

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

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

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

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

προσωρινή συνθετική εξωκυττάρια μήτρα (ECM) που αλληλεπιδρά με τα κύτταρα προς σχηματισμό ενός νέου ιστού.

Η μέθοδος Ηλεκτροστατικής εναπόθεσης (Electrospinning), είναι η πιο κοινή μέθοδος για την κατασκευή των νανοϊνωδών κριωμάτων. Το Electrospay Deposition, η μέθοδος που χρησιμοποιείται στην παρούσα εργασία, βασίζεται στην ίδια αρχή λειτουργίας με τη μέθοδο Ηλεκτροστατικής εναπόθεσης. Οι electrospun πολυμερικές νανοϊνες έχουν πολλές εξαιρετικές ιδιότητες, συμπεριλαμβανομένων των μικρών διαμέτρων, τη μεγάλη ειδική επιφάνεια, ένα υψηλό βαθμό δομικής τελειότητας (high degree of structural perfection) και τις προκύπτουσες ανώτερες μηχανικές ιδιότητες. Επιπροσθέτως, οι nonwoven πολυμερείς δομές προσφέρουν μια μοναδική ικανότητα να ελέγχουν τα μεγέθη των πόρων μεταξύ των ινών.

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

Ο δομικός/μορφολογικός/τοπογραφικός χαρακτηρισμός των κριωμάτων, έγινε με την Ηλεκτρονική Μικροσκοπία Σάρωσης (SEM) και την Σαρωτική Μικροσκοπία Ατομικών Δυνάμεων (AFM) και η αξιολόγηση της διαβροχής (wettability) τους με τη μέτρηση γωνίας διαβροχής (Contact Angle, CA). Η μηχανική αντοχή τους μελετήθηκε με τη μέθοδο του Nanoindentation. Τα κριώματα πολυκαπρολακτόνης παρουσίασαν υδρόφοβη συμπεριφορά, με αύξησή της με την προσθήκη των Νανοσωματιδίων Αργύρου. Το μέγεθος και η ταυτοποίηση των Νανοσωματιδίων Αργύρου έγινε με Περίθλαση ακτινών-Χ, η οποία επαλήθευσε την ύπαρξή τους. Τα κριώματα μελετήθηκαν, επίσης, ως προς την βιολογική απόκριση τους σε κυτταρικές σειρές. Ειδικότερα, η κυτταρική σειρά L929s (αθανатоποιημένη

κυτταρική σειρά ινοβλαστών που απομονώνεται από ινοσάρκωμα (λιπώδης ιστός ποντικού) καλλιεργήθηκε στην επιφάνεια των ικριωμάτων για δυο χρονικά διαστήματα (24hrs, 3 και 7 μέρες), κι έγινε ποσοτική εκτίμηση των κυττάρων που αναπτύχθηκαν με την εφαρμογή του MTT πρωτόκολλου. Για την ολοκλήρωση της κυτταρικής μελέτης ελήφθησαν εικόνες με την Ηλεκτρονική Μικροσκοπία Σάρωσης (SEM). Επιλέχθηκαν κάποια δείγματα ικριωμάτων σαν τα βέλτιστα, στα οποία έγινε καλλιέργεια με ανθρώπινα χονδροκυττάρια, με την ίδια διαδικασία που ακολουθήθηκε και για τα κύτταρα των ινοβλαστών. Η τελευταία αυτή κυτταρική μελέτη συμπληρώθηκε και πάλι με εικόνες με την Ηλεκτρονική Μικροσκοπία Σάρωσης (SEM). Στις ομάδες των δειγμάτων, τη μεγαλύτερη κυτταρική βιωσιμότητα παρουσίασε το 30% PCL in chloroform/methanol στην ελάχιστη απόσταση βελόνας-συλλέκτη (D200=5cm). Τα ικριώματα με Νανοσωματίδια Αργύρου σημείωσαν μικρότερη βιωσιμότητα. Τα πολυμερικά νανοϊνώδη ικριώματα, επιδεικνύουν μεγάλη βιοσυμβατότητα, καθότι αποτελούνται από δομικά στοιχεία που αναγνωρίζονται από τα κύτταρα. Δηλαδή, φαίνεται πως ο κύριος μηχανισμός κυτταρικής πρόσφυσης περιλαμβάνει τις απευθείας αλληλεπιδράσεις ιών-κυττάρων, λόγω της τραχύτητας και της αυξημένης διαθέσιμης περιοχής (αναλογία επιφάνειας/όγκου).

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