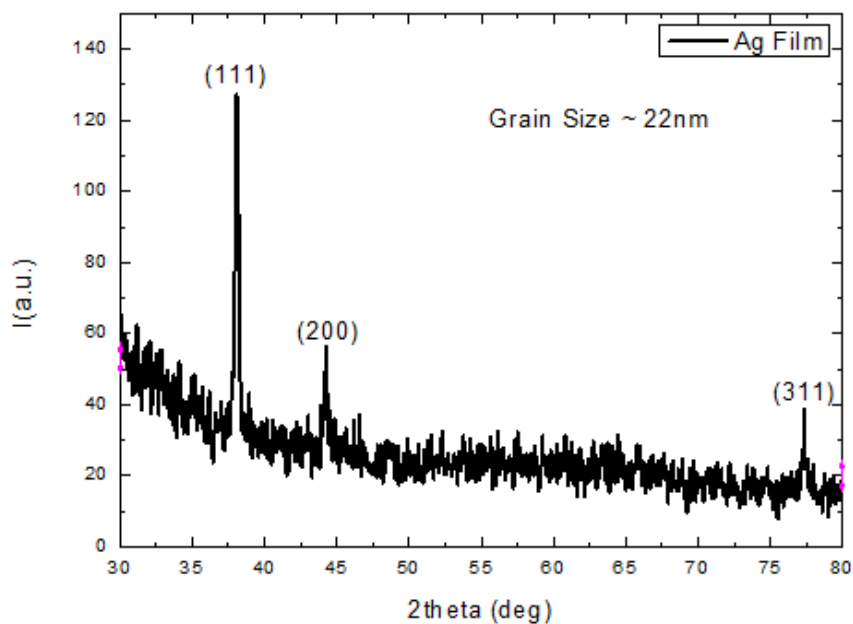
- Θερμαίνεται η EG (20ml) στους 50°C ,
- Προστίθενται 287,67mg PVP και γίνεται ανάδευση του διαλύματος για μισή ώρα στους 50°C,
- Μετά το πέρας της μισής ώρας, προστίθενται τα 288,78mg AgNO<sub>3</sub> και η θερμοκρασία ανεβαίνει στους 120°C. Αφού πιάσει αυτή την θερμοκρασία το διάλυμα, αναδεύεται για 1 ώρα. Παρατηρείται ότι το διάλυμα από διαφανές, γίνεται κίτρινο, καφέ και τελικά σκούρο γκρι.
- Αφού πάρει τη θερμοκρασία δωματίου, προστίθενται 30ml αιθανόλης.
- Περίπου μισή ώρα μετά φυγοκεντρείται το διάλυμα στις 4.500rpm για 45 λεπτά.
- Ξεπλένεται με αιθανόλη και επαναλαμβάνεται η φυγοκέντρηση 3 φορές, έτσι ώστε να γίνει καθίζηση των νανοσωματιδίων αργύρου και ταυτόχρονα απομάκρυνση όλων των υπολοίπων συστατικών.



**Σχήμα 5.2** Διάταξη Φυγοκέντρωσης του εργαστηρίου LTFN

Η ανάμειξη του PCL με νανοσωματίδια είναι μια αποτελεσματική προσέγγιση για να δώσει δραματική βελτίωση στην επιμήκυνση κατά τη θραύση/elongation at break των παραγόμενων νανოსύνθετων (βελτίωση μηχανικών ιδιοτήτων). Η ομοιογενής διασπορά των NPs σε διαλύματα πολυμερούς και οι αλληλεπιδράσεις μεταξύ των σωματιδίων και των αλυσίδων του πολυμερούς είναι 2 κρίσιμες παράμετροι και ταυτόχρονα προκλήσεις για την παρασκευή του νανოსύνθετου.<sup>22</sup>

Τα νανοσωματίδια που κατασκευάσαμε έχουν περίπου 22nm μέγεθος (grain size) μετά από μέτρησή τους με τη μέθοδο XRD\* και ταυτοποίηση του Αργύρου με τρεις κορυφές (Σχήμα 5.3).



**Σχήμα 5.3** Περίθλαση ακτίνων X για ταυτοποίηση των Νανοσωματιδίων Αργύρου



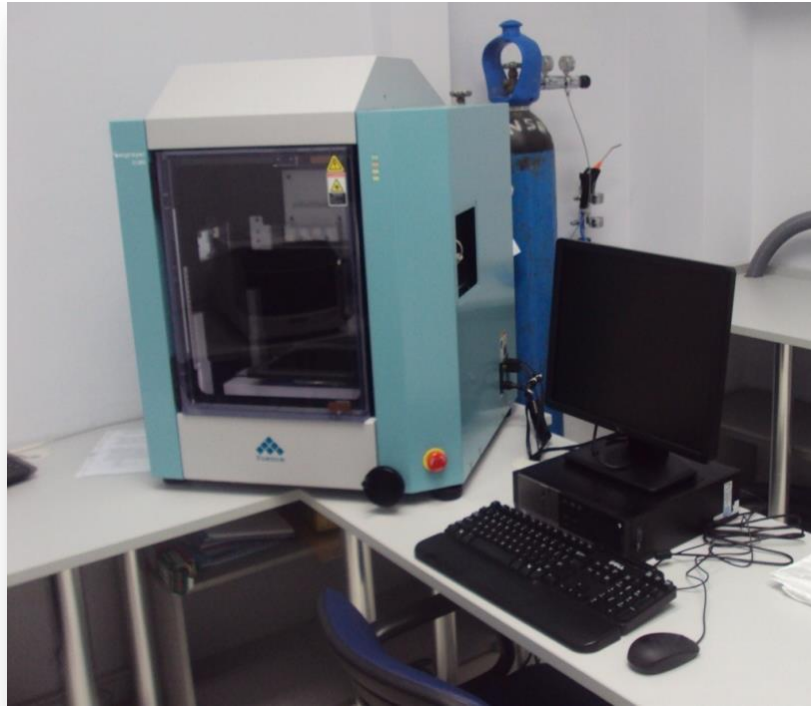
\*Περίθλαση Ακτίνων Χ (XRD): τεχνική για τη μελέτη των κρυσταλλικών δομών και την απόσταση μεταξύ των ατόμων. Βασίζεται στην παρεμβολή μονόχρωμων ακτίνων Χ σε ένα κρυσταλλικό δείγμα. Οι ακτίνες Χ συμπεριφέρονται σαν δημιουργοί της απεικόνισης της κρυσταλλικής δομής, όταν αυτές περιθλώνται σε έναν κρύσταλλο. Έτσι αν ακτίνες Χ πέσουν σε ένα επίπεδο ατόμων με γωνία πρόσπτωσης  $\theta$ , οι ακτίνες θα διαπεράσουν τα στρώματα των ατόμων και θα δώσουν την απεικόνιση τους. Η αλληλεπίδραση των ακτίνων με το δείγμα παράγει την περίθλαση ακτίνων Χ όταν οι συνθήκες ικανοποιούν το Νόμο του Bragg ( $n\lambda=2d \sin\theta$ ), όπου  $\lambda$  το μήκος κύματος της ακτινοβολίας,  $\theta$  η γωνία και  $d$  η απόσταση. Αυτή η περίθλαση των ακτίνων Χ ανιχνεύεται και στη συνέχεια επεξεργάζεται. Είναι προφανές ότι ένας τύπος κρυστάλλου μπορεί να οριστεί ως προς τα μήκη των πλευρών της μοναδιαίας κυψελίδας του και τις γωνιές μεταξύ των όψεων. Δεδομένου ότι κάθε υλικό αποτελείται από μια μοναδική διάταξη και αριθμό ατόμων, κάθε υλικό θα δώσει ένα μοναδικό πρότυπο περίθλασης. Με τη σάρωση του δείγματος εντός ενός εύρους  $2\theta$  γωνιών, όλες οι πιθανές κατευθύνσεις περίθλασης του πλέγματος επιτυγχάνονται, λόγω του τυχαίου προσανατολισμού του υλικού. Μετατροπή των κορυφών περίθλασης σε αποστάσεις  $d$  επιτρέπει την αναγνώριση του υλικού, καθώς όπως προαναφέρθηκε κάθε υλικό έχει ένα σύνολο μοναδικών αποστάσεων  $d$ . Τυπικά, αυτό επιτυγχάνεται με σύγκριση των αποστάσεων  $d$  με βιβλιογραφικά πρότυπα περίθλασης.

## ΚΕΦΑΛΑΙΟ 6. Μέθοδος Ηλεκτροστατικού Ψεκασμού Ινών (Electrospray Deposition Method)

Το electrospinning είναι μια απλή τεχνική για την παραγωγή nonwoven μικρο- ή νανο-ινώδων δομών, και βασίζεται στην εφαρμογή υψηλής τάσης σε ένα πολυμερικό διάλυμα, προκειμένου να δημιουργήσει ένα ηλεκτρικά φορτισμένο πίδακα (jet) που συλλέγεται τυχαία σε ένα γειωμένο στόχο. Η τεχνολογία του electrospinning είναι μια απλή και ευέλικτη μέθοδος παρασκευής εξαιρετικά λεπτών ινών από πολυμερή διαλύματα ή τήγματα. Οι παραγόμενες ίνες έχουν συνήθως διάμετρο από μερικά nm έως μερικά μm, και ως επί το πλείστον εκατοντάδες nm. Οι electrospun πολυμερικές νανοϊνες έχουν πολλές εξαιρετικές ιδιότητες, συμπεριλαμβανομένων των μικρών διαμέτρων, τη μεγάλη ειδική επιφάνεια, ένα υψηλό βαθμό δομικής τελειότητας (high degree of structural perfection) και τις προκύπτουσες ανώτερες μηχανικές ιδιότητες. Επιπροσθέτως, οι nonwoven πολυμερείς δομές προσφέρουν μια μοναδική ικανότητα να ελέγχουν τα μεγέθη των πόρων μεταξύ των ινών. Την τελευταία δεκαετία, η τεχνική του electrospinning έχει προσελκύσει μεγάλο ενδιαφέρον, δεδομένου ότι επιτρέπει την παραγωγή ινώδων nonwoven micro/nano δομών για τη μηχανική ιστών, κυρίως λόγω της ομοιότητας με το εξωκυτταρικό ιστό της μήτρας. Πολλές μελέτες έχουν αποδείξει την ικανότητα των νανοϊνώδων υλικών να καθοδηγήσουν την αρχική προσκόλληση των κυττάρων και στην εξάπλωσή τους πάνω στο υλικό, καθώς και την περαιτέρω ενεργοποίησή τους έτσι ώστε να εκκρίνουν τα κατάλληλα ECM μόρια που στοχεύουν στο δέρμα, τα αιμοφόρα αγγεία, τους χόνδρους, τους μύες, τα λιπώδη, τα νεύρα και τα οστά. Τα ενδιαφέροντα χαρακτηριστικά μιας ινώδους μορφολογίας με διαμέτρους να κυμαίνονται από μερικές δεκάδες nm έως μερικά μm, έχουν προσελκύσει ιδιαίτερη προσοχή που επικεντρώθηκε στην εκμετάλλευση των ιδιοτήτων, καθώς και στις δομικές αλλαγές για τον ιστό που μας ενδιαφέρει ως ικρίωμα για τις εφαρμογές της μηχανικής ιστών.

Τα Electrospun νανοϊνώδη ικρίωματα μιμούνται την αρχιτεκτονική και τις βιολογικές λειτουργίες του ECM, και θεωρούνται πολύ ελπιδοφόρα υποστρώματα για τη μηχανική ιστών.<sup>22</sup>

Για την παρασκευή των πολυμερικών ικριωμάτων πολυκαπρολακτόνης (PCL), χρησιμοποιήθηκε το σύστημα Ηλεκτροψεκασμού Εναπόθεσης (esprayer™ ES-2000S Fuence Co., Ltd) (Σχήμα 6.1) που διαθέτει το εργαστήριο LTFN.



**Σχήμα 6.1** Σύστημα Ηλεκτροψεκασμού εναπόθεσης, του εργαστηρίου LTFN, με το οποίο παρασκευάστηκαν τα ικρίσματα

Το σύστημα περιλαμβάνει ένα ηλεκτρονικό υπολογιστή με τον οποίο γίνεται έλεγχος των παραμέτρων (Τάση, Ρυθμός ροής, θερμοκρασία συλλέκτη-πιάτου, διάρκεια πειράματος, επιλογή είδους σύριγγας, επιλογή μοτίβου κίνησης συλλέκτη: pattern) και το θάλαμο παρασκευής των ινών/υμενίων. Μέσα στο θάλαμο βρίσκεται ο συλλέκτης-πιάτο, ο οποίος καλύπτεται με αλουμινόχαρτο (λόγω αγωγιμότητας) και του οποίου η απόσταση από τη βελόνα μπορεί να μεταβληθεί χειροκίνητα. Επίσης στο θάλαμο υπάρχει και η κατάλληλη υποδοχή για τη σύριγγα. Σε όλα τα πειράματα χρησιμοποιήθηκε γυάλινη σύριγγα στην οποία τοποθετήθηκε ποσότητα διαλύματος ίση με 4mL και η έγχυση έγινε μέσω βελόνας διαμέτρου 0,52mm (needle 21). Όλα τα πειράματα διεξήχθησαν σε θερμοκρασία δωματίου ( $T \sim 20^{\circ}\text{C}$ ). Δύο διαφορετικά είδη μοτίβων κίνησης του συλλέκτη εφαρμόστηκαν (Bio\_spirral και Bio\_lines). Αρχικά όλα τα πειράματα γίνονταν στην μέγιστη απόσταση μεταξύ βελόνας – συλλέκτη (25cm). Διαπιστώθηκε όμως από τις εικόνες AFM και SEM, ότι δεν ήταν εφικτή η δημιουργία ινών σε αυτή την απόσταση και στη συνέχεια επαναλήφθηκαν σε απόσταση 15cm και 5cm όπου παρατηρήθηκε η δημιουργία ινών. Τα πολυμερικά διαλύματα που χρησιμοποιήθηκαν είναι αυτά που αναφέρθηκαν παραπάνω. Λαμβάνονταν κάποια αδρά συμπεράσματα με τη βοήθεια του λέιζερ από τη μορφολογία του πολυμερούς στην άκρη της βελόνας (κώνος του Taylor, ορατές ίνες, electrospray) και του υμενίου στο αλουμινόχαρτο και αναλόγως μεταβάλλονταν οι πειραματικές παράμετροι, μέχρι την υποψία

ίνας και γνωρίζοντας από τη βιβλιογραφία την ιδανική μορφή του κώνου του Taylor. Αρχικά χρησιμοποιήθηκε μόνο το αλουμινόχαρτο σαν υπόστρωμα, στη συνέχεια διαπιστώθηκε πως μπορεί να γίνει ανάπτυξη των ικριωμάτων και πάνω σε πυρίτια (Si), τα οποία χρησιμοποιήθηκαν σαν υποστρώματα (ιδανικότερο υπόστρωμα για contact angle, nanoindentation, πάχος υμενίου με SEM).

Παρακάτω κατηγοριοποιούνται τα πειράματα για την δημιουργία ικριωμάτων ως εξής. Στον πρώτο πίνακα (Πίνακας 6.1) συμπεριλαμβάνονται τα πειράματα που έγιναν στην μέγιστη απόσταση (:w/o = 25cm), που ήταν τα πειράματα για τα οποία αποφασίστηκε αργότερα ότι δεν είναι κατάλληλα ικριώματα για κυτταρική αναγέννηση, καθώς είχαμε τα δημιουργία νανοϊνώδων ικριωμάτων αλλά films/υμενίων, με έντονη την παρουσία beads. Στους Πίνακες 6.2-6.5 αναφέρονται τα πειράματα που έγιναν τόσο στη μεσαία απόσταση (D100 = 15cm), όσο και στην ελάχιστη απόσταση (D200 = 5cm), για τα δυο pattern που εργαστήκαμε (Bio\_Spirral, Bio\_Lines), για μοριακό βάρος πολυμερούς 45kDa, με και χωρίς την παρουσία Νανοςωματιδίων Αργύρου. Αντίστοιχα πειράματα έγιναν τόσο στη μεσαία απόσταση (D100 = 15cm), όσο και στην ελάχιστη απόσταση (D200 = 5cm), για το pattern που επιλέχθηκε, για μοριακό βάρος πολυμερούς 70kDa. Όπως διαπιστώθηκε, η επιλογή του μοτίβου κίνησης του συλλέκτη-πιάτου (pattern) δεν επηρεάζει την εξέλιξη του πειράματος και το τελικό αποτέλεσμα. Γι' αυτό το λόγο στα τελευταία πειράματα επιλέχθηκε ως pattern μόνο το Bio\_Spirral. Η συνολική διάρκεια ανάπτυξης για κάθε διάλυμα, πέραν του Πίνακα 6.1, ήταν 60 λεπτά (T60), ώστε να είναι συγκρίσιμα τα αποτελέσματα μεταξύ τους.

**Πίνακας 6.1** Μέγιστη απόσταση συλλέκτη από βάση (25cm). Διάμετρος βελόνας 0,31 mm. Σε όλα τα πειράματα εφαρμόστηκε Τάση: 25kV, Ρυθμός Ροής: 15 μl/min και μοτίβο: Bio\_lines. Από τις εικόνες AFM και SEM μπορούμε να πούμε ότι δεν δημιουργούνται ίνες. Η μόνη παράμετρος που αλλάζει είναι ο χρόνος ανάπτυξης. Mw 45kDa

| Πολυμερικό διάλυμα (w/v)                          | AFM      | SEM   | Χρόνος ανάπτυξης (min) |
|---|----------|---|------------------------|
| <b>20% PCL in 90% acetic acid</b>                 | Όχι ίνες | Όχι ίνες  | 60                     |
| <b>~ 1% AgNps in [20% PCL in 90%] acetic acid</b> | Όχι ίνες | Όχι ίνες<br>(Μεγαλύτερο Roughness σε σχέση με 30 min) | 60                     |
| <b>~ 1% AgNps in [20% PCL in 90%] acetic acid</b> | Όχι ίνες | Όχι ίνες<br>(smooth surface)                          | 30                     |
| <b>~ 2% AgNps in [20% PCL in 90%] acetic acid</b> | Όχι ίνες | Όχι ίνες<br>(smooth surface με λίγα beads)            | 30                     |
| <b>~ 2% AgNps in [20% PCL in 90%] acetic acid</b> | Όχι ίνες | Όχι ίνες<br>(rough surface με μεγάλα beads)           | 60                     |
| <b>20% PCL in 90% acetic acid</b>                 | Όχι ίνες | Όχι ίνες  | 30                     |

**Πίνακας 6.2** Σε όλα τα πειράματα εφαρμόστηκε Τάση: 15kV, Ρυθμός Ροής: 10 μl/min και χρόνος ανάπτυξης: 60min (T60) και η απόσταση βελόνας συλλέκτη ήταν 5cm (D200). Mw 45kDa

| Πολυμερικό Διάλυμα   | AFM                      | SEM   | Pattern     |
|--|--------------------------|---|-------------|
| <b>D200</b>  |                          |   |             |
| 25% PCL in 90% acetic acid   | ΙΝΕΣ<br>όχι τόσο καθαρές | ΙΝΕΣ<br>(λεπτές & πολλά & μεγάλα beads)   | BIO_SPIRRAL |
| 25% PCL in 90% acetic acid   | ΙΝΕΣ<br>όχι τόσο καθαρές | ΙΝΕΣ<br>(λεπτές & πολλά & μεγάλα beads)   | BIO_LINES   |
| 25% PCL in CH <sub>3</sub> CL/CH <sub>3</sub> OH (3:1)   | ΙΝΕΣ                     | ΙΝΕΣ<br>(χοντρές, έχει και λίγες πολύ πολύ λεπτές, μάλλον λόγω κρυστάλλωσης με την πάροδο του χρόνου) | BIO_LINES   |
| 25% PCL in CH <sub>3</sub> CL/CH <sub>3</sub> OH (3:1)   | ΙΝΕΣ                     | ΙΝΕΣ  | BIO_SPIRRAL |
| 30% PCL in CH <sub>3</sub> CL/CH <sub>3</sub> OH (3:1)   | ΙΝΕΣ<br>BEST             | ΙΝΕΣ<br>(χοντρές και λίγες πολύ λεπτές, μάλλον λόγω κρυστάλλωσης με την πάροδο του χρόνου)            | BIO_LINES   |
| 30% PCL in CH <sub>3</sub> CL/CH <sub>3</sub> OH (3:1)<br>*επανέλαβα το πείραμα στις 24/09/13 με substr. : Si/ Alum.foil | ΙΝΕΣ                     | ΙΝΕΣ<br>(χοντρές και λίγες πολύ λεπτές, μάλλον λόγω κρυστάλλωσης με την πάροδο του χρόνου)            | BIO_SPIRRAL |
| 20% PCL in CH <sub>3</sub> CL/CH <sub>3</sub> OH (3:1)   | Δεν πήραμε εικόνα        |   | BIO_SPIRRAL |

**Πίνακας 6.3** Σε όλα τα πειράματα εφαρμόστηκε Τάση: 15kV, Ρυθμός Ροής: 10 μl/min και χρόνος ανάπτυξης: 60min (T60) και η απόσταση βελόνας συλλέκτη ήταν 15cm (D100). Mw 45kDa

| Πολυμερικό Διάλυμα  | AFM            | SEM  | Pattern     |
|---|----------------|--|-------------|
| <b>D100</b>   |                |  |             |
| 25% PCL in 90% acetic acid  | Όχι καθαρή     | ΙΝΕΣ<br>(λεπτές & πολλά beads)                   | BIO_SPIRRAL |
| 25% PCL in 90% acetic acid  | Όχι καθαρή     | ΟΧΙ ΙΝΕΣ<br>(ίσως πολύ λεπτές), beads            | BIO_LINES   |
| 25% PCL in CH <sub>3</sub> CL/CH <sub>3</sub> OH (3:1)  | ΙΝΕΣ           | ΙΝΕΣ<br>(χοντρές & πολύ λεπτές & ελάχιστα beads) | BIO_SPIRRAL |
| 25% PCL in CH <sub>3</sub> CL/CH <sub>3</sub> OH (3:1)  | ΙΝΕΣ           | ΙΝΕΣ<br>(χοντρές & πολύ λεπτές & ελάχιστα beads) | BIO_LINES   |
| 30% PCL in CH <sub>3</sub> CL/CH <sub>3</sub> OH (3:1)  | ΙΝΕΣ           | ΙΝΕΣ<br>(& ελάχιστα beads)                       | BIO_LINES   |
| 30% PCL in CH <sub>3</sub> CL/CH <sub>3</sub> OH (3:1)<br>* επανάληψη πειράματος με substr. : Si/ Alum.foil | ΙΝΕΣ           | ΙΝΕΣ<br>(& ελάχιστα beads)                       | BIO_SPIRRAL |
| 20% PCL in CH <sub>3</sub> CL/CH <sub>3</sub> OH (3:1)  | Δεν έχω εικόνα |  | BIO_SPIRRAL |

**Πίνακας 6.4** Διαλύματα PCL παρουσία AgNPs. Σε όλα τα πειράματα εφαρμόστηκε Τάση: 15kV, Ρυθμός Ροής: 10 μl/min και χρόνος ανάπτυξης: 60min (T60) και η απόσταση βελόνας συλλέκτη ήταν 5cm (D200). Mw 45kDa

| Πολυμερικό<br>Διάλυμα  | AFM  | SEM                                  | Pattern     |
|--|--|--------------------------------------|-------------|
| <b>3% AgNPs (29 – 37nm diameter)</b>                                 |  |                                      |             |
| 3% AgNPs in [25% PCL in (90% acetic acid)]                           | Spraying   | OXI INES (smooth surface)            | BIO_SPIRRAL |
| 3% AgNPs in [25% PCL in (90% acetic acid)]                           | Spraying   | OXI INES (smooth surface)            | BIO_LINES   |
| 3% AgNPs in [25% PCL in CH <sub>3</sub> CL/CH <sub>3</sub> OH (3:1)] | δεν μπορέσαμε να πάρουμε εικόνα  | INES (χοντρές & λεπτές)              | BIO_SPIRRAL |
| 3% AgNPs in [25% PCL in CH <sub>3</sub> CL/CH <sub>3</sub> OH (3:1)] | INES & κάτι άλλο, (δεν φαίνεται γιατί γρατζουνάει το δείγμα. Δεν πήραμε ολοκληρωμένη εικόνα) | INES (χοντρές & περισσότερες λεπτές) | BIO_LINES   |
| 3% AgNPs in [30% PCL in CH <sub>3</sub> CL/CH <sub>3</sub> OH (3:1)] | δεν μπορέσαμε να πάρουμε εικόνα  |                                      | BIO_SPIRRAL |
| 3% AgNPs in [20% PCL in CH <sub>3</sub> CL/CH <sub>3</sub> OH (3:1)] | δεν μπορέσαμε να πάρουμε εικόνα  |                                      | BIO_SPIRRAL |



**Πίνακας 6.5** Διαλύματα PCL παρουσία AgNPs. Σε όλα τα πειράματα εφαρμόστηκε Τάση: 15kV, Ρυθμός Ροής: 10 μl/min και χρόνος ανάπτυξης: 60min (T60) και η απόσταση βελόνας συλλέκτη ήταν 15cm (D100). Mw 45kDa

| Πολυμερικό<br>Διάλυμα   | AFM                                      | SEM   | Pattern     |
|---|--|---|-------------|
| <b>3% AgNPs (29 – 37nm diameter)</b>  |  |   |             |
| 3% AgNPs in<br>[25% PCL in<br>(90% acetic<br>acid)]                           | Spraying                                 | OXI INES<br>(smooth surface)  | BIO_SPIRRAL |
| 3% AgNPs in<br>[25% PCL in<br>(90% acetic<br>acid)]                           | Spraying                                 | OXI INES<br>(smooth surface)  | BIO_LINES   |
| 3% AgNPs in<br>[25% PCL in<br>CH <sub>3</sub> CL/CH <sub>3</sub> OH<br>(3:1)] | δεν<br>μπορέσαμε να<br>πάρουμε<br>εικόνα | INES<br>(χοντρές & περισσότερες<br>λεπτές & μεγάλα beads σαν<br>σταγόνες κατά μήκος της ίνας) | BIO_SPIRRAL |
| 3% AgNPs in<br>[25% PCL in<br>CH <sub>3</sub> CL/CH <sub>3</sub> OH<br>(3:1)] | δεν<br>μπορέσαμε να<br>πάρουμε<br>εικόνα | INES<br>(χοντρές & περισσότερες<br>λεπτές & μεγάλα beads σαν<br>σταγόνες κατά μήκος της ίνας) | BIO_LINES   |
| 3% AgNPs in<br>[30% PCL in<br>CH <sub>3</sub> CL/CH <sub>3</sub> OH<br>(3:1)] | δεν<br>μπορέσαμε να<br>πάρουμε<br>εικόνα |   | BIO_SPIRRAL |
| 3% AgNPs in<br>[20% PCL in<br>CH <sub>3</sub> CL/CH <sub>3</sub> OH<br>(3:1)] | δεν<br>μπορέσαμε να<br>πάρουμε<br>εικόνα |   | BIO_SPIRRAL |

## ΚΕΦΑΛΑΙΟ 7. Μελέτη των Φυσικών και Μορφολογικών Ιδιοτήτων των Ικτριωμάτων

Η Πολυκαπρολακτόνη (PCL) είναι ένα από τα πιο συχνά εφαρμόζονται συνθετικά πολυμερή για ιατρική χρήση, λόγω της βιοσυμβατότητας και της αργής της βιοαποικοδόμησης. Συνδυάζοντας τις ευνοϊκές εγγενείς ιδιότητες του πολυμερούς PCL με τα μοναδικά χαρακτηριστικά μιας νανοϊνώδους δομής, μπορεί να προκύψει ένα πολλά υποσχόμενο υλικό για βιοϊατρικές εφαρμογές. Οι νανοϊνώδεις δομές παρουσιάζουν μεγάλη ειδική επιφάνεια, μικρό μέγεθος πόρων και υψηλό πορώδες καθιστώντας τα ενδιαφέροντα για μια ευρεία ποικιλία ιατρικών εφαρμογών.

Μια σειρά από μελέτες έχουν αφιερωθεί στο electrospinning του PCL. Ωστόσο, η απόκτηση ινών χωρίς beads και με διαμέτρους στην περιοχή της νανοκλίμακας αποδείχθηκε κάτι δύσκολο. Για ιατρικές εφαρμογές είναι ωστόσο απαραίτητο οι διάμετροι των ινών να έχουν διαμέτρους σε αυτό το εύρος, προκειμένου να μιμηθούν τη φυσική μορφολογία της εξωκυττάριας μήτρας και έτσι να προωθήσουν τη βέλτιστη ανάπτυξη των κυττάρων. Το χλωροφόρμιο είναι ο πιο συχνά εφαρμοζόμενος διαλύτης για το electrospinning του PCL, αλλά παράγει μικροϊνες αντί για νανοϊνες, καθώς οι διάμετροι είναι συνήθως 3-5  $\mu\text{m}$ . Άλλοι σχετικά τοξικοί διαλύτες όπως: διμεθυλοφορμαμίδιο (dimethylformamide : DMF), τετραφθοροαιθυλένιο (tetrafluoroethylene), μεθυλενοχλωρίδιο (methylene chloride), διχλωροαιθάνιο (dichloroethane) και πυριδίνη (pyridine), έχουν αναφερθεί επίσης, και μερικοί από αυτούς δίνουν νανοϊνες με διαμέτρους στην νανοκλίμακα.

Πειραματικές μελέτες, δείχνουν ότι το χλωροφόρμιο οδήγησε σε ενιαίες και παχιές ίνες στη μικροκλίμακα αντί τη περιοχή της νανοκλίμακας. Το οξικό οξύ ως διαλύτης δεν είναι σε θέση να παράγει οποιοδήποτε ινώδες υλικό με τη μέθοδο του electrospinning, ενώ το μυρμηκικό οξύ οδηγεί σε μια δομή που αποτελείται κυρίως από σταγονίδια/droplets. Επίσης, η μέση διάμετρος της ίνας μειώνεται με την αύξηση της υγρασίας. Αυτό πιθανώς προκαλείται κυρίως από την επίδραση πλαστικοποίησης του νερού/ plasticizing effect of water που προκαλεί μια αργή στερεοποίηση και επομένως μια μεγαλύτερη περίοδο λέπτυνσης του πήδακα/jet.<sup>23</sup>

Στη συγκεκριμένη πειραματική μελέτη, στόχος είναι η εξαγωγή συμπερασμάτων για τον τρόπο που επηρεάζουν οι πειραματικές συνθήκες του electrospinning, του διαλύτη και της συγκέντρωσης του πολυμερούς, την μορφολογία του ικρίωματος.

Σαν διαλύτες χρησιμοποιήθηκαν οξικό οξύ και χλωροφόρμιο/μεθανόλη (3:1) και διαπιστώθηκε ότι το οξικό οξύ δεν δίνει ίνες ή αν δίνει, είναι πολύ λεπτές, συγκριτικά με το χλωροφόρμιο/μεθανόλη, και ταυτόχρονα υπάρχουν πολύ μεγάλα beads (πράγμα που συμφωνεί με τη βιβλιογραφία<sup>5,23</sup>). Αυτό μας ώθησε στην χρησιμοποίηση του διαλύτη χλωροφόρμιο/μεθανόλη (3:1) στο μεγαλύτερο μέρος των πειραμάτων μας.

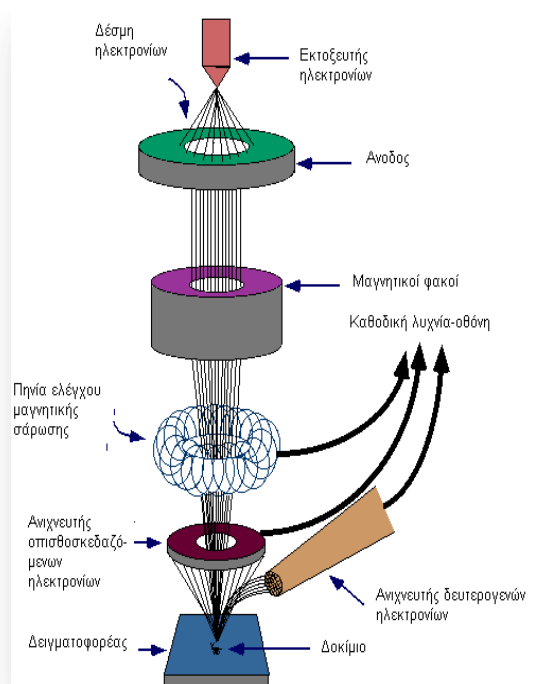
Για το σχηματισμό των ινών, απαιτείται μια ελάχιστη συγκέντρωση πολυμερούς. Κάτω από αυτή την κρίσιμη τιμή, η εφαρμογή τάσης έχει σαν αποτέλεσμα electrospaying ή σχηματισμό beads που οφείλονται πρωταρχικά σε αστάθεια Rayleigh. Σε αυτές τις χαμηλές συγκεντρώσεις, υπάρχει ένα ανεπαρκές μπλεγμένο δίκτυο αλυσίδων πολυμερούς. Καθώς η συγκέντρωση του πολυμερούς αυξάνεται, προκύπτει ένα μείγμα beads και ινών. Περαιτέρω αύξηση στην συγκέντρωση καταλήγει σε σχηματισμό συνεχών ινών, και σε ακόμη υψηλότερες συγκεντρώσεις πολυμερούς, οι ομοιόμορφες ίνες δεν παράγονται πλέον, λόγω του υψηλού ιξώδους του διαλύματος.

### **7.1 . Ηλεκτρονική Μικροσκοπία Σάρωσης (Scanning Electron Microscopy, SEM)**

Η Ηλεκτρονική Μικροσκοπία Σάρωσης (Scanning Electron Microscopy, SEM) είναι μία από τις σύγχρονες και ευέλικτες μεθόδους ανάλυσης της μικροδομής μεγάλου αριθμού υλικών. Το ηλεκτρονικό μικροσκόπιο σάρωσης είναι ένα όργανο που λειτουργεί όπως περίπου και ένα οπτικό μικροσκόπιο μόνο που χρησιμοποιεί δέσμη ηλεκτρονίων υψηλής ενέργειας αντί για φως, για να εξετάσει αντικείμενα σε λεπτομερή κλίμακα. Τα ηλεκτρόνια λόγω της κυματικής τους φύσης μπορούν να εστιαστούν όπως και τα φωτεινά κύματα αλλά σε πολύ μικρότερη επιφάνεια (π.χ. κόκκος υλικού). Η δέσμη ηλεκτρονίων σαρώνει την επιφάνεια του δείγματος με το οποίο αλληλεπιδρά. Από την αλληλεπίδραση αυτή προκύπτουν πληροφορίες σε σχέση με τα άτομα των στοιχείων που απαρτίζουν το εξεταζόμενο υλικό. Από τα άτομα των στοιχείων εκπέμπονται κυρίως δευτερογενή (secondary) και οπισθοσκεδαζόμενα (backscattered) ηλεκτρόνια καθώς και ακτίνες Χ. Υπάρχουν επίσης και μερικές υποκατηγορίες όπως τα ηλεκτρόνια auger και φιλτραρισμένα ή αντανακλώμενα οπισθοσκεδαζόμενα ηλεκτρόνια. Η ένταση των εκπεμπομένων ηλεκτρονίων επηρεάζεται από τα χαρακτηριστικά της επιφάνειας. Έτσι το SEM δίνει πληροφορίες που αφορούν

κυρίως στη μορφολογία και στη σύσταση της επιφάνειας. Εφαρμόζοντας ένα σύστημα ανίχνευσης της διασποράς των ενεργειών των ακτίνων Χ που δημιουργούνται στην επιφάνεια από την προσπίπτουσα δέσμη, μπορεί να γίνει ημιοσοτική στοιχειακή ανάλυση του υλικού. Επομένως το SEM χρησιμοποιείται για την εξέταση μικροδομής στερεών δειγμάτων και για να δίνει εικόνες υψηλού βαθμού διεύθυνσης.<sup>16,17</sup>

Οι βασικές διατάξεις που υπάρχουν στο ΗΜΣ μικροσκόπιο είναι το σύστημα παραγωγής δέσμης ηλεκτρονίων, το σύστημα κατεύθυνσης της δέσμης, το σύστημα πληροφοριών καθώς και το σύστημα κενού. Κατά την λειτουργία του ΗΜΣ έχουμε τον σχηματισμό μιας δέσμης ηλεκτρονίων από την πηγή η οποία επιταχύνεται προς το δείγμα μέσω ενός θετικού ηλεκτρικού δυναμικού. Στη συνέχεια χρησιμοποιώντας ηλεκτρομαγνητικούς φακούς και πηνία σάρωσης, επιτυγχάνεται μια λεπτή εστιασμένη μονοχρωματική δέσμη με τη βοήθεια της οποίας σαρώνεται η επιφάνεια του δείγματος. Οι αλληλεπιδράσεις δέσμης - δείγματος καταγράφονται από τους ανιχνευτές και μετατρέπονται σε εικόνα (Σχήμα 7.1). Όσο πιο πολύ μικρή επιφάνεια ένα ΗΜΣ μπορεί να σαρώσει, τόσο πιο μεγάλη μεγέθυνση επιτυγχάνεται. Με την πρόσπτωση της δέσμης στην επιφάνεια του δοκιμίου, τα ηλεκτρόνια αντιδρούν με τα μόρια ή άτομα του σώματος και παράγουν μία πληθώρα εκπομπών (signals), που είναι χαρακτηριστικές των τοπογραφικών και υλικών ιδιοτήτων του σώματος σε συνάρτηση πάντα με την ταχύτητα των ηλεκτρονίων. Η ταχύτητα των ηλεκτρονίων ρυθμίζεται από τον χρήστη με τη μεταβολή του δυναμικού επιτάχυνσης (accelerating voltage) στο ηλεκτρονικό πιστόλι.



**Σχήμα 07.1:**  
Διάγραμμα  
λειτουργίας ΗΜΣ

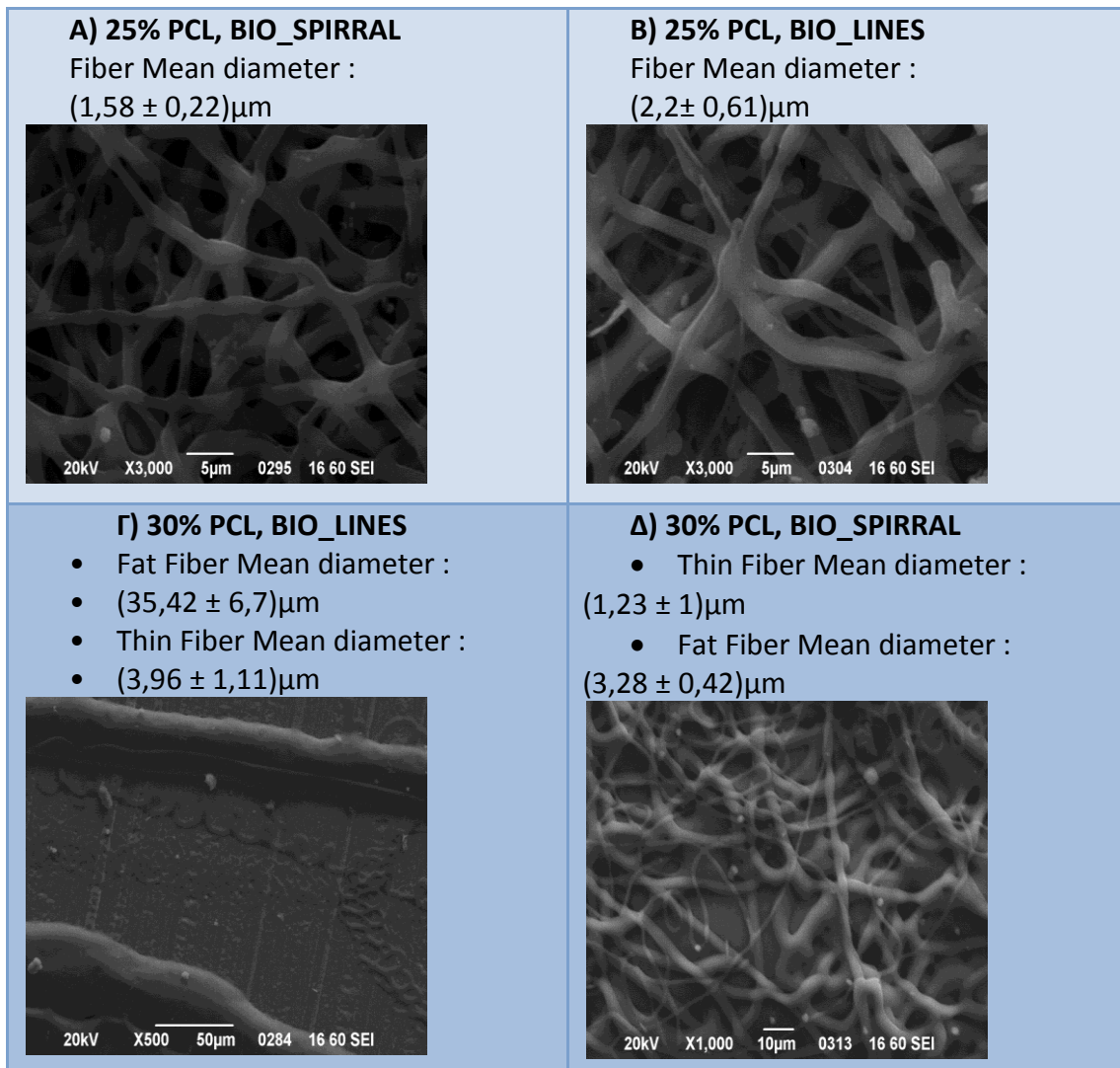
Για την εκτίμηση της μορφολογίας των δειγμάτων χρησιμοποιήθηκε η ηλεκτρονική μικροσκοπία σάρωσης (JSM-6390LV, Jeol) (Σχήμα 7.2) στα 20kV αφότου προηγήθηκε απανθράκωση των δειγμάτων (Jeol Jee-4X Vacuum Evaporator). Οι εικόνες που ελήφθησαν για κάθε δείγμα έγιναν σε διάφορες μεγεθύνσεις (x500, x1000, x3000, x5000, x7000, x8000) ανάλογα με τις διαστάσεις της απεικονιζόμενης δομής. Κυρίως, μελετήθηκαν τα δείγματα με ικρίωματα για να εξαχθούν συμπεράσματα σχετικά με τη διευθέτηση των ινών, την κατανομή των διαμέτρων των ινών, την παρουσία στρογγυλών δομών στην πορεία των ινών (beads) και τις διαστάσεις τους.



**Σχήμα 7.2** Σύστημα Ηλεκτρονικής Μικροσκοπίας Σάρωσης (SEM), του τμήματος Φυσικής, με το οποίο μελετήθηκε η μορφολογία των δειγμάτων.

Ο μέσος όρος των διαμέτρων των ινών καθώς και των beads υπολογίστηκε μετρώντας τη διάμετρο 10 ινών και 10 beads από κάθε εικόνα με το Image J software (National Institutes of Health, USA).

Παρακάτω παρατίθενται οι εικόνες SEM των ικριωμάτων που δημιουργήθηκαν, και από τις οποίες διεξήχθησαν τα συμπεράσματα, όσον αφορά την καταλληλότητα του ικριώματος για την ανάπτυξη κυττάρων (νανοϊνώδη ομοιόμορφα ικρίωματα χωρίς beads), και από τις οποίες αποφασίστηκε σε ποια ικρίωματα τελικά θα γίνει η καλλιέργειά τους. Με τη χρήση του λογισμικού μετρήθηκε η διάμετρος ινών και των beads, και βγήκαν συμπεράσματα όσον αφορά την επίδραση του διαλύτη, του μοτίβου κίνησης του συλλέκτη, της απόστασης βελόνας-συλλέκτη, τη συγκέντρωση του πολυμερούς, την ύπαρξη ή όχι νανοσωματιδίων αργύρου και την αλλαγή του μοριακού βάρους του πολυμερούς.

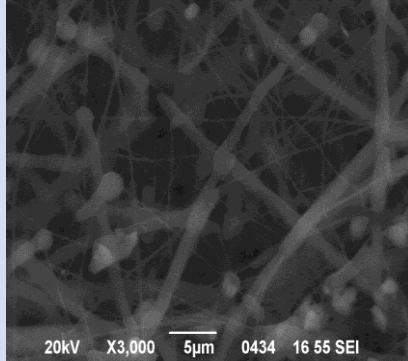


**Σχήμα 7.3** Εικόνες SEM PCL(25 & 30% w/v) ικριωμάτων σε διαλύτη **chloroform/methanol (3:1)**, σε απόσταση **D200**, χρόνος ανάπτυξης **T60**. Τα ικρίωματα αναπτύχθηκαν με τη μέθοδο **electrospray deposition**, με υπόστρωμα: αλουμινόχαρτο, διάμετρος βελόνας: 0,31mm. Σε όλα εφαρμόστηκε η ίδια τάση και ροή : **Vol: 15kV, Speed: 10μl/min.** (PCL MW 45kDa).

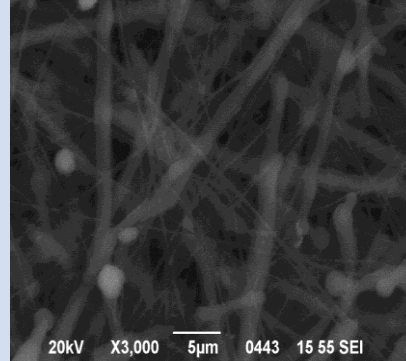
Από το σχήμα 7.3 παρατηρούμε ότι με την αύξηση της συγκέντρωσης του πολυμερούς αυξάνεται και η διάμετρος της ίνας, ενώ το pattern δεν παίζει ιδιαίτερο ρόλο.

**A) 25% PCL, BIO\_SPIRRAL**

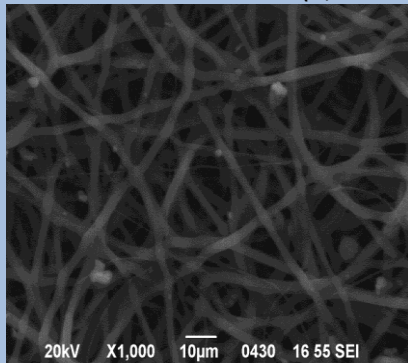
Thin Fiber Mean diameter :  
 $(0,3 \pm 0,05)\mu\text{m}$   
 Fat Fiber Mean diameter :  
 $(1,43 \pm 0,37)\mu\text{m}$

**B) 25% PCL, BIO\_LINES**

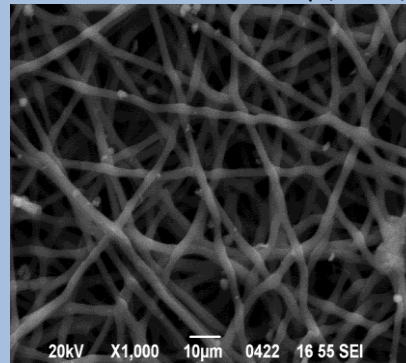
Thin Fiber Mean diameter :  
 $(0,34 \pm 0,07)\mu\text{m}$   
 Fat Fiber Mean diameter :  
 $(1,70 \pm 0,25)\mu\text{m}$

**Γ) 30% PCL, BIO\_SPIRRAL**

Fiber Mean diameter :  $(2,53 \pm 0,33)\mu\text{m}$

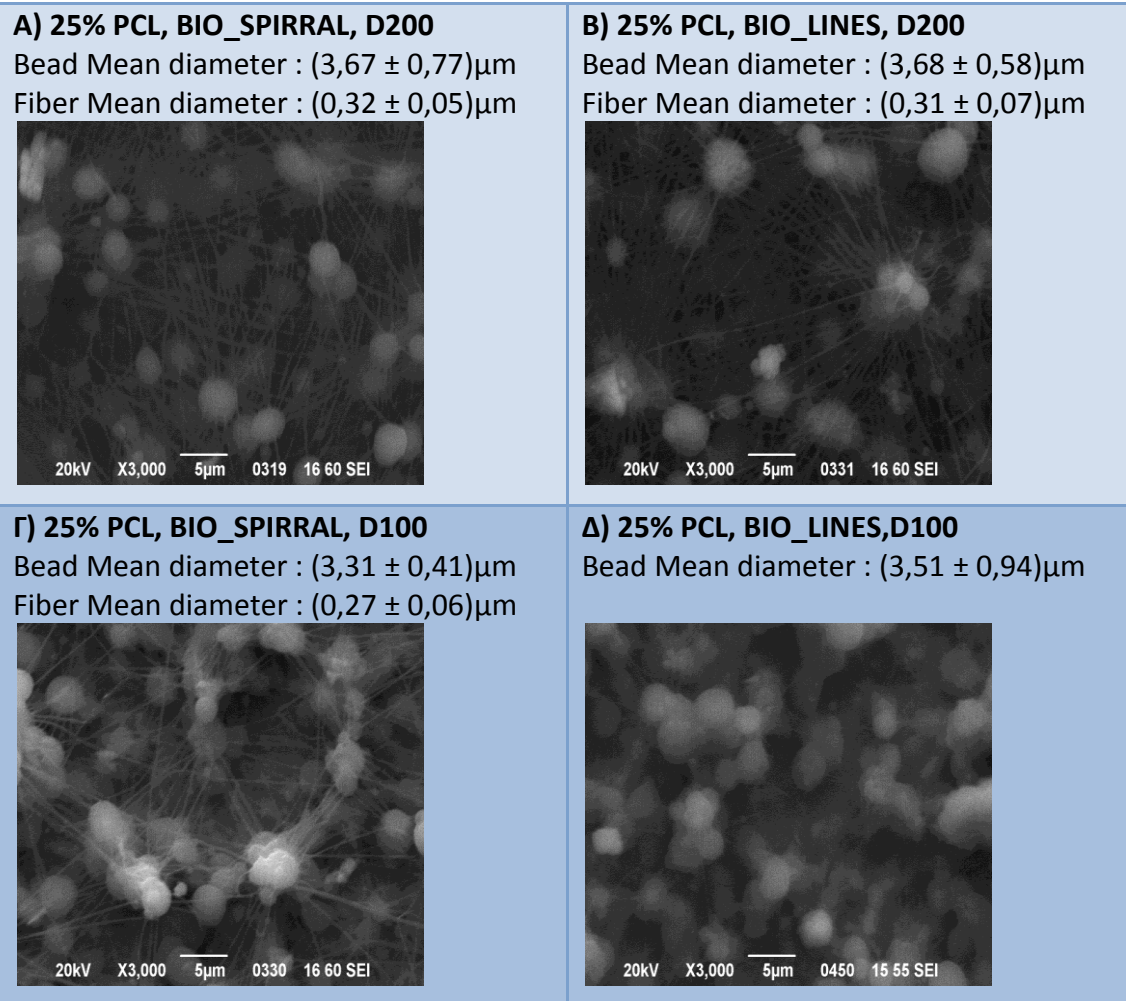
**Δ) 30% PCL, BIO\_BIOLINES**

Fiber Mean diameter :  $(2,4 \pm 0,44)\mu\text{m}$



**Σχήμα 7.4** Εικόνες SEM PCL(25 & 30% w/v) ικριωμάτων σε διαλύτη **chloroform/methanol (3:1)**, σε απόσταση **D100**, χρόνος ανάπτυξης **T60**. Τα ικρίσματα αναπτύχθηκαν με τη μέθοδο electrospray deposition, με υπόστρωμα: αλουμινόχαρτο, διάμετρος βελόνας: 0,31mm. Σε όλα εφαρμόστηκε η ίδια τάση και ροή : **Vol: 15kV, Speed: 10μl/min.** (PCL MW 45kDa)

Από το σχήμα 7.4 παρατηρούμε ότι με την αύξηση της συγκέντρωσης του πολυμερούς αυξάνεται και η διάμετρος της ίνας, ενώ το pattern δεν παίζει ιδιαίτερο ρόλο.



**Σχήμα 7.5** Εικόνες SEM **PCL(25% w/v)** ικριωμάτων σε διαλύτη **acetic acid**, χρόνος ανάπτυξης **T60**. Τα ικριώματα αναπτύχθηκαν με τη μέθοδο electrospray deposition, με υπόστρωμα: αλουμινόχαρτο, διάμετρος βελόνας: 0,31mm. Σε όλα εφαρμόστηκε η ίδια τάση και ροή : **Vol: 15kV, Speed: 10µl/min**. (PCL MW 45kDa).

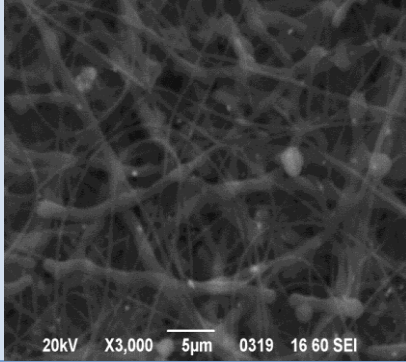
Από το Σχήμα 7.5 παρατηρούμε ότι με διαλύτη οξικό οξύ έχουμε ίνες πολύ μικρής διαμέτρου, σε συνδυασμό με πολύ μεγάλα beads, περιβάλλον όχι ιδανικό για την ανάπτυξη κυττάρων.



**A) 3% AgNPs in 25% PCL, BIO\_SPIRRAL, D200**

Thin Fiber Mean diameter :  
(0,43 ± 0,12) μm

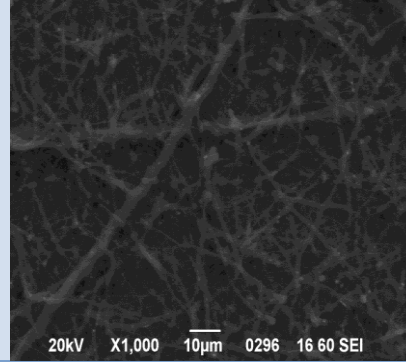
Fat Fiber Mean diameter :  
(1,27 ± 0,18) μm



**B) 3% AgNPs in 25% PCL, BIO\_LINES, D200**

Thin Fiber Mean diameter :  
(1,5 ± 0,21) μm

Fat Fiber Mean diameter :  
(4.0 ± 0,28) μm

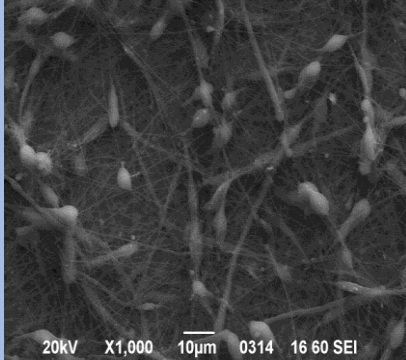


**Γ) 3% AgNPs in 25%PCL, BIO\_SPIRRAL, D100**

Thin Fiber Mean diameter :  
(0,32 ± 0,13) μm

Fat Fiber Mean diameter :  
(1,97 ± 0,51) μm

Bead Mean diameter :  
(4,92 ± 1,26) μm

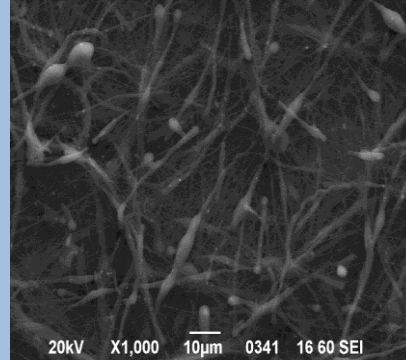


**Δ) 3% AgNPs in 25% PCL, BIO\_LINES, D100**

Thin Fiber Mean diameter :  
(0,38 ± 0,06) μm

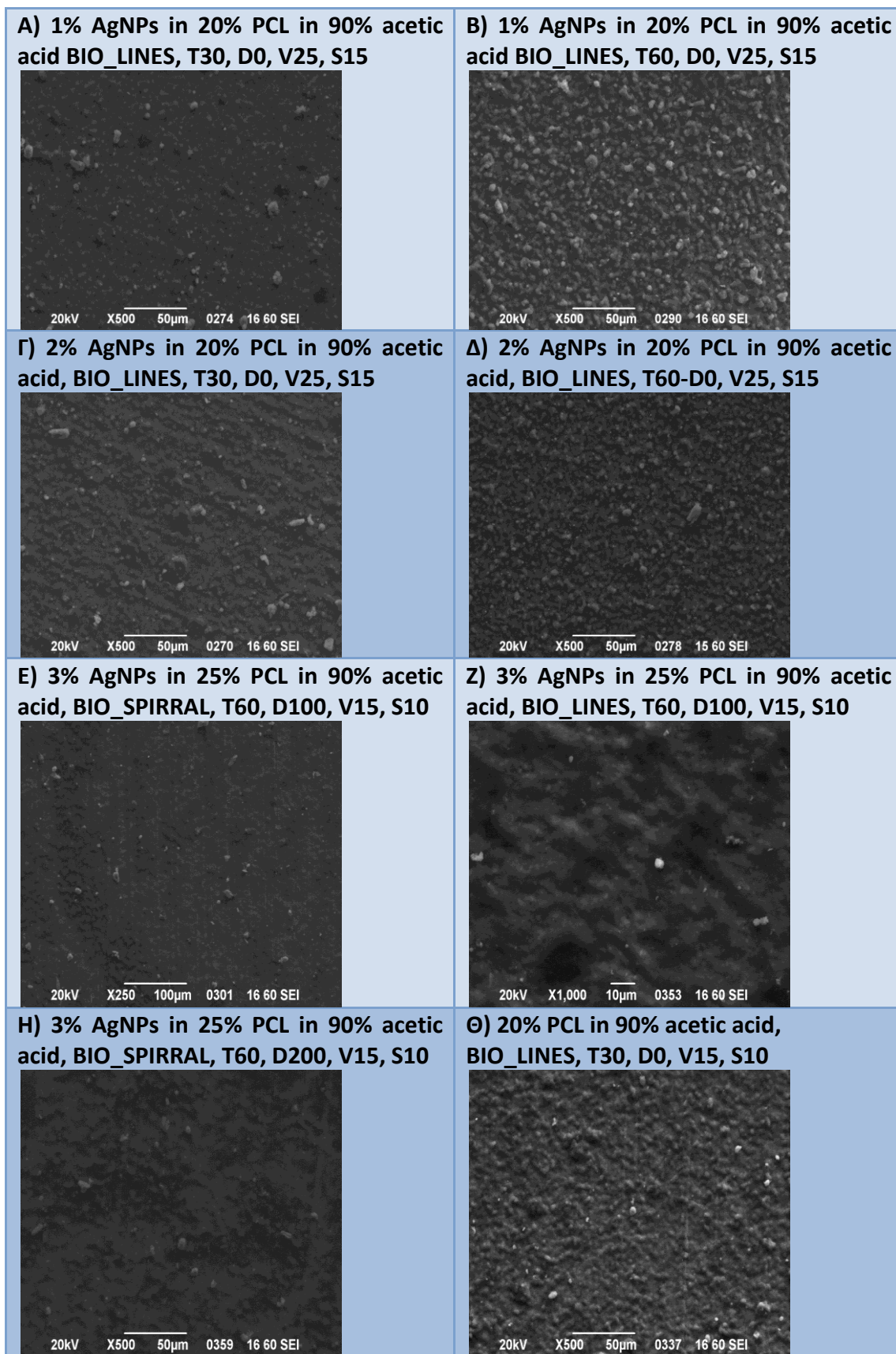
Fat Fiber Mean diameter :  
( 1,87 ± 0,46) μm

Bead Mean diameter :  
(3,3 ± 0,67) μm



**Σχήμα 7.6** Εικόνες SEM **PCL(25% w/v)** ικριωμάτων σε διαλύτη **chloroform/methanol (3:1)**, χρόνος ανάπτυξης **T60**. Τα ικριώματα αναπτύχθηκαν με τη μέθοδο **electrospray deposition**, με υπόστρωμα: αλουμινόχαρτο, διάμετρος βελόνας: 0,31mm. Σε όλα εφαρμόστηκε η ίδια τάση και ροή : **Vol: 15kV, Speed: 10μl/min**. (PCL MW 45kDa).

Από το σχήμα 7.6 παρατηρούμε ότι με την εισαγωγή νανοσωματιδίων, η διάμετρος των ινών μειώνεται συγκριτικά με τα ικριώματα χωρίς νανοσωματίδια.



**Σχήμα 7.7** Εικόνες SEM **PCL(20 & 25% w/v)** ικριωμάτων σε διαλύτη **acetic acid**. Τα ικριώματα αναπτύχθηκαν με τη μέθοδο electrospray deposition, με υπόστρωμα: αλουμινόχαρτο, διάμετρος βελόνας: 0,31mm. Όπου V: τάση, S: ρυθμός ροής, D0 = 25cm, D100 = 15cm, D200 = 5cm, T: χρόνος ανάπτυξης. Κανένα από τα παραπάνω διαλύματα δεν έκανε σχηματισμό ινών. (PCL Mr 45kDa).

Από το σχήμα 7.7 παρατηρούμε ότι όσο περισσότερη ώρα αναπτύσσεται το υμένιο ή όσο περισσότερη είναι η συγκέντρωση των νανοσωματιδίων, τόσο πιο rough γίνεται η επιφάνεια.

Σύμφωνα με τα παραπάνω,

- ✓ Με την αύξηση της συγκέντρωσης του πολυμερούς αυξάνεται και η διάμετρος των ινών του ικριώματος,
- ✓ Αύξηση της απόστασης βελόνας – συλλέκτη, δίνει μικρότερη διάμετρο ινών,
- ✓ Το pattern δεν φαίνεται να επηρεάζει ιδιαίτερα το αποτέλεσμα της μορφολογίας του ικριώματος,
- ✓ Με διαλύτη οξικό οξύ δημιουργούνται ίνες πολύ μικρής διαμέτρου σε συνδιασμό με πολύ μεγάλα beads, περιβάλλον όχι ιδανικό για τα κύτταρα,
- ✓ Η εισαγωγή νανοσωματιδίων δίνει ίνες μικρότερης διαμέτρου, σε σχέση με τα ικριώματα χωρίς την παρουσία νανοσωματιδίων αργύρου
- ✓ Αύξηση του χρόνου ανάπτυξης του ικριώματος, παρουσία νανοσωματιδίων, δίνει πιο rough επιφάνεια,

Οπότε, **επιλέχθηκαν ως καταλληλότερα τα ικριώματα με διαλύτη χλωροφόρμιο/μεθανόλη (3:1) και με μοτίβο κίνησης του συλλέκτη Bio\_Spirral** (εφόσον η διαφορά με το Bio\_Lines ήταν μηδαμινή). **Απορρίφθηκε εντελώς η απόσταση βελόνας-συλλέκτη 25cm (D0), και επιλέχθηκε για την συνέχιση των πειραματικών διαδικασιών η συγκέντρωση των νανοσωματιδίων αργύρου: 3%AgNPs.**

### 7.1.1 Πρωτόκολλο μονιμοποίησης κυττάρων στην επιφάνεια δειγμάτων

Το SEM αποτελεί επίσης ένα χρήσιμο εργαλείο για την παρατήρηση κυττάρων τα οποία έχουν καλλιεργηθεί σε ικριώματα. Συγκεκριμένα, προσφέρει τη δυνατότητα τοπογραφικής και μορφολογικής χαρτογράφησης των κυττάρων. Για τη μονιμοποίηση των κυττάρων στην επιφάνεια των δειγμάτων ακολουθήθηκε το παρακάτω πρωτόκολλο:

- Καλλιέργεια των κυττάρων στα δείγματα σε τροφικό κυτταρικό διάλυμα (Phosphate Buffered Saline, PBS)
- Τα δείγματα μονιμοποιούνται σε 2.5% φορμαλδεΐδη (σε PBS) για 15 λεπτά
- Αφυδάτωση κυττάρων με κλιμακούμενες συγκεντρώσεις διαλύματος αιθανόλης σε απιονισμένο νερό (70%, 90%, 100%)
- Αφαίρεση της αιθανόλης από τα δείγματα
- Τα δείγματα αφήνονται να στεγνώσουν στον αέρα

- Απανθράκωση των δειγμάτων

Το παραπάνω πρωτόκολλο μπορεί να χρησιμοποιηθεί και για παρατήρηση κυττάρων με τη Μικροσκοπία Ατομικών Δυνάμεων (AFM), με παράλειψη του τελευταίου βήματος.

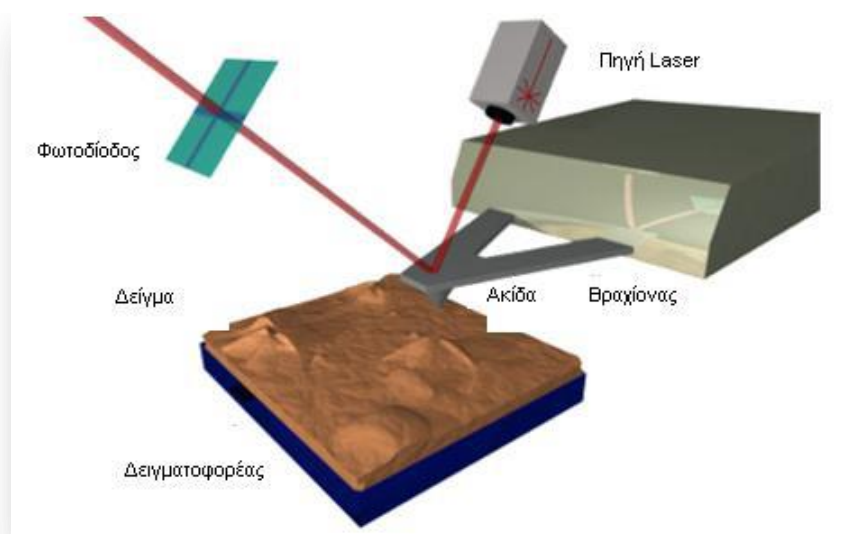
## 7.2 Σαρωτική Μικροσκοπία Ατομικών Δυνάμεων (AFM)

Η ανάλυση με *Σαρωτική Μικροσκοπία Ατομικών Δυνάμεων (Atomic Force Microscope, AFM)* ή *Σάρωση με Μικροσκόπιο Δύναμης (SFM)*, έχει συμβάλει διεξοδικά στην επιστημονική έρευνα, προσφέροντας τη δυνατότητα τοπογραφικής και μορφολογικής χαρτογράφησης επιφανειών κι επομένως υψηλής ανάλυσης απεικόνιση, μελέτη νανομηχανικών ιδιοτήτων σε επίπεδο pico-Newton, μελέτη ηλεκτρομηχανολογικών ιδιοτήτων, ακόμη και στοχευμένη θεραπεία με την τοπική διοχέτευση των φαρμάκων και των νανοσωματιδίων. Το AFM, περιλαμβάνεται σε μια ευρύτερη ομάδα των τεχνικών που ονομάζονται *Σαρωτική Μικροσκοπία Ακίδας ή σημειακού διερευνητή (SPM)*. Όλα τα SPM βασίζονται στη μέτρηση της αλληλεπίδρασης μεταξύ της επιφάνεια του δείγματος και ενός διερευνητή-αισθητήρα του συστήματος. Στο AFM, η αλληλεπίδραση αυτή αντιστοιχεί στην δύναμη μεταξύ των ατόμων του δείγματος και των ατόμων από την λεπτή ακίδα του διερευνητή που σαρώνει την επιφάνεια.

Η αρχή της μεθόδου βασίζεται στην προσέγγιση της επιφάνειας του προς εξέταση δείγματος από την ακίδα μέχρι η τελευταία να την αγγίξει και να αισθανθεί τη δύναμη από το σημείο επαφής της με την επιφάνεια. Η ακίδα, με μήκος λίγων μικρομέτρων και διάμετρο μικρότερη από 10 nm, χρησιμοποιείται ως ανιχνευτής και βρίσκεται στο άκρο ενός βραχίονα (*cantilever*) μήκους 100-200 μm. Έπειτα, ο βραχίονας κάμπτεται ανάλογα με την δύναμη που αισθάνεται η ακίδα στο σημείο επαφής. Έτσι ανάλογα με την κάμψη του βραχίονα, η δέσμη laser ανακλάται κάθε φορά προς διαφορετική διεύθυνση και προσπίπτει τελικά σε διαφορετική περιοχή στην επιφάνεια του φωτοευαίσθητου ανιχνευτή. Το επαγόμενο κάθε φορά φωτόρευμα καταγράφεται στον ηλεκτρονικό υπολογιστή.

Επειδή το μέγεθος της δύναμης αλλά και η φύση της (ελκτική ή απωστική) εξαρτώνται από τη φύση της ακίδας και του σημείου επαφής, η καταγραφή των ρευμάτων μας καταγράφει την τοπογραφία της επιφάνειας. Η τεχνική AFM χρησιμοποιείται για την απεικόνιση και το

χαρακτηρισμό επιφανειών με διακριτική ικανότητα που φτάνει το 0,1nm αλλά και για τη μελέτη μηχανικών ιδιοτήτων διαφόρων υλικών, όπως μονωτών, ημιαγωγών και ηλεκτρικά αγώγιμων υλικών. Εκτός από οπτικό μέσο, το AFM βρίσκει σήμερα εφαρμογές όπως ο χειρισμός (manipulation), η καταγραφή μηχανικών ιδιοτήτων των διαφόρων υλικών και η μέτρηση διαμοριακών δυνάμεων στην νανοκλίμακα. Το σύστημα εργάζεται είτε σε περιβάλλον ατμοσφαιρικού αέρα, είτε σε υγρό περιβάλλον ή υπό υψηλό κενό, είτε σε περιβάλλον αζώτου. Από τα πλεονεκτήματα της μεθόδου, τα σημαντικότερα είναι ότι είναι μη-καταστρεπτική, καθώς η τοπογραφία του δείγματος και οι τιμές της επιφανειακής τραχύτητας, προκύπτουν χωρίς επεξεργασία του δείγματος. Στο Σχήμα 7.8 φαίνεται σχηματική απεικόνιση της διάταξης του AFM.



Σχήμα 7.8 Σχηματική απεικόνιση της λειτουργίας του AFM

Η ταξινόμηση των τρόπων λειτουργίας του AFM σχετίζεται με το πεδίο όπου αναπτύσσονται οι δυνάμεις αλληλεπίδρασης μεταξύ ακίδας και δείγματος κατά τη διάρκεια της μέτρησης. Λαμβάνοντας υπόψη τις δυνάμεις που δημιουργούνται (απωστική μικρής εμβέλειας δύναμη (<1 nm), ελκτική μεγάλης εμβέλειας δύναμη (van der Waals <100 nm), κατηγοριοποιούνται **τρεις μέθοδοι σάρωσης**:

#### **AFM Συνεχούς Επαφής (Contact Mode AFM)**

Στη λειτουργία αυτή, η ακίδα του AFM βρίσκεται σε συνεχή επαφή με την επιφάνεια του δείγματος. Οι δυνάμεις μεταξύ ακίδας-δείγματος είναι απωστικές και χρησιμοποιούνται για την καταγραφή του προφίλ της επιφάνειας. Το μεγαλύτερο πλεονέκτημα αυτής της λειτουργίας είναι ότι παρέχει υψηλή διακριτική ικανότητα. Όμως, λόγω της συνεχούς επαφής δείγματος-ακίδας, οι

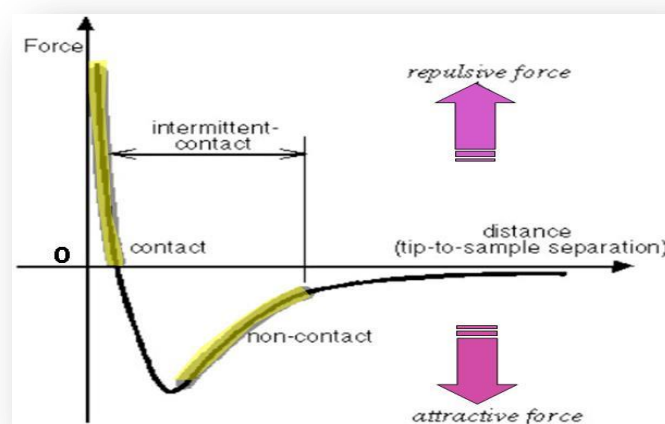
δυνάμεις συνάφειας ενδέχεται να βλάψουν ασθενώς συνδεδεμένα μόρια που προσροφόνται στα βιοϋλικά, όπως για παράδειγμα οι πρωτεΐνες, και να δημιουργήσουν σφάλματα στην εικόνα. 18,19,20,21

### AFM Ημί-επαφής (Semi-contact or Tapping Mode AFM)

Στη λειτουργία ημιεπαφής η ακίδα δε βρίσκεται σε συνεχή επαφή με την επιφάνεια του δείγματος. Το σύστημα βραχίονας-ακίδα, ταλαντώνεται με τη βοήθεια ενός πιεζοκρυστάλλου. Το πλεονέκτημα αυτής της μεθόδου είναι η μεγάλη διακριτική ικανότητα, όπως και στο AFM συνεχούς επαφής, μόνο που δεν είναι καταστροφική, επειδή απουσιάζουν οι πλευρικές δυνάμεις τριβής που εφαρμόζονται στο δείγμα και μπορούν να το αλλοιώσουν και να το φθείρουν. Η τεχνική αυτή είναι ιδανική για μαλακά υλικά, όπως είναι τα πολυμερικά και τα βιολογικά δείγματα. Αυτός ο τρόπος απεικόνισης χρησιμοποιήθηκε στις μετρήσεις των επιφανειών των ικριωμάτων που κατασκευάστηκαν για την παρούσα εργασία.

### AFM Μη επαφής (Non-Contact Mode AFM)

Στο AFM μη επαφής όπως υποδηλώνει και η ονομασία του η ακίδα δεν έρχεται σε επαφή με την επιφάνεια του δείγματος. Το σύστημα βραχίονας-ακίδα ταλαντώνεται ακριβώς επάνω και κάθετα προς την επιφάνεια του δείγματος με πλάτος μικρότερο από 10 nm. Χρησιμοποιείται κυρίως σε περιπτώσεις πολύ μαλακών δειγμάτων. Ορισμένα από τα πλεονεκτήματα αυτής της μεθόδου είναι η μεγάλη ευαισθησία στις μετρήσεις και οι μικρές τιμές των δυνάμεων που εφαρμόζονται στο δείγμα.



Σχήμα 7.9 Διαγράμματα δυνάμεων/ενέργειας των contact, semicontact και noncontact mode



Στην παρούσα εργασία, το AFM (NTEGRA, NT-MDT) (7.10) χρησιμοποιήθηκε τόσο για τη μελέτη της τοπογραφίας και της τραχύτητας των ικριωμάτων και των υμενίων, όσο και για την κατανομή των διαμέτρων των ινών και την μορφολογία τους (διασταύρωση δεδομένων με SEM).



**Σχήμα 7.10** Η Σαρωτική Μικροσκοπία Δυνάμεων (AFM) με την οποία μελετήθηκε η τοπογραφία των δειγμάτων

Η σάρωση έγινε με το μικροσκόπιο σε **tapping mode** τρόπο λειτουργίας ώστε να ελαχιστοποιηθεί η πιθανότητα βλάβης στα δείγματα που ήταν μαλακά. Το λογισμικό που χρησιμοποιήθηκε για τη λήψη και επεξεργασία των εικόνων ήταν το Nova 1.1.0.1844. Οι εικόνες πάρθηκαν σε διάφορα μεγέθη σάρωσης, ανάλογα με τις διαστάσεις τις απεικονιζόμενης δομής και της ανάδειξης του επιθυμητού συμπεράσματος. Όλες οι μετρήσεις έγιναν σε περιβάλλον ατμοσφαιρικού αέρα.

Παρακάτω (σχήμα 7.11), παρατίθενται οι εικόνες AFM, με τις μέσες διαμέτρους, που μπόρεσαν να παρθούν, καθώς η μεγάλη ανομοιογένεια των ικριωμάτων δεν επέτρεψε την απόκτηση εικόνων για όλα τα δείγματα.

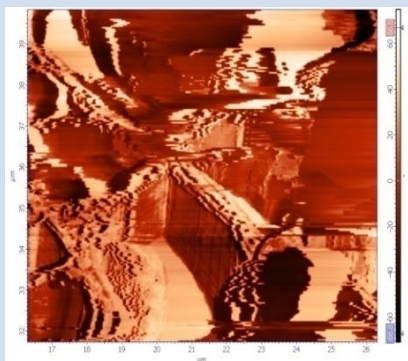
**Σχήμα 7.11** Εικόνες Ύψους (Height) Σαρωτικής Μικροσκοπίας Ατομικών Δυνάμεων (AFM), για τις διάφορες συγκεντρώσεις του PCL. T60 : χρόνος ανάπτυξης 60min, Biospirral : pattern, D100 = 15cm, D200 = 5cm. Mr=45000

**A) 25% PCL in 90% acetic acid**

BIO\_SPIRRAL, T60 min, D200

peak to peak,  $s_y = 4149,94 \text{ nm}$

root mean square,  $s_q = 605,18 \text{ nm}$



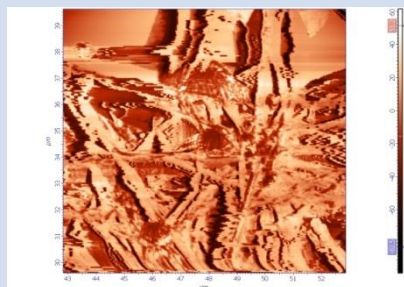
**B) 25% PCL in 90% acetic acid**

PATTERN : BIO\_LINES, T60, D200

peak to peak,  $s_y = 2855,28 \text{ nm}$

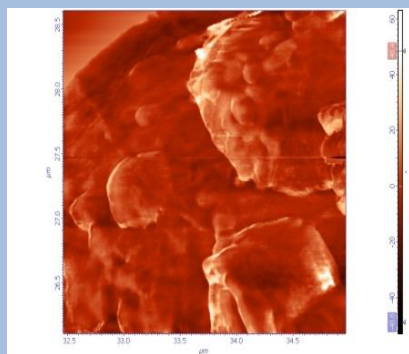
root mean square,  $s_q = 385,64 \text{ nm}$

mean diameter : 0,4  $\mu\text{m}$



**Γ) 25% PCL in 90% acetic acid**

BIO\_LINES, T60, 100



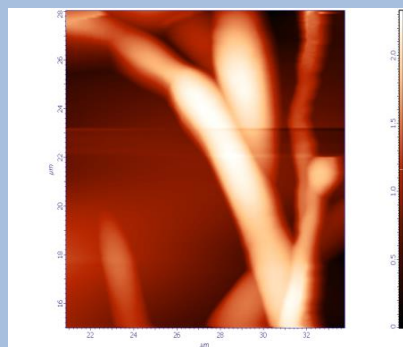
**Δ) 25% PCL in CH3CL/CH3OH (3:1)**

BIO\_LINES, T60, D200

peak to peak,  $s_y = 4167,66 \text{ nm}$

root mean square,  $s_q = 647,18 \text{ nm}$

mean diameter : 2,02  $\mu\text{m}$





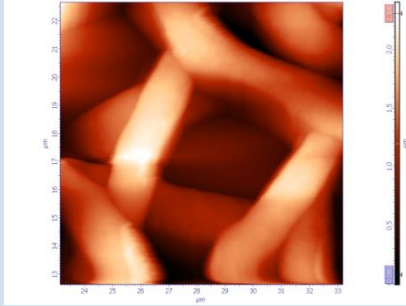
**E) 25% PCL in CH<sub>3</sub>CL/CH<sub>3</sub>OH (3:1)**

BIO\_SPIRRAL, T60, D200

peak to peak,  $s_y = 2398,58$  nm

root mean square,  $s_q = 473,13$  nm

mean diameter : 2,21  $\mu\text{m}$



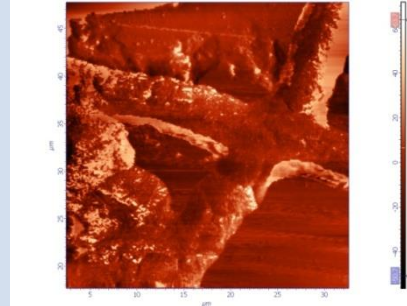
**Z) 30% PCL in CH<sub>3</sub>CL/CH<sub>3</sub>OH (3:1)**

BIO\_SPIRRAL, T60, D200

peak to peak,  $s_y = 1804,87$  nm

root mean square,  $s_q = 283,23$  nm

mean diameter : 5,39  $\mu\text{m}$



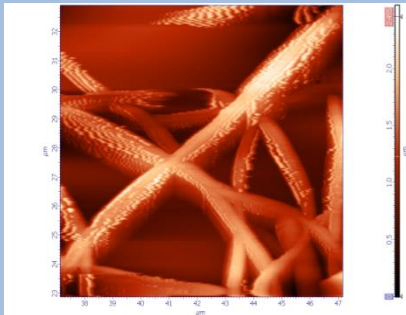
**H) 25% PCL in CH<sub>3</sub>CL/CH<sub>3</sub>OH (3:1)**

BIO\_SPIRRAL, T60, D100

peak to peak,  $s_y = 2550,58$  nm

root mean square,  $s_q = 413,34$  nm

mean diameter : 1,3  $\mu\text{m}$



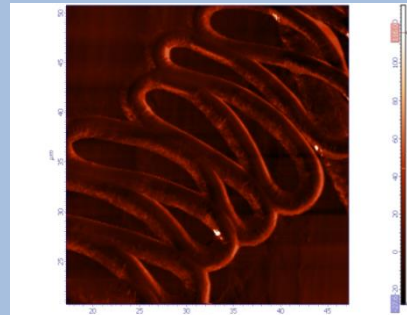
**Θ) 30% PCL in CH<sub>3</sub>CL/CH<sub>3</sub>OH (3:1)**

BIO\_LINES, T60, D200

peak to peak,  $s_y = 2438,96$  nm

root mean square,  $s_q = 336,12$  nm

mean diameter : 2,76  $\mu\text{m}$



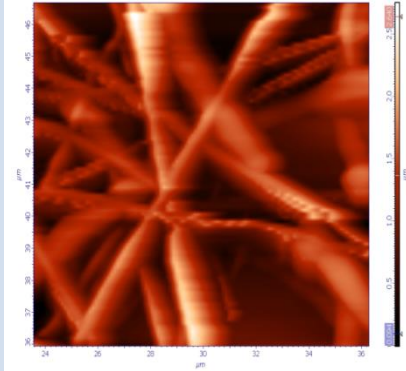
**I) 25% PCL in CH<sub>3</sub>CL/CH<sub>3</sub>OH (3:1)**

BIO\_LINES, T60, D100

peak to peak,  $s_y = 2749,27 \text{ nm}$

root mean square,  $s_q = 427,0 \text{ nm}$

mean diameter : 1,55  $\mu\text{m}$



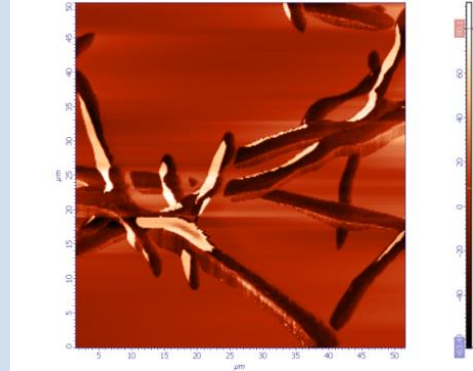
**K) 30% PCL in CH<sub>3</sub>CL/CH<sub>3</sub>OH (3:1)**

BIO\_LINES, T60, D100

peak to peak,  $s_y = 154,92 \text{ nm}$

root mean square,  $s_q = 18,76 \text{ nm}$

mean diameter : 2,93  $\mu\text{m}$



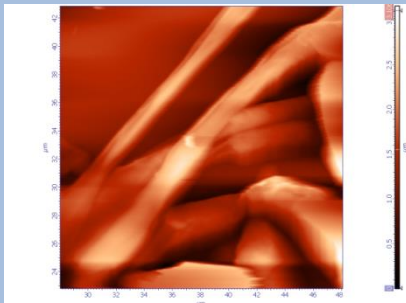
**Λ) 30% PCL in CH<sub>3</sub>CL/CH<sub>3</sub>OH (3:1)**

BIO\_SPIRRAL, T60, D100

peak to peak,  $s_y = 3151,17 \text{ nm}$

root mean square,  $s_q = 496,45 \text{ nm}$

mean diameter : 2,71  $\mu\text{m}$



Σχήμα 7.12 Εικόνες Ύψους (Height) Σαρωτικής Μικροσκοπίας Ατομικών Δυνάμεων (AFM), για τις διάφορες συγκεντρώσεις του PCL, για 3%AgNPs.

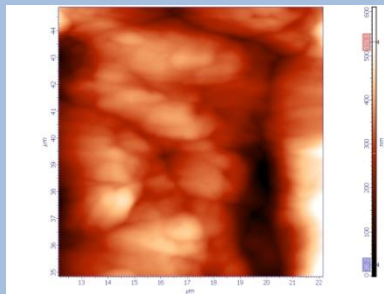
T60 : χρόνος ανάπτυξης 60min, Biospirral : pattern, D100 = 15cm, D200 = 5cm. Mr=45000

**A) 3% AgNPs in [25% PCL in (90% acetic acid)]**

BIO\_LINES, T60, D100

peak to peak,  $s_y = 609,78 \text{ nm}$

root mean square,  $s_q = 85,49 \text{ nm}$

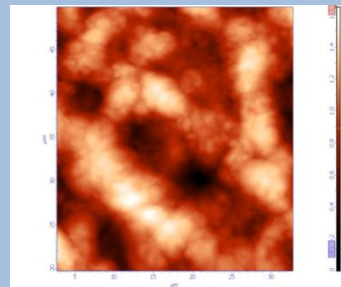


**B) 3% AgNPs in [25% PCL in (90% acetic acid)]**

BIO\_LINES, T60, D200

peak to peak,  $s_y = 1647,49 \text{ nm}$

root mean square,  $s_q = 264,91 \text{ nm}$

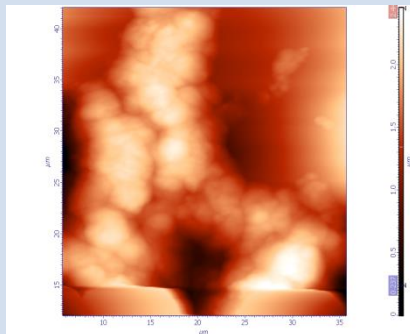


**Γ) 3% AgNPs in [25% PCL in (90% acetic acid)]**

BIO\_SPIRRAL, T60, D100

peak to peak,  $s_y = 2433,02 \text{ nm}$

root mean square,  $s_q = 381,51 \text{ nm}$

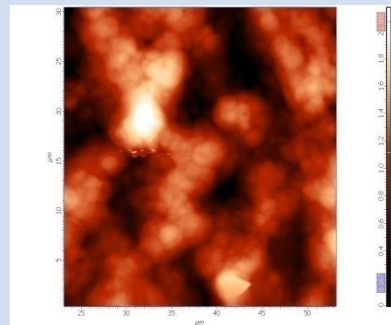


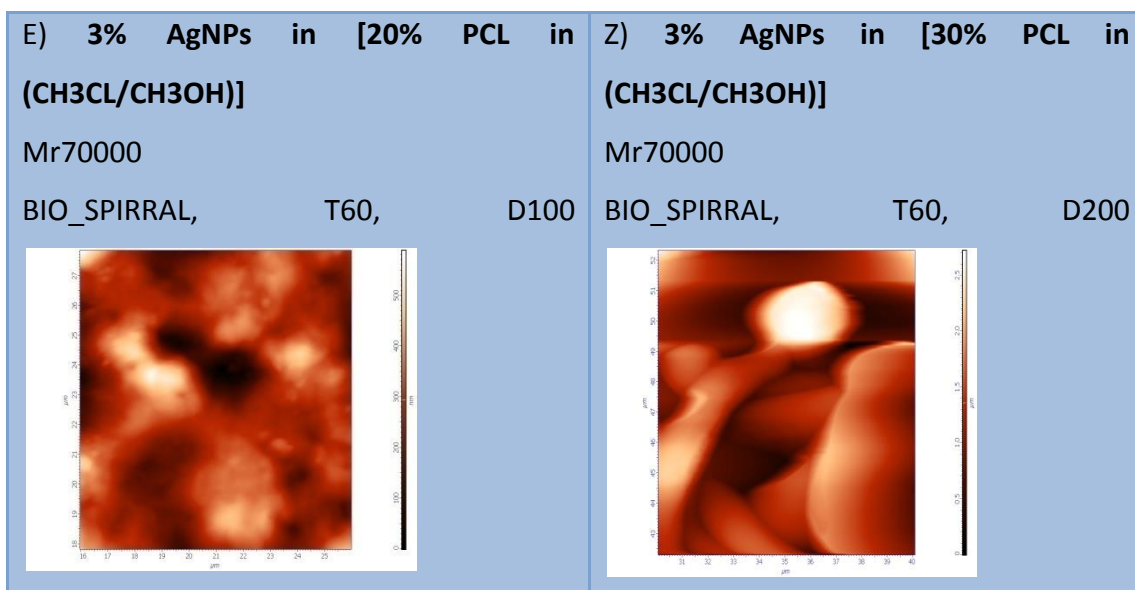
**Δ) 3% AgNPs in [25% PCL in (90% acetic acid)]**

BIO\_SPIRRAL, T60, D200

peak to peak,  $s_y = 2168,68 \text{ nm}$

root mean square,  $s_q = 368,11 \text{ nm}$





Αν συγκεντρώσουμε τα στοιχεία μόνο για τα διαλύματα που έχουμε επιλέξει να ασχοληθούμε εκτενέστερα (Bio\_Spirral, χλωροφόρμιο/μεθανόλη), και για τα οποία μπορέσαμε να πάρουμε εικόνες AFM, έχουμε:

**Πίνακας 7.1** διάμετρος ινών και RMS από εικόνες AFM

| A/A | Nanoscaffolds | Root Mean Square, Sq (nm) | Mean diameter (μm) (n=5) |
|-----|---------------|---------------------------|--------------------------|
| 1   | 25% PCL, D200 | 473,13                    | 2,21                     |
| 2   | 25% PCL, D100 | 413,34                    | 1,3                      |
| 3   | 30% PCL, D200 | 283,23                    | 5,39                     |
| 4   | 30% PCL, D100 | 496,45                    | 2,71                     |

Η μελέτη της διαμέτρου των ινών από το SEM (n=10) (κεφάλαιο 7) και η σύγκρισή τους με τη μέτρηση της διαμέτρου των ινών από το AFM (n=5) (Πίνακας 7.1), δηλώνει πως υπάρχει συμφωνία των μετρήσεων, με τις μετρήσεις του SEM να είναι πιο ακριβείς, καθώς οι εικόνες είναι πιο ευδιάκριτες, και μπορούμε να έχουμε μια πιο ευρεία εικόνα του ικρίωματος σε σύγκριση με

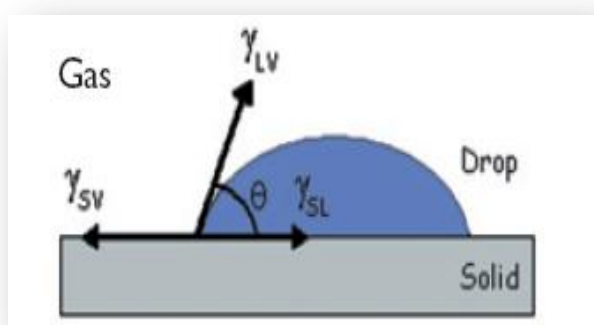
αυτές του AFM. Επίσης, οι πληροφορίες που λαμβάνουμε από τις αντίστοιχες εικόνες αλληλοσυμπληρώνουν η μια την άλλη.

Από τις εικόνες AFM παρατηρούμε πως

- ✓ **Η διάμετρος των ινών αυξάνεται με μείωση της απόστασης βελόνας – συλλέκτη, με μέγιστη τιμή στην απόσταση D200 (5cm).**
- ✓ **Με αύξηση της συγκέντρωσης του πολυμερούς αυξάνεται και η διάμετρος των ινών, με μέγιστη τιμή για 30% PCL,**
- ✓ Η επιλογή του μοτίβου κίνησης του συλλέκτη (pattern Bio\_Lines or Bio\_Spirral), δεν φαίνεται να επηρεάζει συστηματικά το αποτέλεσμα στην μορφή του ικριώματος που προκύπτει, ή στην διάμετρο των ινών, με εξαίρεση τα ικριώματα για την συγκέντρωση 30%PCL in CH<sub>3</sub>Cl/CH<sub>3</sub>OH, Bio\_Lines, D200 όπου φαίνεται να δημιουργείται μια ομοιόμορφα επαναλαμβανόμενη δομή και στο ίδιο διάλυμα για pattern Bio\_Spirral η διάμετρος της ίνας είναι πολύ μεγαλύτερη σε σχέση με όλα τα υπόλοιπα ικριώματα. Βέβαια, από τις εικόνες SEM, μπορούμε να δούμε, πως για το 30%PCL in CH<sub>3</sub>Cl/CH<sub>3</sub>OH, Bio\_Lines, D200, πέρα από τις ίνες με την ομοιόμορφη διάταξη, υπάρχουν και άλλες με πολύ μεγαλύτερο πάχος, ανάλογο με εκείνο του αντίστοιχου διαλύματος για Bio\_Spirral. Συνεπώς, **το μοτίβο κίνησης δεν φαίνεται να επηρεάζει με κάποιο τρόπο την διάμετρο και την κατανομή των ινών στο ικρίωμα.**
- ✓ **Τα διαλύματα με διαλύτη οξικό οξύ μας δίνουν την υπόνοια ύπαρξης ινών, με ξεκάθαρη την ύπαρξη μεγάλων beads, πράγμα που επιβεβαιώνεται από τις εικόνες SEM.**
- ✓ Τέλος, τα πειραματικά μας αποτελέσματα δείχνουν πως **η προσθήκη των νανοσωματιδίων αργύρου φαίνεται να επηρεάζει την τραχύτητα της επιφάνειας των ικριωμάτων, κάτι που συμφωνεί με την βιβλιογραφία.**<sup>26</sup>

### 7.3 Γωνία Επαφής (Contact Angle, CA)

Ως γωνία επαφής (CA) ορίζουμε την γωνία που σχηματίζει μια σταγόνα απιονισμένου νερού με την επιφάνεια του δείγματός μας. Αν  $CA > 90^\circ$  τότε η επιφάνεια είναι υδρόφοβη και αν  $CA < 90^\circ$  τότε η επιφάνεια είναι υδρόφιλη. Όσο μικρότερη είναι η γωνία επαφής τόσο πιο υδροφιλική είναι η επιφάνεια. Υπολογίζεται από την εξίσωση Young :  $\cos\theta = (\gamma_{sv} - \gamma_{sl}) / \gamma_{lv}$ , εξαρτάται δηλαδή από τα μεγέθη των διεπιφανειακών τάσεων, δηλαδή την συνισταμένη των δυνάμεων συνοχής οι οποίες έλκουν τα μόριά τους προς το εσωτερικό της υγρής μάζας. (SV: solid-vaapor, SL: solid-liquid, LV: liquid-vaapor). Όταν το υγρό τοποθετηθεί σε επαφή με μια ακλόνητη επιφάνεια/στερεό, οι

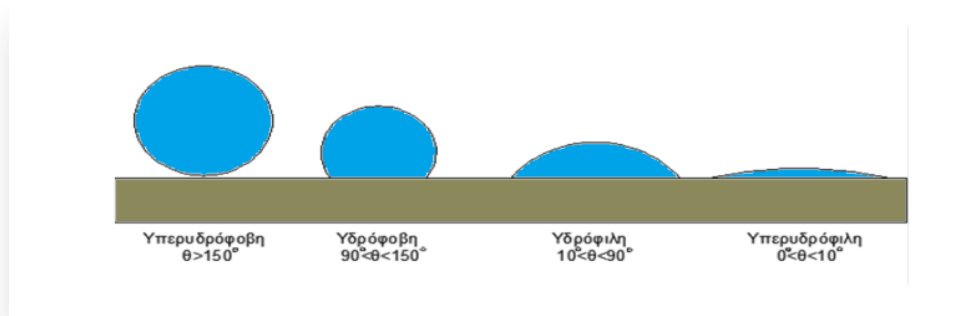


Σχήμα 7.13 Contact Angle

τριχοειδείς δυνάμεις οδηγούν την διεπιφάνεια αυθόρμητα προς την ισορροπία (Σχήμα 7.13). καθώς η σταγόνα απλώνει, η γωνία επαφής σταθεροποιείται από την αρχική της τιμή που είναι  $180^\circ$  την στιγμή της επαφής, μέχρι τη γωνία  $\theta^\circ$  που επέρχεται η ισορροπία. Η ελεύθερη ενέργεια επιφανείας είναι αντιστρόφως ανάλογη από την

γωνία επαφής και υπολογίζεται από τη σχέση:  $\cos\theta = -1 + 2 \sqrt{\frac{\gamma_{sv}}{\gamma_{lv}}} e^{-\beta(\gamma_{lv} - \gamma_{sv})^2}$ .

Η παράμετρος διαβροχής ενός στερεού εξαρτάται από τη σύσταση (υλικό), την ομοιογένεια και την τραχύτητα της εξωτερικής του επιφάνειας. Η ισχύς της αλληλεπίδρασης με το υγρό εξαρτάται από τη πολικότητα ή μη του υλικού. Κατά τη διεπαφή μιας στερεής επιφάνειας με νερό, στην περίπτωση μερικής διαβροχής, εάν η γωνία επαφής είναι μεταξύ  $0^\circ$  και  $10^\circ$  η επιφάνεια καλείται υπερυδρόφιλη, εάν είναι μικρότερη των  $90^\circ$ , η επιφάνεια χαρακτηρίζεται ως υδρόφιλη, εάν παίρνει τιμές μεταξύ των  $90^\circ$  και των  $150^\circ$  χαρακτηρίζεται ως υδρόφοβη, ενώ για τιμές από  $150^\circ$  έως  $180^\circ$  η επιφάνεια χαρακτηρίζεται ως υπερυδρόφοβη (σχήμα 7.14).



**Σχήμα 7.14** Η μορφή της σταγόνας για τις τέσσερις περιπτώσεις διαβροχής.

**Μερική διαβροχή**, όπου το υγρό διαβρέχει μερικώς τη στερεή επιφάνεια:  $\gamma_{SL} = \gamma_{SG} + \gamma_{LG}$  · [7.1]

**Ολική διαβροχή**, η γωνία  $\theta$  δεν ορίζεται πλέον. Στην περίπτωση αυτή ισχύει:

$$\gamma_{SL} > \gamma_{SG} + \gamma_{LG} \cdot \quad [7.2]$$

**Μηδενική διαβροχή**, το υγρό έχει τη μορφή σφαίρας και ισχύει η εξίσωση:

$$\gamma_{SL} < \gamma_{SG} + \gamma_{LG} \cdot \quad [7.3]$$

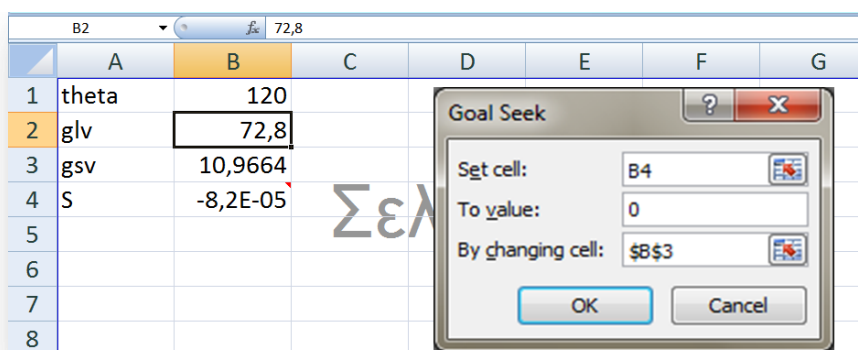
Οι μετρήσεις της γωνίας επαφής (Contact Angle) έγιναν με το σύστημα CAM 200 contact angle/surface energy analyzer (KSV Instr. Ltd Finland) (Σχήμα ). Τα στιγμιότυπα διαβροχής των δειγμάτων καταγράφηκαν από τη κάμερα του συστήματος κι έπειτα αναλύθηκαν με το λογισμικό της κατασκευαστικής εταιρείας.



**Σχήμα 7.15** Το σύστημα Contact Angle με το οποίο έγινε μελέτη της διαβροχής των δειγμάτων, του εργαστηρίου LTFN



Σαν παράμετροι του υλικού τέθηκαν για το PCL MW: 45 000Da & 70 000Da, density: 1,1450 g/cm<sup>3</sup>. Οι μετρήσεις πραγματοποιήθηκαν με απιονισμένο νερό. Συγκεκριμένα κάθε δείγμα τοποθετήθηκε στη κατάλληλη βάση του συστήματος, πάνω στο οποίο εναποτέθηκε προσεκτικά μια σταγόνα 5μl. Εικόνες από τη σταγόνα ελήφθησαν αυτόματα από το σύστημα (συγκεκριμένα 5) και με τη βοήθεια του λογισμικού που παρέχεται από τον κατασκευαστή, λάβαμε τις γωνίες διαβροχής. Συνολικά πραγματοποιήθηκαν 3 μετρήσεις (n=3) από 3 διαφορετικά σημεία κάθε δείγματος και υπολογίστηκε ο μέσος όρος. Κατά αυτόν τον τρόπο εξάχθηκαν συμπεράσματα σχετικά με την υδροφιλικότητα ή την υδροφοβικότητα των δειγμάτων μας. Στους πίνακες 7.2-7.13 αναφέρουμε την γωνία επαφής για όλα τα δείγματα, με διάφορα υποστρώματα (γυαλί : glass, πυρίτιο : Si, αλουμινόχαρτο: aluminium foil), και την ελεύθερη ενέργεια επιφάνειας αντίστοιχα (: mean free energy -  $\gamma_{sv}$ ). Για να περιγράψουμε την τάση των ατόμων να αντιδράσουν ή να απομακρυνθούν από την επιφάνεια ορίζουμε την ενέργεια της επιφάνειας  $\gamma$ . Η  $\gamma$  είναι η διαφορά της ενέργειας ανά μονάδα επιφάνειας μεταξύ ατόμων που βρίσκονται στην επιφάνεια και στον όγκο ενός υλικού. Η  $\gamma$  που είναι γνωστή και ως επιφανειακή τάση κυμαίνεται συνήθως στην περιοχή τιμών 0,1-1 J/m<sup>2</sup>. Την υπολογίσαμε θεωρώντας πως η επιφάνεια σε μικροσκοπικό επίπεδο είναι ομοιόμορφη, με τη βοήθεια ενός υπολογιστικού φύλλου (σχήμα 7.16), στο οποίο αντικαθιστούσαμε την τιμή  $\theta$ , την οποία μετρήσαμε (contact angle), το  $g_{lv} = 72,8$  είναι η ελεύθερη ενέργεια επιφάνειας του νερού, και θέλω να υπολογίσω το  $g_{sv}$ . Επιλέγοντας το S, στη συνέχεια επιλέγω: Data → What if analysis → Goal Seek → στο πινακάκι που εμφανίζεται, στο τρίτο κελί, επιλέγω το  $g_{sv}$  κελί → οκ.



Σχήμα 7.16 Υπολογισμός contact angle



**ΠΙΝΑΚΑΣ 7.2** Contact Angle (Degrees) & Mean Free Energy (N/cm<sup>2</sup>),

Dw/o, MW45kDa, 90% acetic acid, T30, V=15kV, Speed = 4μl/min, Bio\_lines

|         |  |
|---------|--|
| 20% PCL | <u>Substrate aluminum foil:</u><br>Mean Contact Angle : 70,43 ± 0,21<br>volume : 4,90 ± 0,03<br>mean free energy $\gamma_{SV}$ : 40,94 |
|---------|--|

**ΠΙΝΑΚΑΣ 7.3** Contact Angle (Degrees) & Mean Free Energy (N/cm<sup>2</sup>), Dw/o, MW45kDa, 90% acetic acid,

with AgNPs, T30 &amp; T60, V=15kV, Speed = 4μl/min, Bio\_lines

|  |  |
|--|--|
| ~ 1% AgNps in 20% PCL<br>TIME : 60 min | <u>Substrate aluminum foil:</u><br>Mean Contact Angle : 90,35 ± 0,23<br>volume : 4,95 ± 0,02<br>mean free energy $\gamma_{SV}$ : 28,33 |
| ~ 1% AgNps in 20% PCL<br>TIME : 30 min | <u>Substrate aluminum foil:</u><br>Mean Contact Angle : 71,49 ± 0,05<br>volume : 4,97 ± 0,00<br>mean free energy $\gamma_{SV}$ : 40,29 |
| ~ 2% AgNps 20% PCL<br>TIME : 30 min    | <u>Substrate aluminum foil:</u><br>Mean Contact Angle : 59,14 ± 0,06<br>volume : 5,03 ± 0,00<br>mean free energy $\gamma_{SV}$ : 47,97 |

**ΠΙΝΑΚΑΣ 7.4** Contact Angle (Degrees) & Mean Free Energy (N/cm<sup>2</sup>),  
D100, MW45kDa, 90% acetic acid, T60, V=15kV, Speed = 10μl/min

|                        |   |
|------------------------|---|
| 25% PCL<br>BIO_SPIRRAL | <u>Substrate aluminum foil:</u><br>Mean Contact Angle : 108,84 ± 0,18<br>volume : 4,62 ± 0,02<br>mean free energy $\gamma_{SV}$ : 17,05 |
| 25% PCL<br>BIO_LINES   | <u>Substrate aluminum foil:</u><br>Mean Contact Angle : 111,13 ± 0,06<br>volume : 4,97 ± 0,01<br>mean free energy $\gamma_{SV}$ : 15,74 |

**ΠΙΝΑΚΑΣ 7.5** Contact Angle (Degrees) & Mean Free Energy (N/cm<sup>2</sup>),  
D200, MW45kDa, 90% acetic acid, T60, V=15kV, Speed = 10μl/min

|                        |   |
|------------------------|---|
| 25% PCL<br>BIO_SPIRRAL | <u>Substrate aluminum foil:</u><br>Mean Contact Angle (degrees) : 126,35 ± 0,05<br>Mean volume (microl) : 4,99 ± 0,00<br>mean free energy $\gamma_{SV}$ (N/cm <sup>2</sup> ) : 7,95<br><br><u>Substrate glass :</u><br>Mean Contact Angle : 127,53 ± 0,05<br>volume : 4,9 ± 0,00<br>mean free energy $\gamma_{SV}$ : 7,43 |
| 25% PCL<br>BIO_LINES   | <u>Substrate aluminum foil:</u><br>Mean Contact Angle : 130,31 ± 0,04<br>volume : 5,03 ± 0,00<br>mean free energy $\gamma_{SV}$ : 6,25<br><br><u>Substrate glass :</u><br>Mean Contact Angle : 131,43 ± 0,03<br>volume : 4,94 ± 0,00<br>mean free energy $\gamma_{SV}$ : 5,84   |

**ΠΙΝΑΚΑΣ 7.6** Contact Angle (Degrees) & Mean Free Energy (N/cm<sup>2</sup>),  
D100, MW45kDa, CH<sub>3</sub>Cl/CH<sub>3</sub>OH (3:1), T60, V=15kV, Speed = 10μl/min

|                        |  |
|------------------------|--|
| 20%PCL<br>BIO_SPIRRAL  | <u>Substrate Si:</u><br>Mean Contact Angle : 135,87± 0,08<br>volume : 5,23 ± 0,00<br>mean free energy $\gamma_{SV}$ : 4,27   |
| 25% PCL<br>BIO_SPIRRAL | <u>Substrate aluminum foil:</u><br>Mean Contact Angle : 133,89 ± 0,05<br>volume : 5,00 ± 0,00<br>mean free energy $\gamma_{SV}$ : 4,92<br><u>Substrate Si:</u><br>Mean Contact Angle : 130,55± 0,04<br>volume : 5,21 ± 0,00<br>mean free energy $\gamma_{SV}$ : 6,19           |
| 25% PCL<br>BIO_LINES   | <u>Substrate aluminum foil:</u><br>Mean Contact Angle : 130,31 ± 0,30<br>volume : 4,96 ± 0,00<br>mean free energy $\gamma_{SV}$ : 6,3  |
| 30% PCL<br>BIO_LINES   | <u>Substrate aluminum foil:</u><br>Mean Contact Angle : 115,92 ± 0,07<br>volume : 4,71 ± 0,00<br>mean free energy $\gamma_{SV}$ : 13,09<br><br><u>Substrate glass :</u><br>Mean Contact Angle : 121,92 ± 0,04<br>volume : 4,93 ± 0,01<br>mean free energy $\gamma_{SV}$ : 9,98 |
| 30% PCL<br>BIO_SPIRRAL | <u>Substrate aluminum foil:</u><br>Mean Contact Angle : 124,16 ± 0,03<br>volume : 4,85 ± 0,00<br>mean free energy $\gamma_{SV}$ : 8,93   |

|  |  |
|--|--|
|  | <p><u>Substrate glass :</u></p> <p>Mean Contact Angle : 119,55 ± 0,05</p> <p>volume : 4,66 ± 0,01</p> <p>mean free energy <math>\gamma_{sv}</math> : 11,17</p> <p><u>Substrate Si:</u></p> <p>Mean Contact Angle : 127,5± 0,04</p> <p>volume : 5,14 ± 0,00</p> <p>mean free energy <math>\gamma_{sv}</math> : 7,43</p> |
|--|--|

**ΠΙΝΑΚΑΣ 7.7** Contact Angle (Degrees) & Mean Free Energy (N/cm<sup>2</sup>),

D100, MW70kDa, CH<sub>3</sub>Cl/CH<sub>3</sub>OH (3:1), T60, V=15kV, Speed = 10μl/min, Bio\_Spirral

|         |  |
|---------|--|
| 20%PCL  | <p><u>Substrate Si:</u></p> <p>Mean Contact Angle : 128,66± 0,06</p> <p>volume : 5,08 ± 0,00</p> <p>mean free energy <math>\gamma_{sv}</math> : 6,95</p> |
| 30% PCL | <p><u>Substrate Si:</u></p> <p>Mean Contact Angle : 129,67± 0,06</p> <p>volume : 5,17± 0,00</p> <p>mean free energy <math>\gamma_{sv}</math> : 6,56</p>  |

**ΠΙΝΑΚΑΣ 7.8** Contact Angle (Degrees) & Mean Free Energy (N/cm<sup>2</sup>),

3% AgNPs, D100, MW45kDa, CH<sub>3</sub>Cl/CH<sub>3</sub>OH (3:1), T60, V=15kV, Speed = 10μl/min, Bio\_Spirral

|                    |  |
|--------------------|--|
| 3%AgNPs in 20% PCL | <u>Substrate Si:</u><br>Mean Contact Angle : 134,92± 0,06<br>volume : 5,22 ± 0,00<br>mean free energy $\gamma_{SV}$ : 4,57 |
| 3%AgNPs in 25% PCL | <u>Substrate Si:</u><br>Mean Contact Angle : 131,63± 0,05<br>volume : 5,26 ± 0,00<br>mean free energy $\gamma_{SV}$ : 5,78 |
| 3%AgNPs in 30%     | <u>Substrate Si:</u><br>Mean Contact Angle : 129,72± 0,04<br>volume : 5,14 ± 0,00<br>mean free energy $\gamma_{SV}$ : 6,51 |

**ΠΙΝΑΚΑΣ 7.9** Contact Angle (Degrees) & Mean Free Energy (N/cm<sup>2</sup>),

3% AgNPs, D100, MW70kDa, CH<sub>3</sub>Cl/CH<sub>3</sub>OH (3:1), T60, V=15kV, Speed = 10μl/min, Bio\_Spirral

|                    |   |
|--------------------|---|
| 3%AgNPs in 20% PCL | <u>Substrate Si:</u><br>Mean Contact Angle : 99,54 ± 0,8<br>volume : 4,99± 0,00<br>mean free energy $\gamma_{SV}$ : 22,63 |
| 3%AgNPs in 25% PCL | <u>Substrate Si:</u><br>Mean Contact Angle : 134,8± 0,04<br>volume : 5,25± 0,00<br>mean free energy $\gamma_{SV}$ : 4,64  |
| 3%AgNPs in 30% PCL | <u>Substrate Si:</u><br>Mean Contact Angle : 135,32± 0,04<br>volume : 5,18± 0,00<br>mean free energy $\gamma_{SV}$ : 4,45 |

**ΠΙΝΑΚΑΣ 7.10** Contact Angle (Degrees) & Mean Free Energy (N/cm<sup>2</sup>),  
D200, MW45kDa, CH<sub>3</sub>Cl/CH<sub>3</sub>OH (3:1), T60, V=15kV, Speed = 10μl/min

|                        |   |
|------------------------|---|
| 20%PCL<br>Bio_SPIRRAL  | <u>Substrate Si:</u><br>Mean Contact Angle : 121,32± 0,05<br>volume : 5,2 ± 0,00<br>mean free energy $\gamma_{SV}$ : 10,3   |
| 25% PCL<br>BIO_LINES   | <u>Substrate aluminum foil:</u><br>Mean Contact Angle : 112,2 ± 0,10<br>volume : 4,98± 0,01<br>mean free energy $\gamma_{SV}$ : 15,13   |
| 25% PCL<br>BIO_SPIRRAL | <u>Substrate aluminum foil:</u><br>Mean Contact Angle : 117,98 ± 0,31<br>volume : 5,13 ± 0,04<br>mean free energy $\gamma_{SV}$ : 12,0<br><br><u>Substrate glass :</u><br>Mean Contact Angle : 106,06 ± 0,36<br>volume : 4,89 ± 0,01<br>mean free energy $\gamma_{SV}$ : 18,68<br><br><u>Substrate Si: (λίνες ίνες, η σταγόνα ήρθε σε επαφή με το υπόστρωμα)</u><br>Mean Contact Angle : 94,79± 0,85<br>volume : 5,4 ± 0,00<br>mean free energy $\gamma_{SV}$ : 25,53 |
| 30% PCL<br>BIO_LINES   | <u>Substrate aluminum foil:</u><br>Mean Contact Angle : 90,31 ± 0,26<br>volume : 4,59 ± 0,32<br>mean free energy $\gamma_{SV}$ : 28,32  |

|                                   |  |
|-----------------------------------|--|
|                                   | <p><u>Substrate glass :</u></p> <p>Mean Contact Angle : 118,0 ± 0,13</p> <p>volume : 4,92 ± 0,02</p> <p>mean free energy <math>\gamma_{SV}</math> : 12.0</p>   |
| <p>30% PCL</p> <p>BIO_SPIRRAL</p> | <p><u>Substrate aluminum foil:</u></p> <p>Mean Contact Angle : 91,23 ± 0,40</p> <p>volume : 5,06 ± 0,01</p> <p>mean free energy <math>\gamma_{SV}</math> : 27,78</p> <p><u>Substrate glass :</u></p> <p>Mean Contact Angle : 118,61 ± 0,02</p> <p>volume : 4,94 ± 0,00</p> <p>mean free energy <math>\gamma_{SV}</math> : 11,68</p> <p><u>Substrate Si:</u></p> <p>Mean Contact Angle : 104,12 ± 0,06</p> <p>volume : 5,25 ± 0,00</p> <p>mean free energy <math>\gamma_{SV}</math> : 19,82</p> |

**ΠΙΝΑΚΑΣ 7.11** Contact Angle (Degrees) & Mean Free Energy (N/cm<sup>2</sup>),

3% AgNPs, D200, MW45kDa, CH<sub>3</sub>Cl/CH<sub>3</sub>OH (3:1), T60, V=15kV, Speed = 10μl/min, Bio\_Spirral

|                    |  |
|--------------------|--|
| 3%AgNPs in 20%     | <u>Substrate Si:</u><br>Mean Contact Angle : 129,78± 0,06<br>volume : 5,27 ± 0,00<br>mean free energy $\gamma_{sv}$ : 6,47   |
| 3%AgNPs in 25% PCL | <u>Substrate Si:</u><br>Mean Contact Angle : 120,56± 0,05<br>volume : 5,22 ± 0,00<br>mean free energy $\gamma_{sv}$ : 10,68  |
| 3%AgNPs in 30%     | <u>Substrate Si: (λίγες ίνες, η σταγόνα ήρθε σε επαφή με το υπόστρωμα)</u><br>Mean Contact Angle : 90,66± 0,12<br>volume : 5,35 ± 0,00<br>mean free energy $\gamma_{sv}$ : 28,12 |

**ΠΙΝΑΚΑΣ 7.12** Contact Angle (Degrees) & Mean Free Energy (N/cm<sup>2</sup>),

D200, MW70kDa, CH<sub>3</sub>Cl/CH<sub>3</sub>OH (3:1), T60, V=15kV, Speed = 10μl/min, Bio\_Spirral

|         |   |
|---------|---|
| 30% PCL | <u>Substrate Si: (λίγες ίνες, η σταγόνα ήρθε σε επαφή με το υπόστρωμα)</u><br>Mean Contact Angle : 97,95± 0,9<br>volume : 4,81± 0,001<br>mean free energy $\gamma_{sv}$ : 23,59 |
|---------|---|



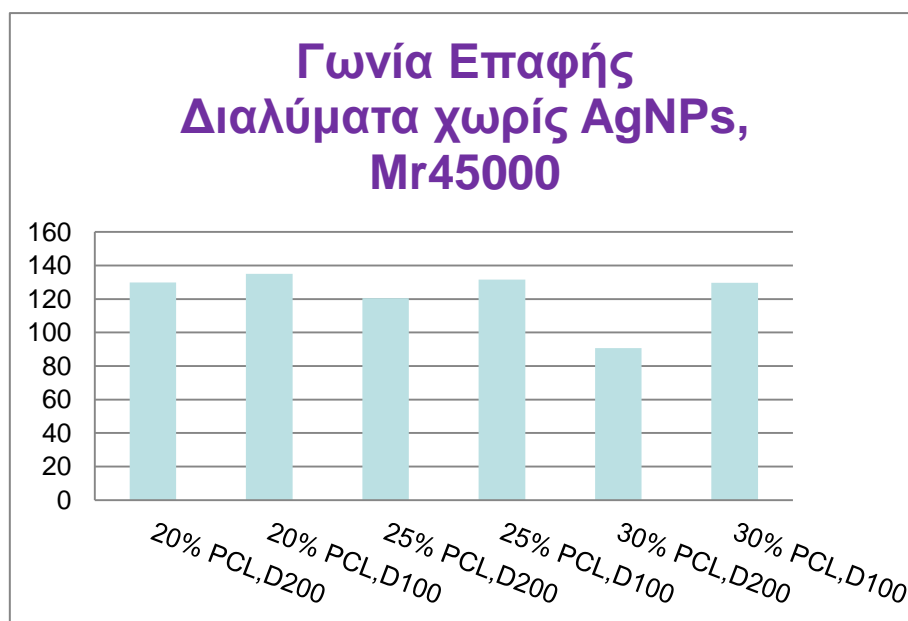
**ΠΙΝΑΚΑΣ 7.13** Contact Angle (Degrees) & Mean Free Energy (N/cm<sup>2</sup>),

3% AgNPs, D200, MW70kDa, CH<sub>3</sub>Cl/CH<sub>3</sub>OH (3:1), T60, V=15kV, Speed = 10μl/min, Bio\_Spirral

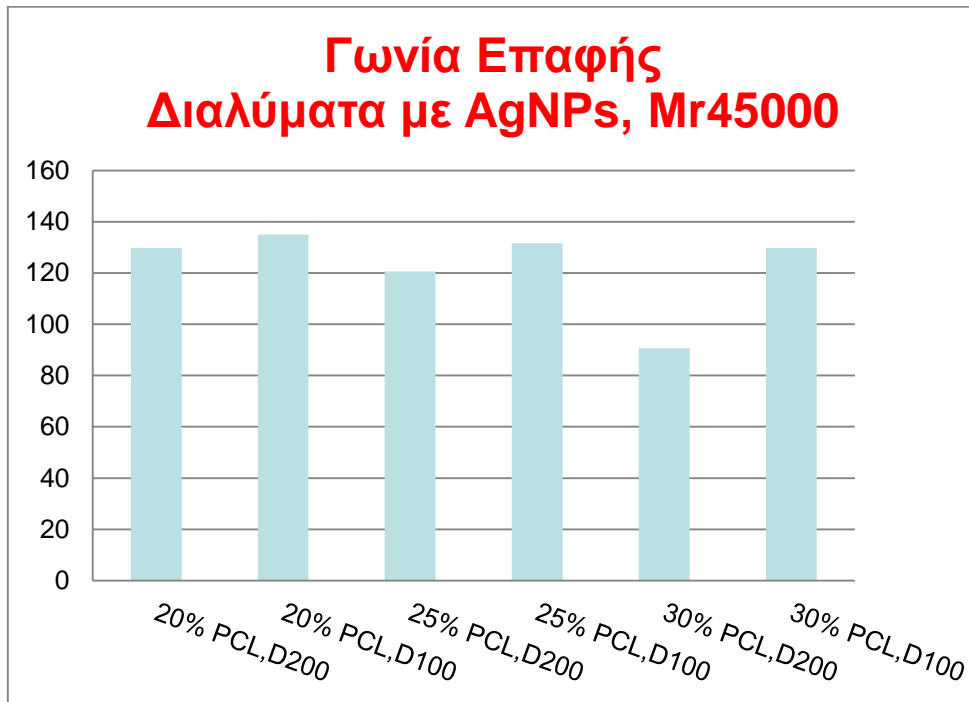
|                    |  |
|--------------------|--|
| 3%AgNPs in 20% PCL | <u>Substrate Si: (λίγες ίνες, η σταγόνα ήρθε σε επαφή με το υπόστρωμα)</u><br>Mean Contact Angle : 46,06± 0,25<br>volume : 5,015± 0,00<br>mean free energy $\gamma_{sv}$ : 55,79 |
| 3%AgNPs in 25% PCL | <u>Substrate Si:</u><br>Mean Contact Angle : 126,13± 0,04<br>volume : 5,14± 0,00<br>mean free energy $\gamma_{sv}$ : 8,032   |
| 3%AgNPs in 30% PCL | <u>Substrate Si: (λίγες ίνες, η σταγόνα ήρθε σε επαφή με το υπόστρωμα)</u><br>Mean Contact Angle : 51,05± 0,06<br>volume : 5,06 ± 0,00<br>mean free energy $\gamma_{sv}$ : 52,89 |

Συγκεντρώνοντας τα αποτελέσματα στα παρακάτω σχήματα (7.14 – 7.17), συσχετίζονται το διάλυμα με την αντίστοιχη γωνία επαφής, μόνο για τα διαλύματα που μας ενδιαφέρουν:

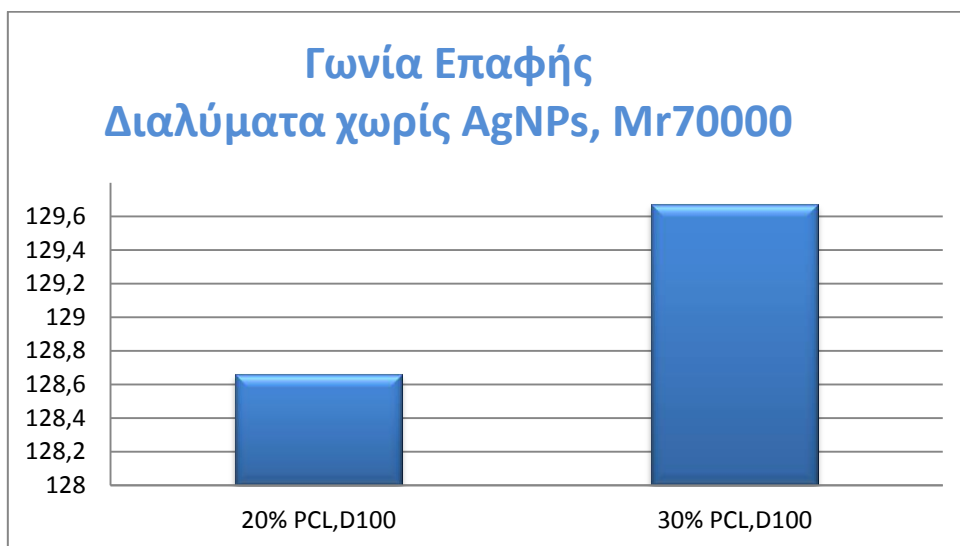
**Σχήμα 7.14** Μελέτη γωνίας Επαφής για διαλύματα χωρίς AgNPs, MW=45kDa



**Σχήμα 7.15** Μελέτη γωνίας επαφής διαλύματα με AgNPs, MW=45kDa

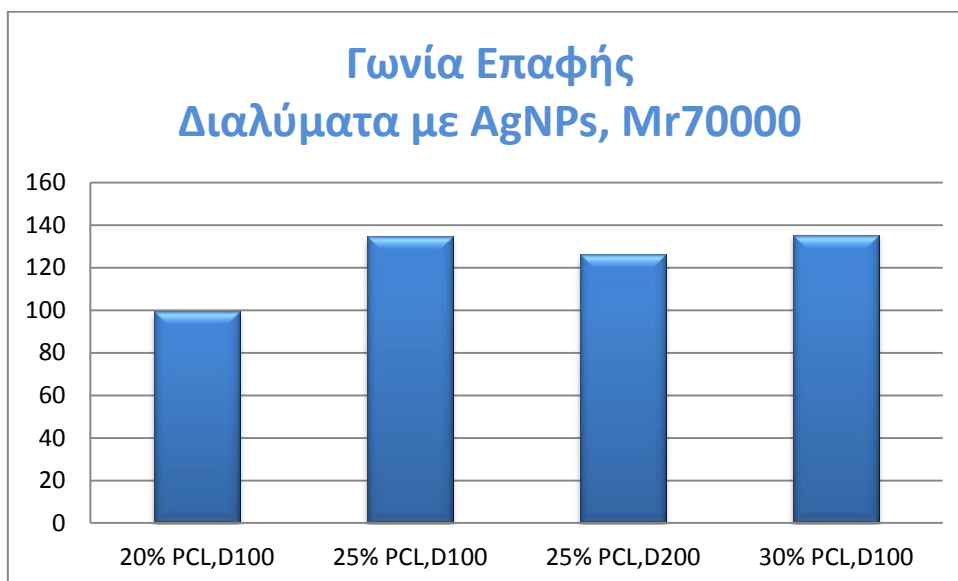


**Σχήμα 7.16** Μελέτη γωνίας επαφής διαλύματα χωρίς AgNPs, MW=70kDa



(Στο παραπάνω διάγραμμα συμπεριλάβαμε μόνο τις έγκυρες μετρήσεις)

**Σχήμα 7.17** Μελέτη γωνίας επαφής διαλύματα με AgNPs, MW=70kDa



(Στο παραπάνω διάγραμμα δεν συμπεριλήφθηκαν οι μετρήσεις για 20%PCL,D200 & 30%PCL,D200, καθώς οι ίνες ήταν πολύ αραιές και η σταγόνα ήρθε σε επαφή και με το υπόστρωμα.)

Όπως φαίνεται από τα παραπάνω,

- ✓ Όλα τα ικρίωματα της πολυκαπρολακτόνης παρουσιάζουν υδροφοβικότητα, με αύξησή της για μείωση της απόστασης βελόνας-συλλέκτη, και επομένως, με μεγαλύτερες τιμές υδροφοβικότητας στην ελάχιστη απόσταση D200,
- ✓ Η αύξηση της συγκέντρωσης του PCL, έχει ως συνέπεια την αύξηση της υδροφοβικότητας, και τέλος,
- ✓ Η ενσωμάτωση των Νανοσωματιδίων Αργύρου έχει ως συνέπεια την αλλαγή της επιφανειακής τραχύτητας των ικριωμάτων, και πιο συγκεκριμένα τα κάνει περισσότερο υδρόφοβα, κάτι που συμφωνεί με την βιβλιογραφία.<sup>26</sup>

Από την βιβλιογραφία,<sup>25</sup> γνωρίζουμε ότι με αύξηση της ελεύθερης επιφανειακής ενέργειας (δηλαδή μείωση της γωνίας επαφής) και ταυτόχρονη αύξηση της επιφανειακής τραχύτητας, υπάρχει μεγαλύτερη πιθανότητα της κυτταρικής προσκόλλησης, κάτι που εμφανίζεται στα ικρίωματα με συγκέντρωση πολυκαπρολακτόνης 25%, αλλά και από τα ικρίωματα με νανοσωματίδια στα ικρίωματα χωρίς. Επίσης, το ίδιο συμβαίνει και όταν μεταβαίνουμε από 25%PCL σε 30%PCL, όπως φαίνεται στον πίνακα 7.14.

**ΠΙΝΑΚΑΣ 7.14** PCL MW45kDa

| Διάλυμα                  | Γωνία Επαφής (Degrees) | Ελεύθερη Ενέργεια Επιφάνειας (N/cm <sup>2</sup> ) | Επιφανειακή τραχύτητα (nm) |
|--------------------------|------------------------|---|----------------------------|
| 3% AgNPs 20% in PCL,D200 | 129,78                 | 6,473658  | -                          |
| 3% AgNPs in 20% PCL,D100 | 134,92                 | 4,565517  | -                          |
| 3%AgNPs in 25% PCL,D200  | 120,56                 | 10,68046  | 368,108                    |
| 3% AgNPs in 25% PCL,D100 | 131,63                 | 5,778345  | 381,507                    |
| 3% AgNPs in 30% PCL,D200 | 90,66                  | 28,11693  | -                          |
| 3% AgNPs in 30% PCL,D100 | 129,72                 | 6,513041  | -                          |
| 20% PCL,D200             | 121.32                 | 10,29829  | -                          |
| 20% PCL,D100             | 135.87                 | 4,270189  | -                          |
| 25% PCL,D200             | 94.79                  | 25,52567  | 473,132                    |
| 25% PCL,D100             | 130.55                 | 6,186297  | 413,337                    |
| 30% PCL,D200             | 104.12                 | 19,82216  | 283,227                    |
| 30% PCL,D100             | 127.5                  | 7,429325  | 496,453                    |

## ΚΕΦΑΛΑΙΟ 8. Κυτταροσυμβατότητα Ικριωμάτων

Οι Επιφανειακές ιδιότητες των νανοσύνθετων ικριωμάτων αποτελούν βασικό παράγοντα για την επιτυχία της μηχανικής ιστών, όσον αφορά την προσκόλληση των κυττάρων.

Είναι γνωστό ότι τόσο οι χημικές όσο και τοπογραφικές ιδιότητες της επιφάνειας του υλικού μπορούν να επηρεάσουν την κυτταρική συμπεριφορά και μπορούν να ελέγξουν το κυτταρικό σχήμα, τη λειτουργικότητα και την κινητικότητα. Πρόσφατες μελέτες έχουν επισημάνει τους μηχανισμούς αναγνώρισης κυττάρου-επιφάνειας και έχουν δώσει αξιόπιστα στοιχεία για τη χρήση νέων υλικών τα οποία είναι σε θέση να καθοδηγήσουν και να ενεργοποιήσουν συγκεκριμένη συμπεριφορά των κυττάρων σε σχέση με τα βιοϋλικά. Ιδιαίτερα οι επιπτώσεις της μικρο - τοπογραφίας και, πιο πρόσφατα, η επίδραση της νανοτοπογραφίας στην κυτταρική βιολογία αποτελούν επίσης ένα κρίσιμο θέμα. Ο σχεδιασμός της νανοτοπογραφίας της επιφάνειας των βιοϋλικών για αναπτύξεις στην μηχανική ιστών έχει αποδειχθεί ότι ενισχύει τη διαφοροποίηση κυττάρων (progenitor cells) στο προγραμματισμένο μονοπάτι των κυτταρικών γραμμών τους (lineage pathway). Για αυτό το λόγο, έχουν γίνει προσπάθειες για να προσαρμοστούν η επιφάνεια των βιοϊατρικών συσκευών και των βιοϋλικών, να παρέχουν χημικές και φυσικές ουρές/cues για να γίνουν βιοσυμβατά με τους περιβάλλοντες ιστούς, ή για να καθοδηγούν τα κύτταρα να σχηματίσουν ιστό.

Η χημική τροποποίηση των επιφανειών των νανοσύνθετων ικριωμάτων είναι μια από τις επερχόμενες προσεγγίσεις που επιτρέπει την ενισχυμένη βιοσυμβατότητα, ενώ ταυτόχρονα παρέχει ένα όχημα μεταφοράς πρωτεϊνών. Ομοίως, η φυσική προσρόφηση, οι τροποποιήσεις που προκαλούνται από ακτινοβολία, το μόσχευμα/grafting, και οι πρωτεϊνικές τροποποιήσεις είναι άλλες μέθοδοι που έχουν επιτυχώς χρησιμοποιηθεί για μεταβολές των ιδιοτήτων της επιφάνειας του ικριώματος.

Είναι γνωστό ότι οι αλειφατικοί πολυεστέρες δεν παρέχουν ένα επιθυμητό περιβάλλον για την κυτταρική προσκόλληση, λόγω της έλλειψης των βιολογικών θέσεων αναγνώρισης και της εγγενούς υδροφοβικότητάς τους, σε σύγκριση με τη φυσική εξωκυττάρια μήτρα: δεν διαθέτουν λειτουργικές ομάδες για την προσκόλληση των βιολογικά δραστικών μορίων. Προκειμένου να χρησιμοποιηθεί ένα νανοσύνθετο από βιοαποικοδομήσιμο πολυεστέρα στη μηχανική ιστών,

πρέπει οι επιφάνειές τους να τροποποιηθούν χημικά και φυσικά με βιοδραστικά μόρια και ligands/προσδέτες κυτταρικά αναγνωρίσιμους μετά τη διαδικασία της επεξεργασίας. Αυτό παρέχει βιο-διαμορφωμένα ή βιομιμητικά μικροπεριβάλλοντα, κατάλληλα για την σύνδεση κύτταρων και ιστών.

Ως εκ τούτου, έχουν γίνει πολλές προσεγγίσεις για την τροποποίηση της επιφάνειας των βιοαποδομήσιμων πολυμερών ικρωμάτων προκειμένου να εισαγάγουν χρήσιμα επιφανειακά χαρακτηριστικά στο πολυμερές. Οι τεχνικές επεξεργασίας της επιφάνειας, όπως:

- plasma treatment,
- ion sputtering,
- oxidation &
- corona discharge,

επηρεάζουν τις χημικές και φυσικές ιδιότητες του στρώματος της επιφάνειας, χωρίς να μεταβάλλονται σημαντικά οι ιδιότητες του όγκου του υλικού/bulk material.

Χρησιμοποιώντας τις διεργασίες πλάσματος, είναι δυνατό να μεταβληθεί η χημική σύνθεση και οι ιδιότητες, όπως η διαβρεξιμότητα, η επιφανειακή ενέργεια, η προσκόλληση των μετάλλων/metal adhesion, ο δείκτης διάθλασης, η σκληρότητα, η χημική αδράνεια/chemical inertness και η βιοσυμβατότητα.

Οι τεχνικές πλάσματος μπορούν εύκολα να χρησιμοποιηθούν για να επάγουν τις επιθυμητές ομάδες ή αλυσίδες στην επιφάνεια ενός υλικού. Η επεξεργασία πλάσματος/plasma treatment των πολυμερικών υποστρωμάτων χρησιμοποιείται ευρέως, για να προσαρμόσει την πρόσφυση της επιφάνειας και τις ιδιότητες διαβροχής, αλλάζοντας τη χημική σύνθεση της επιφάνειας. Η κατάλληλη επιλογή της πηγής πλάσματος επιτρέπει την εισαγωγή ποικίλων λειτουργικών ομάδων στην επιθυμητή επιφάνεια, βελτιώνοντας τη βιοσυμβατότητα ή επιτρέποντας την επακόλουθη ομοιοπολική ακινητοποίηση των διαφόρων βιοδραστικών μορίων. Για παράδειγμα, τυπικές επεξεργασίες πλάσματος με οξυγόνο, αμμωνία, ή αέρα, μπορεί να δημιουργήσουν καρβοξυλομάδες ή αμινομάδες επί της επιφάνειας. Η επεξεργασία πλάσματος επηρεάζει τη χημεία της επιφάνειας του βιοαποικοδομήσιμου πολυμερούς, αλλά ταυτόχρονα εισάγει και σημαντικές αλλαγές στην τοπογραφία.

Υπάρχει μια ποικιλία από συστατικά πρωτεϊνών της εξωκυττάριας μήτρας όπως η ζελατίνη, το κολλαγόνο, η λαμινίνη, και η φμπρονεκτίνη που θα μπορούσαν να ακινητοποιηθούν επί της επιφάνειας που έχει επεξεργαστεί με πλάσμα για την ενίσχυση της κυτταρικής προσκόλλησης και τον πολλαπλασιασμό. Μία από τις μεθόδους της επιφανειακής τροποποίησης για τα βιοπολυμερή υποστρώματα, είναι η προσκόλληση των συστατικών της εξωκυττάριας μήτρας ή των συνθετικών παράγωγων πεπτιδίων τους, όπως η Arg-Gly-Asp (RGD), που είναι η πιο αποτελεσματική και συχνά χρησιμοποιούμενη πεπτιδική αλληλουχία για την διέγερση/ενεργοποίηση της κυτταρικής προσκόλλησης στην επιφάνεια του συνθετικού υλικού.

Εφόσον τα τρισδιάστατα ικρίσματα έχουν μεγαλύτερη επιφάνεια και υψηλά διασυνδεδεμένες πορώδης δομές με κατάλληλο πορώδες και μέγεθος πόρου, η τροποποίηση της επιφάνειας του ικρίσματος για τη βελτίωση της αλληλεπίδρασης μεταξύ των κυττάρων και της επιφάνειας του ικρίσματος έχει περισσότερες δυνατότητες στη μηχανική ιστών.<sup>22</sup>

Το σημαντικότερο ίσως σημείο της παρούσας διπλωματικής, εκτός από την βελτιστοποίηση των παραμέτρων της ηλεκτροστατικής ισοποίησης για την παραγωγή νανοϊνώδων ικριωμάτων πολυκαπρολακτόνης, είναι η μελέτη της συμπεριφοράς των κυττάρων στα ικρίσματα που δημιουργήσαμε, καθώς στόχος μας είναι η μελλοντική εφαρμογή τους σε ιατρικά εμφυτεύματα για την πρόωση της ιστικής αναγέννησης. Αρχικά καλλιεργήθηκαν ινοβλάστες ποντικού (κυτταρική σειρά L929) 1 και 3 ημέρες, και στη συνέχεια χονδροβλάστες ανθρώπου 1, 3 και 7 ημέρες.

Τα ικρίσματα που επιλέχθηκαν είναι, όπως έχει προαναφερθεί, εκείνα που αναπτύχθηκαν σε απόσταση βελόνας-συλλέκτη D200 & D100 (5 & 15 cm αντίστοιχα), με διαλύτη χλωροφόρμιο/μεθανόλη (σε αναλογία 3:1), σε συγκεντρώσεις πολυκαπρολακτόνης 20%, 25% και 30%, με ή χωρίς νανοσωματίδια αργύρου (3% AgNPs), για δυο μοριακά βάρη του πολυμερούς, 45000 και 70000 Da και για μοτίβο κίνησης του συλλέκτη (pattern) το Bio\_Spirral.

Η κυτταρική σειρά L929 (:ινοβλάστες ποντικού που προέρχονται από τον υποδώριο λιπώδη ιστό), ανήκει στην κατηγορία των immortalized cell lines, δηλαδή κυττάρων που δεν επέρχονται στην φυσιολογική κυτταρική γήρανση λόγω μετάλλαξης, και μπορούν να υποβάλλονται σε κυτταρική διαίρεση για παρατεταμένες χρονικές περιόδους in vitro. Η αθανασία τους προκαλείται είτε φυσικά είτε από επιστήμονες για πειραματικούς σκοπούς.

Η λειτουργία των ινοβλαστών συνίσταται στη σύνθεση και έκκριση της άμορφης θεμέλιας ουσίας και, όπως το όνομά τους υπονοεί, των ινών του συνδετικού ιστού, περιλαμβανομένου του κολλαγόνου, των ελαστικών και δικτυωτών ινών της εξωκυττάριας ουσίας. Οι ινοβλάστες είναι ωοειδή ή αστεροειδή κύτταρα με μακριές, λεπτές αποφυάδες οι οποίες φέρουν διακλαδώσεις.



## 8.1 Πρωτόκολλο Υποκαλλιέργειας (sub-culturing) L929 Κυττάρων και Ανθρώπινων Χονδροκυττάρων

✓ Αρχικά καθαρίζεται ο χώρος εργασίας και όλα τα αντικείμενα που θα χρησιμοποιηθούν με αιθανόλη 70%.

✓ Στη συνέχεια, τοποθετούνται όλα τα αναλώσιμα για περίπου μισή ώρα κάτω από υπεριώδη ακτινοβολία UV για απολύμανσή τους, στον θάλαμο νηματικής ροής του εργαστηρίου με UV : PV-30/70, Telstar Technologies S.L. (Σχήμα 8.1) Τα διαλύματα που χρησιμοποιούνται είναι αποστειρωμένα και ευαίσθητα σε πιθανή μόλυνση, γι' αυτό και αυτό το βήμα είναι πολύ σημαντικό.

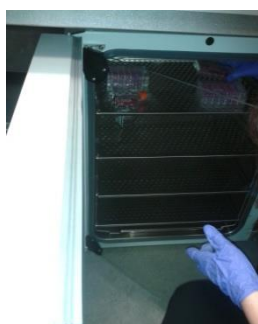
**Σχήμα 8.1** Θάλαμος Νηματικής ροής UV



Ο θάλαμος επώασης (incubator) των κυττάρων που

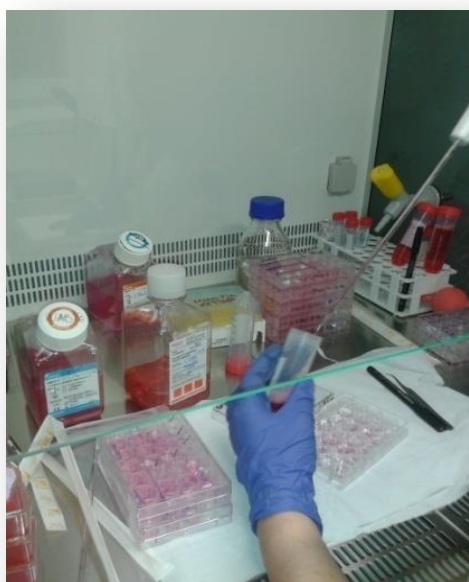
χρησιμοποιήθηκε για την σωστή ανάπτυξή τους, είναι ο (Galaxy 170S, New Brunswick) σε συνθήκες 37 °C και 5% CO<sub>2</sub> (σχήμα 8.2).

**Σχήμα 8.2** Θάλαμος επώασης κυττάρων



Για την φυγοκέντριση και τη λήψη του κυτταρικού ιζήματος χρησιμοποιήθηκε η φυγόκεντρος Universal 320, Hettich (σχήμα 8.3).

**Σχήμα 8.3** Φυγόκεντρος



**Σχήμα 8.4** Φιάσκες, τριβλία, τροφικό διάλυμα, πηγαδάκια, σε αποστειρωμένο χώρο

✓ Τα κύτταρα L929 / Ανθρώπινα Χονδροκύτταρα, καλλιεργούνται είτε σε φλάσκες (flasks) με βιδωτό πώμα χωρητικότητας 50 mL (25 cm<sup>2</sup>), είτε σε τριβλία Petri (Petri dishes) διαμέτρου 90 mm με αεριζόμενο καπάκι από πολυ(στυρένιο). Αυτό εξαρτάται από την ποσότητα των κυττάρων που απαιτείται για το κάθε πείραμα. Η φλάσκα όταν καλυφθεί πλήρως με κύτταρα έχει περίπου 1.500.000-2.000.000 αριθμό κυττάρων, ενώ αντίστοιχα το τριβλίο περίπου 2.500.000-3.000.000 κύτταρα. (Σχήμα 8.4)

Στον παρακάτω πίνακα (Πίνακας 8.1) συγκεντρώνονται τα υλικά και τα αντιδραστήρια που χρησιμοποιήθηκαν:

**ΠΙΝΑΚΑΣ 8.1 Αντιδραστήρια καλλιέργειας κυττάρων**

| Υλικά   | Αντιδραστήρια   |
|---|---|
| Φυγόκεντροι σωλήνες των 15ml ή 50ml               | Θρεπτικό κυτταρικό διάλυμα (τροφικό διάλυμα) με δείκτη pH: DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium) ή MED199 (Medium199) |
| Τίπς για πιπέτα των 200μl και 1000μl              | 5% FBS (Fetal Bovine Serum) 1% P/S (μίγμα αντιβιοτικών πενικιλίνης/στρεπτομυκίνης)                                      |
| Σωλήνες μιας χρήσης για τροφικό διάλυμα των 10 ml | Τρυψίνη (trypsin) 0,25%   |
|   | PBS (Phosphate buffered saline): Φυσιολογικός ορός  |

✓ Αφού καλλιεργηθούν τα κύτταρα στις φλάσκες/τριβλία, αφαιρείται το τροφικό διάλυμα και τα κύτταρα που δεν είναι προσκολλημένα στην επιφάνεια της φλάσκας/ή του τριβλίου. (Οι ινοβλάστες & τα ανθρώπινα χονδροκύτταρα, είναι cell monolayers και όταν καλύψουν την

επιφάνεια, αυτά που περισσεύουν πεθαίνουν, αλλάζοντας το ΡΗ του κυτταρικού διαλύματος, γι'αυτό πρέπει να είμαστε προσεκτικοί και να παρακολουθούμε στο οπτικό μικροσκόπιο την ανάπτυξή τους.)

✓ Αφού αφαιρεθεί το τροφικό διάλυμα με τα κύτταρα που δεν ήταν προσκολλημένα, 'ξεπλένουμε' ανακινώντας πολύ προσεκτικά, (έτσι ώστε να μην ξεκολλήσουν τα κύτταρα), με PBS (είναι ουσιαστικά το τροφικό διάλυμα χωρίς τις πρωτεΐνες). Για την κάλυψη του πάτου της φλάσκας συνήθως απαιτείται 1ml ενώ για το τριβλίο 2ml.

✓ Στη συνέχεια προστίθεται τρυψίνη (ένζυμο που βοηθάει την αποκόλληση των κυττάρων) 0,25% (αραιωμένη σε διάλυμα PBS), και τοποθετούμε τη φλάσκα/τριβλίο στον θάλαμο επώασης για περίπου 10 λεπτά. Για τη φλάσκα χρησιμοποιούνται 2 ml τρυψίνης, ενώ για το τριβλίο 3ml.

✓ Αφού περάσει αυτό το χρονικό διάστημα, προστίθεται θρεπτικό υλικό στη φλάσκα / τριβλίο, ποσότητας ίσης με αυτή της τρυψίνης, έτσι ώστε να εξουδετερωθεί η τρυψίνη και τα κύτταρα να μην νεκρωθούν. Το θρεπτικό υλικό που χρησιμοποιήθηκε είναι είτε το DMEM (5% FBS, 1%A/B), είτε το MED199 (5% FBS, 1%A/B).

✓ Τώρα πλέον τα κύτταρα έχουν αποκολληθεί από την επιφάνεια της φλάσκας/τριβλίου, οπότε μεταγγίζεται το ολικό διάλυμα σε φυγόκεντρο σωλήνα και φυγοκεντρείται για 5min στις 3000rpm, ώστε να μαζευτούν ως ίζημα τα κύτταρα στον πάτο του σωλήνα φυγοκέντρησης.

✓ Αφαιρείται το υπερκείμενο διάλυμα και προστίθεται 1ml θρεπτικό υλικό.

✓ Για να διασπαστεί το ίζημα των κυττάρων αναρροφάται με την πιπέτα.

✓ Στη συνέχεια προστίθεται νέο θρεπτικό υλικό στις καινούργιες φλάσκες/τριβλία (10 ml σε φλάσκες, 12 ml σε τριβλία) και προστίθεται η ποσότητα του κυτταρικού διαλύματος που προήλθε από την κυτταροκαλλιέργεια. Η ποσότητα του κυτταρικού διαλύματος που προστίθεται σε κάθε νέα φλάσκα / τριβλίο, εξαρτάται από τον επόμενο πειραματικό προγραμματισμό (συνήθως 150-300  $\mu$ L).

## 8.2 Πρωτόκολλο της Βιοχημικής Μεθόδου για την εκτίμηση της Κυτταροτοξικότητας – MTT και αποτελέσματα πειραματικής μεθόδου



Σχήμα 8.5 Φωτόμετρο ELISA

Η τεχνική MTT είναι μια φθηνή, ακριβής, ταχεία μέθοδος, που μπορεί να μελετήσει όλα τα είδη των κυττάρων, χωρίς την χρήση ραδιοϊσοτόπων. Βασίζεται στην ιδιότητα των μεταβολικά ενεργών κυττάρων να ανάγουν ένα άλας τετραζολίου κίτρινου χρώματος, το (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium bromide) με τη βοήθεια του μιτοχονδριακού ενζύμου ηλεκτρική αφυδρογονάση (succinic dehydrogenase), με αποτέλεσμα να παράγονται ως προϊόν ιώδεις

κρύσταλλοι. Οι κρύσταλλοι αυτοί είναι δυνατό να διαλυτοποιηθούν με τη βοήθεια κατάλληλων οργανικών διαλυτών (π.χ. ισοπροπανόλη, DMSO dimethylsulphoxide) και να προσδιοριστεί στη συνέχεια φασματοφωτομετρικά (οπτική απορρόφηση) η έκταση της αντίδρασης: όσο μεγαλύτερος είναι ο αριθμός των ζωντανών κυττάρων τόσο πιο έντονος είναι ο σχηματισμός των κρυστάλλων τετραζολίου και τόσο μεγαλύτερη οπτική απορρόφηση καταγράφεται σε μήκος κύματος από 570-630 nm (Σχήμα 8.5). Επομένως η τεχνική ανάλυσης MTT αντανακλά άμεσα τη μιτοχονδριακή δραστηριότητα και κατ' επέκταση τη ζωτικότητα (viability) και το ρυθμό αύξησης (growth rate) ενός κυτταρικού πληθυσμού .

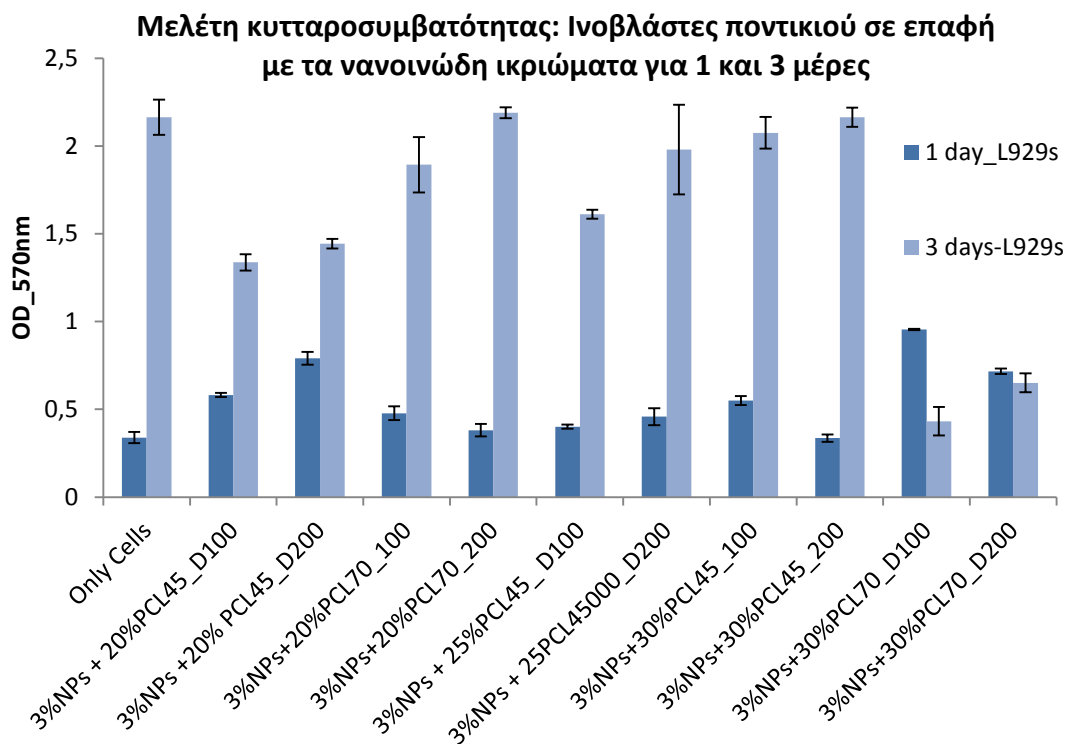
Για το MTT test χρησιμοποιήθηκαν μικροπλακίδια με 96 πηγαδάκια που είναι κατάλληλα για κυτταροκαλλιέργειες, PBS, τροφικό διάλυμα DMEM ή MED199 (1%A/B 5%FBS), διάλυμα MTT 10X της εταιρίας Sigma και διάλυμα ισοπροπανόλης.

Τα βήματα που ακολουθήθηκαν για την μελέτη της κυτταροτοξικότητας, έχουν ως εξής:

- ✓ Αρχικά καλλιεργήθηκαν με τη μέθοδο που περιγράφηκε παραπάνω, η κυτταρική σειρά L929 για την λήψη του κυτταρικού ιζήματος.
- ✓ Στη συνέχεια προστέθηκε 1ml τροφικό διάλυμα και μετά αραιώθηκε το κυτταρικό διάλυμα με τροφικό διάλυμα, προσθέτοντας ποσότητα ανάλογη με τον αριθμό των δειγμάτων. Υπολογισμός της κυτταρικής συγκέντρωσης με αιμοκυτταρόμετρο Neubauer (περίπου 50000 κύτταρα σε κάθε πηγαδάκι).

- ✓ Τοποθετήθηκαν τα ικρίσματα/δείγματα σε UV για περίπου μισή ώρα και μετά σε καθαρά well-plates.
- ✓ Κατόπιν, προστέθηκε τροφικό διάλυμα περίπου 0,5ml, για να αποκτήσει το δείγμα ίδιο περιβάλλον με αυτό του κυττάρου, για περίπου 10 λεπτά, μετά το αφαιρούμε και προσθέτουμε την κατάλληλη ποσότητα του κυτταρικού διαλύματος που έχουμε καλλιεργήσει.
- ✓ Τοποθετήθηκαν τα well-plates στον θάλαμο επώασης σε θερμοκρασία 37°C και με συγκέντρωση CO<sub>2</sub> 5% για περίπου μισή ώρα.
- ✓ Προστέθηκε 1ml τροφικό διάλυμα σε κάθε δείγμα και τοποθετήθηκε στο θάλαμο επώασης για τις χρονικές περιόδους που επιλέχθηκαν για το πείραμά μας.
- ✓ Αφαιρέθηκε το κυτταρικό διάλυμα και προστέθηκε 0,5ml PBS σε κάθε πηγαδάκι.
- ✓ Προστέθηκε η κατάλληλη ποσότητα MTT σε κάθε πηγαδάκι, όπου για το διάλυμα MTT ισχύει : 5mg/ml, όπου το MTT διαλύεται σε ίσα μέρη PBS/τροφικού διαλύματος.
- ✓ Τοποθετήθηκαν τα δείγματα στον θάλαμο επώασης για 3 ώρες.
- ✓ Αφαιρέθηκε το διάλυμα MTT και προστέθηκε ισοπροπανόλη, που προκαλεί αλλαγή στο χρώμα του διαλύματος από κίτρινο σε μοβ! Εδώ να επισημάνουμε ότι πρέπει να χρησιμοποιηθούν well-plates κατάλληλα για ανάγνωση από το φασματοφωτόμετρο ELISA, (Σχήμα 8.5). Τοποθετούνται στο θάλαμο επώασης για 10 λεπτά και στη συνέχεια στο ψυγείο.
- ✓ Μετράμε σε δυο διαφορετικά μήκη κύματος: 570 nm και 630nm (reference) με το φασματοφωτόμετρο ELISA-READER. Η ένταση του παραγόμενου χρώματος είναι ανάλογη με την βιωσιμότητα των κυττάρων και αντιστρόφως ανάλογη με την τοξικότητα του υλικού.

Στο παρακάτω διάγραμμα (Διάγραμμα 8.1) παρατίθενται τα αποτελέσματα της κυτταροτοξικότητας για τους ινοβλάστες ποντικίου, για 1 και 3 ημέρες καλλιέργειας:



**Διάγραμμα 8.1** Κυτταροτοξικότητα ινοβλαστών ποντικού για 1 & 3 ημέρες καλλιέργειας

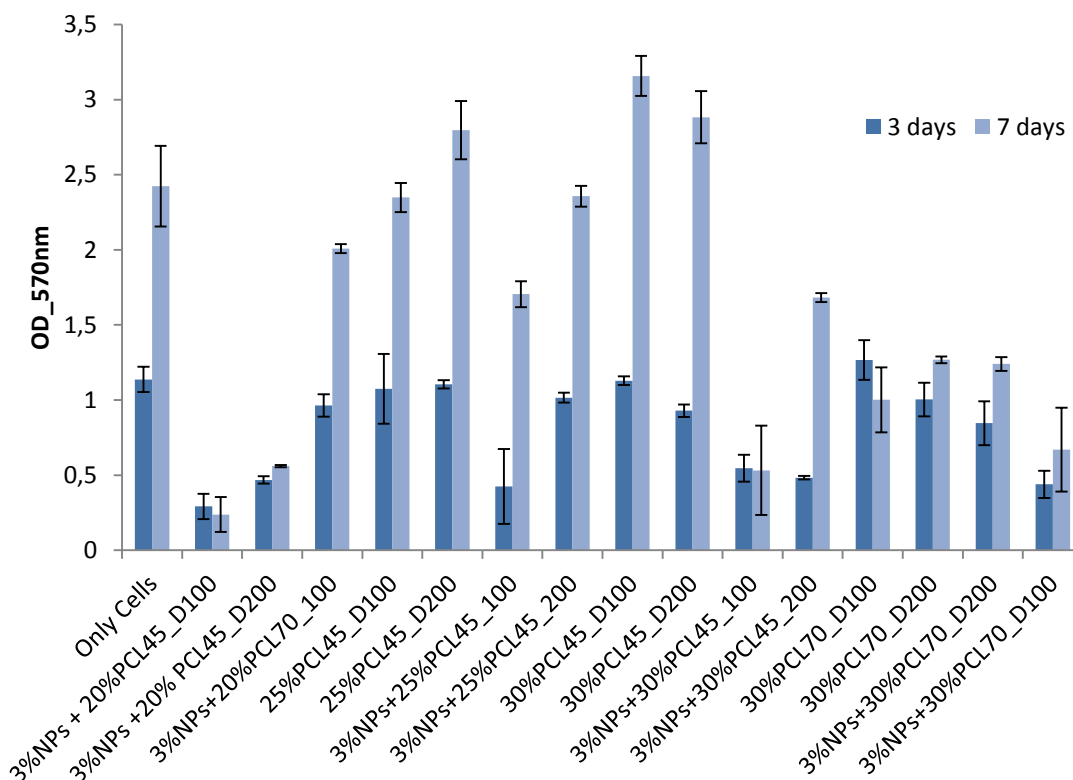
Ο κύριος στόχος της παραπάνω μελέτης ήταν η βελτιστοποίηση των κυτταρικών συνθηκών για τη κατάλληλη εκτίμηση της κυτταρικής συμβατότητας των ικριωμάτων που αναπτύχθηκαν. Οι κυτταρικές συνθήκες που μελετήθηκαν ήταν η χρονική διάρκεια των κυττάρων με τα ικρίσματα για τη ποσοτική μελέτη (με MTT τεστ) και της ποιοτικής εκτίμησης (μέσω SEM). Στη πρώτη μελέτη που έγινε χρησιμοποιήθηκαν ινοβλάστες ποντικού για 1 και 3 μέρες για τις ομάδες των ικριωμάτων με νανοσωματίδια αργύρου και εκτιμήθηκε αν η παρουσία αργύρου προκαλεί κυτταροτοξικότητα, και αν υπάρχει προσκόλληση κυττάρων στα ικρίσματα. Επίσης δόθηκε σημασία και στην επίδραση της διαμέτρου των ινών στη κυτταροσυμβατότητα των ικριωμάτων. Στο παραπάνω διάγραμμα (διάγραμμα 8.1) παρατηρείται ότι κατά τη διάρκεια της 1 μέρας κανένα από τα ικρίσματα δεν παρουσίασε τοξικότητα σε σύγκριση πάντοτε με το control group. Ωστόσο παρατηρήθηκε κυτταροτοξικότητα στις 3 μέρες για τις περισσότερες ομάδες των ικριωμάτων σε σύγκριση με την ομάδα του control. Συγκεκριμένα μόνο τα ικρίσματα στην απόσταση D200 και συγκέντρωση 25% και 30% PCL ήταν κυτταροσυμβατά στις 3 μέρες, όλα τα υπόλοιπα ικρίσματα παρουσίασαν τοξικότητα. Επίσης παρατηρήθηκε ότι η απόσταση από το γειωμένο συλλέκτη (substrate) παίζει ρόλο στην κυτταροσυμβατότητα όπως αποδεικνύεται στο διάγραμμα, όπου τα

ικριώματα που αναπτύχθηκαν σε απόσταση D200 (5εκ η σύριγγα από το γειωμένο πιάτο) είχαν μεγαλύτερη διάμετρο ιών και παρουσίασαν μεγαλύτερη κυτταροσυμβατότητα. Η αύξηση της συγκέντρωσης του PCL στα ικριώματα είχε επίδραση στην κυτταροσυμβατότητα των ικριωμάτων, και κυρίως για τη 30% PCL συγκέντρωση. Το MW του PCL δεν φάνηκε να επηρεάζει τη κυτταροσυμβατότητα των ικριωμάτων σύμφωνα με το διάγραμμα; αυτό όμως που παρατηρήθηκε είναι ότι για το PCL με MW70, αυξάνοντας τη συγκέντρωση μειώθηκε η κυτταροσυμβατότητα των ικριωμάτων. Η συγκέντρωση του Αργύρου ήταν σταθερή για όλα τα ικριώματα και αποδείχτηκε ότι έχει επίδραση στην κυτταροσυμβατότητα των ικριωμάτων για τις 3 μέρες.

Η SEM απεικόνιση των ομάδων των ικριωμάτων με άργυρο για τις 1 και 3 μέρες δεν απέδωσε κάποια συμπεράσματα όπως παρατίθεται παρακάτω στον Πίνακα 8.2. Δεν είναι εμφανή η κυτταρική προσκόλληση και απεικόνιση των ινοβλαστών για αυτές τις ομάδες των ικριωμάτων. Επομένως αποφασίστηκε ότι η χρονική διάρκεια της 1 μέρας δεν μπορεί να δώσει αποτελέσματα σχετικά με τη κυτταρική προσκόλληση και πολλαπλασιασμό των ικριωμάτων.

Στη συνέχεια,(διάγραμμα 8.2), παραθέτουμε τα αποτελέσματα κυτταροσυμβατότητας για τα ανθρώπινα χονδροκύτταρα, για 3 & 7 ημέρες ανάπτυξης στα ικριώματά μας:

**Μελέτη κυτταροσυμβατότητας: Ανθρώπινα Χονδροκύτταρα  
σε επαφή με τα νανοϊνώδη ικρίωματα για 3 και 7 μερες**



**Διάγραμμα 8.2** Κυτταροσυμβατότητα ανθρώπινων χονδροκυττάρων για 3 & 7 ημέρες ανάπτυξης

Οι κύριοι στόχοι αυτής της μελέτης αφορούσαν την επίδραση του Αργύρου στην τοξικότητα, την επίδραση της συγκέντρωσης και του MW του PCL, και η απόσταση κατά τη διάρκεια του ηλεκτροστατικού ψεκασμού στην κυτταροσυμβατότητα των ικριωμάτων ως προς τα ανθρώπινα χονδροκύτταρα. Καταρχήν παρατηρήθηκε στο Διάγραμμα 8.2 αύξηση της κυτταροσυμβατότητας των ικριωμάτων από τις 3 στις 7 μέρες. Η προσθήκη του αργύρου είχε ως αποτέλεσμα τη μείωση της κυτταροσυμβατότητας σε όλα τα ικρίωματα και στις 3 αλλά και στις 7 μέρες, με μεγαλύτερη μείωση να παρατηρείται για τη μεγαλύτερη συγκέντρωση PCL, 30%. Επίσης ήταν ενδιαφέρον να παρατηρήσουμε ότι αυξάνοντας τη συγκέντρωση του PCL για το MW 45kDa αυξανόταν και η κυτταροσυμβατότητα τους. Για το MW 70kDa και με την αύξηση της συγκέντρωσης του PCL παρατηρήθηκε μείωση της κυτταροσυμβατότητας. Επίσης παρατηρήθηκε ότι η απόσταση από το γειωμένο πιάτο (substrate) έπαιξε και σε αυτή τη μελέτη ρόλο στην κυτταροσυμβατότητα όπως αποδεικνύεται στο διάγραμμα 8.2, όπου τα ικρίωματα που αναπτύχθηκαν σε απόσταση D200 (5εκ



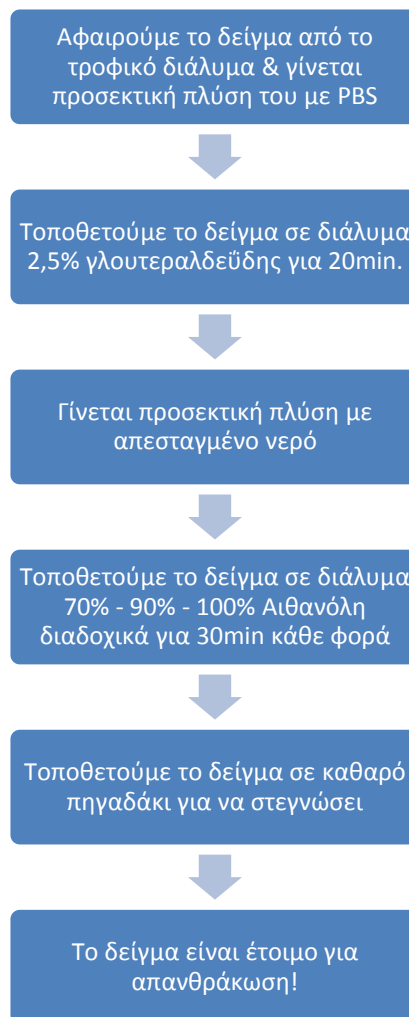
η σύριγγα από το γειωμένο πιάτο) ανεξαρτήτου συγκέντρωσης παρουσίασαν μεγαλύτερη κυτταροσυμβατότητα.

### 8.3 Σταθεροποίηση των ικριωμάτων με κύτταρα, για μελέτη τους με SEM

Για να μπορέσουμε να έχουμε εικόνα της ανάπτυξης των κυττάρων στα ικριώματά μας, στις 1,3 και 7 ημέρες, μέσω SEM, θα πρέπει να τα επεξεργαστούμε, έτσι ώστε να μην επηρεαστούν από τις συνθήκες κενού που δημιουργούνται κατά την παρατήρηση με SEM. Πιο συγκεκριμένα, τα βιολογικά δείγματα, όπως κύτταρα και ιστοί, ή συστατικά ιστού, πρέπει πρώτα να σταθεροποιηθούν, προκειμένου να διατηρήσουν την αρχική τους κατάσταση. Για τα κύτταρα L929 χρησιμοποιήθηκε η χημική μέθοδος σταθεροποίησης με **γλουτεραλδεΐδη** και διαφορετικές συγκεντρώσεις αιθανόλης (σε αποσταγμένο νερό). Η γλουτεραλδεΐδη (gluteraldehyde) έχει την ικανότητα να νεκρώνει τα κύτταρα άμεσα κάνοντας cross-linking στις πρωτεΐνες του κυττάρου. Η ολοκλήρωση της διαδικασίας σταθεροποίησης (SEM - fixation) πετυχαίνεται με σταδιακή αφυδάτωση του δείγματος (gradually dehydration) με τη χρήση διαφορετικών συγκεντρώσεων αιθανόλης ή ακετόνης.

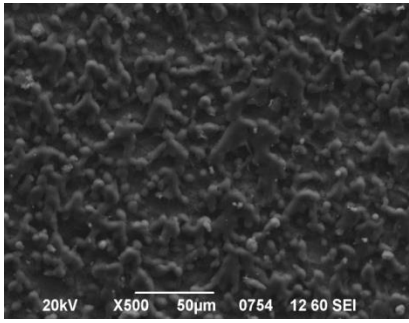
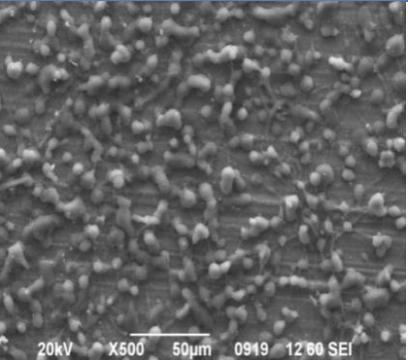
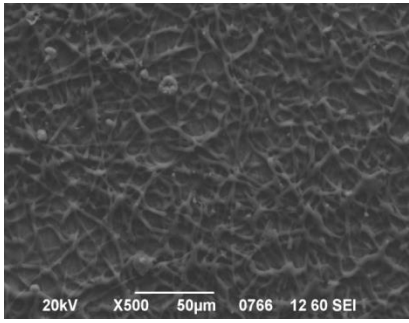
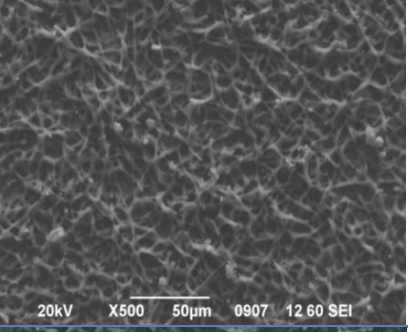
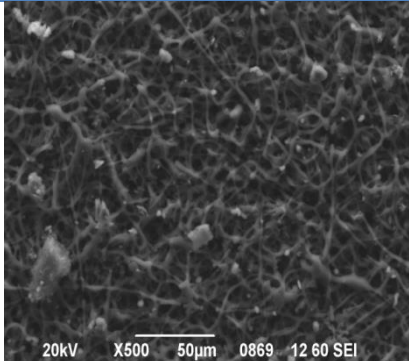
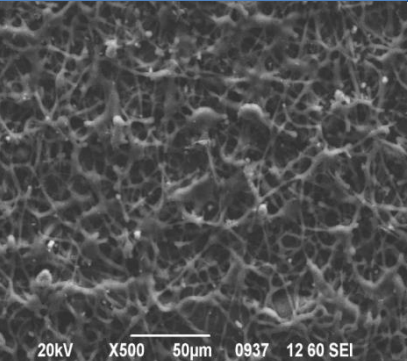
Για να σταθεροποιήσουμε το δείγμα, ενεργούμε ως εξής:

(Το διάλυμα γλουτεραλδεΐδης που χρησιμοποιείται, σύμφωνα με το πρωτόκολλο, πρέπει να είναι 2.5%. Το αρχικό διάλυμα που διαθέτουμε είναι 25% και συνεπώς παρασκευάζεται ο συνολικός όγκος διαλύματος που θα χρησιμοποιηθεί για την πειραματική διαδικασία με αρραίωση (1:10) του αρχικού διαλύματος σε PBS.)



Στον παρακάτω πίνακα (8.2) βλέπουμε τα αποτελέσματα των εικόνων SEM, της επαφής των ινοβλαστών με τα ικρίωμάτα μας.

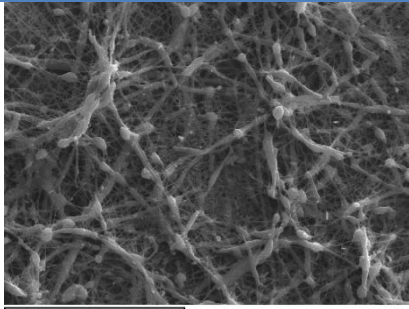
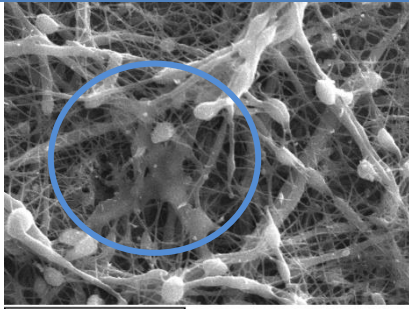
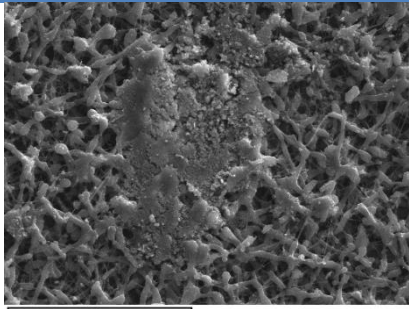
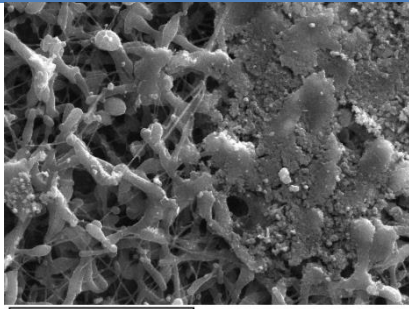
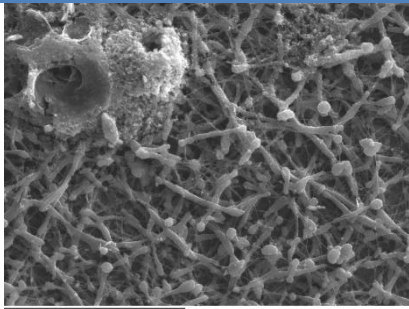
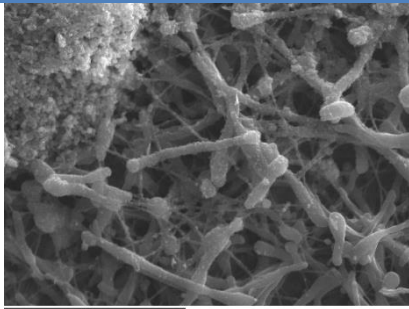
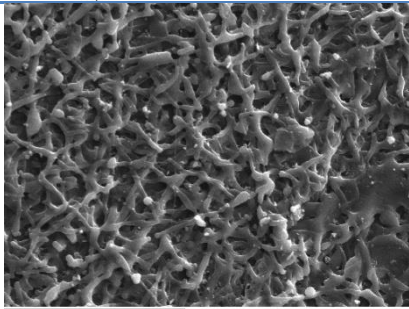
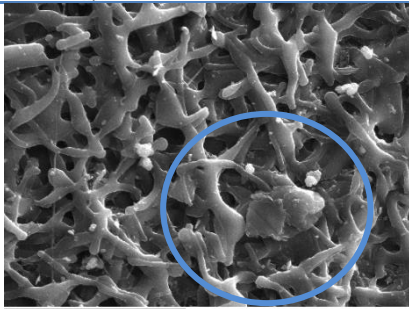
**ΠΙΝΑΚΑΣ 8.2** Εικόνες SEM κυτταρικής καλλιέργειας της σειράς L929 (ινοβλάστες ποντικού), σε ικρίωματα PCL για 1 και 3 ημέρα ανάπτυξης,  $MW_{PCL} = 45kDa$

| 1 <sup>η</sup> μέρα ανάπτυξης<br>Μεγέθυνση x 500                                    | 3 <sup>η</sup> μέρα ανάπτυξης<br>Μεγέθυνση x500                                      | ΙΚρίωμα   |
|---|--|---|
|    |    | 3% Ag NPs in 20% PCL<br>in<br>Chloroform/Methanol<br>D200 |
|   |   | 3% Ag NPs in 25% PCL<br>in<br>Chloroform/Methanol<br>D200 |
|  |  | 3% Ag NPs in 30% PCL<br>in<br>Chloroform/Methanol<br>D200 |

Αφού έγινε η μελέτη της κυτταροτοξικότητας των ικριωμάτων μας για τη σειρά L929, καλλιεργήσαμε στα ικρίωματα και ανθρώπινα χονδροκύτταρα ακριβώς με την ίδια διαδικασία που ακολουθήθηκε για τους ινοβλάστες.

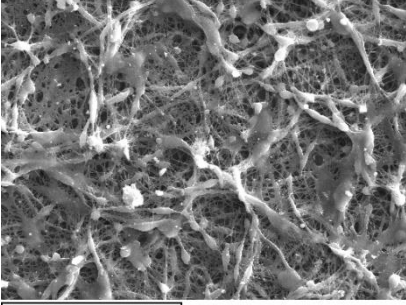
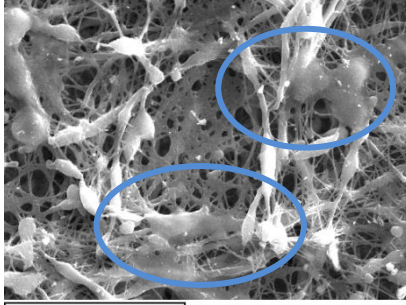
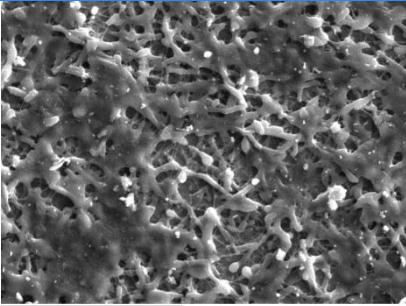
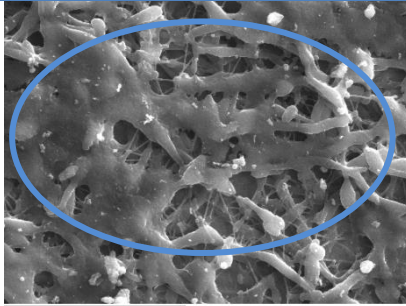
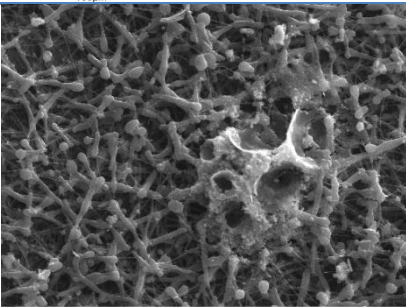
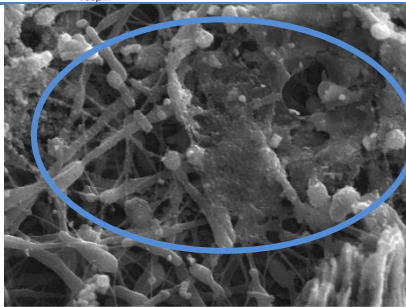
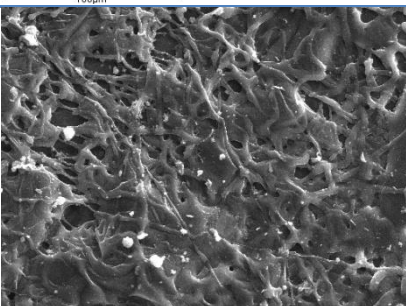
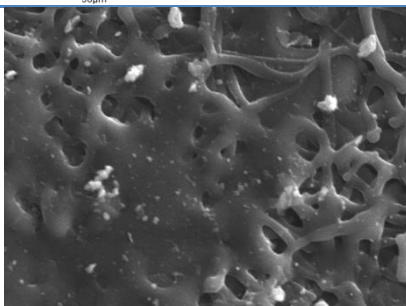
Στους παρακάτω πίνακες (8.3-8.4) φαίνονται τα αποτελέσματα των εικόνων SEM από τα ικρίωματα με Νανοσωματίδια Αργύρου, για 25% και 30%, στα οποία αναπτύχθηκαν ανθρώπινα χονδροκύτταρα, για μοριακό βάρος της Πολυκαπρολακτόνης 45000.

**ΠΙΝΑΚΑΣ 8.3** Εικόνες SEM κυτταρικής καλλιέργειας Ανθρώπινων Χονδροκυττάρων σε ικρίωματα PCL με AgNPs, για 3 ημέρες ανάπτυξης,  $MW_{PCL} = 45kDa$  και σε μπλε κύκλο παρουσιάζεται η κυτταρική προσκόλληση.

| Μεγέθυνση x 500   | Μεγέθυνση x 1000  | Ικρίωμα   |
|---|---|---|
|    |    | 3% AgNPs in 25% PCL in Chloroform/Methanol D100 |
|   |   | 3% AgNPs in 25% PCL in Chloroform/Methanol D200 |
|  |  | 3% AgNPs in 30% PCL in Chloroform/Methanol D100 |
|  |  | 3% AgNPs in 30% PCL in Chloroform/Methanol D200 |



**ΠΙΝΑΚΑΣ 8.4** Εικόνες SEM κυτταρικής καλλιέργειας Ανθρώπινων Χονδροκυττάρων σε ικρίωματα PCL με AgNPs, για 7 ημέρες ανάπτυξης,  $M_{rPCL} = 45kDa$  και σε μπλε κύκλο παρουσιάζεται η κυτταρική προσκόλληση.

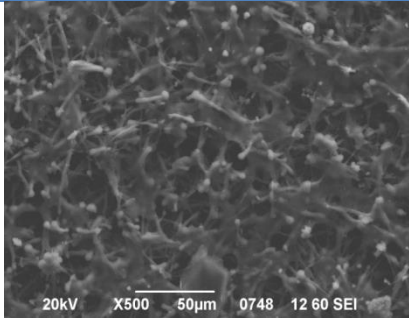
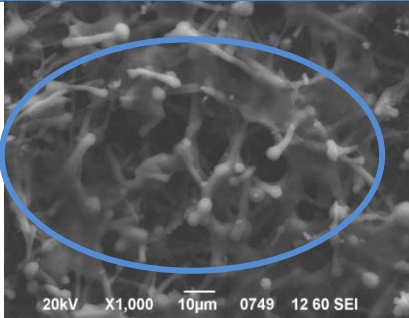
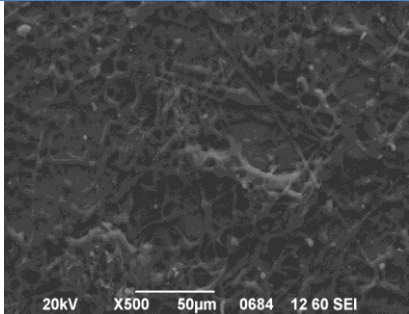
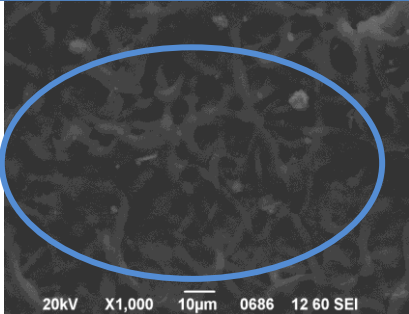
| Μεγέθυνση x 500   | Μεγέθυνση x 1000  | Ικρίωμα   |
|---|---|---|
|    |    | 3% AgNPs in 25% PCL in Chloroform/Methanol D100 |
|   |   | 3% AgNPs in 25% PCL in Chloroform/Methanol D200 |
|  |  | 3% AgNPs in 30% PCL in Chloroform/Methanol D100 |
|  |  | 3% AgNPs in 30% PCL in Chloroform/Methanol D200 |

Στους παρακάτω πίνακες (8.5-8.8) φαίνονται τα αποτελέσματα των εικόνων SEM από τα ικρίωματα χωρίς Νανοσωματίδια Αργύρου, για 25% και 30%, στα οποία αναπτύχθηκαν ανθρώπινα χονδροκύτταρα, για μοριακό βάρος της Πολυκαπρολακτόνης 45000:

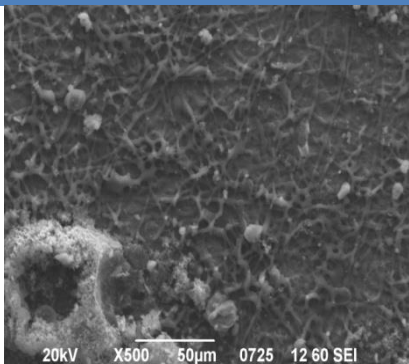
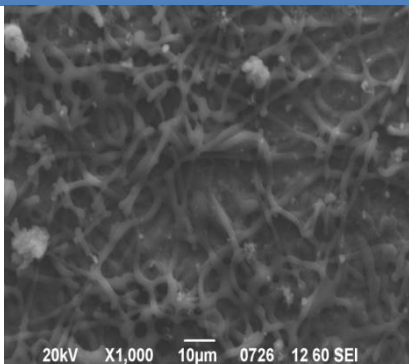
**ΠΙΝΑΚΑΣ 8.5** Εικόνες SEM κυτταρικής καλλιέργειας Ανθρώπινων Χονδροκυττάρων σε ικρίωματα PCL χωρίς AgNPs, για 3 ημέρες ανάπτυξης,  $MW_{PCL} = 45kDa$  και σε μπλε κύκλο παρουσιάζεται η κυτταρική προσκόλληση.

| Μεγέθυνση x 500 | Μεγέθυνση x 1000 | Ικρίωμα   |
|-----------------|------------------|---|
|                 |                  | 25% PCL in Chloroform/Methanol D100                         |
|                 |                  | Chondrocytes with 25% PCL (45k) in Chloroform/Methanol D200 |
|                 |                  | 30% PCL (45k) in Chloroform/Methanol D100                   |
|                 |                  | 30% PCL (45k) in Chloroform/Methanol D200                   |

**ΠΙΝΑΚΑΣ 8.6** Εικόνες SEM κυτταρικής καλλιέργειας Ανθρώπινων Χονδροκυττάρων σε ικρίωματα PCL χωρίς AgNPs, για 7 ημέρες ανάπτυξης,  $MW_{PCL} = 45kDa$  και σε μπλε κύκλο παρουσιάζεται η κυτταρική προσκόλληση.

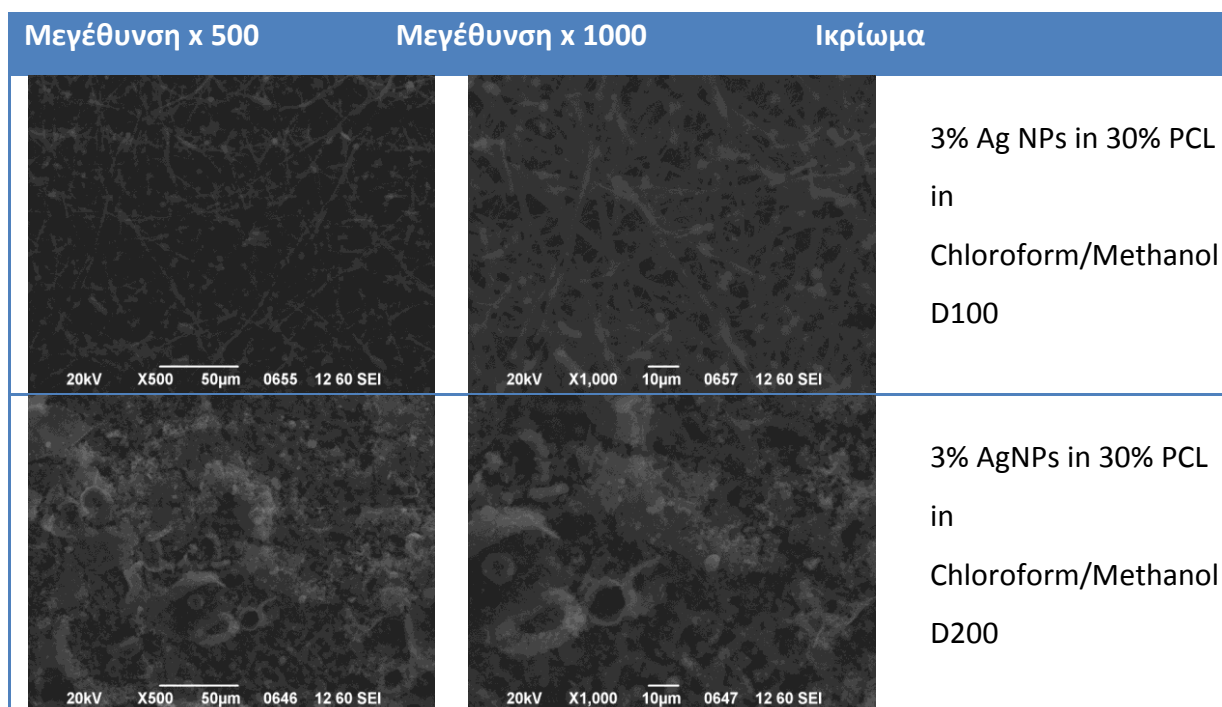
| Μεγέθυνση x 500  | Μεγέθυνση x 1000   | Ικρίωμα                                   |
|--|--|---|
|   |   | 25% PCL in<br>Chloroform/Methanol<br>D100 |
|  |  | 30% PCL in<br>Chloroform/Methanol<br>D200 |

**ΠΙΝΑΚΑΣ 8.7** Εικόνες SEM κυτταρικής καλλιέργειας Ανθρώπινων Χονδροκυττάρων σε ικρίωματα PCL με AgNPs, για 3 ημέρες ανάπτυξης,  $M_{PCL} = 70kDa$

| Μεγέθυνση x 500   | Μεγέθυνση x 1000  | Ικρίωμα  |
|---|---|--|
|  |  | 3% Ag NPs 30% PCL<br>in<br>Chloroform/Methanol<br>D200 |



**ΠΙΝΑΚΑΣ 8.8** Εικόνες SEM κυτταρικής καλλιέργειας Ανθρώπινων Χονδροκυττάρων σε ικρίωματα PCL με AgNPs, για 7 ημέρες ανάπτυξης,  $M_{r_{PCL}}=70kDa$



Στους Πίνακες 8.3 και 8.4-8.8 παρατηρούμε τη κυτταρική προσκόλληση και πολλαπλασιασμό των χονδροκυττάρων για 3 και 7 μέρες αντίστοιχα. Τα κύτταρα παρουσιάζουν προεκβολές από το κυτταρικό σώμα (lamellipodia). Δεν υπάρχουν επεκτάσεις σε φιλοπόδια (filopodia) λόγω της επιφάνειας με την οποία έρχονται σε επαφή τα κύτταρα. Λόγω της μεγαλύτερης διαμέτρου των ινών στα ικρίωματα που είναι σε απόσταση 5cm (συνθήκη ανάπτυξης) παρατηρείται μια μεγαλύτερη επιφάνεια καλυμμένη με τα κύτταρα (στοιχείο μεγαλύτερου κυτταρικού πολλαπλασιασμού σε αυτά τα ικρίωματα) και το οποίο συμπέρασμα έρχεται σε συμφωνία με το Διάγραμμα 8.2 για την οπτική πυκνότητα των ανθρωπίνων χονδροκυττάρων με τα ικρίωματα.

Από την βελτιστοποίηση των κυτταρικών συνθηκών παρατηρήθηκε ότι γενικά η 1 και 3 μέρες δεν μπόρεσαν να δώσουν συμπληρωματικές πληροφορίες σχετικά με την κυτταρική προσκόλληση και πολλαπλασιασμό των κυττάρων (μελέτη με SEM). Αυτό οφείλεται στα εξής: i) αυτές οι 2 χρονικές περιόδους δεν είναι ιδανικές για μελέτων ικριωμάτων νανονινών, ii) ο αρχικός αριθμός των κυττάρων (50000-70000) δεν ήταν αρκετός, και iii) δεν πρέπει να ξεχνάμε ότι το PCL είναι ένα υδρόφοβο υλικό και από μόνο του δεν είναι η ιδανική επιφάνεια για καλή κυτταρική προσκόλληση.<sup>27</sup> Η ποσοτική ανάλυση και εκτίμηση μέσω του MTT τεστ οδηγεί σε μια σειρά από

συμπεράσματα για όλες τις χρονικές περιόδους (1, 3 και 7 μέρες) σχετικά με τη κυτταροτοξικότητα του αργύρου στα ικρίωματα, με την απόσταση του γειωμένου πιάτου κατά την ανάπτυξη των ινών και τη μεγαλύτερη κυτταροσυμβατότητα (μεγαλύτερη οπτική πυκνότητα). Ωστόσο αυτό δεν είναι εμφανές κατά τη διάρκεια της ποιοτικής εκτίμησης μέσω της SEM παρατήρησης. Είναι εμφανής η κυτταρική προσκόλληση χονδροκυττάρων μόνο για τις 7 μέρες σε μια σειρά από ικρίωματα.



## ΚΕΦΑΛΑΙΟ 9. Degradation Study

Η αποικοδόμηση είναι ζωτικής σημασίας στην επιλογή των βιοϋλικών και στο σχεδιασμό στη μηχανική ιστών. Έτσι, ένα ικρίωμα νανοσύνθετου πολυμερούς πρέπει να πληροί ορισμένα σχεδιαστικά και λειτουργικά κριτήρια, συμπεριλαμβανομένης της βιοσυμβατότητας, ειδικά χαρακτηριστικά βιοαποικοδομησιμότητας, μηχανικές ιδιότητες, και σε ορισμένες περιπτώσεις αισθητικές απαιτήσεις. Η υποκείμενη λύση για τη χρήση των πολυμερών νανοσύνθετων σε πολύ διαφορετικές εφαρμογές είναι η σωστή επιλογή της χημείας της μήτρας τους πολυμερούς, ο τύπος του πληρωτικού, και η αλληλεπίδραση μήτρας-πληρωτικού μέσω της οποίας μπορεί να προσαρμοστεί η διαδικασία αποδόμησης.

Το βιοϋλικό δεν θα πρέπει μόνο να τονώσει και να υποστηρίξει την ανάπτυξη του ιστού, αλλά θα πρέπει επίσης να αποδομείται με τον ίδιο ρυθμό με τον οποίο σχηματίζεται ο νέος ιστός και το σημαντικότερο, θα πρέπει να διαθέτει την επιπλέον ικανότητα να αντέχει τις συνθήκες φόρτωσης που παρουσιάζονται *in situ*. Η μηχανική υποστήριξη είναι απαραίτητη συνεχώς καθώς το υλικό αποικοδομείται, μέχρις ότου ο νέος ιστός μπορέσει να αντέξει το φορτίο. Δεδομένου ότι η μηχανική ιστών στοχεύει στην αναγέννηση νέων ιστών, τα βιοϋλικά αναμένεται να είναι αποικοδομήσιμα και απορροφήσιμα με ένα κατάλληλο ρυθμό που να ταιριάζει με την ταχύτητα σχηματισμού του νέου ιστού.

Η συμπεριφορά της αποικοδόμησης έχει έναν κρίσιμο αντίκτυπο στη μακροπρόθεσμη απόδοση μιας κατασκευής πολυμερούς/κυττάρων της μηχανικής ιστών. Η κινητική της αποικοδόμησης μπορεί να επηρεάσει ένα φάσμα διεργασιών, όπως η κυτταρική ανάπτυξη, η αναγέννηση των ιστών και η ανταπόκριση των υποδοχέων. Ο μηχανισμός της βιοαποικοδόμησης ενός αλειφατικού πολυεστέρα είναι η βιο-διάβρωση του υλικού που καθορίζεται κυρίως από την επιφανειακή υδρόλυση του πολυμερούς. Η εκτεταμένη βιβλιογραφία σχετικά με τη βιοαποικοδόμηση των πολυμερών υλικών αποκαλύπτει την πολυπλοκότητα του μηχανισμού υδρόλυσης, στον οποίο είναι σημαντικό να κατανοήσουμε όχι μόνο το χρόνο που το υλικό ξεκινάει τη διαδικασία της βιο-διάβρωσης το ίδιο, αλλά και σε ποιές συνθήκες θα συμβεί αυτό, σε σχέση με την χημική σύνθεση των δειγμάτων, το pH του μέσου, τη θερμοκρασία, την επεξεργασία της επιφάνειας, το μέγεθος και το σχήμα του δείγματος, ενισχύοντας τα σωματίδια και τη λειτουργικότητα των σωματιδίων. Το σχήμα 9.1 δείχνει σχηματικά τη διαδικασία της βιοαποικοδόμησης. Υπογραμμίζονται οι

παράγοντες που επηρεάζουν την αποικοδόμηση και συσχετίζονται με τη σημασία τους στη βιοϊατρική εφαρμογή. Όταν τα μόρια νερού επιτίθενται στους δεσμούς εστέρα στις αλυσίδες του πολυμερούς, το μέσο μήκος των αποικοδομήσιμων αλυσίδων γίνεται μικρότερο. Η διαδικασία καταλήγει σε μικρά τμήματα αλυσίδων που έχουν ακραίες ομάδες καρβοξυλικού που καθιστούν το πολυμερές διαλυτό στο νερό. Πολύ συχνά, τα μοριακά βάρη μερικών θραυσμάτων εξακολουθούν να είναι σχετικά μεγάλα, με αποτέλεσμα οι αντίστοιχοι συντελεστές διάχυσης να είναι αργοί. Ως αποτέλεσμα, τα εναπομείναντα oligομερή μειώνουν την τοπική τιμή pH, καταλύουν την υδρόλυση των υπόλοιπων δεσμών εστέρα και επιταχύνουν τη διαδικασία της αποικοδόμησης. Αυτός ο μηχανισμός ονομάζεται αυτοκατάλυση, και παρατηρείται συχνά σε παχιά βιοαποικοδομήσιμα υλικά. Η αποικοδόμηση σε ημικρυσταλλικούς πολυεστέρες υποβάλλεται κατά προτίμηση εντός της άμορφης περιοχής, λόγω του υψηλότερου ποσοστού της πρόσληψης νερού στον ελεύθερο όγκο απ' ότι στις κρυσταλλικές περιοχές. Τα αποικοδομήσιμα τμήματα θα μπορούσαν στη συνέχεια να διαχέονται και να προκαλέσουν την εκ νέου κρυστάλλωση. Αυτή η αύξηση της κρυσταλλικότητας κατά την υδρολυτική αποικοδόμηση μπορεί να ανιχνευθεί από την λεύκανση των δειγμάτων και από την αλλαγή των ιδιοτήτων.

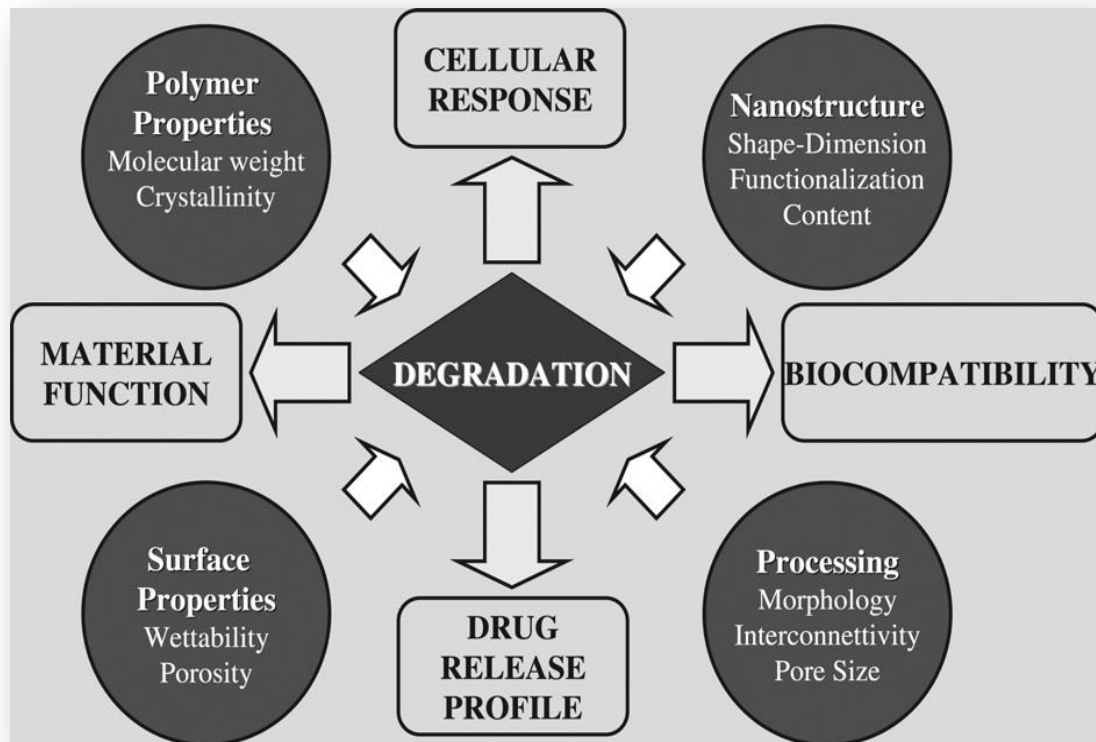
Εκτός από τις νανοδομές στα βιο-απορροφήσιμα πολυμερή μπορεί να αλλάξει η συμπεριφορά αποικοδόμησης του πολυμερούς, επιτρέποντας την ταχεία ανταλλαγή πρωτονίων στο νερό για αλκάλια στο γυαλί ή στα κεραμικά.

Εάν η διάσταση των βιοϋλικών είναι μικρή (η διαδρομή της διάχυσης είναι σύντομη), τα υδρόφιλα oligομερή μπορούν να διαφύγουν γρήγορα από την επιφάνεια. Αυτή ακριβώς είναι η περίπτωση των electrospun ικρνωμάτων, όπου η διάσταση των νανοϊνών είναι μικρή και το μήκος διάχυσης των αποικοδομήσιμων υποπροϊόντων (υδρόφιλα oligομερή) είναι σύντομο. Ως αποτέλεσμα, η πιθανότητα αυτοκατάλυσης των electrospun ικρνωμάτων είναι πολύ μικρή.<sup>22</sup>

Το PCL είναι ένας ημι-κρυσταλλικός απορροφήσιμος πολυεστέρας ο οποίος είναι βιοδιασπώμενος, καθώς οι δεσμοί εστέρα σπάνε με υδρόλυση. Τα προϊόντα αυτής της αποικοδόμησης μεταβολίζονται και εκκρίνονται από το ανθρώπινο σώμα. Λόγω του σχετικά μεγάλου χρονικού διαστήματος αποικοδόμησής του, χρησιμοποιείται για μακροχρόνια in vivo εμφυτεύματα.

Ο χαρακτηρισμός της επιφάνειας, όπως η X-ray Photoelectron Spectroscopy (XPS), οι μετρήσεις της γωνίας επαφής (contact angle) και η Ηλεκτρονική Μικροσκοπία Σάρωσης (Scanning Electron

Microscopy - SEM), υποστήριξε την υπόθεση ότι τα φαινόμενα της επιφάνειας διαχωρισμού σχετίζονται κυρίως με το μοριακό τους βάρος. Οι ελαστομερείς ιδιότητες των συμπολυμερών σχετίζονται με το μοριακό βάρος (MW) και τη μορφολογία τους.<sup>24</sup>



Σχήμα

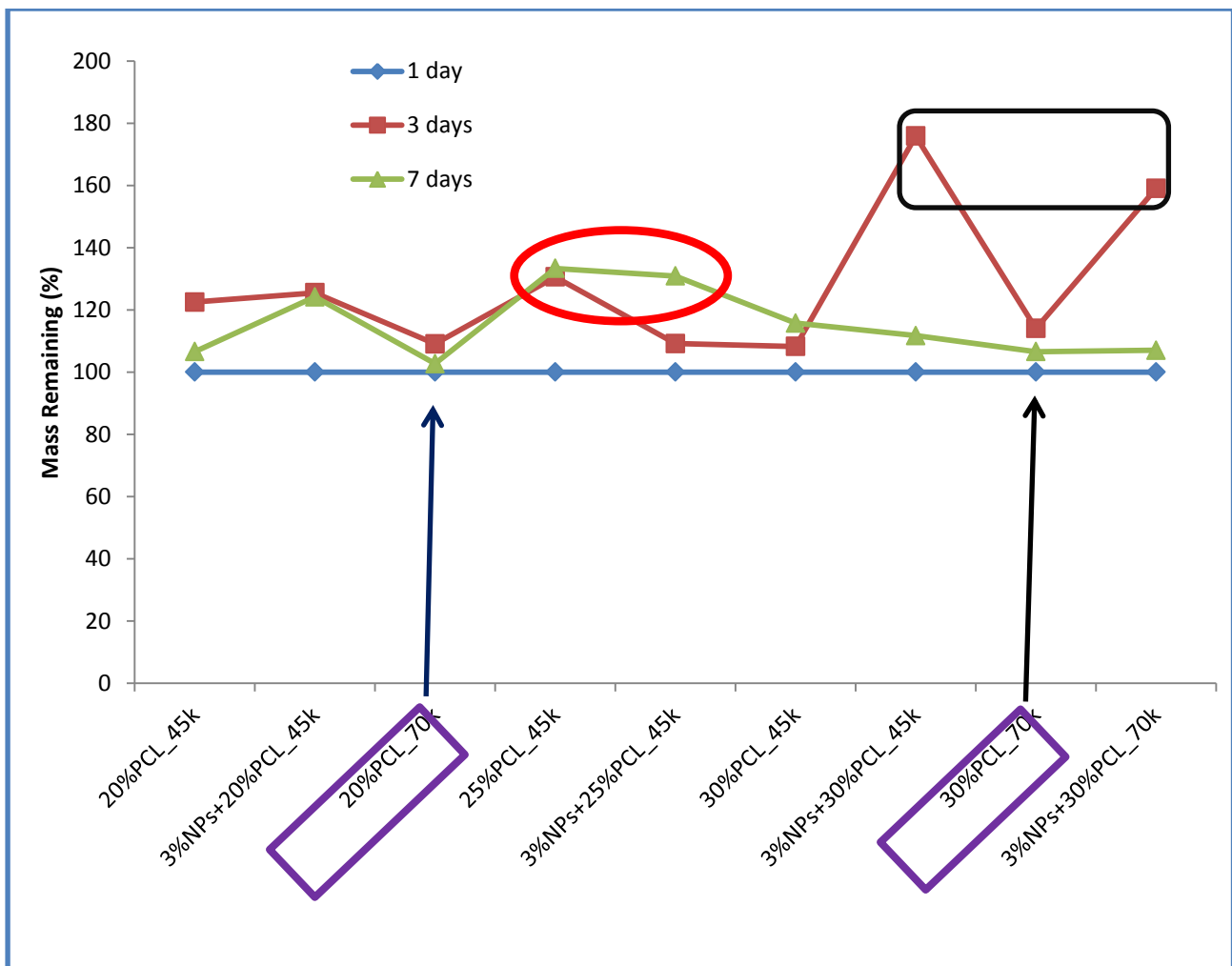
Σχήμα 9.1 Σημαντικότητα της βιοαποικοδόμησης στις βιοϊατρικές εφαρμογές

Η πειραματική διαδικασία που ακολουθήσαμε περιγράφεται ως εξής:

Δείγματα από τα νανοϊνώδη ικρίσματα (διαστάσεις 1cmx1cm) από κάθε ομάδα ζυγίστηκαν όπως φαίνεται στον Πίνακα 9.1 και το αρχικό τους βάρος ορίστηκε ως  $W_0$ . Μετά τοποθετήθηκαν σε 12well plates με εμβαδό του κάθε πηγαδιού  $3.7\text{cm}^2$  και 1ml DMEM with 10%FBS and 1% A/B προστέθηκε πάνω σε κάθε δείγμα/πηγαδάκι. Τα χρονικά διαστήματα που επιλέχθηκαν είναι οι 3 και 7 μέρες και βασίστηκαν στα διαστήματα για τα οποία μελετήθηκε η κυτταροσυμβατότητα αυτών των ικρίσμάτων. Τα πιάτα διατηρήθηκαν για όλη τη διάρκεια του πειράματος στους  $37^\circ\text{C}$ . Στα προκαθορισμένα χρονικά διαστήματα, τα δείγματα αφαιρέθηκαν από τα πηγαδάκια, ξεπλύθηκαν με PBS και αφέθηκαν να στεγνώσουν/ξηρανθούν σε θερμοκρασία δωματίου και σε καθαρό χώρο για 2 μέρες. Τα δειγματάκια των 3 ημερών ζυγίστηκαν και ορίστηκαν ως  $W_{3d}$ , ενώ των 7 ημερών ως  $W_{7d}$ . Η μάζα τοις εκατό, όπως υπολογίστηκε είναι ό, τι απομένει  $W_x/W_0 \times 100\%$ .

ΠΙΝΑΚΑΣ 9.1 Αρχικό, στις 3 & 7 μέρες βάρος δειγμάτων.

| ΙΚΡΙΩΜΑ                          | Mean Starting Weight (Wo) | W3d        | 3d_Mass Remaining | W7d      | 7d_Mass Remaining |
|----------------------------------|---------------------------|------------|-------------------|----------|-------------------|
| Aluminium Foil                   | 0,004475                  |            | 0                 |          | 0                 |
| <b>20%PCL(45000)_100</b>         | 0,00485                   | 0,00651    | 134,3191197       | 0,00487  | 100,4814305       |
| <b>20%PCL(45000)_200</b>         | 0,00566                   | 0,00693    | 122,5103123       | 0,00603  | 106,5998821       |
| <b>20%PCL(70000)_D100</b>        | 0,00704                   | 0,007675   | 109,0973703       | 0,007225 | 102,7007818       |
| <b>25%PCL(45000)_100</b>         | 0,00508                   | 0,00563    | 110,7540984       | 0,00574  | 112,9180328       |
| <b>25%PCL(45000)_200</b>         | 0,00528                   | 0,0069     | 130,5993691       | 0,007045 | 133,3438486       |
| <b>30%PCL(45000)_100</b>         | 0,00655                   | 0,00824    | 125,8976318       | 0,00719  | 109,854851        |
| <b>30%PCL(45000)_D200</b>        | 0,00538                   | 0,00582    | 108,2287308       | 0,006225 | 115,7601116       |
| <b>30%PCL(70000)_D200</b>        | 0,00632                   | 0,0072     | 114,0142518       | 0,00673  | 106,5716548       |
| <b>30%PCL(70000)_D100</b>        | 0,00639                   | 0,007755   | 121,3140399       | 0,006865 | 107,3914744       |
| <b>3%NPs +20%PCL(45000)_D100</b> | 0,00634                   | 0,00664    | 104,7318612       | 0,00694  | 109,4637224       |
| <b>3%NPs +20%PCL(45000)_D200</b> | 0,00773                   | 0,0097     | 125,4851229       | 0,0096   | 124,1914618       |
| <b>3%NPs +20%PCL(70000)_D100</b> |                           |            |                   |          |                   |
| <b>3%NPs +20%PCL(70000)_D200</b> |                           |            |                   |          |                   |
| <b>3%NPs +25%PCL(45000)_D100</b> | 0,00659                   | 0,00883    | 134,0926348       | 0,00707  | 107,365224        |
| <b>3%NPs +25%PCL(45000)_D200</b> | 0,00838                   | 0,00915    | 109,1885442       | 0,01097  | 130,9069212       |
| <b>3%NPs +25%PCL(45000)_D100</b> | 0,00574                   | 0,00659    | 114,7284123       | 0,007135 | 124,2165738       |
| <b>3%NPs +25%PCL(45000)_D200</b> | 0,00657                   | 0,00806315 | 122,7267884       | 0,00814  | 123,8964992       |
| <b>3%NPs +25%PCL(70000)_D100</b> | 0,00592                   | 0,00824    | 139,1891892       | 0,00675  | 114,0202703       |
| <b>3%NPs +30%PCL(45000)_D100</b> | 0,00725                   | 0,008065   | 111,2030334       | 0,008945 | 123,3367804       |
| <b>3%NPs +30%PCL(45000)_D200</b> | 0,00812                   | 0,014275   | 175,8726899       | 0,00907  | 111,7453799       |
| <b>3%NPs +30%PCL(70000)_D200</b> | 0,00556                   | 0,00884    | 158,9928058       | 0,00595  | 107,0143885       |
| <b>3%NPs +30%PCL(70000)_D100</b> | 0,00612                   | 0,00899    | 146,8954248       | 0,006525 | 106,6176471       |



**Διάγραμμα 9.1**

Από το παραπάνω διάγραμμα (9.1) συμπεραίνουμε ότι:

- ✓ Στις 3 μέρες παρατηρείται μεγαλύτερη(αυξημένη) διαφορά μάζας σε σύγκριση με τις 7 μέρες. Αυτό μάλλον οφείλεται στην προσρόφηση νερού από το ικρίωμα και μετά τις 7 ημέρες το υλικό αρχίζει να αποικοδομείται.
- ✓ Για το MW 70k παρουσιάζεται η μικρότερη διαφορά μάζας από το αρχικό, ιδίως για τις 7 ημέρες.
- ✓ Η ενσωμάτωση των νανοσωματιδίων οδηγεί σε πιο αυξημένη διαφορά μάζας στις 3 ημέρες σε σύγκριση με σκέτο το PCL (black rectangle).
- ✓ Από τη σύγκριση των συγκεντρώσεων του PCL δεν μπορούμε να βγάλουμε συμπεράσματα για αυτά τα χρονικά διαστήματα, καθώς από τη βιβλιογραφία η πλήρης αποδόμηση του PCL μπορεί να διαρκέσει έως και 2 έτη, οπότε οι 7 ημέρες είναι πολύ μικρό χρονικό διάστημα .
- ✓ Το 25% PCL έχει τη μεγαλύτερη αύξηση στη διαφορά μάζας και για τις 7 μέρες.

## **ΚΕΦΑΛΑΙΟ 10. Μελέτη των Μηχανικών Ιδιοτήτων των Ικριωμάτων της Πολυκαπρολακτόνης με τη Μέθοδο του Nanoindentation**

Τα πολυμερή νανοσύνθετα είναι αποτέλεσμα του συνδυασμού πολυμερών και ανόργανων/οργανικών πρόσθετων στην κλίμακα των νανομέτρων.

Τα νανοσύνθετα υλικά παρουσιάζουν συχνά εξαιρετική ισορροπία μεταξύ αντοχής και σκληρότητας και συνήθως βελτιωμένα χαρακτηριστικά σε σύγκριση με τα μεμονωμένα συστατικά τους. Μάλιστα, η φυσική μήτρα/matrix του οστού είναι ένα οργανικό/ανόργανο σύνθετο υλικό από κολλαγόνο και απατίτες. Από αυτή τη σκοπιά, τα σύνθετα υλικά είναι άριστες επιλογές ως ικρίωματα για τη μηχανική ιστού των οστών.

Οι μηχανικές ιδιότητες των διαθέσιμων πολυμερικών πορώδων ικρίωμάτων αποκάλυψαν ανεπαρκή ακαμψία (stiffness) και αντοχή στη θλίψη (compressive strength) σε σύγκριση με τα ανθρώπινα οστά, έτσι η δυνατότητα να χρησιμοποιηθούν οργανικές/ανόργανες νανοδομές που περιέχουν βιοδιασπώμενα πολυμερή θα μπορούσε να είναι μια σημαντική δυνατότητα να αυξηθούν και να ρυθμιστούν οι μηχανικές, ηλεκτρικές και αποδομίσημες ιδιότητες. Η πρόσφυση (interface adhesion) μεταξύ νανοσωματιδίων και της πολυμερικής μήτρας είναι ο βασικός παράγοντας που επηρεάζει τις ιδιότητες των νανοσυνθέτων. Προκειμένου να αυξηθεί η διεπιφανειακή αντοχή (interface strength) μεταξύ των δύο φάσεων, έχουν δοκιμαστεί διάφοροι μέθοδοι στο παρελθόν. Ως εκ τούτου, οι μηχανικές ιδιότητες των νανοσύνθετων ελέγχονται από πολλές νανοσύνθετες παραμέτρους όπως οι ιδιότητες της μήτρας, οι ιδιότητες και η κατανομή των πληρωτικών υλικών (fillers), καθώς και η διεπιφανειακή πρόσφυση, και η σύνθεση ή η μέθοδος επεξεργασίας.

Τα πολυμερή είναι τα πρωταρχικά υλικά για την παραγωγή ικρίωματος σε εφαρμογές μηχανικής ιστού και πολλοί τύποι βιοαποικοδομήσιμων πολυμερικών υλικών έχουν ήδη χρησιμοποιηθεί σε αυτό τον τομέα. Όπως έχει αναφερθεί, κατηγοριοποιούνται σε φυσικά και συνθετικά. Τα συνθετικά πολυμερή έχουν καλή μηχανική αντοχή και το σχήμα τους και ο ρυθμός αποδόμησής τους μπορούν εύκολα να ρυθμιστούν, αλλά οι επιφάνειές τους είναι υδροφοβικές και υστερούν από σήματα κυτταρικής αναγνώρισης (cell recognition signal)).

Υπάρχουν πολλοί αλειφατικοί πολυεστέρες, όπως η πολυκαπρολακτόνη (PCL), που χρησιμοποιείται στην έρευνα για τη μηχανική ιστών. Ο ρυθμός αποδόμησης της PCL είναι

σημαντικά πιο αργός σε σχέση με τα PLA, PGA & PLGA. Η αργή αποδόμηση του PCL το κάνει λιγότερο ελκυστικό για βιοϊατρικές εφαρμογές, αλλά πιο ελκυστικό για εφαρμογές μακροπρόθεσμων εμφυτευμάτων και για ελεγχόμενη απελευθέρωση φαρμάκων. Το PCL έχει πρόσφατα συντεθεί για να βελτιώσει τις ιδιότητες αποικοδόμησης και έχει χρησιμοποιηθεί ως υλικό για ράμματα και ως ένα μακροπρόθεσμο σύστημα παροχής φαρμάκου. Το PCL είναι ένα υποψήφιο πολυμερές για τη μηχανική ιστού των οστών. Στην πραγματικότητα έδειξε αρκετές μηχανικές ιδιότητες που χρησιμεύουν ως ικρίωμα σε εφαρμογές, όπως η υποκατάσταση οστών, όπου οι φυσικές ιδιότητες πρέπει να διατηρηθούν για τουλάχιστον 6 μήνες. Τα ικρίωματα εμπλέκονται σε μια διαδικασία αναγέννησης οστών, και αυτό θα μπορούσε να ενισχυθεί με την προσθήκη ενός ανθρακικού απατίτη (carbonated apatite component) δηλαδή το κύριο συστατικό της ανόργανης φάσης του οστού.<sup>22</sup>

Η τάση ελαχιστοποίησης των διαστάσεων των υλικών και των συστημάτων στην κλίμακα των νανομέτρων δημιούργησε την ανάγκη ανάπτυξης τεχνικών μέτρησης των μηχανικών ιδιοτήτων σε αυτή τη κλίμακα. Αρχικά θα αναλύσουμε την πειραματική τεχνική του Nanoindentation, καθώς και τα μοντέλα ανάλυσης των μετρήσεων, που αποτελούν τα «εργαλεία» για τον προσδιορισμό της νανοτοπογραφίας, των νανομηχανικών και οπτικών ιδιοτήτων και των νανοδομικών χαρακτηριστικών των ικριωμάτων που εξετάζουμε στην παρούσα εργασία.

Συγκεκριμένα, σκοπός είναι η καταγραφή της μηχανικής απόκρισης ενός διεγέρτη, είτε με σημειακή, είτε με διαμήκη νανοεγχάραξη (Nanoindentation, NI και Scratch Test, ST αντίστοιχα)<sup>1,2</sup>.

### **10.1 Νανοεγχάραξη: Ημιστατική και Δυναμική μέτρηση**

Η σημειακή εγχάραξη ή σκληρομέτρηση (indentation) αποτελεί την δημοφιλέστερη και πλέον εύχρηστη τεχνική προσδιορισμού των μηχανικών ιδιοτήτων των υλικών. Τα πρώτα πειράματα εγχάραξης πραγματοποιήθηκαν από τον Brinell<sup>3</sup> στις αρχές του προηγούμενου αιώνα και ως εγχαράκτες χρησιμοποιήθηκαν λείες σφαίρες από ρουλεμάν (ball bearing). Κατά τα συμβατικά πειράματα εγχάραξης εφαρμοζότανε συγκεκριμένο φορτίο σε έναν θεωρητικά άκαμπτο εγχαράκτη, ο οποίος εισχωρεί στο μετρούμενο υλικό. Μετά την παύση εφαρμογής του φορτίου μετράται το αποτύπωμα του εγχαράκτη στο δείγμα και υπολογίζεται η σκληρότητα του υλικού, ως ο λόγος του εφαρμοζόμενου φορτίου προς το εμβαδόν της επιφάνειας του αποτυπώματος. Με τα

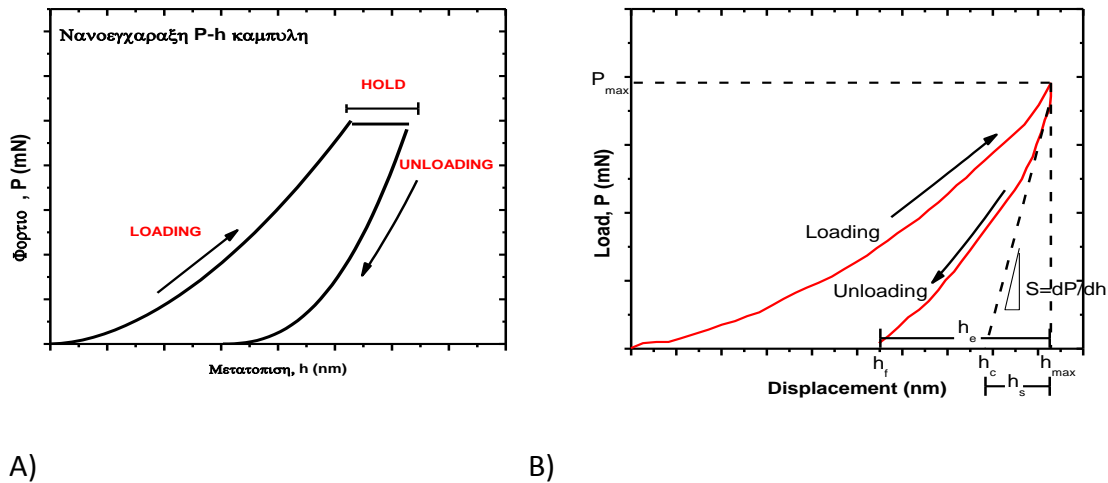
πειράματα αυτά ήταν δυνατή η μέτρηση μόνο της σκληρότητας του υλικού και για τον λόγο αυτό συνήθως αναφέρονται στην βιβλιογραφία ως πειράματα σκληρομέτρησης (Hardness Test).

Οι σύγχρονες διατάξεις πραγματοποίησης πειραμάτων σημειακής νάνοεγχάραξης (Nanoindentation, NI)<sup>4</sup> βασίζονται στην ίδια ιδέα με εκείνες της συμβατικής εγχάραξης, με τη διαφορά ότι χρησιμοποιούν εγχαράκτες με αιχμές κυρτότητας (R) λίγων δεκάδων νανομέτρων, των οποίων το αποτύπωμα είναι αδύνατο να καταγραφεί από οπτικό μικροσκόπιο, και το κυριότερο καταγράφουν την κάθετη προς το επίπεδο του δείγματος μετατόπιση (h) του εγχαράκτη, η οποία μπορεί να είναι λίγες δεκάδες νανόμετρα, εκτός από το φορτίο (P) που ασκεί. Επομένως ένα πείραμα – μέτρηση NI αφορά την άσκηση από έναν άκαμπτο εγχαράκτη συγκεκριμένου / καταγραφόμενου φορτίου και την καταγραφή της μετατόπισής του κάθετα στην επιφάνεια του δείγματος. Για τον λόγο αυτό οι σύγχρονες διατάξεις νανοεγχάραξης περιγράφονται και ως «depth-sensing» διατάξεις. Γνωρίζοντας την γεωμετρία του εγχαράκτη μέσω ειδικών διαδικασιών και την μετατόπιση αυτού κάθετα στο επίπεδο της επιφάνειας είναι δυνατό να υπολογίσουμε την επιφάνεια επαφής (A) εγχαράκτη – δείγματος και στην συνέχεια να προσδιορίσουμε πειραματικά τις μηχανικές ιδιότητες των υλικών στην νανοκλίμακα.

Στο Σχήμα 10.1(α) παρουσιάζεται το πρωταρχικό αποτέλεσμα πειράματος NI, η καμπύλη φορτίου – μετατόπισης (Load (P) – displacement (h) curves), η οποία δίνει την εξέλιξη του ασκούμενου από τον εγχαράκτη στο δείγμα φορτίου συναρτήσει της μετατόπισης του εγχαράκτη. Η παρούσα καμπύλη προέρχεται από το πλέον απλό πείραμα NI και αποτελείται από τρία τμήματα (έχει παραληφθεί εκείνο της προσέγγισης του εγχαράκτη στην επιφάνεια). Πρώτο είναι το τμήμα της αύξησης του φορτίου (Loading), το οποίο γίνεται με έλεγχο είτε της μετατόπισης είτε του φορτίου, ακολουθεί εκείνο κατά το οποίο το φορτίο παραμένει σταθερό (Hold) και το τελικό τμήμα είναι εκείνο της αποφόρτισης (Unloading) και μηδενισμού του ασκούμενου φορτίου.

Στα Σχήματα 10.1(β) και 10.2 παρουσιάζεται καμπύλη P-h και προβολή στο επίπεδο πειράματος NI, στα οποία φαίνονται τα μεγέθη στα οποία βασίζεται η ανάλυση του μέρους της αποφόρτισης **ημιστατικού (Quasistatic) πειράματος νανοεγχάραξης** σύμφωνα με το μοντέλο ελαστικής επαφής των Oliver – Pharr<sup>1</sup>:





Σχήμα 10.1 Καμπύλες Α)φορτίου & Β)μετατόπισης πειραμάτων νανοεγχάραξης

$h_{max}$  : Μέγιστο βάθος διείσδυσης της ακίδας του εγχαράκτη

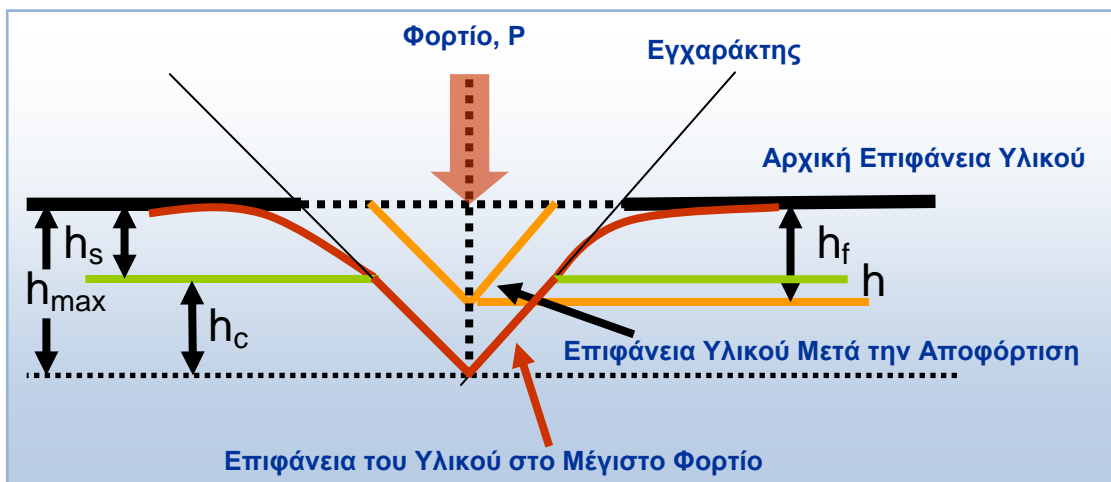
$P_{max}$  : Μέγιστο εφαρμοζόμενο φορτίο

$h_f$  : Τελικό / παραμένων βάθος της νανοεγχάραξης στο υλικό μετά την ολική αποφόρτιση

$h_c$  : Βάθος επαφής υλικού και ακίδας εγχάραξης μετά την αποφόρτιση

$h_e$  : Ελαστική μετατόπιση της επιφάνειας του δείγματος μετά την αποφόρτιση

$h_s$  : Μετατόπιση της επιφάνειας του δείγματος στην περιφέρεια της επαφής με την ακίδα



Σχήμα 10.2 Σχηματική αναπαράσταση των μεγεθών που εμπλέκονται στο μοντέλο Oliver-Pharr.

Σύμφωνα με το μοντέλο των Oliver-Pharr, το οποίο βασίζεται στην ανάλυση κατά Sneddon<sup>5.4</sup> της επαφής δύο σωμάτων, κατά την ελαστική επαφή με εγχαράκτη διαφόρων γεωμετρικών σχημάτων

(επίπεδο, σφαίρα, κώνος, παραβολοειδές εκ περιστροφής) η αρχική αποφόρτιση ακολουθεί εκθετικό νόμο:

$$P = c(h - h_f)^n \quad (10.1)$$

όπου  $P$  είναι το φορτίο,  $h$  είναι η ελαστική μετατόπιση και  $c, n$  είναι σταθερές, η πρώτη εξαρτάται από το υλικό και η άλλη από τη γεωμετρία του εγχαράκτη. Με τον τρόπο αυτό υπολογίζεται η λεγόμενη μετατόπιση (βάθος) επαφής  $h_c$  στο μέγιστο φορτίο  $P_{\max}$  και στην συνέχεια η επιφάνεια επαφής εγχαράκτη – δείγματος ακόμα και στην περίπτωση που αυτή μεταβάλλεται κατά την αποφόρτιση. Το  $h_c$  υπολογίζεται με χρήση της ανάλυσης του Sneddon<sup>5</sup>, όπως φαίνεται από το Σχ. 5.20(β) το βάθος επαφής  $h_c$  ισούται με:

$$h_c = h_{\max} - h_s \quad (10.2)$$

Η ελαστική μετατόπιση  $h_s$  της περιφέρειας του δείγματος, δηλαδή της περιοχής του υλικού που δεν είναι σε άμεση επαφή με την ακίδα του εγχαράκτη, προκύπτει από τη σχετική θεώρηση του Sneddon. Έτσι έχουμε:

$$\left. \begin{aligned} h_s &= \frac{\pi - 2}{\pi} (h_{\max} - h_f) \\ \varepsilon &= 2 \frac{\pi - 2}{\pi} \\ h_{\max} - h_f &= \frac{2P}{S} \end{aligned} \right\} \Rightarrow h_c = h_{\max} - \varepsilon \frac{P_{\max}}{S}, \quad (10.3)$$

όπου  $\varepsilon$  συντελεστής εξαρτώμενος από την γεωμετρία της ακίδας (1 για επίπεδο εγχαράκτη, 0,72 για κωνικό, 0,75 για σφαιρικό) και  $S$  η ακαμψία (Stiffness), η οποία δίνεται από την σχέση:

$$S = \frac{dP}{dh}. \quad (10.4)$$

Η σχέση που συνδέει την ακαμψία  $S$  με το αναγόμενο μέτρο ελαστικότητας  $E_r$ , ανεξαρτήτως της γεωμετρίας του εγχαράκτη, είναι η ακόλουθη:

$$S = \left( \frac{2}{\sqrt{\pi}} \right) \cdot \sqrt{A} \cdot E_r. \quad (10.5)$$

όπου  $A$  η επιφάνεια επαφής του εγχαράκτη με το δείγμα.

Η επιφάνεια επαφής περιγράφεται από συνάρτηση  $F(h_c)$  και εξαρτάται όπως είναι κατανοητό από τη γεωμετρία του εγχαράκτη. Επομένως η γνώση του  $h_c$  παρέχει την δυνατότητα προσδιορισμού του  $E_r$  και στην συνέχεια από την σχέση 10.6 υπολογίζεται το μέτρο ελαστικότητας του δείγματος, ενώ ο εγχαράκτης θεωρείται άκαμπτος:

$$\frac{1}{E_r} = \frac{1-\nu_{sa}^2}{E_{sa}} + \frac{1-\nu_i^2}{E_i} \quad (10.6)$$

όπου οι δείκτες  $sa, i$  υποδηλώνουν τις τιμές του Poisson ratio ( $\nu$ ) και του μέτρου ελαστικότητας. Αντίστοιχα η σκληρότητα  $H$  των δειγμάτων στην **ημιστατική νανοεγχάραξη** μετράται μόνο στο μέγιστο εφαρμοζόμενο φορτίο και δίνεται από την σχέση:

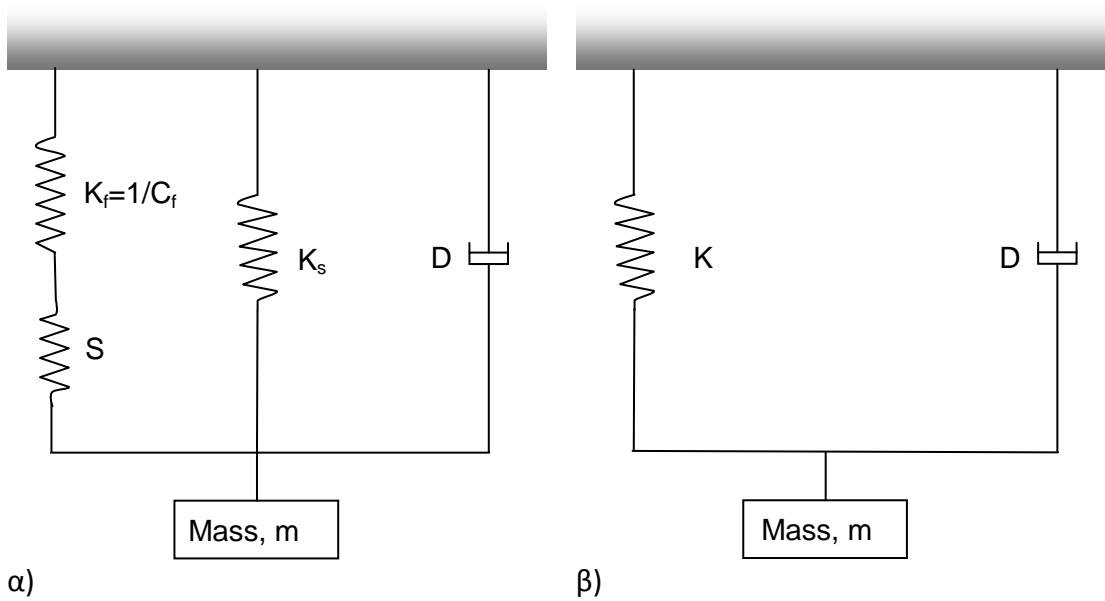
$$H = \frac{P_{\max}}{A} \quad (10.7)$$

Αντίθετα η **δυναμική νανοεγχάραξη (DNI)** παρέχει την δυνατότητα μέτρησης τόσο της σκληρότητας όσο και του μέτρου ελαστικότητας σε κάθε βάθος μετατόπισης του εγχαράκτη.<sup>1</sup> Η DNI μέτρηση στην διάταξη Nano Indenter XP υλοποιείται από την δυνατότητα συνεχούς μέτρησης της ακαμψίας μέσω της επιλογής Continuous Stiffness Measurements (CSM). Συγκεκριμένα κατά το τμήμα της φόρτισης επιβάλλεται μικρού πλάτους και υψηλής συχνότητας ταλάντωση στο σήμα της δύναμης. Το πλάτος ταλάντωσης του σήματος της δύναμης είναι εξαιρετικά μικρό και δεν επηρεάζει την διαδικασία της παραμόρφωσης του δείγματος. Ένας phase-sensitive lock-in ενισχυτής καταγράφει με υψηλή ακρίβεια τόσο την αντίστοιχη μετατόπιση (δυνατότητα μέτρησης μετατοπίσεων 0,04 nm<sup>6</sup>) που προκαλείται από την δύναμη ταλάντωσης όσο και την διαφορά φάσης μεταξύ των σημάτων δύναμης και μετατόπισης. Η διαφορική εξίσωση της εξαναγκασμένης ταλάντωσης είναι η ακόλουθη:

$$F_o \sin \omega t - D \frac{dh}{dt} - Kh = m \frac{dh^2}{dt^2}, \quad (10.8)$$

όπου  $dh$  η στιγμιαία μετατόπιση του συστήματος,  $D$  ο συντελεστής απόσβεσης του πλαισίου στήριξης του συστήματος και  $Kh$  η δύναμη επαναφοράς.

Στο Σχήμα 10.3 παρουσιάζονται δυναμικά μηχανικά μοντέλα του συστήματος κατά την DNI.



**Σχήμα 10.3** α) Δυναμικό μοντέλο και β) απλοποιημένο δυναμικό μοντέλο του συστήματος για μέτρηση DNI.

Έχοντας υπ' όψιν το δυναμικό μοντέλο του Σχήματος 10.3(α), η ακαμψία  $S$  κατά την επαφή υπολογίζεται είτε από το πλάτος της ταλάντωσης (Εξ. 10.8) είτε από την διαφορά φάσης μεταξύ του σήματος της δύναμης και της μετατόπισης (Εξ. 10.9):

$$\left| \frac{F_0}{h(\omega)} \right| = \sqrt{[(S^{-1} + C_f)^{-1} + K_s - m \cdot \omega^2]^2 + \omega^2 \cdot D^2} \quad , \quad (10.8)$$

$$\tan \varphi = \frac{\omega \cdot D}{(S^{-1} + C_f)^{-1} + K_s - m \cdot \omega^2} \quad , \quad (10.9)$$

όπου  $C_f$ : η σταθερά του πλαισίου στήριξης,

$D$ : ο συντελεστής απόσβεσης

$K_s$ : η ακαμψία των υποστηρικτικών ελατηρίων

$F_0$ : η δύναμη ταλάντωσης

$h(\omega)$ : η προκύπτουσα μετατόπιση κατά την ταλάντωση

$\omega$ : η συχνότητα της ταλάντωσης

$\varphi$ : η φάση μεταξύ των σημάτων της δύναμης και της μετατόπισης

$m$ : η μάζα.

Το απλοποιημένο δυναμικό μοντέλο (Σχήμα 10.3(β)) προκύπτει από την αντικατάσταση:

$$K = (S^{-1} + C_f)^{-1} + K_s. \quad (10.10)$$

Η ιδιοσυχνότητα του συστήματος και δίνεται από τη σχέση (10.11)

$$\omega_o = \sqrt{\frac{K}{m}} \quad (10.11)$$

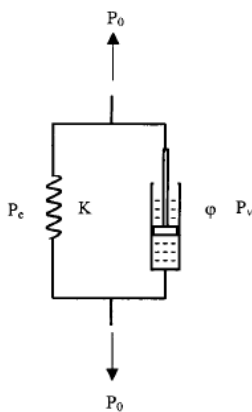
## 10.2 Νανοεγχάραξη και χρονοεξαρτώμενες παραμορφώσεις

Το μοντέλο των Oliver – Pharr<sup>1</sup>, όπως αναπτύχθηκε παραπάνω, αφορά μετρήσεις σημειακής νανοεγχάραξης σε υλικά με ελαστική-πλαστική συμπεριφορά, χωρίς να λαμβάνεται υπ' όψιν ο χρόνος και οι εξαρτώμενες από τον χρόνο παραμορφώσεις. Όμως, τα περισσότερα οργανικά υλικά εμφανίζουν ιξωδοελαστική συμπεριφορά, ενώ ιξωδοπλαστικότητα έχει παρατηρηθεί τόσο σε οργανικά όσο και σε ανόργανα υλικά.<sup>7</sup>

Με την τεχνική της σημειακής νανοεγχάραξης είναι δυνατό να μελετηθεί το φαινόμενο του ερπυσμού, κατά το οποίο παρατηρείται μεταβολή της προκαλούμενης παραμόρφωσης, ενώ το ασκούμενο φορτίο παραμένει σταθερό. Η μελέτη αυτής της συμπεριφοράς στα πειράματα νανοεγχάραξης πραγματοποιείται κατά την διαδικασία στην οποία το μέγιστο εφαρμοζόμενο φορτίο παραμένει σταθερό (Σχήμα 10.1(α)).<sup>8</sup> Ο ερπυσμός εμφανίζεται με το πέρασμα του χρόνου σε μια ελαστική παραμόρφωση, ως αποτέλεσμα της διάχυσης και της κίνησης των ατόμων ή της κίνησης των εξαρθρώσεων, ο βαθμός της οποίας εξαρτάται ισχυρά από τη θερμοκρασία. Τα υλικά τα οποία παραμορφώνονται ελαστικά αλλά επιδεικνύουν εξαρτώμενη από το χρόνο συμπεριφορά και καλούνται ιξωδοελαστικά (viscoelastic), ενώ υλικά που υφίστανται πλαστική παραμόρφωση που εξαρτάται από το χρόνο καλούνται ιξωδοπλαστικά (viscoplastic). Η ιξωδοελαστική συμπεριφορά, μπορεί να προσομοιωθεί χρησιμοποιώντας απλά φυσικά μοντέλα, αποτελούμενα από ελατηρίο, το οποίο προσομοιάζει γραμμικά ελαστικό στερεό, και τον αποσβεστήρα κρούσεων, ο οποίος προσομοιώνει τα ιξώδη ρευστά.<sup>9,10</sup>

Για την μελέτη του φαινομένου του ερπυσμού κατά την διάρκεια του πειράματος νανοεγχάραξης έχουν αναπτυχθεί διάφορα μοντέλα και εξισώσεις που συνδέουν το βάθος διείσδυσης / μετατόπιση του εγχαράκτη με τον χρόνο. Το μοντέλο EVEN<sup>10</sup> εξετάζει το φαινόμενο του ερπυσμού κατά τη διάρκεια του τεστ της νανοεγχάραξης. Το μοντέλο αυτό βασίζεται σε θεωρητική ανάλυση και υποδεικνύει ένα ελαστικο-ιξωδοελαστικό-ιξώδες μοντέλο που περιγράφει το φαινόμενο του ερπυσμού κατά την νανοεγχάραξη.

Στο Σχήμα 10.4 παρουσιάζεται στην πιο απλή μορφή του, το ισοδύναμο μηχανικό μοντέλο EVEN, το οποίο αποτελείται από ένα σύστημα ελατηρίων και αποσβεστήρων κρούσεων (μοντέλο Kelvin), που αποτελείται από ένα ελατήριο συνδεδεμένο εν παραλλήλω με έναν αποσβεστήρα κρούσεων. Στο μοντέλο αυτό όπου περιγράφεται ο ερπυσμός των πολυμερών η επιβαλλόμενη τάση είναι ίση με το άθροισμα των τάσεων στα δύο στοιχεία.



**Σχήμα 10.4** Το ιξωδοελαστικό μοντέλο δύο στοιχείων του Kelvin<sup>5.10</sup>

Εάν θεωρηθεί αρχικά εγχάραξη από έναν εγχαράκτη επίπεδης αιχμής, τότε το φορτίο σε συνάρτηση με το βάθος διείσδυσης για το ελατήριο θα είναι της μορφής:

$$P_e = \frac{4RE}{1-\nu_e} h_{se}, \quad (10.22)$$

όπου R η ακτίνα του indenter, E το μέτρο ελαστικότητας του υλικού και  $\nu_e$  ο λόγος του Poisson του υλικού. Για τον αποσβεστήρα κρούσεων η σχέση που συνδέει το φορτίο P με την μετατόπιση h είναι:

$$P = \phi \frac{dh}{dt}, \quad (10.23)$$

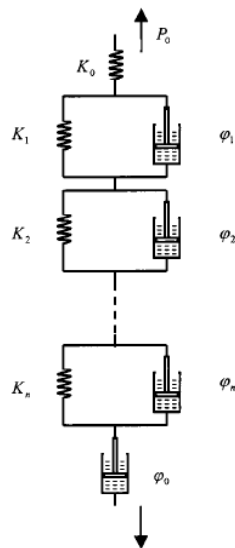
όπου  $\phi$  είναι σταθερά σχετιζόμενη με το ιξώδες  $\mu$ . Σύμφωνα με το μοντέλο του Kelvin ισχύει ότι  $P = P_e + P_u$  και  $h = h_u = h_e$ , οπότε προκύπτει η σχέση που περιγράφει το φαινόμενο του ερπυσμού συναρτήσει του εφαρμοζόμενου φορτίου  $P$  και του βάθους διείσδυσης εγχαράκτη επίπεδης αιχμής κατά την νανοεγχάραξη:

$$h = \frac{P_0}{K} (1 - e^{-Kt/\phi}), \quad (10.24)$$

όπου  $h$  είναι το βάθος διείσδυσης κατά τον ερπυσμό,  $P_0$  το μέγιστο σταθερό φορτίο και  $t$  ο χρόνος εφαρμογής του μέγιστου φορτίου, ο οποίος συμπίπτει με τον χρόνο του ερπυσμού.

Η συνολική μετατόπιση κατά την επιβολή του σταθερού φορτίου περιλαμβάνει την ακαριαία ελαστική παραμόρφωση, την πλαστική παραμόρφωση, την ιξωδοελαστική παραμόρφωση και την ιξώδη ροή. Αν δεν ληφθεί υπόψη η πλαστική παραμόρφωση τότε το μοντέλο EVEN μπορεί να απεικονιστεί με το μοντέλο του Σχήμα 10.5, ενώ η συνολική μετατόπιση κατά τη διάρκεια του ερπυσμού δίνεται από τη σχέση:

$$h = \frac{P_0}{K_0} + \sum_{i=1}^n \frac{P_0}{K_i} (1 - e^{-k_i t / \phi_i}) + \frac{P_0}{\phi_0} t, \quad (10.25)$$



**Σχήμα 10.5** Το γενικευμένο μοντέλο Kelvin αποτελούμενο από συνδεδεμένα σε σειρά στοιχεία Kelvin<sup>5.10</sup>

Θέτοντας στην Εξ. 5.25 όπου :

$P_0/K_0 = h_e$  που αντιπροσωπεύει το βάθος διείσδυσης για το πρώτο ελατήριο

$P_0/K_i = h_i$  που αντιπροσωπεύει το βάθος διείσδυσης για το  $i$  στοιχείο Kelvin

$\Phi_0/P_0=\mu_0$  που δηλώνει μια σταθερά σχετική με το ιξώδες για τον τελευταίο αποσβεστήρα κρούσεων

$\Phi_i/k_i=\tau_i$  που δηλώνει το χρόνο χαλάρωσης για το  $i$  στοιχείο και προκύπτει τελικά η εξίσωση:

$$h = h_e + \sum_{i=1}^n h_i (1 - e^{-t/\tau_i}) + \frac{t}{\mu_0} \quad (10.26)$$

### 10.3 Πειραματικά αποτελέσματα

Τα νανοϊνώδη βιοϋλικά έχουν υψηλή μηχανική αντοχή παρά τη συγκριτικά μικρή απόδοση των συστατικών τους όταν αυτά εξετάζονται ξεχωριστά. Τα φυσικά βιοϋλικά είναι αυτοσυγκροτούμενα (self-assembled) σε ένα συστηματικό μοτίβο μιας οργανικής μήτρας και τα mineralised οργανικά σε κλίμακες μήκους υπο-μικρομέτρου και νανομέτρου, παρέχουν ανώτερη (superior) αντοχή και αντίσταση στη θραύση. Τέτοια συστήματα υλικών είναι και τα ευρέως μελετημένα: σμάλτο και οστό.

Η δομή των πολυμερικών συστατικών που περιορίζεται γεωμετρικά σε κλίμακα μήκους nm και μm βοηθάει αυτά τα φυσικά υλικά να βελτιστοποιήσουν τις μηχανικές ιδιότητες των συνθέτων που προκύπτουν. Καθώς τα πολυμερικά μόρια είναι χωρικά περιορισμένα στην νανο-κατάσταση, οι νανοϊνες πρέπει να ξανα-οργανωθούν για να προσαρμοστούν στις περιορισμένες διαστάσεις για τη βελτίωση της μηχανικής τους συμπεριφοράς. Ο περιορισμός που προκύπτει από τις συνθήκες επεξεργασίας μπορεί να επηρεάσει τη δομή του υλικού, τη μακρομοριακή διαμόρφωση και τα μηχανικά χαρακτηριστικά, οδηγώντας σε ανώτερες (superior) ιδιότητες.<sup>13</sup>

Η ικανότητα του electrospinning να παράγει νανοϊνες πολυμερών με ελεγχόμενες δομές, προσανατολισμούς και διαστάσεις, το θέτει ως μία τεχνική προς εκτενή μελέτη, ιδιαίτερα όσον αφορά τις μηχανικές ιδιότητες των παραγόμενων ινών και ικρωμάτων. Η δυσκολία στον χειρισμό των ινών και στην μέτρηση του χαμηλού φορτίου που χρειάζεται για την παραμόρφωση, καθιστά πρόκληση τον χαρακτηρισμό της συμπεριφοράς των νανοϊνών στον εφελκυσμό (tensile behavior). Παρ' όλα αυτά, η ακριβής μέτρηση των μηχανικών ιδιοτήτων της νανοϊνώδους μήτρας είναι απαραίτητη, ειδικά για βιοϊατρικές εφαρμογές, επειδή το ικρίωμα πρέπει να είναι ικανό να αντέχει τις δυνάμεις που ασκούνται από τον αναπτυσσόμενο ιστό ή κατά τη διάρκεια φυσιολογικών δραστηριοτήτων.<sup>11</sup>

Βρέθηκε, ότι **η συγκέντρωση του πολυμερούς, η τάση, η απόσταση βελόνας-συλλέκτη και ο ρυθμός ροής, είναι οι πιο κρίσιμες παράμετροι, που επηρεάζουν τις μηχανικές ιδιότητες του**



παραγόμενου ικρίωματος, και κατά συνέπεια διαμορφώνουν τη διαφοροποίηση των βλαστικών κυττάρων που αναπτύσσονται μέσα στο ικρίωμα. Η ελαστικότητα της μήτρας κατευθύνει τη διαφοροποίηση των ανθρώπινων μεσεγχυματικών βλαστικών κυττάρων, σε κύτταρα του τύπου του ιστού και συμφωνεί με την σκληρότητα του περιβάλλοντος που καλλιεργούνται.<sup>11</sup> Η αντοχή (strength) και η παραμορφωσιμότητα των νανοϊνών έχει αποδειχθεί ότι επηρεάζουν την in vitro κυτταρική μετανάστευση, τον πολλαπλασιασμό και τη διαφοροποίηση, μαζί με την κυτταρική μορφολογία. Συνεπώς, η δομική ακεραιότητα και η μηχανική αντοχή του ικρίωματος είναι πολύ σημαντικά για τον σχηματισμό του νέου ιστού.<sup>2</sup> Επομένως, **οι μηχανικές ιδιότητες των πολυμερικών νανοϊνών που παράγονται με electrospinning, επηρεάζονται από τη διάμετρο της ίνας, τη μοριακή γεωμετρία (γεωμετρικοί παράμετροι των μορίων), τον μοριακό προσανατολισμό, και το βαθμό της κρυσταλλικότητας.** Έχει προσδιοριστεί επίσης ότι μειώνοντας τη διάμετρο των ινών, βελτιώνεται η κρυσταλλικότητα και ο μοριακός προσανατολισμός που εξηγεί τις ενισχυμένες ιδιότητες εφελκυσμού για τις ίνες μικρότερης διαμέτρου.<sup>13</sup>

Μερικά από τα πιο σημαντικά βιβλιογραφικά συμπεράσματα είναι:

- Η αντοχή στον εφελκυσμό (tensile strength) αρχικά αυξάνεται με την αύξηση της συγκέντρωσης του πολυμερούς και μετά μειώνεται με επιπλέον αύξησή της. Το Μέτρο Ελαστικότητας (E) (Elastic or Young's modulus) αυξάνεται συνεχόμενα με αύξηση της συγκέντρωσης.
- Αύξηση της απόστασης βελόνα-συλλέκτη έχει ως αποτέλεσμα την υποβάθμιση των μηχανικών ιδιοτήτων ( μείωση των τιμών του Μέτρου Ελαστικότητας) των νανοϊνών. Η μικρότερη απόσταση έχει ως αποτέλεσμα το σχηματισμό ισχυρότερων ινών.
- Οι μηχανικές ιδιότητες (Μέτρο Ελαστικότητας) βελτιώθηκαν με την αύξηση της εφαρμοζόμενης τάσης κατά το electrospinning: Η μέση διάμετρος των ινών μειώνεται με αύξηση της τάσης. Αύξηση της εφαρμοζόμενης τάσης θα αυξήσει τη δύναμη του ηλεκτρικού πεδίου και μεγαλύτερες ηλεκτροστατικές δυνάμεις έκτασης (stretching) προκαλούν το jet να επιταχυνθεί περισσότερο στο ηλεκτροστατικό πεδίο και κατά συνέπεια να δημιουργήσει λεπτότερες ίνες. Οι μηχανικές ιδιότητες των νανοϊνών επηρεάζονται από τη μέση διάμετρο των ινών. Έτσι όσο αυξάνεται το μέγεθος της ίνας, τόσο οι τιμές του Μέτρου ελαστικότητας μειώνονται και οι μεγαλύτερης διαμέτρου ίνες τείνουν να εμφανίσουν bulk-like ιδιότητες.

- Ο ρυθμός ροής δεν έχει σημαντική επίδραση στις μηχανικές ιδιότητες των ινών. Αλλά η αλληλεπίδρασή του με άλλες παραμέτρους είναι σημαντική.<sup>11</sup>

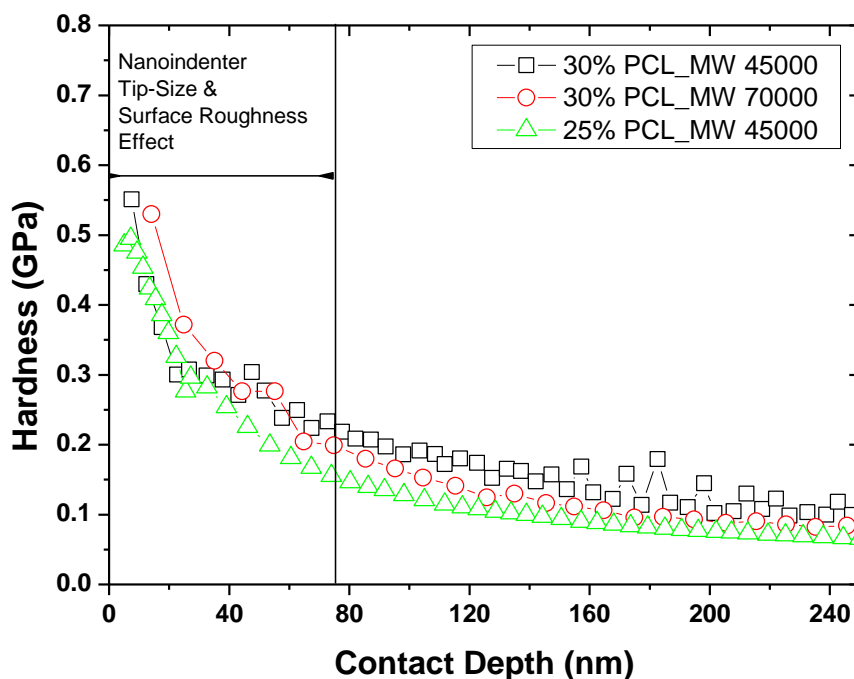
Ο μηχανικός έλεγχος των ινών για διάμετρο <math><1\mu\text{m}</math> με τη χρήση συμβατικών μεθόδων μέτρησης δεν είναι δυνατός. Αυτό απαιτεί εναλλακτικές τεχνολογίες ικανές να χειριστούν παραμορφώσεις μεγέθους νανομέτρων και δυνάμεις με ακρίβεια nN. Οι τεχνικές που παρακάμπτουν τις παραπάνω δυσκολίες είναι από τη μια πλευρά, τα συστήματα μικρο- και νανο- δοκιμών εφελκυσμού και από την άλλη, οι μέθοδοι που βασίζονται σε μετρήσεις μικροσκοπικών δυνάμεων, όπως η τεχνική AFM και Nanoindentation (με την οποία ασχοληθήκαμε εμείς).

Ενδεικτικά, η μέση τιμή του E ενός ικριώματος πολυκαπρολακτόνης (Mr 80.000) βρέθηκε  $3,8\pm 0,8$  MPa, ενώ για το αντίστοιχο PCL film  $190\pm 6$  MPa. Η διαφορά οφείλεται στο πορώδες των νανοϊνών ικριωμάτων, την αλληλεπίδραση μεταξύ των ινών (ολίσθηση μεταξύ τους), το σημείο σύνδεσης (point bonding), τη διασταυρούμενη σύνδεση (crosslinking) και στον προσανατολισμό των ινών. Αυτή η υψηλή παρουσία πορώδους θα μπορούσε να εξηγήσει το χαμηλότερο Μέτρο Ελαστικότητας που έχουν τα PCL νανοϊνώδη ικριώματα. Διαφοροποιώντας το πορώδες του δείγματος, θα μπορούσε να είναι ένας τρόπος να ρυθμίσουμε τις μηχανικές ιδιότητες του ικριώδους. Οι μηχανικές ιδιότητες των απλών νανοϊνών μέσα στα ικριώματα είναι επίσης σημαντικές στο να καταλάβουμε τη συμπεριφορά των κυττάρων που θα προσκολληθούν στις ίνες, καθώς αναπτύσσουν νέο ιστό. Οι μετρήσεις μακρο-εφελκυσμού που έγιναν στα PCL νανοϊνώδη ικριώματα μας δίνουν  $E = 3,8\pm 0,8$  MPa. Το Μέτρο Ελαστικότητας των ανεξάρτητων ινών είναι  $E = 3,7\pm 0,7$  GPa, 3 τάξεις μεγέθους μεγαλύτερη τιμή.<sup>12</sup> Η διαφορά μπορεί να εξηγηθεί από τη κενοδοπιώδη δομή (υψηλό πορώδες) του νανοϊνώδους ικριώματος και τον τυχαίο προσανατολισμό των ινών που το συγκροτούν. Οι δύο αυτές τιμές του E είναι πολύ σημαντικές, καθώς παρέχουν πληροφορίες για τις μηχανικές ιδιότητες τόσο στη κλίμακα ιστού όσο και του κυττάρου.<sup>12</sup>

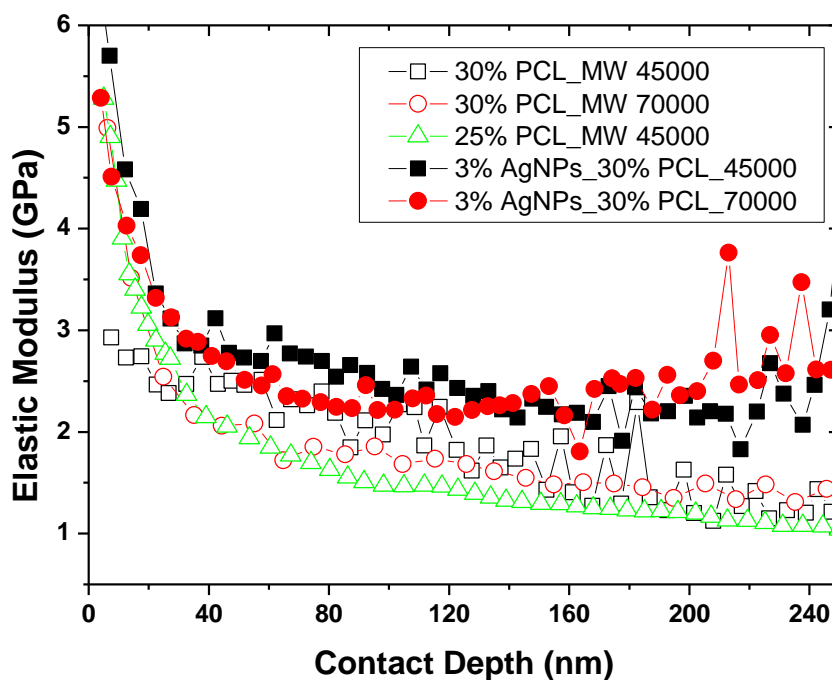
Από τις παραπάνω ενότητες, καταλήξαμε πως τα ικριώματα με τις καλύτερες ιδιότητες, που παρουσιάζουν και κυτταροσυμβατότητα, είναι εκείνα με 30%PCL, 25%PCL και 3%AgNPs[in 30%PCL] στην απόσταση D200 (=5cm) σε διαλύτη χλωροφόρμιο/μεθανόλη (3:1). Οπότε μελετώντας αυτά τα ικριώματα με τη μέθοδο του Nanoindentation, τόσο για Mr=45000 όσο και

για  $M_r=70000$ , πήραμε τα αποτελέσματα που παρουσιάζονται στα παρακάτω σχήματα (σχήμα 10.6 & 10.7).

Τα δείγματα κόπηκαν  $10 \times 10$  χιλιοστά, κομμένα κοντά στο κέντρο του electrospun φύλλου. Το σύστημα του indenter ρυθμίστηκε χρησιμοποιώντας ένα πρότυπο δείγμα πυριτίου (με μετρημένο συντελεστή  $70,5$  GPa). Χρησιμοποιήθηκε ένα διαμάντι indenter Berkovich με συνολική περιεχόμενη γωνία των  $142.3^\circ$  και  $50\text{nm}$  ακτίνα για όλες τις μετρήσεις. Ο χρόνος παραμονής ήταν  $10\text{sec}$  στο μέγιστο φορτίο και  $50\text{sec}$  χρόνος παραμονής (hold time) κατά τη διάρκεια της φόρτισης (10% της μέγιστης φόρτισης) χρησιμοποιήθηκαν προκειμένου να ελαχιστοποιηθεί η θερμική μετατόπιση (thermal drift). Η ακαμψία του δείγματος μετρήθηκε συνεχώς κατά τη διάρκεια της φόρτισης και της εκφόρτισης των δειγμάτων, επιτρέποντας τον προσδιορισμό του μέτρου ελαστικότητας ως συνάρτηση της μετατόπισης σε βάθος του indenter. Τα δεδομένα υποβλήθηκαν σε επεξεργασία χρησιμοποιώντας λογισμικό για την παραγωγή της καμπύλης φορτίου-μετατόπισης, από την οποία υπολογίστηκε ο συντελεστής ελαστικότητας ως συνάρτηση του βάθους διείσδυσης. Για το κάθε δείγμα έγιναν 8 μετρήσεις, σε κόμβους όπου ήταν πολλές ίνες ενωμένες. Παρόλα αυτά η μετρήσεις μας, αφορούν μια ίνα.



**Σχήμα 10.6** Οι τιμές της Σκληρότητας (H) των ικνωμάτων 30% PCL Μοριακού Βάρους 45000 και 70000 και 25% PCL Μοριακού Βάρους 45000 σε σχέση με το βάθος διείσδυσης του εγχαράκτη στο δείγμα.



**Σχήμα 10.7** Οι τιμές της Ελαστικότητας (E) των ικριωμάτων 30% PCL Μοριακού Βάρους 45000 και 70000 και 25% PCL Μοριακού Βάρους 45000 σε σχέση με το βάθος διείσδυσης του εγχαράκτη στο δείγμα.

Σε κάθε ικρίωμα έγιναν 8 μετρήσεις, σε κόμβους όπου ήταν πολλές ίνες ενωμένες.

Το Μέτρο Ελαστικότητας των νανοϊνών του ικριωμάτός μας, είναι περίπου 1,8 -2 GPa. (Του οστού είναι περίπου 20-25 GPa<sup>4</sup>), και μειώνεται στα 1.5 GPa με την μείωση της περιεκτικότητας σε PCL.

Από την τάξη μεγέθους συμπεραίνουμε πως αυτή η τιμή αφορά μια ίνα την οποία εντοπίσαμε με τον indenter, και όχι ένα σύστημα ινών, είναι δηλαδή 3 τάξεις μεγέθους παραπάνω απ'ότι έχει ένα ικρίωμα. Η μεγάλη διαφορά μεταξύ ίνας και νανοϊνώδους ικριώματος, οφείλεται όπως αναφέραμε παραπάνω, κυρίως στο υψηλό πορώδες του ικριώματος, τον προσανατολισμό των ινών, την αλληλεπίδραση μεταξύ των ινών (ολίσθηση μεταξύ τους), το σημείο σύνδεσης (point bonding) και τη διασταυρούμενη σύνδεση (crosslinking).

Το μοριακό βάρος δεν επηρεάζει σημαντικά τις μηχανικές ιδιότητες του ικριώματος (συγκριτικά έχουμε ίδια παραμόρφωση στο ίδιο φορτίο), ενώ η μείωση στην περιεκτικότητα του PCL οδηγεί σε μείωση των τιμών του E.

Αντίθετα η προσθήκη 3% Νανοδομημένων Ag συμβάλει στην αύξηση των τιμών του E, καθώς αυτό μετρήθηκε πάνω από 2 GPa και συγκεκριμένα 2,2 -2,4 GPa.

Συμπερασματικά, το ικρίωμα που κατασκευάσαμε έχει πολύ καλύτερο μέτρο ελαστικότητας από το αναμενόμενο, ενώ παρουσία νανοσωματιδίων Αργύρου βρέθηκε οι τιμές του  $E$  είναι μεγαλύτερες από 2GPa.

## ΚΕΦΑΛΑΙΟ 11. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟΥ ΜΕΡΟΥΣ

- <sup>1</sup> W.C. Oliver, G.M. Pharr, *J. Mater. Res.*, 7 (1992) 1564.
- <sup>2</sup> C. Charitidis, S. Logothetidis, M. Gioti, *Surf. Coat. Tech.*, 125 (2000) 201–206
- <sup>3</sup> X. Li, B. Bushan, *Materials Characterization*, 48 (2002) 11.
- <sup>4</sup> W.C. Oliver, J.B. Pethica, U.S. Patent No 4848141, July 1989
- <sup>5</sup> I.N. Sneddon, *Int. J. Eng. Sci.* 3 (1965) 47.
- <sup>6</sup> G. M. Pharr, W. C. Oliver, F. R. Brotzen *J. Mater. Res.* 7 (1992) 613.
- <sup>7</sup> Κ. Παναγιώτου «Επιστήμη Και Τεχνολογία Πολυμερών», Εκδόσεις Πήγασος Θεσ/νίκη 2000
- <sup>8</sup> Σ. Λογοθετιδης. Σημειώσεις Νανομηχανικής, ΔΠΜΣ «Νανοεπιστήμες και Νανοτεχνολογίες (2005)
- <sup>9</sup> Fischer-Cripps A.C., *Materials and Engineering*, 385. (2004), pp. 74-82
- <sup>10</sup> S. Yang, Y-W. Zhang, *Journal of Applied Physics*, 95 (2004) pp.3655-3666
- <sup>11</sup> optimising the mechanical properties of electrospun polycaprolactone and nanohydroxyapatite composite nanofibers, A.Doustgani, E. Vasheghani-Farahani, M. Soleimani, S. Hashemi-Najafabadi (2012)
- <sup>12</sup> Mechanical testing of electrospun PCL fibers, F. Croisier, A.-S. Duwez, C. Jerome, A.F. Leonard, K.O. van der Werf, (2012)
- <sup>13</sup> Effect of fiber diameter on tensile properties of electrospun poly( $\epsilon$ -caprolactone), Shing-Chung Wong, Avinash Baji (2008)
- <sup>14</sup> M.-S. Schotz et al./ *Composites Science and Technology* (2011)
- <sup>15</sup> An electrospun triphasic nanofibrous scaffold for bone tissue engineering S A Catledge<sup>1</sup>, W C Clem<sup>2</sup>, N Shrikishen<sup>1,4</sup>, S Chowdhury<sup>1</sup>, A V Stanishevsky<sup>1</sup>, M Koopman<sup>3</sup> and Y K Vohra<sup>1</sup> (2007)
- <sup>16</sup> McMullan D., *Scanning electron microscopy 1928–1965*, *Scanning*, 2006; 17 (3): 175
- <sup>17</sup> Smith KCA, Oatley CW, *The scanning electron microscope and its fields of application*, *British Journal of Applied Physics* , 1955; 6(11): 391
- <sup>18</sup> Garcia R, Perez R “Dynamic atomic force microscopy methods”, *Surface Science Reports*; 47: 197-301, 2002
- <sup>19</sup> “Handbook of Nanotechnology”, Edited by Bhushan, Springer
- <sup>20</sup> Wilson R.A., Bullen H.A., *Basic Theory, Atomic Force Microscopy (AFM), Introduction to Scanning Probe Microscopy (SPM)*
- <sup>21</sup> Twyman R.M, *Atomic Force Microscopy Methodologies*. *Encyclopedia of Neuroscience*, 2009; 1: 595-598
- <sup>22</sup> *Polymer Degradation and Stability – Biodegradable polymer matrix nanocomposites for tissue engineering: A review* (2010), I. Armentano et al.
- <sup>23</sup> *European Polymer Journal - An alternative solvent system for the steady state electrospinning of polycaprolactone*. Lien Van Schueren, Bert De Schoenmaker, Ozlem I. Kalaoglu, Karen De Clerck, 2011
- <sup>24</sup> *Polymer Degradation and Stability - Hydrolytic and microbial degradation of multi-block polyurethanes based on poly(3-caprolactone)/poly(ethylene glycol) segments*. S. Cometa, I. Bartolozzi, A. Corti, F. Chiellini, E. De Giglio, E. Chiellini, 2010
- <sup>25</sup> N.J. Hallab, K.J. Bundy, K. O'Connor, R.L. Moses, J.J. Jacobs, *Evaluation of metallic and polymeric biomaterial surface energy and surface roughness characteristics for directed cell adhesion*, *Tissue Eng.* 7 (2001) 55–71
- <sup>26</sup> Masami Okamoto\*, Baiju John, *Synthetic biopolymer nanocomposites for tissue engineering scaffolds*, *Progress in Polymer Science* 38 (2013) 1487– 1503
- <sup>27</sup> Laleh Ghasemi-Mobarakeh et.al., *Bio-functionalized PCL nanofibrous scaffolds for nerve tissue engineering*, *Materials Science and Engineering C* 30 (2010) 1129–1136.

## ΚΕΦΑΛΑΙΟ 12. Συμπεράσματα – Προτάσεις επέκτασης της συγκεκριμένης μελέτης

Στην παρούσα διπλωματική εργασία έγινε ανάπτυξη και χαρακτηρισμός νανοϊνώνδων ικριωμάτων πολυκαπρολακτόνης (PCL, συνθετικό πολυμερές). Η πολυκαπρολακτόνη επιλέχθηκε καθώς είναι ένα βιοσυμβατό (μη-καρκινογόνο, μη πυρετογόνο, μη-τοξικό, μη-αλλεργιογόνο, αιμοσυμβατό, μη-φλεγμονώδες) και βιοαποικοδομήσιμο πολυμερές. Τα Νανοσωματίδια Αργύρου επιλέχθηκαν για εμπλουτισμό των νανοϊνώνδων ικριωμάτων, λόγω της αντιμικροβιακής τους ιδιότητας (αποτροπή σχηματισμού biofilm βακτηρίων στην επιφάνεια των ιατρικών εμφυτευμάτων). Επίσης αυξάνουν την τραχύτητα της επιφάνειας, και κατά συνέπεια αυξάνουν την υδροφοβικότητά της, και επηρεάζουν έντονα την κυτταρική πρόσφυση, ανάλογα με το μέγεθος, τη μορφολογία, το σχήμα, το φορτίο, την ανιδραστηκότητά τους, τη λειτουργηκότητά τους και την δημιουργία ή μη συσσωματωμάτων.

Απώτερος σκοπός ήταν,

- ✓ Η βελτιστοποίηση των συνθηκών ανάπτυξης των ικριωμάτων με την τεχνική του Ηλεκτροστατικού ψεκασμού,
  - Βελτιστοποίηση της τεχνικής, (τάση, ρυθμός ροής, απόσταση βελόνας-συλλέκτη),
  - Βελτιστοποίηση του υλικού, (συγκέντρωση, διαλύτης, μοριακό βάρος, ύπαρξη ή όχι Νανοσωματιδίων),
- ✓ Ο προσδιορισμός των φυσικών και μηχανικών τους ιδιοτήτων,
  - AFM, SEM, Contact Angle, Nanoindentation
- ✓ Η μελέτη του ρυθμού αποικοδόμησής τους, καθώς και
- ✓ Η μελέτη και σύγκριση της κυτταρικής συμπεριφοράς των ινοβλαστών ποντικού και των ανθρώπινων χονδροκυττάρων, στα διάφορα ικρίωματα, για χρόνο ανάπτυξης 1, 3 και 7 ημέρες ανάπτυξης.
  - MTT

**Τα συμπεράσματα που εξάγονται από την εκπόνηση της παρούσας μελέτης είναι τα εξής:**

• Η παρασκευή ενός πολυμερικού νανοϊνώδους ικριώματος με τη μέθοδο της ηλεκτροστατικής εναπόθεσης, πρέπει να περιλαμβάνει οπωσδήποτε τη βελτιστοποίηση του, ώστε να λάβει συγκεκριμένη **τοπογραφία** (ομοιόμορφη κατανομή διαμέτρων ινών, ελάχιστη έως καθόλου παρουσία beads) που να προάγει την κυτταρική πρόσφυση και πολλαπλασιασμό.

• Από τη βελτιστοποίηση των συνθηκών ανάπτυξης ικριωμάτων με τη μέθοδο ηλεκτροστατικής εναπόθεσης, που αφορά κυρίως τη **συγκέντρωση του πολυμερούς, το είδος του διαλύτη (επιφανειακή τάση, πτητικότητα), την απόσταση βελόνας-συλλέκτη, την εφαρμοζόμενη τάση, το ρυθμό ροής και την ύπαρξη ή όχι νανοσωματιδίων Αργύρου**, συμπεραίνουμε ότι:

- Αύξηση της συγκέντρωσης του πολυμερούς έχει ως αποτέλεσμα την αύξηση της διαμέτρου των ινών.
- Αύξηση της απόστασης βελόνας-συλλέκτη συνεπάγεται μείωση της διαμέτρου των ινών.
- Με προσθήκη AgNPs μειώνεται η διάμετρος των ινών.
- Η αλλαγή του μοτίβου κίνησης του συλλέκτη δεν επηρεάζει σημαντικά τη δομή του ικριώματος.
- Με διαλύτη οξικό οξύ η διάμετρος των ινών είναι της τάξης των nm, ενώ με χλωροφόρμιο/μεθανόλη είναι της τάξης των μm.
- Η επίδραση των παραγόντων τάσης – ρυθμού ροής είναι μικρότερη σε σχέση με τις ρεολογικές ιδιότητες του διαλύματος, το είδος του διαλύτη, τη συγκέντρωση του πολυμερούς, και την απόσταση συλλέκτη-βελόνας.
- Αύξηση της συγκέντρωσης του πολυμερούς μας δίνει πιο ομοιογενή ικριώματα με πολύ λιγότερα beads.

• **Όλα τα ικριώματα της πολυκαπρολακτόνης παρουσιάζουν υδροφοβικότητα, με αύξησή της για μείωση της απόστασης βελόνας-συλλέκτη, και επομένως, με μεγαλύτερες τιμές υδροφοβικότητας στην ελάχιστη απόσταση D200,**

• **Η αύξηση της συγκέντρωσης του PCL, έχει ως συνέπεια την αύξηση της υδροφοβικότητας.**

• Από τη βιβλιογραφία<sup>25</sup> γνωρίζουμε πως με αύξηση της ελεύθερης επιφανειακής ενέργειας (δηλαδή μείωση της γωνίας επαφής) και ταυτόχρονη αύξηση της επιφανειακής τραχύτητας, υπάρχει μεγαλύτερη πιθανότητα της κυτταρικής προσκόλλησης, κάτι που εμφανίζεται στα



ικριώματα με συγκέντρωση πολυκαπρολακτόνης 25%, αλλά και από τα ικριώματα με νανοσωματίδια στα ικριώματα χωρίς. Επίσης, το ίδιο συμβαίνει και όταν μεταβαίνουμε από 25%PCL σε 30%PCL.

- Στα πολυμερικά νανοϊνώδη ικριώματα φαίνεται πως ο κύριος μηχανισμός κυτταρικής πρόσφυσης περιλαμβάνει τις **απευθείας αλληλεπιδράσεις ινών-κυττάρων**, λόγω της τραχύτητας και της αυξημένης διαθέσιμης περιοχής (**αναλογία επιφάνειας/όγκου**). Τα συνθετικά πολυμερή, όπως το PCL, στερούνται θέσεων αναγνώρισης κι επομένως εξαρτώνται απόλυτα από τη δυνατότητα **απορρόφησης πρωτεϊνών του ECM**, όπως η φμπρονεκτίνη, στην επιφάνεια τους.
- Παρατηρείται ότι κατά τη διάρκεια της 1 μέρας κανένα από τα ικριώματα δεν παρουσίασε τοξικότητα σε σύγκριση με το control group, για τους **ινοβλάστες ποντικίου**. Ωστόσο παρατηρήθηκε κυτταροτοξικότητα στις 3 μέρες για τις περισσότερες ομάδες των ικριωμάτων σε σύγκριση με την ομάδα του control. Συγκεκριμένα **μόνο τα ικριώματα στην απόσταση D200 και συγκέντρωση 25% και 30% PCL ήταν κυτταροσυμβατά στις 3 μέρες**, όλα τα υπόλοιπα ικριώματα παρουσίασαν τοξικότητα. Επίσης παρατηρήθηκε ότι η απόσταση από το γειωμένο συλλέκτη (substrate) παίζει ρόλο στην κυτταροσυμβατότητα όπως αποδεικνύεται στο διάγραμμα, όπου **τα ικριώματα που αναπτύχθηκαν σε απόσταση D200 (5εκ η σύριγγα από το γειωμένο πιάτο) είχαν μεγαλύτερη διάμετρο ινών και παρουσίασαν μεγαλύτερη κυτταροσυμβατότητα**. Η αύξηση της συγκέντρωσης του PCL στα ικριώματα είχε επίδραση στην κυτταροσυμβατότητα των ικριωμάτων, και κυρίως για τη 30% PCL συγκέντρωση. **Το MW του PCL δεν φάνηκε να επηρεάζει τη κυτταροσυμβατότητα των ικριωμάτων**, αυτό όμως που παρατηρήθηκε είναι ότι για το PCL με MW70, αυξάνοντας τη συγκέντρωση μειώθηκε η κυτταροσυμβατότητα των ικριωμάτων. Η συγκέντρωση του Αργύρου ήταν σταθερή για όλα τα ικριώματα και αποδείχτηκε ότι μειώνει τη κυτταροσυμβατότητα των ικριωμάτων για τις 3 μέρες. Συμπερασματικά από τις εικόνες SEM, η χρονική διάρκεια της 1 μέρας δεν μπορεί να δώσει αποτελέσματα σχετικά με τη κυτταρική προσκόλληση και πολλαπλασιασμό των ικριωμάτων.
- Για τα **ανθρώπινα χονδροκύτταρα**, παρατηρήθηκε αύξηση της κυτταροσυμβατότητας των ικριωμάτων από τις 3 στις 7 μέρες. Η προσθήκη του αργύρου είχε ως αποτέλεσμα τη μείωση της κυτταροσυμβατότητας σε όλα τα ικριώματα και στις 3 αλλά και στις 7 μέρες, με μεγαλύτερη μείωση να παρατηρείται για τη μεγαλύτερη συγκέντρωση PCL, 30%. Επίσης ήταν ενδιαφέρον να παρατηρήσουμε ότι αυξάνοντας τη συγκέντρωση του PCL για το MW 45kDa

αυξανόταν και η κυτταροσυμβατότητα τους. Για το MW 70kDa και με την αύξηση της συγκέντρωσης του PCL παρατηρήθηκε μείωση της κυτταροσυμβατότητας. Επίσης παρατηρήθηκε ότι η απόσταση από το γειωμένο πιάτο (substrate) έπαιξε και σε αυτή τη μελέτη ρόλο στην κυτταροσυμβατότητα, όπου τα ικρίσματα που αναπτύχθηκαν σε απόσταση D200 (5εκ η σύριγγα από το γειωμένο πιάτο) ανεξαρτήτου συγκέντρωσης παρουσίασαν μεγαλύτερη κυτταροσυμβατότητα.

- Από την βελτιστοποίηση των κυτταρικών συνθηκών παρατηρήθηκε ότι γενικά η **1 και 3 μέρες** δεν μπόρεσαν να δώσουν συμπληρωματικές πληροφορίες σχετικά με την κυτταρική προσκόλληση και πολλαπλασιασμό των κυττάρων (μελέτη με SEM). Αυτό οφείλεται στα εξής: i) **οτι αυτές οι 2 χρονικές περιόδοι δεν είναι ιδανικές για μελέτη νανοϊνώδων ικριωμάτων**, ii) **ο αρχικός αριθμός των κυττάρων(50000-70000) δεν ήταν αρκετός** και iii) **δεν πρέπει να ξεχνάμε ότι το PCL είναι ένα υδρόφοβο υλικό και από μόνο του δεν είναι η ιδανική επιφάνεια για καλή κυτταρική προσκόλληση.**
- Ως γνωστόν, Το βιοϋλικό δεν θα πρέπει μόνο να τονώσει και να υποστηρίξει την ανάπτυξη του ιστού, αλλά θα πρέπει επίσης να αποδομείται με τον ίδιο ρυθμό με τον οποίο σχηματίζεται ο νέος ιστός και το σημαντικότερο, θα πρέπει να διαθέτει την επιπλέον ικανότητα να αντέχει τις συνθήκες φόρτωσης που παρουσιάζονται in situ. Η μηχανική υποστήριξη είναι απαραίτητη συνεχώς καθώς το υλικό αποικοδομείται, μέχρις ότου ο νέος ιστός μπορέσει να αντέξει το φορτίο. Δεδομένου ότι η μηχανική ιστών στοχεύει στην αναγέννηση νέων ιστών, τα βιοϋλικά αναμένεται να είναι αποικοδομήσιμα και απορροφήσιμα με ένα κατάλληλο ρυθμό που να ταιριάζει με την ταχύτητα σχηματισμού του νέου ιστού.<sup>11</sup> Βιβλιογραφικά γνωρίζουμε ότι η **συγκέντρωση του πολυμερούς, η τάση, η απόσταση βελόνας-συλλέκτη και ο ρυθμός ροής, είναι οι πιο κρίσιμες παράμετροι, που επηρεάζουν τις μηχανικές ιδιότητες του παραγόμενου ικριώματος, και κατά συνέπεια διαμορφώνουν τη διαφοροποίηση των βλαστικών κυττάρων που αναπτύσσονται μέσα στο ικρίωμα. Οι μηχανικές ιδιότητες των πολυμερικών νανοϊνών που παράγονται με electrospinning, επηρεάζονται από τη διάμετρο της ίνας, τη μοριακή γεωμετρία (γεωμετρικοί παράμετροι των μορίων), τον μοριακό προσανατολισμό, και το βαθμό της κρυσταλλικότητας. Έχει προσδιοριστεί επίσης ότι μειώνοντας τη διάμετρο των ινών , βελτιώνεται η κρυσταλλικότητα και ο μοριακός προσανατολισμός που εξηγεί τις ενισχυμένες ιδιότητες εφελκυσμού για τις ίνες μικρότερης διαμέτρου. Τέλος, Η διαφορά στο Young's modulus μεταξύ των διαφόρων ικριωμάτων, οφείλεται στο πορώδες των νανοϊνώδων ικριωμάτων, την αλληλεπίδραση μεταξύ των ινών (ολίσθηση μεταξύ τους), το**

σημείο σύνδεσης (point bonding), τη διασταυρούμενη σύνδεση (crosslinking) και στον προσανατολισμό των ινών. Αυτή η υψηλή παρουσία πορώδους θα μπορούσε να εξηγήσει το χαμηλότερο Young's modulus που έχουν τα PCL νανοϊνώδη ικρίωματα σε σχέση με τα polymer films.<sup>2</sup> Από τις μετρήσεις των μηχανικών ιδιοτήτων των ικριωμάτων του συγκεκριμένου πειράματος, μπορούμε να συμπεράνουμε τα εξής:

- Το Μέτρο Ελαστικότητας (E) των νανοϊνών του ικριωμάτος μας, είναι περίπου 1,8 -2 GPa και μειώνεται στα 1.5 GPa με την μείωση της περιεκτικότητας σε PCL, κα'τι που συμφωνεί και με τη βιβλιογραφία. Από την τάξη μεγέθους συμπεραίνουμε πως αυτή η τιμή αφορά μια ίνα την οποία εντοπίσαμε με τον indenter, και όχι ένα σύστημα ινών, είναι δηλαδή 3 τάξεις μεγέθους παραπάνω απ' ότι έχει ένα ικρίωμα.
- Το μοριακό βάρος δεν επηρεάζει σημαντικά τις μηχανικές ιδιότητες του ικριώματος (συγκριτικά έχουμε ίδια παραμόρφωση στο ίδιο φορτίο), ενώ
- Η μείωση στην περιεκτικότητα του PCL οδηγεί σε μείωση των τιμών του E.
- Αντίθετα η προσθήκη 3% Νανοσωματιδίων Ag συμβάλει στην αύξηση των τιμών του E, καθώς αυτό μετρήθηκε πάνω από 2 GPa και συγκεκριμένα 2,2 -2,4 GPa.
- Συμπερασματικά, το ικρίωμα που κατασκευάσαμε έχει πολύ καλύτερο μέτρο ελαστικότητας από το αναμενόμενο, ενώ παρουσία Νανοσωματιδίων Αργύρου βρέθηκε ότι οι τιμές του E είναι μεγαλύτερες από 2GPa.

Από τα παραπάνω, βλέπουμε πως η δημιουργία ενός νανοϊνώδους πολυμερικού ικριώματος για ιατρικές εφαρμογές, απαιτεί την ταυτόχρονη μελέτη πολλών παραμέτρων, την διασταύρωση και την επανάληψη των πειραμάτων, την μελέτη των δειγμάτων με πολλές μεθόδους για την απόκτηση μιας σφαιρικής εικόνας των φυσικών, χημικών και μηχανικών ιδιοτήτων των ικριωμάτων, πριν, κατά τη διάρκεια και μετά την ανάπτυξη των κυττάρων σε αυτά.

Η επιτυχής βελτιστοποίηση των ικριωμάτων πολυκαπρολακτόνης (συγκέντρωση και συνθήκες ανάπτυξης ), στόχευε στην εφαρμογή του ικριώματος ως μέρος ενός εμφυτεύματος για την αναγέννηση του χόνδρου στην άρθρωση του γόνατος (Πρόγραμμα Νανοαρθροχόνδρος).

## Προς επέκταση της παρούσας εργασίας, θα μπορούσε να γίνει :

- ✓ Περαιτέρω μελέτη των παραμέτρων της τεχνικής ανάπτυξης του electrospinning, όπως το πάχος της βελόνας, διαφορετικό pattern, απόσταση βελόνας-συλλέκτη, διάρκεια ανάπτυξης. Μελέτη της επίδρασης των παραπάνω παραμέτρων στη μέση διάμετρο των ινών και στο πάχος των ικριωμάτων.
- ✓ Αλλαγή διαλύτη.
- ✓ Προσπάθεια μετατροπής της υδρόφοβης επιφάνειας των ικριωμάτων σε υδρόφιλη, για ευκολότερη προσκόλληση των πρωτεϊνών πάνω της και κατά συνέπεια και των κυττάρων.
- ✓ Η επιλογή του καταλληλότερου ικριώματος της παρούσας εργασίας θα μπορούσε να εμπλουτιστεί με νανοσωματίδια αργύρου διαφορετικών συγκεντρώσεων, μεγεθών και σχημάτων.
- ✓ Ο ρυθμός αποικοδόμησης του πολυμερούς θα μπορούσε να μελετηθεί για μεγαλύτερο χρονικό διάστημα.
- ✓ Οι μηχανικές ιδιότητες θα μπορούσαν να μελετηθούν και με άλλη μέθοδο, εκτός του nanoindentation (όπως AFM).
- ✓ Μελέτη της χημικής φύσης των πολυμερικών ικριωμάτων πολυκαπρολακτόνης με μεθόδους X-ray photoelectron spectroscopy (XPS) και Raman Spectroscopy.
- ✓ Εφαρμογή διαφορετικών πρωτόκολλων ποσοτικής εκτίμησης της κυτταρικής βιωσιμότητας όπως XTT και Alamar Blue, και σύγκριση των αποτελεσμάτων με την τεχνική MTT.
- ✓ Χρήση της τεχνικής φθορισμού κυττάρων και παρατήρηση τους με οπτικό μικροσκόπιο (fluorescence microscopy).
- ✓ In-Vivo μελέτη των παραγόμενων ικριωμάτων.