



**ΕΘΝΙΚΟ ΜΕΤΣΟΒΙΟ ΠΟΛΥΤΕΧΝΕΙΟ**  
**ΣΧΟΛΗ ΜΗΧΑΝΙΚΩΝ ΜΕΤΑΛΛΕΙΩΝ-ΜΕΤΑΛΛΟΥΡΓΩΝ**

**ΣΥΝΘΕΣΗ ΚΟΝΕΩΣ ΥΔΡΟΞΥΔΡΑΠΑΤΙΤΗ ΠΑΡΟΥΣΙΑ ΤΟΥ  
ΒΙΟΠΟΛΥΜΕΡΟΥΣ ΧΙΤΟΖΑΝΗ ΚΑΙ ΑΜΙΝΟΞΕΩΝ**

**ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ**

**ΣΤΕΡΓΙΟΥ ΓΕΩΡΓΙΟΣ**

ΑΘΗΝΑ 2012

## ***Αντί προλόγου...***

Ένα ταξίδι στον κόσμο των βιοϋλικών ξεκίνησε στο 4<sup>ο</sup> έτος φοίτησής μου στη σχολή των Μηχανικών Μεταλλείων - Μεταλλουργών με πρώτο το μάθημα των Κεραμικών υλικών και στη συνέχεια των Πυρίμαχων Υλικών. Τότε πήρα και την απόφαση να ασχοληθώ με το αντικείμενο αυτό και από την πρώτη στιγμή, η Καθηγήτρια και επιβλέπουσα της διπλωματικής αυτής εργασίας Κα Αθηνά Τσετσέκου -την οποία ευχαριστώ από καρδιάς-, με στήριξε πάρα πολύ.

Δίπλα μου καθ'όλη τη διάρκεια της εκπόνησης της εργασίας αυτής ήταν και η Δέσποινα Μπρασινίκα, ετοιμοπόλεμη να μου λύσει οποιαδήποτε απορία και να μου δώσει όλες τις κατευθυντήριες γραμμές για τη λειτουργία του εργαστηρίου.

Παράλληλα θα ήθελα να ευχαριστήσω τους καθηγητές της συμβουλευτικής επιτροπής, κ. Δημήτριο Πάνια και κ. Χρήστο Αργυρούση για τη βοήθεια και τα εύστοχα σχόλια τους κατά τη συγγραφή της διπλωματικής αυτής εργασίας.

Ένα μεγάλο ευχαριστώ οφείλω στην οικογένεια μου, για την υπομονή και την υποστήριξή τους, στις ευχάριστες αλλά και δυσάρεστες στιγμές του ταξιδιού αυτού, αλλά και στους φίλους μου εντός και εκτός του Πολυτεχνείου, που με τον δικό τους τρόπο συνέβαλλαν στην επίτευξη του στόχου μου.

Τέλος θα ήθελα να αφιερώσω την εργασία μου αυτή σε ένα άτομο που όλα τα χρόνια της ζωής μου με στήριξε με όλη της την ψυχή, τη γιαγιά μου.

**"Βαγγελιώ σε ευχαριστώ για όλα"**

# Περιεχόμενα

<b>Περίληψη</b> .....	i
<b>Εισαγωγή</b> .....	1
<b>1. Βιοϋλικά</b> .....	3
1.1 Μεταλλικά Βιοϋλικά.....	4
1.2 Πολυμερή Βιοϋλικά.....	5
1.3 Κεραμικά Βιοϋλικά.....	7
1.3.1 Κεραμικά Βιοϋλικά Φωσφορικού Ασβεστίου.....	8
1.4 Σύνθετα Βιοϋλικά.....	8
<b>2. Δομή και σύσταση οστού</b> .....	10
2.1 Υδροξυαπατίτης.....	13
2.1Εφαρμογές Υδροξυαπατίτη.....	17
2.2 Χιτοζάνη.....	20
2.3 L-Αργινίνη.....	22
<b>3. Πειραματική διαδικασία</b> .....	25
3.1 Περίθλαση Ακτίνων Χ (XRD).....	29
3.2 Υπέρυθρη φασματομετρία με μετασχηματισμό Fourier.....	33
3.3 Ηλεκτρονικό Μικροσκόπιο Διέλευσης ηλεκτρονίων.....	39
3.4 Ηλεκτρονικό Μικροσκόπιο Σάρωσης ηλεκτρονίων .....	48
<b>4. Αποτελέσματα - Συζήτηση</b> .....	56
4.1 Περίθλαση Ακτίνων Χ (XRD).....	56
4.2 Υπέρυθρη φασματομετρία με μετασχηματισμό Fourier.....	63
4.3 Ηλεκτρονικό Μικροσκόπιο Διέλευσης ηλεκτρονίων.....	67
<b>5. Ανάπτυξη Ικτριωμάτων</b> .....	69
5.1 Λυοφυλίωση.....	69

5.2 Πολυσακχαρίτες.....	71
5.3 Αποτελέσματα SEM.....	72
<b>5. Συμπεράσματα.....</b>	<b>77</b>
<b>Βιβλιογραφία.....</b>	<b>79</b>

## ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Σκοπός αυτής της διπλωματικής εργασίας είναι η παρασκευή κόνεως υδροξυαπατίτη παρουσία αργινίνης και χιτοζάνης για την παραγωγή μοσχευμάτων καλύτερης οστεοσυμβατότητας. Στις μέρες μας η ανάγκη για την αντικατάσταση κάποιου κατεστραμμένου ή φθαρμένου τμήματος οστού είναι αυξημένη με αποτέλεσμα να αυξάνεται και η ανάγκη για ένα υλικό με καλύτερες μηχανικές αντοχές στην παροδο του χρόνου αλλά και βελτιωμένη οστεοσυμβατότητα. Στόχος λοιπόν της Ιστικής Μηχανικής είναι η ανάπτυξη υλικών που όχι μόνο είναι βιώσιμα υποκατάστατα των ιστών αλλά αντικαθιστούν, διατηρούν και πολλές φορές βελτιώνουν τη λειτουργία του ιστού.

Τα πλέον ευρέως χρησιμοποιούμενα συνθετικά υλικά που χρησιμοποιούνται για το σκοπό αυτό είναι είτε πλαστικά είτε μεταλλικά και διαμορφώνονται κατάλληλα για την εμφύτευσή τους στον ανθρώπινο οργανισμό. Τα υλικά αυτά όμως είναι ικανά να προκαλέσουν ανοσοποιητική αντίδραση στον οργανισμό και αυτός κατ' επέκταση να τα απορρίψει προκαλώντας πολλές φορές μεγαλύτερη ζημιά στον οργανισμό. Επιπλέον τα υλικά αυτά υπόκεινται σε φθορά με την πάροδο του χρόνου και η αντικατάστασή τους είναι πολυέξοδη και επίπονη διαδικασία. Το πλέον διαδεδομένο υλικό για το σκοπό αυτό είναι το τιτάνιο, το οποίο παρά τις αξιόλογες μηχανικές του ιδιότητες, φθείρεται με την πάροδο του χρόνου και η αντικατάστασή του κρίνεται απαραίτητη.

Έχουν διεξαχθεί αρκετές έρευνες με σκοπό την κατασκευή εμφυτευμάτων με βάση το Τιτάνιο και τη βελτιστοποίηση των ιδιοτήτων τους. Στην συγκεκριμένη μελέτη όμως πραγματοποιήθηκαν έρευνες για τη δημιουργία εμφυτευμάτων απουσία μετάλλου. Για να επιτευχθεί αυτό παρήχθησαν διάφορα μείγματα υδροξυαπατίτη με πρόσθετο το αμινοξύ L-αργινίνη σε διαφορετικές συγκεντρώσεις παρουσία του βιοπολυμερούς χιτοζάνη, και αυτό σε διαφορετικές συγκεντρώσεις. Μετά την παραγωγή τους τα μείγματα αυτά μελετήθηκαν με Περίθλαση Ακτίνων Χ και

Φασματομετρία Υπερύθρου με μετασχηματισμό Fourier για να καθορισθεί η δομή και η κρυσταλλικότητά τους.

# 1. Βιοϋλικά

Βιοϋλικό κατά τον Williams (1987) είναι ένα υλικό που χρησιμοποιείται στη βιοϊατρική τεχνολογία ή ιατρική συσκευή και το οποίο έρχεται σε επαφή ή αλληλεπιδρά με βιολογικά συστήματα ή βιολογικούς οργανισμούς.

Τα βιοϋλικά χρησιμοποιούνται για την αντικατάσταση, τη διάγνωση, τη θεραπεία βιολογικών ιστών και οργάνων, καθώς και για την υποβοήθηση λειτουργίας βιολογικών οργανισμών, με την ελάχιστη δυνατή αντίδραση από τον οργανισμό.

Βιοϋλικά θεωρούνται:

- Βιολογική ύλη
- Βιοσυμβατό μη βιολογικό υλικό
- Φυσικά ή τεχνητά υλικά
- Υλικά που χρησιμοποιούνται στην ιατρική και βιοϊατρική τεχνολογία
- Υλικά για καλλιέργειες κυττάρων
- Υλικά για επεξεργασία και ανάλυση βιομορίων (βιοτεχνολογία)
- Υλικά για μικροσυστοιχίες (Gene microarrays) και biochips
- Υλικά για βιοανιχνευτές
- Υλικά για φαρμακευτική χορήγηση (DDS- Drug Delivery System)
- Υλικά για ιατρικά μοσχεύματα

Τα βιοϋλικά μπορεί να είναι είτε βιολογικά υλικά προερχόμενα από κάποιο οργανισμό-δότη, μεταλλικά υλικά (όπως το Τιτάνιο), κεραμικά υλικά (όπως ο χημικός υδροξυαπατίτης), πολυμερή ή σύνθετα υλικά.[1,6]

<b>Εφαρμογή</b>	<b>Ετήσια παγκόσμια χρήση</b>
Ενδοφάλμιοι φακοί	7.000.000
Φακοί επαφής	75.000.000
Τεχνητά αγγεία	400.000



Τεχνητές αρθρώσεις	1.000.000
Καθετήρες	300.000.000
Καρδιακές βαλβίδες	200.000
Προσθετικά στήθους	300.000
Οδοντιατρικά προσθετικά	500.000
Βηματοδότες	200.000

**Πίνακας 1.1** μέσου όρου χρήσης βιοϋλικών για το έτος 2010

## 1.1 Μεταλλικά Βιοϋλικά

Τα μέταλλα χρησιμοποιούνται ως βιοϋλικά χάρη στην άριστη θερμική και ηλεκτρική αγωγιμότητά τους, αλλά και στις μηχανικές τους ιδιότητες. Ο λόγος είναι η ύπαρξη των ελεύθερων ηλεκτρονίων, τα οποία μπορούν γρήγορα να μεταφέρουν ηλεκτρικό φορτίο και θερμική ενέργεια. Τα κινούμενα ελεύθερα ηλεκτρόνια δρουν ως συνδετική δύναμη που συγκρατούν τα θετικά μεταλλικά ιόντα μαζί. Αυτή η επίδραση είναι δυνατή, όπως γίνεται αντιληπτό από τη διάταξη μέγιστης συμπύκνωσης έχοντας ως αποτέλεσμα υψηλό ειδικό βάρος και τα υψηλά σημεία τήξης των περισσότερων μετάλλων. Καθώς ο μεταλλικός δεσμός είναι μη κατευθυντικός, η θέση των μεταλλικών ιόντων μπορεί να τροποποιηθεί χωρίς να καταστραφεί η κρυσταλλική δομή οδηγώντας σε ένα στερεό που παραμορφώνεται πλαστικά.

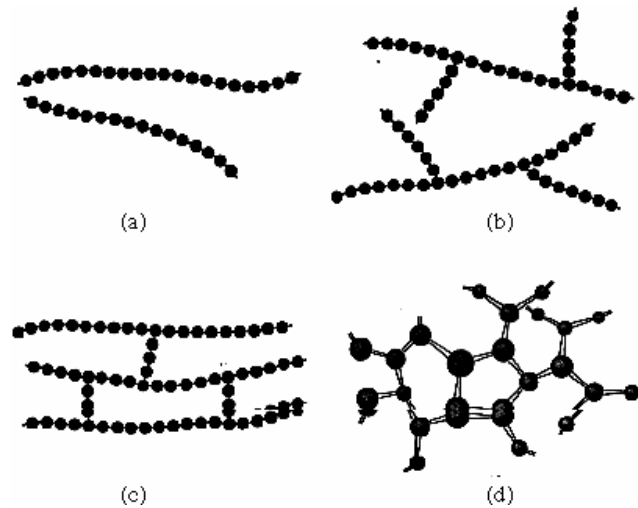
Μερικά μέταλλα χρησιμοποιούνται ως παθητικά υποκατάστατα για σκληρούς ιστούς, όπως επί παραδείγματι στην ολική αρθροπλαστική ισχίου και γόνατος, για την υποστήριξη της επούλωσης καταγμάτων με τη μορφή οστεοσυνθετικών πλακών ή κοχλιών, σε συσκευές συγκράτησης της σπονδυλικής στήλης, αλλά και στα οδοντικά εμφυτεύματα χάρη στις άριστες μηχανικές ιδιότητες. Μερικά μεταλλικά κράματα χρησιμοποιούνται

με πιο ενεργό ρόλο σε συσκευές, όπως οι αγγειακές ενδοπροθέσεις (stents), τα σύρματα καθοδήγησης σε καθετηριασμούς, ορθοδοντικά τόξα και κοχλιακά εμφυτεύματα.

Το πρώτο μεταλλικό κράμα που αναπτύχθηκε ειδικά για εφαρμογές στον άνθρωπο ήταν ο κραματοποιημένος χάλυβας με βανάδιο στην κατασκευή οστεοσυνθετικών πλακών και κοχλιών. Τα περισσότερα μέταλλα, όπως ο σίδηρος, το χρώμιο, το κοβάλτιο, το νικέλιο, το τιτάνιο, το ταντάλιο, το νιόβιο, το μολυβδένιο και το βολφράμιο, που δοκιμάστηκαν σε κράματα για ανάλογες εφαρμογές ήταν ανεκτά από τον οργανισμό μόνο σε ελάχιστες ποσότητες. Μερικές φορές αυτά τα μεταλλικά στοιχεία στις φυσικές τους μορφές είναι σημαντικά για τις λειτουργίες των ερυθροκυττάρων (σίδηρος) ή τη σύνθεση της βιταμίνης B12 (κοβάλτιο), ωστόσο δεν είναι ανεκτά σε μεγάλες ποσότητες. Η βιοσυμβατότητα των μεταλλικών εμφυτευμάτων είναι ένα θέμα στο οποίο επικεντρώνεται σε μεγάλο βαθμό το ερευνητικό ενδιαφέρον, καθώς αυτά τα εμφυτεύματα είναι δυνατόν να διαβρωθούν και σε *in vivo* περιβάλλον, προκαλώντας την καθεαυτή αποσύνθεση του εμφυτεύματος που το αποδυναμώνει, αλλά και βλαβερή επίδραση των προϊόντων της διάβρωσης στους περιβάλλοντες ιστούς και όργανα.

## 1.2 Πολυμερή Βιοϋλικά

Πολυμερή χαρακτηρίζονται τα υλικά που αποτελούνται από πολύ μεγάλα μόρια- αλυσίδες ατόμων άνθρακα, στα οποία συνδέονται διάφορα άτομα ή ρίζες. Γίνεται αντιληπτό ότι τα μακρομόρια αυτά αποτελούνται από ομάδες μονομερών, δηλαδή μικρότερες δομικές μονάδες, που επαναλαμβάνονται κατά μήκος της αλυσίδας, με αποτέλεσμα το μοριακό βάρος να είναι πολύ υψηλό υπερβαίνοντας κάποιες φορές το ένα εκατομμύριο. Οι αλυσίδες δεν είναι πάντα γραμμικές, αλλά συχνά μπορούν να διακλαδώνονται, να διασταυρώνονται ή να δικτυώνονται σχηματίζοντας τρισδιάστατες δομές. Αυτές οι διαμορφώσεις επιφέρουν αλλαγές στα φυσικά χαρακτηριστικά και τη συμπεριφορά του υλικού.



**Σχήμα 1.1:** Σχηματικές αναπαραστάσεις (a) γραμμικών, (b) διακλαδωμένων, (c) διασταυρωμένων και (d) δικτυωμένων μοριακών δομών. Οι κύκλοι δηλώνουν τις ανεξάρτητες ομάδες μονομερών. [Callister, 1999]

Τα πολυμερή που χρησιμοποιούνται ως βιοϋλικά είναι είτε φυσικά είτε τεχνητά. Τα φυσικά πολυμερή, που ανήκουν στην κατηγορία των βιομοριακών υλικών, παράγονται μέσα από βιολογικές διεργασίες και απαντώνται, κατά κύριο λόγο, στο εξωκυττάριο υλικό των συνδετικών ιστών, όπως επί παραδείγματι στους τένοντες, στο δέρμα, στα οστά, στα δόντια και στα αιμοφόρα αγγεία. Αντιπροσωπευτικά δείγματα είναι το κολλαγόνο, η ελαστίνη, το μετάξι, η κερατίνη, η ακτίνη και η μυοσίνη. Λειτουργικός τους ρόλος είναι η μηχανική στήριξη, η εξωτερική προστασία, η θερμική μόνωση, η συστολή και κινητικότητα, μπορεί όμως να έχουν και δομικό ρόλο. [1,3-5] Η δομή και οι ιδιότητές τους παρουσιάζουν ιδιαίτερο ενδιαφέρον και, ως εκ τούτου, αξιοποιούνται και στα τεχνητά εμφυτεύματα στην προσπάθεια μίμησης των φυσικών βιολογικών δομών.

Αρκετά εκτεταμένη, ωστόσο, είναι και η χρήση των τεχνητών πολυμερών ως βιοϋλικών, κυρίως χάρη στην ικανότητά τους να μορφοποιούνται εύκολα και να αποκτούν διάφορες μορφές, όπως νήματα, ράβδοι, ιξώδη υγρά και υμένα. Παρά το γεγονός, όμως, ότι κατασκευάζονται και μορφοποιούνται αρκετά εύκολα, υστερούν σε σχέση με άλλα βιοϋλικά στη συμπεριφορά τους μεσομακροπρόθεσμα. Οι κυριότερες κατηγορίες τεχνητών πολυμερών με εφαρμογές στα βιοϋλικά

είναι το πολυαιθυλένιο, τα πολυαμίδια, ο πολυμεθακρυλικός μεθυλεστέρας, το πολυτετραφθοροαιθυλένιο, οι πολυουρεθάνες και άλλες κατηγορίες η δομή και οι ιδιότητες των οποίων αναπτύσσονται παρακάτω.

Οι κυριότερες απαιτήσεις που τίθενται όσον αφορά στη χρησιμοποίηση των πολυμερών ως βιοϋλικών είναι:

- η βιοσυμβατότητα, δηλαδή η ικανότητα του υλικού να μην προκαλεί καρκινογένεση, τοξικότητα και αλλεργική αντίδραση
- οι φυσικές ιδιότητες, δηλαδή η αντοχή, η ελαστικότητα και η σταθερότητα του υλικού
- η ικανότητα μορφοποίησης, με εξώθηση, σε καλούπι ή σχηματισμός ινών
- η ικανότητα αποστείρωσης, σε αυτόκλειστο, με θερμή ξήρανση, με αέριο αιθυλενοξειδίο και ακτινοβολία.

### 1.3 Κεραμικά Βιοϋλικά

Ο όρος κεραμικά αναφέρεται σε θερμικά κατεργασμένα υλικά (με έψηση) τα οποία προέρχονται από αργιλικές πρώτες ύλες. Τα κεραμικά υλικά σήμερα καλύπτουν μεγάλο εύρος εφαρμογών στην ιατρική. Ενδεικτικά αναφέρεται η χρήση της πορσελάνης στην οδοντιατρική και της αλουμίνας, της ζirkονίας και του φωσφορικού ασβεστίου στην ορθοπεδική. Τα βασικά πλεονεκτήματα των κεραμικών έναντι των μετάλλων εστιάζονται στην αυξημένη αντίσταση στη διάβρωση, τη σχετικά χαμηλή πυκνότητα, στο υψηλό μέτρο ελαστικότητας και στην καλή αντοχή στη θλίψη. Τα μειονεκτήματα που εμφανίζουν σε σχέση με τα μεταλλικά υλικά σχετίζονται με τη μικρή αντοχή σε εφελκυσμό, την ευθραυστότητα, την εύκολη διάδοση των ρωγμών και τη μικρή αντοχή σε κόπωση.[4]

### 1.3.1 Κεραμικά Βιοϋλικά Φωσφορικού ασβεστίου

Τα άλατα φωσφορικού ασβεστίου συγκεντρώνουν το ερευνητικό ενδιαφέρον ως προς τη δυνατότητα χρήσης τους ως χειρουργικών εμφυτευμάτων, οδοντικών εμφυτευμάτων, αλλά και ως υλικών πλήρωσης οστικών ελλειμμάτων. Εκτός από τη βιοσυμβατότητα αυτών των υλικών, σημαντικό χαρακτηριστικό είναι η ικανότητά τους να ενισχύουν την ανάπτυξη οστεογενετικών κυττάρων, ενώ η επιφανειακή εναπόθεσή τους, κυρίως υδροξυαπατίτη [κεφ.2.1], σε μεταλλικά προσθετικά υλικά συντελεί στην καλύτερη πρόσδεση του βιοϋλικού με το φυσικό οστό. Παρ' όλα αυτά, στην περίπτωση που η επικάλυψη δεν είναι επιτυχής και υπάρχει αποκόλληση της σκόνης, έχουν αναφερθεί προβλήματα λοίμωξης στους παρακείμενους ιστούς. Για το σκοπό αυτό, η έρευνα εστιάζεται στην ανάπτυξη τεχνικών επικάλυψης.[2]

### 1.4 Σύνθετα Βιοϋλικά

Στην κατηγορία των σύνθετων υλικών εντάσσονται τα υλικά που αποτελούνται από δύο ή περισσότερα συστατικά, τα οποία συνδυάζονται για να επιτευχθούν ειδικές ιδιότητες και χαρακτηριστικά, που καθένα από τα συμμετέχοντα συστατικά δεν μπορεί από μόνο του να επιτύχει. Τα σύνθετα υλικά χαρακτηρίζονται από τη συνύπαρξη δύο τουλάχιστον μακροσκοπικά διακρινόμενων συστατικών, της μήτρας και της ενισχυτικής φάσης, με το συστατικό ενίσχυσης να προσδίδει στο υλικό βελτιωμένες μηχανικές, κυρίως, ιδιότητες. Η μήτρα είναι, συνήθως, χαμηλής πυκνότητας και η συμμετοχή του στο σύνθετο εξασφαλίζει τη μέγιστη δυνατή εκμετάλλευση των ιδιοτήτων της ενίσχυσης. [6]

Ανάλογα με τη μορφή του συστατικού ενίσχυσης, τα σύνθετα κατατάσσονται σε:

- Σύνθετα υλικά με ενίσχυση ινών (fibrous composites)
- Σύνθετα υλικά με ενίσχυση σωματιδίων (particulate composites)

- Στρωματικά σύνθετα υλικά (laminar composites)

Τα σύνθετα υλικά βρίσκουν εφαρμογή στην Ορθοπεδική και στην Οδοντιατρική. Ιδιαίτερο ενδιαφέρον παρουσιάζει η αξιοποίηση του υδροξυαπατίτη στα σύνθετα υλικά με στόχο τη μίμηση της δομής και των ιδιοτήτων των φυσιολογικών οστών, με προοπτική τη δυνατότητα αξιοποίησης τέτοιων σύνθετων υλικών ως οστικών υποκατάστατων.

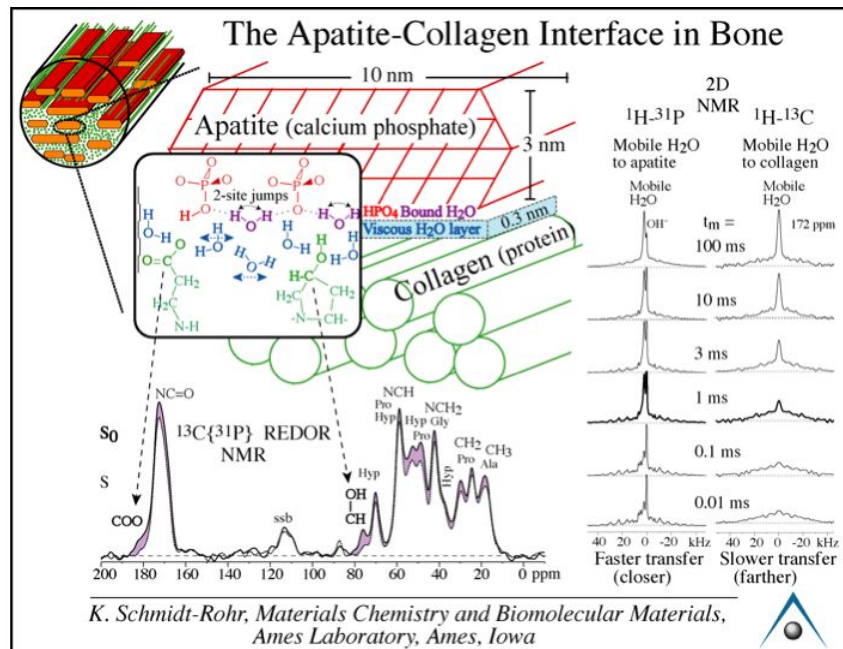
## 2. ΔΟΜΗ ΚΑΙ ΣΥΣΤΑΣΗ ΟΣΤΟΥ

Τα οστά χαρακτηρίζονται από μεγάλο βαθμό στερεότητας και αντοχής, αλλά μικρό βαθμό ελαστικότητας. Η βασική τους λειτουργία είναι η στήριξη και η προστασία των διάφορων οργάνων (προστασία σπλάχνων και ζωτικών οργάνων που βρίσκονται εντός ειδικών κοιλοτήτων), παράλληλα όμως ο ρόλος τους είναι σημαντικός στο μεταβολισμό του ασβεστίου, του οποίου αποτελούν τη σπουδαιότερη αποθήκη καθώς και πηγή προμήθειας για τις ανάγκες του οργανισμού. Επιπλέον σε όλη τη διάρκεια της ζωής ανακατασκευάζονται, για να προσαρμοστούν σε καινούργιες μηχανικές συνθήκες λειτουργίας που δημιουργούνται.[7,8]

Τα οστά αποτελούνται από οργανικό και ανόργανο μέρος. Το οργανικό μέρος είναι το 35% περίπου και το 65% είναι τα ανόργανα συστατικά.

Το οργανικό μέρος περιλαμβάνει:

- Τα κύτταρα του οστίτη ιστού.
- Τα κολλαγόνα ινίδια (πρωτεΐνες με μεγάλη περιεκτικότητα σε γλυκίνη, προζίνη, οξυπροζίνη).
- Τη θεμέλια ουσία (πρωτεΐνες: κυρίως πολυσακχαρίτες). Τα κολλαγόνα ινίδια και η θεμέλια ουσία συνιστούν τη μεσοκυττάρια ουσία του οστίτη ιστού.



**Σχήμα 2.01** Δομή οστού, σχέση απατίτη-κολλαγόνου για το φυσικό οστό. (Materials Chemistry and Biomolecular Materials Program)

Τα κύτταρα του οστίτη ιστού είναι οι οστεοβλάστες, τα οστεοκύτταρα και οι οστεοκλάστες (σύμφωνα με κάποιους τα εξειδικευμένα κύτταρα του οστίτη ιστού θεωρούνται ότι είναι τεσσάρων τύπων: οιοστεοβλάστες, τα οστεοκύτταρα, οιοστεοκλάστες και οι οστεοβλάστες επιφανείας). Το οστό συντίθεται από τους οστεοβλάστες, συντηρείται από τα οστεοκύτταρα και αποδομείται από τους οστεοκλάστες. Πρόκειται για μια σειρά κυττάρων συνδετικογενούς προελεύσεως και ιδιάζουσας δυναμικότητας.

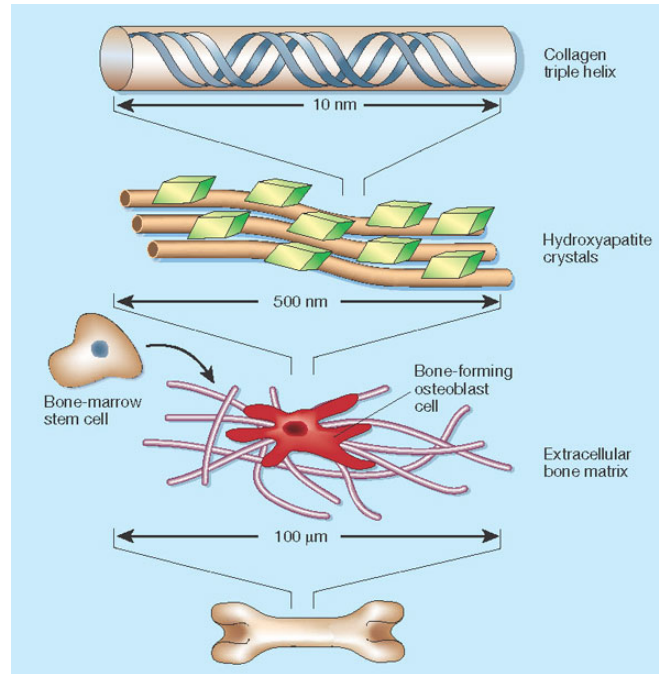
Οι οστεοβλάστες αποτελούν τα οστεοπαραγωγικά κύτταρα που παράγουν τη μεσοκυττάρια ουσία. Η τελευταία μετά την οστεοποίησή της περικλείει τους οστεοβλάστες που μετατρέπονται στη φάση αυτή σε οστεοκύτταρα. Τα οστεοκύτταρα δημιουργούν αποφυάδες που φέρονται μέσα στα οστικά σωληνάρια και έτσι επικοινωνούν μεταξύ τους. Τα κύτταρα αυτά δεν αποτελούν ανενεργά στοιχεία του οστού, όπως πιστευόταν παλαιότερα, αλλά συμμετέχουν ενεργά στο μεταβολισμό και την ομοιόσταση του ασβεστίου. [7,8]

Οι οστεοκλάστες είναι πολυπύρρηνα γιγαντοκύτταρα (με 2-60 πυρήνες) ειδικευμένα στην απορρόφηση οστίτη ιστού. Βρίσκονται σε θέσεις, όπου γίνεται αποδόμηση του οστίτη ιστού και ενεργοποιούνται ύστερα από δράση της παραθυρμόνης.

Τα κολλαγόνα ινίδια παράγονται από τους οστεοβλάστες και έχουν διαφορετική σύνθεση από τα ινίδια άλλων ιστών, γεγονός που κάνει δυνατή την εναπόθεση σε αυτά αλάτων ασβεστίου.

Η μεσοκυττάρια ουσία του οστίτη ιστού αποτελείται από οργανική και ανόργανη φάση. Η οργανική φάση ή οστεοειδές αποτελείται από θεμέλια ουσία και κολλαγόνες ίνες οι οποίες σχηματίζουν δεσμίδες από οστέινη ουσία, ενώ η ανόργανη κυρίως από άλατα ασβεστίου.





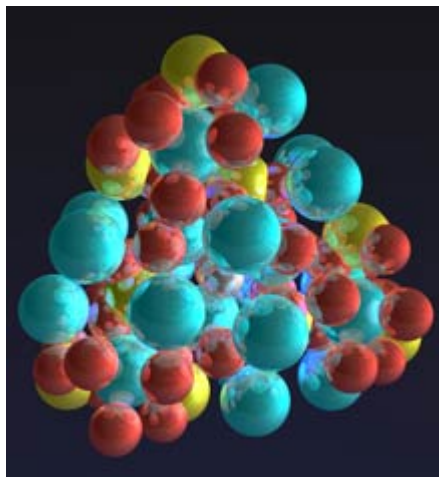
**Σχήμα 2.02** Δομή οστού, σχέση απατίτη-κολλαγόνου-οστεοβλαστών για το φυσικό οστό. ( Nanotechnology: Boning up on biology-T. Andrew Taton)

Τα ανόργανα συστατικά των οστών είναι κυρίως το φωσφορικό ασβέστιο (80-90%) που βρίσκεται με τη μορφή υπερμικροσκοπικών κρυστάλλων του υδροξυαπατίτη, το ανθρακικό ασβέστιο (8-10%), το φθοριούχο και χλωριούχο ασβέστιο (0,5%), το φωσφορικό μαγνήσιο (1-2%) και τα αλκαλικά άλατα (2%). Τα συστατικά αυτά εμποτίζουν τη θεμέλια ουσία καθώς και τα κολλαγόνα ινίδια. (Σχήμα 2.02)

Όπως προκύπτει από τα παραπάνω, το οστό είναι ουσιαστικά ένα κεραμικό σύνθετο υλικό αποτελούμενο από μέταλλα και πρωτεΐνες. Για το λόγο αυτό, για την παραγωγή τεχνητού οστού προτιμάται ένα σύνθετο υλικό που μιμείται τις ιδιότητες του φυσικού. Στην παρούσα μελέτη το κολλαγόνο τύπου I που αποτελεί τη μήτρα του οστού αντικαταστάθηκε από τη χιτοζάνη και συνδυάστηκε με Υδροξυαπατίτη παρουσία του αμινοξέος L-Αργινίνη. Πιο συγκεκριμένα δε χρησιμοποιήθηκε εμπορικός υδροξυαπατίτης αλλά παρήχθηκε in vitro παρουσία του πολυμερούς και του αμινοξέος. [9]

## 2.1 Υδροξυαπατίτης

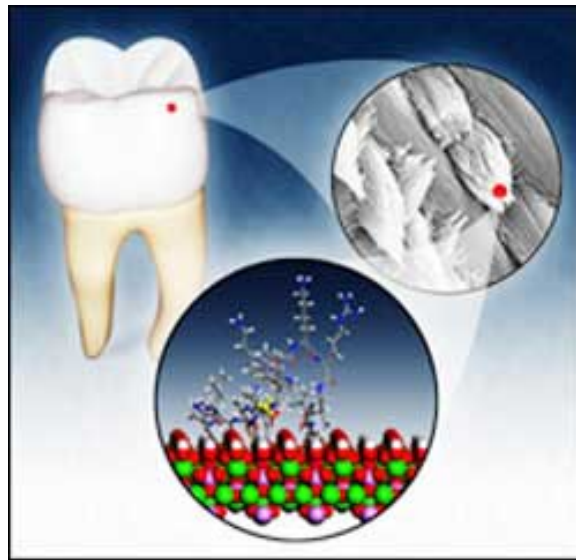
Ο Υδροξυαπατίτης ( HAp ) με τη χημική δομή  $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$  χρησιμοποιείται ευρέως ήδη στην Ιατρική για την κατασκευή εμφυτευμάτων εξαιτίας της ομοιότητάς του με τα μεταλλικά συστατικά που ευρίσκονται σε σκληρούς ιστούς , όπως στα δόντια και στα οστά. Η δομή του μοιάζει έντονα με εκείνη του **βιοαπατίτη**, ένα ορυκτό φωσφορικού ασβεστίου , το οποίο είναι το κύριο ανόργανο συστατικό που ευρίσκεται σε σκληρούς ιστούς με κύριο στοιχείο το ασβέστιο ( δόντια και οστά ) που συναντώνται στα σπονδυλόζωα . Πρόκειται για ένα άριστο βιοσυμβατό υλικό με σκληρούς ιστούς, το οποίο παρουσιάζει οστεοαγώγιμες ιδιότητες όπως επίσης μη τοξική , μη φλεγμονώδη και μη ανοσογόνα συμπεριφορά. Λόγω του υψηλού επιπέδου βιοσυμβατότητας που παρουσιάζει, είναι συνήθως το υλικό που επιλέγεται για την κατασκευή βιοκεραμικών, όπου παρουσία των φυσιολογικών ρευστών, δημιουργεί σταθερούς δεσμούς έτσι ώστε να προκύψουν σκληροί (και σε μερικές περιπτώσεις μαλακοί) ιστοί [10-11].



**Σχήμα 2.03** Απεικόνιση της δομής του Υδροξυαπατίτη.

Ο Υδροξυαπατίτης είναι χημικά παρόμοιος με το κύριο συστατικό των οστών και των σκληρών ιστών στα θηλαστικά. Σκληροί ιστοί, όπως οστά, οδοντίνη (dentin) και οδοντικό σμάλτο (**Σχήμα 2.04**) είναι φυσικά

σύνθετα, τα οποία περιέχουν Υδροξυαπατίτη, (καθώς επίσης πρωτεΐνες, άλλα οργανικά υλικά και νερό. Το σμάλτο είναι ο πλέον άκαμπτος (stiffest) σκληρός ιστός, με ένα μέτρο ελαστικότητας  $E=74$  GPa, και περιέχει το περισσότερο ορυκτό. Η οδοντίνη ( $E=21$  GPa) και συμπαγείς ιστοί ( $E=12$  έως  $18$  GPa) περιέχουν συγκριτικά λιγότερο ορυκτό. Ο λόγος Poisson για τον ορυκτό ή συνθετικό υδροξυαπατίτη είναι περίπου  $0.27$ , τιμή που πλησιάζει αυτό των οστών ( $= 0.3$ ). Είναι ένα από τα λίγα υλικά που ταξινομούνται ως βιοενεργά, αυτό σημαίνει ότι έχει την ικανότητα να βοηθά το κόκκαλο στην ανάπτυξη του[12-14].



**Σχήμα 2.04** Απεικόνιση της δομής του Υδροξυαπατίτη που απαντάται στο δόντι.

Ο Υδροξυαπατίτης είναι μια θερμικά ασταθής ένωση, καθώς αποσυντίθεται σε θερμοκρασία  $800-1200^{\circ}\text{C}$  ανάλογα με τη στοιχειομετρία του. Επιπλέον, κατά γενική ομολογία ο πυκνός υδροξυαπατίτης δεν έχει τη μηχανική αντοχή για να διατηρηθεί αναλλοίωτος για μεγάλο χρονικό διάστημα σε περιβάλλον όπου υπόκειται σε μεγάλες πιέσεις και τριβές.

Εντούτοις, παρουσιάζει σπουδαίες ιδιότητες όπως είναι η εξαιρετική βιοσυμβατότητα. Ο υδροξυαπατίτης φαίνεται να σχηματίζει ένα άμεσο χημικό δεσμό με σκληρούς ιστούς. Με την εμφύτευση Υδροξυαπατίτη ως σωματιδίων ή πορωδών μερών σε οστά, νέα δικτυωτά πολυστρώματα οστών σχηματίζονται εντός 4 έως 8 εβδομάδων[3,15].

Επιστρώματα Υδροξυαπατίτη εφαρμόζονται συχνά στα μεταλλικά μοσχεύματα για να αλλάξουν τις ιδιότητες της επιφάνειας. Με τον τρόπο αυτό ο οργανισμός θεωρεί πως το εμφύτευμα είναι κατασκευασμένο από Υδροξυαπατίτη, υλικό με πολύ μεγάλη βιοσυμβατότητα. Χωρίς την ύπαρξη του επιστρώματος ο οργανισμός θα εντόπιζε ένα ξένο σώμα και θα εργαζόταν με τέτοιο τρόπο ώστε να το απομονώσει από τους περιβάλλοντες ιστούς.

Ο υδροξυαπατίτης μπορεί να συναντηθεί σε διάφορες μορφές όπως σκόνη ή κόκκοι και μπορεί να χρησιμοποιηθεί για να γεμίσει τις ατέλειες ή τα κενά οστών. Αυτά τα κενά και οι ατέλειες μπορούν να προκύψουν σε περιπτώσεις όπου πρέπει να αφαιρεθούν μεγάλα τμήματα του οστού (π.χ. καρκίνοι οστών). Το υλικό πληρώσεως των οστών θα παράσχει ένα ικρίωμα και θα ενθαρρύνει τη γρήγορη πλήρωση του κενού διαμορφώνοντας το οστό. Θα γίνει επίσης μέρος της δομής των οστών και θα μειώσει αισθητά τον χρόνο θεραπείας (επούλωσης), καθώς εάν κανένα υλικό πληρώσεως των οστών δεν χρησιμοποιούταν τότε ο χρόνος θεραπείας για το ίδιο περιστατικό θα ήταν κατά πολύ μεγαλύτερος.

Ο Υδροξυαπατίτης μπορεί να συντεθεί με ποικίλες μεθόδους όπως αντιδράσεις στερεάς κατάστασης, τεχνικές πλάσματος, κρυστάλλωση υπό υδροθερμικές συνθήκες, υδρόλυση στρώματος άλλων αλάτων φωσφορικού ασβεστίου και μέσω της τεχνικής sol-gel. Αυτές οι συμβατικές μέθοδοι, εντούτοις, παράγουν κυρίως ακανόνιστες μορφές κόνεων που είναι ανεπιθύμητες βεβαίως, δεδομένου ότι το μέγεθος και η μορφολογία καθορίζουν κατά ένα μεγάλο μέρος τη βιολογική συμπεριφορά του εκάστοτε υλικού. Το οστό είναι φύσει ένα σύνθετο υλικό, αποτελούμενο από νανοράβδους Υδροξυαπατίτη ενσωματωμένους στη μήτρα κολλαγόνου. Επομένως, αυτοί είναι οι λόγοι για τους οποίους οι νανοράβδοι Υδροξυαπατίτη προτιμώνται σε περιπτώσεις που απαιτείται βιοσυμβατότητα [10].

Ο καθαρός Υδροξυαπατίτης είναι ένα σκληρό, εύθραυστο κεραμικό υλικό με Μέτρο Ελαστικότητας 130 GPa, τιμή μέγιστης παραμόρφωσης 0.001 και μέγιστη αντοχή 100 MPa. Βέβαια, η μέγιστη παραμόρφωση ενός κράματος

είναι περίπου τέσσερις φορές υψηλότερη από του καθαρού υδροξυαπατίτη. Επειδή έχει υψηλό βαθμό βιοσυμβατότητας, είναι συνήθως το υλικό που επιλέγεται για την κατασκευή πυκνών αλλά και πορωδών βιοκεραμικών. Είναι επίσης ένα πλήρως σημαντικό και πολλά υποσχόμενο υλικό, ως ενισχυτικό πληρωτικό για κράματα, μονωτικούς παράγοντες και χρωματομέγεθος για απλό και γρήγορο εγκλωβισμό πρωτεϊνών και νουκλεϊκών οξέων.

Επειδή το κολλαγόνο λειτουργεί ως το μακρομόριο πλαισίωσης κατά τη βιο-ορυκτοποίηση του οστού, ενώ οι μη κολλαγονούχες πρωτεΐνες λειτουργούν ως μακρομόρια ελέγχου, η βιομιμητική προσέγγιση (θα αναλυθεί ως όρος παρακάτω) έχει αρχίσει πρόσφατα να επιχειρείται για τη σύνθεση του Υδροξυαπατίτη. Τα μακρομόρια, όπως τα μονοσάκχαρα και τα σχετικά πολυμερή έχουν ερευνηθεί και βρέθηκε ότι η προσθήκη τους επέδρασε σημαντικά όσον αφορά στη μορφολογία του Υδροξυαπατίτη. Παρόλα αυτά, αυτά τα μακρομόρια παρουσιάζουν γενικώς μία ευρεία διασπορά μοριακού βάρους που παρεμποδίζει τη χρήση τους σε ιατρικές εφαρμογές.

Ο υδροξυαπατίτης είναι λευκός κρυσταλλικός με εξαγωνική μορφή, έχει μοριακό βάρος 502.31, πυκνότητα 3.16 g/cc, μέγιστη αντοχή στη συμπίεση 300-900 MPa, μέτρο ελαστικότητας 80-120 GPa, σκληρότητα κατά Vickers 450-530 και λόγο Poisson περίπου 0.28. [paper] Δεν χάνει εύκολα τα υδροξύλια του από το κρυσταλλικό του πλέγμα, το οποίο παραμένει σταθερό μέχρι τους 1000°C. Άνω των 1500°C αποσυντίθεται σε ένα μίγμα ουδέτερου φωσφορικού ασβεστίου (τρι-ασβεστούχο φωσφορικό άλας,  $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ ) και τετρα-ασβεστούχο φωσφορικού άλατος ( $\text{Ca}_4(\text{PO}_4)_3$ ). Πρόσφατες έρευνες έδειξαν ότι με παρουσία  $\text{TiO}_2$  η θερμοκρασία αποσύνθεσης του υδροξυαπατίτη μειώνεται στους 800°C. Η βιβλιογραφία για τον υδροξυαπατίτη είναι εκτεταμένη, και διάφοροι τύποι υδροξυαπατίτη έχουν παρασκευαστεί με διαφορετικές μεθόδους όπως με τις αντιδράσεις στερεάς κατάστασης, μέσω καθίζησης και υδρόλυσης φωσφορικού ασβεστίου και με τη μέθοδο sol-gel. Αρκετές κατηγορίες υδροξυαπατίτη έχουν μη στοιχειομετρική σύσταση και περιλαμβάνουν κατηγορίες ανεπαρκείς σε ασβέστιο, που ονομάζονται υδρίδια

τριασβεστούχου φωσφορικού άλατος, και αρκετά επεξεργασμένα προϊόντα με κλάσμα ασβεστίου/φωσφόρου μεταξύ 1.3 και 2.00 (Ca/P υδροξυαπατίτη = 1.67). Τα πιο ακάθαρτα προϊόντα μπορεί να περιέχουν ποσότητες  $\text{Ca(OH)}_2$ ,  $\text{CaHPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  ή  $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ . [15-17]

Η ανυπαρξία στοιχειομετρίας μπορεί να ληφθεί υπόψη μόνο για σθένη μέσα στο πλέγμα ή αντικαταστάσεις στο κρυσταλλικό πλέγμα ή στην επιφάνεια, και παραμένει ένα θέμα προς έρευνα. Υδροξυαπατίτες που πλησιάζουν τον ιδανικό χημικό τύπο μπορούν να παρασκευαστούν με προσθήκη υδροξειδίου του ασβεστίου σε αραιό διάλυμα ορθοφωσφορικού οξέος και εξουδετέρωση στο σημείο βρασμού. Οι βιολογικοί απατίτες έχουν κλάσμα  $\text{Ca/P} < 1.67$ , ενώ οι εμπορικοί υδροξυαπατίτες μπορεί να περιέχουν  $\text{CaHPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  ή  $\text{Ca(OH)}_2$ .

## ΕΦΑΡΜΟΓΕΣ ΥΔΡΟΞΥΑΠΑΤΙΤΗ

Ενώ πολυάριθμα κράματα πολυμερών – υδροξυαπατίτη έχουν ερευνηθεί, πολύ λίγα έχουν διεξαχθεί με δένδριμερική πολυμερή και υδροξυαπατίτη. Όπως τελικά φαίνεται, τα δένδριμερική πολυμερή και ιδιαίτερος τα δένδριμερή έχουν πολλαπλές λειτουργίες, ειδικότερα δε ότι είναι διαθέσιμα για χημικές αντιδράσεις ή σχεδιασμένες αλληλεπιδράσεις. Αυτό το στοιχείο είναι πλεονεκτικό για τη ιστική μηχανική (tissue engineering). Οι πολλαπλές λειτουργίες των δένδριμερών θα μπορούσαν να επιτρέψουν αυξημένη αλληλεπίδραση με τον κεραμικό υδροξυαπατίτη. Μία συμβιοτική αλληλεπίδραση θα ενδυνάμωνε τη μήτρα και θα μπορούσε να βοηθήσει στον περιορισμό της κρυστάλλωσης του υδροξυαπατίτη. Αυτή η άμορφη εκδοχή του υδροξυαπατίτη μοιάζει πιο πολύ με τον απατίτη που ευρίσκεται φυσικά στο κόκκαλο. Οι αυξημένες αλληλεπιδράσεις ωθούν προς την κατεύθυνση της αύξησης της αντοχής του υδροξυαπατίτη μέσα στο κράμα.

Το φωσφορικό ασβέστιο ως κρύσταλλοι στη μορφή πλακιδίων ή βελονών υδροξυαπατίτη είναι το κύριο συστατικό των κοκκάλων και των δοντιών. Η σημασία του υδροξυαπατίτη οδήγησε σε εκτεταμένη έρευνα σε πολλές περιοχές όπως οι φυσικοχημικοί μηχανισμοί της σύνθεσης αλλά και η εφαρμογή του ως βιοϊατρικό ή βιομηχανικό υλικό. Συγκεκριμένα, η

**βιοσυμβατότητα** και οι **οστεοαγώγιμες ιδιότητες** του υδροξυαπατίτη το κατέστησαν επιθυμητό ως εμφυτεύσιμο υλικό και μέσο μεταφοράς φαρμάκου.



**Σχήμα 2.05** Μοσχεύματα τιτανίου επικαλυμένα με υδροξυαπατίτη. Μία από τις βασικότερες εφαρμογές του υδροξυαπατίτη.

Είναι γεγονός ότι επιχειρούνται νέες προσεγγίσεις ή τροποποιούνται οι προϋπάρχουσες μέθοδοι για να παράγονται κρύσταλλοι υδροξυαπατίτη με μειωμένο μέγεθος κόκκων και αυξημένη επιφάνεια ή ελεγχόμενη μορφολογία ή συνδυασμό και των δύο μαζί. Με αυτό τον τρόπο, ρυθμίζονται οι φυσικές και οι χημικές ιδιότητες του συνθετικού υδροξυαπατίτη που χρησιμοποιείται για συγκεκριμένες βιοϊατρικές εφαρμογές. Ο υδροξυαπατίτης μπορεί να συντεθεί μέσω πολλών μεθόδων συμπεριλαμβανομένου των συμβατικών προσεγγίσεων, όπως οι αντιδράσεις στερεάς κατάστασης και οι υγρές χημικές μέθοδοι, που βασίζονται στην κατακρήμνιση σε χαμηλή θερμοκρασία. Αυτές οι συμβατικές μέθοδοι κυρίως συντελούν στην ανάπτυξη ασταθών μορφών κόνεων. Παρ' όλα αυτά, το μέγεθος και η μορφολογία καθορίζει σημαντικά τη συμπεριφορά ενός συγκεκριμένου υλικού. Το κόκκαλο μάλιστα είναι από μόνο του ένα κράμα

που αποτελείται από νανοράβδους υδροξυαπατίτη που είναι ενσωματωμένοι στη μήτρα κολλαγόνου[19].

Παρόλο που ο έλεγχος της μικροδομής φαίνεται λογικά ως μεγάλη πρόκληση, η βιολογία έχει δώσει ήδη κάποια στοιχεία για να επιτευχθεί αυτό. Η ελεγχόμενη πυρήνωση και η διαδικασία της κρυσταλλικής ανάπτυξης, μετριάζόμενες από τον έλεγχο του μακρομορίου και από την οργάνωση των κυττάρων μπορούν να καταλήξουν στη λήψη ομοιόμορφων προϊόντων.

Μονοσακχαρίτες και πολυμερή χρησιμοποιούνται για να επηρεάσουν τη μορφολογία του συνθετικού υδροξυαπατίτη. Ο έλεγχος πάνω στην οργάνωση των κρυστάλλων υδροξυαπατίτη επιτεύχθηκε χρησιμοποιώντας λυοτροπικές φάσεις και αυτοδιαχειριζόμενες ίνες. Στην πρώτη περίπτωση, αυτό οδήγησε σε κράμα που αποτελείται από εναλλακτικά στρώματα υδροξυαπατίτη και οργανικού υλικού ενώ στη δεύτερη περίπτωση ένα κράμα αποκτήθηκε στο οποίο οι κρύσταλλοι συγκεντρώθηκαν με τον άξονα c κατά μήκος του άξονα των ινών.

Δύο μηχανισμοί έχουν προταθεί για να προσδώσει κανείς σκληρότητα σε σύνθετα απατίτη. Ο Currey και οι συνεργάτες του διατύπωσαν ότι αυτό μπορεί να συμβεί με την επιβολή φορτίου, με επακόλουθο βέβαια τη δημιουργία μικρορωγμών. Το υλικό όμως παραμένει συνεκτικό σε αυτή την περίπτωση μέχρι να επέλθει η θραύση. Αντιθέτως, ο Hansma και οι συνεργάτες του υποστήριξαν ότι η σκληρότητα προκύπτει από την παρουσία οργανικού υλικού το οποίο δρα ως γέφυρα ανάμεσα στους κρυστάλλους. Με αυτό τον τρόπο, η διάδοση των ρωγμών ανακόπτεται. [15-18]



## 2.2 Χιτοζάνη

Η χιτοζάνη είναι ένας γραμμικός πολυσακχαρίτης που προέρχεται από την μερική αποακετυλίωση της χιτίνης. Η χιτίνη, πολυ(β-(1→4)-N-ακετυλο-D-γλυκοζαμίνη) είναι ένας φυσικός πολυσακχαρίτης υψηλής σημασίας. Η χιτίνη απαντάται στη φύση σε υψηλώς διαταγμένες κρυσταλλικές μικροϊνώδεις δομές και αποτελεί δομικό συστατικό των εξωσκελετών των αρθρώσεων και των κυτταρικών τοιχωμάτων διαφόρων μυκήτων και ζυμών.[paper]

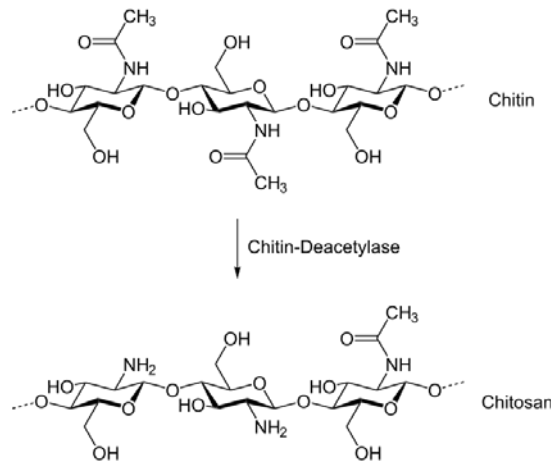


**Σχήμα 2.06.** Μορφή της σκόνης της χιτοζάνης.

Η χιτοζάνη θεωρείται ως κατάλληλο και λειτουργικό υλικό για τις βιοϊατρικές εφαρμογές λόγω της μεγάλης βιοσυμβατότητας, βιοαποικοδόμησης αλλά και της αντιφλεγμονώδους δράσης της. Παρουσιάζει δε την ικανότητα προσκόλλησης και πολλαπλασιασμού κυττάρων μέσα στον οργανισμό.

Η χιτοζάνη παραλαμβάνεται μέσω της μερικής αποακετυλίωσης της χιτίνης σε στερεά κατάσταση υπό ισχυρές αλκαλικές συνθήκες είτε με ενζυμική υδρόλυση παρουσία του ενζύμου χιτινική αποακετυλάση (**Σχήμα 2.07**). Η απομάκρυνση των ακετυλομάδων είναι μία έντονη διεργασία καθστώντας έτσι απαραίτητη την προστασία από το οξυγόνο με εφαρμογή

αδρανούς ατμόσφαιρας η με προσθήκη βιοϋδριδίου στο αλκαλικό διάλυμα[paper]Σκοπός της προστασίας αυτής είναι η αποφυγή της οξειδωσης η του αποπολυμερισμού.



**Σχήμα 2.07** Μετατροπή Χιτίνης σε Χιτοζάνη

Το παραληφθέν προϊόν καθαρίζεται με διάλυση σε περίσσεια οξέος και φιλτράρισμα μέσω μεμβρανών με πορώδες έως και 45μm. Εν συνεχεία το pH ρυθμίζεται στο 7.5 με προσθήκη καυστικού νατρίου η αμμωνίου κάτι που οδηγεί σε κροκίδωση και αδιαλυτοποίηση του πολυσακχαρίτη. Εν τέλει το ίζημα πλένεται με νερό και ξηραίνεται.

Η χιτοζάνη παρουσιάζει ένα μοναδικό κατιονικό χαρακτήρα και μία εξαιρετική ικανότητα σχηματισμού φιλμ ενώ η βιολογική της δραστηριότητα την καθιστά κατάλληλη για ένα μεγάλο αριθμό εφαρμογών.Φαρμακευτική, Βιοϊατρική,Ιστική Μηχανική και προσωπική υγιεινή/καλλωπισμός είναι μερικοί από τους σημαντικότερους τομείς όπου εφαρμόζεται επιτυχώς η χιτοζάνη. Τέλος μπορεί να χρησιμοποιηθεί και ως φορέας φαρμακευτικών ουσιών (DDS-Drug Delivery System) σε στοματική, ρινική, παρεντερική και διαδερμική χορήγηση όπως και σε μοςχεύματα.

Πέραν των προαναφερθέντων ιδιοτήτων σχετικά με τον ανθρώπινο οργανισμό όμως, της μεγάλης βιοσυμβατότητας και βιοδιασπασιμότητας, η χιτοζάνη υστερεί όσον αφορά τις μηχανικές της ιδιότητες. Για το λόγο αυτό [21]

έχουν πραγματοποιηθεί πολλές έρευνες σχετικά με το συνδυασμό της με άλλα υλικά όπως ο υδροξυαπατίτης [20] , το φωσφορικό τριασβέστιο [21,22], το φωσφορικό ασβέστιο [23-28] και βιοϋλικά όπως η ζελατίνη [21,28,29]

## 2.3 L-ΑΡΓΙΝΙΝΗ

Για να δείχνει αλλά και να είναι υγιές ένα σώμα, πρέπει να συνθέτει την αργινίνη που χρειάζεται, στο ήπαρ και τους νεφρούς ή να την προσλαμβάνει με την τροφή.

Στους ενήλικες η L-αργινίνη είναι ένα μη απαραίτητο αμινοξύ, πράγμα που σημαίνει ότι το σώμα μπορεί να το συνθέσει και συνεπώς να δημιουργήσει το δικό του απόθεμα. Το παιδικό σώμα όμως δεν μπορεί να παράγει αρκετή ποσότητα και να καλύψει τις απαιτήσεις της ανάπτυξής του. [paper]

Πρόσφατα η επιστημονική κοινότητα αποκάλυψε και τον πολύ σημαντικό ρόλο της αργινίνης στη διατήρηση της καλής καρδιαγγειακής λειτουργίας. Το συγκεκριμένο αμινοξύ είναι ο βασικός προάγγελος του νιτρικού οξέος, ενός βιοχημικού μορίου, που είναι υπεύθυνο για την ηρεμία των αιμοφόρων αγγείων και την καλή λειτουργία του νευρικού συστήματος. Η αργινίνη είναι όμως απαραίτητη και για την κυτταρική διαίρεση, την επούλωση των πληγών, την απομάκρυνση της αμμωνίας από το σώμα, την ανοσολογική λειτουργία και την απελευθέρωση των ορμονών.[30-32]

**Τα οφέλη που αποδίδονται στην ύπαρξη της L-αργινίνης είναι πάρα πολλά:**

- ✓ Αποτελεί πρόδρομο για τη σύνθεση του μονοξειδίου του αζώτου
- ✓ Διεγείρει την απελευθέρωση της αυξητικής ορμόνης
- ✓ Βελτιώνει τη λειτουργία του ανοσοποιητικού

- ✓ Μειώνει το χρόνο επούλωσης των τραυματισμών και ειδικότερα των οστών
- ✓ επισπεύδει το χρόνο επιδιόρθωσης των κατεστραμμένων ιστών
- ✓ Μειώνει τον κίνδυνο της καρδιακής νόσου
- ✓ Αυξάνει τη μυϊκή μάζα
- ✓ Μειώνει το λιπώδη ιστό του σώματος
- ✓ Συμβάλλει στη βελτίωση της ευαισθησίας στην ινσουλίνη
- ✓ Συμβάλλει στην αντιμετώπιση της ανδρικής υπογονιμότητας
- ✓ Αυξάνει την κυκλοφορία του αίματος σε όλο το σώμα

[33-37]

### **Διατροφικές πηγές της Αργινίνης**

Ζωικές πηγές: γαλακτοκομικά προϊόντα (π.χ. τυρί, ricotta, γάλα, γιαούρτι), βοδινό κρέας, χοιρινό κρέας (π.χ. μπέικον, ζαμπόν), πουλερικά (π.χ. κοτόπουλο και γαλοπούλα), άγρια θηράματα (π.χ. φασιανός, ορτύκια), θαλασσινά (π.χ. αστακός, σολομός, γαρίδες, σαλιγκάρια, τόνος).  
Φυτικές πηγές: φυτόρ σιταριού και αλεύρι, φαγόπυρο, πλιγούρι βρώμης, ξηροί καρποί (καρύδα, πεκάν, κάσιους, καρύδια, αμύγδαλα, καρύδια Βραζιλίας, φουντούκια, φιστίκια), σπόροι (κολοκύθας, σουσαμιού, ηλιανθου), ρεβίθια, σόγια.[net]

### **Γιατί είναι σημαντική**

Η δράση της αργινίνης είναι πολλαπλή. Λόγω του σημαντικού ρόλου της στην ουρία, βοηθά στην αποτοξίνωση του οργανισμού απομακρύνοντας την τοξική αμμωνία. Επίσης, παίζει σημαντικό ρόλο στη διέγερση της υπόφυσης που απελευθερώνει την αυξητική ορμόνη, η οποία είναι πολύ σημαντική για την ανάπτυξη των παιδιών. Η παρουσία της βελτιώνει την ανοσοποιητική λειτουργία του θύμου αδένος αλλά και τη γρήγορη επούλωση των πληγών.

### **Τι είναι τα αμινοξέα**

Αμινοξέα ονομάζονται τα καρβονικά οξέα που περιέχουν μία τουλάχιστον αμινομάδα. Δεκαεννέα (19) από αυτά και ένα (1) ιμινοξύ (η

προλίνη) χρησιμοποιούνται στην κατασκευή των περισσότερων πρωτεϊνών των ζωντανών οργανισμών στη Γη. Αυτά ονομάζονται πρωτεϊνικά αμινοξέα. Στον άνθρωπο, οκτώ από τα είκοσι αμινοξέα που χρησιμοποιούνται στη σύνθεση πρωτεϊνών δεν μπορούν να συντεθούν από τον οργανισμό και πρέπει να λαμβάνονται από την τροφή, για το λόγο αυτό καλούνται απαραίτητα ή βασικά αμινοξέα. Τέσσερα από τα είκοσι είναι ημιαπαραίτητα, αφού δεν μπορούν να συντεθούν στα παιδιά. Τα υπόλοιπα 8 συντίθενται μέσω των μεταβολικών μονοπατιών.

Πολλά αμινοξέα δημιουργούνται (συντίθενται) από άλλα αμινοξέα με μια διαδικασία που λέγεται τρανσαμίνωση (transamination), αν και οι περισσότεροι οργανισμοί λαμβάνουν τα βασικά αμινοξέα (essential amino acids) με την τροφή.[30-37]

## 3.0 Πειραματική Διαδικασία

### Γενικά.

Για το σκοπό της συγκεκριμένης εργασίας παρασκευάστηκαν διαλύματα υδροξυαπατίτη παρουσία πρόσθετων βιοπολυμερών. Πιο συγκεκριμένα επιχειρήθηκε η βιομιμική σύνθεση νανοκρυστάλλων υδροξυαπατίτη παρουσία του πολυμερούς χιτοζάνη και του αμινοξέος L-Αργινίνη σύμφωνα με βιβλιογραφική ανασκόπηση. Κατά τη διάρκεια των πειραμάτων διερευνήθηκαν οι καταλληλότερες συνθήκες αλλά και μέθοδοι σύνθεσης παρουσία των βιομορίων αυτών.

Τα αντιδραστήρια που χρησιμοποιήθηκαν για τη σύνθεση του υδροξυαπατίτη είναι τα εξής:

- α. Υδροξείδιο του ασβεστίου  $\text{Ca}(\text{OH})_2$
- β. ορθοφωσφορικό οξύ, (85%)  $\text{H}_3\text{PO}_4$  το οποίο χρησιμοποιείται για τη διάλυση της χιτοζάνης, η οποία είναι διαλυτή μόνο σε όξινα διαλύματα.

Για τη σύνθεση των νανοκρυστάλλων υδροξυαπατίτη μελετήθηκαν ως προς τον σχηματισμό αυτών, διάφορες παράμετροι. Αρχικά επιλέχθηκαν δύο μοριακές αναλογίες ασβεστίου προς φώσφορο, 1/1 και 10/6. Η τιμή 1/1 δηλώνει σύνθεση κρυστάλλων υδροξυαπατίτη με περίσσεια φωσφορικού οξέος ενώ η αναλογία 10/6 είναι η μοριακή αναλογία που συναντάται στο φυσικό οστό. Εν συνεχεία υπολογίστηκε η επιθυμητή συγκέντρωση του βιοπολυμερούς (χιτοζάνη) σε σχέση με την τελική ποσότητα υδροξυαπατίτη που παράγεται. Στην προκειμένη μελέτη επιλέχθηκε η τελική κατά βάρος αναλογία 70/30 υδροξυαπατίτη/βιοπολυμερές. Επιπλέον επιλέχθηκε να χρησιμοποιηθούν δύο διαφορετικές τελικές συγκεντρώσεις του ορθοφωσφορικού οξέος, 0,06M και 0,1M, ώστε να καθοριστεί εάν επηρεάζει την ανάπτυξη των κρυστάλλων του υδροξυαπατίτη ο βαθμός διάλυσης του πολυμερούς. Τέλος η συγκέντρωση της L-αργινίνης υπολογίστηκε σε σύγκριση με τη συγκέντρωση του υδροξειδίου του ασβεστίου ( $\text{Ca}^{2+}:\text{Arg} = 1:1$  ή  $1:2$  - δηλαδή περίσσεια ή όχι της αργινίνης-)

## Αναλυτικά

Αρχικά υπολογίστηκαν οι ποσότητες των αντιδραστηρίων για την παραγωγή των εκάστοτε διαλυμάτων.

Μοριακό Βάρος  $\text{Ca}_5(\text{PO}_4)_3(\text{OH}) - [\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2] / 2 = 502,31$

**Για την μοριακή αναλογία Ασβεστίου προς Φώσφορο=1:1 , χρησιμοποιήθηκε Φωσφορικό οξύ  $\text{H}_3\text{PO}_4$  85% g/g και προέκυψε ότι:**

Ασβέστιο  $m = 1,0743 \text{ g Ca}(\text{OH})_2$

Αργινίνη:  $m = 2,5259 \text{ g Arg} / 5,0518 \text{ g Arg}$

Χιτοζάνη:  $m = 0,6229 \text{ g (7/3)} / 0,9678 \text{ g (6/4)} / 0,3629 \text{ g (8/2)}$

**Για τη μοριακή αναλογία Ασβεστίου προς Φώσφορο=10:6**

$a \text{ ml H}_3\text{PO}_4 \rightarrow (0,85 \times 1,689a) / 98 = 0,014649a \text{ mol}$

Ασβέστιο  $m = 0,024465a \times 74,10 = 1,8128 \text{ g}$

Αργινίνη  $m = 4,2618 \text{ g Arg}$

Χιτοζάνη  $m = 1,0543 \text{ g}$

Τα διαλύματα παρασκευάστηκαν με τον ακόλουθο τρόπο. Αρχικά ζυγίστηκαν οι επιθυμητές ποσότητες αντιδραστηρίων και σε δοχεία ζέσεως τοποθετήθηκαν οι αντίστοιχες ποσότητες απιονισμένου νερού. Αφού προστεθεί το Φωσφορικό οξύ σε (0.06M, 0.1M) στο αντίστοιχο ποτήρι με το νερό προστίθεται η χιτοζάνη και τοποθετούνται για περίπου για 30 με 35 λεπτά υπό έντονη ανάδευση με κατάλληλο αναδευτήρα (dispenser). Στη συνέχεια ετοιμάζεται το διάλυμα νερού και υδροξειδίου του ασβεστίου το οποίο αναδεύεται και αυτό με τον ίδιο τρόπο. Στη συνέχεια προετοιμάζεται και το τελευταίο διάλυμα νερού-αργινίνης το οποίο τοποθετείται σε λουτρό σταθερής θερμοκρασίας 40 °C υπό ανάδευση. Τέλος τα δύο πρώτα

διαλύματα, του ασβεστίου και της χιτοζάνης, προστίθενται παράλληλα στάγδην για τη δημιουργία του τελικού διαλύματος υδροξυαπατίτη.

Τα παραληφθέντα αιωρήματα τοποθετούνται σε λουτρό θερμοκρασίας 40 °C για 24 ώρες. Να σημειωθεί στο σημείο αυτό πως πραγματοποιήθηκαν και πειράματα όπου τα τελικά αιωρήματα παρέμειναν για 72 ώρες στο λουτρό καθώς παρατηρήθηκε καλύτερη ομοιγένεια στο τελικό υλικό καθώς και άλλα χωρίς γήρανση στους 40 βαθμούς. Τα αποτελέσματα θα παρουσιαστούν αναλυτικότερα στη συνέχεια.

Μετά την παραμονή τους στο λουτρό τα αιωρήματα φυγοκεντρήθηκαν για 20 λεπτά στις 11.000 στροφές και αφού αφαιρέθηκε το υπερκείμενο νερό τοποθετήθηκαν σε κάψες και παρέμειναν για 72 περίπου ώρες σε πυριαντήριο σε θερμοκρασία 40 °C έως ότου να απομακρυνθεί πλήρως η υγρασία. Τέλος κονιορτοποιήθηκαν σε γουδί από αχάτι για να υποστούν φυσικοχημικό χαρακτηρισμό.

Παρακάτω παρατίθενται οι όγκοι των υδάτων, του φωσφορικού οξέος και τα γραμμάρια των αντιδραστηρίων για το κάθε πείραμα:

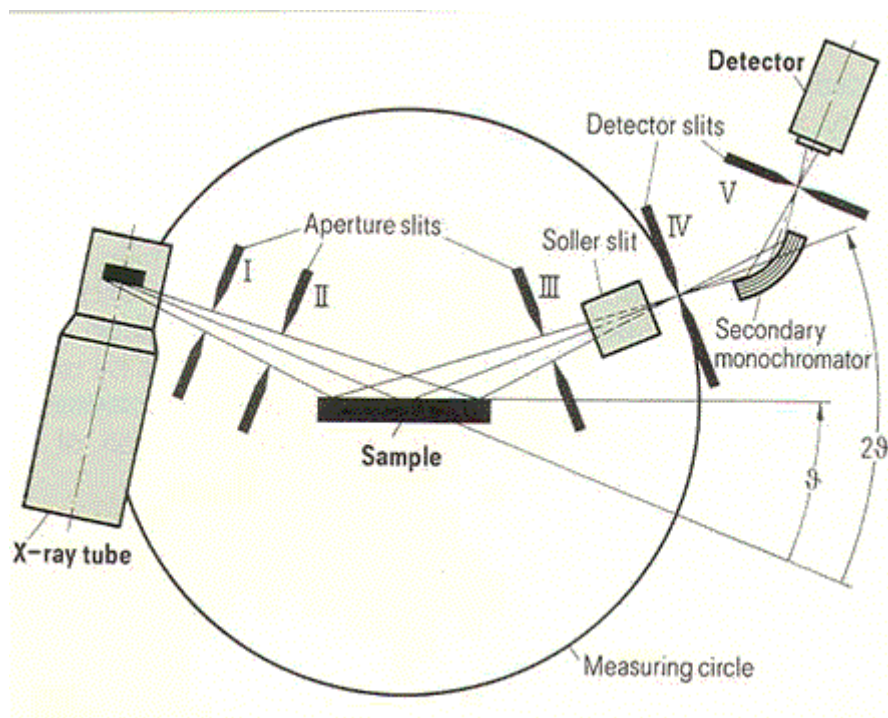
Κωδικός	Μοριακή αναλογία Ca/P	HAp/Πολυμερές	Ca <sup>2+</sup> : Arg	Συγκέντρωση H <sub>3</sub> PO <sub>4</sub>
<b>A6-7/3X</b>	1/1	HAp/Chit = 70/30	1: 1	0,06M
<b>A1-7/3X</b>	1/1	HAp/Chit = 70/30	1: 1	0,1M
<b>B6-7/3X</b>	1/1	HAp/Chit = 70/30	1: 2	0,06M
<b>B1-7/3X</b>	1/1	HAp/Chit = 70/30	1: 2	0,1M
<b>A6-7/3X -R</b>	10/6	HAp/Chit = 70/30	1: 1	0,06M
<b>A1-7/3X -R</b>	10/6	HAp/Chit = 70/30	1: 1	0,1M



<b>B6-7/3X -R</b>	10/6	HAp/Chit=70/30	1:2	0,06M
<b>B1-7/3X-R</b>	10/6	HAp/Chit=70/30	1:2	0,1M

### 3.1 ΠΕΡΙΘΛΑΣΗ ΑΚΤΙΝΩΝ Χ

Η περίθλαση των ακτίνων Χ, είτε χρησιμοποιούμενη σε μονοκρυστάλλους είτε σε κόνεις, σχετίζεται με την κρυσταλλική δομή του υλικού και για αυτό το λόγο είναι η συχνότερα χρησιμοποιούμενη τεχνική χαρακτηρισμού των πολυμόρφων. Είναι καλά εμπεδωμένο ότι τα άτομα ή τα μόρια ενός υλικού δρουν ως φράγματα περίθλασης των ακτίνων Χ και ο τρόπος με τον οποία αυτά είναι διατεταγμένα στο χώρο περιθλούν τις ακτίνες Χ με μοναδικό για κάθε υλικό τρόπο, παρέχοντας μια απεικόνιση της κρυσταλλικής του δομής στο χώρο.



**Σχημα 3.01.** Δομή οργάνου Περιθλασημετρίας Ακτίνων Χ (XRD)

### **Περιθλαση ακτίνων Χ μονοκρυστάλλων**

Ένα κρυσταλλικό υλικό με τη μορφή κόνης είναι το σύνολο ενός μεγάλου αριθμού κρυστάλλων. Κάθε κρύσταλλος σχηματίζεται από την επαναλαμβανόμενη διευθέτηση στο χώρο της μοναδιαίας κυψελίδας, η οποία αποτελεί το ελάχιστο δομικό στοιχείο ενός κρυστάλλου. Η μοναδιαία κυψελίδα από την άλλη, προκύπτει από τη συμμετρική επανάληψη των ατόμων ή μορίων του υλικού και τα χαρακτηριστικά της είναι μοναδικά για κάθε υλικό. Για να προσδιοριστεί η κρυσταλλική δομή ενός υλικού είναι απαραίτητο να προσδιοριστούν τα χαρακτηριστικά της μοναδιαίας κυψελίδας του κρυστάλλου (διαστάσεις πλευρών και οι μεταξύ τους γωνίες). Για ένα δεδομένο κρυσταλλικό πλέγμα, οι γωνίες περίθλασης των ακτίνων Χ είναι ίδιες ανεξάρτητα από το περιεχόμενο της μοναδιαίας κυψελίδας, τα άτομα ή τα μόρια δηλαδή από τα οποία αποτελείται και εξαρτώνται μόνο από το σχήμα αυτής. Οι γωνίες περίθλασής λοιπόν δίνουν πληροφορίες σχετικά με τα χαρακτηριστικά της κυψελίδας και του κρυσταλλικού πλέγματος γενικότερα.

Επιπρόσθετα, το είδος των ατόμων ή των μορίων τα οποία αποτελούν την μοναδιαία κυψελίδα σχετίζεται με την ένταση της περιθλώμενης ακτινοβολίας. Επομένως, από ένα φάσμα περίθλασης ακτίνων Χ ενός μονοκρυστάλλου μπορούμε να προσδιορίσουμε τα μοναδικά για κάθε υλικό χαρακτηριστικά της κυψελίδας. Και αφού κάθε πολύμορφο θα έχει διαφορετικού σχήματος μοναδιαία κυψελίδα, άρα θα είναι εφικτός ο χαρακτηρισμός αλλά και ο προσδιορισμός των κρυσταλλογραφικών του παραμέτρων με βάση την περίθλαση ακτίνων Χ μονοκρυστάλλων. Περισσότερες λεπτομέρειες για τη διαδικασία με την οποία προσδιορίζονται τα κρυσταλλογραφικά δεδομένα ενός κρυστάλλου μπορούν να βρεθούν στη βιβλιογραφία [38-41].

Κάποια χαρακτηριστικά παραδείγματα εφαρμογής της περίθλασης ακτίνων Χ μονοκρυστάλλων αναφέρονται στη συνέχεια. Τα δομικά χαρακτηριστικά των πλεγμάτων κυψελίδων των δύο άνυδρων πολυμόρφων της νιτροφουραντοΐνης καθώς επίσης και των δύο πολυμόρφων της μονοένυδρης μορφής, προσδιορίστηκαν με βάση τη συγκεκριμένη τεχνική. Επίσης, η προντουκόλη είναι ένα ακόμα παράδειγμα

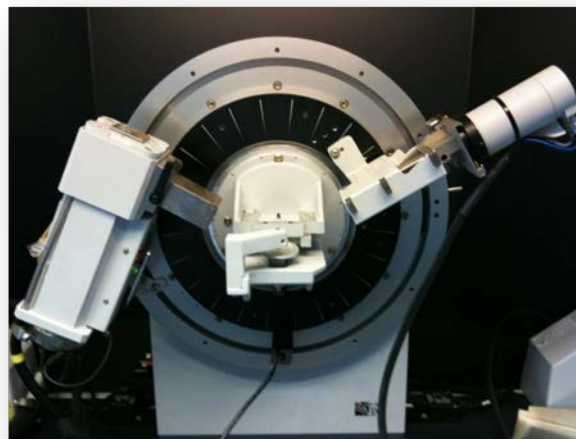
όπου προσδιορίστηκε ότι αν και τα δύο πολύμορφα της ανήκουν στο ίδιο κρυσταλλικό σύστημα (μονοκλινικό), ωστόσο τα χαρακτηριστικά των δομικών κυψελίδων έδειξαν ότι αυτές ανήκουν σε διαφορετικές ομάδες συμμετρίας.

### **Περίθλαση ακτίνων Χ κόνεων (X-ray Powder Diffraction, XRPD)**

Αν και η γνώση των κρυσταλλογραφικών παραμέτρων ενός υλικού αποτελεί τον απόλυτο χαρακτηρισμό των πολύμορφων φάσεων μιας ουσίας, ωστόσο υπάρχουν περιορισμοί στη χρήση της οι οποίοι έγκεινται στη δυσκολία παρασκευής του μονοκρυστάλλου καθώς επίσης και στην πολυπλοκότητα ανάλυσης των πειραματικών δεδομένων. Γι' αυτό το λόγο, η τεχνική η οποία χρησιμοποιείται κατά κόρον για αναλύσεις ρουτίνας όσον αφορά τον προσδιορισμό των πολυμόρφων είναι η περίθλαση ακτίνων Χ κόνεως. Στην πραγματικότητα, οι περισσότερες ουσίες λαμβάνονται κατά την παρασκευή τους ως μικροκρυσταλλικά στερεά, τα οποία δεν αποτελούνται από τέλειους κρυστάλλους και επομένως δε είναι δυνατό να προσδιοριστούν τα χαρακτηριστικά της μοναδιαίας κυψελίδας. Εξάλλου, όταν έχουμε να κάνουμε με φαρμακευτικές ουσίες, αυτό που ενδιαφέρει είναι να πιστοποιηθεί απλά και μόνο η ύπαρξη μιας νέας κρυσταλλικής φάσης ή ο αποκλεισμός αυτή από ένα φαρμακευτικό σκεύασμα. Ο τρόπος με τον οποίο επιτυγχάνεται κάτι τέτοιο είναι απλά με τη σύγκριση των φασμάτων της περίθλασης ακτίνων Χ που προκύπτουν από τις διάφορες κόνεις, με βάση το δεδομένο ότι διαφορετικά πολύμορφα θα δώσουν διαφορετικά φάσματα.

Επίσης, άλλη μια από τις δυνατότητες που προσφέρει η συγκεκριμένη τεχνική είναι ο ποσοτικός προσδιορισμός συστατικών σε μίγμα [42-45]. Η συνηθέστερη μέθοδος ποσοτικής αναλύσεως βασίζεται στον υπολογισμό του λόγου των εντάσεων δύο διακριτών κορυφών ενός φάσματος αφού πρώτα έχει κατασκευαστεί πρότυπη καμπύλη με βάση γνωστές συγκεντρώσεις. Αυτός ο λόγος είναι ανάλογος του λόγου των συγκεντρώσεων των δύο συστατικών του μίγματος. Ανάλογη διαδικασία

ακολουθείται και στην περίπτωση που το μίγμα αποτελείται από περισσότερα των δύο συστατικών.



**Σχημα 3.02.** Bruker D8 Focus. Το όργανο που χρησιμοποιήθηκε για τη συγκεκριμένη μελέτη. Στη δεξιά εικόνα φαίνεται σε μεγέθυνση με τη σειρά από αριστερά προς τα δεξιά η λάμπα, το δείγμα και ο δεκτης.

## 3.2 ΥΠΕΡΥΘΡΗ ΦΑΣΜΑΤΟΜΕΤΡΙΑ ΜΕ ΜΕΤΑΣΧΗΜΑΤΙΣΜΟ FOURIER

Η υπέρυθρη φασματοσκοπία (Infrared Spectroscopy, IR) θεωρείται σημαντική φασματοσκοπική τεχνική στην Οργανική Χημεία, λόγω της ευκολίας λήψης φασμάτων και της σύγκρισής τους με φάσματα γνωστών οργανικών ενώσεων. Χρησιμοποιείται ευρύτατα κατά τη σύνθεση χημικών ενώσεων και για την πιστοποίηση της καθαρότητάς τους.

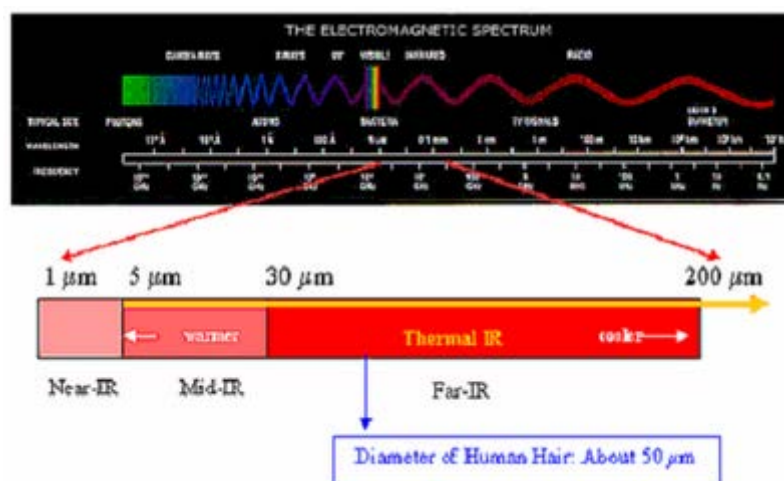
Το υπέρυθρο (Infrared – IR) είναι εκείνο το τμήμα της ηλεκτρομαγνητικής ακτινοβολίας, το οποίο εκτείνεται πέρα από το ορατό και φθάνει μέχρι την περιοχή των μικροκυμάτων.

Διακρίνεται σε 3 περιοχές:

Εγγύς υπέρυθρο: 0,8μ – 2μ

Κυρίως υπέρυθρο: 2μ – 15μ

Άπω υπέρυθρο: 15μ – 400μ



**Σχημα 3.03** Περιοχές μικροκυμάτων υπέρυθρου

Τα φάσματα υπέρυθρου είναι φάσματα απορρόφησης. Στα φάσματα IR δεν χρησιμοποιείται η συχνότητα ή το μήκος κύματος της

χρησιμοποιούμενης ακτινοβολίας, αλλά εισάγεται μια νέα έννοια, η έννοια του κυματαριθμού ( $\nu$ ).

Ο κυματαριθμός  $\nu$  δίνεται από την σχέση:

$$\nu(\text{cm}^{-1}) = \frac{1}{\lambda(\text{cm})}$$

όπου  $\lambda$ : το μήκος κύματος της ακτινοβολίας.

### **Αρχή Φασματοσκοπίας Υπέρυθρου**

Τα άτομα των μορίων ακόμη και στην βασική ενεργειακή τους κατάσταση δεν παραμένουν ποτέ ακίνητα, αλλά αντιθέτως εκτελούν κινήσεις δόνησης και περιστροφής. Όταν μια ποσότητα ύλης ακτινοβολείται με υπέρυθρη ακτινοβολία, ένα ποσοστό από τα μόρια που δέχονται την ακτινοβολία διεγείρονται, αυξάνοντας την ενέργεια δόνησης και περιστροφής τους.

Για να λάβει χώρα απορρόφηση ενέργειας από τα μόρια, θα πρέπει η συχνότητα της προσπίπτουσας ακτινοβολίας να συμπίπτει με την συχνότητα δόνησης των ατόμων του δεσμού.

Οι συχνότητες με τις οποίες δονούνται τα άτομα στο μόρια εξαρτώνται μόνο από τις μάζες των ατόμων, τον τύπο του δεσμού και το σχήμα του μορίου.

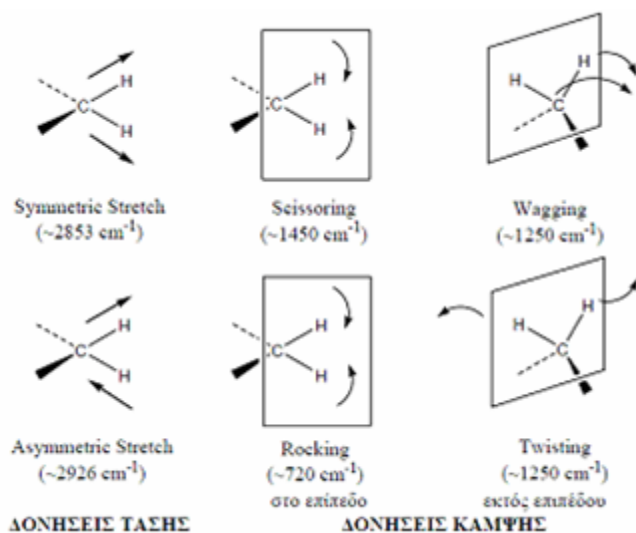
Αν ένα μόριο είναι συμμετρικό δεν παρατηρείται απορρόφηση υπέρυθρης ακτινοβολίας. Ένα μόριο θα απορροφήσει στο IR μόνο εφόσον μεταβάλλεται η διπολική ροπή του κατά την διάρκεια της δόνησης. Διαφορετικά, η δόνηση θεωρείται ανενεργή στο IR. Όσο μεγαλύτερη είναι η μεταβολή της διπολικής ροπής, τόσο ισχυρότερη είναι και η απορρόφηση.

Οι δονήσεις που λαμβάνουν χώρα διακρίνονται σε 2 κατηγορίες:

Δονήσεις τάσης: Τα άτομα του δεσμού διαδοχικά πλησιάζουν και απομακρύνονται μεταξύ τους κινούμενα κατά μήκος του δεσμού.

Δονήσεις κάμψης: Τα άτομα των γειτονικών δεσμών κινούνται έτσι ώστε να αλλάζει η γωνία των δεσμών.

Εκτός από τις παραπάνω λαμβάνουν χώρα και συνδυασμένες δονήσεις. Υπάρχουν δηλαδή και άλλα είδη παραμόρφωσης της δομής των μορίων, όπως όταν αυτό σείεται (wagging), κλυδωνίζεται (rocking), στρεβλώνεται (twisting), ή έχει ψαλιδωτή κίνηση (scissoring), κ.λπ.



Σχημα 3.04 Διαφορετικά είδη δόνησης

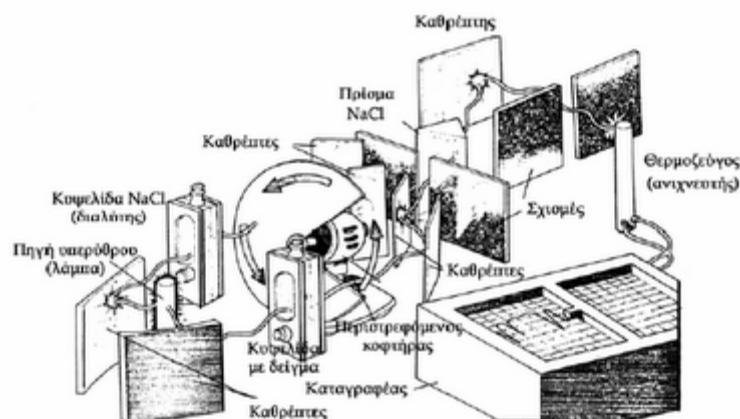
Οι μοριακές ταλαντώσεις ορισμένων ομάδων είναι ιδιαίτερα χαρακτηριστικές. Για αυτό και η φασματοσκοπία υπέρυθρου είναι κατάλληλη για τον χαρακτηρισμό ορισμένων ομάδων σε ένα μόριο (π.χ. υδροξύλια, καρβοξύλια, αμινομάδες, διπλοί και τριπλοί δεσμοί κ.α)

### Το όργανο και η βαθμονόμηση του

Κάθε φασματοφωτόμετρο IR αποτελείται σε βασικές γραμμές από τα μέρη που αποτελείται και ένα φασματοφωτόμετρο ορατού – υπεριώδους. Είναι προφανές, ότι στην περίπτωση αυτή χρησιμοποιείται ως πηγή, μια



πηγή IR ακτινοβολίας. Τα βασικά μέρη ενός τέτοιου οργάνου φαίνονται στο παρακάτω σχήμα.



**Σχημα 3.05** Διάταξη οργάνου

Σαν πηγή ενέργειας μπορεί να χρησιμοποιηθεί ράβδος από κεραμικό υλικό, το οποίο μετά από ηλεκτρική θέρμανση στους 1600°C, δίνει ένα μεγάλο μέρος σε υπέρυθρη ακτινοβολία.

Πριν αρχίσει η καταγραφή οποιουδήποτε φάσματος πρέπει να διαβαθμίσουμε (ή βαθμονομήσουμε) το φασματοφωτόμετρο με μία γνωστή ουσία (calibration). Χρησιμοποιείται δείγμα φιλμ πολυστυρολίου (του οποίου ο καθαρισμός δεν επιτρέπεται να γίνει με ακετόνη γιατί το διαλύει). Το πολυστυρόλιο παρουσιάζει αρκετές ισχυρές απορροφήσεις IR με ακριβείς συχνότητες. Κυρίως χρησιμοποιείται η ταινία απορρόφησης στα 1603 cm<sup>-1</sup> για

την εσωτερική διαβάθμιση του οργάνου (με μικρή εσωτερική βίδα).

## Η μέτρηση

Επειδή η ύαλος και ο χαλαζίας κόβουν την υπέρυθρη ακτινοβολία χρησιμοποιούνται κυψελίδες από κρυστάλλους, όπως NaCl, KCl κ.α. Είναι προφανές, ότι λόγω της ευαισθησίας των παραπάνω μορίων στην υγρασία

είναι αναγκαία η απουσία νερού ακόμη και από το δείγμα.

Η ποσότητα της ουσίας που χρησιμοποιείται για τις μετρήσεις στην φασματοσκοπία υπέρυθρου κυμαίνεται από 1-15mg. Ο προσδιορισμός γίνεται:

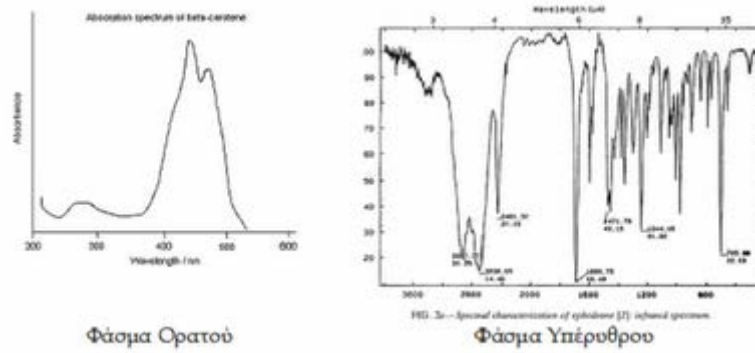
1. Σε αέρια φάση
2. Σε υγρή φάση μεταξύ 2 πλακών NaCl.
3. Σε διάλυμα
4. Σε στερεή κατάσταση υπό μορφή αιωρήματος σε παραφινέλαιο
5. Σε στερεή κατάσταση υπό μορφή δισκίου με KBr.

### **Η μορφή των φασμάτων**

Τα φάσματα υπέρυθρου έχουν τετμημένη (άξονας  $\chi$ ) το μήκος κύματος της ακτινοβολίας σε  $\mu$  ή τον κυματαριθμό της σε  $\text{cm}^{-1}$  (συνηθέστερα) και σαν τεταγμένη την διαπερατότητα  $T(\%)$  και σπανιότερα την απορρόφηση  $A(\%)$ .

Το φάσμα διακρίνεται σε 2 βασικές περιοχές. Η μια περιέχει τις απορροφήσεις πάνω από  $1500\text{cm}^{-1}$ . Στην περιοχή αυτή απαντούν οι απορροφήσεις όλων των χαρακτηριστικών ομάδων. Η δεύτερη περιοχή αφορά τους κυματαριθμούς από  $1500\text{cm}^{-1}$ . Η περιοχή αυτή αφορά απορροφήσεις, οι περισσότερες από τις οποίες δεν μπορούν ανα αποδοθούν σε συγκεκριμένες διεγέρσεις. Η περιοχή αυτή χαρακτηρίζεται σαν περιοχή δακτυλικού αποτυπώματος του μορίου.

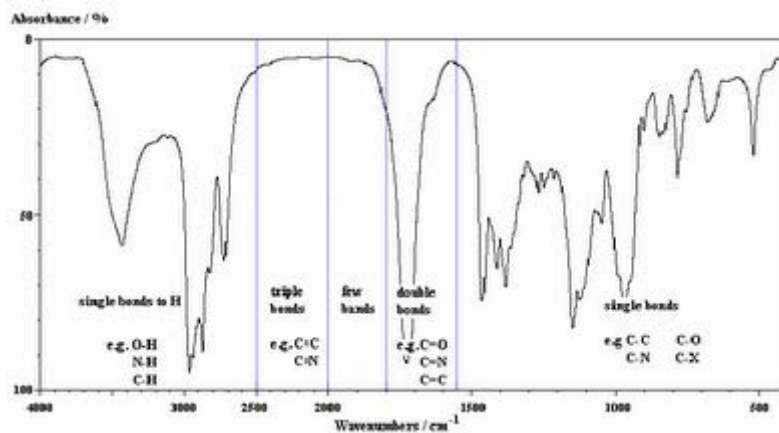
Τα λαμβανόμενα φάσματα IR χαρακτηρίζονται από ταινίες απορρόφησης μικρού εύρους σε σχέση με τα φάσματα VIS – UV, τα οποία προκαλούνται από ηλεκτρονικές μεταπτώσεις και χαρακτηρίζονται από ταινίες απορρόφησης μεγάλου εύρους.



**Σχήμα 3.06** Φάσμα ορατού αριστερά και φάσμα υπέρυθρου δεξιά

Από το παραπάνω σχήμα (**Σχήμα 3.06**) μπορεί να γίνει αντιληπτό, ότι στα φάσματα υπέρυθρου η διαπερατότητα αυξάνεται στον κατακόρυφο άξονα από πάνω προς τα κάτω, ενώ στα φάσματα UV – VIS συμβαίνει ο ακριβώς αντίστροφο. Αποτέλεσμα είναι τα Φάσματα IR (συνήθως) να παρουσιάζουν την αντίστροφη εικόνα από τα φάσματα υπεριώδους ορατού.

### Ερμηνεία των φασμάτων IR



**Σχήμα 3.07** Περιοχές όπου χωρίζεται ένα διάγραμμα FTIR για την ερμηνεία του.

Ένα φάσμα υπέρυθρου μπορεί να χωριστεί στις παρακάτω περιοχές, με βάση τα άτομα ή τις ομάδες των οποίων οι δονήσεις προκαλούν απορρόφηση στο IR:

- Περιοχή τάσης Υδρογόνου ( $4.000 - 2.500\text{cm}^{-1}$ ). Η απορρόφηση στις περιοχές αυτές προκαλείται από δονήσεις τάσεων δεσμών C-H, O-H, N-H και S-H. Η συχνότητα απορρόφησης εξαρτάται από το άτομο που με το οποίο συνδέεται το H.

- Περιοχή τάσεως τριπλού δεσμού ( $2.500 - 2.000\text{ cm}^{-1}$ ). Στην περιοχή αυτή απορροφούν οι τριπλοί δεσμοί μεταξύ ατόμων άνθρακα και οι τριπλοί δεσμοί μεταξύ ατόμων άνθρακα και αζώτου. Στην ίδια περιοχή απορροφούν και οι δεσμοί  $\text{-C=C=C-}$  και  $\text{N=C=O}$ .

- Περιοχή τάσης διπλού δεσμού ( $2.000 - 1.600\text{ cm}^{-1}$ ). Υπεύθυνες για την απορρόφηση στην περιοχή αυτή είναι οι δονήσεις των δεσμών C=C, C=O και C=N.

- Περιοχή τάσης και κάμψης απλού δεσμού ( $1.500 - 700\text{ cm}^{-1}$ ). Στην περιοχή αυτή εμφανίζονται πολλές απορροφήσεις, π.χ. δονήσεις κάμψεως των δεσμών C-H και οι δονήσεις τάσεων και κάμψεως απλών δεσμών που συνδέουν ομάδες, όπως του μεθυλενίου ( $\text{-CH}_2\text{-}$ ), μεθυλίου ( $\text{-CH}_3$ ) και αμινομάδες. Η περιοχή αυτή ονομάζεται περιοχή δακτυλικού αποτυπώματος, επειδή το φάσμα στην περιοχή αυτή χαρακτηρίζει το μόριο ως σύνολο[46-47].

### 3.3 Το Ηλεκτρονικό Μικροσκόπιο Διέλευσης (ΗΜΔ, TEM, Transmission Electron Microscope).

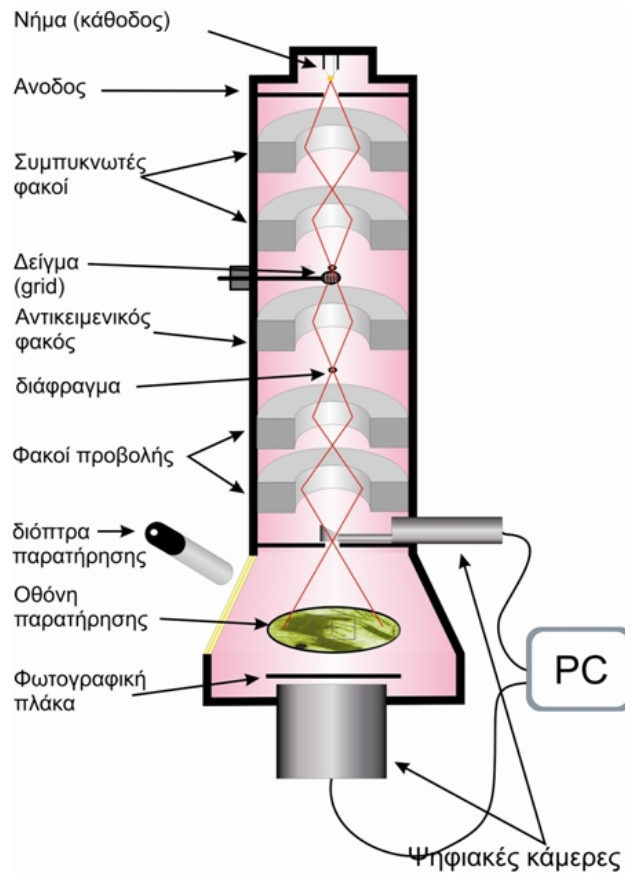
Στο ΗΜΔ (Εικόνα 1), η πηγή ηλεκτρονίων αποτελείται ένα νήμα βολφραμίου (ή ακίδα  $\text{LaB}_6$ ) που με την πυράκτωσή, όταν περάσει από αυτό ηλεκτρικό ρεύμα, εκπέμπει ηλεκτρόνια. Μεταξύ του νήματος, που αποτελεί την κάθοδο, και της ανόδου, εφαρμόζεται μια διαφορά δυναμικού (συνήθως της τάξης των 60-100 kV) η οποία επιταχύνει τα ηλεκτρόνια. Η πορεία των ηλεκτρονίων, ρυθμίζεται από τους ηλεκτρομαγνητικούς φακούς

στους οποίους αλλάζοντας την ένταση του ρεύματος που τους διαπερνάει, μπορούμε να μεταβάλλουμε την ένταση του μαγνητικού πεδίου τους (δηλαδή την εστιακή τους απόσταση) και επομένως να εστιάσουμε τη δέσμη των ηλεκτρονίων πάνω στο παρασκεύασμα.

Οι κύριες ρυθμίσεις σ' ένα ΗΜΔ επιτυγχάνονται με:

1. τον συγκεντρωτή φακό (condenser lens), εστίαση της δέσμης στο παρασκεύασμα.
2. τον αντικειμενικό φακό (objective lens), εστίαση της εικόνας στην οθόνη.
3. ενδιάμεσος ή και φακός προβολής (intermediate, projector lens) για τη ρύθμιση της μεγέθυνσης.

Η εικόνα σχηματίζεται πάνω σε μια οθόνη επικαλυμμένη με φωσφορίζουσα ουσία η οποία διεγείρεται από τα ηλεκτρόνια που πέφτουν επάνω της, αφού αυτά διαπεράσουν το παρασκεύασμα. Τα σημεία του παρασκευάσματος που δεν είναι διαπερατά από τα ηλεκτρόνια, μας δίνουνσκοτεινές περιοχές (ηλεκτρονιόφιλες, ηλεκτρονιακά πυκνές, electron dense) ενώ αντίθετα τα διαπερατά σημεία (ηλεκτρονιακά διαφανή, electron lucent) μας δίνουν φωτεινές περιοχές. Αυτή η διαφοροποίηση επιτυγχάνεται με την εκλεκτική «χρώση» του παρασκευάσματος



**Σχημα 3.08** Σχηματική παράσταση ενός ηλεκτρονικού μικροσκοπίου διέλευσης.

Φυσικά αυτές τις εικόνες εκτός του ότι μπορούμε να τις παρατηρήσουμε απ' ευθείας στην οθόνη του μικροσκοπίου, μπορούμε και να τις απεικονίσουμε με τις ειδικές φωτογραφικές μηχανές που είναι πάντα ενσωματωμένες στα μικροσκόπια. Τα πιο σύγχρονα μικροσκόπια διαθέτουν ενσωματωμένη ψηφιακή κάμερα και μικροϋπολογιστή και έτσι μπορεί να γίνει απ' εθείας ψηφιοποίηση και αποθήκευση της εικόνας

Επειδή τα ηλεκτρόνια δε μπορούν να ταξιδέψουν στον αέρα, το όλο σύστημα, πηγή ηλεκτρονίων, φακοί, παρασκευάσμα, οθόνη και σύστημα φωτογράφησης πρέπει να βρίσκονται σε υψηλό κενό της τάξης των  $10^{-4}$  Torr τουλάχιστο.

Ο τρόπος που λειτουργεί το ηλεκτρονικό μικροσκόπιο, μας θέτει πολλούς περιορισμούς ως προς τη φύση των δειγμάτων που μπορούμε να παρατηρήσουμε. Έτσι ένα δείγμα για να είναι δυνατό να παρατηρηθεί με

το κλασσικό ΗΜΔ και με τις κλασσικές μεθόδους θα πρέπει να έχει τις παρακάτω ιδιότητες:

- α. να αντέχει σε υψηλό κενό,
- β. να είναι σταθερό στο βομβαρδισμό ηλεκτρονίων,
- γ. να είναι αρκετά λεπτό για να μπορούν να το διαπερνούν τα ηλεκτρόνια, και
- δ. να επιτρέπει τη διαφορική σκέδαση των ηλεκτρονίων.

Αυτές οι ιδιότητες που πρέπει να έχει ένα παρασκεύασμα, μας περιορίζουν στο να μπορούμε να εξετάσουμε μόνο μονιμοποιημένα δείγματα (νεκρά), αφυδατωμένα, κομμένα σε πολύ λεπτές τομές (πάχος 50-100 nm) και «χρωματισμένα» με «χρωστικές» που περιέχουν βαριά μέταλλα, όπως για παράδειγμα είναι ο μόλυβδος και το ουράνιο. [48-49]

### ***Κλασσικές τεχνικές προετοιμασίας προετοιμασία βιολογικών δειγμάτων για παρατήρηση στο ΗΜΔ.***

Ένα βιολογικό δείγμα για να αποκτήσει τις πιο πάνω ιδιότητες θα πρέπει να υποβληθεί στην πιο κάτω διαδικασία:

**α. Μονιμοποίηση** (στερέωση, καθήλωση, προσήλωση, fixation). Έχει ως σκοπό την ακινητοποίηση (νέκρωση) όλων των διαδικασιών του κυττάρου και μπορεί να επιτευχθεί με χημικούς και φυσικούς τρόπους. Οι χημικοί τρόποι, που είναι και οι πιο συνηθισμένοι) περιλαμβάνουν επεξεργασία του δείγματος με ουσίες όπως οι αλδεΰδες (φορμαλδεΰδη HCHO, παραφορμαλδεΰδη, γλουταρική αλδεΰδη CHOCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CHO και μίγματά τους) ή άλλες ουσίες όπως η ακρολεΐνη CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CHO, το τετροξειδίο του οσμίου OsO<sub>4</sub>, το υπερμαγγανικό κάλιο KMnO<sub>4</sub>, κ.ά. διαλυμένα σε κατάλληλα ρυθμιστικά διαλύματα (φωσφορικά, κακοδυλικό νάτριο, veronal acetate, PIPES κλπ.) των οποίων η συγκέντρωση και το pH πρέπει να είναι ρυθμισμένα με μεγάλη ακρίβεια. Οι φυσικοί τρόποι μονιμοποίησης χρησιμοποιούν γρήγορη ψύξη του δείγματος, συνήθως με υγρό N<sub>2</sub> ή Freon σε θερμοκρασία υγρού N<sub>2</sub>. Αυτές οι μέθοδοι είναι ιδιαίτερα χρήσιμες σε περιπτώσεις όπου χρειάζεται να διατηρηθεί η δραστητικότητα ουσιών όπως τα νουκλεϊκά οξέα (DNA, RNA) ή οι πρωτεΐνες (ένζυμα).

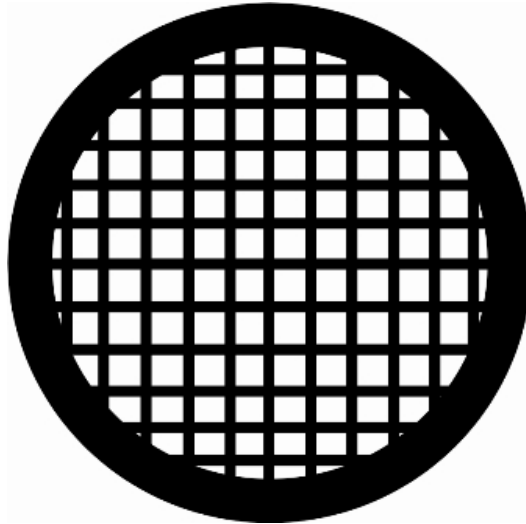
**β. Αφυδάτωση.** Σ' αυτό το στάδιο γίνεται αντικατάσταση του νερού του μονιμοποιημένου δείγματος με αιθυλική αλκοόλη ή ακετόνη και στη συνέχεια με τον ενδιάμεσο διαλύτη 1,2-εποξυπροπάνιο (προπυλενοξείδιο) που είναι διαλύτης των εποξικών ρητινών που χρησιμοποιούνται στο επόμενο στάδιο.

**γ. Εμπότιση - έγκλειση.** Για να μπορέσει να κοπεί ένα βιολογικό παρασκεύασμα σε λεπτές τομές θα πρέπει το μέσο αφυδάτωσης ν' αντικατασταθεί με το μέσο έγκλεισης που πριν πολυμεριστεί είναι υγρό και στερεοποιείται με πολυμερισμό όταν εκτεθεί σε υψηλή θερμοκρασία (περίπου 70°C) ή υπεριώδη ακτινοβολία. Τα μέσα έγκλεισης είναι συνήθως εποξικές ή άλλες ρητίνες με διάφορα εμπορικά ονόματα όπως Araldite, Spurr, LR-White κ.ά.

**δ. Τμήση τομών** Τα δείγματα κατόπιν κόβονται σε πολύ λεπτές τομές, πάχους 50-100 nm, με τον υπερμικροτόμο, και τοποθετούνται πάνω σε ειδικά πλέγματα Εικόνα 2, (grids, αντίστοιχα με τις αντικειμενοφόρους πλάκες) που τοποθετούνται στο ΗΜΔ.

**ε. Χρώση.** Συνήθως τα βιολογικά δείγματα είναι τελείως διαπερατά από τα ηλεκτρόνια γιατί τα στοιχεία από τα οποία αποτελούνται (συνήθως C, H, O και N) είναι πολύ ελαφριά για να σκεδάσουν τα επιταχυνμένα ηλεκτρόνια και να δώσουν την απαιτούμενη αντίθεση (contrast). Για το λόγο αυτό χρειάζεται να τα «χρωματίσουμε» με χημικές ουσίες που δεσμεύονται εκλεκτικά από τα διάφορα συστατικά του κυττάρου, με αποτέλεσμα τη διαφορική σκέδαση των ηλεκτρονίων και το σχηματισμό της εικόνας. Οι πιο συνηθισμένες χρωστικές για τη χρώση τομών είναι το οξικό ουρανύλιο, ο κιτρικός μόλυβδος και το υπερμαγγανικό κάλιο.





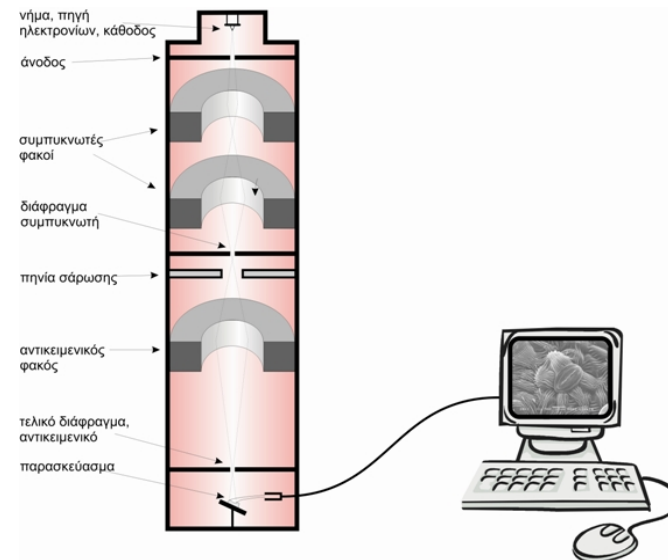
**Σχημα 3.09** Πλέγμα (grid) ηλεκτρονικού μικροσκοπίου τα οποία έχουν διάμετρο 3mm και είναι συνήθως κατασκευασμένα από χαλκό, νικέλιο, χρυσό ή άνθρακα.

**Αρνητική χρώση (Negative staining).**

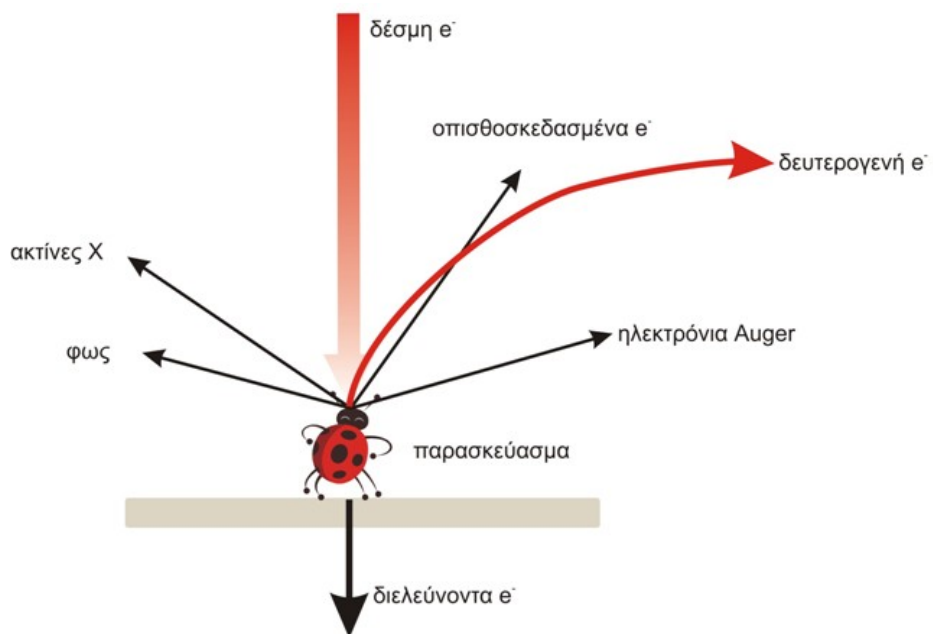
Ορισμένες κατηγορίες κυττάρων, μικροοργανισμών ή μεγαλομορίων των οποίων δε μας ενδιαφέρει άμεσα η εσωτερική τους δομή (βακτήρια, ιοί, πρωτεϊνικά μόρια, νουκλεϊκά οξέα κλπ.) μπορούν να παρατηρηθούν με το ΗΜΔ με αρνητική χρώση. Με αυτή τη μέθοδο συνήθως το παρασκεύασμα δε χρειάζεται να μονιμοποιηθεί, παρά μόνο να τοποθετηθεί και απλωθεί πάνω στα πλέγματα (grids) που είναι καλυμμένα με μια πολύ λεπτή μεμβράνη, από πλαστικό ή άνθρακα. Στη συνέχεια γίνεται η χρώση με ένα διάλυμα που περιέχει ένα βαρύ μέταλλο, όπως για παράδειγμα το φωσφοβολφραμικό οξύ (ΡΤΑ), το μολυβδαινικό αμμώνιο, το οξικό ουρανύλιο, η βολφραμική μεθυλαμίνη, το μυρμηκικό ουρανύλιο ή συνδυασμούς τους. Η μέθοδος αυτή είναι πολύ απλή και γρήγορη και ιδιαίτερα χρήσιμη στη διάγνωση ιώσεων φυτών και ζώων. Η μέθοδος αυτή μπορεί να χρησιμοποιηθεί σε συνδυασμό και με άλλες ιστοχημικές ή ανοσοβιολογικές μεθόδους.

Ηλεκτρονικό Μικροσκόπιο Σάρωσης (ΗΜΣ, Scanning Electron Microscope, SEM).

Το ΗΜΣ παράγει καλά εστιασμένες τρισδιάστατες εικόνες με μεγάλη λεπτομέρεια. Ένα σύγχρονο ΗΜΣ έχει διακριτική ικανότητα που φτάνει τα 3 nm. Το ΗΜΣ χρησιμοποιεί, όπως και το ΗΜΔ, μια δέσμη ηλεκτρονίων που εδώ όμως αντί να διαπερνούν το παρασκεύασμα, σαρώνουν την επιφάνειά του (όπως σαρώνουν τα μάτια μας τη σελίδα ενός βιβλίου όταν διαβάζουμε) με πολύ μεγάλη ταχύτητα. Η δέσμη των ηλεκτρονίων παράγεται και εδώ από ένα νήμα, και ένα σύστημα ανόδου καθόδου όπου εφαρμόζεται υψηλή τάση, συνήθως της τάξης των 15-40 kV, για την επιτάχυνση των ηλεκτρονίων. Η δέσμη των ηλεκτρονίων αφού εστιαστεί από σύστημα συγκεντρωτών φακών βομβαρδίζει το παρασκεύασμα με αποτέλεσμα κάποια από τα ηλεκτρόνια να το διαπερνούν, κάποια να σκεδάζονται ή να άγονται ενώ συγχρόνως να προκαλείται η παραγωγή δευτερογενών ηλεκτρονίων, ακτινών X και ηλεκτρονίων Auger, όπως δείχνει η Εικόνα 4. Τα δευτερογενή ηλεκτρόνια, που προέρχονται από την επιφάνεια του παρασκευάσματος έχουν μικρή σχετικά ενέργεια που σχετίζεται με τη τοπογραφία του. Αυτά τα δευτερογενή ηλεκτρόνια συλλέγονται και στέλνονται σαν ένα ηλεκτρονικό σήμα μέσω ενός ενισχυτή εικόνας σ' ένα καθοδικό σωλήνα (CRT) όπου γίνεται και η παρατήρηση ή και η φωτογράφιση του δείγματος. Τα υπόλοιπα ηλεκτρόνια ή ακτινοβολίες που παράγονται μπορούν να μας δώσουν άλλες πληροφορίες σχετικές με την υφή και σύσταση του παρασκευάσματος.[48-49



**Σχημα 3.10** Σχηματική παράσταση των διαφόρων τμημάτων ενός ηλεκτρονικού μικροσκοπίου σάρωσης (ΗΜΣ).



**Σχημα 3.11** Οι διάφοροι τρόποι αλληλοεπίδρασης παρασκευάσματος και δέσμης επιταχυνμένων ηλεκτρονίων, όπως συμβαίνει και στο ΗΜΣ.

## Προετοιμασία παρασκευασμάτων για το ΗΜΣ.

Ένα παρασκεύασμα για να παρατηρηθεί με το κλασσικό ΗΜΣ θα πρέπει να έχει ορισμένες ιδιότητες που είναι:

- α. να αντέχει στο υψηλό κενό,
- β. να αντέχει στο βομβαρδισμό ηλεκτρονίων, και
- γ. να είναι αγώγιμο.

Έχοντας αυτές τις ιδιότητες υπ' όψη μπορούμε να κρίνουμε τι επεξεργασία χρειάζεται κάποιο παρασκεύασμα ανάλογα με την υφή του. Πιο κάτω αναφέρονται μερικά χαρακτηριστικά παραδείγματα μεθόδων προετοιμασίας παρασκευασμάτων.

**1. Μέταλλα:** δεν απαιτείται καμιά απολύτως προετοιμασία, μπορούν να παρατηρηθούν απ' ευθείας αφού πρώτα επικολληθούν στις ειδικές βάσεις (stubs) με ειδική αγώγιμη κόλλα όπως είναι ο κολλοειδής άργυρος (silver dug) ή ο κολλοειδής άνθρακας.

**2. Ορυκτά:** επικόλληση σε stubs και επικάλυψη με λεπτό στρώμα μετάλλου (χρυσού), που συνήθως γίνεται με εκκένωση αίγλης σε ατμόσφαιρα αργού, για να γίνουν αγώγιμα.

**3. Βιολογικά παρασκευάσματα ξερά,** π.χ. γυρεόκοκκοι, φυτικά σπέρματα, ξύλο, δόντια κλπ. ακολουθείται η ίδια προετοιμασία όπως και για τα ορυκτά.

**4. Βιολογικά παρασκευάσματα νωπά.** Ο κλασσικός τρόπος προετοιμασίας περιλαμβάνει χημική μονιμοποίηση, συνήθως με γλουταρική αλδεΐδη και καμιά φορά και με  $OsO_4$ , σε ευαίσθητα παρασκευάσματα, ακολουθεί αφυδάτωση με αλκοόλη ή ακετόνη, ξήρανση σε συσκευή κρίσιμου σημείου (critical point dryer) και στη συνέχεια όπως και στο (2). Καλύτερη μονιμοποίηση επιτυγχάνεται με τη φυσική μονιμοποίηση, όπου το παρασκεύασμα παγώνεται πολύ γρήγορα και παρατηρείται παγωμένο. Η φυσική μονιμοποίηση (κρυοτεχνική) απαιτεί ειδικές για τη διατήρηση του παρασκευάσματος σε χαμηλή θερμοκρασία κατά τη διάρκεια της παρατήρησης. Λόγω του πολύ γρήγορου παγώματος τα παρασκευάσματα υφίστανται τις λιγότερες δυνατές τεχνητές αλλοιώσεις (artefacts).

Με τη μέθοδο της φυσικής μονιμοποίησης, μπορεί να γίνει παρατήρηση σχεδόν οποιουδήποτε παρασκευάσματος όπως είναι διάφορα τρόφιμα, γαλακτώματα, σε υγρή ή στερεή κατάσταση.[48-49]

### 3.4 Ηλεκτρονικό Μικροσκόπιο Σάρωσης, SEM

Τα προς εξέταση δείγματα τοποθετούνται σε θάλαμο όπου υπάρχει υψηλό κενό και βομβαρδίζονται με μια δέσμη ηλεκτρονίων. Από το όργανο λαμβάνονται εικόνες με τη βοήθεια των οποίων γίνονται οι οπτικές παρατηρήσεις του δείγματος.

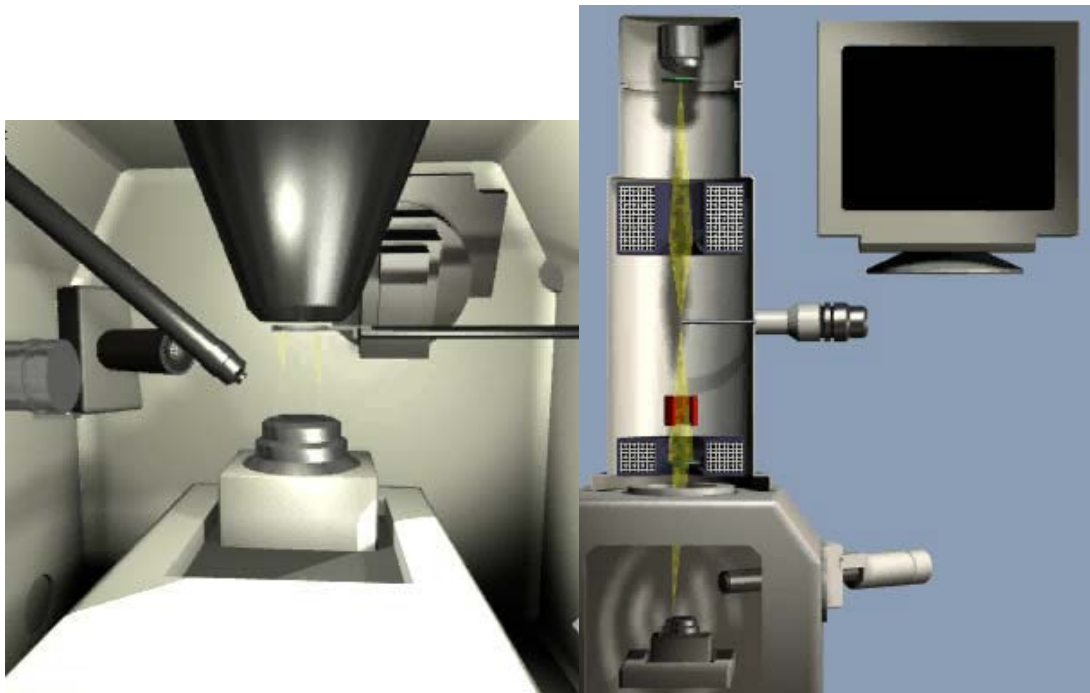
Η βασική αρχή λειτουργίας του ηλεκτρονικού μικροσκοπίου σάρωσης (ScanningElectronMicroscope) είναι η σάρωση του δείγματος με μια δέσμη ηλεκτρονίων καλά εστιασμένη.



**Σχήμα 3.11** : Άποψη του ηλεκτρονικού μικροσκοπίου JSM της εταιρείας JEOL.

Καθώς η δέσμη σαρώνει το δείγμα, ηλεκτρόνια ανακρούονται από αυτό και συγκεντρώνονται σε μια άνοδο συλλογής, που διατηρείται σε δυναμικό μερικές εκατοντάδες βολτ θετικότερο ως προς το δείγμα. Το ρεύμα στην άνοδο συλλογής ενισχύεται και χρησιμοποιείται για να διαμορφώσει τη δέσμη ηλεκτρονίων σε καθοδικό σωλήνα, ο οποίος σαρώνεται σε συγχρονισμό με τη δέσμη του μικροσκοπίου. Ο καθοδικός σωλήνας παρουσιάζει έτσι ένα πολύ μεγεθυμένο είδωλο του αντικειμένου.

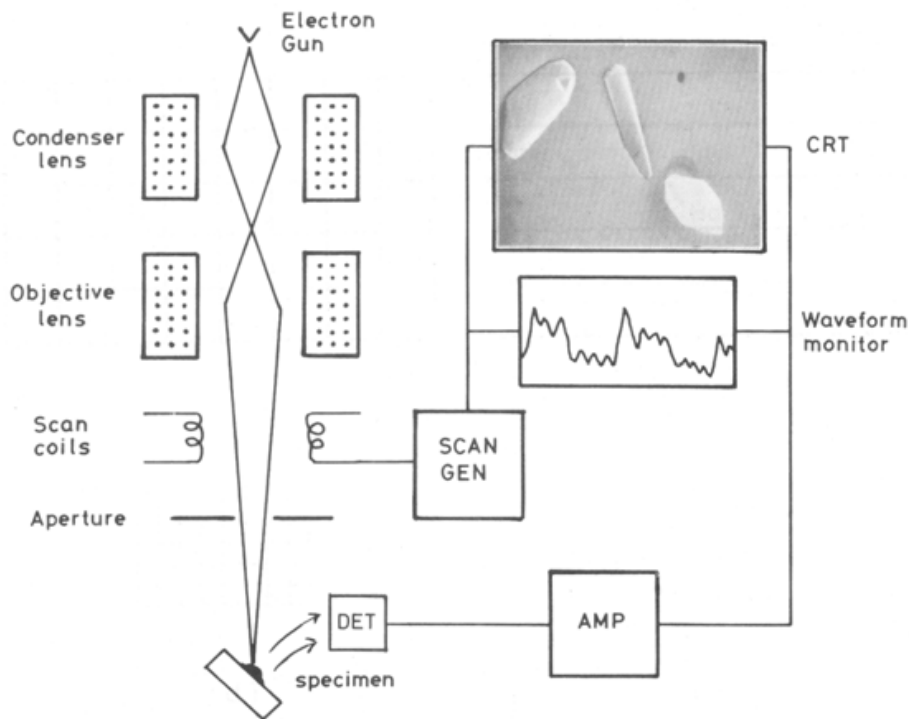
Η δέσμη των ηλεκτρονίων παράγεται από την θερμιονική εκπομπή ενός νήματος βολφραμίου και επιταχύνεται από ένα ηλεκτρικό πεδίο με τάση από 5 – 30 kV. Καθώς η δέσμη προσπίπτει στην επιφάνεια του δοκιμίου και εισχωρεί σε ένα βάθος της τάξεως του 1μm προκαλεί την εκπομπή νέων ηλεκτρονίων, αλλά και ακτίνων – X από το δείγμα. Στο Σχήμα 3.12 παρατηρείται το εσωτερικό τμήμα ενός ηλεκτρονικού μικροσκοπίου σάρωσης (SEM).



Σχήμα 3.12 : Άποψη του εσωτερικού του ηλεκτρονικού μικροσκοπίου σάρωσης (SEM).

Τα ηλεκτρόνια που εκπέμπονται από το δείγμα διακρίνονται σε δευτερογενή (secondary) και οπισθοσκεδαζόμενα (backscattered). Η κλασική εικόνα που συνήθως λαμβάνεται με το ηλεκτρονικό μικροσκόπιο σάρωσης και βάσει της οποίας γίνεται η μελέτη των δειγμάτων σχηματίζεται από τα δευτερογενή ηλεκτρόνια. Τα οπισθοσκεδαζόμενα ηλεκτρόνια σε συνδυασμό και με τις ακτίνες – X δίνουν πληροφορίες για τη χημική σύσταση του δείγματος.

Στο Σχήμα 3.13 φαίνεται το σχηματικό διάγραμμα ενός ηλεκτρονικού μικροσκοπίου σάρωσης (SEM). Ένα ηλεκτρονικό κανόνι θερμιονικής εκπομπής παράγει ηλεκτρόνια τα οποία επιταχύνονται σε ενέργεια τυπικά 1-40keV. Η δέσμη εστιάζεται μέσω ενός ή δύο συμπυκνωτών φακών έτσι ώστε στο επίπεδο του δείγματος να έχει διάμετρο 2-100nm. Η λεπτή δέσμη ηλεκτρονίων σαρώνει την επιφάνεια του δείγματος με την βοήθεια των πηνίων σάρωσης ενώ ένας ανιχνευτής δευτερογενών ηλεκτρονίων μετρά τα παραγόμενα ηλεκτρόνια. Ταυτόχρονα η κηλίδα της οθόνης CRT σαρώνει την οθόνη σε συγχρονισμό με την δέσμη των ηλεκτρονίων και η φωτεινότητά της διαμορφώνεται από το ενισχυμένο σήμα του ανιχνευτή. Η σάρωση γίνεται σε ένα κάναβο (raster) που αποτελείται από ένα αριθμό οριζόντιων γραμμών. Αυτό έχει σαν αποτέλεσμα η ποσότητα των δευτερογενών ηλεκτρονίων που προέρχονται από κάθε σημείο του δείγματος να απεικονίζεται σαν οπτική εικόνα στην οθόνη CRT.



Σχήμα 3.13 : Σχηματικό διάγραμμα SEM.

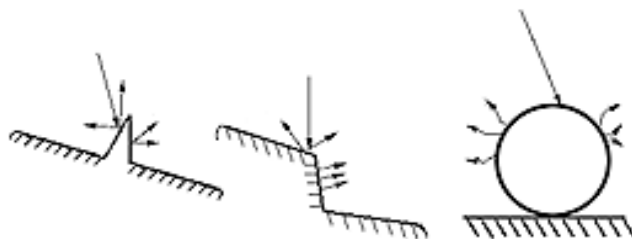
Η μεγέθυνση που επιτυγχάνεται είναι ο λόγος των διαστάσεων της οθόνης CRT προς τις πραγματικές διαστάσεις του κάναβου που σαρώνει η δέσμη των ηλεκτρονίων στο δείγμα. Π.χ. εάν ο κάναβος στο δείγμα είναι 10x10μm και η οθόνη 10x10cm τότε η μεγέθυνση είναι 10000 φορές. Στο Σχήμα 3.14 φαίνεται η εικόνα δευτερογενών ηλεκτρονίων ενός πυριτιούχου δένδριτη σε κράμα νικελίου. Η διακριτική ικανότητα ενός SEM εξαρτάται από την ωφέλιμη μεγέθυνση του αντικειμενικού του φακού, αλλά κυρίως από τη ελάχιστη διάμετρο δέσμης που είναι δυνατό να

παράγει και άρα από το ηλεκτρονικό κανόνι και το συμπηκνωτή φακό. Στα σύγχρονα SEM με θερμικονικό κανόνι η διακριτική ικανότητα είναι  $\sim 3-5\text{nm}$  ενώ στην περίπτωση κανονιού εκπομπής πεδίου είναι  $1-2\text{nm}$ .



Σχήμα 3.14 : Εικόνα δευτερογενών ηλεκτρονίων ενός πυριτιούχου δενδρίτη σε κράμα νικελίου.

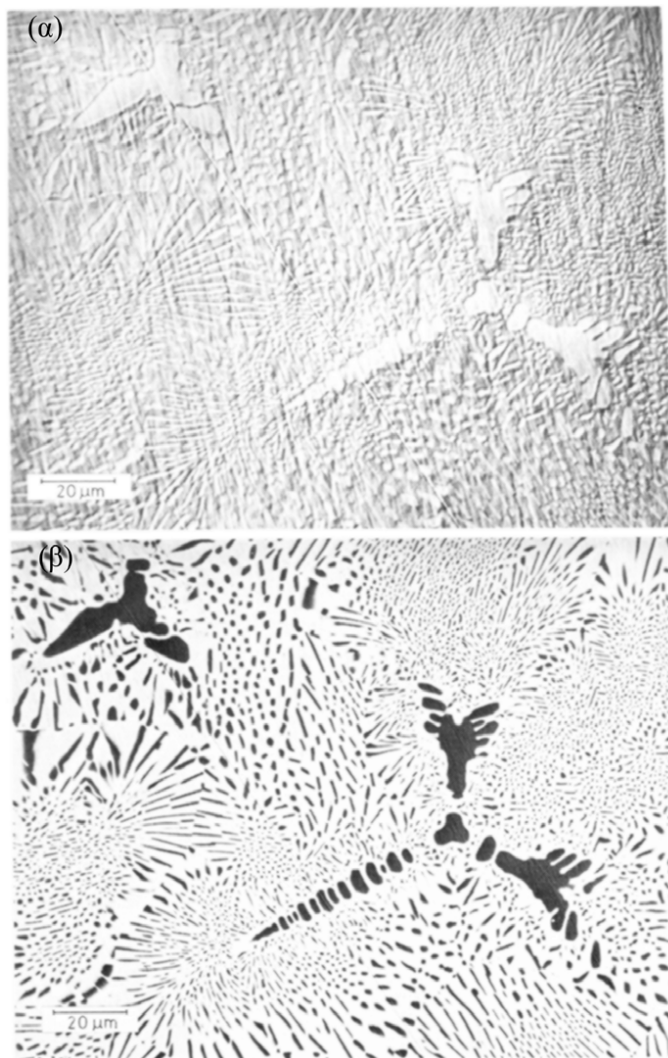
Η πρόσκρουση ενός ηλεκτρονίου πάνω στα άτομα του δείγματος μπορεί να προκαλέσει την απομάκρυνση από αυτά εκατοντάδων δευτερογενών ηλεκτρονίων. Μόνο όμως όσα εκπέμπονται σε βάθος μικρότερο από  $10\text{nm}$  από την επιφάνεια του υλικού διαφεύγουν στο κενό και μπορούν να ανιχνευθούν. Η ποσότητα των δευτερογενών ηλεκτρονίων, που εκπέμπονται από την επιφάνεια του δείγματος, εξαρτάται από την γωνία πρόσπτωσης του πρωτογενούς ηλεκτρονίου και είναι τόσο μεγαλύτερη όσο μεγαλύτερη είναι και η γωνία αυτή. Αυτό έχει σαν αποτέλεσμα οι ακμές, οι γωνίες και οι καμπυλώσεις μιας τραχείας επιφάνειας να φαίνονται 'φωτεινότερες' από τα μέρη που είναι κάθετα στην προσπίπτουσα δέσμη, γι' αυτό και η χρησιμοποίηση των δευτερευόντων ηλεκτρονίων οδηγεί σε απεικόνιση του ανάγλυφου της επιφάνειας του δείγματος (Secondary Electron Image, SEI).





Σχήμα 3.15 : Εκπομπή δευτερογενών ηλεκτρονίων αναλόγως της επιφανειακής μορφολογίας του δείγματος.

Ένα ποσοστό των προσπιπόντων ηλεκτρονίων ανακλάται, μετά από μία ή περισσότερες συγκρούσεις με τους πυρήνες των ατόμων του δείγματος, και αν η ενέργειά του είναι αρκετή (μεγαλύτερη από 50 eV) μπορεί να ανιχνευτεί (BackscatteredElectronImage, BEI). Τα οπισθοσκεδαζόμενα ηλεκτρόνια προέρχονται από μεγαλύτερο βάθος και εξαρτώνται από το Z του υλικού. Κατά συνέπεια μπορούν να δώσουν μια εικόνα της χημικής σύστασης του υλικού, όπως φαίνεται στο Σχήμα 3.16.



Σχήμα 3.16 : Εικόνα (α) δευτερογενών και (β) οπισθοσκεδαζόμενων ηλεκτρονίων ασημοκόλλησης.

Όταν δύο ανιχνευτές είναι τοποθετημένοι σε αντιδιαμετρικές θέσεις ως προς την προσπίπτουσα δέσμη ηλεκτρονίων και σε μικρή γωνία με την επιφάνεια του δείγματος, η εικόνα της τοπογραφίας της επιφάνειας μπορεί να εξαχθεί από τη διαφορά των δύο ενδείξεων των ανιχνευτών (Εικόνα οπισθοσκεδαζόμενων ηλεκτρονίων τοπογραφίας, BEI topography). Η χρησιμοποίηση των ανακλώμενων ηλεκτρονίων δίνει καλύτερα αποτελέσματα από την ανίχνευση των δευτερευόντων, όταν είναι σχεδόν επίπεδο (π.χ. όταν έχει προηγηθεί λείανση). Αν η πυκνότητα των ανακλώμενων ηλεκτρονίων είναι μικρή, για βελτίωση της εικόνας, το δείγμα μπορεί να καλυφθεί με λεπτό στρώμα ενός βαρέος μετάλλου.

Επειδή, ο αριθμός των ανακλώμενων ηλεκτρονίων είναι ανάλογος του μέσου ατομικού αριθμού  $Z$  του δείγματος, μπορούμε να έχουμε μια εικόνα της σύστασης του υλικού αν οι ενδείξεις των δύο ανιχνευτών αθροιστούν, οπότε οι ενδείξεις οι οφειλόμενες στο ανάγλυφο της επιφάνειας απαλείφονται (Εικόνα οπισθοσκεδαζόμενων ηλεκτρονίων σύστασης, BEI composition).

Ένα τρίτο χαρακτηριστικό των ανακλώμενων ηλεκτρονίων είναι ότι η ποσότητά τους εξαρτάται από την γωνία ανάμεσα στην προσπίπτουσα δέσμη και τα επίπεδα του κρυσταλλικού πλέγματος, αν το δείγμα είναι κρυσταλλικό, με αποτέλεσμα τη δημιουργία φαινομένων συμβολής (Electron Channeling Pattern, ECP). Η ανίχνευση των φαινομένων αυτών δίνει πληροφορίες για το είδος των κρυστάλλων, τον προσανατολισμό τους και τις τοπικές τους δομικές ατέλειες.

Η διέγερση εξάλλου, ηλεκτρονίων των ατόμων του δείγματος οδηγεί στην εκπομπή ακτίνων  $-X$ , μήκους κύματος χαρακτηριστικού του υλικού, φαινόμενο που μπορεί να αξιοποιηθεί για την ποιοτική ή ποσοτική στοιχειακή ανάλυση του υλικού (electron probe micro-analysis: EPMA). Κατά την πρόσπτωση της δέσμης ηλεκτρονίων στα άτομα του δείγματος ένα ποσοστό των προσπιπτόντων ηλεκτρονίων (1:10000 περίπου) προκαλεί την απομάκρυνση ηλεκτρονίων από τους εσωτερικούς φλοιούς των ατόμων αυτών. Οι κενές θέσεις καλύπτονται γρήγορα από ηλεκτρόνια των εξωτερικών φλοιών με ταυτόχρονη εκπομπή ακτίνων- $X$  χαρακτηριστικού μήκους κύματος, ακτινοβολία που μπορεί να ανιχνευθεί με κατάλληλο ανιχνευτή. Επειδή όμως η ενεργειακή στάθμη των εσωτερικών φλοιών ενός ατόμου δεν εξαρτάται από τους χημικούς δεσμούς στους οποίους συμμετέχει το άτομο και δεδομένου ότι οι υποφλοιοί των εσωτερικών φλοιών είναι λίγοι, αρκούν 1 ή 2 φασματικές γραμμές για να ταυτοποιήσουμε ένα στοιχείο.

Υπάρχουν δύο μέθοδοι ανάλυσης βασισμένοι στην ανίχνευση αυτών των ακτίνων  $-X$ :

α) Η ακτινοβολία  $X$  που εκπέμπεται από το δείγμα περιθλάται από κρύσταλλο κατά γωνία που εξαρτάται από το μήκος κύματος της, σύμφωνα με τον νόμο του Bragg:  $n\lambda = 2d\sin\theta$  (Φασματοσκοπία διαχεόμενου μήκους κύματος, WDS). Χρησιμοποιούνται διάφορα εναλλακτικά είδη κρυστάλλων. Οι ανιχνευτές κατορθώνουν να καλύψουν μήκη κύματος της περιοχής 0.87-93 Å πετυχαίνοντας την ανίχνευση των στοιχείων με ατομικό αριθμό 5 (B) – 93(Np).

β) Η ακτινοβολία  $X$  που εκπέμπεται από το δείγμα προσπίπτοντας σε κρύσταλλο Si (p-i-n) προκαλεί την εκπομπή φωτοηλεκτρονίων ενεργειακής στάθμης χαρακτηριστικής του στοιχείου από το οποίο προέρχεται η ακτινοβολία (Φασματοσκοπία διαχεόμενης ενέργειας, EDS). Με κατάλληλη ενίσχυση των εκπεμπόμενων φωτοηλεκτρονίων, οι ανιχνευτές μπορούν να ανιχνεύσουν τα στοιχεία με ατομικό αριθμό 11(Na)-92(U).



Σχήμα 3.17 : Μονάδα SEM/EDS πολλαπλών συνθηκών.

Τα κύρια πλεονεκτήματα της φασματοσκοπίας διαχεόμενης ενέργειας είναι η ταχύτητα, η ικανότητα ταυτόχρονης ανίχνευσης όλων των στοιχείων και η ανυπαρξία κινητών εξαρτημάτων (η φασματοσκοπία διαχεόμενου μήκους κύματος απαιτεί συνεχείς μετακινήσεις του κρυστάλλου ή και αλλαγή κρυστάλλων). Από την άλλη πλευρά όμως, η φασματοσκοπία διαχεόμενου μήκους κύματος έχει πολύ μεγαλύτερη ευαισθησία και ακρίβεια (διακριτική ικανότητα 20 eV, έναντι 150 eV της φασματοσκοπίας διαχεόμενης ενέργειας, χρήσιμη για την ανίχνευση ιχνοστοιχείων), μεγαλύτερες δυνατότητες ανίχνευσης ελαφρών στοιχείων (B, C, N, O) και απλότητα κατασκευής. Και οι δύο μέθοδοι επιτυγχάνουν την ποιοτική και ποσοτική (με ακρίβεια 2-5%) μικροανάλυση του δείγματος επιτρέποντας την "χαρτογράφηση" της συγκέντρωσης ενός ή περισσότερων στοιχείων στο δείγμα.

Το δείγμα μπορεί να είναι παχύ σε σχέση με τα κοινά ηλεκτρονικά μικροσκόπια, αφού η δέσμη δεν χρειάζεται να περάσει δια μέσου αυτού. Επίσης, η παραγωγή των ανακρουόμενων ηλεκτρονίων εξαρτάται από τη γωνία πρόσπτωσης της δέσμης στην επιφάνεια. Συνεπώς, οι μικρογραφίες του ηλεκτρονικού μικροσκοπίου σάρωσης έχουν πολύ καλύτερη τρισδιάστατη εμφάνιση από τις συνήθεις. Η διακριτικότητα είναι της τάξης των νανόμετρων, πολύ μεγαλύτερη από εκείνη των καλύτερων οπτικών μικροσκοπίων.

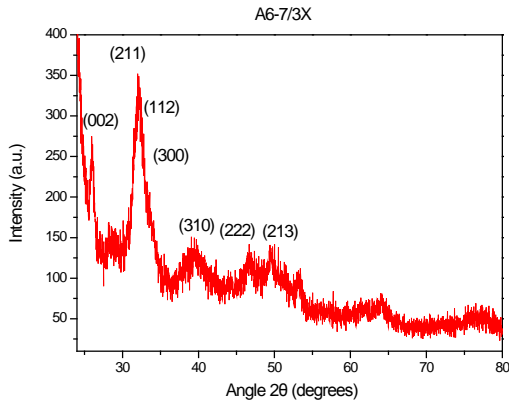
## 4. Αποτελέσματα-Συζήτηση

Τα αιωρήματα που παρήχθησαν κατά την πειραματική διαδικασία ξηράνθηκαν σε πυραντήριο στους 40°C για περίπου τρεις μέρες έως ότου να απομακρυνθεί πλήρως η υγρασία και στη συνέχεια κονιορτοποιήθηκαν για να υποστούν φυσικοχημικό χαρακτηρισμό με Περίθλαση Ακτίνων Χ (κεφ 4.1), Υπέρυθρη Φασματομετρία με μετασχηματισμό Fourier (κεφ 4.2) και Ηλεκτρονική μικροσκοπία διέλευσης ηλεκτρονίων (TEM) (κεφ 4.3)

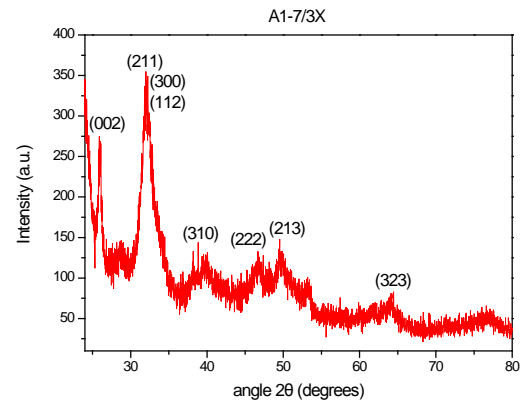
### 4.1 Αποτελέσματα Περίθλασης Ακτίνων Χ (XRD)

*4.1.1 Ανάλυση δειγμάτων με μοριακή αναλογία ασβεστίου προς φώσφορο =1:1 και HAp/Chit= 70/30 με μεταβαλλόμενες τις τιμές των αναλογιών  $Ca^{2+}:Arg$  και της συγκέντρωση  $H_3PO_4$*

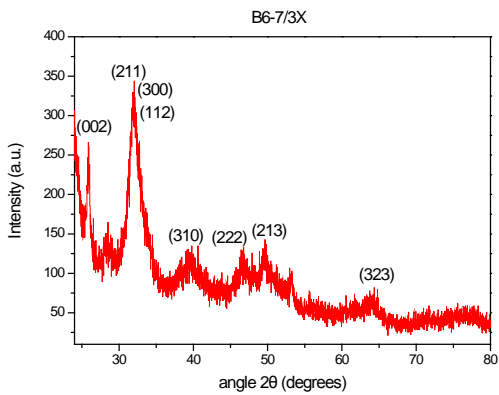
Στα **Σχήματα 4.01- 4.04** εξετάζονται τα δείγματα με σταθερή αναλογία μαζών υδροξυαπατίτη/βιοπολυμερούς (HAp/chit = 70/30) και σταθερή μοριακή αναλογία Ca/P = 1/1, ενώ μεταβάλλονται η τελική συγκέντρωση του ορθοφωσφορικού οξέος (0,06M ή 0,1M) και η μοριακή αναλογία  $Ca^{2+}:Arg = 1:2$



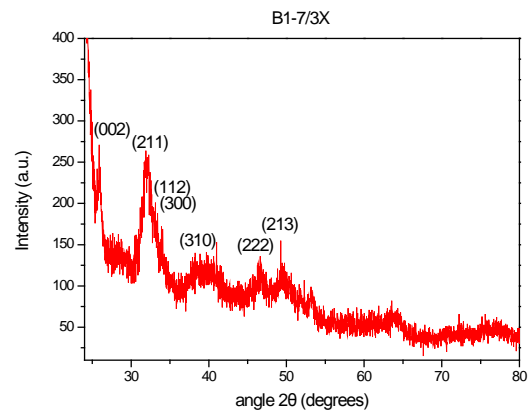
**Σχήμα(4.01)** Ανάλυση XRD κρυστάλλων υδροξυαπατίτη με αναλογίες Ca/P= 1/1, αναλογία μαζών HAp/Chit= 70/30, μοριακή αναλογία Ca<sup>2+</sup>:Arg = 1:1, συγκέντρωση H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> 0,06M



**Σχήμα(4.02)** Ανάλυση XRD κρυστάλλων υδροξυαπατίτη με αναλογίες Ca/P= 1/1, αναλογία μαζών HAp/Chit= 70/30, μοριακή αναλογία Ca<sup>2+</sup>:Arg = 1:1, συγκέντρωση H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> 0,1M



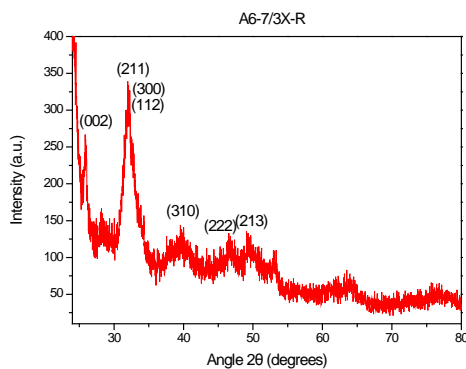
**Σχήμα(4.03)** Ανάλυση XRD κρυστάλλων υδροξυαπατίτη με αναλογίες Ca/P= 1/1, αναλογία μαζών HAp/Chit= 70/30, μοριακή αναλογία Ca<sup>2+</sup>:Arg = 1:2, συγκέντρωση H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> 0,06M



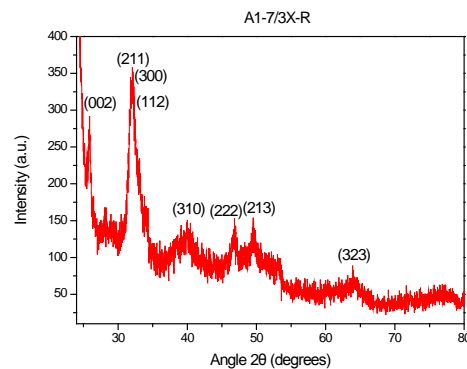
**Σχήμα(4.04)** Ανάλυση XRD κρυστάλλων υδροξυαπατίτη με αναλογίες Ca/P= 1/1, αναλογία μαζών HAp/Chit= 70/30, μοριακή αναλογία Ca<sup>2+</sup>:Arg = 1:2, συγκέντρωση H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> 0,1M

Από τα φάσματα αυτά παρατηρούνται οι χαρακτηριστικές κορυφές του εξαγωνικού υδροξυαπατίτη που απαντάται και στον οστικό. Επιπροσθέτως το εύρος των κορυφών αυτών υποδηλώνει πως το υλικό είναι νανοκρυσταλλικό ενώ διαφέρει ανάλογα με τις συνθήκες παραγωγής των αιωρημάτων. Προκύπτει δηλαδή μερική διαφοροποίηση στο μέγεθος των νανοκρυστάλλων με πιο σωστά κρυσταλλωμένη νανοδομή στο δείγμα με αναλογία  $Ca^{2+}:Arg = 1:1$  και όχι με περίσσεια Αργινίνης. Η σύγκριση των άνωθεν δειγμάτων έγινε σε αντιπαραβολή με οστικό και οδοντικό υδροξυαπατίτη της βάσης δεδομένων crystal diffraction open database 2011 (COD 2011).

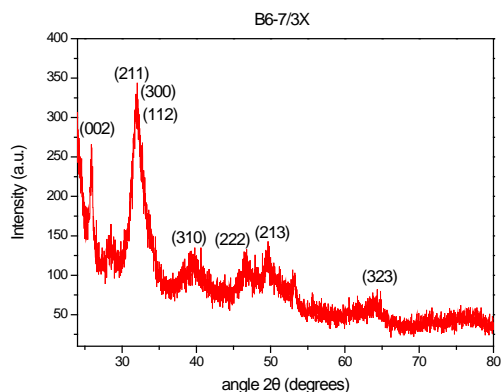
*4.1.2 Ανάλυση δειγμάτων με μοριακή αναλογία ασβεστίου προς φώσφορο =10:6 και HAp/Chit= 70/30 με μεταβαλλόμενες τις τιμές των αναλογιών  $Ca^{2+}:Arg$  και της συγκέντρωση  $H_3PO_4$*



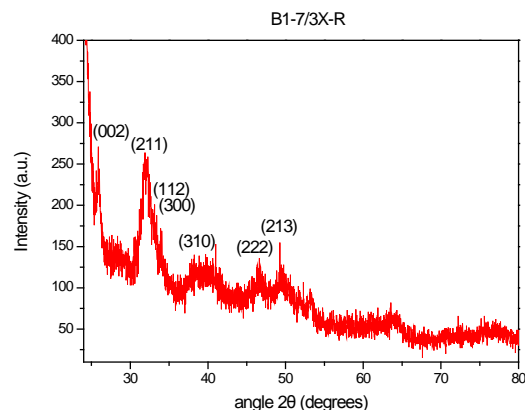
**Σχήμα(4.05)** Ανάλυση XRD κρυστάλλων υδροξυαπατίτη με αναλογίες Ca/P= 10/6, αναλογία μαζών HAp/Chit= 70/30, μοριακή αναλογία  $Ca^{2+}:Arg = 1:1$ , συγκέντρωση  $H_3PO_4$  0,06M



**Σχήμα(4.06)** Ανάλυση XRD κρυστάλλων υδροξυαπατίτη με αναλογίες Ca/P= 10/6, αναλογία μαζών HAp/Chit= 70/30, μοριακή αναλογία  $Ca^{2+}:Arg = 1:1$ , συγκέντρωση  $H_3PO_4$  0,1M



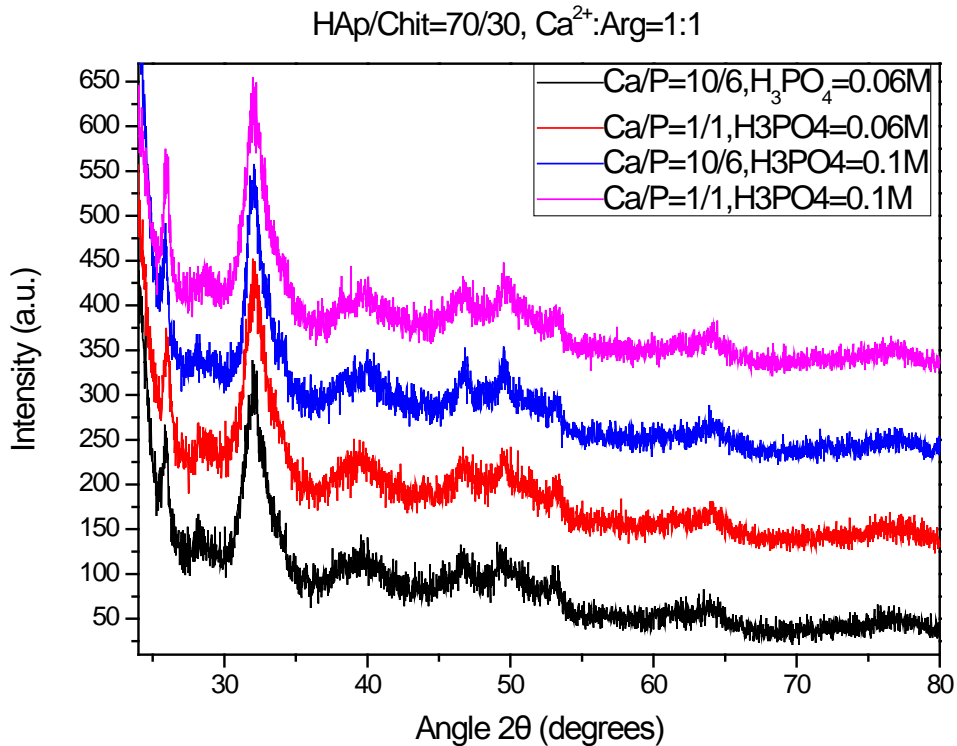
**Σχήμα(4.07)** Ανάλυση XRD κρυστάλλων υδροξυαπατίτη με αναλογίες Ca/P= 10/6, αναλογία μαζών HAp/Chit= 70/30, μοριακή αναλογία  $Ca^{2+}:Arg = 1:2$ , συγκέντρωση  $H_3PO_4$  0,06M



**Σχήμα(4.08)** Ανάλυση XRD κρυστάλλων υδροξυαπατίτη με αναλογίες Ca/P= 10/6, αναλογία μαζών HAp/Chit= 70/30, μοριακή αναλογία  $Ca^{2+}:Arg = 1:2$ , συγκέντρωση  $H_3PO_4$  0,1M

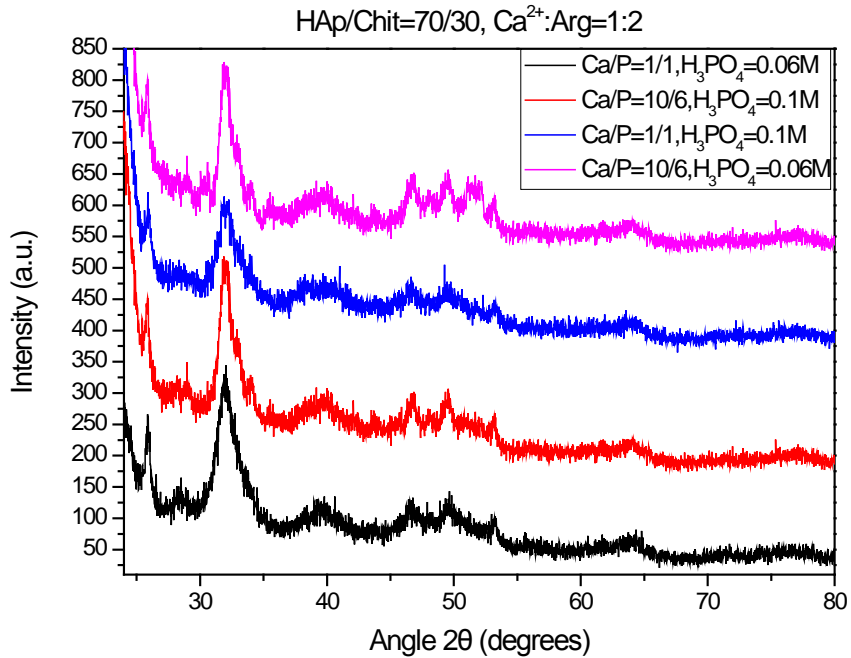
Από την ανάλυση των φασμάτων για μοριακή αναλογία Ca/P =10/6 παρατηρείται καλύτερη κρυστάλλωση του υδροξυαπατίτη σε σχέση με την αναλογία 1/1 (περίσσεια φωσφορικού οξέος) καθ'ότι παρατηρούνται πιο ξεκάθαρες και καλύτερες κορυφές σε αντιστοιχία με αυτές των σχημάτων 4.01-4.04. Ίσως μερικές από τις κορυφές να είναι ελαφρώς στενότερες υποδηλώνοντας ελαφρά μεγαλύτερο μέγεθος νανοκρυστάλλων. Και σε αυτή την περίπτωση απαντώνται οι χαρακτηριστικές κορυφές του εξαγωνικού υδροξυαπατίτη και προκύπτει και πάλι πως πρόκειται για νανοκρυσταλλικά υλικά με διαφορές στο μέγεθος των κρυστάλλων ανάλογα με τις συνθήκες παρασκευής τους. Ο χαρακτηρισμός του υδροξυαπατίτη έγινε και εδώ σε αναφορά της προαναφερθείσας βάσης δεδομένων.



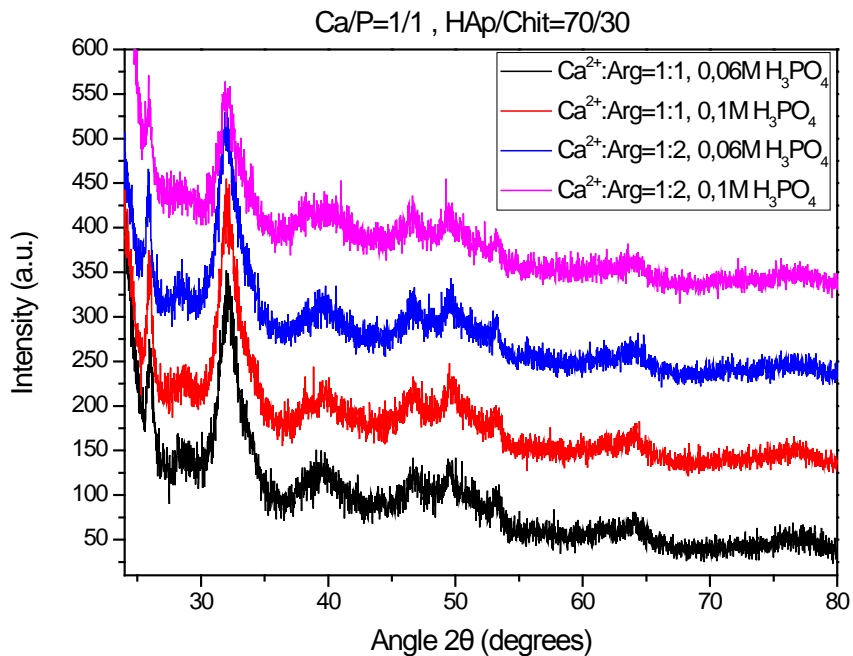


**Σχήμα 4.09.** Φάσματα περίθλασης ακτίνων Χ για τα δείγματα με μοριακή αναλογία Ca<sup>2+</sup>:Arg = 1:1 και αναλογίες μαζών HAP/Chit = 70/30.

Στο **Σχήμα 4.09** συγκρίνονται φάσματα περίθλασης ακτίνων Χ για δείγματα με σταθερή μοριακή αναλογία Ca<sup>2+</sup>:Arg = 1:1 και αναλογίες μαζών HAP/Chit = 70/30 ενώ μεταβάλλονται οι αναλογίες Ca/P και η τελική συγκέντρωση ορθοφωσφορικού οξέος. Και στις τέσσερις περιπτώσεις εμφανίζονται σχεδόν ταυτόσημες κορυφές υδροξυαπατίτη τόσο μεταξύ τους όσο και σε αντιπαραβολή με τις χαρακτηριστικές κορυφές του οστικού υδροξυαπατίτη. Στο **Σχήμα 4.10** συγκρίνονται φάσματα περίθλασης ακτίνων Χ για δείγματα με σταθερή μοριακή αναλογία Ca<sup>2+</sup>:Arg = 1:2 και αναλογίες μαζών HAP/Chit = 70/30 ενώ μεταβάλλονται και εδώ οι αναλογίες Ca/P και η τελική συγκέντρωση ορθοφωσφορικού οξέος. Και σε αυτή την περίπτωση απαντώνται οι χαρακτηριστικές κορυφές του οστικού υδροξυαπατίτη. Να τονιστεί στο σημείο αυτό πως οι κορυφές στις 20 μοίρες είναι κορυφές του υλικού του δειγματοφορέα (plexiglass) καθώς χρησιμοποιήθηκε μικρής διαμέτρου δειγματοφορέας για το μηχάνημα Brucker D8 Focus.

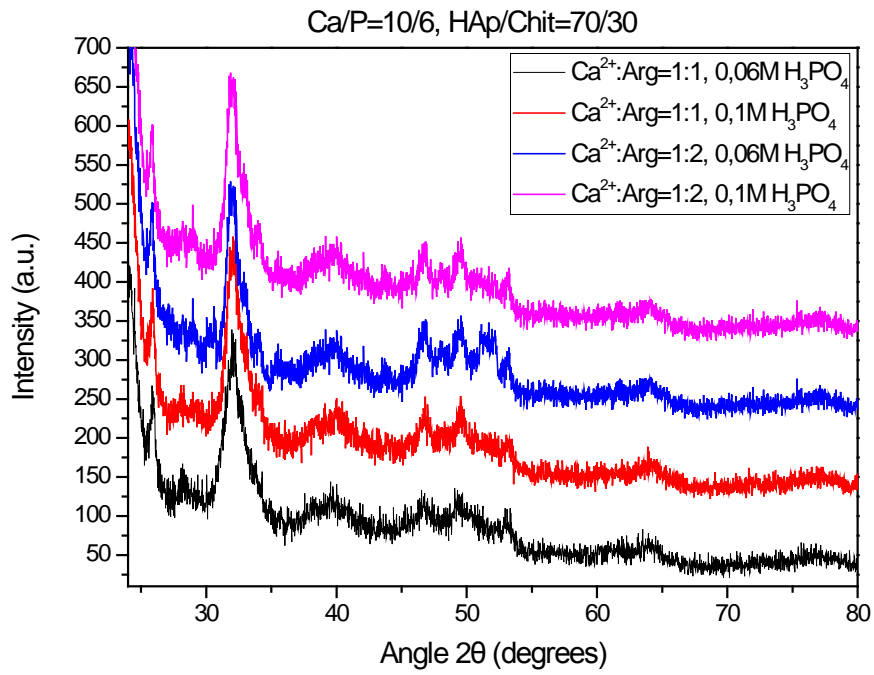


**Σχήμα 4.10.** Φάσματα περίθλασης ακτίνων Χ για τα δείγματα με μοριακή αναλογία  $\text{Ca}^{2+}:\text{Arg} = 1:2$  και αναλογίες μαζών  $\text{HAP}/\text{Chit} = 70/30$ .



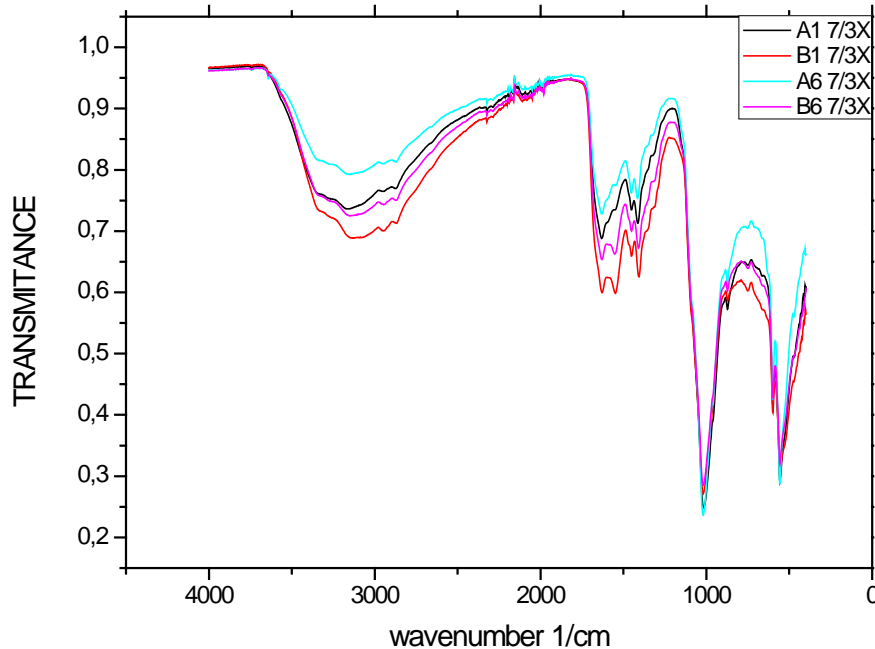
**Σχήμα 4.11.** Συγκριτικά φάσματα περίθλασης ακτίνων Χ για τα δείγματα με μοριακή αναλογία  $\text{Ca}/\text{P} = 1:1$  και αναλογίες μαζών  $\text{HAP}/\text{Chit} =$

70/30.



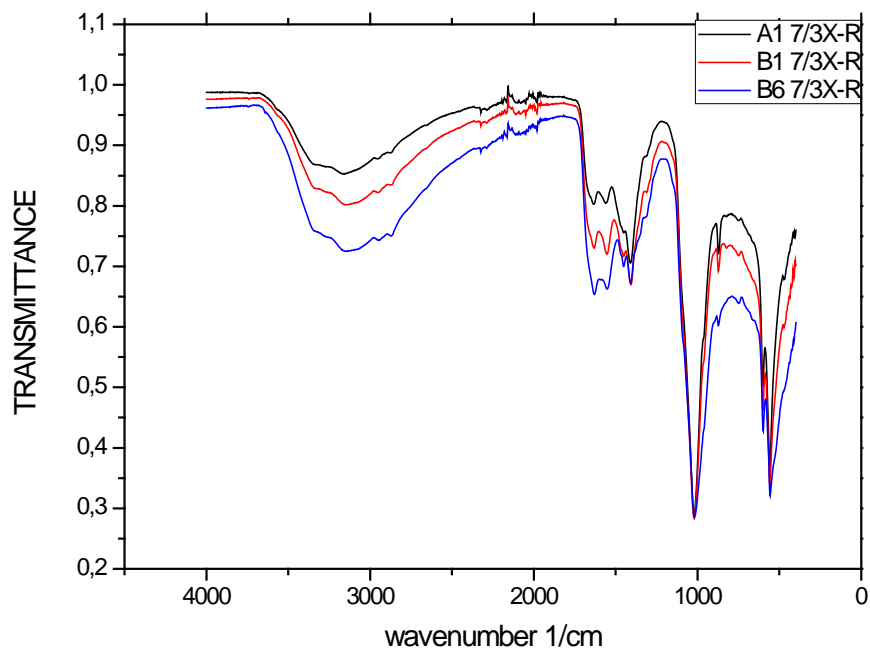
**Σχήμα 4.12.** Συγκριτικά φάσματα περιθλασης ακτίνων X για τα δείγματα με μοριακή αναλογία Ca/P = 10:6 και αναλογίες μαζών HAp/Chit = 70/30

## 4.2 Αποτελέσματα Υπέρυθρης φασματοσκοπίας με μετασχηματισμό Fourier FTIR



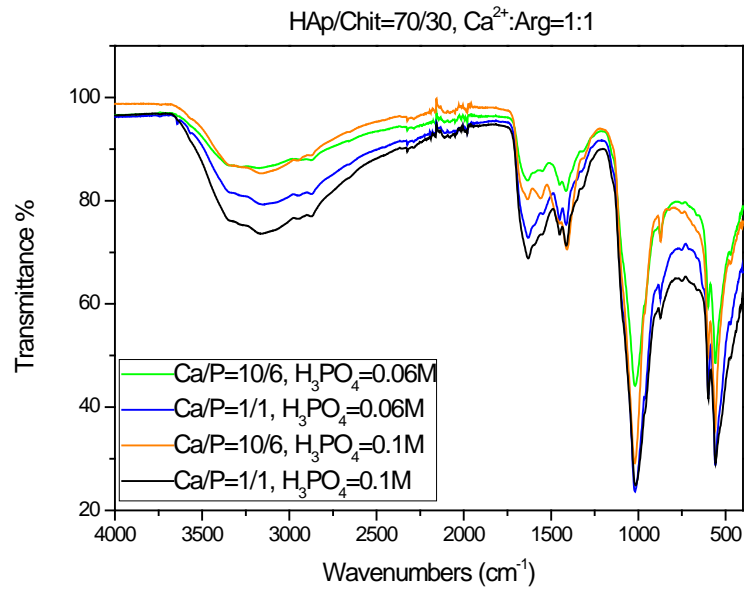
**Σχήμα (4.11)** Φάσματα FTIR για δείγματα με σταθερή μοριακή αναλογία Ca/P 1/1 και σταθερή αναλογία HAp/Chit 70/30 και μεταβαλλόμενες τιμές συγκέντρωσης ορθοφωσφορικού οξέως (1.1 και 0.06M) και αναλογίας ασβεστίου προς αργινίνη (1:1 και 1:2)

Τα φάσματα που προέκυψαν για δείγματα με σταθερή μοριακή αναλογία Ca/P 1/1 και σταθερή αναλογία HAp/Chit 70/30 (**Σχήμα (4.11)**) έδωσαν κορυφές στα 663, 1376, 1548  $\text{cm}^{-1}$  που αποδόθηκαν στην αργινίνη και στα 1153, 1317 και 2855  $\text{cm}^{-1}$  στη χιτοζάνη. Ακόμα ανιχνεύτηκαν κορυφές στα 557 και 599  $\text{cm}^{-1}$  που αποδόθηκαν σε καμπτική δόνηση του δεσμού O-P-O και στα 1022  $\text{cm}^{-1}$  μια κορυφή λόγω εκτατικής δόνησης του δεσμού P-O και μια κορυφή των 467 που αποδίδεται σε  $\nu_2$  δόνηση κάμψης του δεσμού O-P-O. Επιπρόσθετα ενδείξεις ύπαρξης ανθρακικών ενώσεων αποτέλεσαν οι κορυφές 1411 και 1443  $\text{cm}^{-1}$  (δόνηση του  $\text{CO}_3^{2-}$ ) και η κορυφή στα 875  $\text{cm}^{-1}$  ( $\nu_2$  δόνηση του  $\text{HPO}_4^{2-}$ ).

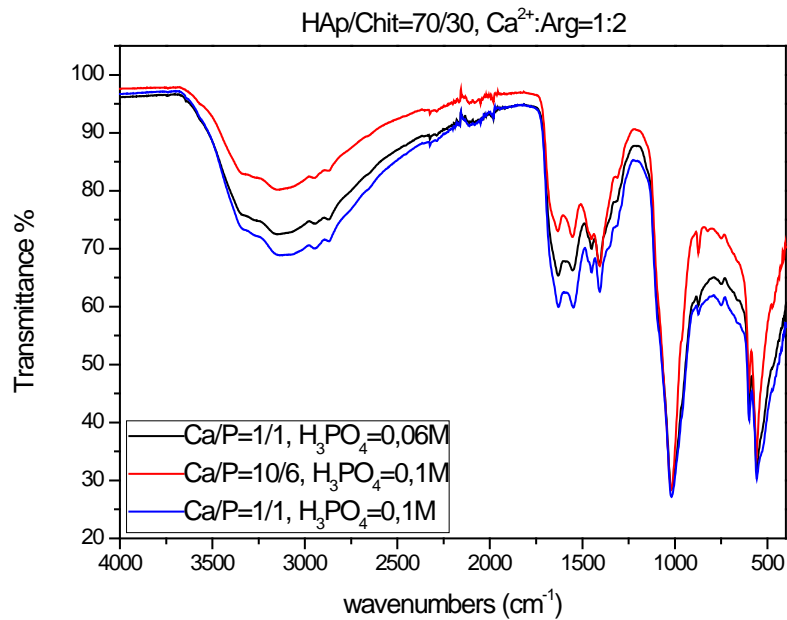


**Σχήμα (4.12)** Φάσματα FTIR για δείγματα με σταθερή μοριακή αναλογία Ca/P 10/6 και σταθερή αναλογία HAp/Chit 70/30 και μεταβαλλόμενες τιμές συγκέντρωσης ορθοφωσφορικού οξέως (1.1 και 0.06M) και αναλογίας ασβεστίου προς αργινίνη (1:1 και 1:2)

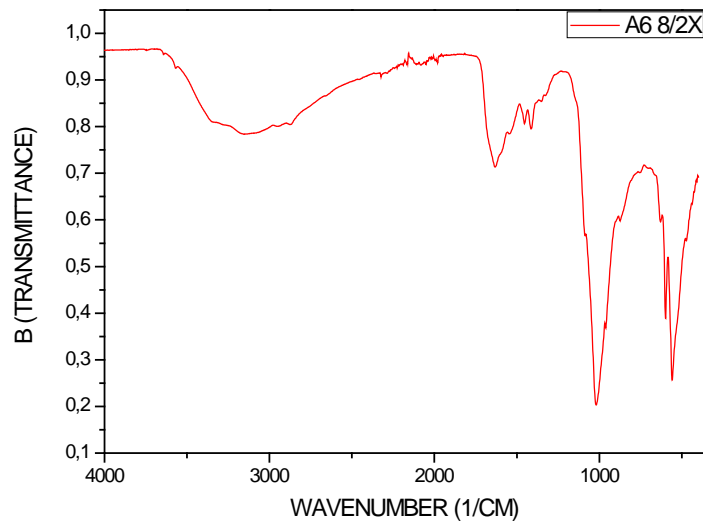
Τα φάσματα που προέκυψαν για δείγματα με σταθερή μοριακή αναλογία Ca/P 1/1 και σταθερή αναλογία HAp/Chit 70/30 (**Σχήμα (4.12)**) έδωσαν κορυφές στα  $1550\text{ cm}^{-1}$  για την αργινίνη και  $665, 709, 1024, 1258, 1315, 1635$  και  $2867\text{ cm}^{-1}$  για την χιτοζάνη. Ταυτοποιήθηκαν ακόμα οι κορυφές στα  $557$  και  $595\text{ cm}^{-1}$  λόγω καμπτικής δόνησης του δεσμού O-P-O και οι  $961$  και  $1024\text{ cm}^{-1}$  λόγω εκτατικής δόνησης του δεσμού P-O και μια κορυφή των  $471\text{ cm}^{-1}$  που αποδίδεται σε  $\nu_2$  δόνηση κάμψης του δεσμού O-P-O. Μια επιπλέον κορυφή μπορεί να οφείλεται σε δονήσεις της ρίζας  $\text{HPO}_4^{-2}$  εμφανίζεται στα  $875\text{ cm}^{-1}$ . Η ρίζα αυτή είναι χαρακτηριστική κατά τον σχηματισμό μη τοιχειομετρικού δροξυαπατίτη. Ενδείξεις ύπαρξης ανθρακικών ενώσεων αποτέλεσαν οι κορυφές στα  $1410$  και  $1453\text{ cm}^{-1}$  που αποδόθηκαν σε δονήσεις του  $\text{CO}_3^{2-}$ .



**Σχήμα 4.13.** Φάσματα ανάλυσης υπέρυθρης φασματοσκοπίας για τα δείγματα με μοριακή αναλογία Ca<sup>2+</sup>:Arg = 1:1 και αναλογίες μαζών HAP/Chit = 70/30.



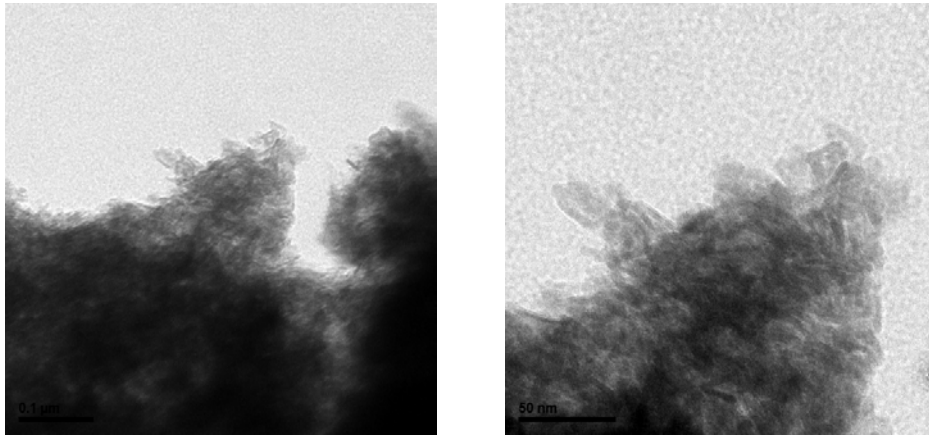
**Σχήμα 4.14** Φάσματα ανάλυσης υπέρυθρης φασματοσκοπίας για τα δείγματα με μοριακή αναλογία Ca<sup>2+</sup>:Arg = 1:2 και αναλογίες μαζών HAP/Chit = 70/30.



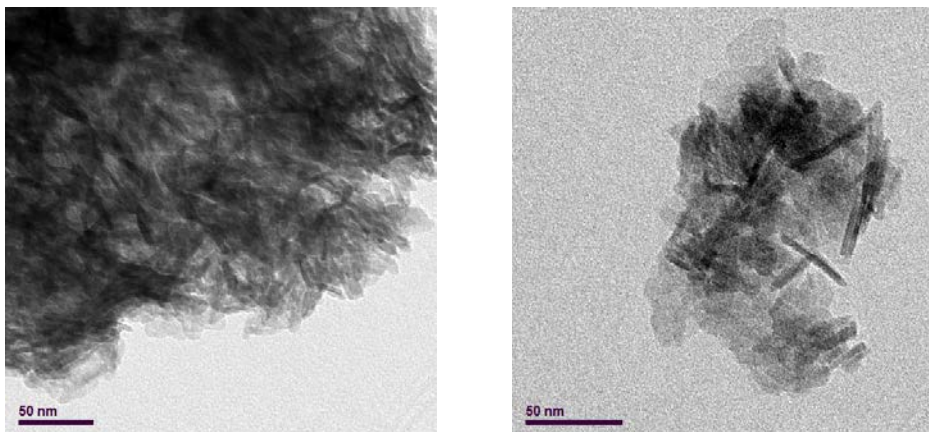
**Σχήμα 4.15** Φάσμα ανάλυσης υπέρυθρης φασματοσκοπίας για δείγμα με μοριακή αναλογία  $\text{Ca}^{2+}:\text{Arg} = 1:1$  , αναλογία μαζών HAP/Chit = 80/20 και συγκέντρωση φωσφορικού οξέος 0.06M.

### 4.3 Ηλεκτρονική Μικροσκοπία Διέλευσης Ηλεκτρονίων, (TEM)

Το μέγεθος και το σχήμα των κρυστάλλων του παραγόμενου υδροξυαπατίτη παρουσία χιτοζάνης και L-αργινίνης για αναλογία μαζών HAP/Chit = 70/30, καθώς και η ομοιογένεια των κρυστάλλων αυτών μελετήθηκε με Ηλεκτρονική Μικροσκοπία Διέλευσης Ηλεκτρονίων.

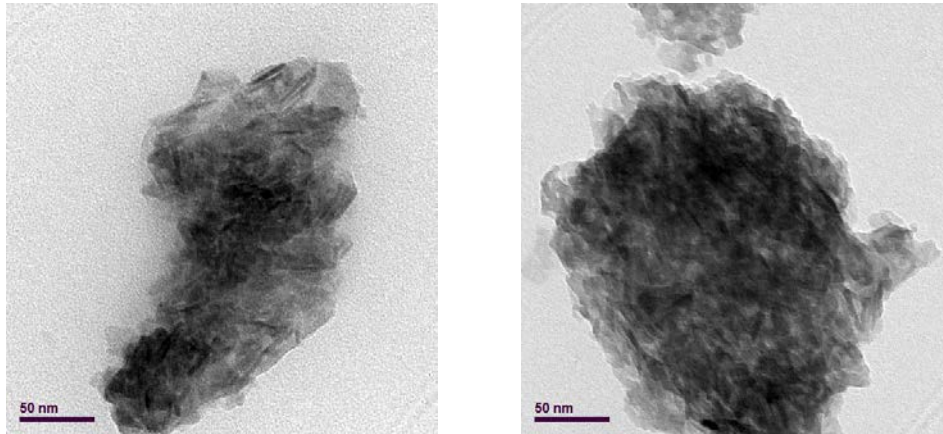


**Σχήμα 4.16.** Εικόνες TEM για δείγματα με αναλογίες μαζών HAP/Chit=70/30, αναλογία  $\text{Ca}^{2+}:\text{Arg}=1:1$ , μοριακή αναλογία  $\text{Ca}/\text{P}=10/6$  και συγκέντρωση  $\text{H}_3\text{PO}_4$  0,06M.



**Σχήμα 4.17.** Εικόνες TEM για δείγματα με αναλογίες μαζών HAP/Chit=70/30, αναλογία  $\text{Ca}^{2+}:\text{Arg}=1:1$ , μοριακή αναλογία  $\text{Ca}/\text{P}=1/1$  και συγκέντρωση  $\text{H}_3\text{PO}_4$  0,06M.





**Σχήμα 4.18.** Εικόνες TEM για δείγματα με αναλογίες μαζών HAP/Chit=60/40, αναλογία  $\text{Ca}^{2+}:\text{Arg}=1:1$ , μοριακή αναλογία Ca/P=1/1 και συγκέντρωση  $\text{H}_3\text{PO}_4$  0,06M.

Από τις εικόνες του Ηλεκτρονικού Μικροσκοπίου Διέλευσης Ηλεκτρονίων (**Σχήμα 4.16 4.17 και 4.18**) προκύπτει ότι οι κρύσταλλοι που αναπτύχθηκαν αποτελούνται από ραβδόμορφα πλακίδια, των οποίων οι διαστάσεις εξαρτώνται από την τελική περιεκτικότητα σε βιομόρια (χιτοζάνη και L-αργινίνη). Παρατηρήθηκε μικρό εύρος διασποράς στις διαστάσεις των σωματιδίων με μέση τιμή μήκους περίπου 30 nm και μέση τιμή πάχους περίπου 5 nm. Προκύπτει πως η συγκεκριμένη μέθοδος σύνθεσης κρυστάλλων υδροξυαπατίτη είναι επιτυχής αφού το σχήμα και οι διαστάσεις των κρυστάλλων που αναπτύχθηκαν είναι παρόμοιες με αυτές που συναντώνται στους κρυστάλλους του υδροξυαπατίτη στο φυσικό οστό. Ωστόσο όπως διαπιστώθηκε από τις παραπάνω φυσικοχημικές αναλύσεις η περίσσεια αργινίνης αυξάνει αισθητά τη διασπορά στις διαστάσεις των κρυστάλλων, μειώνοντας έτσι την ποιότητα όσον αφορά στην ομοιογένεια.

Από το σύνολο των αιωρημάτων υδροξυαπατίτη - χιτοζάνης - L-αργινίνης που εξετάστηκαν με XRD, FTIR και TEM, προέκυψε ότι αυτό με τις βέλτιστες φυσικοχημικές ιδιότητες είναι αυτό που αναπτύχθηκε με τελική μοριακή αναλογία Ca/P = 10/6, αναλογία μαζών HAP/Chit = 70/30, μοριακή αναλογία  $\text{Ca}^{2+}:\text{Arg} = 1:1$  και τελική συγκέντρωση  $\text{H}_3\text{PO}_4$  0,06M (A6-7/3X -R).

## 5.0 Ανάπτυξη ικριωμάτων

Με τα παραχθέντα αιωρήματα Υδροξυαπατίτη επιχειρήθηκε ανάπτυξη υβριδικών ικριωμάτων για τη μελέτη των μηχανικών τους ιδιοτήτων. Στα αιωρήματα αυτά προστέθηκαν πηκτικοί παράγοντες (κομμι τζελάν και ξανθανικό κομμι- κεφ 5.2-) για τη βελτίωση των ιδιοτήτων αυτών. Τα αιωρήματα που επιλέχθηκαν για την παραγωγή των ικριωμάτων με τη μέθοδο της λειωφιλίωσης ήταν αυτά με αναλογία τελική μοριακή αναλογία  $Ca/P = 1/1$ , αναλογία μαζών  $HAp/Chit = 70/30$ , μοριακή αναλογία  $Ca^{2+}:Arg = 1:1$  και τελική συγκέντρωση  $H_3PO_4$  0,06M (A6-7/3X).

### 5.1 Λυοφυλίωση

Η λυοφιλίωση χρησιμοποιείται ως μέθοδος ξήρανσης στη συντήρηση τροφίμων και την παρασκευή φαρμάκων. Το προς ξήρανση δείγμα καταψύχεται και στη συνέχεια τοποθετείται μέσα σε θάλαμο υψηλού κενού. Το παγωμένο νερό εξαχνώνεται αφού προηγουμένως έχει γίνει υψηλό κενό με τη βοήθεια αντλίας κενού.

Αναλυτικότερα, όταν η θερμοκρασία είναι χαμηλότερη από 0 °C, σχηματίζεται καθαρός πάγος στο εσωτερικό του προς ξήρανση δείγματος, ο οποίος μπορεί να εξαχνωθεί με την εφαρμογή του κενού. Η εξαχνωση αρχικά πραγματοποιείται στην επιφάνεια του προϊόντος και βαθμιαία προχωρά προς το εσωτερικό του. Αφού η διαδικασία της κατάψυξης είναι γρήγορη, σχηματίζονται μόνο μικροί κρύσταλλοι πάγου. Η αργή ψύξη θα σχημάτιζε πολύ μεγαλύτερους κρυστάλλους πάγου και θα μπορούσε να καταστρέψει τη δομή του δείγματος, με την είσοδο κρυστάλλων στα κυτταρικά τοιχώματα. Στο στάδιο της εφαρμογής κενού, η χαμηλή πίεση προστατεύει τα παγωμένα δείγματα από το να λιώσουν και επιταχύνει το επόμενο στάδιο της διαδικασίας που είναι το πρωταρχικό στάδιο της ξήρανσης. Η εξαχνωση του πάγου διασφαλίζει ότι η δομή του δείγματος παραμένει ανέπαφη. Κατά τη διάρκεια του πρώτου σταδίου της ξήρανσης, περίπου το 95% του νερού απομακρύνεται από το προϊόν. Τα κυριότερα

μέρη των εργαστηριακών συσκευών λυοφιλίωσης είναι ο θάλαμος κατάψυξης, ο ψυχόμενος συμπυκνωτής, από τον οποίο διέρχονται οι υδρατμοί ενώ παράλληλα παρέχει τη δυνατότητα απομάκρυνσης του σχηματιζόμενου πάγου χωρίς να διακόπτεται το κενό στους θαλάμους, και η αντλία κενού που διατηρεί την πίεση μέσα στο θάλαμο κάτω των 4 mm Hg (Ζουμπούλης και συν., 2009).

Η ιστορία της λυοφιλίωσης ξεκινάει από τους Ίνκας και τους Ινδιάνους που χρησιμοποιούσαν την τεχνική αυτή για να συντηρούν τις πατάτες. Συγκεκριμένα, έφτιαχναν έναν πολτό τον οποίο αφυδάτωναν, εκθέτοντάς τον στο ψύχος και την ελαττωμένη ατμοσφαιρική πίεση που επικρατεί στο μεγάλο υψόμετρο του Περού. Έτσι παρασκεύαζαν μια σκόνη που μπορούσε να συντηρηθεί έως και τέσσερα χρόνια. Στην Ευρώπη, το 1890, ο Altman τοποθέτησε βιολογικούς ιστούς, παγωμένους στους -15 °C, σε ξηραντήρα και στη συνέχεια εφάρμοσε κενό (Couriel, 1980). Η μεγάλη ζήτηση για ευαίσθητα αντιβιοτικά και πλάσμα αίματος τις πρώτες δεκαετίες του 20ου αιώνα, οδήγησε στην εκτεταμένη μελέτη της λυοφιλίωσης και την νάπτυξη της σε βιομηχανική κλίμακα (Adams, 2007). Τα πλεονεκτήματα της λυοφιλίωσης είναι τα εξής (Ratti, 2001; Adams, 2007):

- Διατήρηση των μορφολογικών, βιοχημικών και γενετικών χαρακτηριστικών των κυττάρων.
- Δυνατότητα ξήρανσης μεγάλων ποσοτήτων.
- Συντήρηση της βιωσιμότητας των μικροοργανισμών και της δραστηριότητας των πρωτεϊνών, των πεπτιδίων και των φαρμακευτικών ενεργών ουσιών.
- Ηπιότερες συνθήκες ξήρανσης σε σχέση με άλλες μεθόδους.
- Μικρές πιθανότητες μόλυνσης του δείγματος λόγω της απομάκρυνσης έως και 98% της υγρασίας.

Δυνατότητα γρήγορης και τέλει επανυδάτωσης του δείγματος.

Εκτός από τα παραπάνω πλεονεκτήματα η μέθοδος της λυοφιλίωσης παρουσιάζει και μειονεκτήματα. Το υψηλό κόστος εγκατάστασης και εξοπλισμού, η κατανάλωση μεγάλων ποσών ενέργειας, η πολυπλοκότητα και ο σχετικά μεγάλος χρόνος της διεργασίας περιορίζουν πολλές φορές την εφαρμογή της μεθόδου (Mille et al., 2004).

## 5.2 Πολυσακχαρίτες

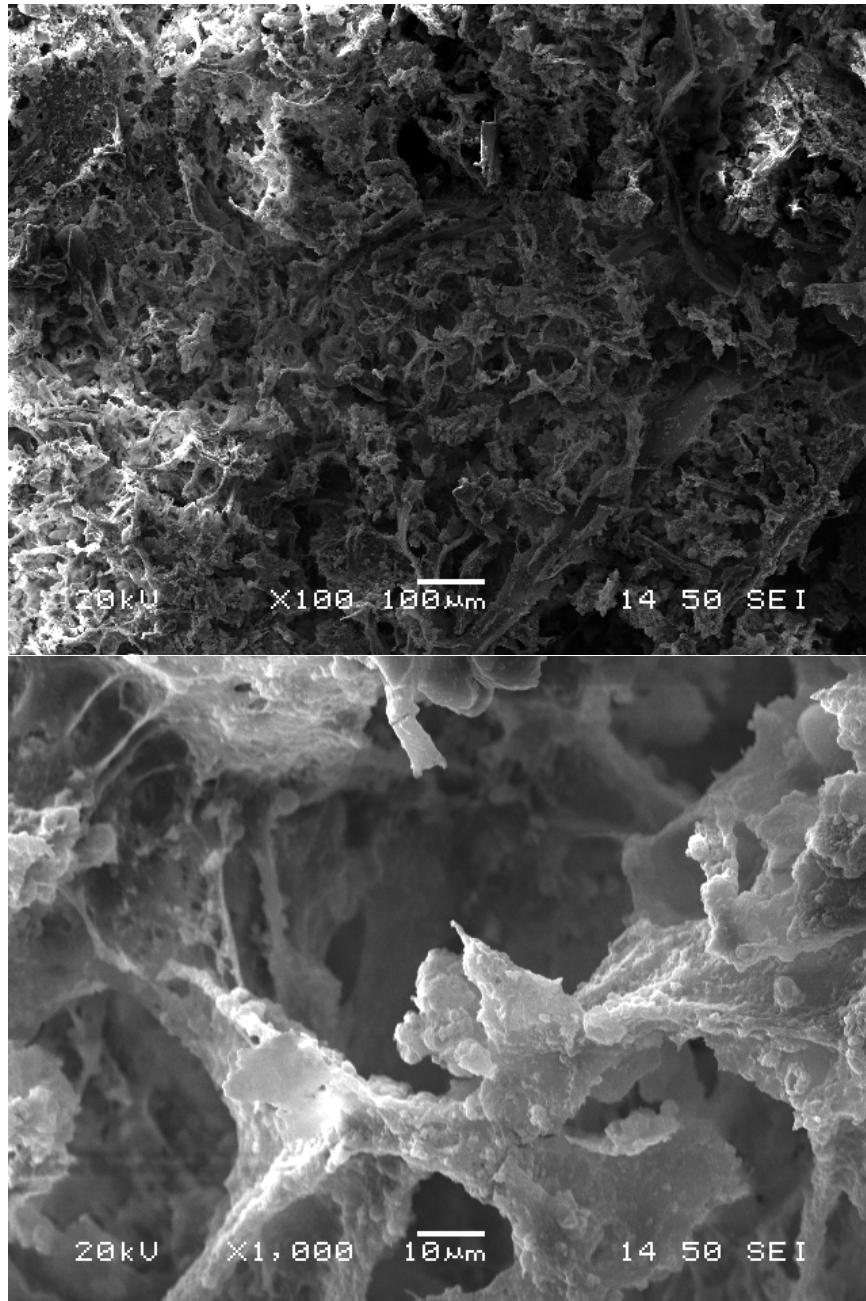
Ο πολυσακχαρίτης , (polysaccharide), είναι ένα μεγάλο μόριο υδατάνθρακα, δηλαδή ένα πολλαπλό σάκχαρο με δομή σαν αλυσίδα ή διακλαδωμένη από πολλές μονάδες μονοσακχαριτών και που ενώνονται μεταξύ τους με αντιδράσεις συμπύκνωσης. Αν και οι περισσότεροι πολυσακχαρίτες έχουν ένα τερματικό μονομερές ως σάκχαρο αναγωγής, αυτό σχηματίζει ένα μικρό μόνο τμήμα του όλου μορίου, με συνέπεια, οι περισσότεροι εξ αυτών να μην ενεργούν ως ζάχαρη αναγωγής.

Οι πολυσακχαρίτες είναι αδιάλυτοι και άγλυκοι και θεωρούνται σημαντικοί είτε ως μόρια αποθήκευσης, είτε ως υλικά ενίσχυσης. Σημαντικότεροι πολυσακχαρίτες είναι το άμυλο, η ιναλίνη και το γλυκογόνο, (χαρακτηριζόμενοι ως αποθηκευτικοί), και η κυτταρίνη (στα φυτά), και η χιτίνη (στα κελύφη των καρκινωδών), (χαρακτηριζόμενοι ως υλικά ενίσχυσης).

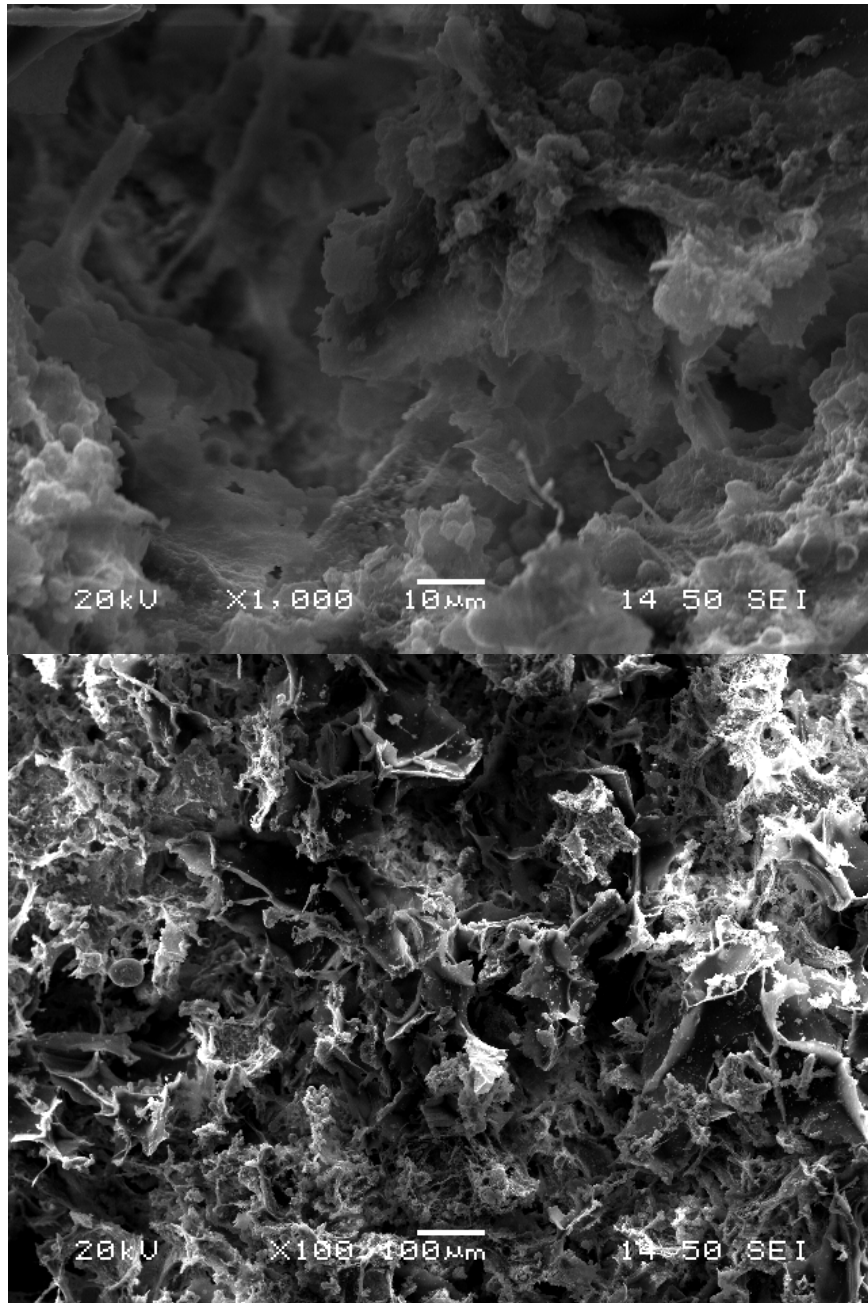
Ειδικότερα παρά το ότι και οι τρεις κύριοι πολυσακχαρίτες: άμυλο, γλυκογόνο και κυτταρίνη δομούνται από το ίδιο μονομερές τη γλυκόζη, διαφέρουν ως προς το μέγεθος, τη μορφή τους στο χώρο, και το βιολογικό τους ρόλο. Η Κυτταρίνη για παράδειγμα σχηματίζει ευθεία αλυσίδα, το άμυλο μια σπειροειδή αλυσίδα, και το γλυκογόνο μια διακλαδωμένη αλυσίδα.

Το ξανθανικό κόμμι και το κόμμι τζελάν (E415 και E418 αντιστοίχως) αποτελούν φυσικούς πηκτικούς παράγοντες και ανήκουν στην ευρύτερη κατηγορία E400-E499 των γαλακτωματοποιητών, στεθεροποιητών και πηκτικών παραγόντων.

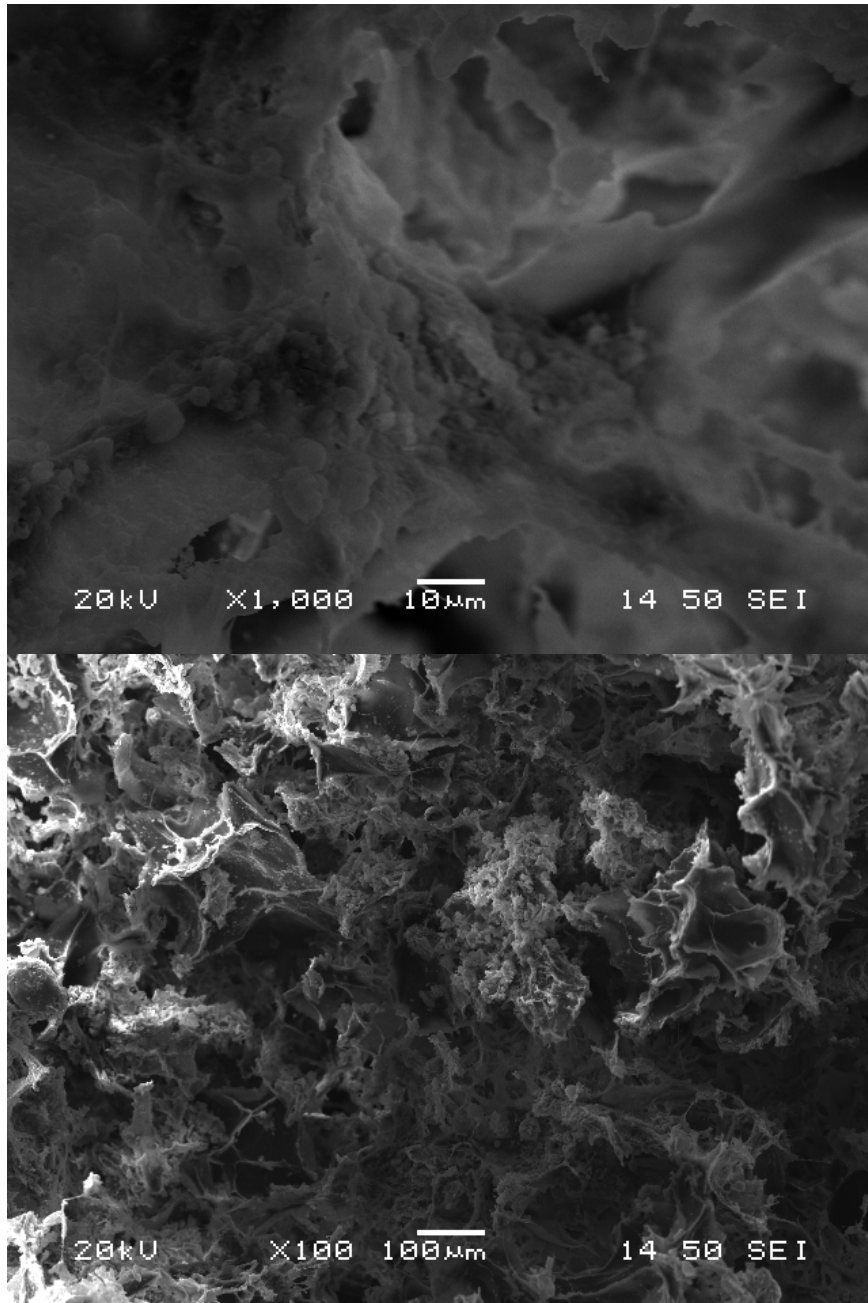
### 5.3 Αποτελέσματα SEM των δειγμάτων μετά τη Λυοφυλίωση



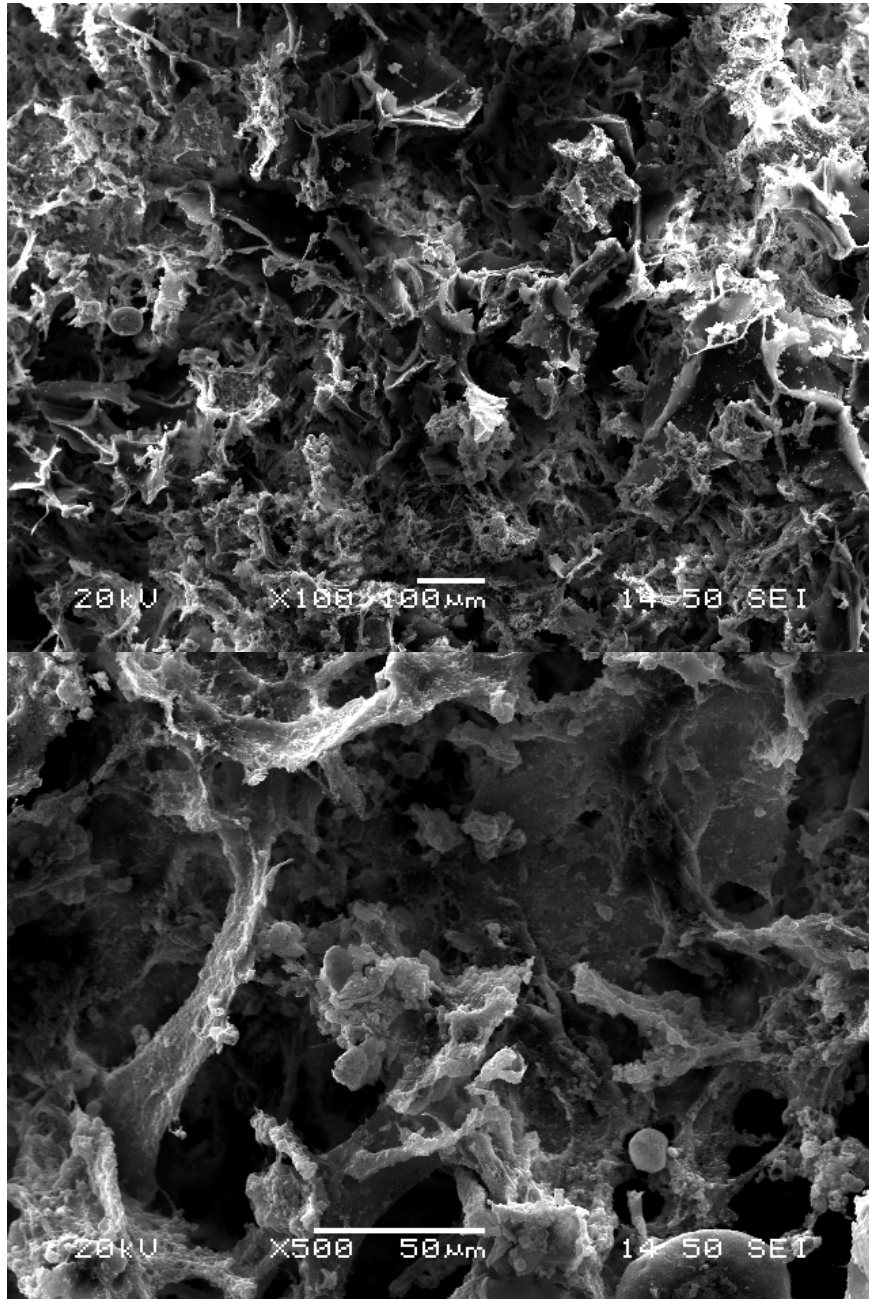
**Σχήμα 5.01.** Εικόνες SEM για δείγμα με αναλογία μαζών HAP/Chit=70/30, αναλογία  $\text{Ca}^{2+}:\text{Arg}=1:1$ , μοριακή αναλογία  $\text{Ca}/\text{P}=1/1$  και συγκέντρωση  $\text{H}_3\text{PO}_4$  0,06M.



**Σχήμα 5.02.** Εικόνες SEM για δείγμα με αναλογία μαζών HAP/Chit=70/30, αναλογία  $\text{Ca}^{2+}:\text{Arg}=1:1$ , μοριακή αναλογία  $\text{Ca}/\text{P}=1/1$  και συγκέντρωση  $\text{H}_3\text{PO}_4$  0,06M με προσθήκη 0.1 g gellan gum



**Σχήμα 5.03.** Εικόνες SEM για δείγμα με αναλογία μαζών HAP/Chit=70/30, αναλογία  $\text{Ca}^{2+}:\text{Arg}=1:1$ , μοριακή αναλογία  $\text{Ca}/\text{P}=1/1$  και συγκέντρωση  $\text{H}_3\text{PO}_4$  0,06M με προσθήκη 0.5 g gellan gum



**Σχήμα 5.04.** Εικόνες SEM για δείγμα με αναλογία μαζών HAP/Chit=70/30, αναλογία  $\text{Ca}^{2+}:\text{Arg}=1:1$ , μοριακή αναλογία  $\text{Ca}/\text{P}=1/1$  και συγκέντρωση  $\text{H}_3\text{PO}_4$  0,06M με προσθήκη 0.1 g xanthan gum



Από τα Σχήματα **5.01-5.04** προκύπτει ότι τα ικρίωματα παρουσιάζουν επιθυμητό πορώδες δίκτυο που κυμαίνεται από τα 30 έως και τα 200 μικρόμετρα, όμοιο με αυτό του φυσικού οστού. Σε όλα τα δείγματα παρατηρήθηκε αρκετά καλό πορώδες δίκτυο, όμως από άποψη μηχανικών αντοχών, σε δοκιμή που έγινε καθαρά με πίεση του χεριού προέκυψε ότι το ικρίωμα με τις καλύτερες μηχανικές ιδιότητες είναι αυτό με το ξανθανικό κόμμι. Παρόλα αυτά τα ικρίωματα είναι ακόμα αρκετά ψαθυρά και χρίζουν περαιτέρω μελέτης.

## 6. Συμπεράσματα

Ο υδροξυαπατίτης είναι ένα από τα βασικότερα ανόργανα συστατικά των οστών. Για το λόγο αυτό πραγματοποιούνται συνεχώς μελέτες για τη χρήση του στην κατασκευή εμφυτευμάτων, οδοντικών και οστικών, τα οποία θα εμφανίζουν τις ίδιες ιδιότητες με αυτές του φυσικού οστού. Μέχρι στιγμής είναι ευρέως διαδεδομένη η χρήση μεταλλικών εμφυτευμάτων υδροξυαπατίτη (Επικάλυψη υδροξυαπατίτη σε Τιτάνιο) κυρίως στην οδοντιατρική (θήκες δοντιών) αλλά και σε οστικές επεμβάσεις όπως είναι η επέμβαση αντικατάστασης ισχύου. Στην τελευταία περίπτωση το μεταλλικό μόσχευμα που εισάγεται στο οστόν, σταθεροποιείται με χρήση τσιμέντου φωσφορικού ασβεστίου CPC (calcium phosphate cement- τσιμέντο φωσφορικών αλάτων)

Στην προκειμένη μελέτη διερευνήθηκαν τρόποι παρασκευής εμφυτευμάτων υδροξυαπατίτη απουσία μετάλλου, εμφυτευμάτων δηλαδή αμιγώς καθαρού υδροξυαπατίτη. Σκοπός είναι παρασκευή αιωρημάτων υδροξυαπατίτη με οργανικά πρόσθετα, τα οποία θα βελτιώσουν τόσο τις φυσικοχημικές όσο και τις μηχανικές ιδιότητες του χημικού υδροξυαπατίτη όσο και την ικανότητα οστεοενσωμάτωσης.

Τα μέχρι στιγμής πειράματα έδειξαν θετικά αποτελέσματα καθότι επιτεύχθηκε η παραγωγική χημικού υδροξυαπατίτη με σύσταση όμοια με αυτή του οστικού και του εμπορικού. Τα παραληφθέντα αιωρήματα υδροξυαπατίτη/πολυμερούς μετά τους φυσικοχημικούς χαρακτηρισμούς τείνουν προς τη σύσταση του φυσικού οστού, κάτι αρκετά θετικό για μελλοντική μελέτη.

Τα πειράματα που έλαβαν χώρα απέδειξαν πως η περίσσεια της αργινίνης εμποδίζει την επιθυμητή κρυστάλλωση του HAp, παρουσιάζοντας περισσότερες άμορφες φάσεις, ενώ η επιθυμητή μορφή είναι ραβδόμορφα επιμήκη πλακίδια. Επίσης η συγκεντρωση 0.1M του H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> δεν προσδίδει κάποια παραπάνω ιδιότητα στο τελικό υλικό όπως φαίνεται και από της φυσικοχημικές αναλύσεις.

Συγκεντρωτικά από τα αποτελέσματα των φυσικοχημικών αναλύσεων XRD, TEM, FTIR προκύπτει πως τα δείγματα με μοριακή αναλογία Ασβεστίου προς φώσφορο 10/6 , αναλογία Υδροξυαπατίτη προς χιτοζάνη 70/30 , ασβέστιο προς αργινίνη 1:1 και τελική συγκέντρωση φωσφορικού οξέος 0.06M παρουσιάζουν τα καλύτερα αποτελέσματα, ελάχιστα καλύτερα από τα αντίστοιχα με μοριακή αναλογία Ca/P 1/1.

Μελλοντικός στόχος είναι η βελτίωση των φυσικοχημικών και μηχανικών ιδιοτήτων του χημικού υδροξυαπατίτη για την παρασκευή των εμφυτευμάτων με τελικό σκοπό την καλύτερη οστεοενσωμάτωση και βιοαποικοδόμηση.

## Βιβλιογραφία

- [1]. C.M. Agrawal, Reconstructing the Human Body Using Biomaterials, JOM, Jan1998, p 31–35
- [2]. M. Long and H.J. Rack, Titanium Alloys<sup>10</sup> / Handbook of Materials for Medical Devices in Total Joint Replacement—A Materials Science Perspective, Biomaterials, Vol19, 1998, p 1621–1639
- [3]. D. Williams, An Introduction to Medical and Dental Materials, Concise Encyclopedia of Medical & Dental Materials, D.Williams, Ed., Pergamon Press and The MIT Press, 1990, p xvii–xx
- [4]. D. Dowson, Friction and Wear of Medical Implants and Prosthetic Devices, Friction, Lubrication, and Wear Technology, Vol 18, ASM Handbook, ASM International, 1992, p 656–664
- [5]. P. Didisheim and J.T. Watson, Cardiovascular Applications, Biomaterials Science: An Introduction to Materials in Medicine, B.D. Ratner, A.S. Hoffman, F.J. Schoen, and J.E. Lemons, Ed., Academic Press, 1996, p 283–297
- [6]. Biomaterials lecture on [www.u.arizona.edu](http://www.u.arizona.edu/~trouard/courses/bme516/biomater_lec1.pdf) ([http://www.u.arizona.edu/~trouard/courses/bme516/biomater\\_lec1.pdf](http://www.u.arizona.edu/~trouard/courses/bme516/biomater_lec1.pdf))
- [7] Οστά και Σκελετικό Σύστημα  
<http://www.lib.teiher.gr/webnotes/seyp/anatomycourse/anatomy2.pdf>
- [8] BONE STRUCTURE AND FUNCTION IN NORMAL AND DISEASE STATES- Philip Sambrook (<http://www.medicaltextbooksrevealed.com/files/11200-53.pdf>)
- [9] Ο πιθανός ρόλος ορμονών του λιπώδους ιστού (λεπτίνης & αντιπονεκτίνης) στην οστεοπενία περιεμμηνοπαυσιακών γυναικών- Διδακτορική διατριβή-Μερόπη Κοντογιάννη 2004, σελ 3-10
- [10] Δ. Μπρασινίκα Ανάπτυξη σύνθετων επικαλύψεων νανο-υδροξυαπατίτη (HA)/βιοπολυμερών και μελέτη των νανομηχανικών ιδιοτήτων τους. Αθήνα 2008 (επιβλ.καθ. Κ. Χαριτίδης)
- [11] Holmes RE, Bucholz RW, Mooney V. Porous hydroxyapatite as a bone-graft substitute in metaphyseal defects. J Bone Joint Surg

1986;68:904–911.

[12]. Jarcho M. Calcium phosphate ceramics as hard tissue prosthetics. *ClinOrthop* 1981;157:259–278.

[13]. Ogiso M. Reassessment of long-term use of dense HA as dental implant: case report. *J Biomed Mater Res* 1998;43:318–320.

[14]. Hench LL. Bioceramics: from concept to clinic. *J Am Ceram Soc* 1991;74(7):1487–1510.

[15]. Zhang R, Ma PX. Poly(γ-hydroxyl acids)/hydroxyapatite porous composites for bone-tissue engineering. I. Preparation and morphology. *J Biomed Mater Res* 1999;44:446–455.

[16]. Molly M. Stevens, *Biomaterials for bone tissue engineering*, May 2008

Allison A. Campbell, *Bioceramics for implant coatings*, November 2003

[17]. El. Feki, J.M Savariault, A. Ben Salah, Structure refinements by the Rietveld method of partially substituted hydroxyapatite, 1999

[18]. R.N Correia, M.C.F Magalhaes, P.A.A.P Marques, A.M.R Senos, Wet synthesis and characterization of modified hydroxyapatite powders, 1996

[19]. Ishihara K, Arai H, Nakabayashi N, Morita S, Furuya K. Adhesive bone cement containing hydroxyapatite particle as bone compatible filler. *J Biomed Mater Res* 1992;26:937–945.

[20] Li BQ, Hu QL, Qian XZ, Fang ZP, Shen JC. Bioabsorbable chitosan/hydroxyapatite composite rod for internal fixation of bone fracture prepared by in situ precipitation. *Acta Polym Sin* 2002;6:828–33.

[21] Yin Y, Ye F, Chu J, Zhang F, Li X, Yao K. Preparation characterization of macroporous chitosan-gelatin/b-tricalcium phosphate composite scaffolds for bone tissue. *J Biomed Mater Res* 2003;67A:844–55.

[22] Takahashi Y, Yamamoto M, Tabata Y. Osteogenic differentiation of mesenchymal stem cells in biodegradable sponges composed of gelatin and b-tricalcium phosphate. *Biomaterials* 2005;26:3587–96.

[23] Zhang Y, Zhang M. Three-dimensional macroporous calcium phosphate bioceramics with nested chitosan sponges for load-bearing bone implants. *J Biomed Mater Res* 2002;61:1–8.

[24] Zhang Y, Zhang M. Cell growth and function on calcium phosphate reinforced chitosan scaffolds. *J Mater Sci Mater Med* 2004;15(3):255–60.

[25] Xu HH, Simon CG. Fast setting calcium phosphate–chitosan scaffold: mechanical properties and biocompatibility. *Biomaterials* 2005;26:1337–48.

- [26] Sendemir-Urkmez A, Jamison RD. The addition of biphasic calcium phosphate to produce chitosan scaffolds enhances bone tissue development in vitro. *J Biomed Mater Res* 2007;81A(3):624–33.
- [27] Chesnutt BM, Viano AM, Yuan Y, Yang Y, Guda T, Appleford MR, Ong JL, Haggard WO, Bumgardner JD. Design and characterization of a novel chitosan/nanocrystalline calcium phosphate composite scaffold for bone regeneration. *J Biomed Mater Res A* 2008;February 27:23
- [28] Zhang Y, Zhang M. Synthesis and characterization of macroporous chitosan/calcium phosphate composite scaffolds for tissue engineering. *J Biomed Mater Res* 2001;55(3):304–12.
- [29] Liu H, Mao J, Yao K, Yang G, Cui L, Cao Y. A study on a chitosan-gelatin, hyaluronic acid scaffold as artificial skin in vitro and its tissue engineering applications. *J BiomaterSciPolym Ed* 2004;15:25–40
- [30]. Barbul, A. (1986) Arginine: biochemistry, physiology, and therapeutic implications. *JPEN* 10: 227–238.
- [31]. Visek, W. J. (1986) Arginine needs, physiological state and usual diets. A reevaluation. *J. Nutr.* 116: 36–46.
- [32]. Beaumier, L., Castillo, L., Yu, Y.-M., Ajami, A. M. & Young, V. R. (1996) Arginine: New and exciting developments for an “old” amino acid. *Biomed. Environ. Sci.* 9: 296–315.
- [33]. Abumrad, N. N. & Barbul, A. (2004) The use of arginine in clinical practice. In: *Metabolic and Therapeutic Aspects of Amino Acids in Clinical Nutrition* (Cynober, L. A., ed.), pp. 595–611. CRC Press, Boca Raton, FL.
- [34]. Wu, G. & Morris, S. M., Jr. (1998) Arginine metabolism: nitric oxide and beyond. *Biochem. J.* 336: 1–17.
- [35]. Morris, S. M., Jr. (2002) Regulation of enzymes of the urea cycle and arginine metabolism. *Annu. Rev. Nutr.* 22: 87–105.
- [36]. Wu, G. & Morris, S. M., Jr. (2004) Arginine metabolism in mammals. In: *Metabolic and Therapeutic Aspects of Amino Acids in Clinical Nutrition* (Cynober, L. A., ed.), pp. 153–167. CRC Press, Boca Raton, FL.
- [37]. Morris, S. M., Jr. (2004) Recent advances in arginine metabolism. *Curr. Opin. Clin. Nutr. Metab. Care* 7: 45–51.
- [38] R. W. James, *The Optical Principles of X-Rays*, G. Bell, London, 1954
- [39] M. J. Buerger, *X-Ray Crystallography*, John Wiley, New York, 1942

- [40] G. H Stout and L.H. Jensen, X-Ray Structure Determination, Macmilan, New York, 1968
- [41] M. M. Woolfson, An Introduction to X-Ray Crystallography, Cambridge Univ.
- [42] E. W. Pienaar, M. R. Caira and A. P. Lötter, J. Cryst. Spect. Res., 23, 785 (1993)
- [43] E. W. Pienaar, M. R. Caira and A. P. Lötter, J. Cryst. Spect. Res., 23, 739 (1993)
- [44] J. J. Gerber, M. R. Caira and A. P. Lötter, J. Cryst. Spect. Res., 23, 863 (1993)
- [45] R. Suryanarayanan, "X-Ray Powder Diffractometry", Chapter 7 in Physical Characterization of Pharmaceutical Solids (H. G. Brittain, ed.) Marcel Dekker, New York, 1995, pp. 199-216
- [46] [http://www.semfe.gr/files/users/413/meuodoi\\_xarakthrismou\\_ylikwn\\_ask4\\_2010.pdf](http://www.semfe.gr/files/users/413/meuodoi_xarakthrismou_ylikwn_ask4_2010.pdf)
- [47] [http://www.optics-vision.gr/files/items/2/26/tsiapa\\_eirini\\_2008.pdf](http://www.optics-vision.gr/files/items/2/26/tsiapa_eirini_2008.pdf)
- [48] [http://www.physics.ntua.gr/~micronano/ERG%20TEXNIKES/Simeioseis\\_TEM.pdf](http://www.physics.ntua.gr/~micronano/ERG%20TEXNIKES/Simeioseis_TEM.pdf)
- [49] <http://www.aua.gr/fasseas/electron%20microscopes.htm>