



**ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΚΡΗΤΗΣ  
ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ  
ΤΜΗΜΑ ΙΑΤΡΙΚΗΣ**

**ΨΥΧΑΡΑΚΗΣ ΣΤΥΛΙΑΝΟΣ  
ΙΑΤΡΟΣ**

**ΑΝΑΠΛΑΣΗ ΔΕΡΜΑΤΟΣ ΑΝΘΡΩΠΟΥ. ΑΝΑΠΤΥΞΗ  
ΚΕΡΑΤΙΝΟΚΥΤΤΑΡΩΝ ΚΑΙ ΙΝΟΒΛΑΣΤΩΝ ΣΕ ΤΡΙΣΔΙΑΣΤΑΤΑ  
ΙΚΡΙΩΜΑΤΑ ΠΟΥ ΕΧΟΥΝ ΚΑΤΑΣΚΕΥΑΣΤΕΙ ΜΕ ΧΡΗΣΗ  
ΛΕΙΖΕΡ**

**ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ**

**Επιβλέπουσα Καθηγήτρια: κ. Ανδρονίκη Τόσκα**

**Ηράκλειο 2013**



**ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΚΡΗΤΗΣ  
ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ  
ΤΜΗΜΑ ΙΑΤΡΙΚΗΣ**

**ΨΥΧΑΡΑΚΗΣ ΣΤΥΛΙΑΝΟΣ  
ΙΑΤΡΟΣ**

**ΑΝΑΠΛΑΣΗ ΔΕΡΜΑΤΟΣ ΑΝΘΡΩΠΟΥ. ΑΝΑΠΤΥΞΗ  
ΚΕΡΑΤΙΝΟΚΥΤΤΑΡΩΝ ΚΑΙ ΙΝΟΒΛΑΣΤΩΝ ΣΕ ΤΡΙΣΔΙΑΣΤΑΤΑ  
ΙΚΡΙΩΜΑΤΑ ΠΟΥ ΕΧΟΥΝ ΚΑΤΑΣΚΕΥΑΣΤΕΙ ΜΕ ΧΡΗΣΗ  
ΛΕΙΖΕΡ**

**ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ**

που εκπονήθηκε στο Ινστιτούτο Ηλεκτρονικής Δομής και Λείζερ του Ιδρύματος Τεχνολογίας και Έρευνας

**ΕΠΤΑΜΕΛΗΣ ΕΞΕΤΑΣΤΙΚΗ ΕΠΙΤΡΟΠΗ**

Καθηγήτρια κ. Ανδρονίκη Τόσκα, Επιβλέπουσα

Καθηγητής κ. Κωνσταντίνος Φωτάκης Μέλος Τριμελούς Συμβουλευτικής Επιτροπής

Καθηγητής κ. Γεώργιος Χαλκιαδάκης Μέλος Τριμελούς Συμβουλευτικής Επιτροπής

Καθηγητής κ. Αριστείδης Τσατσάκης

Καθηγητής κ. Αναστάσιος Φιλαλήθης

Καθηγητής κ. Γεώργιος Τζανακάκης

Λέκτορας κ. Αναστάσιος Κουτσόπουλος

Στυλιανός Ψυχάρakis  
Πανεπιστήμιο Κρήτης

**<< ΑΝΑΠΛΑΣΗ ΔΕΡΜΑΤΟΣ ΑΝΘΡΩΠΟΥ. ΑΝΑΠΤΥΞΗ ΚΕΡΑΤΙΝΟΚΥΤΤΑΡΩΝ  
ΚΑΙ ΙΝΟΒΛΑΣΤΩΝ ΣΕ ΤΡΙΣΔΙΑΣΤΑΤΑ ΙΚΡΙΩΜΑΤΑ ΠΟΥ ΕΧΟΥΝ  
ΚΑΤΑΣΚΕΥΑΣΤΕΙ ΜΕ ΧΡΗΣΗ ΛΕΙΖΕΡ >>**

Η έγκριση της παρούσας Διδακτορικής Διατριβής από το τμήμα Ιατρικής της Σχολής  
Επιστημών Υγείας του Πανεπιστημίου Κρήτης, δεν υποδηλώνει αποδοχή των γνώμων  
του συγγραφέα.

Νόμος 5343/1932, άρθρο 202, παρ.2

## Περιεχόμενα

Ευχαριστίες.....	7
Εισαγωγή-Σκοπός της διατριβής.....	9
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1 .....	13
1.1 Μηχανική ιστών .....	14
1.2 Ικρίσματα μηχανικής ιστών .....	17
1.2.1 Βασικά χαρακτηριστικά ικριωμάτων .....	17
1.2.2 Υλικά κατασκευής και είδη ικριωμάτων .....	19
1.3 Ελεγχόμενη απελευθέρωση φαρμακευτικών ουσιών.....	22
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2 .....	25
2.1 Γενικά χαρακτηριστικά των πολυμερών .....	26
2.2 Συνθετικά πολυμερή .....	28
2.3 Φυσικά πολυμερή.....	31
2.4 Εφαρμογές πορώδων πολυμερικών υλικών.....	36
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3 .....	39
3.1 Γενικά.....	40
3.2 Απομάκρυνση σωματιδίων (Particulate leaching).....	42
3.3 Δημιουργία αφρού με υψηλής πίεσης διοξειδίου του άνθρακα.....	43
3.4 Ξήρανση κρίσιμου σημείου (Critical Point Drying).....	46
3.5 Ηλεκτροϊνοποίηση (Electrospinning).....	48
3.6 Διφωτονική απορρόφηση .....	50
3.6.1 Γραμμική απορρόφηση.....	52
3.6.2 Μη γραμμική επιδεκτικότητα .....	54
3.6.3 Μη γραμμική-διφωτονική απορρόφηση .....	56
3.7 Διφωτονικός πολυμερισμός.....	58
3.7.1 Φωτοπολυμερισμός με την χρήση φωτοεκκινητών .....	58
3.7.2 Φωτοπολυμερισμός μέσω ελευθέρων ριζών .....	60
3.7.3 Κατιονικός φωτοπολυμερισμός.....	61
3.7.4 Διφωτονικός φωτοπολυμερισμός.....	62
3.7.5 Διφωτονική φωτολιθογραφία.....	64
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 4 .....	69
4.1 Υβριδικά μη βιοδιασπώμενα υλικά .....	70
4.2 Διαδικασία sol-gel (θερμοαντιστρεπτής πηκτής) .....	70
4.3 Υλικό sol-gel Zirconium.....	72

4.3.1	Σύνθεση του υλικού sol-gel Zirconium.....	72
4.3.2	Προετοιμασία πριν τον πολυμερισμό.....	74
4.3.3	Φασματα απορρόφησης των υλικών.....	74
4.3.4	Οπτικές ιδιότητες .....	75
4.4	Υλικό sol-gel Titanium .....	76
4.4.1	Σύνθεση του υλικού sol-gel Titanium .....	76
4.4.2	Προετοιμασία πριν τον πολυμερισμό.....	78
4.4.3	Φάσματα απορρόφησης των υλικών.....	78
4.4.4	Οπτικές ιδιότητες .....	79
4.5	Διάταξη διφωτονικού πολυμερισμού .....	80
4.6	Κυτταρικές σειρές.....	82
4.6.1	Ινοβλάστες.....	82
4.6.2	Κερατινοκύτταρα.....	84
4.7	Κυτταρική καλλιέργεια.....	87
4.8	Δοκιμασία κυτταρικής επιβίωσης.....	87
4.9	Ανοσοϊστοχημική διαδικασία.....	87
4.10	Ηλεκτρονική μικροσκοπία σάρωσης.....	88
	ΚΕΦΑΛΑΙΟ 5 .....	91
5.1	Επιλογή του ιδανικού βιοενεργού υλικού με βάση την κυτταρική επιβίωση.....	92
5.2	Επιλογή του βιοενεργού υλικού με βάση την ανάπτυξη των κυτταρικών .....	97
5.3	Μελέτη της δυνατότητας κυτταρικών καλλιιεργειών πάνω σε συμπαγή .....	99
5.4	Μελέτη της δυνατότητας κυτταρικών καλλιιεργειών πάνω σε πορώδη.....	102
	ΚΕΦΑΛΑΙΟ 6 .....	109
6.	Συμπεράσματα .....	110
	ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ .....	113
	Ελληνόγλωσση Βιβλιογραφία .....	114
	Ξενόγλωσση Βιβλιογραφία .....	114

## Ευχαριστίες

Η παρούσα διατριβή εκπονήθηκε στο Ινστιτούτο Ηλεκτρονικής Δομής και Λείζερ του Ίδρυμα Τεχνολογίας και Έρευνας και χρηματοδοτήθηκε από πόρους του Ινστιτούτου.

Θα ήθελα να ευχαριστήσω την επιβλέπουσα Καθηγήτρια Δερματολογίας και Αφροδισιολογίας κ. Ανδρονίκη Τόσκα για την εμπιστοσύνη που μου έδειξε αναθέτοντας μου τη διατριβή αλλά και για τη μετέπειτα αρωγή και συμπαράστασή της στην ολοκλήρωση του συγκεκριμένου ερευνητικού εγχειρήματος. Ευχαριστώ επίσης τον Καθηγητή Φυσικής και Πρόεδρο του Ιδρύματος Τεχνολογίας και Έρευνας κ. Κωνσταντίνο Φωτάκη ο οποίος συνέβαλε καταλυτικά στην υλοποίηση των πειραματικών υποθέσεων και την συγγραφή και δημοσίευση των ερευνητικών αποτελεσμάτων τόσο ψυχολογικά όσο και οικονομικά διασφαλίζοντας τους απαραίτητους πόρους. Ευχαριστίες οφείλω και στον τρίτο επιβλέποντα, κ. Γεώργιο Χαλκιαδάκη, Καθηγητή Χειρουργικής, για τις συζητήσεις και τις ανταλλαγές απόψεων που υπήρξαν μεταξύ μας κατά τη διάρκεια εκπόνησης της διατριβής καθώς και για τα σχόλια και τις παρατηρήσεις του που βοήθησαν στην καλύτερη παρουσίαση της εργασίας.

Ευχαριστώ τα μέλη της επταμελούς επιτροπής για το χρόνο που διέθεσαν. Ευχαριστώ επίσης την Δρ. Ανθή Ρανέλλα για την πολύτιμη συνεισφορά της στον τομέα των κυτταροκαλλιεργειών και την Ερευνήτρια κ. Μαρία Φαρσάρη για την καθοδήγηση της στις εφαρμογές των λέιζερ, καθώς και για την ιδανική συνεργασία που είχαμε όλα αυτά τα χρόνια. Ευχαριστώ επίσης την υποψήφια διδάκτορα κ. Βασιλική Μελισσινάκη για την αγαστή σύμπνοια και συνεργασία κατά την διάρκεια εκπόνησης της διατριβής.

Ευχαριστώ, για διαφορετικούς λόγους τον καθένα, τον Αναπληρωτή Καθηγητή κ. Κωνσταντίνο Κρασαγάκη, την Καθηγήτρια Ανοσολογίας κ. Ειρήνη Αθανασάκη, την Αναπληρώτρια Καθηγήτρια κ. Σαμπίνε Κρύγκερ- Κρασαγάκη, τον Δρ. Γεώργιο Φιλιππίδη, τον Δρ. Ιωάννη Ζαχαράκη, τον κ. Γεώργιο Βρέντζο, τον Δρ. Αλέξανδρο Σελίμη, τον Δρ. Εμμανουήλ Στρατάκη, τον Δρ. Μάριο Μπαρμπέρογλου, τον Δρ. Γεώργιο Τσερεβελάκη, την κ. Μαρία Συγλέτου, την κ. Νίκη Κουφάκη, την Δρ. Αλεξάνδρα Μανουσάκη, την Δρ. Σάντρα Σιάκουλη, όλους τους εργαζόμενους της Δερματολογικής Κλινικής του Πανεπιστημιακού Νοσοκομείου Ηρακλείου και του Ιδρύματος Τεχνολογίας και Έρευνας και τους φίλους μου.

Τέλος θα ήθελα να ευχαριστήσω τους γονείς μου και τον αδερφό μου για την συμπαράσταση και την κατανόηση που έδειξαν καθ' όλη τη διάρκεια της διατριβής.



## Εισαγωγή-Σκοπός της διατριβής

Η παρούσα διατριβή εκπονήθηκε στα πλαίσια ενός ευρύτερου διατμηματικού έργου (τμήματα Ιατρικής, Φυσικής και Βιολογικού) στο Πανεπιστήμιο Κρήτης και το Ίδρυμα Τεχνολογίας και Έρευνας, που είχε στόχο την κατασκευή ικριωμάτων (scaffolds) για την ανάπλαση δέρματος ανθρώπου με την ανάπτυξη ινοβλαστών και κερατινοκυττάρων πάνω στις συγκεκριμένες δομές που προσομοιάζουν με την εξωκυττάρια ουσία. Πολύ συχνά σε παθήσεις του δέρματος, τραυματισμούς ή εγκαύματα απαιτείται η χρήση υλικών που υποκαθιστούν τα κατεστραμμένα τμήματα του δέρματος. Η αποκατάσταση στην παρούσα φάση περιορίζεται μόνο στη περιδέση με τεχνητά υλικά χωρίς βιολογικό περιεχόμενο ή σε εκτεταμένες χειρουργικές επεμβάσεις οι οποίες πραγματοποιούνται σε πολλαπλές συνεδρίες και πολλές φορές δεν έχουν το επιθυμητό αποτέλεσμα. Αυτό που προτείνεται στα πλαίσια της συγκεκριμένης διδακτορικής διατριβής είναι η ανάπτυξη ικριωμάτων βιοσυμβατών υλικών και η ανάπτυξη μέσα στις συγκεκριμένες κατασκευές τρισδιάστατου κυτταρικού δικτύου. Για να καταστεί αυτό δυνατό πρέπει να παρασκευαστούν μηχανικά ισχυρά ικριώματα τα οποία να αποτελέσουν γόνιμο έδαφος για την καλλιέργεια κυτταρικών στοιχείων. Η περιοχή του δέρματος έχει ιδιαίτερα χαρακτηριστικά καθώς εκτίθεται σε μεγάλο αριθμό εξωτερικών παραγόντων και αυτόχρονα χαρακτηρίζεται από ελαστικότητα και δυνατότητα επαναφοράς γεγονός που αυξάνει τις απαιτήσεις όσον αφορά την καταλληλότητα των υλικών που πρέπει να χρησιμοποιηθούν. Η προτεινόμενη προσέγγιση πρέπει να μελετηθεί εργαστηριακά (in vitro) προτού γίνει οποιαδήποτε προσπάθεια εφαρμογής της σε ζώντες οργανισμούς.

Το σκεπτικό και η μεθοδολογία υλοποίησης ενός τέτοιου στόχου, in vitro, σε γενικές γραμμές, έχουν ως ακολούθως: Αρχικά, πραγματοποιείται έλεγχος των υλικών που πρόκειται να χρησιμοποιηθούν καθώς η βιοσυμβατότητα τους με κυτταρικές δομές είναι ακόμη άγνωστη. Στη συνέχεια πρέπει να κατασκευαστεί ικρίωμα με επιθυμητές ιδιότητες και να δημιουργηθούν δομές με ποικίλο αρχιτεκτονικό σχεδιασμό έτσι ώστε να προκύψουν ιδανικές τρισδιάστατες κατασκευές οι οποίες θα προάγουν την κυτταρική προσκόλληση και ανάπτυξη. Ταυτόχρονα με τα παραπάνω απαιτείται να γίνει επιλογή, απομόνωση και ανάπτυξη της κατάλληλης κυτταρικής σειράς (ινοβλαστών και κερατινοκυττάρων) που θα

χρησιμοποιηθούν στις πειραματικές καλλιέργειες. Τέλος, οι κυτταρικές σειρές καλλιεργούνται στα ικρίωματα των βιοϋλικών και μελετάται η κυτταρική απόκριση.

Το σκεπτικό αυτό αποτελεί την επιτομή ενός σύγχρονου διεπιστημονικού κλάδου, της μηχανικής ιστών (tissue engineering). Γενικά, στην μηχανική ιστών απαιτείται η χρήση ικριωμάτων που παίζουν το ρόλο μιας τεχνητής εξωκυττάριας ουσίας που υποστηρίζει την προσκόλληση και την ανάπτυξη των κυττάρων. Ανάμεσα στις βασικές επιθυμητές ιδιότητες ενός ικριώματος μηχανικής ιστών περιλαμβάνονται η βιοαποικοδομησιμότητα ή η βιοσυντήρηση ανάλογα με το είδος του ιστού που αντικαθίσταται, η βιοενεργότητα, η βιοσυμβατότητα και η διαμόρφωση κατάλληλης πορώδους δομής.

Τα βιοαποικοδομήσιμα φυσικά πολυμερή θεωρούνται ιδανικά υλικά για κατασκευή ικριωμάτων. Επίσης η κατασκευή σύνθετων υλικών πολυμερών παρουσιάζει μεγάλο ενδιαφέρον είτε για την αύξηση της βιοενεργότητας είτε για την μεταβολή της μηχανικής και θερμικής συμπεριφοράς. Ο εγκλεισμός ουσιών σε βιοαποικοδομήσιμες μήτρες διαγράφεται ως μια σύγχρονη τάση στον φαρμακευτικό χώρο, καθώς με αυτόν τον τρόπο είναι δυνατή η ελεγχόμενη απελευθέρωση φαρμάκων. Αυτό συνδέεται άμεσα με την μηχανική ιστών και είναι επιθυμητό τα ικρίωματα να δρουν και ως φορείς φαρμακευτικών ουσιών (π.χ. αντιβιοτικών) ή παραγόντων ανάπτυξης.

Ανεξάρτητα από τα παραπάνω, τα πορώδη πολυμερή υλικά βρίσκουν ένα πλήθος εφαρμογών όπως φίλτρα, υλικά συσκευασίας, μονωτικά υλικά κ.α. Η αντικατάσταση των ευρέως χρησιμοποιούμενων πλαστικών με βιοπολυμερή είναι μεγάλης σημασίας για τη μείωση της περιβαλλοντικής ρύπανσης. Επίσης έχει μεγάλη αξία, όχι μόνο η παρασκευή ενός προϊόντος φιλικού προς το περιβάλλον, αλλά και η παραγωγή του να γίνεται με περιβαλλοντικά αποδεκτό τρόπο. Έτσι η χρήση εναλλακτικών διαλυτών (π.χ. υπερκρίσιμων ρευστών, ιοντικών υγρών) για την κατεργασία πολυμερών είναι μεγάλης πρακτικής χρησιμότητας. Εκτός του πρακτικού ενδιαφέροντος, η κατεργασία των πολυμερών με τέτοιους εναλλακτικούς διαλύτες παρουσιάζει και αυξημένο επιστημονικό ενδιαφέρον, αφού κατά την αλληλεπίδρασή τους λαμβάνουν χώρα διάφορα φυσικοχημικά φαινόμενα (π.χ. πλαστικοποίηση του πολυμερούς).

Ο κεντρικός σκοπός της παρούσας διατριβής είναι η ανάπτυξη νέων σύνθετων πορωδών πολυμερών υλικών με την χρήση υπερταχειών παλμών λέιζερ προκειμένου να χρησιμοποιηθούν ως ικρίωματα μηχανικής ιστών. Η ανάπτυξη αυτή συντελείται σε ένα ευρύτερο πλαίσιο ανάπτυξης νέων σύνθετων πορωδών υλικών από

βιοσυμβατά πολυμερή καθώς και μελέτης των βιολογικών φαινομένων που λαμβάνουν χώρα κατά την καλλιέργεια των κυττάρων στις δομές αυτές.

Η διατριβή αναπτύσσεται σε 6 συνολικά κεφάλαια. Στο κεφάλαιο 1 γίνεται μια εισαγωγή στην ιστομηχανική με περιγραφή των αρχών της ιστομηχανικής και των γενικών χαρακτηριστικών των ικριωμάτων.

Στο κεφάλαιο 2 γίνεται βιβλιογραφική ανασκόπηση και αναφέρονται πληροφορίες για τα πιο συχνά χρησιμοποιούμενα πολυμερή σε εφαρμογές ιστομηχανικής, δίνοντας έμφαση σε αυτά που χρησιμοποιήθηκαν κατά τη διάρκεια της διατριβής. Επίσης αναφέρονται άλλες εφαρμογές των πορωδών υλικών

Στο κεφάλαιο 3 περιγράφονται οι τεχνικές παραγωγής πορωδών δομών με έμφαση σε αυτές που χρησιμοποιήθηκαν κατά τη διάρκεια της διατριβής. Πιο συγκεκριμένα δίνεται ο μηχανισμός της εκάστοτε τεχνικής καθώς και σύγχρονες εφαρμογές τους.

Στο κεφάλαιο 4 αναφέρονται οι τεχνικές ανάλυσης και χαρακτηρισμού που χρησιμοποιήθηκαν κατά την εκπόνηση της διατριβής.

Στο κεφάλαιο 5 παρουσιάζονται τα αποτελέσματα της διατριβής που αφορούν τη σύνθεση και την κατασκευή των ικριωμάτων καθώς και την καλλιέργεια των κυττάρων πάνω σε αυτές.

Τέλος στο κεφάλαιο 6 συνοψίζονται τα αποτελέσματα και τα συμπεράσματα που προέκυψαν από την εκπόνηση της διατριβής και γίνονται προτάσεις για τη συνέχιση της έρευνας στο σχετικό πεδίο.



# **ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1**

## **ΜΗΧΑΝΙΚΗ ΙΣΤΩΝ**

## 1.1 Μηχανική ιστών

Η μηχανική ιστών (tissue engineering) έχει οριστεί ως ο κλάδος της επιστήμης που ασχολείται με την εφαρμογή των αρχών της βιολογίας και της ιατρικής από τη μία, και των αρχών της φυσικοχημείας και της μηχανικής από την άλλη με στόχο τον σχεδιασμό, κατασκευή, τροποποίηση, ανάπτυξη και συντήρηση των ζωντανών ιστών και των λειτουργιών τους (Berthiaume et al 2003, Ehrenfreund-Kleinman et al 2006). Η μελλοντική (αλλά και τωρινή σε μικρό βαθμό) συμβολή αυτού του διεπιστημονικού κλάδου στις εγχειρήσεις ανόρθωσης και τις μεταμοσχεύσεις ιστών θεωρείται αναμφισβήτητη. Ο τελικός μακρινός στόχος της ιστομηχανικής είναι η πλήρης αποκατάσταση ενός πλήρως λειτουργικού ανθρώπινου οργάνου (π.χ. σε περίπτωση απώλειας ποδιού), (Ma 2004).

Γενικά η μηχανική ιστών μπορεί να διαιρεθεί σε δύο μεγάλες κατευθύνσεις, α) την εργαστηριακή (*in vitro*) κατασκευή τεχνητών ιστών και β) την τροποποίηση της κυτταρικής ανάπτυξης και λειτουργίας απ' ευθείας σε ζωντανούς οργανισμούς (*in vivo*), (Berthiaume et al 2003). Οι τεχνητοί ιστοί, εκτός της κλινικής χρησιμότητας τους ως μοσχεύματα, παρουσιάζουν και ερευνητική (π.χ. για την μελέτη πολύπλοκων λειτουργιών των ιστών). Παράδειγμα *in vivo* εφαρμογής είναι η χρήση επιθεμάτων από βιοσυμβατά πολυμερή για ανάπλαση δέρματος και αποφυγή ουλών.

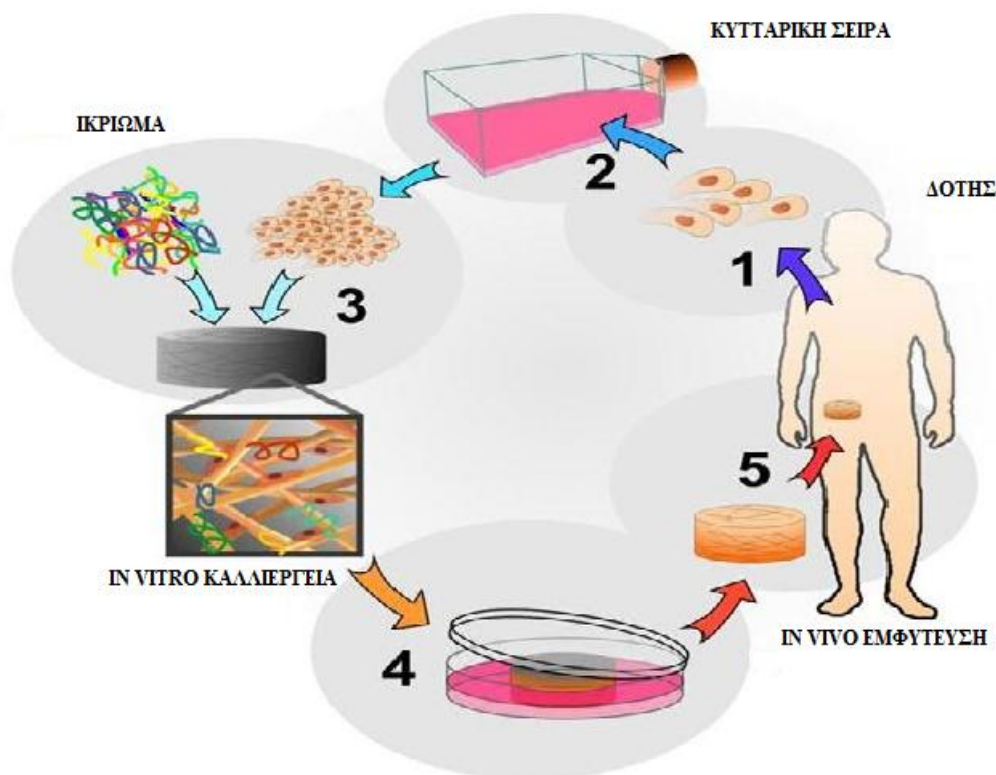
Ήδη από τη δεκαετία του 1930 έγιναν πειράματα που έδειξαν ότι το σκεπτικό της μηχανικής ιστών είναι εφικτό. Καρκινικά κύτταρα από ποντίκια εγκλείστηκαν σε πολυμερική μεμβράνη και τοποθετήθηκαν σε γαστρική κοιλότητα γουρουνιού (Ehrenfreund-Kleinman et al 2006). Αυτά τα πειράματα έδειξαν ότι τα κύτταρα επιζούσαν και δεν καταστρέφονταν από το ανοσοποιητικό σύστημα. Επίσης συμπαγή (μη πορώδη) φιλμ κολλαγόνου χρησιμοποιήθηκαν για ανάπλαση δέρματος. Τις δυσδιάστατες αυτές καλλιέργειες ακολούθησαν οι καλλιέργειες σε τρεις διαστάσεις. Σε τέτοιου είδους καλλιέργειες οι κυτταρικές μάζες είναι κατά πολύ μεγαλύτερες από τις αντίστοιχες σε δύο διαστάσεις. Οι υψηλές αυτές τιμές κυτταρικού πληθυσμού είναι κατάλληλες για τη δημιουργία τρισδιάστατων ιστών (Berthiaume et al 2003, Ehrenfreund-Kleinman et al 2006).

Η τρισδιάστατη καλλιέργεια κυττάρων είναι δυνατή με τη χρήση ενός κατάλληλου υλικού-φορέα των κυττάρων, του ικριώματος (scaffold), που δρα σαν εξωκυττάρια ουσία (extracellular matrix). Η επιλογή του υλικού από το οποίο κατασκευάζεται το

ικρίωμα, καθώς και τα λοιπά χαρακτηριστικά του, επηρεάζουν άμεσα την επιτυχή ανάπτυξη των κυττάρων και άρα του τελικού ιστού. Λόγω της άμεσης συνάφειας των ικριωμάτων με το σκοπό της παρούσας διατριβής, θα γίνει εκτενής αναφορά στα ικρίωματα και τα χαρακτηριστικά τους σε ξεχωριστή παράγραφο.

Θέματα πρωταρχικής σημασίας σε εφαρμογές μηχανικής ιστών είναι το είδος και η προέλευση των κυττάρων που θα χρησιμοποιηθούν. Το είδος των κυττάρων καθορίζεται κυρίως από τον τύπο του προς ανάπλαση ιστού, ενώ η προέλευσή τους μπορεί να ποικίλει και να είναι είτε ανθρώπινη είτε ζωική. Συνηθισμένη προσέγγιση είναι η χρήση των αντίστοιχων κυττάρων για ένα συγκεκριμένο τύπο ιστού (π.χ. κερατινοκυττάρων για ανάπλαση δέρματος). Μια άλλη προσέγγιση είναι η χρήση αρχέγονων κυττάρων, τα οποία στη συνέχεια διαφοροποιούνται σε άλλους τύπους κυττάρων υπό κατάλληλες συνθήκες (Hwang et al. 2008). Επίσης, το αν η καλλιέργεια των κυττάρων θα γίνει *in vivo* ή *in vitro* παίζει σημαντικό ρόλο στην επιλογή του είδους των κυττάρων και αντίστροφα. Αυτό συμβαίνει εξαιτίας της ιδιαιτερότητας του κάθε τύπου κυττάρων, καθώς υπάρχουν τύποι που αναπαράγονται εύκολα σε *in vitro* συνθήκες (π.χ. ινοβλάστες) ενώ άλλοι όχι (π.χ. ηπατικά κύτταρα ) (Berthiaume et al 2003).

Ένας άλλος σημαντικός παράγοντας στην τρισδιάστατη καλλιέργεια είναι η συγκέντρωση “σποράς” (seeding density) των κυττάρων στο φορέα-ικρίωμα, η οποία επηρεάζει την προσκόλληση των κυττάρων. Η προσκόλληση κυττάρων στο υπόστρωμα προαπαιτείται της ανάπτυξης και σωστής λειτουργίας τους. Μετά τη σπορά και την προσκόλληση των κυττάρων τα κύτταρα διαδίδονται και αναπτύσσονται σε ένα σταθερό σχήμα. Η τελική μορφολογία των κυττάρων εξαρτάται από την προσκόλληση των κυττάρων στο υπόστρωμα, από την μηχανική σταθερότητα του υποστρώματος (που πρέπει να αντέχει στις τάσεις που ασκούνται από τα κύτταρα) καθώς και από την μεταξύ των κυττάρων αλληλεπίδραση. Τέλος η δυνατότητα οξυγόνωσης των κυττάρων πρέπει να λαμβάνεται σοβαρά υπόψη (Berthiaume et al 2003). Στην εικόνα 1.1, περιγράφεται συνοπτικά η στρατηγική της μηχανικής ιστών. Πρώτο στάδιο είναι η απομόνωση και παραγωγή των επιθυμητών κυττάρων σε επαρκή ποσότητα. Παράλληλα με το πρώτο στάδιο απαιτείται ο σχεδιασμός και η κατασκευή ενός βιοσυμβατού φορέα των κυττάρων (με κατάλληλο σχήμα και διαστάσεις). Στη συνέχεια τα κύτταρα τροφοδοτούνται στο ικρίωμα και εκκολάπτονται και τελικά ο φορέας μεταμοσχεύεται στο επιθυμητό σημείο.



**Εικόνα 1.1:** Στρατηγική της μηχανικής ιστών

Μετά την τοποθέτηση του μοσχεύματος στον οργανισμό, θέμα μείζονος σημασίας είναι η αγγείωση και η αιμάτωση του. Ανεπαρκής παροχή αίματος (που μεταφράζεται σε μειωμένη παροχή οξυγόνου και θρεπτικών συστατικών) μπορεί να οδηγήσει σε θάνατο των κυττάρων. Συνήθως με τη μεταμόσχευση προκαλείται αυθόρμητα αγγείωση ως ένα βαθμό. Περισσότερες πληροφορίες για αυτό το θέμα μπορούν να βρεθούν στη βιβλιογραφία (Rouwkema et al. 2008).

Σημαντική είναι η πρόοδος στον τομέα της ανάπλασης οστού και δέρματος (Molly 2008, MacNeil 2008, Karageorgiou et al. 2004). Άλλοι τύποι ιστών επίσης έχουν αποτελέσει αντικείμενο εκτενούς έρευνας (Nisbet et al. 2008, Melrose et al. 2008, Siepe et al. 2008). Είναι γεγονός πάντως ότι στη συντριπτική πλειοψηφία των περιπτώσεων, η έρευνα επικεντρώνεται σε έναν μόνο τύπο ιστού (και όχι σε πολλαπλούς ιστούς ή διεπιφάνειες ιστών).

Η εκπόνηση της παρούσας διατριβής γίνεται στα πλαίσια διατμηματικής συνεργασίας με τελικό στόχο την ανάπτυξη νέων υλικών για ανάπλαση δέρματος και εξωκυττάριας ουσίας. Δεν στοχεύεται όμως ο ιστός απομονωμένος αλλά ο ιστός πάνω σε βιοϋλικά με κατάλληλα τροποποιημένη αρχιτεκτονική δομή.



## 1.2 Ικρίώματα μηχανικής ιστών

### 1.2.1 Βασικά χαρακτηριστικά ικριωμάτων

Όπως ήδη αναφέρθηκε, πολύ συχνά σε εφαρμογές μηχανικής ιστών απαιτείται η χρήση ενός υλικού-φορέα των κυττάρων, του ικριώματος. Πριν γίνει αναφορά στα γενικά χαρακτηριστικά των ικριωμάτων κρίνεται σκόπιμο να αποσαφηνιστούν οι όροι βιοαποικοδομήσιμο, βιοσυμβατό και βιοενεργό υλικό και να τονιστεί ότι οι τρεις όροι είναι ανεξάρτητοι μεταξύ τους.

Βιοαποικοδομήσιμο είναι το υλικό το οποίο μπορεί να αποσυντεθεί από ζωντανούς οργανισμούς (όχι απαραίτητα από τον άνθρωπο). Παραδείγματα βιοαποικοδομήσιμων υλικών είναι το πολυγαλακτικό οξύ το οποίο μπορεί να αποικοδομηθεί και από τον άνθρωπο και η κυτταρίνη η οποία αποικοδομείται ενζυμικά από μικροοργανισμούς. Βιοσυμβατό είναι το υλικό το οποίο δεν είναι τοξικό, δεν προκαλεί ανοσολογική απάντηση και δεν αποβάλλεται από τους ζωντανούς οργανισμούς. Σε αντίθεση με τον όρο βιοαποικοδομήσιμο που σχετίζεται τόσο με τον άνθρωπο, ζώα όσο και με τους μικροοργανισμούς, ο όρος βιοσυμβατό υλικό στη συντριπτική πλειοψηφία αναφέρεται σε υλικά που χρησιμοποιούνται σε ανθρώπινους ή ζωικούς οργανισμούς. Τα δύο βιοαποικοδομήσιμα υλικά που προαναφέρθηκαν είναι και βιοσυμβατά. Άλλο παράδειγμα βιοσυμβατού υλικού είναι ο πολυμεθακρυλικός μεθυλεστέρας (PMMA) που δεν είναι όμως βιοαποικοδομήσιμο υλικό. Τέλος ο όρος βιοενεργό αποδίδεται σε υλικά τα οποία έχουν επίδραση και προκαλούν κάποιου είδους απόκριση από ζώντες οργανισμούς. Παράδειγμα βιοενεργού υλικού είναι οι εμπορικές κρέμες κολλαγόνου που προκαλούν αναγέννηση των κυττάρων με αποτέλεσμα τη μείωση των ρυτίδων. Άλλο παράδειγμα είναι ένα ικρίωμα πολυμερούς-υδροξυαπατίτη το οποίο ευνοεί την προσκόλληση οστεοβλαστών και την ανάπτυξη οστού. Γενικά η βιοενεργότητα δε συνδέεται κατ' ανάγκη με θετική επίδραση (π.χ. μία τοξική ουσία είναι βιοενεργή). Στην συνέχεια του κειμένου πάντως, ο όρος βιοενεργότητα θα χρησιμοποιείται με την έννοια ότι ένα υλικό προκαλεί θετική αντίδραση για τα κύτταρα (ευνοεί δηλαδή την προσκόλληση και ανάπτυξη των κυττάρων).

Από τα παραπάνω γίνονται ήδη αντιληπτά τρία από τα επιθυμητά χαρακτηριστικά ενός ικριώματος μηχανικής ιστών. Η βιοσυμβατότητα και η βιοενεργότητα είναι

αναγκαία χαρακτηριστικά ενώ η βιοαποικοδομησιμότητα δεν είναι πάντα απαραίτητη και εξαρτάται από το είδος του ιστού που υποκαθίσταται (Ma 2004). Εφόσον το ικρίωμα είναι βιοσυμβατό μπορεί να παραμείνει (χωρίς να αποικοδομηθεί) στον οργανισμό μετά την ανάπλαση ιστού, ή να αφαιρεθεί. Η βιοαποικοδομησιμότητα στις εφαρμογές μηχανικής ιστών μπορεί να προκαλέσει και προβλήματα καθώς αν το ικρίωμα αποικοδομείται με ρυθμό ταχύτερο από το ρυθμό αναγέννησης του ιστού, υπάρχει πιθανότητα κατάρρευσης του συστήματος. Όπως προαναφέρθηκε, το ικρίωμα δρα ως τεχνητή εξωκυττάρια ουσία, δηλαδή ως ένα τεχνητό προσωρινό στήριγμα για τα κύτταρα. Με την αποικοδόμηση μειώνεται η μηχανική αντοχή του υλικού και άρα η δυνατότητα στήριξης του υπό ανάπλαση ιστού.

Ανεξάρτητα από την αποικοδόμηση και ότι αυτό συνεπάγεται για τη μηχανική αντοχή του φορέα, το ικρίωμα είναι επιθυμητό να έχει εκτός της αντοχής και κατάλληλες μηχανικές ιδιότητες. Για παράδειγμα, ένα σκληρό άκαμπτο υλικό είναι καταλληλότερο από ένα ελαστικό υλικό ως προσωρινό μόσχευμα σε οστό, γιατί οι ιδιότητες του προσομοιάζουν καλύτερα τις μηχανικές ιδιότητες του οστού.

Ένα άλλο σημαντικό και απαραίτητο χαρακτηριστικό των ικριωμάτων είναι το υψηλό πορώδες. Το πορώδες ορίζεται ως το πηλίκο του κενού όγκου προς τον συνολικό όγκο του υλικού. Ο κενός όγκος στην προκειμένη περίπτωση οφείλεται στην ύπαρξη πόρων. Απαιτούνται πόροι κατάλληλης διαμέτρου έτσι ώστε να είναι δυνατή η διείσδυση και ανάπτυξη του κυττάρου μέσα στο ικρίωμα. Εξυπακούεται ότι οι πόροι πρέπει να είναι “ανοικτοί”, δηλαδή να υπάρχει εσωτερική διασύνδεση (interconnection) μεταξύ τους. Στενά συνδεδεμένη με τα παραπάνω είναι η ειδική επιφάνεια του ικριώματος (πηλίκο της επιφάνειας προς τη μάζα ή τον όγκο του υλικού). Η ειδική επιφάνεια επίσης πρέπει να είναι υψηλή, δηλαδή σε μικρό όγκο ή μάζα υλικού να υπάρχει μεγάλη επιφάνεια για την προσκόλληση των κυττάρων.

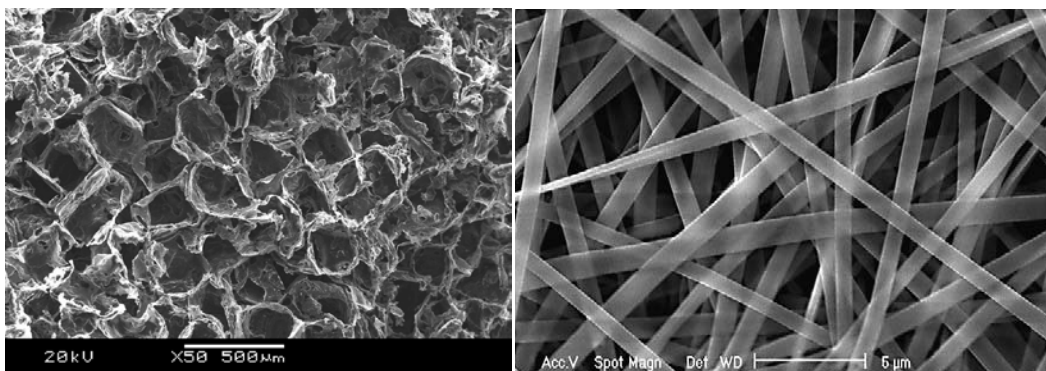
Τα ικρίωματα τέλος, είναι επιθυμητό να δρουν ως φορείς ελεγχόμενης απελευθέρωσης φαρμακευτικών ουσιών ή παραγόντων ανάπτυξης, για την αποφυγή μολύνσεων και την καταπολέμηση φλεγμονών κατά την ανάπλαση του ιστού. Η ελεγχόμενη απελευθέρωση ουσιών από βιοαποικοδομήσιμα υλικά αποτελεί ένα ξεχωριστό κλάδο της μηχανικής ιστών.

## 1.2.2 Υλικά κατασκευής και είδη ικριωμάτων

Τα ικριώματα διακρίνονται σε δύο μεγάλες κατηγορίες, τα ικριώματα στερεάς κατάστασης και τα υδροπηκτώματα. Όσον αφορά την δομή τους τα ικριώματα στερεάς κατάστασης χωρίζονται σε δύο τύπους, τα πορώδη και τα ινώδη ικριώματα (Ma 2004). Και οι δύο παραπάνω τύποι ικριωμάτων διαθέτουν πόρους με αποτέλεσμα την δημιουργία κενών όπου μπορούν να αναπτυχθούν οι κυτταροκαλλιέργειες. Στα ινώδη υλικά οι πόροι σχηματίζονται από το πλέγμα των ινών. Σε αυτήν την περίπτωση οι πόροι έχουν διαφορετική μορφολογία από τους πόρους των πορωδών ικριωμάτων. Στην εικόνα 1.2 παρουσιάζονται οι δομές ινωδών και πορωδών ικριωμάτων όπως απεικονίζονται με την βοήθεια του ηλεκτρονικού μικροσκοπίου σάρωσης. Τα ινώδη ικριώματα συνήθως χρησιμοποιούνται για την ανάπλαση ιστών με υψηλό δείκτη ελαστικότητας και ευπλαστότητας ενώ τα πορώδη ικριώματα για κατηγορίες ιστών οι οποίες απαιτούν μεγάλη μηχανική αντοχή ή σαφή διαχωρισμό των κυτταρικών υπότυπων που αποτελούν το όργανο.

Οι κυριότεροι τύποι υλικών που χρησιμοποιούνται ανήκουν στην κατηγορία των πολυμερών τα οποία μπορεί να περιέχουν αποκλειστικά οργανικά υλικά ή να έχουν υβριδικό χαρακτήρα (οργανικά και ανόργανα υλικά σε καθορισμένες αναλογίες). Για την ανάπλαση οργάνων όπως τα οστά και τα δόντια χρησιμοποιούνται βιοενεργά υαλώδη υλικά (bioglass) και βιοκεραμικά (π.χ. υδροξυαπατίτης) ή υβριδικά υλικά πολυμερών και βιογυαλιών ή βιοκεραμικών.

Ευρέως χρησιμοποιούμενα πολυμερή σε εφαρμογές ιστομηχανικής είναι οι αλειφατικοί πολυεστέρες (π.χ. το πολυγαλακτικό οξύ), οι πολυσακχαρίτες (π.χ. χιτοζάνη και υαλουρονικό οξύ) καθώς και πρωτεΐνες (π.χ. φιβρίνη, ζελατίνη και κολλαγόνο).



**Εικόνα 1.2:** α) Πορώδες ικρίωμα, β) ινώδες ικρίωμα

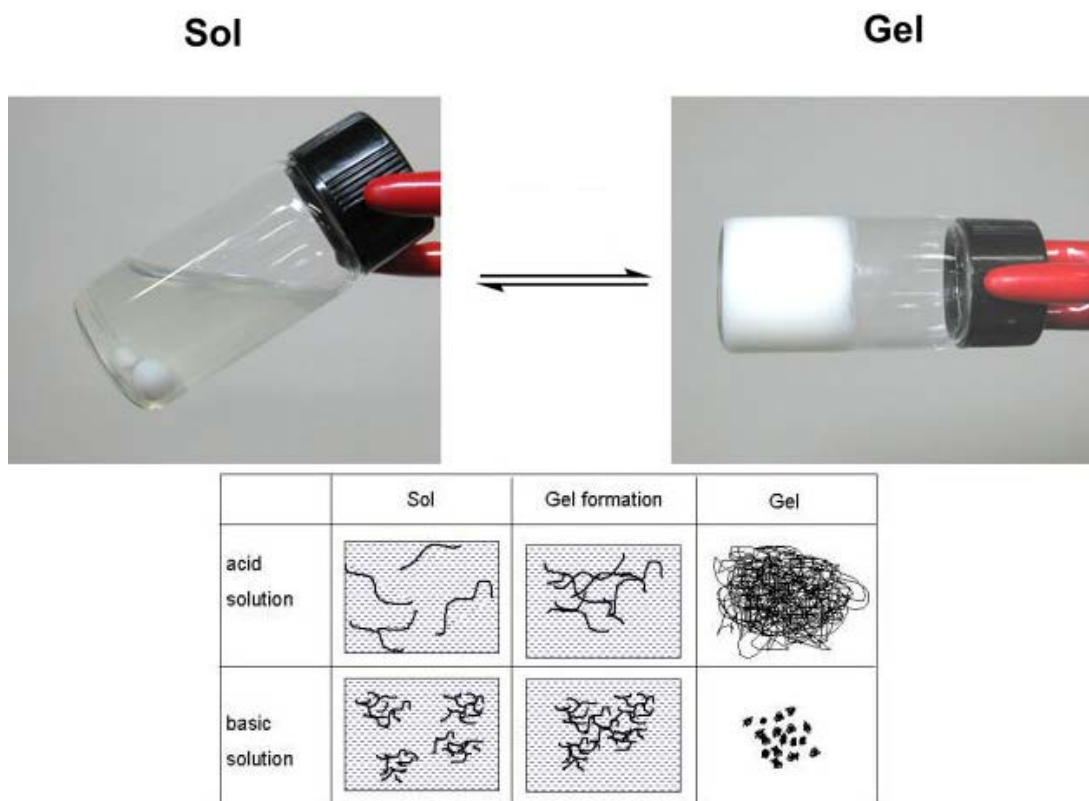
Μία πολύ σημαντική κατηγορία ικριωμάτων είναι τα υδροπηκτώματα (hydrogels). Τα υδροπηκτώματα αυτά είναι κολλοειδείς διασπορές πολυμερών σε νερό. Η συγκέντρωση του νερού είναι συνήθως μεγαλύτερη από 90%. Αλυσίδες ή νανοσωματίδια πολυμερούς σχηματίζουν σταυροδεσμούς (crosslinking) με αποτέλεσμα τη δημιουργία ενός τρισδιάστατου πλέγματος (οι πόροι του πλέγματος αυτού είναι πάρα πολύ μικροί και δεν έχουν σχέση με τους πόρους των ικριωμάτων που προαναφέρθηκαν). Οι σταυροδεσμοί αυτοί εμποδίζουν τη διάλυση του πολυμερούς.

Τα υδροπηκτώματα μπορούν να διαχωριστούν σε δύο κατηγορίες: τις φυσικές πηκτές και τις χημικές πηκτές. Ο διαχωρισμός αυτός πραγματοποιείται ανάλογα με την αιτία που προκαλεί τον σχηματισμό των σταυροδεσμών. Όσον αφορά τις φυσικές πηκτές οι σταυροδεσμοί δημιουργούνται από φυσικές αλληλεπιδράσεις μεταξύ των μακρομορίων (π.χ. δεσμοί υδρογόνου). Στις χημικές πηκτές οι σταυροδεσμοί δημιουργούνται με ομοιοπολική ένωση των μορίων του πολυμερούς με μόρια του διασταυρωτή (crosslinker). Ένας από τους πιο γνωστούς διασταυρωτές είναι η γλουταραλδεϋδη.

Τα υδροπηκτώματα παρουσιάζουν συγκεκριμένα χαρακτηριστικά τα οποία σχετίζονται με την μέθοδο σχηματισμού τους και παρουσιάζονται ως πλεονεκτήματα σε σχέση με τα ικρίωματα στερεάς κατάστασης. Αρχικά τα υδροπηκτώματα από τη “φύση” τους είναι βιομημητικά υλικά καθώς τα κύτταρα στους ζωικούς οργανισμούς βρίσκονται σε υδατικό περιβάλλον, επομένως και ο εγκλεισμός των κυττάρων σε ένα υδροπηκτώμα αποτελεί μία διεργασία που μιμείται τις πραγματικές συνθήκες σε σχέση με την καλλιέργεια των κυττάρων σε ένα πορώδες στερεό που βρίσκεται μέσα στο νερό. Τα υδροπηκτώματα έχουν την δυνατότητα να προσαρμόσουν το σχήμα τους στις ατέλειες (π.χ. πληγές) οποιουδήποτε σχήματος πολύ πιο εύκολα, ενώ στα στερεά ικρίωματα απαιτείται η ύπαρξη και κατασκευή του αντίστοιχου καλουπιού. Τέλος η εμφύτευση του ικριώματος πραγματοποιείται πολύ πιο άμεσα και η προσαρμογή της στο συγκεκριμένο σημείο επιτυγχάνεται πολύ ευκολότερα. Φυσικά τα πλεονεκτήματα αυτά οφείλονται στην υψηλή ελαστικότητα των δομών αυτών με αποτέλεσμα να υστερούν σε εφαρμογές όπου απαιτείται αυξημένη μηχανική αντοχή.

Ιδιαίτερο ενδιαφέρον σε αυτήν την κατηγορία παρουσιάζουν οι θερμοαντιστρεπτές πηκτές. Οι πηκτές (gel) αυτές με αλλαγή της θερμοκρασίας μπορούν να μετατραπούν σε λύμα (sol). Το λύμα έχει μικρό ιξώδες και είναι υγρό. Με θέρμανση το λύμα

μετατρέπεται σε πηκτή που συνεπάγεται ραγδαία αύξηση του ιξώδους με αποτέλεσμα η πηκτή να εμφανίζεται ως στερεή (παρόλο που κατά 90% είναι νερό). Θερμοαντιστρεπτές πηκτές οι οποίες σε θερμοκρασία μικρότερη από αυτή του σώματος μεταπίπτουν σε λύμα, ενώ σε θερμοκρασία ίση ή μεγαλύτερη από αυτή του σώματος είναι πηκτές, είναι ιδανικές για εφαρμογές ιστομηχανικής. Στην εικόνα 1.3 παρουσιάζεται αυτή η διεργασία.



**Εικόνα 1.3:** Θερμοαντιστρεπτή πηκτή (sol-gel)

Υλικά που χρησιμοποιούνται για την παραγωγή υδροπηκτών είναι τα υδρόφιλα πολυμερή όπως η πολυαιθυλενογλυκόλη ή μίγματα της με πολυεστέρες, η χιτοζάνη, η ζελατίνη και η πολυβινυλική αλκοόλη.

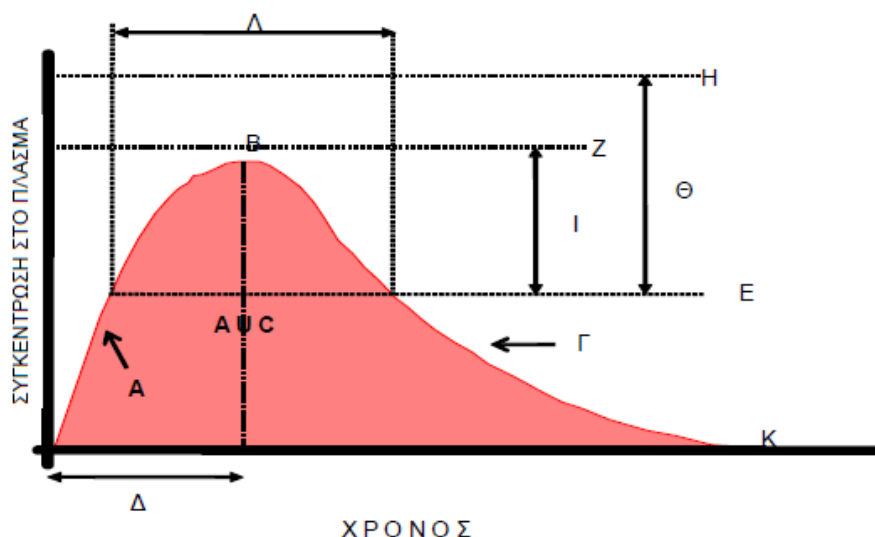
Μια ξεχωριστή κατηγορία ικριωμάτων αποτελούν τα βιολογικά ενεργά ικριώματα. Αυτά τα ικριώματα έχουν ανάλογη δομή με την εξωκυττάρια ουσία στον οργανισμό. Αποτελούνται από κολλαγόνο τύπου I ή II ή από συμπολυμερή κολλαγόνου και γλυκοζαμινογλυκανών. Έχουν υψηλό πορώδες (μεγαλύτερο από 90%) και μεγέθη πόρων που κυμαίνονται μεταξύ 5 και 500  $\mu\text{m}$  (Yannas 2006).

### 1.3 Ελεγχόμενη απελευθέρωση φαρμακευτικών ουσιών

Η ελεγχόμενη απελευθέρωση ουσιών είναι μία πολύ σημαντική διεργασία τόσο σε εφαρμογές ιστομηχανικής όσο και σε άλλες βιοϊατρικές εφαρμογές. Η σπουδαιότητα της ελεγχόμενης απελευθέρωσης παρατηρείται στην φαρμακοκινητική. Η δραστηριότητα του φαρμάκου εξαρτάται από την συγκέντρωση του στον οργανισμό. Το φάρμακο γίνεται δραστικό όταν ξεπεράσει κάποια ελάχιστη συγκέντρωση στον οργανισμό αλλά και τοξικό όταν υπερβεί την μέγιστη θεραπευτική συγκέντρωση. Με άλλα λόγια χαμηλές συγκεντρώσεις φαρμάκου δεν έχουν επίδραση ενώ υψηλότερες συγκεντρώσεις μπορεί να οδηγήσουν σε ανεπιθύμητα αποτελέσματα. Η λήψη φαρμάκων με τον συμβατικό τρόπο γίνεται ανά τακτά χρονικά διαστήματα. Όταν το φάρμακο λαμβάνεται, βρίσκεται στον οργανισμό σε υψηλή συγκέντρωση η οποία με την πάροδο του χρόνου μειώνεται μέχρι την επόμενη λήψη. Αποτέλεσμα αυτών είναι η συγκέντρωση του φαρμάκου στον οργανισμό να μεταβάλλεται κυματοειδώς και σπάνια να έχει την επιθυμητή τιμή (εικόνα 1.4).

Για την επίτευξη της επιθυμητής τιμής κατασκευάζονται βιοαποικοδομήσιμες μήτρες οι οποίες επιτυγχάνουν την ελεγχόμενη αποδέσμευση της φαρμακευτικής ουσίας. Η μέθοδος που χρησιμοποιείται για την επίτευξη της ελεγχόμενης απελευθέρωσης είναι ο εγκλεισμός του φαρμάκου σε ένα βιοαποικοδομήσιμο πολυμερές. Ο ρυθμός αποικοδόμησης του πολυμερούς καθορίζει το ρυθμό απελευθέρωσης του φαρμάκου στον οργανισμό, και έτσι οι διακυμάνσεις στις τιμές της συγκέντρωσης του φαρμάκου είναι πολύ μικρότερες σε σχέση με το συμβατικό τρόπο λήψης.

Ο μικροεγκλεισμός της ουσίας στο πολυμερές μπορεί να πραγματοποιηθεί με τη μέθοδο εναπόθεσης διαλύματος (solvent casting). Σε αυτήν την τεχνική, η προς εγκλεισμό ουσία διαλύεται ή διασπείρεται σε διάλυμα πολυμερούς. Στη συνέχεια το διάλυμα εναποτίθεται σε κατάλληλο δοχείο και συνθήκες έτσι ώστε να εξατμιστεί ο διαλύτης. Τέλος το φάρμακο εγκλείεται στο φιλμ πολυμερούς που σχηματίζεται κατά την εξάτμιση.



#### ΕΠΕΞΗΓΗΣΕΙΣ ΣΧΕΔΙΑΓΡΑΜΜΑΤΟΣ

A	ΦΑΣΗ ΑΠΟΡΡΟΦΗΣΗΣ ΚΑΙ ΚΑΤΑΝΟΜΗΣ	H	ΜΕΓΙΣΤΗ ΑΝΕΚΤΗ ΣΥΓΚΕΝΤΡΩΣΗ
B	ΜΕΓΙΣΤΗ ΣΥΓΚΕΝΤΡΩΣΗ ΣΤΟ ΠΛΑΣΜΑ ( $C_{max}$ )	Θ	ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΙΚΗ ΖΩΝΗ
Γ	ΦΑΣΗ ΑΠΟΜΑΚΡΥΝΣΗΣ	I	ΘΕΡΑΠΕΥΤΙΚΗ ΖΩΝΗ
Δ	ΧΡΟΝΟΣ ΕΠΙΤΕΥΞΗΣ ΜΕΓΙΣΤΗΣ ΣΥΓΚΕΝΤΡΩΣΗΣ	K	ΤΕΛΕΥΤΑΙΑ ΑΝΙΧΝΕΥΣΙΜΗ ΣΥΓΚΕΝΤΡΩΣΗ
E	ΚΑΤΩΤΑΤΗ ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΙΚΗ ΣΥΓΚΕΝΤΡΩΣΗ	Λ	ΔΙΑΡΚΕΙΑ ΔΡΑΣΗΣ ΦΑΡΜΑΚΟΥ
Z	ΠΙΘΑΝΗ ΤΟΞΙΚΗ ΣΥΓΚΕΝΤΡΩΣΗ	A.U.C	ΕΠΙΦΑΝΕΙΑ ΚΑΤΩ ΑΠΟ ΤΗΝ ΚΑΜΠΥΛΗ

**Εικόνα 1.4:** Συγκέντρωση φαρμάκου στον οργανισμό συναρτήσει του χρόνου λήψης του φαρμάκου.

Μία άλλη μέθοδος για τον εγκλεισμό του φαρμάκου είναι ο διαχωρισμός φάσεων. Σε αυτήν την τεχνική, το φάρμακο διαλύεται ή διασπείρεται σε διάλυμα πολυμερούς και στη συνέχεια προκαλείται διαχωρισμός του πολυμερούς από τον διαλύτη. Κατά τη στερεοποίηση του πολυμερούς το φάρμακο ενθυλακώνεται. Ο διαχωρισμός φάσεων μπορεί να επιτευχθεί είτε με αλλαγή της θερμοκρασίας είτε με τη χρήση αντιδιαλύτη (ουσία που είναι αναμίξιμη με τον διαλύτη αλλά δεν διαλύει το πολυμερές και το φάρμακο). Ιδιαίτερο ενδιαφέρον παρουσιάζουν οι διεργασίες όπου ως αντιδιαλύτης χρησιμοποιείται υπερκρίσιμο διοξείδιο του άνθρακα, γιατί παρέχουν τη δυνατότητα ελέγχου τόσο του μεγέθους όσο και της μορφολογίας των σωματιδίων που παράγονται. Τέλος, η ενθυλάκωση ουσιών σε υδροπηκτώματα έχει ευρύ φάσμα εφαρμογών.





**ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2**  
**ΒΙΟΣΥΜΒΑΤΑ ΚΑΙ**  
**ΒΙΟΑΠΟΙΚΟΔΟΜΗΣΙΜΑ**  
**ΠΟΛΥΜΕΡΗ**

## 2.1 Γενικά χαρακτηριστικά των πολυμερών

Η λέξη πολυμερές είναι σύνθετη και προκύπτει από τις λέξεις πολύ και μέρος. Η αιτιολογία της ονοματολογίας των πολυμερών προκύπτει από την χημική δομή τους. Πιο συγκεκριμένα τα υλικά αυτά προκύπτουν από τη χημική ένωση πολλαπλών όμοιων μεταξύ μορίων, με αποτέλεσμα τη δημιουργία τεράστιων μορίων (μακρομορίων). Η πιο γνωστή κατηγορία πολυμερών που έχει εφαρμογή στην καθημερινή ζωή του ανθρώπου είναι τα γνωστά σε όλους πλαστικά υλικά. Παράλληλα πολλά ελαστικά υλικά (π.χ. ελαστικά αυτοκινήτων) είναι επίσης πολυμερή. Ένα διάσημο πολυμερές που απαρτίζει ένα μεγάλο ποσοστό του ανθρώπινου σώματος είναι το κολλαγόνο που εντοπίζεται στον στηρικτικό ιστό. Τα κύτταρα των φυτών και των δέντρων σε μεγάλο ποσοστό αποτελούνται από κυτταρίνη, ενώ οι καρποί ορισμένων περιέχουν άμυλο που είναι δύο φυσικά πολυμερή. Το περίβλημα των αρθρόποδων θαλάσσιων (π.χ. αστακοί) καθώς και το περίβλημα των μυρμηγκιών αποτελείται από ένα άλλο φυσικό πολυμερές τη χιτίνη. Ο κατάλογος με παραδείγματα πολυμερών που συναντώνται στην φύση είναι πραγματικά αχανής. Χρησιμοποιούνται σε ευρύ φάσμα εφαρμογών της καθημερινότητας του ανθρώπου, από τρόφιμα και καλλυντικά ως και υποκατάστατα ιστών.

Ένα από τα κυριότερα χαρακτηριστικά των πολυμερών είναι το υψηλό μοριακό τους βάρος (από εκατοντάδες ως και εκατομμύρια γραμμάρια ανά γραμμομόριο, g/mol). Το γεγονός αυτό έχει ως αποτέλεσμα τα πολυμερή να είναι στερεά υλικά σε συνήθεις συνθήκες πίεσης και θερμοκρασίας. Όπως και τα υπόλοιπα στερεά, τα πολυμερή μπορεί να είναι άμορφα, κρυσταλλικά ή ημικρυσταλλικά. Τα κρυσταλλικά πολυμερή έχουν θερμοκρασία τήξης, τα άμορφα πολυμερή έχουν θερμοκρασία υαλώδους μετάβασης, ενώ τα ημικρυσταλλικά έχουν και τις δύο θερμοκρασίες. Τα άμορφα πολυμερή όταν θερμανθούν πάνω από τη θερμοκρασία υαλώδους μετάβασης βρίσκονται σε ελαστομερή κατάσταση (το πολυμερές υπόκειται σε μεγάλες αντιστρεπτές παραμορφώσεις χωρίς θραύση). Στην συγκεκριμένη κατάσταση οι αλυσίδες του πολυμερούς είναι εύκαμπτες, σε αντίθεση με την υαλώδη κατάσταση όπου βρίσκονται τα πολυμερή όταν έχουν θερμοκρασία μικρότερη από τη θερμοκρασία υαλώδους μετάβασης. Ας σημειωθεί ότι ορισμένα πολυμερή δεν παρουσιάζουν κάποια προσδιορίσιμη από τις προαναφερθείσες μεταπτώσεις (υαλώδη

μετάβαση ή τήξη). Χαρακτηριστικό παραδείγματα τέτοιων πολυμερών είναι η χιτίνη και η κυτταρίνη, που είναι κρυσταλλικά υλικά. Το γεγονός αυτό οφείλεται στην ύπαρξη ενδο- και δια-μοριακών δεσμών υδρογόνου που αναπτύσσονται στα υλικά αυτά. Όταν αυξάνεται η θερμοκρασία, τα μακρομόρια των πολυμερών αυτών συντάσσονται πυκνά και είναι άκαμπτα λόγω αυτών των δεσμών, ενώ σε κάποια θερμοκρασία αρχίζει η αποικοδόμηση τους πριν προλάβουν να λιώσουν ή να βρεθούν σε ελαστομερή κατάσταση.

Οι περισσότερες από τις ιδιότητες των πολυμερών εξαρτώνται ως ένα βαθμό από το μοριακό τους βάρος. Η συσχέτιση των ιδιοτήτων με το μοριακό βάρος παύει να υφίσταται από μία σχετικά υψηλή τιμή του τελευταίου και περαιτέρω αύξηση του μοριακού βάρους δεν έχει ουσιαστική επίδραση στα χαρακτηριστικά του πολυμερούς.

Μία διαφορετική μέθοδος κατάταξης των πολυμερών πέρα από την κρυσταλλικότητα τους είναι η προέλευσή τους. Με αυτήν την κατηγοριοποίηση τα πολυμερή διακρίνονται σε δύο βασικούς τύπους: τα φυσικά που βρίσκονται στην φύση και τα συνθετικά που παράγονται στο εργαστήριο. Στα φυσικά πολυμερή συγκαταλέγονται οι πολυσακχαρίτες, οι πρωτεΐνες, οι φυσικές ρητίνες ενώ τα συνθετικά είναι πιο εύχρηστο να κατηγοριοποιηθούν με βάση τη θερμική συμπεριφορά τους (θερμοπλαστικά και θερμοσκληρυνόμενα). Βιοαποικοδομήσιμα ή βιοσυμβατά πολυμερή μπορεί να είναι και τα φυσικά και τα συνθετικά (Παναγιώτου 2000).

Παρακάτω γίνεται αναφορά και περιγραφή των πιο σημαντικών βιοσυμβατών και βιοαποικοδομήσιμων πολυμερών που χρησιμοποιούνται σε εφαρμογές ιστομηχανικής. Ιδιαίτερη έμφαση δίνεται στα πολυμερή που χρησιμοποιήθηκαν στην παρούσα διατριβή και γίνεται ανασκόπηση της βιβλιογραφίας σχετικά με την παραγωγή ικριωμάτων από αυτά. Τέλος, αναφέρονται συνοπτικά άλλες εφαρμογές των πορωδών πολυμερικών υλικών (εκτός από ικριώματα ιστομηχανικής).

## 2.2 Συνθετικά πολυμερή

Οι γραμμικοί αλειφατικοί πολυεστέρες έχουν ευρεία χρήση σε εφαρμογές ιστομηχανικής. Το πολυγλυκολικό οξύ (PGA) και το πολυγαλακτικό οξύ (PLA) είναι δύο σχετικά υδρόφιλα πολυμερή που έχουν μελετηθεί εκτενώς. Παρόλο που τα μονομερή τους, το υδρόξυ-οξικό οξύ και το υδρόξυ-προπανικό οξύ, είναι οξέα, τα πολυμερή τους ανήκουν στην κατηγορία των εστέρων. Η αποικοδόμηση τους προκαλείται από την υδρόλυση των εστερικών δεσμών. Η ύπαρξη μίας επιπλέον μεθυλομάδας στην επαναλαμβανόμενη μονάδα του PLA το καθιστά πιο υδρόφοβο, με αποτέλεσμα να αποικοδομείται βραδύτερα. Άλλοι πολυεστέρες της ίδιας κατηγορίας είναι η πολυεκαπρολακτόνη (PCL) και ο πολυυδρόξυ-βουτυρικός εστέρας (PHB). Και τα δύο αυτά πολυμερή έχουν μεγάλο χρόνο αποικοδόμησης με αποτέλεσμα να είναι καταλληλότερα για εφαρμογές μακράς διάρκειας. Η χρήση συμπολυμερών μπορεί να συνδράμει σε ενδιάμεσους χρόνους αποικοδόμησης. Τα παραπάνω πολυμερή συντίθενται στο χημικό εργαστήριο με εξαίρεση τον πολυυδρόξυ-βουτυρικός εστέρας που συντίθεται από μικροοργανισμούς (Ma 2004). Τα υλικά αυτά είναι και βιοσυμβατά και βιοαποικοδομήσιμα και έχουν πολλαπλές εφαρμογές εκτός της μηχανικής ιστών (π.χ. ελεγχόμενη απελευθέρωση ουσιών). Παρουσιάζουν καλή διαλυτότητα σε κοινούς οργανικούς διαλύτες και είναι δυνατή η κατεργασία τους με εναλλακτικές μεθόδους (π.χ. CO<sub>2</sub>), γεγονός που επιτρέπει την εύκολη επεξεργασία τους. Τα παραπάνω χαρακτηριστικά έχουν επιτρέψει την παρασκευή πορώδων και ινώδων ικριωμάτων με ποικίλες τεχνικές με στόχο την ανάπλαση διαφόρων τύπων ιστών (Xin et al 2004, Jung et al 2008, Jeong et al 2008, Guan et al 2008).

Η πολυβίνυλο πυρρολοδόνη και η πολυβινυλική αλκοόλη είναι δύο υδατοδιαλυτά πολυμερή που έχουν χρησιμοποιηθεί ευρέως στην καθημερινή ζωή αλλά και σε βιοϊατρικές εφαρμογές. Πιο συγκεκριμένα έχουν χρησιμοποιηθεί ευρέως σε τρόφιμα, καλλυντικά, χρώματα και κόλλες καθώς και ως ικριώματα ιστομηχανικής με τη μορφή υδροπηκτών για διάφορους τύπους ιστών (Vrana et al 2008, Nilasaroya et al 2008, Patel et al 2007). Ως υδροπήκτωμα έχει χρησιμοποιηθεί ευρέως η πολυ(αιθύλενο γλυκόλη).

Άλλα πολυμερή που έχουν χρησιμοποιηθεί σε εφαρμογές ιστομηχανικής αλλά σε μικρότερη έκταση είναι η πολυαιθύλενο γλυκόλη, παράγωγα της τυροσίνης,

πολυουρεθάνες, πολυφωσφοεστέρες και ορθοεστέρες (Ma 2004, Patel et al 2007, Adhikari et al 2008).

Ένα συνθετικό πολυμερές που τα τελευταία χρόνια έχει τραβήξει την προσοχή των ερευνητών για εφαρμογές ιστομηχανικής είναι η οξική κυτταρίνη. Η οξική κυτταρίνη είναι σχετικά υδρόφοβη και παράγεται από ένα φυσικό πολυμερές, την κυτταρίνη. Πιο συγκεκριμένα προκύπτει από τη μερική εστεροποίηση της κυτταρίνης με οξικό οξύ (ετερογενώς). Η αντίδραση πραγματοποιείται με χρήση του αντίστοιχου ανυδρίτη οξέος, παρουσία θειικού οξέος ως καταλύτη. Εκτός του μοριακού βάρους, η οξική κυτταρίνη χαρακτηρίζεται και από το βαθμό υποκατάστασης, ανάλογα με το βαθμό εστεροποίησης των υδροξυλίων της κυτταρίνης. Πρόσφατα, με τη χρήση ιοντικών υγρών, επιτεύχθηκε η παραγωγή οξικής κυτταρίνης μέσω ομογενούς αντίδρασης και χωρίς τη χρήση καταλυτών (Wu et al 2004). Με την ομογενή αντίδραση καθίσταται δυνατή και εύκολη η παραγωγή οξικής κυτταρίνης διαφόρων βαθμών υποκατάστασης, που συνεπάγεται δυνατότητα ελέγχου της υδροφοβικότητας και του ρυθμού αποικοδόμησης του τελικού προϊόντος.

Η εστεροποίηση των υδροξυλίων της κυτταρίνης έχει ως αποτέλεσμα την αύξηση της υδροφοβικότητας στην οξική κυτταρίνη, παρόλα αυτά η ύπαρξη των εστερικών δεσμών καθιστούν την οξική κυτταρίνη πιο επιρρεπή στην αποικοδόμηση σε υδατικό περιβάλλον. Ας διευκρινιστεί ότι η οξική κυτταρίνη από άποψη γωνίας επαφής μπορεί να θεωρηθεί υδρόφιλη καθώς διαβρέχεται από το νερό σε μεγάλο βαθμό ενώ από άποψη διαλυτότητας θεωρείται υδρόφοβη. Επίσης η ύπαρξη των εστερικών δεσμών εμποδίζει την κρυστάλλωση, οπότε η οξική κυτταρίνη είναι ένα άμορφο πολυμερές που παρουσιάζει θερμοκρασία υαλώδους μετάβασης και αυξημένη διαλυτότητα σε κοινούς οργανικούς διαλύτες όπως η ακετόνη. Έχει χρησιμοποιηθεί ευρέως για κατασκευή φίλτρων, στις μαγνητικές ταινίες και ως υπόστρωμα των φωτοευαίσθητων ουσιών στα φωτογραφικά φιλμ (πλέον έχει αντικατασταθεί από άλλους πολυεστέρες).

Ως υλικό ικρίωματος ιστομηχανικής η OK έχει μελετηθεί σε μικρό βαθμό. Πορώδεις δομές OK έχουν παραχθεί με χρήση υπερκρίσιμου διοξειδίου του άνθρακα (Reverchon et al 2007). Οι δομές αυτές όμως δεν είναι κατάλληλες για εφαρμογές ιστομηχανικής καθώς υπάρχει μικρή ή και καθόλου διασύνδεση μεταξύ των πόρων. Η τεχνική της ηλεκτροϊνοποίησης έχει χρησιμοποιηθεί για την παραγωγή νανοϊνών οξικής κυτταρίνης. Τέτοιες δομές μπορούν να βρουν εφαρμογή ως φίλτρα αλλά και ως ικρίωματα ιστομηχανικής. Επίσης έχουν γίνει προσπάθειες εγκλεισμού διαφόρων

ουσιών σε ίνες οξικής κυτταρίνης (Chen et al 2008). Ενθαρρυντικά αποτελέσματα προέκυψαν από την καλλιέργεια οστεοβλαστών σε ικρίωμα μίγματος αμύλου και οξικής κυτταρίνης και από την καλλιέργεια καρδιακών κυττάρων σε πλέγματα οξικής κυτταρίνης (Entcheva et al 2004, Salgado et al 2002).

Ένα συνθετικό βιοσυμβατό αλλά όχι βιοαποικοδομήσιμο πολυμερές που χρησιμοποιείται σε βιοϊατρικές εφαρμογές είναι ο πολυμεθακρυλικός μεθυλεστέρας (PMMA). Η πιο γνωστή εμπορική του ονομασία είναι Plexy glass. Πολλές φορές του αποδίδεται ο όρος ακρυλικό γυαλί, γιατί έχει χρησιμοποιηθεί ως υποκατάστατο γυαλιού. Η πυκνότητα του σε σχέση με το γυαλί είναι πολύ μικρότερη με αποτέλεσμα να είναι πολύ ελαφρύτερο και η μορφοποίηση του είναι δυνατόν να πραγματοποιηθεί σε θερμοκρασίες αρκετά χαμηλές. Κατά την καύση του απελευθερώνει μόνο νερό και διοξείδιο του άνθρακα.

Ο πολυμεθακρυλικός μεθυλεστέρας χρησιμοποιείται σε ευρύ φάσμα εφαρμογών. Τα ακρυλικά χρώματα περιέχουν PMMA διεσπαρμένο σε νερό. Έχει χρησιμοποιηθεί για κατασκευή επίπλων, μουσικών οργάνων, ως καμβάς ζωγραφικής (από τον Σαλβαντόρ Νταλί για παράδειγμα), ακόμα και για τεχνητά νύχια. Επίσης δρα ως φίλτρο της ηλεκτρομαγνητικής ακτινοβολίας ορισμένων μηκών κύματος (π.χ. για ένα μέρος της υπεριώδους).

Το PMMA είναι ένα βιοσυμβατό πολυμερές το οποίο έχει χρησιμοποιηθεί ως υλικό κατασκευής πολλών συσκευών καθημερινής χρήσης (π.χ. φακών επαφής). Επιπλέον χρησιμοποιείται στην ορθοπαιδική για τη δημιουργία καλουπιών για τα μοσχεύματα. Πιο συγκεκριμένα το μονομερές του PMMA (υγρό) μαζί με στερεή σκόνη συγκεκριμένων βιοκεραμικών τοποθετείται στην κατεστραμμένη περιοχή του οστού. Καθώς η διασπορά αυτή (στερεού σε υγρό) είναι υγρή και παίρνει ακριβώς το σχήμα της κατεστραμμένης περιοχής ενώ στη συνέχεια ακολουθεί πολυμερισμός, με επακόλουθο την στερεοποίηση. Έτσι λαμβάνεται ένα λεπτομερές αντίγραφο της κατεστραμμένης περιοχής το οποίο αναπτύσσεται μέσα στο οστικό έλλειμμα. Το PMMA επίσης χρησιμοποιείται με τον ίδιο τρόπο για να γεμίσει τον πιθανό κενό χώρο ανάμεσα στο εμφύτευμα και στο οστό (σε αυτήν την περίπτωση παραμένει στον οργανισμό). Μία άλλη εφαρμογή του PMMA είναι τα οδοντικά τα οποία μπορούν να χρωματιστούν κατάλληλα έτσι ώστε το εμφύτευμα να έχει την ίδια απόχρωση με τα υπόλοιπα δόντια του ασθενούς. Στην ιστομηχανική έχει χρησιμοποιηθεί κυρίως ως ικρίωμα στερεάς κατάστασης αλλά και ως υδροπήκτωμα σε συνδυασμό με υδρόφιλα πολυμερή (Derkaoui et al 2008, Shimko et al 2006).

## 2.3 Φυσικά πολυμερή

Μία άλλη κατηγορία πολυμερών τα οποία μπορούν να βρεθούν στη φύση είναι τα φυσικά πολυμερή. Το ίδιο φυσικό πολυμερές μπορεί να αποτελεί συστατικό διαφορετικών οργανισμών με αποτέλεσμα να υπάρχουν διαφοροποιήσεις τόσο στο μοριακό βάρος όσο και στη χημική δομή. Άμεσο επακόλουθο είναι η ίδια ουσία να εμφανίζει διαφορετικές ιδιότητες (π.χ. στη διαλυτότητα). Όπως προκύπτει από τα παραπάνω, η καθαρότητα και η επαναληψιμότητα στο μοριακό βάρος και σε άλλες ιδιότητες στα φυσικά πολυμερή δεν μπορεί να θεωρηθεί δεδομένη.

Μια σημαντική κατηγορία φυσικών πολυμερών είναι οι πολυσακχαρίτες οι οποίοι αποτελούν πολυμερή σακχάρων. Οι πολυσακχαρίτες αφθονούν στους φυτικούς και ζωικούς οργανισμούς.

Ένας από τους καλύτερα μελετημένους πολυσακχαρίτες είναι το αλγινικό οξύ που βρίσκεται σε ορισμένα είδη φυκιών (η λέξη άλγη είναι ξένης προέλευσης και είναι συνώνυμη της λέξης φύκια). Ανάλογα με τη θέση του καρβοξυλίου το αλγινικό οξύ μπορεί να εμφανίζεται διαλυτό ή μη στο νερό. Στην πραγματικότητα το αλγινικό οξύ είναι συμπολυμερές του β-D-μανουρονικού οξέος και του α-L-γουλουρονικού οξέος (Ma 2006). Τα επιμέρους ποσοστά των μορίων αυτών στην αλυσίδα του αλγινικού οξέος καθορίζουν εκτός της υδατοδιαλυτότητας και άλλες ιδιότητες όπως τη δυνατότητα δημιουργίας πηκτώματος και τη μηχανική αντοχή. Το αλγινικό οξύ μπορεί να παραχθεί και από βακτήρια αλλά με σημαντικά υψηλότερο κόστος, οπότε η κύρια πηγή του είναι από τα φύκια. Το μεγάλο ποσοστό του διαθέσιμου αλγινικού οξέος χρησιμοποιείται στη βιομηχανία τροφίμων ως γαλακτωματοποιητής ή διογκωτικός/πηκτικός παράγοντας (π.χ. παγωτά, κρέμες, χυμοί φρούτων). Επίσης έχει χρησιμοποιηθεί σε βιομηχανίες φαρμάκων και καλλυντικών. Στον τομέα της ιστομηχανικής κυρίως χρησιμοποιείται ως υδροπήκτωμα αλλά και σε μικρότερο βαθμό ως ικρίωμα στερεάς κατάστασης (Ashton et al 2007). Η δημιουργία δεσμών στα υδροπηκτώματα βασίζεται στην ικανότητα του αλγινικού οξέος να δεσμεύει επιλεκτικά διάφορα κατιόντα. Ευρέως διαδεδομένο για την συγκεκριμένη εφαρμογή είναι το κατιόν ασβεστίου, που υπάρχει στον ανθρώπινο οργανισμό σε μεγάλες ποσότητες.

Άλλα πολυσάκχαρα που έχουν χρησιμοποιηθεί σε εφαρμογές ιστομηχανικής είναι η δεξτράνη (dextran) και η αραβινογαλακτάνη (arabinogalactan). Η αραβινογαλακτάνη είναι διακλαδισμένο συμπολυμερές της αραβινόζης και της γαλακτόζης (σε αναλογία

1 προς 6). Αποτελεί εξαίρεση ανάμεσα στα φυσικά πολυμερή καθώς παραλαμβάνεται από ένα συγκεκριμένο δέντρο, με υψηλή καθαρότητα και με επαναλήψιμο μοριακό βάρος και φυσικοχημικές ιδιότητες. Παρουσιάζει υψηλή διαλυτότητα στο νερό (σχεδόν 70%) και μπορεί να κατεργαστεί εύκολα, ενώ είναι βιοσυμβατή και βιοαποικοδομήσιμη. Παρόλα αυτά, η χρήση της για κατασκευή ικριωμάτων είναι περιορισμένη. Η δεξτράνη επίσης έχει περιορισμένη χρήση. Η δεξτράνη είναι γραμμικό πολυμερές της γλυκόζης με β(1-6) δεσμούς. Συνήθως αυτά τα δύο υλικά χρησιμοποιούνται ως πρόσθετα σε άλλα πολυμερή (Derkaoui et al 2008, Pan et al 2008).

Πολύ σημαντική κατηγορία πολυσακχαριτών είναι οι γλυκοζοαμινογλυκάνες (ΓΑΓ). Υπάρχουν έξι τύποι γλυκοζοαμινογλυκανών, αλλά τρεις χρησιμοποιούνται πιο συχνά: το υαλουρονικό οξύ, η ηπαρίνη και η θειική χονδροϊτίνη (chondroitin sulfate). Οι γλυκοζοαμινογλυκάνες είναι γραμμικά πολυμερή δισακχαριτών και είναι συστατικά της εξωκυττάριας ουσίας στους περισσότερους ζωικούς οργανισμούς. Μελέτες σε ικρίωματα υαλουρονικού οξέος για ανάπλαση χόνδρου, έδειξαν ότι το υλικό αυτό δεν προκαλεί φλεγμονές ή αρνητικές αποκρίσεις, ενώ αποικοδομείται σε λογικό χρονικό διάστημα (4 μήνες) και προκαλεί την ανάπτυξη κολλαγόνου. Το υαλουρονικό οξύ έχει χρησιμοποιηθεί σε σύνθετα υλικά με άλλα πολυμερή. Γενικά και τα τρία αυτά φυσικά πολυμερή χρησιμοποιούνται μέχρι τώρα κυρίως ως πρόσθετα σε ικρίωματα άλλων πολυμερών για βελτίωση της βιοενεργότητας (Ehrenfreund-Kleinman et al 2006, Nilasaroya et al 2008, Cho et al 2007).

Η χιτοζάνη είναι ένα πολυσάκχαρο ιδιαίτερα χρήσιμο στις βιοϊατρικές εφαρμογές. Παρουσιάζει βιοσυμβατότητα, είναι βιοαποικοδομήσιμη (και από τον άνθρωπο) ενώ έχει αναφερθεί ότι έχει αντιμικροβιακές και επολυωτικές ιδιότητες. Βρίσκεται στη φύση, αλλά σε μεγαλύτερο ποσοστό παράγεται με αποακετυλίωση της χιτίνης (αντίδραση χιτίνης με πυκνό υδατικό διάλυμα καυστικού νατρίου σε υψηλές θερμοκρασίες). Εκτός του μοριακού βάρους η χιτοζάνη χαρακτηρίζεται και από το βαθμό αποακετυλίωσης που επηρεάζει δραματικά ιδιότητες όπως είναι η διαλυτότητα και ο ρυθμός αποικοδόμησης. Αυτή η ιδιότητα έχει αποτελέσει αντικείμενο έρευνας σε εφαρμογές ιστομηχανικής (Freier et al 2005). Η χιτοζάνη έχει χρησιμοποιηθεί ευρέως ως ικρίωμα στερεάς κατάστασης για διάφορους τύπους ιστών. Στην συντριπτική πλειοψηφία τα πορώδη ικρίωματα χιτοζάνης παράγονται με τη μέθοδο της λυοφίλησης (freeze-drying) (Khor et al 2003, Mao et al 2003, Huang et al 2005). Με την τεχνική της απομάκρυνσης σωματιδίων (particulate leaching) έχουν παραχθεί



κάποια ικριώματα χωρίς όμως εντυπωσιακά αποτελέσματα στην παραγόμενη πορώδη δομή (Zeng et al 1996). Τέλος έχει αναφερθεί η παραγωγή ινωδών δομών χιτοζάνης με την τεχνική της ηλεκτροϊνοποίησης (Ohkawa et al 2004, Sangsanoh et al 2006).

Η χιτοζάνη παραλαμβάνεται κυρίως από ένα φυσικό πολυμερές τη χιτίνη. Η χιτίνη και η κυτταρίνη είναι τα δύο πιο άφθονα πολυμερή που υπάρχουν στη γη (Kurita 2006). Όπως προκύπτει από τη δομή τους οι ουσίες αυτές έχουν μεγάλη συγγένεια. Στην θέση 2 όπου η κυτταρίνη έχει υδροξύλιο η χιτίνη έχει ομάδα ακεταμιδίου ενώ η χιτοζάνη αμινομάδα. Η χιτίνη βρίσκεται στο σκελετό θαλασσινών ειδών όπως τα καβούρια. Παραλαμβάνεται με κατεργασία των πρώτων υλών με υδροχλωρικό οξύ για απομάκρυνση του ανθρακικού ασβεστίου και με κατεργασία με καυστικό νάτριο για απομάκρυνση πρωτεϊνών. Χαρακτηρίζεται από το μοριακό βάρος (που συνήθως είναι αρκετά υψηλό) και από το βαθμό ακετυλίωσης (ή αποακετυλίωσης). Και η χιτίνη και η χιτοζάνη περιέχουν ακετάμιδο και άμινο-ομάδες στα μόρια τους. Όταν το ποσοστό των άμινο-ομάδων είναι μικρότερο από 50% τότε το πολυμερές ονομάζεται χιτίνη. Στην περίπτωση που υπερτερούν οι άμινο-ομάδες τότε το πολυμερές ονομάζεται χιτοζάνη. Η χιτίνη εμφανίζεται σε τρεις μορφές την α-, την β-και την γ-. Με διαφορά η πιο διαδεδομένη στη φύση είναι η α-χιτίνη. Στην α-χιτίνη οι αλυσίδες διευθετούνται αντιπαράλληλα με αποτέλεσμα την ανάπτυξη τόσο ενδομοριακών όσο και διαμοριακών δεσμών υδρογόνου, ενώ στη β-χιτίνη αναπτύσσονται μόνο μερικοί ενδομοριακοί δεσμοί καθώς οι αλυσίδες διευθετούνται παράλληλα η μία με την άλλη. Η δομή της γ-χιτίνης είναι μια ενδιάμεση κατάσταση μεταξύ της α- και της β-χιτίνης. Στο υπόλοιπο του κειμένου όταν γίνεται αναφορά στη χιτίνη θα εννοείται α-χιτίνη.

Η ύπαρξη των ενδο- και διαμοριακών δεσμών υδρογόνου στη χιτίνη, την καθιστά ένα ισχυρά ανθεκτικό πολυμερές τόσο θερμικά όσο και χημικά. Η χημική σταθερότητα της χιτίνης μπορεί να αποτελέσει και πρόβλημα καθώς είναι αδιάλυτη στο νερό και στους περισσότερους οργανικούς διαλύτες, σε αντίθεση με τη χιτοζάνη που μπορεί εύκολα να διαλυθεί σε αραιό (1%) υδατικό διάλυμα οξικού οξέος. Η χιτίνη διαλύεται σε διμεθυλακεταμίδιο που περιέχει 5% χλωριούχο λίθιο.

Η παραγωγή ικριωμάτων χιτίνης είναι σχεδόν ανύπαρκτη, με εξαίρεση λιγосτές εργασίες όπου γίνεται κατεργασία της χιτοζάνης και μετά γίνεται η μετατροπή σε χιτίνη (Zeng et al 1996, Gerentes et al 2002). Έχει αναφερθεί η χρήση της τεχνικής απομάκρυνσης άλατος για δημιουργία πορωδών ικριωμάτων απευθείας στη χιτίνη (Weng et al 2001). Οι δομές αυτές παρουσιάζουν χαμηλή διασύνδεση. Επίσης η ομάδα του Khor έχει ισχυριστεί πολλές φορές ότι έκανε παραγωγή πορωδών δομών

στη χιτίνη. Γενικά οι εργασίες της συγκεκριμένης ομάδας δεν είναι ιδιαίτερα σαφείς καθώς από τις φωτογραφίες που παρουσιάζουν συνήθως δεν είναι δυνατό να διαπιστωθεί αν όντως υπάρχουν πόροι ενώ άλλες πληροφορίες σχετικά με το πορώδες ή τη διασύνδεση των πόρων δεν αναφέρονται. Η ίδια ομάδα έκανε και *in vitro* πειράματα με τη χιτίνη (Chow et al 2000, Chow et al 2001, Khor et al 2003, Ge et al 2004).

Η χιτίνη έχει χρησιμοποιηθεί επιτυχώς σε *in vivo* εφαρμογές για ανάπλαση δέρματος μετά από έγκαυμα στα δάχτυλα του χεριού (Ohshima et al 1991). Επίσης έχει παραχθεί ινώδες ικρίωμα χιτίνης με την τεχνική της ηλεκτροϊνοποίησης (Noh et al 2006). Για να καταστεί δυνατή η παραγωγή ινών χιτίνης η συγκεκριμένη ομάδα ακτινοβόλησε τη χιτίνη και υπήρξε δραματική μείωση του μοριακού βάρους (αν και αυτό δεν εξηγεί την επίτευξη διάλυσης) ενώ μετά διαλύθηκε σε εξαφθόρο-ισοπροπανόλη σε 20 ημέρες. Το ινώδες αυτό ικρίωμα χρησιμοποιήθηκε για καλλιέργεια ανθρώπινων ινοβλαστών. Εν κατακλείδι, για τη χιτίνη μπορεί να ειπωθεί ότι υπάρχουν ενθαρρυντικά αποτελέσματα για τη χρήση της ως ικρίωματος. Παρόλα αυτά, η χρήση της είναι περιορισμένη και ένας λόγος για αυτό είναι η αδυναμία παραγωγής μιας πορώδους δομής κατάλληλης για τέτοιες εφαρμογές.

Κάτι ανάλογο μπορεί να ειπωθεί και για την κυτταρίνη. Η κυτταρίνη επίσης έχει διάφορες μορφές όπως η χιτίνη και στη δομή της αναπτύσσονται ενδο- και διαμοριακοί δεσμοί υδρογόνου. Η κατεργασία της κυτταρίνης (όπως και της χιτίνης) είναι δύσκολη υπόθεση καθώς οι ουσίες που χρησιμοποιούνται ως διαλύτες της δεν είναι πτητικές, τα διαλύματα τους ακόμα και σε χαμηλές συγκεντρώσεις είναι αρκετά ιξώδη και έχουν τη τάση πήκτωσης. Η δημιουργία πορώδους δομής κατάλληλης για εφαρμογές ιστομηχανικής στην κυτταρίνη είναι ανύπαρκτη στη βιβλιογραφία. Έχουν γίνει προσπάθειες παραγωγής ινωδών δομών κυτταρίνης με την τεχνική της ηλεκτροϊνοποίησης αλλά με όχι και τόσο επιτυχή αποτελέσματα (Viswanathan et al 2006).

Η κυτταρίνη μπορεί να παραχθεί και από βακτήρια οπότε ονομάζεται βακτηριακή κυτταρίνη (bacterial cellulose, BC). Η δομή της βακτηριακής κυτταρίνης είναι ινώδης και μοιάζει πολύ με τις δομές των πολυμερών που παράγονται με την τεχνική της ηλεκτροϊνοποίησης. Η βακτηριακή κυτταρίνη έχει χρησιμοποιηθεί ως ικρίωμα ιστομηχανικής με θετικά και ενθαρρυντικά αποτελέσματα (Muller et al 2006, Czaja et al 2007, Maneerung et al 2008).

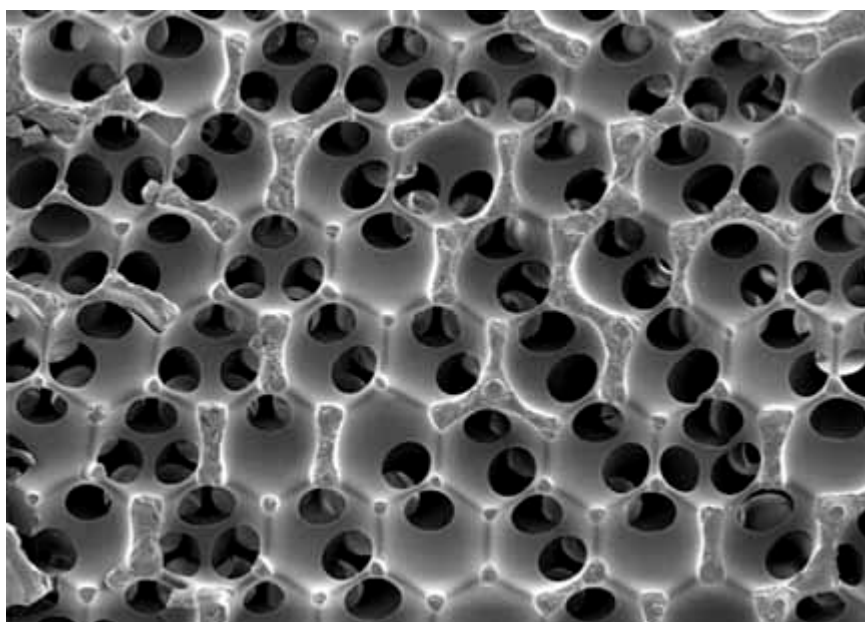
Εκτός από τα πολυσάκχαρα, για την παρασκευή ικριωμάτων έχουν χρησιμοποιηθεί πολλά είδη πρωτεϊνών. Ίσως η πιο συχνά χρησιμοποιούμενη πρωτεΐνη είναι το κολλαγόνο. Το κολλαγόνο αποτελεί συστατικό της εξωκυττάριας ουσίας και πολλών ειδών ιστών όπως το οστό, ο συνδετικός ιστός και οι μυς. Αποτελεί το 25 με 30% του συνόλου των πρωτεϊνών που υπάρχουν στον ανθρώπινο οργανισμό. Έχει ινώδη μορφή (τριπλή έλικα) και περιέχει το αμινοξύ γλυκίνη στη δομή του. Η λέξη είναι ελληνικής προέλευσης και σημαίνει παραγωγός κόλλας. Από τα αρχαία χρόνια χρησιμοποιούνταν ζωικές κόλλες με βάση το κολλαγόνο. Στην κατασκευή μουσικών οργάνων (π.χ. βιολιά, κιθάρες) ακόμα και σήμερα χρησιμοποιούνται ζωικές κόλλες οι οποίες είναι θερμοπλαστικές ώστε να είναι δυνατή η μετέπειτα επεξεργασία των οργάνων. Το κολλαγόνο χρησιμοποιείται σε κρέμες για καταπολέμηση των ρυτίδων και ως τεχνητός ιστός σε διάφορες χειρουργικές επεμβάσεις. Το κολλαγόνο έχει χρησιμοποιηθεί ευρέως ως ικρίωμα ιστομηχανικής είτε μόνο του (χωρίς όμως καλές μηχανικές ιδιότητες) είτε με άλλα φυσικά ή συνθετικά πολυμερή. Έχουν ήδη αναφερθεί πληροφορίες για τα βιολογικά ενεργά ικρίωματα που αποτελούνται από κολλαγόνο και γλυκοζαμινογλυκάνες. Η τεχνική της ηλεκτροϊνοποίησης χρησιμοποιείται για την παραγωγή ινωδών δομών κολλαγόνου ενώ η μέθοδος της λυοφίλησης χρησιμοποιείται για την παραγωγή πορωδών δομών (Pang et al 2009, Buttafoco et al 2006, Matthews et al 2002, Rho et al 2006, Venugopal et al 2005, Pek et al 2008, Al-Munajjed et al 2009).

Η μερική υδρόλυση του κολλαγόνου οδηγεί στην παραγωγή μιας άλλης πρωτεΐνης της ζελατίνης. Η ζελατίνη χρησιμοποιείται στην ζαχαροπλαστική, την φαρμακευτική και στην Παρασκευή καλλυντικών ως παράγοντας πήκτωσης. Επιπλέον έχει χρησιμοποιηθεί στα φωτογραφικά φιλμ μαζί με την οξική κυτταρίνη. Την τελευταία δεκαετία άρχισε να χρησιμοποιείται και ως υλικό κατασκευής ικριωμάτων. Συνήθως χρησιμοποιείται ως πρόσθετο σε άλλα πολυμερή για βελτίωση της βιοαποικοδομησιμότητας και της βιοενεργότητας. Η μέθοδος που χρησιμοποιείται πιο συχνά για την κατασκευή πορωδών ικριωμάτων ζελατίνης είναι η λυοφίληση (Zhao et al 2006, Zhang et al 2004, Kang et al 1999, Kim et al 2005, Kang et al 2006).

## 2.4 Εφαρμογές πορώδων πολυμερικών υλικών

Τα πορώδη πολυμερικά υλικά εκτός από ικρίωματα ιστομηχανικής και φορείς ελεγχόμενης απελευθέρωσης ουσιών μπορούν να χρησιμοποιηθούν και σε ένα άλλο πλήθος εφαρμογών. Ένα από τα προτερήματα των πορώδων υλικών είναι η χαμηλή πυκνότητα εξαιτίας της ύπαρξης πορώδους (Cooper 2003). Έτσι, μπορούν να χρησιμοποιηθούν σε εφαρμογές που απαιτούνται ελαφριά υλικά με μηχανική αντοχή (π.χ. ταμπλό στο εσωτερικό αυτοκινήτων, σόλες παπουτσιών). Η ύπαρξη πορώδους έχει ως αποτέλεσμα τη μείωση της μηχανικής αντοχής του υλικού. Παρόλα αυτά, όσο μειώνεται το μέγεθος των πόρων τόσο αυξάνεται η μηχανική αντοχή.

Τα πορώδη υλικά έχουν εφαρμογές σε υλικά συσκευασίας, ως θερμοκοιτίδες (π.χ. πλαστικά δοχεία, μονώσεις σωληνώσεων). Στα υλικά αυτά η ύπαρξη διασύνδεσης μεταξύ των πόρων δεν είναι επιθυμητή. Υλικά με κλειστούς πόρους χαρακτηρίζονται ως κυψελωτά. Στην εικόνα 2.1 παρουσιάζεται η δομή ενός κυψελωτού υλικού (φωτογραφία από ηλεκτρονικό μικροσκόπιο σάρωσης).



**Εικόνα 2.1:** Πορώδης κυψελωτή δομή (Bryers et al, 2012)

Πορώδη υλικά χρησιμοποιούνται ως απορροφητικά υλικά σε διάφορες εφαρμογές (π.χ. σφουγγάρια καθαρισμού, σερβιέτες κ.τ.λ.). Χρησιμοποιούνται επίσης σε διεργασίες διαχωρισμού (π.χ. ως φίλτρα). Πορώδη υλικά που έχουν ινώδη δομή έχουν χρησιμοποιηθεί ευρέως ως φίλτρα αλλά και για την κατασκευή ρούχων που

επιτρέπουν τη διέλευση του αέρα. Τα πορώδη πολυμερικά υλικά μπορούν να χρησιμοποιηθούν ως αρνητικές ρέπλικες για την κατασκευή μεταλλικών ή κεραμικών πορωδών υλικών που είναι πιο δύσκολο να κατασκευαστούν με άλλο τρόπο. Τέτοια μη πολυμερικά υλικά έχουν επίσης πολλές εφαρμογές με κυριότερη τη χρήση τους ως καταλύτες.

Μία άλλη ειδική κατηγορία πορωδών υλικών είναι οι αεροπηκτές (aerogels). Οι αεροπηκτές είναι νανοπορώδη υλικά που προκύπτουν από την ξήρανση πηκτών υπό συγκεκριμένες συνθήκες. Ο υγρός διαλύτης της πηκτής απομακρύνεται σε υπερκρίσιμες συνθήκες έτσι ώστε να αποφεύγεται η ύπαρξη διεπιφάνειας υγρού-αερίου που μπορεί να οδηγήσει σε κατάρρευση της δομής. Τα υλικά αυτά χαρακτηρίζονται από πολύ μικρό μέγεθος πόρων, υψηλή ειδική επιφάνεια και καλή μηχανική αντοχή. Τα συγκεκριμένα υλικά έχουν κάποιες επιπλέον ιδιότητες καθώς μπορούν να χρησιμοποιηθούν ακόμη και ως θερμικοί ή ηχητικοί υπερμονωτές. Κύρια υλικά παρασκευής αεροπηκτωμάτων είναι το αλουμίνιο, το πυρίτιο και ο άνθρακας. Στην εικόνα 2.2 παρουσιάζεται η φωτογραφία ενός αεροπηκτώματος



**Εικόνα 2.2:** Αυτοκίνητο στηρίζεται σε ένα κομμάτι αεροπηκτικής (Meador, 2008).



**ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3**  
**ΤΕΧΝΙΚΕΣ ΚΑΤΑΣΚΕΥΗΣ**  
**ΙΚΡΙΩΜΑΤΩΝ**

### 3.1 Γενικά

Το κυριότερο χαρακτηριστικό των ικριωμάτων είναι η ύπαρξη πόρων έτσι ώστε να είναι δυνατή η διακίνηση των κυττάρων μέσα στον σκελετό. Τα ικριώματα στερεάς κατάστασης, όπως ήδη αναφέρθηκε, μπορούν να διαχωριστούν σε ινώδη και πορώδη. Για την παραγωγή ινώδων ικριωμάτων μπορεί να χρησιμοποιηθεί η τεχνική της ηλεκτροϊνοποίησης, που παρέχει τη δυνατότητα παραγωγής νανοϊνών. Για την παραγωγή πορώδων δομών έχουν αναπτυχθεί διάφορες τεχνικές. Ένα ποσοστό των τεχνικών αυτών λίγο πολύ βασίζονται στην ίδια λογική: μία ουσία (που μπορεί να είναι στερεή, υγρή ή ακόμα και αέρια) αναμιγνύεται ή διασπείρεται στο πολυμερές ή σε διάλυμα του, και στη συνέχεια με απομάκρυνση της ουσίας αυτής, δημιουργούνται πόροι στις θέσεις που πριν καταλαμβάνονταν από την ουσία.

Πορώδεις δομές σε πολυμερή μπορούν να παραχθούν με τη μέθοδο του διαχωρισμού φάσεων. Σε αυτήν τη μέθοδο το πολυμερές διαλύεται σε κάποιο διαλύτη και στη συνέχεια προκαλείται με κάποιο τρόπο διαχωρισμός φάσεων. Προκύπτουν δύο φάσεις, μία πλούσια σε πολυμερές (και μικρή ποσότητα διαλύτη) και μία φτωχή σε πολυμερές (και με μεγάλο ποσοστό διαλύτη). Στη συνέχεια απομακρύνεται ο διαλύτης από την πλούσια σε πολυμερές φάση (π.χ. με εξάτμιση) και έτσι δημιουργούνται οι πόροι και παγιώνονται κατά τη στερεοποίηση του πολυμερούς. Ο διαχωρισμός φάσεων μπορεί να προκύψει είτε λόγω αλλαγής της θερμοκρασίας είτε με την προσθήκη αντιδιαλύτη. Ο αντιδιαλύτης έχει την ιδιότητα να είναι αναμίξιμος με το διαλύτη του πολυμερούς αλλά δεν έχει αναμειχτεί με το πολυμερές. Σε ειδικές διεργασίες (π.χ. χρήση διοξειδίου του άνθρακα ως αντιδιαλύτη) ο διαχωρισμός φάσεων μπορεί να προκύψει και από μεταβολή της πίεσης. Πλεονεκτήματα αυτής της μεθόδου είναι η ύπαρξη διασύνδεσης μεταξύ των πόρων και η δυνατότητα ελέγχου ως ένα βαθμό του συνολικού πορώδους. Μειονεκτήματα της συγκεκριμένης τεχνικής είναι η ανομοιομορφία και η δυσκολία ελέγχου του μεγέθους των πόρων. Με την τεχνική αυτή είναι δυνατόν να παραχθούν πόροι ακατάλληλοι για εφαρμογές ιστομηχανικής.

Μία άλλη μέθοδος παραγωγής πορώδων δομών είναι η λυοφίληση. Στη μέθοδο αυτή το πολυμερές διαλύεται σε κάποιον διαλύτη, και το διάλυμα ψύχεται έτσι ώστε να στερεοποιηθεί. Στη συνέχεια ο διαλύτης περνά στην αέρια φάση (χωρίς παρεμβολή υγρής κατάστασης) με τη δημιουργία κενού. Οι πόροι δημιουργούνται



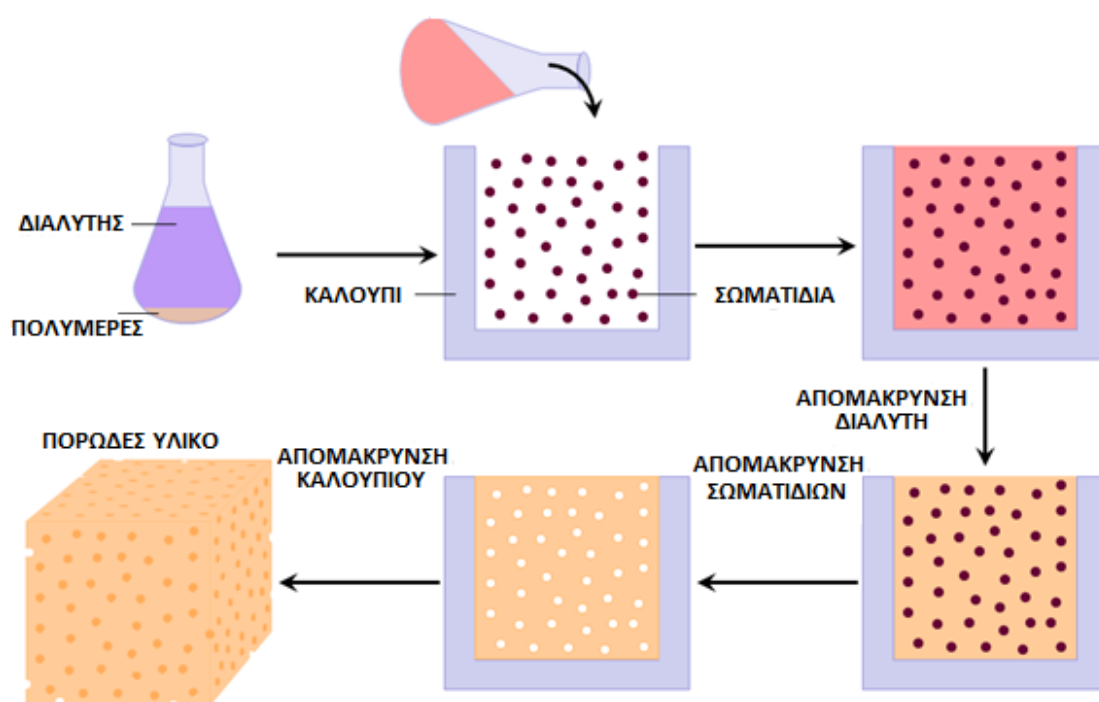
στη θέση όπου είχαν σχηματιστεί οι κρύσταλλοι ή τα στερεά σωματίδια του διαλύτη. Πλεονεκτήματα της μεθόδου είναι ο έλεγχος του πορώδους (ανάλογα με την συγκέντρωση του διαλύματος) και η δυνατότητα δημιουργίας πόρων με ομοιόμορφα μεγέθη και σχήματα (όχι απαραίτητα σφαιρικό). Τα κυριότερα μειονεκτήματα της μεθόδου είναι ο ελλιπής έλεγχος της διασύνδεσης και του μεγέθους των πόρων. Επιπλέον απαιτείται η χρήση ειδικής συσκευής που λειτουργεί σε χαμηλές θερμοκρασίες υπό κενό.

Μία πολλά υποσχόμενη κατηγορία τεχνικών για κατασκευή ικριωμάτων είναι η ταχεία πρωτοτύπηση (rapid prototyping). Στις τεχνικές αυτές σχεδιάζεται το ικρίωμα με τη βοήθεια λογισμικού προγράμματος και στη συνέχεια γίνεται τρισδιάστατη εκτύπωση του ικριώματος. Πλεονεκτήματα της μεθόδου είναι η δυνατότητα δημιουργίας περίπλοκων δομών με καλό έλεγχο στο πορώδες και το μέγεθος πόρων. Περιορισμός υπάρχει στα υλικά που μπορούν να χρησιμοποιηθούν για την κατασκευή ικριωμάτων (το αντίστοιχο μελάνι σε δυσδιάστατες εκτυπώσεις). Αυτό το πρόβλημα μπορεί να ξεπεραστεί με τη χρήση της τρισδιάστατης εκτύπωσης για την κατασκευή μιας αρνητικής ρέπλικας του ικριώματος. Μετά η ρέπλικα αυτή εμβαπτίζεται σε διάλυμα πολυμερούς και ακολουθεί εξάτμιση του διαλύτη. Στη συνέχεια διαλύεται η ρέπλικα και παραλαμβάνεται το ικρίωμα του πολυμερούς. Περιορισμοί υπάρχουν επίσης λόγω της ακρίβειας στην κίνηση της κεφαλής εκτύπωσης (Ma 2004).

Για την κατασκευή ινώδων ικριωμάτων εκτός της ηλεκτροϊνοποίησης, έχει χρησιμοποιηθεί ο διαχωρισμός φάσεων. Σε αυτήν την περίπτωση συνήθως απαιτείται η δημιουργία πηκτής κατά το διαχωρισμό φάσεων. Αυτή η μέθοδος μπορεί να συμπεριληφθεί στις διεργασίες αυτο-συναρμολόγησης (self assembly). Σε αυτές τις διεργασίες λόγω της ύπαρξης κατάλληλων ομάδων τα μακρομόρια οργανώνονται σε σχετικά περίπλοκες δομές (π.χ. ίνες) χωρίς την ανθρώπινη επέμβαση. Η χρήση αυτών των τεχνικών είναι ακόμα περιορισμένη (Ma 2004).

### 3.2 Απομάκρυνση σωματιδίων (Particulate leaching)

Από τις βασικότερες μεθόδους για την κατασκευή ικριωμάτων είναι η απομάκρυνση σωματιδίων. Σε αυτήν τη μέθοδο, διάλυμα πολυμερούς τοποθετείται σε ένα καλούπι που περιέχει στερεά σωματίδια. Εξατμίζεται ο διαλύτης και έτσι προκύπτει ένα στερεό πολυμερές με διεσπαρμένα σωματίδια. Το υλικό αυτό στη συνέχεια εμβαπτίζεται σε ένα διαλύτη που διαλύει τα σωματίδια αλλά όχι το πολυμερές, με αποτέλεσμα να σχηματίζονται πόροι στις θέσεις όπου πριν υπήρχαν τα σωματίδια. Η διαδικασία αυτή φαίνεται σχηματικά στην εικόνα 3.1.



**Εικόνα 3.1:** Δημιουργία πορώδους δομής με τη μέθοδο της απομάκρυνσης σωματιδίων.

Καθώς το μεγαλύτερο ποσοστό των πολυμερών είναι αδιάλυτα στο νερό, ως διαλύτης των σωματιδίων χρησιμοποιείται συνήθως το νερό ενώ τα σωματίδια συνήθως είναι μαγειρικό αλάτι (χλωριούχο νάτριο ή ιωδιούχο κάλιο). Η μέθοδος αυτή παρέχει τη δυνατότητα άμεσου ελέγχου του μεγέθους των πόρων (ανάλογα με το μέγεθος των σωματιδίων που χρησιμοποιούνται) και του πορώδους (από την αναλογία σωματιδίων-πολυμερούς που θα χρησιμοποιηθεί). Η συγκεκριμένη διαδικασία δεν απαιτείται κάποια ειδική διάταξη ή συσκευή και δεν απαιτούνται ιδιαίτερες συνθήκες πίεσης ή θερμοκρασίας. Στις δομές που προκύπτουν οι πόροι

παρουσιάζουν διασύνδεση. Το κυριότερο μειονέκτημα της συγκεκριμένης μεθόδου είναι η δυσκολία ελέγχου του μεγέθους των οπών διασύνδεσης. Επίσης οι κατανομές μεγέθους πόρων σε αυτήν την περίπτωση είναι πιο αμβλείες από τις αντίστοιχες κατανομές που προκύπτουν με άλλες τεχνικές ενώ έχει περιορισμένα ποσοστά εφαρμογής σε υδρόφιλα πολυμερή (π.χ. χιτίνη, χιτοζάνη, κυτταρίνη, κολλαγόνο).

### **3.3 Δημιουργία αφρού με υψηλής πίεσης διοξειδίου του άνθρακα.**

Τα παραπροϊόντα της κατεργασίας των πολυμερών από οργανικούς διαλύτες αποτελούν σοβαρό περιβαλλοντικό πρόβλημα και η κατεργασία τους συνήθως περιλαμβάνει διεργασίες διαχωρισμού με αυξημένες ενεργειακές απαιτήσεις, καθώς επίσης και την απομάκρυνση μικρών υπολειμμάτων διαλυτών ή υγρασίας από το τελικό προϊόν που είναι μια διαδικασία που γίνεται σε σχετικά υψηλές θερμοκρασίες ή με χρήση αντλιών κενού. Σε όλες τις μεθόδους παραγωγής πορωδών υλικών το πολυμερές διαλύεται σε κάποιον οργανικό διαλύτη με αποτέλεσμα να παρουσιάζεται έντονο περιβαλλοντικό πρόβλημα με τα απόβλητα ειδικά αν εφαρμοστούν οι τεχνικές αυτές σε βιομηχανική κλίμακα.

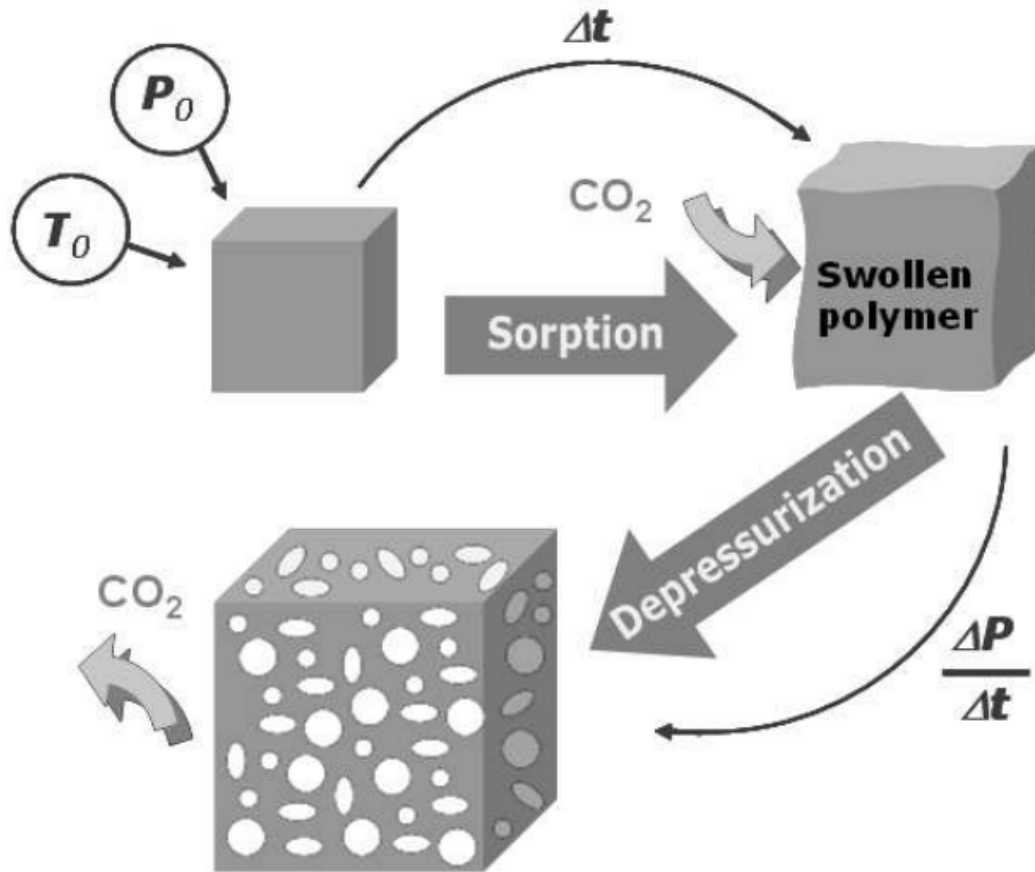
Ως αποτέλεσμα γίνεται αναζήτηση εναλλακτικών διαλυτών και διεργασιών με ελαττωμένες περιβαλλοντικές επιπτώσεις. Τέτοιοι εναλλακτικοί διαλύτες θεωρούνται τα υπερκρίσιμα ρευστά. Με τη χρήση υπερκρίσιμων ρευστών για την κατεργασία πολυμερών, η διαδικασία απλοποιείται καθώς το υπερκρίσιμο ρευστό απομακρύνεται από το προϊόν με απλή εκτόνωση της πίεσης αφήνοντας το στεγνό (οπότε αποφεύγεται το στάδιο της ξήρανσης). Επιπλέον, το υπερκρίσιμο ρευστό συνήθως μετά την κατεργασία παραμένει καθαρό και μπορεί σχετικά εύκολα να ανακυκλωθεί.

Το ρευστό που βρίσκεται σε συνθήκες πίεσης και θερμοκρασίας πάνω από το κρίσιμο σημείο του ορίζεται ως υπερκρίσιμο ρευστό. Το κρίσιμο σημείο ορίζεται ως το ζεύγος τιμών πίεσης και θερμοκρασίας όπου σταματάει η ύπαρξη ισορροπίας υγρού-αερίου. Στην πραγματικότητα η συνύπαρξη υγρού-αερίου σταματάει σε οποιαδήποτε θερμοκρασία ίση ή υψηλότερη από την κρίσιμη και ανεξάρτητα από την τιμή της πίεσης. Για αυτό ακόμα και αν ένα ρευστό βρίσκεται σε πίεση μικρότερη της κρίσιμης πίεσης αλλά σε θερμοκρασία υψηλότερη από την κρίσιμη μπορεί να

χαρακτηριστεί ως υπερκρίσιμο. Στο κρίσιμο σημείο η υγρή και η αέρια φάση γίνονται ταυτόσημες, ενώ περαιτέρω αύξηση της πίεσης δεν οδηγεί σε υγροποίηση (ή περαιτέρω αύξηση της θερμοκρασίας δεν οδηγεί σε ατμοποίηση). Τα υπερκρίσιμα ρευστά έχουν τιμές διαχυτότητας και ιξώδους πιο κοντά σε αυτές των αερίων ενώ η πυκνότητα τους είναι συγκρίσιμη με την πυκνότητα των υγρών.

Ένα από τα πιο ευρέως χρησιμοποιούμενα υπερκρίσιμα ρευστά είναι το διοξείδιο του άνθρακα ( $\text{CO}_2$ ). Είναι αρκετά διαδεδομένο επειδή είναι φτηνό, άφλεκτο, δεν είναι τοξικό και έχει χαμηλό κρίσιμο σημείο (73.8 bar και  $31^\circ\text{C}$ ). Στην τεχνολογία πολυμερών κατέχει ξεχωριστή θέση καθώς χρησιμοποιείται τόσο στη φυσική κατεργασία πολυμερών (π.χ. παραγωγή πορωδών υλικών ή νανοσωματιδίων) όσο και στη χημική σύνθεση ως μέσο πολυμερισμού (Cooper 2003, Quirk et al 2004, Tsivintzelis et al 2007).

Η παραγωγή πορωδών υλικών με χρήση υπερκρίσιμου  $\text{CO}_2$  συνήθως γίνεται με την μέθοδο της ταχείας εκτόνωσης. Το πολυμερικό δείγμα τοποθετείται σε δοχείο υψηλής πίεσης και εκτίθεται σε ατμόσφαιρα υπερκρίσιμου  $\text{CO}_2$  για αρκετό χρονικό διάστημα έτσι ώστε να επιτευχθεί ισορροπία (το  $\text{CO}_2$  απορροφάται από το πολυμερές). Στη συνέχεια η πίεση ελαττώνεται απότομα με αποτέλεσμα να προκαλείται υπερκορεσμός που έχει ως συνέπεια την ταχεία εκρόφηση του  $\text{CO}_2$  από το πολυμερές. Με αυτόν τον τρόπο επιτυγχάνεται ο αφρισμός του πολυμερούς (δημιουργία πόρων). Η ρόφηση  $\text{CO}_2$  προκαλεί διόγκωση και πλαστικοποίηση του πολυμερούς δηλαδή το πολυμερές βρίσκεται σε ελαστομερή κατάσταση. Σε αυτήν την κατάσταση δημιουργούνται οι πόροι (σχηματισμός και ανάπτυξη), ενώ κατά τη διάρκεια της εκρόφησης κάποια στιγμή το πολυμερές μεταβαίνει στην υαλώδη κατάσταση, όπου και παγιώνεται η παραγόμενη πορώδης δομή (εικόνα 3.2). Αν ο κορεσμός του πολυμερούς γίνει σε συνθήκες υαλώδους κατάστασης, τότε κατά την εκτόνωση συνήθως δεν λαμβάνονται πόροι. Σε αυτήν την περίπτωση το δείγμα τοποθετείται όσο το δυνατόν πιο γρήγορα σε υψηλή θερμοκρασία οπότε προκαλείται αφρισμός λόγω μεταβολής της θερμοκρασίας. Η παραλλαγή αυτή της μεθόδου ονομάζεται μέθοδος ανύψωσης της θερμοκρασίας.



**Εικόνα 3.2:** Μηχανισμός της μεθόδου αφρισμού πολυμερών με CO<sub>2</sub> (Jacobs 2008).

Η συγκεκριμένη μέθοδος παρουσιάζει πλεονεκτήματα όπως η δυνατότητα ελέγχου του μεγέθους των πόρων ανάλογα με την πίεση και τη θερμοκρασία κορεσμού, η ομοιομορφία στην δομή και η στενή κατανομή στο μέγεθος των πόρων. Επιπλέον δεν χρησιμοποιείται οργανικός διαλύτης οπότε δεν υπάρχουν ίχνη στο τελικό προϊόν και γενικά δεν απαιτείται κάποια επιπλέον διεργασία. Μειονέκτημα της μεθόδου είναι η αδυναμία ελέγχου του πορώδους ανεξάρτητα από το μέγεθος πόρων καθώς για να αυξηθεί το πορώδες πρέπει να ελαττωθεί το μέγεθος των πόρων). Επίσης η μέθοδος αυτή μπορεί να εφαρμοστεί σε άμορφα ή ημικρυσταλλικά πολυμερή που παρουσιάζουν θερμοκρασίας υαλώδους μετάβασης και μπορούν να απορροφήσουν το CO<sub>2</sub>. Τα κρυσταλλικά πολυμερή όπως η χιτίνη, κυτταρίνη, χιτοζάνη δεν απορροφούν CO<sub>2</sub> ούτε παρουσιάζουν κάποια θερμοκρασιακή μεταβολή οπότε η μέθοδος αυτή δεν μπορεί χρησιμοποιηθεί. Τέλος, μειονέκτημα της μεθόδου για εφαρμογές ιστομηχανικής είναι η χαμηλή διασύνδεση μεταξύ των πόρων και η απουσία επιφανειακού πορώδους. Το πρόβλημα αυτό λύνεται εύκολα αν συνδυαστεί

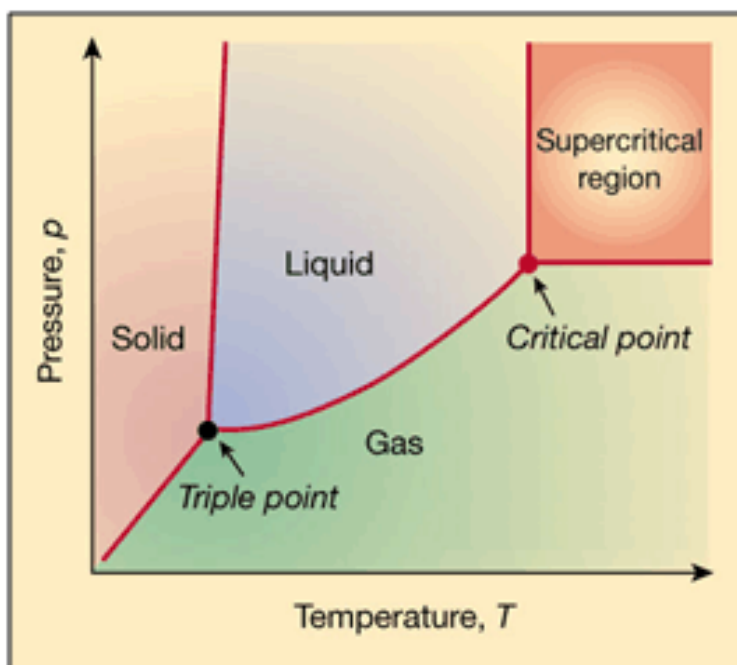
η μέθοδος αυτή με τη μέθοδο της απομάκρυνσης σωματιδίων. Με αυτόν τον τρόπο μπορεί να ελεγχθεί και το μέγεθος των οπών διασύνδεσης και να αυξηθεί το πορώδες. Παρόλα τα μειονεκτήματα, ικρίωματα πολυμερών κατασκευασμένα με αυτήν την τεχνική χρησιμοποιήθηκαν επιτυχώς σε εφαρμογές ιστομηχανικής κυρίως από την ερευνητική ομάδα του Howdle (Barry et al 2004, Quirk et al 2004, Silva et al 2006).

Η απορρόφηση του CO<sub>2</sub> από πολυμερή παρουσιάζει ενδιαφέρον τόσο από κινητική όσο και από θερμοδυναμική σκοπιά. Πειραματικά έχουν μετρηθεί οι συντελεστές διάχυσης του CO<sub>2</sub> σε διάφορα πολυμερή καθώς και η διαλυτότητα, η ταπείνωση της θερμοκρασίας υαλώδους μετάβασης και το ποσοστό διόγκωσης του πολυμερούς (Pantoula et al 2006, Pantoula et al 2007, Aionicesei et al 2008). Επίσης έχει πραγματοποιηθεί η θεωρητική περιγραφή/πρόβλεψη αυτών των φαινομένων (Panayiotou et al 2007). Ένα κενό που υπάρχει στην πειραματική μελέτη της ρόφησης του CO<sub>2</sub> από πολυμερή είναι η ενεργειακή μεταβολή που προκαλείται λόγω της ρόφησης. Τόσο η ενεργειακή μεταβολή όσο και τα υπόλοιπα θερμοδυναμικά και κινητικά μεγέθη που εμπλέκονται στο φαινόμενο της απορρόφησης CO<sub>2</sub> από πολυμερή, εκτός του ακαδημαϊκού ενδιαφέροντος παρουσιάζουν και πρακτική χρησιμότητα (για το βέλτιστο σχεδιασμό διατάξεων και διεργασιών).

### **3.4 Ξήρανση κρίσιμου σημείου (Critical Point Drying)**

Μία τεχνική που εφαρμόζεται σε πηκτές είναι η ξήρανση κρίσιμου σημείου. Η δομή που προκύπτει μπορεί να είναι νανοπορώδης ή ναοϊνώδης. Οι πηκτές αποτελούνται από μόρια που σχηματίζουν τρισδιάστατα πλέγματα. Η δημιουργία του πλέγματος οφείλεται συνήθως στην ανάπτυξη σταυροδεσμών ανάμεσα στα μόρια ή στα συσσωματώματα τους. Οι πόροι του πλέγματος στις πηκτές καταλαμβάνονται από μόρια διαλύτη. Αν γίνει ξήρανση της πηκτής με συνηθισμένο τρόπο, τότε η δομή αυτή καταστρέφεται λόγω της επιφανειακής τάσης του υγρού. Για να αποφευχθεί η κατάρρευση της πηκτής, η ξήρανση πρέπει να γίνει απουσία υγρής κατάστασης. Η ξήρανση κρίσιμου σημείου βασίζεται σε αυτήν την αρχή. Η πηκτή εκτίθεται σε τέτοιες συνθήκες έτσι ώστε ο διαλύτης να βρεθεί σε υπερκρίσιμη φάση (όπου δεν υπάρχει διεπιφάνεια υγρού-αερίου) και στη συνέχεια προκαλείται ελάττωση της

πίεσης (αλλά σε θερμοκρασία υψηλότερη της κρίσιμης έτσι ώστε να μην σχηματιστεί υγρή φάση) και έτσι ο διαλύτης απομακρύνεται ως αέριο (εικόνα 3.3). Εναλλακτικά αν ο διαλύτης παρουσιάζει διαλυτότητα με το  $\text{CO}_2$ , η πηκτή εκτίθεται σε περιβάλλον υγρού  $\text{CO}_2$  έτσι ώστε να αντικατασταθεί ο διαλύτης με  $\text{CO}_2$ . Στη συνέχεια ακολουθείται η ίδια διαδικασία που προαναφέρθηκε. Πλεονέκτημα της χρήσης του  $\text{CO}_2$  είναι ότι δεν απαιτούνται υψηλές πιέσεις και θερμοκρασίες. Η τεχνική αυτή χρησιμοποιείται ευρέως για την παραγωγή αεροπηκτών (Pierre et al 2002). Πολύ πρόσφατα, η ξήρανση κρίσιμου σημείου άρχισε να χρησιμοποιείται και για την παραγωγή ικρωμάτων ιστομηχανικής (Reverchon et al 2008, Liu et al 2009).



**Εικόνα 3.3:** Η βασική αρχή της ξήρανσης κρίσιμου σημείου (Prizant 2009).

Η ξήρανση κρίσιμου σημείου και η λυοφίληση έχουν κοινό χαρακτηριστικό ως διεργασίες την απουσία υγρής φάσης που είναι υπεύθυνη για την κατάρρευση/συρρίκνωση της δομής κατά την απομάκρυνση του διαλύτη. Αξίζει να αναφερθεί στο σημείο αυτό η ομοιότητα που παρουσιάζουν οι πηκτές με τα κύτταρα. Για να καταστεί δυνατή η παρατήρηση κυττάρων (ειδικά με ηλεκτρονικό μικροσκόπιο) τα κύτταρα πρέπει να έχουν διατηρήσει τη φυσική δομή τους καθώς και το σχήμα τους, αλλά να είναι απαλλαγμένα από τα υγρά που περιέχουν. Έτσι, η προετοιμασία κυττάρων για παρατήρηση με ηλεκτρονικό μικροσκόπιο, μεταξύ άλλων

περιλαμβάνει τη δημιουργία σταυροδεσμών με χημικό τρόπο ανάμεσα στις πρωτεΐνες που υπάρχουν στο κυτταρόπλασμα. Το κυτταρόπλασμα που περιέχει σημαντική ποσότητα νερού ανάμεσα σε ενωμένες με σταυροδεσμούς πρωτεΐνες στην ουσία είναι και συμπεριφέρεται όπως μία πολυμερική υδροπηκτή. Αν γίνει η ξήρανση σε ένα απλό φούρνο τα κύτταρα συρρικνώνονται και καταστρέφεται το μακροσκοπικό τους σχήμα. Για την αποφυγή αυτού τα κύτταρα υποβάλλονται σε λυοφίληση, οπότε και το νερό απομακρύνεται ως αέριο απευθείας από την στερεά κατάσταση με αποτέλεσμα την διατήρηση της αρχικής δομής και σχήματος. Εναλλακτικά τα κύτταρα εμβαπτίζονται επανειλημμένα σε αλκοόλη ή ακετόνη έτσι ώστε να αντικατασταθεί το νερό που περιέχουν με τον αντίστοιχο διαλύτη και στη συνέχεια υποβάλλονται σε ξήρανση κρίσιμου σημείου με χρήση CO<sub>2</sub>.

### 3.5 Ηλεκτροϊνοποίηση (Electrospinning)

Η ηλεκτροϊνοποίηση (HI) είναι μία αρκετά παλιά τεχνική που χρησιμοποιείται για τη δημιουργία ινών από πολυμερή. Η βασική αρχή της μεθόδου είναι σχετικά απλή. Διάλυμα πολυμερούς ρέει μέσω μιας ηλεκτρικά αγωγίμης βελόνας (ή σωλήνωσης) με τη χρήση αντλίας. Συνεχής τάση (της τάξης των 5-25 kV) εφαρμόζεται ανάμεσα στη βελόνα και σε ένα γειωμένο στόχο (χώρο συλλογής). Το διάλυμα του πολυμερούς ρέει από την άκρη της βελόνας με τη μορφή σταγόνας (που τείνει να πάρει σφαιρικό σχήμα λόγω της επιφανειακής τάσης). Η ύπαρξη ηλεκτρικού πεδίου προκαλεί την παραμόρφωση της σταγόνας (που παίρνει κωνικό σχήμα), εφόσον το πεδίο είναι αρκετά υψηλό έτσι ώστε οι ηλεκτρικές δυνάμεις να υπερσχύσουν έναντι της επιφανειακής τάσης του διαλύματος. Ο κώνος που σχηματίζεται ονομάζεται συχνά κώνος Taylor προς τιμήν του ανθρώπου που μελέτησε αυτό το φαινόμενο για πρώτη φορά. Από την άκρη του κώνου Taylor γίνεται η παραγωγή ινών με ταυτόχρονη εξάτμιση του διαλύτη.

Οι παράγοντες που επηρεάζουν τη διάμετρο και τη μορφολογία των ινών μπορούν να διακριθούν σε δύο υποκατηγορίες ανάλογα με το αν έχουν να κάνουν με τη διεργασία ή με το διάλυμα. Έτσι, παράμετροι της διεργασίας όπως η εφαρμοζόμενη τάση, η απόσταση βελόνας και χώρου συλλογής, η ροή του διαλύματος, η διάμετρος της βελόνας είναι μείζονος σημασίας. Συνήθως με αύξηση της τάσης, μείωση της απόστασης, μείωση της ροής και μείωση της συγκέντρωσης μειώνεται η διάμετρος



της ίνας. Η συγκέντρωση του διαλύματος έχει μεγάλη συμβολή στη μορφολογία και τη διάμετρο των ινών. Η συγκέντρωση του διαλύματος έχει σημαντική επίδραση σε διάφορες ιδιότητες του διαλύματος όπως το ιξώδες, η επιφανειακή τάση, η πτητικότητα και η αγωγιμότητα που εμπλέκονται άμεσα στο φυσικοχημικό μηχανισμό παραγωγής των ινών.

Όταν χρησιμοποιούνται αραιά διαλύματα συνήθως δεν είναι δυνατή η παραγωγή ινών. Σε αυτήν την περίπτωση παράγονται σωματίδια πολυμερούς και αυτό αποτελεί μία ξεχωριστή τεχνική που ονομάζεται ηλεκτροψέκασμα (electrospraying) (Kessick et al 2004). Επίσης, ανάλογα με τις συνθήκες, η παραγωγή ινών μπορεί να είναι προβληματική. Για παράδειγμα, σε πολύ υψηλές τάσεις το διάλυμα απομακρύνεται βίαια από την άκρη της βελόνας (χωρίς να σχηματιστεί ο κώνος Taylor) με αποτέλεσμα να σχηματίζονται συσσωματώματα. Ακόμα είναι δυνατή η παραγωγή ινών με μεγάλη αυξομείωση κατά μήκος της διαμέτρου. Στην πραγματικότητα παράγονται σωματίδια και ίνες μαζί (beads on string).

Τα τελευταία έτη επινοήθηκαν διάφορες παραλλαγές της ΗΙ. Μία από αυτές τις παραλλαγές είναι η ΗΙ τήγματος (melt electrospinning). Σε αυτήν την τεχνική το πολυμερές δεν διαλύεται σε κάποιον διαλύτη αλλά κατεργάζεται σε υψηλές θερμοκρασίες έτσι ώστε να λιώσει και να ρέει συνήθως με τη χρήση εκβολέα (extruder). Πλεονέκτημα της τεχνικής είναι η αποφυγή χρήσης οργανικών διαλυτών (Lyons et al 2005).

Σε μια άλλη παραλλαγή της τεχνικής, το διάλυμα ρέει σε δύο διαφορετικές βελόνες. Η τάση εφαρμόζεται ανάμεσα στις δύο βελόνες. Αποτέλεσμα είναι η αλληλεξουδετέρωση του φορτίου των εγχυμάτων και η ευθυγράμμιση των παραγόμενων ινών (Pan et al 2006).

Άλλες παραλλαγές περιλαμβάνουν τη χρήση υπερκρίσιμου CO<sub>2</sub> (Levit et al 2004 , Shen et al 2006), τη χρήση αερίων για ελάττωση του ιξώδους του διαλύματος (Lin et al 2008) και τη χρήση εναλλασσόμενου ρεύματος (Kessick et al 2004).

Η ΗΙ έχει χρησιμοποιηθεί ευρέως για την παρασκευή ικριωμάτων ιστομηχανικής κυρίως για ανάπλαση μαλακών ιστών και κυρίως δέρματος (Agarwal et al 2008). Έτσι, συχνά τέτοια ικριώματα χρησιμοποιούνται για καλλιέργεια ινοβλαστών (Dalton et al 2006, Mac Neil 2008). Επίσης έχουν γίνει επιτυχείς προσπάθειες εγκλεισμού ουσιών σε ναοϊνώδη ικριώματα για εφαρμογές ελεγχόμενης απελευθέρωσης (Luong-Vav et al 2006, Chen et al 2008).

### 3.6 Διφωτονική απορρόφηση

Η διφωτονική απορρόφηση είναι ένα μη γραμμικό-φαινόμενο κατά το οποίο δύο φωτόνια απορροφούνται ταυτόχρονα σε ένα υλικό μέσο. Τις τρεις τελευταίες δεκαετίες το συγκεκριμένο φαινόμενο έχει προσελκύσει ιδιαίτερα το ενδιαφέρον των επιστημόνων με στόχο την ανακάλυψη νέων αποδοτικότερων εφαρμογών λόγω των ιδιαίτερων χαρακτηριστικών του. Η διφωτονική μικροσκοπία, ο διφωτονικός πολυμερισμός και η τρισδιάστατη αποθήκευση δεδομένων είναι μερικές από τις σημαντικότερες εφαρμογές που εκμεταλλεύονται τα πλεονεκτήματα της διφωτονικής απορρόφησης. Την τελευταία δεκαετία η έρευνα επικεντρώνεται στη θεωρητική και πειραματική μελέτη της διφωτονικής απορρόφησης οργανικών ενώσεων με σκοπό την διασύνδεση των χαρακτηριστικών της δομής των μορίων με την εύρεση στρατηγικών σύνθεσης οργανικών ενώσεων με ιδιαίτερα χαρακτηριστικά.

Όσον αφορά την τεχνική, η ισχυρή μονοχρωματική ακτινοβολία ενός laser μπορεί να προκαλέσει αλλαγή των οπτικών ιδιοτήτων ενός υλικού. Η μη γραμμική απορρόφηση αναφέρεται στην αλλαγή της διαπερατότητας ενός υλικού ως συνάρτηση της έντασης ή της ροής του προσπίπτοντος φωτός. Σε υψηλές εντάσεις καθίσταται δυνατή η διέγερση του υλικού με ταυτόχρονη απορρόφηση περισσότερων του ενός φωτονίων. Η πρώτη θεωρητική προσέγγιση του φαινομένου έγινε το 1931 από την Maria Göppert-Mayer η οποία χρησιμοποιώντας δεύτερης τάξης κβαντική θεωρία διαταραχών υπολόγισε τη πιθανότητα διφωτονικής μετάβασης ενός συστήματος (Göppert 1931), η οποία είναι και η ισχυρότερη εκ των πολυφωτονικών μεταβάσεων.

Η πρώτη πειραματική επιβεβαίωση του φαινομένου έγινε μετά από 30 χρόνια, το 1961, από τους Kaiser και Garret, οι οποίοι χρησιμοποιώντας laser Ρουβιδίου στα 694,3nm και εστιάζοντας τη δέσμη σε ένα κρύσταλλο  $\text{CaF}_2:\text{Eu}^{2+}$  παρατήρησαν μπλε φθορισμό η ένταση του οποίου ήταν ανάλογη του τετραγώνου της έντασης του προσπίπτοντος φωτός (Kaiser 1961). Έκτοτε η διφωτονική απορρόφηση, αλλά και η μη γραμμική απορρόφηση ανώτερης τάξης, παρατηρήθηκε σε μεγάλο πλήθος υλικών και για διάφορα μήκη κύματος, καθώς η συνεχής ανάπτυξη της τεχνολογίας των laser προσέφερε περισσότερες, ισχυρότερες και καλύτερης ποιότητας δέσμες φωτός. Μέχρι τα τέλη της δεκαετίας του 1980 οι περισσότερες μελέτες επικεντρώθηκαν στη διφωτονική φασματοσκοπία απλών ατομικών ή μοριακών αερίων, οργανικών

διαλυτών και ενώσεων, καθώς και σε ανόργανους κρυστάλλους και ημιαγωγούς. Όλες αυτές οι μελέτες προσέφεραν νέες πληροφορίες και γνώσεις για ηλεκτρονιακές, δονητικές και περιστροφικές καταστάσεις των εξεταζόμενων ατομικών και μοριακών καταστάσεων.

Από τη δεκαετία του 1990 η έρευνα στράφηκε στην ανάπτυξη νέων, υψηλής απόδοσης, διφωτονικών υλικών και στη διερεύνηση των εφαρμογών τους. Την τελευταία δεκαετία υπήρξε μια ραγδαία αύξηση των επιστημονικών εργασιών που σχετίζονται με την πολυφωτονική απορρόφηση (He 2008). Στις εργασίες αυτές μελετούνται κυρίως οργανικές ενώσεις οι οποίες έχουν μικρούς χρόνους απόκρισης και ευκολία στη χρήση, σύνθεση και τροποποίηση των φυσικών και χημικών ιδιοτήτων τους συγκρινόμενες με τις ανόργανες ενώσεις. Σε ορισμένες εφαρμογές η μη γραμμική απορρόφηση είναι ένα ανεπιθύμητο φαινόμενο και πρέπει να μειωθεί η αρνητική επίδρασή του, όπως για παράδειγμα στους οπτικούς διακόπτες που χρησιμοποιούνται στις τηλεπικοινωνίες και στους οπτικούς υπολογιστές (Isu 2006). Παράλληλα υπάρχουν πολλές νέες τεχνικές όπως ο διφωτονικός πολυμερισμός (Maguo 1997), η πολυφωτονική μικροσκοπία (Zipfel 2003) και η τρισδιάστατη αποθήκευση πληροφοριών (Walker 2008) οι οποίες βασίζονται στη μη γραμμική απορρόφηση του φωτός και στα πλεονεκτήματά της.

### 3.6.1 Γραμμική απορρόφηση

Η παρουσία ηλεκτρικού πεδίου  $\vec{E}$  σε ένα διηλεκτρικό μέσο επάγει την γένεση πόλωσης  $\vec{P}$ . Για χαμηλές εντάσεις ηλεκτρικού πεδίου η πόλωση είναι ευθέως ανάλογη του πεδίου

$$\vec{P} = \epsilon_0 \chi \vec{E} \quad (3.1)$$

όπου  $\chi$  είναι η γραμμική ηλεκτρική επιδεκτικότητα η οποία εξαρτάται από τη συχνότητα  $\omega$  του ηλεκτρικού πεδίου (Loudon 1983). Η εξάρτηση αυτή διαμορφώνεται από τις ενεργειακές στάθμες και τις κυματοσυναρτήσεις των ατόμων που αποτελούν το διηλεκτρικό μέσο. Οι λύσεις των εξισώσεων του Maxwell είναι κυματικής μορφής με τη σχέση μεταξύ της συχνότητας και του κυματάριθμου να δίνεται από τη σχέση

$$(kc/\omega)^2 = 1 + \chi \quad (3.2)$$

όπου η ποσότητα  $(1 + \chi)$  είναι γνωστή ως σχετική διηλεκτρική σταθερά η οποία είναι ανεξάρτητη από την ένταση του ηλεκτρικού πεδίου, εξαρτάται όμως από τη συχνότητά του. Η επιδεκτικότητα είναι γενικά μιγαδικό μέγεθος και μπορεί να γραφεί ως

$$\chi = \chi' + i\chi'' \quad (3.3)$$

και ο μιγαδικός δείκτης διάθλασης δίνεται από την σχέση

$$n + ik \equiv \tilde{n} = \sqrt{1 + \chi} \quad (3.4)$$

όπου  $n$  και  $k$  είναι ο δείκτης διάθλασης και ο συντελεστής απόσβεσης αντίστοιχα.

Από τις (3.2), (3.3) και (3.4) με εξίσωση των πραγματικών και φανταστικών μερών προκύπτει ότι

$$n^2 - k^2 = 1 + \chi' \quad (3.5)$$

$$2nk = \chi'' \quad (3.6)$$

Από τις παραπάνω σχέσεις μπορεί να υπολογιστεί η εξάρτηση από τη συχνότητα των  $n$  και  $k$  γνωρίζοντας την εξάρτηση της γραμμικής επιδεκτικότητας από τη συχνότητα. Θεωρώντας τα ηλεκτρόνια που είναι προσκολλημένα στα σταθερά μόρια του διηλεκτρικού μέσω συνδεδετικών δυνάμεων ως αρμονικούς ταλαντωτές μπορεί να προκύψει μια σχέση της επιδεκτικότητας με τη συχνότητα (Griffiths 1999). Η εξίσωση κίνησης του αρμονικού ταλαντωτή

$$\frac{d^2x}{dt^2} + \Gamma \frac{dx}{dt} + \omega_0^2 x = \frac{-e}{m} E_0 e^{-i\omega t} \quad (3.7)$$

έχει ως λύση

$$x(t) = \frac{-e}{m} \frac{1}{(\omega_0^2 - \omega^2) - i\Gamma\omega} E_0 e^{-i\omega t} \quad (3.8)$$

όπου  $\omega_0$  είναι η φυσική συχνότητα ταλάντωσης και  $\Gamma$  η σταθερά απόσβεσης του ταλαντωτή.

Η διπολική ροπή που προκύπτει από τη μετατόπιση αυτή του ηλεκτρονίου είναι

$$p(t) = -ex(t) = \frac{e^2}{m} \frac{1}{(\omega_0^2 - \omega^2) - i\Gamma\omega} E_0 e^{-i\omega t} \quad (3.9)$$

Εν γένει, ηλεκτρόνια που βρίσκονται σε διαφορετικές θέσεις στο μόριο ταλαντώνονται με διαφορετικές φυσικές συχνότητες και σταθερές απόσβεσης. Αν υπάρχουν  $f_j$  ηλεκτρόνια με φυσική συχνότητα  $\omega_j$  και απόσβεση  $\Gamma_j$  και υπάρχουν  $N$  μόρια ανά μονάδα όγκου τότε η πόλωση δίνεται από τη σχέση

$$P(t) = Np(t) = \frac{Ne^2}{m} \left( \sum_j \frac{f_j}{(\omega_j^2 - \omega^2) - i\Gamma_j\omega} \right) E_0 e^{-i\omega t} \quad (3.10)$$

Από τη σύγκριση αυτής με την (3.1) προκύπτει

$$\chi = \frac{Ne^2}{\epsilon_0 m} \left( \sum_j \frac{f_j}{(\omega_j^2 - \omega^2) - i\Gamma_j\omega} \right) \quad (3.11)$$

και από τη σχέση (3.6)

$$\kappa = \frac{Ne^2}{2n\epsilon_0 m} \text{Im} \left\{ \sum_j \frac{f_j}{(\omega_j^2 - \omega^2) - i\Gamma_j\omega} \right\} = \frac{Ne^2}{2n\epsilon_0 m} \sum_j \frac{f_j \Gamma_j}{(\omega_j^2 - \omega^2) - \Gamma_j^2 \omega^2} \quad (3.12)$$

από την οποία φαίνεται ότι στο συντονισμό, όπου  $\omega = \omega_j$ , ο συντελεστής απορρόφησης μεγιστοποιείται.

Ένα ηλεκτρομαγνητικό κύμα μέσα στο γραμμικό υλικό χρησιμοποιώντας τη σχέση (3.4) γράφεται ως

$$E(r,t) = E_0 e^{i(kz - \omega t)} = E_0 e^{\left\{ i \left( \frac{\omega}{c} n + i \frac{\omega}{c} \kappa \right) z - i\omega t \right\}} = E_0 e^{\left\{ i\omega \left( \frac{nz}{c} - t \right) - \frac{\omega \kappa z}{c} \right\}} = E_0 e^{-\frac{\omega \kappa z}{c}} e^{i\omega \left( \frac{nz}{c} - t \right)} \quad (3.13)$$

όπου το πρώτο εκθετικό είναι η απόσβεση του ηλεκτρικού πεδίου κατά τη διάδοσή του. Η ένταση του ηλεκτρομαγνητικού κύματος δίνεται τότε από τη σχέση

$$\bar{I} = \frac{1}{2} \epsilon_0 c n |E(r,t)|^2 = \frac{1}{2} \epsilon_0 c n E(r,t) E^*(r,t) = \frac{1}{2} \epsilon_0 c n E_0^2 e^{-2\frac{\omega \kappa}{c} z} = I_0 e^{-\alpha z} \quad (3.14)$$

όπου

$$\alpha = \frac{2\omega \kappa}{c} \quad (3.15)$$

είναι ο συντελεστής απορρόφησης.

### 3.6.2 Μη γραμμική επιδεκτικότητα

Η περιγραφή της γραμμικής διάδοσης των ηλεκτρομαγνητικών κυμάτων σε ένα μέσο από την εξάρτηση από την συχνότητα της γραμμικής επιδεκτικότητας του μέσου. Με όμοιο τρόπο η διάδοση ηλεκτρομαγνητικών κυμάτων σε μέσο όπου υφίστανται μη γραμμικές διαδικασίες περιγράφεται με όρους της μη γραμμικής επιδεκτικότητας του μέσου. Για τον υπολογισμό της μη γραμμικής επιδεκτικότητας διατηρούνται οι όροι υψηλότερης τάξης οι οποίοι παραλείπονται κατά τον υπολογισμό της γραμμικής επιδεκτικότητας. Έτσι έχοντας ως αφετηρία τη γενική έκφραση της πόλωσης κατά την αλληλεπίδραση υλικού-ακτινοβολίας

$$\tilde{P}(t) = \varepsilon_0 \chi^{(1)} \tilde{E}(t) + \varepsilon_0 \chi^{(2)} \tilde{E}^2(t) + \varepsilon_0 \chi^{(3)} \tilde{E}^3(t) + \dots \quad (3.16)$$

υπολογίζονται οι μη γραμμικές οπτικές επιδεκτικότητες  $\chi^{(2)}$ ,  $\chi^{(3)}$ ... χρησιμοποιώντας κάποιο πολύπλοκο ατομικό ή μοριακό μοντέλο πολλών ενεργειακών επιπέδων. Περιορίζοντας τη θεωρητική ανάλυση σε κεντροσυμμετρικά υλικά, όπως αυτά που μελετήθηκαν στην παρούσα εργασία, η παραπάνω έκφραση της πόλωσης περιορίζεται στις περιττές δυνάμεις της έντασης του πεδίου. Τα κεντροσυμμετρικά υλικά έχουν κέντρο συμμετρίας αντιστροφής και η πόλωση σε αυτά έχει ίδιο μέτρο και αντίθετη φορά όταν αντιστρέφεται η φορά του πεδίου. Αν στο δεξί μέρος της σχέσης (3.16) διατηρηθούν οι άρτιες δυνάμεις του πεδίου τότε η αλλαγή πρόσημου του πεδίου δεν θα έδινε ίσου μέτρου και αντίθετου πρόσημου πόλωση. Έτσι στα κεντροσυμμετρικά μέσα οι άρτιας τάξης επιδεκτικότητες έχουν μηδενική τιμή και η γενική έκφραση της πόλωσης απλοποιείται στη μορφή

$$\tilde{P}(t) = \varepsilon_0 \chi^{(1)} \tilde{E}(t) + \varepsilon_0 \chi^{(3)} \tilde{E}^3(t) + \varepsilon_0 \chi^{(5)} \tilde{E}^5(t) + \dots \quad (3.17)$$

Καθώς αυξάνει η τάξη της μη γραμμικής επιδεκτικότητας η τιμή της μειώνεται σύμφωνα με την προσεγγιστική σχέση

$$\chi^{(n+2)} / \chi^{(n)} \approx E_0^{-2} \quad (3.18)$$

όπου το ηλεκτρικό πεδίο  $E_0^{-2}$  είναι χαρακτηριστικό του μη γραμμικού μέσου και είναι της τάξης του  $10^{11} \text{Vm}^{-1}$ . Η σειρά της σχέσης (3.17) συγκλίνει για τιμές του E μικρότερες του  $E_0$  (ισχύει για τις πλείστες των δεσμών φωτός που υπάρχουν σήμερα) και μπορεί να τερματιστεί στον τρίτης τάξης όρο ο οποίος είναι ήδη αρκετά μικρότερος του γραμμικού όρου.

Η εξάρτηση του γραμμικού όρου από τη συχνότητα είναι απλή ένα πεδίο  $E$  συχνότητας  $\omega$  προκαλεί μια ταλαντούμενη πόλωση με συχνότητα ταλάντωσης  $\omega$  και μέγεθος ανάλογο του  $\chi^{(1)}(\omega)$ . Αν το πεδίο έχει συνιστώσες διαφορετικών συχνοτήτων τότε η συνεισφορά τους στους γραμμικούς όρους της πόλωσης είναι απλώς αθροιστική. Η συμπεριφορά των μη γραμμικών όρων όμως είναι πιο πολύπλοκη. Για παράδειγμα για τον τρίτης τάξης όρο, αν το ηλεκτρικό πεδίο έχει τρεις διαφορετικές συνιστώσες ως προς τη συχνότητα, π.χ.

$$\tilde{E}(t) = E_1(e^{-i\omega_1 t} + e^{i\omega_1 t}) + E_2(e^{-i\omega_2 t} + e^{i\omega_2 t}) + E_3(e^{-i\omega_3 t} + e^{i\omega_3 t}) \quad (3.19)$$

τότε το  $\tilde{E}^3$  έχει 22 συνιστώσες διαφορετικών συχνοτήτων προερχόμενες από τον συνδυασμό αθροίσματος και διαφοράς των τριών συνιστωσών του  $\tilde{E}$ , οι οποίες είναι

$\omega_1 + \omega_2 + \omega_3$	$\omega_1 + \omega_2 - \omega_3$	$\omega_1 - \omega_2 + \omega_3$	$-\omega_1 + \omega_2 + \omega_3$
$2\omega_1 + \omega_2$	$2\omega_1 + \omega_3$	$3\omega_1$	
$2\omega_2 + \omega_1$	$2\omega_2 + \omega_3$	$3\omega_2$	
$2\omega_3 + \omega_1$	$2\omega_3 + \omega_2$	$3\omega_3$	
$2\omega_1 - \omega_2$	$2\omega_1 - \omega_3$	$\omega_1$	
$2\omega_2 - \omega_1$	$2\omega_2 - \omega_3$	$\omega_2$	
$2\omega_3 - \omega_1$	$2\omega_3 - \omega_2$	$\omega_3$	

Σύμφωνα με την εξίσωση (3.17) το πεδίο  $\tilde{E}(t)$  προκαλεί συνιστώσες πόλωσης σε όλες αυτές τις συχνότητες. Η τιμή της μη γραμμικής επιδεκτικότητας  $\chi^{(3)}$  εξαρτάται από τις συνιστώσες συχνότητας ηλεκτρικού πεδίου στις οποίες επιδρά. Επιπλέον, μέσω των στοιχείων του πίνακα ηλεκτρικού δίπολου, εξαρτάται από τα διανύσματα πόλωσης των τριών συνιστωσών πεδίου στην εξίσωση (3.19) και από τη κατεύθυνση της επαγόμενης πόλωσης  $P$ . Επομένως, εν γένει, η  $\chi^{(3)}$  είναι συνάρτηση τριών συχνοτήτων και τεσσάρων χωρικών κατευθύνσεων. Όπως θα δειχθεί παρακάτω η μη γραμμική επιδεκτικότητα τρίτης τάξης σχετίζεται με την διφωτονική απορρόφηση. Όμοια, η τριφωτονική απορρόφηση σχετίζεται με την πέμπτης τάξης επιδεκτικότητα.

### 3.6.3 Μη γραμμική-διφωτονική απορρόφηση

Στη διφωτονική απορρόφηση από δύο δέσμες φωτός το ολικό πεδίο  $\vec{E}$  είναι άθροισμα των  $\vec{E}_1$  και  $\vec{E}_2$  συχνότητας  $\omega_1$  και  $\omega_2$  αντίστοιχα. Από το γραμμικό και τρίτης τάξης όρο της εξίσωσης (3.17) προκύπτει

$$\vec{P} = \varepsilon_0 \chi^{(1)}(\vec{E}_1 + \vec{E}_2) + \varepsilon_0 \chi^{(3)}(\vec{E}_1 + \vec{E}_2)^3 \quad (3.20)$$

Παρακάτω συμβολίζονται με  $E^+$  και  $P^+$  οι συνιστώσες που έχουν χρονική εξάρτηση  $\exp(-i\omega t)$  και με  $E^-$  και  $P^-$  αυτές που έχουν χρονική εξάρτηση  $\exp(i\omega t)$ . Οι όροι στις δύο πλευρές της εξίσωσης (3.20) με την ίδια χρονική εξάρτηση μπορούν να εξισωθούν χωριστά. Το τμήμα το οποίο έχει χρονική εξάρτηση  $\exp(-i\omega_1 t)$  δίνει

$$\begin{aligned} P^+(\omega_1) &= \\ &= \varepsilon_0 \{ \chi^{(1)}(\omega_1) E_1^+ + 6\chi^{(3)}(-\omega_2, \omega_2, \omega_1) E_2^- E_2^+ E_1^+ + 3\chi^{(3)}(-\omega_1, \omega_1, \omega_1) E_1^- E_1^+ E_1^+ \} \end{aligned} \quad (3.21)$$

όπου οι συχνότητες στις οποίες αναφέρεται η κάθε επιδεκτικότητα γράφονται τώρα αναλυτικά. Όμοια το τμήμα  $\exp(-i\omega_2 t)$  δίνει

$$\begin{aligned} P^+(\omega_2) &= \\ &= \varepsilon_0 \{ \chi^{(1)}(\omega_2) E_2^+ + 6\chi^{(3)}(-\omega_1, \omega_1, \omega_2) E_1^- E_1^+ E_2^+ + 3\chi^{(3)}(-\omega_2, \omega_2, \omega_2) E_2^- E_2^+ E_2^+ \} \end{aligned} \quad (3.22)$$

Για τον υπολογισμό της διφωτονικής απορρόφησης στη συχνότητα  $\omega_2$  θεωρείται ότι η δέσμη 1 έχει πολύ μεγαλύτερη ένταση από τη δέσμη 2 και δεν υπάρχει απορρόφηση στις συχνότητες  $\omega_1$ ,  $\omega_2$ ,  $2\omega_1$ ,  $2\omega_2$ , αλλά μόνο διφωτονική απορρόφηση στη συχνότητα  $\omega_1 + \omega_2$ . Η μέση, χρονικά, ένταση  $\bar{I}_{10}$  της δέσμης 1 αλλάζει μόνο κατά ένα μικρό ποσοστό λόγω της διφωτονικής απορρόφησης και μπορεί να θεωρηθεί αμετάβλητη. Επιπλέον ο τελευταίος όρος της εξίσωσης (3.22) είναι πολύ μικρότερος του μεσαίου όρου και η εξίσωση γράφεται προσεγγιστικά ως

$$P^+(\omega_2) = \varepsilon_0 \left\{ \chi^{(1)}(\omega_2) + \frac{3}{\varepsilon_0 c n_{\omega_1}} \chi^{(3)}(-\omega_1, \omega_1, \omega_2) \bar{I}_{10} \right\} E_2^+ \quad (3.23)$$

όπου η ένταση του πεδίου δίνεται από τη σχέση

$$\bar{I} = 2\varepsilon_0 c n E^- E^+ \quad (3.24)$$



Ο δεύτερος όρος στην αγκύλη έχει τη μορφή ενός εξαρτώμενου από την ένταση όρου, προστιθέμενο στη γραμμική επιδεκτικότητα στη συχνότητα  $\omega_2$ . Η παραπάνω σχέση έχει τη μορφή της (3.1)

$$P = \varepsilon_0 \tilde{\chi} E \quad (3.25)$$

της γραμμικής αλληλεπίδρασης ακτινοβολίας-ύλης. Η σχέση που συνδέει επομένως τη συχνότητα με τον κυματάριθμο είναι όμοια με την (3.2)

$$(kc/\omega)^2 = 1 + \tilde{\chi} \quad (3.26)$$

και ο μιγαδικός δείκτης διάθλασης όμοια με την (3.4)

$$n + ik = kc/\omega \quad (3.27)$$

όπου  $n$  είναι ο δείκτης διάθλασης και  $k$  είναι ο συντελεστής απόσβεσης, αντίστοιχα.

Η επιδεκτικότητα είναι γενικώς μιγαδικός αριθμός και μπορεί να γραφεί ως

$$\tilde{\chi} = \tilde{\chi}' + i\tilde{\chi}''$$

(3.28)

Με

$$\tilde{\chi}' = \text{Re}\{\chi^{(1)}(\omega_2)\} + \frac{3}{\varepsilon_0 c n_{\omega_1}} \overline{I_{10}} \text{Re}\{\chi^{(3)}(-\omega_1, \omega_1, \omega_2)\} \quad (3.29)$$

$$\begin{aligned} \tilde{\chi}'' &= \text{Im}\{\chi^{(1)}(\omega_2)\} + \frac{3}{\varepsilon_0 c n_{\omega_1}} \overline{I_{10}} \text{Im}\{\chi^{(3)}(-\omega_1, \omega_1, \omega_2)\} = \\ &= \frac{3}{\varepsilon_0 c n_{\omega_1}} \overline{I_{10}} \text{Im}\{\chi^{(3)}(-\omega_1, \omega_1, \omega_2)\} \end{aligned} \quad (3.30)$$

εφόσον δεν υπάρχει απορρόφηση στη συχνότητα  $\omega_2$ . Από τις σχέσεις (3.26), (3.27) και (3.28) έχουμε

$$(n + ik)^2 = 1 + \tilde{\chi}' + i\tilde{\chi}'' \Rightarrow n^2 - \kappa^2 + i2n\kappa = 1 + \tilde{\chi}' + i\tilde{\chi}'' \quad (3.31)$$

και επομένως

$$n^2 - \kappa^2 = 1 + \tilde{\chi}' \quad (3.32)$$

$$2n\kappa = \tilde{\chi}'' \quad (3.33)$$

Ο συντελεστής απορρόφησης δίνεται ομοίως από τη σχέση (3.15) και επομένως αντικαθιστώντας από τη σχέση (3.33) και τη σχέση (3.30) προκύπτει ότι ο συντελεστής απορρόφησης της δέσμης 2, συχνότητας  $\omega_2$ , είναι

$$\alpha_2^{(2)} = \frac{2\kappa_2 \omega_2}{c} = \frac{\omega_2}{n_2 c} \tilde{\chi}'' = \frac{3\omega_2}{\varepsilon_0 c^2 n_1 n_2} \overline{I_{10}} \text{Im}\{\chi^{(3)}(-\omega_1, \omega_1, \omega_2)\} \quad (3.34)$$

ο οποίος εξαρτάται από την ένταση της δέσμης 1. Η μέση, χρονικά, ένταση της δέσμης 2 συχνότητας  $\omega_2$  μειώνεται εκθετικά με την απόσταση  $z$  σύμφωνα με τη σχέση

$$I_2 = \overline{I_{20}} e^{-\alpha_2^{(2)} z} \quad (3.35)$$

και επομένως η εξασθένιση της δέσμης 2 εξαρτάται, μέσω του  $\alpha^{(2)}$ , από την ένταση της δέσμης 1.

Στην περίπτωση διφωτονικής απορρόφησης μίας δέσμης φωτός συχνότητας  $\omega_1$  η σχέση (3.21) περιορίζεται στην

$$P^+(\omega) = \varepsilon_0 \{ \chi^{(1)}(\omega) E^+ + 3\chi^{(3)}(-\omega, \omega, \omega) E^- E^+ E^+ \} \quad (3.36)$$

και ο συντελεστής απορρόφησης προκύπτει ότι είναι

$$\alpha^{(2)} = \frac{3\omega}{2\varepsilon_0 c^2 n_\omega^2} \bar{I}_1 \operatorname{Im}\{\chi^{(3)}(-\omega, \omega, \omega)\} \quad (3.37)$$

### 3.7 Διφωτονικός πολυμερισμός

Ο διφωτονικός πολυμερισμός αποτελεί μία από τις κυριότερες εφαρμογές της διφωτονικής απορρόφησης. Η ιδιότητα της διφωτονικής απορρόφησης να περιορίζει την δράση της στο σημείο της εστίας φωτοβόλησης επέτρεψε τον περιορισμό της επέκτασης του πολυμερισμού στο παρακαείμενο υλικό. Ως αποτέλεσμα ο πολυμερισμένος όγκος που δημιουργείται μετά από κάθε ακτινοβόληση έχει διαστάσεις της τάξεως των νανομέτρων με αποτέλεσμα να καθίσταται δυνατή η κατασκευή τρισδιάστατων νανοϊκρωμάτων.

#### 3.7.1 Φωτοπολυμερισμός με την χρήση φωτοεκκινήτων

Κατά την διαδικασία του φωτοπολυμερισμού το φως, το οποίο χρησιμοποιείται ως πηγή ενέργειας, προκαλεί τον πολυμερισμό μικρών, ακόρεστων, υγρής κατάστασης μορίων σε στερεά μακρομόρια (Sun 2004). Η συγκεκριμένη διαδικασία μπορεί να προκληθεί με πολλά είδη ακτινοβολιών όπως ακτίνες X, ακτίνες γ, μικροκύματα, δέσμες ιόντων ή ηλεκτρονίων. Παρόλα αυτά ο φωτοπολυμερισμός αναφέρεται σε ακτινοβολία στην υπεριώδη, ορατή και υπέρυθη φασματική περιοχή. Το αρχικά υγρό υλικό που χρησιμοποιείται στον πολυμερισμό αποτελείται από μονομερή ή ολιγομερή.

Με την ακτινοβόληση τα μόρια αυτά μπορούν να στερεοποιηθούν με δύο τρόπους: τον αλυσωτό ή τον βηματικό πολυμερισμό. Στον αλυσωτό πολυμερισμό πραγματοποιούνται αλυσιδωτές συνδέσεις μονομερών/ολιγομερών στο μόριο

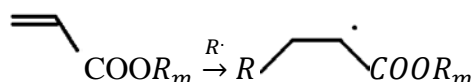
οδηγώντας στο μακρομόριο, ενώ στο βηματικό πραγματοποιούνται μεμονωμένες συνδέσεις μεταξύ δύο μορίων. Η σημαντικότερη διαφορά στα δύο είδη αντιδράσεων αφορά την κβαντική απόδοση η οποία ορίζεται ως το πηλίκο του αριθμού των πολυμερισμένων μονάδων μονομερούς προς τον αριθμό των φωτονίων που απατούνται για να προκαλέσουν αυτόν τον πολυμερισμό.

Στην περίπτωση του βηματικού πολυμερισμού η προσθήκη κάθε μονάδος μονομερούς ή ολιγομερούς απαιτεί την απορρόφηση ενός φωτονίου οδηγώντας σε τιμή κβαντικής απόδοσης μικρότερη της μονάδας. Αντίθετα στον αλυσωτό πολυμερισμό η κβαντική απόδοση μπορεί να έχει τιμή μερικές χιλιάδες καθώς ένα φωτόνιο μπορεί να προκαλέσει αλυσιδωτές αντιδράσεις και σύνδεση πολλών μονάδων μονομερούς ή ολιγομερούς στο μακρομόριο. Παρακάτω περιοριζόμαστε στον αλυσωτό φωτοπολυμερισμό. Για την πραγματοποίηση του φωτοπολυμερισμού εκτός από το μονομερές ή ολιγομερές συνήθως απαιτείται η προσθήκη φωτοεκκινητή για εκκίνηση ή την αύξηση της κβαντικής απόδοσης του πολυμερισμού. Οι φωτοεκκινητές είναι φωτοευαίσθητες ενώσεις χαμηλού μοριακού βάρους οι οποίες με την απορρόφηση του φωτός δημιουργούν ελεύθερες ρίζες ή ιόντα που δρουν ως εκκινητές του πολυμερισμού.

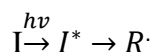
Υπάρχουν δύο κύριες κατηγορίες αρχικών υλικών φωτοπολυμερισμού με βάση το μηχανισμό πολυμερισμού τους: στον πολυμερισμό μέσω ελευθέρων ριζών για ακρυλικές ενώσεις ή ακόρεστους εστέρες και στον κατιονικό πολυμερισμό εποξειδίων και βύνιλο-εθέρων.

### 3.7.2 Φωτοπολυμερισμός μέσω ελευθέρων ριζών

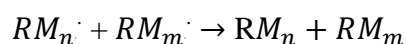
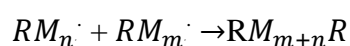
Τα αρχικά μονομερή ή oligομερή που χρησιμοποιούνται στον φωτοπολυμερισμό μέσω ελευθέρων ριζών είναι συνήθως μεθακρυλικές ενώσεις. Η έναρξη του πολυμερισμού γίνεται με διάσπαση του διπλού δεσμού άνθρακα-άνθρακα σε απλό και σύνδεση με την ελεύθερη ρίζα του φωτοεκκινητή όπως φαίνεται παρακάτω.



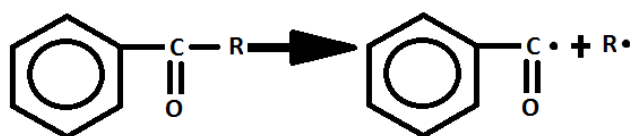
Κατόπιν η ρίζα του μονομερούς συνδέεται με άλλο μονομερές με διάσπαση του διπλού δεσμού του. Η όλη διαδικασία φαίνεται σχηματικά παρακάτω:



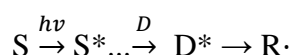
όπου με I και I\* συμβολίζεται ο φωτοεκκινητής στη θεμελιώδη και διεγερμένη κατάσταση, με R· η ελεύθερη ρίζα, και M το μονομερές (ή oligομερές). Οι φωτοπαραγόμενες ελεύθερες ρίζες αντιδρούν με τα μονομερή ή oligομερή δημιουργώντας ρίζες μονομερών, οι οποίες συνενώνονται με νέα μονομερή και συνεχίζοντας οι ρίζες μονομερών μεγαλώνουν με αλυσιδωτές αντιδράσεις, έως ότου δύο ρίζες συναντηθούν μεταξύ τους. Η αύξηση της αλυσίδας τερματίζει με έναν από τους παρακάτω τρόπους:



Η παραγωγή των ελευθέρων ριζών μετά από την απορρόφηση φωτονίου μπορεί να πραγματοποιηθεί με διάφορες φωτοχημικές διαδικασίες όπως διάσπαση του μορίου, απόσπαση ενδομοριακού ή διαμοριακού υδρογόνου, μεταφορά ηλεκτρονίου ή/και πρωτονίου. Ο πρώτος μηχανισμός είναι αυτός που απαντάται στους περισσότερο αποδοτικούς φωτοεκκινητές ελευθέρων ριζών (Fouassier 1995) και προκαλείται με διάσπαση δεσμού μεταξύ άνθρακα καρβονυλίου και α-άνθρακα (α-cleavage) όπως φαίνεται παρακάτω:



Σε πολλές περιπτώσεις η απορρόφηση του φωτός και η δημιουργία ελευθέρων ριζών πραγματοποιείται συνεργατικά από δύο διαφορετικά μόρια. Η απορρόφηση πραγματοποιείται από ένα μόριο φωτοαισθητήρα το οποίο μετά τη διέγερσή του ανταλλάσει ενέργεια ή/και άτομο υδρογόνου με ένα άλλο μόριο (συνεκκινητή) για τη δημιουργία ελευθέρων ριζών για τον πολυμερισμό. Ο συνεκκινητής (συνήθως τριτοταγής αμίνη) είτε δεν έχει τη δυνατότητα απορρόφησης φωτονίων είτε το φάσμα απορρόφησης του είναι μακριά από το μήκος κύματος που χρησιμοποιείται. Η διαδικασία δημιουργίας ελευθέρων ριζών στην περίπτωση αυτή φαίνεται σχηματικά παρακάτω



όπου με S και D συμβολίζονται ο φωτοαισθητήρας και ο συνεκκινητής αντίστοιχα, ενώ με αστερίσκο σημειώνεται η διεγερμένη κατάσταση αυτών.

Οι φωτοεκκινητές οι οποίοι χρειάζονται την παρουσία συνεκκινητή για την παραγωγή ελευθέρων ριζών ονομάζονται τύπου II ενώ αυτοί που μπορούν να τις παράγουν μόνοι τους ονομάζονται τύπου I. ,ωστόσο οι φωτοεκκινητές τύπου I μπορούν να χρησιμοποιηθούν και ως τύπου II.

### 3.7.3 Κατιονικός φωτοπολυμερισμός

Ορισμένου τύπου μονομερή όπως εποξίδια και βίνυλ-εθέρες που δεν πολυμερίζονται με ελεύθερες ρίζες είναι δυνατόν να πολυμεριστούν με την παρουσία κατιονικών φωτοεκκινητών (Decker et al 2001). Ο κατιονικός φωτοπολυμερισμός ξεκινά με τη δημιουργία ισχυρού Brösted ή Lewis οξέος το οποίο είναι ικανό να πολυμερίσει εποξίδια και βινύλια (LaFratta et al 2007). Στα επόξυ μονομερή η εκκίνηση του πολυμερισμού γίνεται με άνοιγμα του δακτυλίου oxirane ομάδος ενώ στους βίνυλ-εθέρες με τη διάσπαση του διπλού δεσμού άνθρακα-άνθρακα σε απλό. Το φωτο-οξύ δρα καταλυτικά και επομένως κάθε μόριο γεννήτορας φωτο-οξέως (photoacid generator, PAG) μπορεί να εκκινήσει πολλούς πολυμερισμούς. Σε πολλές περιπτώσεις κατά την ακτινοβολήση δημιουργείται το οξύ χωρίς να ξεκινά ο πολυμερισμός ή να γίνεται με πολύ μικρό ρυθμό μετά την ακτινοβολήση. Ο πολυμερισμός γίνεται σε δεύτερο στάδιο με τη θέρμανση της ρητίνης κατά την οποία πραγματοποιείται η διασύνδεση των μονομερών (Fouassier et al 1993). Το γεγονός

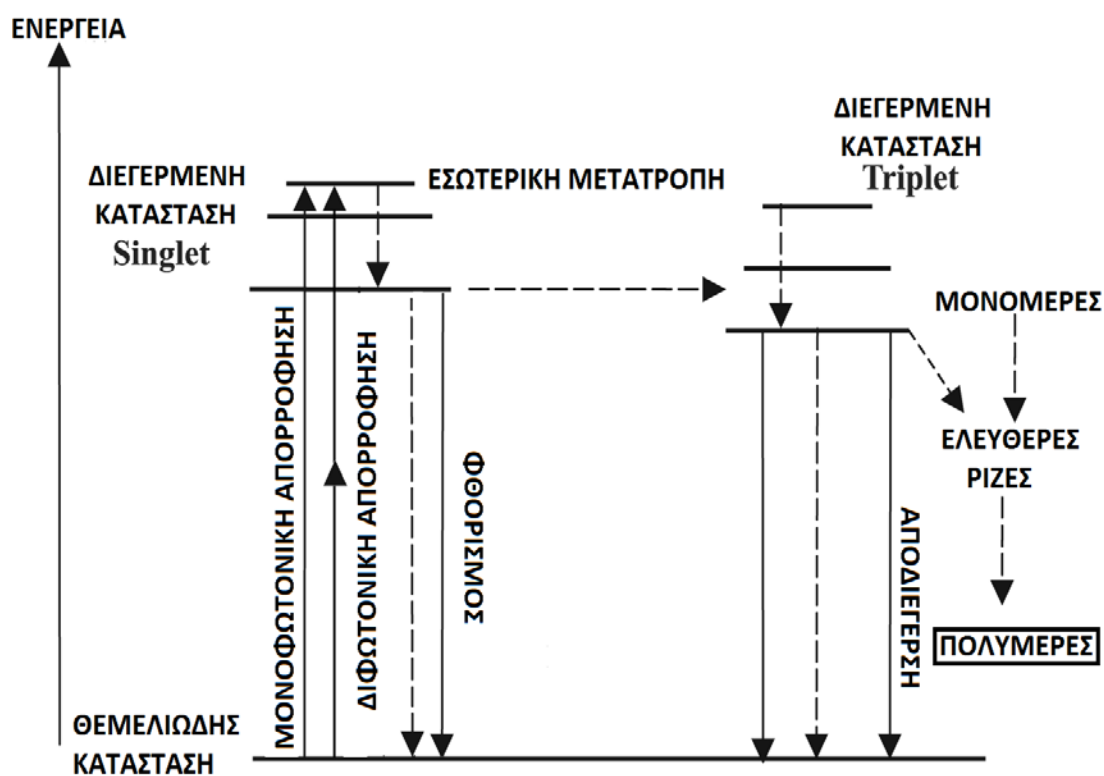
αυτό προσδίδει μεγαλύτερο χρόνο στη διαδικασία και αποτρέπει την απεικόνιση της μικροκατασκευής κατά τη διάρκεια της ακτινοβολήσης. ,ωστόσο λόγω της ασήμαντης διαφοράς του δείκτη διάθλασης του τμήματος που ακτινοβολείται δεν επηρεάζεται η δέσμη, δίνοντας περισσότερο ευέλικτους τρόπους ακτινοβολήσης με μεγαλύτερη ακρίβεια εγγραφής. Επίσης στον κατιονικό πολυμερισμό παρατηρείται συνήθως μικρότερη συρρίκνωση κατά τη στερεοποίηση, σε σχέση με τον πολυμερισμό ελευθέρων ριζών, γεγονός που οδηγεί σε μεγαλύτερη ακρίβεια στην κατασκευή των δομών.

Τα φωτο-οξέα που χρησιμοποιούνται στον κατιονικό πολυμερισμό μπορούν να χρησιμοποιηθούν και στην περίπτωση θετικού τύπου ρητίνης (Zhou et al 2002). Η ρητίνη αυτή είναι πολυμερισμένο υλικό του οποίου το τμήμα που ακτινοβολείται γίνεται διαλυτό και κατά το ξέπλυμα με διαλύτη (development) αφαιρείται. Αυτή η μέθοδος είναι ιδιαίτερα χρήσιμη σε ορισμένες μικροκατασκευές όπως οι μικροαυλακώσεις όπου η αφαίρεση του εσωτερικού τμήματος είναι πρακτικότερη από τη δημιουργία των τοιχωμάτων.

### **3.7.4 Διφωτονικός φωτοπολυμερισμός**

Πολλά μονομερή που πολυμερίζονται με υπεριώδη ακτινοβολήση παρουσιάζουν την ίδια αντίδραση και με την ταυτόχρονη απορρόφηση δύο φωτονίων στην ορατή ή υπέρυθη φασματική περιοχή, όταν η ένταση του φωτός είναι αρκετά μεγάλη (Sun et al 2004). Ωστόσο η απόδοση του διφωτονικού πολυμερισμού εξαρτάται από την ικανότητα διφωτονικής απορρόφησης των μονομερών, το κατώφλι του πολυμερισμού και την καταστροφή που μπορεί να προκληθεί από την υψηλής έντασης ακτινοβολία laser. Για την αύξηση της απόδοσης του διφωτονικού πολυμερισμού χρειάζονται μόρια με μεγάλη ενεργό διατομή διφωτονικής απορρόφησης. Τα μόρια αυτά απορροφώντας δύο φωτόνια είτε μετατρέπονται σε ελεύθερες ρίζες ή ιόντα είτε μεταφέρουν ενέργεια σε άλλα μόρια (συνεκκινητές) μετατρέποντάς τα σε εκκινητές του πολυμερισμού. Όταν ο πολυμερισμός επιτυγχάνεται χωρίς την παρουσία συνεκκινητών τα μόρια αυτά ονομάζονται εκκινητές τύπου I ενώ όταν χρειάζονται συνεκκινητές ονομάζονται τύπου II. Ωστόσο οι εκκινητές τύπου I μπορούν να χρησιμοποιηθούν και ως τύπου II.

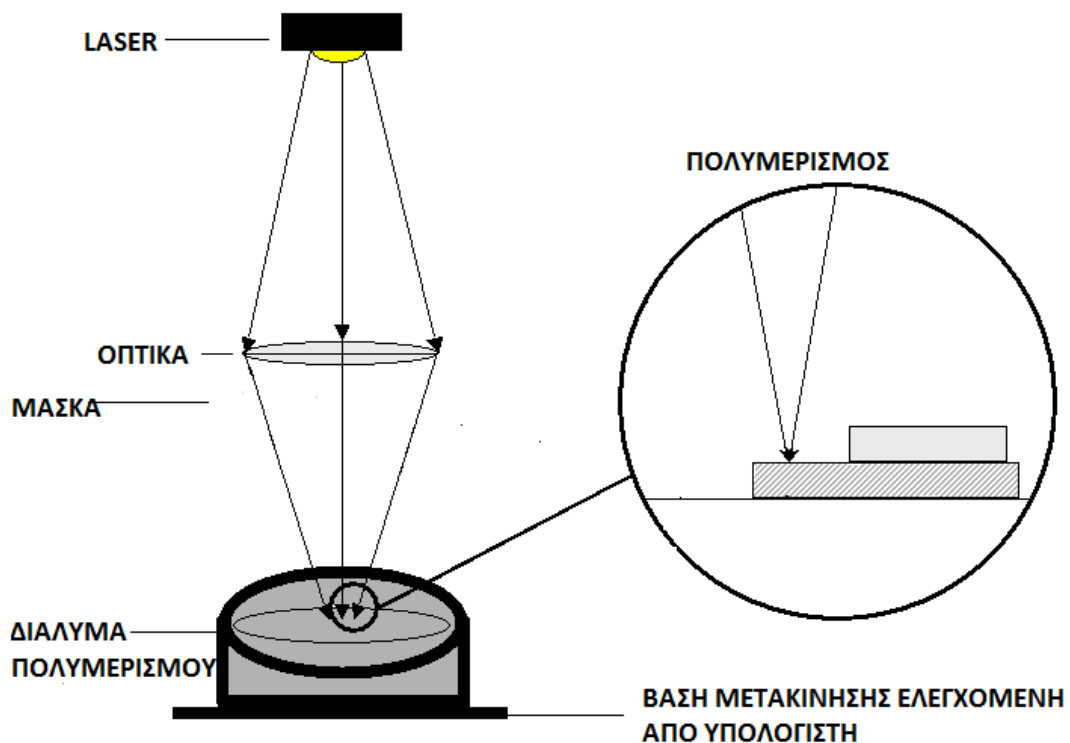
Στην εικόνα 3.4 φαίνονται σχηματικά οι συνηθέστερες διεργασίες που γίνονται μετά από τη διέγερση του ατόμου κατά την εκκίνηση του πολυμερισμού (Wu 2006). Μετά την μονοφωτονική ή διφωτονική απορρόφηση ο φωτοεκκινητής μεταβαίνει στην απλής πολλαπλότητας (singlet) διεγερμένη κατάσταση. Οι διεργασίες που ακολουθούν για την εκκίνηση του πολυμερισμού πραγματοποιούνται, στις περισσότερες περιπτώσεις, μετά από τη μετάβασή του μορίου στην τριπλής πολλαπλότητας κατάσταση (triplet) η οποία έχει μεγαλύτερο χρόνο ζωής. Το μόριο τότε μπορεί μέσω μεταφοράς ηλεκτρονίου/πρωτονίου με ένα δότη ηλεκτρονίου/υδρογόνου να προκαλέσει την δημιουργία εκκινητών πολυμερισμού. Ωστόσο οι τύπου I φωτοεκκινητές μπορούν να υποστούν απευθείας διάσπαση, χωρίς τη διαμεσολάβηση άλλου μορίου. Μέρος της απορροφούμενης ενέργειας μπορεί να χαθεί από την επαναφορά στη θεμελιώδη κατάσταση μέσω εσωτερικής μετατροπής ή με μεταφορά ενέργειας στο μονομερές ή σε οξυγόνο. Η δημιουργία των εκκινητών μπορεί να πραγματοποιηθεί επίσης μέσω της απορρόφησης του φθορισμού διφωτονικά διεγερμένων μορίων. Ο προκαλούμενος φθορισμός διεγείρει τους φωτοεκκινητές που χρησιμοποιούνται στο μονοφωτονικό φωτοπολυμερισμό.



Εικόνα 3.4: Φωτοπολυμερισμός

### 3.7.5 Διφωτονική φωτολιθογραφία

Στις αρχές της δεκαετίας του 1980 παρουσιάστηκε μία νέα τεχνική κατασκευής τρισδιάστατων δομών η οποία ονομάστηκε φωτολιθογραφία (Kodama et al 1981). Έχοντας ως βασική αρχή την διεργασία του φωτοπολυμερισμού μια δέσμη laser υπεριώδους σαρώνει την επιφάνεια ενός φωτοευαίσθητου υγρού υλικού που αποτελείται από μονομερή ή oligομερή προκαλώντας την στερεοποίηση του. Η διαδικασία της στερεολιθογραφίας για τη δημιουργία τρισδιάστατης κατασκευής γίνεται πολυμερίζοντας επίπεδο ανά επίπεδο. Μία τυπική διάταξη στερεολιθογραφίας φαίνεται στην εικόνα 3.5.



Εικόνα 3.5: Διάταξη φωτολιθογραφίας για τρισδιάστατες κατασκευές

Αρχικά το τρισδιάστατο σχέδιο της δομής που πρόκειται να κατασκευαστεί διαχωρίζεται σε δισδιάστατα επίπεδα ως προς τον άξονα της δέσμης (άξονας z). Ξεκινώντας από το κατώτερο δισδιάστατο επίπεδο γίνεται η σάρωση με τη δέσμη

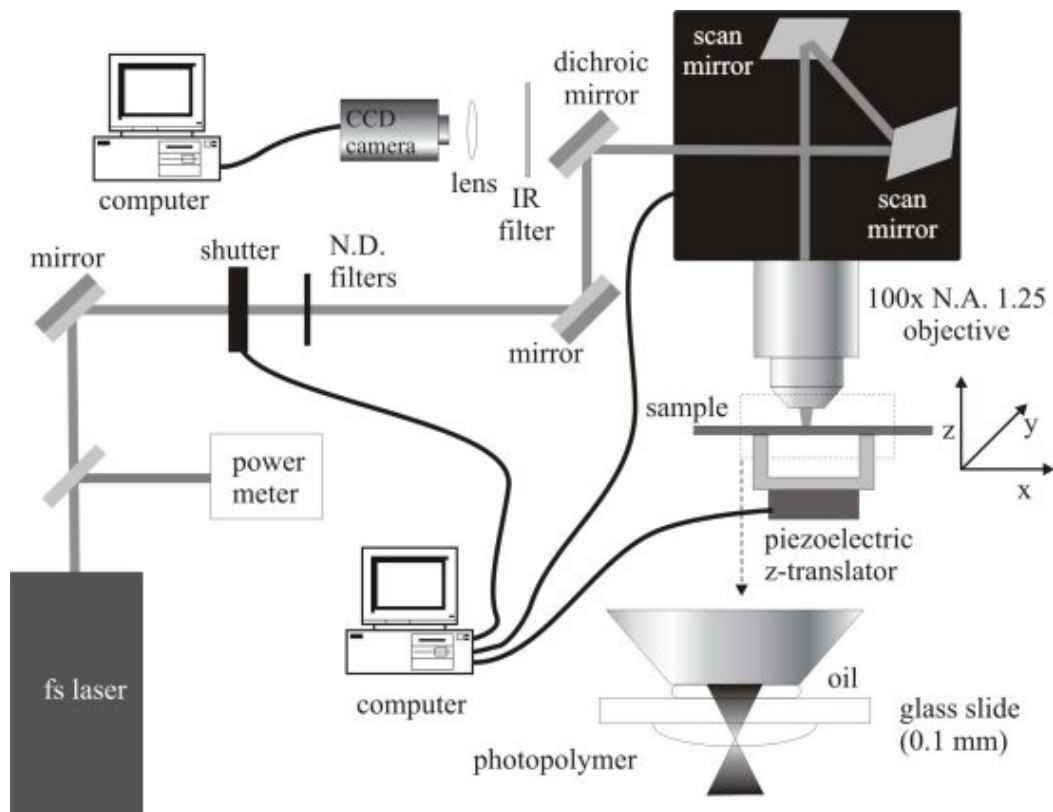


laser για την δημιουργία του σχεδίου του επιπέδου αυτού μέσω πολυμερισμού το οποίο προσκολλάται στο υπόστρωμα. Μετά την κατασκευή του πρώτου επιπέδου, μετακινείται με την βοήθεια ηλεκτρονικού υπολογιστή το σημείο εστίασης σε ανώτερες στρώσεις της υγρής ουσίας. Πολυμερίζοντας με σάρωση της δέσμης laser σύμφωνα με το σχέδιο του δεύτερου επιπέδου και συνεχίζοντας την ίδια διαδικασία για τα άλλα επίπεδα δημιουργείται η τρισδιάστατη κατασκευή. Για την κατασκευή του κάθε επιπέδου εκτός από τη σάρωση της δέσμης μια άλλη μέθοδος είναι με την προβολή του σχεδίου στην αρχική ουσία διαμορφώνοντας τη δέσμη μέσω μίας δυναμικά μορφοποιούμενης μάσκας.

Σε πρώτη φάση οι κατασκευές ήταν μακρο-διαστάσεων αλλά η τεχνική βελτιώθηκε σε μικρο-στερεολιθογραφία χρησιμοποιώντας βάσεις μικρο-μετακίνησης και καλύτερα οπτικά για την εστίαση της δέσμης σε μία λεπτή στρώση αρχικής υγρής ουσίας. Με αυτόν τον τρόπο κατέστησαν εφικτές μικροκατασκευές ανάλυσης μερικών μικρομέτρων.

Οι δυσκολίες της συμβατικής λιθογραφίας στην κατασκευή δομών με ανάλυση μικρότερη του μικρομέτρου εξαλείφονται πλέον με την χρησιμοποίηση του διφωτονικού πολυμερισμού για την κατασκευή των δομών. Η διφωτονική απορρόφηση εξαρτάται από το τετράγωνο της έντασης του laser και επομένως περιορίζεται χωρικά σε μία στενή περιοχή της εστίας όπου υπάρχει μεγάλη ένταση και η οποία μπορεί να είναι όγκου μερικών φεμτολίτρων χρησιμοποιώντας αντικειμενικούς φακούς μεγάλου αριθμητικού ανοίγματος. Κατά συνέπεια ο προκαλούμενος πολυμερισμός συμβαίνει σε μια πολύ μικρή περιοχή δίνοντας έτσι μία ενδογενή τρισδιάστατη ανάλυση στη μέθοδο εγγραφής με την σάρωση της δέσμης και του υποστρώματος στις τρεις διαστάσεις.

Οι πρώτες τρισδιάστατες μικροκατασκευές χρησιμοποιώντας την μέθοδο αυτή παρουσιάστηκαν το 1997 (Maruo et al 1997). Έκτοτε πολλές εργασίες έχουν δημοσιευτεί με την δημιουργία διφωτονικά πολυμερισμένων μικροκατασκευών με ανάλυση μερικών εκατοντάδων νανομέτρων. Η μελέτη για βελτιστοποίηση των τεχνικών και των υλικών που χρησιμοποιούνται έχει οδηγήσει σε διαστάσεις μικρότερες των 100nm (Haske et al 2007, Xing et al 2007).



Εικόνα 3.6 Διάταξη διφωτονικού πολυμερισμού

Μία τυπική διάταξη διφωτονικού πολυμερισμού φαίνεται στην εικόνα 3.6. Η δέσμη laser διευρύνεται μέσω ενός τηλεσκοπίου ώστε να καλύπτει την πίσω επιφάνεια του φακού μικροσκοπίου που θα χρησιμοποιηθεί. Ένα ουδέτερο φίλτρο χρησιμοποιείται για τον έλεγχο της προσπίπτουσας ισχύς και ένα κλείστρο (shutter) για τον έλεγχο της ακτινοβολίας. Η δέσμη laser εστιάζεται μέσω ενός αντικειμενικού φακού στο δείγμα που είναι τοποθετημένο σε γυάλινο πλακίδιο προσαρμοσμένο σε ηλεκτρονικά ελεγχόμενη βάση μετακίνησης στους τρεις άξονες. Η σάρωση στο εγκάρσιο, ως προς τον άξονα της δέσμης, επίπεδο μπορεί να γίνει και με τη χρήση γαλβανοπεριστρεφόμενου ζεύγους κατόπτρων το οποίο προκαλεί μικρή απόκλιση της δέσμης από τον άξονα του φακού με αποτέλεσμα την εγκάρσια μετατόπιση της εστίας. Στην εικόνα 3.6 φαίνεται επίσης η δυνατότητα της συνεχούς παρακολούθησης της διαδικασίας πολυμερισμού μέσω μιας διάταξης ανάστροφου μικροσκοπίου. Το φως από μια λάμπα επάνω από το δείγμα αφού περάσει από ένα φίλτρο υπεριώδους και διαμέσου της ρητίνης συλλέγεται από τον αντικειμενικό φακό μικροσκοπίου. Έπειτα μέσω ενός διχρωϊκού κάτοπτρου, το οποίο επιτρέπει την διέλευση της δέσμης laser ενώ αντίθετα ανακλά το φως της λάμπας οδηγείται στην CCD κάμερα απεικονίζοντας την πολυμερισμένη δομή που κατασκευάζεται.

Για την αποφυγή ανεπιθύμητης μετατόπισης της μικροκροκατασκευής κατά τη διάρκεια της δημιουργίας της το δείγμα είναι συνήθως παχύρευστο υγρό, άμορφο, στερεό ή ημιστερεής (gel) μορφής. Σε σύγκριση με την υγρή μορφή τα δείγματα σε στερεή ή ημιστερεή κατάσταση έχουν περισσότερο δύσκολες και χρονοβόρες διαδικασίες προετοιμασίας. Παρόλα αυτά τα μειονεκτήματα, η αποτροπή μετακίνησης μέσα στα υλικά αυτά δίνει το πλεονέκτημα της κατασκευής περισσότερο πολύπλοκων δομών όπως αυτά που περιλαμβάνουν ελεύθερα κινούμενα μέρη. Η αύξηση του ιξώδους στα υγρές κατάστασης δείγματα μπορεί να επιτευχθεί με αύξηση του αριθμού των oligομερών ως προς τα μονομερή. Στα προπαρασκευασμένα εμπορικά δείγματα ένα πρώτο στάδιο μερικού πολυμερισμού με θέρμανση ή υπεριώδη ακτινοβολία, αναδεύοντας συνεχώς, χρησιμοποιείται για τη βελτίωση του πολυμερισμού και για να γίνει πιο παχύρευστο το υλικό (Sun et al 2000). Επίσης μπορεί να γίνει προσθήκη άλλου μονομερούς/ολιγομερούς στο αρχικό για την αύξηση του ιξώδους ή της μετατροπής του σε ημιστερεή ή στερεή κατάσταση πριν από τον διφωτονικό πολυμερισμό.

Το δείγμα για να είναι αποδοτικό στις μικροκατασκευές μέσω διφωτονικού πολυμερισμού πρέπει να έχει ορισμένα χαρακτηριστικά (Wu et al 2006). Απαραίτητη προϋπόθεση είναι να μην απορροφά μονοφωτονικά στο μήκος κύματος της δέσμης του λέιζερ καθώς στην περίπτωση αυτή δεν θα ήταν δυνατή η διφωτονική απορρόφηση. Επιπλέον ο ρυθμός πολυμερισμού του θα πρέπει να είναι αρκετά γρήγορος και να επιτρέπει την εστίαση της δέσμης με ελάχιστη σκέδαση. Το σχηματιζόμενο πολυμερές οφείλει να έχει υψηλή αντίσταση στους διαλύτες που χρησιμοποιούνται για την απομάκρυνση του μη-ακτινοβολημένου τμήματος προκειμένου να επιβιώνει κατά τη διαδικασία αυτή. Για τον ίδιο λόγο θα πρέπει να έχει όσο το δυνατόν καλύτερη προσκόλληση στο συνήθως γυάλινο υπόστρωμα που χρησιμοποιείται για την υποστήριξή της κατασκευής. Κατά την διάρκεια του πολυμερισμού πολλές φορές παρατηρείται αλλοίωση λόγω συρρίκνωσης και για τον λόγο αυτό χαρακτηρίζονται σημαντικές οι μηχανικές ιδιότητες που προσδίδει η πολυμερισμένη ουσία στην τρισδιάστατη κατασκευή ώστε να ανταποκρίνεται όσο το δυνατόν περισσότερο στο σχέδιο σάρωσης της δέσμης αλλά παράλληλα να είναι και εύκαμπτη και ανθεκτική ώστε να υποστηρίζουν τα επιρόσθετα βάρη μετά την κατασκευή τους. Ένα άλλο απαραίτητο χαρακτηριστικό του μονομερούς ή oligομερούς που θα χρησιμοποιηθεί ως δείγμα είναι ο δείκτης διάθλασης του. Πιο συγκεκριμένα ο δείκτης διάθλασης του υλικού πρέπει να είναι κοντά στην τιμή του

γυαλιού (~1.5), το οποίο χρησιμοποιείται ως υπόστρωμα, για την αύξηση της εστιακής απόστασης και κατά συνέπεια την δυνατότητα κατασκευής μεγαλύτερου ύψους δομών. Σε πολλές κατασκευές, όπως οι φωτονικοί κρύσταλλοι, η αύξηση του δείκτη διάθλασης που παρατηρείται όταν η ρητίνη πολυμεριστεί, είναι επιθυμητό να είναι αρκετά μεγάλη ώστε να αυξάνεται η απόδοση αυτών των δομών. Τέλος τα ικρίωματα που θα παρασκευαστούν θα πρέπει να έχουν απόλυτη θερμική ευστάθεια σε θερμοκρασίες έως 150<sup>0</sup>C. Αυτές οι ιδιότητες, καθώς και άλλες που απαιτούνται ανάλογα με τις εφαρμογές, επιτυγχάνονται με τη μίξη διαφόρων συστατικών για τη δημιουργία δειγμάτων με τα επιθυμητά χαρακτηριστικά.

Παρόλο που η χρησιμοποίηση του διφωτονικού πολυμερισμού για την δημιουργία τρισδιάστατων μικροκατασκευών είναι σε πρώιμο στάδιο έχει βρει ήδη αρκετές εφαρμογές. Λόγω της υψηλής οπτικής καθαρότητας και της ομαλότητας των πολυμερισμένων δομών έχουν γίνει πολλές εφαρμογές στο πεδίο της οπτικής. Σε αυτές περιλαμβάνονται κυματοδηγοί, οπτικοί συζεύκτες, συμβολόμετρα (Klein et al 2005), μικροφακοί (Guo et al 2006) ακόμη και μικρο-laser (Yokoyama et al 2003). Επίσης λόγω της δυνατότητας δημιουργίας λεπτομερειών της τάξης των 100nm η τεχνική έχει χρησιμοποιηθεί για την κατασκευή φωτονικών κρυστάλλων, διαφόρων μοτίβων, με ζώνη αποκοπής στην κοντινή υπέρυθρη περιοχή του φάσματος. Μειονέκτημα αποτελεί η μικρή σχετικά διαφορά του δείκτη διάθλασης με τον αέρα που μειώνει την απόδοση του φωτονικού κρυστάλλου. Όμως με προσθήκη στο αρχικό δείγμα συστατικών με υψηλό δείκτη διάθλασης μπορεί να αυξηθεί η απόδοση (Duan et al 2004). Επίσης μπορεί να χρησιμοποιηθεί ως καλούπι γεμίζοντας την κατασκευή με υλικό υψηλού δείκτη διάθλασης και αφαίρεση του πολυμερούς, αφήνοντας ένα φωτονικό κρύσταλλο με το νέο υλικό (Sun et al 2007).

Ένας άλλος τομέας στον οποίο έχει βρει εφαρμογή ο διφωτονικός πολυμερισμός είναι οι μικρομηχανικές συσκευές. Έχουν κατασκευαστεί γρανάζια, αντλίες, σωληνώσεις, βελόνες και άλλες συσκευές σε διαστάσεις μερικών μικρομέτρων. Πολλές από τις μικροσυσκευές αυτές χρησιμοποιούνται στη μελέτη βιολογικών μικροσυστημάτων.

Στη βιολογία επίσης έχει χρησιμοποιηθεί η δυνατότητα διφωτονικού πολυμερισμού ορισμένων πρωτεϊνών και κολλαγόνου (Basu et al 2005) για την δημιουργία μικρο κελιών καλλιέργειας κυττάρων, δίνοντας την προοπτική ακόμη και για απομόνωση ενδοκυτταρικών στοιχείων μέσα στο ίδιο κύτταρο. Παρακάτω θα μιλήσουμε για τις εφαρμογές του διφωτονικού πολυμερισμού πάνω στον συγκεκριμένο τομέα.

# **ΚΕΦΑΛΑΙΟ 4**

## **ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ**

## 4.1 Υβριδικά μη βιοδιασπώμενα υλικά

Τα βιοσυνθετικά είναι εξαιρετικά υβριδικά υλικά που αποτελούνται από οργανικά και ανόργανα τμήματα και προκύπτουν μέσω της βιο-ορυκτοποίησης. Τα δόντια, τα κόκκαλα και τα μαλλιά και γενικότερα η εξωκυττάρια ουσία είναι χαρακτηριστικά παραδείγματα βιοσυνθετικών που αποτελούνται από ένα επαναλαμβανόμενο και καλά οργανωμένο οργανικό πολυμερές στο οποίο επικάθεται μία ανόργανη προσθήκη. Την τελευταία δεκαετία, νέοι τύποι υβριδικών πολυμερών έχουν παρασκευαστεί και έχουν την ονομασία ανόργανα-οργανικά συμπολυμερή. Τα συγκεκριμένα υλικά έχουν προσελκύσει το ενδιαφέρον των επιστημόνων λόγω των ιδιαίτερων φυσικών και χημικών τους ιδιοτήτων που προκύπτουν από την υβριδική τους φύση. Η παρασκευή τους γίνεται με την διαδικασία sol-gel ξεκινώντας από την υγρή μορφή.

## 4.2 Διαδικασία sol-gel (θερμοαντιστρεπτής πηκτής)

Οι πρώτες παρατηρήσεις πάνω στην διαδικασία sol-gel έγιναν το 1950 με τις μελέτες του Graham πάνω στα gel σιλικόνης. Τότε παρατηρήθηκε ότι η υδρόλυση του tetraethyl orthosilicate (TEOS),  $\text{Si}(\text{OC}_2\text{H}_5)_4$ , σε όξινο περιβάλλον, παρήγαγε  $\text{SiO}_2$  στη μορφή υάλου. Ίνες θα μπορούσαν να αντληθούν από την πηκτή (gel), και μπορούσαν να παραχθούν ακόμη και οπτικοί φακοί. Παρόλα αυτά για να μην μετατραπεί η πηκτή σιλικόνης σε σκόνη απαιτούνταν υπερβολικά μεγάλοι χρόνοι αποξήρανσης γεγονός που δεν επέτρεπε την ανάδειξη τεχνολογικού ενδιαφέροντος. Ορισμένοι ερευνητές αναγνώρισαν την δυνατότητα να επιτύχουν υψηλά επίπεδα χημικής ομοιογένειας και το 1960 παρήγαγαν έναν μεγάλο αριθμό καινοτόμων συνθετικών κεραμικών που βασίζονταν σε Al, Si, Ti και Zr.

Η τεχνολογία θερμοαντιστρεπτής πηκτής (sol-gel) είναι ένα ισχυρό εργαλείο για την παρασκευή υβριδικών ανόργανων-οργανικών υλικών. Ως πλεονεκτήματα έχει της ευκολία προετοιμασίας, τροποποίησης και επεξεργασίας των υλικών, παράλληλα με την υψηλή οπτική τους ποιότητα, την φωτοχημική και ηλεκτροχημική τους αδράνεια

και την καλή μηχανική και χημική τους σταθερότητα. Αυτή η τεχνική περιλαμβάνει την μετατροπή ενός κολλοειδούς διαλύματος (λύμα/sol) που αποτελείται από μονομερή σε ένα ολοκληρωμένο δίκτυο πολυμερών (πηκτή/gel). Το sol, που είναι ένα διάλυμα που περιέχει σωματίδια σε εναιώρημα, πολυμερίζεται σε χαμηλή θερμοκρασία για να διαμορφώσει ένα gel. Στη συνέχεια το gel θα συμπυκνωθεί μέσω μίας θερμικής διαδικασίας για να δώσει ένα ανόργανο υλικό τύπου υάλου, πολυκρυστάλλου ή gel. Με την συγκεκριμένη διεργασία είναι δυνατή η παραγωγή υβριδικών υλικών με ιδιαίτερες ιδιότητες και καθίσταται δυνατή η δημιουργία κατασκευών όπως οι ίνες και πολύ λεπτές επιστρώσεις με αποτέλεσμα να χρησιμοποιείται ευρέως σε χημικούς αισθητήρες, καταλύσεις και μεμβράνες (Sangeeta et al 1992, Klein 1993, Sakka 1996).

Η διαδικασία παραγωγής περιλαμβάνει τέσσερα βήματα. Σαν πρώτο βήμα έχουμε την υδρόλυση και την συμπύκνωση στην οποία τα μονομερή όπως τα μεταλλικά οξείδια ή αλκοξείδια αναμιγνύονται με νερό και υπόκεινται σε υδρόλυση και συμπύκνωση για τον σχηματισμό πορώδων αλληλοσυνδεδεμένων σύμπλοκων δομών. Σαν καταλύτης της συγκεκριμένης διεργασίας χρησιμοποιείται κάποιο οξύ όπως το HCL ή κάποια βάση όπως η NH<sub>3</sub>. Στο δεύτερο βήμα περιλαμβάνεται η ζελατινοποίηση, όπου ο διαλύτης απομακρύνεται και διαμορφώνεται το gel με θέρμανση σε χαμηλή θερμοκρασία. Η υδρόλυση και η συμπύκνωση δεν σταματούν μέχρι την ζελατινοποίηση με αποτέλεσμα να χάνεται ένας σημαντικός όγκος του δείγματος. Στην συνέχεια επέρχεται ο φωτοπολυμερισμός ως τρίτο στάδιο. Εξαιτίας της ύπαρξης διπλών δεσμών, προστίθεται στο δείγμα ο φωτοεκκινητής και οι φωτοεπαγόμενες ελεύθερες ρίζες προκαλούν τοπικό πολυμερισμό. Κατά την διάρκεια αυτού του σταδίου δεν υπάρχει απομάκρυνση υλικού με αποτέλεσμα ο όγκος να παραμένει σταθερός. Τελευταίο στάδιο της διαδικασίας αποτελεί η ανάπτυξη. Σε αυτήν την φάση το sol-gel εμβαπτίζεται στον κατάλληλο διαλύτη και το μη πολυμερισμένο υλικό απομακρύνεται. Στην συγκεκριμένη πειραματική διαδικασία, η sol-gel τεχνική χρησιμοποιήθηκε για την προετοιμασία δύο διαφορετικών φωτοευαίσθητων υβριδικών υλικών, το ένα με βάση το Zirconium και το άλλο με βάση το Titanium. Η διαδικασία σύνθεσης τους περιγράφεται παρακάτω.

## 4.3 Υλικό sol-gel Zirconium

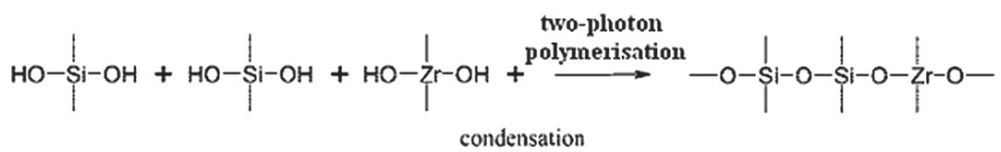
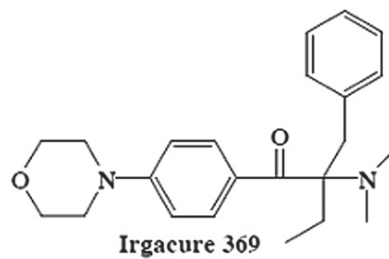
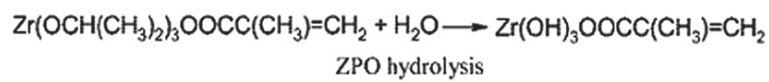
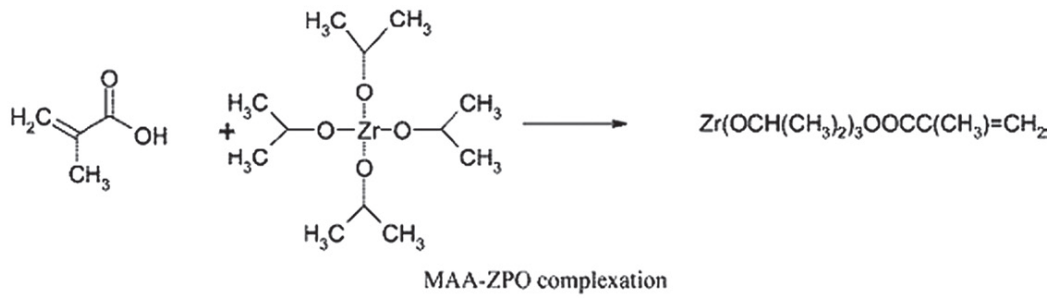
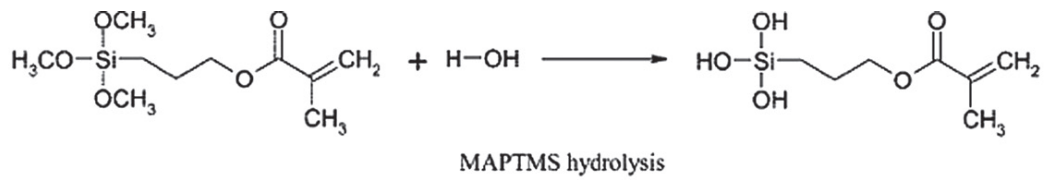
Πρόσφατα το συγκεκριμένο υβριδικό οργανικό-ανόργανο sol-gel υλικό, το οποίο είναι ένα σύμπλεγμα Zirconium και σιλικόνης, παράχθηκε από τις ερευνήτριες Μ. Φαρσάρη και Μ. Βαμβακάκη για φωτονικές εφαρμογές με την τεχνική του διφωτονικού πολυμερισμού. Το κυριότερο χαρακτηριστικό του συγκεκριμένου υλικού είναι η ελάχιστη συρρίκνωση κατά την διαδικασία του πολυμερισμού (Sakellari et al 2008, Ovsianikov et al 2008, Ovsianikov et al 2009, Bhuiyan et al 2006, Farsari et al 2010). Επιπλέον τροποποιώντας την αναλογία Zirconium- σιλικόνης, αλλάζει και ο δείκτης διάθλασης του υλικού.

### 4.3.1 Σύνθεση του υλικού sol-gel Zirconium

Το υλικό παρασκευάζεται από methacryloxypropyltrimethoxysilane (MAPTMS, Polysciences Inc.) και methacrylic acid (MAA, Sigma-Aldrich). Και τα δύο συστατικά αποτελούνται από φωτοπολυμεριζόμενες μεθακρυλικές ομάδες. Το Zirconium n-propoxide ( $Zr(OCH_2CH_2CH_3)_4$ ), (ZPO, 70% solution in 1-propanol, Sigma-Aldrich) χρησιμοποιήθηκε για την δημιουργία του ανόργανου δικτύου. Η μοριακή αναλογία του MAPTMS προς το ZPO ήταν 8:2. Το ανόργανο προποξίδιο στην συνέχεια αναμείχθηκε με MAA και ερευνήθηκαν τέσσερις διαφορετικές αναλογίες ZPO με MAA, 1:3, 1:4, 1:8 και 1:12. Η σύνθεση των συγκεκριμένων υλικών περιγράφεται παρακάτω.

Αρχικά το MAPTMS υδρολύθηκε με την προσθήκη 0.1M HCl και το μείγμα ανακινήθηκε για 30 λεπτά. Σε ένα ξεχωριστό δοχείο το ZPO αναμείχθηκε με MAA παρουσία ίσου όγκου Dimethyl Sulfoxide και το sol που παράχθηκε ανακινήθηκε για 30 λεπτά. Έπειτα το MAPTMS sol προστέθηκε στάγδην στο ανακινημένο ZPO sol και η ανακίνηση συνεχίστηκε για περίπου μία ώρα. Στην συνέχεια προστέθηκε ο φωτοεκκινητής Irgacure 369 (Ciba Speciality Chemicals), 1.4wt% στο MAPTMS για να παραχθεί το τελικό προϊόν. Μετά από ανακίνηση έξι ωρών, το δείγμα φιλτραρίστηκε χρησιμοποιώντας φίλτρα 0,22μm. Στην εικόνα 4.1 παρουσιάζονται οι χημικοί τύποι και οι αντιδράσεις που πραγματοποιούνται κατά την διαδικασία sol-gel μέχρι το τελικό προϊόν.





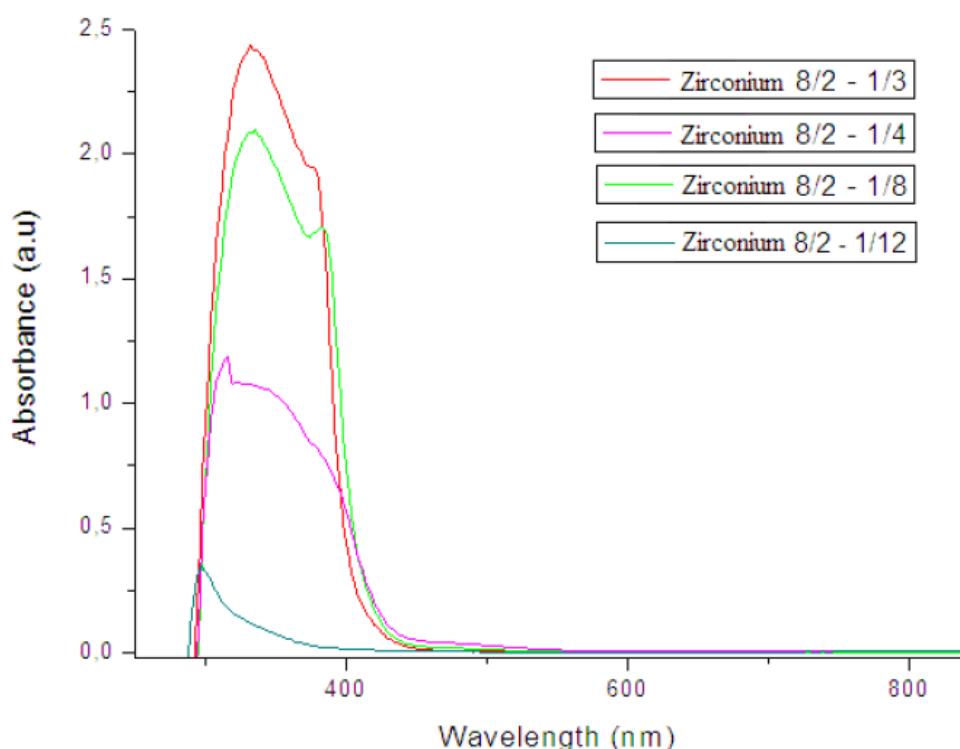
**Εικόνα 4.1:** Σύνθεση του υλικού sol-gel Zirconium

### 4.3.2 Προετοιμασία πριν τον πολυμερισμό

Οι επιστρώσεις κατασκευάστηκαν με την διαδικασία του spin-coating αφού τα υλικά είχαν ήδη τοποθετηθεί πάνω σε καλυπτρίδες υάλου. Οι λεπτές επιστρώσεις αποξηράθηκαν για 12 ώρες σε συνθήκες κενού και θερμοκρασίας περίπου 50°C. Οι συνθήκες κενού και αυξημένης θερμοκρασίας συνέβαλαν στην συμπύκνωση των hydroxyl-mineral ομάδων και την δημιουργία της ανόργανης μήτρας. Σε επόμενο στάδιο επεξεργασίας το υλικό που δεν είχε εκτεθεί στην λέιζερ ακτινοβολία απομακρύνθηκε με την βοήθεια μείγματος 1:1 isopropanol :4 -methyl-2-pentanone και έπειτα isopropanol.

### 4.3.3 Φάσματα απορρόφησης των υλικών

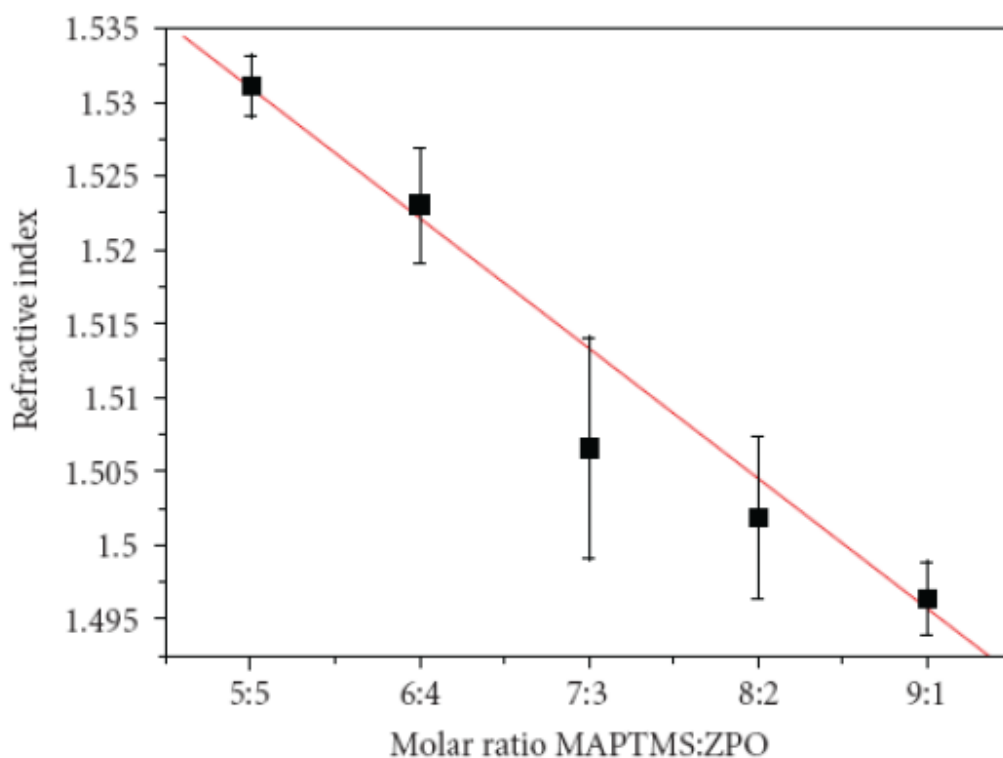
Τα φάσματα εκπομπής των λεπτών επιστρώσεων μετρήθηκαν με UV-Vis Spectrometer. Η εικόνα 4.2 αποτυπώνει τα φάσματα απορρόφησης των υλικών με τις διαφορετικές αναλογίες που χρησιμοποιήθηκαν



Εικόνα 4.2: Φάσματα απορρόφησης των υλικών

#### 4.3.4 Οπτικές ιδιότητες

Έχει αποδειχτεί ότι τροποποιώντας την αναλογία MAPTMS και ZPO τροποποιείται ο δείκτης διάθλασης του υλικού (Εικόνα 4.3). Όπως φαίνεται και στο διάγραμμα όσο αυξάνεται το ποσοστό του ZPO τόσο αυξάνεται και ο δείκτης διάθλασης του υλικού. Το γεγονός ότι η αύξηση αυτή είναι γραμμική απλοποιεί τα κριτήρια του σχεδιασμού του υλικού.



Εικόνα 4.3: Συσχέτιση δείκτη διάθλασης και αναλογίας MAPTMS:ZPO.

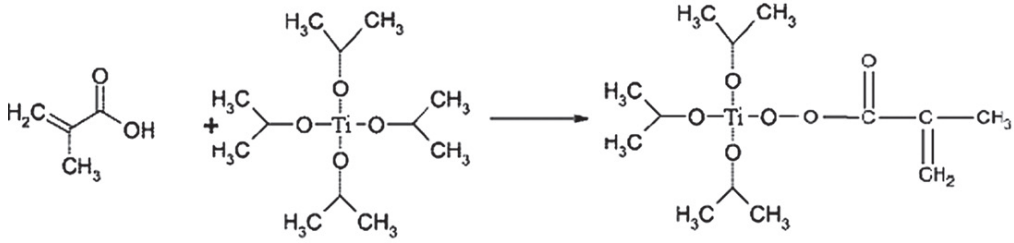
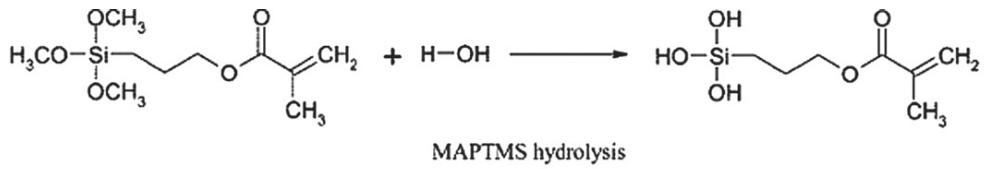
## 4.4 Υλικό sol-gel Titanium

Πρόσφατα το συγκεκριμένο υβριδικό οργανικό-ανόργανο sol-gel υλικό, το οποίο είναι ένα σύμπλεγμα Titanium και σιλκόνης, παράχθηκε από τις ερευνήτριες Μ. Φαρσάρη και Μ. Βαμβακάκη για φωτονικές εφαρμογές με την τεχνική του διφωτονικού πολυμερισμού. Το κυριότερο χαρακτηριστικό του συγκεκριμένου υλικού είναι η ελάχιστη συρρίκνωση κατά την διαδικασία του πολυμερισμού. Επιπλέον τροποποιώντας την αναλογία Titanium - σιλκόνης, επηρεάζεται και ο δείκτης διάθλασης του υλικού (Sakellari et al 2010).

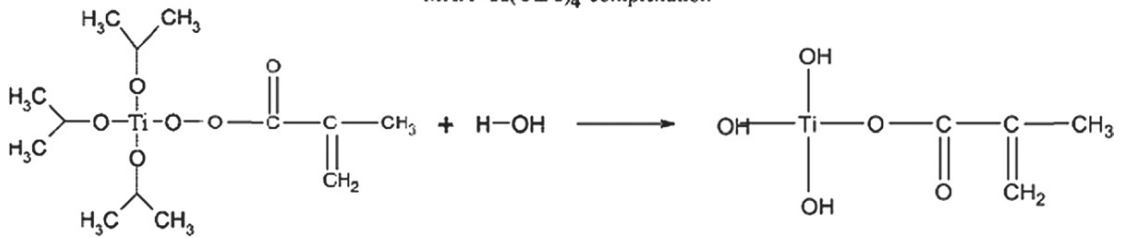
### 4.4.1 Σύνθεση του υλικού sol-gel Titanium

Το υλικό παρασκευάζεται από methacryloxypropyltrimethoxysilane (MAPTMS, Polysciences Inc.) και methacrylic acid (MAA, Sigma-Aldrich). Και τα δύο συστατικά αποτελούνται από φωτοπολυμεριζόμενες μεθακρυλικές ομάδες. Το Titanium isopropoxide ( $\text{Ti}[\text{OCH}(\text{CH}_3)_2]_4$ ), (Ti(iPO), 97% Sigma-Aldrich) χρησιμοποιήθηκε για την δημιουργία του ανόργανου δικτύου. Η μοριακή αναλογία του MAPTMS προς το Ti(iPO) ήταν 8:2. Το ανόργανο ισοπροποξίδιο στην συνέχεια αναμείχθηκε με MAA και ερευνήθηκαν τέσσερις διαφορετικές αναλογίες Ti(iPO) με MAA, 1:3, 1:4, 1:8 και 1:12. Η σύνθεση των συγκεκριμένων υλικών περιγράφεται παρακάτω.

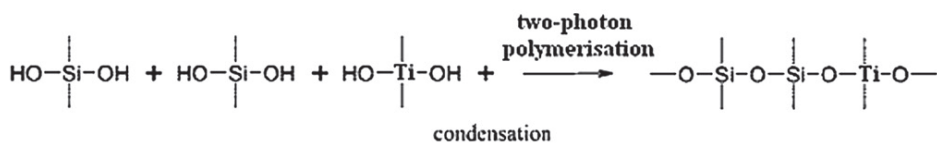
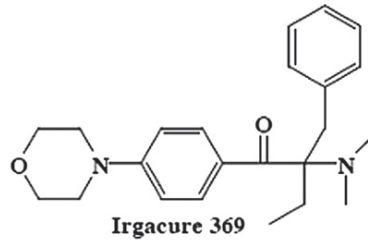
Αρχικά το MAPTMS υδρολύθηκε με την προσθήκη 0.1M HCl και το μείγμα ανακινήθηκε για 30 λεπτά. Σε ένα ξεχωριστό δοχείο το Ti(iPO) αναμείχθηκε με MAA παρουσία ίσου όγκου Dimethyl Sulfoxide και το sol που παράχθηκε ανακινήθηκε για 12 ώρες. Έπειτα το MAPTMS sol προστέθηκε στάγδην στο ανακινημένο Ti(iPO) sol και η ανακίνηση συνεχίστηκε για περίπου μία ώρα. Στην συνέχεια προστέθηκε ο φωτοεκκινητής Irgacure 369 (Ciba Speciality Chemicals), 1.4wt% στο MAPTMS για να παραχθεί το τελικό προϊόν. Μετά από ανακίνηση έξι ωρών, το δείγμα φιλτραρίστηκε χρησιμοποιώντας φίλτρα 0,22 $\mu\text{m}$ . Στην εικόνα 4.4 παρουσιάζονται οι χημικοί τύποι και οι αντιδράσεις που πραγματοποιούνται κατά την διαδικασία sol-gel μέχρι το τελικό προϊόν.



MAA- Ti(OiPr)<sub>4</sub> complexation



Complexed Titanium hydrolysis



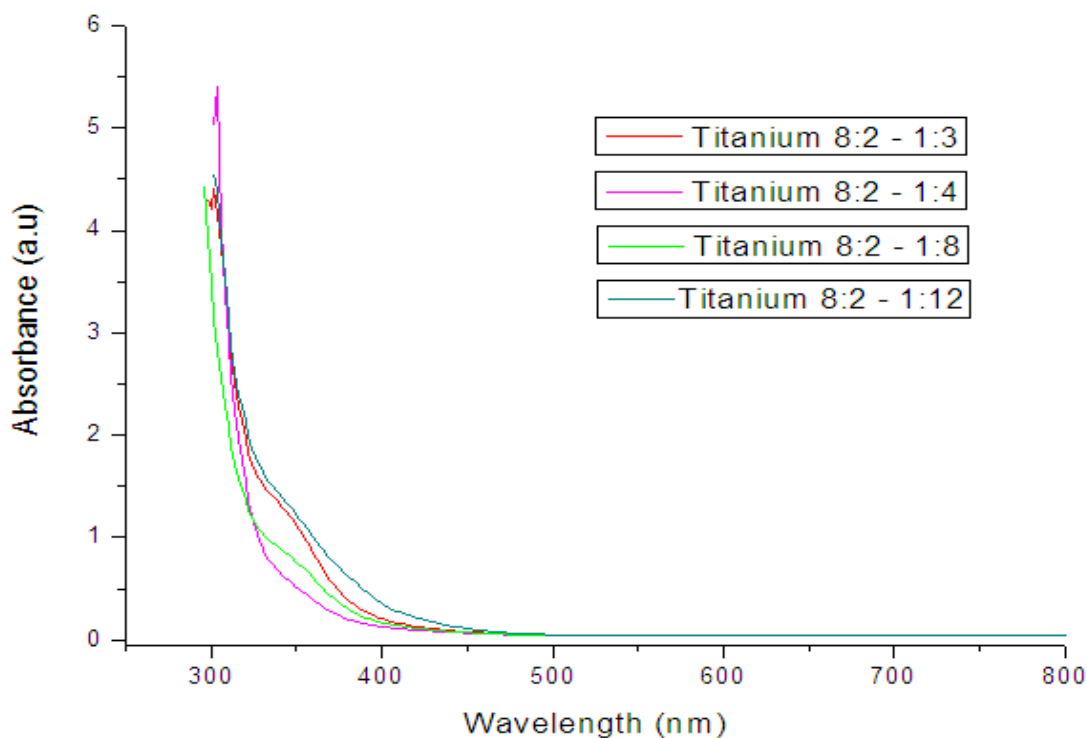
**Εικόνα 4.4:** Σύνθεση του υλικού sol-gel Titanium

#### 4.4.2 Προετοιμασία πριν τον πολυμερισμό

Οι επιστρώσεις κατασκευάστηκαν με την διαδικασία του spin-coating αφού τα υλικά είχαν ήδη τοποθετηθεί πάνω σε καλυπτρίδες υάλου. Οι λεπτές επιστρώσεις αποξηράθηκαν για 12 ώρες σε συνθήκες κενού και θερμοκρασίας περίπου 50°C. Οι συνθήκες κενού και αυξημένης θερμοκρασίας συνέβαλαν στην συμπύκνωση των hydroxyl-mineral ομάδων και την δημιουργία της ανόργανης μήτρας. Σε επόμενο στάδιο επεξεργασίας το υλικό που δεν είχε εκτεθεί στην λέιζερ ακτινοβολία απομακρύνθηκε με την βοήθεια μείγματος 1:1 isopropanol :4 -methyl-2-pentanone και έπειτα isopropanol.

#### 4.4.3 Φάσματα απορρόφησης των υλικών

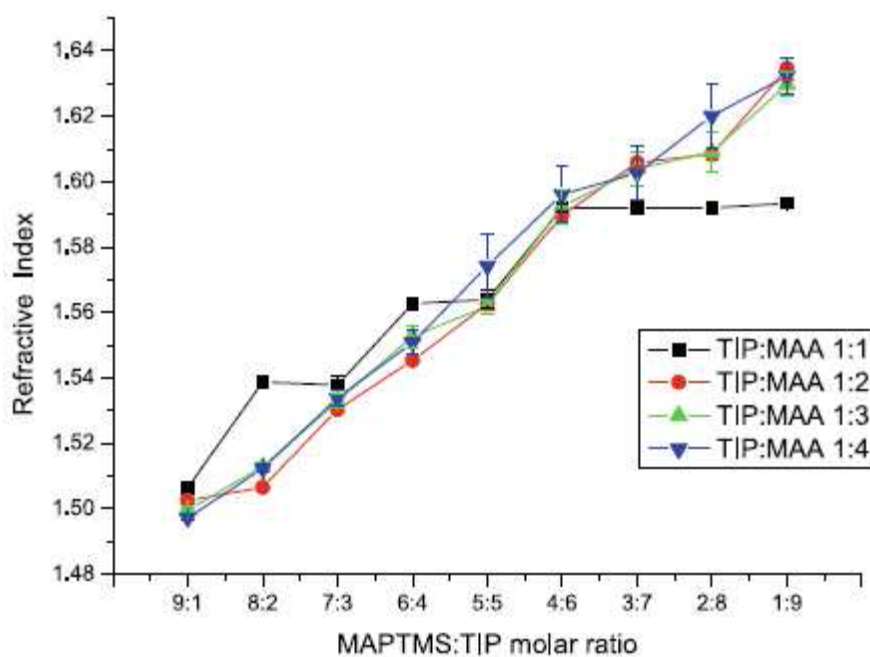
Τα φάσματα εκπομπής των λεπτών επιστρώσεων μετρήθηκαν με UV-Vis Spectrometer. Η εικόνα 4.5 αποτυπώνει τα φάσματα απορρόφησης των υλικών με τις διαφορετικές αναλογίες που χρησιμοποιήθηκαν



Εικόνα 4.5: Φάσματα απορρόφησης των υλικών

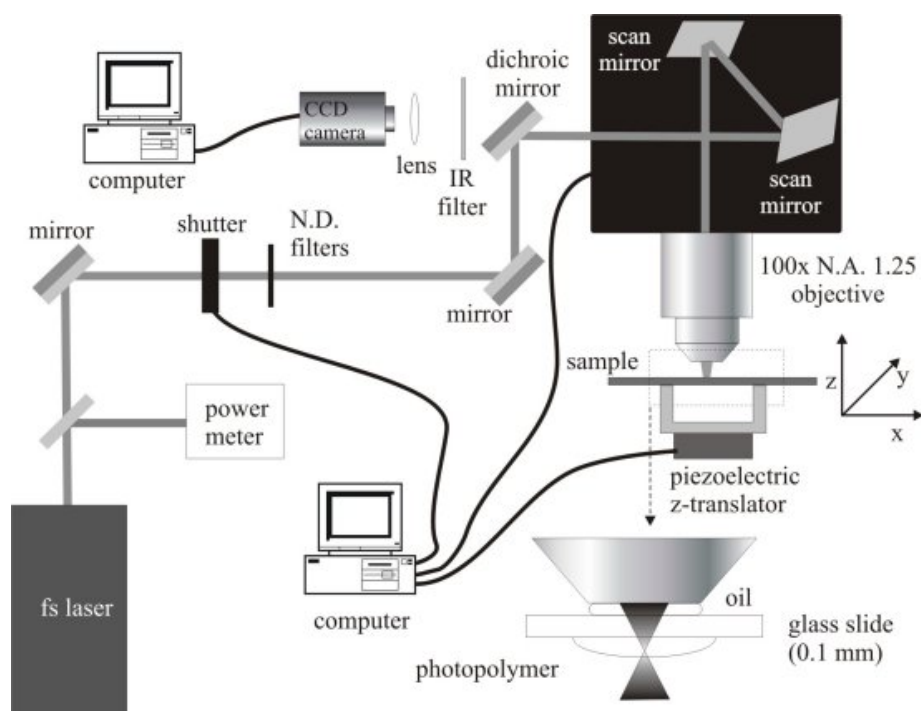
#### 4.4.4 Οπτικές ιδιότητες

Έχει αποδειχτεί ότι ενώ ο δείκτης διάθλασης αυξάνει γραμμικά με το titanium isopropoxide, η αύξηση του MAA τον αφήνει ανεπηρέαστο (Εικόνα 4.6).



Εικόνα 4.6: Συσχέτιση δείκτη διάθλασης και αναλογίας MAPTMS:TIP.

## 4.5 Διάταξη διφωτονικού πολυμερισμού



Εικόνα 4.7: Διάταξη διφωτονικού πολυμερισμού

Στην εικόνα 4.7 παρουσιάζεται η πειραματική διάταξη που χρησιμοποιήθηκε στα πειράματα διφωτονικού πολυμερισμού. Η πηγή του λέιζερ που χρησιμοποιήθηκε ήταν ένα Ti:Sapphire femtosecond oscillator που λειτουργούσε στα 800nm. Η διάρκεια του παλμού του συγκεκριμένου λέιζερ ήταν λιγότερο από 200fs συχνότητα 50-80MHz. Η ενέργεια που χρειαζόταν για τον πολυμερισμό διέφερε ανάλογα με το υλικό, τον φωτοεκκινητή και την εστίαση αλλά συνήθως ήταν της τάξης μερικών nanojoules ανά παλμό.

Μεταφέροντας το σημείο εστίασης τρισδιάστατα μέσα στο δείγμα κατασκευάζονταν τα ικρίωματα. Η φωτοπολυμεριζόμενη δομή συνήθως κατασκευάζεται σε στρώσεις με την βοήθεια ενός x-y galvanometric mirror scanner ή x-y piezoelectric stages. Στην πρώτη περίπτωση η δομή παραμένει ακίνητη και κινείται η δέσμη ενώ στην δεύτερη περίπτωση το δείγμα μετακινείται και ο παλμός παραμένει εστιασμένος σε ένα συγκεκριμένο σημείο του χώρου. Η κίνηση στον z άξονα πραγματοποιείται με την χρήση μίας υψηλής ευαισθησίας linear stage.

Στην δική μας διάταξη χρησιμοποιήθηκε ένα x-y-z galvanometric minor digital scanner (Scanlabs Hurriscan II) που ελεγχόταν από το λογισμικό SAMLight (SCAPS). Το συγκεκριμένο λογισμικό πραγματοποιεί τον σχεδιασμό της κατασκευής



ανά επίπεδο. Το beam waist του εστιαζόμενου λέιζερ παλμού προκύπτει από τον τύπο  $r = 0.61\lambda / N.A$  (N.A.: numerical aperture). Ο έλεγχος του παλμού μπορεί να ελεγχθεί με ένα ταχύ μηχανικό διάφραγμα ενώ η ένταση του ελέγχεται με neutral density filters, με variable attenuator ή έναν συνδυασμό ενός polarizer και ενός waveplate. Για την παρακολούθηση της διαδικασίας πολυμερισμού χρησιμοποιείται μία CCD κάμερα πίσω από έναν διχροϊκό καθρέπτη καθώς κατά την διαδικασία πολυμερισμού αλλάζει ο δείκτης διάθλασης με αποτέλεσμα οι ακτινοβολούμενες δομές να γίνονται ορατές. Μετά το πέρας της διαδικασίας απομακρύνεται το μη πολυμερισμένο υλικό όπως σε κάθε τεχνική λιθογραφίας.

## 4.6 Κυτταρικές σειρές

Η μηχανική ιστών χρησιμοποιεί ζωντανά κύτταρα ως κατασκευαστικά υλικά. Χαρακτηριστικά παραδείγματα αποτελούν οι ινοβλάστες στην μηχανική ιστών δέρματος και τα χονδροκύτταρα στην αντικατάσταση αρθρικού χόνδρου. Στην συγκεκριμένη έρευνα χρησιμοποιήθηκαν φυσιολογικοί ινοβλάστες ποντικού (NIH/3T3), φυσιολογικοί ινοβλάστες ανθρώπου (ATCC<sup>®</sup> PCS-201-012<sup>TM</sup>) και φυσιολογικά επιδερμικά κερατινοκύτταρα ανθρώπου (ATCC<sup>®</sup> PCS-200-011<sup>TM</sup>).

### 4.6.1 Ινοβλάστες

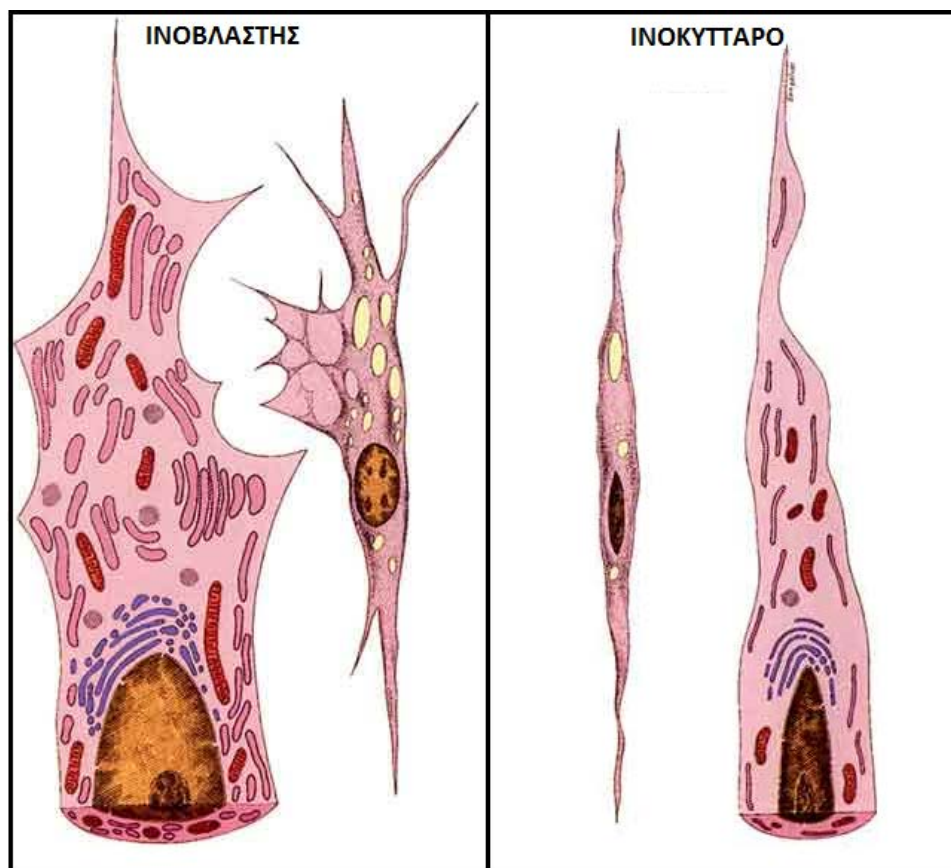
Η ινοβλάστη (Εικόνα 4.8) αποτελεί τον μόνο κυτταρικό τύπο που απαντάται, ανεξαιρέτως, σε όλα τα είδη συνδετικού ιστού. Έχει σχήμα ατρακτοειδές ή αστεροειδές και από το κυτταρικό σώμα προσεκβάλλουν κοντές, διακλαδιζόμενες αποφυάδες. Στο ενήλικο άτομο οι ινοβλάστες εκκρίνουν κολλαγόνο. Περιέχουν μεγάλο ωοειδή πυρήνα, του οποίου η χρωματίνη συγκεντρώνεται σε περιφερικά αθροίσματα κάτω από την πυρηνική μεμβράνη. Σε κεντρικότερη θέση του πυρήνα διακρίνεται ένα ευμέγεθες πυρήνιο. Το κυτταρόπλασμα είναι βασεόφιλο και περιέχει τα οργανίδια που συμμετέχουν στην πρωτεϊνσύνθεση. Οι ινοβλάστες συνθέτουν τις πρωτεΐνες των ινών του συνδετικού ιστού (κολλαγόνο, ελαστικές ίνες, κτλ.), τις δομικές γλυκοπρωτεΐνες και τις πρωτεογλυκάνες της θεμέλιας ουσίας. Έτσι, ελέγχουν τη σύσταση αλλά και την διατήρηση της ακεραιότητας αυτής. Όπως και άλλα κύτταρα του συνδετικού ιστού, οι ινοβλάστες προέρχονται από τα αρχέγονα μεσεγχυματικά κύτταρα. Η σύνθεση του εξωκυττάριου χώρου προσδιορίζει τις φυσικές ιδιότητες των συνδετικών ιστών. Με αυτόν τον τρόπο και ανάλογα με την θέση που εντοπίζονται στο σώμα παρατηρούνται και διαφορετικές μορφές των ινοβλαστών. Οι ενεργοποιημένοι ινοβλάστες ανιχνεύονται κατά την επούλωση τραυμάτων. Έχουν μεγάλο υποστρόγγυλο πυρήνα με εμφανές πυρήνιο, άφθονο κυτταρόπλασμα και μεγάλες επιμήκεις κυτταροπλασματικές αποφυάδες. Οι μυοϊνοβλάστες που παρουσιάζουν επιπροσθέτως συσταλτική δράση, διαδραματίζουν σημαντικό ρόλο στη συστολή και στην ελάττωση της έκτασης του σχηματιζόμενου ουλώδους ιστού. Στον λεμφικό ιστό και στο μυελό των οστών, όταν οι ινοβλάστες σχηματίζουν τις δικτυωτές ίνες λαμβάνουν αστεροειδές σχήμα με πολλές

διακλαδώσεις και ονομάζονται δικτυωτά κύτταρα. Τέλος ο όρος ινοκύτταρο αποδίδεται στα κύτταρα που παρουσιάζουν χαμηλή συνθετική δραστηριότητα, μικρό μέγεθος, ελάχιστο κυτταρόπλασμα και συρρικνωμένο βαθυχρωματικό πυρήνα. Τα ινοκύτταρα παρατηρούνται στους τένοντες και στον κερατοειδή χιτώνα του οφθαλμού.

Στα παρακάτω πειράματα χρησιμοποιήθηκαν δύο κυτταρικές σειρές ινοβλαστών:

- i. φυσιολογικοί ινοβλάστες ανθρώπου (ATCC<sup>®</sup> PCS-201-012<sup>TM</sup> )
- ii. φυσιολογικοί ινοβλάστες ποντικού NIH/3T3 (ATCC<sup>®</sup> CRL1658<sup>TM</sup> )

με θρεπτικό υλικό Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM) ενισχυμένο με 10% foetal bovine serum (FBS) και 1% αντιβιοτικό διάλυμα (Gentamycin, GIBCO, Invitrogen, Karlsruhe, Germany).



**Εικόνα 4.8:** Ενεργή ινοβλάστη (αριστερά) και ινοβλάστη σε φάση ηρεμίας (δεξιά). Παρουσιάζονται τα εξωτερικά μορφολογικά χαρακτηριστικά και η υπερμικροσκοπική δομή κάθε κυττάρου. Οι ενεργές ινοβλάστες που παρουσιάζουν έντονη πρωτεϊνοσύνθεση είναι πλουσιότερες σε μιτοχόνδρια, σταγονίδια λιπιδίων, συσκευή Golgi και αδρό ενδοπλασματικό δίκτυο, σε σύγκριση με τις ινοβλάστες που βρίσκονται σε φάση ηρεμίας (συχνά ονομάζονται ινοκύτταρα).

## 4.6.2 Κερατινοκύτταρα

Η εξωτερική επιφάνεια του δέρματος αποτελείται από κερατινοποιημένο πλακώδες επιθήλιο που ονομάζεται επιδερμίδα (εικόνα 4.9). Το πάχος της επιδερμίδας ποικίλλει ανάλογα με τις λειτουργικές δυνατότητες και τις επιδράσεις αφυδάτωσης στις οποίες υπόκειται. Τα κύτταρα που παράγονται με μίτωση στη βασική στιβάδα, κοντά στο χόριο της επιδερμίδας, υφίστανται μεταβολές ωρίμανσης όσον αφορά στην παραγωγή κερατίνης. Η εξωτερική κερατινοποιημένη στιβάδα αποπίπτει συνεχώς και αντικαθίσταται με προοδευτική μετακίνηση και ωρίμανση των κυττάρων της βασικής στιβάδας. Έτσι όλα τα κύτταρα αυτής της κυτταρικής σειράς περιγράφονται ως κερατινοκύτταρα. Γενικά ο ρυθμός μίτωσης στη βασική στιβάδα είναι ισοδύναμος με τον ρυθμό αποφολίδωσης της κερατίνης από την εξωτερική επιφάνεια. Στον άνθρωπο η διενέργεια ωρίμανσης ενός βασικού κυττάρου έως την αποφολίδωση του διαρκεί από 25 έως 50 ημέρες, ενώ είναι ταχύτερη σε περιοχές που εκτίθενται σε έντονες δυνάμεις τριβής.

Οι φάσεις αυτής της δυναμικής διεργασίας αντικατοπτρίζονται στις πέντε ακόλουθες μορφολογικές στιβάδες:

Η βασική στιβάδα. Τα κύτταρα της βασικής στιβάδας έχουν σχήμα κυβοειδές ή χαμηλό κυλινδρικό και είναι προσκολλημένα στη βασική μεμβράνη με ημιδεσμοσώματα. Τα γειτονικά κύτταρα αυτής της στιβάδας συνδέονται μεταξύ τους με δεσμοσώματα. Τα βασικά κύτταρα έχουν στρογγυλούς ή ωοειδείς πυρήνες με ευδιάκριτα πυρήνια και το κυτταρόπλασμα τους είναι πλούσιο σε ριβοσώματα και μιτοχόνδρια. Σε μικρό βαθμό βρίσκονται τονοϊνίδια, καθώς και κοκκία μελανίνης και λυσοσώματα. Στα κύτταρα της βασικής στιβάδας παρατηρούνται μιώσεις, ενώ ανάμεσα τους βρίσκονται διάσπαρτα μελανοκύτταρα και κύτταρα Merkel.

Η ακανθωτή στιβάδα. Τα ακανθωτά κύτταρα έχουν πολυεδρικό σχήμα με κεντρικό στρογγυλό πυρήνα και ροδόχροο κυτταρόπλασμα. Βρίσκονται σε επαφή μεταξύ τους με ένα σύστημα μεσοκυττάρων γεφυρών που σχηματίζονται από μικρές κυτταροπλασματικές αποφυάδες της κυτταρικής επιφάνειας και καταλήγουν σε συνάψεις δεσμοσωμάτων. Το κυτταρόπλασμα των ακανθωτών κυττάρων περιέχει πολλά τονοϊνίδια και ωοειδείς κατασκευές, τα σωματίδια του ODLAND.

Η κοκκώδης στιβάδα. Τα κοκκώδη κερατινοκύτταρα περιέχουν μικρά ή ωοειδή βασίφιλα στρογγυλά σωματίδια (κοκκία κερατοϋαλίνης) που αποτελούνται από

πρωτεϊνικό υλικό, το οποίο περιέχει άφθονα αμινοξέα πλούσια σε θείο. Περιέχουν επίσης άφθονα τονοϊνίδια και σωμάτια Odland. Μετά την νέκρωση του πυρήνα και του κυτταροπλάσματος η κερατοϋαλίνη και τα τονοϊνίδια ενώνονται και σχηματίζουν την κερατίνη στιβάδα. Τα σωμάτια του Odland παράγουν ένα σύμπλοκο υδροφοβικού φωσφολιπιδίου το οποίο δρα ως συγκολλητική ουσία των φολίδων της κερατίνης.

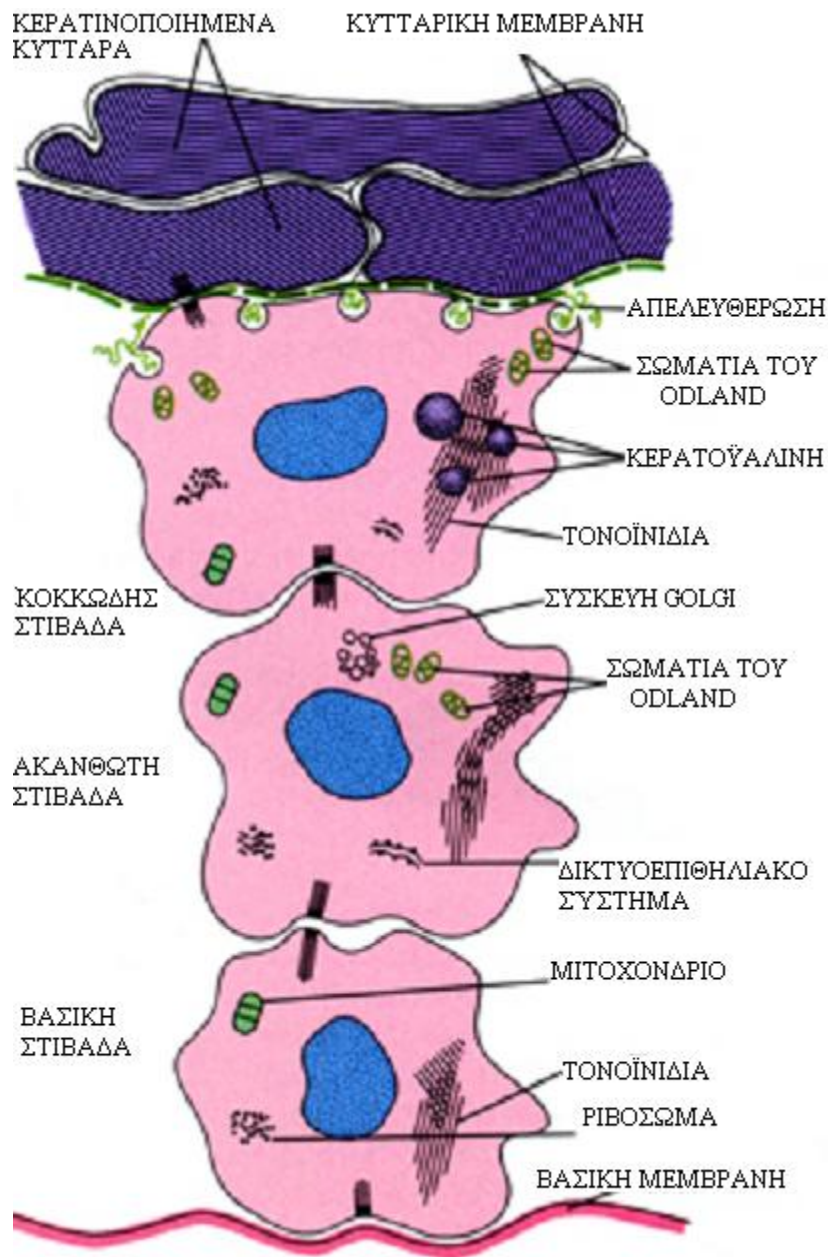
Η διαυγής στιβάδα. Είναι παρούσα μόνο σε εξαιρετικά παχύ δέρμα (παλάμες - πέλματα) και εμφανίζεται ως ομοιογενές στρώμα μεταξύ της κοκκιώδους και της κερατινοποιημένης στιβάδας.

Η κερατίνη στιβάδα. Αποτελείται από απύρηνα και πεπλατυσμένα κερατινοκύτταρα. Αυτά είναι αφυδατωμένα, περιέχουν κερατίνη η οποία διαθέτει ελαστικότητα, μηχανική αντοχή και ανθεκτικότητα στις χημικές επιδράσεις του περιβάλλοντος. Έτσι η σημασία της στιβάδας αυτής για την αμυντική λειτουργία του δέρματος είναι ουσιαστική. Από την επιφάνεια της κερατίνης συνεχώς απολεπίζονται κύτταρα. Η ομαλή λειτουργία της απολέπισης συμβάλλει στην ανανέωση της στιβάδας της κερατίνης, καθώς και στην απομάκρυνση μικροβίων και ουσιών.

Στα παρακάτω πειράματα χρησιμοποιήθηκε μία κυτταρικές σειρές κερατινοκυττάρων:

- i. φυσιολογικά επιδερμικά κερατινοκύτταρα ανθρώπου (ATCC® PCS-200-011™)

με θρεπτικό υλικό Keratinocyte Growth Kit (ATCC® PCS-200-011™) και 1% αντιβιοτικό διάλυμα (Gentamycin, GIBCO, Invitrogen, Karlsruhe, Germany).



**Εικόνα 4.9:** Κερατινοκύτταρα

## 4.7 Κυτταρική καλλιέργεια

Πριν την καλλιέργεια τα ικρίωματα και οι επιστρώσεις ακτινοβολούνταν με UV λάμπα για 2 ώρες για λόγους αποστείρωσης. Αρχικά τα κύτταρα αναπτύσσονταν σε 75% επικάλυψη της επιφάνειας καλλιέργειας και στην συνέχεια αποσπόντουσαν με την χρήση 0.05% trypsin/EDTA (GIBCO, Invitrogen, Karlsruhe, Germany). Έπειτα αραιώνονταν σε συγκέντρωση  $10^5$  κύτταρα/ml και μεταφέρονταν πάνω στα ικρίωματα και τις επιστρώσεις σε ειδικούς χώρους καλλιέργειας με συνθήκες 37°C και 5% CO<sub>2</sub>. Για τις πειραματικές ανάγκες τα κύτταρα καλλιεργήθηκαν από 1 έως 7 ημέρες. Όλα τα πειράματα πραγματοποιήθηκαν τουλάχιστον τρεις φορές.

## 4.8 Δοκιμασία κυτταρικής επιβίωσης

Για την ευκρινή διάκριση μεταξύ ζωντανών και νεκρών κυττάρων χρησιμοποιήθηκε το Live-Dead Cell Staining Kit (BioVision). Η συγκεκριμένη διαδικασία χρησιμοποιεί μια πράσινη φθορίζουσα χρωστική (Ex/Em = 488/518 nm), η οποία διαπερνά τα ζωντανά κύτταρα. Τα νεκρά κύτταρα χρωματίζονται κόκκινα με το *propidium iodide*, μία κόκκινη φθορίζουσα χρωστική (Ex/Em = 488/615) η οποία δεν διαπερνά τα ζωντανά κύτταρα. Στο τέλος της καλλιέργειας των κυττάρων (24, 72, 120 ή 168 ώρες), οι δομές και τα κύτταρα επωάζονταν με τις συγκεκριμένες χρωστικές στους 37°C για 15 λεπτά. Έπειτα τα κύτταρα παρατηρούνταν αμέσως στο μικροσκόπιο φθορισμού. Τα νεκρά και τα ζωντανά κύτταρα μπορούσαν τότε να διακριθούν χρησιμοποιώντας ένα φίλτρο band-pass (FITC, Rhodamine). Με αυτόν τον τρόπο τα κύτταρα απεικονίζονται πράσινα λόγω της πράσινης κυτταροδιαπερατής χρωστικής ενώ τα νεκρά απεικονίζονται κόκκινα λόγω της κόκκινης μη κυτταροδιαπερατής χρωστικής. Η παραπάνω διαδικασία ήταν ίδια για όλες τις κυτταρικές σειρές.

## 4.9 Ανοσοϊστοχημική διαδικασία

Για την διπλή χρώση της F-actin και της Vinculin χρησιμοποιήθηκε το focal adhesion staining kit (Chemicon International Inc., Temecula, CA, USA). Τα κύτταρα μονιμοποιήθηκαν με 4% παραφορμαλδεΐδη για 15 λεπτά και έγιναν διαπερατά με την χρήση 0.1% Triton X-100 (Merck KGaA, Darmstadt, Germany) σε PBS για 3-5 λεπτά σε πάγο. Η actin και τα σημεία εστιακής πρόσδεσης χρωματίστηκαν, επωάζοντας τα κύτταρα σε διάλυμα φραγμού με πρωτογενές αντίσωμα (anti-vinculin) (1:200) για 1 ώρα και στην συνέχεια σε δευτερογενές αντίσωμα (1:200) (mouse-anti-mouse FITC conjugate) (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Munich, Germany) για 45 λεπτά με ταυτόχρονη επώαση με tetramethyl rhodamine isothiocyanate-conjugated phalloidin. Τέλος τα δείγματα ξεπλύθηκαν με PBS και αποθηκεύτηκαν σε γλυκερόλη 10% σε σκοτεινό περιβάλλον. Η συνεστιακή μικροσκοπία έγινε με την χρήση του Zeiss AxioKop 2 plus laser scanning confocal microscope.

#### 4.10 Ηλεκτρονική μικροσκοπία σάρωσης

Τα παραγόμενα κατά τη διάρκεια της διατριβής πορώδη υλικά εξετάζονταν με ηλεκτρονικό μικροσκόπιο σάρωσης (scanning electron microscope, SEM). Εναλλακτικά το SEM μεταφράζεται, Σαρωτικό Μικροσκόπιο Ηλεκτρονίων, για να δοθεί έμφαση στην λέξη electron που αναφέρεται στη δέσμη ηλεκτρονίων που χρησιμοποιείται στο συγκεκριμένο τύπο μικροσκοπίου για το φωτισμό και τη δημιουργία του ειδώλου του αντικειμένου, σε αντίθεση με το οπτικό ή φωτονικό μικροσκόπιο όπου το είδωλο σχηματίζεται μέσω φακών από την αλληλεπίδραση του αντικειμένου με δέσμη φωτονίων.

Στα μικροσκόπια γενικά, μια μεγάλη μεγεθυντική ικανότητα δεν αποτελεί από μόνη της ικανή συνθήκη για την επιτυχή παρατήρηση/μεγέθυνση ενός αντικειμένου. Το φαινόμενο της περίθλασης επιβάλλει περιορισμό στην ελάχιστη απόσταση που μπορούν να απέχουν δύο σημεία (ή αντικείμενα) και να παραμένουν διακριτά. Η ελάχιστη αυτή απόσταση ονομάζεται διαχωριστική ή διακριτική ικανότητα του μικροσκοπίου και ορίζεται από την παρακάτω σχέση (Παναγιώτου 1998):

$$\delta = \lambda / [2n \cdot \eta\mu(\theta/2)] = \lambda / (2 \cdot A)$$

όπου:

$\delta$  είναι η διακριτική ικανότητα,



$\lambda$  είναι το μήκος κύματος της ακτινοβολίας που χρησιμοποιείται για το φωτισμό του αντικειμένου,

$n$  είναι ο δείκτης διάθλασης του μέσου που περιβάλλει το αντικείμενο,

$\theta$  είναι το γωνιακό άνοιγμα από το αντικείμενο στον αντικειμενικό φακό και

$A$  είναι το αριθμητικό άνοιγμα της φωτεινής δέσμης που προσπίπτει στον αντικειμενικό φακό

Παρατηρείται ότι η διακριτική ικανότητα εξαρτάται ευθέως ανάλογα από το μήκος κύματος της ακτινοβολίας που χρησιμοποιείται. Αυτός είναι και ο λόγος που στα ηλεκτρονικά μικροσκόπια η διακριτική ικανότητα είναι καλύτερη (μικρότερη) από την αντίστοιχη στα οπτικά (η δέσμη ηλεκτρονίων που χρησιμοποιείται έχει τάξεις μεγέθους μικρότερο  $\lambda$  από το αυτό του ορατού φωτός).

Η προσπίπτουσα δέσμη ηλεκτρονίων κατά τη διάρκεια σάρωσης του αντικειμένου αλληλεπιδρά με αυτό και παράγονται διάφορα σήματα όπως σκέδαση δευτερογενών ηλεκτρονίων και ακτίνων X. Τα σήματα αυτά μπορούν να ανιχνευτούν και να εμφανιστούν σε οθόνη σωλήνα καθοδικών ακτίνων.

Σε αντιστοιχία με τους φακούς που χρησιμοποιούνται για την εστίαση της δέσμης φωτονίων στα οπτικά μικροσκόπια, η εστίαση της δέσμης των ηλεκτρονίων επιτυγχάνεται με την εφαρμογή ηλεκτρομαγνητικών πεδίων. Στην παρούσα διατριβή χρησιμοποιήθηκε το μοντέλο JEOL 7000 field emission scanning electron microscope (15kV).



# **ΚΕΦΑΛΑΙΟ 5**

## **ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ**

## **5.1 Επιλογή του ιδανικού βιοενεργού υλικού με βάση την κυτταρική επιβίωση και ανάπτυξη των κυτταρικών σειρών**

Η χρήση τεχνολογικά καινοτόμων υλικών για την παρασκευή ικριωμάτων που χρησιμοποιούνται στην τεχνολογία ιστικών καλλιιεργειών αποζητά τον ενδεδλεχό έλεγχο της βιωσιμότητας και ανάπτυξης των κυτταρικών σειρών που αλληλεπιδρούν με το υπόστρωμα. Επιπλέον, ειδικές τεχνικές απαιτούνται για την εκτίμηση των χημικών και μηχανικών ιδιοτήτων των ικριωμάτων που επιτρέπουν την κυτταρική προσκόλληση και ανάπτυξη (Karageorgiou et al 2005, Caporali et al 2010). Ένα σημαντικό χαρακτηριστικό όσον αφορά τον τύπο και τις ιδιότητες των υποψήφιων υλικών καθορίζεται από τον κυτταρικό τύπο που θα αναπτυχθεί στις συγκεκριμένες επιφάνειες.

Στην παρούσα εργασία, NIH/3T3 ινοβλάστες ποντικού και κερατινοκύτταρα χρησιμοποιήθηκαν ως τυπικοί αντιπρόσωποι του συνεκτικού ιστού και της επιδερμίδας καθώς και σαν κυτταρικές σειρές που έχουν ευρέως χρησιμοποιηθεί και μελετηθεί. Οι συγκεκριμένοι ινοβλάστες έχουν χρησιμοποιηθεί επιτυχώς ως υποστρώματα για την καλλιέργεια κερατινοκυττάρων ως δερματικών αναλόγων στην θεραπεία ελκών και άλλων νοσημάτων cells (Prunieras et al 1983, Gomes et al 2003, Ma et al 2008) .

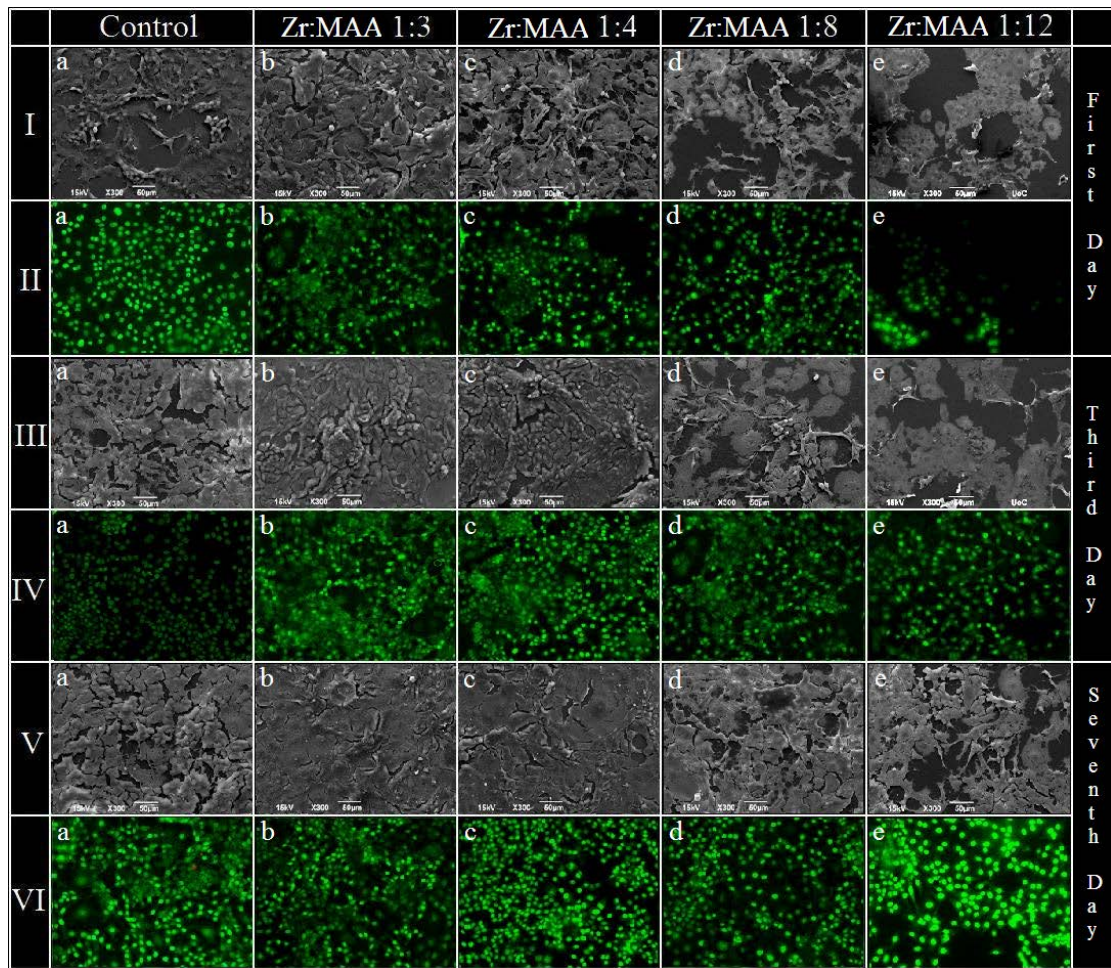
Τα βιοενεργά υλικά που χρησιμοποιήθηκαν στην συγκεκριμένη ερευνητική διαδικασία αρχικά εκτιμήθηκαν ανάλογα με την ικανότητα τους να υποστηρίξουν την κυτταρική επιβίωση και ανάπτυξη. Καλυπτρίδες με λεπτές επιστρώσεις κατασκευασμένες με βάση το Titanium και το Zirconium (πίνακας 5.1) μεταφέρθηκαν μέσα σε αποστειρωμένες πλάκες καλλιέργειας εικοσιτεσσάρων θέσεων και προστέθηκαν 2ml κυτταρικού διαλύματος, τα οποία καλλιιεργήθηκαν σε συνθήκες 37<sup>0</sup>C και 5% CO<sub>2</sub>.

SAMPLES	MOLAR RATIO			
	Zirconium n-propoxide	Titanium (IV) isopropoxide	MAA	MAPTMS
Ti 1:3		1	3	4
Ti 1:4		1	4	4
Ti 1:8		1	8	4
Ti 1:12		1	12	4
Zr 1:3	1		3	4
Zr 1:4	1		4	4
Zr 1:8	1		8	4
Zr 1:12	1		12	4

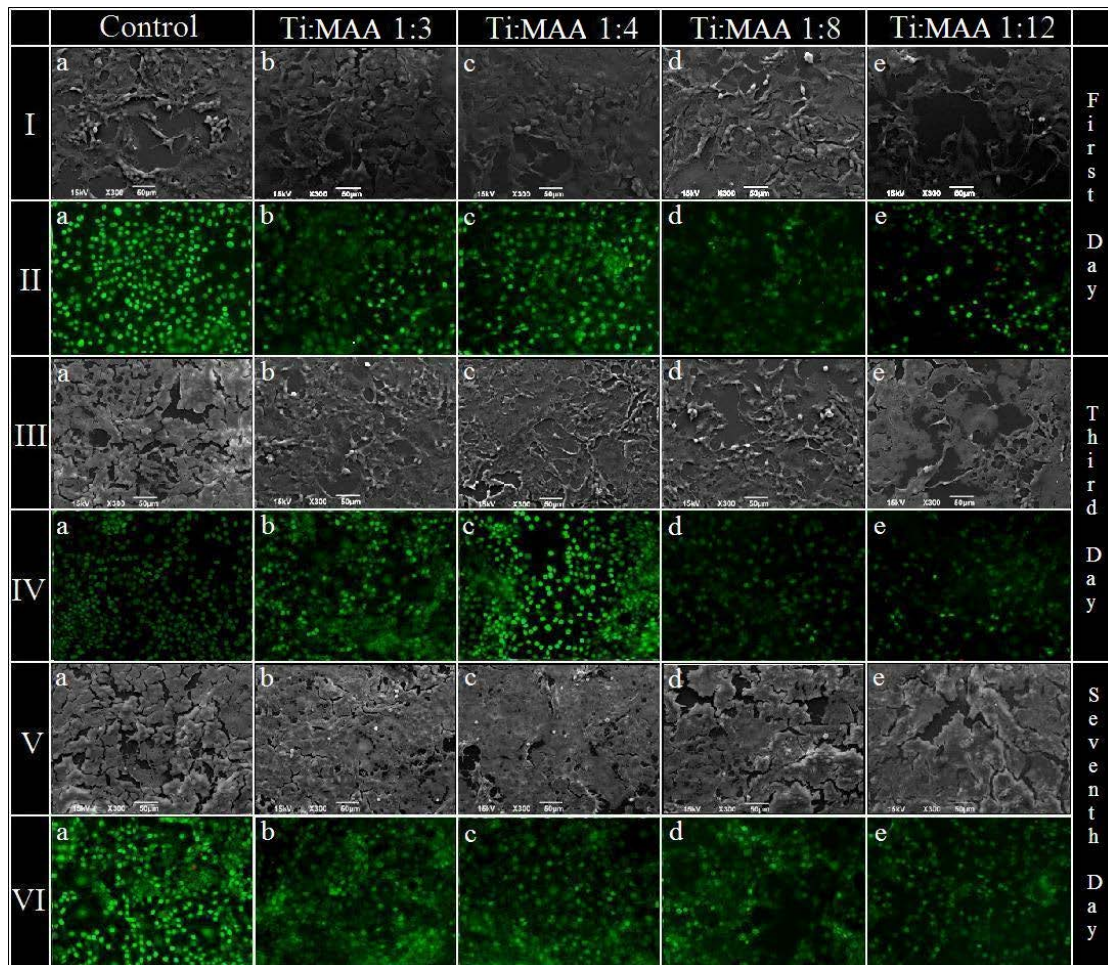
**Πίνακας 5.1:** Σύσταση των υβριδικών βιοϋλικών

Η κυτταρική επιβίωση εκτιμήθηκε μετά από μία, τρεις, πέντε και επτά ημέρες καλλιέργειας. Χρησιμοποιώντας μία φθορίζουσα χρωστική με δυνατότητα να διαπερνά το κυτταρικό τοίχωμα, τα υγιή κύτταρα παρουσιάστηκαν με πράσινη απόχρωση και παρουσίασαν πλήρη ανάπτυξη κυτταροπλασματικών αλληλεπιδράσεων (Εικόνα 5.1 II, IV, VI και Εικόνα 5.2 II, IV, VI). Τα νεκρά κύτταρα χρωματίστηκαν κόκκινα και μπορούσαν σπάνια να εντοπιστούν στις επιστρώσεις. Γι αυτό τον λόγο, οι κυτταρικές καλλιέργειες φάνηκε να ανέχονται πλήρως τα υβριδικά υλικά που ελέγχθηκαν, παρουσιάζοντας υψηλά επίπεδα κυτταρικής επιβίωσης και κυτταρικών αλληλεπιδράσεων.

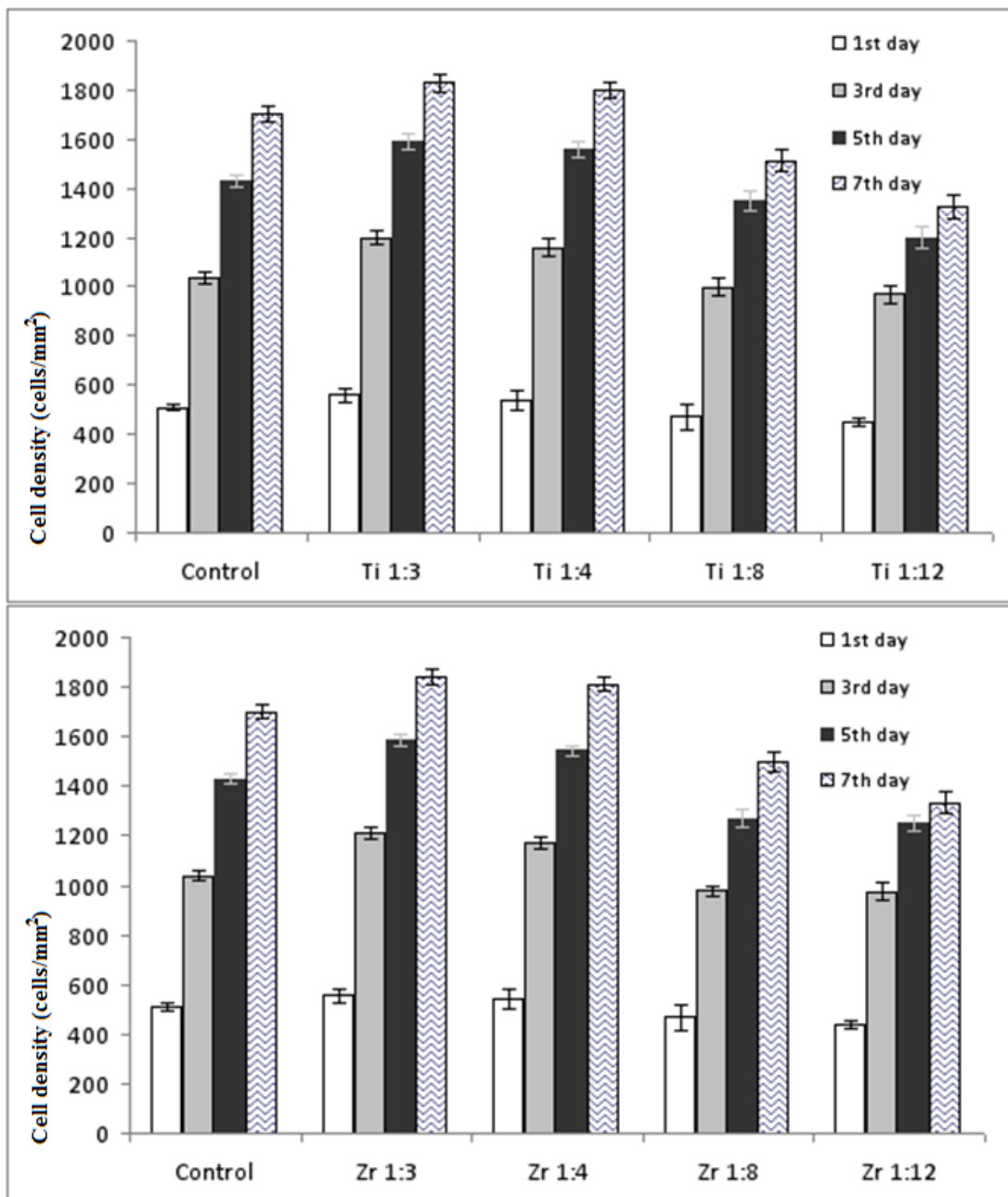
Η ανάλυση με το ηλεκτρονικό μικροσκόπιο (Εικόνες 5.1 και 5.2 : I, III, V) καθώς και η ανάλυση με οπτική μικροσκοπία (Εικόνες 5.1 και 5.2 : II, IV, VI) κατέστησαν δυνατή την επισκόπηση της ανάπτυξης των κυττάρων στις υβριδικές επιστρώσεις. Τα αποτελέσματα αποδεικνύουν ότι η σύσταση του υβριδικού υλικού (λόγος οργανικού/ανόργανου) επηρέασε σημαντικά την κυτταρική ανάπτυξη (Εικόνα 5.3). Η υπολογιζόμενη κυτταρική πυκνότητα (αριθμός κυττάρων ανά μονάδα επιφάνειας) στις επιστρώσεις των υβριδικών υλικών και στις γυάλινες επιφάνειες ελέγχου έδειξαν ότι παρόλο που οι δύο τύποι υβριδικών υλικών είχαν παρόμοια συμπεριφορά, η κυτταρική ανάπτυξη επηρεαζόταν αντίστροφα με την συγκέντρωση του MAA στις επιστρώσεις. Για όλα τα χρονικά διαστήματα επώασης που ελέγχθηκαν, υψηλότερες τιμές κυτταρικής πυκνότητας παρουσιάστηκαν στις επιστρώσεις αναλογίας Zr:MAA, Ti:MAA 1:3 και 1:4, προτείνοντας τα συγκεκριμένα υποστρώματα ως περισσότερο ευνοϊκά για τη κυτταρική ανάπτυξη. Έχοντας επίγνωση των συγκεκριμένων αποτελεσμάτων και λόγω της ευκολότερης μεθόδου παρασκευής του υβριδικού υλικού μέταλλο:MAA 1:3, η συγκεκριμένη αναλογία χρησιμοποιήθηκε παρακάτω για την κατασκευή των ικριωμάτων.



**Εικόνα 5.1:** Εικόνες ηλεκτρονικής μικροσκοπίας με κυτταρικές καλλιέργειες (Σειρές I, III, V, VII) και μικροσκοπίας φθορισμού ζωντανών (πράσινα) και νεκρών (κόκκινα) κυττάρων (Σειρές II, IV, VI, VIII) για την πρώτη, τρίτη και έβδομη μέρα καλλιέργειας σε επιφάνειες ελέγχου (a) και σε επιφάνειες με βάση το Zirconium (b-e). Η κλίμακα σε όλες τις εικόνες είναι 50µm.



**Εικόνα 5.2:** Εικόνες ηλεκτρονικής μικροσκοπίας με κυτταρικές καλλιέργειες (Σειρές I, III, V, VII) και μικροσκοπίας φθορισμού ζωντανών (πράσινα) και νεκρών (κόκκινα) κυττάρων (Σειρές II, IV, VI, VIII) για την πρώτη, τρίτη και έβδομη μέρα καλλιέργειας σε επιφάνειες ελέγχου (a) και σε επιφάνειες με βάση το Titanium (b-e). Η κλίμακα σε όλες τις εικόνες είναι 50µm.



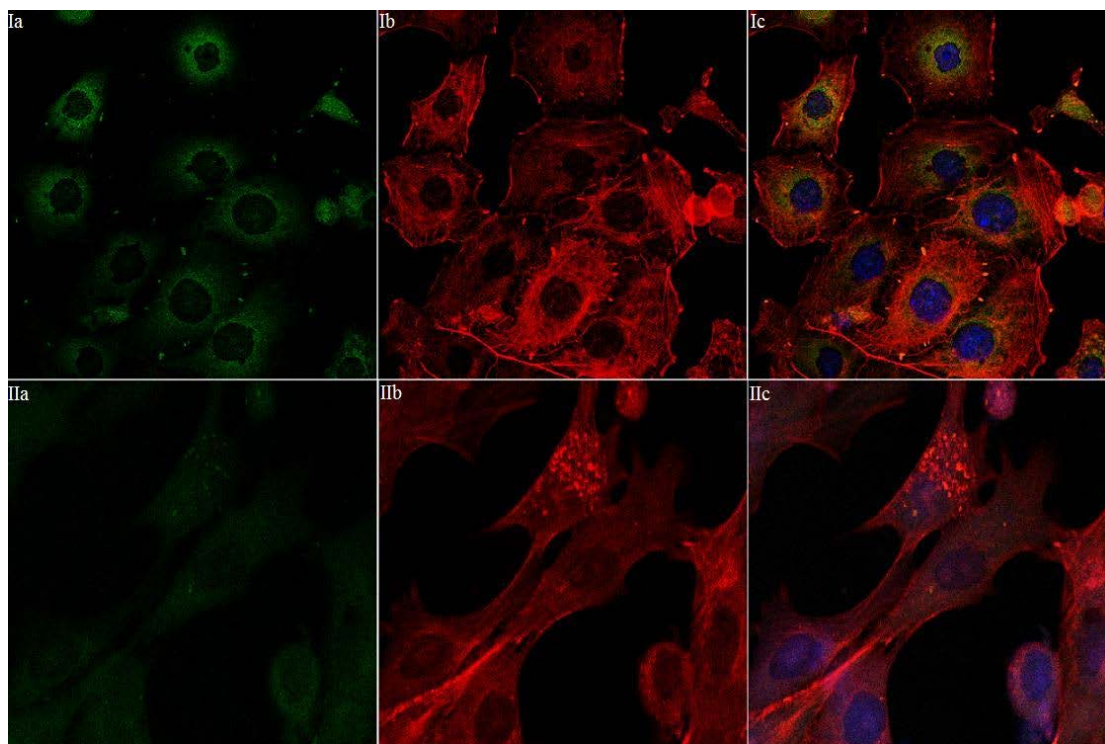
**Εικόνα 5.3:** Ποσοτικοποίηση της κυτταρικής ανάπτυξης στα διάφορα υλικά. Αναπαριστάται η κυτταρική πυκνότητα (αριθμός κυττάρων ανά μονάδα επιφανείας  $\text{mm}^2$ ) σε όλες τις επιστρώσεις για την πρώτη, τρίτη, πέμπτη και έβδομη ημέρα. Ως επιφάνειες ελέγχου χρησιμοποιήθηκε γυαλί. Όλα τα πειράματα πραγματοποιήθηκαν τρεις φορές και οι τιμές της κυτταρικής πυκνότητας αντιπροσωπεύουν την μέση τιμή  $\pm$  SD.



## 5.2 Επιλογή του βιοενεργού υλικού με βάση την ανάπτυξη των κυτταρικών αλληλεπιδράσεων

Έχοντας ως δεδομένο ότι το προτεινόμενο βιοενεργό υλικό έχει ως στόχο την φιλοξενία και την ανάπτυξη κυτταρικών σειρών, είναι σημαντικό να μελετήσουμε ενδελεχώς την μορφολογία του κυττάρου σε όλες τις φάσεις ανάπτυξης του, τις αλληλεπιδράσεις μεταξύ του κυττάρου και του υποστρώματος καθώς και τον τρόπο λειτουργίας της διακυτταρικής επικοινωνίας. Τα προσκολλημένα κύτταρα παρουσιάζουν μεγάλη ευαισθησία στην τοπογραφία του περιβάλλοντος σε κλίμακα νανομέτρων, χρησιμοποιώντας τις κυτταρικές προσεκβολές ως αισθητήρες για την χαρτογράφηση του σημείου πρόσδεσης (Andersson al 2003). Για τον λόγο αυτό το επίπεδο των αλληλεπιδράσεων μεταξύ προσεκβολών και υλικού θα μπορούσε να υποδείξει τον δείκτη γονιμότητας των διερευνούμενων υβριδικών υλικών σε σχέση με τις κυτταρικές σειρές που μελετώνται. Στην συγκεκριμένη ερευνητική διαδικασία, τεχνικές ανοσοϊστοχημείας διαγράφουν τον κυτταροσκελετό και της σημεία εστιακής προσκόλλησης του κυττάρου. Πιο συγκεκριμένα η Vinculin είναι μία μεμβράνη του κυτταροσκελετού στα σημεία εστιακής πρόσδεσης του κυττάρου που συμμετέχει στην προσκόλληση της integrin με την actin του κυτταροσκελετού (Burridge et al 1988). Αυτή η πρωτεΐνη σχετίζεται με την διακυτταρική πρόσδεση αλλά και με την αλληλεπίδραση μεταξύ του κυττάρου και της θεμέλιας ουσίας καθώς θεωρείται ότι λειτουργεί ως άγκυρα της F-actin με την κυτταρική μεμβράνη. Γι αυτό το λόγο ο εντοπισμός της Vinculin θα υποδήλωνε άμεσα την προσκόλληση των κυττάρων στις μελετώμενες επιστρώσεις. Με απώτερο στόχο την απόδειξη του παραπάνω ισχυρισμού τα κύτταρα καλλιεργήθηκαν για πέντε ημέρες πάνω σε ειδικά διαμορφωμένες επιστρώσεις υβριδικών υλικών και στην συνέχεια επεξεργάστηκαν με τεχνικές ανοσοϊστοχημείας χρησιμοποιώντας ένα συγκεκριμένο μονοκλωνικό αντίσωμα προσδεμένο στο FITC. Με την χρήση συνεστιακής μικροσκοπίας εντοπίστηκαν μόρια Vinculin στις άκρες των φιλοποδίων οι οποίες αλληλεπιδρούσαν με τις επιστρώσεις που περιείχαν είτε titanium είτε zirconium (Εικόνες 5.4a και 5.4b αντίστοιχα). Η συγκεκριμένη μεμβρανική έκφραση της Vinculin πρότεινε την ύπαρξη ισχυρών αλληλεπιδράσεων ανάμεσα στο κύτταρο και το υπόστρωμα με τελική διαπίστωση την ισχυρή πρόσδεση των κυττάρων και την επιτυχή τους καλλιέργεια πάνω στα υβριδικά υλικά.

Επιπλέον η μορφολογία του κυτταροσκελετού μελετήθηκε αναλύοντας την κατανομή της actin στις κυτταρικές καλλιέργειες. Μόρια actin, τα οποία αποτελούνταν από διπλές αλυσίδες, εντοπίζονται κυρίως κάτω από την κυτταρική μεμβράνη και είναι υπεύθυνα για την αντίσταση της τάσης, την διατήρηση του κυτταρικού σχήματος και τον σχηματισμό κυτταρικών προσεκβολών όπως τα ψευδοπόδια (Rotsch et al 2000, Trickey et al 2004, Hansen et al 2007). Στα συγκεκριμένα πειράματα η χρήση της τοξίνης phalloidin επέτρεψε την απεικόνιση της actin και κατ' επέκταση της κυτταρικής ανάπτυξης και της αλληλεπίδρασης με το υπόστρωμα. Ο εντοπισμός της κατανομής της actin στο κυτταρόπλασμα επέτρεψε την ακριβή μελέτη της μορφολογίας του κάθε κυττάρου καθώς και της ποιότητας της διακυτταρικής επικοινωνίας και της πρόσδεσης κυττάρων και υποστρώματος titanium και zirconium (Εικόνα 5.4a και 5.4b). Ο σχηματισμός ενός πλήρους δικτύου κυτταροσκελετού ανέδειξε ότι τα κύτταρα αλληλεπιδρούν πλήρως με τις υποκείμενες υβριδικές επιστρώσεις. Η ανάλυση με την χρήση συνεστιακής μικροσκοπίας απέδειξε την ανάπτυξη ενός μικροϊνώδους δικτύου που υποδεικνυε την ισχυρή αλληλεπίδραση κυττάρων και υβριδικών επιφανειών (Εικόνα 5.4).



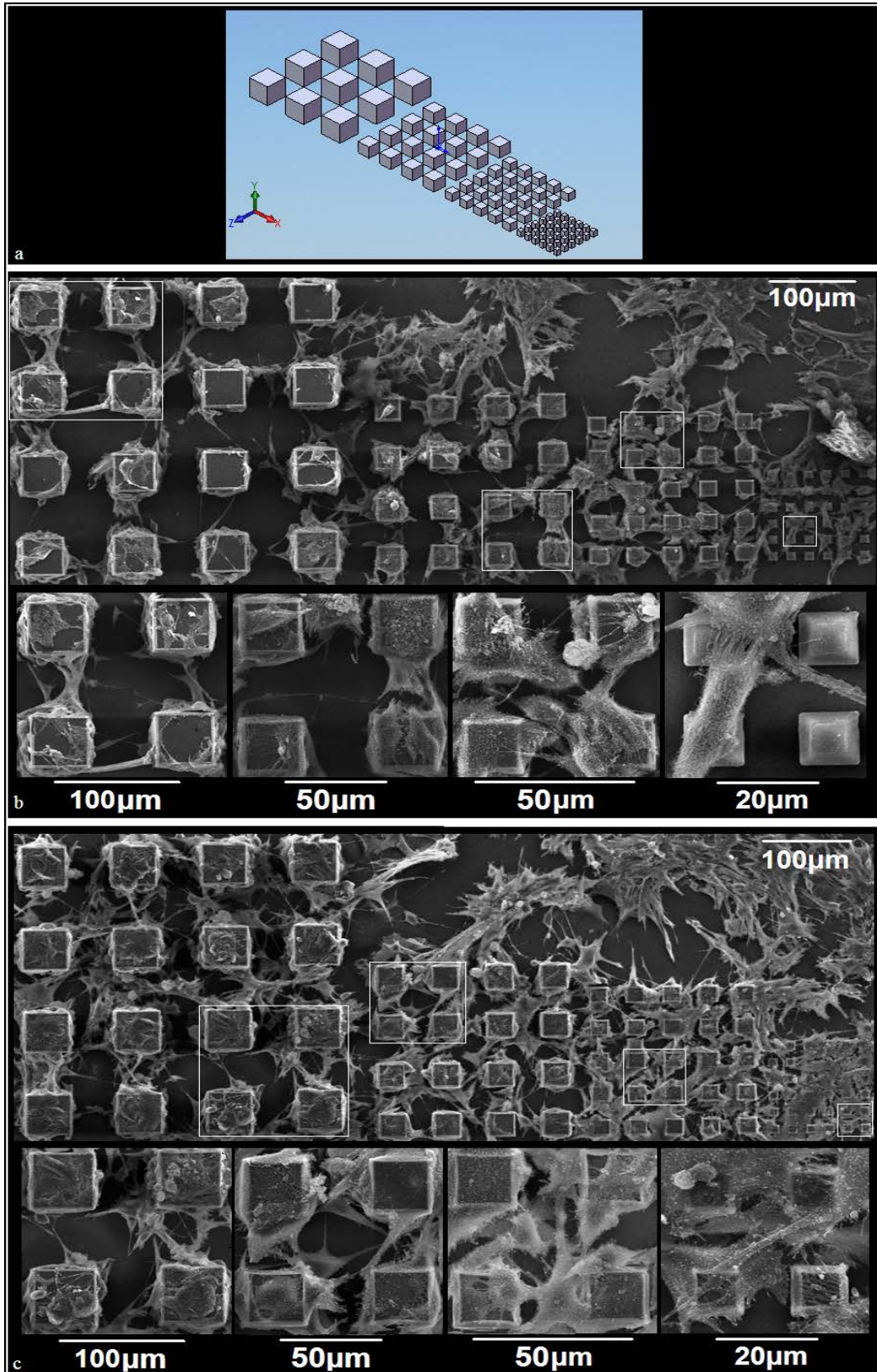
**Εικόνα 5.4:** Απεικόνιση με τεχνικές ανοσοϊστοχημείας Vinculin και actin σε κυτταρικές καλλιέργειες που καλλιιεργήθηκαν σε βιοενεργά υλικά. Οι εικόνες από το συνεστιακό μικροσκόπιο δείχνουν την κατανομή της Vinculin (πράσινο) και της actin (κόκκινο) σε κυτταρικές καλλιέργειες 3 ημερών σε επιστρώσεις με βάση το Titanium

(I) και με βάση το Zirconium (II). Οι πυρήνες έχουν χρωματιστεί μπλε με TO-PRO-3 dye.

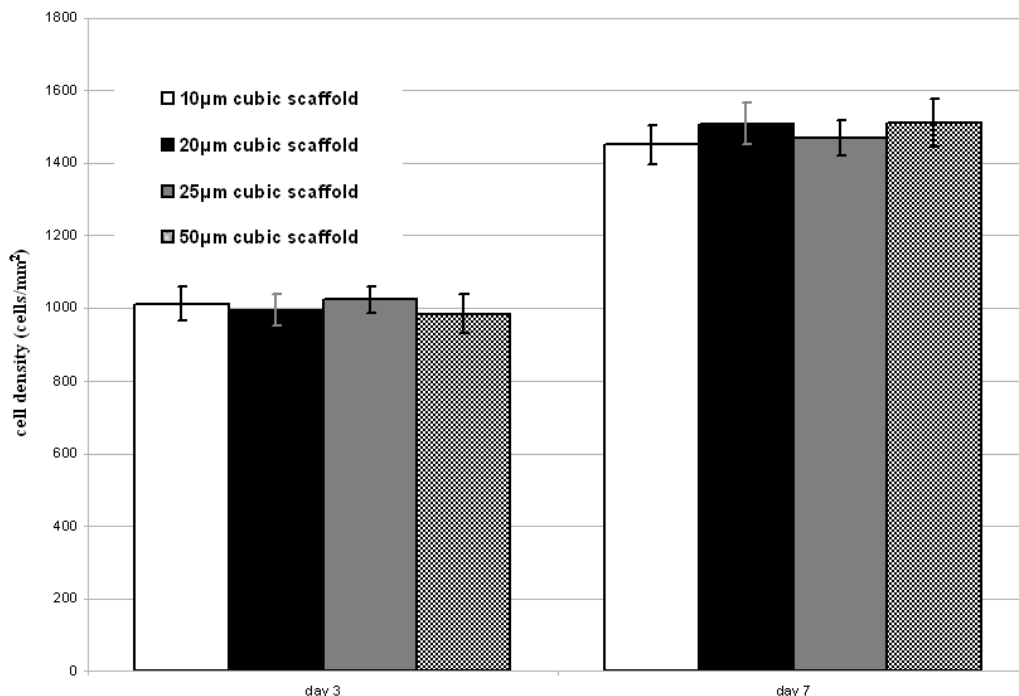
### **5.3 Μελέτη της δυνατότητας κυτταρικών καλλιιεργειών πάνω σε συμπαγή υβριδικά κυβικά ικρίώματα.**

Τα συμπαγή υβριδικά κυβικά ικρίώματα κατασκευάστηκαν με την μέθοδο του διφωτονικού πολυμερισμού (Ovsianikov, Viertl et al. 2008; Sakellari, Gaidukeviciute et al. 2010). Οι τρισδιάστατοι κύβοι επιλέχθηκαν ως κατασκευή αυθαίρετα με στόχο να αυξήσουν την επιφάνεια καλλιέργειας. Το σχήμα τους και το μέγεθος τους διαφοροποιείται συστηματικά με σκοπό να διερευνηθεί η χωρική τοπογραφία με την κυτταρική ανάπτυξη (Εικόνα 5.5a). Όπως παρουσιάστηκε παραπάνω, η ιδανική αναλογία οργανικής και ανόργανης σύνθεσης του βιοϋλικού όσον αφορά την κυτταρική επιβίωση είναι  $Ti:MAA = 1:3$  και  $Zr:MAA = 1:3$ . Οι συγκεκριμένες αναλογίες ήταν αυτές που χρησιμοποιήθηκαν για την κατασκευή των υβριδικών κύβων. Τα συγκεκριμένα ικρίώματα τοποθετήθηκαν πάνω στην ίδια πλάκα καλλιέργειας ώστε να διατηρηθούν σταθερές οι συνθήκες της πειραματικής διαδικασίας και να μειωθούν στο ελάχιστο οι διαφοροποιήσεις της κυτταρικής πυκνότητας και των διακυτταρικών αλληλεπιδράσεων. Οι κύβοι που κατασκευάστηκαν με διαφορετικό μήκος ακμής, καλύφθηκαν από κύτταρα και καλλιιεργήθηκαν για τρεις ημέρες. Μετά το πέρας της καλλιέργειας, τα κύτταρα αφυδατώθηκαν, μονιμοποιήθηκαν και παρατηρήθηκαν με την βοήθεια του ηλεκτρονικού μικροσκοπίου. Από το συγκεκριμένα πειράματα προέκυψε ότι οι κύβοι που η σύσταση τους βασίζεται σε υβριδικά υλικά με βάση το Titanium και το Zirconium (Εικόνα 5b και 5c αντίστοιχα) αύξησαν της επιφάνεια καλλιέργειας χωρίς να επηρεάσουν την κυτταρική ανάπτυξη και προσκόλληση. Σε μεγαλύτερες μεγεθύνσεις παρατηρείται ότι τα κύτταρα χρησιμοποιώντας τις προσεκβολές τους προσδέθηκαν στενά με τις πλευρικές επιφάνειες των κυβικών κατασκευών και διαμόρφωσαν γέφυρες επικοινωνίας ανάμεσα σε γειτονικές δομές με αποτέλεσμα να εκμεταλλευτούν πλήρως την αύξηση της επιφάνειας της κυτταρικής καλλιέργειας (Εικόνα 5.5b και 5.5c). Η ποσοτικοποίηση των αποτελεσμάτων απέδειξε ότι οι μικροκύβοι δύναται να χρησιμοποιηθούν ως μέθοδος επέκτασης της επιφάνειας

ανάπτυξης των κυττάρων ανεξαρτήτως του μεγέθους της ακμής του κάθε ικριώματος (εικόνα 5.6).



**Εικόνα 5.5:** Υψηλής μεγέθυνσης εικόνες ηλεκτρονικού μικροσκοπίου κυτταρικών καλλιέργειών πάνω σε επιστρώσεις υβριδικού titanium (b) και zirconium (c) μετά από 3 ημέρες καλλιέργειας. Ηλεκτρονικό σχέδιο των ικριωμάτων (a).

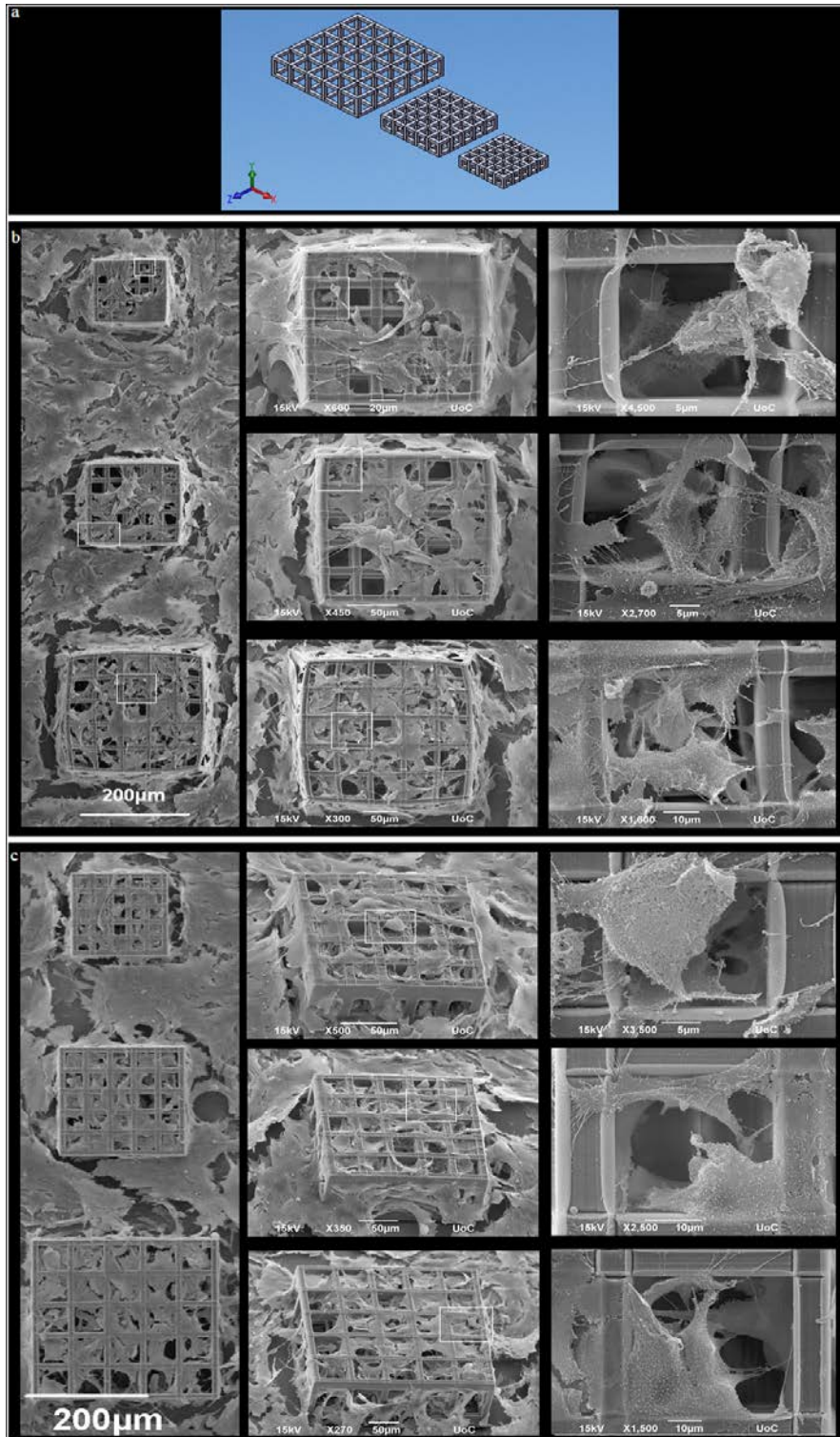


**Εικόνα 5.6:** Κυτταρική πυκνότητα πάνω στα συμπαγή κυβικά ικριώματα (αριθμός κυττάρων ανά  $\text{mm}^2$ ). Ο αριθμός των κυττάρων ανά μονάδα επιφανείας παρουσιάζεται ανεξάρτητος από τις διαστάσεις της δομής (x axis) ή τον τύπο του υβριδικού υλικού. Όλα τα πειράματα πραγματοποιήθηκαν τρεις φορές και οι τιμές της κυτταρικής πυκνότητας αντιπροσωπεύουν την μέση τιμή  $\pm$  SD.

Βασιζόμενοι στην παρατηρούμενη κυτταρική ανάπτυξη και μορφολογία, ο συγκεκριμένος τύπος ικριώματος προσφέρει ισχυρή στήριξη ενώ παράλληλα αυξάνει την δυνητική επιφάνεια καλλιέργειας χωρίς να εμποδίζει την κυτταρική ανάπτυξη. Τέτοιου είδους ικριώματα μπορούν να χρησιμοποιηθούν ως εμφυτεύματα στους περισσότερους συμπαγείς ιστούς όπως είναι τα οστά ή σε καλλιέργειες που απαιτούν ισχυρή μηχανική στήριξη λόγω της ανάπτυξης σε πολλά επίπεδα όπως η επιδερμίδα και τα ανάλογα δέρματος (Shikinami et al 2006, Yang et al 2010). Μολαταύτα, η ύπαρξη δυνητικών πόρων σε όλους τους ανθρώπινους ιστούς, ακόμη και στα οστά, οδήγησε στην μελέτη δόμησης πορώδων κατασκευών.

## **5.4 Μελέτη της δυνατότητας κυτταρικών καλλιιεργειών πάνω σε πορώδη υβριδικά ικρίώματα.**

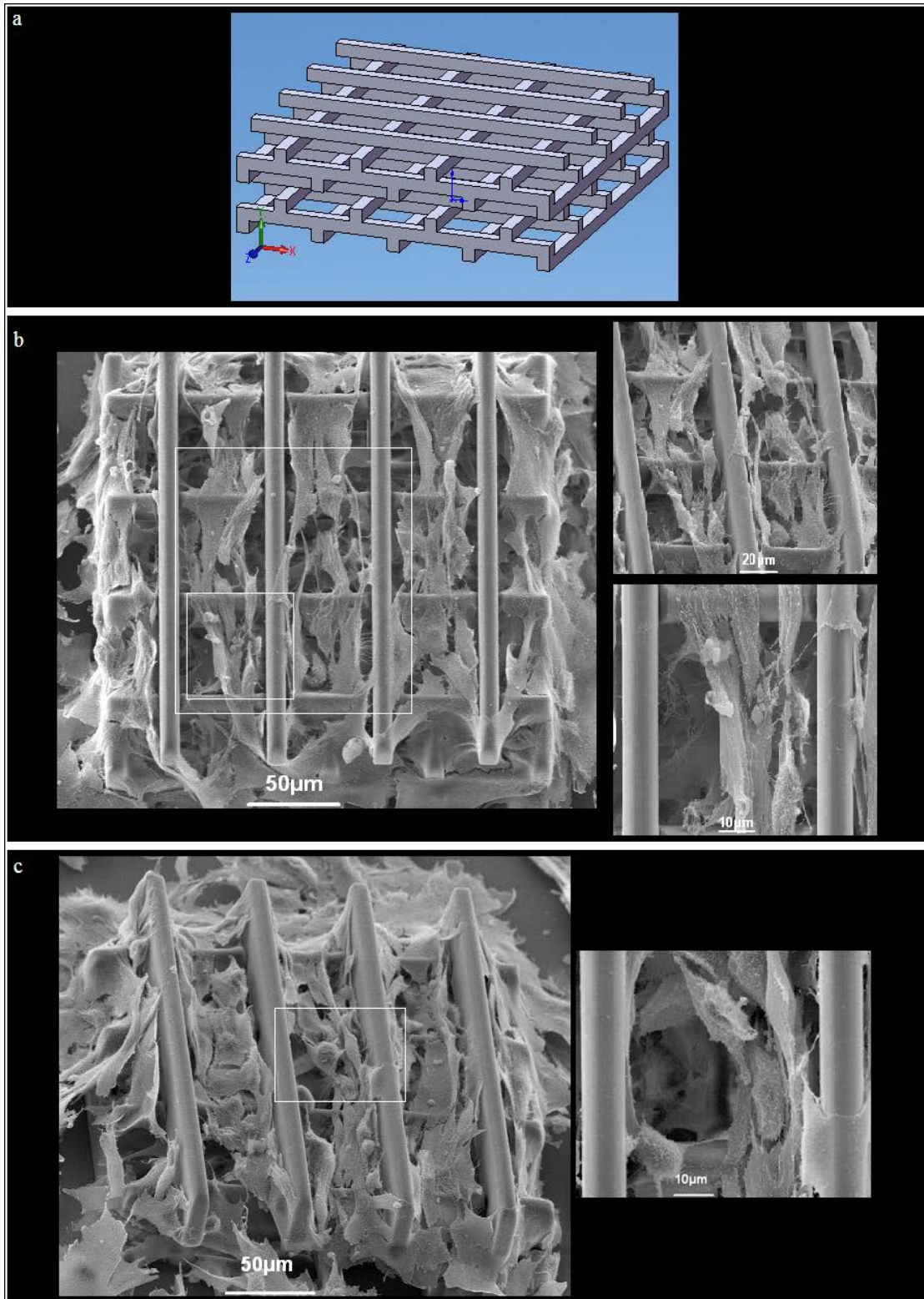
Η ύπαρξη δυνητικών πόρων είναι ένα από τα κυριότερα χαρακτηριστικά των περισσότερων ιστών. Επομένως η κατασκευή πορώδων ικρίωμάτων αποτελεί μία καινοτόμο ιδέα η οποία απαιτεί την ενδελεχή μελέτη θεωρητικών μοντέλων που θα μπορούσαν με περισσή άνεση να φιλοξενήσουν κυτταροκαλλιέργειες. Τρία διαφορετικά μεγέθη πόρων χρησιμοποιήθηκαν για τις συγκεκριμένες δομές που είχαν ως βάση της σύστασή τους υβριδικά υλικά zirconium και titanium. Το μέγεθος τους ήταν 20, 30 και 50  $\mu\text{m}$  και η πορότητα τους ήταν αντίστοιχα 0.625, 0.755 και 0.873 (Εικόνα 5.7a). Ακολουθώντας πιστά το προαναφερόμενο πρωτόκολλο καλλιέργειας, τα κύτταρα παρατηρήθηκαν χρησιμοποιώντας τεχνικές ηλεκτρονικού μικροσκοπίου. Στην περίπτωση αυτή, τα κύτταρα μετανάστευσαν επιτυχώς μέσα στα ικρίωματα τόσο σε αυτά που είχαν ως βάση το Zirconium όσο και σε αυτά που είχαν ως βάση το Titanium (Εικόνα 5.7b και 5.7c), ανεξαρτήτως μεγέθους. Πιο συγκεκριμένα ανέπτυξαν ένα πλήρες δίκτυο προσεκβολών και κυτταρικής ανάπτυξης, επιτρέποντας και την διακυτταρική επικοινωνία αλλά και την αλληλεπίδραση μεταξύ κυττάρων και υποστρώματος. Οι πόροι με την μεγαλύτερη διατομή διευκόλυναν την ανάπτυξη τρισδιάστατων καλλιιεργειών στα ενδότερα τμήματα της κατασκευής, γεγονός που μπορεί να συμβάλει στην ευκολότερη διαστρωμάτωση των καλλιιεργειών σε περιπτώσεις πολλαπλών κυτταρικών σειρών (Εικόνα 5.7).



**Εικόνα 5.7:** Εικόνες ηλεκτρονικού μικροσκοπίου από τρισδιάστατες κυτταρικές καλλιέργειες πάνω σε υβριδικά ικρίωματα κατασκευασμένα με βάση το titanium (b) και το zirconium (c). Διάρκεια καλλιέργειας τρεις ημέρες. Ηλεκτρονικό σχέδιο των ικρίωμάτων (a).

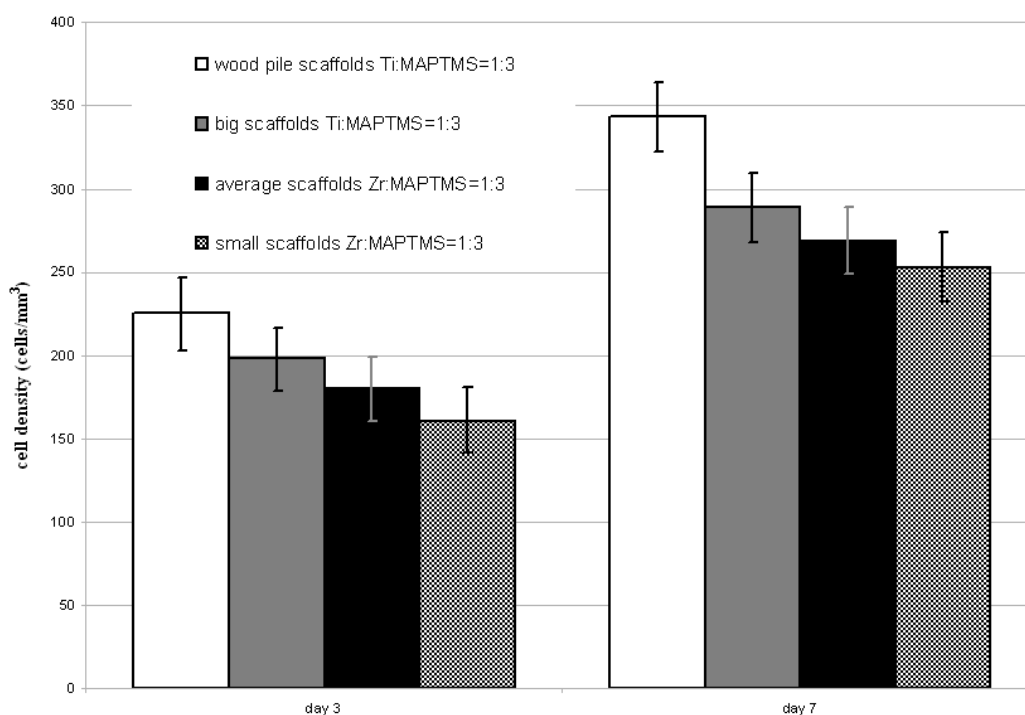
Επιπρόσθετα κατασκευάστηκαν δομές με την μορφή ξύλινης παλέτας, οι οποίες αποτελούνταν από διασταυρούμενες μονοδιάστατες ράβδους που ακολουθούσαν μία επιλεγμένη αλληλουχία θέσης στον χώρο η οποία επαναλαμβανόταν κάθε τέσσερα επίπεδα (Εικόνα 5.8a). Με αυτήν την κατασκευή είχαμε μία αύξηση της πορότητας του ικριώματος στο 0,895. Στην περίπτωση αυτή τα κύτταρα προσδένονταν στα ελεύθερα άκρα του ικριώματος τα οποία λειτουργούσαν ως άγκυρες για την μετανάστευση των κυττάρων στις τρισδιάστατες δομές (Εικόνα 5.8b και 5.8c). Ομοίως με τις παραπάνω πειραματικές διαδικασίες, τα κύτταρα αναπτύχθηκαν πλήρως εντός των ικριωμάτων και ανέπτυξαν προσεκβολές οι οποίες διευκόλυναν την πρόσδεση τους στις δομές και στην ψηλάφηση της περιβάλλουσας τοπογραφίας (Εικόνα 5.8b και 5.8c).





Εικόνα 5.8: Εικόνες ηλεκτρονικού μικροσκοπίου από τρισδιάστατες κυτταρικές καλλιέργειες πάνω σε υβριδικά ικρίωματα δίκην παλέτας ξύλου κατασκευασμένα με βάση το titanium (b) και το zirconium (c). Διάρκεια καλλιέργειας τρεις ημέρες. Ηλεκτρονικό σχέδιο των ικριωμάτων (a).

Τα πορώδη ικρίώματα μπορούν να μιμηθούν δομές του οργανισμού και μπορούν να φιλοξενήσουν έναν μεγάλο αριθμό διαφορετικών κυτταρικών σειρών (Mittal et al 2010, Feng et al 2011). Ο εποικισμός των συγκεκριμένων κατασκευών από ινοβλάστες και κερατινοκύτταρα που θα μπορούσαν να αποτελέσουν ανάλογα δέρματος θα μπορούσε να χρησιμοποιηθεί στην επούλωση ελκών ή και χειρουργικών τραυμάτων. Η ανάπτυξη αναλόγων μοσχευμάτων μυελού των οστών και ο εποικισμός τους από αρχέγονα κύτταρα θα μπορούσε να χρησιμοποιηθεί στην αιμοποίηση και στην οστεοβλαστική διαφοροποίηση. Τα ικρίώματα με τους μεγαλύτερους πόρους διευκολύνουν την προσπέλαση των κυττάρων στο εσωτερικό τους. Η ποσοτικοποίηση των αποτελεσμάτων ανέδειξε ότι τα πορώδη ικρίώματα δίκην παλέτας μπορούν να φιλοξενήσουν τον μεγαλύτερο αριθμό κυττάρων ανά μονάδα όγκου, ενώ οι πορώδεις δομές με την μικρότερη διατομή πόρων φιλοξενούν τον μικρότερο (Εικόνα 5.9).



**Εικόνα 5.9:** Ποσοτικοποίηση της κυτταρικής πυκνότητας στα πορώδη ικρίώματα. Η καταμέτρηση του συνολικού αριθμού των κυττάρων (κύτταρα/mm<sup>3</sup>) απέδειξε ότι τα ικρίώματα δίκην παλέτας ξύλου μπορούν να φιλοξενήσουν μεγαλύτερο αριθμό κυττάρων συγκριτικά με τα υπόλοιπα. Όλα τα πειράματα πραγματοποιήθηκαν τρεις φορές και οι τιμές της κυτταρικής πυκνότητας αντιπροσωπεύσουν την μέση τιμή ± SD.

Το αποτέλεσμα αυτό υποδηλώνει ότι η μορφολογία του ικριώματος επηρεάζει την κυτταρική ανάπτυξη σε τρισδιάστατες κατασκευές. Συμπερασματικά οι συγκεκριμένες μετρήσεις καταδεικνύουν ότι δεν υπάρχει συσχέτιση των κυττάρων και του τύπου των υλικών (Zirconium ή Titanium). Παρόλα αυτά, ανάλογα με το ανάλογο του επιθυμητού ιστού μπορούν να παρασκευαστούν περισσότερο πολύπλοκα ικριώματα που να προσιδιάζουν στις ιδιαιτερότητες του κάθε οργάνου.



# **ΚΕΦΑΛΑΙΟ 6**

## **ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ**

## 6. Συμπεράσματα

Η σύνθεση και η επεξεργασία των βιοϋλικών που οδηγεί στην δημιουργία πλήρως λειτουργικών οργάνων απαιτεί την εις βάθος γνώση των αλληλεπιδράσεων μεταξύ του ζωντανού ιστού και των υλικών (Chen et al 2007). Για τον λόγο αυτό η μελέτη της πολυπλοκότητας της διεπιφάνειας μεταξύ του κυττάρου και του βιοϋλικού απαιτεί μια σημαντική διεργασία κατανόησης (Chevallay 2000, Wang et al 2005).

Η παρούσα διδακτορική διατριβή διερεύνησε συστηματικά τις αλληλεπιδράσεις μεταξύ των υβριδικών βιοϋλικών με βάση το Titanium και το Zirconium με τους ινοβλαστών και τα κερατινοκύτταρα. Πιο συγκεκριμένα αποδείχτηκε ότι οι παραπάνω κυτταρικές σειρές αναπτύχθηκαν σε πλήρη κλίμακα και διατήρησαν τις μορφολογικές τους ιδιότητες σε υποστρώματα με αναλογία μετάλλου : οργανικού 1:3. Η χρήση του διφωτονικού πολυμερισμού στην παρασκευή των υβριδικών δομών επέτρεψε την κατασκευή τρισδιάστατων ικριωμάτων με προσαρμόσιμο μέγεθος και σχήμα για χρήση στην μηχανική ιστών. Η χρήση του femtosecond laser και του διφωτονικού πολυμερισμού παρουσιάζει διακριτά πλεονεκτήματα σε σχέση με τις άλλες τεχνικές καθώς:

α) επιτρέπει υψηλό επίπεδο εστίασης και δυνατότητα κατασκευής σε κλίμακα νανομέτρων με μεγάλη ανάλυση γεγονός πολύ σημαντικό συγκριτικά με το μέγεθος του κυττάρου

β) μπορεί να εφαρμοστεί στην επεξεργασία ενός μεγάλου εύρους υλικών

γ) είναι ταχύτατο, εύκολα προσαρμόσιμο και έχει δυνατότητα παράλληλης επεξεργασίας

δ) δεν απαιτεί επαφή με αποτέλεσμα να πραγματοποιούνται χειρισμοί ακόμα και με ευαίσθητα υλικά όπως τα βιολογικά μακρομόρια και ζωντανά κύτταρα χωρίς απώλεια της βιοενεργότητας τους (Stratakis et al 2009).

Η κυτταρική προσκόλληση φαίνεται να προάγεται από την κατάλληλη επιλογή του σχήματος και του μεγέθους των τρισδιάστατων ικριωμάτων. Τοιουτοτρόπως, όσον αφορά τις συμπαγείς κυβικές δομές, ο μικρότερος όγκος διευκόλυνε την κυτταρική ανάπτυξη καθώς ήταν ευκολότερο για τα κύτταρα να εξερευνήσουν ολόκληρη την επιφάνεια των ικριωμάτων ενώ οι μικρότερες αποστάσεις μεταξύ των δομών επέτρεπαν την ευκολότερη διακυτταρική επικοινωνία μεταξύ των γειτονικών κύβων. Στα πορώδη ικριώματα, τα κύτταρα παρουσίασαν σαφέστατη προτίμηση στις

κατασκευές με την μεγαλύτερη διατομή πόρων καθώς εκεί γινόταν ευκολότερα η προσπέλαση στο εσωτερικό. Τέλος οι κατασκευές δίκην ξύλινης παλέτας παρουσίαζαν διπλό πλεονέκτημα λόγω αφενός της υψηλότερης πορότητας του σχεδίου και αφετέρου λόγω των ελεύθερων άκρων στα οποία αγκιστρώνονταν τα κύτταρα με στόχο τον εποικισμό της δομής.

Τα παραπάνω υβριδικά υλικά σε συνδυασμό με τον διφωτονικό πολυμερισμό, χρησιμοποιώντας femtosecond laser, προσφέρουν νέες προοπτικές στις εφαρμογές της μηχανικής ιστών. Πιο συγκεκριμένα τα υβριδικά ικρίωματα μπορούν να μιμηθούν πλήρως την εξωκυττάρια θεμέλια ουσία και να παρέχουν ένα γόνιμο περιβάλλον για μία πλήρως κατευθυνόμενη καλλιέργεια μίας ή περισσότερων κυτταρικών σειρών.





# **ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ**

## Ελληνόγλωσση Βιβλιογραφία

- Αλόνσο Μ., Φιν Ε., Θεμελιώδης πανεπιστημιακή φυσική, μετάφραση Φίλιππας Τ., Ρεσβάνης Λ., Offset εκτυπώσεις : Αθανασόπουλος Σ., Παπαδάμης Σ., Αθήνα 1979.
- Μελισσινάκη Βασιλεία, Μεταπτυχιακή εργασία, Ινστιτούτο ηλεκτρονικής δομής και λέιζερ, Ιδρυμα τεχνολογίας και έρευνας, 2011
- Παναγιώτου Κ., Διεπιφανειακά φαινόμενα και κολλοειδή συστήματα, Εκδόσεις Ζήτη, 2η έκδοση, Θεσσαλονίκη 1998.
- Παναγιώτου Κ., Επιστήμη και Τεχνολογία Πολυμερών, Εκδόσεις Πήγασος, 2η έκδοση, Θεσσαλονίκη, 2000.
- Τσιβιντζέλης Ι., Διδακτορική διατριβή, Εργαστήριο φυσικής χημείας, τμήμα χημικών μηχανικών, Α.Π.Θ. Θεσσαλονίκη 2006.
- Τσιόπτσιας Κ., Διδακτορική διατριβή, Εργαστήριο φυσικής χημείας, τμήμα χημικών μηχανικών, Α.Π.Θ. Θεσσαλονίκη 2009.
- Φυτίλης Ι., Διδακτορική διατριβή, Εργαστήριο LASER, Τομέας ηλεκτρον. και Η/Υ, τμήμα φυσικής, Πανεπιστήμιο Πατρών 2009
- Χατζιωάννου Θ. Π., Κούππαρης Μ. Α., Ενόργανη ανάλυση, Εκδόσεις Δ. Μαυρομάτη, Αθήνα 1997.

## Ξενόγλωσση Βιβλιογραφία

- Adhikari R., Gunatillake P. A., Griffiths I., Tatai L., Wickramaratna M., Houshyar S., Moore T., Mayadunne R. T. M., Field J., McGee M., Carbone T., Biodegradable injectable polyurethanes: Synthesis and evaluation for orthopaedic applications, *Biomaterials* 29 (2008) 3762-3770.
- Agarwal S., Wendorff J. H., Greiner A., Use of electrospinning technique for biomedical applications, *Polymer* 49 (2008) 5603-5621.
- Aionicesei E., Skerget M., Knez Z., Measurement of CO<sub>2</sub> solubility and diffusivity in poly(L-lactide) and poly(D,L-lactide-co-glycolide) by magnetic suspension balance, *The journal of supercritical fluids* 47 (2008) 296-301.

- Aki S. N. V. K., Mellein B. R., Saurer E. M., Brennecke J. F., High pressure phase behavior of carbon dioxide with imidazolium-based ionic liquids, *Journal of physical chemistry part B*, 108 (2004) 20355-20365.
- Al-Munajjed A. A., O'Brien F. J., Influence of a novel calcium-phosphate coating on the mechanical properties of highly porous collagen scaffolds for bone repair, *Journal of the mechanical behavior of biomedical materials* 2 (2009) 138-146.
- Ashton R. S., Banerjee A., Punyani S., Scaffolds based on degradable alginate hydrogels and poly(lactide-co-glycolide) microspheres for stem cell culture). *Biomaterials* 28 (2007) 5518-5525.
- Aubert J. H., Solubility of carbon dioxide in polymers by the quartz crystal microbalance technique, *Journal of supercritical fluids* 11 (1998) 163-172.
- Bamberger A., Sieder G., Maurer G., High-pressure (vapor+liquid) equilibrium in binary mixtures of (carbon dioxide+water or acetic acid) at temperatures from 313 to 353 K, *The Journal of Supercritical Fluids* 17 (2000) 97-110.
- Banerjee T., Lipscomb G. G., Calorimetric probes of carbon dioxide sorption in bisphenol-A based polymers, *Polymer* 38 (1997) 5807-5813.
- Banker G. and Goslin K., *Culturing Nerve Cells*. Second Edition, Massachusetts Institute of Technology, Chapter 6.
- Barry J. J. A., Gidda H. S., Scotchford C. A., Howdle S. M., Porous methacrylate scaffolds: supercritical fluid fabrication and in vitro chondrocyte responses, *Biomaterials* 25 (2004) 3559-3568.
- Basu S., Cunningham L.P., Pins G.D., Bush K.A., Taboada R., Howell A.R., Wang J., Campagnola P.J., "Multiphoton excited fabrication of collagen matrixes crosslinked by a modified benzophenone dimer: bioactivity and enzymatic degradation", *Biomacromolecules* 6 (2005) p.1465
- Benczedi D., Tomka I., Panayiotou C., Volumetric properties of starch-water mixtures, *Fluid phase equilibria* 138 (1997) 145-158.
- Berthiaume F., Yarmush M. L., in "Tissue engineering", Edited by Palsson B., Hubbell J. A., Plonsey R., Bronzino J. D., CRC Press, New York, 2003.
- Bessieres D., Saint Guirons H., Daridon J. L., Thermophysical properties of n-tridecane from 313.14 to 373.15 K and up to 100 Mpa from heat capacity and density data, *Journal of thermal analysis and calorimetry* 62 (2000) 621-632.

- Bhuyan B., Winfield R.J., Brien S. O., Crean G.M., Investigation of the two-photon polymerisation of a Zr-based inorganic–organic hybrid material system. *Applied Surface Science* 252, 4845–4849, (2006).
- Boiloty J. P., Biteau J., Chaputy F., Gacoiny T., Brunz A., Darracqz B., Georgesz P., Levyz Y., Organic–inorganic solids by sol–gel processing: optical Applications. *Pure Appl. Opt.* 7, 169–177, (1998).
- Brinker C.J., Scherer G.W, Sol–Gel science. Boston, MA: Academic Press, (1990).
- Brodkey R. S., Hershey H. C., Transport phenomena, 2η Ελληνική έκδοση, εκδόσεις Τζιόλα, Μετάφραση Κ. Λαβδάκης, Θεσσαλονίκη, 2001.
- Brugnerotto J., Lizardi J., Goycoolea F. M., Arguelles-Monal W., Desbrieres J., Rinaudo M., An infrared investigation in relation with chitin and chitosan characterization, *Polymer* 42 (2001) 3569-3580.
- Brunauer S., Emmett P. H., Teller E., Adsorption of gases in multimolecular layers, *Journal of the American chemical society* 60 (1938) 309-319.
- Bryers J. D., Giachelli C. M. and Ratner B. D. Engineering biomaterials to integrate and heal: The biocompatibility paradigm shifts Article first published online: 24 MAY 2012 | DOI: 10.1002/bit.24559 (pages 1898–1911)
- Buttafoco L., Kolkman N. G., Engbers-Buijtenhuijs P., Poot A. A., Dijkstra P. J., Vermes I., Feijen J., Electrospinning of collagen and elastin for tissue engineering applications, *Biomaterials* 27 (2006) 724-734.
- Chatzistavrou X., Zorba T., Kontonasaki E., Chrissafis K., Koidis P., Paraskevopoulos K. M., Following bioactive glass behavior beyond melting temperature by thermal and optical methods, *Physica Status Solidi* 201 (2004) 944-951.
- Chen L., Bromberg L., Hatton T. A., Rutledge G. C., Electrospun cellulose acetate fibers containing chlorhexidine as a bactericide, *Polymer* 49 (2008) 1266-1275.
- Chen S S, Fitzgerald W, Zimmerberg J, Kleinman H K and Margolis L 2007 Cell–cell and cell–extracellular matrix interactions regulate embryonic stem cell differentiation *Stem Cells* 25 553–61
- Chevallay B and Herbage D 2000 Collagen-based biomaterials as 3D scaffold for cell cultures: applications for tissue engineering and gene therapy *Med. Biol. Eng. Comput.* 38 211–8
- Cho C. H., Eliason J. F., Matthew H., Application of porous glycosaminoglycan-based scaffolds for expansion of human cord blood stem cells in perfusion culture. *Journal of Biomedical materials research part A*, (2007) 98-107.

- Chow K. S., Khor E., Novel fabrication of open-pore chitin matrixes, *Biomacromolecules* 1 (2000) 61-67.
- Chow K. S., Khor E., Wan A. C. A., Porous chitin matrices for tissue engineering: fabrication and in vitro cytotoxic assessment, *Journal of polymer research* 8 (2001) 27-35.
- Condo P. D., Sanchez I. C., Panayiotou C. G., Johnston K. P., Glass transition behavior including retrograde vitrification of polymers with compressed fluid diluents, *Macromolecules* 25 (1992) 6119-6127.
- Cooper A. I., Porous materials and supercritical fluids, *Advanced materials* 15 (2003) 1049-1059.
- Coxam J. Y., Grolier J. P. E., Ogawa H., Excess enthalpy for {x 1-hexanol + (1-x) hexane} at temperatures from 323 to 513 K, and pressures from 3.5 to 15 MPa, *Fluid phase equilibria* 226 (2004) 141-148.
- Crank J., *The mathematics of diffusion*, Clarendon press, Oxford, second edition, 1975.
- Cravo C., Rita A. C. D., Duarte C. M. M., Solubility of carbon dioxide in a natural biodegradable polymer: Determination of diffusion coefficients, *Journal of supercritical fluids* 40 (2007) 194-199.
- Czaja W. K., Young D. J., Kawecki M., Brown R. M., The future prospects of microbial cellulose in biomedical applications, *Biomacromolecules* 8 (2007) 1-12.
- Dalton P. D., Klinkhammer K., Salber J., Klee D., Moller M., Direct in vitro electrospinning with polymer melts. *Biomacromolecules* 7 (2006) 686-690.
- Decker C., "UV-radiation curing chemistry" *Pigment & Resin Technology*, 30 (2001) p. 278
- Deitzel J. M., Kleinmeyer J., Harris D., Beck Tan N. C., The effect of processing variables on the morphology of electrospun nanofibers and textiles, *Polymer* 42 (2001) 261–272.
- Deng and Callender in "Infrared and Raman spectroscopy of biological materials", edited by Gremlich H. U., Yan B., Marcel Dekker Inc, New York, 2001.
- Derecskei B., Kovacs A. D., Molecular modeling simulations to predict density and solubility parameters of ionic liquids, *Molecular simulation* 34 (2008) 1167-1175.
- Derkaoui S. M., Avramoglou T., Barbaud C., Letourneur D., Synthesis and characterization of a new polysaccharide-graft-polymethacrylate copolymer for three dimensional hybrid hydrogels, *Biomacromolecules* 9 (2008) 3033-3038.

- Duan X.M., Sun H.B., Kaneko K., Kawata S., “Two-photon polymerization of metal ions doped acrylate monomers and oligomers for three-dimensional structure fabrication”, *Thin Solid Films* 453–54 (2004) p.518
- Dutta D., Chatterjee S., Pillai K. T., Pujari P. K., Ganguly B. N., Pore structure of silica gel: a comparative study through BET and PALS, *Chemical Physics* 312 (2005) 319-324.
- Edwards D. A., Non Fickian diffusion in thin polymer films, *Journal of polymer science: Part B: Polymer physics*, 34 (1996) 981-997.
- Edwards R. R., Tao Y., Xu S., Wells P. S., Yun K. S., Parcher J. F., Chromatographic investigation of CO<sub>2</sub>-polymer interactions at near critical conditions, *Journal of physical chemistry part B*, 102 (1998) 1287-1295.
- Egorov V. M., Smirnova S. V., Formanovsky A. A., Pletnev I. V., Zolotov Y. A., Dissolution of cellulose in ionic liquids as a way to obtain test materials for metal-ion detection, *Analytical bioanalytical chemistry* 387 (2007) 2263-2269.
- Ehrenfreund-Kleinman T., Golenser J., Domb A. J., in “Scaffolding in tissue engineering” Edited by Ma P. X., Elisseeff J., Taylor & Francis, New York, 2006.
- Entcheva E., Bien H., Yin L., Chung C. Y., Farrell M., Kostov Y., Functional cardiac cell constructs on cellulose-based scaffolding, *Biomaterials* 25 (2004) 5753-5762.
- Feng B, Jinkang Z, Zhen W, Jianxi L, Jiang C, Jian L, Guolin M and Xin D 2011 The effect of pore size on tissue ingrowth and neovascularization in porous bioceramics of controlled architecture in vivo *Biomed. Mater.* 6 015007
- Farrer R.A., LaFratta C.N., Li L.J., Praino J., Naughton M.J., Saleh B.E.A., Teich M.C., Fourkas J.T., “Selective functionalization of 3-D polymer microstructures”, *Journal of American Chemical Society* 128 (2006) p.1796
- Farsari M., Reinhardt C., Sakellari I., Giakoumaki A., Ovsianikov A., Vamvakaki M., Gray D., Chichkov B.N., Fotakis C., Three-Dimensional Direct Writing of Novel Sol-Gel Composites for Photonics Applications.
- Flichy N. M .B., Kazarian S. G., Lawrence C. J., Briscoe B. J., Indentation of Poly(methyl methacrylate) under High-Pressure Gases, *Polymer Science Part B: Polymer Physics*, 39 (2001) 3020-3028.
- Fredenslund A., Sorensen J. M., in “Models for thermodynamic and phase equilibria calculations”, Edited by Sandler S. I., Marcel Dekker, New York 1994.
- Freier T., Koh H. S., Kazazian K., Shoichet M. S., Controlling cell adhesion and degradation of chitosan films by N-acetylation, *Biomaterials* 26 (2005) 5872-5878.

- Freire M. G., Carvalho P. J., Gardas R. L., Marrucho I. M., Santos L. M. N. B. F., Coutinho J. A. P., Mutual solubilities of water and the [Cnmim][Tf2N] hydrophobic ionic liquids, *Journal of physical chemistry part B*, 112 (2008) 1604-1610.
- Fouassier J.P., "Photoinitiation, photopolymerization and photocuring: Fundamentals and applications", Hanser, New York (1995)
- Fouassier J.P., Rabek J.F. (eds), "Radiation curing in polymer science and technology", Elsevier, London (1993)
- Fujita K., Lazarovici P., Guroff G., Regulation of the differentiation of PC12 Pheochromocytoma cells. (1989) *Environ Health Perspect* 80, 127-142.
- Gardas R. L., Freire M. G., Carvalho P. J., Marrucho I. M., Fonseca I. M. A., Ferreira A. G. M., Coutinho J. A. P.,  $\rho T$  measurements of imidazolium-based ionic liquids, *Journal of chemical and engineering data*, 52 (2007) 1881-1888.
- Ge Z., Baguenard S., Lim L. Y., Wee A., Khor E., Hydroxyapatite-chitin materials as potential tissue engineered bone substitutes, *Biomaterials* 25 (2004) 1049-1058.
- Gerentes P., Vachoud L., Doury J., Domard A., Study of a chitin-based gel as injectable material in periodontal surgery, *Biomaterials* 23 (2002) 1295-1302.
- Gomes de Azevedo R., Esperanca J. M. S. S., Szydlowski J., Visak Z. P., Pires P. F., Guedes H. J. R., Rebelo L. P. N., Thermophysical and thermodynamic properties of ionic liquids over an extended pressure range: [bmim][NTf2] and [hmim][NTf2], *Journal of chemical thermodynamics* 37 (2005) 888-899.
- Göppert-Mayer M., "Über Elementarakte mit zwei Quantensprüngen", *Annalen der Physik*, 9 (1931) p.237
- Grenner A., Tsivintzelis I., Kontogeorgis G. M., Economou I. G., Panayiotou C., Evaluation of the Non-Random Hydrogen Bonding (NRHB) Theory and the simplified Perturbed-Chain-Statistical Associating Fluid Theory (sPC-SAFT). 1. Vapor-liquid equilibria. *Ind. Eng. Chem. Res.*, 47 (2008) 5636-5650.
- Griffiths D., «Εισαγωγή στην ηλεκτροδυναμική», 2η έκδοση, τόμος 2, Πανεπιστημιακές Εκδόσεις Κρήτης, Ηράκλειο, 1999
- Guan D., Chen Z., Huang C., Lin Y., Attachment, proliferation and differentiation of BMSCs on gas-jet/electrospun nHAP/PHB fibrous scaffolds. *Applied surface science* 255 (2008) 324-327.
- Guo R., Xiao S., Zhai X., Li J., Xia A., Huang W., "Micro lens fabrication by means of femtosecond two photon photopolymerization", *Optics Express*, 14 (2006) p.810

- Hammond C., Cellular and Molecular Neurophysiology. Third Edition, (2008) Academic Press.
- Hansen J C, Lim J Y, Xu L C, Siedlecki C A, Mauger D T and Donahue H J 2007 Effect of surface nanoscale topography on elastic modulus of individual osteoblastic cells as determined by atomic force microscopy *J. Biomech.* 40 2865–71
- Haske W., Chen V.W., Hales J. M., Dong W. T., Barlow S., Marder S. R., Perry J.W., “65 nm feature sizes using visible wavelength 3-D multiphoton lithography”, *Optics Express* 15 (2007) p.3426
- He G., Tan L., Zheng Q., Prasad P., “Multiphoton Absorbing Materials: Molecular Designs, Characterizations, and Applications”, *Chemical Reviews*, 108 (2008) p.1245
- Huang S., Edelman P., Karlsson S., Albertsson A. C., Li S., Vert M., in “Degradable Polymers, Principles and applications” Edited by Scott G., Gilead D., Chapman & Hall, Cambridge 1995.
- Huang Y., Onyeri S., Siewe M., Moshfeghian A., Madihally S. V., In vitro characterization of chitosan-gelatin scaffolds for tissue engineering, *Biomaterials* 26 (2005) 7616-7627.
- Huddleston J. G., Visser A. E., Reichert W. M., Willauer H. D., Broker G. A., Rogers R. D., Characterization and comparison of hydrophilic and hydrophobic room temperature ionic liquids incorporating the imidazolium cation, *Green chemistry*, 3 (2001) 156-164.
- Hwang N. S., Varghese S., Elisseeff J., Controlled differentiation of stem cells, *Advanced Drug Delivery Reviews* 60 (2008) 199–214.
- Isu T., Akiyama K., Tomita N., Nishimura T., Nomura Y., Kanamoto T., Optical Kerr gate switching of AlGaAs/AlAs multilayer structures without pattern effects by the two-photon resonant nonlinear response, *Physics Status Solidi* 3., (2006) p.671
- Ivanvski S., Gronthos S., Shi S., Bartold P. M., Stem cells in the periodontal ligament, *Oral Diseases*, 12(2006) 358-363.
- Jeong S. I., Ko E. K., Yum J., Jung C. H., Lee Y. M., Shin H., Nanofibrous poly(lactic acid)/hydroxyapatite composite scaffolds for guided tissue regeneration, *Macromolecular bioscience* 8 (2008) 328-338.
- Jacobs J. M., Carbon Dioxide as a Sustainable Means to Control Polymer Foam Morphology (2008), *Leon* p. 10



- Jung Y., Park M. S., Lee J. W., Kim Y. H., Kim S. H., Kim S. H., Cartilage regeneration with highly elastic three dimensional scaffolds prepared from biodegradable poly(L-Lactide-co- $\epsilon$ -caprolactone), *Biomaterials* 29 (2008) 4630-4636.
- Junqueira L. C., Carneiro J., Kelley O. R., in “Basic Histology”, Appleton & Lange, ελληνική μετάφραση της 6ης έκδοσης, California 1989.
- Kaiser W. and Garrett C. G. B., “Two-photon excitation in CaF<sub>2</sub>:Eu<sup>2+</sup>”, *Physical Review Letters*, 7 (1961) p.229
- Kalogiannis K., Michaiolf C., Panayiotou C., Microencapsulation of amoxicillin in poly(L-lactic acid) by supercritical antisolvent precipitation. *Industrial and Engineering Chemistry Research* 45 (2006) 8738-8745.
- Kang H. G., Kim S., Y., Lee Y. M., Novel porous gelatin scaffolds by overrun/particulate leaching process for tissue engineering applications, *Journal biomedical materials research part B* (2006) 388-397.
- Kang H. W., Tabata Y., Ikada Y., Fabrication of porous gelatin scaffolds for tissue engineering, *Biomaterials* 20 (1999) 1339-1344.
- Kapoor A, Caporali E H G, Kenis P J A and Stewart M C 2010 Microtopographically patterned surfaces promote the alignment of tenocytes and extracellular collagen *Acta Biomater.* 6 2580–9 Karageorgiou V., Kaplan D. Porosity of 3D biomaterial scaffolds and osteogenesis, *Biomaterials* 26 (2005) 5474-5491.
- Karageorgiou V and Kaplan D 2005 Porosity of 3D biomaterial scaffolds and osteogenesis *Biomaterials* 26 5474–91
- Kato R., Gmehling J., Systems with ionic liquids: Measurement of VLE and  $\gamma_{\infty}$  data and prediction of their thermodynamic behavior using original UNIFAC, mod. UNIFAC(Do) and COSMO-RS(OI), *Journal of Chemical Thermodynamics*, 37 (2005) 603–619.
- Kato R. Gmehling J., Measurement and correlation of vapour-liquid equilibria of binary systems containing the ionic liquids [EMIM][(CF<sub>3</sub>SO<sub>2</sub>)<sub>2</sub>N], [BMIM][(CF<sub>3</sub>SO<sub>2</sub>)<sub>2</sub>N], [EMIM][(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>], and oxygenated organic compounds respectively water, *Fluid Phase Equilibria*, 231 (2005a) 38–43.
- Kato J., Takeyasu N., Adachi Y., Sun H.B., and Kawata S., “Multiple-spot parallel processing for laser micromanofabrication”, *Applied Physics Letters* 86 (2005) p.044102

- Kazarian S. G., Vincent M. F., Bright F. V., Liotta C. L., Eckert C. A., Specific intermolecular interaction of carbon dioxide with polymers, *Journal of the American chemical society* 118 (1996) 1729-1736.
- Keller J. U., Staudt R., *Gas adsorption equilibria*, Boston: Springer science + Business Media Inc., 2005.
- Kessick R., Fenn J., Tepper G., The use of AC potential in electrospaying and electrospinning processes, *Polymer* 45 (2004) 2981-2984.
- Khor E., Lim L. Y., Implantable applications of chitin and chitosan, *Biomaterials* 24 (2003) 2339-2349.
- Kim H. W., Kim H. E., Salih V., Stimulation of osteoblast responses to biomimetic nanocomposites of gelatin-hydroxyapatite for tissue engineering scaffolds, *Biomaterials* 26 (2005) 5221-5230.
- Klein L. C., Sol-Gel Optical Materials. *Annual Review Materials Science* Vol. 23, 437-452, (1993).
- Klein L. C., *Sol-Gel Optics, Processing and applications*.
- Klein L. C., *Sol-Gel Technology for Thin Films, Fibers, Preforms, Electronics and Specialty Shapes*. Noyes Publications.
- Klein S., Barsella S., Leblond H., Bulou H., Fort A., "One-step waveguide and optical circuit writing in photopolymerizable materials processed by two-photon absorption", *Applied Physics Letters*, 86 (2005) p.211118
- Klukowska A, Posset U., Schottner G., Jankowska-Frydel A., Malatesta V., Photochromic solgel derived hybrid polymer coatings: the influence of matrix properties on kinetics and photodegradation. *Materials Science-Poland*, Vol. 22, No. 3, 187-199, (2004).
- Kodama H. "Automatic method for fabricating a threedimensional plastic model with photo-hardening polymer", *Review of Scientific Instruments* 52 (1981) p.1770
- Kondo T., Matsuo S., Juodkazis S., Mizeikis V., Misawa H., "Multiphoton fabrication of periodic structures by multibeam interference of femtosecond pulses", *Applied Physics Letters* 82 (2003) p.2758
- Kontonasaki E., Sivropoulou A., Papadopoulou L., Garefis P., Paraskevopoulos K., Koidis P., Attachment and proliferation of human periodontal ligament fibroblasts on bioactive glass modified ceramics, *Journal of Oral Rehabilitation* 34 (2007) 57-67.
- Koros W. J., Smith G. N., Stannett V., High pressure sorption of carbon dioxide in solvent-cast poly(methyl methacrylate) and poly(ethyl methacrylate) films, *Journal of applied polymer science* 26 (1981) 159-170.

- Krause B., Mettinkhof R., van der Vegt N., Wessling M., Microcellular foaming of amorphous high-Tg polymers using carbon dioxide, *Macromolecules*, 34 (2001) 874-884.
- Kubisa P., Ionic Liquids in the synthesis and modification of polymers, *Journal of polymer science: Part A: Polymer chemistry* 43 (2005) 4675-4683.
- Kurita K., Chitin and chitosan: functional biopolymers from marine crustaceans, *Marine biotechnology* 8 (2006) 203-226.
- LaFratta C., Fourkas J., Baldacchini T., Farrer R., “Multiphoton Fabrication”, *Angewandte Chemie*, 46 (2007) p.6238
- LaFratta C.N., Li L.J., and Fourkas J.T., “Soft-lithographic replication of 3D microstructures with closed loops”, *Proceeding of National Academy of Sciences of the USA* 103 (2006) p.8589
- Lee K., Kim R., Yang D., Park S., “Advances in 3D nano/microfabrication using two-photon initiated polymerization”, *Progress in Polymer Science*, 33 (2008) p.631
- Leung S. N., Park C. B., Xu D., Li H., Fenton R. G., Computer simulation of bubble-growth phenomena in foaming, *Industrial and engineering chemistry research*, 45 (2006) 7823-7831.
- Levit N., Tepper G., Supercritical CO<sub>2</sub> assisted electrospinning, *The journal of supercritical fluids* 31 (2004) 329-333.
- Lin Y., Yao Y., Yang X., Wei N., Li X., Gong P., Li R., Wu D., Preparation of poly(ether sulfone) nanofibers by gas-jet/electrospinning, *Journal of applied polymer science* 107 (2008) 909-917.
- Lin Y. Jiandong Ding, Injectable hydrogels as unique biomedical materials, *Chemical Society Reviews*, 37 (2008)1473–1481.
- Liu C., Han Z., Czernuszka J. T., Gradient collagen/nanohydroxyapatite composite scaffold: Development and characterization, *Acta biomaterialia* 5 (2009) 661-669.
- Loudon R., “The Quantum Theory of Light”, 2nd edition, Oxford Science Publications, Oxford, 1983
- Luong-Van E., Grondahl L., Chua K. N., Leong K. W., Nurcombe V., Cool S. M., Controlled release of heparin from poly( $\epsilon$ -caprolactone) electrospun fibers, *Biomaterials* 27 (2006) 2042-2050.
- Lyons J., Ko F., Melt electrospinning of polymers: A review, *Polymer news* 30 (2005) 170-178.
- Ma P. X., Scaffolds in tissue engineering, *Materials Today*, 7 (2004) 30-40.

- Ma P. X., in “Scaffolding in tissue engineering” Edited by Ma P. X., Elisseeff J., Taylor & Francis, New York, 2006.
- MacNeil S., Biomaterials for tissue engineering of skin, *Materials Today*, 11 (2008) 26-34.
- Melrose J., Chuang C., Whitelock J., Tissue engineering of cartilages using biomatrices, *Journal of Chemical Technology and Biotechnology* 83 (2008) 444-463.
- Majtan J., Bilikova K., Markovic O., Grof J., Kogan G., Simuth J., Isolation and characterization of chitin from bumblebee (*Bombus terrestris*), *International journal of biological macromolecules*, 40 (2007) 237-241.
- Maneerung T., Tokura S., Rujiravanit R., Impregnation of silver nanoparticles into bacterial cellulose for antimicrobial wound dressing, *Carbohydrate polymers* 72 (2008) 43-51.
- Mao J. S., Zhao L. G., Yin Y. J., Yao K. D., Structure and properties of bilayer chitosan-gelatin scaffolds, *Biomaterials* 24 (2003) 1067-1074.
- Maruo S., Inoue H., “Optically driven micropump produced by three-dimensional two-photon microfabrication”, *Applied Physics Letters* 89 (2006) p.144101
- Maruo S., Nakamura O., Kawata S., “Three-dimensional microfabrication with two-photon-absorbed photopolymerization”, *Optics Letters*, 22 (1997) p.132
- Matthews J. A., Wnek G. E., Simpson D. G., Bowlin G. L., Electrospinning of collagen nanofibers, *Biomacromolecules* 3 (2002) 232-238.
- Meador A. B., National Geographic <http://ngmchina.com.cn/web/?action-viewnews-itemid-194732>)
- Meljac L., Goetz V., Py X., Isothermal composite adsorbent. Part I: thermal characterisation, *Applied thermal engineering* 27 (2007) 1009-1016.
- Melrose J., Chuang C., Whitelock J., Tissue engineering of cartilages using biomatrices, *Journal of Chemical Technology and Biotechnology* 83 (2008) 444-463.
- Missopolinou D. Tsivintzelis I., Panayiotou C., Excess enthalpies of binary mixtures of 2-ethoxyethanol with four hydrocarbons at 298.15, 308.15, and 318.15 K An experimental and theoretical study. *Fluid phase equilibria* 245 (2006) 89-101.
- Molly S. M., Biomaterials for bone tissue engineering, *Materials Today*, 11 (2008) 18-25.
- Mittal A, Negi P, Garkhal K, Verma S and Kumar N 2010 Integration of porosity and bio-functionalization to form a 3D scaffold: cell culture studies and in vitro degradation *Biomed. Mater.* 5 045001

- Muller F. A., Muller L., Hofmann I., Greil P., Wenzel M. M., Staudenmaier R., Cellulose based scaffold materials for cartilage tissue engineering, *Biomaterials* 27 (2006) 3955-3963.
- Nebig S., Bolts R., Gmehling J., Measurement of vapor-liquid equilibria (VLE) and excess enthalpies of binary systems with 1-alkyl-3-methylimidazolium bis(trifluoromethylsulfonyl) imide and prediction of these properties and  $\gamma^\infty$  using modified Unifac, *Fluid Phase Equilibria* 258 (2007) 168-178.
- Nedelec J. M., Sol-Gel Processing of Nanostructured Inorganic Scintillating Materials. *Journal of Nanomaterials* Vol. 2007, Article ID 36392, 8 pages.
- Nilasaroya A., Poole-Warren L. A., Whitelock J. M., Martens P. J., Structural and functional characterization of poly(vinyl alcohol) and heparin hydrogels, *Biomaterials* 29 (2008) 4658-4664.
- Nisbet D. R., Crompton K. E., Horne M. K., Finkelstein D. I., Forsythe J. D., *Journal of Biomedical Materials Research - Part B Applied Biomaterials* 87 (2008) 251-263.
- Nist chemistry webbook , <http://webbook.nist.gov/chemistry/>
- Noh H., K., Lee S. W., Kim J. M., Oh J. E., Kim K. H., Chung C. P., Choi S. C., Park W. H., Min B. M., Electrospinning of chitin nanofibers: Degradation behavior and cellular response to normal human keratinocytes and fibroblasts, *Biomaterials* 27 (2006) 3934-3944.
- Ohkawa K., Cha D., Kim H., Nishida A., Yamamoto H., Electrospinning of chitosan, *Macromolecular rapid communications* 25 (2004) 1600-1605. *Biomacromolecules* 7 (2006) 2710-2714.
- Ohshima Y., Nishino K., Okuda R., Minami A., Kihune K., Clinical application of new chitin non-woven fabric and new chitin sponge as wound dressing, *European journal of plastic surgery* 14 (1991) 207-211.
- Ott J. B., Lemon L. R., Sipowska Brown P. R., Excess enthalpies and excess volumes for (ethane + propa-1-ol) at the temperatures (298.15, 323.15, and 348.15) K and at the pressures (5, 10, 12.5 and 15) MPa.
- Ovsianikov A., Shizhou X., Farsari M., Vamvakaki M., Fotakis C., Chichkov B. N., Shrinkage of microstructures produced by two-photon polymerization of Zr-Based hybrid photosensitive materials. *Optics Express*, Vol. 17, No. 4, 2143-2148, (2009).
- Ovsianikov A., Viertl J., Chichkov B. N., Oubaha M., MacCraith B., Sakellari I., Giakoumaki A., Gray D., Vamvakaki M., Farsari M., Fotakis C., Ultra-Low

- Shrinkage Hybrid Photosensitive Materials for Two-Photon polymerization Microfabrication. American Chemical Society, Vol. 2, No. 11, 2257-2262, (2008).
- Pan H., Li L., Hu L., Cui X., Continuous aligned polymer fibers produced by a modified electrospinning method, *Polymer* 47 (2006) 4901-4904.
- Pan H., Jiang H., Chen W., The biodegradability of electrospun dextran/PLGA scaffold in a fibroblast/macrophage co-culture, *Biomaterials* 29 (2008) 1583-1592.
- Pang Y., Ucuzian A. A., Matsumura A., Brey E. M., Gassman A. A., Husak V. A., Greisler H. P., The temporal and spatial dynamics of microscale collagen scaffold remodelling by smooth muscle cells, *Biomaterials* 30 (2009) 2023-2031.
- Panayiotou C., Stefanis E., Tsvintzelis I., Pantoula M., Economou I., Nonrandom hydrogen-bonding model of fluids and their mixtures. 1. Pure fluids, *Industrial and engineering chemistry research* 43 (2004) 6592-6606.
- Panayiotou C., Tsvintzelis I., Economou I. G., Nonrandom hydrogen-bonding model of fluids and their mixtures. 2. Multicomponent mixtures, *Industrial and engineering chemistry research* 46 (2007) 2628-2636.
- Pantoula M., Panayiotou C., Sorption and swelling in glassy polymer/carbon dioxide systems Part I. Sorption, *The journal of supercritical fluids* 37 (2006) 254-262.
- Pantoula M., Schnitzler J., Eggers R., Panayiotou C., Sorption and swelling in glassy polymer/carbon dioxide systems Part II. Swelling, *The journal of supercritical fluids* 39 (2007) 426-434.
- Papadopoulou L., Kontonasaki E., Zorba T., Chatzistavrou X., Pavlidou E., Paraskevopoulos K., Sklavounos S., Koidis P., Dental ceramics coated with bioactive glass: Surface changes after exposure in a simulated body fluid under static and dynamic conditions *Physica Status Solidi* 198 (2003) 65-75.
- Patel A., Mequanint K., Novel Physically crosslinked polyurethane-block-poly(vinyl pyrrolidone) hydrogel biomaterials, *Macromolecular bioscience* 7 (2007) 727-737.
- Pek Y. S., Gao S., Arshad M. S., Leck K. J., Ying J. Y., Porous collagen-apatite nanocomposite foams as bone regeneration scaffolds, *Biomaterials* 29 (2008) 4300-4305.
- Pierre A. C., Pajonk G. M., Chemistry of aerogels and their applications, *Chemical reviews* 102 (2002) 4243-4265.
- Prusnitz J. M., Lichtenthaler R. N., de Azevedo E. G., Molecular thermodynamics of fluid phase equilibria, 2nd edition, Prentice-Hall, Inc Englewood Cliffs, New Jersey, 1986.

- Prizant A., University of Rochester, Mechanical Engineering Department, May 2009, [http://www.optics.rochester.edu/workgroups/cml/opt307/spr09/amir/\\_Preparation/Preparation.html](http://www.optics.rochester.edu/workgroups/cml/opt307/spr09/amir/_Preparation/Preparation.html)
- Quirk R. A., France R. M., Shakesheff K. M., Howdle S. M., Supercritical fluid technologies and tissue engineering scaffolds, *Current opinion in solid state and materials science* 8 (2004) 313-321.
- Ravindra R., Krovvidi K. R., Khan A. A., Solubility parameter of chitin and chitosan. *Carbohydrate Polymers* 36 (1998) 121-127.
- Reid R., Prausnitz J. M., Poling B. E., *The properties of gases and liquids*, 4th edition McGraw-Hill, Singapore, 1988.
- Reverchon E., Cardea S., Production of polymeric foams by supercritical CO<sub>2</sub>, *Journal of supercritical fluids* 40 (2007) 144-152.
- Reverchon E., Cardea S., Rapuano C., A new supercritical fluids-based process to produce scaffolds for tissue replacement, *The journal of supercritical fluids* 45 (2008) 365-373.
- Rho K. S., Jeong L., Lee G., Seo B. M., Park Y. J., Hong S. D., Roh S., Cho J. J., Park W. H., Min B. M., Electrospinning of collagen nanofibers: Effects on the behavior of normal human keratinocytes and early stage wound healing, *Biomaterials* 27 (2006) 1452-1461.
- Ricciardi R., Auriemma F., De Rosa C., Laupretre F., X-Ray diffraction analysis of poly(vinyl alcohol) hydrogels, obtained by freezing and thawing techniques, *Macromolecules* 37 (2004) 1921-1927.
- Ripamonti U., Renton L., Bone morphogenetic proteins and the induction of periodontal tissue regeneration, *Periodontology* 41 (2006) 73-87.
- Ritzoulis C., Scoutaris N., Papademetriou K., Stavroulias S., Panayiotou C., Milk protein-based emulsion gels for bone tissue engineering, *Food hydrocolloids* 19 (2005) 575-581.
- Rotsch C and Radmacher M 2000 Drug-induced changes of cytoskeletal structure and mechanics in fibroblasts: an atomic force microscopy study *Biophys. J.* 78 520–35
- Rouwkema J., Rivron N. C., van Blitterswijk C. A., Vascularization in tissue engineering, *Trends in Biotechnology*, 26 (2008) 434-441.

- Ruiz J., Mantecon A., Cadiz V., States of water in poly(vinyl alcohol) derivative hydrogels, *Journal of polymer science: Part B: Polymer physics*, 41 (2003) 1462-1467.
- Sakellari I., Gaidukeviciute A., Giakoumaki A., Gray D., Fotakis C., Farsari M., Vamvakaki M., Reinhardt C., Ovsianikov A., Chichkov B.N., Two-photon polymerization of titanium-containing sol-gel composites for three-dimensional structure fabrication. *Appl Phys A* (2010) 100: 359–364
- Sakellari I., Giakoumaki A., Gray D., Vamvakaki M., Farsari M., Fotakis C., Two-Photon Polymerization of Hybrid Sol-Gel Materials for Photonics Applications. *Laser Chemistry*, Vol. 2008, Article ID 493059, 7 pages.
- Sakka S., *Sol-Gel Science and Technology. Volume 3, Sol-gel prepared Organic-inorganic hybrids and nanocomposites*
- Salgado A. J., Gomes M. E., Chou A., Coutinho O. P., Reis R. L., Hutmacher D. W., Preliminary study on the adhesion and proliferation of human osteoblasts on starch-based scaffolds, *Materials science and engineering C* 20 (2002) 27-33.
- Sangeeta D., LaGraff J. R., *Inorganic Materials Chemistry, Desk Reference. Second Edition*, ed, (CRC Press)
- Sangsanoh P., Supaphol P., Stability improvement of electrospun chitosan nanofibrous membranes in neutral or weak basic aqueous solutions,
- Sato Y., Yurugi M., Fujiwara K., Takishima S., Masuoka H., Solubilities of carbon dioxide and nitrogen in polystyrene under high temperature and pressure, *Fluid phase equilibria* 125 (1996) 129-138.
- Schmidt H., *Inorganic-Organic Composites by Sol-Gel Techniques. Journal of Sol-Gel Science and Technology* 1, 217-231, (1994).
- Shafer T. J., Atchison W. D., Transmitter ion channel and receptor properties of pheochromocytoma PC12 cells. A model for neurotoxicological studies. *Neurotoxicology* 12, 473-492.
- Shen Y. R., “The principles of nonlinear optics”, John Wiley & Sons, New York, 1984
- Shen Z., Bowlin E. T., McHugh M. A., Electrospinning in near-critical CO<sub>2</sub>, *Macromolecules* 39 (2006) 8553-8555.
- Shikinami Y, Okazaki K, Saito M, Okuno M, Hasegawa S, Tamura J, Fujibayashi S and Nakamura T 2006 Bioactive and bioresorbable cellular cubic-composite scaffolds for use in bone reconstruction *J. R. Soc. Interface* 3 805–21



- Shimko D. A., Nauman E. A., Development and characterisation of a porous poly(methyl methacrylate) scaffold with controllable modulus and permeability, *Journal of biomedical materials research part B*, (2006) 360-369.
- Silva M. M. C. G., Cyster L. A., Barry J. J. A., Yang X. B., Oreffo R. O. C., Grant D. M., Scotchford C. A., Howdle S. M., Shakesheff K. M., Rose F. R., A. J., The effect of anisotropic architecture on cell and tissue infiltration into tissue engineering scaffolds, *Biomaterials* 27 (2006) 5909-5917.
- Sircar S., Mohr R., Ristic C., Rao M. B., Isosteric heat of adsorption: Theory and experiment, *Journal of physical chemistry part B* 103 (1999) 6539-6546.
- Siepe M., Akhyari P., Lichtenberg A., Schlensak C., Beyersdorf F., Stem cells used for cardiovascular tissue engineering, *European Journal of Cardio-thoracic Surgery* 34 (2008) 242-247.
- Snedden P., Cooper A. I., Scott K., Winterton N., Cross-linked polymer-ionic liquid composite materials, *Macromolecules* 36 (2003) 4549-4556.
- Stampfl J., Schuster M., Baudis S., Lichtenegger H., Liska R., Turecek C., Varga F., Biodegradable stereolithography resins with defined mechanical properties. *Virtual and Rapid Manufacturing*), 283-288, (2007).
- Stellacci F., Bauer C.A., Meyer-Friedrichsen T., Wenseleers W., Alain V., Kuebler S.M., Pond S.J.K., Zhang Y.D., Marder S.R., Perry J.W., "Laser and electron-beam induced growth of nanoparticles for 2D and 3D metal patterning", *Advanced Materials* 14 (2002) p.194
- Stern S., A., De Meringo A. H., Solubility of carbon dioxide in cellulose acetate at elevated pressures, *Journal of polymer science: Polymer physics edition*, 16 (1978) 735-751.
- Stratakis E, Ranella A, Farsari M and Fotakis C 2009 Laser-based micro/nanoengineering for biological applications *Prog. Quantum Electron.* 33 127–63
- Sun Z.B., Dong X.Z., Nakanishi S., Chen W.Q., Duan X.M., Kawata S., "Logpile photonic crystal of CdS-polymer nanocomposites fabricated by combination of two-photon polymerization and in situ synthesis", *Applied Physics A* 86 (2007) p.427
- Sun H.B., Kawakami T., Xu Y., Ye J.Y., Matsuo S., Misawa H., Miwa M., Kaneko R., "Real three-dimensional microstructures fabricated by photopolymerization of resins through two-photon absorption", *Optics Letters* 25 (2000) p.1110
- Sun H., Kawata S., "Two-Photon Photopolymerization and 3D Lithographic Microfabrication", *Advances in Polymer Science*, 170 (2004) p.169

- Sutherland R., "Handbook of nonlinear optics", Marcel Dekker, New York, 1996
- Swatloski R. P., Spear S K., Holbrey J. D., Rogers R. D., Dissolution of cellulose with ionic liquids, *Journal of the American chemical society* 124 (2002) 4974-4975.
- Tanaka T., Ishikawa A., Kawata S., "Two-photoninduced reduction of metal ions for fabricating threedimensional electrically conductive metallic microstructure", *Applied Physics Letters* 88 (2006) p.081107
- Tang Q., Yang B., Zhao Y., Zhao L., Sorption and Diffusion of Sub-Supercritical Carbon Dioxide in Poly(methyl methacrylate), *Macromolecular Science, Part B: Physics*, 46 (2007) 275-284.
- Tariq M., Forte P. A. S., Costa Gomes M. F., Canongia Lopes J. N., Rebelo L. P. N., Densities and refractive indices of imidazolium- and phosphonium-based ionic liquids: Effect of temperature, alkyl chain length and anion, *Journal of chemical thermodynamics*, 41 (2009) 790-798.
- Trickey W R, Vail T P and Guilak F 2004 The role of the cytoskeleton in the viscoelastic properties of human articular chondrocytes *J. Orthop. Res.* 22 131–9
- Tsvintzelis I., Angelopoulou A. G., Panayiotou C., Foaming of polymers with supercritical CO<sub>2</sub>: An experimental and theoretical study, *Polymer* 48 (2007) 5928-2939.
- Turner M. B., Spear S. K., Holbrey J. D., Daly D. T., Rogers R. D., Ionic liquid-reconstituted composites as solid support matrices for biocatalyst immobilization, *Biomacromolecules* 6 (2005) 2497-2502.
- Van Krevelen D. W. *Properties of polymers*, Elsevier, Third edition, Amsterdam 1997.
- Venugopal J., Ma L. L., Yong T., Ramakrishna S., In vitro study of smooth muscle cells on polycaprolactone and collagen nanofibrous matrices, *Cell biology international* 29 (2005) 861-867.
- Viswanathan G., Murugesan S., Pushparj V., Nalamasu O., Ajayan P. M., Linhardt R J., Preparation of biopolymer fibers by electrospinning from room temperature ionic liquids, *Biomacromolecules* 7 (2006) 415-418.
- von Schnitzler J., Eggers R., Mass transfer in a supercritical CO<sub>2</sub>-atmosphere, *Journal of supercritical fluids* 16 (1999) 81-92.
- Vrana N. E., Liu Y., McGuinness G. B., Cahill P. A., Characterization of poly(vinyl alcohol)/chitosan hydrogels as vascular tissue engineering scaffolds, *Macromolecular symposia* 269 (2008) 106-110.

- Walker E., Rentzepis P.M., “Two Photon 3d optical Storage”, *Nature Photonics* 2 (2008) 406
- Wang Y Z, Kim U J, Blasioli D J, Kim H J and Kaplan D L 2005 In vitro cartilage tissue engineering with 3D porous aqueous-derived silk scaffolds and mesenchymal stem cells *Biomaterials* 26 7082–94
- Watase M., Nishinari K., Rheological and DSC changes in poly(vinyl alcohol) gels induced by immersion in water, *Journal of polymer science: Polymer physics edition*, 23 (1985) 1803-1811.
- Weng J., Wang M., Producing chitin scaffolds with controlled pore size and interconnectivity for tissue engineering, *Journal of materials science letters* 20 (2001) 1401-1403.
- Winterton N., Solubilization of polymers by ionic liquids, *Journal of materials chemistry* 16 (2006) 4281-4293.
- Wong T., McGrath J.A., Navsaria H., The role of fibroblasts in tissue engineering and Regeneration. *Journal Compilation, British Association of Dermatologists, British Journal of Dermatology* (2007) 156, pp1149–1155.
- Wu J., Zhang J., Zhang H., He J., Ren Q., Guo M., Homogeneous acetylation of cellulose in a new ionic liquid, *Biomacromolecules* 5 (2004) 266-268.
- Wu Y., Sasaki T., Irie S., Salurai K., A novel biomass-ionic liquid platform for the utilization of native chitin, *Polymer* 49 (2008) 2321-2327.
- Wu S., Serbin J., Gu M., “Two-photon polymerisation for three-dimensional micro-fabrication”, *Journal of Photochemistry and Photobiology A*, 181 (2006) p.1
- Xia Y., Whitesides G.M., “Soft lithography”, *Annual Review of Material Science* 28 (1998) p.153
- Xie H., Zhang S., Li S., Chitin and chitosan dissolved in ionic liquids as reversible sorbents of CO<sub>2</sub>, *Green chemistry* 8 (2006) 630-633.
- Xin X., Hussain M., Mao J. J., Continuing differentiation of human mesenchymal stem cells and induced chondrogenic and osteogenic lineages in electrospun PLGA nanofiber scaffold, *Biomaterials* 28 (2007) 316–325.
- Xing J.-F., Dong X.-Z., Chen W.-Q., Duan X.-M., Takeyasu N., Tanaka T., and Kawata S., “Improving spatial resolution of two-photon microfabrication by using photoinitiator with high initiating efficiency”, *Applied Physics Letters* 90 (2007) p.131106

- Yang B, Yin Z H, Cao J L, Shi Z L, Zhang Z T, Song H X, Liu F Q and Caterson B 2010  
In vitro cartilage tissue engineering using cancellous bone matrix gelatin as a  
biodegradable scaffold *Biomed. Mater.* 5 045003
- Yannas I. V., in “Scaffolding in tissue engineering” Edited by Ma P. X., Elisseff J.,  
Taylor & Francis, New York, 2006.
- Yokoyama S., Nakahama T., Miki H., Mashiko S., “Fabrication of threedimensional  
microstructure in optical-gain medium using two-photon-induced  
photopolymerization technique”, *Thin Solid Films*, 438-439 (2003) p.452
- Yoon J. H., Kawamura T., Takeya S., Jin S., Yamamoto Y., Komai T., Takahashi M.,  
Nawaby A. V., Handa Y. P., Probing fickian and non-fickian diffusion of CO<sub>2</sub> in  
PMMA using in situ raman spectroscopy and microfocus x-ray computed  
tomography, *Macromolecules*, 37 (2004) 9302-9304.
- Yuan J. J., Jin R. H., Fibrous crystalline hydrogels formed from polymers possessing a  
linear poly(ethyleneimine) backbone, *Langmuir* 21 (2005) 3136-3145.
- Zeichner-David M., Regeneration of periodontal tissues: cementogenesis revisited,  
*Periodontology* 2000, 41 (2006) 196-217.
- Zeng ., Ruckenstein E., Control of pore size in macroporous chitosan and chitin  
membranes, *Industrial and engineering chemistry research* 35 (1996) 4169-4175.
- Zhang H., Wu J., Zhang J., He J., 1-allyl-3-methylimidazolium chloride room temperature  
ionic liquid: A new and powerful nonderivatizing solvent for cellulose,  
*Macromolecules* 38 (2005) 8272-8277.
- Zhang Y., Ouyang H., Lim C. T., Ramakrishna S., Huang Z. M., electrospinning of gelatin  
fibers and gelatin/PCL composite fibrous scaffolds, *Journal of biomedical materials  
research part B* (2004) 156-165.
- Zhao F., Grayson W. L., Ma T., Bunnell B., Lu W. W., Effects of hydroxyapatite in 3D  
chitosan gelatin polymer network on human mesenchymal stem cell construct  
development, *Biomaterials* 27 (2006) 1859-1867.
- Zhou W., Kuebler S.M., Braun K.L., Yu T., Cammack J.K., Ober C.K., Perry J.W.,  
Marder S.R., An efficient two-phoon photoacid applied to positive-tone 3D  
microfabrication”, *Science* 296 (2002) p.1106
- Zhu S., Wu Y., Chen Q., Yu Z., Wang C, Jin S., Ding Y., Wu G., Dissolution of cellulose  
with ionic liquids and its application: a mini review, *Green chemistry* 8 (2006) 325-  
327.

Zipfel W.R., Williams R.C., Webb W.W., “Nonlinear magic: multiphoton microscopy in the biosciences”, *Nature Biotechnology* 21 (2003) p.1369