

## HEZURRETAKO EUSKARRIAK

### LABURPENA

Hezur gaixotasunak edo hausturak dituzten pertsonak protesiak edo autoinjertoak erabili ohi dituzte. Hala ere, aukera hauek arazo larriak eragin ditzakete. Hori dela eta, hezurren birsortze teknika berrien bilaketa areagotu egin da, polimero biodegradarrien erabilerak arrakasta berezia lortuz. Testuinguru honetan, gure ikerketaren lehen helburua poly L- laktiko (PLLA) polimero biodegradagarria eta “solvent casting/particulate leaching” teknika erabiliz hezur euskarriak sortzea izan da. Euskarri hauek porositate egoki bat izatea ezinbestekoa denez, gure ikerketaren bigarren helburua porositate hau lortzeko baldintza egokienak aurkitzea izan da. Horretarako, gatz kantitate eta molde tamaina ezberdinekin esperimentatu dugu.

### SARRERA

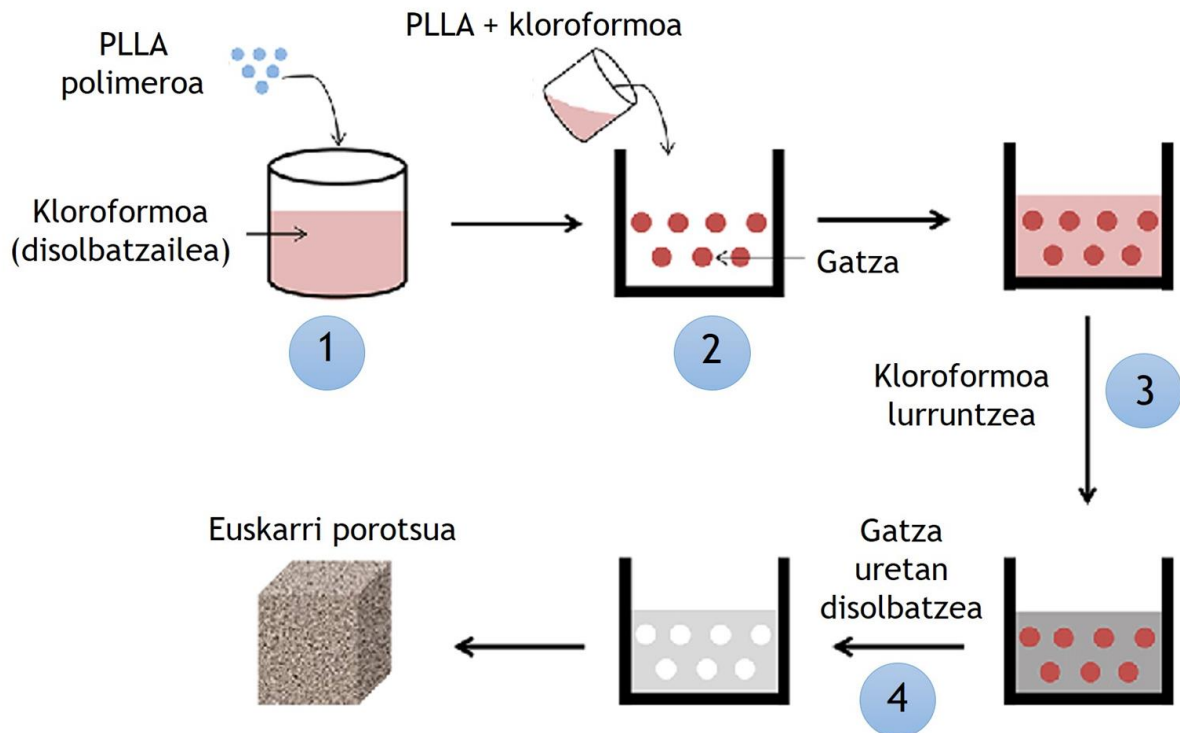
Giza **ehunen ingeneritza**, tresna multzo bat da, ezen inplante batez baliatuz, kaltetuta edo galduta izan den ehun baten birsorkuntza burutzen da, honen birsorketa bideratuz. Hezurretan adibidez, haustura, tumore femoralak, osteoporosia... direla eta, kalte adierazgarriak sortzen dira. Hezurrek ezaugarri autoregeneratiboak badituzte ere, zenbait kasutan honako ezaugarriak ez dira nahikoak kaltetuta dauden ehunak birsortzeko, halaber, haustura handiak egiterakoan birsortze prozesu arruntek ezin dute halako haustura konpondu (Alvarez, 2009). Hau dela eta, hezurren birsortze teknika berrien bilaketa areagotu egin da. Teknika hauek aurrera eramateko, ingeniarietza, biologia eta biokimika alorretako ezagutza eta metodoak erabili behar dira, izan ere, ehun naturalen konposizioa ezagutzeko ordezkoak ekoiz ditzakegu.

Ehunak, funtzio jakin bat betetzen duten eta substantzia batez elkartutak dauden zelula multzoak dira. **Hezur ehuna**, ornodunen eskeleto hezurren osagaia da, organismoaren euskarria eta babeslea dena, gainera mugimenduan laguntzen du. Hezur-ehuna, ehun konektibo mota bat da. Ehun konektiboak hainbat zelula motaz osatuta daude eta ezaugarri aipagarrienetako bat, zelula hauek matrize estrazelular batean sakabanatutak daudela da. Matrize estrazelularra egiturazko sare konplexua da, non zelulak murgilduta dauden. Bi funtzio betetzen ditu: ehunari egiturazko sostengua ematea eta zelulen arteko komunikazioa ahalbidetzea. Dirudienez, matrizearen osagaiak sistema dinamiko eta interaktiboa osatzen dute, bertan dauden zelulei inguruko aldaketen berri emateko. Hezur ehunera bueltatuz, bere matrize estrazelularra hezur matrizea da, osagai organiko eta ez-organiko osatuta dagoena. Osagai organikoen artean kolageno zuntzak daude, hezurri elastikotasuna ematen dietena, eta ez-organikoen baitan fosfato eta kaltzio karbonatoa, hezurra behar duten gogortasuna ematen dutenak. Matrizearen barnean, hainbat zelula mota ezberdin aurki ditzakegu: osteozitoek matrizea sintetizatu eta barruko hutsarte batzuetan harrapatuak geratzen dira; osteoblastoak hezuraren kanpoaldean kokatzen dira eta

zelula artean dagoen substantzien zati organikoak kanporatzen dituzte; azkenik, osteoklastoak, zelula handi, mugikor eta nukleoaniztunak dira, hezur-matrizea berriro xurgatzen dutenak. Bi motatako hezur ehunak daude: trinkoa eta arola. Trinkoaren barruan odol-hodiak eta nerbioak igarotzeko hodiak, eta zelulak txertatzeko hutsarteak daude. Arolan, aldiz, hezur-muin gorria dago, non odol-zelulak sortzen diren (Anaya (Ed), 2018; Badiola & Alonso, 2015; Zubia-Santillana (Ed), 2015). Hezur-ehunaren ezaugarri guzti hauek kontuan hartu beharko dira hezuraren birsorkuntza teknikan ezaugarri egokienak dituzten materialak aukeratu ahal izateko. Aukeratutako materialek izan beharreko ezaugarri ezberdinen artean porositateak garrantzi berezia hartzen duela ondoriozta dezakegu.

Hezur arazoak konpontzeko sortutako lehenengo terapia, gaur egun arte mantentzen dena, material bereziekin sortutako **protesien ezarpena** izan da. Adibidez, titanioa bezalako materialez egindako protesiek gaitasuna dute hezuraren ahalmen mekanikoak konpontzeko. Hala ere, protesiek alderdi negatibo batzuk dituzte. Lehenengo arazoa, ezarritako protesiaren materialen eta inguruko ehunen arteko elkarekintza oso baxua dela. Integrazio falta honen ondorioz, marruskadura indarrak protesi inguruko hezur ehunak higatzen joaten dira. Honetaz gain, beste arazo ohiko bat badago, ebakuntza ondorengo infekzioak. Protisien muga hauen ondorioz mediku eta ikertzaileak beste aukera batzuen bilaketan jarri ziren. Modu honetan, injertoaren erabilera sortu zen. **Autoinjertoak** edo injerto autologoak pazientearen gune osasuntsu bateko hezur ehunen zatiak dira, kaltetutako zonaldean ezartzen direnak. Injerto hauen abantailak inguruko ehunetan ongi integratzen direla eta erantzun innumerik sortzen ez dutela dira. Baina, aukera gutxi dago tamaina handiko kalteak estaltzeko. Aurretik aipatutako arazoak direla eta, oso garrantzitsua da inplante biobateragarriak sortuko dituen teknologia alternatiboak garatzea. Hauek gai izan beharko lirateke kaltetutako zonaldearen funtzionalitatea berreskuratzeko, ehun berrien birsorkuntzaren bitartez (Alvarez, 2009).

Gaur egun, beraz, hezurra edo hezur-matrizea imitatu eta ordezkatu duen **euskarri edo "scafflod"** bat garatzea da hezur-ehunen ingeniartzaren helburua. Euskarri honek ezaugarri espezifiko batzuk eskaini behar ditu: ezaugarri mekaniko egokiak, biodegradagarritasuna eta biobateragarritasuna; ehun berria birsortzen doan bitartean degradatzen dena. Aldi berean, porositate egoki bat izan beharko du, zelulen migrazioa, ehunaren hazkuntza, eta mantenugai eta hondakin metabolikoen garraioa ahalbidetzen duten poroz eratu egongo dena. Euskarrietako materialarentzat polimero sintetikoak erabiltzen ari dira gaur egun, beste material batzuek erakusten dituzten mugak gainditzen dituelako. Polimeroekin euskarriak ekoizteko teknika erabilienetako bat "solvent casting/particulate leaching" da, laburbilduz, honakoan oinarritzen dena (Irudia 1): 1) polimeroa disolbatzaile batean disolbatu; 2) NaCl edo bestelako partikula disolbagarria (uretan disolbagarria) disoluzioan gehitu; 3) disolbatzailea lurruntzen utzi; eta 4) eratutako egitura uretan murgildu gatza desagertu arte. Gatzak utzitako hutsuneak poroak sortuko ditu polimerozko euskarrian barrena, hezuraren matrize estrazelularra imitatuz (Martin *et al.*, 2019).



Irudia 1: “solvent casting/particulate leaching” teknikaren laburpena. Kačarević *et al.* (2019) lanetik moldatua.

**Polimeroak**, errepikatzen diren molekula askoz osatutako kate luzeak dira. Hain luzeak izateak propietate bereziak ematen dizkie, hala nola, moldagarritasuna. Hainbat polimero mota ezberdin daude, bakoitzak funtzio ezberdinak dituelarik. Polimero hauen artean biodegradagarriak dauzkagu, gaur egungo ingurumen-arazoei aurre egiteko erabiltzen dira, hauek denbora laburrean degradatzen direlarik. Biodegradagarriak diren polimero hauek, hainbat motatakoak izan daitezke; naturalak, biopolimeroak ere deituak, eta sintetikoak. Azken hauek, petroleotik lortzen dira eta abantailatsuak dira dituzten propietateekin aplikazio ezberdinetara egokitzeko erraztasuna baitute. Esan bezala, polimero sintetikoek abantailak dituzte, hala nola, degradazio abiadura kontrolagarriak dituzte, propietate mekanikoak aukera daitezke, eta forma ezberdinak ekoizteko edo esterilizatzeko aukera ematen dute. Hainbat polimero biodegradagarri daude, haien artean azido poli L-laktikoa (PLLA). Egitura oso kristalinoa dauka eta fusio tenperatura altua, 180°C ingurukoa. Beste isomero batzuekin alderatuz, daukan propietate mekanikoak hobeak dira eta zailagoa da hidrolizatzeko. Pisu molekular altuko PLLAk 5 urte iraun dezake bixurgatua edo degradatua izan gabe organismo bizidun batean ezarriz gero, hori dela eta, hezurren birsorkuntzarako oso egokiak dira (Labeaga, 2018).

Gure ikerketaren helburu nagusia PLLA polimero biodegradagarria eta “solvent casting/particulate leaching” teknika erabiliz hezurra birsortzeko euskarri porotsuak ekoiztea da. Bigarren helburua ahalik eta euskarri porotsuenak lortzeko baldintza egokienak identifikatzea da. Horretarako, hainbat euskarri ezberdin sortu ditugu, hauek, polimero/gatz ratio eta molde tamaina ezberdinak erabiliz ekoiztu ditugu.

Aurreko informazioa kontuan izanda, PLLA polimeroa eta “solvent casting/particulate leaching” teknika egoki erabiliz, euskarri porotsuak lortuko ditugula uste dugu. Honetaz gain, egindako euskarrietatik bakoitzaren porotasuna aztertu eta egokiena ondorioztatuko dugu, zelulen migrazioa ahalik eta hoberena izan dadin.

## MATERIALAK ETA PROZEDURA

### Materialak:

- 5ml-ko pipeta eta xurgatzilea
- 4 saiodi
- Goilaratxo-espatala
- PLLA (polimero biodegradarria)
- Kloroformoa
- Aluminiozko moldeak cm-tan neurtuta: 2 x 2 x 1 (2 molde) eta 4 x 4 x 5 (2 molde)
- 2 prezipitatu-ontzi
- 2 plastikozko edalontzi
- Almaiza
- Gatza
- Ura
- Etiketak
- Balantza
- Mikroskopia optikoa



Irudia 2: Ikerketa burutzeko erabili ditugun materialak.

### Prozedura:

#### 1. Polimeroa pisatu

Hasteko, azido poli L-laktikoa (PLLA) polimeroaren 250mg-ko lau unitate banatu ditugu (Irudia 3). Horretarako, Andrea Sarria biokimikariaren laguntzaz baliatu gara, izan ere, gure ikastolako balantzek ez daukate behar dugun bereizmena kantitate hain txikiak neurtzeko. Prozesuan zehar erabilitako kantitate guztiak Ester Zuza ikerlariak adierazitakoak dira.



Irudia 3: PLLA polimero poltsa bat, lau unitate 250mg-ko PLLA polimeroak eppendorf hodietan

## 2. *Polimeroa kloroformoan disolbatu*

Ondoren, 4 saioditan 250mg PLLA sartu eta etiketak ipini ditugu. Polimeroak disolbatzeko, saiodi bakoitzean 5ml kloroformo sartu ditugu pipeta erabiliz, saiodiak itxi eta disoluzioa 20 orduz utzi dugu saiodiaren barruan. Kloroformoaren erabilera eta disolbatze denbora kanpaiaren barruan egin dugu (Irudia 4).



Irudia 4: Saiodi bakoitzean 5ml kloroformo.

## 3. *Moldeak egin*

Behin polimeroa disolbatua zegoela, hurrengo pausurako aluminiozko 4 molde sortu ditugu. Horietatik bi, aluminiozko paperarekin egin ditugu, (2 x 2 x 1) cm-ko bolumenarekin. Beste biak egiteko, kasu honetan aluminiozko ontzitxoak erabili ditugu, (4 x 4 x 5) cm-ko bolumenekoak (Irudia 5). Tamaina ezberdineko moldeak eratzearen helburua, lodiera ezberdineko euskarriak sortzea da.

## 4. *Gatza txikitu eta pisatu*

Jarraian, almaizarekin gatza ahalik eta gehien txikitu, eta 4 pisaketa ezberdin egin ditugu 2,2 g pisatzen duten 2 pisaketa eta 4,8 gramo pisatzen duten beste 2 pisaketa. Pisatu dugun gatza aluminiozko ontzi ezberdinetan isuri dugu.

## 5. *Polimero eta kloroformo disoluzioa gatzarekin nahastu*

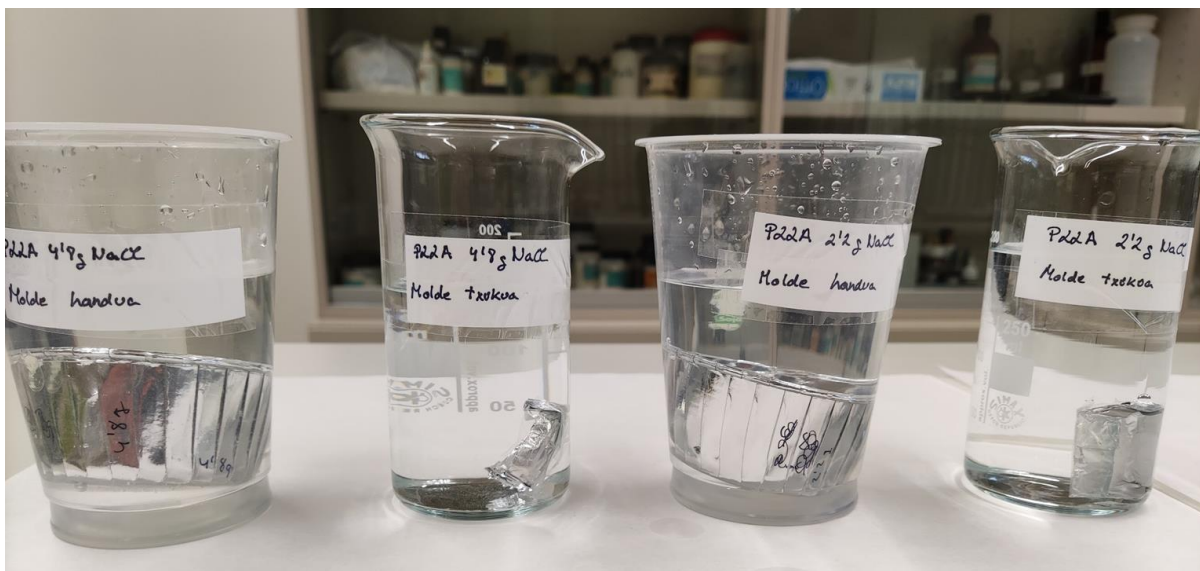
Saiodietan genituen polimero eta kloroformo disoluzio bakoitza aluminiozko ontzitxo bakoitzean isuri eta gatzarekin nahastu dugu goilaratxo batez baliatuz. Nahaste hauek tamaina ezberdineko aluminiozko moldeetan sartu ditugu. Molde handietan, azalera handiko eta lodiera txikiko euskarriak lortuko ditugu eta molde txikietan, azalera txikiagoko eta lodiera handiagoko euskarriak egingo ditugu. Molde txiki eta handi batean 2,2 g gatzdun nahasteak isuri ditugu eta beste molde txiki eta handi batean 4,8 g gatzdun nahasteak (Irudia 5).



Irudia 5: Tamaina ezberdineko aluminiozko moldeak gatz, kloroformo eta polimero nahastearekin. Ezkerretik hasita: 1) 2,2 g gatzdun nahasea (2 x 2 x 1) cm-ko molde txikian; 2) 2,2 g gatzdun nahastea (4 x 4 x 5) cm-ko molde handian 3) 4,8 g gatzdun nahasea (2 x 2 x 1) cm-ko molde txikian; 4) 4,8 g gatzdun nahastea (4 x 4 x 5) cm-ko molde handian

### 6. Kloroformoa lurrundu eta moldeak uretan utzi

Aurreko pausuko nahasteko kloroformoa lurrundu ahal izateko, moldeak 24 orduz utzi ditugu kanpaiaren barruan. Kloroformo guztia lurrundu denean, urez betetako 2 prezipitatu-ontzitan eta 2 plastikozko edalontzitan moldeak sartu ditugu eta 3 egun osoz utzi ditugu (Irudia 6). Modu honetan gatzak uretan disolbatuko da eta gatzak utzitako hutsuneek euskarriari porotasuna emango diote.



Irudia 6: Nahasketak uretan murgildutak

### 7. Euskarri argazkiak atera eta porotasuna konparatu

Lortu ditugun euskarri ezberdinak mikroskopioan jarri ditugu, hauek duten porotasuna aztertu eta konparatzeko helburuarekin. Azken pausu hau errazteko argazkiak egin dizkiogu euskarri bakoitzari (tamaina errealean eta mikroskopioan handituta).



## EMAITZAK

Gatz kantitate eta molde tamaina ezberdinak erabiliz euskarri porotsuak lortu dira. Euskarri hauen porotasuna, bai begi-bistaz zein mikroskopia optikoak erabiliz hauteman daiteke. Sortutako lau euskarrietan, hau da, molde handian 2,2 g eta 4,8 g gatzdun nahastearekin eta molde txikian 2,2 g eta 4,8 g gatzdun nahastearekin, porotasuna nabari daiteke (7-10 Irudiak). Ateratako mikroskopia irudietan, molde handienetako euskarrien poroak ageriagoak dira molde txikikoekin alderatuz (11-14 Irudiak).



Irudia 7: PLLA polimeroaren euskarria, 2,2 g gatzekin nahastua, molde handian.



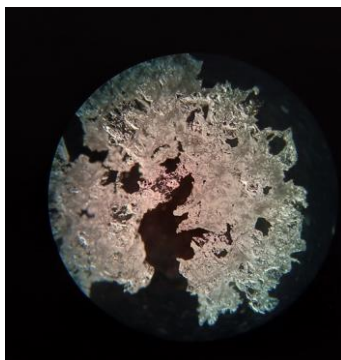
Irudia 8: PLLA polimeroaren euskarria, 2,2 g gatzekin nahastua, molde txikian.



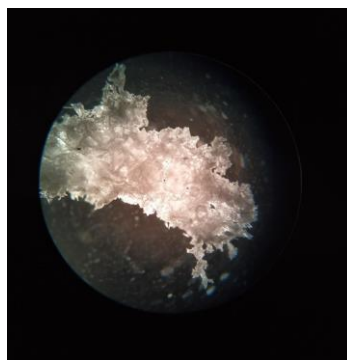
Irudia 9: PLLA polimeroaren euskarria, 4,8 g gatzekin nahastua, molde handian.



Irudia 10: PLLA polimeroaren euskarria, 4,8 g gatzekin nahastua, molde txikian.



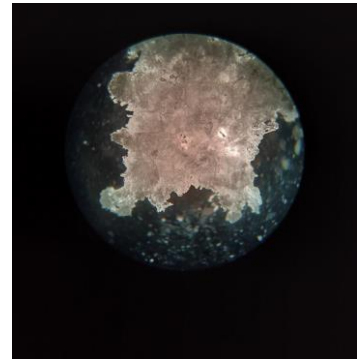
Irudia 11: PLLA polimeroaren euskarria, 2,2 g gatzekin nahastua, molde handian. Mikroskopia optikoa erabiliz.



Irudia 12: PLLA polimeroaren euskarria, 2,2 g gatzekin nahastua, molde txikian. Mikroskopia optikoa erabiliz.



Irudia 13: PLLA polimeroaren euskarria, 4,8 g gatzekin nahastua, molde handian. Mikroskopia optikoa erabiliz.



Irudia 14: PLLA polimeroaren euskarria, 4,8 g gatzekin nahastua, molde txikian. Mikroskopia optikoa erabiliz.

## ONDORIOAK

Ikerketaren emaitzak kontuan hartuz, gure helburu nagusia lortu dugu, izan ere, lortutako scaffoldak porotsuak dira (7-10 irudiak). Hortaz, gure hipotesia baieztatu da, izan ere, “solvent casting/particulate leaching” teknika erabiliz euskarri porotsuak lortu ditugu.

Gure bigarren helburua, berriz, ezin izan dugu lortu, izan ere, ikastolako laborategian eskuragarri dauzkagun tresnekin, euskarri ezberdinen porotasuna ezin dugu egoki

aztertu. Molde handietan sortutako euskarriak porotasun handiagoa daukatela dirudite (11, 13 irudiak) baina, agian, lortutako geruza oso fina zelako izan gara gai mikroskopioan poroak bereizteko. Aldiz, molde txikian lortutako euskarriak lodiagoak ziren eta ez genuen tresna egokirik geruza oso fin bat mozteko, horregatik, agian, mikroskopioan begiratutako geruza lodian (12, 14 irudiak) ezin ditugu poroak bereiztu.

Bestetik, gatza txikitzeko almaiza erabili dugu, baina bestelako tresna egokiagoak erabiliz, tamaina txikiagoko partikulak lortuko genituzke, ziurrenik, porotasun egokiago bat lortuz. Porotasun egoki hau aztertzeko, mikroskopio optikoa erabili beharrean mikroskopio elektronikoa erabili beharko genuke, benetazko euskarriak egiten dituzten ikerlariek bezala (Martin *et al.*, 2009).

Azkenik, honako ikerketaren harira, beste ikerkeketa garatuago bat egin genezake. Honako ikerketan, lortutako euskarrien egokitasuna modu osoago batean aztertuko genuke, izan ere, euskarriaren porotasuna aztertzearekin ez da nahikoa, porotasuna ezinbestekoa bada ere. Scaffoldan zehar dagoen zelulen jarduera aztertu beharko litzateke, zelulek jarduera egoki bat dutela ziurtatuz. Ikerketa hau burutzeko, hainbat faktore bioaktibo gehitu beharko genituzke, hala nola, kolagenoa, antibiotikoak, osteoblastoak... Hala ere, gure ikastolako laborategian eskuragai dauzkagun tresnekin ezinezkoa izango litzateke honako ikerketa burutzea. Pausu hauek, ikerketa berri bat eginen bagenu burutuko genituzke, tresna egokiak lortuko bagenu.

## BIBLIOGRAFIA

**Alvarez, J. F. (2009).** *Regeneración ósea a través de la ingeniería de tejidos*. Revista de Estudios Transdisciplinarios, vol. 1, num. 2, uztaila-abendua, 2019, pp. 98-109. <https://www.redalyc.org/pdf/1792/179214945008.pdf>

**Anaya (Ed) (2018).** *Biología eta Geología 1. Batxilergoa*. Testu liburua ISBN: 978-84-678-5994-2

**Badiola, I. & Alonso, E. (2015).** *Giza histologia orokorra*. Euskal Herriko Unibertsitatea Argitarapen Zerbitzua ISBN 978-84-9082-197-8.

**Labeaga, A. (2018).** *Polímeros biodegradables. Importancia y potenciales aplicaciones*, Master Amaierako Lana, Urrutiko Hezkuntzarako Unibertsitate Nazionala. [http://e-spacio.uned.es/fez/eserv/bibliuned:master-Ciencias-CyTQ-Alabeaga/Labeaga\\_Viteri\\_Aitziber\\_TFM.pdf](http://e-spacio.uned.es/fez/eserv/bibliuned:master-Ciencias-CyTQ-Alabeaga/Labeaga_Viteri_Aitziber_TFM.pdf)

**Martin, V., Anjos, I., Saraiva, A.S., Zuza, E., Gonçalves, L., Alves, M., Santos, C., Ribeiro, I. & Bettencourt, A. (2019).** *Composite scaffolds for bone regeneration and infection control*. The 6th IEE Portuguese Meeting on Bioengineering (ENBENG 2019). <https://ieeexplore.ieee.org/abstract/document/8692450> (*Ester Zuzak bidali digu artikulua*)



**Perić Kačarević, Z., Rider, P., Alkildani, S., et al. (2019).** *An introduction to bone tissue engineering.* The International journal of artificial organs 43(6):039139881987628

<https://www.researchgate.net/publication/335987477> An introduction to bone tissue engineering

**Zubia-Santillana (Ed) (2015).** *Biologia eta Geologia 1. Batxilergoa.* Testu liburua ISBN: 978-84-9894-931-5

## **ESKERRAK**

Lehenik eta behin eskerrak eman nahi dizkiogu Bilboko Ingeniaritza Eskolako **Ester Zuza** ikerlariari. Bera izan da lan honen ideia eta informazio gakoa eman digun ikerlaria eta, hori gutxi ez balitz, ikerketa burutzeko polimeroak eman dizkigu. Prozesu osoa burutu ahal izateko informazioa eta zalantzak berak argitu dizkigu.

Bestetik, **Andrea Sarria** biokimikariari ere bere laguntza eskertu behar diogu polimeroak pisatzeagatik, izan ere, gure ikastolako balantzek ez daukate behar genuen bereizmena hain kantitate txikiak neurtzeko.

Honetaz gain, **Oihana Razkin** irakasleak proiektua bideratu digu, ikerketa burutzen lagundu digu.

Azkenik, eskerrak eman nahi dizkiogu **Elhuyar Zientzia Azokako taldeari** uneoro edozein zalantza argitzeko prestutasuna agertu dutelako.