



**ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΙΩΑΝΝΙΝΩΝ  
ΙΑΤΡΙΚΗ ΣΧΟΛΗ**

**ΤΟΜΕΑΣ ΛΕΙΤΟΥΡΓΙΚΟΣ - ΚΛΙΝΙΚΟΕΡΓΑΣΤΗΡΙΑΚΟΣ  
ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΦΥΣΙΟΛΟΓΙΑΣ**

**ΕΠΙΔΡΑΣΗ ΤΟΥ ΤΙΤΑΝΙΟΥ ΚΑΙ ΤΟΥ ΟΞΕΙΔΙΟΥ ΤΟΥ ΣΤΗ  
ΛΕΙΤΟΥΡΓΙΚΟΤΗΤΑ ΤΩΝ ΑΙΜΟΠΕΤΑΛΙΩΝ ΚΑΙ ΤΟΝ  
ΚΥΤΤΑΡΙΚΟ ΠΟΛΛΑΠΛΑΣΙΑΣΜΟ**

**ΣΤΑΘΟΠΟΥΛΟΣ ΠΑΝΑΓΙΩΤΗΣ  
ΙΑΤΡΟΣ - ΟΔΟΝΤΙΑΤΡΟΣ**

**ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ**

**ΙΩΑΝΝΙΝΑ 2009**



«Η έγκριση της Δίδακτορικής Διατριβής από την Ίατρικη Σχολή του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων, δεν υποδηλώνει αποδοχή της γνώμης του συγγραφέα».

Νόμος 5343/32, άρθρο 202 παρ. 2 (νομική κατοχύρωση Ιατρικού Τμήματος)





**Ημερομηνία αίτησης του κ. Σταθόπουλου Παναγιώτη:** 10-6-2002

**Ημερομηνία ορισμού Τριμελούς Συμβουλευτικής Επιτροπής:** 481<sup>α</sup>/25-6-2002

**Μέλη Τριμελούς Συμβουλευτικής Επιτροπής:**

Επιβλέπων

Ευαγγέλου Άγγελος, Αναπληρωτής Καθηγητής Φυσιολογίας

Μέλη

Καλφακάκου Βασιλική, Αναπληρώτρια Καθηγήτρια Φυσιολογίας

Χαραλαμπόπουλος Κωνσταντίνος, Επίκουρος Καθηγητής Φυσιολογίας

**Ημερομηνία ορισμού θέματος:** 28-6-2002

*«Επίδραση του Τιτανίου και του οξειδίου του στην λειτουργικότητα των αιμοπεταλίων και τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό»*

**ΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΕΠΤΑΜΕΛΟΥΣ ΕΞΕΤΑΣΤΙΚΗΣ ΕΠΙΤΡΟΠΗΣ** : 664<sup>α</sup>/23-6-2009

1. Ευαγγέλου Άγγελος, Καθηγητής Φυσιολογίας Ιατρικής Σχολής Παν/μίου Ιωαννίνων
2. Μπράμης Ιωάννης Καθηγητής Χειρουργικής Ιατρικής Σχολής Παν/μίου Αθηνών
3. Στεφάνου Δημήτριος Καθηγητής Παθολογικής Ανατομίας Ιατρικής Σχολής Παν/μίου Ιωαννίνων
4. Καλφακάκου Βασιλική, Αναπληρώτρια Καθηγήτρια Φυσιολογίας Ιατρικής Σχολής Παν/μίου Ιωαννίνων
5. Μανωλόπουλος Λεωνίδας Αναπληρωτής Καθηγητής Ωτορινολοαρυγγολογίας Ιατρικής Σχολής Παν/μίου Αθηνών
6. Χαραλαμπόπουλος Κωνσταντίνος, Αναπληρωτής Καθηγητής Φυσιολογίας με έμφαση στην Κλινική-Λειτουργική Φυσιολογία Ιατρικής Σχολής Παν/μίου Ιωαννίνων
7. Καρκαμπούνας Σπυρίδωνας Επίκουρος Καθηγητής Φυσιολογίας με έμφαση στην Περιβαλλοντολογική Φυσιολογία Ιατρικής Σχολής Παν/μίου Ιωαννίνων

Έγκριση Διδακτορικής Διατριβής με βαθμό «ΑΡΙΣΤΑ» στις 18-12-2009

**ΠΡΟΕΔΡΟΣ ΤΗΣ ΙΑΤΡΙΚΗΣ ΣΧΟΛΗΣ**

**Γουδέβενος Ιωάννης**

Καθηγητής Παθολογίας-Καρδιολογίας

Η Γραμματέας της Σχολής  
**ΠΑΡΑΣΚΕΥΗ ΣΒΕΝΤΖΟΥΡΗ-ΖΩΗ**





*Στους γονείς και τον αδερφό μου που με στηρίζουν σε κάθε μου βήμα*



## ΠΡΟΛΟΓΟΣ

Τα τελευταία χρόνια η χρήση του τιτανίου έχει καταλάβει σημαντική θέση στην κατασκευή υλικών οστεοσύνθεσης, εμφύτευσης και τεχνητών προθέσεων για την αποκατάσταση δομών του ανθρώπινου οργανισμού που έχουν φθαρεί ή υποστεί βλάβη από φυσικά ή άλλα αίτια. Το τιτάνιο θεωρείται βιοσυμβατό υλικό αλλά η πιθανότητα να ασκεί κάποιες βιολογικές δράσεις απαιτεί περαιτέρω έρευνα. Το θέμα της διδακτορικής διατριβής ανατέθηκε την 20η Ιουλίου του 2005 από την Ιατρική Σχολή του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων και εκπονήθηκε κατά ένα μέρος στο Ιπποκράτειο Γενικό Νοσοκομείο Αθηνών και κατά το υπόλοιπο στο Εργαστήριο Φυσιολογίας του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων. Η διδακτορική διατριβή ολοκληρώθηκε τον Δεκέμβριο του 2009.

Θα ήθελα να ευχαριστήσω τον Καθηγητή κ. Άγγελο Ευαγγέλου για τη δυνατότητα που μου έδωσε να δουλέψω πάνω σ' ένα ερευνητικό θέμα που άπτεται της ειδικότητας αλλά και του άμεσου ενδιαφέροντός μου. Η σύλληψη της αρχικής ιδέας, η καθοδήγηση και η στήριξη που μου παρείχε ήταν αποφασιστικής σημασίας προκειμένου να προχωρήσει και να περατωθεί αυτή η ερευνητική προσπάθεια. Επιπροσθέτως θα ήθελα να ευχαριστήσω τον Αν.Καθηγητή Φυσιολογίας κ.Κωνσταντίνο Χαραλαμπίδου για τις χρήσιμες και ουσιαστικές του υποδείξεις και την καθοδήγηση και την Καθηγήτρια κα Καλφακάκου για τη συμβολή της στα αρχικά και δυσκολότερα στάδια της έρευνας.

Θερμές ευχαριστίες θα ήθελα να εκφράσω και στα υπόλοιπα μέλη της επταμελούς εξεταστικής επιτροπής: κ. Ιωάννη Μπράμη, Καθηγητή Χειρουργικής Παν/μίου Αθηνών, κ. Λεωνίδα Μανωλόπουλο, Αν.Καθηγητή ΩΡΛ Παν/μίου Αθηνών, κ. Δημήτριο Στεφάνου, Καθηγητή Παθολογικής Ανατομικής Παν/μίου Ιωαννίνων και κ. Σπυρίδωνα Καρκαμπούνα, Επίκουρο Καθηγητή Φυσιολογίας Παν/μίου Ιωαννίνων τα οποία με βοήθησαν στην ορθή συγγραφή της παρούσας διατριβής με τις παρατηρήσεις και υποδείξεις τους.

Θα ήθελα ακόμη να εκφράσω τις θερμές μου ευχαριστίες στο Διευθυντή του Τμήματος Αιμοδοσίας του Ιπποκρατείου Γενικού Νοσοκομείου κ.Γεώργιο Θεοδοσιάδη για την επίβλεψη όλης της ερευνητικής εργασίας που έγινε σχετικά με τις μετρήσεις των λειτουργιών των αιμοπεταλίων. Επίσης θα ήθελα να ευχαριστήσω τον Διευθυντή της Γναθοπροσωπικής Χειρουργικής Κλινικής του Γενικού Νοσοκομείου ΚΑΤ κ. Ζαχαριάδη για τη δυνατότητα που μου παρείχε ώστε να χειριστώ τους ασθενείς της Κλινικής και τους Γναθοπροσωπικούς

Χειρουργούς κυρίους Ράγγο και Αλμομάνι που έκαναν δυνατή την διενέργεια αιμοληψιών από τους προσωπικούς τους ασθενείς .

Τις Ευχαριστίες μου θα ήθελα να εκφράσω στην Προϊσταμένη των Νοσοκομειακών Λοιμώξεων του Ιπποκρατείου Γενικού Νοσοκομείου κα. Σμυρνή χωρίς τη συμβολή της οποίας η διεκπεραίωση της ερευνητικής αυτής προσπάθειας θα ήταν αδύνατη. Ένα θερμό ευχαριστώ θέλω ακόμη να απευθύνω στους ερευνητές κυρίους Καραγκούνη, Μέτσιο και Σίμο για τη σημαντική τους βοήθεια στο τμήμα της εργασίας που αφορά την κυτταροτοξικότητα του διοξειδίου του τιτανίου, την κα Παπαδοπούλου Βασιλική που επιμελήθηκε την επεξεργασία των δειγμάτων του αίματος και τη Μαθηματικό – Στατιστικολόγο κα Παναγούλια για τη στατιστική επεξεργασία των αποτελεσμάτων.

Τέλος, οφείλω να εκφράσω τις ευχαριστίες μου στους ανώνυμους εβδομήντα – τέσσερις ασθενείς και υγιείς αιμοδότες που χωρίς κανένα προσωπικό όφελος συμμετείχαν στην ερευνητική αυτή προσπάθεια με μόνη σκέψη ότι η συνεισφορά τους αυτή μπορεί να συντελέσει έστω και ελάχιστα, στην πρόοδο της Ιατρικής Επιστήμης.

## ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

	σελ.
1. Εισαγωγή	7
2. Ειδικό Μέρος: Υλικό και Μέθοδος	31
3. Αποτελέσματα	47
4. Συζήτηση	65
5. Συμπεράσματα	75
6. Περίληψη στα Ελληνικά	77
7. Περίληψη στα Αγγλικά	79
8. Βιβλιογραφία	83





## **1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ**

### **Αιμοπετάλια**

Τα αιμοπετάλια ή θρομβοκύτταρα του αίματος είναι απύρηντα δισκοειδή κύτταρα τα οποία σχηματίζονται στο μυελό των οστών από την κυταρροπλασματική κατάτμηση των γιγάντιων πρόδρομων μορφών τους, των μεγακαρυοκυττάρων . Τα αιμοπετάλια περιέχουν μιτοχόνδρια, μικροσωληνίσκους, κοκκία γλυκογόνου, ελάχιστα στοιχεία της συσκευής Golgi, λίγα ριβοσώματα καθώς και ενζυμικά συστήματα για αερόβια και αναερόβια αναπνοή. Τα χαρακτηριστικότερα οργανίδια τους είναι τα τέσσερα είδη των κοκκίων τους: α. κοκκία που εμφανίζουν μεγάλη ποικιλία όσον αφορά το μέγεθος και το σχήμα, ενώ περιέχουν και τρεις σημαντικές ομάδες πρωτεϊνών (ειδικές πρωτεΐνες αιμοπεταλίων, παράγοντες πήξης), πυκνά κοκκία (δ κοκκία) που είναι ηλεκτρονικά πυκνά και περιέχουν σεροτονίνη που δεν παράγεται από τα ίδια τα κύτταρα αλλά απορροφάται από το πλάσμα, λυσοσώματα που είναι κυστίδια περιλαμβανόμενα από μεμβράνη και περιέχουν λυσοσωματικά ένζυμα (π.χ. υδρολάση) και υπεροξειδισώματα, που είναι λίγα σε αριθμό, με ενζυματική δραστηριότητα υπεροξειδάσης<sup>(1)</sup>.

Η διάμετρος των αιμοπεταλίων είναι περίπου 2-4μm ενώ τα μεγακαρυοκύτταρα από τα οποία τα πρώτα προέρχονται έχουν διάμετρο γύρω στα 30 με 100μm είναι δηλαδή τα μεγαλύτερα κύτταρα που παρατηρούνται σε επιχρίσματα του μυελού των οστών. Τα μεγακαρυοκύτταρα διασπώνται σε αιμοπετάλια είτε ενώ βρίσκονται μέσα στο μυελό είτε εισερχόμενα στην κυκλοφορία. Ο φυσιολογικός αριθμός των αιμοπεταλίων στο περιφερικό αίμα κυμαίνεται από 150.000 – 400.000 /μL.

Στο κυταρρόπλασμα του αιμοπεταλίου εκτός από τα κοκκία υπάρχουν και άλλα σημαντικά οργανίδια και δραστικά συστήματα. Αυτά είναι: α) μόρια ακτίνης και μυοσΐνης, παρόμοια με αυτά που περιέχονται στα μυϊκά κύτταρα και επιτρέπουν τη συστολή του αιμοπεταλίου β) υπολείμματα του ενδοπλασματικού δικτύου και της συσκευής Golgi που συνθέτουν διάφορα ένζυμα και αποταμιεύουν μεγάλες ποσότητες ιόντων ασβεστίου γ) μιτοχόνδρια και συστήματα ενζύμων ικανά για το σχηματισμό της τριφωσφορικής (ATP) και διφωσφορικής αδενοσΐνης (ADP) δ) Συστήματα ενζύμων που συνθέτουν προσταγλανδίνες, ορμόνες που προκαλούν διάφορες αγγειακές (αγγειοσύσπαση – αγγειοδιαστολή) και άλλες τυπικές ιστικές

αντιδράσεις ε) ο παράγοντας σταθεροποίησης του ινώδους μιας πρωτεΐνης που παίζει καθοριστικό ρόλο στην πήξη του αίματος.

Τα αιμοπετάλια έχουν ημιπερίοδο ζωής 8-12 ημέρες στο περιφερικό αίμα και εν συνεχεία νεκρώνονται. Η απομάκρυνση των νεκρών αιμοπεταλίων (τμημάτων μεγακαρυοκυττάρων) γίνεται από τα μακροφάγα του σπλήνα κατά τη διέλευση του αίματος μέσα από το πυκνό δίκτυο των δοκίδων του οργάνου.

### **Λειτουργίες Αιμοπεταλίων**

Σύμφωνα με τα παραπάνω, το αιμοπετάλιο αποτελεί ένα εξαιρετικά δραστήριο έμμορφο στοιχείο του αίματος το οποίο επιτελεί λειτουργίες απαραίτητες για τη διατήρηση της ζωής.<sup>(2)</sup> Καθημερινά στον ανθρώπινο οργανισμό από διάφορες αιτίες δημιουργούνται πολυάριθμες μικροαιμορραγικές εστίες οι οποίες θα ήταν αδύνατο να αναχαιτιστούν εάν δε υφίστατο η ευεργετική επίδραση των αιμοπεταλίων. Τα αιμοπετάλια με την μεταβολική τους δραστηριότητα, τη διέγερση, την προσκόλλησή τους στο αγγειακό τοίχωμα και τη συσσώρευσή τους, που είναι και οι βασικότερες λειτουργίες τους επιτυγχάνουν τη δημιουργία αρχικά του αιμοπεταλιακού ή λευκού όπως επίσης αναφέρεται θρόμβου. Παρά το γεγονός ότι στη διεθνή βιβλιογραφία τα γεγονότα της πρωτογενούς και δευτερογενούς αιμόστασης ή ο σχηματισμός του αιμοπεταλιακού και αιμοστατικού θρόμβου αναφέρονται ως ξεχωριστά στην πραγματικότητα πρόκειται για δύο φάσεις του μηχανισμού πήξης που είναι άρρηκτα συνδεδεμένες. Προς επίρρωσιν τούτου αναφέρουμε ότι τα διεργεμένα αιμοπετάλια επιταχύνουν την πήξη του πλάσματος αλλά και τα προϊόντα της αντίδρασης πήξης του πλάσματος, όπως η θρομβίνη, διεγείρει και επιτείνει τη συσσώρευση των αιμοπεταλίων.<sup>(2)</sup>

### **Αιμόσταση**

Προκειμένου να ξεκινήσει η αποτελεσματική πρωτογενής αιμόσταση είναι απαραίτητα τρία αποφασιστικής σημασίας γεγονότα : η προσκόλληση των αιμοπεταλίων στο αγγειακό τοίχωμα και μεταξύ τους, η απελευθέρωση των προϊόντων των κοκκίων τους και η συσσώρευσή τους. Μέσα σε μερικά δευτερόλεπτα από τον τραυματισμό τα αιμοπετάλια προσκολλώνται στα ινίδια κολλαγόνου που εντοπίζονται στο εσωτερικό του αγγειακού ενδοθηλίου μέσω ενός ειδικού υποδοχέα κολλαγόνου που φέρουν και ο οποίος ουσιαστικά είναι μια γλυκοπρωτεΐνη. Αυτή η αλληλεπίδραση σταθεροποιείται από τον παράγοντα Von Willebrand, μια πρωτεΐνη προσκόλλησης που επιτρέπει στα αιμοπετάλια να παραμείνουν

αγκιστρωμένα στο τοίχωμα του αγγείου παρά τις ισχυρές διατμητικές δυνάμεις που παράγονται μέσα στον αγγειακό αυλό. Ο παράγοντας Von Willebrand το κατορθώνει αυτό σχηματίζοντας μια γέφυρα σύνδεσης μεταξύ του γλυκοπρωτεϊνικού παράγοντα – υποδοχέα των αιμοπεταλίων από τη μία και των ινιδίων κολλαγόνου του αγγείου από την άλλη. Τα παραπλήσια αιμοπετάλια με τη σειρά τους απελευθερώνουν τα περιεχόμενα των κοκκίων τους και παράγουν κυτταρικούς διαμεσολαβητές όπως το ADP, η θρομβοξάνη  $A_2$ , η ηπαρινάση, η ινωδονεκτίνη, το ινωδογόνο, ο PGF (παράγοντας αύξησης των αιμοπεταλίων), ο VWF και ο ενεργοποιημένος παράγοντας V της πήξης.<sup>(2,3,4,5,6,7,8,9,10,11)</sup>

Όπως και σε άλλα κύτταρα, η ενεργοποίηση και έκκριση των αιμοπεταλίων ρυθμίζονται από αλλαγές στα επίπεδα κυκλικών νουκλεοτιδίων, τη συγκέντρωση των ιόντων  $Ca^{++}$  την υδρόλυση των φωσφολιπιδίων της κυτταρικής μεμβράνης καθώς και την φωσφορυλίωση ενδοκυτταρικών πρωτεϊνών που παίζουν καθοριστικό ρόλο στις λειτουργίες αυτές. Τα σχετικά μεταβολικά μονοπάτια (καταρράκτης του αραχιδονικού οξέος) φαίνονται στην εικόνα 1.

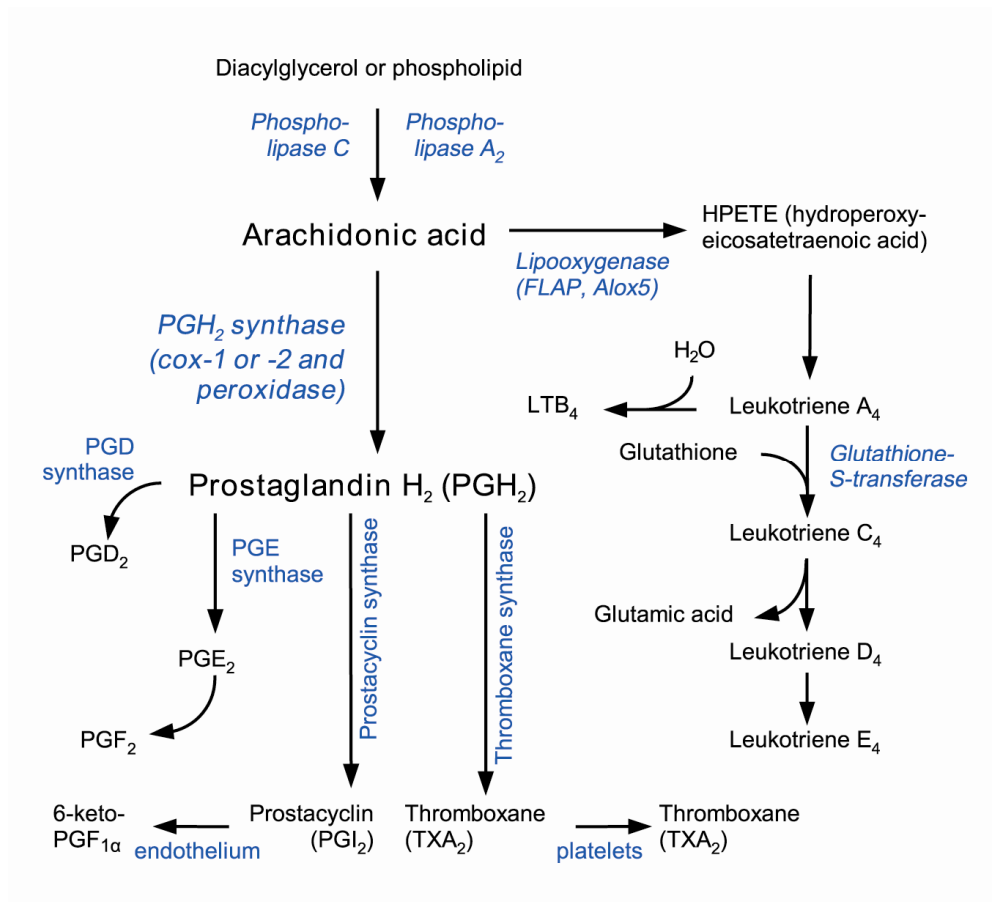
Η σύνδεση των αγωνιστών όπως η επινεφρίνη, το κολλαγόνο ή η θρομβίνη στους μεμβρανικούς υποδοχείς των αιμοπεταλίων ενεργοποιεί δύο ένζυμα της κυτταρικής τους μεμβράνης, την φωσφολιπάση C και την φωσφολιπάση  $A_2$ . Τα ένζυμα αυτά καταλύουν την αντίδραση απελευθέρωσης του αραχιδονικού οξέος από τα δύο κύρια φωσφολιπίδια την φωσφατιδυλινοσιτόλη και φωσφατιδυλογολίνη.

Αρχικά μια μικρή ποσότητα του απελευθερωμένου αραχιδονικού οξέος μετατρέπεται σε θρομβοξάνη  $A_2$  ( $TxA_2$ ) η οποία με τη σειρά της ενεργοποιεί την φωσφολιπάση C. Ο σχηματισμός της θρομβοξάνης  $A_2$  από το αραχιδονικό οξύ καταλύεται από το ένζυμο κυκλοοξυγενάση. Η κυκλοοξυγενάση αναστέλλεται από την ασπιρίνη και τα μη στερεοειδή αντιφλεγμονώδη φάρμακα, αναστολή η οποία έχει σαν άμεσο αποτέλεσμα την παρεμπόδιση της σύνθεσης της θρομβοξάνης  $A_2$  και σαν απώτερο ήπια αιμορραγία σε κάποιους ασθενείς αλλά ταυτόχρονα αποτελεί και την βάση της δράσης κάποιων αντιθρομβωτικών (αντ αιμοπεταλιακών) φαρμάκων.

Η υδρόλυση της μεμβρανικής φωσφατιδυλινοσιτόλης σε διακυλογλυκερόλη και τριφωσφορική ινοσιτόλη είναι σημαντική αφού και τα δύο αυτά μόρια παίζουν βασικό ρόλο στον μεταβολισμό των αιμοπεταλίων. Η τριφωσφορική ινοσιτόλη ρυθμίζει την κίνηση του ασβεστίου εντός του κυτταροπλάσματος και διεγείρει την φωσφορυλίωση των ελαφρών αλυσίδων της μυοσίνης. Η μυοσίνη αλληλεπιδρά με την ακτίνη για να διευκολύνει την

κίνηση των κοκκίων και την αλλαγή σχήματος των αιμοπεταλίων. Η διακυλογλυκερόλη ενεργοποιεί την πρωτεϊνική κινάση C η οποία με τη σειρά της φωσφορυλιώνει μια πρωτεΐνη που ρυθμίζει την έκκριση των κοκκίων των θρομβοκυττάρων.

Ένας άρτια ισορροπημένος μηχανισμός ελέγχει τον ρυθμό και τον βαθμό της αιμοπεταλιακής διέγερσης που φαίνεται στην εικόνα 1. Η θρομβοξάνη A<sub>2</sub> ένα προϊόν του αραχιδονικού οξέος στα αιμοπετάλια, εντείνει τη δράση της φωσφολιπάσης C που ευοδώνει τη διέγερση και την εκκριτική ικανότητα των αιμοπεταλίων. Σε αντίθεση η προστακυκλίνη (PGI<sub>2</sub>), που είναι επίσης προϊόν του αραχιδονικού οξέος αλλά στα ενδοθηλιακά κύτταρα αναστέλλει τη δράση της φωσφολιπάσης C αυξάνοντας τα επίπεδα του κυκλικού AMP (αδενυλική κυκλάση) μέσα στο θρομβοκύτταρο με αποτέλεσμα την αναστολή της διέγερσής του. Αντίστοιχες μεταβολικές οδοί που ρυθμίζουν τη διέγερση και έκκριση λαμβάνουν χώρα και σε άλλα κύτταρα.



Εικόνα 1 ΚΑΤΑΡΑΚΤΗΣ ΑΡΑΧΙΔΟΝΙΚΟΥ ΟΞΕΟΣ

Αμέσως μόλις διεγερθούν τα αιμοπετάλια απελευθερώνουν το περιεχόμενο των κοκκίων τους στο πλάσμα του αίματος. Ενδογλυκοσιδάσες και ένα ένζυμο κατακερματισμού της ηπαρίνης απελευθερώνονται από τα λυσοσώματα, ασβέστιο, σεροτονίνη και διφωσφορική αδενοσίνη (ADP) απελευθερώνονται από τα πυκνά κοκκία. Αρκετές πρωτεΐνες, συμπεριλαμβανομένων και του παράγοντα Von Willebrand, της ινωδονεκτίνης, της θρομβοσπονδίνης και της πρωτεΐνης αδρανοποίησης της ηπαρίνης (αιμοπεταλιακός παράγοντας 4) ελευθερώνονται από τα κοκκία  $\alpha$ . Το ADP που εκκρίνεται τροποποιεί την επιφάνεια των θρομβοκυττάρων με τέτοιο τρόπο ώστε το ινωδογόνο να μπορεί να προσκολληθεί σ' ένα σύμπλεγμα που σχηματίζεται μεταξύ των μεμβρανικών γλυκοπρωτεϊνών IIb και IIIa επιτυγχάνοντας έτσι τη σύνδεση γειτονικών αιμοπεταλίων για τον σχηματισμό του αιμοπεταλιακού θρόμβου.

Ο αυξητικός παράγοντας των αιμοπεταλίων (PGF) μια άλλη πρωτεΐνη των  $\alpha$  – κοκκίων, διεγείρει την αύξηση και τη μετανάστευση των ινοβλαστών και των λείων μυϊκών ινών μέσα στο τοίχωμα του αγγείου, διαδικασία που είναι αποφασιστικής σημασίας για την επανορθωτική διαδικασία που έπεται της αγγειακής βλάβης.

Καθώς ο πρωτογενής (ο αιμοπεταλιακός) θρόμβος έχει σχηματιστεί, οι πρωτεΐνες πήξης του πλάσματος κινητοποιούνται προκειμένου να εκκινήσουν τη δευτερογενή αιμόσταση. Ο καταρράκτης της πήξης μπορεί να διαιρεθεί σε πολλές ενδιάμεσες αντιδράσεις που έχουν σαν αποτέλεσμα την παραγωγή ικανής ποσότητας θρομβίνης η οποία θα μετατρέψει ένα μικρό κλάσμα του ινωδογόνου του πλάσματος σε ινική. Το τελευταίο βήμα στο σχηματισμό του δευτερογενούς ή ερυθρού θρόμβου είναι η μετατροπή της προθρομβίνης σε θρομβίνη υπό την παρουσία των παράγοντα πήξης V, ασβεστίου και φωσφολιπιδίων. Παρά το γεγονός ότι η μετατροπή της προθρομβίνης μπορεί να λάβει χώρα σε ποικίλες φυσικές και τεχνητές επιφάνειες πλούσιες σε φωσφολιπίδια, επιταχύνεται κατά πολλές χιλιάδες φορές στην επιφάνεια των διεγερμένων αιμοπεταλίων.

Το προϊόν αυτής της αντίδρασης, η θρομβίνη, έχει πολλαπλές επιδράσεις στη διαδικασία της αιμόστασης. Έτσι, αν και ο πρωταρχικός της ρόλος είναι να καταλύει την αντίδραση μετατροπής του ινωδογόνου σε ινική, παράλληλα ενεργοποιεί τους παράγοντας πήξης V, VIII, και XIII και διεγείρει τη συσσώρευση των αιμοπεταλίων και την έκκριση των προϊόντων των κοκκίων τους.

Στην πραγματικότητα η διαδικασία της αιμόστασης δεν είναι ομοιόμορφη σ' όλη την έκταση του σώματος αλλά η σύνθεση του θρόμβου ποικίλει ανάλογα με την εντόπιση του

τραυματισμού. Οι αιμοστατικοί θρόμβοι που αναπτύσσονται στις φλέβες όπου η ροή του αίματος είναι αργή είναι πλούσιοι σε ινική και παγιδευμένα ερυθρά αιμοσφαίρια αλλά περιέχουν σχετικά λίγα αιμοπετάλια. Συχνά οι φλεβικοί θρόμβοι αποκαλούνται και ερυθροί εξ αιτίας της εμφάνισής τους στα χειρουργικά και παθολογοανατομικά ευρήματα.

Τα εύθραυστα τελικά τμήματα αυτών των ερυθρών θρόμβων, που συχνά σχηματίζονται στα κάτω άκρα, είναι δυνατόν να υποστούν απόσπαση από το σύνολο του θρόμβου και να λειτουργήσουν ως έμβολα της πνευμονικής κυκλοφορίας. Σε αντίθεση οι αρτηριακοί θρόμβοι οι οποίοι διάγουν κάτω από συνθήκες υψηλών πιέσεων και επομένως ροής κυρίως αποτελούνται από αιμοπετάλια ενώ η περιεκτικότητά τους σε ινική είναι μικρή. Αυτοί οι λευκοί θρόμβοι μπορούν σχετικά εύκολα να αποκολληθούν από το αρτηριακό τοίχωμα και να αποφράξουν περιφερικότερα αγγεία ακόμη και σε πολύ μακρινές θέσεις προκαλώντας παροδική ή και μόνιμη ισχαιμία στους ιστούς που αρδεύονται από αυτά.

Το φαινόμενο αυτό είναι ιδιαίτερα συνηθισμένο στην εγκεφαλική και αμφιβληστροειδική κυκλοφορία και μπορεί να οδηγήσει σε πρόσκαιρη νευρολογική δυσλειτουργία (παροδικά ισχαιμικά επεισόδια συμπεριλαμβανομένης της προσωρινής μονόπλευρης τύφλωσης (αμαύρωση fugax) και των αγγειακών εγκεφαλικών επεισοδίων.

Επιπροσθέτως, υπάρχουν ολοένα και αυξανόμενες επιστημονικές αποδείξεις ότι πολλά επεισόδια εμφράγματος του μυοκαρδίου οφείλονται σε θρόμβους που σχηματίζονται μέσα σε στεφανιαίες αρτηρίες που έχουν υποστεί σκλήρυνση οφειλόμενη σε χρόνια αθηρωμάτωση. Είναι εξαιρετικά μεγάλης σημασίας γνώση να θυμόμαστε ότι υπάρχει μικρή διαφορά ανάμεσα στους θρόμβους που σχηματίζονται κατά τη διάρκεια της αιμόστασης ως φυσιολογική απάντηση στον τραυματισμό και στους παθολογικούς θρόμβους. Για να υπογραμμιστεί αυτή η ομοιότητα αρκεί να έχουμε υπόψη μας ότι η θρόμβωση ενός αγγείου συχνά περιγράφεται ως πήξη που συμβαίνει σε λάθος σημείο ή σε λάθος χρόνο.<sup>(12,13,14,15)</sup>

### **Τιτάνιο (Ti)**

Το τιτάνιο είναι ένα χημικό στοιχείο που συμβολίζεται με τους λατινικούς χαρακτήρες Ti και έχει ατομικό χαρακτήρα 22. Πρόκειται για ένα ελαφρύ, ισχυρό, στιλπνό, με ιδιαίτερη αντοχή στη διάβρωση (συμπεριλαμβανομένων του ύδατος της θάλασσας και της χλωρίνης) από το νερό και άλλα υγρά, μέταλλο γκριζωτού χρώματος που ανήκει στην ομάδα των επαμφοτεριζόντων στοιχείων του περιοδικού πίνακα.

Το τιτάνιο μπορεί να σχηματίσει κράμα με πολλά στοιχεία μεταξύ των οποίων είναι, ο σίδηρος (Fe), το αλουμίνιο (Al), το βανάδιο (V) και το μολυβδένιο με σκοπό να δημιουργηθούν ισχυρά υλικά με χαμηλό βάρος που χρησιμοποιούνται στην αεροναυπηγική (μηχανές αεροσκαφών, πύραυλοι, διαστημόπλοια), για στρατιωτικούς σκοπούς, στη Βιομηχανία (χημικά και πετροχημικά, χαρτικά) στην αυτοκινητοβιομηχανία, στις αγροκαλλιέργειες, σαν υλικό ιατρικών προθέσεων, εμφυτευμάτων στην Ορθοπεδική, Νευροχειρουργική και στη Γναθοπροσωπική Χειρουργική, για κατασκευή αθλητικού εξοπλισμού, κοσμημάτων, κινητών τηλεφώνων και άλλων εφαρμογών.<sup>(16)</sup>

Το Τιτάνιο ανακαλύφθηκε στη Μεγάλη Βρετανία από τον William Gregor το 1791 και πήρε το όνομά του από τους Ελληνικούς Μυθολογικούς Τιτάνες για να τονιστεί μ' αυτό τον τρόπο η ισχύς και η αντοχή του στις καταπονήσεις.

Το στοιχείο αυτό, ανευρίσκεται ως τμήμα αρκετών ορυκτών, κυρίως του ρουτιλίου και του ιλμενίτη τα οποία ευρέως απαντώνται στον φλοιό και τις λιθοσφαιρικές πλάκες της Γης και βρίσκεται σχεδόν σε κάθε έμβιο ον, σε βράχους, στο νερό και το έδαφος.

Το μέταλλο (Ti) εξάγεται από τα αρχικά ορυκτά που το περιέχουν με την επεξεργασία Kroll<sup>(17)</sup> ή την Hunter. Η πιο συχνά απαντώμενη στη φύση ένωσή του, το διοξείδιο του (Τιτανίου) ( $TiO_2$ ), χρησιμοποιείται στην κατασκευή άσπρων χρωστικών ουσιών<sup>(18)</sup>, ενώ παίζει βασικό ρόλο στην οστεοενσωμάτωση των εμφυτευμάτων που χρησιμοποιούνται στην Ιατρική. Άλλες ενώσεις με ευρεία χρήση είναι το τετραχλωριούχο τιτάνιο ( $TiCl_4$ ) και το τριχλωριούχο τιτάνιο ( $TiCl_3$ ) που χρησιμοποιούνται ως καταλύτες στη Βιομηχανία.<sup>(16)</sup>

Οι δυο πιο χρήσιμες ιδιότητες του μετάλλου είναι η μεγάλη αντίσταση που προβάλλει στη διάβρωση (πρακτικά δεν διαβρώνεται) αλλά και η υψηλότερη αναλογία ισχύος / βάρους από κάθε άλλο μέταλλο.<sup>(19)</sup> Στη κατάσταση εκτός κράματος, το τιτάνιο είναι τόσο ισχυρό όσο και το ατσάλι αλλά είναι 45% ελαφρύτερο<sup>(20)</sup>.

Υπάρχουν δύο αλλοτροπικές μορφές<sup>(21)</sup> και 5 ισότοπα του (Ti) τιτανίου, τα στοιχεία  $^{46}Ti$ ,  $^{47}Ti$ ,  $^{48}Ti$ ,  $^{49}Ti$ ,  $^{50}Ti$ . Οι χημικές ιδιότητες του (Ti) είναι παρόμοιες με αυτές του Ζιργκονίου (Zr) όπως άλλωστε και οι φυσικές<sup>(22)</sup>.

## Χαρακτηριστικά

### ΦΥΣΙΚΕΣ ΙΔΙΟΤΗΤΕΣ

#### ΦΥΣΙΚΕΣ ΚΑΙ ΧΗΜΙΚΕΣ ΙΔΙΟΤΗΤΕΣ ΤΙ (ΤΙΤΑΝΙΟΥ)

Ατομικός Αριθμός	22
Ομάδα Περιοδικού Πίνακα	Επαμφοτερίζοντα Μέταλλα
Ομάδα, περίοδος, block (Π.Π.)	4 <sup>n</sup> , 4 <sup>n</sup> , d
Εξωτερική Εμφάνιση – Χροιά	Ασημίζουσα γκρι – άσπρη μεταλλική απόχρωση
Ατομικό Βάρος	47,86 g/mal
Ηλεκτρονίων κατανομή (κατά στοιβάδες)	2, 8, 10, 2 ή [Ar] 3d <sup>2</sup> 4S <sup>2</sup>

#### ΦΥΣΙΚΕΣ

ΦΑΣΗ	ΣΤΕΡΕΗ
Πυκνότητα	4.506 g/cm <sup>3</sup>
Σημείο Τήξεως	1668°C, 1941°K
Σημείο Ζέσεως	3287°C
Θερμότητα Εξατμίσεως	425 Kj /mal
Θερμότητα τήξεως	14,15 Kj /mal
Θερμοχωρητικότητα	25.060 j /mal *K

#### ΠΙΕΣΗ ΑΤΜΟΥ

P	Pa	1	10	100	1K	10K	100K
T	K	1982	2171	2403	2692	3064	3558

#### ΑΤΟΜΙΚΕΣ

Κρυσταλλική Δομή	Εξαγωνική
Ηλεκτραρνητικότητα	1.54 (Pouling κλίμακα)
Ενέργεια ιονισμού κατά στοιβάδα	1 πρώτη: 658 Kj /mal 2 δεύτερη: 1309 Kj /mal 3 Τρίτη : 2652 Kj /mal
Ατομική Ακτίνα	140 pm

#### ΔΙΑΦΟΡΕΣ

Συμπεριφορές σε μαγνητικό πεδίο	Παραμαγνητικό
Ηλεκτρική Αντίσταση	0.420 μΩ* m

Ένα μεταλλικό στοιχείο, το Τιτάνιο, είναι πια διεθνώς αναγνωρισμένο για την υψηλότερη ανά τον Κόσμο ισχύος / βάρους αναλογία του.<sup>(21)</sup> Πρόκειται για μέταλλο ελαφρύ, ισχυρότατο με χαμηλή πυκνότητα που όταν είναι καθαρό από προσμίξεις είναι αρκετά ελατό και όλκιμο,<sup>(23)</sup> λαμπερό με μεταλλική ασημή απόχρωση. Το σχετικά υψηλό σημείο τήξης του (πάνω από



1649°C) το κάνει ιδιαίτερα χρήσιμο ως δύστηκτο υλικό όταν απαιτείται μεγάλη αντοχή στην επίδραση της θερμότητας.

Τα εμπορικά σκευάσματα του τιτανίου (99.2% καθαρότητας) έχουν μέγιστη αντοχή σε εφελκυσμό περίπου ίση με 63.000 psi (434 MPa), ίση με αυτή κάποιων κραμάτων ατσαλιού αλλά κατά τα άλλα είναι κατά 45% ελαφρύτερα. Το τιτάνιο μπορεί μεν να είναι 60% βαρύτερο από το αλουμίνιο αλλά ταυτόχρονα και 2 φορές ισχυρότερο<sup>(20)</sup> από το πιο συχνά χρησιμοποιούμενα κράματα αλουμινίου. Παρόλα αυτά το τιτάνιο χάνει τμήμα της ισχύος και της αντοχής του όταν θερμαίνεται πάνω από τους 430°C.

Πρόκειται για υλικό αρκετά υψηλής σκληρότητας (χωρίς να ξεπερνά σε σκληρότητα κάποια κράματα σιδήρου θερμικά κατεργασμένα), παραμαγνητικό και κακό αγωγό της θερμότητας, ιδιότητες που το καθιστούν χρησιμότερο και πρακτικά έως σήμερα αναντικατάστατο για ορισμένες χρήσεις του στην Ιατρική. Όπως και αυτές που είναι κατασκευασμένες από σίδηρο (ατσάλι), οι δομές που αποτελούνται από τιτάνιο έχουν τέτοιο όριο αντοχής στην κόπωση που μπορεί να εγγυηθεί μακρά περίοδο χρήσης άνευ ουσιαστικής καταπόνησης σε πολλές από τις εφαρμογές του.<sup>(24)</sup>

Το μέταλλο έχει δύο αλλότροπες ισομορφές με την εξαγωνική άλφα μορφή να μετατρέπεται στη δικτυωτή Β<sup>(20)</sup>-μορφή στους 882°C. Όπως ακριβώς συμβαίνει και με τα Ζιργκόνιο (Zr) και Χάφνιο (Hf) μια επιπρόσθετη ωμέγα μορφή υφίσταται και για το τιτάνιο, η οποία είναι θερμοδυναμικά σταθερή σε υψηλές θερμοκρασίες αλλά μπορεί να μετατραπεί σε ασταθή ανάλογα με την υπάρχουσα πίεση. Η φάση αυτή είναι συνήθως εξαγωνική ή τριγωνική.<sup>(25)</sup> Η κατεργασία του υλικού απαιτεί ιδιαίτερη προσοχή αφού εάν δεν χρησιμοποιηθούν κατάλληλα εργαλεία και ψυκτικές μέθοδοι τότε το υλικό χάνει μέρος της σκληρότητάς του και γίνεται ψαθυρό.

## Χημεία

Η πιο αξιοσημείωτη χημική ιδιότητα του τιτανίου είναι η εξαιρετική του αντίσταση στη διάβρωση. Είναι περίπου ίσης αντοχής όσο και η πλατίνα (λευκόχρυσος), ικανό να αντεπεξέρχεται χωρίς απώλειες τις επιθέσεις οξέων, των υδρατμών της χλωρίνης και των κοινών αλατούχων διαλυμάτων.<sup>(21)</sup> Το καθαρό τιτάνιο δεν είναι διαλυτό στο νερό αλλά σε διαλύματα οξέων υψηλής συγκεντρώσεως.<sup>(26)</sup>

Το τιτάνιο, αν και θερμοδυναμικά είναι ενεργό μέταλλο, αντιδρά αργά τόσο με το νερό όσο και με τον αέρα, στον οποίο όταν βρεθεί σε ανεβασμένες θερμοκρασίες σχηματίζει ένα παθητικό και προστατευτικό επένδυμα οξειδίου, που αυξάνει την αντοχή του στη διάβρωση, ενώ σε θερμοκρασία δωματίου αντιστέκεται στην οξειδωση.<sup>(23)</sup> Όταν αρχικά σχηματίζεται αυτή η εξωτερική στοιβάδα οξειδίου, έχει πάχος μόλις 1-2 nm αλλά σταδιακά αυξάνεται για να φτάσει σε πάχος τα 25 nm σε 4 χρόνια.<sup>(23)</sup>

Το τιτάνιο καίγεται όταν θερμανθεί στον αέρα στους 610°C ή σε υψηλότερη θερμοκρασία σχηματίζοντας, διοξείδιο του τιτανίου (TiO<sub>2</sub>).<sup>(21)</sup> Είναι επίσης ένα από τα λίγα στοιχεία που καίγεται στο καθαρό αέριο άζωτο (N<sub>2</sub>) [στους 800 °C και σχηματίζει το νιτρίδιο του τιτανίου].<sup>(17-20)</sup> Το τιτάνιο είναι οξεάντοχο στα αραιωμένα διαλύματα του θειικού, υδροχλωρικού οξέως, της χλωρίνης και του χλωρίου όπως επίσης και σε αυτά των περισσότερων οργανικών οξέων.<sup>(17)</sup> Είναι στοιχείο παραμαγνητικό (ασθενώς ελκόμενο από το μαγνητικό πεδίο) και έχει αρκετά χαμηλή ηλεκτρική και θερμική αγωγιμότητα.<sup>(23)</sup> Πειράματα έχουν δείξει ότι το Τιτάνιο μετατρέπεται σε στοιχείο ραδιενεργό όταν βομβαρδιστεί με δευτερόνια, εκπέμποντας κυρίως ποζιτρόνια και σκληρή γάμμα ακτινοβολία.<sup>(17)</sup> Όταν είναι θερμό και ερυθρό το μέταλλο αντιδρά με το O<sub>2</sub> ενώ όταν φτάσει τους 550°C αντιδρά με τους υδρατμούς χλωρίνης.<sup>(17)</sup> Επίσης αντιδρά και με άλλα αλλογόνα και απορροφά (H<sub>2</sub>)<sup>(18)</sup> υδρογόνο.

### Φυσικές Πηγές Τιτανίου

Το τιτάνιο στη φύση είναι πάντοτε συνδεδεμένο με άλλα στοιχεία. Είναι το ένατο πιο συχνά απαντώμενο στοιχείο στο φλοιό της Γης και το πέμπτο πιο συχνά απαντώμενο μέταλλο. Είναι συστατικό των περισσότερων πετρωμάτων όπως επίσης και των πιο πολλών έμβιων όντων, ενώ περιέχεται και στο νερό ως ιόν.<sup>(17)(23)</sup> Στην πραγματικότητα, από τους 801 διαφορετικούς τύπους πυριγενών πετρωμάτων που έχουν βρεθεί και αναλυθεί στις Ηνωμένες Πολιτείες της Αμερικής οι 784 περιέχουν τιτάνιο,<sup>(20)</sup> ενώ η εκατοστιαία αναλογία περιεκτικότητας του εδάφους σε τιτάνιο ανέρχεται από 0.5 έως και 1.5%.<sup>(20)</sup>

Είναι ευρύτατα διαδεδομένο στα ορυκτά και βρίσκεται ως συστατικό των ανατάση, βρουκίτη, ιλμενίτη, περοβοσκίτη, ρουτιλίου, τιτανίτη· από όλα αυτά τα ορυκτά μόνο το ρουτίλιο και ο ιλμενίτης έχουν κάποια οικονομική σημασία παρά το γεγονός ότι είναι δύσκολο να βρεθούν σε υψηλές συγκεντρώσεις.<sup>(18)</sup> Σημαντικά αποθέματα ιλμενίτου που

περιέχουν τιτάριο εντοπίζονται στη Δ. Αυστραλία, τον Καναδά, την Κίνα, τη Νέα Ζηλανδία, τη Νορβηγία, την Ινδία και την Ουκρανία. Επίσης τεράστιες ποσότητες ρουτίλιου ανευρίσκονται και εξορύσσονται στη Βόρειο Αμερική και τη Νότια Αφρική, οι οποίες συνεισφέρουν στην ετήσια παραγωγή 90.000 τόνων μετάλλου και 4.3 εκατομμυρίων τόνων διοξειδίου του τιτανίου. Τα συνολικά γνωστά αποθέματα τιτανίου υπολογίζονται γύρω στους 600 εκατομμύρια τόνους.<sup>(23)</sup>

Τιτάριο επίσης έχει βρεθεί ότι περιέχεται σε μετεωρίτες, άστρα αλλά και πετρώματα που εξορύχθηκαν από την επιφάνεια του φεγγαριού ως διοξείδιο του τιτανίου. Τέλος είναι συστατικό της στάχτης του άνθρακα, των φυτών αλλά ακόμη και του ανθρώπινου οργανισμού.

### Παραγωγή και Επεξεργασία

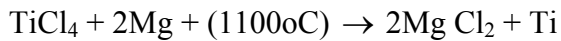
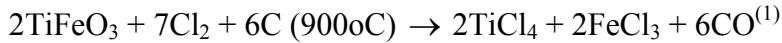
Η επεξεργασία του τιτανίου γίνεται σε τέσσερα στάδια.<sup>(27)</sup> Αναγωγή του τιτανίου (μεταλλεύματος) σε πορώδη σπόγγο, λιώσιμο – τήξη του σπόγγου, πρωτογενής επεξεργασία κατά την οποία οι ράβδοι τιτανίου μετατρέπονται σε πιο κατεργάσιμες μορφές όπως πλάκες, φύλλα, κύβους και δευτερογενής επεξεργασία τελικών μορφών από προϊόντα ελασμάτων.

Επειδή το μέταλλο αντιδρά με το οξυγόνο σε υψηλές θερμοκρασίες δεν μπορεί να παραχθεί από αναγωγή του διοξειδίου του ( $TiO_2$ ). Γι' αυτό το λόγο το μέταλλο παράγεται εμπορικά με τη διαδικασία Kroll, που είναι πολύπλοκη και ιδιαίτερα ακριβή. Κατά τη διάρκειά της, το οξείδιο πρωτογενώς μετατρέπεται σε χλωριούχο άλας με ανθρακοχλωρίνη μία διαδικασία κατά την οποία αέρια χλωρίνης περνούν πάνω από κόκκινο – ζεστό ρουτίλιο ή ιλμενίτη με την παρουσία άνθρακα για να σχηματίσει  $TiCl_4$  τετραχλωριούχο τιτάριο. Αυτό εξαγνίζεται με κλασματική απόσταξη και στη συνέχεια ανάγεται με  $800^\circ C$  λιωμένο μαγνήσιο σε ατμόσφαιρα αργού.<sup>(21)</sup>

Μια πιο σύγχρονη, αναπτυσσόμενη μέθοδος, η διαδικασία του Cambridge είναι πολύ πιθανό σταδιακά να αντικαταστήσει τη μέθοδο Kroll.<sup>(28)</sup> Αυτή η μέθοδος χρησιμοποιεί σκόνη διοξειδίου του τιτανίου ( $TiO_2$ ) που λαμβάνεται από το ρουτίλιο για να παρασκευάσει το τελικό προϊόν του σε μορφή σκόνης ή σπόγγου. Η διαδικασία του FFC Cambridge μπορεί να μετατρέψει προοδευτικά το τιτάριο σε ένα λιγότερο ακριβό και σπάνιο υλικό για την αεροδιαστημική βιομηχανία και την αγορά των τροφίμων πολυτελείας σε τέτοιο βαθμό που

βαθμιαία να αντικαταστήσει το αλουμίνιο ή τον σίδηρο σε πολλά προϊόντα όπου χρησιμοποιούνται τα μέταλλα αυτά.

Τα πιο ευρέως χρησιμοποιούμενα στη βιομηχανία κράματα τιτανίου κατασκευάζονται με αναγωγή. Για παράδειγμα το Χαλκοτιτάνιο (ρουτίλιο με χαλκό) σιδηροανθρακοτιτάνιο και το μαγγανοτιτάνιο είναι όλα προϊόντα αναγωγής.



Γύρω στα 50 είδη κραμάτων τιτανίου χρησιμοποιούνται στη Βιομηχανία παρά το γεγονός ότι μόνο γύρω στα 20 είναι εμπορικά διαθέσιμα.<sup>(29)</sup>

Η Διεθνής Ένωση Δοκιμής Υλικών αναγνωρίζει 31 είδη μεταλλικού τιτανίου και κραμάτων που από τα οποία τα 1 έως 4 είναι αμιγή (χωρίς προσμίξεις άλλων στοιχείων). Αυτά τα 4 είδη διακρίνονται από τις διάφορες βαθμίδες αντοχής, σαν απότοκο της περιεκτικότητας σε (O<sub>2</sub>) οξυγόνο, με το πρώτο είδος να είναι το πιο ελατό (περιεκτ. O<sub>2</sub> 0.18%) και το τέταρτο είδος το λιγότερο ελατό και όλκιμο (περιεκτ. O<sub>2</sub> 0.40%)<sup>(24)</sup> Τα υπόλοιπα είδη είναι κράματα τιτανίου, τα οποία είναι σχεδιασμένα για διάφορους σκοπούς, όπως αυξημένη ολκιμότητα, δύναμη – αντοχή, σκληρότητα, ηλεκτρική αγωγιμότητα, αντίσταση στην τριβή, αντίσταση στη διάβρωση από ειδικά διαλυτικά μέσα, ή συνδυασμούς των παραπάνω ιδιοτήτων.<sup>(30)</sup>

Τα είδη που αναγνωρίζονται από την Δ.Ε.Δ.Υ και άλλα κράματα παράγονται προκειμένου να ικανοποιούν τις απαιτούμενες προδιαγραφές της Αεροδιαστημικής Βιομηχανίας και του Στρατού, τα κριτήρια ISO, της ιατρικής επιστήμης και της βιομηχανίας γενικότερα<sup>(31)</sup>.

Σε ότι αφορά τη διαδικασία παραγωγής του, όλη η κατεργασία του τιτανίου πρέπει να γίνει σε ατμόσφαιρα αργού (Ar) ή ηλίου (He) με απώτερο σκοπό να προστατευτεί από την επιμόλυνση με ατμοσφαιρικά αέρια όπως το οξυγόνο, το άζωτο ή το υδρογόνο.<sup>(20)</sup> Η επιμόλυνση αυτή μπορεί να προκαλέσει μια ποικιλία καταστάσεων, όπως η ευθρυπτότητα, η οποία θα μειώσει την συνοχή των συγκολλήσεων και θα οδηγήσει σε αποτυχία της συνένωσης.

Το καθαρό, επίπεδο εμπορεύσιμο υλικό (πλάκες, φύλλα) μπορεί να μορφοποιηθεί εύκολα<sup>(32,33)</sup>, αλλά κατά την επεξεργασία του και μετά, πάντα πρέπει να λαμβάνεται υπόψη το γεγονός ότι το μέταλλο έχει «μνήμη» και τείνει να επανέλθει στην αρχική του μορφή.<sup>(20)</sup>

## Εφαρμογές

Το τιτάνιο είναι ένα υλικό που συχνά χρησιμοποιείται ως συστατικό του ατσαλιού (σιδηρο-τιτάνιο) για να μειωθεί το μέγεθος των κόκκων του κράματος όπως επίσης ως συστατικό του ανοξειδώτου χάλυβα προκειμένου να μειωθεί η περιεκτικότητά του σε άνθρακα. Επίσης το μέταλλο συχνά σχηματίζει κράμα με το αλουμίνιο, το βανάδιο, τον χαλκό (εξαιρετική σκληρότητα), τον σίδηρο, το μαγγάνιο, το μολυβδένιο και άλλα μέταλλα.<sup>(34)</sup> Εφαρμογές προϊόντων του τιτανίου ανευρίσκονται στην αεροδιαστημική βιομηχανία, την αγορά ειδών πολυτελείας, ενώ η σκόνη τιτανίου χρησιμοποιείται στην πυροτεχνική ως πηγή λαμπερών – φλεγόμενων σωματιδίων.

## TiO<sub>2</sub>

Περίπου το 95% του τιτανίου που εξορύσσεται από την γη προορίζεται για μετατροπή σε (TiO<sub>2</sub>) διοξείδιο του τιτανίου, μια έντονα άσπρη χρωστική σε μορφή σκόνης που χρησιμοποιείται σε χρώματα, μπογιές, χαρτί, οδοντόπαστες και πλαστικά κάθε είδους.<sup>(35)</sup> Χρησιμοποιείται ακόμη στο τσιμέντο, ως οπτική αδιαφάνεια στο χαρτί, ως ενισχυτικός παράγοντας στον γραφίτη, στα μπαστούνια του γκολφ και στα καλάμια ψαρέματος.<sup>(36)</sup>

Το διοξείδιο του τιτανίου είναι ευρέως γνωστό ως τιτανία ή οξείδιο του τιτανίου το οποίο είναι η ένωση του τιτανίου που προκύπτει και στη φύση όπου το μέταλλο οξειδώνεται. Όταν χρησιμοποιείται ως χρωστική αναφέρεται ως άσπρο τιτάνιο, ενώ όταν χρησιμοποιείται ως χρωστική τροφών αναφέρεται με το κωδικό όνομα E 171.

Το διοξείδιο του τιτανίου προκύπτει από τα ορυκτά ρουτίλιο, ανατάση και βρουκίτη.<sup>(37,38)</sup> Από τα τρία ορυκτά το ρουτίλιο είναι το πιο συχνά απαντώμενο στη φύση ενώ τα άλλα δύο ορυκτά μπορούν να μετατραπούν σε ρουτίλιο μετά από θέρμανση.<sup>(39)</sup> Τα φυσικά απαντώμενα οξείδια του μετάλλου μπορούν όταν εξορυχτούν να χρησιμοποιούνται σαν πηγές για την παρασκευή του τιτανίου που χρησιμοποιείται στο εμπόριο. Το οξείδιο του τιτανίου είναι η πιο ευρέως χρησιμοποιούμενη άσπρη χρωστική εξ αιτίας της λαμπρότητάς της. Υπολογίζεται ότι περίπου 4 εκατομμύρια τόνοι χρωστικού TiO<sub>2</sub> καταναλώνονται κάθε χρόνο ανά τον κόσμο. Επίσης το TiO<sub>2</sub> είναι πολύ αποτελεσματικό όπου χρησιμοποιείται, σε μορφή σκόνης, για να προσδώσει αδιαφάνεια και λευκότητα σε πολλά προϊόντα όπως: βαφές, πλαστικά, χαρτικά, μελάνια, τρόφιμα, φάρμακα (χάπια και ταμπλέτες) όπως επίσης και σε οδοντόβουρτσες.

Όταν χρησιμοποιείται ως λευκαντικό στα τρόφιμα έχει τον κωδικό αριθμό E 171. Το υλικό συχνά χρησιμοποιείται για να λευκάνει το αποβουτυρωμένο γάλα ενώ έχει αποδειχτεί στατιστικά ότι κάνει το αποβουτυρωμένο γάλα πιο εύγεστο.<sup>(40)</sup>

Στη κοσμητική και τα προϊόντα δέρματος χρησιμοποιείται τόσο ως χρωστική όσο και ως συστατικό των αντηλιακών κρεμών εξ αιτίας της ιδιότητας που έχει να απορροφά την υπεριώδη ακτινοβολία και να μη διασπάται ή να αποχρωματίζεται από την ακτινοβολία αυτή. Αυτές οι ιδιότητές του τού εντείνουν τη σταθερότητά του και τελικά την ικανότητα να προστατεύει αποτελεσματικά το ανθρώπινο δέρμα από την τόσο επιβλαβή ακτινοβολία. Τα αντηλιακά προϊόντα που έχουν σχεδιαστεί για βρέφη ή για ανθρώπους με εξαιρετικά ευαίσθητο δέρμα συχνά βασίζονται στο διοξείδιο του τιτανίου ή / και στο οξείδιο του ψευδαργύρου (Z ή O) καθώς αυτά τα φυσικά προϊόντα είναι πιο απίθανο να προκαλέσουν δερματικούς ερεθισμούς συγκρινόμενα με χημικές ουσίες που απορροφούν την υπεριώδη ακτινοβολία όπως η αβονδαλύνη.

Το διοξείδιο του τιτανίου χρησιμοποιείται ακόμη ως ημιαγωγός. Ειδικότερα στη μορφή του ανατάση, είναι εξαιρετικός φωτοκαταλύτης κάτω από την υπεριώδη ακτινοβολία και ύστερα από ειδική κατεργασία χρησιμοποιείται ως φωτοκαταλύτης ακόμα και στο φάσμα του ορατού φωτός. Οι ιδιότητές του αυτές, ως φωτοκαταλύτου, ανακαλύφθηκαν από τον Akira Fujishima το 1972<sup>(41)</sup> γι' αυτό και η διαδικασία που συμβαίνει στην επιφάνειά του πήρε το όνομα του Ιάπωνα ερευνητή.<sup>(42)</sup> Στην παραγωγή ενέργειας ως φωτοκαταλύτης επιτελεί τις παρακάτω λειτουργίες: α) καταλύει την υδρόλυση<sup>(18)</sup> (χημική αντίδραση κατά την οποία το H<sub>2</sub>O διασπάται σε O<sub>2</sub> και H<sub>2</sub>) β) παράγει ηλεκτρισμό όταν βρίσκεται υπό μορφή πολύ μικρών σωματιδίων (nanoparticles).

Το 1995 το Ερευνητικό Ινστιτούτο του Τότο ανακάλυψε τον υπέρυδροφιλικό φαινόμενο για το γυαλί που είχε επικαλυφθεί με TiO<sub>2</sub> και εκτέθηκε στο φως. Η ανακάλυψη αυτή του Καθηγητή Fujishima και της ερευνητικής του ομάδας είχε ως αποτέλεσμα την ανάπτυξη του αυτοκαθαριζόμενου γυαλιού. Το TiO<sub>2</sub> όταν ενσωματώνεται σε υλικά που χρησιμοποιούνται στο εξωτερικό των κτιρίων μπορεί να μειώσει τις συγκεντρώσεις των αερίων που μολύνουν την ατμόσφαιρα όπως τα οξείδια του αζώτου.<sup>(43)</sup>

Μια άλλη, εξαιρετικά πολύτιμη για το περιβάλλον, χρήση του TiO<sub>2</sub> είναι αυτή κατά την οποία χρησιμοποιείται σαν μέσο του βιολογικού καθαρισμού των βιομηχανικών αποβλήτων. Αλλά και στην Ιατρική επιστήμη και πολλές ειδικότητες αυτής όπως η Ορθοπαιδική, η Νευροχειρουργική, η Γναθοπροσωπική Χειρουργική, η Οδοντιατρική κ.α. το TiO<sub>2</sub> είναι αυτό

που επιτρέπει την οστεοενσωμάτωση του εμφυτεύματος Τιτανίου στο οστόν, όπου τοποθετείται. Ειδικότερα στην οδοντιατρική, πέραν των οστεοενσωματούμενων εμφυτευμάτων, πρόσφατα το  $TiO_2$  ενσωματώθηκε ως φωτοκαταλύτης στα προϊόντα λεύκανσης των οδόντων. Με τη χρήση αυτή, επιτρέπει την εφαρμογή υπεροξειδίου του υδρογόνου ως λευκαντικού παράγοντα σε χαμηλότερες συγκεντρώσεις και μ' αυτό τον τρόπο πιστεύεται πως επιτυγχάνεται το ίδιο ή παρόμοιο λευκαντικό αποτέλεσμα με πολύ πιο ήπιες παρενέργειες.<sup>(44)</sup>

Τέλος στις ιστορικές χρήσεις του  $TiO_2$  πρέπει να αναφερθεί και η χρησιμοποίησή του στην βαφή του πυραύλου Saturn V (Κρόνος 5) που έως σήμερα είναι το μοναδικό σκάφος που τεκμηριωμένα έχει μεταφέρει ανθρώπινα όντα στο φεγγάρι.

### **Εφαρμογές του Τι στην αεροδιαστημική και ναυπηγική Βιομηχανία**

Εξαιτίας της εξαιρετικά υψηλής τους αναλογίας αντοχής – πυκνότητας, της μεγάλης τους αντοχής στη διάβρωση,<sup>(17)</sup> και της ικανότητας να αντιστέκονται στην κατεργασία σε πολύ υψηλές θερμοκρασίες χωρίς να παραμορφώνονται, τα κράματα του Τι χρησιμοποιούνται στην κατασκευή αεροσκαφών, θωράκισης τεθωρακισμένων, πλοίων του πολεμικού ναυτικού, διαστημοπλοίων αλλά και πυραυλικών συστημάτων.<sup>(18)</sup> Για αυτές τις εφαρμογές το τιτάνιο σχηματίζοντας κράματα με το αλουμίνιο, το βανάδιο και άλλα στοιχεία χρησιμοποιείται για την κατασκευή μιας ποικιλίας εξαρτημάτων μεταξύ των οποίων δομικά μέρη μηχανών κριτικής σημασίας, υδραυλικά συστήματα, συστήματα προσγείωσης αεροσκαφών, εξατμίσεων. Στην πραγματικότητα, περίπου τα 2/3 του συνόλου του Τι που παράγεται παγκοσμίως χρησιμοποιείται για την κατασκευή μηχανών αεροσκαφών και άλλων τμημάτων των αεροσκαφών.<sup>(24)</sup> Εκτός από τα αεροσκάφη, τιτάνιο χρησιμοποιείται στη κατασκευή προπελών αλλά και ολόκληρων υποβρυχίων και διαφορών τμημάτων των διαστημοπλοίων εξαιτίας της μεγάλης του αντοχής στη διάβρωση, στην καταπόνηση από δυνάμεις και το σχετικά μικρό βάρος του αναλογικά με τη μάζα του.<sup>(45)</sup>

### **Βιομηχανικές χρήσεις του Τιτανίου**

Το τιτάνιο χρησιμοποιείται στη χημική και πετροχημική Βιομηχανία πρωταρχικά λόγω της υψηλής αντίστασής του στη διάβρωση. Ειδικά κράματα του μετάλλου χρησιμοποιούνται στην

υδρομεταλλουργεία του νικελίου εξαιτίας της υψηλής τους αντοχής στις δυνάμεις καταπόνησης, αντοχής στη διάβρωση και στο συνδυασμό τους (τιτάνιο Beta C). Στη βιομηχανία χαρτιού το μέταλλο χρησιμοποιείται ως δομικό τμήμα της διαδικασίας παραγωγής χαρτιού σε μέρη αυτής που έρχονται σε επαφή με διαβρωτικά μέσα όπως το υποχλωριώδες  $\text{Na}^+$  και την υγρή αέρια χλωρίνη.<sup>(46)</sup>

### Καλές Τέχνες – Αρχιτεκτονική

Το τιτάνιο χρησιμοποιείται ακόμη σε αυτοκινητιστικές και μοτοσυκλετιστικές εφαρμογές, όπως σε αγωνιστικά οχήματα όπου η μείωση του βάρους είναι αποφασιστικής σημασίας ενώ παράλληλα το ζητούμενο είναι να διατηρείται η υψηλή αντοχή και η σταθερότητα του σκελετού του οχήματος. Το μέταλλο βέβαια είναι αρκετά ακριβό ώστε να χρησιμοποιηθεί στη γραμμή παραγωγής των αυτοκινητοβιομηχανιών. Στο μοντέλο της Corvette του 2006 η εξάτμιση και κάποια άλλα τμήματα του κινητήρα είναι κατασκευασμένα από κράμα τιτανίου.<sup>(47)</sup>

Το μέταλλο χρησιμοποιείται για την κατασκευή πολλών αθλητικών ειδών όπως ρακετών του τένις, μπαστουνιών του golf, του κρίκετ, του hockey, των κρανών του αμερικανικού ποδοσφαίρου και ακτίνων ποδηλάτου υψηλής ποιότητας. Ακόμη το χρησιμοποιούν για την κατασκευή σκελετών οπτικών, όπου προσδίδει αντοχή, μικρό βάρος και πολύ καλή ανεκτικότητα από το δέρμα, που είναι άλλωστε και τα κυριότερα πλεονεκτήματά του, σε σχέση με τα άλλα μέταλλα. Εξαιτίας της πραγματικά αξιοθαύμαστης αντοχής αλλά και ευκολίας στην κατεργασία του, τα τελευταία χρόνια, το μέταλλο έχει γίνει πολύ δημοφιλές ανάμεσα στους καλλιτέχνες και στους τεχνίτες κοσμημάτων. Το τιτάνιο παρουσιάζει την ιδιότητα να μπορεί να σφυρηλατείται, να κάμπτεται, να κυρτώνεται χωρίς να χάνει την αντοχή του. Η βιοσυμβατότητα και η υποαλλεργικότητά του το κάνουν ιδανικό υλικό για την κατασκευή ρολογιών, κοσμημάτων που καλύπτουν μεγάλη επιφάνεια του δέρματος. Αλλά και η αντίστασή του στη διάβρωση όπως και το καλαίσθητο μεταλλικό του χρώμα το καθιστούν θαυμάσιο υλικό για την κατασκευή πολλών ειδών από κοσμήματα έως ιατρικά εμφυτεύματα και προθέσεις.<sup>(48)</sup>

Το τιτάνιο, περιστασιακά, έχει χρησιμοποιηθεί σε αρχιτεκτονικές εφαρμογές όπως το άγαλμα εις μνήμην του Yuri Gagarin, ύψους 40 μέτρων, που βρίσκεται στη Μόσχα και φιλοτεχνήθηκε από τιτάνιο<sup>(49)</sup> όχι μόνο για το λαμπρό του χρώμα αλλά και λόγω της



ιδιαίτερης σχέσης του μετάλλου με την κατασκευή πυραύλων. Κτίρια όπως το Μουσείο Guggenheim στο Μπιλμπάο της Ισπανίας, το κτίριο Fredoric Hamilton στο Denver<sup>(50)</sup> αλλά και το μνημείο 107 μέτρων ύψους, των κατακτητών του Διαστήματος στη Μόσχα όλα περιβάλλονται από Τιτάνιο.

Τα χαρακτηριστικά και ιδιαίτερα πλεονεκτήματά του το καθιστούν ακόμη πολύτιμο και στην σπλοβιομηχανία. Πρωτογενείς κατασκευές αποτελούν οι σκελετοί πιστολιών και κύλινδροι revolver.

### **Το Τιτάνιο στην Ιατρική**

Λόγω της εξαιρετικής βιοσυμβατότητάς του, το Τιτάνιο χρησιμοποιείται σε μια πλειάδα ιατρικών εφαρμογών, συμπεριλαμβανομένων των χειρουργικών προθέσεων και των εμφυτευμάτων, όπως μηριαίες κεφαλές και κοτύλες ισχύου (ολική αρθροπλαστική του ισχύου) οι οποίες μπορούν να παραμείνουν στη θέση τους παραπάνω από 20 έτη. Το τιτάνιο έχει τη μοναδική ιδιότητα να οστεοενσωματώνεται, επιτρέποντας έτσι την τοποθέτηση των οδοντικών οστεοενσωματούμενων εμφυτευμάτων στα οστά των γνάθων τα οποία μπορούν να παραμείνουν στη θέση τους για πάνω από 30 χρόνια. Η ιδιότητα αυτή φυσικά είναι χρήσιμη και για τα ορθοπεδικά εμφυτεύματα και υλικά οστεοσύνθεσης (υλικά αποκατάστασης των καταγμάτων).<sup>(51)</sup>

Θεωρώντας γνωστή και δεδομένη την ιδιότητά του να μη μαγνητίζεται, από τη Χημεία (παραμαγνητική ουσία) οι ασθενείς με υλικά τιτανίου μπορούν να υποβληθούν με απόλυτη ασφάλεια σε εξέταση μαγνητικού συντονισμού. Η προετοιμασία του Τιτανίου προκειμένου να εμφυτευθεί στον οργανισμό περιλαμβάνει την έκθεσή του σε πολύ υψηλή θερμοκρασία, κατεργασία η οποία αφαιρεί τα άτομα από την επιφάνεια του μορίου του, εκθέτοντας το τιτάνιο, το οποίο σε ελάχιστο χρόνο οξειδώνεται.<sup>(51)</sup> Το μέταλλο ακόμη χρησιμοποιείται για την κατασκευή χειρουργικών εργαλείων απαραίτητων στην υπό αξονικό τομογράφο καθοδηγούμενη χειρουργική, όπως επίσης στην κατασκευή αναπηρικών αμαξιδίων και σε πολλά άλλα προϊόντα που χρησιμοποιούνται στην ιατρική όπου ο συνδυασμός υψηλής αντοχής σε καταπόνηση και μικρού σχετικά βάρους είναι απαραίτητος.

## **Χρήσεις του Τιτανίου ειδικότερα στη Στοματο-Γναθο-Προσωπική Χειρουργική**

Η Στοματική και Γναθοπροσωπική Χειρουργική είναι η μοναδική Ιατρική Ειδικότητα η άσκηση της οποίας προϋποθέτει την θεωρητική κατάρτιση δύο Επιστημών: της Ιατρικής και της Οδοντιατρικής. Ανάμεσα στα πολυάριθμα αντικείμενα της Ειδικότητας εξέχουσα θέση κατέχουν η Τραυματολογία, η διόρθωση Κρανιοπροσωπικών δυσμορφιών με την Ορθογναθική Χειρουργική και η αποκατάσταση των Ογκολογικών ελλειμμάτων. Τα τελευταία χρόνια ακόμη μεγάλη και ευρεία εφαρμογή γνωρίζουν τα οδοντικά οστεοενσωματούμενα εμφυτεύματα που χρησιμοποιούνται για την αποκατάσταση των οδοντικών ελλειμμάτων των φραγμών.

Σε όλα τα παραπάνω αντικείμενα η χρήση του τιτανίου έχει γίνει στη σύγχρονη Στοματική και Γναθοπροσωπική Χειρουργική απαραίτητη. Οι βασικές αρχές της ορθής αντιμετώπισης των κατάγμάτων είναι οι: α) Ανάταξη β) Ακινητοποίηση. Με τον όρο οστεοσύνθεση εννοούμε την τοποθέτηση των κατεαγόντων άκρων του οστού σε σωστή θέση και την ακινητοποίησή τους στη θέση αυτή με τη χρήση διαφόρων μέσων (όπως συρμάτων, πλακών, βιδών, πλεγμάτων) με απώτερο σκοπό την σωστή πώρωση του κατάγματος. Τα μέσα αυτά που στη Σύγχρονη Στοματική και Γναθοπροσωπική Χειρουργική αποτελούνται σχεδόν αποκλειστικά από καθαρό τιτάνιο χρησιμοποιούνται ακόμη: για την αποκατάσταση – γεφύρωση μεγάλων ελλειμμάτων που προκύπτουν ύστερα από Ογκολογική Χειρουργική επέμβαση, για την ακινητοποίηση των οστών στη νέα τους θέση μετά από επέμβαση Ορθογναθικής Χειρουργικής, για την αρθροπλαστική της Κροταφογναθικής διαρθρώσεως και ως οδοντικά οστεοενσωματούμενα εμφυτεύματα.

Το καθαρό τιτάνιο όπως προαναφέρθηκε έχει τέτοιες ιδιότητες που το καθιστούν ιδανικό υλικό για εμφύτευση και χρήση ως υλικού οστεοσύνθεσης, αυτές είναι: εξαιρετική βιοσυμβατότητα, μεγάλη ελαστικότητα, υψηλή αντοχή στις μηχανικές καταπονήσεις, μεγάλη αντοχή στη διάβρωση αφού σχηματίζει επιφανειακή – προστατευτική στοιβάδα οξειδίου του τιτανίου ( $TiO_2$ ), ευκολία κύρτωσης, καλή ακτινολογική απεικόνιση, δεν επηρεάζεται από την εξέταση του μαγνητικού συντονισμού ούτε δημιουργεί περιοχές που είναι δύσκολο να διαβαστούν στην αξονική τομογραφία (artifacts).

Παρόλα αυτά είναι σημαντικό ν' αναφερθεί ότι σε ότι αφορά την επίδραση του τιτανίου και των οξειδίων του, που σχηματίζονται όταν αυτό εμφυτευθεί στα οστά, στα κύτταρα του αίματος (εισέρχεται στην αιματική κυκλοφορία) δεν υπάρχει ικανός αριθμός μελετών στη

διεθνή βιβλιογραφία που να διαμορφώνει άποψη υπέρ ή κατά της κυτταροτοξικότητας στα κύτταρα αυτά ή σε άλλους ιστούς.

Οι πλάκες του τιτανίου συγκρατούν τα κατεαγότα τμήματα του οστού στη σωστή θέση, αντιρροπούν τις ασκούμενες δυνάμεις και είναι δυνατόν να φέρουν συγχρόνως φορτίο. Είναι διαθέσιμες σε διάφορα μεγέθη, αριθμό οπών και σχήματα η δε ονοματολογία τους προέρχεται από τη διάμετρο των βιδών που χρησιμοποιούνται. Έτσι διακρίνουμε α) Διφλοιωδικές 2.4mm, 2.3mm β) μονοφλοιωδικές 1.0mm, 1.3mm, 1.5mm, 1.7mm, 2.0mm, γ) πλάκες γεφύρωσης αποκατάστασης (reconstruction) 2.4mm, 2.7mm. Οι πλάκες συγκρατούνται στη θέση τους με βίδες (επίσης από τιτάνιο) που κοχλιώνονται στα οστά. Ακόμη υπάρχουν στο εμπόριο και πλέγματα τιτανίου που τοποθετούνται προκειμένου να καλυφθεί ένα οστικό έλλειμμα όταν η γεφύρωση με πλάκες δεν αρκεί (π.χ. έδαφος του οφθαλμικού κόγχου, μετωπιαίο οστόν κ.α.).

Επειδή η μακροχρόνια επίδραση του Τιτανίου και των οξειδίων τους στους ιστούς και το αίμα δεν έχει εκτενώς μελετηθεί πολλοί χειρουργοί προχωρούν στην αφαίρεση των υλικών οστεοσύνθεσης αφού επέλθει η πάρωση των καταγμάτων (πρακτικά μετά από 12 μήνες τουλάχιστον) και οπωσδήποτε των μεγάλων και ισχυρών πλακών (πάνω από 2.0mm). Ένας επιπλέον λόγος είναι ότι όταν η πλάκα παραμένει για μεγάλο χρονικό διάστημα μετά την πάρωση του οστού τότε απορροφά δυσανάλογα μεγάλες δυνάμεις φόρτισης και αυτό μπορεί να οδηγήσει στην οστεοπόρωση και τελικά στην θραύση του οστού (phenomenon stress shielding).

Φυσικά, είναι ευνόητο ότι δεν είναι δυνατή η αφαίρεση των οστεοενσωματούμενων εμφυτευμάτων, αφού αυτά υποκαθιστούν τις ρίζες των οδόντων που έχουν απολεστεί και θα παραμείνουν στη θέση τους για δεκάδες χρόνια, σε πολλές περιπτώσεις ασθενών και εφ' όρου ζωής.<sup>(52)</sup>

### **Ενώσεις του Τιτανίου και Ισότοπα**

Το τετρασθενές τιτάνιο ( $Ti^{+4}$ ) είναι η μορφή που κυριαρχεί στη χημεία του μετάλλου αλλά ενώσεις του όπου βρίσκεται με σθένος ( $Ti^{+3}$ ) τρία είναι επίσης συχνά απαντώμενες.<sup>(21)</sup> Μερικές από τις πιο συχνά απαντώμενες ενώσεις του τιτανίου είναι: διοξείδιο του τιτανίου ( $TiO_2$ ), ( $TiCl_4$ ) τετραχλωριούχο τιτάνιο, τριχλωριούχο τιτάνιο ( $TiCl_3$ ) και το αζωτούχο ( $TiN$ ). Τα ισότοπα του μετάλλου είναι  $^{46}Ti$ ,  $^{47}Ti$ ,  $^{48}Ti$ ,  $^{49}Ti$ , και  $^{50}Ti$  με το  $^{48}Ti$  να αποτελεί το

κυριότερο και συχνότερο ισότοπο του μετάλλου που απαντάται στη φύση (73,8%). Έντεκα ραδιοσότοπα αυτού έχουν εντοπιστεί στη φύση με χρόνο ημίσειας ζωής που ποικίλει από δευτερόλεπτα έως 63 χρόνια. <sup>(22)</sup> Τα μέταλλα σκάνδιο και βανάδιο βρίσκονται πριν και μετά αντίστοιχα από το τιτάνιο στον περιοδικό πίνακα.

### Προφυλάξεις

Το καθαρό τιτάνιο είναι ένα μέταλλο μη τοξικό ακόμη και σε αρκετά υψηλές δόσεις. Υπολογίζεται ότι περίπου 0.8mgf τιτάνιο πέπτονται καθημερινά από τον άνθρωπο αλλά το περισσότερο αποβάλλεται χωρίς να απορροφηθεί. Παρ' όλα αυτά παραμένει ως αντικείμενο έρευνας αν το τιτάνιο που εγκαθίσταται μόνιμα στον οργανισμό έχει ιδιότητες κυτταροτοξικές σε διάφορους ιστούς είτε ως καθαρό μέταλλο είτε ως οξείδιο. Ένας άγνωστος έως σήμερα μηχανισμός μεταβολισμού των φυτών μπορεί να χρησιμοποιεί τιτάνιο για να διεγείρει την παραγωγή υδρογονανθράκων και να επάγει την κυτταρική αύξηση. Αυτή η γνώση είναι δυνατό να εξηγήσει γιατί τα περισσότερα φυτά περιέχουν 1ppm τιτανίου, ενώ η τσουκνίδα περιέχει 80ppm!!<sup>(51)</sup>

Σε μορφή σκόνης, το τιτάνιο είναι υλικό εύφλεκτο, όπου δέ θερμαίνεται στον αέρα ελλοχεύει ο κίνδυνος έκρηξης. Τα πυροσβεστικά μέσα που χρησιμοποιούν νερό ή CO<sub>2</sub> δεν είναι αποτελεσματικά έναντι του τιτανίου<sup>(18)</sup>. Ακόμη όταν χρησιμοποιείται στην παραγωγή η την επεξεργασία της χλωρίνης πρέπει να δίνεται μεγάλη προσοχή ώστε να μη εκτεθεί σε ξηρό αέρα χλωρίνης διότι υπάρχει ο κίνδυνος πυρκαγιάς τιτανίου χλωρίνης. Επίσης εύφλεκτο είναι και όταν έρθει σε επαφή με το υγρό οξυγόνο (O<sub>2</sub>) , όταν ακόμη το τιτάνιο δεν έχει οξειδωθεί εξωτερικά. Τα άλατα του τιτανίου θεωρούνται σχετικά ακίνδυνα εκτός από τα χλωριούχα άλατά του, όπως το TiCl<sub>2</sub>, το TiCl<sub>3</sub> και το TiCl<sub>4</sub>, που έχουν παρουσιάσει αρκετούς ασυνήθιστους κινδύνους. Όλα τα χλωριούχα άλατα του τιτανίου είναι διαβρωτικά.

### Τιτάνιο και αιμοπετάλια - Κυτταροτοξικότητα

Τα αιμοπετάλια είναι κύτταρα του αίματος που αφενός επιτελούν μεγάλης σημασίας λειτουργίες για τη συνέχιση του φαινομένου της ζωής (αιμόσταση, επούλωση) και αφετέρου έχουν κεντρικό ρόλο στην Χειρουργική αφού χάρη σ' αυτά σχηματίζεται ο πρωτογενής (λευκός) αιμοπεταλιακός θρόμβος και γίνεται έτσι δυνατή η αιμόσταση μετά τα τραύματα

που προκαλούν οι χειρουργικές επεμβάσεις. Στη σύγχρονη Ιατρική γίνεται όλο και περισσότερο δυνατή η χρήση συνθετικών υλικών με απώτερο σκοπό την αναπλήρωση κάποιων δομών του οργανισμού που είτε καταστράφηκαν από τη φθορά που επιφέρει ο χρόνος είτε βίαια διαταράχθηκε η ακεραιότητά τους από εξωγενείς παράγοντες. Ανάμεσα στα υλικά που χρησιμοποιούνται για το σκοπό αυτό κεντρική θέση κατέχει το Τιτάνιο. Κάποια μέταλλα είναι γνωστοί αναστολείς της συσσώρευσης των αιμοπεταλίων όπως το Κάδμιο (Cd)<sup>(53)</sup>, ο Μόλυβδος<sup>(53)</sup>, το μαγνήσιο (Mg)<sup>(54)</sup> ενώ άλλα μέταλλα όπως το αλουμίνιο (Al)<sup>(55)</sup>, ο ψευδάργυρος (Zn)<sup>(56)</sup> και το ασβέστιο (Ca)<sup>(57)</sup> επάγουν τη συσσώρευση των αιμοπεταλίων in vivo.

*Ένα αρχικό ερώτημα που προκύπτει είναι εάν το τιτάνιο προκαλεί κάποια μεταβολή στη διέγερση και στη συσσώρευση των αιμοπεταλίων, αφού και πολύ συχνά χρησιμοποιείται και πολλά χρόνια παραμένει στον ανθρώπινο οργανισμό. Επίσης εξαιρετικό ενδιαφέρον παρουσιάζει και το ερώτημα αν κατά πόσο το σχηματιζόμενο από το τιτάνιο οξείδιο (TiO<sub>2</sub>) όταν εμφυτεύεται στα οστά μπορεί να επηρεάσει τον προγραμματισμένο κυτταρικό θάνατο (απόπτωση) ή να είναι κυτταροξικό.*

Οι απαντήσεις στα ερωτήματα αυτά αποτελούν και τους στόχους της διατριβής αυτής. Ενώ για το πρώτο ερώτημα τα αποδεικτικά στοιχεία που προκύπτουν από τη διεθνή βιβλιογραφία είναι αντικρουόμενα, κάτι που κάνει το ερώτημα πιο ενδιαφέρον, σε ότι αφορά το δεύτερο υπάρχει μάλλον σύμπνοια των έως σήμερα διαμορφωμένων απόψεων.

Ερευνητές υποστηρίζουν ότι ύστερα από σταθερή ενδομυελική ήλωση σε ασθενείς που χειρουργήθηκαν για την αποκατάσταση καταγμάτων του μηριαίου οστού δεν παρατηρήθηκε καμία στατιστικά σημαντική διαφορά στη συγκέντρωση του τιτανίου στον ορό του αίματος των αρρώστων σε ένα έτος.<sup>(58)</sup> Αντίθετα άλλοι ερευνητές αποκάλυψαν ότι σε μετρήσεις που έκαναν μεταξύ ασθενών που είχαν χειρουργηθεί για την αποκατάσταση καταγμάτων σπονδύλων με σπονδυλοδεσία, αυτοί στους οποίους είχε χρησιμοποιηθεί τιτάνιο είχαν συγκέντρωση του μετάλλου στον ορό μεγαλύτερη, σε βαθμό στατιστικά σημαντικό, από άλλους που χρησιμοποιήθηκαν ως ομάδα ελέγχου, 26 μήνες μετά το χειρουργείο.<sup>(59,60)</sup> Παρόμοια αποτελέσματα παρουσιάστηκαν και σε ασθενείς που είχαν υποβληθεί σε ολική αρθροπλαστική με προθέσεις τιτανίου και συγκρίθηκαν με υγιείς εθελοντές.<sup>(61-64)</sup>

Η κυτταροτοξικότητα του TiO<sub>2</sub> φαίνεται να θεμελιώνεται σε αρκετές έρευνες, τα πορίσματα των οποίων όμως διαφέρουν ανάλογα με τις κυτταρικές σειρές που χρησιμοποιήθηκαν. Έτσι όταν TiO<sub>2</sub> (ρουτιλίου) δόθηκε ενδοτραχειακά με ρεύμα αέρα σε Wistar αρουραίους

παρατηρήθηκε φλεγμονώδης αντίδραση των αεροφόρων οδών, πνευμονικό και καρδιακό οίδημα και συστηματική φλεγμονώδης αντίδραση. Σημαντική επίσης ήταν και η επίδραση του  $\text{TiO}_2$  στα αιμοπετάλια των ζώων αφού έγινε επαγωγή της συσσώρευσής τους τόσο *in vivo* όσο και *in vitro*.<sup>(65)</sup>

Άλλοι ερευνητές κατέληξαν στο συμπέρασμα ότι τα σωματίδια  $\text{TiO}_2$  επάγουν τις αποπτωτικές και τις νεκρωτικές διαδικασίες στο κύτταρο όταν σε κυτταρολοκαλιέργιες μονοβλαστών U937 πρόσθεσαν εναιώρημα διοξειδίου του  $\text{TiO}_2$  και παρατήρησαν την επίδρασή του για 24 και 48h αντίστοιχα.<sup>(66)</sup>

Επιβεβαίωση των παραπάνω αποτελεσμάτων έγινε και από μία άλλη ερευνητική ομάδα που εξέθεσε κύτταρα καλλιέργειας βρογχικού επιθηλίου ανθρώπου σε μικροσωματίδια  $\text{TiO}_2$ . Παρατηρήθηκε αυξημένο οξειδωτικό stress, κυτταρικός θάνατος που είχε τους χαρακτήρες της αποπτωτικής διαδικασίας και υπερέκφραση των γονιδίων που κωδικοποιούν για της ιντερλευκίνες IL-1, IL-6, IL-8 και τον TNF-a.<sup>(67)</sup>

Παρά τα παραπάνω, υπάρχουν και μελέτες που δείχνουν ότι το  $\text{TiO}_2$  δεν αποτελεί υλικό κυτταροτοξικό για τα πειραματόζωα όταν χρησιμοποιείται σε μικρές δόσεις ενδοφλεβίως της τάξης των 5mg/kg. Σε μια τέτοια μελέτη επιλέχθηκαν ζώα ράτσας Wistar (αρουραίοι) στους οποίους χορηγήθηκε η προαναφερθείσα δόση  $\text{TiO}_2$  ενδοφλεβίως και στη συνέχεια με συνεχείς βιοψίες και αιμοληψίες μετρήθηκε η φαρμακοκινητική και η βιοθεσιμότητα της ουσίας για 1, 14 και 28 ημέρες αντίστοιχα.<sup>(68)</sup>

Ενώ στο ηπατικό παρέγχυμα η συγκέντρωση της ουσίας παρέμεινε η ίδια μετά από 28 ημέρες, υπήρχε μικρή μείωση στον σπλήνα και επάνοδος στις τιμές των ζώων της ομάδας ελέγχου στους πνεύμονες και στους νεφρούς. Στα κύτταρα του αίματος στο πλάσμα, τον εγκέφαλο και τους λεμφαδένες δεν υπήρξε ανιχνεύσιμο  $\text{TiO}_2$  ούτε καν κατά τη διάρκεια της πρώτης ημέρας.<sup>(69)</sup>

**ΣΚΟΠΟΣ**

Σκοπός αυτής της έρευνας ήταν να μελετηθούν τα αποτελέσματα της επίδρασης του τιτανίου που χρησιμοποιείται στην Ιατρική και ειδικότερα στη Γναθοπροσωπική Χειρουργική ως μετάλλου κατασκευής υλικών οστεοσύνθεσης και εμφυτευμάτων, στη λειτουργικότητα των αιμοπεταλίων. Παράλληλα σε εργαστηριακό επίπεδο μελετήθηκε η επίδραση του διοξειδίου του Τιτανίου ( $TiO_2$ ), που σχηματίζεται όταν το τιτάνιο έρθει σε επαφή με τους ιστούς και τα βιολογικά υγρά, στον κυτταρικό πολλαπλασιασμό όπως επίσης και το αν και κατά πόσο αποτελεί μια ένωση κυτταροτοξική.





## **2. ΥΛΙΚΟ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΣ**

Η έρευνα διεξήχθη σε δύο επίπεδα: α) Σε εθελοντές οι οποίοι έφεραν προθέσεις τιτανίου β) Σε εργαστηριακό χώρο, σε κυτταροκαλλιέργειες φυσιολογικών ινοβλαστών, λειομυοσαρκωματικών κυττάρων από Wistar rats, όπως και κυττάρων αδενοκαρκινώματος μαστού, μελετήθηκαν: i) Η επίδραση του τιτανίου στη διέγερση και συσσώρευση των αιμοπεταλίων με την χρήση της μεθόδου PFA-100 ii) Η επίδραση του  $TiO_2$  σε κυτταροκαλλιέργειες φυσιολογικών και νεοπλασματικών κυττάρων σε ότι αφορά την κυτταροτοξικότητά του και τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό.

### **2.1 Ομάδα υγιών αιμοδοτών**

Προκειμένου να μελετηθεί η επίδραση του  $Ti$  στη συσσώρευση των αιμοπεταλίων, ως ομάδα ελέγχου χρησιμοποιήθηκαν 41 υγιείς αιμοδότες που εξετάστηκαν από το προσωπικό του τμήματος Αιμοδοσίας – Αιμόστασης του Ιπποκρατείου Γενικού Νοσοκομείου Αθηνών με τη μέθοδο ελέγχου της λειτουργικότητας των αιμοπεταλίων με τον αναλυτή PFA-100, που αποτελεί την παγκοσμίως πιο αποδεκτή μέθοδο διαλογής (screening test) της λειτουργικότητας των αιμοπεταλίων. Πρέπει να αναφέρουμε ότι από τα 41 άτομα που μετρήθηκαν, τα 7 (17%) αποκλείστηκαν από τη στατιστική ανάλυση διότι οι χρόνοι τους (closure times) ήταν υπερβολικά υψηλοί. Ύστερα από προσεκτική και ενδελεχή μελέτη του πρόσφατου ιστορικού λήψης φαρμακευτικών ουσιών αποκαλύφθηκε ότι οι εξαιρετικά μεγάλες τιμές ήταν αποτέλεσμα λήψης φαρμάκων που επηρεάζουν τη λειτουργικότητα των αιμοπεταλίων και γι' αυτό το λόγο τα άτομα αυτά αποκλείστηκαν από τη στατιστική αξιολόγηση.

Οι υγιείς εθελοντές αιμοδότες ήταν άνω των 18 ετών με ανώτατη ηλικία 51 ετών, 20 άνδρες και 21 γυναίκες ενώ προκειμένου να συμμετέχουν στην ομάδα control ή (ομάδα A) έπρεπε να έχουν τιμή αιματοκρίτη πάνω από 35% και αριθμό αιμοπεταλίων στο περιφερικό αίμα 150.000 / $\mu$ L και άνω. (ελέγχονταν με γεν. αίματος πριν τη μέτρηση με PFA-100).

Τα κριτήρια αποκλεισμού από την ομάδα A ήταν α) Ιστορικό νόσου των αιμοπεταλίων ή / και διαταραχών της αιμόστασης β) Ηπατική νόσος γ) Νεφρική ανεπάρκεια δ) Αγγειακές δυσπλασίες ή νόσοι του κολλαγόνου ε) πρόσφατη εγκυμοσύνη στ) λήψη προϊόντων του

αίματος ή αντινωδολυτκών παραγόντων (8 ημέρες) ζ) χρήση DDAVP (δεσμοπρεσίνης) που προκαλεί μείωση της αιμορραγικής διάθεσης μέσω αύξησης του VWF η) λήψη ακετυλοσαλυκυλικού οξέος ή παραγώγων του θ) ιβουπροφαίνης, μη στερεοειδών – αντιφλεγμονωδών φαρμάκων, αντιβιοτικών, αντισταμινικών ή τέλος οποιαδήποτε άλλου φαρμάκου το οποίο αποδεδειγμένα επηρεάζει την λειτουργία των αιμοπεταλίων και δεν ανήκει στις παραπάνω κατηγορίες.

Η μέση ηλικία των υγιών αιμοδοτών ήταν 37,4 έτη, η μέση τιμή της αιμοσφαιρίνης 13,9 η μέση τιμή του αριθμού των αιμοπεταλίων ήταν 265.000 / $\mu$ L ενώ το 38,9% των ατόμων είχε ομάδα αίματος O και οι υπόλοιποι ανήκαν στις άλλες ομάδες (μη-O: 61.1%).

Η αιμοληψία έγινε από το προσωπικό του Τμήματος της Αιμοδοσίας του Ιπποκρατείου με προσεκτική φλεβοκέντηση για να επιτευχθεί όσο το δυνατόν η λιγότερο εργώδης λήψη του αίματος (η κακή και εργώδης αιμοληψία επηρεάζει τη μέτρηση με PFA) με σύριγγα 21-G. Ταυτόχρονα με τα δύο φιαλίδια Vacutainer 4.5ml με αντιπηκτικό τα οποία χρησιμοποιήθηκαν για τις μετρήσεις του PFA (με φυσικούς διεγέρτες επινεφρίνη – διφωσφορική αδενοσίνη) γινόταν και γενική εξέταση του αίματος για να προσδιοριστεί ο αιματοκρίτης, η αιμοσφαιρίνη και ο αριθμός των αιμοπεταλίων του κάθε αιμοδότη.

Το αντιπηκτικό που χρησιμοποιείται στη μέθοδο PFA-100 είναι ρυθμιστικό δ/μα κιτρικού Νατρίου (pH:6.5) συγκέντρωσης 105mmol/L (Becton Dickinson, Plymouth, U.K.). Όλες οι μετρήσεις έγιναν εις διπλούν, ενώ ο έλεγχος είχε ολοκληρωθεί μέσα σε 1,5 hr από τη στιγμή της αιμοληψίας. Δύο μετρήσεις έγιναν για την κάθε τιμή του PFA-100 (Col / Epi, col /ADP). Όταν οι δύο μετρήσεις είχαν αποτελέσματα που διέφεραν μεταξύ τους πάνω από 10% τότε το test επαναλαμβανόταν. Όταν ο έλεγχος διακοπτόταν εξαιτίας απόφραξης της ροής τότε επίσης γινόταν επανάληψη του ελέγχου.

## **2.2 ΠΕΡΙΓΡΑΦΗ ΤΗΣ ΜΕΘΟΔΟΥ ΜΕΤΡΗΣΗΣ ΤΗΣ ΛΕΙΤΟΥΡΓΙΚΟΤΗΤΑΣ ΤΩΝ ΑΙΜΟΠΕΤΑΛΙΩΝ ΜΕ ΤΟΝ ΑΝΑΛΥΤΗ PFA-100**

Το PFA-100 (platelet – function – analyzer, αναλυτής λειτουργικότητας των αιμοπεταλίων) είναι ένας αναλυτής υψηλής ποιότητας και ευαισθησίας για την in vitro εκτίμηση της πρωτογενούς αιμόστασης, σε περιφερικό αίμα υπό αντιπηκτικά κατά τη διάρκεια αγγειακού τραυματισμού που εξομοιώνεται υπό εργαστηριακές συνθήκες. <sup>(70-72)</sup>

Βασιζείται στην πρωτότυπη αρχή που περιγράφηκε από τον Kratzer και τους συναδέλφους του.<sup>(73,74)</sup> Πρόκειται για μια συσκευή που ελέγχεται από ειδικό μικροεπεξεργαστή που λειτουργεί με αναλώσιμα μεταλλικά φυσίγγια στα οποία η πρωτογενής αιμόσταση εξομοιώνεται. Τα φυσίγγια αυτά αποτελούνται από πολυαιθυλένιο, πολυπροπυλένιο ή ανοξείδωτο ατσάλι ενώ η εσωτερική τους διάμετρος είναι 200 $\mu\text{m}$ . Ο κύλινδρος περιέχει μια μεμβράνη από κυτταρίνη που στο κέντρο της φέρει μικρό άνοιγμα διαμέτρου περίπου 150 $\mu\text{m}$ . Το κατώτερο τμήμα της μεμβράνης αυτής είναι επενδυμένο με κολλαγόνο τύπου I 2 $\mu\text{g}$  και είτε 10  $\mu\text{g}$  επινεφρίνης είτε 50 $\mu\text{g}$  διφωσφορικής αδενοσίνης (ADP) (Coll /Epi και col / ADP μεμβράνες αντίστοιχα).

Δείγμα αίματος 0,8ml σε άλας του κιτρικού οξέος, ως αντιπηκτικού, τοποθετείται στην ειδική θήκη και εν συνεχεία εισέρχεται στη συσκευή όπου το αίμα διατηρείται στους 37°C. Στην αρχή της δοκιμασίας δημιουργείται με ειδικό μηχανισμό αεροστεγές σφράγισμα της θήκης όπου βρίσκεται το δείγμα και στη συνέχεια με τη χρήση πιστονιού επιτυγχάνεται αρνητική πίεση που διατηρείται σταθερά στα 4kpa. Η συνεχής αυτή αρνητική πίεση αναρροφά το αίμα που βρίσκεται σε αντιπηκτικό με τέτοιο τρόπο ώστε να έρθει σε επαφή με τη μεμβράνη η οποία εν τω μεταξύ έχει αυτόματα ήδη διαβραχεί με ορρό για να διαλυματοποιήσει την επινεφρίνη ή τη διφωσφορική αδενοσίνη που επικαλύπτουν τη μεμβράνη.

Το δείγμα του αίματος έπειτα περνά διαμέσου του ανοίγματος της μεμβράνης. Τα αιμοπετάλια του δείγματος, όταν το ιξώδες του αίματος είναι φυσιολογικό γύρω στα 0,0035 N/m<sup>2</sup>, υπό την επίδραση των αγωνιστών της διέγερσης αυτών και της τοπικής διαχωριστικής δύναμης που μιμείται την αγγειακή βλάβη, αρχίζουν να διεγείρονται και να προσκολλώνται στη μεμβράνη γύρω από την οπή. Η συσσώρευση των αιμοπεταλίων, που εξομοιώνεται κατ' αυτόν τον τρόπο, συνεχίζεται μέχρι τον σχηματισμό ενός σταθερού λευκού (αιμοπεταλιακού) θρόμβου ο οποίος τελικά αποφράσσει το άνοιγμα και σταματάει τη ροή του αίματος διαμέσου αυτού. Η συσκευή παρακολουθεί την αιματική ροή διαμέσου του ανοίγματος μέχρι ένα μέγιστο χρονικό διάστημα 300 δευτερολέπτων και καταγράφει τον ειδικό χρόνο τελικής απόφραξης (C.T.: closure time).

Ο μειωμένος αριθμός αιμοπεταλίων (θρομβοπενία) , τιμή του αιματοκρίτη κάτω από τα φυσιολογικά όρια, καταστάσεις που σχετίζονται με αιμορραγία που διαπιστώνεται και κλινικά, μπορεί να έχουν ως αποτέλεσμα την παράταση του μετρώμενου χρόνου σύγκλεισης (C.T.).<sup>(72)</sup>. Γι' αυτό το λόγο όταν προσπαθούμε να εκτιμήσουμε τη συσσώρευση των

αιμοπεταλίων, ασθενείς με θρομβοπενία ή/και αναιμία HCT <35% καλό είναι να αποκλείονται. Σε μοριακό επίπεδο, ο παράγοντας VWF και οι μεμβρανικές γλυκοπρωτεΐνες των αιμοπεταλίων GPIb και GPIIb-IIIa είναι καθοριστικά μόρια που επηρεάζουν το χρόνο σύγκλεισης (C.T.) και αυτό αποδεικνύεται από το εξής πειραματικό δεδομένο: Όταν σε περιφερικό αίμα με αντιπηκτικό προσθέσουμε αντισώματα κατά του παράγοντα von Willebrand ή / και των παραπάνω γλυκοπρωτεϊνών το αποτέλεσμα είναι η παράταση του χρόνου σύγκλεισης.<sup>(72)</sup> Επιπρόσθετα, τα πεπτίδια Arg-Glu-Asp-Ser και His-His-Leu-Gly-Gly-Ala-Lys-Glu-Ala-Gly-Asp-Val, τα οποία εμπλέκονται στη διαδικασία σύνδεσης του ινωδογόνου και του vWF στις GPIIb-IIIa των διεγερμένων αιμοπεταλίων, επίσης οδηγούν σε παράταση του χρόνου σύγκλεισης.<sup>(72)</sup> Ένα αντίσωμα κατά του ινωδογόνου που ανέστειλε εξ' ολοκλήρου τη συσσώρευση των αιμοπεταλίων, που είχαν διεγερθεί από το ADP, δεν είχε κανένα αποτέλεσμα επί του χρόνου σύγκλεισης<sup>(72)</sup>, παρόλα αυτά απέδειξε με τον τρόπο αυτό ότι ο παράγοντας von Willebrand είναι η κύρια πρωτεΐνη προσκόλλησης που εμπλέκεται στο σχηματισμό του αιμοπεταλιακού θρόμβου στις συνθήκες υψηλής πίεσης που συναντώνται στο άνοιγμα της μεμβράνης στη συσκευή PFA-100.

Φαίνεται λοιπόν πολύ πιθανό ότι τα αιμοπετάλια προσκολλώνται στο κολλαγόνο δια μέσου της πρωτεΐνης GPIb, με τον παράγοντα von Willebrand να μεσολαβεί και ότι οι γλυκοπρωτεΐνες GPIIb-IIIa που ανευρίσκονται στις μεμβράνες των διεγερμένων αιμοπεταλίων παρέχουν τις συνδέσεις στον παράγοντα von Willebrand επιτρέποντας έτσι τη συσσώρευση των αιμοπεταλίων.<sup>(75)</sup> Ο χρόνος σύγκλεισης (C.T.) δεν επηρεάζεται ακόμη από τη δράση αντισωμάτων κατά των υποδοχέων κολλαγόνου των αιμοπεταλίων GPIa-IIa και GPIV, κατά των πρωτεϊνών προσκόλλησης ινωδονεκτίνης και βιτρονεκτίνης.<sup>(72)</sup>

Όπως επισημάνθηκε ήδη, υπάρχουν δύο διαφορετικά είδη φυσιγγίων για χρήση στη συσκευή PFA-100. Το πρώτο είναι το κολλαγόνο / επινεφρίνη (Col/Epi) και το δεύτερο το κολλαγόνο / διφωσφορική αδενοσίνη (col/ADP). Το φυσίγγιο που περιέχει τα Col/ADP αναπτύχθηκε προκειμένου να βοηθήσει να καθοριστεί αν ένας παρατεταμένος χρόνος σύγκλεισης με το Col/Epi φυσίγγιο είναι αποτέλεσμα της επίδρασης της ασπιρίνης (που μπορεί να έχει λάβει ο ασθενής) στη λειτουργία των αιμοπεταλίων. Όπως είναι γνωστό η ασπιρίνη αναστέλλει την παραγωγή θρομβοξάνης A<sub>2</sub> (TXA<sub>2</sub>) από τα αιμοπετάλια και οδηγεί έτσι σε παρατεταμένο χρόνο σύγκλεισης όταν χρησιμοποιείται ως διεγέρτης το Col/Epi αλλά όχι όταν χρησιμοποιείται το col/ADP.<sup>(71,76,77,78)</sup> Επομένως μεγάλοι χρόνοι σύγκλεισης και με

τους δύο διεγέρτες είναι ενδεικτικοί παθολογικής πρωτογενούς αιμόστασης (αιμοπεταλιακός θρόμβος) ανεξάρτητα από τη δράση της ασπιρίνης.

Το ουδέτερο διάλυμα κιτρικού νατρίου (PH 6.5) (105mmol/lit, τελικής συγκέντρωσης στο αίμα) είναι το συνιστώμενο αντιπηκτικό για χρήση στη συσκευή PFA-100 ενώ ακόμη ο αναστολέας της θρομβίνης Phe-Pro-Arg γλωρομεθυλκετόνη (PPACK) έχει επίσης χρησιμοποιηθεί με επιτυχία.<sup>(79)</sup> Τα φιαλίδια Vacutainer με το μπλε πώμα περιέχουν το συγκεκριμένο αντιπηκτικό και χρησιμοποιήθηκαν στην έρευνα αυτή. Ο Heilman και οι συνεργάτες του<sup>(80)</sup> έδειξαν ότι η χρήση κανονικού μη εξουδετερωμένου κιτρικού νατρίου (PH:8.5) οδηγεί σε σημαντικό βαθμό σε επεισόδια απόφραξης της ροής του αίματος κατά τη διάρκεια του ελέγχου. Όταν η συσκευή ανιχνεύσει κάποια απότομη διακοπή στη ροή του αίματος δια μέσου του ανοίγματος της μεμβράνης κατά τη διάρκεια του ελέγχου, την καταγράφει ως απόφραξη της ροής και προειδοποιεί για αποτέλεσμα πιθανώς μη έγκυρο που οφείλεται στην παρακώλυση της ροής από μικροθρόμβους, πήγματα ή άλλα μικροσωματίδια.

Το PFA-test είναι ένα σύγχρονο εργαστηριακό μέσο ελέγχου των αιμοπεταλιακών λειτουργιών, της διέγερσης, της προσκολλητικότητας και της συσσώρευσης που όλες μαζί συντελούν στην πρωτογενή αιμόσταση με τελικό αποτέλεσμα τη δημιουργία του αιμοπεταλιακού θρόμβου. Τα πλεονεκτήματα της δοκιμασίας αυτής είναι η ταχύτητα, η ακρίβεια, η απλότητα, η αξιοπιστία καθώς επίσης και ότι για να πραγματοποιηθεί δεν χρειάζεται ιδιαίτερα εξειδικευμένο προσωπικό. Οι κλινικές του εφαρμογές είναι α) προεγχειρητικός έλεγχος λειτουργικότητας αιμοπεταλίων β) Εκτίμηση – αξιολόγηση γυναικών με μηνορραγία γ) Προσδιορισμός επηρεασμένης λειτουργικότητας των αιμοπεταλίων λόγω λήψεως φαρμάκων (π.χ ασπιρίνη) δ) αξιολόγηση ασθενών με υποψία για νόσο von Willebrand ε) Αξιολόγηση του αιμορραγούντος αρρώστου και στ) Αξιολόγηση της λειτουργικότητας των αιμοπεταλίων για ερευνητικούς σκοπούς.

Όπως προαναφέρθηκε το αποτέλεσμα ελέγχου με τη μέθοδο PFA εξαρτάται από τον αριθμό των αιμοπεταλίων, του αιματοκρίτη, του παράγοντα von Willebrand και την λειτουργία των θρομβοκυττάρων. Εάν οι πρώτοι τρεις παράγοντες είναι εντός φυσιολογικών ορίων τότε το test αποτελεί έναν παγκοσμίως αποδεκτό και πολύ έγκυρο τρόπο αξιολόγησης της λειτουργικότητας των αιμοπεταλίων. Αρχικά πραγματοποιείται έλεγχος με το φυσικό διεγέρτη των αιμοπεταλίων την επινεφρίνη και εάν το αποτέλεσμα είναι κάτω από το όριο που καθορίζεται από το εκάστοτε νοσηλευτικό ίδρυμα που χρησιμοποιεί τη συσκευή αποκλείεται η αιμοπεταλιακή δυσλειτουργία.

Ακόμη όμως και στη περίπτωση που το test με την επινεφρίνη είναι ανώτερο της φυσιολογικής τιμής τότε διενεργείται μέτρηση και με διφωσφορική αδενοσίνη ως διεγέρτη για να αποκλειστεί με τον τρόπο αυτό δυσλειτουργία των αιμοπεταλίων οφειλόμενη στη χρήση ασπιρίνης.

Μόνο στην περίπτωση που και οι δύο χρόνοι είναι παρατεταμένοι υπάρχει η πιθανότητα να υφίσταται δυσλειτουργία των αιμοπεταλίων όπως σε χρόνια νεφρική ανεπάρκεια, σύνδρομο Bernard – Soulier, θρομβασθένεια Glanzmann και νόσο von Willebrand. Τότε η διενέργεια μέτρησης της συσσώρευσης των αιμοπεταλίων και μόνο (aggregometry) θα δώσει ένα σίγουρο και ασφαλές αποτέλεσμα σχετικά με την λειτουργικότητα των θρομβοκυττάρων. Στην περίπτωση σοβαρής ανεπάρκειας του παράγοντα von Willebrand και τα δύο test (Col/Epi, col/ADP) δίνουν αποτέλεσμα συνήθως πάνω από 300sec C.T<sup>(81)</sup>

Η εμπειρία της χρήσης του PFA για τον έλεγχο της λειτουργικότητας των αιμοπεταλίων είναι σήμερα πολύ μεγάλη αφού η δοκιμασία διενεργείται σε όλο τον ιατρικώς προηγμένο κόσμο και η χρήση της αυξάνεται συνεχώς. Μέχρι τον Ιανουάριο του 2005 είχαν δημοσιευτεί πάνω από 200 διεθνείς ερευνητικές εργασίες στο Medline που επιβεβαιώνουν την ανωτερότητα της μεθόδου σε σχέση με όλα τα προϋπάρχοντα μέσα ανάδειξης της δυσλειτουργίας των αιμοπεταλίων.<sup>(82)</sup>

### **2.3 ΟΜΑΔΑ ΑΣΘΕΝΩΝ ΜΕ ΠΡΟΘΕΣΕΙΣ ΤΙΤΑΝΙΟΥ**

Όπως με την ομάδα των υγιών αιμοδοτών έτσι και με αυτή των ασθενών με προθέσεις τιτανίου, δηλαδή την υπό έρευνα ομάδα, η συγκρότησή της έγινε με επιλογή ατόμων ανάμεσα σε εκατοντάδες υγιείς αιμοδότες και δεκάδες ασθενείς φέροντες τιτάνιο που πληρούσαν τις προϋποθέσεις της έρευνας, αντίστοιχα. Με τον τρόπο αυτό ικανοποιήθηκε η απαραίτητη συνθήκη της τυχαιοποίησης των μαρτύρων και ασθενών προκειμένου να επιτευχθεί η μέγιστη δυνατή αξιοπιστία. Όπως και στην ομάδα των μαρτύρων έτσι και στην υπό έρευνα ομάδα όταν οι δύο μετρήσεις (Col/Epi, Col/ADP) έδιναν αποτελέσματα με διαφορά μεγαλύτερη του 10% τότε η μέτρηση επαναλαμβανόταν. Προκειμένου να αποφευχθούν ψευδή αποτελέσματα αλλά και να είναι βέβαιο ότι η πιθανή παράταση του χρόνου σύγκλεισης (C.T) στο PFA θα οφειλόταν στο τιτάνιο και όχι σε κάποιο άλλο εξωγενή

παράγοντα που επίσης επηρεάζει τον C.T. (closure time) θεσπίστηκαν συγκεκριμένα κριτήρια αποκλεισμού και κριτήρια εισόδου στην έρευνα αντίστοιχα. Αυτά είναι : i) Κριτήρια αποκλεισμού ii) Κριτήρια εισόδου. Κριτήρια αποκλεισμού α) Ιστορικό νόσου των αιμοπεταλίων ή / και διαταραχών της αιμόστασης β) Ηπατική νόσος γ) Νεφρική ανεπάρκεια γ) Αγγειακές δυσπλασίες ή νοσήματα του κολλαγόνου δ) Λήψη παραγόντων του αίματος ε) πρόσφατη εγκυμοσύνη στ) Χρήση δεσμοπρεσίνης ζ) λήψη αντιαιμοπεταλιακών φαρμάκων τις προηγούμενες 10 ημέρες η) λήψη κορτικοστεροειδών και μη στερεοειδών αντιφλεγμονωδών φαρμάκων τις προηγούμενες 5 ημέρες θ) εάν έχουν πραγματοποιηθεί ακτινοθεραπεία ή / και χημειοθεραπεία να έχει παρέλθει χρονικό διάστημα μεγαλύτερο των 6 μηνών ι) λήψη αντιβιοτικών ή / και αντισταμινικών φαρμάκων και κ) η περιοχή της εμφύτευσης των υλικών να είναι ελεύθερη λοιμώξεως και να μην έχει σημειωθεί πυρετική κίνηση την τελευταία εβδομάδα προ της αιμοληψίας.

Τα κριτήρια εισόδου στην υπό έρευνα ομάδα ήταν α) τα υλικά οστεοσύνθεσης – εμφύτευσης να αποτελούνται από καθαρό τιτάνιο ή από κράμα πολύ υψηλής περιεκτικότητας σε τιτάνιο (>98%) β) Η τοποθέτηση να έχει γίνει τουλάχιστον προ 12 μηνών.

Τριάντα τρεις ασθενείς που έφεραν τιτάνιο εξετάστηκαν από το προσωπικό του Τμήματος Αιμοδοσίας – Αιμόστασης του Ιπποκράτειου Γενικού Νοσοκομείου Αθηνών με ακριβώς πανομοιότυπο τρόπο με το οποίο εξετάστηκαν οι υγιείς μάρτυρες (προσεκτική φλεβοκέντηση και αιμοληψία με βελόνη 21 G)

Η επιλογή των ασθενών αυτών ήταν εντελώς τυχαία ανάμεσα στους εκατοντάδες ασθενείς του Τμήματος Γναθοπροσωπικής Χειρουργικής του Γενικού Νοσοκομείου ΚΑΤ που είχαν θεραπευτεί και στους οποίους είχαν τοποθετηθεί υλικά οστεοσύνθεσης από τιτάνιο καθώς επίσης και σε ασθενείς που έφεραν οδοντικά οστεοενσωματούμενα εμφυτεύματα καθαρού τιτανίου που είχαν τοποθετηθεί από δύο Στοματικούς και Γναθοπροσωπικούς Χειρουργούς που συνεργάστηκαν με την ερευνητική ομάδα. Όλοι οι ασθενείς πληρούσαν τα κριτήρια εισόδου στην έρευνα και επιλέχτηκαν προσεκτικά ώστε να μην ανήκουν σε καμία από τις κατηγορίες κριτηρίων αποκλεισμού από την έρευνα.

Δεκαέξι ασθενείς (16) ήταν άνδρες και δεκαεφτά (17) ήταν γυναίκες ή δε μέση ηλικία τους ήταν 40,6 έτη με ηλικιακά όρια από 17 έως 71 ετών. Η μέση τιμή του αιματοκρίτη τους ήταν 42.3 ενώ του αριθμού των αιμοπεταλίων 249.000/μL. Οι ασθενείς που επιλέχτηκαν έφεραν: α) 9 ασθενείς έφεραν πλάκα οστεοσύνθεσης reconstruction 2.4 – 2.7mm που έχει τοποθετηθεί στο τμήμα Γναθοπροσωπικής Χειρουργικής του ΚΑΤ ύστερα από εκτομή της κάτω γνάθου

για τη θεραπευτική αντιμετώπιση νεοπλασμάτων ή κύστεων (οδοντογενής κερατινοκύστη, αδαμαντινοβλάστωμα, ακανθοκυτταρικό καρκίνωμα του στόματος) ή την αντιμετώπιση συντριπτικών καταγμάτων της κάτω γνάθου συνέπεια βίαιων τραυματισμών (τροχαίο ατύχημα, εγκληματικές ενέργειες, αυτοπυροβολισμός) β) 13 ασθενείς έφεραν πλάκα /ες οστεοσύνθεσης 2.3mm που τοποθετήθηκαν στο τμήμα Γναθοπροσωπικής Χειρουργικής του Γ.Ν.Α Κ.Α.Τ για την αντιμετώπιση καταγμάτων της κάτω γνάθου ενώ γ) 11 ασθενείς έφεραν οδοντικά – οστεοενσωματούμενα εμφυτεύματα που είχαν τοποθετηθεί από δύο Στοματικούς και Γναθοπροσωπικούς χειρουργούς. Ο αριθμός των εμφυτευμάτων στους ασθενείς αυτούς ήταν από 7 έως και 20 εμφυτεύματα. Τα υλικά αυτά της οστεοσύνθεσης επιλέχθηκαν κατά τέτοιο τρόπο ώστε η ποσότητα του μετάλλου που βρισκόταν στον οργανισμό να είναι τέτοια που να μην εγείρεται αμφιβολία για το αν κατά πόσο θα μπορούσε να έχει βιολογικές επιδράσεις στους ιστούς. Όλα τα υλικά είχαν εμφυτευθεί – τοποθετηθεί στους ασθενείς τουλάχιστον ένα έτος πριν την αιμοληψία ενώ υπήρχε και άρρωστος που τα έφερε πάνω από 4 έτη.

Οι ασθενείς ανακλήθηκαν στο Τμήμα της Γναθοπροσωπικής Χειρουργικής του ΚΑΤ είτε στα πλαίσια του περιοδικού ελέγχου και της προγραμματισμένης επανεξέτασης τους είτε προκειμένου να υποβληθούν σε χειρουργική επέμβαση αφαίρεσης των υλικών της οστεοσύνθεσης.

Πρέπει να σημειωθεί ότι προκειμένου για τα υλικά οστεοσύνθεσης τιτανίου με διάμετρο 2.3mm (διάμετρος βίδας) υπάρχει διεθνής τακτική να αφαιρούνται ύστερα από διάφορο χρονικό διάστημα μεγαλύτερου των έξι με οκτώ μηνών. Οι λόγοι που επιβάλλουν την τακτική αυτή είναι αφενός ότι οι μακροχρόνιες επιδράσεις του τιτανίου και του οξειδίου του στους ιστούς δεν έχουν εκτενώς μελετηθεί και αφετέρου για να αποφευχθεί το ενδεχόμενο εκδήλωσης του φαινομένου stress shielding που συμβαίνει όταν χρησιμοποιούνται ισχυρά υλικά με διάμετρο 2.3mm και άνω.

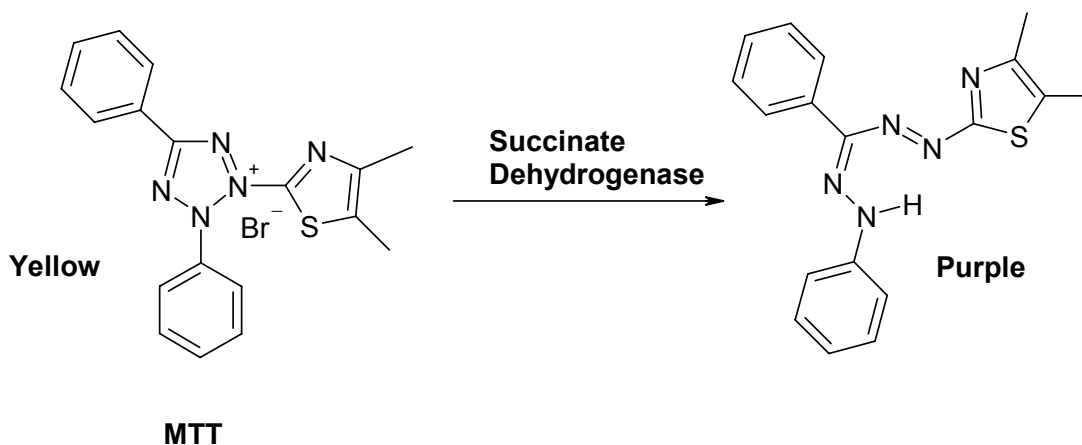
## **2.4 MTT ASSAY**

Οι κυτταροτοξικές ιδιότητες του  $TiO_2$  μελετήθηκαν χρησιμοποιώντας την *in vitro* μέθοδο του MTT, η οποία έχει αποδειχθεί ουσιαστικό εργαλείο για την αξιολόγηση των ιδιοτήτων της αναστολής της κυτταρικής ανάπτυξης. Αυτή η τεχνική ικανοποιεί τα κριτήρια του να είναι



γρήγορη, απλή και ικανή, να ανταπεξέρχεται σε όσο το δυνατόν περισσότερα δείγματα και γι' αυτό το λόγο είναι μία από τις πιο διαδεδομένες τεχνικές για τον καθορισμό της συγκέντρωσης των ουσιών που προκαλούν αναστολή της κυτταρικής ανάπτυξης κατά 50% (IC<sub>50</sub>).

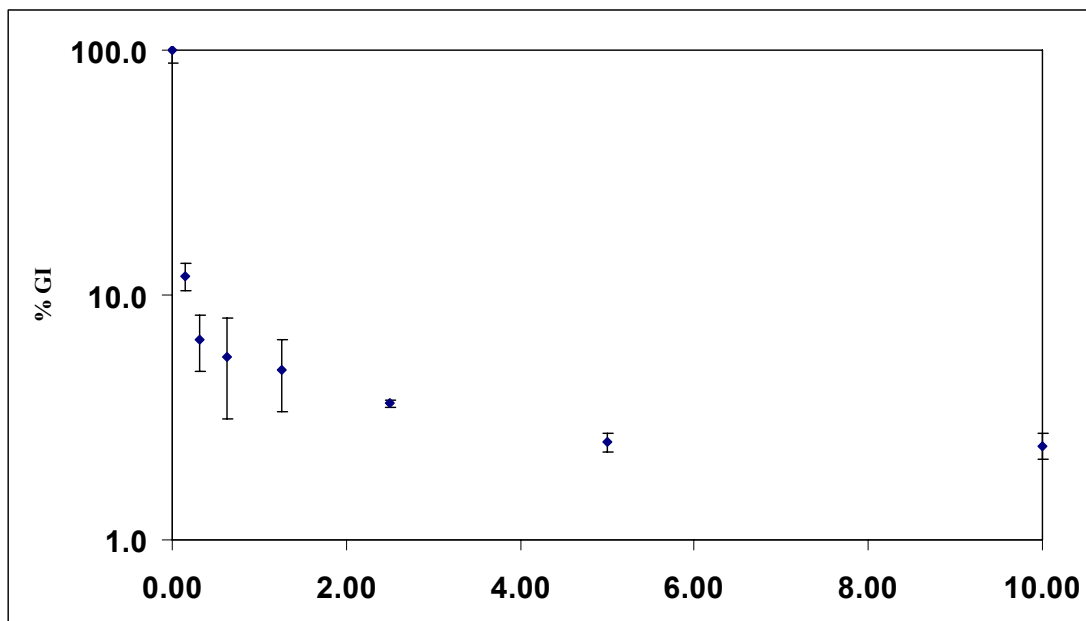
Η τεχνική αυτή βασίζεται στην αντίδραση του MTT ή 3-(4, 5-dimethoxythiazol-2-yl)-2, 5-diphenyl tetrazolium bromide (κίτρινο χρώμα) το οποίο ανάγεται από το μιτοχονδριακό ένζυμο σουκινική αφυδρογονάση δημιουργώντας ένα μώβ ίζημα formazan στα ζώντα/βιώσιμα κύτταρα (εικόνα.2) και πρωτοαναφέρθηκε από τον Mosmann το 1983<sup>(83)</sup>.



Εικόνα 2

Το Μιτοχονδριακό ένζυμο σουκινική αφυδρογονάση είναι ο απαραίτητος καταλύτης προκειμένου το βρωμιούχο τετραζολικό άλας (κίτρινο χρώμα) να αναχθεί σε ίζημα formazan χρώματος μωβ.

Έπειτα χρησιμοποιώντας ένα φασματοφωτόμετρο μετρήθηκε η οπτική πυκνότητα των δειγμάτων στα μήκη κύματος  $\lambda = 540$  και  $690\text{nm}$ . Η αυτόματη αφαίρεση της μέτρησης στα  $690$  από τα  $540$  έχει ως αποτέλεσμα μία γραφική παράσταση του ποσοστού (%) της κυτταρικής ανάπτυξης προς την συγκέντρωση σχετική με τα κύτταρα που δεν έχουν λάβει ουσία (control) επιτρέποντας τον καθορισμό των βιώσιμων κυττάρων σε κάθε ένα πηγάδι του πολυτριβλίου. Ο γραφικός υπολογισμός, μέσω του λογισμικού Microsoft<sup>®</sup> Excel, επέτρεψε τον καθορισμό της τιμής του IC<sub>50</sub> (η απαιτούμενη συγκέντρωση για την αναστολή της κυτταρικής ανάπτυξης κατά 50%) (γραφική παράσταση)



**Γραφική παράσταση: Τυπικό παράδειγμα του υπολογισμού του  $IC_{50}$ :** Ο άξονας των X δείχνει τις τιμές της συγκέντρωσης. Ο άξονας των Y δείχνει το ποσοστό της αναστολής της κυτταρικής ανάπτυξης (%GI-Growth Inhibition) εκφραζόμενο σε λογαριθμική κλίμακα.

### Πρωτόκολλο-MTT ASSAY

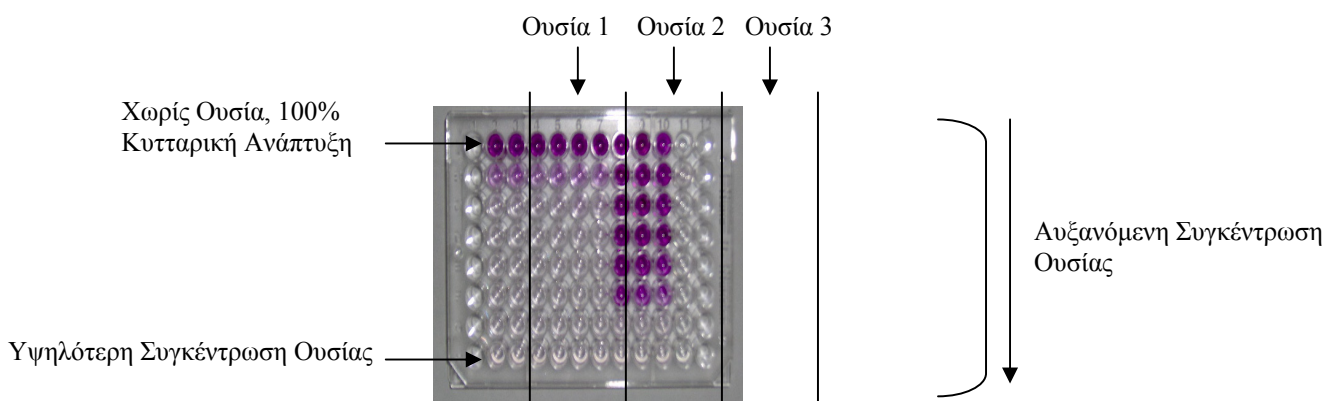
Αρχικά, η απαιτούμενη συγκέντρωση ( $3 \times 10^4$  cells/ml για τα LMS, MCF-7 και  $5 \times 10^4$  cells/ml για τα MRC-5) κυττάρων (0.1ml/well) τοποθετήθηκε σε ένα πολυτριβλίο 96 θέσεων και επώαστηκαν στους 37°C, 5% CO<sub>2</sub> για 24 ώρες προκειμένου τα κύτταρα να δημιουργήσουν δεσμούς προσκόλλησης με την επιφάνεια του πολυτριβλίου.

Στο μεταξύ μία σειρά απο διαλύσεις του TiO<sub>2</sub> έλαβαν μέρος ώστε να λάβουμε τις επιθυμητές συγκεντρώσεις των 64mg/ml, 9.6mg/ml, 0.13mg/ml, 0.0016mg/ml. Έπειτα μια σειρά από περαιτέρω διαλύσεις (1:2) έλαβαν μέρος για κάθε μια από τις παραπάνω συγκεντρώσεις εως ότου εφτά (κατά το ήμισυ η μία από την άλλη) συγκεντρώσεις να ληφθούν για κάθε μία από τις προτεινόμενες 4 συγκεντρώσεις προς έλεγχο. Π.χ.: Για την συγκέντρωση των 64mg/ml πήραμε έπειτα απο 6 διαλύσεις 1:2 τις συγκεντρώσεις των 32, 16, 8, 4, 2 και 1mg/ml. Στην συνέχεια 100μl ( διάλυση 1:2 λόγω του ότι σε κάθε θέση του πιάτου υπάρχουν ήδη 100μl θρεπτικού με κύτταρα) από κάθε μία απο τις συγκεντρώσεις αθροίστηκαν εις τριπλούν στο 96 θέσεων πολυτριβλίο. Έτσι οι τελικές συγκεντρώσεις μέσα στις θέσεις του πιάτου για την συγκέντρωση π.χ. των 64mg/ml διαμορφώθηκαν ως 32, 16, 8, 4, 2, 1, 0.5 mg/ml.

Η ίδια διαδικασία επαναλήφθηκε και για τις υπόλοιπες προς έλεγχο συγκεντρώσεις των 9.6mg/ml, 0.13mg/ml και 0.0016mg/ml με τελικές συγκεντρώσεις ελέγχου 4.8mg/ml, 0.065mg/ml και 0.0008mg/ml αντίστοιχα. Επίσης 100μl θρεπτικού μέσου αθροίσθηκαν στην 1<sup>η</sup> σειρά του πιάτου η οποία χρησιμοποιήθηκε ως control για την μέτρηση της φυσιολογικής κυτταρικής ανάπτυξης. Όλη η παραπάνω διαδικασία έλαβε μέρος κάτω από άσηπτες συνθήκες.

Τα πολυτριβλία 96 θέσεων τοποθετήθηκαν στον επωαστή και τα κύτταρα επώαστηκαν σε συνθήκες 37°C, 5% CO<sub>2</sub> για 48 ώρες. Μετά το πέρας του 48ώρου 50μl από MTT διάλυμα (3mg/ml) σε PBS προστέθηκαν σε κάθε πηγάδι και το πολυτριβλίο τοποθετήθηκε στον επωαστή για περαιτέρω επώαση 3 ωρών στις ίδιες συνθήκες με προηγούμενως.

Μετά το πέρας των 3ωρών, το θρεπτικό μέσο αφαιρέθηκε προσεκτικά και 200μl DMSO προστέθηκαν σε κάθε πηγάδι προκειμένου να διαλυτοποιηθεί το ίζημα formazan.



Εικόνα. 3: Ένα τυπικό πιάτο μετά την διάλυση του ιζήματος formazan. Σε ένα τέτοιο πιάτο μπορούμε να ελέγξουμε την ίδια ουσία σε διαφορετικές συγκεντρώσεις ή διαφορετικές ουσίες στην ίδια ή διαφορετικές συγκεντρώσεις.

Χρησιμοποιώντας το Multiscan® Spectrum της Thermofisher, η οπτική πυκνότητα των δειγμάτων μετρήθηκε στα μήκη κύματος  $\lambda = 540$  και 690nm. Έπειτα η τιμή του IC<sub>50</sub> υπολογίστηκε με την βοήθεια του λογισμικού Microsoft® Excel.

## 2.5 Στατιστική δοκιμασία – περιγραφή

Οι δύο ομάδες, των υγιών αιμοδοτών (ομάδα ελέγχου) και των ασθενών με προθέσεις τιτανίου (ομάδα στόχος) αποτελούνταν από 34 και 33 άτομα τα οποία υποβλήθηκαν από το προσωπικό του Τμήματος της Αιμοδοσίας του Ιπποκρατείου Νοσοκομείου σε μετρήσεις με την μέθοδο PFA-100 προκειμένου να αξιολογηθεί η λειτουργικότητα των αιμοπεταλίων τους και ειδικότερα η συσσωρευσιμότητά τους.

Ο σκοπός της έρευνας αυτής ήταν να μελετηθεί η επίδραση του τιτανίου στη λειτουργικότητα των αιμοπεταλίων. Προκειμένου να δειχτεί εάν υπήρχε κάποια επίδραση του συγκεκριμένου μετάλλου στη βασικότερη αυτή ιδιότητα των θρομβοκυττάρων και αφού προέκυψαν οι μετρήσεις έπρεπε να επιλεγεί η κατάλληλη στατιστική μέθοδος για να συγκριθούν οι μέσες τιμές και οι σταθερές αποκλίσεις των δύο ομάδων για να φανεί εάν υπάρχει διαφορά μεταξύ τους και μάλιστα σε επίπεδο στατιστικής σημαντικότητας.

Μεταξύ των συνηθέστερα χρησιμοποιούμενων στατιστικών δοκιμασιών σημαντικότητας που εφαρμόζονται σε μικρές ομάδες δεδομένων (πληθυσμιακά δείγματα), είναι η σειρά των δοκιμασιών Student. Το αποτέλεσμα αυτών των δοκιμασιών είναι η αποδοχή ή η απόρριψη της μηδενικής υπόθεσης (null hypothesis). Η μηδενική υπόθεση γενικά δηλώνει ότι: Οι διαφορές (στη μέση τιμή στη συγκεκριμένη περίπτωση) και οι αποκλίσεις οφείλονται αποκλειστικά σε τυχαία και όχι σε συστηματικά σφάλματα.

Η εναλλακτική υπόθεση δηλώνει ακριβώς το αντίθετο.

Έτσι η μηδενική υπόθεση στην εν λόγω έρευνα είναι: Οι μέσες τιμές των μετρήσεων των δύο ομάδων (ελέγχου – στόχου) είναι ίδιες, δηλαδή δεν διαφέρουν σε βαθμό στατιστικά σημαντικό και άρα δεν υπάρχει αξιοσημείωτη επίδραση του τιτανίου στη λειτουργικότητα των αιμοπεταλίων.

Όλες οι δοκιμασίες σημαντικότητας παρέχουν αποτελέσματα σε προκαθορισμένη στάθμη εμπιστοσύνης % (Confidence Level, CL%). Οι πλέον χρησιμοποιούμενες στάθμες εμπιστοσύνης είναι 90%, 95% και 99% ή αλλιώς επίπεδα στατιστικής σημαντικότητας  $p < 0.1$ ,  $p < 0.05$ ,  $p < 0.01$ . Στο σημείο αυτό πρέπει να σημειώσουμε ότι όταν μια διαφορά μέσων τιμών προκύψει στατιστικώς σημαντική στο επίπεδο του 10% ( $p < 0.1$ ) τότε η διεθνής επιστημονική κοινότητα την θεωρεί ασαφή, εάν προκύψει στο επίπεδο του 5% ( $p < 0.05$ ) θεωρείται στατιστικά σημαντική και τέλος στο επίπεδο του 1% ( $p < 0.01$ ) θεωρείται λίαν σημαντική. Στην έρευνα αυτή όπως και στη συντριπτική πλειοψηφία των ερευνών που αναφέρονται σε βιολογικά μεγέθη ως επίπεδο στατιστικής σημαντικότητας θεωρήθηκε αυτό του 5% ή  $p < 0.05$ .

Στάθμη ή όρια εμπιστοσύνης 95% σημαίνει ότι: Σε περίπτωση απόρριψης της μηδενικής υπόθεσης είμαστε σίγουροι ότι κάναμε το σωστό στο 95% των περιπτώσεων ή περισσότερο. Με άλλα λόγια διακινδυνεύουμε μια πιθανότητα όχι μεγαλύτερη από  $(100-95)/100 = 0,05$  να κάνουμε σφάλμα πρώτου είδους. Μπορούμε φυσικά να αυξήσουμε ή να μειώσουμε τη στάθμη εμπιστοσύνης μιας δοκιμασίας σημαντικότητας, αλλά πρέπει να λάβουμε υπόψη τους ακόλουθους κινδύνους α) ελαττώνοντας την CL π.χ. στο 90% (κάνοντας πιο εύκολη την απόρριψη της  $H_0$ ) προφανώς αυξάνουμε την πιθανότητα σφάλματος 1<sup>ου</sup> είδους. Από την άλλη μεριά αυξάνοντας τα όρια αξιοπιστίας στο 99% (κάνοντας δυσκολότερη την απόρριψη της  $H_0$ ) προφανώς αυξάνουμε την πιθανότητα σφάλματος 2<sup>ου</sup> είδους. Για τους παραπάνω λόγους μια στάθμη εμπιστοσύνης της τάξης του 0,05 ( $p < 0.05$ ) γενικά θεωρείται ως ένας πολύ καλός συγκερασμός μεταξύ αυτών των δύο κινδύνων.

### Η δοκιμασία t του student για τη σύγκριση δύο μέσων τιμών

Η δοκιμασία αυτή για να χρησιμοποιηθεί προϋποθέτει τα εξής: Αφενός μεν η κατανομή των μετρήσεων του υπό σύγκριση μεγέθους να είναι κανονική (κατά Gauss) αφετέρου δε οι τυπικές αποκλίσεις (SD) μεταξύ των δύο ομάδων να μη διαφέρουν σημαντικά. *Είναι θεμελιώδες να αναφερθεί ότι και οι δύο αυτές βασικές προϋποθέσεις χρησιμοποίησης του t-test πληρούνται στην συγκεκριμένη έρευνα όπως φαίνεται άλλωστε και στο κεφάλαιο των αποτελεσμάτων που ακολουθεί.* Οι δύο μέσες τιμές και οι αντίστοιχες τυπικές αποκλίσεις υπολογίζονται με βάση τις ακόλουθες γνωστές εξισώσεις (όπου  $n_A$  και  $n_B$  είναι ο αριθμός των ατόμων στις ομάδες A και B αντίστοιχα):

$$\bar{X}_A = \sum_{i=1}^{n_A} x_i / n_A, \quad \bar{X}_B = \sum_{i=1}^{n_B} x_i / n_B$$

$$\bar{S}_A = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^{n_A} (\bar{X}_A - x_i)^2}{n_A - 1}}, \quad \bar{S}_B = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^{n_B} (\bar{X}_B - x_i)^2}{n_B - 1}},$$

Στη συνέχεια υπολογίζεται η εκ συνένωσης τυπική απόκλιση  $S_{AB}$ :

$$S_{AB} = \sqrt{\frac{(n_A - 1) \bar{S}_A^2 + (n_B - 1) \bar{S}_B^2}{n_A + n_B - 2}}$$

και τελικά υπολογίζεται το στατιστικό στοιχείο t- πειραματικό (texp):

$$t = \frac{[\bar{X}_A - \bar{X}_B]}{SAB \sqrt{\frac{1}{nA} + \frac{1}{nB}}}$$

Η τιμή του texp συγκρίνεται με την κρίσιμη (θεωρητική τιμή (tth) που

αντιστοιχεί στους δεδομένους βαθμούς ελευθερίας N (στη συγκεκριμένη μελέτη  $N = nA + nB - 2 = 34 + 33 - 2 = 67 - 2 = 65$  και την επιλεγμένη στάθμη εμπιστοσύνης. Πίνακες κρίσιμων τιμών του t βρίσκονται σε όλα τα βιβλία στατιστικής όπως επίσης και σε πολλά βιβλία ποσοτικής χημικής ανάλυσης.

Εάν  $\text{texp} > \text{tth}$  η  $H_0$  απορρίπτεται, ειδάλως η  $H_0$  γίνεται αποδεκτή. Σήμερα πλέον, οι υπολογισμοί στατιστικών στοιχείων (όπως του texp) έχουν απλοποιηθεί με τη χρήση των στατιστικών προγραμμάτων. Επιπλέον δεν υπάρχει πλέον ανάγκη στατιστικών πινάκων κρίσιμων τιμών. Απλά μετά την εισαγωγή στο πρόγραμμα των πειραματικών δεδομένων και την εκτέλεση αυτού παρουσιάζεται ως αποτέλεσμα μια αριθμητική τιμή του p, η οποία υπολογίζεται με αρκετά σύνθετες μαθηματικές μεθόδους. Η τιμή αυτή (p) αντιπροσωπεύει την πιθανότητα σφάλματος πρώτους είδους και είναι υπερεπαρκής για τον ερευνητή προκειμένου να υιοθετήσει ή να απορρίψει τη μηδενική υπόθεση. Παραδείγματος χάριν, εάν υποθέσουμε ότι αποφασίσαμε να δουλέψουμε σε στάθμη εμπιστοσύνης 95% (δηλαδή να διακινδυνεύσουμε την πιθανότητα σφάλματος πρώτου είδους όχι μεγαλύτερη από 5% τότε: α) Μια τιμή  $p = 0.087$  σημαίνει ότι η  $H_0$  πρέπει να γίνει αποδεκτή αφού  $0.087 > 0.05$ .

β) Μια τιμή  $p = 0.026$  σημαίνει ότι η  $H_0$  πρέπει να απορριφθεί αφού  $0.026 < 0.05$ .

Σωστό είναι να διευκρινίσουμε ότι η έννοια σημαντικός δεν σημαίνει μεγάλος, υπερβολικός κ.τ.λ. αλλά ότι υπάρχει σημαντική διαφορά οφειλόμενη σε συστηματικά αίτια (δηλαδή για τη συγκεκριμένη έρευνα ότι η μεταβολή που πιθανόν να παρατηρείται στη συσσώρευση των θρομβοκυττάρων οφείλεται στην επίδραση του τιτανίου), σε αντίθεση με τη μη σημαντική διαφορά που έχει το νόημα διαφοράς οφειλόμενης σε τυχαία αίτια. Επίσης από όλα τα παραπάνω βγαίνει το συμπέρασμα ότι προκειμένου με τη χρήση της στατιστικής δοκιμασίας να ανιχνεύονται ακόμη και μικρές διαφορές των μέσων τιμών ως σημαντικές πρέπει οι τιμές των SD να είναι σχετικά μικρές ( $SD \leq \frac{3}{10} \text{Mean}$ ) ειδάλως όπου  $SD \gg \gg \gg$  η διαφορά των

μέσων τιμών δεν θα ανιχνεύεται. Τέλος με την αύξηση των μετρήσεων (n) μικραίνει το τυπικό σφάλμα SE που σημαίνει μικρή διακύμανση των μετρήσεων και επομένως αυξάνεται η αξιοπιστία της έρευνας. Στην έρευνα αυτή τόσο οι SD ήταν σχετικά πολύ μικρότερες από τις μέσες τιμές αλλά και ο αριθμός των παρατηρήσεων ήταν υπεραρκετός προκειμένου με

ασφάλεια να μπορεί ο ερευνητής να αποφανθεί υπέρ της στατιστικώς σημαντικής ή μη διαφοράς.

Φαίνεται δηλαδή ότι πληρούνται όλες εκείνες οι απαραίτητες προϋποθέσεις για την εφαρμογή t-test ώστε να προκύψουν ασφαλή αποτελέσματα και επομένως συμπέρασμα.





### **3. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ**

#### **3.1 Επίδραση του τιτανίου στη λειτουργικότητα των αιμοπεταλίων**

Τα δημογραφικά στοιχεία αμοτέρων των ομάδων (ελέγχου και στόχου) αναφέρθηκαν στο κεφάλαιο του υλικού και της μεθόδου. Στο κεφάλαιο αυτό θα αναφερθούν τα αποτελέσματα της μεθόδου PFA-100 και για τους δύο διεγέρτες (επινεφρίνη, διφωσφορική αδενοσίνη) για τις δύο ομάδες και στη συνέχεια τα αποτελέσματα της στατιστικής δοκιμασίας που έγινε προκειμένου να δειχτεί αν υπάρχει διαφορά και σε ποιο επίπεδο στατιστικής σημαντικότητας.

Ξεκινώντας την παράθεση των αποτελεσμάτων της ομάδας ελέγχου των υγιών εθελοντών αιμοδοτών, πρέπει να αναφέρουμε ότι από τα 41 άτομα που μετρήθηκαν, τα 7 (17%) αποκλείστηκαν από τη στατιστική ανάλυση διότι οι χρόνοι τους (closure times) ήταν υπερβολικά υψηλοί. Ύστερα από προσεκτική και ενδελεχή μελέτη του πρόσφατου ιστορικού λήψης φαρμακευτικών ουσιών αποκαλύφθηκε ότι οι εξαιρετικά μεγάλες τιμές ήταν αποτέλεσμα λήψης φαρμάκων που επηρεάζουν τη λειτουργικότητα των αιμοπεταλίων και γι' αυτό το λόγο τα άτομα αυτά αποκλείστηκαν από τη στατιστική αξιολόγηση. Η χρήση των ουσιών είχε αρχικά αποκρυσταλλωθεί από την ερευνητική ομάδα ή οι συμμετέχοντες απλά ξέχασαν να την αναφέρουν.

Έτσι ο συνολικός αριθμός των ατόμων στην ομάδα ελέγχου διαμορφώθηκε τελικά στους 34 (τριάντα τέσσερις). Θεωρείται απαραίτητο να ξανααναφερθεί ότι οι συνθήκες διεξαγωγής της έρευνας για τις δύο ομάδες ήταν πανομοιότυπες από τον τρόπο της αιμοληψίας μέχρι τα κριτήρια αποκλεισμού ή εισόδου στην έρευνα και τον απαραίτητο ελάχιστο χρόνο πέραν του οποίου το δείγμα του αίματος απορριπτόταν ως ακατάλληλο.

Ο χρόνος σύγκλεισης (closure time) του ανοίγματος της μεμβράνης από τον αιμοπεταλιακό θρόμβο θα αναφέρεται σε δευτερόλεπτα (sec). Σε ότι αφορά το διεγέρτη κολλαγόνου /επινεφρίνης για την ομάδα των υγιών εθελοντών ο μέσος χρόνος σύγκλεισης (μέση τιμή των χρόνων των συμμετεχόντων) ήταν 123 sec ενώ η σταθερά αποκλίσεως υπολογίστηκε στα 19 sec, σύμφωνα με το μαθηματικό τύπο:

$$SD = \sqrt{\sum \frac{(x - \bar{x})^2}{n-1}} = \sqrt{\frac{\sum x^2 - \frac{(\sum X)^2}{n}}{n-1}}$$

όπου  $x$ : η εκάστοτε τιμή cl-time,  $\bar{x}$ : μέση τιμή

και  $n$ : 34 ο αριθμός των ατόμων. Ακόμη σε ότι αφορά το δεύτερο διεγέρτη κολλαγόνου / διφωσφορικής αδενοσίνης (Col/ADP) η μέση τιμή ήταν 88 sec και η σταθερά αποκλίσεως 14 sec. Για τους χρόνους που προέκυψαν και για τους δύο διεγέρτες της συσσώρευσης των αιμοπεταλίων υπολογίστηκαν το 5<sup>ο</sup> και το 95<sup>ο</sup> εκατοστημόριο και τα αναφερόμενα σ' αυτά 90% όρια αξιοπιστίας τα οποία υπολογίζονται εάν στη μέση τιμή προσθέσουμε και αφαιρέσουμε 2 σταθερές αποκλίσεως. Κατ' αυτόν τον τρόπο το 90% όριο αξιοπιστίας για το Col/Epi κυμαίνονται μεταξύ των 85-161 sec ενώ για το Col/ADP μεταξύ των τιμών 60-116 sec (Πίνακας 1). Τα υπολογιζόμενα όρια αξιοπιστίας ισχύουν εάν και εφόσον η κατανομή στην οποία αναφέρονται είναι κανονική, συνθήκη που σ' αυτή την έρευνα ικανοποιείται πλήρως. Πέντε (5/34) από τα τριαντατέσσερα (15%) δείγματα χρειάστηκαν επανέλεγχο αφού οι δύο μετρήσεις που γίνονταν για τον κάθε υγιή εθελοντή αιμοδότη διέφεραν μεταξύ τους πάνω από 10%.

### ΠΙΝΑΚΑΣ 1: ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ ΥΓΙΩΝ ΑΙΜΟΔΟΤΩΝ

ΔΙΕΓΕΡΤΕΣ ΑΙΜΟΠΕΤΑΛΙΩΝ	ΜΕΣΗ ΤΙΜΗ +/- ΣΤΑΘΕΡΑ ΑΠΟΚΛΙΣΕΩΣ	ΟΡΙΑ ΑΞΙΟΠΙΣΤΙΑΣ
Col/EPI (34)	123-/+ 19 sec	85-161
Col/ADP (34)	88-/+ 14 sec	60-116

Στην ιατρική βιβλιογραφία είναι συνήθης ο προσδιορισμός των φυσιολογικών τιμών ή ορίων των διαφόρων εργαστηριακών μεγεθών δια του τύπου μέση τιμή  $\pm 2$  σταθερές αποκλίσεις. Στην έρευνα αυτή το δείγμα των υγιών εθελοντών αιμοδοτών χρησιμοποιήθηκε ώστε να προσδιοριστούν τα όρια μέσα στα οποία η διακύμανση του χρόνου συγκλείσεως και επομένως η συσσώρευση των αιμοπεταλίων είναι φυσιολογική. Με τον τρόπο αυτό προκύπτει ένα ασφαλές και έγκυρο μέτρο σύγκρισης για την ομάδα των ασθενών που έφεραν τις προθέσεις τιτανίου.

Η ομάδα υπό έρευνα, των ασθενών που έφεραν προθέσεις τιτανίου αποτελείται από 33 άτομα εκ των οποίων τα 16 ήταν άνδρες (48%) και 17 ήταν γυναίκες (52%). Η μέση ηλικία των ασθενών ήταν 40.8 έτη ενώ η μέση τιμή του αιματοκρίτη τους ήταν 41.9 και του αριθμού των αιμοπεταλίων 249.000/uL. Εννέα (9) άρρωστοι (27.2%) έφεραν πλάκα οστεοσύνθεσης τιτανίου reconstruction (2.4 – 2.7mm), 13 ασθενείς έφεραν πλάκες οστεοσύνθεσης 2.3mm (39.39%) ενώ 11 ασθενείς (33.3%) έφεραν οδοντικά οστεοενσωματούμενα εμφυτεύματα. Εξ

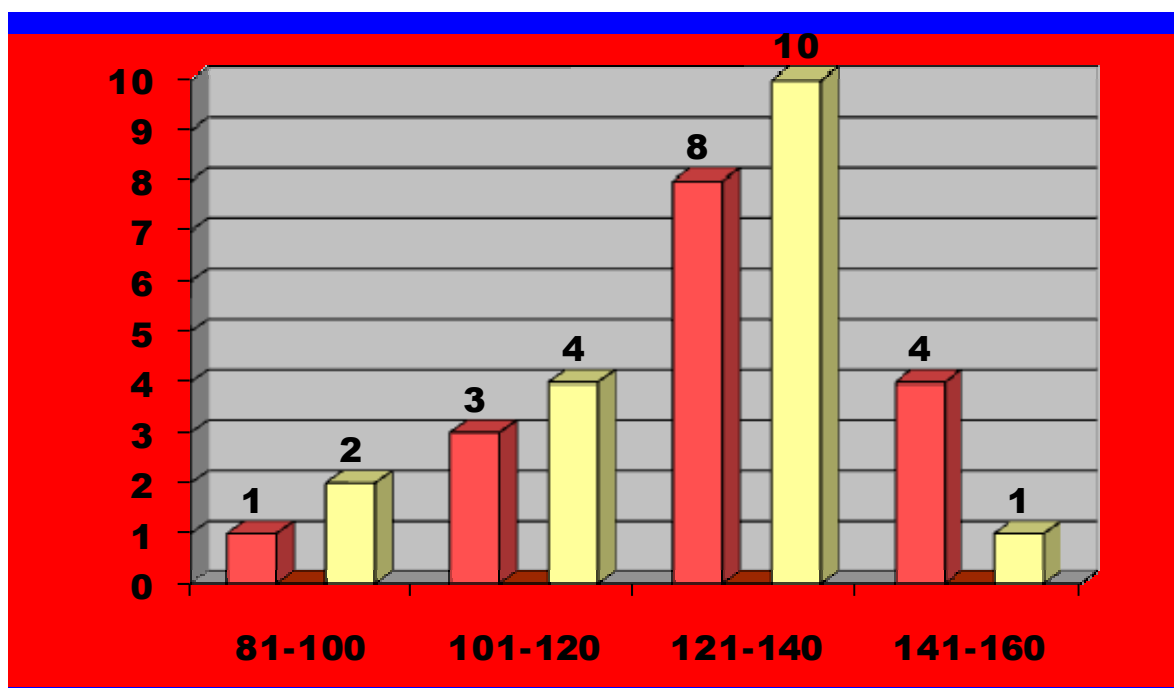
αιτίας της σημαντικότητας των αποτελεσμάτων της ομάδας αυτής θα γίνει εκτενής αναφορά στους χρόνους σύγκλισης CoL/Epi, CoL/ADP, την ηλικία, τον αιματοκρίτη, τον αριθμό των αιμοπεταλίων καθώς επίσης και τον τύπο του υλικού (πλάκες τιτανίου-εμφυτεύματα) που έφερε ο κάθε ασθενής. (Πίνακας 2)

## ΠΙΝΑΚΑΣ 2: ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ ΑΣΘΕΝΩΝ ΜΕ ΠΡΟΘΕΣΕΙΣ ΤΙΤΑΝΙΟΥ

A/A αριθμός/υλικό	Col/Epi	Col/ADP	ΗΛΙΚΙΑ	HCT	PL Tx10 <sup>3</sup>
1. reconustruction	125	94	71	35.6	464
2. πλάκα 2.3 mm	121	78	31	47.9	272
3. reconustruction	92	73	59	40.1	157
4. reconustruction	128	83	50	46	190
5. reconustruction	131	101	50	31.6	359
6. reconustruction	140	102	45	41.4	294
7. πλάκα 2.3 mm	123	94	30	44.2	237
8. οδ.οστέο. εμφ/τα (17 εμφ/τα)	102	85	41	40.3	264
9. reconustruction	122	83	40	46.9	176
10. 2 πλάκες 2.3 mm	113	71	20	43.5	157
11. reconustruction	135	90	62	38.4	258
12. reconustruction	136	84	56	35.2	331
13. reconustruction	137	91	47	42.8	158
14. πλάκα 2.3 mm	139	84	25	46	271
15. πλάκα 2.3 mm	138	82	52	41.2	347
16. πλάκα 2.3 mm	138	83	29	44.7	267
17. 2 πλάκες 2.3 mm	111	77	21	41	275
18. πλάκα 2.3 mm	141	100	25	48.6	245
19. (20) οστέο-εμφ/τα	90	65	49	47	184
20. (6) οστέο-εμφ/τα	111	83	50	40.4	293
21. (17) οστέο-εμφ/τα	126	71	40	41.4	304
22. 2.3 mm πλάκα	135	90	32	45.8	198
23. 2.3 mm πλάκα	92	72	27	45.4	310
24. 2.3 mm πλάκα	107	86	17	40.6	194
25. 2.3 mm πλάκα	105	82	59	37.3	148
26. (7) οστέο-εμφ/τα	123	105	51	47	250
27. (9) οστέο-εμφ/τα	155*	93	46	49.1	161
28. (9) οστέο-εμφ/τα	121	93	46	43.1	187
29. 2.3 (δύο) πλάκες	135	83	31	42.8	281
30 (8) οστ-εμφ/τα	141	90	41	39.2	265
31. (9) οστέο-εμφ/τα	144	116*	51	41.5	193
32. (7) οστέο-εμφ/τα	116	88	41	41.9	295
33. (12) οστέο-εμφ/τα	141	76	51	37.2	311

Η στατιστική επεξεργασία των αποτελεσμάτων των μετρήσεων στους ασθενείς που έφεραν προθέσεις τιτανίου απεικονίζεται στα διαγράμματα 1 και 2. Απεικονίζονται τα αποτελέσματα ύστερα από ομαδοποίηση σε ομάδες των 10 sec ξεχωριστά για τον χρόνο σύγκλεισης με διεγέρτη το κολλαγόνο/ επινεφρίνη και το κολλαγόνο/διφωσφορική αδενοσίνη. Προκειμένου να γίνει δυνατή η κατανομή των ασθενών που έφεραν τις προθέσεις του τιτανίου σχηματίστηκαν ομάδες με βάση τον χρόνο σύγκλεισης (closure time) τόσο για τους διεγέρτες κολλαγόνο / επινεφρίνη όσο και για τους διεγέρτες κολλαγόνο / διφωσφορική αδενοσίνη.

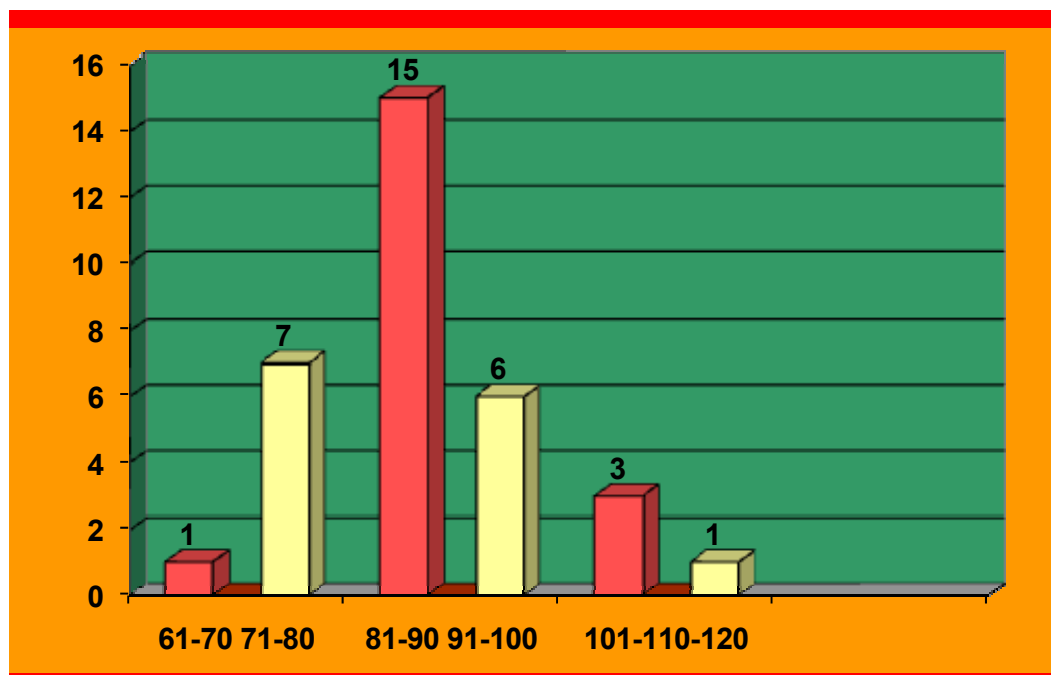
Η κάθε ομάδα αποτελείται από τους ασθενείς που είχαν χρόνο σύγκλεισης εντός στενών χρονικών ορίων (10 sec). Για τους διεγέρτες Col/Epi σχηματίστηκαν 8 ομάδες (από 80 έως 160 sec) και η κατανομή των ασθενών στην κάθε ομάδα φαίνεται στο διάγραμμα 1. Τα αποτελέσματα ήταν 81-90 sec: 1 ασθενής β) 91-100 sec: 2 ασθενείς: γ) 101 – 110: 3 ασθενείς δ) 111 – 120 sec: 4 ασθενείς ε) 121-130 sec: 8 ασθενείς στ) 131-140 sec: 10 ασθενείς ζ) 141 – 150 sec: 4 ασθενείς η) 151 – 160 sec: 1 ασθενής ( διάγραμμα 1)



**Διάγραμμα 1: Κατανομή ασθενών με βάση τον Closure time , διεγέρτης κολλαγόνο/επινεφρίνη**

Για τους διεγέρτες κολλαγόνου / διφωσφορικής αδενοσίνης σχηματίστηκαν αντίστοιχα 6 ομάδες από 60 έως 120 sec και η κατανομή των ασθενών ήταν α) 61-70 sec: 1 ασθενής β) 71–

80 sec: 7 ασθενείς γ) 81-90 sec: 15 ασθενείς δ) 91-100 sec: 6 ασθενείς ε) 101-110 sec: 3 ασθενείς στ) 111-120 sec: 1 ασθενής. Τα αποτελέσματα της μεθόδου PFA-100 για τους διεγέρτες Col/ADP φαίνονται στο διάγραμμα 2. Στον άξονα των xx' σημειώνεται χρόνος σύγκλεισης σε sec, ενώ στον yy' σημειώνεται ο αριθμός των ασθενών.



**Διάγραμμα 2: Κατανομή ασθενών με βάση τον Closure time , διεγέρτης κολλαγόνο/ διφωσφορική αδενοσίνη**

Μετά τη στατιστική ανάλυση των αποτελεσμάτων προέκυψαν για τον κάθε διεγέρτη: η μέση τιμή και η σταθερά απόκλισης κάθε κατανομής. Οι δύο κατανομές ακολουθούν το πρότυπο της κανονικής κατανομής. Η μέθοδος PFA-100 ανάλυσης της λειτουργικότητας των αιμοπεταλίων με διεγέρτη συσσώρευσης το κολλαγόνο / επινεφρίνη είχε τα εξής αποτελέσματα για τους ασθενείς με προθέσεις τιτανίου.

PFA/Επί ΜΕΣΗ ΤΙΜΗ: 124.6 sec PFA /Επί: σταθερά απόκλισης SD: 16.5 sec

### ΡFA/ΕΡΙ ΜΕΣΗ ΤΙΜΗ-ΣΤΑΘΕΡΑ ΑΠΟΚΛΙΣΗΣ



**Διάγραμμα 3**

Στο διάγραμμα 3 απεικονίζεται η μέση τιμή και η σταθερά αποκλίσεως των φυσιολογικών αιμοδοτών σε σύγκριση με των ασθενών με προθέσεις τιτανίου. Κατ' αναλογία τα αποτελέσματα της μεθόδου για τους ασθενείς με προθέσεις τιτανίου με διεγέρτες κολλαγόνο / διφωσφορική αδενοσίνη ήταν PFA / ADP ΜΕΣΗ ΤΙΜΗ: 86.3 sec και PFA / ADP σταθερά απόκλισης: 11 sec.

### ΡFA/ADP ΜΕΣΗ ΤΙΜΗ-ΣΤΑΘΕΡΑ ΑΠΟΚΛΙΣΗΣ



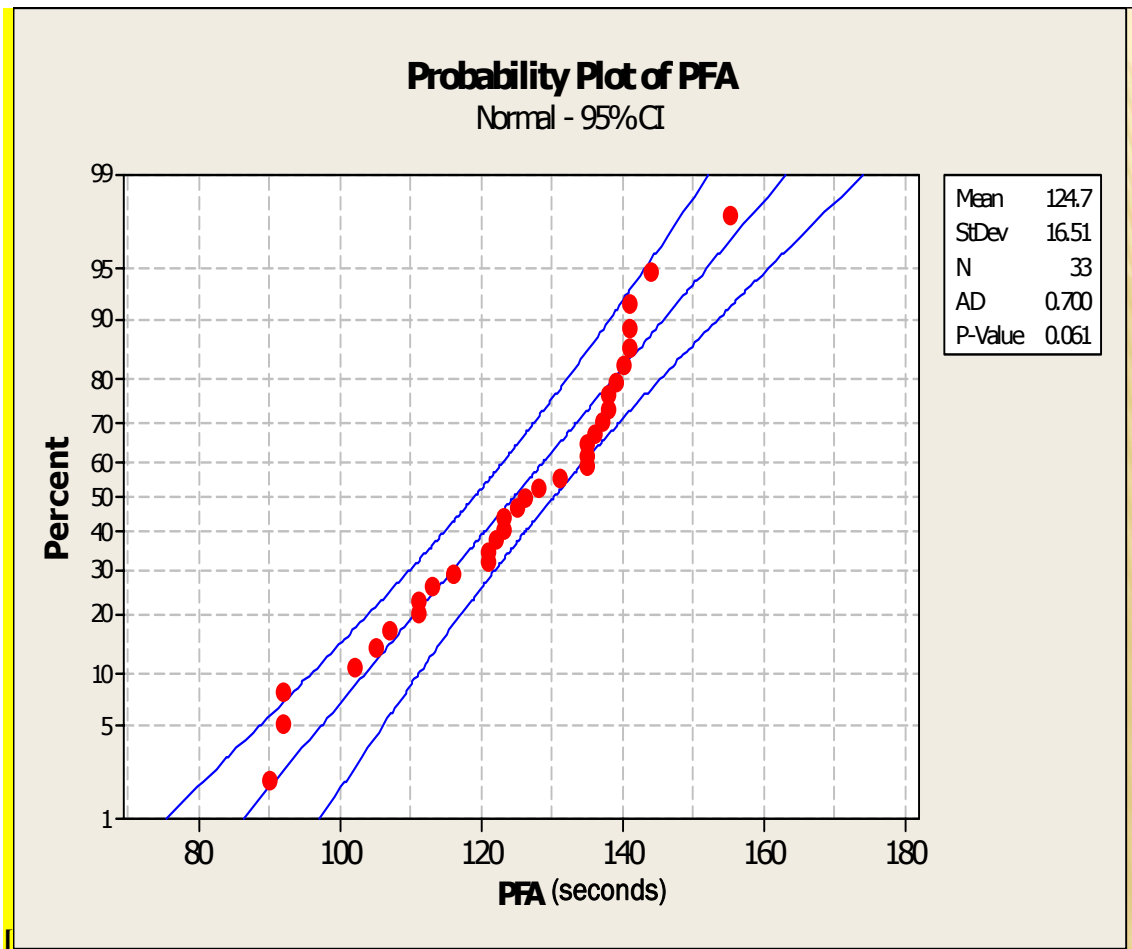
**Διάγραμμα 4**

Στο διάγραμμα 4 απεικονίζονται οι μέσες τιμές και οι σταθερές αποκλίσεως των υγιών αιμοδοτών και των ασθενών με προθέσεις τιτανίου αντίστοιχα σε σύγκριση. Ο άξονας  $yy'$  σημειώνεται με ενδείξεις σε sec.

Η διασπορά των τιμών των μετρήσεων και με τους δύο διεγέρτες (Col/Epi, Col/ADP) απεικονίζεται στα διαγράμματα 5 και 6. Πιο συγκεκριμένα στο διάγραμμα 5 τύπου qqplot απεικονίζονται οι τιμές του χρόνου σύγκλεισης για τους 33 ασθενείς με προθέσεις τιτανίου ως κόκκινοι δίσκοι. Στον άξονα των  $xx'$  σημειώνεται ο χρόνος σε sec ενώ στον άξονα  $yy'$  η εκατοστιαία κλίμακα των ορίων αξιοπιστίας της συγκεκριμένης κατανομής.

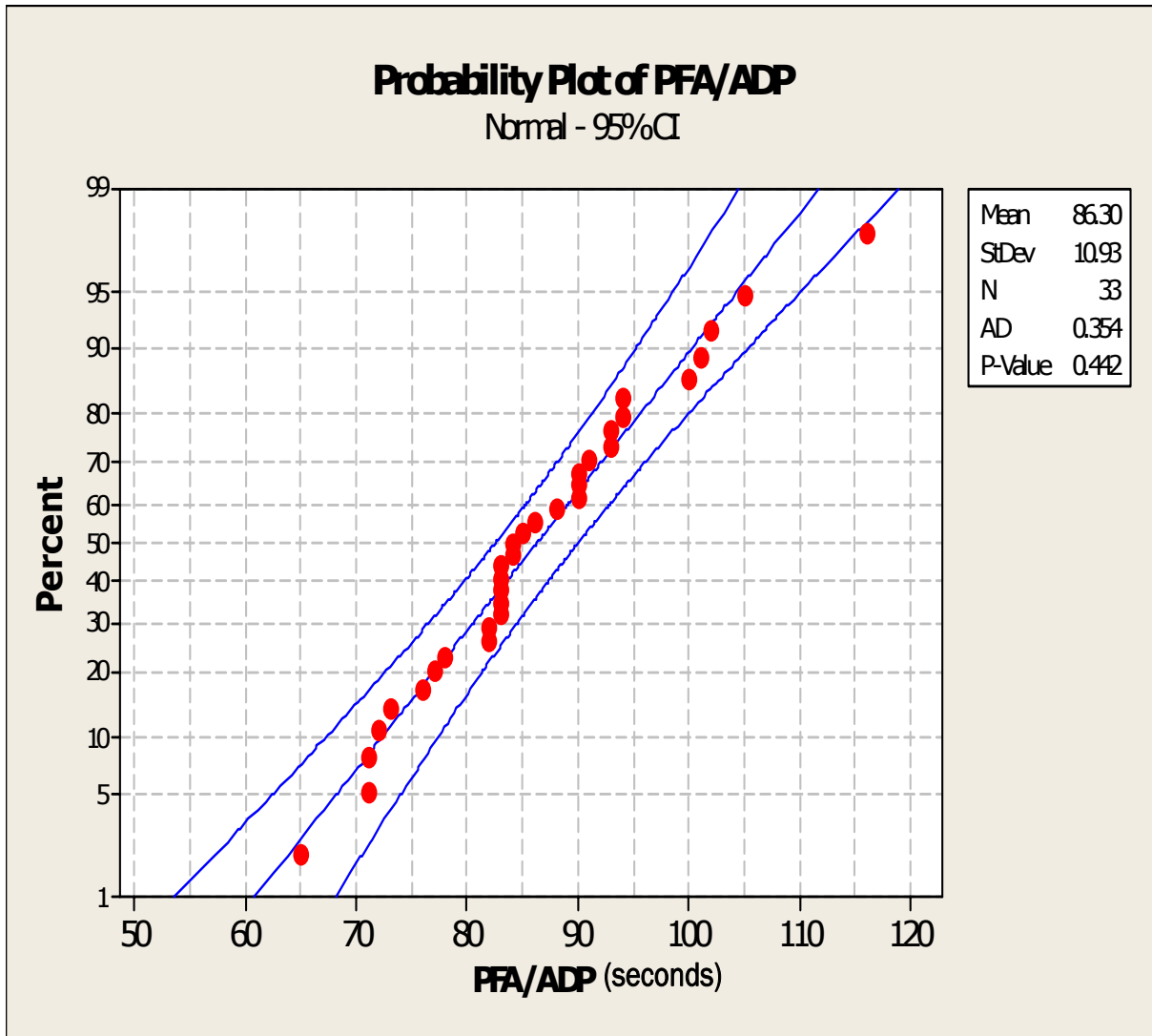
Η κεντρική κυανή γραμμή αναπαριστά το αποτέλεσμα της θεωρητικής κατανομής εάν αυτή ήταν απολύτως κανονική και αντιπροσωπεύει τη μέση τιμή. Οι δύο καμπύλες εκατέρωθεν αυτής παριστούν τις θεωρητικές τιμές δύο σταθερές αποκλίσεως κάτω και πάνω αντίστοιχα από τη μέση τιμή. Στο διάγραμμα 5 απεικονίζονται οι τιμές που μετρήθηκαν για τους 33 ασθενείς με διεγέρτη το κολλαγόνο / επινεφρίνη και η κατανομή τους μέσα στα όρια μέσης τιμής  $\pm 2$  σταθερές αποκλίσεως για όρια αξιοπιστίας 95%.

Ανάλογη είναι η απεικόνιση που πήραμε όταν απεικονίστηκαν με τον ίδιο τρόπο οι τιμές του χρόνου σύγκλεισης των ασθενών με προθέσεις τιτανίου με διεγέρτη της συσσώρευσης κολλαγόνο / διφωσφορική αδενοσίνη. Η κατανομή των τιμών αυτών απεικονίζεται στο διάγραμμα 6.



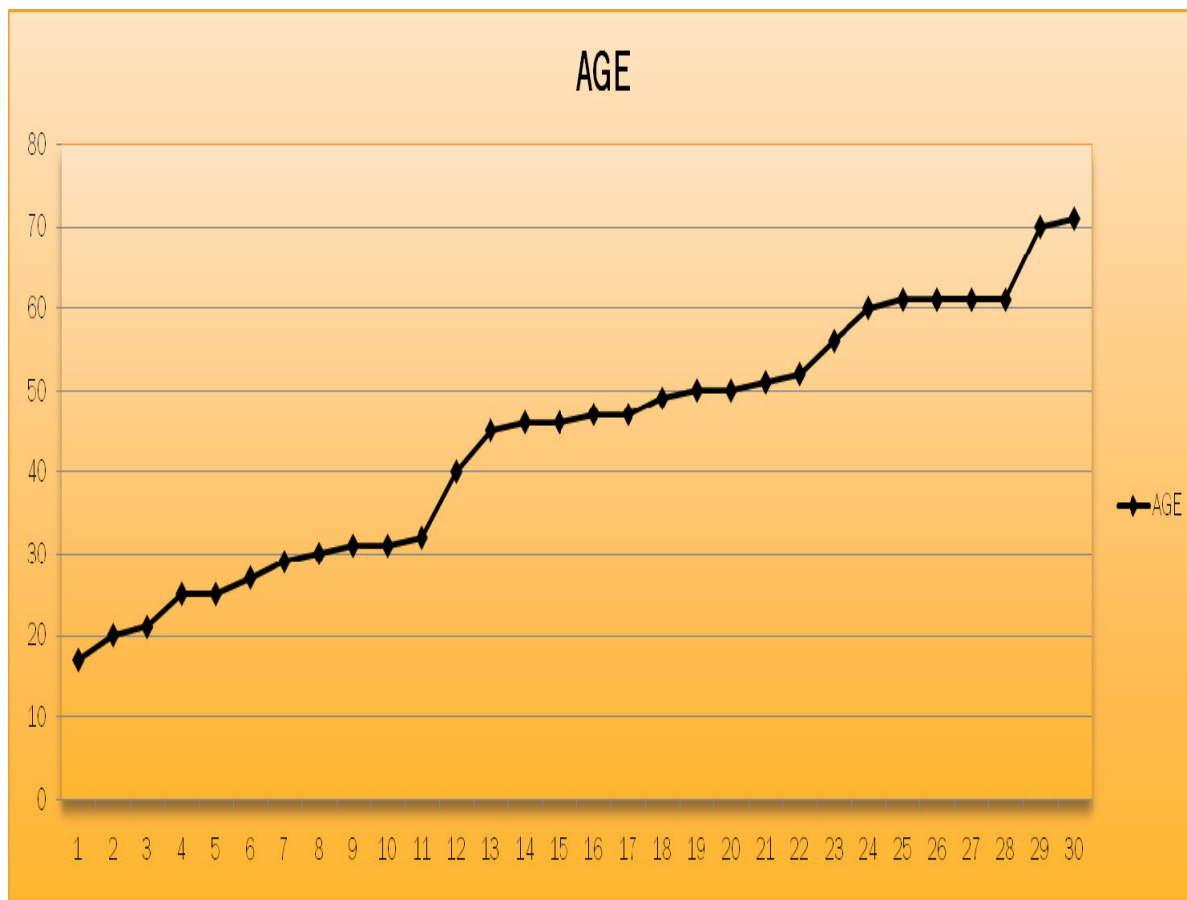
Διάγραμμα 5



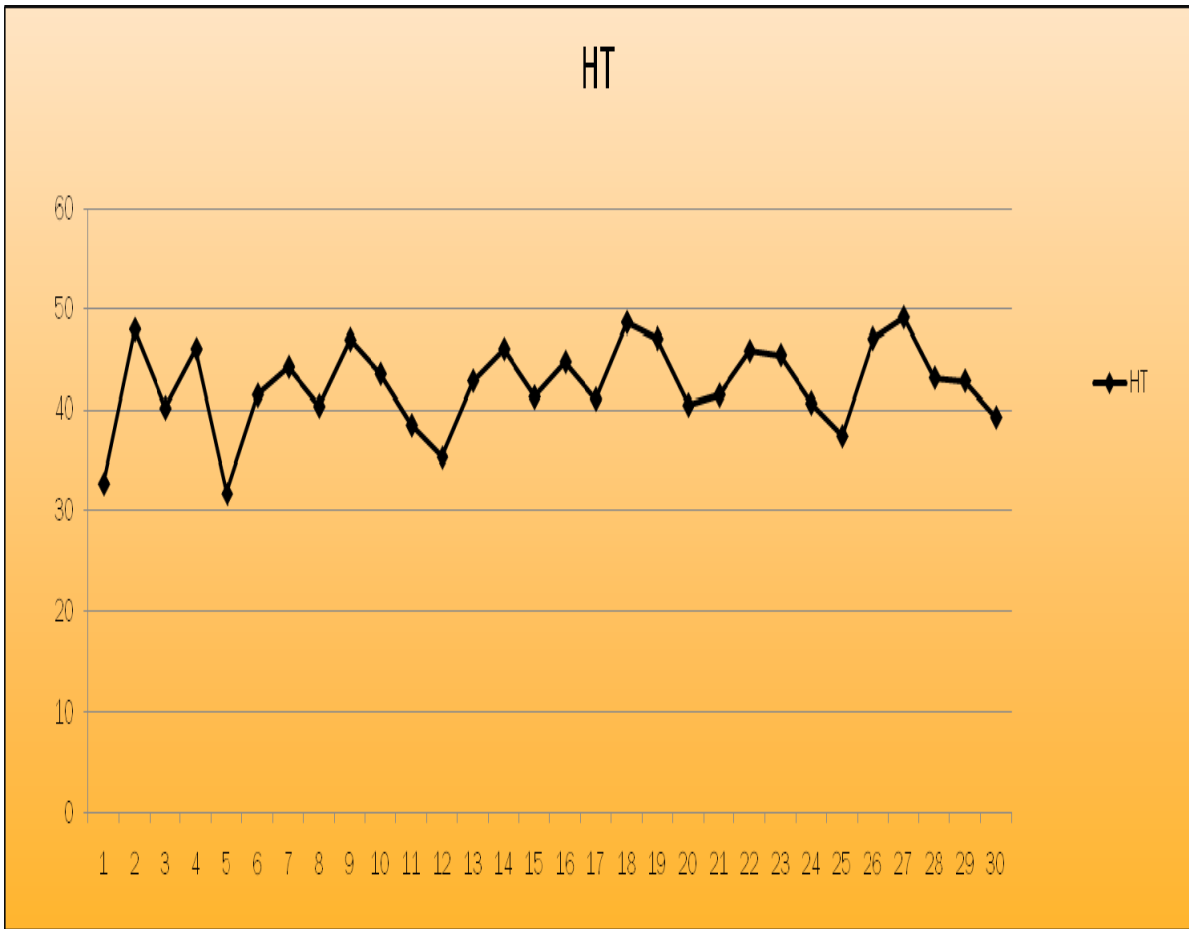


**Διάγραμμα 6**

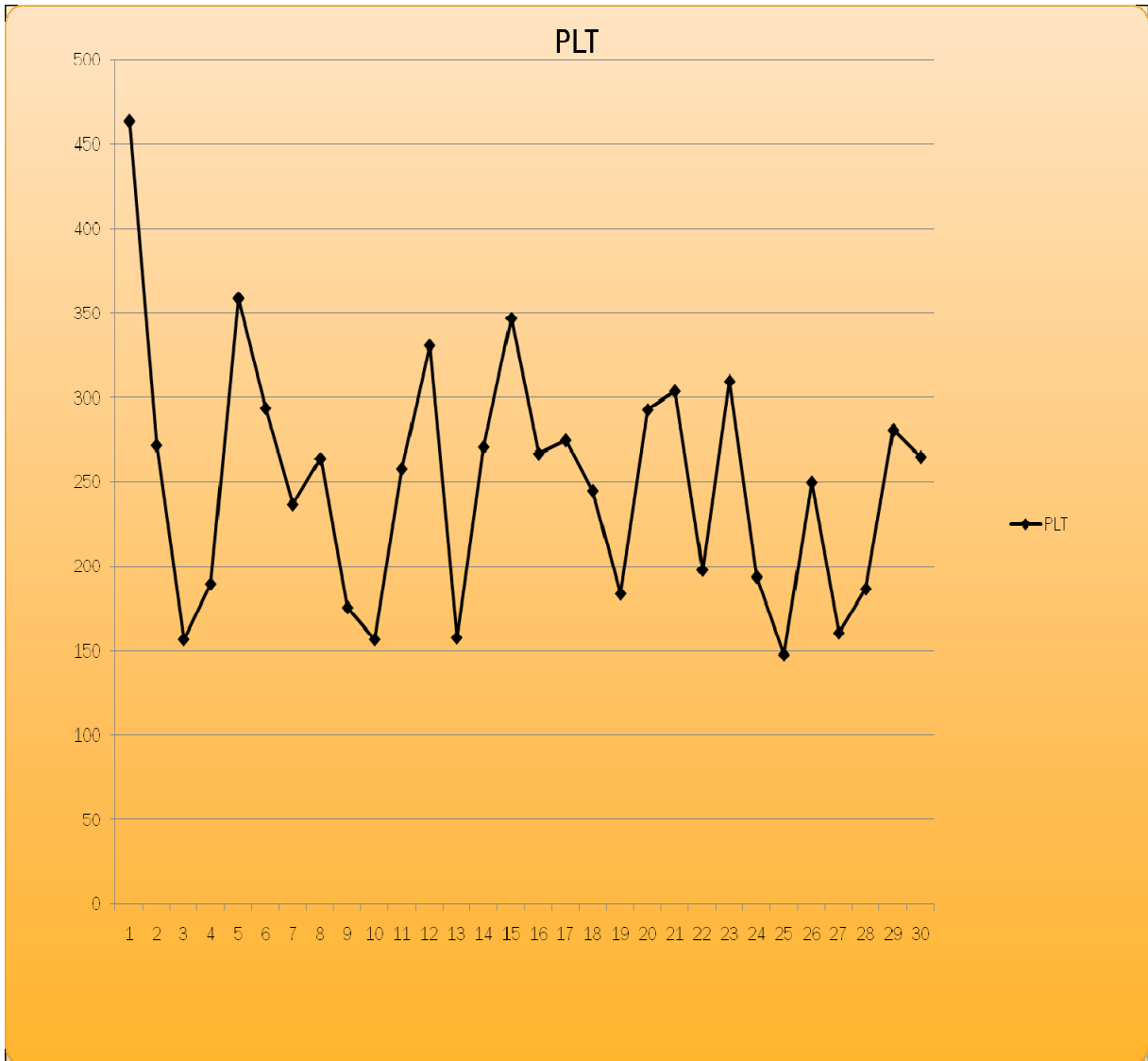
Οι διακυμάνσεις της ηλικίας, του αιματοκρίτη και του αριθμού των αιμοπεταλίων των ασθενών με προθέσεις τιτανίου απεικονίζονται στα διαγράμματα 7, 8 και 9 αντίστοιχα.



**Διάγραμμα 7**



**Διάγραμμα 8**



**Διάγραμμα 9**

Ο νεαρότερος ασθενής που συμμετείχε στην έρευνα ήταν 17 ετών, ο γηραιότερος 71 ετών, ενώ ο μέσος όρος της ηλικίας των ασθενών ήταν 40.6 έτη. Η πιο χαμηλή τιμή αιματοκρίτου μεταξύ των ασθενών ήταν 35.2% η πιο υψηλή 49.1% ενώ ο μέσος όρος της τιμής του αιματοκρίτη ήταν 42.3%. Ο μέσος όρος του αριθμού των αιμοπεταλίων ήταν 249.000 /uL η χαμηλότερη τιμή ήταν 157.000 /uL ενώ η υψηλότερη τιμή 464.000 /uL αιμοπετάλια.

Μεταξύ των υγιών αιμοδοτών και των ασθενών με προθέσεις τιτανίου έγινε στατιστική δοκιμασία two-student t-test για να συγκριθούν οι μέσες τιμές των δύο ομάδων (ελέγχου – στόχου). Η δοκιμασία εφαρμόστηκε δύο φορές, μια για κάθε διεγέρτη που χρησιμοποιήθηκε.

Τα μετρούμενα μεγέθη που συγκρίθηκαν ήταν για τους υγιείς PFA/EPI μέση τιμή 123 sec και σταθερά απόκλισης 19 sec ενώ για τους ασθενείς μέση τιμή: 124.6 sec και σταθερά απόκλισης 16.5 sec. Η απόλυτη τιμή του t-test βρέθηκε να είναι ίση με  $t=0.382$  που αντιστοιχεί σε τιμή του  $p \text{ value} = 0.7$

Αντίστοιχα τα μεγέθη που συγκρίθηκαν, με διεγέρτη της συσσώρευσης των αιμοπεταλίων το κολλαγόνο / διφωσφορική αδενοσίνη, ήταν για τους αιμοδότες μέση τιμή: 88 sec και σταθερά απόκλισης 14 sec ενώ για τους ασθενείς 86.3 sec και σταθερά απόκλισης 11 sec. Η απόλυτη τιμή του t-test βρέθηκε ίση με  $t=0.55$  που αντιστοιχεί σε τιμή του  $p \text{ value} = 0.58$ . Ως βαθμοί ελευθερίας για την εξαγωγή των στατιστικών αποτελεσμάτων υπολογίστηκαν οι εξής  $n=n_1+n_2-2$  όπου  $n_1$ : ο αριθμός των υγιών εθελοντών,  $n_2$ : ο αριθμός των ασθενών με προθέσεις τιτανίου δηλαδή  $n= 34+33-2=65$ .

## ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ T-TEST

ΜΕΤΑΞΥ ΤΩΝ ΑΙΜΟΔΟΤΩΝ ΚΑΙ ΤΩΝ ΑΣΘΕΝΩΝ ΜΕ ΤΙΤΑΝΙΟ ΕΓΙΝΕ ΣΤΑΤΙΣΤΙΚΗ ΔΟΚΙΜΑΣΙΑ T-TEST Η ΟΠΟΙΑ ΕΔΩΣΕ ΤΑ ΠΑΡΑΚΑΤΩ ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ:

- ✚ PFA/EPI:t-test=0.382 P=0.7
- ✚ PFA/ADP:t-test=0.55 P=0.58

ΕΠΟΜΕΝΩΣ ΤΑ ΜΕΤΡΟΥΜΕΝΑ ΜΕΓΕΘΗ ΔΕΝ ΔΙΑΦΕΡΟΥΝ ΣΤΑΤΙΣΤΙΚΩΣ ΣΗΜΑΝΤΙΚΑ

- ✚ PFA/EPI MEANS(123-124,6) SD(19-16,5)
- ✚ PFA/ADP MEANS(88-86,3) SD (14-11)

Στις εικόνες 4 και 5 εμφανίζεται η συσκευή του PFA-100 αναλυτή, οι εφαρμογές που βρίσκει στην κλινική πράξη, τα χαρακτηριστικά της και ο τρόπος λειτουργίας της σχεδιαγραμματικά. Επίσης απεικονίζονται τα πλεονεκτήματα και τα οφέλη που προκύπτουν από τη χρήση της συσκευής.<sup>(84-92)</sup>

## The PFA-100® analyzer

...for better

### When you need to assess platelet function

#### PFA-100® Analyzer Implementation

When you need to assess platelet function

#### PFA-100® and Cardiac Interventions

When you need to assess platelet function

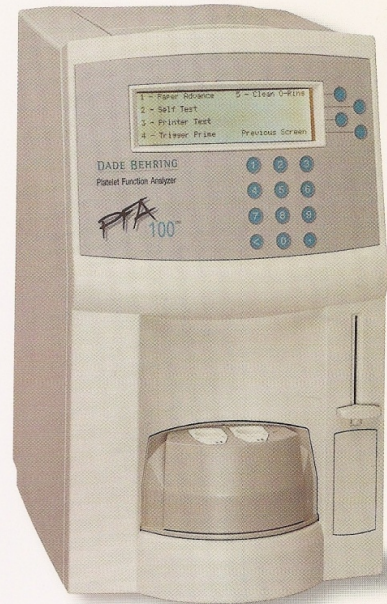
#### PFA-100® and von Willebrand Disease

When you need to assess platelet function

#### PFA-100® and Aspirin Monitoring

When you need to assess platelet function

If you need additional pocket cards please contact your local Dade Behring representative.



### Characteristics

- Flow system
- Uses citrated whole blood
- Uses only 800 µL/test
- Can be performed up to 4 hours post-venipuncture



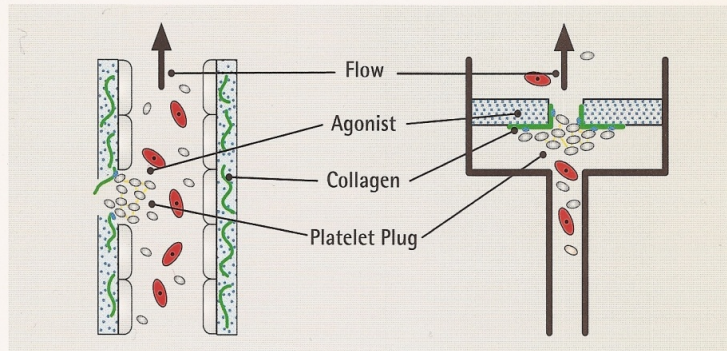
# risk assessment ...for better patient management

## The PFA-100® analyzer

...simulates *in vivo*  
conditions

### 2 Test Cartridges

- The Collagen/Epinephrine cartridge is for primary screening.
- The Collagen/ADP cartridge is used to identify Aspirin usage.



...is easy to use

Including the 3 minute incubation, the first result can be obtained in as little as 4 minutes.\*



...has a great sensitivity  
to primary hemostasis  
defects\*\*

	Platelet Dysfunction n=179	von Willebrand Disease n=298
Overall Sensitivity COL/EPI Cartridge	<b>91%</b>	<b>92%</b>

\* Maximum 8 minutes with abnormal samples

\*\* Based on Falavero 2001 (Haemophilia 7 : 170 - 79) and Mammen et al. 1998 (Sem Thromb Hemost 24 : 195 - 200)

### Advantages

- Simulates *in vivo* conditions
- Simple venipuncture
- Small blood requirement
- Time flexibility

### Benefits

- Provides snapshot of Primary Hemostasis
- Simple, fast, more comfortable for patient
- Repeatable if needed
- Less organizational constraints for the laboratory

### 3.2 ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ ΔΙΕΡΕΥΝΗΣΗΣ ΚΥΤΤΑΡΟΤΟΞΙΚΟΤΗΤΑΣ ΟΞΕΙΔΙΟΥ ΤΟΥ ΤΙΤΑΝΙΟΥ

Κυτταρική Σειρά	LMS	MCF7	MRC5
Συγκέντρωση			
Control-όχι TiO <sub>2</sub>	100% (±0.01)	100% (±0.01)	100% (±0.02)
32 mg/ml	96% (±0.03)	97% (±0.04)	100% (±0.03)
16 mg/ml	98% (±0.02)	97% (±0.03)	98% (±0.05)
8 mg/ml	100% (±0.01)	100% (±0.05)	100% (±0.02)
4 mg/ml	100% (±0.01)	100% (±0.02)	99% (±0.02)
2 mg/ml	100% (±0.03)	100% (±0.03)	100% (±0.02)
1 mg/ml	100% (±0.02)	100% (±0.01)	100% (±0.03)
0.5 mg/ml	100% (±0.01)	100% (±0.02)	98% (±0.05)
Control-όχι TiO <sub>2</sub>	100% (±0.01)	100% (±0.06)	
4.8 mg/ml	97% (±0.04)	96% (±0.04)	
2.4 mg/ml	98% (±0.07)	97% (±0.03)	
1.2 mg/ml	97% (±0.09)	97% (±0.07)	
0.6 mg/ml	100% (±0.05)	100% (±0.03)	
0.3 mg/ml	100% (±0.04)	100% (±0.05)	
0.15 mg/ml	100% (±0.12)	100% (±0.02)	
0.075 mg/ml	100% (±0.06)	100% (±0.01)	
Control-όχι TiO <sub>2</sub>	100% (±0.14)	100% (±0.01)	
0.064 mg/ml	96% (±0.06)	96% (±0.04)	
0.032 mg/ml	98% (±0.03)	98% (±0.04)	
0.016 mg/ml	97% (±0.04)	100% (±0.05)	
0.008 mg/ml	99% (±0.01)	98% (±0.02)	
0.004 mg/ml	99% (±0.12)	100% (±0.01)	
0.002 mg/ml	97% (±0.04)	100% (±0.04)	
0.001 mg/ml	99% (±0.01)	100% (±0.13)	
Control-όχι TiO <sub>2</sub>	100% (±0.03)	100% (±0.04)	
0.0008 mg/ml	98% (±0.02)	96% (±0.04)	
0.0004 mg/ml	98% (±0.02)	98% (±0.06)	
0.0002 mg/ml	100% (±0.05)	100% (±0.03)	
0.0001 mg/ml	99% (±0.07)	98% (±0.02)	
0.00005 mg/ml	100% (±0.11)	100% (±0.12)	
0.000025 mg/ml	100% (±0.09)	98% (±0.03)	
0.0000125 mg/ml	100% (±0.03)	100% (±0.04)	



Πίνακας 3 : Στον παραπάνω πίνακα εμφανίζονται τα αποτελέσματα της κυτταρικής ανάπτυξης σε ποσοστό % σε σύγκριση με το control στο οποίο θεωρούμε ότι η κυτταρική ανάπτυξη είναι στο 100%. Οπότε τα υπόλοιπα ποσοστά που εμφανίζονται είναι σε σύγκριση πάντα με το control. Επίσης δίνονται συγκριτικά αποτελέσματα μεταξύ των διαφορετικών κυτταρικών σειρών. Η σειρά των καρκινικών κυττάρων του μαστού δεν ελέγχθηκε στις 2 μικρότερες ομάδες συγκεντρώσεων μιας και ο έλεγχος του TiO<sub>2</sub> στις 2 μεγαλύτερες ομάδες συγκεντρώσεων δεν αποκάλυψε καμία κυτταροτοξικότητα.



## 4. ΣΥΖΗΤΗΣΗ

### 4.1 Επίδραση του Τιτανίου στη λειτουργικότητα των αιμοπεταλίων

Σε ότι αφορά την επίδραση του τιτανίου στη λειτουργικότητα των αιμοπεταλίων, από την ανασκόπηση και μελέτη της διεθνούς βιβλιογραφίας και των δημοσιευμένων άρθρων δεν ανευρέθησαν στοιχεία που να τεκμηριώνουν είτε τη θετική είτε την αρνητική επίδραση του στοιχείου πάνω στα αιμοπετάλια. Τα μόνα αξιοσημείωτα συμπεράσματα που προκύπτουν από τη μελέτη των διεθνών δημοσιεύσεων πάνω στο θέμα είναι τα εξής: α) Τα επίπεδα του τιτανίου στον ορό ασθενών που χειρουργήθηκαν για κατάγματα του μηριαίου οστού με ενδομυελική ήλωση (υλικά από καθαρό τιτάνιο) δεν παρουσίασαν άνοδο κατά τη διάρκεια του πρώτου έτους μετά το χειρουργείο <sup>(58)</sup> β) τα φυσιολογικά επίπεδα της συγκέντρωσης του τιτανίου στον ορό του ανθρώπινου οργανισμού ανέρχονται στα 150 microg/lit <sup>(58)</sup> γ) Σημαντικά μεγαλύτερα επίπεδα τιτανίου στον ορό ασθενών παρατηρήθηκαν σε αρρώστους που χειρουργήθηκαν με σπονδυλοδεσία ή αρθροπλαστική συγκρινόμενα με τα επίπεδα τιτανίου σε ομάδα ελέγχου φυσιολογικών εθελοντών. <sup>(59-64)</sup> δ) Η ενδοτραχειακή χορήγηση διοξειδίου του τιτανίου υπό μορφή σωματιδίων σε Wistar αρουραίους οδήγησε σε επίταση της συσσώρευσης των αιμοπεταλίων στο αίμα των πειραματοζώων. <sup>(65)</sup>

Σε ότι αφορά την επίδραση του διοξειδίου του τιτανίου στην απόπτωση και τον κυτταρικό θάνατο προέκυψαν τα εξής ενδιαφέροντα συμπεράσματα: α) Αύξηση του οξειδωτικού stress και της απόπτωσης παρατηρήθηκε σε καλλιέργειες ανθρωπίνων κυττάρων βρογχικού επιθηλίου μετά την έκθεσή τους σε μικροσωματίδια διοξειδίου του τιτανίου <sup>(67)</sup> β) Επαγωγή του κυτταρικού θανάτου παρατηρήθηκε όταν μικροσωματίδια  $TiO_2$  προστέθηκαν σε κυτταροκαλλιέργειες ανθρωπίνων λευχαιμικών κυττάρων U 937 <sup>(66)</sup> γ) Η ενδοτραχειακή χορήγηση διοξειδίου του Τιτανίου (από ρουτίλιο) σε Wistar αρουραίους επάγει την πνευμονική φλεγμονώδη αντίδραση και τη δημιουργία πνευμονικού και καρδιακού οιδήματος. <sup>(65)</sup>

Λαμβάνοντας υπόψη όλα τα δημοσιεύματα στη διεθνή βιβλιογραφία προκύπτουν αβίαστα τα εξής συμπεράσματα. i) Δεν υπάρχει πειραματική διάταξη ή in vivo μελέτη που να καταδεικνύει την επίδραση του τιτανίου στη λειτουργικότητα των αιμοπεταλίων ii) Η συγκέντρωση του στοιχείου (Ti) στον ορό κατά άλλους συγγραφείς αυξάνεται και κατά

άλλους δεν παρατηρείται αξιοσημείωτη αύξησή της μετά από εμφύτευση υλικών τιτανίου σε ασθενείς και την παρέλευση ικανού χρονικού διαστήματος iii) Το διοξείδιο του τιτανίου σε μεγάλες συγκεντρώσεις φαίνεται να ασκεί κυτταροτοξική δράση σε πληθυσμούς λευχαιμικών κυττάρων, κυττάρων βρογχικού επιθηλίου καθώς και σε κύτταρα της αναπνευστικής οδού αρουραίων.

Ένας από τους βασικούς στόχους της ερευνητικής αυτής εργασίας ήταν να επιλεγεί μια δοκιμασία ελέγχου της συσσώρευσης των αιμοπεταλίων δοκιμασμένη στο χρόνο και διεθνώς αναγνωρισμένη στο να δίνει αποτελέσματα έγκαιρα, έγκυρα και με αξιοσημείωτη ποιότητα. Το σύστημα του PFA-100 αναλυτή δημιουργεί ένα τεχνητό αγγείο το οποίο αποτελείται από τη δεξαμενή του δείγματος, ένα τριχοειδές και μια βιολογικά δραστική μεμβράνη με κεντρική οπή (επενδεδυμένη με κολλαγόνο + ADP ή κολλαγόνο + επινεφρίνη).

Η εφαρμογή μιας σταθερά αρνητικής πίεσης αναρροφά το δείγμα του αίματος με το αντιπηκτικό από τη δεξαμενή διαμέσου του τριχοειδούς (το οποίο μιμείται την αντίσταση μιας μικρής αρτηρίας) και της οπής (η οποία μιμείται το σημείο της αγγειακής βλάβης). Ο θρόμβος των αιμοπεταλίων ο οποίος σχηματίζεται, σταδιακά αποφράσσει την οπή. Επομένως η ροή του αίματος διαμέσου της οπής μειώνεται σταδιακά μέχρις ότου τελικά να σταματήσει. Ο χρόνος που απαιτείται για να σταματήσει η ροή του αίματος (closure time) καταγράφεται και ονομάζεται χρόνος συγκλείσεως.

Ο έλεγχος της λειτουργικότητας των αιμοπεταλίων με τον αναλυτή PFA-100 αποτελεί την *in vitro* δοκιμασία επιλογής για την πρωτογενή αιμόσταση παγκοσμίως.

Όπως με την ομάδα των υγιών αιμοδοτών που εθελοντικά προσήλθαν στο Τμήμα της Αιμοδοσίας του Ιπποκρατείου Νοσοκομείου έτσι και με την υπό έλεγχο ομάδα των ασθενών που έφεραν προθέσεις Τιτανίου η επιλογή των ατόμων έγινε με τρόπο τυχαίο έτσι ώστε να ικανοποιείται η απαραίτητη συνθήκη της τυχαιοποίησης, που προσδίδει τη μεγαλύτερη δυνατή αξιοπιστία. Τα κριτήρια αποκλεισμού από την έρευνα μελετήθηκαν εκτενώς και αποφασίστηκε να αποκλεισθούν όλοι εκείνοι οι ασθενείς ή αιμοδότες που λάμβαναν φαρμακευτικούς παράγοντες που επηρεάζουν τη συσσώρευση των αιμοπεταλίων ή πάσχουν από καταστάσεις που επίσης επηρεάζουν την υπό έρευνα ιδιότητα των θρομβοκυττάρων (π.χ. νεφρική ανεπάρκεια).

Επιλέχθηκαν άτομα ενήλικα που κάλυπταν όλο το φάσμα της ηλικίας (έως και τα 70 έτη) ενώ ως κατώτατα όρια συμμετοχής για τον αιματοκρίτη και τον αριθμό των αιμοπεταλίων αντίστοιχα θεωρήθηκαν οι τιμές 35% και 150.000 / $\mu$ L έτσι ώστε να μην υπάρχει κανείς

συγχετικός παράγοντας που θα μπορούσε να οδηγήσει σε αποτελέσματα περιορισμένης αξιοπιστίας. Η ποσότητα του εμφυτευμένου τιτανίου, η καθαρότητα των υλικών σε περιεκτικότητα τιτανίου και ο χρόνος που είχαν εμφυτευτεί αυτά ήταν τέτοια ώστε να μην εγείρεται καμμία αμφιβολία για το αν θα μπορούσαν να έχουν βιολογικές επιδράσεις στον οργανισμό εξαιτίας της μικρής ποσότητας ή του σύντομου χρονικού διαστήματος που αφέθηκαν να δράσουν. Η στατιστική δοκιμασία για τη σύγκριση μέσων τιμών, μικρών σχετικά πληθυσμιακών ομάδων, που χρησιμοποιείται διεθνώς με μεγάλη αξιοπιστία και εγκυρότητα είναι το student t-test. Η έρευνα αυτή είχε ως αποτέλεσμα δύο κανονικές κατανομές (μία για κάθε διεγέρτη) των οποίων οι σταθερές αποκλίσεως σε σχέση με αυτές της ομάδας ελέγχου δεν διέφεραν σημαντικά. Πληρούνταν έτσι οι βασικές προϋποθέσεις ώστε να εφαρμοστεί αυτή η στατιστική δοκιμασία. Ο συνολικός των υγιών αιμοδοτών και των ασθενών με προθέσεις τιτανίου ήταν 67 άτομα δηλαδή αριθμός παραπάνω από ικανοποιητικός προκειμένου να αποφευχθεί ο κίνδυνος τα αποτελέσματα να οφείλονται στη τυχαία διακύμανση του μετρούμενου μεγέθους (χρόνος σύγκλεισης στον PFA-100 αναλυτή).

Ξεκινώντας το σχολιασμό και την ερμηνεία των αποτελεσμάτων είναι σημαντικό να αναφέρουμε ότι σε αυτή την ερευνητική προσπάθεια η κεντρική ιδέα ήταν να χρησιμοποιηθεί μια απλή γρήγορη και σχετικά οικονομική αλλά αξιόπιστη εξέταση του αίματος που οι μετρήσεις της να αξιολογούν τις δύο βασικές λειτουργίες των αιμοπεταλίων, τη διέγερση και τη συσσώρευση. Εν συνεχεία, χρησιμοποιώντας τη δοκιμασία αυτή σε υγιείς εθελοντές αιμοδοτές θέσαμε τις τιμές εκείνες (μέση τιμή και ακραίες ανώτατες τιμές) εντός των ορίων των οποίων μία μέτρηση θα θεωρείται φυσιολογική. Κατόπιν την ίδια διαδικασία με πανομοιότυπο τρόπο εφαρμόσαμε και σε ασθενείς με προθέσεις τιτανίου και τα αποτελέσματα των μετρήσεων, αφού κατανεμήθηκαν σε ομάδες συγκρίθηκαν με τη στατιστική δοκιμασία t-test του student για να διαπιστωθεί αν διαφέρουν σε βαθμό στατιστικά σημαντικό από αυτά των φυσιολογικών αιμοδοτών.

Όπως αναφέρθηκε και στο κεφάλαιο των αποτελεσμάτων από τη στατιστική ανάλυση των 41 μετρήσεων για την ομάδα ελέγχου αποκλείσαμε τους επτά συμμετέχοντες οι οποίοι βρέθηκαν να έχουν κάνει χρήση φαρμακευτικών ουσιών που επηρεάζουν τη συσσώρευση των αιμοπεταλίων. Όταν οι δύο μετρήσεις που πραγματοποιούσαμε για κάθε αιμοδότη διέφεραν μεταξύ τους παραπάνω από 10% τότε διενεργούσαμε και τρίτη διαδοχική μέτρηση. Το φαινόμενο παρατηρήθηκε σε πέντε από τους τριαντατέσσερις συμμετέχοντες. Έτσι η μέση τιμή που προέκυψε για το διεγέρτη επινεφρίνη ήταν 123sec και για τη διφωσφορική

αδενοσίνη ήταν  $88sec$ . Ο λόγος που επιλέξαμε οι αιμοδοτές και οι ασθενείς να ελεγχθούν με δύο διεγέρτες είναι ότι μόνο τότε εξασφαλίζουμε οι μετρήσεις να είναι πραγματικές και όχι αυξημένες εξαιτίας παλαιότερης χρήσης ασπιρίνης που είναι ο φαρμακευτικός παράγοντας που κατεξοχήν επηρεάζει και ανεβάζει τον χρόνο σύγκλεισης των θρομβοκυττάρων και επακόλουθα προκαλεί αιμορραγική διάθεση.

Με βάση τις σταθερές αποκλίσεως που ήταν αντίστοιχα  $19sec$  και  $14sec$  υπολογίστηκαν τα 68% και 95% αντίστοιχα όρια αξιοπιστίας που ήταν για την επινεφρίνη  $142sec$  και  $161sec$  αντίστοιχα και για τη διφωσφορική αδενοσίνη  $102sec$  και  $116sec$ . Σε ότι αφορά την ερμηνεία των αποτελεσμάτων είναι σημαντικό να αναφερθεί ότι για την εξαγωγή συμπερασμάτων σχετικά με τη συσσώρευση των αιμοπεταλίων σημασία έχουν μόνο τα ανώτατα και όχι τα κατώτατα όρια. Αυτό πρακτικά σημαίνει ότι όταν μία μέτρηση PFA-100 είναι πολύ υψηλή τότε τίθεται σοβαρότατη υποψία δυσλειτουργίας των θρομβοκυττάρων, τα οποία δεν συσσωρεύονται φυσιολογικά και ως εκ τούτου υπάρχει σοβαρό ενδεχόμενο αιμορραγικής διάθεσης. Το αντίθετο όμως αποτέλεσμα, δηλαδή οι χαμηλές τιμές δεν σημαίνει σε καμία περίπτωση υπερσυσσώρευση αιμοπεταλίων και άρα αυξημένο κίνδυνο δημιουργίας θρόμβωσης ή πνευμονικής εμβολής. Επομένως ουσιαστική σημασία για την έρευνα αυτή έχουν μόνο οι τιμές που φτάνουν τα φυσιολογικά ανώτατα όρια ή και τα ξεπερνούν και για αυτό μόνο σε αυτές θα γίνει στο εξής αναφορά.

Η εμπειρία της χρήσης του PFA-100 για τη λειτουργία των αιμοπεταλίων είναι σήμερα πολύ μεγάλη αφού η μέθοδος αυτή χρησιμοποιείται σε όλο τον ιατρικώς προηγμένο κόσμο και πάνω από 200 διεθνείς δημοσιεύσεις έχουν γίνει στο Medline σχετικώς <sup>(82)</sup>. Η εμπειρία αυτή είναι που επιβάλλει την αξιολόγηση των υψηλών και όχι των χαμηλών μετρήσεων.

Παρατηρώντας τα αποτελέσματα των μετρήσεων για τους ασθενείς που έφεραν προθέσεις τιτανίου και για τους δύο διεγέρτες στα διαγράμματα 1 και 2 αντίστοιχα συμπεραίνουμε ότι: α) Και οι δύο κατανομές έχουν κανονική μορφή με την πρώτη να είναι μετατοπισμένη ελαφρώς προς τα δεξιά δηλαδή προς τις μεγαλύτερες τιμές β) ο κύριος όγκος των ασθενών τοποθετείται γύρω από τη μέση τιμή που ήταν  $124.6sec$  για την επινεφρίνη και  $86.3sec$  για τη διφωσφορική αδενοσίνη γ) Οι μέσες τιμές συγκρινόμενες με τις αντίστοιχες των υγιών αιμοδοτών βρίσκονται πολύ κοντά μεταξύ τους (διαγράμματα 3 και 4) δ) Και οι σταθερές αποκλίσεις όμως στα ίδια διαγράμματα βρίσκονται πολύ κοντά.

Όταν παρατηρούμε μεγάλες τυπικές αποκλίσεις πρέπει να ελεγχθούν τα αποτελέσματα είτε όσον αφορά την αξιοπιστία των μετρήσεων είτε όσον αφορά τον χωρισμό των δειγμάτων

(πιθανώς πρόκειται για ασύμμετρη κατανομή). Στις μετρήσεις βιολογικών παραμέτρων συνήθως παρουσιάζονται τυπικές αποκλίσεις έως 30% της μέσης τιμής. Στην έρευνα αυτή καμμία τυπική απόκλιση δεν ξεπέρασε το 15.9% της μέσης τιμής.<sup>(93)</sup>

Η τυπική απόκλιση δεν επηρεάζεται σημαντικά με την αύξηση του αριθμού του υπό μελέτη δείγματος. Αυτό σημαίνει ότι, αν αυξήσουμε τον αριθμό των ασθενών, η μέση απόκλιση των τιμών γύρω από τη μέση τιμή δεν αυξάνεται αισθητά. Μικραίνει όμως το τυπικό σφάλμα  $[SE = \frac{SD}{\sqrt{n}}]$ , δηλαδή όσο αυξάνεται το δείγμα τόσο αυξάνεται και η αξιοπιστία (ασφάλεια) της μέσης τιμής.<sup>(93)</sup>

Συνήθως οι στατιστικές αναλύσεις περιλαμβάνουν τη σύγκριση αποτελεσμάτων πρό και μετά μιας θεραπευτικής παρέμβασης, στην προκειμένη περίπτωση την εμφύτευση και την χειρουργική τοποθέτηση υλικών τιτανίου. Όταν αλληλοεπικαλύπτονται τα τυπικά σφάλματα των δύο υπό εξέταση πληθυσμών (ομάδες ελέγχου-στόχου) τότε μπορεί κανείς να υποθέσει ότι η σύγκριση των δεδομένων μέσω του t-test δεν θα αποδώσει στατιστικώς σημαντικά αποτελέσματα.<sup>(93)</sup> Στην έρευνα αυτή οι τυπικές αποκλίσεις για την επινεφρίνη ήταν 19sec και 16.5sec αντίστοιχα και για τη διφωσφορική αδενοσίνη 14sec και 11sec, αντίστοιχα για τους υγιείς και τους ασθενείς (διαγράμματα 3 και 4).

Στα διαγράμματα 5 και 6 απεικονίζονται η διασπορά των μετρήσεων και τα όρια αξιοπιστίας για τις κατανομές των δύο διεγερτών στους ασθενείς με προθέσεις τιτανίου. Τρία είναι τα σημαντικά συμπεράσματα: Πρώτον, πρόκειται για κανονικές κατανομές στις οποίες η συντριπτική πλειοψηφία των μετρήσεων βρίσκεται γύρω από και πάνω στην κεντρική κυανή γραμμή που παριστά την θεωρητική κατανομή εάν όλες οι μετρήσεις συνέπιπταν με τη μέση τιμή. Δεύτερον, οι δύο καμπύλες εκατέρωθεν της ευθείας γραμμής παριστούν τα 95% όρια αξιοπιστίας των κατανομών, δηλαδή πρακτικά υπαγορεύουν ότι όλες οι μετρήσεις που βρίσκονται εντός των ορίων αυτών ανήκουν στο 95% των μετρήσεων μιας κανονικής κατανομής. Τρίτον, υπάρχουν δύο μετρήσεις μία στο κάθε διάγραμμα που φαίνεται να ανήκουν οριακά στα 95% όρια αξιοπιστίας. Οι μετρήσεις αυτές ανήκουν αντίστοιχα στους ασθενείς με αύξοντα αριθμό 27 και 31 (πίνακας 2) και ήταν 155sec για την επινεφρίνη και 116sec για τη διφωσφορική αδενοσίνη.

Στο σημείο αυτό πρέπει να αναφερθεί ότι για τους Ειδικούς Αιματολόγους του Ιπποκρατείου Νοσοκομείου τα φυσιολογικά ανώτατα όρια του PFA-100 προκύπτουν εάν στη μέση τιμή προσθέσουμε μία σταθερά απόκλισης δηλαδή για την επινεφρίνη  $123+19=142\text{sec}$  και για τη

διφωσφορική αδενosίνη  $88+14=102\text{sec}$ . Σύμφωνα λοιπόν με αυτά τα αυστηρά όρια κάθε τιμή πάνω από  $142\text{sec}$  και  $102\text{sec}$  αντίστοιχα για τους δύο διεγέρτες θα πρέπει να θεωρείται ύποπτη για δυσλειτουργία των αιμοπεταλίων. Παρόλα αυτά, στη διεθνή βιο-ιατρική βιβλιογραφία ο προσδιορισμός των φυσιολογικών ορίων των διαφόρων εργαστηριακών μεγεθών γίνεται δια του τύπου μέση τιμή  $\pm$  δύο σταθερές αποκλίσεις προκειμένου για κανονικές κατανομές. Έτσι αν ερμηνεύσουμε τις μετρήσεις αυτές σύμφωνα με τα όρια μέση τιμή + μία σταθερά απόκλισης είναι υψηλές και επομένως παθολογικές, εάν όμως ερμηνευτούν με τον τύπο μέση τιμή + δυο σταθερές αποκλίσεις είναι ελαφρώς χαμηλότερες / ίσες με τα ανώτατα όρια  $123+2*19=161\text{sec}$  για την επινεφρίνη και  $88+14*2=116\text{sec}$  για τη διφωσφορική αδενosίνη και επομένως θα θεωρούνται οριακά φυσιολογικές.

Για να απαντηθεί το ερώτημα της φυσιολογικής ή μη συσσώρευσης στις δύο αυτές οριακές περιπτώσεις, οι ασθενείς αυτοί επανακλήθηκαν από το Τμήμα Αιμοδοσίας-Αιμόστασης του Ιπποκρατείου Νοσοκομείου και με νέα αιμοληψία υποβλήθηκαν στην εξέταση της κλασσικής δοκιμασίας συσσώρευσης των αιμοπεταλίων (aggregometry) που διενεργείται μόνο σε τέτοιες ειδικές περιπτώσεις οριακών μετρήσεων του PFA-100 και κατά την οποία το υπό εξέταση πλούσιο σε αιμοπετάλια πλάσμα υποβάλλεται σε έλεγχο με πολλαπλούς διεγέρτες προκειμένου να αποσαφηνιστεί η φυσιολογική ή η ελλατωματική συσσώρευση των αιμοπεταλίων.

Η δοκιμασία συσσώρευσης των αιμοπεταλίων είναι μία in vitro δοκιμασία που χρησιμοποιεί την φασματοφωτομετρία για να υπολογίσει τη συσσώρευση των αιμοπεταλίων που επιτυγχάνεται με τη χρήση διεγερτών της αιμοστατικής διαδικασίας όπως η διφωσφορική αδενosίνη, το κολλαγόνο, η ριστοσετίνη, το αραχιδονικό οξύ και η επινεφρίνη. Όπως και στον PFA-100 αναλυτή στο υπό εξέταση αίμα προστίθεται αντιπηκτική ουσία κιτρικού νατρίου. Η κεντρική ιδέα της μετρήσεως είναι η μείωση της οπτικής πυκνότητας του διαλύματος που συμβαίνει καθώς τα αιμοπετάλια συσσωρεύονται. Αυτή η αλλαγή αναπαρίσταται γραφικά ως καμπύλη συσσώρευσης των αιμοπεταλίων.

Αν και σε πολλά εργαστήρια η συγκεκριμένη μέθοδος έχει γίνει ο ακρογωνιαίος λίθος του κλινικού εργαστηρίου Αιμόστασης, αποτελεί δοκιμασία ακριβή, χρονοβόρα, εργώδη που απαιτεί εξιδευκεμένο προσωπικό τόσο για να επιτελεστεί όσο και για να ερμηνευτούν τα αποτελέσματά της. Για τους παραπάνω λόγους η δοκιμασία συσσώρευσης των αιμοπεταλίων δεν αποτελεί εξέταση ρουτίνας και πολλά εργαστήρια αιμόστασης δεν την παρέχουν. Για



τους ίδιους λόγους αποφασίστηκε να μην χρησιμοποιηθεί η συγκεκριμένη μέθοδος στην έρευνα αυτή.

Οι τιμές αναφοράς για τη δοκιμασία συσσώρευσης των αιμοπεταλίων στο Τμήμα Αιμοδοσίας – Αιμόστασης του Ιπποκρατείου Νοσοκομείου αλλά και οι ευρεθείσες τιμές για τον κάθε διεγέρτη ξεχωριστά για τους ασθενείς με αύξοντα αριθμό 27 και 31 ήταν:

#### ΣΥΣΣΩΡΕΥΣΙΟΜΕΤΡΗΣΗ

*A/A ασθενούς 27*

Περιγραφή εξέτασης	Ευρεθείσα Τιμή	Τιμές Αναφοράς
Συσ/ση αιμοπ/λίων με ADP	78%	>60
Κολλαγόνο	78%	>60
Ριστοσετίνη	82%	>60
Αραχιδονικό Οξύ	82%	>60
Επινεφρίνη	75%	>60

#### ΣΥΣΣΩΡΕΥΣΙΟΜΕΤΡΗΣΗ

*A/A ασθενούς 31*

Περιγραφή εξέτασης	Ευρεθείσα Τιμή	Τιμές Αναφοράς
Συσ/ση αιμοπ/λίων με ADP	88%	>60
Κολλαγόνο	86%	>60
Ριστοσετίνη	94%	>60
Αραχιδονικό Οξύ	93%	>60
Επινεφρίνη	86%	>60

Από την παράθεση των παραπάνω μετρήσεων προκύπτει ότι και στους πέντε διαφορετικούς διεγέρτες που χρησιμοποιήθηκαν ανευρέθηκε σαφώς φυσιολογική τιμή συσσώρευσης θρομβοκυττάρων και επομένως η λειτουργικότητα των αιμοπεταλίων χαρακτηρίζεται ως φυσιολογική παρά τις οριακές τιμές που βρέθηκαν στο PFA-100 σύστημα.

Σε μια προσπάθεια να πάρουμε μετρήσεις από όλο το ηλικιακό φάσμα αλλά και να συμμετέχουν ασθενείς με προθέσεις τιτανίου που έχουν φυσιολογικές τιμές αιματοκρίτου και αριθμού αιμοπεταλίων διενεργήσαμε αιμοληψίες σε άτομα ηλικίας από 17 έως 71 ετών (μέσος όρος 40.6 έτη), με χαμηλότερη τιμή αιματοκρίτη 35.2% και υψηλότερη 49.1% (με μέσο όρο 42.3%) και αντίστοιχες αριθμού αιμοπεταλίων 157.000/uL, 464.00/uL και μέσο όρο 249.000/uL (διαγράμματα 7, 8 και 9).

Σχετικά με τα αποτελέσματα της στατιστικής δοκιμασίας t-test που έγινε για να συγκριθούν οι μέσες τιμές μεταξύ υγιών αιμοδοτών και ασθενών με προθέσεις τιτανίου και για τους δύο διεγέρτες ξεχωριστά παρατηρούμε ότι οι τιμές του p-value είναι τέτοιες (Epi p-value=0.7, ADP p-value=0.58) που δεν αφήνουν περιθώριο παρερμηνείας: Για βαθμούς ελευθερίας  $n_1+n_2-2=34+33-2=65$  η τιμή του t-test στο επίπεδο της στατιστικής σημαντικότητας 5% είναι 2.00 και του επιπέδου της στατιστικής ασάφειας είναι 1.67. Στις μετρήσεις της έρευνας αυτής το t-test έδωσε αντίστοιχα αποτελέσματα  $t_{\text{epi}}=0.382$  και  $t_{\text{ADP}}=0.55$  που είναι κατά πολύ μικρότερες της τιμής που πρέπει να ισχύει για να έχουμε διαφορά στατιστικά σημαντική.

*Επομένως προκύπτει το συμπέρασμα ότι μεταξύ των μέσων τιμών των μετρήσεων του PFA-100 συστήματος για τους υγιείς αιμοδότες και τους ασθενείς με προθέσεις τιτανίου δεν ανευρέθηκε διαφορά στατιστικώς σημαντική ούτε καν στο επίπεδο του 10% τόσο για τους διεγέρτες κολλαγόνο / επινεφρίνη όσο και για τους διεγέρτες κολλαγόνο / διφωσφορική αδενοσίνη. Τα αποτελέσματα της έρευνας αυτής δείχνουν ότι τα υλικά τιτανίου που τοποθετούνται χειρουργικά στον ανθρώπινο οργανισμό δεν ασκούν καμία επίδραση στη λειτουργικότητα των αιμοπεταλίων.*

## 4.2 Διοξείδιο του τιτανίου και κυτταροτοξικότητα

Οι κυτταροτοξικές ιδιότητες του  $\text{TiO}_2$  μετρήθηκαν με την βοήθεια, μιας απο τις πιο διαδεδομένες βιοαναλυτικές τεχνικές, του MTT Assay όπως είναι ευρύτατα γνωστό. Οι κυτταρικές σειρές που χρησιμοποιήθηκαν ήταν η LMS (Leiomyosarcomatic Cells-λειομυοσαρκωματικά κύτταρα από Wistar rats), η MCF7 ( κύτταρα αδενοκαρκινώματος μαστού) και σειρά φυσιολογικών ινοβλαστών πνεύμονα. Οι συγκεντρώσεις του  $\text{TiO}_2$  που ελέγχθηκαν για τις κυτταροτοξικές τους ιδιότητες επιλέχθηκαν σύμφωνα με τις αντίστοιχες συγκεντρώσεις που βρέθηκαν στο αίμα, στο πλάσμα και σε ιστούς γειτονικούς που περιβάλλουν τα εμφυτεύματα του Ti.<sup>(66)</sup>

Στην παρούσα έρευνα οι συγκεντρώσεις που ελέχθησαν ήταν από 0,0000125 έως 32 mg/ml οι οποίες καλύπτουν μεγαλύτερες, μικρότερες αλλά και τις ίδιες συγκεντρώσεις που βρέθηκαν στους ιστούς, στο αίμα και στο πλάσμα.<sup>(66)</sup>

Συμπερασματικά, το TiO<sub>2</sub> βρέθηκε ότι δεν παρουσιάζει καμία κυτταροτοξικότητα και στις 3 κυτταρικές σειρές ελέγχου στις παραπάνω συγκεντρώσεις. Στον πίνακα 3 (σελ.66) βλέπουμε ότι η κυτταρική ανάπτυξη στις συγκεντρώσεις ελέγχου του TiO<sub>2</sub> δεν παρουσιάζει καμία αναστολή σε σύγκριση με το control. Η ελάχιστες διαφορές που παρουσιάζονται στα ποσοστά της κυτταρικής ανάπτυξης στις συγκεντρώσεις ελέγχου του TiO<sub>2</sub> σε σύγκριση με το control δεν είναι στατιστικά σημαντικές καθώς βρίσκονται μέσα στα πλαίσια του πειραματικού λάθους ( $\pm 10\%$ ).



## 5. ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

- *Μεταξύ των μέσων τιμών των μετρήσεων του PFA-100 συστήματος για τους υγιείς αιμοδότες και τους ασθενείς με προθέσεις τιτανίου δεν ανευρέθηκε διαφορά στατιστικώς σημαντική ούτε καν στο επίπεδο του 10% τόσο για τους διεγέρτες κολλαγόνο / επινεφρίνη όσο και για τους διεγέρτες κολλαγόνο / διφωσφορική αδενοσίνη. Τα αποτελέσματα της έρευνας αυτής δείχνουν ότι τα υλικά τιτανίου που τοποθετούνται χειρουργικά στον ανθρώπινο οργανισμό δεν ασκούν καμία επίδραση στη λειτουργικότητα των αιμοπεταλίων.*
- *Το TiO<sub>2</sub> δεν παρουσιάζει καμία κυτταροτοξικότητα σε λειομυοσαρκωματικά κύτταρα από Wistar rats (LMS) , κύτταρα αδενοκαρκινώματος μαστού (MCF-7) και φυσιολογικές ινοβλάστες πνεύμονα (MRC-5) . Οι συγκεντρώσεις του TiO<sub>2</sub> που ελέγχθηκαν για τις κυτταροτοξικές τους ιδιότητες επιλέχθηκαν σύμφωνα με τις αντίστοιχες συγκεντρώσεις που βρέθηκαν στο αίμα και σε ιστούς γειτονικούς που περιβάλλουν τα εμφυτεύματα του Ti και κυμαίνονται από 0,005-4 mg/ml.*
- *Από τα παραπάνω προκύπτει ότι το τιτάνιο που τοποθετείται χειρουργικώς ως υλικό οστεοσύνθεσης σε ασθενείς δεν επηρεάζει τον μηχανισμό πήξης του αίματος. Επιπρόσθετα το TiO<sub>2</sub> δεν ασκεί κυτταροτοξική δράση σε φυσιολογικά κύτταρα (ιστούς) και επιπλέον σε νεοπλασματικά κύτταρα σαρκωμάτων.*



## **6. ΠΕΡΙΛΗΨΗ**

Τα αιμοπετάλια είναι κύτταρα του αίματος που επιτελούν λειτουργίες απαραίτητες για τη διατήρηση της ζωής. Πρόκειται για απύρνηνα κύτταρα του αίματος τα οποία πρωταρχικά σχηματίζουν τον ομώνυμο θρόμβο (αιμοπεταλιακό ή λευκό) που αποτελεί το κυρίαρχο γεγονός της πρωτογενούς αιμόστασης αλλά ακόμη με τους αυξητικούς παράγοντες που εκκρίνουν συμμετέχουν ενεργά στην επούλωση των ιστών ύστερα από τους τραυματισμούς ή άλλες μορφές ιστικής καταστροφής. Γίνεται αντιληπτό ότι τα θρομβοκύτταρα κατέχουν κεντρική θέση και στην επιτέλεση του χειρουργικού έργου αφού καμία χειρουργική επέμβαση δεν θα ήταν δυνατή σε περίπτωση ποσοτικής αλλά και ποιοτικής έκπτωσης των κυττάρων σε μεγάλο βαθμό.

Το τιτάνιο είναι μέταλλο που ανήκει στην 4<sup>η</sup> ομάδα του περιοδικού πίνακα, στα επαμφοτερίζοντα μέταλλα με κύρια χαρακτηριστικά την ελαστικότητα, ελατότητα, ολκιμότητα και την υψηλή του αντοχή στη μηχανική καταπόνηση και την επίδραση της θερμότητας. Επιπρόσθετα το στοιχείο αυτό διαθέτει και χαρακτηριστικά υψηλή αντοχή στη διάβρωση, ιδιότητα που μαζί με αυτές που προαναφέρθηκαν το καθιστούν ιδανικό ως μέσο ακινητοποίησης καταγμάτων, ως υλικό ανακατασκευής αρθρώσεων (αρθροπλαστικές επεμβάσεις) και ως υλικό κατασκευής εμφυτευμάτων όπως τα οδοντικά οστεοενσωματούμενα εμφυτεύματα, οι ενδομυελικοί ήλοι, τα υλικά σπονδυλοδεσίας.

Όταν το τιτάνιο έρθει σε επαφή με τα βιολογικά υγρά σε ελάχιστο χρόνο σχηματίζεται στην εξωτερική επιφάνεια του μετάλλου ένα οξειδίο, το διοξειδίο του τιτανίου ( $TiO_2$ ), το οποίο όχι μόνο δεν αναστέλλει αλλά επάγει τη διαδικασία της οστεοενσωμάτωσης του υλικού, όπως είναι διεθνώς γνωστή η δημιουργία δεσμού μεταξύ του οστού και του εμφυτευόμενου μετάλλου (τιτανίου). Τόσο το τιτάνιο όσο και το σχηματιζόμενο οξειδίο του είναι αναμενόμενο, από τη στιγμή που έρχονται σε επαφή με ιστούς του ανθρώπινου οργανισμού να κινούν το επιστημονικό ενδιαφέρον σχετικά με την επίδρασή τους σ' αυτούς.

Προκειμένου να μελετηθεί η επίδραση του τιτανίου στη συσσώρευση των αιμοπεταλίων επιστρατεύτηκε η διεθνώς γνωστή και αναγνωρισμένη μέθοδος εκτίμησης της λειτουργικότητας των αιμοπεταλίων με το σύστημα PFA-100 . Ύστερα από τυχαία επιλογή 34 εθελοντών αιμοδοτών, που συγκρότησαν την ομάδα ελέγχου και 33 ασθενών που έφεραν προθέσεις τιτανίου, που συγκρότησαν την υπό έρευνα ομάδα, μετρήθηκαν οι χρόνοι

σύγκλεισης των αιμοπεταλίων με δύο ζεύγη φυσικών διεγερτών των αιμοπεταλίων: τους κολλαγόνο / επινεφρίνη και κολλαγόνο / διφωσφορική αδενοσίνη.

Από τις κατανομές που προέκυψαν συγκρίθηκαν οι μέσες τιμές των δύο ομάδων μεταξύ τους με τη στατιστική δοκιμασία του Student t-test. Η στατιστική δοκιμασία για τους διεγέρτες κολλαγόνο / επινεφρίνη ανέδειξε τιμή του t-test: 0.382 και pvalue: 0.7 ενώ για τους διεγέρτες κολλαγόνο / διφωσφορική αδενοσίνη τιμή του t-test: 0.55 και pvalue: 0.58. Τα αποτελέσματα αυτά οδηγούν αβίαστα στο συμπέρασμα ότι το τιτάνιο δεν επηρεάζει σε βαθμό στατιστικά σημαντικό τη λειτουργικότητα των αιμοπεταλίων.

Παράλληλα, σε εργαστηριακό χώρο χρησιμοποιώντας τη μέθοδο MTT Assay για τη μελέτη της κυτταροτοξικότητας του  $\text{TiO}_2$ , μελετήθηκε η επίδραση της ένωσης σε κυτταροκαλλιέργειες λειομυοσαρκοματικών κυττάρων από Wistar αρουραίους, καρκινικών κυττάρων μαστού και ινοβλαστών ανθρώπου. Οι συγκεντρώσεις του  $\text{TiO}_2$  που ελέγχθηκαν επιλέχθηκαν σύμφωνα με τις αντίστοιχες συγκεντρώσεις που βρέθηκαν στο αίμα, στο πλάσμα και στους γειτονικούς ιστούς με τα εμφυτεύματα τιτανίου.

Στη έρευνα αυτή οι συγκεντρώσεις του  $\text{TiO}_2$  που μελετήθηκαν ως προς την κυτταροτοξικότητα επεκτάθηκαν από 0.0000125 έως 32mg/ml για να προκύψουν ασφαλέστερα αποτελέσματα. Συμπερασματικώς, το  $\text{TiO}_2$  βρέθηκε να μην παρουσιάζει καμία κυτταροτοξικότητα στις κυτταροκαλλιέργειες που χρησιμοποιήθηκε.



## **7. ABSTRACT**

### **Titanium maxillofacial implants effects on platelet function and cellular proliferation.**

Platelets are small, irregularly shaped blood cells which play a vital role for the preservation of life. These anuclear cells (diameter 2-3  $\mu\text{m}$ ) are derived from fragmentation of precursor megakaryocytes and their main function is in primary hemostasis. In addition, platelets are considered a significant natural source of growth factors for tissue repair after trauma and other causes of tissue damage. The importance of sufficient number of platelets with normal function in order to conduct surgical operations is obvious. The platelet function analyzer PFA-100<sup>®</sup>, has been designed to provide an in vitro measurement of primary hemostasis simply, quickly, quantitatively and accurately to aid in the routine screening of patients with potential hemorrhagic risk due to abnormal platelet plug formation.

Titanium is a chemical element which belongs to the fourth group and period of the periodic table (group of transition metals) with main characteristics its low density, strength, ductility, corrosion and heat resistance. These properties of titanium have made it an attractive material for implant construction. Although Ti is not the strongest metal, its relatively low specific gravity gives it a very favorable strength to weight – ratio. Therefore titanium implants possess capable load sharing properties decreasing the problems associated with stress shielding. In hip arthroplasties, mandible implants and osteosynthesis materials as well , titanium dioxide, a byproduct of titanium corrosion, has been found adjacent to titanium implants in regional lymph nodes and in some instances in remote organs.

The purpose of this study was, by the use of the PFA-100<sup>®</sup> system, to determine whether surgically placed titanium implants and its degradation products have a significant effect on platelet function. In addition, our aim was to evaluate the effect of TiO<sub>2</sub> on cellular proliferation.

After an institutional review board approval, 33 patients with titanium maxillofacial implants (osteosynthesis materials) and 34 healthy volunteer blood donors were recruited to participate in this study. Inclusion criteria were : patients older than 18 years of age, Hematocrit (HCT)  $\geq 35\%$ , platelet (PLT) count  $\geq 150.000/\mu\text{L}$  and implants consisted of titanium alloy placed

at least 12 months before. Individuals were randomly selected between hundreds of patients that were treated for mandibular fractures and dental implants placement in our Clinic.

Exclusion criteria were: past medical history of bleeding disorders, liver and renal disease, connective tissue diseases, pregnancy, antiplatelet therapy during the previous ten days and every medication which may affect platelet function (N.S.A.I.Ds, desmopressin, cortisone, antibiotics, antihistamines), blood transfusion, chemotherapy and / or radiotherapy during the last six months and presence of infection at the surgical site.

The thirty three (33) patients had been treated with open reduction internal fixation (ORIF) for maxillofacial fractures (titanium osteosynthesis materials, plates and screws) and dental implants surgical placement in our clinic.

All blood samples were analyzed with the PFA-100® system which represents a global accepted test for rapid, simple and reliable measure of platelet function. This is a high shear system for the in vitro measurement of primary hemostasis in anticoagulated whole blood, simulating injury to a small vessel. Collagen/Epinephrine and collagen/ adenosine diphosphate were used as platelet aggregation agonists, respectively.

Platelet aggregation ensues until a stable platelet plug occludes the flow of anticoagulated blood through the simulated vessel injury to a maximum of 300 seconds and registers the Closure Time (C.T.). Prolongation of C.T. indicates platelet dysfunction. Descriptive analysis of the data was performed, including mean, standard deviation and 95% confidence interval for mean, for each group. Student t-tests were used to compare mean closure times (CTs) in order to determine whether there is a statistically significant difference between the two groups (titanium implants and control group). A p-value < 0.05 was considered statistically significant.

Data in each group satisfied the assumption of normality and homogeneity of variance. Student t-test was performed twice to compare mean closure times between groups. No statistically significant differences were found between them (PFA: Coll/Epi t-test = 0.382, p=0.7 PFA : Coll/ADP t-test =0.55, p value = 0.58).

These results suggest that titanium maxillofacial implants do not have any significant effect on platelet function, as can be assessed by the PFA-100® system, at least one year after the surgical treatment.

The cellular responses to degradation products from titanium implants are important indicators for the biocompatibility of these widely used implantable medical devices. The

potential toxicity of TiO<sub>2</sub> nanoparticles from implants has been scarcely studied. The aim of this study was to determine whether TiO<sub>2</sub> nanoparticles have a cell toxic effect. Suspensions of TiO<sub>2</sub> nanoparticles were prepared in DMSO cell culture medium at concentrations that covered a range (0.005-4 mg/ml) corresponding to concentrations found in blood, plasma or in tissues surrounding Ti implants. Three cell cultures: leiomyosarcomatic cells from wistar rats, human breast cancer cells and fibroblasts were exposed to the TiO<sub>2</sub> nanoparticle suspensions. The effect of TiO<sub>2</sub> on cell cultures was evaluated by the use of MTT Assay and spectrophotometry. No significant cell toxic effect of TiO<sub>2</sub> on leiomyosarcomatic cells from wistar rats, human breast cancer cells and fibroblasts was observed in this study.



## **8. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ**

1. A.Stevens , J. Lowe .Human Histology .1993. Mosby Co,78-80
2. Coller B: Progress in hemostasis and Thrombosis,1989 Philadelphia, W. B.Sanders Co,87-115
- 3.Esmon C.T :The regulation of natural antikoagulant pathways.Science 1987;(235):1348-1352
- 4.Haber E: Innovative approaches to plasminogen activator therapy. Science 1989;(243):51-56
5. Hilgarther M. W: Hemophilia in the Child and Adult . 1989 Raven Press,121-123
6. Miller D. R: Blood Diseases in Infancy and Childhood .1989,Mosby Co,387-427
- 7.Renck H: Bleeding and thrombotic disorders in the surgical patient.1988 .Appleton and Lange,63-78
8. Rogers G. M: Hemostatic properties of normal and perturbed vascular cells. Faseb j;1988(2):116-123
9. Siess W. J: Molecular mechanisms of platelet activation. Physiology Rev;1989(69):58-178
- 10.Williams, W.J: Hematology.1990. McGraw- Hill Book, 760-769
11. Zwaal R. F. A: Scrambling membrane phospholipids and local control of blood clotting. News Phys; 1988:57-61
- 12.Colman RW, Hirsh J,Marder J.V et al: Hemostasis and thrombosis:Basic principles and clinical practice.1986. Lippincott Co,805-819
- 13.Nathan DG :Physiology of coagulation :The platelet.In: Hematology of in infancy and childhood.Saunders Co,1987:1271-1292

14. Rosenberg RD: Physiology of coagulation: The fluid phase. In: Hematology of infancy and childhood. Saunders Co, 1987: 1248-1270
15. Wilson J.D: Harrison's Principle of Internal Medicine 12th ed. 1991, McGraw-Hill Book, 348-351
16. "Titanium". Encyclopaedia Britannica Online. (2009).
17. "Titanium". Los Alamos National Laboratory (2004).
18. Krebs R. E: The History and Use of Our Earth's Chemical Elements: A Reference Guide (2nd edition). Greenwood Press. 2006
19. Matthew J, Donachie Jr. . TITANIUM: A Technical Guide. Metals Park, OH: ASM International, 1988: 11-12
20. Jelks B: The Encyclopedia of the Chemical Elements: "Titanium" (1968) Reinhold Book Co, 732-38
21. "Titanium". Columbia Encyclopedia (6th edition). (2006). New York: Columbia University Press.
22. Barbalace K.L: "Periodic Table of Elements: Ti - Titanium". 2009
23. "Titanium". Encyclopaedia Britannica. (2006).
24. Emsley J: Nature's Building Blocks: An A-Z Guide to the Elements. Oxford: Oxford University Press. 2001: 455.
25. Sikka S. K, Vohra Y.K., Chidambaram R: "Omega phase in materials". Progress in Materials Science. 1982; 27: 245 - 310.
26. Casillas N, Charlebois S, Smyrl W, White H. S: "Pitting Corrosion of Titanium". J. Electrochem. Soc. 1994; 141 (3): 636 - 42.
27. Matthew J. Donachie Jr: TITANIUM: A Technical Guide. Metals Park, OH: ASM International, 1988; Chapter 4. .

28. Chen George Zheng, Derek J, Farthing T. W: "Direct electrochemical reduction of titanium dioxide to titanium in molten calcium chloride". *Nature* . 2000;407: 361 - 64.
29. Matthew J. Donachie Jr: TITANIUM: A Technical Guide. Metals Park, OH: ASM International, 1988;16-17
30. Markov A., Reuther H., Shevchenko N. Et al: Enhancement of electrical and chemical surface properties of titanium and iron-carbon alloys irradiated with a low-energy intense pulsed electron beam. 19<sup>th</sup> Crimean Conference Microwave Technology. 2009:593-594
31. Matthew J. Donachie Jr: TITANIUM: A Technical Guide. Metals Park, OH: ASM International, 1988:13-16
32. American Welding Society: Guide for the Fusion Welding of Titanium and Titanium Alloys. Miami: American Welding Society. 2007:81-82
33. Titanium Metals Corporation . Titanium design and fabrication handbook for industrial applications. Dallas: Titanium Metals Corporation. 1997:107-128
34. Hampel C. A: The Encyclopedia of the Chemical Elements. 1968 Van Nostrand Reinhold: 738.
35. United States Geological Survey : "USGS Minerals Information: Titanium". 2006
36. Smook G. A: Handbook for Pulp & Paper Technologists (3rd edition). 2002. Angus Wilde Publications, 223.
37. Goresy E, Chen M, Dubrovinsky L, et al: An ultradense polymorph of Rutile with seven –coordinated titanium from the Ries Crater. *Science* 2001; (293):1467-1470
38. Goresy E. A: An natural shock –induced dense polymorph of rutile with PbO<sub>2</sub> structure in the suevite from the Ries Crater in Germany. *Earth and Planetary Science Letters* 2001;192:485

39. Norman N, Earnshaw A: Chemistry of the Elements (2nd ed.), Oxford: Butterworth-Heinemann.1997:10-24
40. Phillips L, Barbano D: The Influence of Fat Substitutes Based on Protein and Titanium Dioxide on the Sensory Properties of Low fat Milks. J Dairy Science.1997;80:2726-2731
41. Fujishima A, Honda K: Electrochemical Photolysis of Water at a Semiconductor Electrode. Nature. 1972; 238: 37 - 38
42. Fujishima A, Zhang X: Titanium dioxide photocatalysis: present and future approaches. C R Chimie.2006;5-6:750-760
43. Hogan J. Smog-busting paint soaks up noxious gases. Newscientist.2004
44. Jones BJ, Vergne MJ, Bunk DM et al: Cleavage of peptides and proteins using light generated radicals from titanium-dioxide. Anal. Chem .2007;(79):1327-1332
45. Matthew J, Donachie Jr: TITANIUM: A Technical Guide.1988. Metals Park, OH: ASM International, 13-14
46. Matthew J, Donachie Jr: TITANIUM: A Technical Guide.1988. Metals Park, OH: ASM International, 11-16
47. National Corvette Museum (2006). "Titanium Exhausts".
48. Flower H. Materials Science: A moving oxygen history. Nature.2000;(407):305
49. "Yuri Gagarin". Microsoft Encarta.2006
50. "Denver Art Museum, Frederic C. Hamilton Building". SPG Media 2006
51. Emsley J: Nature's Building Blocks: An A-Z Guide to the Elements. Oxford: Oxford University Press.2001:451-453
52. Ε. Βαιρακτάρης ,Γ. Ράλλης: Γναθοπροσωπική Χειρουργική 2005. Κατάγματα του Προσώπου. Ιατρικές εκδόσεις Πασχαλίδης :55-182



53. López JP, de la Peña A, Baños de MacCarthy G. Effect of lead and cadmium on platelet aggregation. *Arch Inst Cardiol Mex.* 1992;62(4):317-24
54. Gawaz M, Ott I, Reininger AJ, Neumann FJ. Effects of magnesium on platelet aggregation and adhesion. Magnesium modulates surface expression of glycoproteins on platelets in vitro and ex vivo. *Thromb Haemost.* 1994 Dec;72(6):912-8
55. Neiva,T.J.C., Fries,D.M., Monteiro,H.P., D'Amico,E.A :Aluminum induces lipid peroxidation and aggregation of human blood platelets.. *SciELO Brasil - Scientific Electronic Library Online*
56. Gerard M, Judit K, Matityahu S : Nutritional zinc increases platelet reactivity. *American Journal of Hematology.*2006; (38):161-165
57. Hu H, Forslund M, Nailin L: Influence of extracellular calcium on single platelet activation as measured by whole blood flow cytometry. *Thrombosis Research* 2005. (116): 241-247
58. McGarry S, Morgan SJ, Grosskreuz RM, Williams AE, Smith WR.Serum titanium levels in individuals undergoing intramedullary femoral nailing with a titanium implant. *J Trauma.* 2008 ;64(2):430-3
59. Richardson TD, Pineda SJ, Strenge KB, Van Fleet TA, MacGregor M, Milbrandt JC, Espinosa JA, Freitag P:Serum titanium levels after instrumented spinal arthrodesis. *Spine.* 2008;33(7):792-6
- 60.Kasai Y, Iida R, Uchida A :Metal concentrations in the serum and hair of patients with titanium alloy spinal implants. *Spine .* 2003 ;28(12):1320-6.
61. Jacobs JJ, Silverton C, Hallab NJ, Skipor AK, Patterson L, Black J, Galante JO: Metal release and excretion from cementless titanium alloy total knee replacements. *ClinOrthop Relat Res.* 1999 ;(358):173-80.

62. Jacobs JJ, Skipor AK, Patterson LM, Hallab NJ, Paprosky WG, Black J, Galante JO: Metal release in patients who have had a primary total hip arthroplasty. A prospective, controlled, longitudinal study. *J Bone Joint Surg Am.* 1998 ;80(10):1447-58.
63. Jacobs JJ, Skipor AK, Black J, Urban R, Galante JO: Release and excretion of metal in patients who have a total hip-replacement component made of titanium-base alloy. *J Bone Joint Surg Am.* 1991;73(10):1475-86
64. Kärholm J, Frech W, Nilsson KG, Snorrason F: Increased metal release from cemented femoral components made of titanium alloy. 19 hip prostheses followed with radiostereometry. *Acta Orthop Scand.* 1994;65(6):599-604.
65. Nemmar A, Melghit K, Ali BH .The acute proinflammatory and prothrombotic effects of pulmonary exposure to rutile TiO<sub>2</sub> nanorods in rats. *Exp Biol Med .* 2008 ;233(5):610-9.
66. Vamanu CI, Cimpan MR, Høl PJ, Sørnes S, Lie SA, Gjerdet NR. Induction of cell death by TiO<sub>2</sub> nanoparticles: studies on a human monoblastoid cell line. *Toxicol In Vitro.* 2008 ;22(7):1689-96.
67. Park EJ, Yi J, Chung KH, Ryu DY, Choi J, Park K. Oxidative stress and apoptosis induced by titanium dioxide nanoparticles in cultured BEAS-2B cells. *Toxicol Lett.* 2008;180(3):222-9
68. Fabian E, Landsiedel R, Ma-Hock L, Wiench K, Wohlleben W, van Ravenzwaay B: Tissue distribution and toxicity of intravenously administered titanium dioxide nanoparticles in rats. *Arch Toxicol.* 2008;(3):151-7.
- 69.ΕΘΝΙΚΟ ΣΥΝΤΑΓΟΛΟΓΙΟ .Εθνικός Οργανισμός Φαρμάκων 2007:405

70. Kundu S, Sio R, Mitu A, Ostgaard R. Evaluation of platelet function by PFA-100. *Clin Chem* 1994; 40:1827-1828
71. Kundu SK, Heilmann EJ, Sio R, et al. Description of an in vitro platelet function analyzer-PFA-100. *Semin Thromb Hemost* 1995;21(suppl2):106-112
72. Kundu SK, Heilmann EJ, Sio R, Garcia C, Ostgaard RA. Characterization of an in vitro platelet function analyzer, PFA-100TM. *ClinAppl Thromb Hemost* 1996;2:241-249
73. Kratzer MAA, Bom GVR. Simulation of primary haemostasis in vitro. *Haemostasis* 1985;15:57-62
74. Kratzer MAA, Bellucci S, Caen JP. Detection of abnormal platelet function with an in vitro model of primary haemostasis. *Haemostasis* 1985;15:363-370
75. Kroll MH, Hellums M, McIntire LV, Schafer AI, Moake JL. Platelets and shear stress. *Blood* 1996;88:1525-1541
76. Mammen EF, Alshameeri RS, Comp PC. Preliminary data from a field trial of the PFA-100 system. *Semin Thromb Hemost* 1995;21:113-121
77. Mammen EP, Comp PC, Gosselin R, et al. PFA-100 System: A new method for assessment of platelet dysfunction. *Semin Thromb Hemost* 1998;24: 195-202
78. Marshall PW, Williams AJ, Dixon RM, et al. A comparison of the effects of aspirin on bleeding time measured using SimplateTM methods and closure time measured using the PFA-100TM, in healthy volunteers. *Br J Clin Pharmacol* 1997; 44:151-155
79. Kottke-Marchant K, Powers J, Brooks L. Inhibition of platelet function with ReoPro (abciximab) detected by platelet function analyzer (PFA-100) in patients undergoing coronary angioplasty (PTCA). *Blood* 1997;90:70

80. Heilmann EJ, Kundu SK, Sio R, et al. Comparison of four commercial citrate blood collection systems for platelet function analysis by the PFA-100™ system. *Thromb Res* 1997; 87: 159-164
81. Rand ML, Carcao M et al: Use of PFA-100 in the assessment of primary, platelet related hemostasis in pediatric setting. *Seminars in thrombosis and hemostasis*. 1998; 24: 523-529
82. Harrison P: The role of PFA-100 testing in the investigation and management of hemostatic defects in children and adults. *Br J Hematology*. 2005; 130: 3-10
83. Mosmann, T. Rapid Colorimetric Assay for Cellular Growth and Survival: Application to Proliferation and Cytotoxicity Assays. *J. Immun. Methods*, 1983, 65: 55-6
84. Kundu S, Heilmann E, Sio R, Garcia C, Davidson R, Ostgaard R. Description of an in vitro platelet function analyzer PFA-100. *Sem Thromb Hemost* 1995; 21: 106-112.
85. Bock M, de Haan J, Beck KH, Gutensohn K, Hertfelder HJ, Karger R, Heim MU, Beeser H, Weber D, Kretschmer V: Standardization of the PFA-100 platelet function test in 105 mmol/l buffered citrate: effect of gender, smoking and oral contraceptives, *Br Haematol* 1999; 106: 898-904
86. Fressinaud E, Veyradier A, Truchaud F, Martin I, Boyer – Neumann C, Trossaert M, Meyer D: Screening for von Willebrand Disease with a new analyzer using high shear stress: A study of 60 cases. *Blood*. 1998; 91: 1325-1331
87. Mammen EF, Comp PC, Gosselin R, Greenberg C, Hoots WK, Kessler CM, Larkin EC, Liles D, Nugent DJ: PFA-100: A new method for assessment of platelet dysfunction. *Sem Thromb Hemost*. 1998; 24: 195-202

88. Cattaneo M, Federici AB, Lecchi A, Agati B, Lombardi R, Stabile F, Bucciarelli P: Evaluation of the PFA-100 system in the Diagnosis and Therapeutic Monitoring of Patients with Von Willebrand Disease. *Thromb Haemost.* 1999; 82: 35-9
89. Fressinaud E, Veyradier A, Sigaud M, Boyer – Neumann C, Le Boterff C, Meyer D :Therapeutic monitoring of von Willebrand Disease: interest and limits of a platelet function analyzer at high shear rates.. *British Journal of Haematology.*1999; 106: 777-783
90. Hezard N, Metz D, Nazeyrollas P, Droulle C, Elaerts J, Porton G, Nguyen P: Use of the PFA-100 apparatus to assess platelet function in patients undergoing PTCA during and after infusion CE3 Fab in the presence of other antiplatelet agents. *Thrombosis and Haemostasis.*2000; 83 (4): 540-4
91. Favaloro E. Utility of the PFA-100 for assessing bleeding disorders. *Haemophilia* .2001;7: 170-179
92. Silverman RN; Clinical utility of the platelet function analyzer PFA-100 in cardio – thoracic procedures involving extra corporal circulation. *J. thor. Cardiovasc. Surg.*2001; 122: 190-191
93. Longmore M, Wilkinson I, Turmezei T: Epidemiology. In: OXFORD HANDBOOK OF CLINICAL MEDICINE. Oxford University Press. 2007:642-652

