



**ΕΛΛΗΝΙΚΗ ΔΗΜΟΚΡΑΤΙΑ
ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΙΩΑΝΝΙΝΩΝ
ΠΟΛΥΤΕΧΝΙΚΗ ΣΧΟΛΗ
ΤΜΗΜΑ ΜΗΧΑΝΙΚΩΝ ΕΠΙΣΤΗΜΗΣ ΥΛΙΚΩΝ
ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΩΝ ΣΠΟΥΔΩΝ
«ΠΡΟΗΓΜΕΝΑ ΥΛΙΚΑ»**

ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ

Νεφέλης Λαγοπάτη

**ΒΙΟΪΛΙΚΑ ΜΕ ΒΑΣΗ ΤΟΝ ΥΔΡΟΞΥΔΡΑΠΑΤΙΤΗ ΦΥΣΙΚΗΣ ΠΡΟΕΛΕΥΣΗΣ
ΣΕ ΕΦΑΡΜΟΓΕΣ ΣΤΗΝ ΑΝΑΓΕΝΝΗΤΙΚΗ ΟΡΘΟΠΕΔΙΚΗ ΙΑΤΡΙΚΗ**

ΙΩΑΝΝΙΝΑ, 2018

Η παρούσα Μεταπτυχιακή Διατριβή εκπονήθηκε στο πλαίσιο των σπουδών για την απόκτηση του Μεταπτυχιακού Διπλώματος Ειδίκευσης στην εξειδίκευση:

Κεραμικά και Πορώδη Υλικά

που απονέμει το Τμήμα Μηχανικών Επιστήμης Υλικών του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων.

Εγκρίθηκε την από την εξεταστική επιτροπή:

ΟΝΟΜΑΤΕΠΩΝΥΜΟ - ΒΑΘΜΙΔΑ

1. Συμεών Αγαθόπουλος, Καθηγητής του Τ.Μ.Ε.Υ. της Πολυτεχνικής Σχολής του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων, **Επιβλέπων**
2. Δημήτριος Γουρνής, Καθηγητής του Τ.Μ.Ε.Υ. της Πολυτεχνικής Σχολής του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων
3. Αλέξανδρος Καραντζαλής, Επίκουρος Καθηγητής Τ.Μ.Ε.Υ. της Πολυτεχνικής Σχολής του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων

ΥΠΕΥΘΥΝΗ ΔΗΛΩΣΗ

"Δηλώνω υπεύθυνα ότι η παρούσα διατριβή εκπονήθηκε κάτω από τους διεθνείς ηθικούς και ακαδημαϊκούς κανόνες δεοντολογίας και προστασίας της πνευματικής ιδιοκτησίας. Σύμφωνα με τους κανόνες αυτούς, δεν έχω προβεί σε ιδιοποίηση ξένου επιστημονικού έργου και έχω πλήρως αναφέρει τις πηγές που χρησιμοποίησα στην εργασία αυτή."



Δρ. Νεφέλη Λαγοπάτη

ΠΡΟΛΟΓΟΣ

Η παρούσα Διπλωματική Εργασία εκπονήθηκε στο Εργαστήριο Κεραμικών & Σύνθετων Υλικών, του τμήματος Μηχανικών Επιστήμης Υλικών, της Πολυτεχνικής Σχολής, του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων, στο πλαίσιο της απόκτησης Διπλώματος Μεταπτυχιακής Ειδίκευσης στα «Προηγμένα Υλικά», με κατεύθυνση «Κεραμικά και Πορώδη Υλικά», υπό την επίβλεψη του Καθηγητή, κ. Συμεών Αγαθόπουλου. Η εργασία εστιάζει το ενδιαφέρον της στη σύνθεση βιοϋλικών από υδροξυαπατίτη φυσικής προέλευσης, με υδροθερμικό μετασχηματισμό, με σκοπό την αξιοποίησή τους, ως εμφυτεύματα σε εφαρμογές της ιστομηχανικής, για την πλήρωση οστικών ελλειμμάτων, για σπονδυλοδεσία και γενικότερα σε εφαρμογές αναγεννητικής ορθοπεδικής ιατρικής. Το ενδιαφέρον για αυτό το επιστημονικό πεδίο είναι μεγάλο και με πολλές ανοιχτές προκλήσεις, καθώς έχει πολύ σημαντικές προεκτάσεις σε οικονομικό αλλά και ανθρωπιστικό επίπεδο, αφού απώτερος στόχος είναι η βελτίωση της ποιότητας ζωής.

Θα ήθελα στο σημείο αυτό, να ευχαριστήσω όλα τα μέλη του εργαστηρίου (διδάκτορες, υποψήφιους διδάκτορες, μεταπτυχιακούς και προπτυχιακούς φοιτητές), για την καλή συνεργασία, που είναι απαραίτητη προϋπόθεση για την ομαλή έκβαση κάθε επιστημονικής προσπάθειας.

Νιώθω, όμως, πολύ έντονα, την ανάγκη να ευχαριστήσω θερμά τον επιβλέποντα καθηγητή της Διπλωματικής Εργασίας, Καθηγητή του Τμήματος Μηχανικών Επιστήμης Υλικών κ. Σ. Αγαθόπουλο, για την ανάθεση του θέματος, για την εμπιστοσύνη που μου έχει δείξει έμπρακτα, για τη συνεχή υποστήριξη, υπομονή και καθοδήγησή του. Και δεν υπάρχει καλύτερο τεκμήριο για αυτά από το γεγονός ότι η συνεργασία αυτή μαζί του οδήγησε στο να ανταποκριθώ στην επιστημονική πρόκληση και να αποδεχτώ την πρόσκλησή του για τη συγγραφή ενός προσκεκλημένου άρθρου ανασκόπησης, το οποίο βασίζεται στην παρούσα διατριβή, και αναμένεται σύντομα να εμφανιστεί στη διεθνή βιβλιογραφία από τον Εκδοτικό Οίκο Springer στον Τόμο με τίτλο «Marine Derived Biomaterials for Tissue Engineering Applications».

Ευχαριστώ, επίσης, τον Καθηγητή του Τμήματος Μηχανικών Επιστήμης Υλικών, κ. Δημήτριο Γουρνή και τον Επίκουρο Καθηγητή του Τμήματος Μηχανικών Επιστήμης Υλικών, κ. Αλέξανδρο Καράντζαλη για την ευγενική τους συμμετοχή στην Εξεταστική Επιτροπή της Διπλωματικής Εργασίας.

Ευχαριστώ πολύ, τέλος, την οικογένειά μου, που πάντα με υποστηρίζει και με συντροφεύει σε όλες τις επιλογές μου.

Δρ. Νεφέλη Λαγοπάτη
Ιωάννινα, 2018

ΠΙΝΑΚΑΣ ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΩΝ

ΠΡΟΛΟΓΟΣ	v
ΠΕΡΙΛΗΨΗ	xi
ΛΕΞΕΙΣ-ΚΛΕΙΔΙΑ.....	xii
ABSTRACT	xiii
KEY-WORDS	xiv
ΠΙΝΑΚΑΣ ΣΥΝΤΟΜΟΓΡΑΦΙΩΝ Ή ΣΥΜΒΟΛΙΣΜΩΝ	xv
ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΕΙΚΟΝΩΝ	xvii
ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΠΙΝΑΚΩΝ	xxi
1 ΣΚΟΠΟΣ ΤΗΣ ΕΡΓΑΣΙΑΣ.....	3
2 ΕΡΕΙΣΤΙΚΟΣ ΙΣΤΟΣ, ΣΚΕΛΕΤΙΚΟ ΣΥΣΤΗΜΑ, ΟΣΤΙΚΕΣ ΑΝΤΙΚΑΤΑΣΤΑΣΕΙΣ.....	9
2.1 ΟΡΓΑΝΩΣΗ ΤΗΣ ΖΩΗΣ ΚΑΙ ΟΡΓΑΝΙΣΜΟΣ: ΚΥΤΤΑΡΟ, ΙΣΤΟΙ ΚΑΙ ΟΡΓΑΝΑ	9
2.1.1 Το κύτταρο	9
2.1.2 Ο ιστός - Το όργανο - Το σύστημα οργάνων - Ο οργανισμός	10
2.1.3 Επιθηλιακός ιστός.....	10
2.1.4 Νευρικός ιστός.....	10
2.1.5 Μυϊκός ιστός	11
2.2 ΕΡΕΙΣΤΙΚΟΣ ΙΣΤΟΣ	11
2.2.1 Σκελετικό σύστημα.....	13
2.2.2 Σπονδυλική στήλη.....	14
2.2.3 Σύσταση του οστού	17
2.2.4 Βιολογία και χημεία του οστίτη ιστού.....	19
2.2.5 Κύτταρα οστίτη ιστού και οστική ανακατασκευή.....	21
2.3 ΟΣΤΙΚΕΣ ΑΝΤΙΚΑΤΑΣΤΑΣΕΙΣ	24
2.3.1 Οστικά μοσχεύματα	24
2.3.2 Σπονδυλοδεσία	28
3 ΒΙΟΪΛΙΚΑ, ΙΣΤΙΚΗ ΜΗΧΑΝΙΚΗ.....	33
3.1 ΒΙΟΪΛΙΚΑ	33
3.1.1 Γενικά	33
3.1.2. Επιθυμητά χαρακτηριστικά και ιδιότητες βιοϋλικών	34
3.1.3. Βιοσυμβατότητα	36
3.1.4. Εφαρμογές	38
3.2 ΙΣΤΙΚΗ ΜΗΧΑΝΙΚΗ	42
3.3 ΙΚΡΙΩΜΑΤΑ ΙΣΤΙΚΗΣ ΜΗΧΑΝΙΚΗΣ	44

3.4	ΑΝΑΓΕΝΝΗΤΙΚΗ ΙΑΤΡΙΚΗ	46
4	ΒΙΟΚΕΡΑΜΙΚΑ, ΥΔΡΟΞΥΑΠΑΤΙΤΗΣ	51
4.1	ΒΙΟΚΕΡΑΜΙΚΑ	51
4.1.1	Γενικά	51
4.2	ΕΝΩΣΕΙΣ ΦΩΣΦΟΡΙΚΟΥ ΑΣΒΕΣΤΙΟΥ	52
4.3	ΥΔΡΟΞΥΑΠΑΤΙΤΗΣ (ΗΑ)	56
4.3.1	Δομή - σύσταση - στοιχειομετρία	56
4.3.2	Επιθυμητές ιδιότητες	57
4.3.3	Μέθοδοι σύνθεσης ΗΑ	57
4.3.4	Εφαρμογές, επικαλύψεις ΗΑ	59
5	ΙΚΡΙΩΜΑΤΑ ΗΑ ΒΙΟΛΟΓΙΚΗΣ ΠΡΟΕΛΕΥΣΗΣ	63
5.1	ΕΙΣΑΓΩΓΗ	63
5.2	ΣΟΥΠΙΑ <i>Sepia Officinalis</i>	64
5.2.1	Δομή και σύσταση εσωτερικού κελύφους σουπιάς	65
5.2.2	Μορφολογία εσωτερικού κελύφους σουπιάς	67
5.3	ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΗ ΔΙΑΔΙΚΑΣΙΑ ΥΔΡΟΘΕΡΜΙΚΟΥ ΜΕΤΑΣΧΗΜΑΤΙΣΜΟΥ ΗΑ	70
5.4	ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΜΟΣ ΥΔΡΟΞΥΑΠΑΤΙΤΗ	70
5.5	ΗΑ ΜΕ ΕΝΙΣΧΥΣΗ ΦΘΟΡΙΟΥ	76
6	ΣΥΝΘΕΤΑ ΒΙΟΪΛΙΚΑ ΚΕΡΑΜΙΚΩΝ-ΥΔΡΟΠΗΚΤΩΜΑΤΩΝ	79
6.1	ΣΥΝΘΕΤΑ ΥΛΙΚΑ	79
6.2	ΥΔΡΟΠΗΚΤΩΜΑΤΑ ΣΥΝΘΕΤΩΝ ΒΙΟΪΛΙΚΩΝ	80
6.2.1	Βιοδιασπώμενα πολυμερή	81
6.1.2	Υδροπήκτωμα αλγινικού οξέος	81
6.1.3	Υδροπήκτωμα χιτοζάνης	83
7	ΕΝΙΣΧΥΜΕΝΟ ΙΚΡΙΩΜΑ ΗΑ ΜΕ ΥΔΡΟΠΗΚΤΩΜΑ	89
7.1	ΕΙΣΑΓΩΓΗ	89
7.2	ΕΝΙΣΧΥΣΗ ΙΚΡΙΩΜΑΤΟΣ ΗΑ ΑΠΟ ΚΕΛΥΦΟΣ ΣΟΥΠΙΑΣ ΜΕ ΥΔΡΟΠΗΚΤΩΜΑ ΑΛΓΙΝΙΚΟΥ-ΧΙΤΟΖΑΝΗΣ	89
7.2.1	Μικροδομή και πορώδες	91
8	ΒΙΟΜΙΜΗΤΙΚΗ ΣΥΝΘΕΣΗ ΗΑ ΣΕ ΜΗΤΡΑ ΥΔΡΟΠΗΚΤΩΜΑΤΩΝ	99
8.1	ΕΙΣΑΓΩΓΗ	99
8.2	ΑΝΤΙΔΡΑΣΤΗΡΙΑ, ΣΥΣΚΕΥΕΣ – ΟΡΓΑΝΑ ΚΑΙ ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΗ ΔΙΑΔΙΚΑΣΙΑ	99
9	ΒΙΟΛΟΓΙΚΗ ΑΠΟΔΟΣΗ, ΣΥΣΤΗΜΑΤΑ ΜΕΤΑΦΟΡΑΣ ΦΑΡΜΑΚΩΝ	109
9.1	ΟΣΤΕΟΕΠΑΓΩΓΗ	109

9.2 ΒΙΟΑΠΟΙΚΟΔΟΜΗΣΗ.....	109
9.3 ΕΛΕΓΧΟΣ ΒΙΟΣΥΜΒΑΤΟΤΗΤΑΣ <i>in vitro</i> ΣΕ ΚΥΤΤΑΡΙΚΕΣ ΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΕΣ.....	110
9.4 <i>In vivo</i> ΕΛΕΓΧΟΣ ΤΩΝ ΙΚΡΙΩΜΑΤΩΝ ΜΕ ΕΜΦΥΤΕΥΣΕΙΣ ΣΕ ΠΕΙΡΑΜΑΤΟΖΩΑ.....	113
10 ΣΥΣΤΗΜΑΤΑ ΜΕΤΑΦΟΡΑΣ ΦΑΡΜΑΚΩΝ.....	125
11 ΣΥΖΗΤΗΣΗ, ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ & ΠΡΟΤΑΣΕΙΣ ΓΙΑ ΜΕΛΛΟΝΤΙΚΗ ΕΡΕΥΝΑ	131
ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ	137
ΕΛΛΗΝΙΚΗ.....	137
ΞΕΝΟΓΛΩΣΣΗ.....	138

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Η αύξηση του προσδόκιμου ζωής, ως αποτέλεσμα των επιτευγμάτων της ιατρικής και άλλων επιστημών που συμβάλλουν θετικά προς αυτή την κατεύθυνση, σε συνδυασμό με τα υψηλά ποσοστά ατυχημάτων, δημιουργεί επιτακτικά την ανάγκη για αντικατάσταση ή αναγέννηση ιστών που έχουν υποστεί σημαντική βλάβη, πάσχουν από κάποια εκφυλιστική πάθηση ή δεν υπάρχουν πια. Η αναγεννητική ιατρική είναι ένας διεπιστημονικός κλάδος που στοχεύει να καλύψει αυτές τις ανάγκες, με τη βοήθεια της ιστομηχανικής. Εστιάζοντας τα ενδιαφέρον στους σκληρούς, κυρίως, οστικούς ιστούς, είναι απαραίτητη, επομένως, η ανάπτυξη καινοτόμων ικριωμάτων, που μπορούν να ευνοήσουν την οστεογένεση στο νέο-σχηματιζόμενο οστό.

Η εργασία αυτή εκπονήθηκε και συγγράφτηκε έτσι ώστε να αποτυπώσει με έναν ολοκληρωμένο τρόπο την ανάπτυξη βιοϋλικών με βάση τον υδροξυαπατίτη (HA) φυσικής προέλευσης. Μέσω ενδελεχούς ανασκόπησης μίας εκτενούς βιβλιογραφίας, παρουσιάζεται το διεπιστημονικό υπόβαθρο, βάσει του οποίου γίνεται η ανάπτυξη αυτών των υλικών, με στόχο την εφαρμογή τους στην αναγεννητική και χειρουργική ορθοπεδική. Με σκοπό να αναδειχτεί η διεπιστημονικότητα της φύσης αυτού του αντικειμένου έρευνας, χωρίς να διαρραγεί η επιστημονική συνέχεια, μέσω του τρόπου παρουσίασης, θεωρήθηκε σκόπιμο να μην γίνει διαχωρισμός εισαγωγικού και πειραματικού μέρους, και η εργασία να έχει τη δομή άρθρου ανασκόπησης, και όχι ενός επιστημονικού άρθρου.

Το οστό είναι σύνθετο νανοϋλικό από HA και, κυρίως, κολλαγόνο, ως οργανική-πολυμερική φάση. Η δομή αυτή του προσδίδει κεραμική φύση, αλλά και ελαστικότητα. Η ανάπτυξη πορώδων ικριωμάτων HA για χρήση τους ως οστικά υποκατάστατα παρουσιάζει μεγάλο ερευνητικό ενδιαφέρον. Αυτό μπορεί να προσεγγιστεί με την κατασκευή κάποιου φορέα, που όταν εμφυτευθεί στην επιλεγμένη περιοχή του οστού, θα δώσει εκεί τα κατάλληλα φάρμακα, ή τα απαιτούμενα κύτταρα, ή τα κατάλληλα γεωμετρικά, χημικά, ή βιολογικά ερεθίσματα και τους παράγοντες που μπορούν να επιτελέσουν το έργο της ανασύνθεσης του κατεστραμμένου ιστού. Έτσι, η σχεδίαση ενός ιδανικού ικριώματος για πλήρωση οστικών ελλειμμάτων θα μπορούσε να περιλαμβάνει ένα πορώδες σύνθετο βιοενεργό βιοϋλικό. Το πορώδες θα ευνοήσει τη διείσδυση, αμέσως μετά την εμφύτευση, των βιολογικών υγρών και των κυττάρων του αίματος, και σε επόμενο στάδιο θα καθοδηγήσει την αγγείωση και θα επάγει το σχηματισμό του οστίτη ιστού. Το υλικό μπορεί να αποτελείται από μία βιοδιασπώμενη πολυμερική μήτρα και από ένα βιοκεραμικό κεραμικό υλικό, παρουσιάζοντας χαρακτηριστικά

βιοενεργότητας και βιοαπορροφησιμότητας και τις απαραίτητες μηχανικές ιδιότητες κατά τη διάρκεια της οστεοενσωμάτωσης και οστεοσύνθεσης του νεοσχηματιζόμενου οστού. Παρουσιάζονται δύο προσεγγίσεις ενός τέτοιου σχεδιασμού: η πρώτη αφορά στη διείδυση πορώδους πολυμερικού αφρού υδροπηκτώματος σε πορώδη HA και η δεύτερη βιομιμητικό σχηματισμό σωματιδίων HA σε μήτρα από πολυμερικό υδροπήκτωμα. Στην περίπτωση της *in situ* βιομιμητικής σύνθεσης HA, μέσα στη μήτρα των υδροπηκτωμάτων, η πιο σημαντική πρόκληση είναι ο HA να έχει χαρακτηριστικά βιολογικού νανο-απατίτη. Στην περίπτωση σύνθεσης με διείδυση υδροπηκτώματος σε HA, η λήψη HA έγινε από πρώτες ύλες θαλάσσιας προέλευσης, και συγκεκριμένα από το εσωτερικό κέλυφος της σουπιάς *Sepia Officinalis*, το οποίο μετασχηματίστηκε σε HA με υδροθερμικό μετασχηματισμό. Η επιλογή αυτή συγκεντρώνει πλεονεκτήματα από τεχνική άποψη, αλλά και λόγω μεγάλης διαθεσιμότητας σε παγκόσμια κλίμακα, καθώς και χαμηλού κόστους. Τα υδροπηκτώματα είναι δημοφιλή στην ιατρική και ερευνώνται ευρέως ως ικρίωματα για πιθανές εφαρμογές στην ιστομηχανική. Η εργασία αυτή εστιάζει σε δύο υδροπηκτώματα φυσικής προέλευσης, τα βιοδιασπώμενα υδροπηκτώματα που βασίζονται στο αλγινικό οξύ και τη χιτοζάνη. Παρουσιάζεται πώς τα λυοφιλοποιημένα αυτά υδροπηκτώματα μπορούν να ενισχύσουν το ικρίωμα το πορώδους HA. Το τελικό βιοϋλικό, συγκεντρώνει πολλά πλεονεκτήματα, ως προς το χειρισμό του από το χειρουργό, αλλά και ως προς τις βιοενεργές του ιδιότητες.

Σημαντικό στάδιο της μελέτης της ανάπτυξης νέων βιοϋλικών και ικριωμάτων είναι πάντα η *in vitro* συμπεριφορά σε κυτταροκαλλιέργειες, καθώς και ο *in vivo* έλεγχος με εμφύτευση των ικριωμάτων σε πειραματόζωα. Και οι δύο αυτές πτυχές περιγράφονται και αναλύονται στην εργασία αυτή, για τα ίδια τα υλικά που κατασκευάστηκαν, αλλά και υπό ένα ευρύτερο φάσμα και οπτική. Επίσης παρουσιάζονται και οι προοπτικές των υλικών αυτών αναφορικά με την πιθανή ανάπτυξη συστημάτων μεταφοράς και απελευθέρωσης φαρμάκων. Στο τελευταίο μέρος, η εργασία εστιάζει το ενδιαφέρον της σε μία γενική συζήτηση με απώτερο σκοπό να αναδειχτούν μελλοντικές προοπτικές, ως φυσική απόρροια των πρόσφατων επιτευγμάτων και της γνώσης που διαθέτουμε σε αυτό το πολλά υποσχόμενο και ταχύτατα αναπτυσσόμενο, αλλά πάντα με καθαρά ανθρωποκεντρικό χαρακτήρα, διεπιστημονικό πεδίο.

ΛΕΞΕΙΣ-ΚΛΕΙΔΙΑ

Υδροξυαπατίτης (HA), υδροθερμικός μετασχηματισμός, εσωτερικό κέλυφος σουπιάς, ικρίωματα ιστομηχανικής, βιομιμητική σύνθεση, υδροπηκτώματα, αλγινικό οξύ, χιτοζάνη, οστικά ελλείμματα, οστικά μοσχεύματα, οστεοβλάστες, πειραματόζωα, *in vitro*, *in vivo*.

ABSTRACT

Hydroxyapatite biomaterials, produced from cuttlefish bone via hydrothermal transformation, for application in tissue engineering and drug delivery systems

Nefeli Lagopati

Department of Materials Science and Engineering, School of Engineering,

University of Ioannina, Greece

An increase in life expectancy due to improvements in healthcare, in parallel with high percentage of injuries, because of traffic accidents and sport activities, has emerged as the primary reasons for the replacements of lost, infected, and damaged bones. Combined with tissue engineering, this is an area of great interest to regenerative medicine. In orthopedics, novel scaffolds development, providing a suitable environment that can favor osteoinduction for the newly formed bone is needed. Composite porous hydrogels, based on alginic acid and chitosan with the dispersed phase from powders of bioceramics, such as hydroxyapatite (HA), are recently developed for this reason.

This study was structured and written in order to present an integrated way of the development of biomaterials, based on hydroxyapatite (HA) of natural origin. The extensive review of the literature, regarding to the development of biomaterials, which can be reliably utilized in orthopedics and maxillofacial surgery was obligatory in order to highlight the interdisciplinary nature of this research object, and the timelessness of its importance. In this way, it was advisable the form of this dissertation to simulate the form of a review article, meaning that the introduction and the experimental part are not separately presented.

Natural bone can be considered as a composite nanomaterial based on HA and collagen, as the main compound of the organic polymeric phase. This structure allows to bone behaving as a bioceramic with important elasticity. Artificially, a structure which could resemble the microstructure and the texture of the natural bone, would be a scaffold with the potential to release drugs, or cells, or growth factors or activate appropriate biological, physical and chemical stimuli, to induce hard tissue regeneration. The selection of a porous composite bioactive biomaterial favors the penetration of biological liquids and blood cells, post implantation of the scaffold. Angiogenesis and bone tissue formation are following. In

this work, a reverse and a novel approach, of the design and production of 3D HA-scaffold enriched with two popular hydrogels, based on alginic acid and chitosan are reported. The first method includes the hydrogel penetration into a porous HA and the second approaches the development of this scaffold from a biomimetic point of view, namely the formation of HA (nano) particles inside a polymeric matrix made of the previously mentioned hydrogels. This reinforcement of HA with alginate or chitosan hydrogels, through infiltration method gives to the final product proper mechanical potential for hard tissue regeneration. More specifically, HA is usually obtained from aragonite from cuttlefish bones (CB) from the species *Sepia Officinalis* and via hydrothermal transformation. The worldwide availability and the low cost of cuttlefish bone, along with their biological-natural origin are attractive features making them highly sorted material used in the preparation of advanced scaffolds containing HA for applications in biomedicine. These advanced scaffolds are easily handled by the surgeon while maintaining their porous structure during the implantation process to promote the regeneration of newly formed bone tissue. In particular, once such a scaffold is implanted in an area where the bone tissue is lost, biological liquids will be able to penetrate into the pores of the lyophilized composite scaffold. The polymeric matrix will then be dissolved and the remaining HA, or its precursor compounds, which will eventually transform into HA, will promote osteoinduction.

In vitro and *in vivo* studies of the developed biomaterials and scaffolds are required. Also, the prospects of these materials are presented with regard to the possible development of drug delivery systems.

The optimization of the fabrication technique is required to unravel the endless potential of biomaterials, shedding light on this promising interdisciplinary field, which includes both tissue engineering and drug delivery system approaches.

KEY-WORDS

Hydroxyapatite (HA), hydrothermal transformation, cuttlefishbone, tissue engineering scaffolds, biomimetic synthesis, hydrogels, alginate, chitosan, bone deficiencies, bone implants, osteoblasts, οστικά μοσχεύματα, osteoblasts, lab animals, *in vitro*, *in vivo*.

ΠΙΝΑΚΑΣ ΣΥΝΤΟΜΟΓΡΑΦΙΩΝ Ή ΣΥΜΒΟΛΙΣΜΩΝ

HA: Υδροξυαπατίτης

BMPs: Οστικές μορφογενετικές πρωτεΐνες (Bone Morphogenetic Proteins)

OCP: οκτα-φωσφορικό οκτα-ασβέστιο (octa-calcium phosphate, $\text{Ca}_8\text{H}_2(\text{PO}_4)_6$)

TGF- β : (Transforming Growth Factor- β) Μεταμορφωτικός αυξητικός παράγοντας – βήτα

PLGA: πολύ(γαλακτικό-γλυκολικό) οξύ

PLA: πολυγαλακτικό οξύ

ES: εμβρυονικά κύτταρα

BM-MSCs: πολυδύναμα μεσεγχυματικά προγονικά κύτταρα προερχόμενα από το μυελό των οστών

UC-MSCs: πολυδύναμα μεσεγχυματικά προγονικά κύτταρα, προερχόμενα από ομφάλιο λώρο

CHAp: ανθρακικός απατίτης

PGA: πολυγλυκόλη

PLLA: πολυλακτικό οξύ

FTIR: Fourier-transform infrared spectroscopy - Φασματοσκοπία Υπερύθρου

SEM: Scanning Electron Microscope - ηλεκτρονικό μικροσκόπιο σάρωσης

EPMA: Electron probe micro-analyzer - Ηλεκτρονική Μικροανάλυση

PTFE: πολυτετραφθοροαιθυλένιο

PE: πολυαιθυλένιο

PET: τερεφθαλικό πολυαιθυλένιο

UHMWPE: Ultra-high-molecular-weight polyethylene - πολυαιθυλένιο

β -TCP: τριβασικό φωσφορικό ασβέστιο

BCP: διφασικό φωσφορικό ασβέστιο

ACP: άμορφο φωσφορικό ασβέστιο ($\text{Ca}_9(\text{PO}_4)_6$)

DCPD: ένυδρο φωσφορικό διασβέστιο ($\text{CaHPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$) - μπρουσίτης

GDL: γλουκονολακτόνη

SOM: soluble organic matrix proteins –πρωτεΐνες διαλυτής οργανικής μήτρας

chf: το κατώτερο τμήμα του θαλάμου του εσωτερικού οστού της σουπιάς

chr: κάθετες δομές αραγονίτη σε μορφή βελόνας

p: πυλώνες του θαλάμου του εσωτερικού οστού της σουπιάς - pillar

vm: κάθετη μεμβράνη

s: διάφραγμα - septum

hm: οριζόντια μεμβράνη

pm: περιφερική μεμβράνη

ds: ραχιαία θωράκιση

DTA/TGA: differential thermal analysis - thermal gravimetric analysis / διαφορική θερμική ανάλυση – Θερμοβαρυμετρική ανάλυση

XRD: Περίθλαση ακτίνων X - X-ray diffraction

JCPDS: Joint Committee on Powder Diffraction Standards - Επιτροπή για τα Πρότυπα Περίθλασης Ακτίνων X

ICDD: International Centre for Diffraction Data – Διεθνές Κέντρο για δεδομένα Περίθλασης Ακτίνων X

TCP: γουιτλοκίτης - τριβασικό φωσφορικό ασβέστιο

FA: φθοραπατίτης

TTCP: τετραβασικό φωσφορικό ασβέστιο

HAF: ενισχυμένος με φθόριο υδροξυαπατίτης

FBS: ορός εμβρύου βοός (fetal bovine serum)

MTT: βρωμιούχο 3-(4, 5-διμεθυλο-θειαζόλιο)-2, 5-διφαινυλο-τετραζόλιο [3-(4, 5-dimethylthiazole-2-yl)-2, 5-diphenyltetrazolium bromide]

PBS: ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών αλάτων PBS (phosphate buffer saline)

EDTA: αιθυλενο-διαμινο-τετραοξικό οξύ (ethylene diamine tetra acetic acid)

SDS: δωδέκυλο θειικό νάτριο - sodium dodecyl sulphate

ALP: αλκαλική φωσφατάση

BCIP–NBT: 5-βρωμο-4-χλωρο-3-ινδολυλο-φωσφορικό / Κυανούν του νιτροτετραζολίου - 5-bromo-4-chloro-3-indolyl-phosphate / Nitro blue tetrazolium

CLSM: συνεστιακό μικροσκόπιο σάρωσης με laser - Confocal Laser Scanning Microscopy

DAPI: 6-διαμιδινο-2-φενυλινδόλιο - 4',6-Diamidino-2-Phenylindole, Dilactate

PMMA: πολυμεθακρυλικό μεθύλιο (polymethylmethacrylate)

ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΕΙΚΟΝΩΝ

Εικόνα 2.1. Κυτταρική διαφοροποίηση. Κατά την κυτταρική διαφοροποίηση, τα κύτταρα αποκτούν διαφορετικά μορφολογικά και λειτουργικά χαρακτηριστικά για να επιτελούν αποτελεσματικά τις εξειδικευμένες λειτουργίες τους (Ανατύπωση από http://el.science.wikia.com – με επεξεργασία).....	9
Εικόνα 2.2 Τομή μακρύ οστού και διάκριση ιστών	12
Εικόνα 2.3 Ο ανθρώπινος σκελετός	14
Εικόνα 2.4 Σπονδυλική Στήλη. α) σπονδυλικές μοίρες. β) εμπρόσθια, οπίσθια και πλάγια όψη της σπονδυλικής στήλης.	16
Εικόνα 2.5 Μορφολογία Σπονδύλων.....	16
Εικόνα 2.6 Πλάγια και άνω όψη σπονδύλων. (α) Πλάγια όψη και (β) Άνω όψη ενός τυπικού σπονδύλου.	16
Εικόνα 2.7 Άνω και πρόσθια όψη του τέταρτου οσφυϊκού σπονδύλου. (α) Άνω όψη και (β) πρόσθια όψη.	17
Εικόνα 2.8 Φάσεις οστικής ανακατασκευής (Καραμπάς, 2011).....	23
Εικόνα 2.9 Εικόνα Σπονδυλοδεσίας (Χριστόπουλος).....	29
Εικόνα 3.1 Εφαρμογές βιοϋλικών (Κατσικογιάννη, 2008).....	39
Εικόνα 3.2 Αντικατάσταση κεφαλής μηριαίου. (α) εμφύτευμα ολικής αντικατάστασης ισχίου, με δίσκο φτιαγμένο από HA που εφαρμόζει στο μηριαίο οστό. (β) εφαρμογή εμφυτεύματος στο ανθρώπινο ισχίο.	40
Εικόνα 3.3 Οδοντικά μικροεμφυτεύματα.....	41
Εικόνα 3.4 Βασική Αρχή της μηχανικής των ιστών. Η αρχή της ιστοτεχνολογίας βασίζεται στο ότι οι ιστοί μπορούν να απομονωθούν από έναν ασθενή, να ανακατασκευαστούν τεχνητά σε μια καλλιέργεια κυττάρων (<i>in vitro</i>) και στη συνέχεια να εμφυτευθούν (<i>in vivo</i>) ως υποκατάστατο ιστού (Χατζηνικολαΐδου, 2015).	43
Εικόνα 5.1 Σουπιά <i>Sepia Officinalis</i>	65
Εικόνα 5.2 Εικόνα δομής HA με περίθλαση ακτίνων Χ. Η πορώδης δομή των ικριωμάτων υδροξυαπατίτη σε ανάλυση με περίθλαση ακτίνων Χ, επιτρέπει την ανίχνευση σε οριζόντια και κάθετη διεύθυνση (Ανατύπωση από Rocha et al., 2005).	68
Εικόνα 5.3 Δομή των θαλάμων α) Τομή από το διάφραγμα και την έναρξη του πυλώνα. Το κατώτερο τμήμα του θαλάμου συμβολίζεται με chf. Το ανώτερο τμήμα αποτελείται από κάθετες δομές αραγονίτη σε μορφή βελόνας (chr). β) νεότερος θάλαμος που δείχνει προσθιοπίσθια ευθυγραμμισμένους πυλώνες και επικλινείς κατακόρυφες μεμβράνες (πυλώνες (p), κάθετη μεμβράνη (vm)). γ) Κάθετες τομές της επιφάνειας των πυλώνων, με δενδριτικά περιγράμματα. δ) Κάθετες ενός πυλώνα, με σχηματισμό που αποτελείται από εξογκώματα στις άκρες. ε) Τομή διαμέσου ενός εγκάρσιου τμήματος πυλώνα και του διαφράγματος. Υπάρχει χαλαρή προσκόλληση των δύο στοιχείων, καθώς οι ίνες αραγονίτη συνθέτουν τον πυλώνα (διάφραγμα (s), πυλώνας (p)). στ) Πλευρική όψη της εγκάρσιας τομής ενός πυλώνα και του παρακείμενου διαφράγματος (διάφραγμα (s), οριζόντια μεμβράνη (hm)). ζ) Σπασμένη εγκάρσια άκρη πυλώνα δημιουργεί έναν οργανικό «φάκελο» (περιφερική μεμβράνη (pm), οριζόντια μεμβράνη (hm)). η) Τμήμα διαμέσου ενός ενσωματωμένου και στιλβωμένου νεότερου δείγματος (ραχιαία θωράκιση (ds), διάφραγμα (s), πυλώνας (p)). (οι εικόνες α, β, γ, δ, ε, ζ, η είναι εικόνες μεγάλης ευκρίνειας δευτερογενών ηλεκτρονίων σε μικροσκοπία SEM. Η εικόνα στ είναι εικόνα ηλεκτρονίων οπισθοσκέδασης). (Αντύπωση από Checa et al., 2015).	69

Εικόνα 5.4 Περιθλασιογράφημα ακτίνων Χ από σκόνη από κέλυφος σουπιάς μετά από υδροθερμικό μετασχηματισμό 6 ωρών με $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$.	72
Εικόνα 5.5 α) Φασματοφωτόμετρο IR, β) υδραυλική πρέσα, γ) σκεύη και αντιδραστήρια για παρασκευή των δισκίων.	72
Εικόνα 5.6 Φάσμα υπερύθρου (FTIR). Σύγκριση φάσματος κελύφους της σουπιάς με το φάσμα του CaCO_3 από 400-1600 cm^{-1} .	72
Εικόνα 5.7 Πλάγια όψη του θαλάμου, με τα κύρια μέρη του (διάφραγμα (s), πυλώνας (p), οριζόντια μεμβράνη (hm), κατακόρυφη μεμβράνη (vm) (Ανατύπωση από Checa et al., 2015)	73
Εικόνα 5.8 Τρισδιάστατη όψη του ικρίωματος του HA από υδροθερμικά μετασχηματισμένο και πυροσυσσωματωμένο κέλυφος σουπιάς. Διακρίνεται η δομική ανισοτροπία του, το πορώδες και η ενδοσύνδεση των πόρων.	73
Εικόνα 5.9 Μετά τον υδροθερμικό μετασχηματισμό και τη πυροσυσσωμάτωση στους 1250°C, το προκύπτον ικρίωμα του υδροξυαπατίτη HA διατηρεί τη δομική ακεραιότητα του αρχικού κελύφους της σουπιάς.	74
Εικόνα 6.1 Χημική δομή αλγινικού οξέος.	81
Εικόνα 6.2 Χημική δομή χιτοζάνης.	84
Εικόνα 7.1 α) 3D απεικόνιση τμήματος κελύφους σουπιάς και β) ικρίωμα HA από κέλυφος σουπιάς μετά από υδροθερμικό μετασχηματισμό και πυροσυσσωμάτωση στους 1250 °C (Τόρη, 2016).	90
Εικόνα 7.2 α) Τοποθέτηση ικρίωματος στο υδροπήκτωμα, β) μετά από απαέρωση και γ) διεύθυνση υδροπηκτώματος στο ικρίωμα.	91
Εικόνα 7.3 Διάγραμμα ποροσιμετρίας υδραργύρου ικρίωματος HA από κέλυφος σουπιάς μετά από υδροθερμικό μετασχηματισμό και πυροσυσσωμάτωση στους 1250°C για 1 ώρα.	92
Εικόνα 7.4 Τρισδιάστατη όψη του ικρίωματος του HA από υδροθερμικά μετασχηματισμένο και πυροσυσσωματωμένο κέλυφος σουπιάς, όπου διακρίνεται η δομική ανισοτροπία του, το πορώδες και η ενδοσύνδεση των πόρων.	92
Εικόνα 7.5 Μετά τον υδροθερμικό μετασχηματισμό και τη πυροσυσσωμάτωση στους 1250°C, το προκύπτον ικρίωμα του υδροξυαπατίτη HA διατηρεί τη δομική ακεραιότητα του αρχικού κελύφους της σουπιάς. Οι πόροι έχουν ιδανικό μέγεθος, περίπου 80 μm x 120 μm (α), και ενδοσύνδεση (β), τα οποία, σε συνδυασμό με το γεγονός ότι το ικρίωμα είναι από ανθρακικά υποκατεστημένο HA, μπορούν να ευνοήσουν την αγγείωση και την οστεοενσωμάτωση, οστεοκαθοδήγηση και οστεοεπαγωγή.	93
Εικόνα 7.6 Μικροδομή εμποτισμένων ικριωμάτων HA με υδροπήκτωμα αλγινικού, μετά από λυοφιλοποίηση.	94
Εικόνα 7.7 Μικροδομή εμποτισμένων ικριωμάτων HA με υδροπήκτωμα χιτοζάνης, μετά από λυοφιλοποίηση.	94
Εικόνα 7.8 Σχηματική Αναπαράσταση της εμβάπτισης του ικρίωματος σε διάλυμα φαρμακευτικού παράγοντα.	95
Εικόνα 8.1 Παρατήρηση του υδροπηκτώματος αλγινικού οξέος με Ca^{2+} , με προσθήκη διαλύματος Na_2HPO_4 0,3M, δεξιά και CaCl_2 0,5M, αριστερά του υοειδούς σωλήνα, κατά την 1η, 2η, 4η και 14 ^η μετά την προσθήκη.	101
Εικόνα 8.2 Παρατήρηση του υδροπηκτώματος αλγινικού οξέος χωρίς Ca^{2+} , με προσθήκη διαλύματος Na_2HPO_4 0,3M, δεξιά και CaCl_2 0,5M, αριστερά του υοειδούς σωλήνα, κατά την 1η, 2η, 4η και 14 ^η μετά την προσθήκη.	102

Εικόνα 8.3 Παρατήρηση του υδροπηκτώματος χιτοζάνης, με προσθήκη διαλύματος Na_2HPO_4 0,3M, δεξιά και CaCl_2 0,5M, αριστερά του υοειδούς σωλήνα, κατά την 1η, 2η, 4η και 14 ^η μετά την προσθήκη.	102
Εικόνα 8.4 Παρατήρηση του υδροπηκτώματος αλγινικού-χιτοζάνης, με προσθήκη διαλύματος Na_2HPO_4 0,3M, δεξιά και CaCl_2 0,5M, αριστερά του υοειδούς σωλήνα, κατά την 1η, 2η, 4η και 14 ^η μετά την προσθήκη.	103
Εικόνα 8.5 Φάσματα υπέρυθρου (FTIR). Φάσμα υπέρυθρου των υδροπηκτωμάτων του αλγινικού με Ca^{2+} , του αλγινικού χωρίς Ca^{2+} , της χιτοζάνης και του υδροπηκτώματος αλγινικού-χιτοζάνης με διάλυμα CaCl_2 0,5M και Na_2HPO_4 0,3M καθώς και τα φάσματα του υδροξυαπατίτη (HA) και του μπρουσίτη (DCPD) από (α) 400 – 4000 cm^{-1} και (β) 400-1800 cm^{-1}	104
Εικόνα 8.6 Περιθλασιογράφημα σκόνης μπρουσίτη που καταβυθίστηκε από αντίδραση CaCl_2 (0,5 M) και Na_2HPO_4 (0,3 M).....	105
Εικόνα 9.1 Οξείδωση MTT. Η οξείδωση του MTT πραγματοποιείται μόνο όταν τα μιτοχονδριακά ένζυμα είναι μεταβολικώς ενεργά και συνεπώς η παραγωγή κρυστάλλων φορμαζάνης πραγματοποιείται μόνο στα βιώσιμα κύτταρα (ανατύπωση από Plumb, 2004).	111
Εικόνα 9.2 Υποδόρια εμφύτευση α) ικρίωματος HA από υδροθερμικά μετασχηματισμένο και πυροσυσσωματωμένο κέλυφος σουπιάς και β) ικρίωματος αλγινικού-χιτοζάνης.	116
Εικόνα 9.3 Συλλογή εμφυτευμάτων μετά από τέσσερις εβδομάδες υποδόριας εμφύτευσης. α) Ικρίωμα HA από υδροθερμικά μετασχηματισμένο και πυροσυσσωματωμένο κέλυφος σουπιάς (αριστερά της ράχης του ζώου) και β) ικρίωμα αλγινικού-χιτοζάνης (δεξιά της ράχης του ζώου).	116
Εικόνα 9.4 Τοποθέτηση ικριωμάτων ανάμεσα στις εγκάρσιες και ακανθώδεις αποφύσεις της σπονδυλικής στήλης επίμυ. α) Ικρίωμα HA από υδροθερμικά μετασχηματισμένο και πυροσυσσωματωμένο κέλυφος σουπιάς (αριστερή πλευρά της σπονδυλικής στήλης του ζώου) και β) ικρίωμα αλγινικού-χιτοζάνης (δεξιά πλευρά της σπονδυλικής στήλης του ζώου).	118
Εικόνα 9.5 Συλλογή εμφυτευμάτων μετά από εμφύτευση 30 ημερών στη σπονδυλική στήλη. α) Ικρίωμα HA από υδροθερμικά μετασχηματισμένο και πυροσυσσωματωμένο κέλυφος σουπιάς και β) ικρίωμα αλγινικού-χιτοζάνης.	118
Εικόνα 9.6 Εμφύτευση ικριωμάτων α) Εμφύτευση ικρίωματος HA (από υδροθερμικά μετασχηματισμένο και πυροσυσσωματωμένο κέλυφος σουπιάς) ενισχυμένο με υδροπήκτωμα αλγινικού (με infiltration) και β) εμφύτευση ικρίωματος αλγινικού-χιτοζάνης και σταθεροποίηση αυτού με βιοαπορροφήσιμο ράμμα.	119
Εικόνα 9.7 Συλλογή εμφυτεύματος από υδροπήκτωμα αλγινικού-χιτοζάνης μετά από ένα μήνα εμφύτευσης (μικρή εικόνα). Στην ίδια τομή δεν βρέθηκε, από την άλλη πλευρά της σπονδυλικής στήλης, το ικρίωμα του HA ενισχυμένο με αλγινικό υδροπήκτωμα, λόγω απορρόφησης.	120

ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΠΙΝΑΚΩΝ

Πίνακας 4.1. Κατηγορίες βιοκεραμικών και τύπος σύνδεσης ιστών	Σελ. 52
Πίνακας 4.2. Ενώσεις φωσφορικού αβεστίου (Dorozhkin & Erple, 2002)	Σελ. 55

Σκοπός της εργασίας

Κεφάλαιο

1

1 ΣΚΟΠΟΣ ΤΗΣ ΕΡΓΑΣΙΑΣ

Η εργασία αυτή εκπονήθηκε και συγγράφτηκε με τέτοιο τρόπο ώστε να αποτυπώσει με έναν ολοκληρωμένο τρόπο την ανάπτυξη βιοϋλικών που έχουν βάση τον υδροξυαπατίτη (HA) φυσικής προέλευσης που έχουν σκοπό την εφαρμογή τους στην αναγεννητική ορθοπεδική και γναθοπροσωπική ιατρική και χειρουργική. Στην εργασία αυτή, μέσω μίας ενδελεχούς ανασκόπησης μίας εκτενούς βιβλιογραφίας, παρουσιάζεται αναλυτικά το ιατρικό υπόβαθρο, σε βάθος και ανάλυση, τόσο όση απαιτείται για το Μηχανικό Υλικών, υπό την οπτική της εμβιομηχανικής, βάσει του οποίου γίνεται η ανάπτυξη νέων βιοϋλικών που θα μπορούν να χρησιμοποιηθούν με αξιοπιστία στην ορθοπεδική. Το ενδιαφέρον εστιάζεται στην ανάγκη της πλήρωσης οστικών ελλειμμάτων καθώς και της οστικής ανακατασκευής με μεθόδους και προσεγγίσεις της ιστομηχανικής (tissue engineering), βιομιμητικές μεθόδους, και τεχνικές σταδιακής, στοχευμένης τοπικά και ελεγχόμενης χρονικά, απελευθέρωσης φαρμάκων (drug delivery systems). Για την επίτευξη της προσέγγισης αυτής, δηλαδή θεωρώντας αυτήν την προσέγγιση ως την ουσιαστική υπόθεση εργασίας στην παρούσα μελέτη, με σκοπό να μη διαρραγεί η επιστημονική συνέχεια της παρουσιάσής της, αλλά ταυτόχρονα και να αναδειχτεί η διεπιστημονικότητα της φύσης αυτού του αντικειμένου έρευνας, δεν γίνεται διαχωρισμός εισαγωγικού και πειραματικού μέρους, αλλά η όλη εργασία έχει συγγραφεί με τη δομή ενός άρθρου ανασκόπησης (review article), παρά ενός επιστημονικού άρθρου (original article).

Το οστό είναι ουσιαστικά ένα σύνθετο νανο-υλικό από HA και, κυρίως, κολλαγόνο, ως οργανική-πολυμερική φάση. Η δομή αυτή προσδίδει στο οστό σαφή κεραμική φύση, αλλά ταυτόχρονα και ελαστικότητα. Η ανάπτυξη πορωδών ικριωμάτων HA για χρήση τους ως οστικά υποκατάστατα παρουσιάζει πολύ μεγάλο ερευνητικό ενδιαφέρον. Αυτό μπορεί να προσεγγιστεί με την κατασκευή κάποιου φορέα, δηλαδή ενός ικριώματος (scaffold), το οποίο, όταν εμφυτευθεί στην κατεστραμμένη-απολεσθείσα ή ημικατεστραμμένη περιοχή του οστού, θα δώσει σε αυτήν τα κατάλληλα φάρμακα, ή τα απαιτούμενα κύτταρα, και γενικά, τα κατάλληλα γεωμετρικά, χημικά, ή βιολογικά ερεθίσματα και τους παράγοντες που μπορούν να επιτελέσουν το έργο της ανασύνθεσης του κατεστραμμένου ή απολεσθέντος ιστού.

Υπό την παραπάνω έννοια/προσέγγιση, η σχεδίαση ενός ιδανικού ικριώματος για πλήρωση οστικών ελλειμμάτων θα μπορούσε να περιλαμβάνει ένα πορώδες σύνθετο

βιοενεργό (ή/και βιοδιασπώμενο) βιοϋλικό. Το πορώδες θα ευνοήσει τη διείσδυση, αμέσως μετά την εμφύτευση, των βιολογικών υγρών και των κυττάρων του αίματος, και σε επόμενο (δεύτερο) χρόνο θα καθοδηγήσει την αγγείωση και θα επάγει το σχηματισμό του οστίτη ιστού (οστεοκαθοδήγηση και οστεοεπαγωγή). Το υλικό μπορεί να αποτελείται από μία βιοδιασπώμενη πολυμερική μήτρα και (σε συνδυασμό, υπό τη μορφή σύνθετου υλικού) από ένα βιοκεραμικό κεραμικό υλικό, όπως HA (ή άλλη πρόδρομη ένωση του HA). Έτσι το υλικό αυτό καθαυτό, θα παρουσιάζει χαρακτηριστικά βιοενεργότητας και βιοαπορροφησιμότητας. Επίσης, στα υλικά αυτά μπορούν να ενσωματωθούν (ακινητοποιηθούν) και φάρμακα ή/και αυξητικοί παράγοντες, τα οποία θα απελευθερωθούν σταδιακά μετά την εμφύτευση κατά τη διάλυση της βιοδιασπώμενης φάσης ή λόγω καθαρά φαινομένων εκρόφησης. Τέλος, η δομή του σύνθετου υλικού, θα προσδίδει τις απαραίτητες μηχανικές ιδιότητες καθ' όλη τη διάρκεια της οστεοενσωμάτωσης και οστεοσύνθεσης του νεοσχηματιζόμενου οστού. Στην εργασία αυτή παρουσιάζονται δύο προσεγγίσεις ενός τέτοιου σχεδιασμού: η πρώτη αφορά στη διείσδυση πορώδους πολυμερικού αφρού υδροπηκτώματος σε πορώδη HA και η δεύτερη βιομιμητικό σχηματισμό σωματιδίων HA σε μήτρα από πολυμερικό υδροπήκτωμα.

Η εργασία αυτή εστιάζει το ενδιαφέρον της αποκλειστικά στη χρήση υλικών βιολογικής προέλευσης για την κατασκευή αυτών των σύνθετων βιοϋλικών-ικριωμάτων. Στη βιομιμητική σύνθεση (η δεύτερη περίπτωση), είναι προφανές ότι ικανοποιείται η προϋπόθεση αυτή. Σε αυτήν την περίπτωση της *in situ* βιομιμητικής σύνθεσης HA μέσα στη μήτρα των υδροπηκτωμάτων, η πιο σημαντική πρόκληση είναι ο HA να έχει χαρακτηριστικά βιολογικού νανο-απατίτη.

Στη δε πρώτη προσέγγιση (δηλαδή του πορώδους HA, στον οποίο διεισδύει το υδροπήκτωμα), η λήψη του HA έγινε από πρώτες ύλες με προέλευση το θαλάσσιο κόσμο, που στην εργασία αυτή ήταν το εσωτερικό κέλυφος της σουπιάς *sepia officinalis* (στην καθομιλουμένη λέγεται «κόκκαλο της σουπιάς», εδώ χρησιμοποιείται ο όρος «κέλυφος», με την έννοια ότι τα κελύφη αποτελούνται από ανθρακικά άλατα του ασβεστίου (αραγονίτης) ενώ τα οστά από φωσφορικά άλατα του ασβεστίου, HA). Πέραν των προφανών πλεονεκτημάτων της χρήσης, ως πρώτης ύλης, υλικών που έχει κατασκευάσει με τη σοφία εκατομμυρίων χρόνων η Μητέρα Φύση, καθαρά από τεχνική άποψη, η χρήση των συγκεκριμένων πρώτων υλών φυσικής (και όχι συνθετικής) προέλευσης έχει το

εξαιρετικό πλεονέκτημα της μεγάλης διαθεσιμότητας σε παγκόσμια κλίμακα (επί παραδείγματι, τα κοράλλια έχουν παρόμοιες εξαιρετικές ιδιότητες, ως προς τη δομή και την υφή, για παρόμοια χρήση, όμως υπάρχουν εν αφθονία μόνο στους κοραλλιογενείς υφάλους, οι οποίοι είναι (πολύ σωστά) είδος υπό προστασία), καθώς και του χαμηλού κόστους. Στην εργασία παρουσιάζονται και οι δυνατότητες τροποποίησης του HA, όπως με παραγωγή φθοριοαπατίτη (που είναι μηχανικά ισχυρότερος του HA), ή άλλων πρόδρομων ενώσεων του φωσφορικού ασβεστίου, που ευνοεί τη βιοαπορρόφηση.

Από την άλλη μεριά, τα υδροπηκτώματα (hydrogels) είναι ιδιαίτερα δημοφιλή στην ιατρική και ερευνώνται ευρέως ως ικρίωματα για πιθανές εφαρμογές τους στην ιστομηχανική. Η εργασία αυτή εστιάζει το ενδιαφέρον της σε δύο υδροπηκτώματα φυσικής προέλευσης, τα βιοδιασπώμενα υδροπηκτώματα που βασίζονται στο αλγινικό οξύ και τη χιτοζάνη. Στην εργασία αυτή, παρουσιάζεται πώς τα λυοφιλοποιημένα αυτά υδροπηκτώματα μπορούν να ενισχύσουν το ικρίωμα το πορώδους HA που έχει παραχθεί από υδροθερμικό μετασχηματισμό κελύφους σουπιάς πυροσυσσωματωμένου μετά στους 1250 °C.

Το τελικό βιοϋλικό που παράγεται με αυτόν τον τρόπο, συγκεντρώνει πολλά πλεονεκτήματα, αναφορικά με τις δυνατότητες χειρισμού του από το χειρουργό, αλλά και ως προς τις βιοενεργές του ιδιότητες. Σημαντικό στάδιο της μελέτης της ανάπτυξης τέτοιων νέων βιοϋλικών και ικριωμάτων είναι πάντα η *in vitro* συμπεριφορά σε κυτταροκαλλιέργειες, καθώς και ο *in vivo* έλεγχος με εμφύτευση των ικριωμάτων σε πειραματόζωα. Και οι δύο αυτές πτυχές περιγράφονται και αναλύονται στην εργασία αυτή, και για τα υλικά αυτά καθαυτά που κατασκευάστηκαν, αλλά ιδωμένα και υπό ένα ευρύτερο φάσμα και οπτική. Επίσης, παρουσιάζονται οι προοπτικές των υλικών αυτών αναφορικά με την ανάπτυξη συστημάτων μεταφοράς και απελευθέρωσης φαρμάκων (drug delivery systems).

Στο τελευταίο μέρος, η εργασία εστιάζει το ενδιαφέρον της σε μία γενική συζήτηση με απώτερο σκοπό να αναδειχτούν μελλοντικές προοπτικές, ως φυσική απόρροια των πρόσφατων επιτευγμάτων και της γνώσης που διαθέτουμε σε αυτό το πολλά υποσχόμενο και ταχύτατα αναπτυσσόμενο, αλλά πάντα με καθαρά ανθρωποκεντρικό χαρακτήρα, διεπιστημονικό πεδίο.

*Εραιοστικόσ ιοτόσ,
οκελετικό σύστημα,
οοστικές αντικοαταοστές*

Κεφάλαιο

2

2 ΕΡΕΙΣΤΙΚΟΣ ΙΣΤΟΣ, ΣΚΕΛΕΤΙΚΟ ΣΥΣΤΗΜΑ, ΟΣΤΙΚΕΣ ΑΝΤΙΚΑΤΑΣΤΑΣΕΙΣ

2.1 ΟΡΓΑΝΩΣΗ ΤΗΣ ΖΩΗΣ ΚΑΙ ΟΡΓΑΝΙΣΜΟΣ: ΚΥΤΤΑΡΟ, ΙΣΤΟΙ ΚΑΙ ΟΡΓΑΝΑ

2.1.1 Το κύτταρο

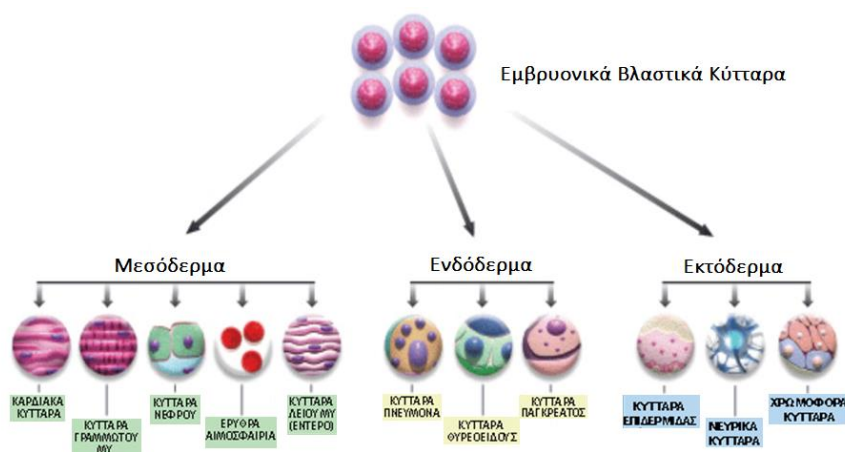
Ο ανθρώπινος οργανισμός συνίσταται από τρισεκατομμύρια κύτταρα. Τα κύτταρα αυτά εμφανίζουν σημαντική ποικιλομορφία, που αφορά στο μέγεθος, το σχήμα, το χρώμα και άλλα χαρακτηριστικά (Alberts et al., 2015).

Η προέλευση των κυττάρων

Όλα τα κύτταρα προέρχονται από ένα αρχικό κύτταρο, το ζυγωτό, με αλληπάλληλες μιτωτικές διαιρέσεις. Τελικά, όμως, αποκτούν διαφορετικά μορφολογικά και λειτουργικά χαρακτηριστικά (Alberts et al., 2015).

Διαφοροποίηση κυττάρων

Τα διαφορετικά αυτά μορφολογικά και λειτουργικά χαρακτηριστικά δημιουργούνται με τη διαδικασία της διαφοροποίησης και τους επιτρέπουν να επιτελούν αποτελεσματικά τις εξειδικευμένες λειτουργίες τους (Εικόνα 2.1).



Εικόνα 2.1. Κυτταρική διαφοροποίηση. Κατά την κυτταρική διαφοροποίηση, τα κύτταρα αποκτούν διαφορετικά μορφολογικά και λειτουργικά χαρακτηριστικά για να επιτελούν αποτελεσματικά τις εξειδικευμένες λειτουργίες τους (Ανατύπωση από <http://el.science.wikia.com> – με επεξεργασία).

2.1.2 Ο ιστός - Το όργανο - Το σύστημα οργάνων - Ο οργανισμός

Κύτταρα που είναι μορφολογικά όμοια και συμμετέχουν στην ίδια λειτουργία αποτελούν έναν ιστό. Διακρίνονται τέσσερα είδη ιστών: ο επιθηλιακός, ο νευρικός, ο μυϊκός και ο ερειστικός ιστός (Alberts et al., 2015).

Ένα όργανο αποτελείται από διαφορετικούς ιστούς και επιτελεί μία συγκεκριμένη λειτουργία. Όργανα που συνεργάζονται για την πραγματοποίηση μίας λειτουργίας συνιστούν ένα σύστημα οργάνων. Όλα τα συστήματα οργάνων συνεργάζονται στενά μεταξύ τους και αποτελούν τον ανθρώπινο οργανισμό. Το ανθρώπινο σώμα αποτελείται από περίπου 100 τρισεκατομμύρια κύτταρα, 22 εσωτερικά όργανα, 206 οστά και 200 μύες που εκτελούν τις εντολές του εγκεφάλου (Lippert, Herbold & Lippert-Burmester, 2010).

2.1.3 Επιθηλιακός ιστός

Ο επιθηλιακός ιστός αποτελείται από κύτταρα που είναι στενά συνδεδεμένα μεταξύ τους. Αυτά σχηματίζουν επιφάνειες, οι οποίες καλύπτουν εξωτερικά το σώμα ή επενδύουν εσωτερικά διάφορες κοιλότητες (Lippert, Herbold & Lippert-Burmester, 2010). Ο ρόλος του επιθηλιακού ιστού είναι κυρίως προστατευτικός, αλλά επίσης απομακρύνει βλέννα και σκόνη, επιτρέπει τη διάχυση και την απορρόφηση ουσιών, ενώ παράλληλα συμβάλλει στην παραγωγή και έκκριση προϊόντων¹.

2.1.4 Νευρικός ιστός

Ο νευρικός ιστός αποτελείται από νευρικά κύτταρα ή νευρώνες και νευρογλοιακά κύτταρα, δηλαδή συναντάται συνύπαρξη διαφορετικών κυττάρων στον ίδιο ιστό, με συμμετοχή, όμως στην ίδια λειτουργία. Τα νευρικά κύτταρα διαθέτουν αποφυάδες και εξειδικεύονται στην παραγωγή και μεταβίβαση νευρικών ώσεων. Τα νευρογλοιακά κύτταρα στηρίζουν, μονώνουν και τρέφουν τους νευρώνες (Lippert, Herbold & Lippert-Burmester, 2010).

¹ Σε αυτή την περίπτωση τα επιθηλιακά κύτταρα συνιστούν κάποιο αδέν, που μπορεί να είναι μονοκύτταρος ή πολυκύτταρος, εξωκρινής, ενδοκρινής ή μικτός.

2.1.5 Μυϊκός ιστός

Ο μυϊκός ιστός αποτελείται από κύτταρα, τις μυϊκές ίνες, οι οποίες έχουν την ικανότητα να συστέλλονται, επιτρέποντας κινήσεις. Διακρίνονται τρία είδη μυϊκού ιστού: ο σκελετικός, ο καρδιακός και ο λείος μυϊκός ιστός, με διαφορετική μορφή και λειτουργία ο καθένας από αυτούς (Lippert, Herbold & Lippert-Burmester, 2010).

Σκελετικός μυϊκός ιστός

Ο σκελετικός μυϊκός ιστός συναντάται στους σκελετικούς μύες και αποτελείται από σχετικά μακριές κυλινδρικές μυϊκές ίνες, που φέρουν γραμμώσεις. Η συστολή τους γίνεται με τη θέλησή μας (εκούσια κίνηση) (Lippert, Herbold & Lippert-Burmester, 2010).

Μυϊκός ιστός της καρδιάς (μυοκάρδιο)

Ο μυϊκός ιστός της καρδιάς βρίσκεται μόνο στα τοιχώματα της καρδιάς. Οι μυϊκές ίνες του είναι κυλινδρικές, με γραμμώσεις. Δεν υπακούουν στη θέλησή μας (ακούσια κίνηση).

Λείος μυϊκός ιστός

Ο λείος μυϊκός ιστός επενδύει τα τοιχώματα των αγγείων, του γαστρεντερικού σωλήνα και άλλες κοιλότητες του σώματός μας. Αποτελείται από ατρακτοειδείς και χωρίς γραμμώσεις μυϊκές ίνες. Δεν υπακούουν στη θέλησή μας (ακούσια κίνηση) (Lippert, Herbold & Lippert-Burmester, 2010).

2.2 ΕΡΕΙΣΤΙΚΟΣ ΙΣΤΟΣ

Ο ερειστικός ιστός αποτελείται από τη μεσοκυττάρια ουσία και τα κύτταρα. Η μεσοκυττάρια ουσία μπορεί να περιέχει δύο τύπων πρωτεϊνικά ινίδια: το κολλαγόνο, που προσδίδει αντοχή και ελαστικότητα και την ελαστίνη για ακόμη μεγαλύτερη ελαστικότητα. Ο ρόλος του ερειστικού ιστού είναι η σύνδεση των δομών μεταξύ τους, προσφέροντας στήριξη και προστασία. Διακρίνονται τρία είδη ερειστικού οστού, ο συνδετικός, ο χόνδρινος και ο οστίτης ιστός (Lippert, Herbold & Lippert-Burmester, 2010).

Συνδετικός ιστός

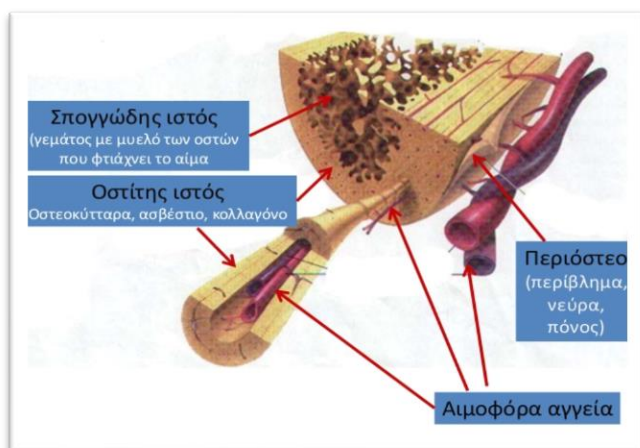
Ο συνδετικός ιστός συναντάται ως χαλαρός συνδετικός ιστός, πυκνός συνδετικός ιστός και αίμα. Ο χαλαρός συνδετικός ιστός συναντάται κυρίως στο δέρμα. Η μεσοκυττάρια ουσία του περιέχει ίνες κολλαγόνου και ελαστίνη. Ο λιπώδης ιστός είναι ένας ειδικός τύπος χαλαρού συνδετικού ιστού, του οποίου τα κύτταρα (λιποκύτταρα) αποθηκεύουν λίπος (Alberts et al., 2015). Η μεσοκυττάρια ουσία του πυκνού συνδετικού ιστού αποτελείται κυρίως από ινίδια κολλαγόνου σε δεσμίδες. Συναντάται στους συνδέσμους των αρθρώσεων και στους τένοντες που συνδέουν τους σκελετικούς μύες με τα οστά. Το αίμα είναι ένας ειδικός τύπος συνδετικού οστού, στο οποίο η εξωκυττάρια ουσία είναι το πλάσμα, ενώ τα κύτταρα διακρίνονται σε ερυθρά αιμοσφαίρια, λευκά αιμοσφαίρια και αιμοπετάλια (Lippert, Herbold & Lippert-Burmester, 2010).

Χόνδρινος ιστός

Ο χόνδρινος ιστός είναι στέρεος και συγχρόνως εύκαμπτος. Τα κύτταρά του, οι χονδροβλάστες, βρίσκονται μέσα σε κοιλότητες της μεσοκυττάριας ουσίας. Ο ιστός αυτός συναντάται στους αρθρικούς χόνδρους, στο πτερύγιο του αυτιού, στους μεσοσπονδύλιους δίσκους και άλλα σημεία του σώματός μας (Alberts et al., 2015).

Οστίτης ιστός

Ο οστίτης ιστός αποτελείται από εξαιρετικά σκληρή μεσοκυττάρια ουσία, η οποία περιέχει άλατα και ινίδια κολλαγόνου. Μέσα σε κοιλότητές της υπάρχουν τα οστεοκύτταρα. Ο οστίτης ιστός συναντάται στα οστά (Alberts et al., 2015) (Εικόνα 2.2).



Εικόνα 2.2 Τομή μακρύ οστού και διάκριση ιστών

2.2.1 Σκελετικό σύστημα

Ο σκελετός του ανθρώπου είναι η οστέινη κατασκευή που υποστηρίζει το σώμα και το διαμορφώνει μορφολογικά (Εικόνα 2.3). Προφυλάσσει τα εσωτερικά όργανα και παρέχει στους μύες του σώματος την κατάλληλη στήριξη. Αποτελείται από 206 οστά και χωρίζεται σε δυο τμήματα, τον αξονικό σκελετό και τον προσαρτημένο σκελετό. Ο αξονικός σκελετός συμπεριλαμβάνει το κρανίο, τη σπονδυλική στήλη και το θώρακα, αποτελείται από 80 οστά και προφυλάσσει τον εγκέφαλο, το νωτιαίο μυελό, την καρδιά και τους πνεύμονες. Ο προσαρτημένος σκελετός έχει 126 οστά και συνίσταται από τα οστά των άκρων, της ωμικής και της πυελικής ζώνης (American college of physicians, 1999). Τα οστά αποτελούν τα κύρια συστατικά του σκελετικού συστήματος και διαφέρουν από το συνδετικό ιστό σε κάμψη και αντοχή (Έξαρχος, 2007, Jumah, 2012).

Ανάλογα με την περιοχή που βρίσκονται και τη μηχανική λειτουργία που επιτελούν, διαμορφώνεται και η μορφή των οστών. Διακρίνονται σε μακρά οστά, όπως το μηριαίο οστό και η κνήμη, σε βραχέα αυλοειδή οστά, όπως τα μετακάρπια και οι σπόνδυλοι, και σε επίπεδα ή πλατιά οστά, όπως το οστό της ωμοπλάτης και το κρανίο. Τα μακρά ή επιμήκη οστά έχουν δύο άκρα, επιφύσεις, και μεταξύ των άκρων αυτών, το σώμα του οστού που ονομάζεται διάφυση. Τα βραχέα οστά έχουν περίπου ίσες και τις τρεις διαστάσεις τους. Τα πλατιά οστά παρουσιάζουν δύο επιφάνειες, χείλη και γωνίες (Lippert, Herbold & Lippert-Burmester, 2010).

Το σκελετικό σύστημα είναι πολύ σημαντικό για το σώμα τόσο από στατικής όσο και μεταβολικής άποψης. Είναι κατασκευασμένο από μεμονωμένα οστά και από το συνδετικό ιστό που τα ενώνει και που απορροφά κραδασμούς (τένοντες, χόνδροι και σύνδεσμοι). συνδέουν τα μεμονωμένα οστά μεταξύ τους. Τα δόντια περιλαμβάνονται επίσης στο σκελετικό σύστημα. Φυσικά, δεν είναι οστά, αφού είναι κατασκευασμένα από διαφορετικό υλικό, την αδαμαντίνη και την οδοντίνη.

Οι λειτουργίες του σκελετού είναι:

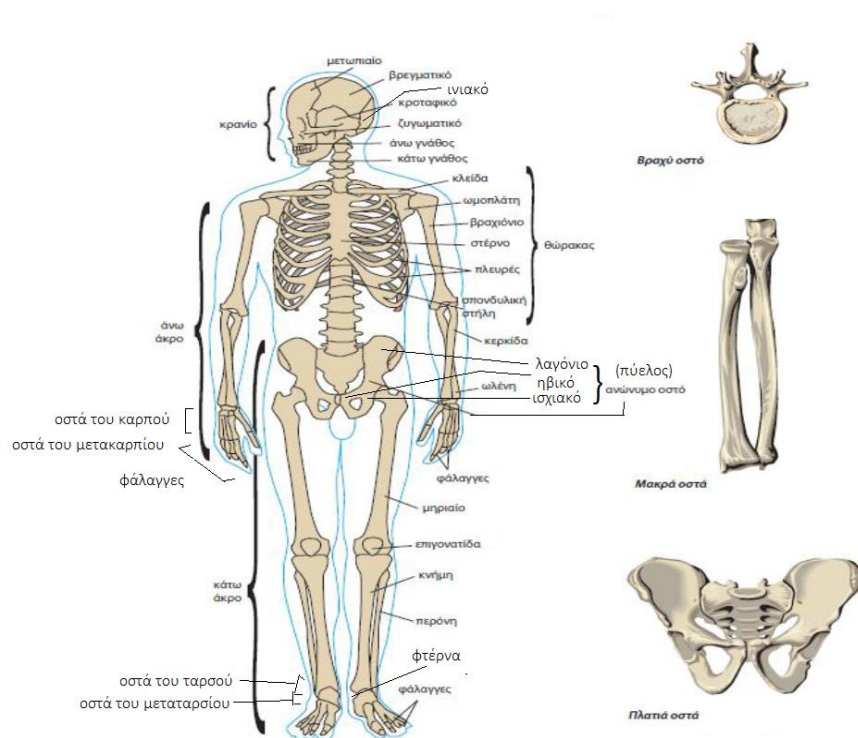
- α) η διατήρηση του σχήματος του σώματος και η υποστήριξή του
- β) η προστασία των μαλακών ιστών των κρανιακών, των θωρακικών και των πυελικών κοιλοτήτων (όργανα)
- γ) η παροχή του πλαισίου, εντός του οποίου βρίσκεται ο μυελός των ιστών.

δ) η παροχή περιοχών πρόσφυσης των μυών και η διευκόλυνση της δράσης, για δυνατή και ευέλικτη κίνηση του σώματος, μεταφέροντας τις δυνάμεις, που αναπτύσσονται λόγω σύσπασης των μυών κατά το βάδισμα, από το ένα τμήμα του σώματος στο άλλο.

ε) η λειτουργία ως μεταβολικής αποθήκης για άλατα

στ) η δημιουργία στερεών αρθρούμενων μονάδων

Το οστό είναι ένα ανισότροπο υλικό που επιτελεί σημαντικές λειτουργίες του οργανισμού. Εξασφαλίζει τη μηχανική στήριξη του σκελετού ενώ αποτελεί και το σημείο πρόσδεσης των μυών και των τενόντων. Η σκληρότητά του και η αντοχή του σε μηχανικές καταπονήσεις λειτουργεί προστατευτικά για τα όργανα της κρανιακής και θωρακικής κοιλότητας (Καραμπάς, 2011).



Εικόνα 2.3 Ο ανθρώπινος σκελετός

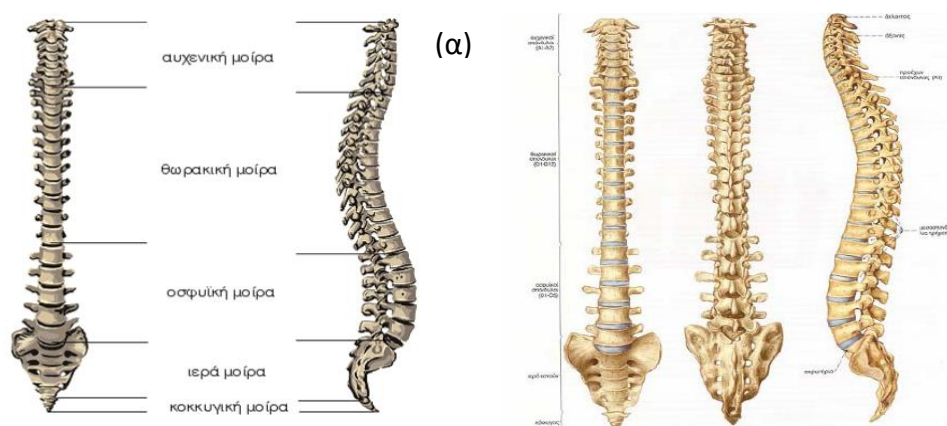
2.2.2 Σπονδυλική στήλη

Η σπονδυλική στήλη αποτελεί τον κύριο στηρικτικό σκελετικό άξονα του σώματος. Έχει, πέντε μοίρες, την αυχενική, τη θωρακική, την οσφυϊκή, την ιερή και την κοκκυγική, και κάθε μοίρα αποτελείται από διαφορετικό αριθμό σπονδύλων (Εικόνα 2.4 (α)). Η σπονδυλική στήλη (Εικόνα 2.4 (β)) αποτελείται από 30-34 σπονδύλους. Από αυτούς, οι 7

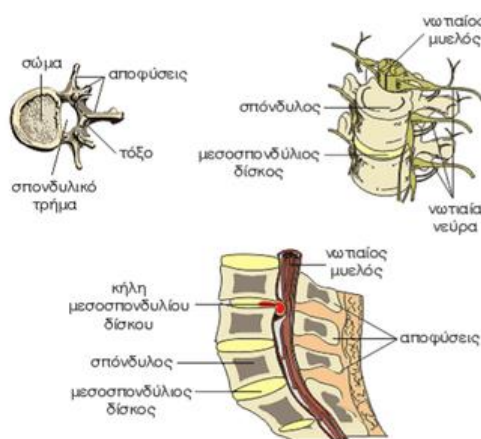
είναι αυχενικοί, οι επόμενοι 12 είναι θωρακικοί και ακολουθούν οι 3-5 οσφυϊκοί, το ιερό οστό και ο κόκκυγας. Το ιερό οστό αποτελείται από 5 συνοστεωμένους ιερούς σπονδύλους, ενώ ο κόκκυγας από 3-5 ενωμένους κοκκυγικούς σπονδύλους. Ανάμεσα στους σπονδύλους, υπάρχουν οι μεσοσπονδύλιοι δίσκοι. Οι βασικές λειτουργίες της σπονδυλικής στήλης είναι η στήριξη του σώματος στην όρθια στάση, η κίνηση του σώματος (έκταση, κάμψη, στρέψη) και η προστασία του νωτιαίου μυελού, ριζών νεύρων και εσωτερικών θωρακικών και κοιλιακών οργάνων (Lippert, Herbold & Lippert-Burmester, 2010).

Οι σπόνδυλοι κάθε σπονδυλικής μοίρας διαφέρουν μεταξύ τους. Παρόλα αυτά υπάρχουν κοινά μορφολογικά χαρακτηριστικά μεταξύ τους. Ένας τυπικός σπόνδυλος αποτελείται από το σπονδυλικό σώμα και το σπονδυλικό τόξο που περιβάλλουν το σπονδυλικό τρήμα, μέσα από το οποίο περνάει ο νωτιαίος μυελός και τα σπονδυλικά νεύρα. Το σπονδυλικό τόξο αποτελείται από την ακανθώδη απόφυση και τις εγκάρσιες αποφύσεις. Τα τμήματα ανάμεσα στην ακανθώδη απόφυση και στις 2 εγκάρσιες αποφύσεις ονομάζονται πέταλα σπονδυλικού σώματος, ενώ στα σημεία συνάντησης των ανωτέρω αποφύσεων, κάθε σπόνδυλος φέρει τις άνω και κάτω αρθρικές αποφύσεις (Εικόνα 2.5).

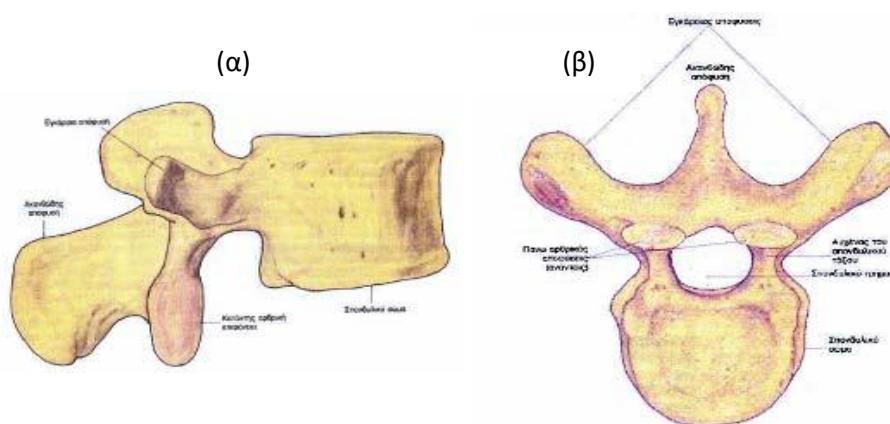
Οι πέντε οσφυϊκοί σπόνδυλοι (Ο1 – Ο5) (Εικόνα 2.6, 2.7) διαφέρουν από τους μεγάλους θωρακικούς σπονδύλους, γιατί έχουν μεγαλύτερες διαστάσεις και δεν φέρουν πλευρικά, άνω και κάτω αρθρικά ημιγλήνια στα σπονδυλικά σώματα. Το σπονδυλικό σώμα είναι πλατύτερο στην εγκάρσια διάμετρό του και υπόκοιλο στις επιφάνειές του και την περιφέρεια. Το πλάτος και το μήκος των σωμάτων είναι μεγαλύτερα από το ύψος τους. Επιπλέον, πάνω στα σπονδυλικά σώματα φέρουν μαστοειδείς, βοηθητικές προεξοχές όπου προσδένουν μύες της πλάτης. Οι οσφυϊκοί σπόνδυλοι είναι μεγάλοι ώστε να μπορούν να συγκρατούν το βάρος του σώματος. Μάλιστα, οι 5 οσφυϊκοί σπόνδυλοι μαζί με τους μεσοσπονδύλιους δίσκους τους, αποτελούν το 25% του συνολικού μήκους της σπονδυλικής στήλης (Lippert, Herbold & Lippert-Burmester, 2010).



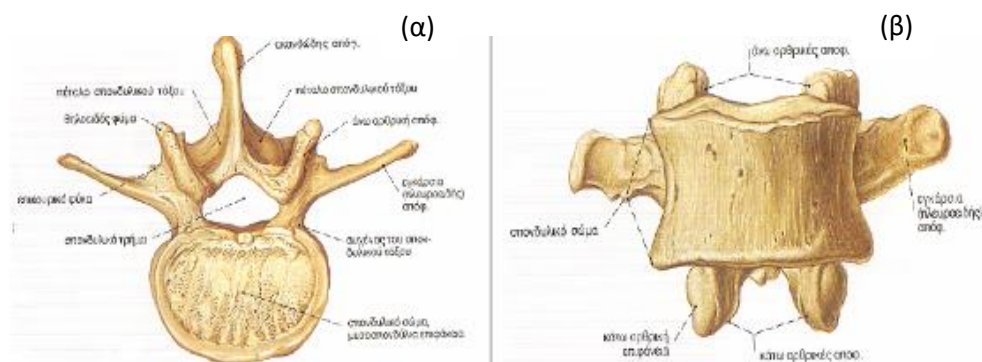
Εικόνα 2.4 Σπονδυλική Στήλη. α) σπονδυλικές μοίρες. β) εμπρόσθια, οπίσθια και πλάγια όψη της σπονδυλικής στήλης.



Εικόνα 2.5 Μορφολογία Σπονδύλων



Εικόνα 2.6 Πλάγια και άνω όψη σπονδύλων. (α) Πλάγια όψη και (β) Άνω όψη ενός τυπικού σπονδύλου.



Εικόνα 2.7 Άνω και πρόσθια όψη του τέταρτου οσφυϊκού σπονδύλου. (α) Άνω όψη και (β) πρόσθια όψη.

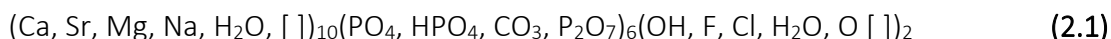
2.2.3 Σύσταση του οστού

Το οστό είναι ένας δυναμικός ιστός, πλούσιο σε αγγεία, που όπως αναφέρθηκε, δρα ως δομική και λειτουργική στήριξη στα σπονδυλωτά. Θεωρείται ως φυσικό υβριδικό σύνθετο κεραμικό-πολυμερές υλικό. Αποτελείται από οργανικό και ανόργανο μέρος. Το οργανικό μέρος, το οποίο και συνιστά το 20-35% του οστού, εμφανίζει υψηλή ελαστικότητα και αντοχή σε κάμψη. Το οργανικό μέρος συμπληρώνουν τα κύτταρα και οι πρωτεΐνες, όπως η οστεοκαλσίνη, η οστεονεκτίνη και οι πρωτεογλυκάνες. Οργανικές ενώσεις, όπως πρωτεΐνες, πολυσακχαρίτες και λιπίδια υπάρχουν σε μικρότερα ποσοστά (Katz, 1980). Τα ανόργανα άλατα απαντώνται σε ποσοστό 60-70% του ξηρού βάρους του οστού (φωσφορικό ασβέστιο (80-90%) που βρίσκεται με τη μορφή υπερμικροσκοπικών κρυστάλλων υδροξυαπατίτη (HA), το ανθρακικό ασβέστιο (8-10%), το φθοριούχο και χλωριούχο ασβέστιο (0,5%), το φωσφορικό μαγνήσιο (1-2%) και τα αλκαλικά άλατα (2%). Άλλα συστατικά του ανόργανου μέρους είναι ιόντα, όπως Na^+ , Mg^{2+} , K^+ , CO_3^{2-} , HPO_4^- , Cl^- και F^- , καθώς και ιχνοστοιχεία. Περίπου το 99% του ασβεστίου (Ca), το 85% του φωσφόρου (P), το 40% του νατρίου (Na) και το 60% του μαγνησίου (Mg) του οργανισμού βρίσκονται αποθηκευμένα στα οστά (Jumah, 2012). Τα άλατα του φωσφορικού ασβεστίου και ο ανθρακικός κρυσταλλικός HA προσδίδουν σκληρότητα και υψηλή αντοχή σε θλίψη (Nudelman et al., 2010). Επιπλέον, σε μικρότερη αναλογία, απαντώνται ανθρακικό ασβέστιο, χλωριούχο ασβέστιο και άλλα ιόντα που δρουν ως ενεργοποιητές ενζύμων. Το 20% w/w του ανόργανου μέρους αποτελείται από νερό.

Οι ίνες κολλαγόνου (τύπου I) αποτελούν ένα από τα κύρια συστατικά του οργανικού μέρους, καθώς και το 90% του συνολικού περιεχομένου σε πρωτεΐνες (Fratzl, 2004). Το εναπομένον 10% αποτελείται από μικρού μεγέθους γλυκοπρωτεΐνες και άλλες μη κολλαγονούχες πρωτεΐνες, όπως η οστεοποντίνη και μικρή ποσότητα κολλαγόνου τύπου V (Jumah, 2012). Οι ίνες του κολλαγόνου εκτείνονται προς όλες τις κατευθύνσεις μέσα στο οστό, αλλά κυρίως κατά μήκος των δυναμικών γραμμών τάσης και δίνουν στο οστό τη μεγάλη μηχανική αντοχή που το χαρακτηρίζει. Το κολλαγόνο, επομένως, που συναντάται στο οστό, έχει τη μορφή ινιδίων διαμέτρου 100–2000 nm. Οι κρύσταλλοι HA, που δίνουν στο οστό μηχανική αντοχή και αντοχή σε θλίψη, είναι στερεά προσκολλημένοι στις ίνες κολλαγόνου. Έχουν μορφή βελόνας, μήκους ~40–60 nm, πλάτους ~20 nm και πάχους ~1.5–5 nm (Orlovskii, Komlev & Barinov, 2002, Liu & Webster, 2007). Αυτός ο στερεός δεσμός εμποδίζει την εμφάνιση χασμάτων στο οστό, βασικό στοιχείο για την εξασφάλιση της αντοχής του οστού. Ο συνδυασμός των ιδιοτήτων των ινών του κολλαγόνου και των κρυστάλλων HA, μαζί με το στερεό δεσμό τους εξασφαλίζει στην κατασκευή του οστού μεγάλη αντοχή, τόσο στην έκταση όσο και στη συμπίεση (Κοντούλη, 2007).

Τα οστά είναι κατασκευασμένα από τη φύση από φωσφορικό ασβέστιο, το οποίο είναι κρυσταλλωμένο σε μορφή HA μαζί με πρωτεΐνες. Συνήθως, το άλας του HA δημιουργείται από εναπόθεση των ανόργανων συστατικών, όπως καθορίζεται από τα οργανικά συστατικά της μήτρας. Το οστό δεν παρουσιάζει ομοιομορφία ούτε στη μικροδομή, ούτε στις μηχανικές ιδιότητες. Οι μηχανικές ιδιότητες του οστού εμφανίζουν ισχυρή ευαισθησία στο πορώδες (5-95%), στο βαθμό βιο-ασβεστοποίησης και στον προσανατολισμό των ινών κολλαγόνου (Dey & Mukhopadhyay, 2015).

Ο βιολογικός HA έχει ιδιαίτερα πολύπλοκη χημεία και δομή επειδή η ορυκτή φάση του δεν είναι καθαρή και αποκλίνει από την ακριβή στοιχειομετρία του HA. Συνήθως, έχει έλλειψη σε ασβέστιο (Ca^{2+}) και είναι πλούσιος σε ανθρακικά ιόντα (CO_3^{2-}), τα οποία αντικαθιστούν τα φωσφορικά ιόντα (HPO_4^-) σε διάφορα σημεία του πλέγματος του HA. Έτσι, η μοριακή αναλογία Ca/P είναι 1,5 έναντι της στοιχειομετρικής αναλογίας 1,67 του συνθετικού HA. Για το λόγο αυτό οι βιολογικοί απατίτες είναι πιο σωστό να αναφέρονται ως ανθρακικοί απατίτες και όχι ως HA (Αγαθόπουλος). Ο γενικός χημικός τύπος του βιολογικού HA είναι:



, όπου με [] σημειώνονται οι ατέλειες του πλέγματος. Ο χημικός τύπος του καθαρού υδροξυαπατίτη είναι: $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$.

Οι μηχανικές ιδιότητες των οστών οφείλονται στην ασβεστοποίηση του βιολογικού HA σε μήτρα ινιδίων κολλαγόνου, γλυκοπρωτεϊνών (πρωτεΐνες με αλυσίδες σακχάρων) και άλλου τύπου πρωτεϊνών. Ο συνδυασμός των οργανικών και των ανόργανων στοιχείων οδηγούν στην αύξηση της δυσθραυστότητας του (πλέον) σύνθετου (σε σχέση με τον HA) υλικού.

Εκτός του HA, έχουν ευρέως ανιχνευτεί σε ζωντανούς οργανισμούς και άλλες πρόδρομες μορφές του HA ως ενδιάμεσα προϊόντα της βιο-ορυκτοποίησης (bio-mineralization) των ενώσεων του φωσφορικού ασβεστίου, όπως είναι το οκτα-φωσφορικό οκτα-ασβέστιο (octa-calcium phosphate, OCP, $\text{Ca}_8\text{H}_2(\text{PO}_4)_6$) και το άμορφο φωσφορικό ασβέστιο. Συγκεκριμένα, υπάρχουν ενδείξεις ότι άμορφο φωσφορικό ασβέστιο σχηματίζεται στα αρχικά στάδια της ασβεστοποίησης του οστού και του χόνδρου. Ανάμεσα στις άλλες φάσεις του φωσφορικού ασβεστίου, το OCP έχει βρεθεί σε αρκετούς ιστούς. Το OCP μετασχηματίζεται σε HA επειδή έχει κρυσταλλική δομή πολύ κοντινή του HA (Καρακασίδης).

2.2.4 Βιολογία και χημεία του οστίτη ιστού

Δομικό συστατικό των οστών, όπως προαναφέρθηκε είναι ο οστίτης ιστός, που αποτελείται από κύτταρα και ασβεστοποιημένη εξωκυττάρια θεμέλια ουσία (Wang, 2012). Ο οστίτης ιστός ανάλογα με τη θέση των κυττάρων και της βασικής του οστικής ουσίας εμφανίζεται σε δύο διαφορετικές μορφές, στο δικτυωτό και το πεταλιώδες οστό. Το δικτυωτό οστό αποτελεί την πρωτογενή μορφή του οστού και χαρακτηρίζεται από την τυχαία κατανομή των ινών κολλαγόνου και των φωσφορικών αλάτων ασβεστίου. Το πεταλιώδες είναι ένα ώριμο, δευτερογενές οστό. Κατά την οστική ανάπτυξη, το δικτυωτό οστό είναι το πρώτο είδος οστού που παράγεται. Αυτό στη συνέχεια αναδομείται για το σχηματισμό πεταλιώδους οστού, το οποίο συνιστά το μεγαλύτερο μέρος του ώριμου σκελετού (Clarke, 2008).

Το πεταλιώδες οστό μπορεί να πάρει τη μορφή μιας συμπαγούς μάζας, οπότε περιγράφεται ως συμπαγές οστό, ή μπορεί να οργανωθεί κατά σπογγοειδή τρόπο, οπότε περιγράφεται ως σπογγώδες οστό. Η εξωτερική επιφάνεια του οστού επενδύεται από μια πυκνή ινώδη μάζα που ονομάζεται περίοστεο, μέσα στο οποίο προσφύονται οι μύες, οι τένοντες και οι σύνδεσμοι. Ουσιαστικά, το περίοστεο είναι ινοελαστική μεμβράνη ή υμένας, που περιβάλλει εξωτερικά ολόκληρο το οστό, εκτός από τις αρθρικές χόνδρινες επιφάνειές του, από όπου λείπει. Είναι σε άμεση επαφή με το οστό και περιέχει πολλά αιμοφόρα αγγεία χορηγώντας στο οστό ένα μέρος από τα τροφοφόρα αγγεία του. Με μικροσκοπική παρατήρηση, δίνει την αίσθηση δύο στρωμάτων ή στιβάδων. Η μία είναι η έξω ή επιφανειακή (ινοελαστική) που περιέχει άφθονο ινώδη συνδετικό ιστό. Πάνω της προσφύονται οι μύες και οι τένοντες και επίσης φέρει τα αγγεία και τα νεύρα. Η έσω, βαθύτερη (οστεογεννητική), στην οποία βρίσκονται οι οστεοβλάστες έτοιμοι να σχηματίσουν οστική ουσία (οστεογενετικό στρώμα του OLLIER).

Οι πιο εσωτερικές οστικές επιφάνειες, συμπεριλαμβανομένων και των δοκίδων του σπογγώδους οστού, επενδύονται από μια λεπτή στιβάδα, το ενδόστεο. Το 80% του σκελετού αποτελείται από φλοιώδη ιστό και το 20% από σπογγώδες ιστό. Η σύσταση και η δομή τους είναι η ίδια, όμως η πυκνότητα του φλοιώδους είναι μεγαλύτερη από αυτή του σπογγώδους. Ως συνέπεια, το πορώδες του σπογγώδους οστού κυμαίνεται μεταξύ 50-95% και του φλοιώδους οστού να είναι περίπου 30% ή λιγότερο (Bayraktar et al., 2004). Στο συμπαγή οστίτη ιστό, η βασική του ουσία είναι ιδιαίτερα πυκνή και οι οστικές του δοκίδες έχουν τόσο στενή επαφή μεταξύ τους, ώστε σχηματίζουν ένα παχύ, ομοιογενές και στέρεο οστό. Στα συμπαγή οστά, τα κύτταρα και η βασική ουσία έχουν συγκεκριμένη αρχιτεκτονική διάταξη. Η δομή τους απεικονίζεται στην Εικόνα 1.2.

Αν μελετήσουμε τη δομή των οστών, από έξω προς τα μέσα διακρίνουμε τα εξής τμήματα:

- α) περίοστεο
- β) οστέινη ουσία
- γ) μυελός των οστών²

² Στα επιμήκη οστά παρατηρείται μία κοιλότητα που καλείται μυελώδης αυλός και περιέχει τον μυελό του οστού. Μυελός των οστών συναντάται επίσης στις μυελοκυψέλες της σπογγώδους ουσίας των πλατέων και βραχέων οστών, αλλά και στις επιφύσεις των

δ) αγγεία

ε) νεύρα.

Η αιμάτωση των οστών προέρχεται από την τροφοφόρο αρτηρία του κάθε οστού που διακλαδίζεται σε ανερχόμενο και κατερχόμενο κλάδο, τροφοδοτώντας με αίμα κυρίως τον μυελό των οστών. Προέρχεται και από τα αγγεία που ξεκινούν από το περίοστεο και τροφοδοτούν τις εξωτερικές στιβάδες των οστών. Οι φλέβες δεν ακολουθούν συνήθως την πορεία των αρτηριών. Η ύπαρξη λεμφικών αγγείων αμφισβητείται. Η αιματική κυκλοφορία των οστών ελέγχεται από τρεις μηχανισμούς: το νευρικό, τον ορμονικό και τον μεταβολικό. Τα συμπαθητικά αγγειοκινητικά νεύρα είναι υπεύθυνα για την αιμάτωση του οστού.

Τα νεύρα των οστών βρίσκονται στο περίοστεο και συνοδεύουν την τροφοφόρο αρτηρία στο εσωτερικό του οστού. Είναι κυρίως νεύρα του συμπαθητικού καθώς και της «εν τω βάθει» αισθητικότητας. Αισθητικές ίνες πόνου στα οστά είναι αμφίβολο αν υπάρχουν, ενώ είναι βέβαιη η ύπαρξη τους στο περίοστεο.

2.2.5 Κύτταρα οστίτη ιστού και οστική ανακατασκευή

Τα οστά αποικοδομούνται και οικοδομούνται εκ νέου και ανανεώνονται διαρκώς, για την εύρυθμη λειτουργία του οργανισμού, μέσω της οστικής ανακατασκευής. Η οστεογένεση, δηλαδή η διάπλαση και η τελειοποίηση των οστών, πραγματοποιείται με αργό ρυθμό ώστε ο αναπτυσσόμενος σκελετός να εξυπηρετεί τη στηρικτική λειτουργία του οργανισμού και των μηχανικών του ιδιοτήτων, όπως είναι η οστική αντοχή και παράλληλα να συνεχίζει την ανάπτυξή του (Lippert, Herbold & Lippert-Burmester, 2010).

μακρών οστών. Είναι όργανο αιμοποίησης, το οποίο κατά την εμβρυική ζωή παράγει ερυθροκύτταρα. Στην εξωμήτριο ζωή παράγει ερυθροκύτταρα, αιμοπετάλια και κοκκώδη λευκοκύτταρα (ουδετερόφιλα, ηωσινόφιλα και βασεόφιλα). Ο μυελός των οστών ολόκληρου του σώματος έχει βάρος 1,5-3,5 κιλά. Σε ηλικία 20 ετών, ο μυελός της διαφύσεως των μακρών οστών γίνεται ανενεργός, πλημμυρίζεται από λίπος και δεν μετέχει πλέον στην αιμοποίηση. Εξαίρεση αποτελούν η άνω μοίρα του βραχιόνιου και του μηριαίου οστού και οι μυελοκυψέλες των σπονδύλων, του στέρνου, των πλευρών, των οστών της πυέλου, του κρανίου, όπου η αιμοποίηση λαμβάνει χώρα καθ' όλη τη διάρκεια της ζωής. Ο μυελός των οστών που επιτελεί την αιμοποίηση καλείται ερυθρός μυελός, ενώ ο ανενεργός καλείται ωχρός μυελός. Στο στέρνο ακόμη και σε άτομα προχωρημένης ηλικίας, υπάρχει πάντα ενεργός μυελός των οστών.

Εκτός από τα βασικά δομικά συστατικά του, το οστό αποτελείται και από ένα σημαντικό αριθμό κυττάρων. Τα οστικά κύτταρα που είναι υπεύθυνα για την οστική ανακατασκευή (οστεογένεση) είναι οι οστεοβλάστες, τα οστεοκύτταρα και οι οστεοκλάστες (Nudelman et al., 2010), η κύρια λειτουργία των οποίων είναι η ρύθμιση του μεταβολισμού του οστού. Το οστό συντίθεται από τους οστεοβλάστες, συντηρείται από τα οστεοκύτταρα και αποδομείται από τους οστεοκλάστες (Currey, 2002).

Οι οστεοβλάστες συνθέτουν τη θεμέλια ουσία καθώς εκκρίνουν κολλαγόνο σχηματίζοντας το περιβάλλον πλέγμα το οποίο ακολούθως οστεοποιείται. Συγκεκριμένα, παράγονται κυστίδια οργανικής θεμέλιας ουσίας, τα οποία στη συνέχεια ασβεστοποιούνται από τους οστεοβλάστες με ανόργανα άλατα ασβεστίου και φωσφορικών, τα οποία τελικά συγκροτούν το κρυσταλλικό σύμπλεγμα του HA. Επομένως, όταν περιβληθούν από το ασβεστοποιημένο πλέγμα προκύπτουν τα οστεοκύτταρα.

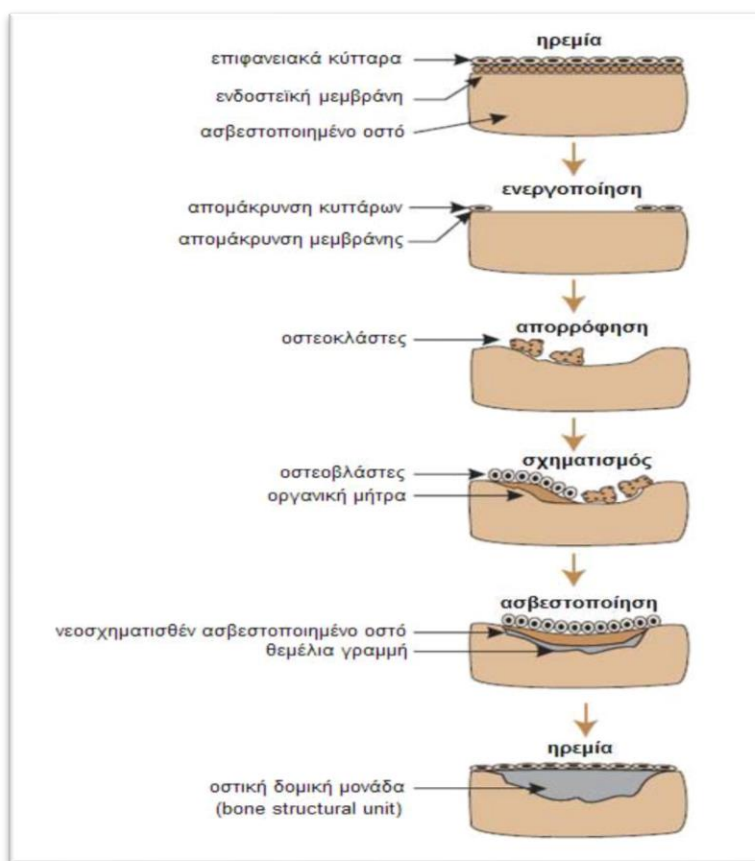
Τα οστεοκύτταρα είναι πρώην οστεοβλάστες που έχουν παγιδευτεί μέσα σε μικρές κοιλότητες από οστεοποιημένη εξωκυττάρια ουσία. Ο κύριος ρόλος τους είναι η συντήρηση της δομής και της σύστασης της εξωκυττάριας ουσίας. Είναι τα κύρια κύτταρα του οστίτη ιστού αφού αποτελούν το 90% των κυττάρων του ώριμου σκελετού.

Οι οστεοκλάστες είναι μεγάλα πολυπύρρηνα κύτταρα που προέρχονται από πρόδρομα κύτταρα του μυελού των οστών τα οποία απορροφούν (διασπούν) το ήδη σχηματοποιημένο οστό, εκκρίνοντας ιόντα υδρογόνου, τα οποία προκαλούν τη διάσπαση της θεμέλιας ουσίας που έχει ως συνέπεια την αποδόμηση των αλάτων του υδροξυαπατίτη με αποτέλεσμα την απελευθέρωση ιόντων ασβεστίου και φωσφόρου στη κυκλοφορία του αίματος (Jumah, 2012, Κοντούλη, 2007). Ενεργοποιούνται ύστερα από δράση της παραθορμόνης.

Τα οστεοκύτταρα δεν αποτελούν ανενεργά στοιχεία του οστού, αλλά συμμετέχουν ενεργά στην ομοιοστάση του ασβεστίου, ενώ έχουν περιορισμένο ρόλο στην αποδόμηση και ανακατασκευή του οστού. Οι λειτουργίες των οστεοβλαστών και των οστεοκλαστών, δείχνουν να είναι αντίθετες, αλλά κατά κάποιον τρόπο συμπληρωματικές και ίσης σημασίας, καθώς οι οστεοκλάστες αποδομούν το οστό, ενώ οι οστεοβλάστες το αναδομούν.

Η οστική ανακατασκευή γίνεται με βάση το φαινόμενο της σύζευξης και σε αυτή διακρίνεται μία σειρά φάσεων. Η πρώτη φάση είναι η φάση της ηρεμίας, κατά την οποία

δεν υπάρχουν οστεοκλάστες και οστεοβλάστες στις ελεύθερες επιφάνειες του οστίτη ιστού. Ακολουθεί η φάση της ενεργοποίησης που προκαλείται από φυσικοχημικά και ορμονικά ερεθίσματα με αποτέλεσμα την ενεργοποίηση των οστεοκλαστών. Στη συνέχεια, γίνεται η απορρόφηση του οστού και η αποκοπή των οστεοκλαστών. Στα κενά που υπάρχουν, εμφανίζονται οι οστεοβλάστες και αρχίζουν την παραγωγή του προ-οστού (οστεοειδές). Στο προ-οστό εναποθέτονται κρύσταλλοι του HA και ασβεστοποιείται. Ως προς τη σύστασή του, το οστεοειδές αποτελείται από ένα δίκτυο ινών κολλαγόνου τύπου I, που διατάσσονται με τέτοιο τρόπο ώστε να σχηματίζουν φύλλα μεμβρανών, τα οποία στη συνέχεια αναδιπλώνονται και σχηματίζουν ένα κανάλι γνωστό ως σωλήνας του Harves ή οστεώνες (Clarke, 2008). Το οστό είναι έτοιμο και είναι ίσο σε ποσότητα με αυτό που απορροφήθηκε. Μετά, ακολουθεί η φάση της ηρεμίας (Currey, 2002) (Εικόνα 2.8).



Εικόνα 2.8 Φάσεις οστικής ανακατασκευής (Καραμπάς, 2011).

2.3 ΟΣΤΙΚΕΣ ΑΝΤΙΚΑΤΑΣΤΑΣΕΙΣ

Η αύξηση του προσδόκιμου ζωής είναι αποτέλεσμα των επιτευγμάτων της ιατρικής, της τεχνολογίας και άλλων επιστημών που συμβάλλουν ταυτόχρονα και στη βελτίωση της ποιότητας ζωής. Αυτή η κατάσταση μακροζωίας, όμως οδηγεί συχνά στην εμφάνιση νόσων που παλαιότερα δεν προλάβαιναν να εκδηλωθούν, όπως οι νευροεκφυλιστικές νόσοι (Alzheimer's, Parkinson's, Huntington's, σκλήρυνση κατά πλάκας, κ.ά.), μυϊκές ή οστικές εκφυλιστικές παθήσεις (οστεοαρθρίτιδα, κ.ά.), αυτοάνοσα νοσήματα (ρευματοειδής αρθρίτιδα, συστηματικός ερυθματώδης λύκος, κ.ά.) που χρήζουν ειδικής αντιμετώπισης και συχνά σχετίζονται με την ανάγκη για αντικατάσταση ή αναγέννηση πασχόντων ιστών. Ταυτόχρονα, τα πολύ υψηλά ποσοστά ατυχημάτων, αυτοκινητικών, αθλητικών αλλά και εργατικών, που καταγράφονται ετησίως σε παγκόσμια κλίμακα, δημιουργούν επίσης πολύ συχνά την ανάγκη για αντικατάσταση, ή αναγέννηση ιστών που έχουν υποστεί σημαντική βλάβη ή δεν υπάρχουν πια. Έτσι αναγκαία και λογική είναι η ανάπτυξη διεπιστημονικών κλάδων που στοχεύουν να καλύψουν αυτές τις ανάγκες. Η αναγεννητική ιατρική είναι ένας πολλά υποσχόμενος διεπιστημονικός κλάδος που, με τη βοήθεια της ιστομηχανικής, της μηχανικής υλικών, αλλά και των επιστημών υγείας συμπράττουν προς αυτό τον σκοπό.

2.3.1 Οστικά μοσχεύματα

Η αγγειογένεση και η οστεογένεση αποτελούν φυσικούς μηχανισμούς επιδιόρθωσης που λαμβάνουν χώρα στον ανθρώπινο οργανισμό. Στην εικόνα 2.8 φαίνονται τα στάδια της οστικής ανακατασκευής. Ωστόσο, οι ιστοί αυτοί πέρα από κάποιο κρίσιμο μέγεθος δεν μπορούν να αναπλαστούν από μόνοι τους και χρειάζονται κλινική βοήθεια.

Η Ορθοπεδική Χειρουργική συχνά χρησιμοποιεί οστικά μοσχεύματα σε περιπτώσεις, όπως: α) ψευδαρθρώσεις καταγμάτων, β) πλήρωση οστικών κύστεων, γ) πλήρωση οστικών κενών και κοιλοτήτων ή γεφύρωση τμημάτων οστών που δημιουργούνται μετά από τραύμα ή αφαίρεση οστού με όγκο ή λοίμωξη, δ) επανεγχειρήσεις ολικών αρθροπλαστικών, ε) σπονδυλοδεσίες. Πρόκειται για μίγματα (φωσφορικού ασβεστίου), που παρασκευάζονται με φυσικό ή με συνθετικό τρόπο και προσομοιάζουν το ανόργανο τμήμα του οστού (Τζόκα, 2016). Είναι ουσίες οστεοκαθοδηγητικές και χρησιμοποιούνται για την πλήρωση οστικών κύστεων ή ελλειμμάτων. Τα μοσχεύματα ανάλογα με τον τρόπο δράσης τους διακρίνονται σε:

- Οστεογενετικά: Μοσχεύματα που περιέχουν ζωντανά κύτταρα, τα οποία είναι δυνατόν να δημιουργήσουν οστό στην περιοχή που θα τοποθετηθούν.
- Οστεοεπαγωγικά: Περιέχουν αυξητικούς παράγοντες, συχνά οστική μορφογενετική πρωτεΐνη, οι οποίοι προσελκύουν κύτταρα από τους γύρω ιστούς της λήπτριας περιοχής. Τα κύτταρα αυτά πολλαπλασιάζονται και διαφοροποιούνται σε οστεοβλάστες που παράγουν οστό.
- Οστεοκαθοδηγητικά: Είναι μοσχεύματα στα οποία δεν υπάρχουν ζωντανά κύτταρα ή αυξητικοί παράγοντες. Δρουν ως ικρίσματα που διευκολύνουν την είσοδο αγγείων, από τους γύρω ιστούς, μέσω των οποίων μεταφέρουν κύτταρα για τη δημιουργία οστού.

Τα είδη των εμφυτευμάτων που χρησιμοποιούνται μπορεί να είναι αυτομοσχεύματα (autografts), αλλομοσχεύματα (allografts), ξеноμοσχεύματα (xenografts) ή οστικά υποκατάστατα. Τα αυτομοσχεύματα λαμβάνονται από τον ίδιο τον οργανισμό του ασθενούς. Έτσι, ο ιστός μεταφέρεται από μία ανατομική θέση σε μία άλλη στον ίδιο ζωντανό οργανισμό. Στην κατηγορία αυτή ανήκουν το σπογγώδες και το φλοιώδες οστό, τα αγγειωμένα οστικά μοσχεύματα και ο αυτόλογος μυελός των οστών. Είναι τα πιο ιδανικά μοσχεύματα και παρουσιάζουν οστεογενετικές, οστεοεπαγωγικές και οστεοκαθοδηγητικές ιδιότητες. Τα πλεονεκτήματα αυτών είναι ο χαμηλός κίνδυνος μετάδοσης ασθενειών και η ιστοσυμβατότητά τους, με το μειονέκτημα ότι δεν υπάρχουν σε απόθεμα (Τζόκα, 2016).

Τα αλλομοσχεύματα είναι οι ιστοί που μεταφέρονται μεταξύ δυο γενετικά διαφορετικών ατόμων του ιδίου όμως είδους. Λαμβάνονται από νεκρά σώματα, ύστερα από κατάλληλη επεξεργασία (κατάψυξη, αποξήρανση και αποστείρωση με ακτινοβολία). Στην κατηγορία αυτή εντάσσονται τα σπογγώδη, τα φλοιώδη, τα μεγάλα οστικά τμήματα και η οστική θεμέλια ουσία. Έχουν οστεοκαθοδηγητικές και λιγότερο οστεοεπαγωγικές ιδιότητες. Δεν περιέχουν κύτταρα και δεν χρησιμοποιούνται νωπά διότι υπάρχει κίνδυνος ανοσολογικών αντιδράσεων και μετάδοσης ασθενειών από το δότη στο λήπτη. Είναι σημαντικό να τονίσουμε ότι καθώς τα αλλομοσχεύματα προέρχονται από ανθρώπους, η μετάδοση ασθενειών από τον δότη στον λήπτη αποτελεί ένα σημαντικό ζήτημα. Υπάρχει κίνδυνος μετάδοσης του ιού HIV, του ιού της ηπατίτιδας Β και του ιού της ηπατίτιδας C (Tomford, 1995). Μία από τις δυσκολίες που συναντάται κατά την ανίχνευση ιογενούς νόσου σε εν δυνάμει δότες ιστού, είναι η ύπαρξη μιας αρχικής περιόδου κατά την οποία ο

δότης μπορεί να έχει το λοιμώδες νόσημα αλλά τα επίπεδα του ιού ή του αντισώματος σε απάντηση στον ιό, να μην είναι αρκετά υψηλά ώστε να ανιχνευθούν (λανθάνουσα περίοδος). Ωστόσο, ο συνδυασμός της προληπτικής εξέτασης των δοτών και της εξέτασης του αίματός τους, μειώνει τον κίνδυνο μετάδοσης ιών από μη επεξεργασμένα μυοσκελετικά μοσχεύματα, ενώ ο κίνδυνος μετάδοσης ιών μέσω μεταμόσχευσης επεξεργασμένων, κατεψυγμένων- αφυδατωμένων οστικών εμφυτευμάτων είναι πρακτικά μηδενικός.

Τα ξενομοσχεύματα προέρχονται από άλλους ζωικούς οργανισμούς και μεταφέρονται σε ανθρώπους, για αυτό έχουν περιορισμένη κλινική χρήση. Είναι οστεοκαθοδηγητικά και περιέχουν μόνο το ανόργανο τμήμα του οστού, λόγω του καθαρισμού στον οποίο υπόκεινται πριν χρησιμοποιηθούν (Giannoudis, 2005). Τα ξενομοσχεύματα, προκειμένου να χρησιμοποιηθούν, είναι σαφές πως πρέπει να υποστούν σχολαστικό καθαρισμό, προκειμένου να αποβληθεί το μεγαλύτερο ποσοστό ζωικών πρωτεϊνών, χωρίς να αλλοιωθεί το κολλαγόνο, έτσι ώστε να διατηρηθούν οι μηχανικές ιδιότητες. Τέτοια μοσχεύματα έχουν χρησιμοποιηθεί ευρέως στην ορθοπεδική χειρουργική, όπως το ελεφαντοστό, το κέρατο των βοοειδών και το βόειο οστό. Εξαιτίας της αδυναμίας ενσωμάτωσής τους στον ξενιστή το ελεφαντοστό και το κέρατο των βοοειδών δεν χρησιμοποιούνται πλέον ως μοσχεύματα. Όσον αφορά στα βόεια μοσχεύματα, μελέτες σε πειραματόζωα, έχουν δείξει καλά αποτελέσματα. Ενώ υπάρχει μία επιφυλακτικότητα σχετικά με τη μετάδοση ασθενειών, έχει παρατηρηθεί γενικά ευρεία χρήση βόειου κολλαγόνου ως σύνθετο άλλων μοσχευμάτων (Keskin, Gundogdu & Atac, 2007).

Στην αναδόμηση του οστικού ιστού που εμφανίζει πρόβλημα, η χρήση αυτόλογου οστού ή αλλομοσχεύματος χρησιμοποιείται ευρέως σε κλινικές εφαρμογές (Jie, Dai & Cao, 2002, Matejovsky, Matejovsky & Kofranek, 2006). Έτσι, τα αυτόλογα οστικά μοσχεύματα ακόμη θεωρούνται ως βασικά παρά το γεγονός ότι έχουν σοβαρά μειονεκτήματα που βασίζονται στη μεταμόσχευση του αυτόλογου οστού, όπως το δευτερογενές τραύμα η ανοσολογική απόρριψη του αλλομοσχεύματος (Imai et al., 2003), η μετεγχειρητική θνησιμότητα και η χαμηλή διαθεσιμότητα. Τα οστικά μοσχεύματα εμφανίζονται χωρίς αγγείωση και εξαρτώνται από τη διάχυση (Tomlinson & Silva, 2013). Έτσι φαίνεται ότι η χρήση αυτόλογων οστών και αλλομοσχεύματος δεν είναι αποτελεσματική για μεγάλες αλλοιώσεις, διότι σε αυτές τις περιπτώσεις, τα αλλομοσχεύματα αποδεικνύεται ότι έχουν

απορροφηθεί από τον οργανισμό πριν από την ολοκλήρωση της οστεογένεσης (Amini, Laurencin & Nukavarapu, 2012). Η έρευνα επικεντρώνεται στην ανάπτυξη συνθετικών υλικών για την αντικατάσταση του αυτόλογου οστού σε μεταμοσχεύσεις. Ερευνάται εκτενώς η δυνατότητα σύνθεσης υλικών για μεταμοσχεύσεις οστών κυρίως κεραμικά με βάση το ασβέστιο, υλικά με βάση τα πολυμερή, είτε συνδυασμός αυτών. Τα συνθετικά οστικά υποκατάστατα πρέπει να έχουν οστεοδιεγερτικές και οστεοκαθοδηγητικές ιδιότητες και να είναι ικανά να σχηματίσουν νέο οστίτη ιστό, λειτουργώντας ως τρισδιάστατες δομές επάνω στα οποία μπορεί να αναπτυχθεί ο νέος ιστός (Daculsi, 2015). Η κατηγορία αυτή ανήκει στα αμιγώς μη-ζωντανά βιοϋλικά. Τα τεχνητά υλικά που προσεγγίζουν πολύ τη δομή και τη συμπεριφορά του οστού, όπως είναι το τσιμέντο, κάποιες βιοϋαλοι, ο υδροξυαπατίτης θα μπορούσαν να δώσουν λύση σε αυτά τα προβλήματα (Krishnan & Lakshmi, 2013).

Το πεδίο έρευνας για την ανάπτυξη μοσχευμάτων είναι ανοιχτό. Προς το παρόν, φαίνεται ότι οι έρευνες οδηγούνται προς τις οστικές μορφογενετικές πρωτεΐνες (BMP) ή άλλους αυξητικούς παράγοντες και στη χρήση των τεχνικών της Ιστομηχανικής (ή Ιστοτεχνολογία, tissue engineering), με σκοπό τη δημιουργία του ιδανικού οστικού μοσχεύματος. Ιδιαίτερα οι οστικές μορφογενετικές πρωτεΐνες, και κυρίως η BMP-2 και BMP-7 που δεν είναι παρά αυξητικοί παράγοντες της οικογενείας των TGF- β , εφαρμόζονται ευρέως στην κλινική πράξη ως οστεοεπαγωγικοί παράγοντες. Στην παρούσα μελέτη συζητάται η χρήση HA, προερχόμενο από αραγονίτη από εσωτερικό οστό σουπιάς, για εφαρμογές της ορθοπεδικής, για αντικατάσταση ή πλήρωση οστικών ατελειών με σκοπό τη δημιουργία νέου οστίτη ιστού. Επίσης, γίνεται αναφορά σε μεθόδους ενίσχυσης πορώδους βιοκεραμικού ικρίωματος με βιοπολυμερή, προς μηχανική ενίσχυση της δομής αυτού, με σκοπό τη χρήση τους ως εμφυτεύματα για σπονδυλοδεσία.

2.3.2 Σπονδυλοδεσία

Οι ενδείξεις της σπονδυλοδεσίας ποικίλλουν ανάλογα με την περιοχή της σπονδυλικής στήλης και ανάλογα με τη βαρύτητα της νόσου. Αυτές καθορίζονται από την πιθανότητα πρόκλησης «αστάθειας» της σπονδυλικής στήλης είτε από την ίδια τη νόσο, είτε από την επιχειρούμενη χειρουργική θεραπεία η οποία συνήθως πραγματοποιείται μέσω αφαίρεσης ενός οστικού τμήματος της σπονδυλικής στήλης (Δημογέροντας).

Η σπονδυλοδεσία είναι μια χειρουργική επέμβαση κατά την οποία δημιουργείται μια συμπαγής ένωση μεταξύ δύο ή περισσότερων σπονδύλων. Έτσι προκύπτει ισχυροποίηση και σταθερότητα στη σπονδυλική στήλη. Σχεδόν όλες οι μέθοδοι σπονδυλοδεσίας βασίζονται στην τοποθέτηση οστικού μοσχεύματος μεταξύ των σπονδύλων. Τα μοσχεύματα λαμβάνονται από το ισχίο ή από άλλο οστό του ασθενούς (αυτόλογα), ή μπορεί να ληφθούν από τράπεζα μοσχευμάτων (ετερόλογα).

Διάφοροι τροποποιητικοί βιολογικοί παράγοντες, όπως πρωτεΐνες και ορμόνες, που προκαλούν περαιτέρω ανάπτυξη οστού μέσα στον οργανισμό, μπορούν να χρησιμοποιηθούν για να μειώσουν ή να εξαφανίσουν την ανάγκη για χρήση οστικών μοσχευμάτων, όπως οι αυξητικοί παράγοντες, όπως οι BMPs (Bone Morphogenetic Proteins), συμβάλλουν καθοριστικά στην επούλωση των ιστών του μυοσκελετικού συστήματος και προάγουν τον πολλαπλασιασμό και τη διαφοροποίηση των κυττάρων. Για τους λόγους αυτούς τους χρησιμοποιεί και η ιστοτεχνολογία (Cao, 2005).

Η σπονδυλοδεσία μπορεί να περιλαμβάνει και τη χρήση επιπρόσθετων υλικών, όπως βιδών, πλακών ή κλωβών. Τα υλικά αυτά δρουν ως νάρθηκας, όπως όταν τοποθετείται γύψος σε ένα σπασμένο χέρι, για να κρατούνται ενωμένοι οι σπόνδυλοι, ενώ το οστικό μόσχευμα επουλώνει και ενδεχομένως γίνεται μέρος του οστού του ασθενούς (π.χ., οστεοποίηση). Αυτή η σύντηξη του οστικού μοσχεύματος με τα οστά της σπονδυλικής στήλης παρέχει μια μόνιμη ένωση μεταξύ των οστών. Μόλις συμβεί αυτό, τα υλικά δεν χρειάζονται πλέον, αλλά οι περισσότεροι ασθενείς προτιμούν να τα αφήσουν στη θέση τους παρά να υποβληθούν σε χειρουργική επέμβαση αφαίρεσής τους (Νομικός) (Εικόνα. 2.9).



Εικόνα 2.9 Εικόνα Σπονδυλοδεσίας (Χριστόπουλος).

*Βιοϋλικά,
ιστική μηχανική*

Κεφάλαιο

3

3 ΒΙΟΪΛΙΚΑ, ΙΣΤΙΚΗ ΜΗΧΑΝΙΚΗ

3.1 ΒΙΟΪΛΙΚΑ

3.1.1 Γενικά

Βιοϋλικά είναι τα φυσικά ή τεχνητά υλικά, με τα οποία μπορούμε να αντικαταστήσουμε τμήματα ή ακόμα και λειτουργίες ενός ζωντανού οργανισμού με τρόπο ασφαλή, οικονομικό, αξιόπιστο και φυσιολογικά αποδεκτό. Πρόκειται για τη συνάντηση του ζωντανού οργανισμού με το άψυχο υλικό. Αφορούν σε τεχνολογία αιχμής που αποκτά αυξανόμενο ενδιαφέρον λόγω της εξειδικευμένης τεχνογνωσίας, του οικονομικού ενδιαφέροντος και του ανθρωποκεντρικού της χαρακτήρα. Ειδικά σε σχέση με το σκελετικό σύστημα, λόγοι που αναφέρθηκαν νωρίτερα (αύξηση προσδόκιμου ζωής, ατυχήματα κ.ά.), επιβάλλουν την αυξημένη ανάγκη σε βιοϋλικά, για ίαση και πλήρωση οστικών ελλειμμάτων που οφείλονται σε παθολογικές καταστάσεις των οστών.

Η χρήση των βιοϋλικών έχει τις ρίζες της σε αρχαίους πολιτισμούς. Ήδη συναντάμε τεχνική αντικατάστασης οργάνων και ιστών στον Αιγυπτιακό πολιτισμό, αφού έχουν βρεθεί μούμιες με τεχνητά μάτια, αυτιά, μύτες και δόντια. Στην Κίνα και την Ινδία, συναντάται η χρήση κόλλας, κεριών και ιστών για να αντικαταστήσουν μέρη του σώματος που έλειπαν ή παρουσίαζαν κάποια δυσλειτουργία. Με το πέρασμα των αιώνων, η βελτίωση των συνθετικών υλικών, των χειρουργικών τεχνικών και των μεθόδων αποστείρωσης, επέτρεψαν τη χρήση των βιοϋλικών με ολοένα και περισσότερους τρόπους (Κατσικογιάννη, 2008).

Η πρώτη επίσημη εμφάνιση των βιοϋλικών έγινε το 1896 από τον G.V. Black με αμαλγάματα, τα οποία ήταν κατασκευασμένα από κράμα Ag-Sn. Κατά τη δεκαετία του 1990, οι οδοντικές επιδιορθώσεις με βιοϋλικά απαριθμούνταν σε 160 εκατομμύρια σε όλο τον κόσμο. Η ανάπτυξη των βιοϋλικών στις μέρες μας, είναι πλέον τόσο μεγάλη και διαδεδομένη, ώστε να εφαρμόζονται περισσότερα από 40 κατηγορίες από αυτά τα βιοϋλικά, σε πολλά πρόσθετα «εξαρτήματα – μέλη» του σώματος (Williams, 1987), με σκοπό τη βελτίωση της ποιότητας της ζωής των πασχόντων, που σε διαφορετική περίπτωση, δεν θα μπορούσαν να έχουν αυτή τη δυνατότητα.

3.1.2. Επιθυμητά χαρακτηριστικά και ιδιότητες βιοϋλικών

Είναι σημαντικό τα βιοϋλικά να διαθέτουν παρόμοιες χημικές, βιολογικές και μηχανικές ιδιότητες με το υλικό το οποίο θα αντικαταστήσουν. Δηλαδή, ένα ιδανικό υποκατάστατο οστικού μοσχεύματος πρέπει να είναι μηχανικά σταθερό, να είναι σε θέση να αποικοδομείται εντός κατάλληλου χρονικού πλαισίου, να εμφανίζει οστεοαγωγίμες, οστεοκαθοδηγητικές και οστεοεπαγωγικές ιδιότητες και να παρέχει ένα ευνοϊκό περιβάλλον για την εισβολή των αιμοφόρων αγγείων και των κυττάρων που σχηματίζουν οστό (Janicki & Schmidmaier, 2011).

Πιο συγκεκριμένα, ένα οστεοαγωγίμο ικρίωμα θα επιτρέπει στα κύτταρα των οστών να προσκολληθούν, να πολλαπλασιάζονται και να σχηματίζουν εξωκυττάρια ουσία στην επιφάνεια και τους πόρους του. Το ικρίωμα πρέπει επίσης να είναι σε θέση να προκαλέσει το σχηματισμό νέου οστού μέσω της πρόσληψης προγενετικών κυττάρων, μια ιδιότητα που είναι γνωστή ως οστεοεπαγωγή (Bose, Roy & Bandyopadhyay, 2012).

Το βιοϋλικό μετά την τοποθέτησή του στο σώμα βρίσκεται σε επαφή με τους ιστούς του οργανισμού, μέσω της διεπιφάνειας επαφής τους. Οι ιδιότητες αυτής της διεπιφάνειας παίζουν σημαντικό ρόλο στη συμβατότητα του βιοϋλικού. Επιπλέον στα βιοϋλικά μπορεί να δοθεί το σχήμα ή/και οι διαστάσεις του τμήματος που θα αντικαταστήσει. Επομένως αντιλαμβανόμαστε ότι τα βιοϋλικά δεν είναι αδρανή υλικά, αλλά συνδέονται άμεσα με το βιολογικό περιβάλλον και αντιδρούν με τους ιστούς του ανθρώπινου οργανισμού (Ratner et al., 2004). Ανάλογα με την απόκριση του ιστού, τα βιοϊατρικά υλικά μπορούν να χωριστούν σε βιοαδρανή, βιοαπορροφήσιμα και βιοενεργά.

Βιοαδρανή (bioinert) είναι εκείνα τα υλικά, που όταν εισαχθούν στον ανθρώπινο οργανισμό, δεν μεταβάλλουν την ισορροπία του, παρουσιάζοντας ελάχιστη αλληλεπίδραση με τον περιβάλλοντα ιστό. Συνήθως ο οργανισμός τα απομονώνει σε μια κάψουλα συνδετικού ιστού (Oga, Arizono & Sugioaka, 1993). Κανένα υλικό δεν είναι απολύτως αδρανές κατά την εμφύτευσή του. Ειδικά όμως για αυτά που θεωρούνται βιοαδρανή, η μόνη αντίδραση που λαμβάνει χώρα από τον οργανισμό είναι η αλληλεπίδραση του υλικού με τον ινώδη ιστό. Στην κατηγορία αυτή εντάσσονται οι ανοξείδωτοι χάλυβες, το τιτάνιο, η αλούμινα, η μερικώς σταθεροποιημένη ζirkονία, το υψηλού μοριακού βάρους πολυαιθυλένιο, κ.ά. (Hayashi et al., 1993).

Βιοενεργά (bioactive) υλικά είναι εκείνα, που όταν τοποθετηθούν εντός του ανθρωπίνου οργανισμού αλληλεπιδρούν με τα περιβάλλοντα οστά ή ακόμη και με τους μαλακούς ιστούς. Αυτό συμβαίνει μέσω μιας χρονικά εξαρτημένης κινητικής τροποποίησης της επιφάνειάς τους, που προκαλείται από την εμφύτευσή τους μέσα στο οστό, ώστε να επιτυγχάνεται άμεση σύνδεση του υλικού με τον ανθρώπινο ιστό σχηματίζοντας χημικούς δεσμούς (Hubbell, 1999). Η αντίδραση ανταλλαγής ιόντων μεταξύ του βιοενεργού εμφυτεύματος και των σωματικών υγρών που το περιβάλλουν έχει σαν αποτέλεσμα τον σχηματισμό μιας στοιβάδας ενεργού ανθρακικού απατίτη (CHAp) πάνω στο μόσχευμα, που είναι χημικά και κρυσταλλογραφικά ισοδύναμη με την ανόργανη φάση του οστού. Παραδείγματα βιοενεργών υλικών είναι οι συνθετικοί HA, οι βιοϋαλοι και τα κεραμικά (Ducheyne & Qiu, 1999). Τα βιοενεργά βιοϋλικά διακρίνονται σε δύο επιμέρους κατηγορίες ανάλογα με τις ιδιότητες οστεοεπαγωγικότητας και οστεοαγωγιμότητας που εμφανίζουν. Υπάρχουν βιοενεργά υλικά, που συνδέονται με τον σκληρό ιστό και προάγουν την ανάπτυξη του νέου ιστού στην επιφάνειά τους, όπως είναι ο HA και χρησιμοποιούνται στην κάλυψη ατελειών των οστών λόγω κυστών και για οστικές συνδέσεις (οστεοεπαγωγικά υλικά). Υπάρχουν και οστεοαγώγιμα βιοενεργά υλικά, που μετά την πρόσδεση στο οστό και την ανάπτυξη νέου ιστού, έχουν τη δυνατότητα να ανακατασκευάζουν το οστό, το οποίο στη συνέχεια συνδέεται με τους μαλακούς ιστούς, όπως είναι τα ούλα και ο χόνδρος (Takemoto et al., 2005, Fujibayashi et al., 2004). Τα υλικά της κατηγορίας αυτής χρησιμοποιούνται κλινικά για τη θεραπεία περιοδοντικών ασθενειών, για την κάλυψη οστικών ατελειών και για την αντικατάσταση των οστών.

Βιοαπορροφήσιμα (bioresorbable, bioabsorbable) είναι τα υλικά, τα οποία μετά την εισαγωγή τους στον ανθρώπινο οργανισμό διαλύονται (απορροφώνται) και αντικαθίστανται σταδιακά από αυξανόμενο ιστό. Τα υλικά αυτά διαλύονται κατά την επαφή τους με τα βιολογικά υγρά του σώματος και τα προϊόντα της διάλυσης αυτής αποβάλλονται από τον οργανισμό μέσω των νεφρών (Gloria, De Santis & Ambrosio, 2010). Συνηθέστερα υλικά της κατηγορίας αυτής είναι ευκόλως διασπώμενα πολυμερή, όπως η πολυγλυκόλη (PGA) (Rimondini et al., 2005), τα πολυλακτικά οξέα (PLLA) και τα συμπολυμερή τους (Shikinami & Okuno, 1999), τα οποία χρησιμοποιούνται κυρίως για ράμματα, καθώς επίσης και το φωσφορικό τριασβέστιο ($\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$). Τα μέταλλα είναι συνήθως αδρανή υλικά, τα

κεραμικά είναι ταυτόχρονα βιοαδρανή, βιοενεργά ή/και βιοαπορροφήσιμα υλικά, ενώ τα πολυμερή είναι βιοαδρανή ή/και βιοαπορροφήσιμα.

Τα πιο σημαντικά προβλήματα που σχετίζονται με τη χρήση εμφυτευμάτων είναι η θρόμβωση στις περιοχές εμφύτευσης αυτών, αλλά και λοιμώξεις που προκαλούνται από τα βιοϋλικά. Σε όλες, πάντως, τις περιπτώσεις εφαρμογής των βιοϋλικών, στόχος είναι η επίτευξη της μεγαλύτερης δυνατής διάρκειας ζωής του υλικού και συγχρόνως η καλή βιοσυμβατότητά του με τον οργανισμό του ασθενή, έτσι ώστε να αποφεύγονται τυχόν επιπλοκές (Hench & Ethridge, 1982).

Είναι σαφές ότι ένα βιοϋλικό για να χρησιμοποιηθεί ως εμφύτευμα, ή γενικότερα πριν την άμεση επαφή του με το ανθρώπινο σώμα, απαιτείται το υλικό να πληροί τις ακόλουθες προδιαγραφές (Αγαθόπουλος):

- Να μην είναι καρκινογόνο ή να επηρεάζει το γενετικό υλικό και να προκαλεί τερατογενέσεις.
- Να έχει υψηλή μηχανική αντοχή, έτσι ώστε να μπορεί να αντέξει τις επαναλαμβανόμενες κυκλικές φορτίσεις που δέχεται κατά τη χρήση του.
- Να είναι πολύ πιο ανθεκτικό στη διάβρωση από το δραστικό περιβάλλον του ανθρώπινου σώματος.
- Να μπορεί εύκολα να διαμορφωθεί στο επιθυμητό σχήμα και μέγεθος για την εφαρμογή που προορίζεται.
- Να είναι υψηλής καθαρότητας, δηλαδή να μην περιέχει ακαθαρσίες ή άλλου είδους ανεπιθύμητες προσθήκες.
- Να είναι εύκολα διαθέσιμο και να μην έχει υψηλό κόστος παραγωγής και πώλησης (Αγαθόπουλος).

3.1.3. Βιοσυμβατότητα

Με τον όρο βιοσυμβατότητα εννοούμε ότι το τεχνητό εμφύτευμα πρέπει να γίνει αποδεκτό από τους ιστούς που το περιβάλλουν και να ενοποιηθεί από τον οργανισμό με ελεγχόμενο και προβλεπόμενο τρόπο. Σύμφωνα με έναν από τους πιο περιγραφικούς ορισμούς: «Βιοσυμβατότητα είναι η ικανότητα του υλικού να αποδίδει προκαλώντας μια κατάλληλη απάντηση του οργανισμού σε μια εξειδικευμένη εφαρμογή». Ο ορισμός αυτός

υποστηρίζει ότι ένα υλικό είναι βιοσυμβατό όχι μόνο όταν δεν απορρίπτεται από τον οργανισμό, αλλά όταν συγχρόνως προάγει τη διαδικασία της ανάρρωσης, της επούλωσης και της ίασης. Επίσης διαφαίνεται η συσχέτιση της έννοιας της βιοσυμβατότητας με το είδος της εφαρμογής, δηλαδή ένα υλικό μπορεί να είναι βιοσυμβατό σε μία εφαρμογή και σε μία άλλη όχι.

Όταν ένα υλικό εμφυτεύεται στο σώμα θα πρέπει ο οργανισμός να το αποδεχθεί. Διαφορετικά υπάρχει κίνδυνος να προκληθεί στην περιοχή του εμφυτεύματος ερεθισμός και φλεγμονή με αποτέλεσμα τη δημιουργία εστίας μόλυνσης και την απόρριψη του εμφυτεύματος από τον οργανισμό. Η ικανότητα του βιοϋλικού να γίνεται αποδεκτό από τον οργανισμό είναι η βιοσυμβατότητα.

Τέσσερα είναι τα συστατικά που συνιστούν την έννοια της βιοσυμβατότητας:

- Η φυσικοχημική αλληλεπίδραση στη διεπιφάνεια ιστού-βιοϋλικού (ισχύς και φύση διεπιφανειακών δεσμών).
- Ο υποβιβασμός (degradation) των ιδιοτήτων του υλικού με το χρόνο.
- Η τοπική απάντηση του οργανισμού στο εμφύτευμα (αντίδραση των ιστών στην περιοχή γύρω από το εμφύτευμα).
- Η ολική αντίδραση του οργανισμού στην παρουσία του εμφυτεύματος (επίδραση του εμφυτεύματος σε όλα τα συστήματα του οργανισμού).

Η εκτίμηση της βιοσυμβατότητας μπορεί να γίνει με φυσικοχημική μελέτη της διεπιφάνειας ιστού-βιοϋλικού καθώς και με βιολογικούς ελέγχους *in vitro* και *in vivo*. Το υλικό έρχεται σε επαφή με το ζωντανό ιστό με την επιφάνειά του, για αυτό πρέπει να γίνει μελέτη των επιφανειακών ιδιοτήτων του υλικού. Έτσι, η επίδραση ενός ιστού στην επιφάνεια ενός υλικού μπορεί να προσδιοριστεί με χημικό τρόπο, έμμεσα και άμεσα, είτε με βιολογικό τρόπο, με *in vitro* και *in vivo* μελέτη.

Ο έμμεσος τρόπος έγκειται στη μέτρηση της συγκέντρωσης των ιόντων που απελευθερώνονται από την επιφάνεια του βιοϋλικού όταν αυτό βρεθεί σε ένα διάλυμα βιολογικού υγρού. Ο άμεσος τρόπος συνίσταται στην παρατήρηση της επιφάνειας που έχει προσβληθεί με μια από τις μεθόδους χαρακτηρισμού των επιφανειών, όπως είναι, FTIR, και Raman (για βάθος ανάλυσης μέχρι 0,5 μm), SEM και EPMA (για βάθος ανάλυσης μέχρι 1,5 μm). Οι τεχνικές αυτές δίνουν πιο ακριβή αποτελέσματα σε σχέση με την έμμεση μέθοδο, αλλά σε αντιστάθμισμα έχουν πολύ πιο μεγάλο κόστος εγκατάστασης. Πάντως και οι δύο

τρόποι μπορούν να δώσουν πληροφορίες αν η επιφάνεια ενός υλικού είναι κατάλληλη ώστε να έρθει σε επαφή με τον οργανισμό.

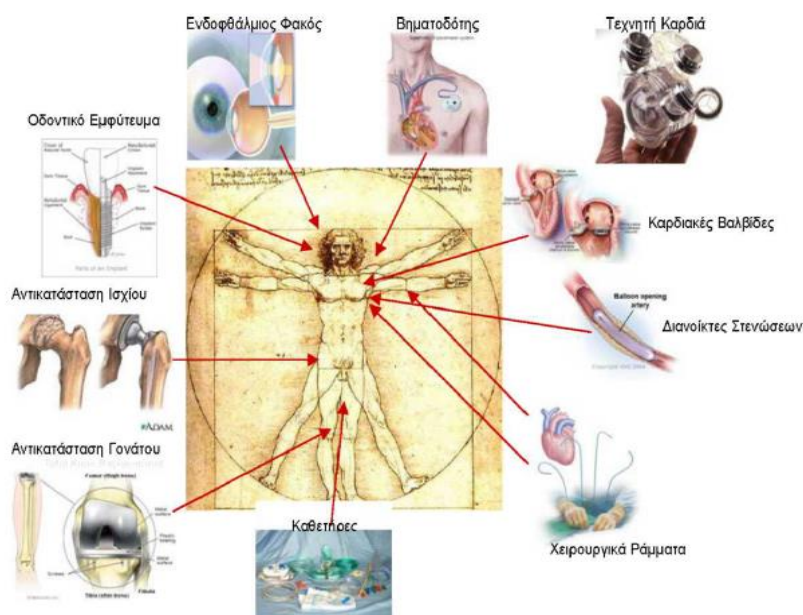
Ο *in vitro* έλεγχος είναι γρήγορος, οικονομικός και οι απαιτήσεις περιορίζονται στον εξοπλισμό ενός βιολογικού εργαστηρίου. Πρόκειται για πειράματα ανάπτυξης ιστοκαλλιιεργειών σε διάφορες συνθήκες θερμοκρασίας και pH. Ο έλεγχος αυτός συνίσταται στην εμφύτευση του βιοϋλικού και στη μετέπειτα ιστολογική εξέταση στην περιοχή του εμφυτεύματος. Αυτή η διαδικασία είναι δαπανηρή, χρονοβόρα, και απαιτεί εξειδικευμένο προσωπικό και πειραματόζωα.

3.1.4. Εφαρμογές

Τα βιοϋλικά χρησιμοποιούνται για την επούλωση ή την αντικατάσταση σκληρών και μαλακών ιστών. Σκληροί ιστοί νοούνται τα οστά και τα δόντια, ενώ μαλακοί είναι το δέρμα και τα αγγεία. Η ιατρική αξιοποιεί σήμερα ένα μεγάλο αριθμό συσκευών και εμφυτευμάτων μέσα στο ανθρώπινο σώμα, όπως χειρουργικά ράμματα, αντικαταστάτες αρθρώσεων και συνδέσμων, μοσχεύματα αρτηριών, βαλβίδες καρδιάς, ενδοφθάλμιους φακούς και οδοντικά εμφυτεύματα, ιατρικές συσκευές, όπως βηματοδότες, καθετήρες, βιοαισθητήρες, τεχνητές καρδιές, αιμοφόρα αγγεία και πλήθος άλλων. Οι κυριότερες εφαρμογές των βιοϋλικών (Εικόνα. 3.1) συνοψίζονται παρακάτω (Hench & Ethridge, 1982):

- Αισθητήρια και νευρικά συστήματα. Παραδείγματα αποτελούν οι οπτικές και ακουστικές προθέσεις, οι προθέσεις κερατοειδούς και μέσου ωτός, ο τεχνητός δακρυϊκός πόρος, οι νευρικές σωληνώσεις κ.ά.
- Καρδιά και καρδιοαγγειακό σύστημα. Παραδείγματα είναι ο βηματοδότης, οι καρδιακές βαλβίδες και τα συστήματα για αντικαταστάσεις αγγειακών και αρτηριακών τμημάτων κ.τ.λ. Υλικά που συνήθως χρησιμοποιούνται είναι ο πυρολυτικός άνθρακας, το τιτάνιο, το πολυτετραφθοροαιθυλένιο (PTFE), το πολυαιθυλένιο (PE) και το τερεφθαλικό πολυαιθυλένιο (PET), ανάλογα με το είδος και την κατασκευή που απαιτείται. Για τις καρδιακές βαλβίδες, χρησιμοποιούνται κυρίως μαλακά βιοπροσθετικά υλικά κυρίως ζωικής προέλευσης (χοιρινές βαλβίδες αορτής ή περικάρδια από βοοειδή), ή σκληρά τεχνητά υλικά για την κατασκευή τεχνητών καρδιακών βαλβίδων (Sewell-Loftin et al., 2011). Οι βιολογικές βαλβίδες εμφανίζουν μεγαλύτερη συμβατότητα σε σχέση με τις μηχανικές και δεν προκαλούν θρομβώσεις, διαθέτουν όμως μικρό χρόνο ζωής

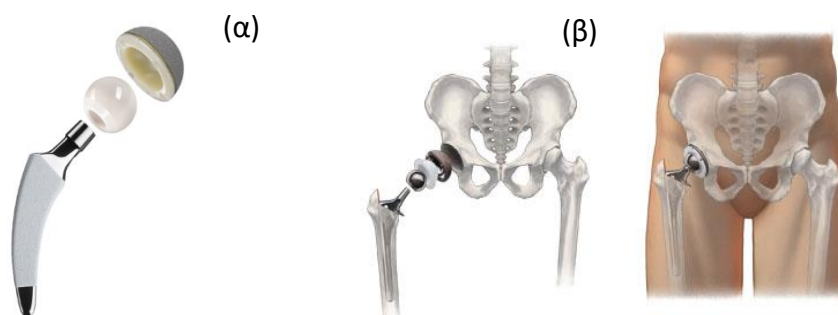
(Parenteau-Bareil, Gauvin & Berthod, 2010). Σε κάθε περίπτωση, οι επιθυμητές ιδιότητες των μοσχευμάτων είναι: η μικροβιακή στείρωση και καθαρότητα, η διαπερατότητα η οποία σχετίζεται με την ύπαρξη πόρων και μειώνεται με διαδικασίες πρόπησης και ζελατινοποίησης, η ευκαμπτότητα και η ελαστικότητα, η αντίσταση στη θρόμβωση και στη μόλυνση, και η διάρκεια ζωής.



Εικόνα 3.1 Εφαρμογές βιοϋλικών (Κατσικογιάννη, 2008)

- Σκελετικό σύστημα. Παραδείγματα αποτελούν το τεχνητό ολικό ισχίο, το γόνατο, ο ώμος, ο αγκώνας και ο καρπός καθώς επίσης και εμφυτεύματα της σπονδυλικής στήλης. Τα βιοϋλικά χρησιμοποιούνται στην ορθοπαιδική για την επούλωση καταγμάτων, ως εμφυτεύματα σπονδυλικής στήλης, σε περιπτώσεις οστεοπόρωσης, οστεοαρθρίτιδας και ρευματοειδούς αρθρίτιδας, όπου δεν επιτυγχάνεται βελτίωση με φυσιοθεραπείες ή χειρουργικές επεμβάσεις, με τη μορφή δισκίων, βιδών και συνδέσμων. Συνήθως επιλέγονται μεταλλικά, κεραμικά και πολυμερή βιοϋλικά. Τα μεταλλικά υλικά, αποτελούνται κυρίως από ανοξείδωτο χάλυβα και κράματα του τιτανίου ή του κοβαλτίου (Liu, Chu & Ding, 2004). Κεραμικά βιοϋλικά όπως αλούμινα και ζirkονία χρησιμοποιούνται για αντικαταστάσεις αρθρώσεων που έχουν υποστεί φθορά, ενώ ο HA χρησιμοποιείται για σύνδεση οστών (Ong, Lovald & Black, 2014, Wang, Ouyang & Poh, 2011). Πολυμερή, όπως το υψηλού μοριακού βάρους

πολυαιθυλένιο (UHMWPE), χρησιμοποιούνται για την κατασκευή επιφανειών στήριξης των κεραμικών ενθεμάτων στις αντικαταστάσεις συνδέσμων. Ένα σημαντικό πρόβλημα που παρουσιάζουν τα ορθοπεδικά εμφυτεύματα είναι η φθορά της πολυμερικής κοιλότητας, σε περιπτώσεις ολικής αντικατάστασης άρθρωσης. Αυτή η κατάσταση μπορεί να είναι εξαιρετικά σοβαρή, αφού δημιουργούνται μικροσκοπικά θραύσματα του υλικού, που εξαπλώνονται στους γειτονικούς ιστούς και τα υγρά της άρθρωσης και ενεργοποιούν το ανοσοποιητικό σύστημα. Απελευθερώνονται ένζυμα τα που καταστρέφουν τα κύτταρα των γειτονικών οστών και προκαλούν οστεόλυση. Η αντικατάσταση ισχίου με εμφύτευμα, κατασκευασμένο από κράμα τιτανίου και δίσκο φτιαγμένο από HA είναι μία συχνή εφαρμογή (Εικόνα 3.2).



Εικόνα 3.2 Αντικατάσταση κεφαλής μηριαίου. (α) εμφύτευμα ολικής αντικατάστασης ισχίου, με δίσκο φτιαγμένο από HA που εφαρμόζει στο μηριαίο οστό. (β) εφαρμογή εμφυτεύματος στο ανθρώπινο ισχίο.

- Οδοντιατρικές Εφαρμογές. Χρησιμοποιούνται για γναθική ανακατασκευή, για ενδοοστικά (πλήρωση κοιλότητων, αντικατάσταση πασχόντων, κατεστραμμένων ή απολεσθέντων δοντιών) ή περιοστικά (άμεση στήριξη δοντιών στη γνάθο), ορθοδοντικά εμφυτεύματα κ.ά.

Για σφραγίσματα χρησιμοποιούνται ευρέως αμαλγάματα, χρυσός, ζirkονία, ακρυλικές ρητίνες, σιλικόνες, ενώ σαν οδοντιατρικά εμφυτεύματα κεραμικά όπως η αλούμινα και η οδοντική πορσελάνη (Figueiredo, et al., 2010, Höland et al., 2009). Από μεταλλικά βιοϋλικά και κυρίως από τιτάνιο κατασκευάζονται στηρίγματα τεχνητών οδοντοστοιχιών ή τμήματα διαφόρων ορθοδοντικών εμφυτευμάτων, ενώ ο HA βρίσκει εφαρμογή στην κατασκευή επικαλύψεων για μεταλλικά εμφυτεύματα. Επίσης

χρησιμοποιείται σαν πληρωτικό υλικό σε κενά των οστών της στοματικής κοιλότητας που έχουν δημιουργηθεί από ασθένειες ή τραύματα. Η οστεοενσωμάτωση στην οδοντιατρική είναι ένα τεράστιο επίτευγμα για την αντιμετώπιση της απώλειας των δοντιών, αφού επιτρέπει την αντικατάστασή τους από ριζόμορφα εμφυτεύματα τιτανίου (τεχνητές ρίζες από τιτάνιο σε μορφή βίδας) (Εικόνα 3.3).



Εικόνα 3.3 Οδοντικά μικροεμφυτεύματα

- Πληρωτικά κενών χώρων. Παραδείγματα είναι τα γεμίσματα προσώπου (μάγουλο, μύτη), αντικατάσταση ή αύξηση στήθους, η αντικατάσταση οστικών κρανιακών ελαττωμάτων, ο τεχνητός αρθρικός χόνδρος, ενθέματα σιαγόνας και άλλα. Οι χειρουργικές επεμβάσεις για επισκευή της καταστροφής που μπορεί να έχουν υποστεί τα οστά στις περιοχές αυτές, με χρήση ιστού του ίδιου του ασθενούς, δεν έχουν πάντα τα επιθυμητά αποτελέσματα. Μερικές φορές είναι απαραίτητη η χρήση τεχνητών μερών προκειμένου να αποκατασταθεί η ικανότητα ομιλίας και σίτισης, ή για λόγους αισθητικής, αποκαθιστώντας τα χαρακτηριστικά του σώματος που χάθηκαν (Chim & Gosain, 2009). Τα ενθέματα τιτανίου, χρησιμοποιούνται ευρέως για τη θεραπεία ασθενών που αντιμετωπίζουν ανάλογα προβλήματα (Neumann & Kevenhoerster, 2009). Για την επιδιόρθωση οπών στο κρανίο, χρησιμοποιείται ένα βιοδιασπώμενο πλαστικό, κατασκευασμένο από πολυκαπρολακτόνη (Williams et al., 2005). Το δομικό του δίκτυο λειτουργεί σαν βάση πάνω στην οποία θα δημιουργηθεί το καινούριο οστό.

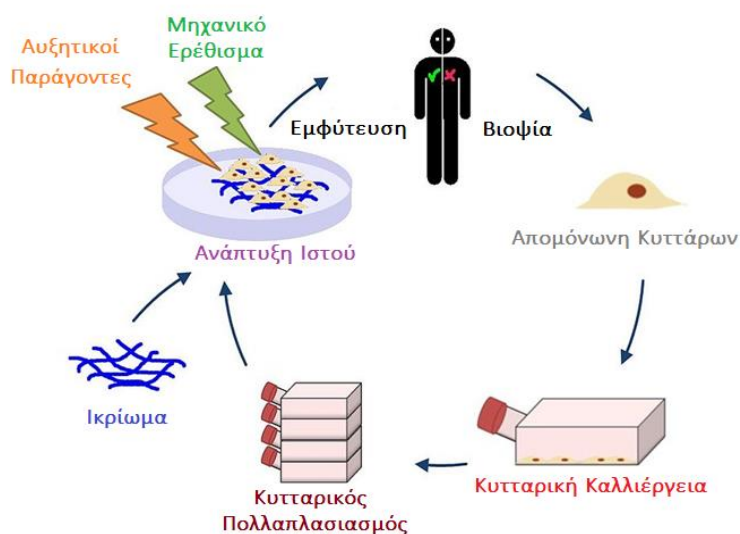
Ειδικά τα αδρανή βιοϋλικά χρησιμοποιούνται κυρίως για την ακινητοποίηση μιας τραυματικής περιοχής, ενώ τα βιοαπορροφήσιμα και τα βιοενεργά στοχεύουν στην επιτάχυνση της κινητικής ίασης. Τα βιοαπορροφήσιμα υλικά έχουν το πλεονέκτημα ότι στο τέλος έχουν αντικατασταθεί πλήρως από τον νεοσχηματισμένο ιστό. Σε τη διάρκεια όμως της απορρόφησης, το εμφύτευμα πρέπει να είναι εντελώς ακινητοποιημένο. Κατά αντίθετο τρόπο λειτουργούν τα βιοενεργά βιοϋλικά. Στην παρούσα εργασία θα μελετηθούν οι ιδιότητες βιοϋλικών με βάση τον ΗΑ φυσικής προέλευσης, με σκοπό την εφαρμογή αυτών σε ορθοπεδικές εφαρμογές.

3.2 ΙΣΤΙΚΗ ΜΗΧΑΝΙΚΗ

Η ιστομηχανική είναι ένα διεπιστημονικό πεδίο βιοτεχνολογίας και έχει εξελιχθεί μέσα από τη μηχανική των βιοϋλικών, ενσωματώνοντας τις αρχές της μηχανικής αλλά και των επιστημών υγείας, δηλαδή την ιατρική, την κυτταρική και τη μοριακή βιολογία. Στόχος είναι η αναγέννηση, η διατήρηση και η βελτίωση της δομής και της λειτουργίας του ιστού ή και ολόκληρου του οργάνου, σε περιπτώσεις σημαντικού τραυματισμού ή ασθένειας, όπως ο καρκίνος ή εκφυλιστικές νόσοι (Howard et al., 2008, Ikada, 2006, Langer & Vacanti, 1993). Αυτό είναι εφικτό, με την αντικατάσταση του κατεστραμμένου ιστού με φυσικά, συνθετικά ή ημισυνθετικά βιομμητικά υλικά, που είτε είναι εξαρχής πλήρως λειτουργικά, είτε αναπτύσσονται σταδιακά, κατακτώντας την απαιτούμενη λειτουργικότητα (Parveen, Krishnakumar & Sahoo, 2006). Η ιστομηχανική επομένως αναφέρεται στην ανάπτυξη και τον συνδυασμό ικριωμάτων, κυττάρων και βιολογικά δραστικών μορίων σε λειτουργικούς ιστούς (Katari, Peloso & Orlando, 2015). Απαιτείται ενσωμάτωση και αλληλεπίδραση μεταξύ ιστών και κυττάρων, μέσω κατάλληλων δικτύων κυτταρικής σηματοδότησης. Για το σκοπό αυτό, χρησιμοποιούνται συχνά, τροποποιητικοί παράγοντες όπως, βιολογικά δραστικές πρωτεΐνες και DNA. Η ιστομηχανική θεωρείται ως ιδανική ιατρική θεραπευτική προσέγγιση, λόγω των εξαιρετικών πλεονεκτημάτων που συγκεντρώνει (Zuk et al., 2001). Θεωρείται ως μία μέθοδος που πληροί τις προϋποθέσεις για την ικανοποίηση των απαιτήσεων που πρέπει να έχει ένα ιδανικό ικρίωμα για χρήση ως οστικό εμφύτευμα (Yarlagadda, Chandrasekharan & Shyan, 2005).

Η τρισδιάστατη καλλιέργεια και η ανάπτυξη των κυττάρων επιτυγχάνεται με τη χρήση ενός ικριώματος το οποίο θα λειτουργεί ως μήτρα για την ανάπτυξη των κυττάρων και θα

δρα ως εξωκυττάρια μήτρα για το σχηματισμό νέου ιστού (Karp, Dalton, Shoichet, 2003). Η *in vitro* ανάπτυξη στην ιστοτεχνολογία περιλαμβάνει την εισαγωγή κυττάρων στο ικρίωμα και στην *in vivo* μέθοδος εμφυτεύεται το ικρίωμα στην συγκεκριμένη ανατομική θέση. Ο συνδυασμός των δύο παραπάνω μεθόδων δίνει τελικά το ιδανικό ικρίωμα για την κατάλληλη εφαρμογή (Εικόνα 3.4).



Εικόνα 3.4 Βασική Αρχή της μηχανικής των ιστών. Η αρχή της ιστοτεχνολογίας βασίζεται στο ότι οι ιστοί μπορούν να απομονωθούν από έναν ασθενή, να ανακατασκευαστούν τεχνητά σε μια καλλιέργεια κυττάρων (*in vitro*) και στη συνέχεια να εμφυτευθούν (*in vivo*) ως υποκατάστατο ιστού (Χατζηνικολαΐδου, 2015).

Μπορούμε να ισχυριστούμε ότι η ιστοτεχνολογία ορίζεται ως η τεχνική που θα πείσει τον οργανισμό να αυτοθεραπευτεί διαμέσου της παροχής είτε κατάλληλων θέσεων (γεωμετρικών, χημικών, μηχανικών) μοριακών ερεθισμάτων, είτε κυττάρων, είτε δομών υποστήριξης και θα τον θέσει σε κατάσταση αυτοίασης. Μια κοινή στρατηγική για την ιστοτεχνολογία οστών είναι να χρησιμοποιηθεί ένα προσωρινό περίγραμμα που να λειτουργεί ως πλαίσιο-οδηγός ώστε να καθοδηγεί τα κύτταρα, τα οποία είναι υπεύθυνα για την ανάπτυξη και τη δημιουργία οστού (Ma & Elisseeff, 2006).

Σε κάθε περίπτωση, απαιτούνται κατάλληλα ικρίωματα για την υποστήριξη της αναγέννησης των οστών, που ειδικά για τα οστά, πρέπει να διαθέτουν ορισμένες χαρακτηριστικές ιδιότητες. Αυτές είναι η βιοσυμβατότητα, η ελεγχόμενη αποικοδόμηση, η

μηχανική ακεραιότητα, η επαγωγή αγγείωσης, η οστεοαγωγιμότητα και η επαγωγή ανάπτυξης και διατήρησης οστικής μάζας (Αγαθόπουλος).

3.3 ΙΚΡΙΩΜΑΤΑ ΙΣΤΙΚΗΣ ΜΗΧΑΝΙΚΗΣ

Τα οστικά υποκατάστατα είναι συνθετικά υλικά, τα οποία μιμούνται τις λειτουργίες των οστικών ιστών. Για την επιλογή του κατάλληλου υλικού πρέπει να λαμβάνονται υπόψη το είδος του οστού και οι μηχανικές του ιδιότητες. Ανάλογα με τις πιέσεις και την ανάγκη σταθερότητας που απαιτείται για το κάθε οστό, επιβάλλεται να αναπτυχθεί υλικό με την κατάλληλη σκληρότητα, την κατάλληλη χημική συμπεριφορά. Δηλαδή, ανάλογα με την περιοχή της εμφύτευσης, οι μηχανικές ιδιότητες είναι διαφορετικές. Για παράδειγμα υπάρχουν έντονες διαφορές, μεταξύ σπογγώδους και φλοιώδους οστού. Το μέτρο ελαστικότητας του φλοιώδους οστού είναι περίπου 15-20 GPa και η αντοχή σε θλίψη κυμαίνεται μεταξύ 100 έως 200 MPa, ενώ οι τιμές του σπογγώδους είναι 0,1-2 GPa και 2 έως 20 MPa, αντίστοιχα. Το ιδανικό ικρίωμα, ως προηγμένο βιοϋλικό, εμφανίζει βιοσυμβατότητα, χωρίς ανοσολογική απόκριση (Polo-Corrales, Latorre-Esteves & Ramirez-Vick, 2014).

Είναι πολύ σημαντικές οι προσπάθειες που έχουν γίνει για την ανάπτυξη βιοσυμβατών ικριωμάτων για τη μηχανική ιστών. Με τον όρο ικρίωματα (scaffolds) εννοούμε τις δομές που αποτελούνται από μια μήτρα που καθοδηγεί την τρισδιάστατη ανάπτυξη κυττάρων και αποτελούν τη βάση για την ανάπτυξη του νέου ιστού. Έχουμε τη δυνατότητα να τους δώσουμε το κατάλληλο σχήμα, μέγεθος, δομή και αρχιτεκτονική, ανάλογα με τον ιστό που πρόκειται να ανακατασκευαστεί. Τα ικρίωματα αυτά που θα χρησιμοποιηθούν για την οστική ανακατασκευή πρέπει να είναι βιοαποικοδομήσιμα, βιοσυμβατά και βιοενεργά. Ο αραγονίτης CaCO_3 , η κοινή γύψος ή γύψος των Παρισίων $\text{CaSO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, ο β-γουιτλοκίτης $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ - ένα είδος τριβασικού φωσφορικού ασβεστίου (TCP) είναι απορροφήσιμα, ανόργανα υλικά, δοκιμασμένα σε εφαρμογή ιστομηχανικής σε οστά (Mahmood et al., 2017, Sharma et al., 2016). Τα κεραμικά, με βάση το φωσφορικό ασβέστιο (CaP), όπως το TCP, ο υδροξυαπατίτης HA ($\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$), το τετραβασικό φωσφορικό ασβέστιο είναι ευρέως χρησιμοποιούμενα, γιατί προκαλούν ελάχιστη ανοσοαπόκριση, είναι ελεύθερα πρωτεϊνών και βιοσυμβατά (Gentile et al., 2014, Chow,

2009, Romagnoli, D'Asta & Brandi, 2013). Γενικά, τα τρισδιάστατα βιοδραστικά οστικά ικρίωματα που χρησιμοποιούνται για οστική αναγέννηση θα πρέπει να βασίζονται σε βιοϋλικά με κατάλληλες ιδιότητες, δηλαδή βιοσυμβατότητα, βιοδραστικότητα, επαγωγή οστεογένεσης, απόδοση σε οστεογένεση και βιοαποικοδόμηση (Grigore, 2018, Li et al., 2013, Mourino & Boccaccini, 2010).

Τα ικρίωματα χρησιμοποιούνται για να καλύψουν τα κενά στους ιστούς, να προσφέρουν δομική υποστήριξη και να μεταφέρουν αυξητικούς παράγοντες ή βλαστοκύτταρα, που θα μπορούσαν να αναδομήσουν τον ιστό (Howard et al., 2008). Τα ικρίωματα είναι χρήσιμο να είναι πορώδη, με αποικοδομήσιμη δομή, κατασκευασμένα από φυσικά υλικά, όπως το κολλαγόνο, ή συνθετικά πολυμερή (πολυλακτίδιο, πολυγλυκολίδιο ή συμπολυμερές πολυλακτιδίου και γλυκολιδίου). Λόγω της φυσικής τους προέλευσης, δεν προκαλούν συνήθως φλεγμονή ή κάποια ανοσολογική αντίδραση, παράλληλα είναι και βιοαποικοδομήσιμα. Η υφή τους ποικίλει. Μπορεί να είναι σπογγώδης, όπως είναι τα χαρτιά και τα υφάσματα, ζελατινώδης ή σύνθετη, με κανάλια, πολυσύνθετους πόρους, κατασκευασμένη με χρήση νέας τεχνολογίας επεξεργασίας υλικών (Parveen, Krishnakumar & Sahoo, 2006). Τα τρισδιάστατα ικρίωματα με συγκεκριμένο πορώδες είναι ζωτικής σημασίας για τη χρήση τους στην αναγέννηση των σκληρών ιστών, διότι τα κενά μέσα στο ικρίωμα, εξαιτίας του αρχικού πορώδους, παρέχουν στα κύτταρα τον απαραίτητο χώρο για να μεταναστεύσουν, να επιβιώσουν, να πολλαπλασιαστούν και τελικά να διαφοροποιηθούν μέσα στον κυτταρικό φαινότυπο, στον οποίο παρατηρείται νέος σχηματισμός ιστού και αγγειοποίηση αυτού.

Προκειμένου να παραχθεί ένας τεχνητός ιστός με την τεχνολογία της ιστομηχανικής, υπάρχουν δύο χρήσιμες προσεγγίσεις. Στη μία περίπτωση, η κατασκευή και χρήση ικριωμάτων προσφέρει τη δυνατότητα μίας κατασκευής υποστήριξης κυττάρων, με *in vitro* καλλιέργεια και ανάπτυξη. Στην περίπτωση αυτή, δημιουργείται μια μήτρα για να παραχθούν τα θεμέλια ενός ιστού για μεταμόσχευση. Στη δεύτερη περίπτωση, το ικρίωμα μπορεί να χρησιμεύσει ως αυξητικός παράγοντας ή ως σύστημα μεταφοράς φαρμακευτικού φορέα, με την έννοια ότι το ίδιο το ικρίωμα είναι συνδεδεμένο και συνυφασμένο με τους αυξητικούς παράγοντες. Έτσι, σε μία μεταμόσχευση, τα κύτταρα από το σώμα, δεσμεύονται σε διάφορες θέσεις του ικριώματος και δημιουργούν ιστό μέσα στη μήτρα. Η τοπογραφία, η αρχιτεκτονική και η σύνθεση των ικριωμάτων φαίνεται ότι

συσχετίζονται και επιδρούν στη συμπεριφορά των κυττάρων (Ripamonti, 2004). Είναι ευρεία η χρήση βιοαποικοδομήσιμων πολυμερών (π.χ. πολύ(γαλακτικό-γλυκολικό) οξύ (PLGA)) για την ανάπτυξη ικριωμάτων. Κάποιοι τύποι ικριωμάτων περιλαμβάνουν αφρώδες υπό υψηλής πίεσης CO₂ πολυγαλακτικό οξύ (PLA), ενέσιμα ικριώματα, νέα προσαρμοσμένα ικριώματα ακόμη και ικριώματα προερχόμενα από τρισδιάστατη εκτύπωση (3D Printed) (Gentile et al., 2014, Santoro et al., 2016, Lopes, Jardim & Filho, 2012).

Η επιλογή των κυττάρων και κυρίως η ιστική προέλευσή τους είναι πολύ σημαντική. Είναι συχνό να λαμβάνονται πρωτογενή κύτταρα προερχόμενα κατευθείαν από τον ασθενή και να χρησιμοποιούνται σε συνδυασμό με ικριώματα για την παραγωγή ιστού για επανεμφύτευση. Ο επιθετικός χαρακτήρας αυτής της στρατηγικής, βέβαια, δημιουργεί δυσκολίες στις εφαρμογές. Μία άλλη, πολλά υποσχόμενη επιλογή είναι τα βλαστοκύτταρα (εμβρυονικά κύτταρα (ES), πολυδύναμα μεσεγχυματικά προγονικά κύτταρα προερχόμενα από το μυελό των οστών (BM-MSCs) και πολυδύναμα μεσεγχυματικά προγονικά κύτταρα, προερχόμενα από ομφάλιο λώρο (UC-MSCs)) (Hewitt et al. 2007).

Σύμφωνα με τη μέχρι σήμερα κλινική πρακτική, τα εμφυτεύματα που μπορούν να χρησιμοποιηθούν για κατασκευή πορωδών ικριωμάτων για πλήρωση οστικών ελλειμμάτων είναι κατασκευασμένα από κεραμικά υλικά με βάση τον HA, ή/και πολυμερικά υλικά που, αφού επιτελέσουν το ρόλο τους, αποδομούνται και διαλύονται εντελώς. Έχει αποδειχτεί ότι τα ικριώματα θα πρέπει να εμφανίζουν σύνθετο πορώδες δίκτυο, αποτελούμενο από πόρους με μέγεθος 50-200 μm και με μικρότερους πόρους των οποίων το μέγεθος δεν θα ξεπερνά τα 10 μm, ώστε να επιτυγχάνονται οι βέλτιστες συνθήκες για την αναγέννηση των ιστών. Πιο συγκεκριμένα οι μικρότεροι πόροι είναι υπεύθυνοι για τη μεταφορά των θρεπτικών συστατικών, ενώ οι μεγαλύτεροι καθορίζουν την κυτταρική ανάπτυξη (Bai et al., 2011).

3.4 ΑΝΑΓΕΝΝΗΤΙΚΗ ΙΑΤΡΙΚΗ

Τα τελευταία χρόνια, η επιστήμη έχει κατευθυνθεί όλο και περισσότερο προς τον τομέα της αναγεννητικής ιατρικής που διερευνά τη δυνατότητα αποκατάστασης της λειτουργίας των οργάνων και των ιστών. Η αναγεννητική ιατρική είναι ένα ευρύτερο πεδίο που περιλαμβάνει την ιστομηχανική (Markowitz-Shulman et al., 2017). Στόχος είναι η αναγέννηση και η ενεργοποίηση του μηχανισμού αυτό-ίασης και αυτό-θεραπείας, η

αναδημιουργία κυττάρων και η αναδόμηση ιστών και οργάνων. Η διαδικασία αναγέννησης των τμημάτων του σώματος που έχουν κάποια πρόβλημα, μπορεί να λάβει χώρα *in vivo* ή *ex vivo*. Απαιτούνται κύτταρα, ικριώματα από φυσικά ή τεχνητά υλικά, αυξητικοί παράγοντες, χειρισμός γονιδίων ή συνδυασμός όλων αυτών των προαναφερθέντων παραγόντων (Orlando et al., 2011a).

Οι όροι «ιστομηχανική» («μηχανική ιστών») και «αναγεννητική ιατρική» θεωρούνται σε μεγάλο βαθμό συμπληρωματικοί και από πολλούς θεωρούνται ως εναλλακτικές μορφές θεραπείας. Αυτή η άποψη πηγάζει από την ίδια τη θεώρηση του κάθε πεδίου χωριστά, που στοχεύει στη βαθύτερη θεραπεία, ως λύση του προβλήματος και δεν περιορίζεται στην αντιμετώπιση, με τη στενή έννοια του όρου, σοβαρών και συχνά χρόνιων νοσημάτων (Ikada, 2006, Lanza, Langer & Vacanti, 1997). Είναι πολύ σημαντική η πρόοδος στην ιστομηχανική αλλά και την αναγεννητική ιατρική, τις τελευταίες δεκαετίες (Oh et al., 2006). Αυτό είναι απολύτως λογικό, αν λάβουμε υπ' όψιν τα δεδομένα που σχετίζονται με χειρουργικές επεμβάσεις, που εκτελούνται ετησίως παγκοσμίως, για τη θεραπεία εκατομμυρίων ασθενών που αντιμετωπίζουν ανεπάρκεια οργάνων ή απώλεια ιστών.

*Βιοκεραμικά,
υδροξυαπατίτης*

Κεφάλαιο

4

4 ΒΙΟΚΕΡΑΜΙΚΑ, ΥΔΡΟΞΥΑΠΑΤΙΤΗΣ

4.1 ΒΙΟΚΕΡΑΜΙΚΑ

4.1.1 Γενικά

Η ανακάλυψη των κεραμικών ήταν ένας σημαντικός παράγοντας στην εξέλιξη του ανθρώπινου πολιτισμού. Αυτή η πολιτιστική επανάσταση οδήγησε σε μεγάλη εξέλιξη στην ποιότητα και στη διάρκεια ζωής. Τα κεραμικά είναι ανόργανα, μη μεταλλικά στερεά που παρασκευάζονται με την επίδραση θερμότητας και επακόλουθη ψύξη. Έχουν κρυσταλλική (κεραμικά) ή μερικώς κρυσταλλική δομή (υαλοκεραμικά), ή μπορεί να είναι άμορφα (ύαλοι). Η χρήση των κεραμικών ήταν περιορισμένη λόγω της δυσθραυστότητάς τους, της χαμηλής αντοχής εφελκυσμού και της χαμηλής αντοχής κρούσης. Τα τελευταία χρόνια, με την ανάπτυξη καινοτόμων τεχνικών παρασκευής κεραμικών, φαίνεται πως τα κεραμικά και τα σύνθετά τους μπορούν να χρησιμοποιηθούν για την αντικατάσταση διαφόρων μερών του σώματος, ιδιαίτερα οστών. Τέτοιου είδους κεραμικά ονομάζονται βιοκεραμικά.

Τα κεραμικά υλικά εμφανίζουν αντίσταση σε διάβρωση, χαμηλή πυκνότητα, υψηλό μέτρο ελαστικότητας και υψηλή αντοχή σε θλίψη. Όμως, έχουν χαμηλή αντοχή σε κάμψη και εφελκυσμό. Η σχετική αδράνεια στα σωματικά υγρά, η υψηλή αντοχή σε θλίψη και η καλή αισθητική οδήγησε στη χρήση κεραμικών σε διάφορους τομείς. Στην οδοντιατρική, ως οδοντικές επικαλύψεις, στην καρδιοχειρουργική, ως εμφυτεύματα, και στην ορθοπεδική, για αντικατάσταση οστών. Τέλος, τα κεραμικά μπορούν να χρησιμοποιηθούν και ως συστατικά ενίσχυσης σε σύνθετα υλικά εμφυτεύσεων (Αγαθόπουλος).

Τα βιοκεραμικά παράγονται σε ποικιλία μορφών και συστάσεων και εξυπηρετούν πολλές διαφορετικές λειτουργίες στην επιδιόρθωση των μελών του σώματος. Σε πολλές εφαρμογές χρησιμοποιούνται στη μορφή υλικών συγκεκριμένου σχήματος, που ονομάζονται εμφυτεύματα, προθέσεις, ή προσθετικές συσκευές. Χρησιμοποιούνται για την πλήρωση κενών χώρων, ως επικάλυψη πάνω σε υπόστρωμα, ή ως δεύτερη φάση σε ένα σύνθετο, συνδυάζοντας τα χαρακτηριστικά των δύο υλικών σε ένα καινούριο υλικό με ενισχυμένες μηχανικές και βιοχημικές ιδιότητες (Bose, Roy & Bandyopadhyay, 2012). Για να χαρακτηριστεί ένα υλικό ως βιοκεραμικό υλικό θα πρέπει να έχει τις ακόλουθες ιδιότητες. Δεν πρέπει να είναι τοξικό, ούτε καρκινογόνο, να μην προκαλεί φλεγμονές και να είναι υποαλλεργικό και τέλος πρέπει να είναι βιοσυμβατό (Tomford, 1995).

Υπάρχουν τέσσερις τύποι βιοκεραμικών, ο καθένας με διαφορετικό τύπο σύνδεσης ιστών σε ένα εμφύτευμα. Στον πίνακα 4.1 συνοψίζονται τα χαρακτηριστικά τους.

Τα βιοκεραμικά φτιάχνονται σε πολλές διαφορετικές φάσεις. Μπορούν να είναι μονοκρυσταλλοί (ζαφείρι), πολυκρυσταλλικά (οξείδιο αλουμινίου ή HA), ύαλοι (βιοϋαλοι), ύαλο-κεραμικά (ύαλο-κεραμικά A/W), ή σύνθετα (πολυαιθυλένιο-HA). Η φάση ή οι φάσεις που χρησιμοποιούνται εξαρτώνται από τις ιδιότητες και τις λειτουργίες που απαιτούνται. Τα κεραμικά και οι ύαλοι χρησιμοποιούνται επίσης σε μία ποικιλία εφαρμογών στην ιατρική βιομηχανία. Γυαλιά για τα μάτια, διαγνωστικά μέσα, χημικά σκεύη, θερμόμετρα, δοχεία για κυτταροκαλλιέργειες, στήλες χρωματογραφίας, λέιζερ και οπτικές ίνες για ενδοσκόπηση είναι πολύ γνωστά προϊόντα καθημερινή χρήσης. Η χρήση των κεραμικών στο εσωτερικό του σώματος ως εμφυτεύματα είναι σχετικά καινούρια.

Πίνακας 4.1. Κατηγορίες βιοκεραμικών και τύπος σύνδεσης ιστών.

Τύπος εμφυτεύματος	Τύπος σύνδεσης	Παράδειγμα
(I) Σχεδόν αδρανές	Μηχανική αλληλοσύνδεση - (Μορφολογική προσκόλληση)	Al ₂ O ₃ , Ζirkονία
(II) Πορώδες	Εσωτερική ανάπτυξη των ιστών μέσα στους πόρους - (Βιολογική προσκόλληση)	HA Πορώδη μέταλλα επικαλυμμένα με HA
(III) Βιοδραστικό	Διεπιφανειακή σύνδεση με τους ιστούς - (Βιοδραστική προσκόλληση)	Βιοδραστικές ύαλοι Βιοδραστικά υαλο-κεραμικά HA
(IV) Βιοαπορροφήσιμο	Αντικατάσταση με ιστούς	Φωσφορικό ασβέστιο Βιοδραστικές ύαλοι

4.2 ΕΝΩΣΕΙΣ ΦΩΣΦΟΡΙΚΟΥ ΑΣΒΕΣΤΙΟΥ

Τα άλατα του φωσφορικού ασβεστίου είναι τα πιο σημαντικά ανόργανα συστατικά των βιολογικών σκληρών ιστών. Υπό τη μορφή του ανθρακικού HA, συναντώνται σε οστά, δόντια και τένοντες, προσδίδοντας, σταθερότητα και σκληρότητα ώστε να είναι λειτουργικά, κάνοντάς τα ενδιαφέροντα υλικά για συνθετικά οστικά μοσχεύματα (Keskin,

Gundoğdu & Atac, 2007). Το φωσφορικό ασβέστιο αποτελεί ένα ελαφρώς διαλυτό άλας, που κρυσταλλώνεται σε μια σειρά διαδοχικών φάσεων, διάμεσου διάλυσης και επανακαταβύθισης, μέχρι το σχηματισμό HA, που αποτελεί τη λιγότερο διαλυτή και περισσότερο σταθερή θερμοδυναμικά φάση. Οι ενώσεις του φωσφορικού ασβεστίου μπορούν να διαλυθούν πλήρως σε υδατικό διάλυμα, δίνοντας ιόντα που βρίσκονται ήδη στο ανθρώπινο σώμα, το οποίο παρέχει ποικίλες δυνατότητες για την εφαρμογή τους ως υλικά διασπώμενων εμφυτευμάτων (Oga, Arizono & Sugioaka, 1993).

Οι ενώσεις φωσφορικού ασβεστίου χρησιμοποιούνται ως υποκατάστατα οστών διότι είναι βιοσυμβατά, δεν είναι τοξικά και δεν αναγνωρίζονται ως ξένα υλικά στο σώμα, αφού η ομοιότητά τους με το φυσικό συστατικό των οστών και των δοντιών των θηλαστικών είναι χαρακτηριστική. Παρουσιάζουν βιοδραστική συμπεριφορά και έχουν την ικανότητα να ενισχύουν την ανάπτυξη των οστεογενετικών κυττάρων στην επιφάνειά τους, γεγονός που τα καθιστά ιδανικά υλικά για την ανάπτυξη οστικών υποκατάστατων για την ανάπλαση ιστών (Δρούγκας, 2017). Πιο συγκεκριμένα, τα ασβεστο-(ορθο)φωσφορικά είναι γνωστά ως οστεοκαθοδηγητικά και συνιστούν στη συγκόλληση των οστεοβλαστών και τον πολλαπλασιασμό τους. Οι μεγαλύτεροι περιορισμοί της χρήσης τους ως βιοκεραμικά οφείλονται στις μηχανικές τους ιδιότητες, διότι είναι ψαθυρά και έχουν χαμηλή αντοχή στη θραύση.

Συνήθως χρησιμοποιούνται ως επικαλύψεις και πληρωτικά υλικά, ενώ είναι δύσκολο να χρησιμοποιηθούν σε μεγάλης έκτασης περιοχές οστικών ατελειών. Τα άλατα φωσφορικού ασβεστίου είναι πιθανό να μπορούν να χρησιμοποιηθούν ως χειρουργικά και οδοντικά εμφυτεύματα, αλλά και ως υλικά πλήρωσης οστικών ελλειμμάτων (Chow, 2009). Με την ενίσχυση των βιοκεραμικών, αναδεικνύονται κάποιες σημαντικές ιδιότητές τους.

Από χημικής απόψεως η συντριπτική πλειοψηφία των βιοκεραμικών από ενώσεις φωσφορικού ασβεστίου, βασίζεται στον HA, το β- TCP, το διφασικό φωσφορικό ασβέστιο (BCP) και άλλες μορφές. Μία μορφή είναι το άμορφο φωσφορικό ασβέστιο ($\text{Ca}_9(\text{PO}_4)_6$) (ACP). Συναντάται ως παροδική φάση κατά τη διάρκεια σχηματισμού φωσφορικών αλάτων ασβεστίου σε υδατικά συστήματα. Συνήθως είναι η πρώτη και η λιγότερο σταθερή φάση που καταβυθίζεται από ένα υπερκορεσμένο διάλυμα που παρασκευάζεται από ανάμειξη διαλυμάτων που περιέχουν κατιόντα ασβεστίου και φωσφορικά ανιόντα. Έπειτα υπάρχει το ένυδρο φωσφορικό διασβέστιο ($\text{CaHPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$) (μπρουσίτης (DCPD)). Μπορεί εύκολα να

κρυσταλλωθεί από υδατικά διαλύματα, είναι η λιγότερο διαλυτή και κατ' επέκταση η πιο σταθερή φάση. Θεωρείται ότι αποτελεί πρώιμη φάση του HA. Ο μπρουσίτης μετατρέπεται σε άνυδρο φωσφορικό διασβέστιο, το μονετίτη, σε θερμοκρασίες πάνω από 800°C. Η δομή του μονετίτη είναι η ίδια με αυτή του μπρουσίτη, αλλά είναι σταθερός μόνο σε υψηλές θερμοκρασίες.

Το φωσφορικό οκτασβέστιο ($\text{Ca}_8(\text{HPO}_4)_2(\text{PO}_4)_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$) (OCP) βρίσκεται συχνά ως ένα ενδιάμεσο στάδιο κατά τη διάρκεια της καταβύθισης του θερμοδυναμικά πιο σταθερού φωσφορικού ασβεστίου, τον HA. Παίζει σημαντικό ρόλο στον *in vivo* σχηματισμό απατίτη στα βιοϋλικά. Το Φωσφορικό τριασβέστιο ($\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$) (β-TCP) είναι το κανονικό ορθοφωσφορικό ασβέστιο. Δεν μπορεί να καταβυθιστεί μέσω διαλύματος, αλλά μπορεί να παρασκευαστεί με πυροσυσσωμάτωση σε θερμοκρασίες υψηλότερες των 800°C. Στη βιοϊατρική, και σε συνδυασμό με τον HA, χρησιμοποιείται ως υποκατάστατο οστού (Wang, Ouyang & Poh, 2011).

Σε υψηλές τιμές pH (~5,5-7) παρατηρείται μια αρχική καθίζηση από άμορφο φωσφορικό ασβέστιο και στη συνέχεια οκτασβέστιο με τον επακόλουθο μετασχηματισμό τους σε HA. Σε χαμηλότερες τιμές pH (~2-6) είναι πιθανό να εμφανιστούν άλλες φάσεις όπως ο μπρουσίτης. Ο σχηματισμός HA γίνεται σε τιμές pH (~9,5-12) (Πίνακας 4.2).

Τα βιοκεραμικά από ενώσεις φωσφορικού ασβεστίου δείχνουν να είναι εύθραυστα πολυκρυσταλλικά υλικά για τα οποία οι μηχανικές ιδιότητες καθορίζονται από την κρυσταλλικότητα, το μέγεθος των κόκκων, τα όρια των κόκκων, το πορώδες και τη σύσταση. Φαίνεται να είναι πολύ ευαίσθητα στην ανάπτυξη των ρωγμών. Για τα οδοντικά βιοκεραμικά, η αντοχή έχει να κάνει με το μέγεθος των κόκκων. Υλικά με λεπτότερο μέγεθος κόκκων έχουν μικρότερες ρωγμές στα όρια των κόκκων και έτσι είναι πιο ανθεκτικά σε σχέση με τα βιοκεραμικά με μεγαλύτερο μέγεθος κόκκων.

Γενικά οι μηχανικές ιδιότητες μειώνονται σημαντικά, ειδικά με την αύξηση της περιεκτικότητας μιας άμορφης φάσης, του μικροπορώδους και του μεγέθους των κόκκων, ενώ η υψηλή κρυσταλλικότητα το μικρό πορώδες και το μικρό μέγεθος κόκκων τείνουν να δώσουν υψηλότερη δυσκαμψία, υψηλότερη αντοχή και θλίψη και εφελκυσμό αλλά και μεγαλύτερη δυσθραυστότητα. Έτσι τα βιοκεραμικά από ενώσεις φωσφορικού ασβεστίου κατέχουν πτωχές μηχανικές ιδιότητες και έτσι δεν επιτρέπεται η χρήση τους σε περιοχές που φέρουν μηχανικό φορτίο όπως τεχνητά δόντια ή οστά. Για παράδειγμα η

δυσθραυστότητα του HA δεν ξεπερνά τα 1,2 MPa*m^{1/2} ενώ των οστών κυμαίνεται στα 2-12 MPa*m^{1/2}.

Πίνακας 4.2. Ενώσεις φωσφορικού αβεστίου (Dorozhkin & Erpple, 2002)

Μοριακή αναλογία Ca/P	Ένωση	Χημικός τύπος	Διαλυτότητα στους 25°C		Σταθερότητα - εύρος pH στους 25°C
			-log(K _{sp})	g/l	
0.5	Monocalcium phosphate monohydrate (MCPM)	Ca(H ₂ PO ₄) ₂ ·H ₂ O	1.14	~18	0.0 – 2.0
0.5	Monocalcium phosphate anhydrous (MCPA)	Ca(H ₂ PO ₄) ₂	1.14	~17	[c]
1.0	Dicalcium phosphate dihydrate (DPCD), Brushite	CaHPO ₄ ·2H ₂ O	6.59	~0.088	2.0 – 6.0
1.0	Dicalcium phosphate anhydrous (DPCA), Monetite	CaHPO ₄	6.90	~0.048	[c]
1.33	Octacalcium phosphate (OCP)	Ca ₈ (HPO ₄) ₂ (PO ₄) ₄ ·5H ₂ O	96.6	~0.0081	5.5 – 7.0
1.5	α-tricalcium phosphate (α-TCP)	α-Ca ₃ (PO ₄) ₂	25.5	~0,0025	[a]
1.5	β-tricalcium phosphate (β-TCP)	β-Ca ₃ (PO ₄) ₂	28.9	~0,0005	[a]
1.0-2.2	Amorphous calcium phosphate (ACP)	Ca _x H _y (PO ₄) _z ·nH ₂ O n=3-4.5, 15-20% H ₂ O	[b]	[b]	~5 – 12 ^[d]
1.5-1.67	Calcium-deficient hydroxyapatite (CDHA) ^[e]	Ca _{10-x} (HPO ₄) _x (PO ₄) _{6-x} x(OH) _{2-x} (0 < x < 1)	~85	~0.0094	6.5 – 9.5
1.67	Hydroxyapatite (HA, HAp, OHAp)	Ca ₁₀ (PO ₄) ₆ (OH) ₂	116.8	~0.0003	9.5 – 12
1.67	Fluorapatite (FA, FAp)	Ca ₁₀ (PO ₄) ₆ F ₂	120.0	~0.0002	7 – 12
1.67	Oxyapatite (OA, OAp) ^[f]	Ca ₁₀ (PO ₄) ₆ O	~69	~0.087	[a]
2.0	Tetracalcium phosphate (TTCP, TetCP), Hilgenstockite	Ca ₄ (PO ₄) ₂ O	38-44	~0.0007	[a]

^[a] Οι ενώσεις αυτές δεν μπορούν να καταβυθιστούν από υδατικά διαλύματα. ^[b] Δεν μπορούν να υπολογιστούν με ακρίβεια. Ωστόσο, βρέθηκαν οι ακόλουθες τιμές: 25.7±0.1 (pH = 7.40), 29.9±0.1 (pH = 6.00), 3.27±0.1 (pH = 5.28). Ο συγκριτικός βαθμός διάλυσης του ρυθμιστικού διαλύματος σε διάλυμα οξέος είναι : ACP > α-TCP > β-TCP > CDHA > HA > FA. ^[c] Σταθερό σε θερμοκρασίες πάνω από 100°C. ^[d] Πάντα μετασταθές. ^[e] Περιστασιακά, ονομάζεται “καταβυθισμένος HA (PHA)”. ^[f] Η παρουσία του OA παραμένει ασαφές.

4.3 ΥΔΡΟΞΥΑΠΑΤΙΤΗΣ (HA)

Ο HA, $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$, είναι η πιο σταθερή και λιγότερη διαλυτή φάση από τα φωσφορικά άλατα του ασβεστίου. Είναι ένα από τα κύρια συστατικά του ανόργανου τμήματος των ανθρώπινων οστών. Αποτελεί ένα από τα βιοϋλικά που έχουν μελετηθεί περισσότερο στο πλαίσιο της ιστομηχανικής σε εφαρμογές αποκατάστασης οστών. Θεωρείται βιοκεραμικό με υψηλή δραστηριότητα, που κορυφώνεται σε περίπου 100 ημέρες (Gerhardt & Boccaccini, 2010). Έχει χημική συγγένεια με τα πρωτογενή μέταλλα που απαντώνται στα οστά και τα δόντια (Shackelford, 2005), έτσι τα ικρίωματα HA μπορούν να χρησιμοποιηθούν σε εφαρμογές για να γεμίσουν οστικά κενά, ενώ η μήτρα του HA σταδιακά εξαφανίζεται και αντικαθίσταται από νέο οστό. Φαίνεται, δηλαδή, ότι τα εξαιρετικά φυσικοχημικά χαρακτηριστικά του (σταθερότητα, βιοσυμβατότητα), το καθιστούν το ιδανικότερο, ίσως, βιοϋλικό για εφαρμογές αναγεννητικής ιατρικής σε σκληρό ιστό (Dey & Mukhopadhyay, 2015).

Ήδη στα μέσα της δεκαετίας του '70 ήταν ήδη γνωστό ότι η ασβεστοποίηση (mineralization) του οστού πάνω στις βιοϋάλους γίνεται διαμέσου ενός πλούσιου σε HA στρώματος (Hench et al., 1982). Έπειτα ερευνήθηκε διεξοδικά η δυνατότητα εφαρμογών με βάση τον HA και εμπορική διάθεση αυτών (Jarcho 1981, de Groot et al. 2002). Αυτό είναι λογικό επακόλουθο των παρατηρήσεων ότι ο HA είναι πορώδες υλικό που επιτρέπει την αγγειογένεση και παρέχει έτσι οξυγόνο και θρεπτικά συστατικά στα κύτταρα (Organ et al., 2014, Kim, Kang & Lee, 2013).

4.3.1 Δομή - σύσταση - στοιχειομετρία

Ο HA είναι μια χημική ένωση συγκεκριμένης σύστασης αλλά και κρυσταλλικής δομής. Στα βιολογικά συστήματα δεν εντοπίζεται καθαρός υδροξυαπατίτης, καθώς είναι δύσκολο να αποφευχθεί η ισόμορφη υποκατάσταση των ιόντων στο πλέγμα του, η οποία και πραγματοποιείται ώστε να σταθεροποιηθεί στην κρυσταλλική εξαγωνική δομή. Οι διάφορες υποκαταστάσεις στη δομή του με τις διάφορες ομάδες του Ca, του PO_4 και του OH οδηγούν σε αλλαγές στις παραμέτρους του κρυσταλλικού πλέγματος, στη μορφολογία και στη διαλυτότητα, χωρίς όμως να παρατηρείται κάποια σημαντική αλλαγή στη συμμετρία του (Χαντζηχρήστου, 2012). Συνήθως συναντάται η υποκατάσταση των ιόντων ασβεστίου (Ca^{2+}) από ιόντα στροντίου (Sr^{2+}), των ιόντων νατρίου (Na^+) από ιόντα μαγνησίου

(Mg⁺), των ιόντων υδροξυλίου (OH⁻) από ιόντα φθορίου (F⁻) και χλωρίου (Cl⁻) και των φωσφορικών ιόντων (PO₄³⁻) από ανθρακικά (CO₃²⁻) και θειικά ιόντα (SO₄²⁻) (Brown, Matthew & Tung, 1981). Η κατανόηση των επιδράσεων των υποκατάστατων στη δομή και στις ιδιότητες του απατίτη είναι σημαντική στην ανάπτυξη του υποκατεστημένου HA ως ένα νέο βιοϋλικό. Οι χημικές ιδιότητες του HA είναι πολύ σημαντικές τόσο για το σχεδιασμό της σύστασης βιοκεραμικών από απατίτη, συμπεριλαμβανομένων και των υποκαταστάσεων, όσο και τον τρόπο κατασκευής τους και τον τρόπο που ο HA εκφράζει τη βιοενεργότητα όταν εμφυτευτεί (Bose, Roy & Bandyopadhyay, 2012).

Βιβλιογραφικά συναντάται σε αναλογία Ca/P περίπου ίση με 1.667. Η ακριβής στοιχειομετρική αναλογία είναι δύσκολο να εκτιμηθεί στον HA, εξαιτίας των διαφορετικών αναλογιών Ca/P που μπορεί να προκύψουν, ανάλογα με τη μέθοδο σύνθεσης και τις αντίστοιχες συνθήκες (Martin, 1996).

4.3.2 Επιθυμητές ιδιότητες

Ο HA που θα παρασκευαστεί, ανεξάρτητα από τη μέθοδο παρασκευής, ιδανικά, θα πρέπει να συγκεντρώνει τις ακόλουθες ιδιότητες:

- Αντίστοιχη πορώδη δομή με το αρχικό κέλυφος, δηλαδή πορώδες, διασύνδεση πόρων και μέγεθος πόρων, με αυτήν του σπογγώδους οστού.
- Ως προς τη σύσταση του HA, που είναι το κύριο συστατικό της θεμέλιας ουσίας των οστών, είναι σημαντικό να έχει κρυσταλλίτες νανο-διαστάσεων (< 100 nm) όπως και στους βιολογικούς απατίτες.
- Να περιέχει όλα τα μεταλλικά ιχνοστοιχεία που υπάρχουν στο αρχικό υλικό των οποίων η παρουσία έχει υψηλή βιολογική σπουδαιότητα και πιστεύεται ότι μπορεί να ενισχύσει τη βιοδραστικότητα και οστεοενσωμάτωση του βιοϋλικού στο σώμα και να επιταχύνει την οστεογένεση του τραυματισμένου οστού στο χώρο του οστικού ελλείμματος.

4.3.3 Μέθοδοι σύνθεσης HA

Η σύνθεση του HA μπορεί να γίνει με αρκετές μεθόδους, με καταβύθιση, με την τεχνική sol-gel, με υδροθερμική μέθοδο, με αντιδράσεις στερεάς κατάστασης, με υδρόλυση και με άλλους τρόπους. Ανάλογα με την τεχνική σύνθεσης, τα προϊόντα μπορεί να

διαφέρουν ως προς τη μορφολογία, τη στοιχειομετρία, τη μοριακή αναλογία Ca/P και το βαθμό κρυσταλλικότητας. Επί παραδείγματι, οι απατίτες που παράγονται από υδατικά διαλύματα με καταβύθιση ή υδρόλυση είναι συνήθως ελλείψεις σε Ca^{2+} και πλούσιοι σε HPO_4^- .

Μέθοδος καταβύθισης: οι πρώτες ύλες που χρησιμοποιούνται είναι συνήθως άλατα που περιέχουν ιόντα ασβεστίου και φωσφορικά ιόντα, ώστε να αντιδράσουν προς το σχηματισμό απατίτη. Η σύνθεση απατίτη με κατάλληλη στοιχειομετρία, απαιτεί σωστή ρύθμιση του pH, της θερμοκρασίας και της αναλογίας των αντιδραστηρίων που προστίθενται στο διάλυμα.

Υδροθερμική μέθοδος: σε αυτή τη διεργασία λαμβάνουν χώρα αντιδράσεις σε υδατικό διάλυμα και αυξημένες θερμοκρασίες και πιέσεις για την κρυστάλλωση κεραμικών υλικών απευθείας από το διάλυμα. Η απλή υδροθερμική μέθοδος περιλαμβάνει θέρμανση των αντιδρώντων σε ένα κλειστό δοχείο (αυτόκλειστο) με νερό. Στο αυτόκλειστο, η πίεση αυξάνει και το νερό παραμένει υγρό πάνω από την κανονική θερμοκρασία βρασμού των 100°C («υπέρθερμο νερό»). Οι σημαντικές, δηλαδή, παράμετροι αυτής της διαδικασίας είναι ο χρόνος και η θερμοκρασία της χημικής αντίδρασης (Kim, Kang & Lee, 2013, Kim, Yang & Lee, 2014, Hongmin et al., 2015, Tkalčec et al., 2014).

Έχει γίνει σημαντική προσπάθεια στην αξιοποίηση των πρώτων υλών που παρέχονται από το θαλάσσιο κόσμο, για την σύνθεση του HA. Με την υδροθερμική μέθοδο μπορεί να παρασκευαστεί HA από πηγές βιολογικής προέλευσης, π.χ. από κοράλλια, κελύφη κ.ά. Προτείνεται μάλιστα η παρασκευή HA από εσωτερικό οστό σουπιάς, υδροθερμικός μετασχηματισμός αραγονίτη (κελύφους) εσωτερικού οστού σουπιάς προς σχηματισμό HA. Έχει βρεθεί σε προηγούμενες εργασίες, μετά τον υδροθερμικό μετασχηματισμό, το τελικό υλικό που παρασκευάζεται διατηρεί στο ακέραιο την αρχική πορώδη δομή του οστού σουπιάς, από το οποίο προήλθε. Έτσι, σε συνδυασμό και με τα πολύ καλά χημικά και κρυσταλλογραφικά χαρακτηριστικά του HA που παρασκευάζεται, το τελικό προϊόν είναι ιδιαίτερα ελκυστικό. Αυτή η υδροθερμική μετατροπή του αραγονίτη σε HA έχει αποδειχτεί αποτελεσματική σε βιοϊατρικές εφαρμογές. Το μέγεθος των κρυστάλλων του HA που παράγεται ποικίλει, από 20 ως 50 nm, δηλαδή είναι αντίστοιχο με αυτό του απατίτη των οστών.

4.3.4 Εφαρμογές, επικαλύψεις HA

Οι χρήσεις του HA αφορούν κυρίως σε οδοντικές και ορθοπεδικές εφαρμογές:

- Επιδιόρθωση οστικών ελλειμμάτων σε οδοντικές ή ορθοπεδικές εφαρμογές.
- Άμεση εμφύτευση ρίζας δοντιού μετά την εξαγωγή.
- Γναθοπροσωπικές αντικαταστάσεις.
- Αντικαταστάσεις του μέσου ωτός.
- Επικαλύψεις οδοντικών και ορθοπεδικών εμφυτευμάτων.

Καθώς θεωρείται ο HA είναι βιοδραστικό υλικό, μπορεί να υποστηρίξει την ανάπτυξη του οστού και την οστική ενσωμάτωση, όταν χρησιμοποιείται στην ορθοπεδική και στη γαστρεντερολογία. Ο HA, ως μία από τις πιο σταθερές μορφές φωσφορικού ασβεστίου, χρησιμοποιείται ως επίστρωση, σε βιολογικώς αδρανή, μεταλλικά εμφυτεύματα (Mansouri et al., 2018, Zhang et al., 2014).

Η τεχνική των κεραμικών επικαλύψεων εφαρμόζεται ευρέως σε μεταλλικά υποστρώματα χρησιμοποιούνται σε μεγάλο αριθμό εφαρμογών, συμπεριλαμβανομένων και των μεθόδων προστασίας των μεταλλικών επιφανειών από διάβρωση καθώς και την αύξηση της πυρίμαχης αντοχής του μετάλλου σε διεργασίες υψηλών θερμοκρασιών. Στη βιοϊατρική, με τις επικαλύψεις τροποποιείται μία επιφάνεια ή ακόμα και εμφανίζεται μία εντελώς καινούργια με εντελώς διαφορετικές ιδιότητες από την επιφάνεια που δεν έχει επικαλυφθεί. Ο συνθετικός HA ήταν από τα πρώτα υλικά που θεωρήθηκαν ως πιθανά υλικά επικαλύψεων μεταλλικών εμφυτευμάτων. Αυτό που επιτυγχάνεται με αυτό τον τρόπο είναι ότι η απλή βιοανεκτικότητα των ιστών απέναντι στα μέταλλα, με την επικάλυψή τους με HA μπορεί να μετατραπεί σε βιοενεργότητα με την ανάπτυξη χημικού συνδέσμου μεταξύ οστού και βιοϋλικού. Έτσι, είναι δυνατή η γρήγορη σταθεροποίηση του εμφυτεύματος από τον περιβάλλοντα ιστό (Δρούγκας, 2017, Zhang et al., 2014).

Ένας ακόμη σπουδαίος παράγοντας που παίζει ρόλο στην αποτελεσματικότητα των επικαλύψεων είναι η διεπιφανειακή σταθερότητα μεταξύ επικάλυψης και υποστρώματος. Αν η επικάλυψη αποκολληθεί από το υπόστρωμα, τότε υπολείμματα HA διαχέονται στο σώμα, όπως είναι αναμενόμενο. Επίσης χάνεται και η μηχανική συνέχεια μεταξύ εμφυτεύματος και ιστού. Η αποκόλληση της επικάλυψης θα φέρει σε επαφή τον ιστό με το μέταλλο, το οποίο ίσως είναι τοξικότερο από ότι το ίδιο το μέταλλο, το οποίο μπορεί να

προστατεύει από λεπτό στρώμα οξειδίου, π.χ. TiO_2 ή Cr_2O_3 για κράματα Ti ή Cr, αντίστοιχα. Έτσι, μέχρι να σχηματιστεί ξανά κάποιο προστατευτικό οξείδιο, μεταλλικά ιόντα θα απελευθερωθούν στο σώμα (Zhang et al., 2014).

*Ικτριώματα ΗΑ
βιολογικής προέλευσης*

Κεφάλαιο

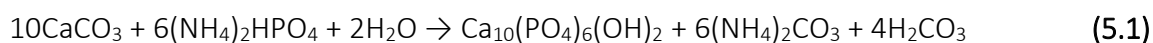
5

5 ΙΚΡΙΩΜΑΤΑ ΗΑ ΒΙΟΛΟΓΙΚΗΣ ΠΡΟΕΛΕΥΣΗΣ

5.1 ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Τα τεχνητά εμφυτεύματα από ΗΑ αποτελούν συνήθη επιλογή για αντικατάσταση σκληρού ιστού, όπως είναι τα οστά, αφού αυτό το υλικό επιτρέπει την επιτάχυνση της οστικής ανάπτυξης γύρω από το εμφύτευμα (Kannan et al., 2007, Dorozhkin & Erppl, 2002). Απατίτες βιολογικής προέλευσης, παρουσιάζουν ιδιαίτερο ενδιαφέρον γιατί πολλοί υποστηρίζουν ότι τα συστατικά του, δηλαδή τα ιόντα ασβεστίου Ca^{2+} , φωσφορικά ανιόντα PO_4^{3-} , και ιόντα υδροξειδίου OH^- , είναι ρυθμιστές της φυσιολογικής διαδικασίας οστικής ενσωμάτωσης (Goller et al., 2005). Ο καθαρός ΗΑ παρ' όλο που προσεγγίζει δομικά το φυσικό οστό, εντούτοις, δεν παρουσιάζει βέλτιστες μηχανικές ιδιότητες. Έτσι η ανάπτυξη σύνθετων βιοϋλικών με βάση τον ΗΑ είναι μία μεγάλη πρόκληση, προκειμένου να συγκεντρωθούν τα απαιτούμενα χαρακτηριστικά.

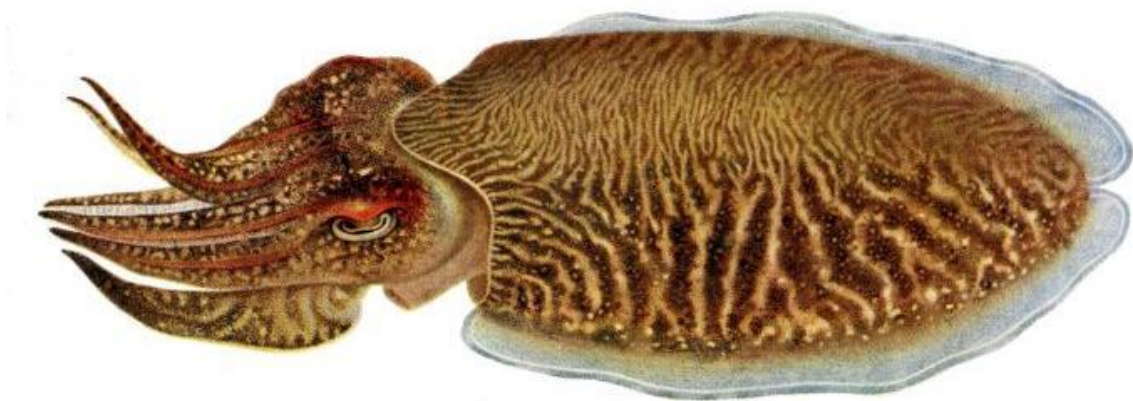
Ο Ειρηνικός Ωκεανός προσφέρει τα ακατέργαστα υλικά που προέρχονται από κοράλλια ήδη από τη δεκαετία του 1970 (Ben-Nissan, 2003). Οι επιστήμονες είχαν ήδη αντιληφθεί ότι τα υλικά αυτά εμφάνιζαν παρόμοια μικροδομή με αυτή της δομής των φυσικών οστών. Κατά αυτό τον τρόπο, έχουν γίνει σημαντικές προσπάθειες με σκοπό την ανάπτυξη έντονα βιοδραστικών οστικών ικριωμάτων από ΗΑ που προέρχεται από εσωτερικό οστό σουπιάς, μέσω υδροθερμικής μετατροπής (Rocha et al., 2005). Στα πλεονεκτήματα αυτής της επιλογής συμπεριλαμβάνεται η μεγάλη διαθεσιμότητα αυτής της πρώτης ύλης, σε παγκόσμια κλίμακα, το χαμηλό κόστος αυτού του φυσικού υλικού, ο απλός και οικονομικός εξοπλισμός που απαιτείται για την όλη διαδικασία. Τα πολύ καλά χαρακτηριστικά του ΗΑ, δηλαδή το πορώδες του και το μέγεθός του, η βιοδραστικότητα και η βιοσυμβατότητα με τους οστεοβλάστες αλλά και η δυνατότητα που προσφέρει για εύκολη διαμόρφωση σχήματος, είναι μερικά από τα πλεονεκτήματα αυτής της επιλογής (Kannan et al., 2007). Ο υδροθερμικός μετασχηματισμός του αραγονίτη (CaCO_3) που προέρχεται από κοράλλια, περιγράφεται από τη σχέση (5.1):



Το εσωτερικό κέλυφος της σουπιάς έχει παρόμοια χημικά και κρυσταλλογραφικά χαρακτηριστικά με τα κοράλλια και άλλα θαλάσσια πλάσματα και θα μπορούσε να είναι το υλικό της επιλογής για οστικές αντικαταστάσεις, αφού η διαθεσιμότητά του είναι παγκόσμια. Ο αραγονίτης από το εσωτερικό κέλυφος της σουπιάς μπορεί να μετατραπεί υδροθερμικά σε HA (Kannan et al., 2007). Στις ακόλουθες ενότητες παρουσιάζονται αναλυτικά τα εξαιρετικά χαρακτηριστικά του εσωτερικού κελύφους σουπιάς, ως πηγή αραγονίτη, με σκοπό τη μετατροπή του σε HA. Η σύνθεση και ο χαρακτηρισμός του HA αναλύονται λεπτομερώς στο επόμενο μέρος. Φυσικά, η σημασία του υλικού αυτού, από βιολογική σκοπιά, γίνεται σαφής, με την ανάλυση των βιοχημικών δυνατοτήτων του. Τα σύνθετα υλικά που βασίζονται στα βιοπολυμερή, είναι ένα ξεχωριστό πεδίο με μεγάλη επιστημονική απήχηση τις τελευταίες δεκαετίες. Σε ξεχωριστή ενότητα αναφέρονται στοιχεία σχετικά με την *in vivo* συμπεριφορά αυτών των προηγμένων υλικών, κατά την εμφύτευση-μεταμόσχευση σε μικρά πειραματόζωα, αλλά και κατά τη χρήση σε συστήματα μεταφοράς φαρμάκων.

5.2. ΣΟΥΠΙΑ *Sepia Officinalis*

Η σουπιά βρίσκεται σε όλες σχεδόν τις θάλασσες των θερμών κι εύκρατων κλιμάτων και ψαρεύονται όλο το χρόνο. Είναι ένα παράκτιο μαλάκιο των αμμωδών βυθών. Η σουπιά έχει πλατύ ωοειδές σώμα με μακριά πλευρικά πτερύγια και 10 πλοκάμια με βεντούζες. Η σουπιά κολυμπά προς τα πίσω εκτοξεύοντας με δύναμη νερό από τον κοιλιακό σάκο. Όταν αισθανθεί πως απειλείται, εκτοξεύει μελάνι από έναν αδένα που βρίσκεται στα σπλάγχνα της για να θολώσει το νερό και να μπορέσει να ξεφύγει από ό,τι την απειλεί. Από τα αρχαία χρόνια το μελάνι της σουπιάς και γενικά των μαλακίων χρησιμοποιήθηκε σαν υλικό γραφής. Ειδικά της σουπιάς, λόγω της ιδιαιτέρας αποχρώσεώς του, χρησιμοποιήθηκε κατά κόρον στην ζωγραφική από τους παλιούς μεγάλους ζωγράφους. Το ιδιαίτερο αυτό χρώμα ονομάζεται «σέπια». Η σουπιά είναι λευκόσαρκη και μαζί με όλα τα βρώσιμα μαλάκια αποτελεί την πλουσιότερη σε σίδηρο ζωική τροφή. Το πιο κοινό είδος είναι η σουπιά η φαρμακευτική (*sepia officinalis*), που φτάνει τα 30 εκ. μήκος (Εικόνα 5.1).



Εικόνα 5.1 Σουπιιά *Sepia Officinalis*

5.2.1 Δομή και σύσταση εσωτερικού κελύφους σουπιιάς

Το εσωτερικό κέλυφος της σουπιιάς ή οστό ή κοχύλι σουπιιάς προέρχεται πολύ συχνά από το θαλάσσιο είδος *Sepia Officinalis* (Rocha et al., 2005a). Το κέλυφος αυτό εμφανίζει παρόμοιες φυσικές ιδιότητες και δυνατότητα διαμόρφωσης, με τα κοράλλια. Το ανόργανο μέρος του έχει μία ανισοτροπική ορυκτή πορώδη δομή ορθορομβικού αραγονίτη, που όπως αναφέρθηκε μπορεί να μετατραπεί υδροθερμικά σε HA, μέσω της χημικής αντίδρασης (5.1) (Čadež et al., 2017, Rocha et al. 2005). Το χαμηλό κόστος παραγωγής και η διαθεσιμότητα του υλικού αυτού, το καθιστά εξαιρετική φυσική πρώτη ύλη.

Το μέγεθος του πορώδους συστήματος καναλιών έχει φυσιολογικά πλάτος ~80 nm και ύψος ~100 nm, επιτρέποντας κατά αυτόν τον τρόπο να διαδραματιστούν στο εσωτερικό του φυσιολογικές δραστηριότητες και διεργασίες (Rocha et al., 2005). Η διαδικασία κατά την οποία το εσωτερικό κέλυφος σουπιιάς βιοορυκτοποιείται, αναφέρεται εκτενώς, βιβλιογραφικά, τις τρεις τελευταίες δεκαετίες (Lowenstam & Weiner, 1989). Το εσωτερικό κέλυφος της σουπιιάς μπορεί να μετατραπεί αποτελεσματικά σε HA, ενισχυμένο με άνθρακα, στους 200 °C. Ιδιαίτερα, η μικροδομή του που παρουσιάζει έντονο το σχηματισμό των καναλιών και η χρήση εσωτερικού κελύφους φρέσκων αλιευμάτων, ευνοούν τη διάχυση του αντιδρώντος διαλύματος προς τις δομικές μονάδες αραγονίτη, με αποτέλεσμα την ταχεία κινητική.

Ο ορθορομβικός αραγονίτης είναι μία πολυμορφική τροποποίηση του άνυδρου ανθρακικού ασβεστίου που, όμως, δεν είναι πολύ σταθερή. Είναι ένα υλικό που έχει

μελετηθεί διεξοδικά. Σε σύγκριση με την αβιοτική μορφή του αραγονίτη, αυτό παράγεται κάτω από έντονες περιβαλλοντικές συνθήκες και παρουσιάζει πιο εξελιγμένα μοτίβα, με ενισχυμένες μηχανικές ιδιότητες (Wolf et al., 2016, Rodríguez-Navarro et al., 2016). Η οργανική μήτρα του εσωτερικού κελύφους της σουπιάς παρέχει ένα κατάλληλο υπόστρωμα που λειτουργεί ως πυρήνας συμπύκνωσης για την ελεγχόμενη ανάπτυξή του. Αποτελείται από πολλά διαφορετικά μακρομόρια, κυρίως πεπτίδια, πολυπεπτίδια και πρωτεΐνες, με μέτρια ποσότητα πολυσακχαριτών, λιπιδίων και χρωστικών ουσιών (Marin, Le Roy & Marie, 2012). Αυτά τα, πλούσια σε πρωτεΐνες, σύμπλοκα, που υπάρχουν στην οργανική μήτρα, επιτρέπουν τον σχηματισμό ενός κρυσταλλικού πυρήνα. Αυτή η διαδικασία βιοορυκτοποίησης, είναι γνωστή ως μηχανισμός δημιουργίας πυρήνα, σε δύο βήματα (Vekilon, 2015). Μέσα από αυτή, τα νανοσωματίδια αραγονίτη, είναι συνυφασμένα, συνήθως, με ιεραρχικά οργανωμένες δομές στη μικροκλίμακα ή και μικρότερα (Kobayashi & Samata, 2006). Οι πρωτεΐνες της διαλυτής οργανικής μήτρας (SOM) πιθανά διαδραματίζουν σημαντικό ρόλο στη μορφογένεση της δομής του εσωτερικού κελύφους σουπιάς, σε επίπεδο νανοκλίμακας (Čadež et al., 2017) και έχουν βρεθεί κυρίως μέσα σε βιοορυκτά, δηλαδή ενδοκρυσταλλικά. Πρωτεΐνες της αδιάλυτης μήτρας εντοπίζονται γύρω από την κρυσταλλική φάση, δηλαδή διακρυσταλλικά.

Ποσοτικά, οι πολυσακχαρίτες αποτελούν την αμέσως επόμενη κατηγορία μακρομορίων, μετά τις πρωτεΐνες, που συναντώνται σε κοχύλια μαλακίων. Συγκεκριμένα, μπορούν να κατανεμηθούν σε δύο διακριτές ομάδες, στη χιτίνη και στα όξινα διαλυτά πολυμερή (Frémy, 1855). Η χιτίνη ταυτοποιήθηκε πρώτα στο εσωτερικό κέλυφος της σουπιάς, σε «επιδερμίδα» καλαμαριού και αργότερα σε πολλά άλλα οστρακοειδή (Goffinet & Jeuniaux, 1979). Η σύνθεση της χιτίνης καταλύεται από το ένζυμο συνθάση χιτίνης (Weiss et al., 2006). Η αναστολή της δραστηριότητας αυτού του ενζύμου, έχει σημαντική επίδραση στη δομή της. Ο β-τύπος της χιτίνης είναι ευρέως διαδεδομένος στα όστρακα των μαλακίων. Μαζί με άλλα μακρομόρια, κυρίως πρωτεΐνες, σχηματίζει υπερμοριακές δομές (Schönitzer & Weiss, 2007).

Εκτός από τη χιτίνη, όξινοι διαλυτοί πολυσακχαρίτες συναντώνται στο εσωτερικό κέλυφος της σουπιάς. Πολλοί πολυσακχαρίτες του κελύφους συνδέονται ομοιοπολικά, με τον πρωτεϊνικό πυρήνα, σχηματίζοντας τότε γλυκοπρωτεΐνες (Marie et al., 2008). Οι πολυσακχαρίτες αποτελούνται από ουδέτερους, αμινο- και όξινους μονοσακχαρίτες σε

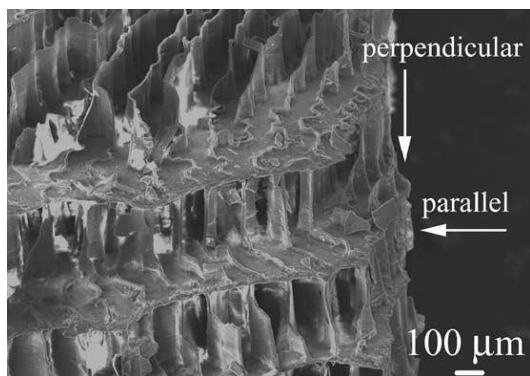
διαφορετικές αναλογίες (Dauphin & Marin, 1995). Επιπλέον, μπορούν να κάνουν σουλφιδικούς δεσμούς (Marie et al., 2008). Σε κλασικά μοντέλα σχηματισμού ορυκτών κελύφων, οι θειωμένοι πολυσακχαρίτες διαδραματίζουν έναν συνεργατικό ρόλο με τις πρωτεΐνες, συγκεντρώνοντας ιόντα ασβεστίου κοντά στους παράγοντες που συμβάλλουν στη συμπύκνωση του πυρήνα (Lowenstam & Weiner, 1989). Ο ρόλος τους περιλαμβάνει και επιπρόσθετες λειτουργίες, όπως είναι η επικοινωνία ιστών – κυττάρων ή η απομόνωση των μορίων του νερού.

Στα κελύφη, τα λιπίδια αντιπροσωπεύουν ένα πολύ μικρό ποσοστό της οργανικής μήτρας, ενώ συνήθως εντοπίζονται κάποια λιπαρά οξέα, η χοληστερόλη και οι κετόνες (Rousseau et al., 2006). Αυτά τα λιπίδια, φαίνεται ότι προάγουν την επιδιόρθωση της κεράτινης στιβάδας, δηλαδή της εξωτερικής στιβάδας του δέρματος της σουπιάς. Ο ρόλος τους όμως στην ορυκτοποίηση (ασβεστοποίηση) - των κελύφων παραμένει άγνωστος.

Οι χρωστικές είναι επίσης σημαντικά συστατικά του κελύφους, αφού σχηματίζουν μοτίβα στην επιφάνεια του κελύφους, που σε πολλές περιπτώσεις, είναι συγκεκριμένα για κάθε είδος. Οι χρωστικές ενσωματώνονται στα κελύφη, όπου φαίνεται να συνδέονται με τα μακρομόρια της μήτρας του κελύφους (Hedegaard, Bardeau & Chateigner, 2006). Συνήθως αποτελούνται από αλυσίδες 8-13 συζευγμένων διπλών δεσμών πολυενίων και καροτενοειδών, που περιλαμβάνουν μη μεθυλιωμένους πολυακετυλενικούς σκελετούς (Barnard & de Wal, 2006). Συχνά οι χρωστικές σχηματίζουν σύμπλοκα με πρωτεΐνες.

5.2.2 Μορφολογία εσωτερικού κελύφους σουπιάς

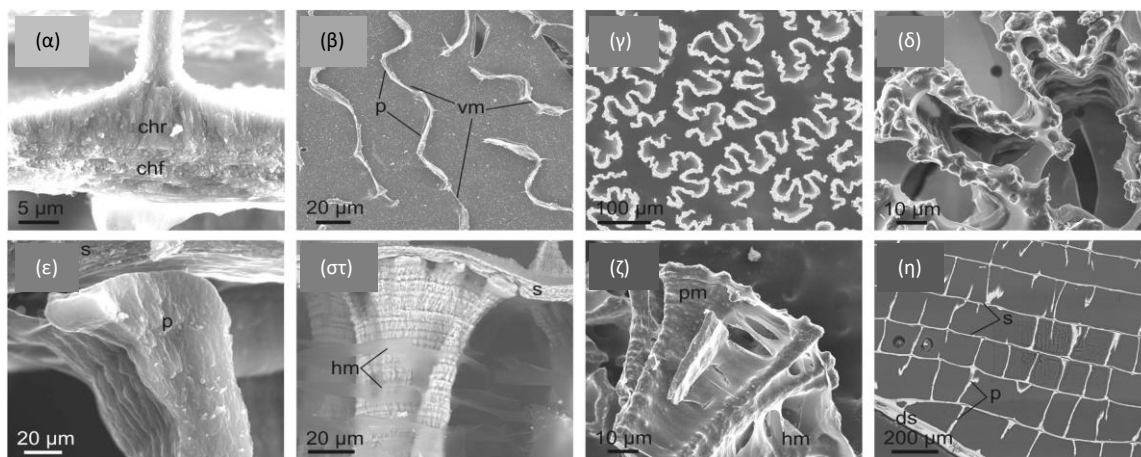
Η μορφολογία του εσωτερικού κελύφους σουπιάς διαφοροποιείται από τη δομή του μεγαλύτερου ποσοστού των πηγών φυσικού αραγονίτη, καθώς βρίσκεται στο εσωτερικό του θαλάσσιου αυτού οργανισμού, στον κοιλιακό της σάκο. Ρυθμίζει την ικανότητα πλεύσης, χρησιμοποιώντας κοιλιακούς θαλάμους και παρέχει μηχανική στήριξη μαζί με την ισχυρή ραχιαία θωράκιση. Ένα ώριμο εσωτερικό κέλυφος μιας ενήλικης σουπιάς διαθέτει περίπου 100 παράλληλα υπερκείμενους θαλάμους, οι οποίοι έχουν μια πολύπλοκη εσωτερική διάταξη ασβεστοποιημένων πυλώνων και οργανικών μεμβρανών (Checa et al., 2015). Κάθε θάλαμος έχει ύψος περίπου 600 μm και είναι σφραγισμένος με σκληρή ραχιαία θωράκιση. Η πλευρά της ουράς παραμένει ανοιχτή για τη ρύθμιση της πλεύσης (Čadež et al., 2017).



Εικόνα 5.2 Εικόνα δομής HA με περίθλαση ακτίνων Χ. Η πορώδης δομή των ικριωμάτων υδροξυαπατίτη σε ανάλυση με περίθλαση ακτίνων Χ, επιτρέπει την ανίχνευση σε οριζόντια και κάθετη διεύθυνση (Ανατύπωση από Rocha et al., 2005).

Οι μεμβράνες προκύπτουν από ένα σύστημα πολλών μικρών μεμβρανών που αρχικά γεμίζουν ολόκληρο τον θάλαμο, που αποτελείται από νανοϊνες ομοιόμορφα προσανατολισμένες, μέσα σε κάθε μεμβράνη και ελαφρώς στραμμένες, σε σχέση με εκείνες των γειτονικών μεμβρανών, δημιουργώντας μια ελικοειδή διάταξη (Checa et al., 2015). Έτσι, οι θάλαμοι αποτελούνται από οριζόντια διαφράγματα και μεμβράνες και κάθετους πυλώνες και μεμβράνες. Τα διαφράγματα διακρίνονται σε θάλαμο «οροφής» και θάλαμος «δαπέδου», δηλαδή ανώτερου και κατώτερου τμήματος. Στο κάθετο τμήμα, το κατώτερο μέρος είναι δομημένο σε στρώσεις κατά τον οριζόντιο άξονα, ενώ στο ανώτερο τμήμα η οροφή αποτελείται από κάθετες δομές αραγονίτη σε μορφή βελόνας (Εικόνα 5.2 και Εικόνα 5.3).

Οι πυλώνες εκτείνονται κατακόρυφα και μοιάζουν με κυματοειδείς πλάκες με σύνηθες πάχος ~2-3 μm . Αυτός ο σχηματισμός επιτρέπει στο εσωτερικό οστό σουπιάς να αντέχει πιέσεις έως 20 atm (Sherrard, 2000). Οι θάλαμοι βρίσκονται κάτω από τη σκληρή ραχιαία θωράκιση, που προστατεύει τη μαλακή πορώδη δομή του. Το υγρό που υπάρχει στο εσωτερικό των θαλάμων συμβάλλει στη διαδικασία της βιοασβεστοποίησης. Το ύψος του θαλάμου φαίνεται πως επηρεάζεται από τις περιβαλλοντικές συνθήκες. Σε κατάσταση έλλειψης τροφής, δημιουργούνται θάλαμοι χαμηλότερου ύψους, δίνοντάς έτσι τη ικανότητα αντίστασης στη διάβρωση (Ward & Boletzky, 1984).



Εικόνα 5.3 Δομή των θαλάμων α) Τομή από το διάφραγμα και την έναρξη του πυλώνα. Το κατώτερο τμήμα του θαλάμου συμβολίζεται με chf. Το ανώτερο τμήμα αποτελείται από κάθετες δομές αραγονίτη σε μορφή βελόνας (chr). β) νεότερος θάλαμος που δείχνει προσθιοπίσθια ευθυγραμμισμένους πυλώνες και επικλινείς κατακόρυφες μεμβράνες (πυλώνες (p), κάθετη μεμβράνη (vm)). γ) Κάθετες τομές της επιφάνειας των πυλώνων, με δονδριτικά περιγράμματα. δ) Κάθετες ενός πυλώνα, με σχηματισμό που αποτελείται από εξογκώματα στις άκρες. ε) Τομή διαμέσου ενός εγκάρσιου τμήματος πυλώνα και του διαφράγματος. Υπάρχει χαλαρή προσκόλληση των δύο στοιχείων, καθώς οι ίνες αραγονίτη συνθέτουν τον πυλώνα (διάφραγμα (s), πυλώνας (p)). στ) Πλευρική όψη της εγκάρσιας τομής ενός πυλώνα και του παρακείμενου διαφράγματος (διάφραγμα (s), οριζόντια μεμβράνη (hm)). ζ) Σπασμένη εγκάρσια άκρη πυλώνα δημιουργεί έναν οργανικό «φάκελο» (περιφερική μεμβράνη (pm), οριζόντια μεμβράνη (hm)). η) Τμήμα διαμέσου ενός ενσωματωμένου και στιλβωμένου νεότερου δείγματος (ραχιαία θωράκιση (ds), διάφραγμα (s), πυλώνας (p)). (οι εικόνες α, β, γ, δ, ε, ζ, η είναι εικόνες μεγάλης ευκρίνειας δευτερογενών ηλεκτρονίων σε μικροσκοπία SEM. Η εικόνα στ είναι εικόνα ηλεκτρονίων οπισθοσκέδασης). (Αντύπωση από Checa et al., 2015).

Πολλά είδη, μεταξύ των οποίων και το *Sepia Officinalis* προβαίνουν σε εποχικές αλλαγές στο βάθος που συναντώνται και αυτό επηρεάζει την ανάπτυξη και την αναπαραγωγική τους ικανότητα (Boletzky, 1983). Ειδικά στο *Sepia Officinalis* προβαίνουν σε περιβάλλον με έντονο χειμερινό ψύχος, δημιουργούνται πυκνότεροι θάλαμοι με μικρότερα κενά μεταξύ τους (Hewitt & Stait, 1988). Είναι πολύ πιθανό ότι από το εσωτερικό κέλυφος της σουπιάς εκκρίνεται σύμπλοκο χιτίνης-πρωτεΐνης. Το εσωτερικό κέλυφος της σουπιάς αυτοοργανώνεται στην κάθε επιφάνειά του, σε επίπεδο στρωμάτωσης, όπως ο υγρός κρύσταλλος της χοληστερόλης, και έτσι οι πυλώνες σχηματίζονται από παχύρρευστους δακτυλίους.

5.3. ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΗ ΔΙΑΔΙΚΑΣΙΑ ΥΔΡΟΘΕΡΜΙΚΟΥ ΜΕΤΑΣΧΗΜΑΤΙΣΜΟΥ ΗΑ

Το εσωτερικό κέλυφος σουπιάς, όπως ήδη αναφέραμε, εξάγεται από τη σουπιά του είδους *Sepia Officinalis*. Στη συνέχεια, πλένεται πολύ καλά με απεσταγμένο νερό και ξηραίνεται. Η ραχιαία θωράκιση απομακρύνεται και το πλευρικό τμήμα κόβεται σε μικρά τεμάχια με χειρουργικό νυστέρι. Εφαρμόζεται διαφορική θερμική ανάλυση και θερμοβαρυμετρική ανάλυση (DTA/TGA) (ρυθμός αύξησης θερμοκρασίας 5°C/min, στον αέρα) για τον ακριβή προσδιορισμό της περιεκτικότητας του εσωτερικού κελύφους σουπιάς σε ανθρακικό ασβέστιο. Τα δείγματα εμβαπτίζονται σε διάλυμα υποχλωριώδους νατρίου 5% για 48 ώρες, με σκοπό να απομακρυνθούν τα οργανικά κατάλοιπα (Mansouri et al., 2018). Για την υδροθερμική μετατροπή σε ΗΑ, χρησιμοποιείται μία ήδη γνωστή μέθοδος υδροθερμικής αντίδρασης, ελαφρά τροποποιημένη (Rocha et al., 2006). Ένα υδατικό διάλυμα δισόξινου φωσφορικού αμμωνίου ($\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$) 0.6 M προστίθεται σε ένα κομμάτι από το εσωτερικό κέλυφος σουπιάς, με σκοπό να ρυθμιστεί η αναλογία μορίων $\text{Ca/P} = 10/6$ και τα κομμάτια τοποθετούνται και σφραγίζονται σε ανοξείδωτο σωλήνα από πολυτετραφθοροαιθυλένιο (Teflon) υπό πίεση (Rocha et al., 2005). Ο σωλήνας τοποθετείται σε φούρνο και θερμαίνεται στους 200°C (5°C/min ρυθμός αύξησης και μείωσης θερμοκρασίας) για 24 ώρες (δοκιμάζονται διαφορετικοί χρόνοι μεταξύ 1 και 24 ωρών). Ο ΗΑ που προκύπτει ξεπλένεται με απεσταγμένο νερό και ξηραίνεται στους 100°C για περαιτέρω δοκιμές. Κατόπιν, συντήκονται σε διάφορες θερμοκρασίες μεταξύ 1000°C και 1400°C με βήμα 50°C (π.χ. 1000°C, 1050°C, 1100°C, κ.ο.κ.) σε αυτόκλειστο (5°C/min ρυθμός αύξησης και μείωσης θερμοκρασίας, 1 ώρα διαβροχή στη θερμοκρασία πυροσυσσωμάτωσης). Το pH του διαλύματος είναι 9.75 (± 0.2) πριν σφραγιστεί στο αυτόκλειστο και λίγο υψηλότερο μετά τον υδροθερμικό μετασχηματισμό (9.8–10.1) (Rocha et al., 2005).

5.4 ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΜΟΣ ΥΔΡΟΞΥΑΠΑΤΙΤΗ

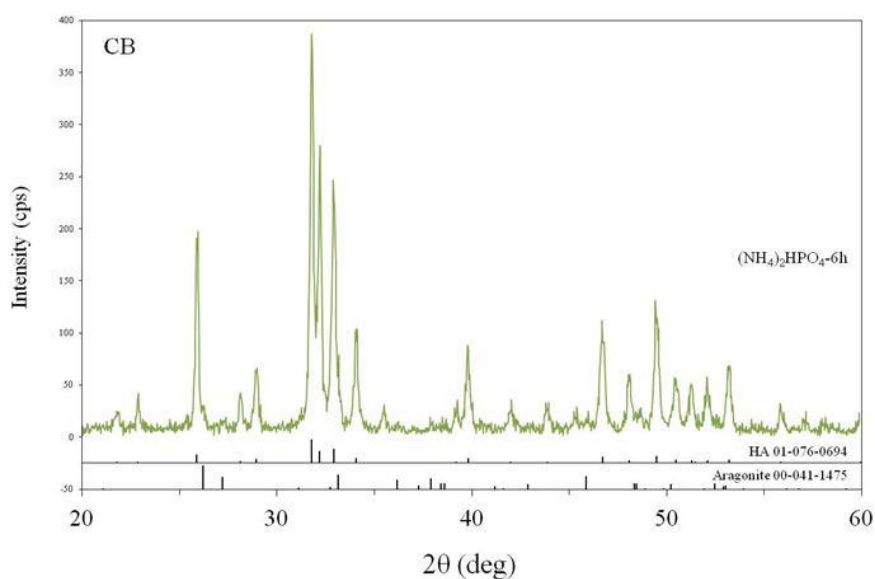
Η μικροδομή και η μορφολογία της επιφάνειας του εσωτερικού κελύφους σουπιάς και του παραγόμενου ΗΑ ελέγχονται με ηλεκτρονική μικροσκοπία σάρωσης (SEM) μετά από επιχρύσωση. Για την εκτίμηση της σύνθεσης του αρχικού και του παραγόμενου ΗΑ και κυρίως για τον προσδιορισμό των κρυσταλλικών φάσεων των ικριωμάτων πραγματοποιείται ανάλυση με περίθλαση ακτίνων Χ (XRD).

Τα περιθλασιογράμματα XRD συλλέγονται με τα ακόλουθα στοιχεία: 20-60° με βήμα 2θ 0.02°/s ρυθμό σάρωσης (Εικόνα 5.4). Η κορυφή που αντιστοιχεί στη χαρακτηριστική του Χαλκού K_{α} ($\lambda = 1.5406$ nm) παράγεται στα 30 kV και 25 mA με σάρωση σε όλο το φάσμα της γωνίας περίθλασης (2θ) (Ivankovic et al., 2009). Η σύγκριση μεταξύ των εικόνων XRD από τα πειραματικά δεδομένα και από δεδομένα που υπάρχουν σε βάσεις δεδομένων επίσημων φορέων, όπως της Επιτροπής για τα Πρότυπα Περίθλασης Ακτίνων Χ (Joint Committee on Powder Diffraction Standards (JCPDS)) ή του Διεθνούς Κέντρου για δεδομένα Περίθλασης Ακτίνων Χ (International Centre for Diffraction Data (ICDD)) και άρα είναι θεωρητικώς αναμενόμενα, επιτρέπει να ταυτοποιηθούν οι φάσεις, με τη χρήση κατάλληλων δεδομένων για αραγονίτη, HA και γουιτλοκίτη (TCP) (Rocha et al., 2005, Rocha et al., 2005a). Το μέσο μέγεθος κρυσταλλιτών (D) του παραγόμενου HA υπολογίζεται από τη σχέση 5.2 (Εξίσωση Scherrer):

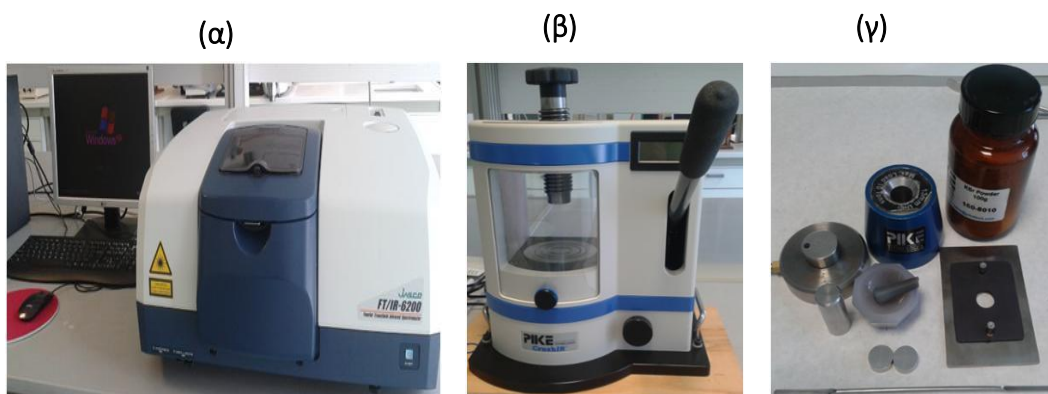
$$D = \frac{K_{\lambda}}{B_{1/2} \cos \theta} \quad (5.2)$$

, όπου K είναι η σταθερά διεύρυνσης, που ποικίλει και επιλέγεται ως 0,9 για επιμήκεις κρυσταλλίτες του απατίτη (Rocha et al., 2005), λ είναι το μήκος κύματος της κορυφής της χαρακτηριστικής ακτινοβολίας του Χαλκού K_{α} ($\lambda = 1.5406$ nm), $B_{1/2}$ είναι το πάχος που αντιστοιχεί στο μισό της μέγιστης τιμής, στο επίπεδο 002 και θ είναι η αντίστοιχη γωνία περίθλασης.

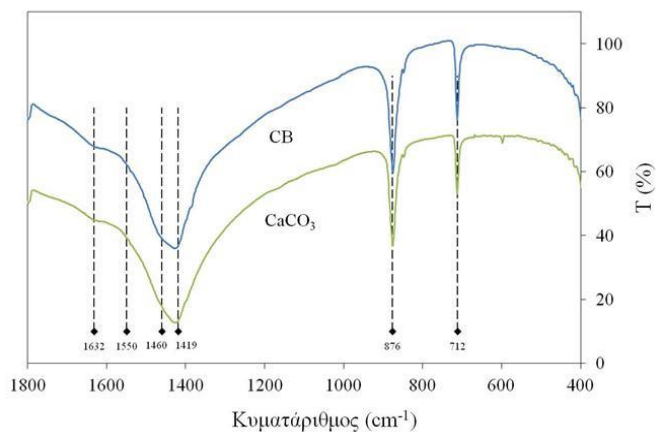
Άλλες δομικές και χημικές ιδιότητες του αναπτυσσόμενου HA αξιολογούνται με φασματοσκοπία υπέρυθρης ακτινοβολίας (FT-IR), με τη μέθοδο KBr, χρησιμοποιώντας λεπτά δείγματα από σκόνη HA, πριν και μετά τον υδροθερμικό μετασχηματισμό, μετά από πίεση σε υδραυλική πρέσα, δημιουργούν μικρό δισκίο διαμέτρου 1-1,5 cm και πάχους 1-1,5 mm (Εικόνα 5.5), με τη βοήθεια κατάλληλου συστήματος κυλινδρικών εκμαγείων (Rocha et al., 2005, Ivankovic et al., 2009). Έτσι, με τη φασματοσκοπία υπέρυθρου, μπορούμε να καταγράψουμε τις δονήσεις που οφείλονται στα ανθρακικά ιόντα, στα φωσφορικά ιόντα και στις μονάδες υδροξυλίου. Επειδή το δείγμα, όπως προέκυψε από την περίθλαση των ακτίνων Χ, περιείχε CaCO_3 , καταγράφηκε και έληφθη και το φάσμα από καθαρή εμπορική σκόνη CaCO_3 (Εικόνα 5.6).



Εικόνα 5.4 Περιθλασιογράφημα ακτίνων Χ από σκόνη από κέλυφος σουπιάς μετά από υδροθερμικό μετασχηματισμό 6 ωρών με $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$.



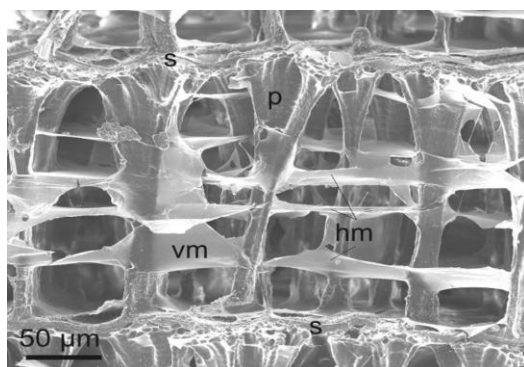
Εικόνα 5.5 α) Φασματοφωτόμετρο IR, β) υδραυλική πρέσα, γ) σκεύη και αντιδραστήρια για παρασκευή των δισκίων.



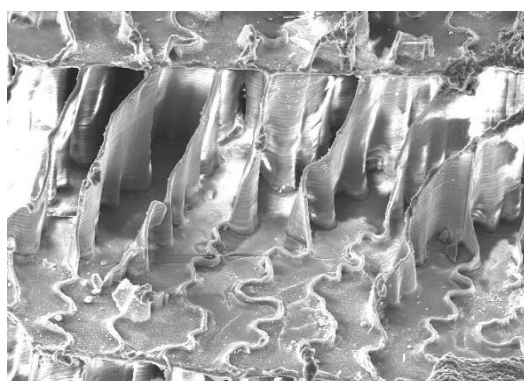
Εικόνα 5.6 Φάσμα υπερύρθρου (FTIR). Σύγκριση φάσματος κελύφους της σουπιάς με το φάσμα του CaCO_3 από 400-1600 cm^{-1} .

Είναι προφανές ότι, το φάσμα του κελύφους της σουπιάς είναι ίδιο με το φάσμα του καθαρού CaCO_3 . Αυτό το εύρημα έρχεται σε συμφωνία με τα πειραματικά αποτελέσματα από την κρυσταλλογραφική ανάλυση αλλά και τη θερμική ανάλυση, δηλαδή ότι η πρώτη ύλη του κελύφους ήταν αραγονίτης. Στο φάσμα μετά τον υδροθερμικό μετασχηματισμό, παρατηρείται μεγάλος αριθμός νέων κορυφών που αναπτύσσονται κατά την πρόοδο του υδροθερμικού μετασχηματισμού και που προφανώς πρέπει να αποδοθούν στις δονήσεις των φωσφρικών ομάδων.

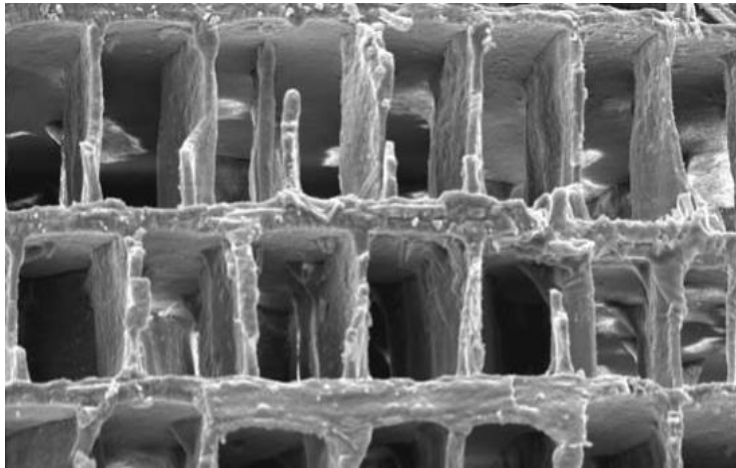
Η μικροδομή των παραγόμενων ικριωμάτων παρατηρείται με ηλεκτρονική μικροσκοπία σάρωσης, με δευτερογενή (secondary) ηλεκτρόνια στο πυροσυσσωματωμένο κέλυφος σουπιάς και τα δείγματα επιστρώθηκαν με άνθρακα (Mäthger et al., 2007) (Εικόνα 5.7, 5.8., 5.9).



Εικόνα 5.7 Πλάγια όψη του θαλάμου, με τα κύρια μέρη του (διάφραγμα (s), πυλώνας (p), οριζόντια μεμβράνη (hm), κατακόρυφη μεμβράνη (vm) (Ανατύπωση από Checa et al., 2015)



Εικόνα 5.8 Τρισδιάστατη όψη του ικριώματος του ΗΑ από υδροθερμικά μετασχηματισμένο και πυροσυσσωματωμένο κέλυφος σουπιάς. Διακρίνεται η δομική ανισοτροπία του, το πορώδες και η ενδοσύνδεση των πόρων.



Εικόνα 5.9 Μετά τον υδροθερμικό μετασχηματισμό και τη πυροσυσσωμάτωση στους 1250°C, το προκύπτον ικρίωμα του υδροξυαπατίτη ΗΑ διατηρεί τη δομική ακεραιότητα του αρχικού κελύφους της σουπιάς.

Ο προσδιορισμός του πορώδους μπορεί να πραγματοποιηθεί με ποροσιμετρία (porosimetry) υδραργύρου, που αποτελεί μια από τις σημαντικότερες μεθόδους εκτίμησης και ανάλυσης της μικροδομής των πορωδών υλικών και προσδιορισμού του πορώδους τους (Chang et al., 2012, Ivankovic et al., 2010, Τζόκα, 2016). Πρόκειται για αναλυτική τεχνική ποσοτικού προσδιορισμού του πορώδους ενός πορώδους υλικού, της διαμέτρου των πόρων και την κατανομή τους, της ειδικής επιφάνειας και της φαινόμενης και πραγματικής πυκνότητας του υλικού. Βασίζεται στη διείσδυση (intrusion) ενός υγρού που δεν διαβρέχει (κακή διαβροχή, $\theta > 90^\circ$) τα στερεά, όπως είναι ο υδράργυρος, στους πόρους του δοκιμίου. Η σχέση που συνδέει τη διάμετρο των πόρων (d) με την πίεση που πρέπει να ασκηθεί για να διεισδύσει το υγρό αυτό σε έναν πόρο είναι:

$$p_L - p_G = - \frac{4\gamma \cos\theta}{d} \quad (5.3)$$

ή η αντίστοιχη σχέση για την ακτίνα του πόρου (r),

$$p_L - p_G = - \frac{2\gamma \cos\theta}{r} \quad (5.4)$$

, όπου p_L είναι η πίεση που ασκείται στο υγρό για να διεισδύσει στον πόρο, p_G η πίεση των ατμών (επειδή το πείραμα γίνεται υπό κενό, $p_G = 0$), γ η επιφανειακή τάση του υγρού (για τον υδράργυρο είναι 0,48 N/m στους 20 °C) και θ η γωνία επαφής, (για τον υδράργυρο σε

επαφή με τα περισσότερα στερεά κυμαίνεται μεταξύ 135° και 142° και έτσι στις μετρήσεις αυτές λαμβάνεται ίση με 140°, σαν μέσος όρος, χωρίς μεγάλο σφάλμα).

Η ασκούμενη εξωτερική πίεση προσπαθεί να ξεπεράσει την αντίσταση της επιφανειακής τάσης του υγρού ώστε να διεισδύσει μέσα στον πόρο. Σύμφωνα με την παραπάνω σχέση, όσο μικρότερος είναι ο πόρος, τόσο μεγαλύτερη δύναμη πρέπει να ασκηθεί για να εισέλθει ο υδράργυρος σε αυτόν. Εκτός από το ποροσίμετρο υπάρχει η αντλία και ένας υπολογιστής.

Κατά την εφαρμογή αυτής της μεθόδου, κόβουμε το δείγμα σε κατάλληλο μέγεθος ώστε να χωράει στην κυψελίδα και το ζυγίζουμε. Τοποθετούμε το δείγμα στην κυψελίδα, η οποία εφαρμόζεται σε κατάλληλη θέση του οργάνου. Ανοίγουμε την αντλία κενού και γίνεται πλήρωση της κυψελίδας με υδράργυρο, υπό κενό. Ανοίγουμε τη βαλβίδα, για να ασκηθεί πίεση στον υδράργυρο, ώστε να διεισδύσει στους πόρους του υλικού και ρυθμίζοντας τις κατάλληλες παραμέτρους στον υπολογιστή ξεκινά η μέτρηση. Αφού ολοκληρωθεί η μέτρηση, ακολουθεί η διαδικασία αποσυμπίεσης, όπου ο υδράργυρος εξέρχεται από τους πόρους του δείγματος. Η συσκευή μετράει όγκο εισερχομένου υδραργύρου ως προς την εφαρμοζόμενη πίεση και μέσω του ενσωματωμένου λογισμικού προγράμματος κατασκευάζεται διάγραμμα ειδικού όγκου-πίεσης και ιστόγραμμα που παρουσιάζει την κατανομή του όγκου των πόρων.

Με την τεχνική ποροσιμετρία με αιθανόλη, πρέπει τα δείγματα, το πυκνόμετρο και τα υγρά διαλύματα να είναι προθερμασμένα στους 25°C.

Το πορώδες υπολογίζεται από τη σχέση 5.5:

$$\text{Πορώδες (\%)} = \frac{W_p - W_s}{W_p - W_e} \cdot 100 \quad (5.5)$$

, όπου W_s είναι η μάζα του ικριώματος, W_p η μάζα του ικριώματος με τους πόρους γεμάτους αιθανόλη και W_e η μάζα του ικριώματος, όταν βυθιστεί σε αιθανόλη (Kim et al., 2013).

Προέκυψε ικρίωμα με μέγεθος πόρων που κυμαίνεται από 80-100μm, και ενδοσύνδεση των πόρων μεταξύ τους, δηλαδή ικανοποιητικά χαρακτηριστικά για οστικά εμφυτεύματα.

5.5 ΗΑ ΜΕ ΕΝΙΣΧΥΣΗ ΦΘΟΡΙΟΥ

Ο φθοραπατίτης (FA) επιλέγεται συχνά για οστικά εμφυτεύματα (Overgaard et al., 1997). Είναι λιγότερο διαλυτός από τον ΗΑ (Gineste et al., 1999) και προωθεί την επανασβεστοποίηση. Πολλές *in vivo* μελέτες έχουν αποδείξει ότι η επίστρωση με FA παρουσιάζει παρόμοια εφαρμογή σε οστά, όπως και η αντίστοιχη επίστρωση με ΗΑ, αλλά λιγότερο εκφυλισμό 3 μήνες μετά την εμφύτευση (Gineste et al., 1999, Leamy et al., 1998).

Ο ΗΑ και ο FA συνυπάρχουν στο στερεό μίγμα του απατίτη που προέρχεται από φυσικό οστό (Monroe 1987). Ο ενισχυμένος με φθόριο ΗΑ (HAF) έχει επιλεγεί για την παρασκευή υλικών για εμφυτεύματα για οδοντιατρικές και ορθοπεδικές εφαρμογές (Kim et al., 2003). Επιπλέον θεωρείται κατάλληλο βιοκεραμικό υλικό για μακράς διάρκειας εμφυτεύσεις. Για την παρασκευή του HAF εφαρμόζεται ο υδροθερμικός μετασχηματισμός, με μερικά ακόμη πειραματικά στάδια. Συγκεκριμένα, μετά την προσθήκη του όξινου φωσφορικού αμμωνίου, προστίθεται το φθόριο, διαμέσου του διαλύματος φθοριούχου αμμωνίου, σε διαφορετικές συγκεντρώσεις (Kannan et al., 2007).

*Σύνθετα βιοϋλικά
κεραμικών-υδροπηκτωμάτων*

Κεφάλαιο

6

6 ΣΥΝΘΕΤΑ ΒΙΟΪΛΙΚΑ ΚΕΡΑΜΙΚΩΝ-ΥΔΡΟΠΗΚΤΩΜΑΤΩΝ

6.1 ΣΥΝΘΕΤΑ ΥΛΙΚΑ

Τα σύνθετα βιοϋλικά αποτελούνται από δύο ή περισσότερα συστατικά που συνδυάζονται για να ενισχυθούν οι ιδιότητες από τα συμμετέχοντα συστατικά που από μόνα τους δεν μπορούν να πετύχουν, συγκεκριμένα τη μήτρα και την ενισχυτική φάση, η οποία προσδίδει στο υλικό ενισχυμένες ιδιότητες. Είναι ιδιαιτέρως ενδιαφέροντα, τα σύνθετα βιοϋλικά πολυμερών με κεραμικές φάσεις. Τα πλεονεκτήματα από την ανάπτυξη αυτών των σύνθετων υλικών είναι η υψηλή επαγωγή οστεοσύνθεσης που παρουσιάζουν, γεγονός που τα καθιστά χρήσιμα ως μέσα πλήρωσης ατελειών, αλλά και η ικανότητα ελεγχόμενης βιοαποικοδόμησης (Jones et al., 2012).

Ο συνδυασμός πολυμερών και κεραμικών οδηγεί σε σύνθετα υλικά με βελτιωμένες μηχανικές ιδιότητες, εξαιτίας της υψηλότερης ακαμψίας και αντοχής του ανόργανου υλικού. Ο βασικός παράγοντας που επηρεάζει τις μηχανικές ιδιότητες και τη δομική ακεραιότητα των ικριωμάτων είναι το πορώδες τους. Επομένως, είναι σημαντική η ανάπτυξη τεχνολογίας παραγωγής προϊόντων τρισδιάστατων ικριωμάτων με ελεγχόμενο πορώδες (Oga, Arizono & Sugioaka, 1993). Ειδικά για την οστική αναγέννηση και για εφαρμογές της ιστοτεχνολογίας, είναι πολύ σημαντικός ο σχεδιασμός βιοϋλικών με ελεγχόμενη σύνθεση και δομή.

Βιβλιογραφικά δεδομένα υποστηρίζουν ότι τα υβριδικά ικριώματα χιτοζάνης-αλγινικού οξέος παρουσιάζουν βελτιωμένη μηχανική αντοχή και δομική σταθερότητα και έχουν δείξει ότι διεγείρουν το σχηματισμό νέου οστού (Li, 2014). Επίσης πορώδη σύνθετα ικριώματα από HA / χιτοζάνη-αλγινικό οξύ, όπως και ο συνδυασμός HA / ζελατίνης είναι μία πολύ καλή επιλογή αφού παρουσιάζουν παρόμοια χημική δομή και σύσταση με αυτή του φυσικού οστού.

Τα προηγμένα κεραμικά, που έχουν ενισχυθεί με μόρια, μονοκρυσταλλωμένες ίνες, ζirkόνια, νανο-δομές, έχουν σχεδιαστεί για να αυξήσουν τη μηχανική αξιοπιστία και να ενισχύσουν την αντίσταση στην αποσύνθεση. Έτσι μπορούν να χρησιμοποιηθούν σε απαιτητικές εφαρμογές, που καθαρά βιοκεραμικά, χωρίς ενίσχυση με κάποιο διαφορετικό υλικό, δεν θα μπορούσαν να χρησιμοποιηθούν.

6.2 ΥΔΡΟΠΗΚΤΩΜΑΤΑ ΣΥΝΘΕΤΩΝ ΒΙΟΪΛΙΚΩΝ

Τα υδροπηκτώματα (hydrogels) αποτελούνται από υδρόφιλες διασταυρωμένες πολυμερικές δομές που παράγονται από την αντίδραση ενός ή περισσότερων μονομερών ή από τους συνδυαστικούς δεσμούς μεταξύ των αλυσίδων (Hoffman, 2012). Αποτελούνται από διασυνδεδεμένα πολυμερικά δίκτυα, τα οποία έχουν υψηλό αριθμό υδρόφιλων ομάδων, δηλαδή έχουν υψηλή συγγένεια με το νερό. Όμως, δεν διαλύονται εύκολα, εξαιτίας των χημικών ή φυσικών δεσμών που σχηματίζονται μεταξύ των αλυσίδων του πολυμερούς (Bhattacharai, Gunn & Zhang, 2010).

Τα υδροπηκτώματα μπορούν να παρασκευαστούν από φυσικά πολυμερή, όπως πολυσακχαρίτες, είτε από συνθετικά πολυμερή. Οι πολυσακχαρίτες είναι μια ομάδα υδατοδιαλυτών πολυμερών που χρησιμοποιούνται για την παρασκευή υδροπηκτωμάτων, λόγω της ικανότητάς τους να σχηματίζουν πηκτώματα (gels) υπό καθορισμένες συνθήκες. Θεωρείται ενδιαφέρων τύπος βιοϋλικού, με πολλές εφαρμογές στην ιστοτεχνολογία, αφού οι πολυσακχαρίτες μπορούν να ενσωματώσουν και να διανέμουν κύτταρα και βιολογικά ενεργά μακρομόρια. Μπορεί ακόμη εύκολα να μετατραπούν σε ποικιλία φυσικών μορφών καθώς επίσης και να εγχυθούν στο σώμα με έναν ελάχιστο επεμβατικό τρόπο (ημιεπεμβατικό τρόπο). Από τα πιο ελκυστικά χαρακτηριστικά τους είναι, όμως, ότι μιμούνται πολλές ιδιότητες της εξωκυτταρικής μήτρας των ιστών. Ακόμη η υψηλή περιεκτικότητα σε νερό, τα καθιστά συμβατά με την πλειοψηφία των συνθηκών διαβίωσης των ιστών. Είναι μαλακά και εύκαμπτα, και έτσι ελαχιστοποιείται η βλάβη στον περιβάλλοντα ιστό κατά τη διάρκεια και μετά την εμφύτευσή τους (Dash et al., 2012).

Στην ιστομηχανική, χρησιμοποιούνται εκτενώς τα φυσικά υδροπηκτώματα, συμπεριλαμβανομένου του κολλαγόνου και των πολυσακχαριτών (αλγινικό οξύ, χιτοζάνη, υαλουρονικό οξύ), λόγω της βιοσυμβατότητάς τους, που έχει μελετηθεί διεξοδικά (Hench et al., 1982).

Τα συνθετικά υδροπηκτώματα αποδεικνύεται ότι επιτρέπουν καλύτερο έλεγχο των μηχανικών ιδιοτήτων και της τελικής δομής (Ratner et al. 2004). Η βιοδραστικότητα του HA δεν φαίνεται να επηρεάζεται, αν η πολυμερική φάση που έχει επιλεγεί για τη σύνθεση είναι βιοαποικοδομήσιμη. Πολλές σύγχρονες μελέτες εστιάζουν στη σύνθεση λυοφιλοποιημένων αφρών, που είναι βασισμένοι σε υδροπηκτώματα αλγινικού οξέος ή χιτοζάνης. Τα υδροπηκτώματα είναι πολύ εύχρηστα και πρακτικά βιοϋλικά σε εφαρμογές

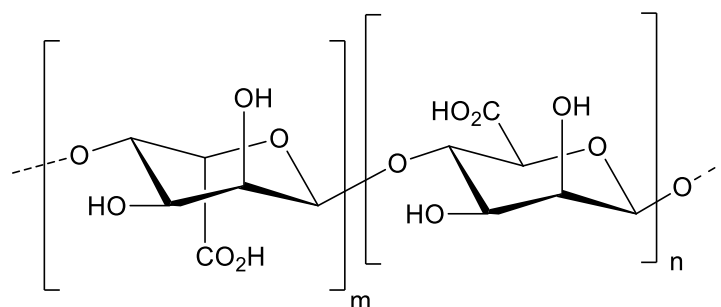
ιστομηχανικής, αφού μπορούν να λειτουργήσουν ως φαρμακευτικοί παράγοντες ή ως μεταφορείς βιομορίων.

6.2.1 Βιοδιασπώμενα πολυμερή

Τα βιοδιασπώμενα πολυμερή βρίσκουν εφαρμογή, συνήθως, σε εκείνες τις περιπτώσεις που απαιτείται προσωρινή παρουσία του εμφυτεύματος και επακόλουθη διάσπαση αυτού, όταν ολοκληρωθεί η διαδικασία αναγέννησης του ιστού και αποκατάστασης της πάσχουσας περιοχής όπου εμφυτεύτηκε. Τα προσωρινά ικρίωματα εφαρμόζονται σε περιπτώσεις όπου υπάρχει κάποιο έλλειμμα λόγω τραύματος ή επέμβασης και απαιτείται τεχνητή υποστήριξη (Nair, 2007). Τα ικρίωματα αυτά, λειτουργούν ως μια τεχνητή εξωκυττάρια μήτρα ώστε να παρέχουν την απαραίτητη υποστήριξη, επιτρέποντας στα κύτταρα να διατηρούν τις λειτουργίες τους και να πολλαπλασιάζονται. Αποτελούν ένα εκμαγείο που χρησιμεύει ώστε να καθοδηγήσει το σχηματισμό ενός νέου ιστού. Ειδικά, στον οστίτη ιστό, το ικρίωμα εισάγεται στην ελαττωματική περιοχή ή στο κατεστραμμένο ιστό ώστε να προάγει την αναγέννηση του οστού, ενώ σταδιακά θα αποσυντίθεται και θα αντικαθίσταται από νεοσυντιθέμενο οστικό ιστό (Thein-Han & Misra, 2009).

6.1.2 Υδροπήκτωμα αλγινικού οξέος

Το αλγινικό οξύ σχηματίζει υδροπήκτωμα, το οποίο έχει ευρέως ερευνηθεί σε διάφορες εφαρμογές, στη βιομηχανία τροφίμων, στη φαρμακοβιομηχανία, στη βιομηχανία καλλυντικών αλλά και στην ιστοτεχνολογία. Το αλγινικό είναι ένας φυσικός πολυσακχαρίτης που εξάγεται από καφέ άλγη. Η χημική του δομή φαίνεται στην Εικόνα 6.1) (Han et al., 2010, Dettmar et al., 2006).



Εικόνα 6.1 Χημική δομή αλγινικού οξέος.

Η διαδικασία της ζελατινοποίησης εξαρτάται από τη διάχυση των ιόντων ζελατινοποίησης (gelling ions) στο πολυμερικό δίκτυο. Οι τρόποι παρασκευής του πηκτώματος από αλγινικό οξύ είναι δύο:

- Η μέθοδος διάλυσης/διάχυσης
- Η εσωτερική μέθοδος ζελατινοποίησης (Li, 2014, Zhu et al., 2016).

Η ικανότητα των υδροπηκτωμάτων από αλγινικό οξύ να αποικοδομούνται με την πάροδο του χρόνου και να διασπώνται σε χαμηλού μοριακού βάρους ολιγομερή είναι σημαντικά προαπαιτούμενα για πολλές εφαρμογές ιστομηχανικής. Η σύνθεση, η διάταξη και το μοριακό βάρος καθορίζουν τις φυσικές ιδιότητες των αλγινικών οξέων.

Το αλγινικό οξύ χρησιμοποιείται για επιδέσμους τραυμάτων, εξαιτίας της υψηλής του βιοσυμβατότητας, της χαμηλής τοξικότητας και των ήπιων συνθηκών σχηματισμού πηκτώματος (Hench, 1982). Επίσης, χρησιμοποιείται ευρέως στη βιομηχανία τροφίμων και φαρμάκων ως μήτρα για ακινητοποίηση φαρμάκων, μακρομορίων και βιολογικών κυττάρων, λόγω της βιοσυμβατότητας και της αφθονίας του (Hench, 1982). Εφαρμογές που περιλαμβάνουν την ακινητοποίηση των κυττάρων μέσω αλγινικού είναι οι ακόλουθες (Augst et al., 2006):

- Ρύθμιση της ινσουλίνης στο διαβήτη
- Θεραπεία νεφρικής ανεπάρκειας
- Θεραπεία του εμφράγματος του μυοκαρδίου
- Θεραπεία οστικών ελλειμμάτων
- Μελέτη για την αγγειοποίηση όγκων

Τα ικρίωματα αλγινικού οξέος δεν χρησιμοποιούνται πάρα πολύ, εξαιτίας των φτωχών μηχανικών ιδιοτήτων, την έλλειψη κυτταρικών διασυνδέσεων και την ανεξέλεγκτη αποικοδόμηση (Bouhadir, et al., 2002). Είναι συνήθως μαλακά και αδύναμα και έτσι συνήθως δεν επιλέγονται για καλούπια και φόρμες για ιστούς, στην αναγεννητική ιατρική. Καθώς το αλγινικό οξύ είναι υδρόφιλο, τα ικρίωματα αλγινικού οξέος έχουν περιορισμένη ικανότητα απορρόφησης πρωτεϊνών, αφού τα περισσότερα κύτταρα δεν μπορούν να προσκολληθούν σε αυτά. Όταν τα ικρίωματα αυτά βυθιστούν στο θρεπτικό υλικό, η απώλεια δισθενών κατιόντων στο μέσο, προκαλεί ανεξέλεγκτη αποικοδόμηση του αλγινικού οξέος. Για να αρθούν αυτοί οι περιορισμοί, προτείνεται για ενίσχυση, η χρήση

του HA, με σκοπό την ανάπτυξη δημιουργούν νέων, σύνθετων ικριωμάτων αλγινικού οξέος / HA.

Σύμφωνα με το σύνθητες πρωτόκολλο, για να παρασκευαστεί καθαρό σπογγώδες αλγινικό οξύ, σκόνη αλγινικού διαλύεται και αναμιγνύεται σε δισ-απεσταγμένο νερό. Το διάλυμα διασταυρωμένων δομών προστίθεται στο διάλυμα αλγινικού οξέος και αναδεύεται συνεχώς με τον ομογενοποιητή στις 26.000 στροφές/ λεπτό για 3 λεπτά. Η συγκέντρωση του αλγινικού οξέος διατηρείται σταθερή 3% (w/v) για κάθε τύπο ικριώματος (Lin et al., 2004). Το διάλυμα που έχει προκύψει αφήνεται για 30 λεπτά σε ηρεμία, και μετά καταψύχεται για 6 ώρες και λυοφιλοποιείται όλη τη νύχτα, σε θερμοκρασία ξήρανσης με ψύξη -45 ° C.

Για την παρασκευή σύνθετων ικριωμάτων αλγινικού οξέος / HA, η επιθυμητή ποσότητα σκόνης HA διαλύεται εντελώς σε δισαπεσταγμένο νερό με τον ομογενοποιητή στις 26.000 στροφές/ λεπτό για 3 λεπτά. Το διάλυμα διασταυρωμένων δομών προστίθεται στο διάλυμα αλγινικού οξέος / HA και ομογενοποιούνται. Το πήκτωμα αλγινικού / HA κατόπιν χυτεύεται και λυοφιλοποιείται με την ίδια διαδικασία που αναφέρθηκε παραπάνω (Lin et al., 2004).

Μια άλλη μέθοδος περιλαμβάνει την παρασκευή ικριώματος HA ξεχωριστά από την παρασκευή του υδροπηκτώματος αλγινικού οξέος. Για την παρασκευή του υδροπηκτώματος αλγινικού οξέος προστίθενται 0,1 g αλγινικού οξέος σε 3 ml δισ-απεσταγμένου νερού, υπό έντονη ανάδευση. Στη συνέχεια προστίθεται ποσότητα 0,0047 g χλωριούχου ασβεστίου (CaCl_2) σε 1 ml απεσταγμένου νερού, για να δημιουργηθεί και το δεύτερο διάλυμα. Μετά ακολουθεί ανάμιξη των δύο διαλυμάτων. Ένα ακόμη διάλυμα παρασκευάζεται, με την προσθήκη 0,015 g γλουκονολακτόνης (GDL) σε 1 ml απεσταγμένου νερού. Αυτό το διάλυμα προστίθεται στάγδην στο προηγούμενο (Τόρη, 2016).

6.1.3 Υδροπήκτωμα χιτοζάνης

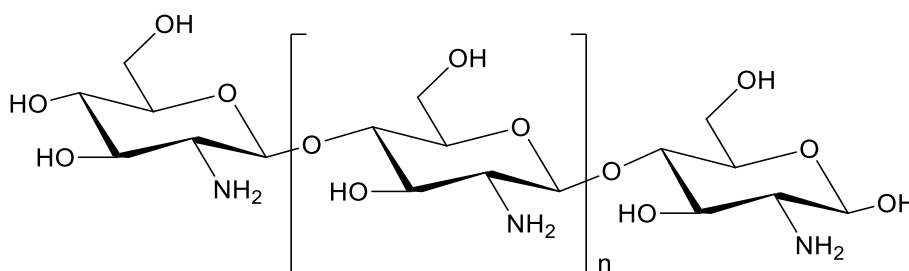
Η χιτίνη και η χιτοζάνη είναι φυσικοί βιοαποικοδομήσιμοι και βιοσυμβατοί αμινο πολυσακχαρίτες με ιδιαίτερα εξελιγμένες λειτουργίες και πολλές εφαρμογές στη βιοϊατρική αλλά και στη βιομηχανία (Pillai, Paul & Sharma, 2009). Η χιτίνη είναι ένα φυσικό, μη τοξικό βιοπολυμερές. Η χιτίνη είναι το δεύτερο σε αφθονία βιοπολυμερές, μετά την κυτταρίνη. Τα φυτά παράγουν κυτταρίνη στα κυτταρικά τοιχώματά τους και τα έντομα και τα μαλάκια

παράγουν χιτίνη στα κελύφη τους, για αυτό η χιτίνη μπορεί να απομονωθεί από κελύφη οστρακοειδών (Muzzarelli, Jeuniaux & Gooday, 1985).

Η κυτταρίνη και η χιτίνη είναι, ως εκ τούτου, πολυσακχαρίτες που παρέχουν δομική ακεραιότητα για τα φυτά και τα ζώα, αντίστοιχα.

Η χιτοζάνη (πολυ(β-(1-4)-D-γλυκοζαμίνη) είναι ένα φυσικό πολυκατιονικό πολυμερές. Το μόριό της είναι ένας γραμμικός, ημι-κρυσταλλικός πολυσακχαρίτης. Η δομή αυτού του πολυμερούς απεικονίζεται στην Εικόνα 6.2. Η χιτοζάνη θεωρείται ως ο μοναδικός θετικά φορτισμένος φυσικός πολυσακχαρίτης.

Η χιτοζάνη δεν υπάρχει στο φυσικό περιβάλλον, αλλά προέρχεται από τη μερική αποακετυλίωση του φυσικού πολυμερούς, χιτίνη. Ο βαθμός αποακετυλίωσης της χιτοζάνης εξαρτάται από τον αριθμό των αμινομάδων κατά μήκος των αλυσίδων. Για να ονομαστεί χιτοζάνη, η αποακετυλιωμένη χιτίνη πρέπει να περιέχει τουλάχιστον το 60% των υπολειμμάτων της D-γλυκοζαμίνης (η οποία αντιστοιχεί σε ένα βαθμό αποακετυλίωσης 60).



Εικόνα 6.2 Χημική δομή χιτοζάνης.

Η αποακετυλίωση της χιτίνης γίνεται με χημική υδρόλυση υπό αλκαλικές συνθήκες ή με ενζυμική υδρόλυση. Ο βαθμός αποακετυλίωσης της χιτοζάνης κυμαίνεται από 60 έως 95%, ενώ το μοριακό βάρος κυμαίνεται τυπικά από 300-1000 kDa, ανάλογα με την πηγή και την προετοιμασία (Croisier & Jerome, 2013).

Η χιτοζάνη είναι αδιάλυτη σε αλκαλικά υδατικά διαλύματα ($\text{pH} > 7$), ενώ διαλύεται σε όξινα διαλύματα ($\text{pH} < 6$).

Τα υδροπηκτώματα χιτοζάνης μπορούν να σχηματίζονται αναμειγνύοντας τη χιτοζάνη με υδροδιαλυτά πολυμερή. Η θετικά φορτισμένη χιτοζάνη θα αλληλεπιδράσει με τα αρνητικά φορτισμένα μόρια προς σχηματισμό υδροπηκτωμάτων. Μεγαλύτερα αρνητικά φορτισμένα μόρια, φυσικά και συνθετικά πολυανιόντα, μπορούν επίσης να δώσουν

πηκτώματα με τη χιτοζάνη, για παράδειγμα, πρωτεΐνες (όπως ζελατίνη, κολλαγόνο), ανιονικοί πολυσακχαρίτες (όπως υαλουρονικό οξύ, αλγινικό) και συνθετικά πολυανιόντα (όπως πολυακρυλικό οξύ) (Rinaudo, 2006, Croisier & Jerome, 2013).

Η χιτοζάνη εμφανίζει αντιβακτηριακή, αντιμυκητιακή και αιμοστατική δράση αλλά και αναλγητικές ιδιότητες. Μπορεί να αλληλεπιδρά με επιφανειακά μόρια, αλλάζοντας τη διαπερατότητά τους. Ο ρυθμός βιοαποικοδόμησής της είναι αξιοσημείωτος. Εξαιτίας αυτών των ιδιοτήτων της, χρησιμοποιείται ευρέως σε βιοϊατρικές και φαρμακευτικές εφαρμογές. Η χρήση της σε χειρουργικά ράμματα, οδοντιατρικά εμφυτεύματα, τεχνητό δέρμα και αναδόμηση οστού είναι μερικές από τις πιο συχνές εφαρμογές (Rinaudo, 2006). Μερικές ακόμη εφαρμογές της είναι στη βιομηχανία τροφίμων, ως συντηρητικό, ως σταθεροποιητής χρώματος και ως πρόσθετο ζωοτροφών. Στη γεωργία, χρησιμοποιείται ως ενισχυτικό της ανάπτυξης των φυτών. Στη διατροφολογία, λειτουργεί ως λιποδιαλύτης, απομακρύνοντας το λίπος από το πεπτικό σύστημα (Μπρασινίκα, 2015).

Ένα σύνθετο βιοϋλικό από HA και χιτοζάνη παρουσιάζει μεγάλη οστεοαγωγιμότητα και βιοαποικοδομησιμότητα παράλληλα με μηχανική αντοχή και έτσι ενδείκνυται για ορθοπεδική εφαρμογή. Το ενδιαφέρον στον τομέα της ανάπτυξης προηγμένων βιοϋλικών με βάση τον HA και τη χιτοζάνη είναι ιδιαίτερος αυξημένο τα τελευταία χρόνια, κάτι που αποδεικνύεται από το μεγάλο αριθμό επιστημονικών άρθρων, που σχετίζονται με την ανάπτυξη, την αξιολόγηση και το χαρακτηρισμό τους (Escobar-Sierra et al., 2015, Teixeira et al., 2009).

Το σύνθετο ικρίωμα HA / χιτοζάνης μπορεί να παρασκευαστεί με δύο διαφορετικές μεθόδους και μία ακόλουθη διαδικασία λυοφιλοποίησης, με σκοπό να προκύψει κατάλληλη μορφολογία και πορώδες. Η παρασκευή ικριωμάτων HA / χιτοζάνης *in situ* είναι η πρώτη μέθοδος που παρατίθεται. Προετοιμάζεται ένα διάλυμα χιτοζάνης (2% w/v), με διάλυση κατάλληλης ποσότητας χιτοζάνης σε οξικό οξύ (1% v/v). Στο διάλυμα αυτό, προστίθεται διάλυμα νιτρικού ασβεστίου ($\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$) 0.5M, υπό σταθερή ανάδευση. Ακολουθεί η παρασκευή διαλύματος δισόξινου φωσφορικού αμμωνίου ($\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$) 0.3M, το οποίο προστίθεται στάγδην στο προηγούμενο διάλυμα, ως πρόδρομη ένωση *in situ*, διατηρώντας την αναλογία Ca/P ίση με 1.67. Το τελικό διάλυμα αναδεύεται έντονα για 2 ώρες, μέχρι την πλήρη ομογενοποίησή του. Τελικά τοποθετείται σε κατάλληλα δοχεία και

ψύχεται για 8 ώρες στους -80°C και λυοφιλοποιείται για 24 ώρες (Escobar-Sierra et al., 2015).

Η παρασκευή ικρίωματος HA / χιτοζάνης σε μορφή σκόνη είναι η δεύτερη μέθοδος. Ένα διάλυμα χιτοζάνης (2% w/v) παρασκευάζεται με διάλυση χιτοζάνης σε σκόνη σε οξικό οξύ 1% (v/v), όπως και στο προηγούμενο πρωτόκολλο. Η σκόνη HA διασπείρεται σε απιονισμένο νερό για 2 ώρες. Στη συνέχεια, το εναιώρημα προστίθεται στάγδην στο διάλυμα χιτοζάνης, υπό ανάδευση. Έπειτα, το εναιώρημα HA / χιτοζάνης αναδεύεται έντονα, σε μαγνητικό αναδευτήρα για 2 ώρες, με σκοπό να δημιουργηθεί ένα ομογενές μίγμα. Στη συνέχεια τοποθετείται σε κατάλληλα αποθηκευτικά δοχεία, ψύχεται για 8 ώρες στους -80°C και λυοφιλοποιείται για 24 ώρες (Escobar-Sierra et al., 2015).

Για την μεμονωμένη παρασκευή ικρίωματος HA και υδροπηκτώματος χιτοζάνης ακολουθείται η παρακάτω μέθοδος. Για την παρασκευή του υδροπηκτώματος χιτοζάνης, 0,05 ml οξικού οξέος (Ac-OH) προστίθενται σε 5 ml απεσταγμένου νερού. Στη συνέχεια προστίθενται 0,1 g χιτοζάνη, υπό έντονη ανάδευση, μέχρι την πλήρη διάλυσή της.

*Ενισχυμένο ικρίωμα ΗΑ
με υδροπήκτωμα*

Κεφάλαιο

7

7 ΕΝΙΣΧΥΜΕΝΟ ΙΚΡΙΩΜΑ ΗΑ ΜΕ ΥΔΡΟΠΗΚΤΩΜΑ

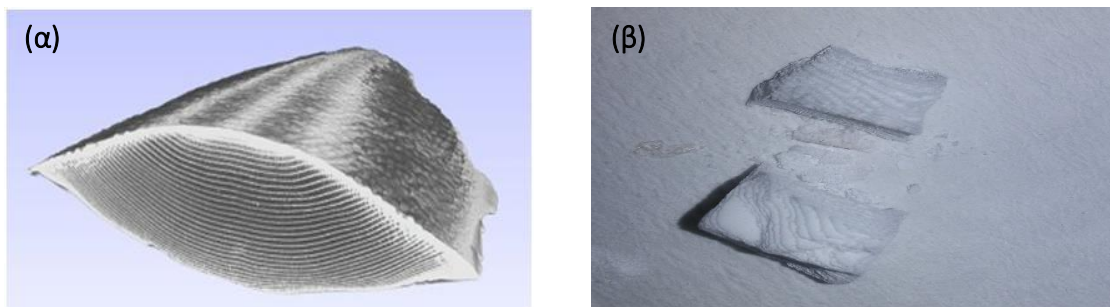
7.1 ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Μετά τη λυοφιλοποίηση, τα υδροπηκτώματα συνήθως δίνουν αφρούς με μεγάλο πορώδες και δεν καταρρέουν σε σκόνες. Ταυτόχρονα, τα ικρίωματα ΗΑ παρουσιάζουν σοβαρό πρόβλημα θραύσης – θρυμματισμού με κατάρρευση της δομής, σε προσπάθεια εμφύτευσης. Έτσι, είναι σημαντική η προσπάθεια ενίσχυσης πορωδών ικριωμάτων από ΗΑ με τα υδροπηκτώματα αυτά, αφού έτσι θα συγκεντρωθούν στο τελικό προϊόν τα επιθυμητά χαρακτηριστικά (Nooeaid et al., 2012).

Συγκεκριμένα, το ικρίωμα ΗΑ, από πυροσυσσωματωμένο κέλυφος σουπιάς, στο οποίο έχει μετασχηματιστεί με υδροθερμικό μετασχηματισμό, ο αραγονίτης του κελύφους σε ΗΑ, θα ενισχυθεί με υδροπηκτώματα. Με τη διείσδυση των υδροπηκτωμάτων αλγινικού-χιτοζάνης στο πορώδες των ικριωμάτων του ΗΑ, αναμένεται να προστατευτεί η δομική ακεραιότητα του ικριώματος του ΗΑ κατά την εμφύτευση, δηλαδή το λυοφιλοποιημένο υδροπήκτωμα αλγινικού-χιτοζάνης μέσα στους πόρους του ικριώματος του ΗΑ θα αποτρέψει την κατάρρευση του ικριώματος του ΗΑ. Το πορώδες των λυοφιλοποιημένων υδροπηκτωμάτων αλγινικού-χιτοζάνης θα επιτρέψει τη διείσδυση των βιολογικών υγρών αμέσως μετά την εμφύτευση. Επίσης, με τη βιοδιάσπαση των υδροπηκτωμάτων αλγινικού-χιτοζάνης θα ελευθερωθούν οι πόροι του ικριώματος του ΗΑ και έτσι θα επιτραπεί η αγγείωση και η δημιουργία του νέου οστού μέσα στο πορώδες του ικριώματος του ΗΑ. Από τα παραπάνω κρίνεται ενδιαφέρουσα η προσπάθεια ανάπτυξης ενός τέτοιου ενισχυμένου ικριώματος.

7.2 ΕΝΙΣΧΥΣΗ ΙΚΡΙΩΜΑΤΟΣ ΗΑ ΑΠΟ ΚΕΛΥΦΟΣ ΣΟΥΠΙΑΣ ΜΕ ΥΔΡΟΠΗΚΤΩΜΑ ΑΛΓΙΝΙΚΟΥ-ΧΙΤΟΖΑΝΗΣ

Πραγματοποιήθηκε υδροθερμικός μετασχηματισμός στο οστό της σουπιάς για 6 ώρες στους 200°C, με $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$. Στη συνέχεια ακολούθησε έψηση για 1 ώρα στους 1250 °C. Το ικρίωμα φαίνεται στην Εικόνα 7.1.



Εικόνα 7.1 α) 3D απεικόνιση τμήματος κελύφους σουπιάς και β) ικρίωμα HA από κέλυφος σουπιάς μετά από υδροθερμικό μετασχηματισμό και πυροσυσσώματωση στους 1250 °C (Τόρη, 2016).

Στη συνέχεια έγινε η παρασκευή των υδροπηκτωμάτων από αλγινικό και χιτοζάνη, αντίστοιχα, όπως αναφέρθηκε σε προηγούμενη ενότητα. Εν τάχει, υπενθυμίζουμε ότι για την παρασκευή του υδροπηκτώματος από αλγινικό οξύ, διαλύεται 0,1 g αλγινικού μαζί με 0,015 g γλουκονολακτόνης (GDL) και 0,0047 g χλωριούχου ασβεστίου (CaCl_2) σε 5 ml απιονισμένου νερού (dH_2O). Για την παρασκευή του υδροπηκτώματος από χιτοζάνη διαλύεται 0,05 ml οξικού οξέος σε 5 ml απιονισμένου νερού και στο έτοιμο διάλυμα 5 ml οξικού οξέος διαλύεται 0,1 g χιτοζάνης.

Πραγματοποιείται διείσδυση (infiltration), υπό κενό, στο ικρίωμα της σουπιάς, με τα υδροπηκτώματα, ώστε να εισχωρήσουν τα υδροπηκτώματα στους πόρους του ικριώματος. Παρατηρήθηκε ότι, όταν το ικρίωμα αφέθηκε στην επιφάνεια του υδροπηκτώματος (είτε του αλγινικού, είτε της χιτοζάνης), αυτό δεν βυθιζόταν (Εικόνα 7.2α). Με δεδομένο ότι η πυκνότητα του HA είναι $\sim 3.2 \text{ g/cm}^3$, τα δε υδροπηκτώματα είναι σχετικά αραιά υδατικά διαλύματα και ο HA είναι υδρόφιλο υλικό, είναι προφανές ότι η διείσδυση, λόγω του πολύ μεγάλου ιξώδους των υδροπηκτωμάτων, θα είναι πολύ αργή. Η διαδικασία υποβοηθήθηκε με εφαρμογή κενού, ώστε να βυθιστεί το ικρίωμα στο υδροπήκτωμα. Συγκεκριμένα, δοκιμαστικός σωλήνας τοποθετήθηκε σε σφαιρική φιάλη η οποία συνδέθηκε και ενώθηκε σε γραμμή κενού με υδραντλία. Μετά το βρασμό του υδροπηκτώματος (λόγω μειωμένης πίεσης), παρατηρήθηκε απαέρωση των πόρων του ικριώματος, (φυσαλίδες αέρα που βγαίνουν από το ικρίωμα στην Εικόνα 7.2 β) και βύθισή του στο υδροπήκτωμα. Η διαδικασία υποβοηθήθηκε σημαντικά όταν έγινε διαδοχική (2-3 φορές) εισροή αέρα και εφαρμογή κενού (με τη διαδικασία αυτή, έφευγε πιο εύκολα ο εγκλωβισμένος αέρας από

τους πόρους του ικρίωματος). Στο τέλος, το ικρίωμα βυθιζότανε στο υδροπήκτωμα (Εικόνα 7.2 γ).



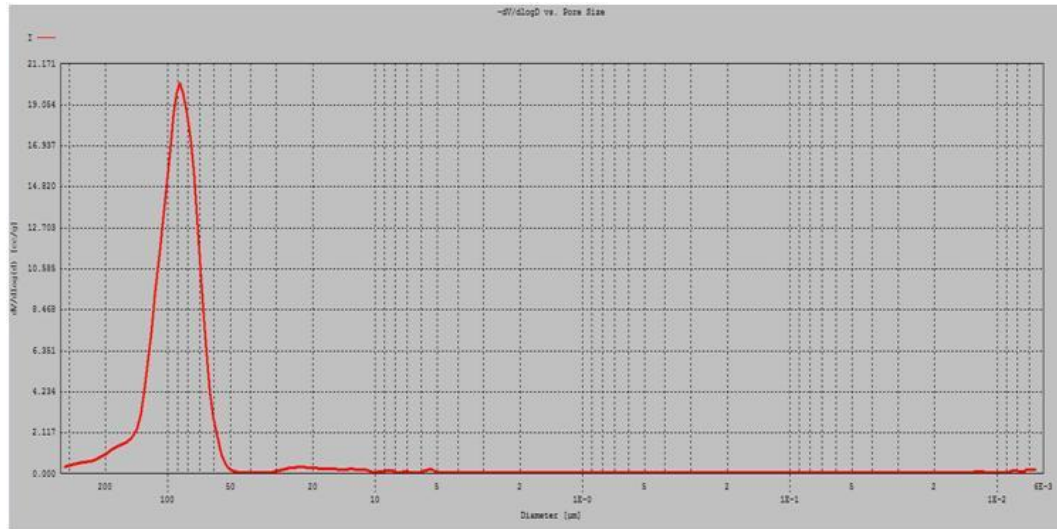
Εικόνα 7.2 α) Τοποθέτηση ικρίωματος στο υδροπήκτωμα, β) μετά από απαέρωση και γ) διείσδυση υδροπηκτώματος στο ικρίωμα.

Χαρακτηρισμός

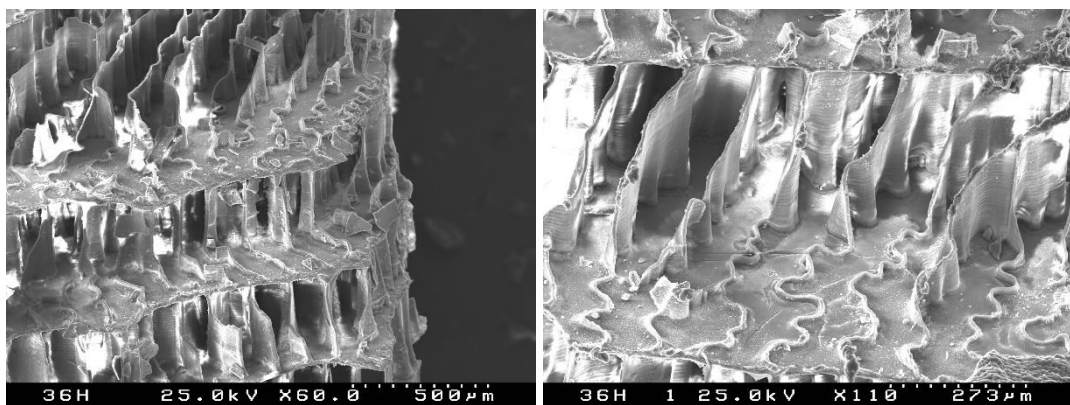
Τα ικρίωματα λυοφιλοποιούνται για να γίνει η παρατήρηση της μικροδομής τους, με ηλεκτρονική μικροσκοπία σάρωσης (SEM), ώστε να διαπιστωθεί εάν τα πολυμερικά υδροπηκτώματα έχουν εισχωρήσει στους πόρους του υδροθερμικά μετασχηματισμένου και πυροσυσσωματωμένου κελύφους σουπιάς. Έπειτα, μελετήθηκε η *in vivo* συμπεριφορά των σύνθετων αυτών ικριωμάτων με εμφυτεύσεις σε πειραματόζωα.

7.2.1 Μικροδομή και πορώδες

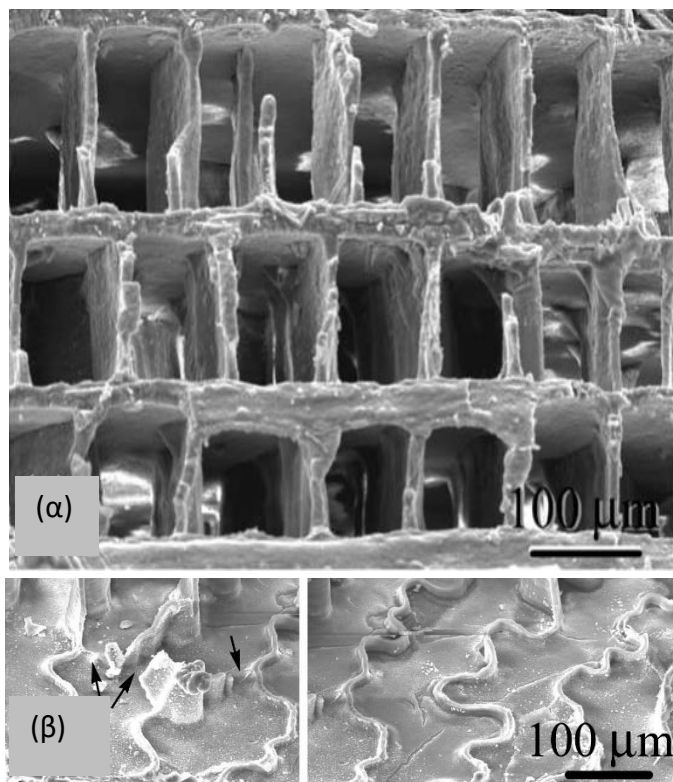
Αφού έγινε ο υδροθερμικός μετασχηματισμός στο κέλυφος της σουπιάς για 6 ώρες στους 200 °C και στη συνέχεια ακολούθησε έψηση αυτού για 1 ώρα στους 1250°C, έγινε μέτρηση του πορώδους και έτσι παίρνουμε το διάγραμμα της Εικόνας 7.3. Παρατηρείται ότι, το ικρίωμα του υδροξυαπατίτη που σχηματίστηκε έχει ιδανική πορώδη δομή για οστικό εμφύτευμα, δηλαδή έχει μέγεθος πόρων που κυμαίνεται από 80-100μm, και ενδοσύνδεση των πόρων μεταξύ τους. Επίσης, πραγματοποιήθηκε ηλεκτρονική μικροσκοπία σάρωσης στο πυροσυσσωματωμένο κέλυφος σουπιάς (Εικόνες 7.4 και 7.5), και η μικροδομή επιβεβαιώνει τα παραπάνω χαρακτηριστικά.



Εικόνα 7.3 Διάγραμμα ποροσιμετρίας υδραργύρου ικριώματος HA από κέλυφος σουπιάς μετά από υδροθερμικό μετασχηματισμό και πυροσυσσωμάτωση στους 1250°C για 1 ώρα.

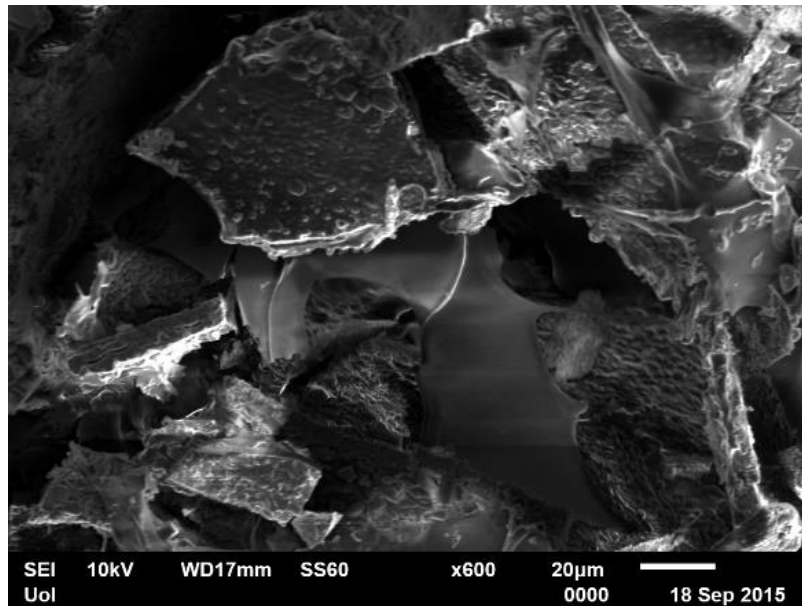


Εικόνα 7.4 Τρισδιάστατη όψη του ικριώματος του HA από υδροθερμικά μετασχηματισμένο και πυροσυσσωματωμένο κέλυφος σουπιάς, όπου διακρίνεται η δομική ανισοτροπία του, το πορώδες και η ενδοσύνδεση των πόρων.

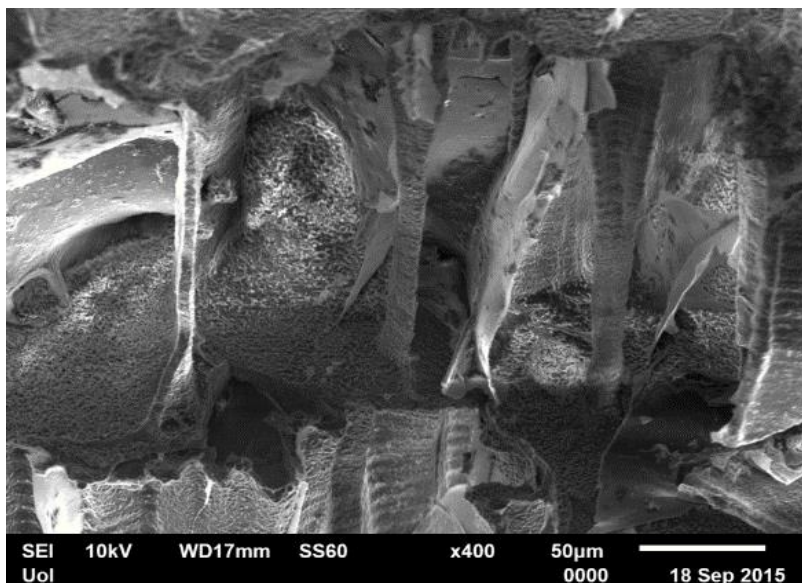


Εικόνα 7.5 Μετά τον υδροθερμικό μετασχηματισμό και τη πυροσυσσωμάτωση στους 1250°C, το προκύπτον ικρίωμα του υδροξυαπατίτη HA διατηρεί τη δομική ακεραιότητα του αρχικού κελύφους της σουπιάς. Οι πόροι έχουν ιδανικό μέγεθος, περίπου 80 μm x 120 μm (α), και ενδοσύνδεση (β), τα οποία, σε συνδυασμό με το γεγονός ότι το ικρίωμα είναι από ανθρακικά υποκατεστημένο HA, μπορούν να ευνοήσουν την αγγείωση και την οστεοενσωμάτωση, οστεοκαθοδήγηση και οστεοεπαγωγή.

Στην Εικόνα 7.6 φαίνεται η μικροδομή του ικριώματος με διεισδυμένο αλγινικό υδροπηκτώμα. Παρατηρείται η χαρακτηριστική μικροδομή του αλγινικού υδροπηκτώματος, γεγονός που αποδεικνύει ότι πράγματι στο ικρίωμα έχει διεισδύσει, μετά την παραπάνω διαδικασία, επιτυχώς στους πόρους του το αλγινικό υδροπήκτωμα. Στην Εικόνα 7.7 φαίνεται η μικροδομή του ικριώματος, μετά τη λυοφιλοποίηση, με διεισδυμένο υδροπηκτώμα χιτοζάνης. Παρατηρείται και εδώ η χαρακτηριστική μικροδομή του υδροπηκτώματος χιτοζάνης, ένδειξη ότι πράγματι στο ικρίωμα έχει διεισδύσει, μετά την παραπάνω διαδικασία, επιτυχώς στους πόρους του το υδροπήκτωμα της χιτοζάνης.

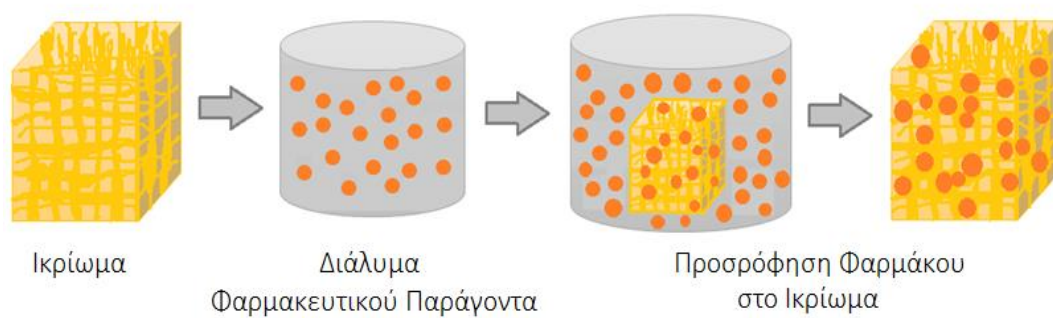


Εικόνα 7.6 Μικροδομή εμποτισμένων ικριωμάτων HA με υδροπήκτωμα αλγινικού, μετά από λυοφιλοποίηση.



Εικόνα 7.7 Μικροδομή εμποτισμένων ικριωμάτων HA με υδροπήκτωμα χιτοζάνης, μετά από λυοφιλοποίηση.

Γενικώς η ενίσχυση του ικριώματος με κάποιο άλλο παράγοντα, που πιθανά είναι φαρμακευτικός φορέας, μπορεί να επιτευχθεί με εμβάπτιση του ικριώματος στο διάλυμα του φαρμακευτικού φορέα, όπως απεικονίζεται σχηματικά, στην εικόνα 7.8



Εικόνα 7.8 Σχηματική Αναπαράσταση της εμφάνισης του ικριώματος σε διάλυμα φαρμακευτικού παράγοντα.

*Βιομιμητική σύνθεση ΗΑ
σε μήτρα υδροπηκτωμάτων*

Κεφάλαιο

8

8 ΒΙΟΜΙΜΗΤΙΚΗ ΣΥΝΘΕΣΗ ΗΑ ΣΕ ΜΗΤΡΑ ΥΔΡΟΠΗΚΤΩΜΑΤΩΝ

8.1 ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Με στόχο την ανάπτυξη υλικών που προσεγγίζουν ικανοποιητικά τις ιδιότητες του απατίτη του φυσικού οστού, επιλέγεται η παρασκευή φωσφορικών αλάτων του ασβεστίου με τη μέθοδο της χημικής καταβύθισης μέσα σε περιβάλλον βιο-υδροπηκτωμάτων. Οι δομές που σχηματίζονται προσεγγίζουν τη δομή του βιοαπατίτη των οστών με χρήση εύκολα διαθέσιμων αντιδραστηρίων. Η σύνθεση των κρυστάλλων του ΗΑ πραγματοποιείται παρουσία βιοπολυμερών, όπως είναι το αλγινικό και η χιτοζάνη, γιατί κατά αυτό τον τρόπο επιτυγχάνεται μίμηση του περιβάλλοντος, στο οποίο πραγματοποιείται η φυσική διαδικασία ανάπτυξης αυτών.

8.2 ΑΝΤΙΔΡΑΣΤΗΡΙΑ, ΣΥΣΚΕΥΕΣ – ΟΡΓΑΝΑ ΚΑΙ ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΗ ΔΙΑΔΙΚΑΣΙΑ

Αντιδραστήρια

- Αλγινικό οξύ: Alginic acid sodium salt, viscosity 15-20 cP 1% wt in H₂O, Cat. No. 180947, Sigma-Aldrich.
- Χιτοζάνη: Chitosan medium molecular weight, viscosity 200–800 cP, 1wt% in 1% acetic acid at 25°C, Cat. No. 448877, deacetylation degree 75–85%, Sigma–Aldrich.
- Χλωριούχο ασβέστιο: Calcium Chloride, Dehydrated 97%, Cat. No 21075, Fluka.
- Όξινο φωσφορικό νάτριο Na₂HPO₄: di-Sodium hydrogen phosphate, MW=142, Cat. No 6586, Merck.
- Γλουκονολακτόνη: Gluconolactone, Cat. No. G2164, MW= 178,14, Sigma-Aldrich.
- Οξικό οξύ: Acetic acid 100% Anhydrous, M=60,05 g/mol, Merck.

Συσκευές

- Το βάρος των αντιδραστηρίων που χρησιμοποιήθηκαν μετρήθηκε με ζυγό ακριβείας KERN 770, με ακρίβεια τεσσάρων δεκαδικών ψηφίων.
- Η ανάδευση των διαλυμάτων πραγματοποιήθηκε με μαγνητικό αναδευτήρα της εταιρίας VELP scientifica.

- Το pH των υδροπηκτωμάτων μετρήθηκε με ηλεκτρονικό πεχάμετρο HANNA pH meter με ηλεκτρόδιο καλομέλανα.

Πειραματική διαδικασία

Χρησιμοποιήθηκαν υδροπηκτώματα από αλγινικό με Ca^{2+} , χιτοζάνη, αλγινικό–χιτοζάνη και αλγινικό χωρίς Ca^{2+} . Παρασκευάστηκαν, αρχικά αυτά τα υδροπηκτώματα. Για την παρασκευή υδροπηκτώματος 2% χιτοζάνης διαλύθηκαν 0,1 ml AcOH σε 10 ml απιονισμένο νερό, προς παρασκευή διαλύματος 10 ml AcOH (1%) και προστέθηκαν 0,2 g χιτοζάνης, υπό ανάδευση. Δημιουργήθηκε υδροπήκτωμα χιτοζάνης με όξινο $\text{pH} \sim 4$.

Για την παρασκευή υδροπηκτώματος 2% αλγινικού διαλύθηκε ποσότητα 0,2 g αλγινικού, 0,0093 g CaCl_2 και 0,03 g GDL σε απιονισμένο νερό με τελικό όγκο διαλύματος 10 ml. Το υδροπήκτωμα του αλγινικού που δημιουργήθηκε και ήταν ήδη ασβεστιωμένο με CaCl_2 είχε $\text{pH} \sim 5-6$, ελαφρώς όξινο, για να διευκολύνει την δημιουργία ιόντων ασβεστίου. Για την παρασκευή υδροπηκτώματος 2% αλγινικού, χωρίς Ca^{2+} , διαλύθηκε ποσότητα 0,2 g αλγινικού και 0,03 g GDL σε απιονισμένο νερό με τελικό όγκο διαλύματος 10 ml. Το υδροπήκτωμα του αλγινικού χωρίς Ca^{2+} δημιουργήθηκε με σκοπό την παρατήρηση του τρόπου πρόσληψης των ιόντων ασβεστίου από το διάλυμα που θα πορστεθεί στη συνέχεια.

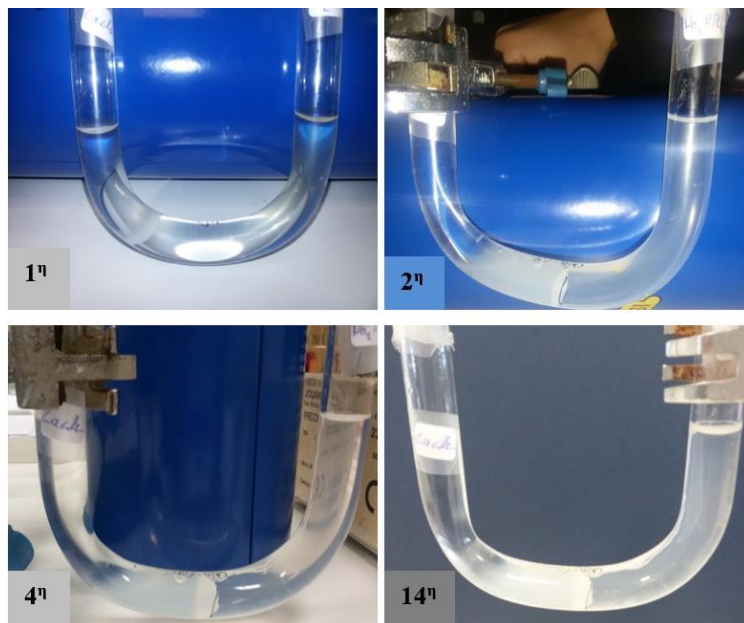
Για την παρασκευή μίγματος υδροπηκτωμάτων 2% αλγινικού - 2% χιτοζάνης αναμίχθηκαν τα υδροπηκτώματα του αλγινικού και της χιτοζάνης, η παρασκευή των οποίων αναφέρθηκε στο κεφάλαιο 6, ξεχωριστά για το καθένα. Στη συνέχεια τοποθετήθηκαν τα υδροπηκτώματα σε τέσσερις υοειδείς σωλήνες. Αριστερά προστέθηκε διάλυμα CaCl_2 0,5M και δεξιά του κάθε υδροπηκτώματος προστέθηκε διάλυμα Na_2HPO_4 0,3M. Έτσι, η αναλογία $\text{Ca}^{2+}/\text{PO}_4^{3-}$ ήταν 10/6, δηλαδή αυτή του HA.

Χαρακτηρισμός

Αφού ολοκληρώθηκε η αντίδραση, οι γέλες αφαιρέθηκαν από τους υοειδείς σωλήνες και τοποθετήθηκαν σε πυριαντήριο για ξήρανση, ώστε να ακολουθήσει ο χαρακτηρισμός τους με φασματοσκοπία υπερύθρου (IR) και να διαπιστωθεί ο βιομιμητικός σχηματισμός HA στα πολυμερικά υδροπηκτώματα.

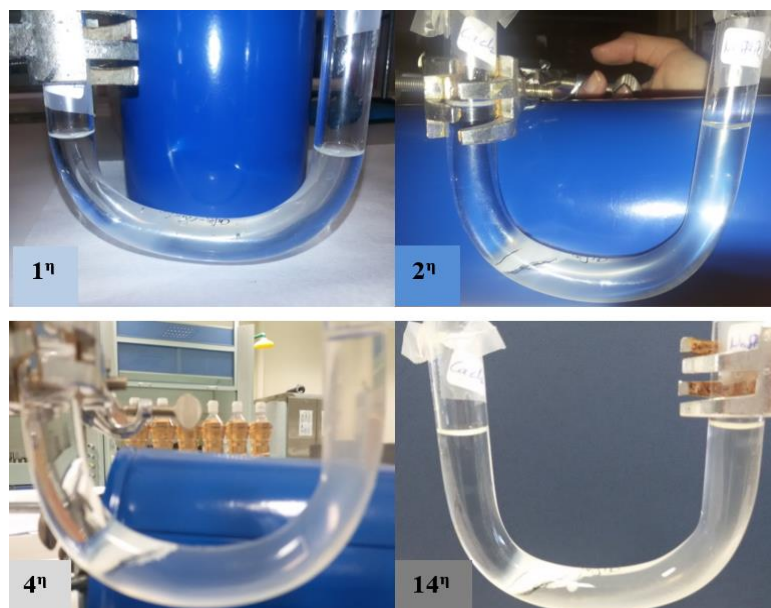
8.2 ΣΧΗΜΑΤΙΣΜΟΣ ΒΙΟΜΙΜΗΤΙΚΟΥ ΗΛ ΣΕ ΥΔΡΟΠΗΚΤΩΜΑΤΑ

Έγινε οπτική παρατήρηση στα υδροπηκτώματα αλγινικού με Ca^{2+} (CaCl_2), αλγινικού χωρίς Ca^{2+} , χιτοζάνης, και αλγινικού-χιτοζάνης με προσθήκη διαλύματος CaCl_2 0,5M, αριστερά του υοειδούς σωλήνα και προσθήκη διαλύματος Na_2HPO_4 0,3M, δεξιά του υοειδούς σωλήνα προς σχηματισμό υδροξυαπατίτη.

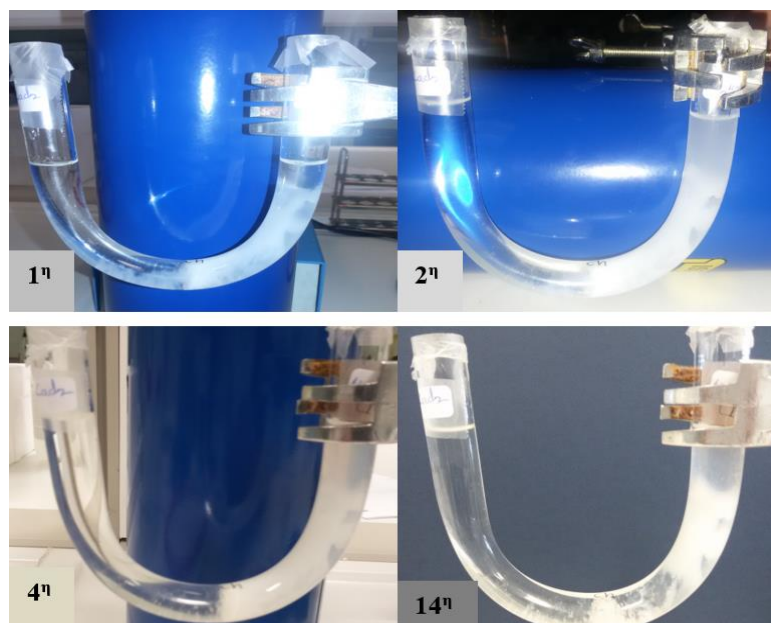


Εικόνα 8.1 Παρατήρηση του υδροπηκτώματος αλγινικού οξέος με Ca^{2+} , με προσθήκη διαλύματος Na_2HPO_4 0,3M, δεξιά και CaCl_2 0,5M, αριστερά του υοειδούς σωλήνα, κατά την 1η, 2η, 4η και 14η μετά την προσθήκη.

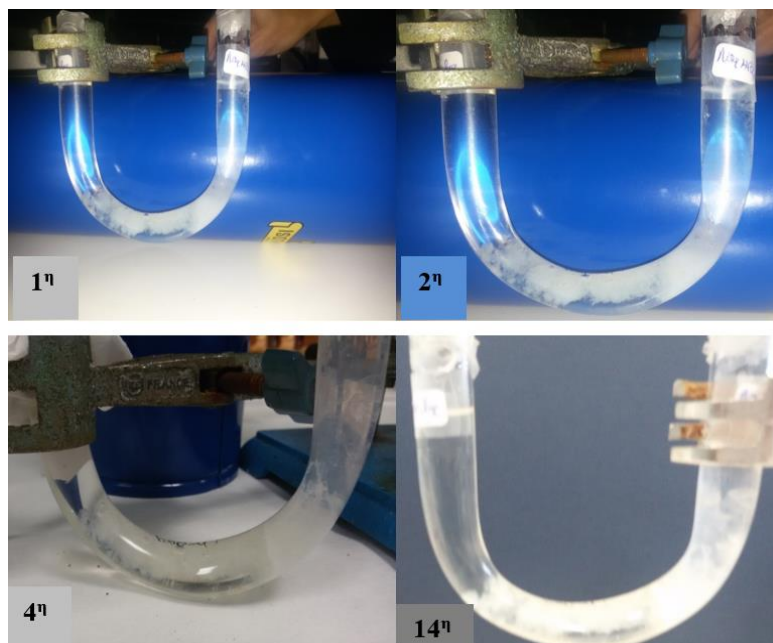
Με την πάροδο των ημερών φαίνεται πως οι λευκές περιοχές διευρύνονται, κυρίως τις πρώτες 4 ημέρες. Μετά το πέρας δύο εβδομάδων, έχουν διαχυθεί πλέον όλα τα φωσφορικά ιόντα και τα ιόντα ασβεστίου, για αυτό και δεν είναι εμφανής καμία περαιτέρω αλλαγή. Στα υδροπηκτώματα του αλγινικού με Ca^{2+} (Εικόνα 8.1) και χωρίς Ca^{2+} (Εικόνα 8.2), η καταβύθιση παρατηρείται στην αριστερή πλευρά του υοειδούς σωλήνα, δηλαδή από την πλευρά των ιόντων ασβεστίου. Ενώ, στην περίπτωση του υδροπηκτώματος της χιτοζάνης (Εικόνα 8.3) και του υδροπηκτώματος αλγινικού-χιτοζάνης (Εικόνα 8.4), η καταβύθιση εμφανίζεται στη δεξιά πλευρά του υοειδούς σωλήνα, που είναι τα φωσφορικά ιόντα. Όμως, στο υδροπήκτωμα αλγινικού-χιτοζάνης, η καταβύθιση προχωράει έντονα και στην αριστερή περιοχή (περιοχή του CaCl_2).



Εικόνα 8.2 Παρατήρηση του υδροπηκτώματος αλγινικού οξέος χωρίς Ca^{2+} , με προσθήκη διαλύματος Na_2HPO_4 0,3M, δεξιά και CaCl_2 0,5M, αριστερά του υοειδούς σωλήνα, κατά την 1η, 2η, 4η και 14^η μετά την προσθήκη.

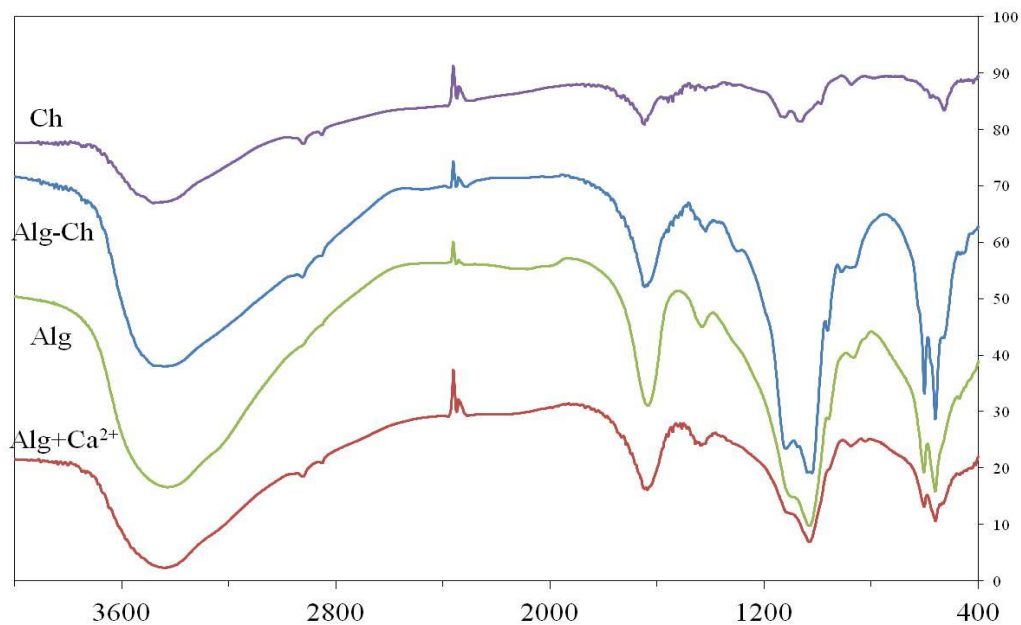


Εικόνα 8.3 Παρατήρηση του υδροπηκτώματος χιτοζάνης, με προσθήκη διαλύματος Na_2HPO_4 0,3M, δεξιά και CaCl_2 0,5M, αριστερά του υοειδούς σωλήνα, κατά την 1η, 2η, 4η και 14^η μετά την προσθήκη.

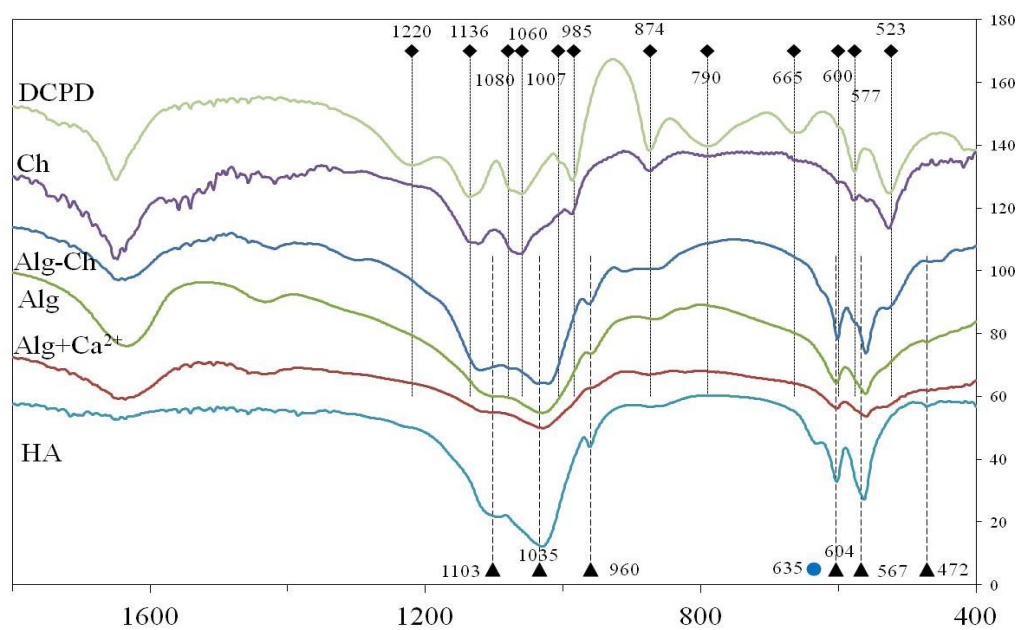


Εικόνα 8.4 Παρατήρηση του υδροπηκτώματος αλγινικού-χιτοζάνης, με προσθήκη διαλύματος Na_2HPO_4 0,3M, δεξιά και CaCl_2 0,5M, αριστερά του υοειδούς σωλήνα, κατά την 1η, 2η, 4η και 14^η μετά την προσθήκη.

Μετά την απομάκρυνση από τους σωλήνες και την ξήρανση έγινε μελέτη με φασματοσκοπία υπερύθρου (Εικόνες 8.5, 8.6). Στα φάσματα του αλγινικού με ή χωρίς Ca^{2+} , παρατηρείται ταύτιση με το φάσμα του HA. Εντοπίζονται οι κορυφές στους κυματαριθμούς 1103 cm^{-1} και 1035 cm^{-1} που οφείλονται στις ασύμμετρες δονήσεις τάσης των φωσφορικών ομάδων (PO_4^{3-}). Η κορυφή στα 960 cm^{-1} αντιστοιχεί στις συμμετρικές δονήσεις των φωσφορικών ομάδων (PO_4^{3-}). Επίσης, παρατηρούνται οι δύο στενές ζώνες στα 604 cm^{-1} και 567 cm^{-1} που αντιστοιχούν στις δονήσεις κάμψης των φωσφορικών ομάδων (PO_4^{3-}) και η κορυφή στα 472 cm^{-1} . Τέλος, στα 635 cm^{-1} παρατηρείται η χαρακτηριστική δόνηση των ομάδων του OH του HA.



(α)



(β)

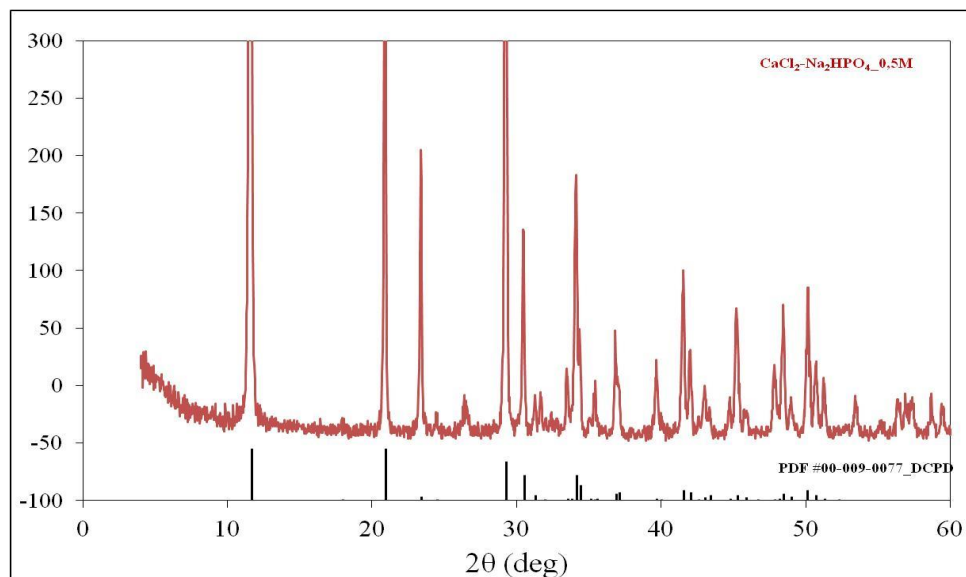
Εικόνα 8.5 Φάσματα υπέρυθρου (FTIR). Φάσμα υπέρυθρου των υδροπηκτωμάτων του αλγινικού με Ca^{2+} , του αλγινικού χωρίς Ca^{2+} , της χιτοζάνης και του υδροπηκτώματος αλγινικού-χιτοζάνης με διάλυμα CaCl_2 0,5M και Na_2HPO_4 0,3M καθώς και τα φάσματα του υδροξυαπατίτη (HA) και του μπρουσίτη (DCPD) από (α) 400 – 4000 cm^{-1} και (β) 400-1800 cm^{-1} .

Στην περίπτωση των γελών της χιτοζάνης, από το φάσμα IR παρατηρήθηκε σχηματισμός μπρουσίτη (DCPD). Έτσι το ίδιο πείραμα επαναλήφθηκε και χωρίς γέλη, δηλαδή έγινε αντίδραση CaCl_2 0,5M και Na_2HPO_4 0,3M. Με περίθλαση ακτίνων X (Εικόνα 8.6) διαπιστώθηκε σχηματισμός μπρουσίτη. Αυτό εξηγείται λόγω του γεγονότος ότι το υδροπρήκτωμα της χιτοζάνης σχηματίζεται σε όξινο pH, όπου ευνοείται ο σχηματισμός μπρουσίτη (και όχι του HA, που απαιτεί πιο αλκαλικό pH).

Η κορυφή στα 874 cm^{-1} αντιστοιχεί στις αλληλεπιδράσεις των όξινων φωσφορικών ιόντων (HPO_4^{2-}) του μπρουσίτη. Επιπλέον, οι χαρακτηριστικές κορυφές του μπρουσίτη στα 1220 και 523 cm^{-1} οφείλονται στις δονήσεις κάμψης των φωσφορικών ομάδων (PO_4^{3-}) του μπρουσίτη. Επίσης, οι δυο μεγάλες κορυφές στα 1136 και 1060 cm^{-1} καθώς επίσης και η μικρή κορυφή στα 985 cm^{-1} αποδίδονται στις δονητικές ζώνες του μπρουσίτη (Xie et al., 2002, Singh, Singh, & Aggarwal, 2010).

Στο φάσμα του υδροπρηκτώματος αλγινικού-χιτοζάνης παρατηρείται ο σχηματισμός DCPD και HA. Επίσης, σε όλα τα φάσματα IR δεν βλέπουμε τις κορυφές του αλγινικού και της χιτοζάνης.

Στο περιθλασιογράφημα σκόνης της Εικόνας 57 του $\text{CaCl}_2\cdot\text{Na}_2\text{HPO}_4$ παρατηρείται η χαρακτηριστική κορυφή του μπρουσίτη στις $11,6804^\circ$ και $20,9341^\circ$.



Εικόνα 8.6 Περιθλασιογράφημα σκόνης μπρουσίτη που καταβυθίστηκε από αντίδραση CaCl_2 (0,5 M) και Na_2HPO_4 (0,3 M).

*Βιολογική απόδοση
in vitro και in vivo*

Κεφάλαιο

9

9 ΒΙΟΛΟΓΙΚΗ ΑΠΟΔΟΣΗ, ΣΥΣΤΗΜΑΤΑ ΜΕΤΑΦΟΡΑΣ ΦΑΡΜΑΚΩΝ

9.1 ΟΣΤΕΟΕΠΑΓΩΓΗ

Τα κεραμικά από φωσφορικό ασβέστιο είναι ικανά να επάγουν οστεοποίηση, σε μη οστικά σημεία, χωρίς αν είναι απολύτως γνωστός ο μηχανισμός και το αίτιο, αυτής της οστεοεπαγωγής. Αυτό το φαινόμενο είναι το κλειδί για την ανάπτυξη βελτιστοποιημένων υλικών για αναδόμηση οστού και αναγέννηση αλλά και για την προστασία από παθολογικής φύσης έκτοπες παθολογικές ασβεστοποιήσεις (Chai et al., 2012, Barradas et al., 2011). Η οστεοεπαγωγή αρχικά εξαρτάται από την αρχική επίδραση του υλικού (Chai et al., 2012). Το μέγεθος των πόρων και η διάμετρος των καναλιών καθορίζουν τη συγκέντρωση των κυττάρων που μπορούν να «φιλοξενηθούν» στο ικρίωμα και επίσης τη διαθεσιμότητα και τη διάχυση θρεπτικών συστατικών και οξυγόνου. Αυτοί οι πόροι προσφέρουν το διαθέσιμο χώρο για οστική αναδόμηση και ταυτόχρονα την αγγειογένεση. Η οστεοεπαγωγή επηρεάζεται επίσης από τη σύνθεση και τη διαλυτότητα του υλικού που επιλέγεται και αυτό το φαινόμενο σχετίζεται με την επαγωγή της χημειοταξίας των βλαστικών κυττάρων και την διαφοροποίηση που προωθείται με την απελευθέρωση ασβεστίου και φωσφορικών ιόντων (Chai et al., 2012, R. Sammons, 2015).

Η ανοσολογική απόκριση στο υλικό που εμφυτεύεται σχετίζεται με τη οστεοεπαγωγή. Η δημιουργία φλεγμονής στην χημειοταξία των πρόδρομων οστεοκλαστών, που εξασφαλίζει τη δημιουργία ώριμων οστεοκλαστών, με την απορρόφηση του υλικού, με την απελευθέρωση ασβεστίου και φωσφορικών ιόντων. Η τάση καθίζησης που εμφανίζεται παρουσία περιοχών που δρουν ως πυρήνες συμπύκνωσης, και απουσία αναστολέων, αυξάνεται από την υψηλή, τοπικά, συγκέντρωση ιόντων (Shindyapina et al., 2014).

9.2 ΒΙΟΑΠΟΙΚΟΔΟΜΗΣΗ

Σύγχρονες έρευνες υποστηρίζουν ότι υπάρχει συσχέτιση μεταξύ των μεγεθών των κόκκων, των θερμοκρασιών πυροσυσσώματωσης και του βαθμού αποικοδόμησης και απορρόφησης (Chang et al., 1999, Malard et al., 1999). Η μελέτη της *in vitro* βιοαποικοδόμησης του φωσφορικού ασβεστίου έχει δείξει ότι το TCP διαλύεται πιο γρήγορα από τον HA (Jarcho, 1981, Daculsi, 1998). Οι *in vitro* δοκιμές HA, και σωματιδίων τετραβασικού φωσφορικού ασβεστίου (TTCP) και σωματιδίων TCP έχουν πραγματοποιηθεί

σε γαλακτικό οξύ, κιτρικό οξύ και σε απεσταγμένο νερό (Klein et al., 1990). Τα αποτελέσματα δείχνουν ότι είναι μεγαλύτερη η διαλυτότητα του TTCP στο απεσταγμένο νερό, αμέσως μικρότερη η διαλυτότητα του στο TCP και μικρότερη του HA. Στα διαλύματα γαλακτικού και στο κιτρικού οξέος, η διαλυτότητα των TTCP και TCP είναι παρόμοιες, αλλά ξεπερνούν τη διαλυτότητα του HA (Klein et al., 1990).

Το ίδιο το περιβάλλον, φυσιολογικά επιδρά στη βιοαποικοδόμηση των βιοκεραμικών από TCP. Η χημική σύνθεση, η κρυσταλλικότητα, η μικροδομή και το πορώδες, όλα επηρεάζουν το ρυθμό αποικοδόμησης (Daculsi, 1998). Για τη μηχανική σταθερότητα και αντοχή, τα εμφυτεύματα HA υφίστανται ελάχιστη δοκιμασία (Bauer et al. 1991).

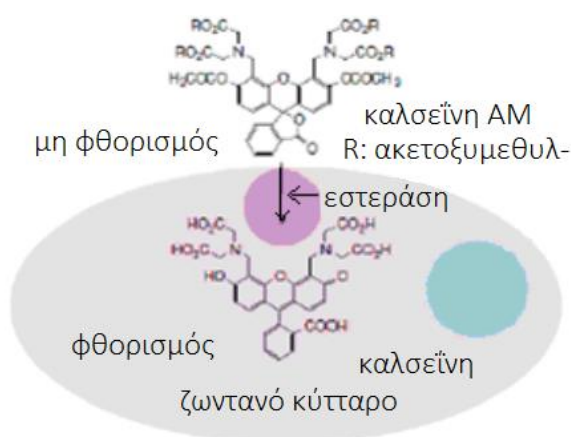
Μία ολοκληρωμένη αντίληψη των παραγόντων που επιδρούν στη βιοαπορρόφηση υλικών που χρησιμοποιούνται στα εμφυτεύματα φωσφορικού ασβεστίου, ακόμη δεν έχει επιτευχθεί πλήρως. Οι χημικές ιδιότητες αλλά και η δομή του υλικού φαίνεται να συμβάλλουν στην βιοαποικοδόμησή τους. Εμφυτεύματα υψηλής πυκνότητας από κρυσταλλικό HA δείχνουν χαμηλό ρυθμό αποικοδόμησης, εξαιτίας της χημικής τους σύνθεσης και της μικρής ελεύθερης επιφάνειας. Τα εμφυτεύματα που είναι φτιαγμένα από πυκνό TCP παρουσιάζουν σημαντική ρυθμό διάλυσης, μεγαλύτερο από τον αντίστοιχο ρυθμό του πυκνού HA (Epinette et al., 2004). Τα εμφυτεύματα από πορώδες TCP απορροφώνται γρηγορότερα από τα πορώδη εμφυτεύματα HA. Το μακροπορώδες αποδεικνύεται ότι αυξάνει το βαθμό διάλυσης και σε συνδυασμό με την παρουσία μικροπορώδους, πιθανά προάγει την βιοαπορρόφηση των υλικών από φωσφορικό ασβέστιο. Τέλος, η διαλυτότητα επηρεάζεται από τις περιβαλλοντικές συνθήκες (π.χ. pH) και η απορρόφηση μπορεί να ελεγχθεί και να ρυθμιστεί από την κυτταρική δραστηριότητα (Epinette et al., 2004).

9.3 ΕΛΕΓΧΟΣ ΒΙΟΣΥΜΒΑΤΟΤΗΤΑΣ *in vitro* ΣΕ ΚΥΤΤΑΡΙΚΕΣ ΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΕΣ

Έχουν πραγματοποιηθεί πολλές δοκιμές ελέγχου της βιοσυμβατότητας των παραγόμενων ικριωμάτων σε οστεοβλάστες. Για το σκοπό αυτό, καλλιεργούνται οστεοβλάστες, σε κατάλληλο θρεπτικό μέσο, που ενισχύεται με 10% ορό εμβρύου βοός (fetal bovine serum (FBS)) and 1% αντιβιοτικά. Η μελέτη της κυτταροτοξικότητας γίνεται με τη μέθοδο MTT. Η μέθοδος MTT είναι μια χρωματομετρική μέθοδος, που περιλαμβάνει την χρήση ενός άλατος, του (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2, 5-diphenyltetrazolium bromide

(MTT) (Lagopati et al., 2014, Lagopati et al., 2010, Λαγοπάτη, 2013). Η μέθοδος MTT (MTT colorimetric assay) εκμεταλλεύεται τη μετατροπή των αλάτων τετραζολίου σε μη διαλυτά παράγωγα φορμαζάνης. Το κίτρινου χρώματος άλας τετραζολίου MTT, οξειδώνεται από τις αφυδρογονάσεις των μιτοχονδρίων των ζωντανών κυττάρων και παράγονται έγχρωμοι κρύσταλλοι φορμαζάνης (ιώδεις), οι οποίοι συσσωρεύονται στα μιτοχόνδρια του κυττάρου (σχήμα 9.1) [182]. Η οξείδωση του MTT πραγματοποιείται μόνο όταν τα μιτοχονδριακά ένζυμα είναι μεταβολικώς ενεργά και συνεπώς η παραγωγή κρυστάλλων φορμαζάνης πραγματοποιείται μόνο στα βιώσιμα κύτταρα (σχήμα 9.1) (Denizot & Lang, 1986).

Ένα μειονέκτημα της μεθόδου είναι ότι εκτιμά τον αριθμό κυττάρων μέσω της μεταβολικής δραστηριότητας. Αυτό σε κάποιες περιπτώσεις αποδεικνύεται δυσλειτουργικό, αφού μπορεί να λάβουμε παρόμοια αποτελέσματα από ένα μικρό έντονα ενεργό, μεταβολικά, κυτταρικό πληθυσμό και από ένα σχετικά μεγάλο αριθμό λιγότερο ενεργών κυττάρων. Συνήθως όμως λειτουργεί ικανοποιητικά.



Εικόνα 9.1 Οξείδωση MTT. Η οξείδωση του MTT πραγματοποιείται μόνο όταν τα μιτοχονδριακά ένζυμα είναι μεταβολικώς ενεργά και συνεπώς η παραγωγή κρυστάλλων φορμαζάνης πραγματοποιείται μόνο στα βιώσιμα κύτταρα (ανατύπωση από Plumb, 2004).

Πρωτογενείς καλλιέργειες οστεοβλαστών δημιουργούνται, με απομόνωση οστεοβλαστών από κρανίο νεογέννητου (1-5 ημερών) μυός (Silver et al., 2001). Τα κρανία έχουν παρθεί με τομή και απελευθέρωση από μαλακό ιστό, έχουν τεμαχιστεί σε μικρά μέρη. Στη συνέχεια ξεπλένονται σε ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών αλάτων PBS (phosphate buffer saline - PBS), χωρίς την προσθήκη ασβεστίου και μαγνησίου. Τα τμήματα αυτά επωάζονται με 1% θρυψίνη – EDTA για 5 λεπτά. Τέσσερις διαδοχικές πέψεις με 2%

κολλαγενάση στους 37°C για 45 λεπτά, η καθεμία, με σκοπό να δημιουργηθεί ένα κυτταρικό εναιώρημα, με μεγάλη συγκέντρωση σε οστεοβλάστες. Πραγματοποιείται φυγοκέντρωση στις 3000 rpm για 5 λεπτά. Το ίζημα επαναιωρείται σε 5 ml φρέσκου θρεπτικού μέσου, ενισχυμένο 10% ορό εμβρύου βοός (fetal bovine serum (FBS)) and 1% αντιβιοτικά. Τελικά τα κύτταρα καλλιεργούνται σε φλάσκες και διατηρούνται σε ελεγχόμενο περιβάλλον με περιεκτικότητα σε CO₂ 5%, 95% υγρασία και θερμοκρασία 37°C (Rocha et al., 2006).

Τα ικρίωματα τεμαχίζονται σε μικρά κομμάτια και αποστειρώνονται. Οι οστεοβλάστες τοποθετούνται σε τριβλία για 2 ώρες, ώστε να «κολλήσουν» στον πυθμένα του. Τα ικρίωματα τοποθετούνται με προσοχή πάνω από τα κύτταρα. Αυτή η μέθοδος επιτρέπει στα κύτταρα να εισχωρήσουν στους πόρους, εξαιτίας της δράσης των τριχοειδών αγγείων (Rocha et al., 2006). Η βιωσιμότητα των οστεοβλαστών προσδιορίζεται με τη μέθοδο MTT (Lagorati et al., 2010). Ο σχηματισμός φορμαζάνης είναι ανάλογος του αριθμού των αφυδρογονασών και έτσι υπάρχει η δυνατότητα για έμμεσο τρόπο μέτρησης του κυτταρικού πολλαπλασιασμού (Amaral et al., 2002).

Το MTT (5 mg/mL) προστίθεται σε κάθε φρέαρ καλλιέργειας. Μετά από δύο ώρες επώασης, η κυτταρική μορφολογία παρατηρείται με οπτικό μικροσκόπιο και στη συνέχεια διαλυτοποιούνται οι κρύσταλλοι φορμαζάνης με 100 μ L δωδέκυλο θειικό νάτριο - sodium dodecyl sulphate (SDS) με 10% HCl. Η οπτική πυκνότητα μετράται στα 570 nm και το υπόβαθρο στα 650 nm (Meleti et al., 2000).

Η μέτρηση της παραγωγής αλκαλικής φωσφατάσης (ALP) μπορεί να εκτιμηθεί με τη μέθοδο BCIP–NBT (5-βρωμο-4-χλωρο-3-ινδοϋλο-φωσφορικό / κυανού του νιτροτετραζολίου). Η μέθοδος αυτή βασίζεται σε χρωμοαντίδραση που ξεκινά με τη δέσμευση initiated των φωσφορικών ομάδων του BCIP από την αλκαλική φωσφατάση που υπάρχει στα κύτταρα και τελειώνει με την παραγωγή πρωτονίου, που ανάγει το NBT σε αδιάλυτο μωβ κατακρήμνισμα (Rocha et al., 2006). Έτσι το υπερκείμενο από το κάθε φρέαρ απομακρύνεται και το κυτταρικό ταπήτιο ξεπλένεται τρεις φορές με PBS. Στη συνέχεια, προστίθενται 200 μ L διαλύματος BCIP–NBT σε κάθε φρεάτιο. Μετά από 2 ώρες επώασης, τα κύτταρα τοποθετούνται στο οπτικό μικροσκόπιο και το αδιάλυτο μωβ κατακρημνίζεται και διαλυτοποιείται με 210 μ L SDS - 10% HCl και επωάζεται για 18 ώρες. Η οπτική πυκνότητα προσδιορίζεται στα 570 nm και στα 650 nm (Klein et al., 1998).

Κάποιες μελέτες χρησιμοποιούν κυτταρικές σειρές, όπως τα κύτταρα MG63 (ανθρώπινη οστεοσαρκωματική κυτταρική σειρά), ώστε να εκτιμηθεί η βιοσυμβατότητα του ΗΑ, που έχει παρασκευαστεί με υδροθερμική μετατροπή από οστό σουπιάς (Cozza et al., 2017, Kim et al., 2014). Για να εξεταστεί η μορφολογία του κυτταρικού πληθυσμού, γίνεται χαρακτηρισμός με συνεστιακό μικροσκόπιο σάρωσης με laser (Confocal Laser Scanning Microscopy (CLSM)). Για αυτό το σκοπό, μετά από 1, 3 και 7 ημέρες επώασης σε καλλιεργητικό μέσο, τα κύτταρα μονιμοποιούνται, καθίστανται διαπερατά με 4% διάλυμα παραφορμαλδεΰδης σε διάλυμα PBS με 0.2% Triton X-100. Στη συνέχεια επισημαίνονται με φαλλοϊδίνη-ροδαμίνη για την οπτικοποίηση της νηματοειδούς ακτίνης (F-actin) και με τη χρωστική 6-διαμιδινο-2-φενυλινδόλιο (4',6-Diamidino-2-Phenylindole, Dilactate (DAPI)) για χρώση του πυρήνα. Η μορφολογία των κυττάρων που έχουν προσκολληθεί στο υπόστρωμα παρατηρείται με συνεστιακό μικροσκόπιο σάρωσης με laser (Cozza et al., 2017).

Ο κυτταρικός πολλαπλασιασμός εκτιμάται με ποσοτικοποίηση του DNA. Η μεταβολική δραστηριότητα των κυττάρων μπορεί να προσδιοριστεί και με τη μέθοδο AlamarBlue Cell Viability, αντί για το MTT. Η μέθοδος αυτή βασίζεται στο σήμα φθορισμού που λαμβάνεται από κάθε δείγμα (Pabbruwe et al., 2005).

Οι οστεοβλάστες, παρουσία των ικριωμάτων ΗΑ, δείχνουν ικανοποιητική βιοσυμβατότητα. Με παρατήρηση σε οπτικό μικροσκόπιο, φαίνεται ότι οι οστεοβλάστες δεν έδειξαν καμία ένδειξη μορφολογικής αλλαγής μετά από 24, 48 και 72 ώρες επώασης με τα ικριώματα, συγκρινόμενα με τα δείγματα, που αποτελούν αρνητικούς μάρτυρες του πειράματος.

Τα δεδομένα από τη δοκιμή MTT δείχνουν σημαντική αύξηση της βιωσιμότητας / πολλαπλασιασμού των οστεοβλαστών παρουσία των ικριωμάτων, συγκρινόμενα με τα δείγματα, που αποτελούν αρνητικούς μάρτυρες του πειράματος, ενώ η παραγωγή αλκαλικής φωσφατάσης δεν φαίνεται να παρουσιάζει διακυμάνσεις (Rocha et al., 2006).

9.4 *In vivo* ΕΛΕΓΧΟΣ ΤΩΝ ΙΚΡΙΩΜΑΤΩΝ ΜΕ ΕΜΦΥΤΕΥΣΕΙΣ ΣΕ ΠΕΙΡΑΜΑΤΟΖΩΑ

Σίγουρα ο απώτερος σκοπός της ανάπτυξης νέων υλικών για εμφυτεύματα είναι η κλινική τους εφαρμογή. Έτσι απαιτείται η δοκιμή τους σε πειραματόζωα. Ακολούθως παρουσιάζεται η *in vivo* συμπεριφορά των ικριωμάτων που παρήχθησαν στην παρούσα

εργασία. Ιδιαίτερη έμφαση δίνεται και στη δυνατότητα που παρέχεται στο χειρουργό να χειριστεί και να εμφυτεύσει τα ικρίωματα αυτά. Οι εμφυτεύσεις έγιναν υποδόρια καθώς επίσης και σύμφωνα με ιατρικό πρωτόκολλο για σπονδυλοδεσία.

Συνήθως, τα ικρίωματα ΗΑ αποδεικνύονται εύθρυπτα, με αποτέλεσμα να είναι απολύτως αντιληπτό ότι η μικροδομή των ικριωμάτων είναι εύκολο να καταρρεύσει κατά την προσπάθεια εμφύτευσης από τον χειρουργό (Τόρη, 2016, Τζόκα, 2016). Για να αποφευχθεί μία τέτοια κατάσταση, η ενίσχυση με κάποιο βιοαποικοδομήσιμο υδροπήκτωμα, όπως χιτοζάνης ή αλγινικού οξέος, όπως αναφέρθηκε είναι μία καλή επιλογή. Στη συνέχεια επιχειρείται η ξήρανση και η εμφύτευση του ικρίωματος (Τζόκα, 2016). Σε περίπτωση πίεσης, πέραν της ανεκτής, από το χειρουργό, που θα οδηγήσει σε δημιουργία ρωγμών στο ικρίωμα, τότε δεν θα υπάρξει καταστροφή και η μικροδομή δεν θα αλλοιωθεί, διότι το υδροπήκτωμα θα λειτουργήσει ως κόλλα μεταξύ των τοιχωμάτων του ικρίωματος. Μετά την ολική ενσωμάτωση του ικρίωματος στο σώμα του πειραματόζωου, εξαιτίας της παρουσίας του ΗΑ, το υδροπήκτωμα θα αποικοδομηθεί (Τόρη, 2016).

Η αποστείρωση των ικριωμάτων πραγματοποιείται με υπέρυθρη ακτινοβολία (UV) πριν από την εμφύτευση. Έπειτα τα ικρίωματα εμβαπτίζονται για 2 ώρες σε πλάσμα αίματος, για την προαγωγή της απορρόφησης των αυξητικών παραγόντων, που είναι πολύ σημαντικά για την οστεοεπαγωγή (Τζόκα, 2016).

Ιατρικό πρωτόκολλο

Για τις ανάγκες των πειραμάτων χρησιμοποιήθηκαν επίμυες τύπου Wistar (250 g) ηλικίας 4-5 εβδομάδων. Η προμήθειά τους έγινε από το Εκτροφείο Πειραματόζωων του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων. Οι επίμυες φιλοξενήθηκαν στο Εργαστήριο Μικροχειρουργικής σε συνθήκες σύμφωνες με τις σχετικές διατάξεις της Ελληνικής νομοθεσίας για τα πειραματόζωα. Επίσης, είχαν ελεύθερη πρόσβαση σε τροφή και νερό, ενώ ζούσαν σε περιβάλλον όπου φως και σκοτάδι εναλλάσσονταν περιοδικά κάθε 12 ώρες.

Κατά τη διάρκεια των εμφυτεύσεων χρησιμοποιήθηκαν αναισθησία και αναλγητικές ουσίες ώστε να περιοριστεί κατά το δυνατό ο πόνος και η ταλαιπωρία των ζώων. Τα ζώα αναισθητοποιήθηκαν με κεταμίνη (Narketan 10, 100 mg/ml, Vetoquinolag, Switzerland) της οποίας η χορήγηση έγινε ενδοπεριτοναϊκά (100 mg/kg). Μετά την ολοκλήρωση του πειράματος, για τη συνέχεια του πειραματικού πρωτοκόλλου, τα πειραματόζωα

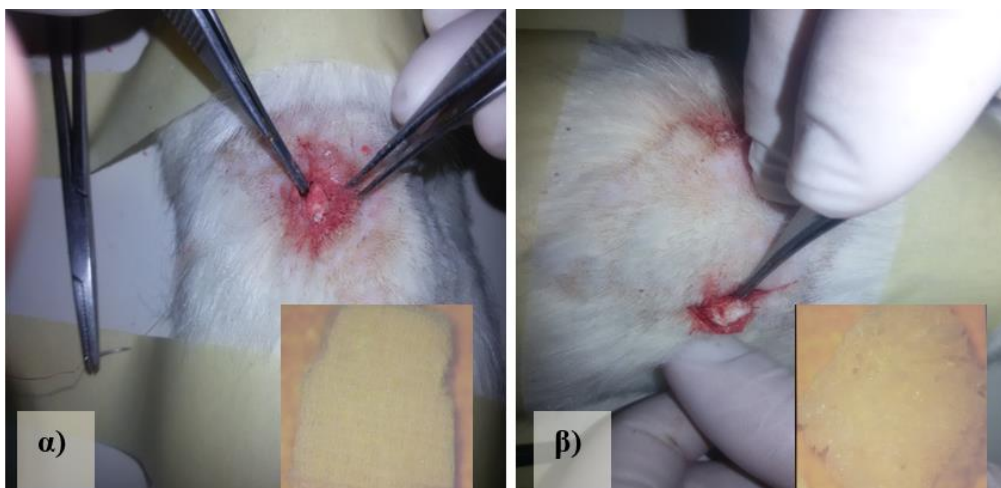
θυσιάστηκαν με ενδοπεριτοναϊκή έγχυση θανατηφόρας δόσης κεταμίνης (τεχνική η οποία προκαλεί άμεσο και ανώδυνο θάνατο στα ζώα).

Η σταθερότητα και η βιοαποικοδόμηση του ικριώματος εξετάζεται, μετά την εμφύτευσή του, υποδόρια, στη ράχη επίμυων. Στη συνέχεια ελέγχεται η βιολογική επίδραση του ικριώματος στη γεφύρωση παρακείμενων εγκάρσιων αποφύσεων της σπονδυλικής στήλης του επίμυος (Ο3-Ο5) (Τζόκα 2016, Τόρη, 2016).

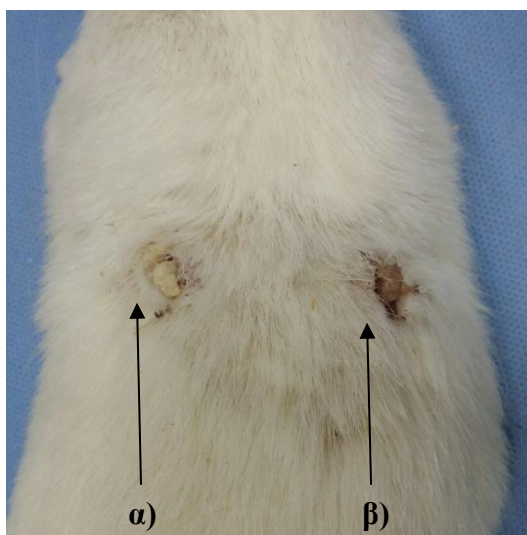
Για να υπάρχει αξιοπιστία και δυνατότητα στατιστικής ανάλυσης των πειραματικών αποτελεσμάτων, το ιατρικό πρωτόκολλο προβλέπει ο αριθμός των πειραματόζων που πρέπει να χρησιμοποιηθούν για τη συγκεκριμένη μελέτη να είναι 16. Η θυσία των πειραματόζων και η λήψη του εναπομείναντος ικριώματος για ανάλυση να γίνει την 5^η, 10^η, 15^η, 20^η, 25^η, 30^η, 35^η και 40^η ημέρα από τη στιγμή της εμφύτευσης. Το ικρίωμα τότε, αφαιρείται και εξετάζεται περαιτέρω. Επίσης, σε κάθε χρονική στιγμή, θυσιάζονται 2 πειραματόζωα. Οι παραπάνω αριθμοί στο ιατρικό αυτό πρωτόκολλο αφορούν στη μελέτη ενός συγκεκριμένου εμφυτεύματος. Επειδή δοκιμάστηκαν διαφορετικά εμφυτεύματα, ώστε να επιλεγεί εκείνο με τα καλύτερα χαρακτηριστικά και έπειτα να αρχίσει η συστηματική *in vivo* μελέτη του σύμφωνα με το ιατρικό πρωτόκολλο, το πρωτόκολλο δεν τηρήθηκε ευλαβικά, ως προς τον αριθμό των πειραματόζων και τους χρόνους δειγματοληψίας. Στη συνέχεια παρουσιάζονται τα αποτελέσματα από τις εμφυτεύσεις του κάθε ικριώματος.

Υποδόρια εμφύτευση ικριώματος ΗΑ από υδροθερμικά μετασχηματισμένο και πυροσυσσωματωμένο κέλυφος σουπιάς και ικρίωμα αλγινικού-χιτοζάνης

Χρησιμοποιήθηκε ένα πειραματόζωο στη ράχη του οποίου έγιναν δύο τομές. Στην αριστερή τομή τοποθετήθηκε το πορώδες ικρίωμα του ΗΑ από υδροθερμικά μετασχηματισμένο και πυροσυσσωματωμένο κέλυφος σουπιάς (όχι ενισχυμένο). Στη δεξιά τομή τοποθετήθηκε πορώδες ικρίωμα αλγινικού-χιτοζάνης (χωρίς κεραμικό). Οι εμφυτεύσεις φαίνονται στην Εικόνα 9.2



Εικόνα 9.2 Υποδόρια εμφύτευση α) ικρίωματος HA από υδροθερμικά μετασχηματισμένο και πυροσυσσωματωμένο κέλυφος σουπιάς και β) ικρίωματος αλγινικού-χιτοζάνης.



Εικόνα 9.3 Συλλογή εμφυτευμάτων μετά από τέσσερις εβδομάδες υποδόριας εμφύτευσης. α) Ικρίωμα HA από υδροθερμικά μετασχηματισμένο και πυροσυσσωματωμένο κέλυφος σουπιάς (αριστερά της ράχης του ζώου) και β) ικρίωμα αλγινικού-χιτοζάνης (δεξιά της ράχης του ζώου).

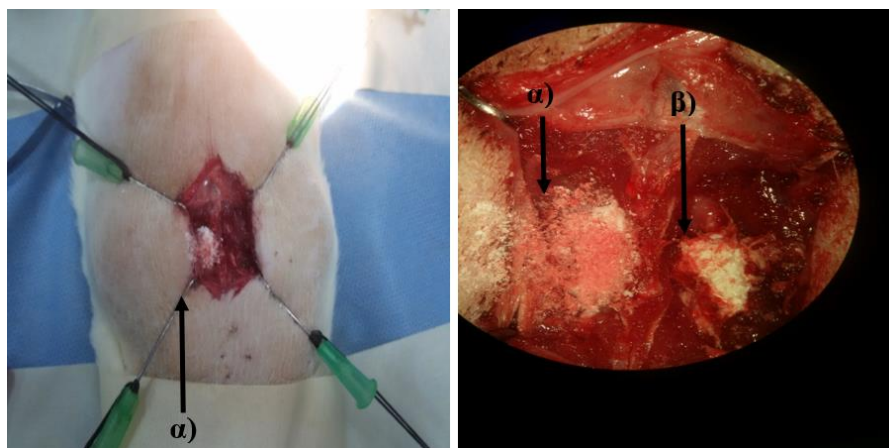
Ύστερα από τέσσερις εβδομάδες, το πειραματόζωο θυσιάστηκε. Το ικρίωμα αλγινικού-χιτοζάνης υπήρχε, αλλά είχε τη μορφή «τσίχλας», έχασε, δηλαδή, την δομική ακεραιότητα του αρχικού πορώδους ικρίωματος (Εικόνα 9.3). Αντίθετα το κεραμικό ικρίωμα του HA από το υδροθερμικά μετασχηματισμένο και πυροσυσσωματωμένο κέλυφος σουπιάς, διατήρησε στο ακέραιο την αρχική δομή του, χωρίς καμία σημαντική αλλαγή με οπτική παρατήρηση.

Εμφύτευση ικρίωματος HA από υδροθερμικά μετασχηματισμένο και πυροσυσσωματωμένο κέλυφος σουπιάς και ικρίωμα αλγινικού-χιτοζάνης, στη σπονδυλική στήλη

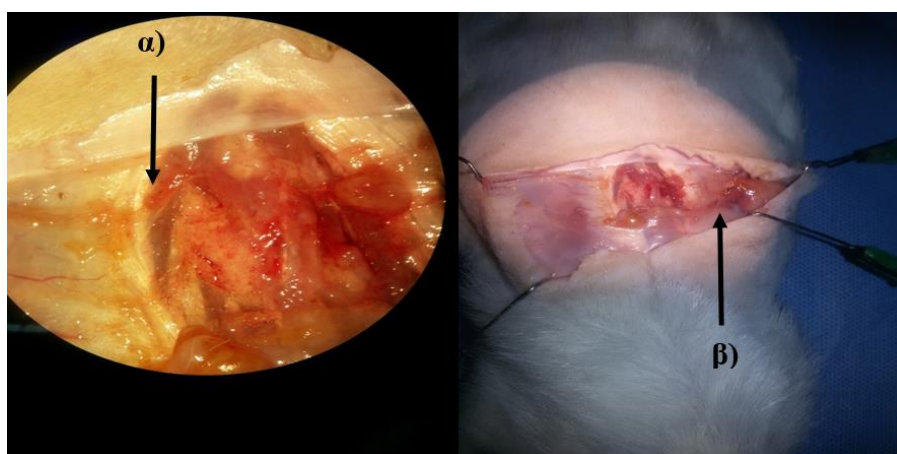
Επειδή τα αποτελέσματα της προηγούμενης υποδόριας εμφύτευσης έδειξαν ότι αμφότερα τα ικρίωματα δεν διαλύονταν, στις εμφυτεύσεις αυτές τοποθετήθηκαν ακριβώς τα ίδια ικρίωματα σύμφωνα με το ιατρικό πρωτόκολλο της σπονδυλοδεσίας και συγκεκριμένα με σκοπό να μελετηθεί η επίδρασή τους στη γεφύρωση παρακείμενων εγκάρσιων αποφύσεων της σπονδυλικής στήλης του επίμυος (Ο3-Ο5).

Χρησιμοποιήθηκε ένας επίμυος, στη σπονδυλική στήλη του οποίου έγινε μια τομή και εμφυτεύθηκαν, δεξιά και αριστερά, τα ικρίωματα ανάμεσα στις εγκάρσιες και τις ακανθώδεις αποφύσεις. Αριστερά τοποθετήθηκε το πορώδες ικρίωμα του HA (από το κέλυφος σουπιάς) και δεξιά το πορώδες ικρίωμα αλγινικού-χιτοζάνης (Εικόνα 9.4). Αναφορικά με το πορώδες κεραμικό ικρίωμα του HA από το κέλυφος της σουπιάς, επειδή κατά την εμφύτευση απαιτείται εφαρμογή δύναμης στο εμφύτευμα από το χειρουργό, διαπιστώσαμε ότι όταν προσπαθήσαμε να τοποθετήσουμε το βιοϋλικό αυτό στη συγκεκριμένη ανατομική θέση αυτό θρυμματιζόταν σε σκόνη και για αυτό δεν ήταν εύκολος ο χειρισμός του από το χειρουργό κατά τη διαδικασία της εμφύτευσης, ώστε να διατηρήσει την πορώδη μικροδομή του.

Μετά το πέρας 30 ημερών, ο επίμυος θανατώθηκε, ώστε να γίνει η παρατήρηση της συμπεριφοράς των δύο ικριωμάτων, του HA από κέλυφος σουπιάς και του αλγινικού-χιτοζάνης, στη συγκεκριμένη ανατομική θέση όπου αυτά εμφυτεύθηκαν. Όπως φαίνεται στην Εικόνα 9.5α, το ικρίωμα του HA (από το κέλυφος σουπιάς) παρέμεινε στη θέση που εμφυτεύτηκε, ακόμα και στη μορφή της σκόνης που δημιουργήθηκε κατά την εμφύτευση, όπως αναφέρθηκε παραπάνω. Το ικρίωμα αλγινικού-χιτοζάνης (Εικόνα 9.5β) μετά την εμφύτευση βρέθηκε στη ράχη του επίμυος, λόγω του γεγονότος ότι αυτό πριν εμφυτευτεί στη συγκεκριμένη ανατομική θέση θα έπρεπε να συγκρατηθεί με κάποιο τρόπο (π.χ. με ράμμα). Η μορφή του ήταν ακριβώς όπως στην περίπτωση της υποδόριας εμφύτευσης.



Εικόνα 9.4 Τοποθέτηση ικρίωμάτων ανάμεσα στις εγκάρσιες και ακανθώδεις αποφύσεις της σπονδυλικής στήλης επίμυ. α) Ικρίωμα HA από υδροθερμικά μετασχηματισμένο και πυροσυσσωματωμένο κέλυφος σουπιάς (αριστερή πλευρά της σπονδυλικής στήλης του ζώου) και β) ικρίωμα αλγινικού-χιτοζάνης (δεξιά πλευρά της σπονδυλικής στήλης του ζώου).



Εικόνα 9.5 Συλλογή εμφυτευμάτων μετά από εμφύτευση 30 ημερών στη σπονδυλική στήλη. α) Ικρίωμα HA από υδροθερμικά μετασχηματισμένο και πυροσυσσωματωμένο κέλυφος σουπιάς και β) ικρίωμα αλγινικού-χιτοζάνης.

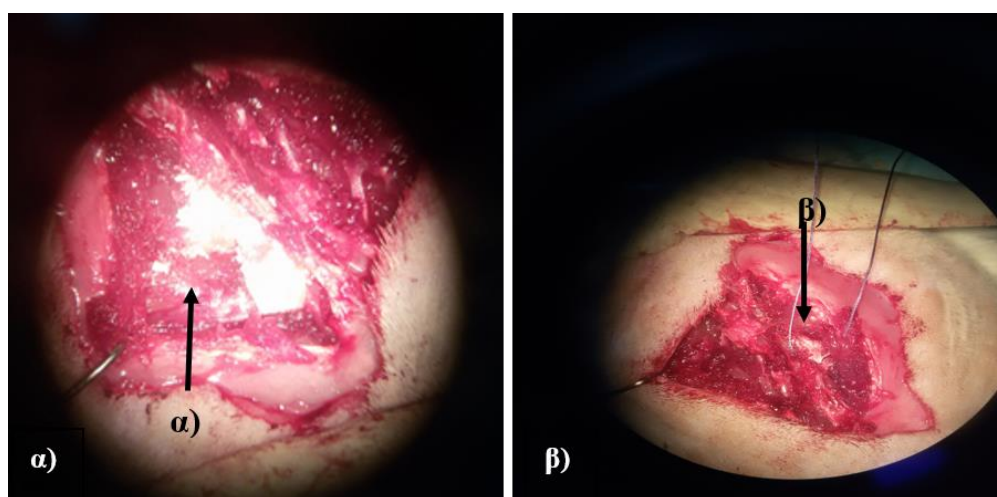
Εμφύτευση ικρίωματος HA από υδροθερμικά μετασχηματισμένο και πυροσυσσωματωμένο κέλυφος σουπιάς ενισχυμένο με υδροπήκτωμα αλγινικού και χιτοζάνης στη σπονδυλική στήλη

Από την προηγούμενη εμφύτευση στη σπονδυλική στήλη, διαπιστώσαμε ότι το ικρίωμα του HA από το κέλυφος της σουπιάς θρυμματιζόταν όταν προσπαθήσαμε να το τοποθετήσουμε στη συγκεκριμένη ανατομική θέση. Για το λόγο αυτό οι εμφυτεύσεις σε αυτόν τον κύκλο των πειραμάτων έγιναν με τα ενισχυμένα ικρίωματα του HA, όπου με τη

μέθοδο της διείσδυσης (infiltration) οι πόροι του πληρώθηκαν με υδροπήκτωμα αλγινικού ή χιτοζάνης.

Στον επίμυ Α, στην αριστερή πλευρά της σπονδυλικής στήλης τοποθετήθηκε το ικρίωμα HA από το κέλυφος σουπιάς που ήταν ενισχυμένο με υδροπήκτωμα αλγινικού (Εικόνα 9.6α). Στη δεξιά πλευρά τοποθετήθηκε το ικρίωμα αλγινικού-χιτοζάνης. Επειδή στο προηγούμενο πείραμα με το ικρίωμα αλγινικού-χιτοζάνης αντιμετωπίσαμε το πρόβλημα της μη σταθεροποίησής του στη θέση εμφύτευσης, με αποτέλεσμα να γίνει μετακίνησή του σε άλλο σημείο, στο πείραμα αυτό συγκρατήσαμε το ικρίωμα αυτό με κατάλληλο βιοαπορροφήσιμο χειρουργικό ράμμα, όπως φαίνεται στην Εικόνα 9.6β.

Στο δεύτερο επίμυ, Β στην αριστερή πλευρά της σπονδυλικής στήλης τοποθετήθηκε το ικρίωμα HA από το κέλυφος σουπιάς που ήταν ενισχυμένο με υδροπήκτωμα χιτοζάνης.



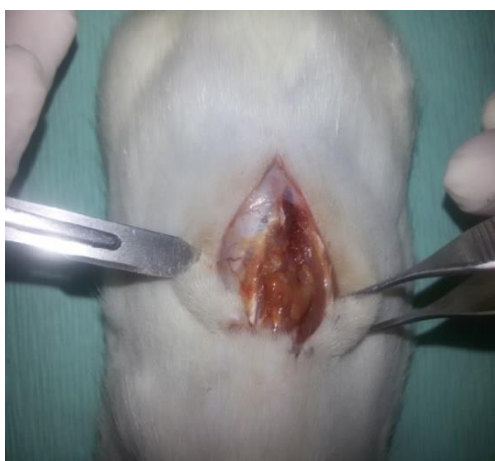
Εικόνα 9.6 Εμφύτευση ικριωμάτων α) Εμφύτευση ικριώματος HA (από υδροθερμικά μετασχηματισμένο και πυροσυσσωματωμένο κέλυφος σουπιάς) ενισχυμένο με υδροπήκτωμα αλγινικού (με infiltration) και β) εμφύτευση ικριώματος αλγινικού-χιτοζάνης και σταθεροποίηση αυτού με βιοαπορροφήσιμο ράμμα.

Μετά από ένα μήνα, οι δύο επίμυες θανατώθηκαν. Τα ευρήματα έχουν ως εξής.

Στον επίμυ Α το ικρίωμα του HA από το κέλυφος της σουπιάς που περιείχε ως φάση ενίσχυσης το υδροπήκτωμα του αλγινικού απορροφήθηκε πλήρως (Εικόνα 9.7). Αυτό το αποτέλεσμα, με δεδομένο το ότι το ικρίωμα του HA χωρίς ενίσχυση στον προηγούμενο κύκλο πειραμάτων ακόμη και σε μορφή σκόνης δεν διαλύθηκε, δείχνει ότι το αλγινικό

υδροπήκτωμα, το οποίο είδαμε στα *in vitro* πειράματα ότι διαλύεται ταχύτατα στο πλάσμα του αίματος, ευνόησε τη διάλυση και του ικρίωματος του HA.

Στον ίδιο επίμυ Α, το ικρίωμα του υδροπηκτώματος αλγινικού-χιτοζάνης βρέθηκε στην ανατομική θέση που τοποθετήθηκε, άρα ήταν ευεργετική η σταθεροποίησή του με το ράμμα, όμως η εμφάνισή του ήταν όπως ακριβώς παρατηρήθηκε και στις προηγούμενες εμφυτεύσεις (Εικόνα 9.7).



Εικόνα 9.7 Συλλογή εμφυτεύματος από υδροπήκτωμα αλγινικού-χιτοζάνης μετά από ένα μήνα εμφύτευσης (μικρή εικόνα). Στην ίδια τομή δεν βρέθηκε, από την άλλη πλευρά της σπονδυλικής στήλης, το ικρίωμα του HA ενισχυμένο με αλγινικό υδροπήκτωμα, λόγω απορρόφησης.

Στον επίμυ Β, το ικρίωμα του HA από το κέλυφος της σουπιάς που περιείχε ως φάση ενίσχυσης το υδροπήκτωμα της χιτοζάνης βρέθηκε στην ανατομική θέση που τοποθετήθηκε. Αυτό το αποτέλεσμα δείχνει ότι η χιτοζάνη ενισχύει την αντίσταση απορρόφησης (διάλυσης) του ικρίωματος του HA και υποδηλώνει τη διαφορά με το αλγινικό υδροπήκτωμα όταν αυτά βρεθούν στο περιβάλλον των βιολογικών υγρών του σώματος.

Μετά την απομάκρυνση του εμφυτεύματος έγινε προσεκτική μελέτη και παρατήρηση της γειτονίας της θέσης που τοποθετήθηκε το εμφύτευμα με σκοπό να διαπιστωθούν πιθανές ενδείξεις δημιουργίας νέου οστού. Τόσο η παρατήρηση του εμφυτεύματος που συλλέχθηκε όσο και η παραπάνω εξέταση στη σπονδυλική στήλη δεν έδωσαν ενδείξεις ότι το εμφύτευμα αυτό είχε προάγει τη δημιουργία νέου οστού. Στην παρούσα εμφύτευση δεν χρησιμοποιήθηκε συσκευή ακινητοποίησης (fixation device) της θέσης που τοποθετήθηκε το ικρίωμα. Αυτός μπορεί να είναι ένας άλλος πιθανός λόγος του μη σχηματισμού νέου οστού.

Σίγουρα αυτά τα αποτελέσματα αναδεικνύουν ως εξαιρετικά ενδιαφέρουσα την εμφύτευση ικριωμάτων HA από υδροθερμικά μετασχηματισμένο κέλυφος σουπιάς

ενισχυμένων με υδροπήκτωμα αλγινικού-χιτοζάνης, όπου το αλγινικό θα πυροδοτεί την βιοαπορρόφηση και η χιτοζάνη τη σταθερότητα του ικριώματος σε όλη τη διάρκεια της οστεοσύνθεσης. Σίγουρα η βελτιστοποίηση της μεθόδου και περισσότερη διερεύνηση απαιτείται προκειμένου να γίνει επιτυχής αυτή η εφαρμογή.

Συστήματα μεταφοράς φαρμάκων

Κεφάλαιο

10

10ΣΥΣΤΗΜΑΤΑ ΜΕΤΑΦΟΡΑΣ ΦΑΡΜΑΚΩΝ

Το σύστημα μεταφοράς φαρμάκου είναι μια μέθοδος χορήγησης μιας φαρμακευτικής ένωσης για την επίτευξη στοχευμένου θεραπευτικού αποτελέσματος σε ανθρώπους ή ζώα (Tiwari et al., 2012). Πρόκειται για τεχνολογία της μηχανικής επιστήμης, για στοχευμένη μεταφορά και ελεγχόμενη τοπική απελευθέρωση του θεραπευτικού φορέα (Costa, 2015, Monteiro et al., 2015). Η εξατομικευμένη ιατρική προσέγγιση είναι ο σκοπός της ανάπτυξης ενός ακριβούς συστήματος μεταφοράς φαρμάκου, με περισσότερα βιολογικά στοιχεία, σε σχέση με τα χαρακτηριστικά που βασίζονται στην επιστήμη των υλικών (Skalko-Basnet, 2014).

Μία ακόμη πρόκληση είναι η ανάπτυξη συστήματος μεταφοράς νανοσωματιδίων σε στοχευμένη θεραπεία όγκων, αλλά και σε διαγνωστικές εφαρμογές (Chen et al., 2017). Τα ικρίωματα μπορούν να χρησιμοποιηθούν για να μεταφέρουν αυξητικούς παράγοντες στις περιοχές που χρήζουν επιδιόρθωσης, διευκολύνοντας έτσι τη διαδικασία αναδόμησης και αναγέννησης του ιστού (Kanczler et al. 2007).

Μία πολύ δυσμενής κατάσταση είναι αυτή στην οποία υποβάλλονται οι ασθενείς με χρόνια οστεομυελίτιδα, που αποτελεί ένα νόσημα που θεραπεύεται φαρμακευτικά και χειρουργικά (Hannan et al., 2009). Η παρατεταμένη χορήγηση αντιβιοτικών για μεγάλο χρονικό διάστημα συναντάται συχνά (Jain et al, 2000) με πολύ σοβαρές παρενέργειες και για αυτό δεν ενδείκνυται. Η τοπικά στοχευμένη αντιβιοτική θεραπεία έχει αναπτυχθεί για την ελαχιστοποίηση αυτών των προβλημάτων. Υπάρχουν πολλά βιοϋλικά, που θα μπορούσαν να λειτουργήσουν ως μεταφορείς των αντιβιοτικών, σε συστήματα μεταφοράς και ελεγχόμενης απελευθέρωσης φαρμακευτικών φορέων. Πολλά από αυτά τα υλικά δεν είναι βιοαποικοδομήσιμα, όπως το πολυμεθακρυλικό μεθύλιο (polymethylmethacrylate (PMMA)). Άλλα γνωστά βιοαποικοδομήσιμα υλικά είναι ο HA, η κοινή γύψος ή γύψος των Παρισίων, η χιτοζάνη και εξετάζονται με σκοπό να αντικαταστήσουν το PMMA.

Υπάρχουν πολλές μελέτες που εστιάζουν στη ανάπτυξη συστημάτων μεταφοράς φαρμακευτικών φορέων, που επιτρέπουν έκλυση, επαρκώς παρατεταμένη. Μία ενδιαφέρουσα προσπάθεια περιλαμβάνει την ανάπτυξη βιοαποικοδομήσιμου σύνθετου υλικού με HA, γύψο και χιτοζάνη. Το σύνθετο αυτό υλικό σταδιακά απελευθερώνει το αντιμικροβιακό φάρμακο και αναστέλλει την ανάπτυξη των μικροοργανισμών για περισσότερο από ένα μήνα. Επίσης, η χαμηλότερη θερμοκρασία ρύθμισης στους 30 ° C

επιτρέπει τον εμποτισμό με θερμοσταθερά αντιβιοτικά (Buranapanitkit et al., 2000, Krisanapiboon et al., 2006). Το σύνθετο υλικό εμβαπτίζεται σε αντιβιοτικά και μετά δοκιμάζεται σε οστεοβλάστες για έλεγχο κυτταροτοξικότητας και βιοσυμβατότητας, με τη μέθοδο MTT.

Μεγάλη ποικιλία από χορηγούμενα φάρμακα, όπως και ειδικές ομάδες άλλων λειτουργικών φορέων χρησιμοποιούνται συχνά για τη σύνδεση των αντιβιοτικών με τα ικρίωματα ή τα σύμπλοκα ανθρακικού ασβεστίου. Έτσι, ανοίγεται το πεδίο για αναρίθμητες τεχνολογικές εφαρμογές, με σκοπό την ανάπτυξη συνδέσεων HA-φαρμάκων, με σκοπό τη στοχευμένη και ελεγχόμενη μεταφορά και απελευθέρωση φαρμάκων στην περιοχή – στόχος, που μεγιστοποιεί το θεραπευτικό αποτέλεσμα, ελαχιστοποιώντας τις παρενέργειες. (Loca et al., 2015).

Πόροι μικρής διαμέτρου, με διασυνδέσεις μεταξύ τους, παρέχουν τις κατάλληλες εκείνες συνθήκες, που απαιτούνται για την ανάπτυξη αποτελεσματικού συστήματος μεταφοράς φαρμάκων. Αυτοί οι πόροι μπορούν να μεταφέρουν φαρμακευτικές ουσίες και να επιτρέψουν την αργή απελευθέρωσή τους. Το μέγεθος, το πλήθος και η διασύνδεση μεταξύ τους είναι οι κύριοι παράγοντες απελευθέρωσης (Loca et al., 2011a, Zalite et al., 2010). Το χαμηλότερο πορώδες ενός ικριώματος από βιοκεραμικά δίνει μία μεγαλύτερη αρχική απελευθέρωση φαρμάκου (Palazzo et al., 2005).

Πολλές έρευνες έχουν αποδείξει ότι το μέγεθος του πορώδους πρέπει να είναι σε αντιστοιχία τάξης μεγέθους με τους φαρμακευτικούς φορείς ή άλλα βιοδραστικά μόρια, με σκοπό την προετοιμασία ενός συστήματος αργής απελευθέρωσης φαρμάκων (Maniya et al., 2013). Πραγματικά, έχει φανεί ότι πόροι με καλή διασύνδεση μεταξύ τους και με μέση διάμετρο περισσότερο από 100 nm είναι σημαντικά χαρακτηριστικά για την ανάπτυξη του οστικού ιστού και τον πολλαπλασιασμό των κυττάρων, που είναι κρίσιμες παράμετροι για οστική αναδόμηση.

Μπορεί να προκύψει ως συμπέρασμα, ότι ικρίωματα από κεραμικά/πολυμερή μπορούν να αναπτυχθούν με σκοπό τη χρήση τους σε συστήματα μεταφοράς και ελεγχόμενης απελευθέρωσης φαρμάκων, μέσω τριών στρατηγικών μεθόδων. Η πρώτη μέθοδος προτείνει τη μέθοδο ενσωμάτωσης του φαρμάκου μέσα στο ικρίωμα HA, πριν την επίστρωση / ενθυλάκωση με πολυμερές. Η δεύτερη στρατηγική μέθοδος προτείνει την ενσωμάτωση του φαρμάκου μεταξύ της πολυμερικής επίστρωσης και του ικριώματος HA.

Η Τρίτη μέθοδος υποστηρίζει την ενσωμάτωση του φαρμακευτικού φορέα στο ικρίωμα HA, που ήδη έχει επιστρωθεί με το επιλεγμένο πολυμερές (Loca et al., 2015).

Ο συνδυασμός των μεθόδων και των τεχνολογιών παρασκευής των κεραμικών αξιοποιείται για την ανάπτυξη σύνθετων τρισδιάστατων δομών HA, με πορώδη δομή που εμφανίζει ιεραρχική λογική ως προς το μέγεθος των πόρων. Η ανάπτυξη τεχνολογίας παρασκευής επιτρέπει να δημιουργηθούν τεχνητές βιοκεραμικές δομές που προσομοιώνουν τη δομή του φυσικού οστού. Σύνθετες τρισδιάστατες πορώδεις δομές HA πιθανά να μπορούν να λειτουργήσουν ως φορείς όχι μόνο μία φαρμακευτικής ουσίας, αλλά να λειτουργήσουν σαν μήτρες για ταυτόχρονη μεταφορά περισσότερων φαρμάκων (Loca et al., 2015).

*Συζήτηση, συμπεράσματα &
προτάσεις για μελλοντική έρευνα*

Κεφάλαιο

11

11ΣΥΖΗΤΗΣΗ, ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ & ΠΡΟΤΑΣΕΙΣ ΓΙΑ ΜΕΛΛΟΝΤΙΚΗ ΕΡΕΥΝΑ

Κατά την τελευταία, κυρίως, δεκαετία, έχουν καταγραφεί, πολύ σημαντικά επιτεύγματα στην ιστική μηχανική και την αναγεννητική ιατρική (Ikada, 2006). Παρ' όλα αυτά, υπάρχουν ακόμη πολλά που μπορούν να προταθούν, να ερευνηθούν αλλά και ενσωματωθούν στις βασικές στρατηγικές μεθόδους που ήδη εφαρμόζονται στο πεδίο αυτό. Τέτοια νέα βήματα μπορούν να βασιστούν εν πολλοίς στη χρήση κυττάρων, στον εξατομικευμένο σχεδιασμό, στη ρύθμιση της ανοσολογικής απόκρισης και στην αγγειογένεση. Η μοντελοποίηση, σε κάθε περίπτωση, μπορεί, επίσης, να αποτελέσει ένα εξαιρετικά υποστηρικτικό εργαλείο στα παραπάνω (Howard et al., 2008).

Στην παρούσα εργασία, έγινε προσπάθεια εκτενούς ανασκόπησης, βιβλιογραφικής και με πειράματα που διεξήχθησαν στο Εργαστήριό μας, στο διεπιστημονικό πεδίο που σχετίζεται με την ανάπτυξη βιοϋλικών που μπορούν να χρησιμοποιηθούν με αξιοπιστία στην ορθοπεδική και τη γναθοπροσωπική χειρουργική. Η σημερινή κατάσταση στην κλινική πρακτική και εμπειρία δείχνει ότι είναι σημαντική η ανάγκη για την κάλυψη οστικών ελλειμμάτων και για οστική ανακατασκευή. Αυτά μπορούν να είναι εφικτοί στόχοι με εφαρμογή των μεθόδων της ιστικής μηχανικής και της τεχνολογίας των συστημάτων μεταφοράς και απελευθέρωσης φαρμάκων. Απαραίτητη προϋπόθεση είναι η κατασκευή ικρίωματος, που θα δώσει στην κατεστραμμένη-απολεσθείσα ή ημικατεστραμμένη περιοχή του οστού τα κατάλληλα φάρμακα, ή τα απαιτούμενα κύτταρα, που μπορούν να επιτελέσουν το έργο της αναδόμησης του κατεστραμμένου ή απολεσθέντος οστικού ιστού. Το οστό είναι ουσιαστικά ένα σύνθετο υλικό από ΗΑ και άλλα συστατικά, και κυρίως κολλαγόνο, ως οργανική-πολυμερική φάση. Επομένως, το ενδιαφέρον στρέφεται σε υλικά που παρουσιάζουν κεραμική υφή, αλλά διαθέτουν και ικανή ελαστικότητα. Τα υλικά από ΗΑ χρησιμοποιούνται ευρέως στην αναδόμηση σκληρού ή μαλακού ιστού, στην ιστική μηχανική, στη μεταφορά φαρμάκων/γονιδίων/πρωτεϊνών, στη χρωματογραφία, σε απεικονιστικές μεθόδους και στη διάγνωση. Σκιαγραφώντας το ιδανικό ικρίωμα για πλήρωση οστικών ελλειμμάτων, θα αναζητούσαμε πορώδες (κεραμικό) υλικό, ενισχυμένο με πολυμερικό υλικό, βιοσυμβατό, βιοενεργό ή/και βιοαποαρροφήσιμο. Στόχος είναι η ανάπτυξη ενός ρεαλιστικού, να κατασκευαστεί, βιοϋλικού, το οποίο να μπορεί να αξιοποιηθεί στην κλινική πρακτική. Είναι επομένως ανοιχτό το πεδίο διερεύνησης των

δυνατοτήτων πολλών υλικών που θα μπορούσαν να συγκεντρώνουν ενδιαφέροντα χαρακτηριστικά (Lin et al., 2015).

Η ανάπτυξη πορωδών ικριωμάτων για χρήση ως οστικά υποκατάστατα είναι εξαιρετικά ενδιαφέρουσα ερευνητικά στον τομέα των βιοϋλικών. Πολλές επιστημονικές ομάδες εστιάζουν το ενδιαφέρον τους στην ανάπτυξη καινοτόμων ικριωμάτων από HA. Αυτή η επιλογή δεν είναι τυχαία, αφού έχει αποδειχθεί ότι προσεγγίζει σε πολλά επίπεδα τη δομή του φυσικού οστού. Τα τεχνητά βιοκεραμικά από HA εμφανίζουν, όμως δυσκολία στο να απορροφηθούν από το φυσιολογικό περιβάλλον του οργανισμού. Δηλαδή, ο ρυθμός αποικοδόμησής τους είναι πολύ αργός (Zhang et al., 2014). Αυτό εμποδίζει τη χρήση τους σε μοσχεύματα οστών, σε ικρίωματα, σε μεταφορείς φαρμάκων και σε άλλες ακόμη εφαρμογές. Όμως, με τη προσθήκη μίας δεύτερης φάσης, π.χ. φωσφορικό τριασβέστιο (β-TCP), ανθρακικό ασβέστιο, κ.ά., γίνεται εφικτή η ρύθμιση του ρυθμού αποικοδόμησης των διφασικών, πλέον, ικριωμάτων από HA (Zhang et al., 2014). Ο ρυθμός βιοαποικοδόμησης αυξάνεται με την αύξηση της ποσότητας προσθέτων που προσδίδουν μηχανική ενίσχυση στο τελικό υλικό (Queiroz et al., 2003, Lin et al., 2011, Wang et al., 2013). Γενικά, πάντως, τα παραδοσιακά βιοκεραμικά στερούνται ικανότητας οστεοεπαγωγής, βιοδραστικότητας και δεν είναι εύκολο να επάγουν διαφοροποίηση στα βλαστικά κύτταρα και τους οστεοβλάστες, για πρόκληση οστικής αναδόμησης (Zhang et al., 2014).

Από την άλλη μεριά, οι προσπάθειες παρασκευής των προαναφερθέντων ικριωμάτων με υδροθερμική μετατροπή αραγονίτη που λαμβάνεται από θαλάσσια είδη, όπως κοράλλια, κελύφη, οστά σουπιάς, έχουν πολύ μεγάλο ενδιαφέρον. Η συγκεκριμένη αυτή μέθοδος, που επιλέχθηκε να μελετηθεί εκτενώς στην παρούσα εργασία, θα μπορούσε να ειπωθεί ότι μοιάζει, εν πολλοίς, με την ίδια τη διαδικασία κατασκευής του οστού, ενώ το τελικό ικρίωμα επίσης εμφανίζει παρόμοια δομή με αυτή του οστού. Επιπλέον, αυτή την επιλογή καθίσταται ακόμη πιο ενδιαφέρουσα, αν συνυπολογίζουμε, τη μεγάλη διαθεσιμότητα των θαλάσσιων οργανισμών, όπως η σουπιά *Sepia Officinalis* σε παγκόσμια κλίμακα και το χαμηλό κόστος.

Η προσέγγιση αυτή, επίσης λαμβάνει υπόψη τη νανο-κλίμακα και τα νανο-χαρακτηριστικά του HA που παράγεται. Αυτή η bottom-up προσέγγιση είναι πολύ σημαντική, όταν πρόκειται για βιοϋλικά. Ο HA που παράγεται συνθετικά έχει κρυσταλλίτες αρκετών εκατοντάδων νανομέτρων και έτσι απέχει πολύ από τους βιολογικούς απατίτες

που συναντώνται στα οστά, οι οποίοι συμπλεκόμενοι με το κολλαγόνο, δίνουν ουσιαστικά το νανοσύνθετο υλικό του φυσιολογικού οστού. Τα ικρίωματα HA που δημιουργούνται από οστό σουπιάς εμφανίζουν κρυσταλλίτες με μέγεθος ~ 30 nm, όπως περίπου συναντάται στους βιολογικούς απατίτες.

Ένα άλλο σημαντικό πεδίο της ιστομηχανικής – αναγεννητικής ιατρικής – βιοϋλικών είναι η ανάπτυξη υδροπηκτωμάτων, για βιοϊατρική χρήση. Το αλγινικό οξύ και η χιτοζάνη είναι πολυσακχαρίτες φυσικής προέλευσης που συχνά επιλέγονται για σύνθεση βιοδιασπώμενων υδροπηκτωμάτων. Το αλγινικό οξύ επιλέγεται, αφού σχηματίζει αυθόρμητα υδροπήκτωμα υψηλής ποιότητας με ιόντα ασβεστίου (Ca^{2+}), που υπάρχουν σε αφθονία, ως κύριο συστατικό, τόσο στο αίμα και εν γένει στα βιολογικά υγρά, όσο και στον υδροξυαπατίτη, που είναι το βασικό ανόργανο συστατικό των οστών. Το υδροπήκτωμα του αλγινικού οξέος, παρά το γεγονός ότι σχηματίζεται με εύκολα ελεγχόμενο τρόπο και το λυοφιλοποιημένο υδροπήκτωμα έχει ιδανικό πορώδες, καταρρέει σχετικά εύκολα σε υδατικά διαλύματα, νερό και φυσιολογικό ορό. Απαιτείται, έτσι, η ενίσχυση του υδροπηκτώματος του αλγινικού οξέος με ζελατίνη και στη συνέχεια με χιτοζάνη, η οποία επιβραδύνει το ρυθμό διάλυσης. Πρακτικά, δεν είναι απλή αυτή η ανάμιξη, αφού το υδροπήκτωμα καθεμίας από τις ουσίες που αναφέρθηκαν, παρασκευάζεται σε άλλες συνθήκες pH. Έτσι, απαιτείται πολύ προσεκτική μελέτη των βιβλιογραφικών δεδομένων για την επιλογή της μεθόδου που θα επιτρέψει αυτήν την ανάμιξη.

Στην εργασία αυτή μελετήθηκαν δύο προσεγγίσεις σύνθετων βιοϋλικών HA φυσικής προέλευσης. Η μία αφορούσε σύνθεση HA μέσα στη μήτρα των υδροπηκτωμάτων με βιομιμητικό τρόπο. Ο HA που αναμένεται να σχηματιστεί στο υδροπήκτωμα με τον τρόπο αυτό πρέπει να έχει χαρακτηριστικά βιολογικού νανο-απατίτη. Τα αποτελέσματα των πειραμάτων έδειξαν ότι αυτό δεν είναι καθόλου δεδομένο. Στην πραγματικότητα, τα αποτελέσματα αυτά, σε συνδυασμό με τη βιβλιογραφία, δείχνουν ότι η καταβύθιση του HA στο οστό είναι αποτέλεσμα επίδρασης και άλλων πολλών βιολογικών παραγόντων (π.χ. πρωτεϊνών) που επηρεάζουν το φαινόμενο της καταβύθισης και καθορίζουν την απόκτηση νανο-χαρακτηριστικών από το βιολογικό HA των οστών.

Η επιτυχής δεύτερη προσέγγιση, με τη διείδυση του πολυμερικού αφρού στο ικρίωμα του πορώδους HA, έδειξε ότι είναι δυνατό, ένα ικρίωμα (του πολυμερικού αφρού του υδροπηκτώματος) να χρησιμοποιηθεί για να ενισχύσει μηχανικά ένα άλλο πορώδες

ικρίωμα (του πορώδους HA, το οποίο εάν προσπαθήσει να το χειριστεί ο χειρουργός π.χ. στη σπονδυλοδεσία, αυτό θρυμματίζεται εύκολα σε σκόνη HA). Με αυτόν τον τρόπο, το τελικό πορώδες και σύνθετο βιοϋλικό συγκεντρώνει πολλά πλεονεκτήματα, τόσο ως προς τις δυνατότητες χειρισμού του από το ιατρό στο χειρουργείο, όσο και ως προς τις βιοενεργές του ιδιότητες. Το πορώδες υδροπήκτωμα μέσα στους πόρους του ικριώματος του HA επιτρέπει τη διείσδυση των βιολογικών υγρών στους πόρους του ικριώματος, οι οποίοι διευρύνονται όσο το βιοπολυμερές υδροπήκτωμα διαλύεται.

Η εξέλιξη και η βελτίωση των παραπάνω σύνθετων ικριωμάτων του HA οφείλεται κυρίως στα αποτελέσματα των πειραμάτων ελέγχου του ικριώματος αυτού, ως προς την αντίσταση στη διάλυση/κατάρρευση, σε πλάσμα αίματος. Πρόκειται για ένα δύσκολο χημικό περιβάλλον ιδιαίτερα για τα υδροπηκτώματα. Εξετάζεται, επίσης, η συμπεριφορά των ικριωμάτων αυτών *in vitro* και *in vivo*. Τα αποτελέσματα από τα *in vivo* και τα *in vitro* πειράματα είναι σε συμφωνία. Η παρουσία πρωτεϊνών στα βιολογικά υγρά *in vitro* και *in vivo*, είναι σημαντικός παράγοντας για τη χημική ευστάθεια του ικριώματος. Τα πορώδη αυτά ικριώματα χάνουν εύκολα την πορώδη δομή τους μέσα στο σώμα του πειραματόζωου, αν σκεφτούμε ότι το πολυμερικό υδροπήκτωμα, διαλύεται, ενώ ο σκελετός του HA, κατά την εμφύτευση από τον ιατρό, έχει κατακερματιστεί (και απλώς, ο πολυμερικός αφρός, που έχει πληρώσει τους πόρους του, συγκρατεί τη δομική ακεραιότητα των τοιχωμάτων των πόρων του). Το τελευταίο δείχνει ξεκάθαρα ότι πράγματι απαιτείται η ενίσχυση του πορώδους ικριώματος του HA με κάποιο πολυμερές επάνω στα τοιχώματα των πόρων του HA, διασφαλίζοντας τη δομική του ακεραιότητα για τουλάχιστον για 2-3 εβδομάδες, μέσα στο σώμα του πειραματόζωου, μέχρι να γίνει η οστεογένεση. Η αλλαγή στις αναλογίες των συστατικών, μέχρι να επιτευχθεί το επιθυμητό αποτέλεσμα, είναι και αυτός ένας άλλος τρόπος δυνατής ενίσχυσης.

Με δεδομένο, λοιπόν, ότι φαίνεται ότι αυτά τα ενισχυμένα ικριώματα είναι εύκολο να τα χειριστεί ο χειρουργός πρακτικά με ασφάλεια, δηλαδή δεν καταστρέφονται κατά την εμφύτευση, από το χειρουργό, η ταχύτητα διάλυσης των υδροπηκτωμάτων που έχουν διεισδύσει στους πόρους του ικριώματος του HA είναι ιδιαίτερα σημαντικό χαρακτηριστικό του τελικού σύνθετου ικριώματος του HA από υδροθερμικά μετασχηματισμένο κέλυφος σουπιάς. Ο συνδυασμός αλγινικού-χιτοζάνης είναι μάλλον ικανοποιητικά καλός για την ενίσχυση πορώδους ικριώματος HA, αφού, οι πειραματικές ενδείξεις δείχνουν ότι, το

αλγινικό οξύ αναμένεται να πυροδοτεί τη βιοαπορρόφηση και η χιτοζάνη θα ευνοεί τη σταθερότητα του ικριώματος καθ' όλη τη διάρκεια της οστεοσύνθεσης.

Σε επίπεδο ανάπτυξης συστημάτων μεταφοράς, είναι σημαντικό αλλά και δύσκολο να συνθέσει κάποιος σωματίδια HA με ενιαία μονο-διασπορά μεγέθους πόρων με στενή κατανομή μεγέθους πόρων (Lin et al., 2015). Αυτή, όμως, είναι σημαντική απαίτηση για το σχεδιασμό συστημάτων μεταφοράς φαρμάκων. Η λύση του προβλήματος μπορεί να βρεθεί μέσω χρήσης σύνθετων βιοϋλικών, σαν αυτά των οποίων την κατασκευή παρουσιάσαμε στην παρούσα εργασία. Συγκεκριμένα, η διασπορά της φαρμακευτικής ουσίας μπορεί να γίνει στην πολυμερική μήτρα του υδροπηκτώματος και η αποδέσμευσή της θα εξαρτάται από τον τρόπο πρόσδεσης της ουσίας αυτής με τη μήτρα του υδροπηκτώματος. Επ αυτού, η πολυμερική μήτρα μπορεί να φιλοξενήσει άλλα νανοσωματίδια, π.χ. μεσοπορώδη (όπως MCM, SBA, φυλλόμορφα, κ.α.), μέσα στα οποία να υπάρχει η φαρμακευτική ουσία.

Οι μελλοντικές προοπτικές του ερευνητικού αυτού πεδίου είναι αξιοσημείωτες και αναμένονται ακόμη μεγαλύτερα επιτεύγματα, με σκοπό τόσο τις θεραπευτικές προσεγγίσεις, όσο και την παρηγορητική αγωγή. Θα πρέπει να τονιστεί ότι ο βασικός άξονας που πυροδοτεί σκέψεις, εμπνεύσεις και ιδέες κινείται γύρω από την ανάγκη να μιμηθούμε και να αφοιγκραστούμε τι υπαγορεύει η ίδια η Μητέρα Φύση. Με δεδομένο ότι ο HA είναι ίσως το πιο υποσχόμενο ασφαλές υλικό για οστική αναδόμηση, η διεθνής τάση στα βιοϋλικά και συγκεκριμένα στα βιοκεραμικά, όπως αποτυπώνεται στα πιο πρόσφατα συνέδρια των βιοκεραμικών και σε δημοσιευμένα άρθρα, είναι να κατασκευαστούν βιοκεραμικά που να μιμούνται όσο πιο πιστά γίνεται τη Φύση. Σε αυτήν την προσπάθεια, σημαντικός, πλέον, αρωγός γίνεται η νανο-τεχνολογία (Zhang et al., 2014), αφού τα κεραμικά που κατασκευάζονται με τις συμβατικές μεθόδους δεν μπορούν να ικανοποιήσουν όλες τις απαιτούμενες ιδιότητες ενός βιοϋλικού. Είναι, επίσης, σημαντικό να τονιστεί ότι αυτές οι προσεγγίσεις στη νανο-κλίμακα είναι εν γένει χαμηλού κόστους και υψηλής αποτελεσματικότητας, ως προς τις ιδιότητες του τελικού προϊόντος, και απόδοσης, ως προς τη διαδικασία σύνθεσης (Lin et al., 2015). Έτσι, μπορούν, με τρόπο αποτελεσματικό, να κατασκευαστούν προηγμένα νανο-βιοκεραμικά, ή, πιο σωστά, νανο-σύνθετα βιοϋλικά βιοκεραμικών, με ενισχυμένες (κατάλληλες και απόλυτα ελεγχόμενες, πιο ορθά) μηχανικές ιδιότητες, σε σύγκριση με βιοϋλικά με δομή μικρο-κλίμακας (Baino et al., 2015). Στόχος είναι να μπορούν τα βιοϋλικά αυτά να μπορούν να διατηρούν με

αξιοπιστία την εύρυθμη λειτουργία του οργανισμού, χωρίς να την επηρεάζουν αρνητικά. Επίσης, σε πιο δύσκολες περιπτώσεις, όπως σε περιπτώσεις σοβαρής έκπτωσης λειτουργιών και δομών, με την επιλογή των κατάλληλων υλικών, η χρήση της νανο-τεχνολογίας στην κατασκευή των βιοϋλικών, παρέχει σοβαρές υποσχέσεις ότι θα μπορεί να πυροδοτείται, μέσω της νανοδομής του υλικού, και η τελευταία ικανότητα που διαθέτει ο οργανισμός για αυτο-ίαση, ακόμη και αν αυτή δεν είναι άμεσα φανερά φανερή. Τα παραπάνω δείχνουν ξεκάθαρα ότι το πεδίο της έρευνας για ανάπτυξη νέων υλικών, με σκοπό την οστική αναδόμηση και την αναγεννητική ιατρική, παραμένει ανοιχτό και γεμάτο προκλήσεις.

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

ΕΛΛΗΝΙΚΗ

Αγαθόπουλος Σ., Οστά και δόντια, Σημειώσεις Πανεπιστήμιο Ιωαννίνων.

Δημογέροντας Γ., Νευροχειρουργός-Χειρουργός Σπονδυλικής Στήλης,
<http://www.neuroxeirurgos.gr>

Δρούγκας Γ. (2017). Σύνθεση και χαρακτηρισμός σύνθετων υλικών πολυμερικής μήτρας και με ενίσχυση υδροξυαπατίτη για εφαρμογές στην ορθοπεδική, *Μεταπτυχιακή Εργασία*, Τμήμα Μηχανικών Επιστήμης Υλικών, Πολυτεχνική Σχολή, Πανεπιστήμιο Ιωαννίνων.

Έξαρχος Ο. (2007), Ανάπτυξη μεθοδολογίας επεξεργασίας εικόνων pQ-CT για την κατασκευή 3-D μοντέλων πεπερασμένων στοιχείων μακρών οστών, *Διπλωματική εργασία*, Σχολή Μηχανολόγων Μηχανικών, Εθνικό Μετσόβιο Πολυτεχνείο.

Καρακασίδης Μ., Σημειώσεις μαθήματος Κεραμικά υλικά, Πανεπιστήμιο Ιωαννίνων.

Καραμπάς Ι.Α. (2011). Ανάπτυξη αναλυτικής μεθοδολογίας για την εκτίμηση της ποιότητας των οστών, *Διδακτορική διατριβή*, Τμήμα Φαρμακευτικής, Πανεπιστήμιο Πατρών (2011).

Κατσικογιάννη Μ.Γ. (2008). Διερεύνηση διεπιφανειακών φαινομένων μεταξύ βακτηρίων και βιοϋλικών, *Διδακτορική διατριβή*, Τμήμα μηχανολόγων και αεροναυπηγών μηχανικών, Πανεπιστήμιο Πατρών.

Κοντούλη Χ. (2007). Γενετική προδιάθεση στην ανδρική οστεοπόρωση, *Διπλωματική εργασία*, Χαροκόπειο Πανεπιστήμιο.

Λαγοπάτη Ν. (2013). Φωτοκαταλυτική Αντικαρκινική δράση διοξειδίου του Τιτάνιου (TiO₂): Μηχανισμοί και Εφαρμογές, *Διδακτορική διατριβή*, Τμήμα Βιολογίας, Εθνικό και Καποδιστριακό Πανεπιστήμιο Αθηνών.

Μπρασινίκα Δ. (2015). Βιομιμητική ανάπτυξη σύνθετων βιοκεραμικών νανο υδροξυαπατίτη-βιοπολυμερών με ελεγχόμενες ιδιότητες για βιολογικές εφαρμογές, *Διδακτορική διατριβή*, Σχολή μηχανικών μεταλλείων- μεταλλουργών, Εθνικό Μετσόβιο Πολυτεχνείο.

Νομικός Π., Νευροχειρουργός, <http://www.nomikosp.gr>

Τζόκα Μ. (2016). Σύνθεση και χαρακτηρισμός πορωδών σύνθετων βιοϋλικών με πολυμερική μήτρα και ενίσχυση με βιοκεραμικές νανο-κόνεις, *Μεταπτυχιακή Εργασία*, Τμήμα Μηχανικών Επιστήμης Υλικών, Πολυτεχνική Σχολή, Πανεπιστήμιο Ιωαννίνων.

Τόρη Ι. (2016). Σύνθεση με υδροθερμικό μετασχηματισμό και χαρακτηρισμός βιοκεραμικών φωσφορικού ασβεστίου, *Μεταπτυχιακή Εργασία*, Τμήμα Μηχανικών Επιστήμης Υλικών, Πολυτεχνική Σχολή, Πανεπιστήμιο Ιωαννίνων.

Χαντζηχρήστου Ε. Γ. (2012). Ανάπτυξη υάλων και υαλοκεραμικών βιοϋλικών με βάση τη μίκα και το γουολαστονίτη, *Διπλωματική εργασία*, Τμήμα Μηχανικών Επιστήμης Υλικών, Πολυτεχνική Σχολή, Πανεπιστήμιο Ιωαννίνων (2012).

Χατζηνικολαΐδου Μ. (2015). Σημειώσεις, Development of biomaterials for bone tissue repair.

Χριστόπουλος Χ., Νευροχειρουργός, <https://dr-christopoulos.de/el>

ΞΕΝΟΓΛΩΣΣΗ

Alberts B. et al. (2015). Essential Cell Biology, Paschalidis Editions.

Amaral M. et al. (2002). Si3N4-bioglass composites stimulate the MG63 osteoblast-like cells *Biomaterials* (Vol. 23, pp. 4897– 4906).

American college of physicians (1999). Medicine in 21th century, Domiki Editions.

Amini A. R., Laurencin C. T. & Nukavarapu S. P. (2012). Bone Tissue Engineering: Recent Advances and Challenges, *Critical Reviews in Biomedical Engineering* (Vol. 40 (5), pp. 363– 408).

Augst A. D., Kong H. J. & Mooney D. J. (2006). Alginate Hydrogels as Biomaterials *Macromolecular Bioscience* (Vol. 6 (8), pp. 623–633).

Bai F., et al. (2011). The effect of pore size on tissue ingrowth and neovascularization in porous bioceramics of controlled architecture in vivo *Biomedical Materials* (Vol.6, pp. 015007-015017).

- Baino F., Novajra G. & Vitale-Brovarone C. (2015). Bioceramics and Scaffolds: A Winning Combination for Tissue Engineering *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology* (Vol. 3, p. 202).
- Barnard W. & de Wal D. (2006). Raman investigation of pigmentary molecules in the molluscan biogenic matrix *Journal of Raman Spectroscopy* (Vol. 37, pp. 342-352).
- Barradas A.M.C. et al. (2011). Osteoinductive biomaterials: current knowledge of properties, experimental models and biological mechanisms *European cells & materials* (Vol. 21, pp. 407–429).
- Bauer T.W. et al. (1991). Hydroxyapatite-coated femoral stems. Histological analysis of components retrieved at autopsy *The Journal of Bone and Joint Surgery* (Vol. 73, pp. 1439-1452).
- Bayraktar H.H., et al. (2004). Comparison of the elastic and yield properties of human femoral trabecular and cortical bone tissue *Journal of Biomechanics* (Vol. 37, pp. 27-35).
- Ben-Nissan B. (2003). Natural bioceramics: from coral to bone and beyond *Current Opinion in Solid State and Materials Science* (Vol. 7, pp. 283–288).
- Bhattarai N., Gunn J. & Zhang M. (2010). Chitosan-based hydrogels for controlled, localized drug delivery *Advanced Drug Delivery Reviews* (Vol. 62, pp. 83-99).
- Boletzky S. v. (1983). *Sepia officinalis*. Cephalopod Life Cycles, Vol. I, Species Accounts, P. R. Boyle, ed. Academic Press, London, pp. 31-52.
- Bose S., Roy M. & Bandyopadhyay A. (2012). Recent advances in bone tissue engineering scaffolds *Trends in Biotechnology - Cell Press* (Vol. 30, pp. 546-554).
- Bouhadir K.H. & Mooney D.J. (2002). Synthesis of hydrogels: alginate hydrogels. In: Atala A, Lanza RP, editors. *Methods of tissue engineering*. New York: Academic Press, pp. 653–662.
- Brown P.W., Matthew M. & Tung M.S. (1981). Crystal chemistry of octacalcium phosphate, *Progress in Crystal Growth and Characterization of Materials* (Vol. 4, pp. 59-87).
- Buranapanitkit B. et al. (2000). In vitro elution of gentamicin from locally implantable beads *Journal of Musculoskeletal Research* (Vol. 4, pp. 169–176).

Čadež V. et al. (2017). Formation and morphogenesis of a cuttlebone's aragonite biomineral structures for the common cuttlefish (*Sepia officinalis*) on the nanoscale: revisited *Journal of Colloid and Interface Science* (Vol. 508, pp. 95-104).

Cao X. & Chen D. (2005). The BMP signaling and in vivo bone formation *Gene* (Vol. 357, pp. 1-8).

Chai Y.C. et al. (2012). Current views on calcium phosphate osteogenicity and the translation into effective bone regeneration strategies *Acta Biomaterialia* (Vol. 8, pp. 3876–3887).

Chang Y.L. et al. (1999). Biomechanical and morphometric analysis of hydroxyapatite-coated implants with varying crystallinity *Journal of Oral and Maxillofacial Surgery* (Vol. 57, pp. 1096-1108).

Chang S.J. et al. (2012). In vitro properties of gellan gum sponge as the dental filling to maintain alveolar space *Carbohydrate Polymers* (Vol. 88, pp. 684–689).

Checa A. G. et al. (2015). The cuttlefish *Sepia officinalis* (Sepiidae, Cephalopoda) constructs cuttlebone from a liquid-crystal precursor *Scientific Reports* (Vol. 5, p.11513).

Chen B. et al. (2017). Current Multistage Drug Delivery Systems Based on the Tumor Microenvironment *Theranostics* (Vol. 7 (3), pp. 538–558).

Chim H. & Gosain A.K. (2009). Biomaterials in craniofacial surgery: experimental studies and clinical application *Journal of Craniofacial Surgery* (Vol. 20, pp. 29-33).

Chow L.C. (2009). Next generation calcium phosphate-based biomaterials *Dental Materials Journal* (Vol. 28 (1), pp. 1–10).

Clarke B. (2008). Normal bone anatomy and physiology *Clinical Journal of the American Society of Nephrology* (Vol.3, pp. 131-139).

Costa P.F. (2015). Bone tissue engineering drug delivery, Current Formation and morphogenesis of a cuttlebone's aragonite biomineral structures for the common cuttlefish (*Sepia officinalis*) on the nanoscale: revisited *Molecular Biology Reports* (Vol. 1, pp. 87-93).

Cozza N. et al. (2018). Bioactivity and mineralization of natural hydroxyapatite from cuttlefish bone and Bioglass® co-sintered bioceramics *Journal of Tissue Engineering and Regenerative Medicine* (Vol. 12 (2), pp. 1131-1142).

Croisier F. & Jerome C. (2013). Chitosan-based biomaterials for tissue engineering *European Polymer Journal* (Vol. 49, pp. 780-792).

Currey J.D. (2002). *Bones: structure and mechanics*, Princeton University Press.

Daculsi G. (1998). Biphasic calcium phosphate concept applied to artificial bone, implant coating and injectable bone substitute *Biomaterials* (Vol. 19, pp. 1473-1478).

Daculsi G. (2015). *Bioceramics for Bone Regeneration: A Review for Future Development*. Paper presented at the 27th symposium and annual meeting of the international society for ceramics in medicine, Bali Indonesia.

Dash M. et al. (2011). Chitosan – a versatile semi – synthetic polymer in biomedical applications, *Progress in Polymer Science* (Vol. 36, pp. 981-1014).

Dauphin Y. & Marin F. (1995). The compositional analysis of recent cephalopod shell carbohydrates by Fourier-Transform InfraRed spectrometry and high-performance anion-exchange-pulsed amperometric detection *Experientia* (Vol. 51, pp. 278-283).

de Groot R. S., Wilson M. A. & Boumans R. M. J. (2002). A typology for the classification, description and valuation of ecosystem functions, goods and services *Ecological Economics* (Vol.41 (3), pp. 393-408).

Denizot F. & Lang R. (1986). Rapid colorimetric assay for cell growth and survival. Modifications to the tetrazolium dye procedure giving improved sensitivity and reliability *Journal of Immunological Methods* (Vol. 22;89(2), pp. 271-277).

Dettmar P.W. et al. (2006). Rapid onset of effect of sodium alginate on gastro-oesophageal reflux compared with ranitidine and omeprazole, and relationship between symptoms and reflux episodes *International Journal of Clinical Practice* (Vol. 60(3), pp. 275-283).

Dey A. & Mukhopadhyay A. K. (2015) *Microplasma Sprayed Hydroxyapatite Coatings*, CRC Press, Taylor & Francis Group.

Dorozhkin S.V. & Epple M. (2002). Biological and medical significance of calcium phosphates *Angewandte Chemie International Edition* (Vol. 41. pp. 3130–3146).

Ducheyne P. & Qiu Q. (1999). Bioactive ceramics: the effect of surface reactivity on bone formation and bone cell function *Biomaterials* (Vol.20, pp. 2287-2303).

Escobar-Sierra D. M., Martins J. & Ossa Orozco C. P. (2015). Chitosan/hydroxyapatite scaffolds for tissue engineering manufacturing method effect comparison *Revista Facultad de Ingeniería Universidad de Antioquia* (Vol. 75, pp. 24-35).

Epinette J.-A. & Manley M. T. (2004). Fifteen Years of Clinical Experience with Hydroxyapatite Coatings in Joint Arthroplasty, Springer.

Figueiredo M. et al. (2010). Physicochemical characterization of biomaterials commonly used in dentistry as bone substitutes-Comparison with human bone *Journal of Biomedical Materials Research Part B: Applied Biomaterials* (Vol.92, pp. 409-419).

Fratzl P. et al. (2004). Structure and mechanical quality of the collagen–mineral nanocomposite in bone *Journal of Materials Chemistry* (Vol. 14, pp. 2115-2123).

Frémy M.E. (1855). Recherches chimiques sur les os *Annales de chimie et de physique* ME, (Vol. 43, pp. 47-107).

Fujibayashi S. et al. (2004). Osteoinduction of porous bioactive titanium metal *Biomaterials* (Vol.25, pp. 443-450).

Gentile P., et al. (2014). An Overview of Poly (lactic-co-glycolic) Acid (PLGA)-Based Biomaterials for Bone Tissue Engineering *International Journal of Molecular Sciences* (Vol. 15(3), pp. 3640–3659).

Gerhardt L.-C. & Boccaccini A. R. (2010). Bioactive Glass and Glass-Ceramic Scaffolds for Bone Tissue Engineering *Materials (Basel)* (Vol.3 (7), pp. 3867–3910).

Giannoudis P.V., Dinopoulos H. & Tsiridis E. (2005). Bone substitutes: An update, Injury *International Journal of the Care of the Injured* (pp. 20-27).

Gineste L. et al. (1999). Degradation of hydroxylapatite, fluorapatite, and fluorhydroxyapatite coatings of dental implants in dogs *Journal of Biomedical Materials Research Part B Applied Biomaterials* (Vol. 48, pp. 224–234).

Gloria A., De Santis R. & Ambrosio L. (2010). Polymer-based composite scaffolds for tissue engineering *Journal of Applied Biomaterials & Functional Materials* (Vol. 8, pp. 57-67).

Goffinet G. & Jeuniaux C. (1979). Distribution and quantitative importance of chitin in Mollusca shells *Cahiers de Biologie Marine* (Vol. 20, pp. 341-349).

Goller G. et al. (2005). The influence of sintering temperature on mechanical and microstructural properties of bovine hydroxyapatite *Key Engineering Materials* (Vol. 284–286, pp. 325–328).

Grigore M.E. (2018). Drug Delivery Systems in Hard Tissue Engineering *SF Journal of Biotechnology and Biomedical Engineering* (Vol. 1 (1): 1001, pp. 1-6).

Han J. et al. (2010). Alginate-chitosan/hydroxyapatite complex porous scaffolds: Preparation and characterization *International Journal of Biological Macromolecules* (Vol. 46, pp. 199-205).

Hannan C. M. & Attinger C. E. (2009). Special Considerations in the Management of Osteomyelitis Defects (Diabetes, the Ischemic or Dysvascular Bed, and Irradiation) *Seminars in plastic surgery* (Vol. 23 (2), pp. 132-140).

Hayashi K. et al. (1993). Bone-implant interface mechanics of in vivo bio-inert ceramics, *Biomaterials* (Vol.14, pp. 1173-1179).

Hedegaard C., Bardeau J.F. & Chateigner D. (2006). Molluscan shell pigments: an in situ resonance Raman study *Journal of Molluscan Studies* (Vol. 72, pp. 157-162).

Hench L.L. & Ethridge E.C. (1982). *Biomaterials: An Interfacial Approach*, Academic Press, New York.

Hewitt R. & Stait B. (1988). Seasonal variation in septal spacing of *Sepia Officinalis* and some Ordovician actinocerid nautiloids *Lethaia* (Vol. 21, pp. 383-394).

Hewitt Z., et al. (2007). Ablation of undifferentiated human embryonic stem cells, exploiting innate immunity against the Gal alpha1–3Galbeta1–4GlcNAc-R (alpha-Gal) epitope *Stem Cells* (Vol. 25, pp. 10–18).

Hoffman A.S. (2012). Hydrogels for biomedical applications *Advanced Drug Delivery Reviews* (Vol. 64, pp. 18-23).

Höland W. et al. (2009). Future perspectives of biomaterials for dental restoration *Journal of the European Ceramic Society* (Vol. 29, pp. 1291-1297).

Hongmin L. et al. (2015). Osteoinductive nanohydroxyapatite bone substitute prepared via in situ hydrothermal transformation of cuttlefish bone *Journal of Biomedical Materials Research Part B: Applied Biomaterials* (Vol. 103 (4), pp. 816-824).

Howard D., et al. (2008). Tissue engineering: strategies, stem cells and scaffolds *Journal of Anatomy* (Vol. 213, pp. 66–72).

Hubbell J.A. (1999). Bioactive biomaterials *Current Opinion in Biotechnology* (Vol.10, pp. 123-129).

Ikada Y. (2006). Challenges in tissue engineering *Journal of The Royal Society Interface*, (Vol. 3, pp. 589–601).

Imai S., et al. (2003). Determination of the Position and Orientation of Artificial Knee Implants using Markers Embedded in a Bone: Preliminary In Vitro Experiments *Medical Engineering & Physics* (Vol. 25, pp. 419-424).

Ivankovic H. et al. (2009). Preparation of highly porous hydroxyapatite from cuttlefish bone *Journal of Materials Science: Materials in Medicine* (Vol. 20, pp. 1039–1046).

Ivankovic H. et al. (2010). Hydroxyapatite formation from cuttlefish bones: kinetics *Journal of Materials Science: Materials in Medicine* (Vol. 21, pp.2711–2722).

Jain A.K. & Panchagnula R. (2000). Skeletal drug delivery systems *International Journal of Pharmaceutics* (Vol. 206, pp. 1–12).

Janicki P. & Schmidmaier G. (2011). What should be the characteristics of the ideal bone graft substitute? Combining scaffolds with growth factors and/or stem cells *Injury* (Vol. 41, pp. 77-81).

Jarcho M. (1981). Calcium phosphate ceramics as hard tissue prosthetics *Clinical Orthopaedics and Related Research* (Vol.57, pp. 259-278).

Jie Q., Dai X. & Cao Q. (2002). Massive Allograft for Defects after Bone Malignant Tumor Resection *China Journal of Modern Medicine* (Vol.12, pp.60-62).

Jones J. & Clare A. (2012). Bio-Glasses: An Introduction, Wiley.

Jumah B.E. (2012). Επίδραση μηχανικού ερεθίσματος στην έκφραση μορίων προσκόλλησης ανθρώπινων οστεοβλαστών σε επίστρωση νανοσωλήνων άνθρακα, *Μεταπτυχιακή εργασία*,

Τμήμα Φαρμακευτικής, Δ.Π.Μ.Σ. «ΙΑΤΡΙΚΗ ΧΗΜΕΙΑ: Σχεδιασμός και Ανάπτυξη Φαρμακευτικών Προϊόντων», Πανεπιστήμιο Πατρών

Kanczler J.M. et al. (2007). Supercritical carbon dioxide generated vascular endothelial growth factor encapsulated poly (DL-lactic acid) scaffolds induce angiogenesis in vitro *Biochemical and Biophysical Research Communications* (Vol. 352, pp. 135–141).

Kannan S. et al. (2007). Fluorine-substituted hydroxyapatite scaffolds hydrothermally grown from aragonitic cuttlefish bones *Acta Biomaterialia* (Vol. 3, pp. 243–249).

Karp J.M., Dalton P.D. & Shoichet M.S. (2003). Scaffolds for tissue engineering *MRS Bulletin* (Vol.28, pp. 301-306).

Katari R., Peloso A. & Orlando G. (2015). Tissue engineering and regenerative medicine: semantic considerations for an evolving paradigm *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology* (Vol.2 (57), pp. 1-6).

Katz J. L. (1980). The mechanical properties of biological materials. Cambridge: Cambridge University Press.

Keskin D., Gundogdu C. & Atac A.C. (2007). Experimental comparison of bovine-derived xenograft, xenograft-autologous bone marrow and autogenous bone graft for the treatment of bony defects in the rabbit ulna *Medical Principles and Practice* (Vol.16, pp. 299-305).

Kim H.W. et al. (2003). Enhanced performance of fluorine substituted hydroxyapatite composites for hard tissue engineering *Journal of Materials Science: Materials in Medicine* (Vol.14, pp. 899–904).

Kim B.S., Kang H.J. & Lee J. (2013). Improvement of the compressive strength of a cuttlefish bone-derived porous hydroxyapatite scaffold via polycaprolactone coating *Journal of Biomedical Materials Research Part B: Applied Biomaterials* (Vol. 101 (7), 1302-1309).

Kim B.S., Yang S.S. & Lee J. (2014). A polycaprolactone/cuttlefish bone-derived hydroxyapatite composite porous scaffold for bone tissue engineering *Journal of Biomedical Materials Research Part B: Applied Biomaterials* (Vol. 102 (5), pp. 943-951).

Klein C.P. et al. (1990). Studies of the solubility of different calcium phosphate ceramic particles in vitro *Biomaterials* (Vol. 11, pp. 509-512).

Klein B., Bem-Bassat H. & Solomon V. (1998). Structurally different bisphosphonates exert opposing effects on alkaline phosphatase and mineralization in marrow osteoprogenitors. *Journal of Cellular Biochemistry* (Vol.68, pp. 186 –194).

Kobayashi I. & Samata T. (2006). Bivalve shell structure and organic matrix. *Materials Science and Engineering: C* (Vol. 26, pp. 692 – 698).

Krisanapiboon A., Buranapanitkit B., & Oungbho K. (2006). Biocompatibility of hydroxyapatite composite as a local drug delivery system *Journal of Orthopaedic Surgery* (Vol. 14(3), pp. 315-318).

Krishnan V. & Lakshmi T. (2013). Bioglass: A novel biocompatible innovation *Journal of Advanced Pharmaceutical Technology and Research* (Vol. 4 (2), pp. 78–83).

Lagopati N. et al. (2010). Photo-induced treatment of breast epithelial cancer cells using nanostructured titanium dioxide solution *Journal of Photochemistry and Photobiology A: Chemistry* (Vol. 214, pp. 215–223).

Lagopati N. (2014). Effect of nanostructured TiO₂ crystal phase on photoinduced apoptosis of breast cancer epithelial cells, *International Journal of Nanomedicine* (Vol. 9, pp. 3219–3230).

Langer R. & Vacanti J. P. (1993). Tissue Engineering *Science* (Vol. 260, pp. 920-926).

Lanza R., Langer R. & Vacanti J.P. (1997). Principles of Tissue Engineering. R.G. Landes Company and Academic Press Inc., Texas, Austin.

Leamy P. et al. (1998). Fluoride uptake by hydroxyapatite formed by the hydrolysis of a-tricalcium phosphate *Journal of Biomedical Materials Research Part A* (Vol. 42, pp. 458–464).

Li X.M., et. al. (2013). Nanostructured scaffolds for bone tissue engineering *Journal of Biomedical Materials Research Part A* (Vol. 101 (8), pp. 2424–2435).

Li B. (2014). Dating of black gel pen ink using the dissolution-diffusion method *Forensic Science International* (Vol. 234, pp. 126-131).

Lin H.-R. & Yeh Y.-J. (2004). Porous Alginate/Hydroxyapatite Composite Scaffolds for Bone Tissue Engineering: Preparation, Characterization, and In Vitro Studies *Journal of Biomedical Materials Research Part B: Applied Biomaterials* (Vol. 71 (1), pp. 52-65).

Lin K. et al. (2011). Fabrication and characterization of hydroxyapatite/wollastonite composite bioceramics with controllable properties for hard tissue repair *Journal of the American Ceramic Society* (Vol. 94, pp. 99–105).

Lin K. & Chang J. (2015). Structure and properties of hydroxyapatite for biomedical applications, Hydroxyapatite (HAp) for Biomedical Applications, Woodhead Publishing Series in Biomaterials: Number 95, Edited by Michael Mucalo, Elsevier.

Lippert H., Herbold D & Lipper-Burmester W. (2010). Anatomy (Atlas), Parisianos Editions.

Liu X., Chu P.K. & Ding C. (2004). Surface modification of titanium titanium alloys, and related materials for biomedical applications *Materials Science and Engineering Reports* (Vol.47, pp. 49-121).

Liu H. & Webster T. J. (2007). Bioinspired nanocomposites for orthopedic applications. In Nanotechnology for the regeneration of hard and soft tissues, Webster T. J. (Ed.). Singapore: World Scientific Publishing.

Loca D. et al. (2011a). Lidocaine loaded Ca/P scaffolds for bone regeneration and local drug delivery *Advanced Materials Research* (Vol. 222, pp. 289–292).

Loca D. et al. (2015). Porous hydroxyapatite for drug delivery, Hydroxyapatite (HAp) for Biomedical Applications, Woodhead Publishing Series in Biomaterials: Number 95, Edited by Michael Mucalo, Elsevier.

Lopes M. S., Jardini A. L. & Filho R. M. (2012). Poly (lactic acid) production for tissue engineering applications *Procedia Engineering* (Vol. 42, pp. 1402 – 1413).

Lowenstam H. A. & Weiner S. (1989). On Biomineralization, Oxford University Press, Oxford.

Ma X. & Elisseeff J. (2006). Scaffolding in tissue engineering, Taylor & Francis, New York.

Mahmood S. K., et al. (2017). Preparation and characterization of cockle shell aragonite nanocomposite porous 3D scaffolds for bone repair *Biochemistry and Biophysics Reports* (Vol. 10, pp. 237–251).

Malard O. et al. (1999). Influence of biphasic calcium phosphate granulometry on bone ingrowth, ceramic resorption, and inflammatory reactions: preliminary in vitro and in vivo study *Journal of Biomedical Materials Research* (Vol. 46, pp.103-111).

Maniya N.H., Patel S.R. & Murthy Z.V.P. (2013). Electrochemical preparation of microstructured porous silicon layers for drug delivery applications *Superlattices and Microstructures* (Vol. 55, pp. 144–150).

Mansouri K. et al. (2018). The Role of Cuttlebone and Cuttlebone Derived Hydroxyapatite with Platelet Rich Plasma on Tibial Bone Defect Healing in Rabbit: An Experimental Study, *Kafkas Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi* (Vol. 24 (1), pp.107-115).

Marie B. et al. (2008). Nacre calcification in the freshwater mussel *Unio pictorum*: carbonic anhydrase activity and purification of a 95-kDa calcium-binding glycoprotein *ChemBiochem* (Vol. 9, pp. 2515-2523).

Marin F., Le Roy N. & Marie B. (2012). The formation and mineralization of mollusk shell *Frontiers in Bioscience (Schol Ed)* (Vol. 4, pp.1099-1125).

Markowitz-Shulman A. et al. (2017). Exploring the state of the science in the field of regenerative medicine, The National Academies of Sciences, Engineering, Medicine, The National Academies Press, Washington DC.

Martin R. B. (1996). Biomaterials. In Introduction to bioengineering, Berger S. A., Goldsmith W., and Lewis E. R. (Eds.). Oxford: Oxford University Press, pp. 339–360.

Matejovsky Jr. Z., Matejovsky Z. & Kofranek I. (2006). Massive allografts in tumour surgery *International Orthopaedics* (Vol. 30 (6) pp. 478–483).

Mäthger L. M. et al. (2007). Disruptive coloration elicited on controlled natural substrates in cuttlefish, *Sepia officinalis* *The Journal of Experimental Biology* Published by The Company of Biologists (Vol. 210, pp. 2657-2666).

Meleti Z., Shapiro I.M. & Adams C.S. (2000). Inorganic phosphate induces apoptosis of osteoblastic-like cells in culture *Bone* (Vol. 27, pp. 359–366).

Monroe E.A. (1987). Biomaterials – teeth. Course notes of the State University of New York, College of Ceramics at Alfred University, New York.

Monteiro N. et al. (2015). Nanoparticle-based bioactive agent release systems for bone and cartilage tissue engineering *Regenerative Therapy* (Vol.1, pp. 109-118).

Mourino V. & Boccaccini A.R. (2010). Bone tissue engineering therapeutics: controlled drug delivery in three-dimensional scaffolds *Journal of The Royal Society Interface* (Vol.7, pp. 209–227).\

Muzzarelli R., Jeuniaux C. & Gooday G.W. (1985). *Chitin in nature and technology*, paper presented at the 3rd International Conference on Chitin and Chitosan, Ancona, Italy.

Nair L.S. & Laurencin C.T. (2007). Biodegradable polymers as biomaterials *Progress in Polymer Science* (Vol. 32, pp. 762-798).

Neumann A. & Kevenhoerster K. (2009). Biomaterials for craniofacial reconstruction *GMS Current Topics in Otorhinolaryngology* (Vol. 8, pp. 1-17).

Nooeaid P. et al. (2012). Osteochondral tissue engineering: scaffolds, stem cells and applications *Journal of Cellular and Molecular Medicine* (Vol. 16 (10), pp. 2247-2270).

Nudelman F., et al. (2010). The role of collagen in bone apatite formation in the presence of hydroxyapatite nucleation inhibitors *Nature Materials* (Vol. 9, pp. 1004-1009).

Oga M., Arizono T. & Sugioka Y. (1993). Bacterial adherence to bioinert and bioactive materials studied in vitro *Acta Orthopaedica* (Vol. 64, pp. 273-276).

Oh S., et al. (2006). Bioceramics for Tissue Engineering Applications – A Review *American Journal of Biochemistry and Biotechnology* (Vol. 2 (2), pp. 49-56).

Ong K.L., Lovald S. & Black J. (2014). *Orthopaedic Biomaterials in Research and Practice*, 2nd Edition, CRC Press, Taylor & Francis Group.

Orlando G. et al. (2011a). Regenerative medicine and organ transplantation: past, present and future *Transplantation* (Vol.91, pp.1310–1317).

Orlovskii V. P., Komlev V. S. & Barinov S. M. (2002). Hydroxyapatite and hydroxyapatite-based ceramics *Inorganic Materials* (Vol. 38, pp.973–984).

Oryan A. et al. (2014). Bone regenerative medicine: classic options, novel strategies, and future directions *Journal of Orthopaedic Surgery and Research* (Vol.9, 18).

Overgaard S. et al. (1997). Hydroxyapatite and fluorapatite coatings for fixation of weight loaded implants *Clinical Orthopaedics and Related Research* (Vol. 336, pp. 286–296).

Pabbruwe M.B., Stewart K. & Chaudhuri J.B. (2005). A comparison of colorimetric and DNA quantification assays for the assessment of meniscal fibrochondrocyte proliferation in microcarrier culture *Biotechnology Letters* (Vol. 27 (19), pp. 1451-1455).

Palazzo B. et al. (2005). Controlled drug delivery from porous hydroxyapatite grafts: an experimental and theoretical approach *Materials Science and Engineering: C* (Vol. 25, pp. 207–213).

Parenteau-Bareil R., Gauvin R. & Berthod F. (2010). Collagen-based biomaterials for Tissue Engineering applications *Materials* (Vol.3, pp. 1863-1887).

Parveen S., Krishnakumar K. & Sahoo S.K. (2006). New Era in Health Care: Tissue Engineering *Journal of Stem cells and Regenerative Medicine* (Vol. 1 (1), pp. 8-24).

Pillai C.K.S., Paul W. & Sharma C.P. (2009). Chitin and chitosan polymers: Chemistry, solubility and fiber formation *Progress in Polymer Science* (Vol. 34, pp. 641–678).

Plumb J.A. (2204). Cell sensitivity assays: the MTT assay *Methods in Molecular Medicine* (Vol. 88, pp. 165–169).

Polo-Corrales L., Latorre-Esteves M. & Ramirez-Vick J. E. (2014). Scaffold Design for Bone Regeneration *Journal of Nanoscience and Nanotechnology* (Vol. 14 (1), pp. 15–56).

Queiroz A.C. et al. (2003). Dissolution studies of hydroxyapatite and glass-reinforced hydroxyapatite ceramics *Materials Characterization* (Vol. 50, pp. 197–202).

Ratner B.D., et al. (2004). Biomaterials Science: An Introduction to Materials in Medicine, third edition, Society of Biomaterials, Elsevier Academic Press.

Rimondini L. et al. (2005). In vivo experimental study on bone regeneration in critical bone defects using an injectable biodegradable PLA/PGA copolymer *Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology, Oral Radiology and Endodontology* (Vol.99, pp.148-154).

Rinaudo M. (2006). Chitin and chitosan: Properties and applications *Progress in Polymer Science* (Vol. 31, pp. 603–632).

Ripamonti U. (2004). Soluble, insoluble and geometric signals sculpt the architecture of mineralized tissues *Journal of Cellular and Molecular Medicine* (Vol. 8, pp. 169–180).

Rocha J.H.G. et al. (2005). Scaffolds for bone restoration from cuttlefish *Bone* (Vol. 37, pp. 850–857).

Rocha J.H.G. et al. (2005a). Hydroxyapatite scaffolds hydrothermally grown from aragonitic cuttlefish bones *Journal of Materials Chemistry* (Vol.15, pp. 5007–5011).

Rocha J.H.G. et al. (2006). Hydrothermal growth of hydroxyapatite scaffolds from aragonitic cuttlefish bones *Journal of Biomedical Materials Research Part A* (Vol. 77 (1), pp. 160-168).

Rodríguez-Navarro C. et al. (2016). Nonclassical crystallization in vivo et in vitro (II): Nanogranular features in biomimetic minerals disclose a general colloid-mediated crystal growth mechanism *Journal of Structural Biology* (Vol. 196 (2), pp. 260-287).

Romagnoli C., D'Asta F. & Brandi M. L. (2013). Drug delivery using composite scaffolds in the context of bone tissue engineering *Clinical Cases in Mineral and Bone Metabolism* (Vol. 10 (3), pp. 155-161).

Rousseau M. et al. (2006). Restoration of stratum corneum with nacre lipids *Comparative Biochemistry and Physiology* (Vol. 145, pp. 1-9).

Sammons R. (2015). Biological responses to hydroxyapatite, Hydroxyapatite (HAp) for Biomedical Applications, Woodhead Publishing Series in Biomaterials: Number 95, Edited by Michael Mucalo, Elsevier.

Santoro M., et al. (2016). Poly (lactic acid) nanofibrous scaffolds for tissue engineering *Advanced Drug Delivery Reviews* (Vol.15 (107), pp. 206-212).

Schönitzer V. & Weiss I.M. (2007). The structure of mollusk larval shells formed in the presence of the chitin synthase inhibitor Nikkomycin Z *BMC Structural Biology* (Vol. 7).

Sewell-Loftin M.K. et al. (2011). EMT-Inducing biomaterials for heart valve engineering: Taking cues from developmental biology *Journal of Cardiovascular Translational Research* (Vol. 4, pp. 658-671).

Shackelford J. F. (2005). Bioceramics, vol. 1. Amsterdam, The Netherlands: Gordon and Breach Science Publishers.

Sharma C, et al. (2016). Fabrication and characterization of novel nanobiocomposite scaffold of chitosan–gelatin–alginate–hydroxyapatite for bone tissue engineering *Materials Science and Engineering C* (Vol. 64, pp. 416-427).

Sherrard K. M. (2000). Cuttlebone Morphology Limits Habitat Depth in Eleven Species of Sepia (Cephalopoda: Sepiidae) *Biological Bulletin* (Vol. 198 (3), pp. 404-414).

Shikinami Y. & Okuno M. (1999). Bioresorbable devices made of forged composites of hydroxyapatite (HA) particles and poly-L-lactide (PLLA): Part I. Basic characteristics *Biomaterials* (Vol.20, pp. 859-877).

Shindyapina A.V. et al. (2014). Mineralization of the connective tissue: a complex molecular process leading to age-related loss of function *Rejuvenation Research* (Vol.17, pp.116–133).

Silver I.A., Deas J. & Erecinska M. (2001). Interactions of bioactive glasses with osteoblasts in vitro *Biomaterials* (Vol.22, pp. 175–185).

Singh S., Singh V. & Aggarwal S. (2010) Synthesis of brushite nanoparticles at different temperatures *Chemical Papers* (Vo. 64, pp. 491-498).

Škalko-Basnet N. (2014). Biologics: the role of delivery systems in improved therapy *Biologics: Targets and Therapy* (Vol. 8, pp. 107–114).

Takemoto M., et al. (2005). Mechanical properties and osteoconductivity of porous bioactive titanium *Biomaterials* (Vol. 26, pp. 6014-6023).

Teixeira S. et al. (2009). Physical characterization of hydroxyapatite porous scaffolds for tissue engineering *Material Science Engineering C* (Vol.29, pp. 1510-1514).

Thein-Han W.W. & Misra R.D.K. (2009). Biomimetic chitosan–nanohydroxyapatite composite scaffolds for bone tissue engineering *Acta Biomaterialia* (Vol. 5, pp. 1182-1197).

Tiwari G. et al. (2012). Drug delivery systems: An updated review *International Journal of Pharmaceutical Investigation* (Vol. 2(1), pp. 2–11).

Tkalčec E. et al. (2014). Hydrothermal synthesis and thermal evolution of carbonate-fluorhydroxyapatite scaffold from cuttlefish bones *Materials Science and Engineering C* (Vol. 42, pp. 578-586).

- Tomford W.W. (1995). Transmission of disease through transplantation of musculoskeletal allografts *The Journal of Bone and Joint Surgery* (Vol. 77, pp. 1741-1754).
- Tomlinson R. E. & Silva M. J. (2013). Skeletal Blood Flow in Bone Repair and Maintenance *Bone Research* (Vol. 1 (4), pp. 311–322).
- Vekilov P.G. (2015). Nucleation and Growth Mechanisms of Protein Crystals, *Handbook of Crystal Growth*, Chapter 19, Elsevier.
- Wang W., Ouyang Y. & Poh C.K. (2011). Orthopaedic Implant Technology: Biomaterials from Past to Future *Annals Academy of Medicine* (Vol. 40, pp. 237-244).
- Wang Y.et al. (2012). The predominant role of collagen in the nucleation, growth, structure and orientation of bone apatite *Nature Materials* (Vol.11, pp 724-733).
- Wang D.G. et al. (2013). A study on in vitro and in vivo bioactivity of HA/45S5 composite films by pulsed laser deposition *Applied Surface Science* (Vol. 270, pp. 667–674).
- Ward P. & Boletzky S. v. (1984). Shell implosion depth and implosion morphologies in three species of Sepia (Cephalopoda) from the Mediterranean Sea *Journal of the Marine Biological Association of the United Kingdom* (Vol. 64, pp. 955-966).
- Weiss I.M. et al. (2006). The chitin synthase involved in marine bivalve mollusk shell formation contains a myosin domain *FEBS Letters* (Vol. 580, pp. 1846-1852).
- Williams D.F. (1987). Review: Tissue-biomaterial interaction *Journal of Materials Science* (Vol. 22, pp. 3421-3445).
- Williams J.M. et al. (2005). Bone tissue engineering using polycaprolactone scaffolds fabricated via selective laser sintering *Biomaterials* (Vol.26, pp 4817-4827).
- Wolf S.E. et al. (2016). Nonclassical crystallization in vivo et in vitro (I): Process-structure-property relationships of nanogranular biominerals *Journal of Structural Biology* (Vol. 196 (2), pp. 244-259).
- Xiea J., et al. (2002) FTIR/ATR study of protein adsorption and brushite transformation to hydroxyapatite *Biomaterials* (Vol.23, pp. 3609–3616).

Yarlagadda P.K., Chandrasekharan M. & Shyan J.Y. (2005). Recent advances and current developments in tissue scaffolding *Bio-Medical Materials and Engineering* (Vol.15, pp. 159-177).

Zalite V. et al. (2012). The effect of pore forming agent particle size on the porosity, microstructure and in vitro studies of hydroxyapatite ceramics *Key Engineering Materials* (pp. 493–494, pp. 277–280).

Zhang B. G. X. et al. (2014). Bioactive Coatings for Orthopaedic Implants—Recent Trends in Development of Implant Coatings *International Journal of Molecular Sciences* (Vol. 15(7), pp. 11878–11921).

Zhu L. et al. (2016). An evaluation of total starch and starch gelatinization methodologies in pelleted animal feed *Journal of Animal Science* (Vol. 94 (4), pp.1501-1507).

Zuk P.A., et al. (2001). Multilineage cells from human adipose tissue: implications for cell-based therapies *Tissue Engineering* (Vol.7 (2), pp. 211-228).