



ΕΛΛΗΝΙΚΗ ΔΗΜΟΚΡΑΤΙΑ
ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΙΩΑΝΝΙΝΩΝ
ΠΟΛΥΤΕΧΝΙΚΗ ΣΧΟΛΗ
ΤΜΗΜΑ ΜΗΧΑΝΙΚΩΝ ΕΠΙΣΤΗΜΗΣ ΥΛΙΚΩΝ

**Ανάπτυξη και Χαρακτηρισμός Ικτριωμάτων Πολυμερικών Υδροπηκτών για
Βιοϊατρικές Εφαρμογές**

Ανδρέας Καρύδης-Μεσσήνης

Διδακτορική Διατριβή

Ιωάννινα, 2021

Το έργο συγχρηματοδοτείται από την Ελλάδα και την Ευρωπαϊκή Ένωση (Ευρωπαϊκό Κοινωνικό Ταμείο) μέσω του Επιχειρησιακού Προγράμματος «Ανάπτυξη Ανθρώπινου Δυναμικού, Εκπαίδευση και Διά Βίου Μάθηση», στο πλαίσιο της Πράξης «Ενίσχυση του ανθρώπινου ερευνητικού δυναμικού μέσω της υλοποίησης διδακτορικής έρευνας» (MIS-5000432), που υλοποιεί το Τδρμα Κρατικών Υποτροφιών (ΙΚΥ).



**Επιχειρησιακό Πρόγραμμα
Ανάπτυξη Ανθρώπινου Δυναμικού,
Εκπαίδευση και Διά Βίου Μάθηση**
Με τη συγχρηματοδότηση της Ελλάδας και της Ευρωπαϊκής Ένωσης





**ΕΛΛΗΝΙΚΗ ΔΗΜΟΚΡΑΤΙΑ
ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΙΩΑΝΝΙΝΩΝ
ΠΟΛΥΤΕΧΝΙΚΗ ΣΧΟΛΗ
ΤΜΗΜΑ ΜΗΧΑΝΙΚΩΝ ΕΠΙΣΤΗΜΗΣ ΥΛΙΚΩΝ**

**Ανάπτυξη και Χαρακτηρισμός Ικριωμάτων Πολυμερικών Υδροπηκτών για
Βιοϊατρικές Εφαρμογές**

Ανδρέας Καρύδης-Μεσσήνης

Διδακτορική Διατριβή

Ιωάννινα, 2021

Το έργο συγχρηματοδοτείται από την Ελλάδα και την Ευρωπαϊκή Ένωση (Ευρωπαϊκό Κοινωνικό Ταμείο) μέσω του Επιχειρησιακού Προγράμματος «Ανάπτυξη Ανθρώπινου Δυναμικού, Εκπαίδευση και Διά Βίου Μάθηση», στο πλαίσιο της Πράξης «Ενίσχυση του ανθρώπινου ερευνητικού δυναμικού μέσω της υλοποίησης διδακτορικής έρευνας» (MIS-5000432), που υλοποιεί το Τόρμα Κρατικών Υποτροφιών (ΙΚΥ).



**Επιχειρησιακό Πρόγραμμα
Ανάπτυξη Ανθρώπινου Δυναμικού,
Εκπαίδευση και Διά Βίου Μάθηση**

Με τη συγχρηματοδότηση της Ελλάδας και της Ευρωπαϊκής Ένωσης



«Η έγκριση της διδακτορικής διατριβής από το Τμήμα Μηχανικών Επιστήμης Υλικών της Πολυτεχνικής Σχολής του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων δεν υποδηλώνει αποδοχή των γνωμών του συγγραφέα Ν. 5343/32, άρθρο 202, παράγραφος 2».

Ημερομηνία αίτησης του κ. Καρύδη-Μεσσήνη Ανδρέα: 12/01/2018

Ημερομηνία ορισμού Τριμελούς Συμβουλευτικής Επιτροπής: 31/01/2018

Μέλη Τριμελούς Συμβουλευτικής Επιτροπής:

Επιβλέπων

Νικόλαος Ζαφειρόπουλος, Καθηγητής του Τμήματος Μηχανικών Επιστήμης Υλικών, της Πολυτεχνικής Σχολής του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων.

Μέλη

Απόστολος Αυγερόπουλος, Καθηγητής του Τμήματος Μηχανικών Επιστήμης Υλικών, της Πολυτεχνικής Σχολής του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων

Δημήτριος Φωτιάδης, Καθηγητής του Τμήματος Μηχανικών Επιστήμης Υλικών, της Πολυτεχνικής Σχολής του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων.

Ημερομηνία ορισμού θέματος: 31/01/2018

«Ανάπτυξη και Χαρακτηρισμός Ικριωμάτων Πολυμερικών Υδροπηκτών για Βιοϊατρικές Εφαρμογές».

ΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΕΠΤΑΜΕΛΟΥΣ ΕΞΕΤΑΣΤΙΚΗΣ ΕΠΙΤΡΟΠΗΣ: 21/04/2021

- **Νικόλαος Ζαφειρόπουλος**, Καθηγητής του Τμήματος Μηχανικών Επιστήμης Υλικών, της Πολυτεχνικής Σχολής του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων.
- **Απόστολος Αυγερόπουλος**, Καθηγητής του Τμήματος Μηχανικών Επιστήμης Υλικών, της Πολυτεχνικής Σχολής του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων.
- **Δημήτριος Φωτιάδης**, Καθηγητής του Τμήματος Μηχανικών Επιστήμης Υλικών, της Πολυτεχνικής Σχολής του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων.
- **Νεκταρία-Μαριάνθη Μπάρκουλα**, Καθηγήτρια του Τμήματος Μηχανικών Επιστήμης Υλικών, της Πολυτεχνικής Σχολής του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων.
- **Κωνσταντίνος Σαλμάς**, Επίκουρος Καθηγητής του Τμήματος Μηχανικών Επιστήμης Υλικών, της Πολυτεχνικής Σχολής του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων.
- **Άρης Γιαννακάς**, Επίκουρος Καθηγητής του Τμήματος Επιστήμης και Τεχνολογίας Τροφίμων, της Σχολής Γεωπονικών Επιστημών του Πανεπιστημίου Πατρών.
- **Κωνσταντίνος Λάσιος**, Επίκουρος Καθηγητής του Τμήματος Χημικών Μηχανικών, της Πολυτεχνικής Σχολής του Πανεπιστημίου Πατρών.

Έγκριση Διδακτορικής Διατριβής με βαθμό «ΑΡΙΣΤΑ» στις 12 Νοεμβρίου 2021

Ο Πρόεδρος του Τμήματος

Η Γραμματέας του Τμήματος

Απόστολος Αυγερόπουλος

Μαρία Κόντου

Καθηγητής

Στον Αλέξανδρο, για όσα ζήσαμε...

*The grass was greener
The light was brighter
When friends surrounded
The nights of wonder*

Pink Floyd, 1994

Στην οικογένεια μου.

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Η διδακτορική διατριβή εκπονήθηκε στο Εργαστήριο Επιστήμης και Τεχνολογίας Πολυμερών (ΦΕΚ ίδρυσης Εργαστηρίου: τ.Β', 254/10-02-2016), του Τμήματος Μηχανικών Επιστήμης Υλικών της Πολυτεχνικής Σχολής του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων, ενώ υποστηρίχθηκε οικονομικά από το Ίδρυμα Κρατικών Υποτροφιών (ΙΚΥ) (MIS 5000432).

Αρχικά, θα ήθελα να ευχαριστήσω τον επιβλέποντα καθηγητή μου, Καθηγητή Νικόλαο Ζαφειρόπουλο, για την ανάθεση του θέματος και για την εμπιστοσύνη που επέδειξε στο πρόσωπό μου. Ήταν εκεί στις δυσκολίες της διατριβής στηρίζοντας με ηθικά και επιστημονικά, βοηθώντας με να μη χάσω τον δρόμο μου. Θέλω όμως ακόμη περισσότερο να τον ευχαριστήσω που αρκετές φορές μου επέτρεψε να αυτενεργήσω, δίνοντας μου τη δυνατότητα να πειραματιστώ σε διάφορους επιστημονικούς τομείς. Σας ευχαριστώ πολύ για όλες τις ευκαιρίες που μου δώσατε τα χρόνια αυτά!

Ένα τεράστιο ευχαριστώ οφείλω στον Καθηγητή Απόστολο Αυγερόπουλο, που με στήριξε ποικιλοτρόπως όλα αυτά τα χρόνια και για τις ευκαιρίες που μου έδωσε. Σας ευχαριστώ πολύ για την άψογη συνεργασία, τον άμεσο εγκλιματισμό μου στο χώρο του εργαστηρίου και την πολύτιμη βοήθεια που μου παρείχατε.

Ευχαριστώ πολύ τον Καθηγητή Δημήτριο Φωτιάδη που μου έκανε την τιμή να συνεπιβλέψει την παρούσα διδακτορική διατριβή.

Ευχαριστώ θερμά την Καθηγήτρια Νεκταρία-Μαριάνθη Μπάρκουλα για τις συμβουλές, την υποστήριξη και την άψογη συνεργασία μας. Σας ευχαριστώ πολύ, η στήριξή σας ήταν πολύτιμη.

Ευχαριστώ πολύ τους Επίκουρους Καθηγητές, Κωνσταντίνο Σαλμά και Άρη Γιαννακά τόσο για τη συνεργασία μας, αλλά και τις γνώσεις που μου μετέφεραν ήδη από τα χρόνια της προπτυχιακής φοίτησής στο Τμήμα Διαχείρισης Περιβάλλοντος και Φυσικών Πόρων.

Θέλω επίσης να ευχαριστήσω τον Επίκουρο Καθηγητή, Κωνσταντίνο Δάσιο για την προθυμία που επέδειξε για οποιαδήποτε βοήθεια και για τη συμμετοχή του στην επταμελή εξεταστική επιτροπή.

Ευχαριστώ θερμά το μέλος ΕΔΠΠ, Μαρία Καράμπελα για τη στήριξη της όλα αυτά τα χρόνια.

Ένα μεγάλο ευχαριστώ στο μεταδιδακτορικό ερευνητή, Αναστάσιο Βασιλειάδη και την μεταδιδακτορική ερευνήτρια, Μαρία Μάρκου για την εκπόνηση των μελετών αντιμικροβιακής δράσης και κυτταροτοξικότητας αντίστοιχα. Θέλω να ευχαριστήσω τη διδάκτορα Χριστίνα Γιώτη και τον υποψήφιο διδάκτορα Γιώργο Ασημακόπουλο για τις μετρήσεις θερμικής-σταθμικής ανάλυσης καθώς επίσης και το μεταδιδακτορικό ερευνητή Κωνσταντίνο Βασιλόπουλο για την πραγματοποίηση των μετρήσεων φασματοσκοπίας FT-IR. Ένα μεγάλο ευχαριστώ στο Χρήστο Δρούγκα (ΕΤΕΠ) για την βοήθεια του, σε ότι χρειάστηκα. Ευχαριστώ τους υποψήφιους διδάκτορες Γκρέτη, Γιάννη, Γιώργο και Κώστα, μέλη του εργαστηρίου Επιστήμης και Τεχνολογίας Πολυμερών για το καλό κλίμα και τη συνεργασία και ιδιαίτερα τον μεταδιδακτορικό ερευνητή και φίλο Δημήτριο Μοσχόβα για την αμέριστη συμπαράσταση του όλα αυτά τα χρόνια. Θέλω επίσης να ευχαριστήσω το διδάκτορα και φίλο Νικόλαο Χαλμπέ που μοιραστήκαμε προβληματισμούς, αντιμετωπίσαμε τις δυσκολίες της διατριβής και την Πέπη που με αντέχει.

Κλείνοντας, θέλω να ευχαριστήσω την οικογένεια μου για τη στήριξη σε όλα τα στάδια της ζωής μου.

Περιεχόμενα

ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΠΙΝΑΚΩΝ	1
ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΣΧΗΜΑΤΩΝ	2
ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΣΥΝΤΟΜΟΓΡΑΦΙΩΝ.....	9
ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΣΥΝΤΟΜΟΓΡΑΦΙΩΝ ΥΛΙΚΩΝ	10
ΠΕΡΙΛΗΨΗ.....	12
ΑΒSTRACT.....	13
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ/ΣΚΟΠΟΣ.....	14
Κίνητρο	14
Σκοπός της διατριβής	14
Δομή της διατριβής	15
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2. ΔΕΡΜΑ ΚΑΙ ΕΠΙΘΕΜΑΤΑ ΕΠΟΥΛΩΣΗΣ ΤΡΑΥΜΑΤΩΝ	17
2.1. ΔΕΡΜΑ	17
2.2. ΜΗΧΑΝΙΣΜΟΣ ΕΠΟΥΛΩΣΗΣ ΤΡΑΥΜΑΤΩΝ.....	18
2.3. ΑΝΑΓΚΗ ΓΙΑ ΕΠΙΘΕΜΑΤΑ ΕΠΟΥΛΩΣΗΣ ΤΡΑΥΜΑΤΩΝ	20
2.3.1. Επιθέματα επούλωσης τραυμάτων	21
2.3.1.1. Αρχαία χρόνια.....	21
2.3.1.2. Νέα εποχή	21
2.4. ΤΑΞΙΝΟΜΗΣΗ ΕΠΙΘΕΜΑΤΩΝ ΕΠΟΥΛΩΣΗΣ ΤΡΑΥΜΑΤΩΝ.....	22
2.4.1. Παραδοσιακά επιθέματα.....	22
2.4.2. Βιολογικά επιθέματα.....	23
2.4.3. Τεχνητά επιθέματα.....	23
2.5. ΙΔΑΝΙΚΑ ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΤΙΚΑ ΕΠΙΘΕΜΑΤΩΝ ΤΡΑΥΜΑΤΩΝ.....	24
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3. ΥΔΡΟΠΗΚΤΕΣ.....	28
3.1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ.....	28
3.2. ΒΙΟΪΑΤΡΙΚΕΣ ΕΦΑΡΜΟΓΕΣ ΥΔΡΟΠΗΚΤΩΝ.....	29
3.3. ΥΔΡΟΠΗΚΤΕΣ ΑΠΟΤΕΛΟΥΜΕΝΕΣ ΑΠΟ ΦΥΣΙΚΑ ΚΑΙ ΣΥΝΘΕΤΙΚΑ ΠΟΛΥΜΕΡΗ - ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΚΗ ΑΝΑΣΚΟΠΗΣΗ	34
3.3.1. Φυσικά πολυμερή	34
3.3.1.1. Ζελατίνη	34
3.3.1.2. Χιτοζάνη	35
3.3.1.3. Κολλαγόνο.....	37
3.3.1.4. Αλγινικό οξύ και αλγινικό νάτριο	38
3.3.1.5. Άμυλο και παράγωγα.....	39

3.3.1.6.	Δεξτράνη.....	39
3.3.1.7.	Γλυκάνη.....	40
3.3.1.8.	Πολυ-N-ακετυλο γλυκοζαμίνη.....	40
3.3.1.9.	Υαλουρονικό οξύ.....	41
3.3.1.10.	Βακτηριακή κυτταρίνη.....	41
3.3.1.11.	Κερατίνη.....	41
3.3.1.12.	Μετάξι.....	42
3.3.2.	Συνθετικά πολυμερή.....	42
3.3.2.1.	Πολυαιθυλενογλυκόλη.....	42
3.3.2.2.	Πολυκαπρολακτόνη.....	43
3.4.	ΜΕΘΟΔΟΙ ΔΗΜΙΟΥΡΓΙΑΣ ΣΤΑΥΡΟΔΕΣΜΩΝ ΣΤΙΣ ΥΔΡΟΠΗΚΤΕΣ..	44
3.4.1.	Φυσική δημιουργία σταυροδεσμών.....	45
3.4.1.1.	Δεσμοί υδρογόνου μεταξύ των αλυσίδων.....	45
3.4.1.2.	Ιοντικές αλληλεπιδράσεις.....	46
3.4.1.3.	Κρυστάλλωση.....	47
3.4.1.4.	Υδρόφοβες αλληλεπιδράσεις.....	48
3.4.1.5.	Δημιουργία σταυροδεσμών μέσω αφυδάτωσης.....	48
3.4.2.	Χημική δημιουργία σταυροδεσμών.....	49
3.4.2.1.	Δημιουργία σταυροδεσμών με χημικές αντιδράσεις των συμπληρωματικών ομάδων.....	49
3.4.2.2.	Δημιουργία σταυροδεσμών μέσω ακτινοβολίας.....	50
3.4.2.3.	Δημιουργία σταυροδεσμών με χρήση ενζύμων.....	51
3.5	ΕΠΙΛΟΓΗ ΤΩΝ ΦΥΣΙΚΩΝ ΠΟΛΥΜΕΡΩΝ ΓΙΑ ΤΗΝ ΑΝΑΠΤΥΞΗ ΤΩΝ ΥΛΙΚΩΝ ΤΗΣ ΠΑΡΟΥΣΗΣ ΔΙΑΤΡΙΒΗΣ.....	52
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 4. ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΕΣ ΤΕΧΝΙΚΕΣ ΕΝΟΡΓΑΝΗΣ ΑΝΑΛΥΣΗΣ.....		53
4.1.	ΦΑΣΜΑΤΟΣΚΟΠΙΑ FT-IR.....	53
4.2.	ΠΕΡΙΘΛΑΣΗ ΑΚΤΙΝΩΝ -X (XRD).....	53
4.3.	ΘΕΡΜΙΚΗ ΣΤΑΘΜΙΚΗ ΑΝΑΛΥΣΗ (TGA).....	55
4.4.	ΔΥΝΑΜΙΚΗ ΜΗΧΑΝΙΚΗ ΑΝΑΛΥΣΗ (DMA).....	55
4.5.	ΗΛΕΚΤΡΟΝΙΚΗ ΜΙΚΡΟΣΚΟΠΙΑ ΣΑΡΩΣΗΣ (SEM).....	57
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 5. ΑΝΑΠΤΥΞΗ ΚΑΙ ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΜΟΣ ΥΔΡΟΠΗΚΤΩΝ ΧΙΤΟΖΑΝΗΣ (Chi)-ΖΕΛΑΤΙΝΗΣ ΙΧΘΥΩΝ (FG).....		58
5.1	ΕΙΣΑΓΩΓΗ.....	58
5.2.	ΣΥΝΘΕΣΗ ΥΔΡΟΠΗΚΤΩΝ ΧΙΤΟΖΑΝΗΣ-ΖΕΛΑΤΙΝΗΣ ΙΧΘΥΩΝ.....	59
5.2.1.	Αντιδραστήρια.....	59

5.2.2. Περιγραφή της συνθετικής πορείας.....	60
5.2.2.1 Σύνθεση της υδροπηκτής Chi ₅₀ FG ₅₀	60
5.2.2.2. Μηχανισμός σχηματισμού υδροπηκτής.....	61
5.3 ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΜΟΣ ΥΔΡΟΠΗΚΤΩΝ ΧΙΤΟΖΑΝΗΣ (Chi)-ΖΕΛΑΤΙΝΗΣ ΙΧΘΥΩΝ (FG)	63
5.3.1. Φασματοσκοπία FT-IR.....	63
5.3.1.1. Πειραματική διαδικασία	63
5.3.1.2. Αποτελέσματα και συζήτηση.....	63
5.3.2. Περίθλαση Ακτίνων -X (XRD)	65
5.3.2.1. Πειραματική διαδικασία	65
5.3.2.2. Αποτελέσματα και συζήτηση.....	65
5.3.3. Θερμική Σταθμική Ανάλυση (TGA)	66
5.3.3.1. Πειραματική διαδικασία	66
5.3.3.2. Αποτελέσματα και συζήτηση.....	67
5.3.4. Δυναμική Μηχανική Ανάλυση (DMA)	68
5.3.4.1. Πειραματική διαδικασία	68
5.3.4.2. Αποτελέσματα και συζήτηση.....	68
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 6. ΑΝΑΠΤΥΞΗ ΚΑΙ ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΜΟΣ ΥΔΡΟΠΗΚΤΩΝ ΧΙΤΟΖΑΝΗΣ (Chi)-ΖΕΛΑΤΙΝΗΣ ΙΧΘΥΩΝ (FG) -ΓΛΥΚΕΡΟΛΗΣ (Gly).....	71
6.1 ΕΙΣΑΓΩΓΗ.....	71
6.2 ΣΥΝΘΕΣΗ ΤΩΝ ΥΔΡΟΠΗΚΤΩΝ	73
6.2.1. Αντιδραστήρια.....	73
6.2.2. Περιγραφή της συνθετικής πορείας.....	74
6.2.2.1. Σύνθεση της υδροπηκτής Chi ₃₀ FG ₃₀ Gly ₄₀	74
6.2.2.2. Μηχανισμός σχηματισμού υδροπηκτών	77
6.3. ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΜΟΣ ΥΔΡΟΠΗΚΤΩΝ ΧΙΤΟΖΑΝΗΣ (Chi)-ΖΕΛΑΤΙΝΗΣ ΙΧΘΥΩΝ (FG) -ΓΛΥΚΕΡΟΛΗΣ (Gly)	78
6.3.1. Φασματοσκοπία FT-IR.....	78
6.3.1.1. Πειραματική διαδικασία	78
6.3.1.2. Αποτελέσματα και συζήτηση.....	79
6.3.2. Περίθλαση Ακτίνων-X (XRD)	81
6.3.2.1. Πειραματική διαδικασία	81
6.3.2.2. Αποτελέσματα και συζήτηση.....	82
6.3.3. Θερμική Σταθμική Ανάλυση (TGA)	83
6.3.3.1. Πειραματική διαδικασία	83

6.3.3.2. Αποτελέσματα και συζήτηση.....	84
6.3.4. Δυναμική Μηχανική Ανάλυση (DMA).....	85
6.3.4.1. Πειραματική διαδικασία	85
6.3.4.2. Αποτελέσματα και συζήτηση.....	85
6.3.4.2.1. Υλικά Α' ομάδας	85
6.3.4.2.2. Υλικά Β' ομάδας	90
6.3.5. Ηλεκτρονική μικροσκοπία σάρωσης (SEM).....	93
6.3.5.1. Πειραματική διαδικασία	93
6.3.5.2. Αποτελέσματα και συζήτηση.....	93
6.3.6. Μελέτη απορρόφησης νερού.....	95
6.3.6.1. Πειραματική διαδικασία	95
6.3.6.2. Αποτελέσματα και συζήτηση.....	96
6.3.7. Μελέτη ρυθμού αποδόμησης.....	98
6.3.7.1. Πειραματική διαδικασία	98
6.3.7.2. Αποτελέσματα και συζήτηση.....	98
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 7. ΑΝΑΠΤΥΞΗ ΚΑΙ ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΜΟΣ ΧΙΤΟΖΑΝΗΣ (Chi) - ΖΕΛΑΤΙΝΗΣ ΙΧΘΥΩΝ (FG) - ΓΛΥΚΕΡΟΛΗΣ (Gly) ΥΣΤΕΡΑ ΑΠΟ ΘΕΡΜΙΚΗ ΚΑΤΕΡΓΑΣΙΑ (TH).....	102
7.1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ	102
7.2. ΣΥΝΘΕΣΗ ΥΔΡΟΠΗΚΤΗΣ Chi ₁₅ FG ₅₀ Gly ₃₅ (TH).....	103
7.2.1. Αντιδραστήρια.....	103
7.2.2. Περιγραφή της συνθετικής διαδικασίας.....	103
7.2.3. Μηχανισμός σχηματισμού υδροπηκτής	105
7.3. ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΜΟΣ ΥΔΡΟΠΗΚΤΗΣ ΧΙΤΟΖΑΝΗΣ (Chi) - ΖΕΛΑΤΙΝΗΣ ΙΧΘΥΩΝ (FG) - ΓΛΥΚΕΡΟΛΗΣ (Gly) ΥΣΤΕΡΑ ΑΠΟ ΘΕΡΜΙΚΗ ΚΑΤΕΡΓΑΣΙΑ (TH).....	106
7.3.1. Φασματοσκοπία FT-IR.....	106
7.3.1.1. Πειραματική διαδικασία	106
7.3.1.2. Αποτελέσματα και συζήτηση.....	106
7.3.2. Περίθλαση Ακτίνων-X (XRD)	108
7.3.2.1. Πειραματική διαδικασία	108
7.3.2.2. Αποτελέσματα και συζήτηση.....	108
7.3.3. Θερμική Σταθμική Ανάλυση (TGA)	109
7.3.3.1. Πειραματική διαδικασία	109
7.3.3.2. Αποτελέσματα και συζήτηση.....	109

7.3.4. Δυναμική Μηχανική Ανάλυση (DMA)	110
7.3.4.1. Πειραματική διαδικασία	110
7.3.4.2. Αποτελέσματα και συζήτηση.....	110
7.3.5. Μελέτη απορρόφησης νερού	113
7.3.5.1. Πειραματική διαδικασία	113
7.3.5.2. Αποτελέσματα και συζήτηση.....	113
7.3.6. Μελέτη ρυθμού αποδόμησης.....	115
7.3.6.1. Πειραματική διαδικασία	115
7.3.6.2. Αποτελέσματα και συζήτηση.....	115
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 8. ΑΝΑΠΤΥΞΗ ΚΑΙ ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΜΟΣ ΥΔΡΟΠΗΚΤΩΝ ΧΙΤΟΖΑΝΗΣ (Chi) - ΖΕΛΑΤΙΝΗΣ ΙΧΘΥΩΝ (FG) - ΧΟΝΔΡΟΪΤΙΝΗΣ (ChS) - ΓΛΥΚΕΡΟΛΗΣ (Gly)	117
8.1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ	117
8.2. ΣΥΝΘΕΣΗ ΤΩΝ ΥΔΡΟΠΗΚΤΩΝ	119
8.2.1. Αντιδραστήρια.....	119
8.2.2. Περιγραφή της συνθετικής πορείας.....	120
8.2.2.1. Σύνθεση της υδροπηκτής Chi ₂₀ FG ₂₀ ChS ₅ Gly ₅₅	120
8.2.2.2. Μηχανισμός σχηματισμού υδροπηκτής.....	123
8.3. ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΜΟΣ ΜΕΜΒΡΑΝΩΝ ΧΙΤΟΖΑΝΗΣ/ΖΕΛΑΤΙΝΗΣ	
ΙΧΘΥΩΝ/ΧΟΝΔΡΟΪΤΙΝΗΣ/ΓΛΥΚΕΡΟΛΗΣ	124
8.3.1. Φασματοσκοπία FT-IR	124
8.3.1.1. Πειραματική διαδικασία	124
8.3.1.2. Αποτελέσματα και συζήτηση.....	124
8.3.2. Περίθλαση Ακτίνων-X (XRD)	126
8.3.2.1. Πειραματική διαδικασία	126
8.3.2.2. Αποτελέσματα και συζήτηση.....	126
8.3.3. Θερμική Σταθμική Ανάλυση (TGA)	127
8.3.3.1 Πειραματική διαδικασία	127
8.3.3.2. Αποτελέσματα και συζήτηση.....	127
8.3.4. Δυναμική Μηχανική Ανάλυση (DMA)	129
8.3.4.1. Πειραματική διαδικασία	129
8.3.4.2. Αποτελέσματα και συζήτηση.....	129
8.3.5. Ηλεκτρονική μικροσκοπία σάρωσης (SEM).....	132
8.3.5.1. Πειραματική διαδικασία	132
8.3.5.2. Αποτελέσματα και συζήτηση.....	132

8.3.6. Μελέτη απορρόφησης νερού.....	136
8.3.6.1 Πειραματική διαδικασία	136
8.3.6.2. Αποτελέσματα και συζήτηση.....	136
8.3.7. Μελέτη ρυθμού αποδόμησης.....	139
8.3.7.1. Πειραματική διαδικασία	139
8.3.7.2. Αποτελέσματα και συζήτηση.....	139
8.3.8. Μελέτη ρυθμού εξάτμισης νερού.....	141
8.3.8.1. Πειραματική διαδικασία	141
8.3.8.2. Αποτελέσματα και συζήτηση.....	142
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 9. ΜΕΛΕΤΗ ΑΝΤΙΜΙΚΡΟΒΙΑΚΗΣ ΔΡΑΣΤΙΚΟΤΗΤΑΣ ΥΔΡΟΠΗΚΤΩΝ.....	144
9.1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ	144
9.2. ΣΥΝΘΕΣΗ ΤΩΝ ΥΔΡΟΠΗΚΤΩΝ	145
9.2.1 Αντιδραστήρια.....	145
9.2.2. Περιγραφή της συνθετικής διαδικασίας	145
9.2.2.1. Σύνθεση υδροπηκτής που περιέχει αντιβιοτικά.....	146
9.3. ΥΠΟΛΟΓΙΣΜΟΣ ΦΟΡΤΩΣΗΣ ΦΑΡΜΑΚΟΥ.....	146
9.4. ΜΕΛΕΤΗ ΑΝΤΙΜΙΚΡΟΒΙΑΚΗΣ ΔΡΑΣΤΙΚΟΤΗΤΑΣ	146
9.4.1. Πειραματική διαδικασία	146
9.4.2. Αποτελέσματα και συζήτηση	147
9.4.2.1. Υδροπηκτές χωρίς αντιμικροβιακούς παράγοντες	147
9.4.2.2. Υδροπηκτές που περιέχουν αντιβιοτικά	149
9.4.2.3. Υδροπηκτές που περιέχουν αιθέρια έλαια.....	151
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 10. IN VITRO ΕΠΟΙΚΗΣΗ ΤΩΝ ΥΔΡΟΠΗΚΤΩΝ ΑΠΟ ΕΝΔΟΘΗΛΙΑΚΑ ΚΥΤΤΑΡΑ	155
10.1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ	155
10.2. ΣΥΝΘΕΣΗ ΤΩΝ ΥΔΡΟΠΗΚΤΩΝ	156
10.2.1. Πειραματική διαδικασία	156
10.3. ΜΕΛΕΤΗ ΕΠΟΙΚΗΣΗΣ ΕΝΔΟΘΗΛΙΚΩΝ ΚΥΤΤΑΡΩΝ.....	156
10.3.1. Πειραματική διαδικασία	156
10.3.1.1. Καλλιέργεια ενδοθηλιακών κυττάρων απομονωμένων από φλέβα ομφάλιου λώρου	156
10.3.1.2. Καλλιέργεια ενδοθηλιακών κυττάρων στις υδροπηκτές	156
10.3.2. Αποτελέσματα και συζήτηση	157
10.3.2.1. Προσκόλληση ενδοθηλιακών κυττάρων στις υδροπηκτές	157

10.3.2.2. Πολλαπλασιασμός ενδοθηλιακών κυττάρων στις υδροπηκτές	159
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 11. ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ ΚΑΙ ΜΕΛΛΟΝΤΙΚΟΙ ΣΤΟΧΟΙ.....	162
11.1. ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ.....	162
11.2. ΜΕΛΛΟΝΤΙΚΟΙ ΣΤΟΧΟΙ.....	165
ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ	166

ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΠΙΝΑΚΩΝ

ΠΙΝΑΚΑΣ	ΣΕΛ.
Πίνακας 2.1. Χαρακτηριστικά που πρέπει να διαθέτουν τα επιθέματα επούλωσης τραυμάτων.	25
Πίνακας 5.1. Ποσότητες αντιδραστηρίων που χρησιμοποιήθηκαν για τη σύνθεση των υδροπηκτών χιτοζάνης, ζελατίνης ιχθύων και των αναμιγμάτων.	61
Πίνακας 6.1. Ονόματα υλικών και ποσότητες αντιδραστηρίων που χρησιμοποιήθηκαν για την σύνθεση των υδροπηκτών χιτοζάνης-γλυκερόλης και ζελατίνης ιχθύων-γλυκερόλης.	75
Πίνακας 6.2. Ονόματα υλικών και ποσότητες αντιδραστηρίων που χρησιμοποιήθηκαν για τη σύνθεση των υδροπηκτών χιτοζάνης-ζελατίνης ιχθύων-γλυκερόλης.	76
Πίνακας 8.1. Ονομασίες υδροπηκτών και ποσότητες συστατικών που χρησιμοποιήθηκαν για την σύνθεση του κάθε υλικού.	121
Πίνακας 9.1. Αντιμικροβιακή δραστικότητα υδροπηκτής Chi _{22.5} FG _{22.5} Gly ₅₅ με TH και υδροπηκτής Chi _{22.5} FG _{22.5} Gly ₅₅ με AgSD (mm ζώνης αναστολής) έναντι των μικροοργανισμών Escherichia coli, Bacillus subtilis και Streptococcus thermophilus.	149
Πίνακας 9.2. Αντιμικροβιακή δραστικότητα υδροπηκτής Chi _{22.5} FG _{22.5} Gly ₅₅ ύστερα από προσθήκη θυμαρελαίου και υδροπηκτής Chi _{22.5} FG _{22.5} Gly ₅₅ ύστερα από προσθήκη ριγανελαίου (mm ζώνης αναστολής) έναντι των μικροοργανισμών Escherichia coli, Bacillus subtilis και Streptococcus thermophilus.	152

ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΣΧΗΜΑΤΩΝ

ΣΧΗΜΑ	ΣΕΛ.
Σχήμα 1.1. Σχηματική απεικόνιση της δομής της διδακτορικής διατριβής.	16
Σχήμα 2.1. Σχηματική απεικόνιση των στιβάδων του δέρματος, της επιδερμίδας, του χορίου και της υποδόριας στρώσης.	18
Σχήμα 2.2. Σχηματική απεικόνιση των χρονικά εξαρτώμενων φάσεων που λαμβάνουν χώρα κατά την διαδικασία αποκατάστασης του ιστού.	20
Σχήμα 3.1. Δημοσιεύσεις που αφορούν υδροπηκτές για βιοϊατρικές εφαρμογές (Ιανουάριος 2010-Σεπτέμβριος 2020)	30
Σχήμα 3.2. Απεικόνιση του προϊόντος Geliperm® (αριστερά) και της ομάδας προϊόντων Curasol® (δεξιά).	31
Σχήμα 3.3. Εφαρμογή υδροπηκτής σε τραυματισμένη επιφάνεια και αναφορά των χαρακτηριστικών που πρέπει να διαθέτει.	32
Σχήμα 3.4. Σχηματική απεικόνιση του ρόλου της μεμβράνης υδροπηκτής ως ασπίδα προστασίας από βακτήρια και υποστήριξη της μετανάστευσης των ινοβλαστών.	32
Σχήμα 3.5. Χημική δομή ζελατίνης.	35
Σχήμα 3.6. Δομική μονάδα χιτοζάνης.	37
Σχήμα 3.7. Αλληλεπιδράσεις κατά την φυσική δημιουργία σταυροδεσμών.	45
Σχήμα 3.8. Διαδικασία σχηματισμού υδροπηκτών μέσω της τεχνικής ψύξης-απόψυξης.	47
Σχήμα 4.1. Απεικόνιση διαφόρων αρπαγών που χρησιμοποιούνται κατά τις μετρήσεις DMA.	56
Σχήμα 5.1. Απλουστευμένη απεικόνιση των αλληλεπιδράσεων μεταξύ της χιτοζάνης και της ζελατίνης ιχθύων.	62
Σχήμα 5.2. Υδροπηκτές Chi ₅₀ FG ₅₀ και Chi ₂₀ FG ₈₀ από αριστερά προς τα δεξιά.	62
Σχήμα 5.3. Συγκεντρωτικά φάσματα FT-IR των υδροπηκτών ζελατίνης ιχθύων (α), χιτοζάνης (β), Chi ₅₀ FG ₅₀ (γ), Chi ₃₀ FG ₇₀ (δ) και Chi ₂₀ FG ₈₀ (ε).	64
Σχήμα 5.4. Συγκεντρωτικά διαγράμματα XRD των υδροπηκτών ζελατίνης ιχθύων (α), χιτοζάνης (β), Chi ₅₀ FG ₅₀ (γ), Chi ₃₀ FG ₇₀ (δ) και Chi ₂₀ FG ₈₀ (ε).	66

Σχήμα 5.5. Συγκεντρωτικά αποτελέσματα θερμικής ανάλυσης για την μεμβράνη ζελατίνης ιχθύων (α), χιτοζάνης (β), Chi ₃₀ FG ₇₀ (γ) και Chi ₂₀ FG ₈₀ (δ).	67
Σχήμα 5.6. Αποτελέσματα δυναμικής μηχανικής ανάλυσης, μέτρο αποθήκευσης (■) και παράγοντας απώλειας (■) των μεμβρανών χιτοζάνης (α), ζελατίνης ιχθύων (β) και Chi ₅₀ FG ₅₀ (γ).	69
Σχήμα 6.1. Σχηματική απεικόνιση της συνθετικής διαδικασίας που ακολουθήθηκε για την σύνθεση των υδροπηκτών.	74
Σχήμα 6.2. Απλουστευμένη απεικόνιση των αλληλεπιδράσεων μεταξύ χιτοζάνης-γλυκερόλης (πάνω αριστερά), ζελατίνης ιχθύων-γλυκερόλης (πάνω δεξιά) και χιτοζάνης-ζελατίνης ιχθύων γλυκερόλης (κάτω).	78
Σχήμα 6.3. Συγκεντρωτικά φάσματα FT-IR των υδροπηκτών χιτοζάνης (α), ζελατίνης ιχθύων (δ), χιτοζάνης-ζελατίνης ιχθύων (ζ) ,χιτοζάνης-γλυκερόλης (β, γ), ζελατίνης ιχθύων-γλυκερόλης (ε, στ) και χιτοζάνης-ζελατίνης ιχθύων-γλυκερόλης (η, θ).	81
Σχήμα 6.4. Συγκεντρωτικά διαγράμματα XRD των υδροπηκτών χιτοζάνης (α), ζελατίνης ιχθύων (δ), χιτοζάνης-ζελατίνης ιχθύων (ζ) ,χιτοζάνης-γλυκερόλης (β, γ), ζελατίνης ιχθύων-γλυκερόλης (ε, στ) και χιτοζάνης-ζελατίνης ιχθύων-γλυκερόλης (η, θ).	83
Σχήμα 6.5. Αποτελέσματα θερμικής ανάλυσης των υδροπηκτών Chi ₂₀ FG ₈₀ (α), Chi ₁₅ FG ₅₀ Gly ₃₅ (β) και Chi ₁₅ FG ₆₅ Gly ₂₀ (γ).	84
Σχήμα 6.6. Αποτελέσματα δυναμικής μηχανικής ανάλυσης, μέτρο αποθήκευσης (■) και παράγοντας απώλειας (■) των υδροπηκτών χιτοζάνης (α), Chi ₄₅ Gly ₅₅ (β) ζελατίνης ιχθύων (γ) και FG ₇₅ Gly ₂₅ (δ).	87
Σχήμα 6.7. Αποτελέσματα δυναμικής μηχανικής ανάλυσης-μέτρο αποθήκευσης των υδροπηκτών Chi ₅₀ FG ₅₀ (α), Chi ₃₀ FG ₃₀ Gly ₄₀ (β), Chi ₂₅ FG ₄₅ Gly ₃₀ (γ) και Chi ₁₅ FG ₆₅ Gly ₂₀ (δ).	88
Σχήμα 6.8. Αποτελέσματα δυναμικής μηχανικής ανάλυσης-παράγοντας απώλειας των υδροπηκτών Chi ₅₀ FG ₅₀ (α), Chi ₃₀ FG ₃₀ Gly ₄₀ (β), Chi ₂₅ FG ₄₅ Gly ₃₀ (γ) και Chi ₁₅ FG ₆₅ Gly ₂₀ (δ).	89

Σχήμα 6.9. Αποτελέσματα δυναμικής μηχανικής ανάλυσης-μέτρο, αποθήκευσης των υδροπηκτών Chi ₅₀ FG ₅₀ (α), Chi _{22.5} FG _{22.5} Gly ₅₅ (β), Chi ₂₀ FG ₃₅ Gly ₄₅ (γ) και, Chi ₁₅ FG ₅₀ Gly ₃₅ (δ).	91
Σχήμα 6.10. Αποτελέσματα δυναμικής μηχανικής ανάλυσης-παράγοντας απώλειας των υδροπηκτών Chi ₅₀ FG ₅₀ (α), Chi _{22.5} FG _{22.5} Gly ₅₅ (β), Chi ₂₀ FG ₃₅ Gly ₄₅ (γ) και, Chi ₁₅ FG ₅₀ Gly ₃₅ (δ).	92
Σχήμα 6.11. Εικόνες SEM από την επιφάνεια των υδροπηκτών Chi ₄₅ Gly ₅₅ και FG ₇₅ Gly ₂₅ .	93
Σχήμα 6.12. Εικόνες SEM επιφάνειας των υδροπηκτών Chi ₃₀ FG ₃₀ Gly ₄₀ (α), Chi ₂₅ FG ₄₅ Gly ₃₀ (β) και Chi ₁₅ FG ₆₅ Gly ₂₀ (γ), Chi _{22.5} FG _{22.5} Gly ₅₅ (δ), Chi ₂₀ FG ₃₅ Gly ₄₅ (ε) και, Chi ₁₅ FG ₅₀ Gly ₃₅ (στ).	94
Σχήμα 6.13. Εικόνες SEM των υδροπηκτών Chi ₄₅ Gly ₅₅ (αριστερά) και FG ₇₅ Gly ₂₅ (δεξιά) αφού υποβλήθηκαν σε εγκάρσια τομή.	95
Σχήμα 6.14. Αποτελέσματα μελέτης απορρόφησης νερού των υδροπηκτών Chi ₃₀ FG ₃₀ Gly ₄₀ (α), Chi ₂₅ FG ₄₅ Gly ₃₀ (β), Chi ₁₅ FG ₆₅ Gly ₂₀ (γ).	96
Σχήμα 6.15. Αποτελέσματα μελέτης απορρόφησης νερού των υδροπηκτών Chi _{22.5} FG _{22.5} Gly ₅₅ (α), Chi ₂₀ FG ₃₅ Gly ₄₅ (β) και, Chi ₁₅ FG ₅₀ Gly ₃₅ (γ).	97
Σχήμα 6.16. Αποτελέσματα μελέτης ρυθμού αποδόμησης των υδροπηκτών Chi ₃₀ FG ₃₀ Gly ₄₀ (α) και Chi ₂₅ FG ₄₅ Gly ₃₀ (β).	99
Σχήμα 6.17. Αποτελέσματα μελέτης ρυθμού αποδόμησης των υδροπηκτών Chi _{22.5} FG _{22.5} Gly ₅₅ (α), Chi ₂₀ FG ₃₅ Gly ₄₅ (β) και Chi ₁₅ FG ₅₀ Gly ₃₅ (γ).	100
Σχήμα 6.18. Απεικόνιση των υδροπηκτών Chi ₂₀ FG ₈₀ (α) Chi ₁₅ FG ₆₅ Gly ₂₀ (β) και Chi ₁₅ FG ₅₀ Gly ₃₅ (γ) ύστερα από παραμονή σε νερό.	101
Σχήμα 7.1. Υδροπηκτική Chi ₁₅ FG ₅₀ Gly ₃₅ (α) και Chi ₁₅ FG ₅₀ Gly ₃₅ (TH) (β).	104
Σχήμα 7.2. Σχηματική απεικόνιση του μηχανισμού σχηματισμού της υδροπηκτικής Chi ₁₅ FG ₅₀ Gly ₃₅ (TH).	105
Σχήμα 7.3. Συγκεντρωτικά φάσματα FT-IR των υδροπηκτών Chi ₁₅ FG ₅₀ Gly ₃₅ (α), Chi ₁₅ FG ₅₀ Gly ₃₅ (TH) (β) και Chi ₁₅ FG ₅₀ Gly ₃₅ (TH/RA) (γ).	107
Σχήμα 7.4. Αποτελέσματα περίθλασης ακτίνων-X των υδροπηκτών Chi ₁₅ FG ₅₀ Gly ₃₅ (α) και Chi ₁₅ FG ₅₀ Gly ₃₅ (TH) (β).	108

Σχήμα 7.5. Αποτελέσματα θερμικής ανάλυσης των υδροπηκτών Chi ₁₅ FG ₅₀ Gly ₃₅ (α) και Chi ₁₅ FG ₅₀ Gly ₃₅ (TH) (β).	109
Σχήμα 7.6. Αποτελέσματα δυναμικής μηχανικής ανάλυσης-μέτρο αποθήκευσης των υδροπηκτών Chi ₁₅ FG ₅₀ Gly ₃₅ (α), Chi ₁₅ FG ₅₀ Gly ₃₅ (TH) (β) και Chi ₁₅ FG ₅₀ Gly ₃₅ (TH/RA) (γ).	111
Σχήμα 7.7. Αποτελέσματα δυναμικής μηχανικής ανάλυσης-παράγοντας απώλειας των υδροπηκτών Chi ₁₅ FG ₅₀ Gly ₃₅ (α), Chi ₁₅ FG ₅₀ Gly ₃₅ (TH) (β) και Chi ₁₅ FG ₅₀ Gly ₃₅ (TH/RA) (γ).	112
Σχήμα 7.8. Αποτελέσματα όπως ελήφθησαν από την TA Instruments όπου απεικονίζεται η επίδραση της υγρασίας στο μέτρο αποθήκευσης μεμβράνης ζελατίνης.	113
Σχήμα 7.9. Αποτελέσματα μελέτης απορρόφησης νερού των υδροπηκτών Chi ₁₅ FG ₅₀ Gly ₃₅ (α) και Chi ₁₅ FG ₅₀ Gly ₃₅ (TH) (β).	114
Σχήμα 7.10. Αποτελέσματα μελέτης του ρυθμού αποδόμησης των υδροπηκτών Chi ₁₅ FG ₅₀ Gly ₃₅ (α) και Chi ₁₅ FG ₅₀ Gly ₃₅ (TH) (β).	115
Σχήμα 8.1. Σχηματική περιγραφή της πειραματικής διαδικασίας και απεικόνιση των υλικών διαφορετικής μορφολογίας που προκύπτουν ύστερα από εξάτμιση του διαλύτη σε θερμοκρασία δωματίου και μετά από Freeze-drying.	122
Σχήμα 8.2. Σχηματική απεικόνιση του μηχανισμού σχηματισμού της υδροπηκτής Chi ₂₀ FG ₂₀ ChS ₅ Gly ₅₅ .	123
Σχήμα 8.3. Φάσματα FT-IR των υλικών Χονδροϊτίνη (α), Chi ₃₀ Gly ₇₀ (β), Chi ₁₅ FG ₅₀ Gly ₃₅ (γ) και Chi ₁₃ FG ₅₀ ChS ₃ Gly ₃₄ (δ).	125
Σχήμα 8.4. Αποτελέσματα περίθλασης ακτίνων-X για τη θεικής χονδροϊτίνης (α), την υδροπηκτή Chi ₁₅ FG ₅₀ Gly ₃₅ (β) και την Chi ₁₃ FG ₅₀ ChS ₃ Gly ₃₄ (γ).	126
Σχήμα 8.5. Αποτελέσματα θερμικής ανάλυσης των υδροπηκτών Chi ₁₅ FG ₅₀ Gly ₃₅ (α) και Chi ₁₃ FG ₅₀ ChS ₃ Gly ₃₄ (β).	128
Σχήμα 8.6. Αποτελέσματα δυναμικής μηχανικής ανάλυσης-μέτρο αποθήκευσης των υδροπηκτών Chi ₂₀ FG ₂₀ ChS ₅ Gly ₅₅ (α), Chi ₁₇ FG ₃₄ ChS ₄ Gly ₄₅ (β) και Chi ₁₃ FG ₅₀ ChS ₃ Gly ₃₄ (γ).	129

Σχήμα 8.7. Αποτελέσματα δυναμικής μηχανικής ανάλυσης-παράγοντας απώλειας των υδροπηκτών Chi ₂₀ FG ₂₀ ChS ₅ Gly ₅₅ (α), Chi ₁₇ FG ₃₄ ChS ₄ Gly ₄₅ (β) και Chi ₁₃ FG ₅₀ ChS ₃ Gly ₃₄ (γ).	130
Σχήμα 8.8. Παράγοντας απώλειας (tan delta) των υδροπηκτών Chi _{22.5} FG _{22.5} Gly ₅₅ (α) και Chi ₂₀ FG ₂₀ ChS ₅ Gly ₅₅ (β).	131
Σχήμα 8.9. Εικόνες ηλεκτρονικής μικροσκοπίας σάρωσης (SEM) των υδροπηκτών Chi ₂₀ FG ₂₀ ChS ₅ Gly ₅₅ (α, β), Chi ₁₇ FG ₃₄ ChS ₄ Gly ₄₅ (γ, δ) και Chi ₁₃ FG ₅₀ ChS ₃ Gly ₃₄ (ε, στ).	133
Σχήμα 8.10. Εικόνες ηλεκτρονικής μικροσκοπίας σάρωσης (SEM) των υδροπηκτών Chi ₂₀ FG ₂₀ ChS ₅ Gly ₅₅ (α), Chi ₁₇ FG ₃₄ ChS ₄ Gly ₄₅ (β) και Chi ₁₃ FG ₅₀ ChS ₃ Gly ₃₄ (γ) αφού υπεβλήθησαν σε εγκάρσια τομή.	134
Σχήμα 8.11. Εικόνες ηλεκτρονικής μικροσκοπίας σάρωσης (SEM) σε διαφορετικές μεγεθύνσεις ικρίωματος Chi ₂₀ FG ₂₀ ChS ₅ Gly ₅₅ FD-TH.	134
Σχήμα 8.12. Εικόνες ηλεκτρονικής μικροσκοπίας σάρωσης (SEM) της υδροπηκτής Chi ₂₀ FG ₂₀ ChS ₅ Gly ₅₅ FD-TH αφού υποβλήθηκε σε εγκάρσια τομή.	135
Σχήμα 8.13. Αποτελέσματα μελέτης απορρόφησης νερού υδροπηκτών που περιέχουν χονδροϊτίνη.	136
Σχήμα 8.14. Σύγκριση αποτελεσμάτων μελέτης απορρόφησης νερού υλικών με και χωρίς (βλέπε πίνακα 7.2, ομάδα Β') χονδροϊτίνη.	137
Σχήμα 8.15. Απεικόνιση της μεταβολής της διαμέτρου των υδροπηκτών ύστερα από παραμονή σε νερό για 1h.	138
Σχήμα 8.16. Αποτελέσματα μελέτης του ρυθμού αποδόμησης των υδροπηκτών Chi ₂₀ FG ₂₀ ChS ₅ Gly ₅₅ (α), Chi ₁₇ FG ₃₄ ChS ₄ Gly ₄₅ (β) και Chi ₁₃ FG ₅₀ ChS ₃ Gly ₃₄ (γ).	140
Σχήμα 8.17. Αποτελέσματα της μελέτης του ρυθμού εξάτμισης νερού από τις υδροπηκτές Chi ₂₀ FG ₂₀ ChS ₅ Gly ₅₅ (α), Chi ₁₇ FG ₃₄ ChS ₄ Gly ₄₅ (β) και Chi ₁₃ FG ₅₀ ChS ₃ Gly ₃₄ (γ).	142
Σχήμα 8.18. Αφυδατωμένη υδροπηκτική ύστερα από την πραγματοποίηση της δοκιμής (α), ολιγόλεπτη εμβάπτιση σε νερό (β) και διογκωμένη υδροπηκτική έτοιμη ξανά προς χρήση (γ).	143

Σχήμα 9.1. Υδροπηκτική Chi _{22.5} FG _{22.5} Gly ₅₅ (αριστερά) και υδροπηκτική Chi ₂₀ FG ₂₀ ChS ₅ Gly ₅₅ (δεξιά) σε στερεό θρεπτικό μέσο εμβολιασμένο με <i>Escherichia coli</i> .	148
Σχήμα 9.2. Υδροπηκτική Chi _{22.5} FG _{22.5} Gly ₅₅ (αριστερά) και υδροπηκτική Chi ₂₀ FG ₂₀ ChS ₅ Gly ₅₅ (δεξιά) σε στερεό θρεπτικό μέσο εμβολιασμένο με <i>Bacillus subtilis</i> .	148
Σχήμα 9.3. Υδροπηκτική Chi _{22.5} FG _{22.5} Gly ₅₅ (αριστερά) και υδροπηκτική Chi ₂₀ FG ₂₀ ChS ₅ Gly ₅₅ (δεξιά) σε στερεό θρεπτικό μέσο εμβολιασμένο με <i>Streptococcus thermophilus</i> .	149
Σχήμα 9.4. Υδροπηκτική Chi _{22.5} FG _{22.5} Gly ₅₅ με Tet.Hyd. (αριστερά) και υδροπηκτική Chi _{22.5} FG _{22.5} Gly ₅₅ με AgSD (δεξιά) σε στερεό θρεπτικό μέσο εμβολιασμένο με <i>Escherichia coli</i> .	150
Σχήμα 9.5. Υδροπηκτική Chi _{22.5} FG _{22.5} Gly ₅₅ με Tet.Hyd. (αριστερά) και υδροπηκτική Chi _{22.5} FG _{22.5} Gly ₅₅ με AgSD (δεξιά) σε στερεό θρεπτικό μέσο εμβολιασμένο με <i>Bacillus subtilis</i> .	150
Σχήμα 9.6. Υδροπηκτική Chi _{22.5} FG _{22.5} Gly ₅₅ με Tet.Hyd. (αριστερά) και υδροπηκτική Chi _{22.5} FG _{22.5} Gly ₅₅ με AgSD (δεξιά) σε στερεό θρεπτικό μέσο εμβολιασμένο με <i>Streptococcus thermophilus</i> .	151
Σχήμα 9.7. Υδροπηκτική Chi _{22.5} FG _{22.5} Gly ₅₅ με θυμαρέλαιο (αριστερά) και υδροπηκτική Chi _{22.5} FG _{22.5} Gly ₅₅ με ριγανέλαιο (δεξιά) σε στερεό θρεπτικό μέσο εμβολιασμένο με <i>Escherichia coli</i> .	152
Σχήμα 9.8. Υδροπηκτική Chi _{22.5} FG _{22.5} Gly ₅₅ με θυμαρέλαιο (αριστερά) και υδροπηκτική Chi _{22.5} FG _{22.5} Gly ₅₅ με ριγανέλαιο (δεξιά) σε στερεό θρεπτικό μέσο εμβολιασμένο με <i>Bacillus subtilis</i> .	153
Σχήμα 9.9. Υδροπηκτική Chi _{22.5} FG _{22.5} Gly ₅₅ με θυμαρέλαιο (αριστερά) και υδροπηκτική Chi _{22.5} FG _{22.5} Gly ₅₅ με ριγανέλαιο (δεξιά) σε στερεό θρεπτικό μέσο εμβολιασμένο με <i>Streptococcus thermophilus</i> .	153
Σχήμα 10.1. Αποτελέσματα μελέτης της κυτταρικής προσκόλλησης ενδοθηλιακών κυττάρων στις υδροπηκτές ύστερα από καλλιέργεια 4 ωρών.	158
Σχήμα 10.2. Εικόνες όπως ελήφθησαν από μικροσκόπιο φθορισμού ύστερα από εποίκιση ενδοθηλιακών κυττάρων για 4 ώρες στις υδροπηκτές	159

Chi ₂₀ FG ₃₅ Gly ₄₅ (α), Chi ₁₅ FG ₅₀ Gly ₃₅ (β), Chi ₁₅ FG ₅₀ Gly ₃₅ (TH) (γ) και Chi ₁₃ FG ₅₀ ChS ₃ Gly ₃₄ (δ).	
Σχήμα 10.3. Αποτελέσματα μελέτης κυτταρικού πολλαπλασιασμού ύστερα από καλλιέργεια ενδοθηλιακών κυττάρων 24 και 48 ωρών στις υδροπηκτές.	160
Σχήμα 10.4. Εικόνες όπως ελήφθησαν από μικροσκόπιο φθορισμού ύστερα από εποίκηση ενδοθηλιακών κυττάρων για 48 ώρες στις υδροπηκτές Chi ₂₀ FG ₃₅ Gly ₄₅ (α), Chi ₁₅ FG ₅₀ Gly ₃₅ (β) και Chi ₁₅ FG ₅₀ Gly ₃₅ (TH) (γ).	160
Σχήμα 10.5. Υδροπηκτική Chi ₁₃ FG ₅₀ ChS ₃ Gly ₃₄ σε θρεπτικό μέσο με ενδοθηλιακά κύτταρα (α) και εικόνα οπτικού μικροσκοπίου από το θρεπτικό μέσο πέριξ της υδροπηκτής (β).	161

ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΣΥΝΤΟΜΟΓΡΑΦΙΩΝ

ΣΥΝΤΟΜΟΓΡΑΦΙΕΣ/ΣΥΜΒΟΛΑ	
AgSD	αργυρούχος σουλφαδιαζίνη
CFU	colony forming units
DMA	δυναμική μηχανική ανάλυση
DSC	διαφορική θερμιδομετρία σάρωσης
ECGS	endothelial cell growth supplement
ECM	εξωκυτταρική μήτρα
EDC	1-αίθυλο-3-(3-διμεθυαμινοπροπυλο)-καρβοϊμίδιο
EGDMA	διμεθυλακρυλική αιθυλενογλυκόλη
FT-IR	φασματοσκοπία υπερύθρου
HAc	οξικό οξύ
HEMA	(υδροξυαιθυλ)μεθακρυλικό εστέρα
HRP	υπεροξειδάση του χρένου
L.B. Agar	Luria Bertani Agar
MB	μοριακό βάρος
MTGase	μικροβιακή τρανσγλουταμινάση
NCCLS	National Committee for Clinical Laboratory Standards
NHS	1-υδροξυ-2,5-πυρρολιδινδιόνη
PBS	phosphate buffered saline
storage modulus	μέτρο αποθήκευσης
SEM	ηλεκτρονική μικροσκοπία σάρωσης
tan delta	παράγοντας απώλειας
Tet.Hyd.	υδροχλωρική τετρακυκλίνη
TGA	θερμική σταθμική ανάλυση
UV	υπεριώδης ακτινοβολία
WVTR	ρυθμός μετάδοσης υδρατμών
XRD	περίθλαση ακτίνων-X

ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΣΥΝΤΟΜΟΓΡΑΦΙΩΝ ΥΛΙΚΩΝ

ΣΥΝΤΟΜΟΓΡΑΦΙΕΣ ΥΛΙΚΩΝ	
Chi	100 % Χιτοζάνη
FG	100 % Ζελατίνη Ιχθύων
Chi₅₀FG₅₀	50 % Χιτοζάνη-50 % Ζελατίνη Ιχθύων
Chi₃₀FG₇₀	30 % Χιτοζάνη-70 % Ζελατίνη Ιχθύων
Chi₂₀FG₈₀	20 % Χιτοζάνη-80 % Ζελατίνη Ιχθύων
Gly	100 % Γλυκερόλη
Chi₄₅Gly₅₅	45 % Χιτοζάνη-55 % Γλυκερόλη
FG₇₅Gly₂₅	75 % Ζελατίνη Ιχθύων-25 % Γλυκερόλη
Chi₃₀Gly₇₀	30 % Χιτοζάνη-70 % Γλυκερόλη
FG₆₀Gly₄₀	60 % Ζελατίνη Ιχθύων-40 % Γλυκερόλη
Chi₃₀FG₃₀Gly₄₀	30 % Χιτοζάνη-30% Ζελατίνη Ιχθύων-40 % Γλυκερόλη
Chi₂₅FG₄₅Gly₃₀	25 % Χιτοζάνη-45 % Ζελατίνη Ιχθύων-30 % Γλυκερόλη
Chi₁₅FG₆₅Gly₂₀	15 % Χιτοζάνη-65 % Ζελατίνη Ιχθύων-20 % Γλυκερόλη
Chi_{22.5}FG_{22.5} Gly₅₅	22.5 % Χιτοζάνη-22.5 % Ζελατίνη Ιχθύων-55 % Γλυκερόλη
Chi₂₀FG₃₅Gly₄₅	20 % Χιτοζάνη-35 % Ζελατίνη Ιχθύων-45 % Γλυκερόλη
Chi₁₅FG₅₀Gly₃₅	15 % Χιτοζάνη-50 % Ζελατίνη Ιχθύων-35 % Γλυκερόλη
Chi₁₅FG₅₀Gly₃₅ (TH)	15% Χιτοζάνη-50 % Ζελατίνη Ιχθύων-35 % Γλυκερόλη ύστερα από θερμική κατεργασία (TH) και παραμονή σε θερμοκρασία δωματίου για 7 ημέρες
Chi₁₅FG₅₀Gly₃₅ (TH/RA)	15% Χιτοζάνη-50 % Ζελατίνη Ιχθύων-35 % Γλυκερόλη αμέσως μετά (RA) τη θερμική κατεργασία (TH)
Chi₂₀FG₂₀ChS₅ Gly₅₅	20 % Χιτοζάνη-20 % Ζελατίνη Ιχθύων-5 % Χονδροϊτίνη-55 % Γλυκερόλη

Chi₁₇FG₃₄ChS₄ Gly₄₅	17 % Χιτοζάνη-34 % Ζελατίνη Ιχθύων-4 % Χονδροϊτίνη-45 % Γλυκερόλη
Chi₁₃FG₅₀ChS₃ Gly₃₄	13 % Χιτοζάνη-50 % Ζελατίνη Ιχθύων-3 % Χονδροϊτίνη-34 % Γλυκερόλη
Chi₂₀FG₂₀ChS₅Gly₅₅ FD- TH	20 % Χιτοζάνη-20 % Ζελατίνη Ιχθύων-5 % Χονδροϊτίνη-55 % Γλυκερόλη ύστερα από freeze drying (FD) ακολουθούμενο από θερμική κατεργασία (TH)

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Το υψηλό ποσοστό θανάτων ασθενών που υποφέρουν από εγκαύματα μεγάλης επιφάνειας (70 % της συνολικής επιφάνειας του σώματος) και το υψηλό κόστος διαχείρισης/φροντίδας των τραυμάτων, καθιστούν την ανάπτυξη επιθεμάτων μέσω απλών και οικονομικών συνθετικών διαδικασιών, επιτακτική.

Για την ανάπτυξη των υδροπηκτών χρησιμοποιήθηκαν τα φυσικά πολυμερή χιτοζάνη, ζελατίνη ιχθύων και θειϊκή χονδροϊτίνη ενώ η χρήση της γλυκερόλης κρίθηκε αναγκαία για τη συνολική βελτίωση των ιδιοτήτων των υλικών. Για περαιτέρω βελτίωση μέρους των ιδιοτήτων, πραγματοποιήθηκε θερμική κατεργασία, οδηγώντας σε λήψη υλικών με εξαιρετικές ιδιότητες (μείωση του ρυθμού αποδόμησης και βελτίωση του κυτταρικού πολλαπλασιασμού). Επίσης με σκοπό τη λήψη πορώδους υλικού πραγματοποιήθηκε λυοφιλίωση. Τα υλικά που συντέθηκαν στα πλαίσια της διατριβής, χαρακτηρίστηκαν μέσω φασματοσκοπίας υπερύθρου (FTIR), περίθλασης ακτίνων-X (XRD), θερμικής-σταθμικής ανάλυσης (TGA), δυναμικής μηχανικής ανάλυσης (DMA) και ηλεκτρονιακής μικροσκοπίας σάρωσης (SEM). Πραγματοποιήθηκαν μελέτες απορρόφησης νερού, ρυθμού αποδόμησης και απώλειας νερού. Επιπρόσθετα, ενσωματώθηκαν στις υδροπηκτές αντιβιοτικά (υδροχλωρική τετρακυκλίνη και αργυρούχος σουλφαδιαζίνη) και εμβαπτίστηκαν με αιθέρια έλαια (ρίγανης και θυμαριού) με σκοπό να προσδοθούν αντιμικροβιακές ιδιότητες. Τέλος, πραγματοποιήθηκαν *in vitro* δοκιμές εποίκησης ενδοθηλιακών κυττάρων στις υδροπηκτές με σκοπό αρχικά τη μελέτη ύπαρξης κυτταροτοξικού παράγοντα και στη συνέχεια της κυτταρικής προσκόλλησης και πολλαπλασιασμού. Τα αποτελέσματα της ζώνης αναστολής (δοκιμές αντιμικροβιακής δραστηριότητας) όπως επίσης και αυτά της κυτταρικής προσκόλλησης και του κυτταρικού πολλαπλασιασμού (*in vitro* δοκιμές εποίκησης ενδοθηλιακών κυττάρων στις υδροπηκτές), υποδεικνύουν ότι οι υδροπηκτές μπορούν πιθανώς να χρησιμοποιηθούν ως βιοϋλικά στον τομέα της επούλωσης/φροντίδας τραυμάτων (προστασία από βακτήρια, παροχή υγρού περιβάλλοντος κ.τ.λ.).

ABSTRACT

The high mortality rate of patients suffering from large surface burns (70% of total body surface area) and the high cost of wound management / care, render the development of patches through simple and economical synthetic routes, imperative.

The natural polymers chitosan, fish gelatin and chondroitin sulfate were utilized for the development of the hydrogels, while the use of glycerol was found to be necessary for the overall improvement of the materials' properties. To further improve some of the properties, heat treatment was performed, leading to the acquisition of materials with excellent characteristics (reduction of the degradation rate and improvement of cell proliferation). Freeze-drying was also performed to obtain a porous scaffold. The materials synthesized in the present dissertation were characterized by infrared spectroscopy (FTIR), X-ray diffraction (XRD), thermogravimetric analysis (TGA), dynamic mechanical analysis (DMA) and scanning electron microscopy (SEM). Water absorption, degradation rate and water loss studies were also took place. In addition, antibiotics (tetracycline hydrochloride and silver sulfadiazine) were incorporated into the hydrogels, which were further dipped in essential oils (oregano and thyme) to enhance antimicrobial properties. Finally, in vitro endothelial cell colonization tests were carried out on hydrogels with the aim of firstly studying the presence of a cytotoxic agent and subsequently study the cell adhesion and proliferation on the hydrogel membranes. The results of the inhibition zone (antimicrobial tests) as well as the cell attachment and proliferation (in vitro endothelial cell colonization tests) indicate that the hydrogel membranes could be potential biomaterials in wound healing/care applications (protection against bacteria, providing a moist environment etc.).

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ/ΣΚΟΠΟΣ

Κίνητρο

Το κόστος για τη διαχείριση και την ίαση διαφόρων τύπων τραυμάτων έχει υπολογιστεί ότι κυμαίνεται από 28.1 έως 96.8 δις δολάρια συμπεριλαμβανομένου και του κόστους διαχείρισης των λοιμώξεων [1,2]. Επίσης οι δαπάνες για τη θεραπεία τραυμάτων μη νοσηλευόμενων ασθενών (9.9–35.8 δις δολάρια) είναι υψηλότερες σε σχέση με τις δαπάνες ασθενών που νοσηλεύονται σε δομές υγείας (5.0–24.3 δις δολάρια). Αυτό πιθανότατα οφείλεται στη δυνατότητα φροντίδας των πληγών, χωρίς νοσηλεία, λόγω της πληθώρας προϊόντων που παρέχονται στην αγορά [1].

Βάσει στοιχείων του Παγκοσμίου Οργανισμού Υγείας (Π.Ο.Υ.), πάνω από 300.000 θάνατοι ετησίως, αποδίδονται σε τραυματισμούς που προκαλούνται από πυρκαγιά [3]. Ο ρυθμός της θνησιμότητας που προκαλείται από εγκαύματα, έχει μειωθεί τις δύο τελευταίες δεκαετίες λόγω της προόδου στον τομέα της αναγεννητικής ιατρικής. Ωστόσο, το ποσοστό θνησιμότητας εξακολουθεί να είναι πολύ υψηλό για ασθενείς που έχουν υποστεί έγκαυμα σε περισσότερο από το 70% της συνολικής επιφάνειας του σώματος τους [4]. Γίνεται λοιπόν κατανοητό ότι η ανάγκη για ανάπτυξη επιθεμάτων είναι επιτακτική.

Σκοπός της διατριβής

Σκοπός της παρούσας διατριβής ήταν η ανάπτυξη μεμβρανών υδροπηκτών με σκοπό τη χρήση τους σε βιοϊατρικές εφαρμογές και πιο συγκεκριμένα στον τομέα της επούλωσης τραυμάτων. Τα υλικά αυτά έχουν το πλεονέκτημα ότι μπορούν να χρησιμοποιηθούν τόσο σε ξηρή όσο και σε ενυδατωμένη κατάσταση, ανάλογα τις ανάγκες και τη φύση της πληγής (εκκρίσεις κ.τ.λ.) ενώ μπορούν να ενσωματωθούν (σε αυτά) διάφοροι βιοδραστικοί παράγοντες προσδίδοντας περαιτέρω ιδιότητες στα υλικά (αντιμικροβιακή δραστηριότητα κ.τ.λ.). Επίσης, πέραν των μελετών που σχετίζονται με τις βιοϊατρικές εφαρμογές των υλικών μελετήθηκαν οι αλληλεπιδράσεις μεταξύ των πρόδρομων ενώσεων που χρησιμοποιήθηκαν προς σχηματισμό των μεμβρανών (αν και τα συστήματα που περιγράφονται έχουν χρησιμοποιηθεί σε εφαρμογές συσκευασίας,

ανάπτυξη βρώσιμων υλικών κ.τ.λ., η κατανόηση των μοριακών αλληλεπιδράσεων είναι περιορισμένη). Οι συνθετικές πορείες των υδροπηκτών είναι οικονομικά συμφέρουσες, εύκολα εφαρμόσιμες σε μεγάλη κλίμακα και εναρμονισμένες με τις αρχές της «πράσινης» και βιώσιμης χημείας [5] σε βαθμό που δεν επηρεάζεται η ποιότητα των τελικών προϊόντων.

Δομή της διατριβής

Ακολουθεί περιληπτική περιγραφή της διατριβής ενώ στο σχήμα 1.1 αποτυπώνεται η δομή της σχηματικά.

Στο κεφάλαιο 2 περιγράφονται συνοπτικά τα χαρακτηριστικά του δέρματος ενώ γίνεται και μια σύντομη περιγραφή του μηχανισμού επούλωσης τραυμάτων. Επίσης πραγματεύεται η ανάγκη που προκύπτει για την ανάπτυξη επιθεμάτων, ταξινομούνται βάσει των χαρακτηριστικών τους και τέλος αναφέρονται τα χαρακτηριστικά που πρέπει ιδανικά να διαθέτουν.

Το κεφάλαιο 3 αναφέρεται στις υδροπηκτές και στις βιοϊατρικές τους εφαρμογές. Ακολουθεί βιβλιογραφική ανασκόπηση υδροπηκτών αποτελούμενων από φυσικά και συνθετικά πολυμερή και τέλος περιγράφονται οι φυσικές και χημικές μέθοδοι δημιουργίας σταυροδεσμών.

Στο κεφάλαιο 4 περιγράφονται συνοπτικά οι τεχνικές ενόργανης ανάλυσης που χρησιμοποιήθηκαν για το χαρακτηρισμό των υλικών.

Το κεφάλαιο 5 πραγματεύεται τη σύνθεση και το χαρακτηρισμό υδροπηκτών χιτοζάνης-ζελατίνης ιχθύων (τα τελικά υλικά κρίθηκαν ακατάλληλα για χρήση σε εφαρμογές επούλωσης λόγω της ψαθυρότητας και του υψηλού ρυθμού αποδόμησης που επέδειξαν).

Στο κεφάλαιο 6 περιγράφεται η ανάπτυξη και ο χαρακτηρισμός υδροπηκτών χιτοζάνης-ζελατίνης ιχθύων-γλυκερόλης. Στην ουσία αποτελεί μια προσπάθεια αριστοποίησης των συστημάτων του κεφαλαίου 5 (βελτίωση των μηχανικών ιδιοτήτων και του ρυθμού αποδόμησης).

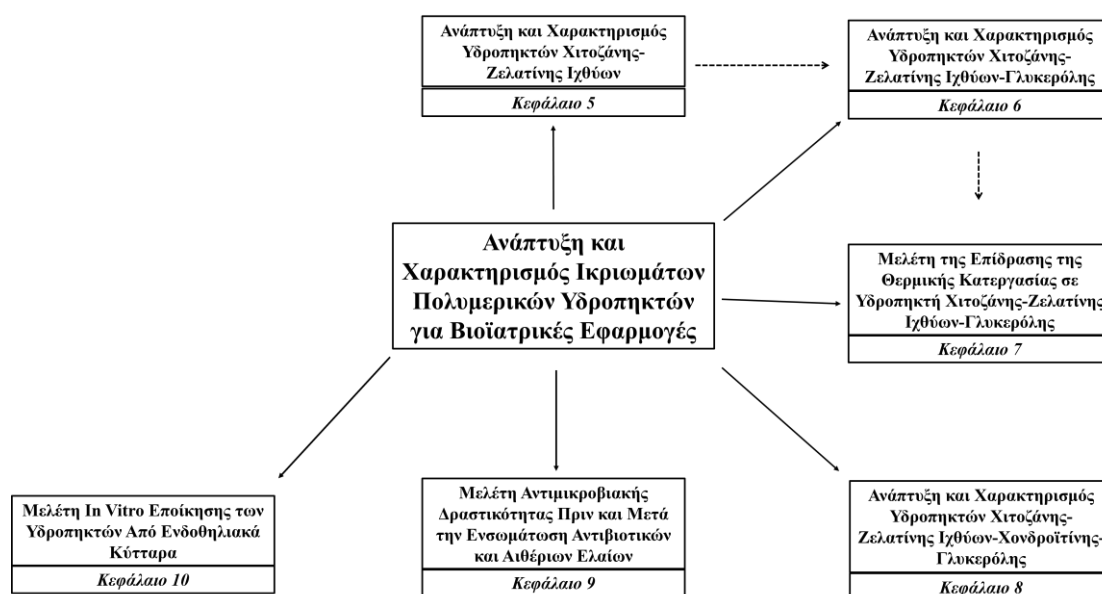
Το κεφάλαιο 7 πραγματεύεται την επίδραση της θερμικής κατεργασίας σε υδροπηκτική χιτοζάνης-ζελατίνης ιχθύων-γλυκερόλης η οποία πραγματοποιήθηκε με σκοπό τη βελτίωση μέρους των ιδιοτήτων υλικού του κεφαλαίου 6 (περαιτέρω βελτίωση του ρυθμού αποδόμησης και των μηχανικών ιδιοτήτων του υλικού).

Στο κεφάλαιο 8 περιγράφεται η ανάπτυξη και ο χαρακτηρισμός υδροπηκτών χιτοζάνης-ζελατίνης ιχθύων-χονδροϊτίνης-γλυκερόλης και πορώδους πολυμερικού ικριώματος ενώ πραγματοποιούνται και συγκρίσεις με τα υλικά του κεφαλαίου 6.

Στο κεφάλαιο 9 μελετάται η αντιμικροβιακή δραστηριότητα των υδροπηκτών πριν και μετά την ενσωμάτωση αντιβιοτικών και την εμφάνιση σε αιθέρια έλαια έναντι τριών μικροοργανισμών.

Το κεφάλαιο 10 πραγματεύεται την *in vitro* εποίκιση ενδοθηλιακών κυττάρων σε επιλεγμένα υλικά των κεφαλαίων 6, 7 και 8. Ουσιαστικά μελετήθηκε η επίδραση της συγκέντρωσης της ζελατίνης, της θερμικής κατεργασίας και της ενσωμάτωσης της χονδροϊτίνης στην κυτταρική προσκόλληση και στον κυτταρικό πολλαπλασιασμό.

Στο κεφάλαιο 11 διατυπώνονται τα συμπεράσματα που προέκυψαν από την παρούσα διατριβή ενώ αναπτύσσονται προτάσεις για μελλοντική έρευνα.

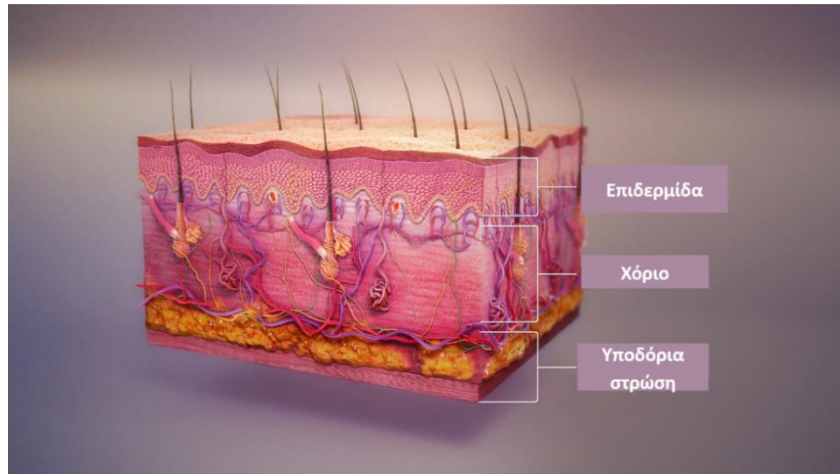


Σχήμα 1.1. Σχηματική απεικόνιση της δομής της διδακτορικής διατριβής.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2. ΔΕΡΜΑ ΚΑΙ ΕΠΙΘΕΜΑΤΑ ΕΠΟΥΛΩΣΗΣ ΤΡΑΥΜΑΤΩΝ

2.1.ΔΕΡΜΑ

Το δέρμα αποτελεί το μεγαλύτερο σε έκταση ανθρώπινο όργανο, καταλαμβάνει επιφάνεια περίπου 2 m^2 και ζυγίζει περίπου το 10 % της συνολικής μάζας του ανθρώπινου σώματος. Αποτελείται από μια σύνθετη δομή τριών στιβάδων, την επιδερμίδα, το χόριο και την υποδόρια στρώση [6,7]. Τα ανώτερα στρώματα της επιδερμίδας ή αλλιώς τα στρώματα κεράτινης στιβάδας, αποτελούν τον κύριο φραγμό αποτρέποντας οποιαδήποτε εξωτερική εισβολή μέσω διαδερμικής διείσδυσης, δρουν δηλαδή ως φυσική ασπίδα προστασίας του οργανισμού από εξωτερικούς παράγοντες. Η αμέσως επόμενη στιβάδα μετά την επιδερμίδα, είναι αυτή του χορίου, αποτελείται από μια μήτρα συνδετικών ιστών και προσδίδει στο δέρμα ελαστικότητα και αντοχή στην παραμόρφωση. Επίσης, περιέχει τα αιμοφόρα αγγεία, μέσω των οποίων μεταφέρονται τα απαραίτητα θρεπτικά συστατικά και το οξυγόνο σε όλα τα κύτταρα του οργανισμού και παράλληλα απομακρύνονται τα μεταβολικά απόβλητα αυτών (των κυττάρων), όπως και το διοξείδιο του άνθρακα [8]. Το τρίτο και τελευταίο στρώμα ονομάζεται υποδόρια στρώση, είναι υποδόριος λιπώδης ιστός που παρέχει θερμική μόνωση και μηχανική προστασία στο σώμα [9,10]. Συνοψίζοντας, το πολύπλοκο αυτό όργανο προστατεύει τα εσωτερικά όργανα από παθογόνους μικροοργανισμούς, μηχανικές και χημικές προσβολές, είναι υπεύθυνο για τη ρύθμιση και διατήρηση της θερμοκρασίας του σώματος, υποστηρίζει τα αιμοφόρα αγγεία και τα νεύρα, ενώ αποτρέπει την αφυδάτωση [11]. Επίσης, αποτρέπει την μεταβολή της συγκέντρωσης των βιολογικών υγρών στο σώμα, διατηρώντας την σταθερή (ομοιόσταση). Τέλος μια σημαντική λειτουργία του δέρματος είναι η ανοσολογική παρακολούθηση, που αποτελεί μια διαδικασία παρακολούθησης του ανοσοποιητικού συστήματος για την ανίχνευση και καταστροφή ιογενών, μολυσμένων και νεοπλασματικά μετασχηματισμένων κυττάρων στο σώμα [12-14].



Σχήμα 2.1. Σχηματική απεικόνιση των στιβάδων του δέρματος, της επιδερμίδας, του χορίου και της υποδόριας στρώσης [15].

2.2.ΜΗΧΑΝΙΣΜΟΣ ΕΠΟΥΛΩΣΗΣ ΤΡΑΥΜΑΤΩΝ

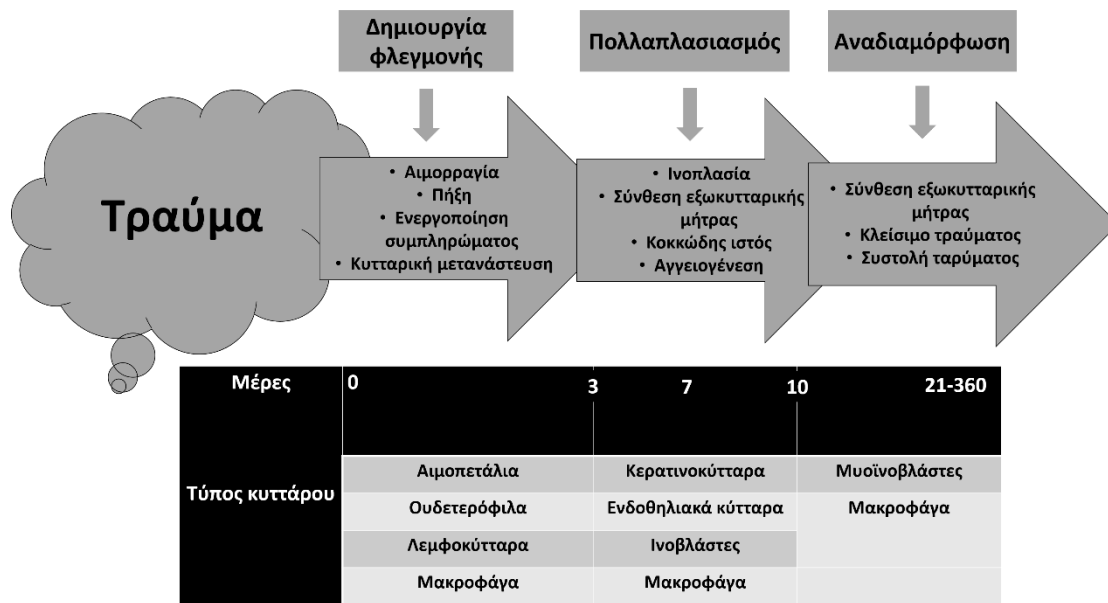
Υπό φυσιολογικές συνθήκες οι τρεις στιβάδες του δέρματος είναι εγγενώς αυτό-ανανεώσιμες, δηλαδή το ανθρώπινο σώμα έχει την ικανότητα να αποκαθιστά την ακεραιότητα τους μέσω μιας πολύπλοκης διαδικασίας [16]. Η επιδιόρθωση των επιδερμικών, επιφανειακών μερικού πάχους, βαθέων μερικού πάχους και πλήρους πάχους τραυμάτων αποτελεί μια από τις πιο περίπλοκες και διαδικασίες που λαμβάνουν χώρα στον οργανισμό [17-19]. Περιλαμβάνει πολύπλοκες αλληλεπιδράσεις μεταξύ της εξωκυτταρικής μήτρας (ECM), διαλυτών μεσολαβητών και διαφόρων τύπων κυττάρων (ινοβλάστες, κερατινοκύτταρα και υποτύπων λευκοκυττάρων). Όλα τα παραπάνω δρουν συνεργιστικά με σκοπό την αποκατάσταση της ακεραιότητας του κατεστραμμένου ιστού και την αντικατάσταση του ιστού που έχει χαθεί, με νέο [18,20,21].

Η διαδικασία αποκατάστασης του ιστού αποτελείται από μια αλληλουχία χρονικά εξαρτώμενων φάσεων, την αιμόσταση, την δημιουργία φλεγμονής, την μετανάστευση, τον πολλαπλασιασμό και την αναδιαμόρφωση της πληγής [18,22]. Οι φάσεις αυτές μπορούν να συνοψιστούν σε τρεις κύριες, δηλαδή την αιμόσταση και τη φλεγμονή (συνήθως ταξινομούνται μαζί), τον σχηματισμό νέου ιστού (ή τον πολλαπλασιασμό) και την αναδιαμόρφωση του [17,20].

Η πρώτη φάση αποτελείται από την πήξη και την αιμόσταση. Αν δεν υπάρχει σοβαρή αιμορραγία, η αιμόσταση επιτυγχάνεται αρχικά με την συσσώρευση αιμοπεταλίων ενώ στη συνέχεια εναποτίθεται μια ινώδης μήτρα δημιουργώντας ικρίωμα με σκοπό την διείσδυση των κυττάρων του δέρματος (αιμοπετάλια και ουδετερόφιλα). Ακολουθεί η δημιουργία φλεγμονής που αποτελεί μέρος μιας πολύπλοκης βιολογικής απόκρισης των ιστών του σώματος σε επιβλαβή ερεθίσματα, όπως παθογόνους οργανισμούς και κατεστραμμένα κύτταρα. Είναι μια προστατευτική απόκριση του οργανισμού όπου εμπλέκονται ανοσοκύτταρα και αιμοφόρα αγγεία [7,22-26]. Η φλεγμονώδης φάση ξεκινά σχεδόν ταυτόχρονα με την αιμόσταση, μερικές φορές μέσα σε λίγα λεπτά από τον τραυματισμό και διαρκεί από 24 ώρες έως και 3 ημέρες. Αποτελεί πολύ βασική διαδικασία καθώς εκτός του ότι προστατεύει την πληγή από παθογόνους μικροοργανισμούς, συμμετέχει και στην επιδιόρθωση του ιστού [18,22,27,28].

Στο δεύτερο στάδιο της επούλωσης, λαμβάνει χώρα ο πολλαπλασιασμός των κυττάρων όπου το κύτταρο αναπτύσσεται και διαιρείται παράγοντας δύο νέα κύτταρα. Η διαδικασία του πολλαπλασιασμού οδηγεί σε εκθετική αύξηση του αριθμού των κυττάρων, επομένως αποτελεί έναν γρήγορο μηχανισμό ανάπτυξης ιστού. Λαμβάνει χώρα μεταξύ της δεύτερης και δέκατης ημέρας μετά τον τραυματισμό, χαρακτηρίζεται από μετανάστευση των ινοβλαστών, εναπόθεση της εξωκυτταρικής μήτρας και σχηματισμό του κοκκώδους ιστού [17,20,22,29-33].

Η αναδιαμόρφωση της πληγής που αναφέρεται και ως φάση ωρίμανσης αποτελεί την τρίτη και τελευταία φάση της επουλωτικής διαδικασίας, ξεκινά δύο έως τρεις εβδομάδες μετά τον τραυματισμό και μπορεί να διαρκέσει από 21 μέρες έως και ένα ή δύο χρόνια. Αποτελεί τη μεγαλύτερη σε διάρκεια φάση, κατά την οποία λαμβάνει χώρα η σύνθεση κολλαγόνου προκειμένου να ενισχυθεί ο ιστός. Η αναδιαμόρφωση συμβαίνει καθώς η πληγή συνεχίζει να συστέλλεται και οι ίνες αναδιοργανώνονται [17,22-24].



Σχήμα 2.2. Σχηματική απεικόνιση των χρονικά εξαρτώμενων φάσεων που λαμβάνουν χώρα κατά την διαδικασία αποκατάστασης του ιστού.

2.3.ΑΝΑΓΚΗ ΓΙΑ ΕΠΙΘΕΜΑΤΑ ΕΠΟΥΛΩΣΗΣ ΤΡΑΥΜΑΤΩΝ

Η απώλεια της ακεραιότητας του δέρματος μπορεί να οφείλεται σε γενετικές διαταραχές, οξεία τραύματα προερχόμενα από ατυχήματα, χρόνιες πληγές (φλεβικές πληγές, πληγές που οφείλονται στο διαβήτη κ.τ.λ.) η ακόμη και σε πληγές που προέρχονται από χειρουργικές επεμβάσεις [3]. Η πιο κοινή αιτία απώλειας δερματικού ιστού είναι τα εγκαύματα. Μπορούν να προκαλέσουν εκτεταμένες και βαθιές πληγές, ικανές να επηρεάσουν την φυσιολογική λειτουργία του ανοσοποιητικού συστήματος του οργανισμού μέσω μολύνσεων, να αλλοιώσουν την εικόνα του σώματος δημιουργώντας ουλές ενώ μπορεί να προκληθεί και μεγάλη απώλεια βιολογικών υγρών. Όλα τα παραπάνω είναι πιθανό να οδηγήσουν σε σοβαρή αναπηρία ή ακόμη και σε θάνατο ασθενών [12,22,34]. Η διαδικασία της επούλωσης μπορεί να διακοπεί από μια σειρά παραγόντων, όπως τοπικοί παράγοντες (οξυγόνωση πληγής, λοίμωξη πληγής, βάθος πληγής κ.τ.λ.) και παράγοντες όπως η ηλικία, η φαρμακευτική αγωγή, το φύλο, οι ορμόνες του φύλου, το άγχος, η ισχαιμία, ασθένειες όπως ο διαβήτης, η παχυσαρκία, ο αλκοολισμός, το κάπνισμα ακόμη και η διατροφή [24,35-38].

Με βάση στοιχεία του Παγκοσμίου Οργανισμού Υγείας (Π.Ο.Υ.), πάνω από 300.000 θάνατοι ετησίως, αποδίδονται σε τραυματισμούς που προκαλούνται από

πυρκαγιά [3]. Ο ρυθμός της θνησιμότητας που προκαλείται από εγκαύματα, έχει μειωθεί τις δύο τελευταίες δεκαετίες λόγω της προόδου στον τομέα της αναγεννητικής ιατρικής. Ωστόσο, το ποσοστό θνησιμότητας εξακολουθεί να είναι πολύ υψηλό για ασθενείς που έχουν πάθει έγκαυμα σε περισσότερο από το 70% της συνολικής επιφάνειας του σώματος τους [4]. Από τα παραπάνω, γίνεται κατανοητό ότι η ανάγκη για ανάπτυξη επιθεμάτων είναι επιτακτική.

2.3.1. Επιθέματα επούλωσης τραυμάτων

Η διαχείριση των τραυμάτων πρέπει να γίνεται με τέτοιο τρόπο ώστε να ολοκληρώνεται η διαδικασία της επούλωσης στον ελάχιστο δυνατό χρόνο, αποτελεσματικά και προσφέροντας ένα καλό αισθητικά αποτέλεσμα (αποφυγή δημιουργίας ουλής) [39]. Για πολλά χρόνια, η διαχείριση των πληγών βασίστηκε στην κάλυψη της πληγής και τα υλικά που χρησιμοποιήθηκαν διέθεταν παθητικό ρόλο στην επουλωτική διαδικασία.

2.3.1.1. Αρχαία χρόνια

Στα αρχαία χρόνια χρησιμοποιήθηκε πληθώρα φυσικών προϊόντων για την ίαση τραυμάτων. Το 1600 π.Χ. χρησιμοποιούνταν λωρίδες λιναριού εμποτισμένες με λάδι ενώ στη Μεσοποταμία, το 2500 π.Χ. χρησιμοποιούνταν ταμπλέτες πηλού ως επουλωτικό μέσο. Ο καθαρισμός των πληγών πραγματοποιούνταν με νερό ή γάλα πριν εφαρμοστεί μέλι ή ρετσίνι στο τραύμα. Στην αρχαία Ελλάδα, από το 460-370 π.Χ., για την ίαση των τραυμάτων, χρησιμοποιούνταν κρασί ή ξύδι για τον καθαρισμό της πληγής πριν εφαρμοστεί μέλι, λάδι ή κρασί από τον Ιπποκράτη. Έχει επίσης αναφερθεί η χρήση μαλλιού εμποτισμένου με κρασί ως επίθεμα [40-42].

2.3.1.2. Νέα εποχή

Μέχρι το 1962, δεν υπήρχε αρκετό ενδιαφέρον από τους επιστήμονες στον τομέα της ανάπτυξης επιθεμάτων τραυμάτων. Θεωρούνταν ότι η επούλωση της πληγής ολοκληρώνεται ταχύτερα και πιο αποτελεσματικά, όταν παραμένει αφυδατωμένη και ακάλυπτη. Αυτό ίσχυε μέχρι να οριστούν τα χαρακτηριστικά που πρέπει ιδανικά να

διαθέτει ένα επίθεμα πληγής. Η πρωτοποριακή εργασία του Winter [43], το 1962 περιέγραψε την πρώτη γενιά επιθέματος και ανέφερε ότι ο ρυθμός επιθηλιοποίησης σε τραύμα χοίρου, ήταν διπλάσιος όταν χρησιμοποιήθηκε επίθεμα, σε σχέση με τραύμα χοίρου όπου ήταν ακάλυπτο και εκτεθειμένο. Έκτοτε, ο ρυθμός των ερευνών εκτινάχθηκε, υποδεικνύοντας ότι τα επιθέματα τραυμάτων πρέπει να διατηρούν την περιοχή της πληγής ενυδατωμένη, να είναι βιοσυμβατά και να προστατεύουν το τραύμα από βακτηριακές μολύνσεις, ώστε να επιταχύνεται η αναγέννηση του δερματικού ιστού. Τη δεκαετία του 1980, τα επιθέματα τραυμάτων ταξινομήθηκαν ανάλογα με το βαθμό ενυδάτωσης τους, σε ξηρά και υγρά. Τα ξηρά επιθέματα θεωρούνταν ιδανικά για την επούλωση πληγών μέχρι τα μέσα της δεκαετίας του 1970. Η βαμβακερή γάζα ή μίγματα τεχνητού μεταξιού με πολυεστέρα ή βαμβάκι, ήταν τα πιο διαδεδομένα επιθέματα στην αγορά [44].

2.4.ΤΑΞΙΝΟΜΗΣΗ ΕΠΙΘΕΜΑΤΩΝ ΕΠΟΥΛΩΣΗΣ ΤΡΑΥΜΑΤΩΝ

Τα επιθέματα που χρησιμοποιούνται για την επούλωση τραυμάτων, αναφέρονται και ως τεχνητό δέρμα, πρέπει να διαθέτουν τις ιδιότητες του φυσικού δερματικού ιστού ώστε να επιταχύνεται η αποκατάσταση της τραυματισμένης ή κατεστραμμένης περιοχής του δέρματος. Ταξινομούνται σε παραδοσιακά, βιολογικά και τεχνητά επιθέματα [9,45].

2.4.1. Παραδοσιακά επιθέματα

Το πιο διάσημο παράδειγμα αυτής της κατηγορίας επιθεμάτων, είναι τα σύνθετα υλικά βαμβακερής γάζας που ήταν διαθέσιμα στην αγορά μέχρι τα μέσα της δεκαετίας του 1970 [44]. Τα υλικά αυτά χαρακτηρίζονταν από χαμηλό κόστος, ευκολία στην χρήση και απλή διαδικασία παραγωγής. Όμως, τα μειονεκτήματα που διέθεταν, οδήγησαν στον περιορισμό της χρήσης τους. Μπορεί μετά την εφαρμογή τους το μέγεθος της πληγής να μειώνονταν οπτικά αλλά η υψηλή και ανεξέλεγκτη προσροφητική ικανότητα των βαμβακερών γαζών προκαλούσε ταχεία απομάκρυνση των εκκρίσεων, οδηγώντας σε αφυδάτωση της πληγής, προάγοντας τις βακτηριακές μολύνσεις, δυσχεραίνοντας έτσι την επούλωση. Οι μολύνσεις προκαλούσαν προβλήματα στην βιωσιμότητα των κυττάρων, αποτρέποντας την

επαναφορά/επούλωση του κατεστραμμένου ιστού. Επιπρόσθετα ο Winter [43] ανέφερε ότι μερικές φορές η χρήση ξηρών επιθέματων, δημιουργεί ένα στρώμα ξηρού δέρματος η οποία μειώνει τον ρυθμό επιθηλίωσης και συνάμα τον ρυθμό επούλωσης [9,43].

Επομένως, οι βαμβακερές γάζες που είχαν κατακλείσει την αγορά, μπήκαν στο περιθώριο διότι: 1) δεν παρείχαν προστασία από παθογόνους μικροοργανισμούς, 2) προκαλούσαν πόνο στους ασθενείς κατά την αφαίρεση λόγω της προσκόλλησης στο τραύμα. 3) λόγω της χαμηλής διαπερατότητας αερίων, δεν ήταν κατάλληλα για χρήση σε χρόνια τραύματα και 4) διατηρούσαν το τραύμα ξηρό, μειώνοντας το ρυθμό επιθηλίωσης και τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό [9].

Αργότερα για την βελτίωση των χαρακτηριστικών των προαναφερθέντων υλικών επιχειρήθηκε η ενσωμάτωση μιας μη προσκολλητικής επιφάνειας στην γάζα με σκοπό την μείωση του πόνου, την αποφυγή αιμορραγίας και την ελαχιστοποίηση της καταστροφής του αναγεννημένου ιστού κατά την απομάκρυνση του επιθέματος από την πληγή. Στη συνέχεια αναπτύχθηκαν και σύνθετα υλικά βαμβακερής γάζας ώστε να καλύπτουν όλες τις απαιτήσεις των επιθέματων, που ήταν επικαλυμμένα με χιτοζάνη, άργυρο και οξείδιο του ψευδαργύρου [46] ενώ τα αποτελέσματα από τη μελέτη του των υλικών, επέδειξαν αυξημένη ικανότητα απορρόφησης νερού και βελτιωμένη αντιμικροβιακή δραστηριότητα ενάντια στους παθογόνους μικροοργανισμούς *Escherichia coli* και *Staphylococcus aureus* [9,46].

2.4.2. Βιολογικά επιθέματα

Τα βιολογικά επιθέματα χαρακτηρίζονται ως τα πιο κατάλληλα για ολοκληρωτική επούλωση χρόνιων πληγών με μεγάλο βάθος. Η μέθοδος αυτή βασίζεται στην δωρεά φυσιολογικού δερματικού ιστού από άλλον οργανισμό (άνθρωπο, ζώο κ.τ.λ.). Το βασικό μειονέκτημα αυτής της μεθόδου είναι η δυσκολία εύρεσης δότη, επειδή μπορεί να χρειαστεί μεγάλο τμήμα δερματικού ιστού [47].

2.4.3. Τεχνητά επιθέματα

Τα επιθέματα τεχνητού δέρματος συντίθενται από υλικά που μπορεί να μην υπάρχουν στα συστατικά του δέρματος [48]. Τα συστατικά από τα οποία αποτελείται το τεχνητό δέρμα θα πρέπει να είναι μηχανικά σταθερά, βιοσυμβατά και

βιοαποικοδομήσιμα, παρέχοντας ταυτόχρονα ένα κατάλληλο περιβάλλον που να προάγει την αποκατάσταση του ιστού. Υπάρχουν τεράστιες απαιτήσεις για υλικά πολυμερικών μεμβρανών, με σκοπό τη χρήση τους ως επιθέματα επούλωσης. Τα πολυμερικά επιθέματα χρησιμοποιούνται σε διάφορες μορφές, όπως υμένα, αφροί, υδροπηκτές, αλγινικά και υδροκολλοειδή [9].

2.5.ΙΔΑΝΙΚΑ ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΤΙΚΑ ΕΠΙΘΕΜΑΤΩΝ ΤΡΑΥΜΑΤΩΝ

Τα τελευταία χρόνια, οι μέθοδοι διαχείρισης των τραυμάτων έχουν εξελιχθεί αρκετά λόγω της βαθύτερης κατανόησης των μοριακών και κυτταρικών διεργασιών που λαμβάνουν χώρα κατά την διαδικασία της επούλωσης αλλά και των παραγόντων που την αποτρέπουν ή την παρεμποδίζουν. Κατά συνέπεια, ο σχεδιασμός και η λειτουργικότητα των επιθεμάτων έχει στραφεί προς την δημιουργία πολύ-λειτουργικών υλικών [49]. Οι πληγές είναι ανόμοιες ως προς τη φύση τους και τα χαρακτηριστικά τους και εξαρτώνται από πληθώρα παραγόντων, όπως η προέλευση (έγκαυμα, χειρουργική επέμβαση, τομή κ.τ.λ.), η κατάσταση της υγείας του ατόμου και η εκδήλωση λοίμωξης κ.τ.λ. [49]. Κατά συνέπεια, οι απαιτήσεις του τραύματος για κάποιο επίθεμα πληγής, εξαρτώνται πλήρως από το είδος της. Ωστόσο ορισμένα κοινά χαρακτηριστικά που πρέπει ιδανικά να διαθέτουν τα επιθέματα συνοψίζονται στον Πίνακα. 2.1.

Τα περισσότερα από τα αναφερόμενα χαρακτηριστικά εξαρτώνται από τα εγγενή χαρακτηριστικά των πρόδρομων ενώσεων που οδηγούν στην ανάπτυξη του τελικού προϊόντος. Τα σύγχρονα επιθέματα πρέπει να είναι βιοσυμβατά, μη κυτταροτοξικά, να μη δημιουργούν φλεγμονή, να διαθέτουν ρυθμό αποδόμησης ανάλογο με το ρυθμό δημιουργίας νέου ιστού, να απελευθερώνουν ενσωματωμένα βιοδραστικά συστατικά και να αποτρέπουν/αντιμετωπίζουν πιθανές λοιμώξεις [50,51].

Πίνακας 2.1. Χαρακτηριστικά που πρέπει να διαθέτουν τα επιθέματα επούλωσης τραυμάτων [49].

Φυσικά	Χημικά	Τεχνολογικά
-Διατήρηση υγρού περιβάλλοντος γύρω από την πληγή	-Βιοσυμβατό	-Συμφέρουσα οικονομικά σύνθεση
-Διαπερατότητα σε νερό και αέρια	-Κατάλληλος ρυθμός αποδόμησης	-Επαναληψιμότητα σύνθεσης υλικού
-Απορρόφηση εκκρίσεων και αίματος από την πληγή	-Μη-τοξικό	-Μηχανική σταθερότητα
-Μηχανική προστασία τραύματος	-Μη φλεγμονώδες	-Εύκολη αποστείρωση
-Ευκολία προσαρμογής σε όλους τους τύπους πληγών και σε όλα τα σημεία του σώματος	-Μη αλλεργιογόνο	-
-Προστασία από επιβλαβείς/μολυσματικούς παράγοντες	-Αντιμικροβιακή δραστηριότητα	-
-Διατήρηση θερμοκρασίας	-	-
-Εύκολη εφαρμογή και απομάκρυνση με ελάχιστη συχνότητα	-	-

Η βασικότερη ιδιότητα που απαιτείται να διαθέτουν τα επιθέματα τραυμάτων και ειδικά αυτά που προορίζονται για πληγές εγκαυμάτων, είναι η ικανότητα απορρόφησης και κατακράτησης νερού. Για αυτόν τον τύπο βλάβης, είναι απαραίτητο να διατηρείται το τραύμα ενυδατωμένο, να απορροφώνται οι εκκρίσεις του και να επιταχύνεται η διαδικασία επούλωσης αποφεύγοντας την κυτταρική αφυδάτωση ώστε να προάγεται η σύνθεση του κολλαγόνου και η αγγειογένεση [52]. Η κατάλληλη ενυδάτωση αυξάνει τον ρυθμό επούλωσης, προστατεύει την πληγή από μολύνσεις και μειώνει τον πόνο [53]. Είναι επίσης γνωστό ότι οι εκκρίσεις, προκαλούν διαχωρισμό στα στρώματα του ιστού της πληγής, με αποτέλεσμα να μειώνεται ο ρυθμός της επούλωσης [49]. Γι'αυτό, οι εκκρίσεις πρέπει να απομακρύνονται από το σημείο του τραύματος χρησιμοποιώντας κατάλληλο επίθεμα με ικανότητα αποστράγγισης.

Ωστόσο, είναι σημαντικό για την πληγή να διατηρείται ενυδατωμένη σε κάποιο βαθμό ώστε να διευκολύνεται η διαδικασία της επούλωσης. Η ικανότητα διατήρησης της υγρασίας εμποδίζει την προσκόλληση του επιθέματος στο τραύμα, προστατεύοντας έτσι τον ιστό και μειώνοντας τον πόνο που προκαλείται κατά τη διάρκεια της αλλαγής του επιθέματος [54]. Στα ξηρά τραύματα ενδείκνυται η χρήση επιθέματων με χαμηλό ρυθμό εξάτμισης, ενώ στα τραύματα με αυξημένες εκκρίσεις προτείνεται το επίθεμα να διαθέτει υψηλό ρυθμό εξάτμισης. Επομένως, το επίθεμα πρέπει να εξισορροπεί τον ρυθμό απορρόφησης και απελευθέρωσης υγρών. Επιπροσθέτως, τα επιθέματα πρέπει να επιτρέπουν την απελευθέρωση φαρμάκων και άλλων βιοδραστικών ενώσεων με τις οποίες είναι εμποτισμένο το υλικό [55]. Από την άλλη πλευρά, ο πλήρης περιορισμός της εξάτμισης του υγρού πρέπει να αποφεύγεται, καθώς η συσσώρευση υγρών κάτω από το επίθεμα μπορεί να οδηγήσει στη δημιουργία λοίμωξης [49]. Έχει αναφερθεί ότι ο ρυθμός μετάδοσης υδρατμών (WVTR) από το δέρμα εξαρτάται από τον τύπο του τραύματος και το στάδιο της επούλωσης. Στο υγιές δέρμα, ο ρυθμός μετάδοσης υδρατμών έχει υπολογιστεί σε $WVTR=204 \text{ g m}^{-2} \text{ day}^{-1}$. Για εγκαύματα 1^{ου} βαθμού, ο ρυθμός μετάδοσης υδρατμών είναι $WVTR=278 \text{ g m}^{-2} \text{ day}^{-1}$, ενώ για τα τραύματα που βρίσκονται σε φάση κοκκοποίησης, είναι $WVTR=5138\pm 202 \text{ g m}^{-2} \text{ day}^{-1}$ [56-58]. Θεωρείται ότι το επίθεμα συγκρατεί την υγρασία όταν ο ρυθμός μετάδοσης υδρατμών είναι μικρότερος από $840 \text{ g m}^{-2} \text{ day}^{-1}$ [49]. Ο υψηλός ρυθμός μετάδοσης υδρατμών αυξάνει τον ρυθμό αφυδάτωσης του τραύματος, προκαλώντας τον σχηματισμό ουλής. Αντίθετα, ο χαμηλός ρυθμός μετάδοσης συμβάλλει στην συσσώρευση εκκρίσεων στην περιοχή του τραύματος παρεμποδίζοντας την διαδικασία της επούλωσης, προκαλώντας λοίμωξη στην περιοχή του τραύματος [59]. Επομένως, οι φυσικοχημικές ιδιότητες του επιθέματος πρέπει να προσαρμόζονται στον τύπο του τραύματος και στον βαθμό εξίδρωσης (εκκρίσεις) [49]. Το επίθεμα πρέπει επίσης να παρέχει φυσιολογική θερμοκρασία στο δέρμα, βελτιώνοντας την ροή του αίματος στην περιοχή του τραύματος, προάγοντας έτσι την επιδερμική κυτταρική μετανάστευση [18]. Η βέλτιστη κυτταρική λειτουργία επιτυγχάνεται διατηρώντας μια θερμοκρασία συγκρίσιμη με εκείνη του ανθρώπινου σώματος. Η υποθερμία οδηγεί σε αγγειοσυστολή και σε μείωση της παροχής οξυγόνου στα φαγοκύτταρα, παρεμποδίζοντας την διαδικασία της μίτωσης και την απελευθέρωση αυξητικών παραγόντων [60]. Το οξυγόνο αποτελεί επίσης κρίσιμο στοιχείο για την επούλωση πληγής. Υπό υποξικές συνθήκες, μειώνεται ο ρυθμός της επούλωσης λόγω παρεμπόδισης των διαδικασιών της κοκκοποίησης και

της επιθηλίωσης. Ως εκ τούτου, μια επιθυμητή μορφολογία και η ικανότητα διατήρησης της υγρασίας στο σημείο του τραύματος κρίνονται απαραίτητα για την ταχύτερη και βέλτιστη επούλωση πληγής [61].

Μια επίσης σημαντική ιδιότητα που πρέπει να διαθέτουν τα επιθέματα επούλωσης πληγών είναι η αποτροπή δημιουργίας αποικίας μολυσματικών μικροοργανισμών ή η καταπολέμηση των ήδη εγκατεστημένων στο τραύμα. Σε υγιή άτομα, η μόλυνση αποφεύγεται με ενεργοποίηση του ανοσοποιητικού συστήματος: τα μακροφάγα κύτταρα μεταναστεύουν στην περιοχή του τραύματος και στη συνέχεια πραγματοποιείται η φαγοκυττάρωση των παθογόνων μικροοργανισμών [49]. Ωστόσο, εάν το ανοσοποιητικό σύστημα δεν μπορεί να τους εξαλείψει, ακολουθεί μόλυνση στην περιοχή του τραύματος. Η μόλυνση οδηγεί στην παρεμπόδιση της δημιουργίας του ιστού κοκκοποίησης, της απελευθέρωσης αυξητικών παραγόντων και των συστατικών της εξωκυτταρικής μήτρας (κολλαγόνο, ελαστίνη), παρεμποδίζοντας την φυσιολογική διαδικασία επούλωσης [49,62]. Επομένως, τα επιθέματα θα πρέπει να διαθέτουν την ικανότητα ενσωμάτωσης βιοδραστικών παραγόντων και ελεγχόμενης αποδέσμευσης τους τόσο χωρικά όσο και χρονικά [49,63].

Τα τεχνολογικά χαρακτηριστικά των επιθεμάτων είναι άλλος ένας παράγοντας που πρέπει να ληφθεί υπόψη. Η συνθετική διαδικασία των επιθεμάτων πρέπει να είναι απλή, γρήγορη και οικονομικά συμφέρουσα. Πρέπει επίσης να παρέχουν μηχανική σταθερότητα στο τραύμα, να αποστειρώνονται εύκολα [49] και ο ρυθμός αποδόμησης των υλικών να ταιριάζει με τις ιδιότητες του τραύματος που θα εφαρμοστεί.

Από τα προαναφερόμενα γίνεται κατανοητό ότι δεν είναι δυνατό να υπάρξει ένα και μοναδικό επίθεμα τραύματος, που να διαθέτει όλα τα επιθυμητά χαρακτηριστικά. Ως εκ τούτου, ανάλογα το είδος του τραύματος και το στάδιο της επούλωσης, πρέπει να εφαρμόζεται και το ανάλογο επίθεμα.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3. ΥΔΡΟΠΗΚΤΕΣ

3.1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ

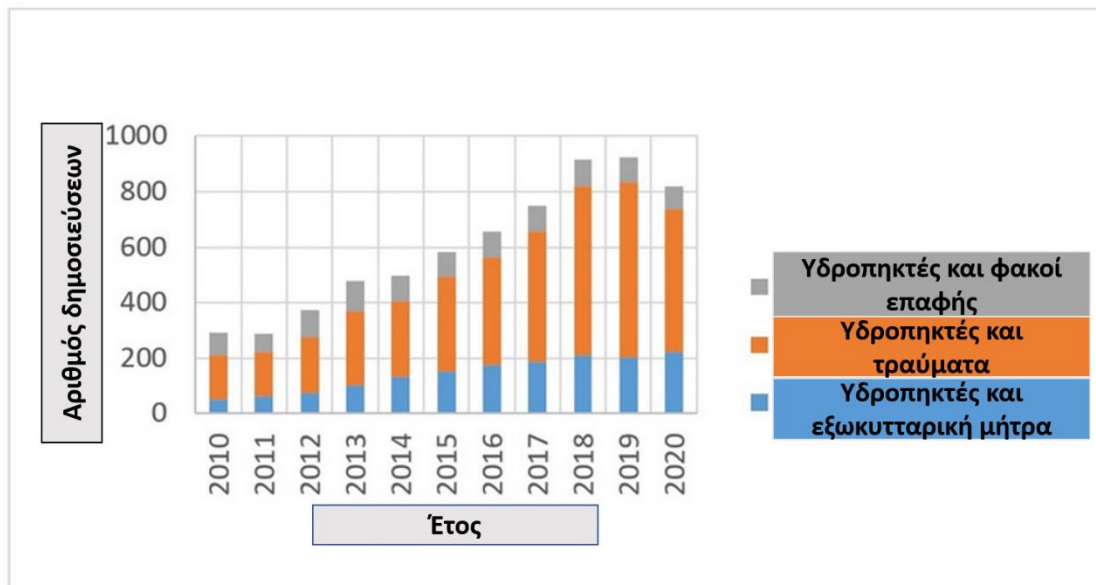
Οι υδροπηκτές, είναι εξαιρετικά υδρόφιλα μακρομοριακά δίκτυα, που συντίθενται μέσω χημικής ή φυσικής δημιουργίας σταυροδεσμών. Λόγω των ιδιαίτερων ιδιοτήτων που διαθέτουν όπως, η υψηλή ευαισθησία σε φυσιολογικά περιβάλλοντα, η υδρόφιλη φύση τους, η παρόμοια περιεκτικότητα τους σε νερό με τους μαλακούς ιστούς και η ευκαμψία που διαθέτουν, τις καθιστούν ως εξαιρετικά υλικά για χρήση σε βιοϊατρικές εφαρμογές. Διαθέτουν την ιδιότητα ρόφησης και εκρόφησης νερού ενώ αποκρίνονται διαφορετικά ανάλογα τις συνθήκες. Η διαφορετική αυτή φυσιολογική απόκριση των υδροπηκτών σε μεταβολή συγκεκριμένων συνθηκών τις καθιστά ως μια εξαιρετική επιλογή σε πληθώρα βιοϊατρικών εφαρμογών [9,64,65].

Έχει αναπτυχθεί ευρύ φάσμα υδροπηκτών με βάση φυσικά και συνθετικά πολυμερή ή συνδυασμό των δύο με σκοπό να χρησιμοποιηθούν στην μηχανική των ιστών [66], την μεταφορά φαρμάκων [67] και την επεξεργασία λυμάτων [68-70]. Οι διογκωμένες υδροπηκτές είναι μαλακά υλικά ικανά να μιμούνται τις μηχανικές ιδιότητες των ζωικών ιστών και προτιμώνται σε εφαρμογές αναγεννητικής ιατρικής [71]. Χρησιμοποιούνται σε βιοϊατρικές εφαρμογές με διάφορες μορφές, συμπεριλαμβανομένων ικριωμάτων [72,73], ενέσιμων υδροπηκτών [74], νανοπηκτές (δηλ. νανοσωματίδια υδροπηκτών) [75], μικροπηκτές και μικροσφαιρίδια (π.χ. για ενθυλάκωση κυττάρων ή θεραπευτικών παραγόντων) [76], νανοϊνες [77] και μεμβράνες, γνωστές ως μεμβράνες υδροπηκτών [78]. Οι μεμβράνες αποτελούν φραγμούς που επιλεκτικά επιτρέπουν ή εμποδίζουν την διείσδυση ουσιών ή μικροοργανισμών. Η διαδικασία αυτή εξαρτάται κυρίως από το αν υπάρχουν πόροι, το μέγεθος των πόρων και τις πρόδρομες ενώσεις που αποτελούνται οι μεμβράνες [79]. Χρησιμοποιούνται ευρέως για επεξεργασία λυμάτων, για διαχωρισμό αερίων όπως επίσης και σε ιατρικές και φαρμακευτικές εφαρμογές. Υπάρχουν εμπορικά διαθέσιμες μεμβράνες αποτελούμενες από συνδυασμό υδρόφοβων πολυμερών και κεραμικών για επεξεργασία νερού και διάφορες άλλες εφαρμογές [78]. Οι πολυμερικές μεμβράνες είναι φτιαγμένες από φυσικά, συνθετικά πολυμερή ή συνδυασμό των δύο. Μπορεί να διαθέτουν πορώδη ή μη πορώδη δομή. Αν διαθέτουν πορώδες, τότε ο διαχωρισμός γίνεται βάσει του μεγέθους των πόρων, ενώ όταν η δομή είναι μη πορώδης τότε ο

διαχωρισμός βασίζεται στη διαλυτότητα και στην διαφορετική διάχυση των μορίων [79]. Οι μεμβράνες υδροπηκτών συνδυάζουν τις ιδιότητες των λεπτών μεμβρανών με τις μηχανικές ιδιότητες και την απορρόφηση νερού των πολυμερικών υδροπηκτών [78]. Ο ρυθμός διάχυσης των μορίων που διαπερνούν τις υδροπηκτές εξαρτάται από το μέγεθός και τη φύση τους (υδρόφιλα/υδρόφοβα). Αυτά τα χαρακτηριστικά, καθιστούν τις μεμβράνες υδροπηκτών, υποσχόμενα υλικά για πλήθος εφαρμογών [80]. Οι μεμβράνες υδροπηκτών μπορούν να χρησιμοποιηθούν σε εφαρμογές απορρόπανσης, ως επιστρώσεις με αντιμικροβιακές ιδιότητες, ως υποστρώματα για κυτταρικές καλλιέργειες και σε εφαρμογές επούλωσης πληγών [78].

3.2. ΒΙΟΪΑΤΡΙΚΕΣ ΕΦΑΡΜΟΓΕΣ ΥΔΡΟΠΗΚΤΩΝ

Οι Wichterle και Lim [81], το 1960, ήταν οι πρώτοι που εισήγαγαν την χρήση των υδροπηκτών σε βιοϊατρικές εφαρμογές, δημοσιεύοντας μια επιστημονική εργασία όπου αναφέρεται η σύνθεση υδροπηκτής χρησιμοποιώντας (υδροξυαιθυλ)μεθακρυλικό εστέρα (HEMA) και διμεθυλακρυλική αιθυλενογλυκόλη (EGDMA), που στη συνέχεια χρησιμοποιήθηκε ως φορέας φαρμάκων, απορροφήσιμα ράμματα και για την παραγωγή φακών επαφής [82]. Το 1980, οι Lin και Sun, αναφέρουν την σύνθεση μικροκαψουλών αλγινικού ασβεστίου, δοκιμάζοντας τις για τη ρύθμιση του διαβήτη σε ποντίκια (χρήση ως τεχνητό πάγκρεας) [83]. Ακολούθησε η δημοσίευση της πατέντας της ομάδας του Yanna, το 1981, όπου αναφέρεται η σύνθεση υλικού αποτελούμενου από κολλαγόνο και πολυσακχαρίτες, με σκοπό την χρήση του σε εφαρμογές ίασης τραυμάτων [84]. Έκτοτε, οι πολυμερικές υδροπηκτές έχουν εγείρει το ενδιαφέρον πολλών ερευνητικών ομάδων που ασχολούνται με το αντικείμενο των βιοϋλικών και όπως παρατηρείται από το Σχήμα 3.1, την τελευταία δεκαετία το ενδιαφέρον για την ανάπτυξη υδροπηκτών, κυρίως στον τομέα ανάπτυξης επιθεμάτων, έχει κορυφωθεί.



Σχήμα 3.1. Δημοσιεύσεις που αφορούν υδροπηκτές για βιοϊατρικές εφαρμογές (Ιανουάριος 2010-Σεπτέμβριος 2020) [85].

Η χρήση των υδροπηκτών σε βιοϊατρικές εφαρμογές ήταν επαναστατική καθώς διευκόλυνε τη σύνθεση επιθεμάτων αποτελώντας το βασικότερο βήμα για την μετάβαση από παθητικά επιθέματα σε πολυλειτουργικά υλικά. Νωρίτερα, έως τη δεκαετία του 1960, τα επιθέματα ήταν παθητικά υλικά με μηδαμινό ρόλο στην επουλωτική διαδικασία [9]. Ο Winter [43], το 1962, εισήγαγε την πρώτη γενιά πολυμερικών επιθεμάτων κατάλληλων για επούλωση τραυμάτων. Στα μέσα της δεκαετίας του 1970, υπήρξε έντονο ενδιαφέρον ανάπτυξης και μελέτης συστημάτων πολυμερικών μεμβρανών με σκοπό την δημιουργία σύνθετων υλικών για χρήση ως επιθέματα. Το 1978, αναπτύχθηκαν αρκετά πολυμερικά υλικά με βάση την χιτίνη και αποτέλεσαν τα πρώτα επιθέματα τραυμάτων, λόγω των ελκυστικών ιδιοτήτων τους, υποδεικνύοντας ότι τα πολυμερή αποτελούν εξαιρετική επιλογή για την ανάπτυξη επιθεμάτων [9,86].

Η ερευνητική τάση ως προς την ανάπτυξη πολυμερικών υδροπηκτών με σκοπό τη χρήση τους ως προσωρινά επιθέματα επούλωσης, αποτελούσε πλέον κύριο εμπορικό στόχο. Αυτό είχε σαν αποτέλεσμα την εμφάνιση κάποιων εμπορικών προϊόντων υδροπηκτών όπως το Geliper[®], το Curasol[®] και το Tegagel[®] [87,88].

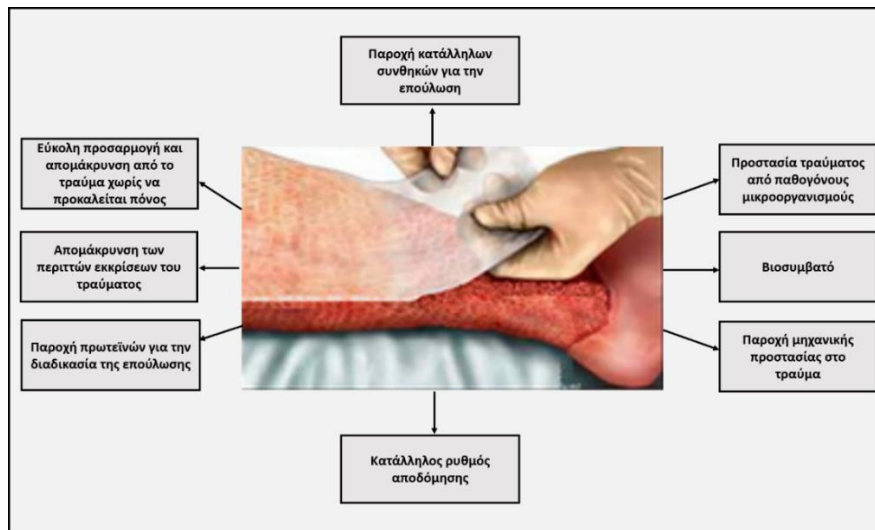


Σχήμα 3.2. Απεικόνιση του προϊόντος Geliperm® [89] (αριστερά) και της ομάδας προϊόντων Curasol® [90] (δεξιά).

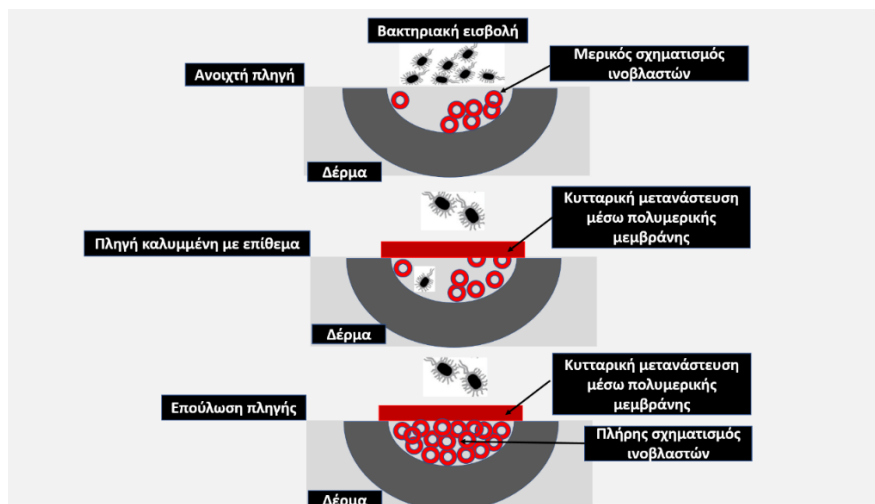
Οι υδροπηκτές πληρούν όλα τα κριτήρια που πρέπει να διαθέτει ένα επίθεμα επούλωσης τραύματος. Μπορούν να χρησιμοποιηθούν σε ασθενείς που πάσχουν από εγκαύματα μειώνοντας τον χρόνο επούλωσης σημαντικά διότι: (1) ελέγχουν τις εκκρίσεις του τραύματος, (2) διατηρούν το περιβάλλον του τραύματος υγρό (3) είναι βιοσυμβατές και 4) με ικανότητα ενσωμάτωσης βιοδραστικών παραγόντων μέσω της διαδικασίας δημιουργίας πηκτής. Οι βιοδραστικοί παράγοντες απελευθερώνονται στο τραύμα μέσω της απορρόφησης των εκκρίσεων του από την υδροπηκτική, ύστερα από την επαφή του επιθέματος με την πληγή. Η περιεκτικότητα των υλικών αυτών σε νερό είναι παρόμοια με αυτή των μαλακών ιστών παρέχοντας την απαιτούμενη ελαστικότητα και ευελιξία προσαρμογής του επιθέματος σε πληγές που βρίσκονται σε διάφορα σημεία του σώματος [9].

Όπως προαναφέρθηκε, η διαδικασία της επούλωσης ολοκληρώνεται ταχύτερα και πιο αποτελεσματικά με την χρήση ενυδατωμένων επιθεμάτων σε σχέση με τα ξηρά επιθέματα. Με τη χρήση ενυδατωμένων επιθεμάτων, σχηματίζεται ο νέος ιστός, χωρίς να προκαλείται ξηροδερμία ή φλεγμονή [43]. Τα επιθέματα υδροπηκτών, είναι κατάλληλα για την επιδιόρθωση τραυματισμένου δερματικού ιστού, λόγω της υψηλής απορροφητικής τους ικανότητας και της ελεγχόμενης διατήρησής του νερού. Ένα επίθεμα τραύματος πρέπει να πληροί τα ακόλουθα χαρακτηριστικά: 1) να διατηρεί υγρή την περιοχή γύρω από το τραύμα, 2) να διαθέτει ιδανικό ρυθμό μετάδοσης υδρατμών, 3) να απομακρύνει τις περιττές εκκρίσεις αποτρέποντας την πλήρη απομάκρυνσή τους, 4) να προστατεύει την πληγή από παθογόνους μικροοργανισμούς και άλλους πιθανούς μολυσματικούς παράγοντες, 5) να μειώνει την νέκρωση στην

επιφάνεια της πληγής, 6) να διεγείρει την ανάπτυξη των αυξητικών παραγόντων, 7) να παρέχει μηχανική προστασία στο τραύμα, 8) να αφαιρείται εύκολα κατά την αλλαγή, χωρίς να προκαλεί πόνο, 9) να είναι μη αλλεργικό, μη τοξικό και βιοσυμβατό ελαστικό 10) να συνεισφέρει στην μείωση του πόνου και 11) να είναι οικονομικό και να αποστειρώνεται εύκολα [91].



Σχήμα 3.3. Εφαρμογή υδροπηκτής σε τραυματισμένη επιφάνεια και αναφορά των χαρακτηριστικών που πρέπει να διαθέτει [92].



Σχήμα 3.4. Σχηματική απεικόνιση του ρόλου της μεμβράνης υδροπηκτής ως ασπίδα προστασίας από βακτήρια και υποστήριξη της μετανάστευσης των ινοβλαστών.

Τα περισσότερα πολυμερικά επιθέματα διαθέτουν αρκετά πλεονεκτήματα, ωστόσο, οι υδροπηκτές αποτελούν την καλύτερη επιλογή σε σύγκριση με τα υπόλοιπα διότι συγκεντρώνουν τα περισσότερα επιθυμητά χαρακτηριστικά που πρέπει να διαθέτουν τα επιθέματα επούλωσης τραυμάτων. Ένα βασικό μειονέκτημα των υδροπηκτών είναι οι χαμηλές μηχανικές ιδιότητες όταν έχουν απορροφήσει νερό. Αυτό μπορεί να αντιμετωπιστεί συνδυάζοντας περισσότερα από ένα πολυμερή για τη δημιουργία του επιθέματος. Οι υδροπηκτές συντίθενται συνήθως μέσω χημικών ή φυσικών αλληλεπιδράσεων μεταξύ των πολυμερικών αλυσίδων και κάποιου διασταυρωτή. Η δημιουργία σταυροδεσμών μπορεί να είναι είτε χημική (μέσω ομοιοπολικού δεσμού) είτε φυσική (μέσω ηλεκτροστατικών αλληλεπιδράσεων, δεσμών υδρογόνου κ.τ.λ.). Αφού δημιουργηθεί δίκτυο, οι υδροπηκτές έχουν την ικανότητα να προσροφούν νερό αρκετές φορές περισσότερο από το βάρος τους, χωρίς να διαλύονται [9].

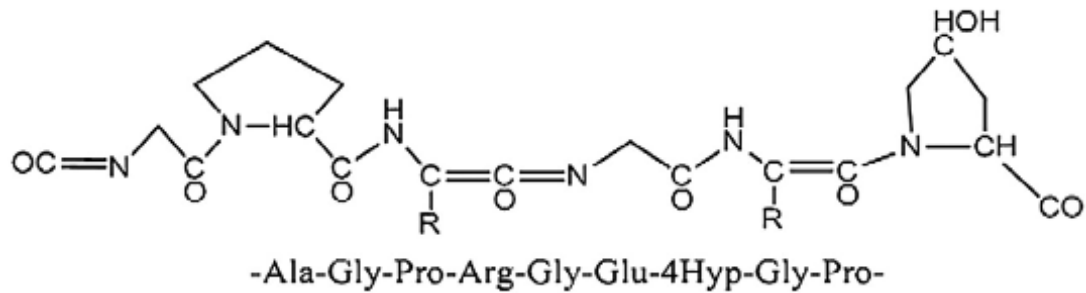
Το ετήσιο κόστος για την φροντίδα των χρόνιων τραυμάτων στις ΗΠΑ αγγίζει τα 25 δισεκατομμύρια δολάρια [9]. Επιπλέον οι εταιρίες που εμπορεύονται προϊόντα για φροντίδα τραυμάτων φαίνεται ότι αύξησαν τους τζίρους τους κατά 1.3 δισεκατομμύριο δολάρια το 2019 (4.4 δισεκατομμύρια δολάρια) σε σύγκριση με το 2012 (3.1 δισεκατομμύρια δολάρια). Σε παλαιότερη έρευνα αναφέρεται ότι το ετήσιο κόστος νοσηλείας ασθενών κυμαίνονταν μεταξύ 6 έως 15 δισεκατομμύρια δολάρια [82]. Είναι κατανοητό ότι είναι δύσκολο να υπολογιστούν με ακρίβεια τα κόστη, παρόλα αυτά είναι πολύ υψηλά και η ανάγκη για ανάπτυξη οικονομικών πολύ-λειτουργικών επιθεμάτων είναι αναγκαία. Παραδόξως, αν και τα πολυμερικά επιθέματα αποτελούν αρκετά υποσχόμενα υλικά και έχουν δημοσιευθεί αρκετές εργασίες, υστερούν αρκετά ως προς την απλότητα της συνθετικής διαδικασίας, την επαναληψιμότητα, την εφαρμογή σε μεγάλη κλίμακα και το κόστος της διαδικασίας παραγωγής.

3.3. ΥΔΡΟΠΗΚΤΕΣ ΑΠΟΤΕΛΟΥΜΕΝΕΣ ΑΠΟ ΦΥΣΙΚΑ ΚΑΙ ΣΥΝΘΕΤΙΚΑ ΠΟΛΥΜΕΡΗ - ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΚΗ ΑΝΑΣΚΟΠΗΣΗ

3.3.1. Φυσικά πολυμερή

3.3.1.1. Ζελατίνη

Η ζελατίνη είναι ένα φυσικό πολυμερές που λαμβάνεται από την θερμική μετουσίωση του κολλαγόνου ενώ χρησιμοποιείται ευρέως στη βιομηχανία για πολλαπλές εφαρμογές [93]. Κατά κύριο λόγο εξάγεται από το δέρμα διαφόρων ζώων (45 % από βοοειδή, χοίρους και πουλερικά), σε μικρότερο ποσοστό για την εξαγωγή χρησιμοποιούνται οστά (27 %) και άλλο ένα μέρος εξάγεται από συνδετικούς ιστούς και άλλα όργανα (28 %) [9,94,95]. Η ζελατίνη ιχθύων αποτελεί άλλη μια λιγότερο διαδεδομένη πηγή ζελατίνης και αποτελεί το 1.5 % της παγκόσμιας παραγωγής [96]. Το ποσοστό αυτό αυξάνεται καθημερινά, υποδεικνύοντας ότι η εξαγωγή ζελατίνης από εναλλακτικές πηγές λόγω των αυξημένων αναγκών, των ασθενειών που προσβάλλουν τα θηλαστικά αλλά και λόγω θρησκευτικών πεποιθήσεων που θα περιγραφούν στη συνέχεια, είναι επιτακτική. Η φυσική προέλευση της ζελατίνης, της προσδίδει ιδιαίτερα βιολογικά χαρακτηριστικά και για τον λόγο αυτό χρησιμοποιείται σε πληθώρα βιοϊατρικών εφαρμογών [9], όπως φακούς επαφής, ιστομηχανική, συστήματα μεταφοράς φαρμάκων [97]. Στο παρελθόν, αναπτύχθηκαν υλικά από γλυκάνη και ζελατίνη με σκοπό την χρήση τους ως επιθέματα εγκαυμάτων [98]. Το 2007, στην ερευνητική εργασία των Pulieri *et al.*, αναφέρεται η ανάπτυξη υλικών από χιτοζάνη και ζελατίνη και στη συνέχεια εφάρμοσε θερμική κατεργασία με σκοπό να βελτιώσει τον ρυθμό αποδόμησης των υλικών [99]. Το 2013, οι Hago και Li, ανέπτυξαν υδροπηκτές αποτελούμενες από ζελατίνη και πολυβινυλική αλκοόλη που περιείχαν γλουταμινάση με σκοπό τη χρήση τους ως επιθέματα πληγών. Από την μελέτη αποδείχθηκε ότι η περιεκτικότητα της ζελατίνης στις μεμβράνες, παίζει καταλυτικό ρόλο στην ανάπτυξη ινοβλαστών και στον κυτταρικό πολλαπλασιασμό [100]. Μια πιο πρόσφατη εργασία που δημοσιεύτηκε από τους Patel *et al.*, το 2018, αναφέρει την σύνθεση μεμβρανών από χιτοζάνη και ζελατίνη με σκοπό την ενσωμάτωση και μεταφορά λουπεόλης, για χρήση ως επίθεμα πληγής [101].



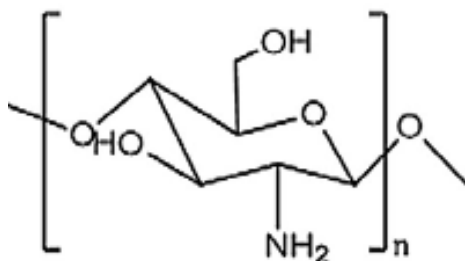
Σχήμα 3.5. Χημική δομή ζελατίνης.

3.3.1.2. Χιτοζάνη

Η χιτοζάνη είναι ένας πολυσακχαρίτης που προκύπτει από την αποκετυλίωση της χιτίνης. Διαλύεται σε όξινα περιβάλλοντα και αποτελεί ένα από τα πιο συχνά χρησιμοποιούμενα υλικά μετά το κολλαγόνο σε επιθέματα τραυμάτων. Λειτουργεί ως αιμοστατικός παράγοντας, διαθέτει αντιμικροβιακή δραστηριότητα, δρα κατά των μυκήτων και διαθέτει εξαιρετική διαπερατότητα οξυγόνου [9,102], γι' αυτό και θεωρείται εξαιρετικό υλικό για την ανάπτυξη επιθεμάτων. Έχει αναφερθεί ότι ενισχύει την κοκκοποίηση της πληγής και δρα ως επιταχυντής για τη θεραπεία ανοιχτών και μεγάλου βάθους τραυμάτων. Εξαιτίας του αιμοστατικού της ρόλου, επιταχύνει το σχηματισμό ινοβλαστών αυξάνοντας έτσι τον ρυθμό της επούλωσης. Η χιτοζάνη ως επίθεμα πληγών έχει χρησιμοποιηθεί σε διάφορες μορφές, όπως φίλμ, υδροπηκτές, ίνες και νανοσωματίδια [103]. Το μειονέκτημα της, είναι το σχετικά υψηλό κόστος και η δυσκολία στο χειρισμό [9]. Η χιτοζάνη χρησιμοποιήθηκε για πρώτη φορά σαν επικάλυψη σε στρατιωτικές γάζες που χρησιμοποιούνταν ως επιθέματα. Βαμβακερά υφάσματα επιστρωμένα με χιτοζάνη και πολυαιθυλενογλυκόλη, λυοφιλοποιήθηκαν με σκοπό τον σχηματισμό ενός λεπτού πορώδους φιλμ. Διαπιστώθηκε ότι η προσθήκη της χιτοζάνης ελέγχει την μορφολογία της επιφάνειας ενώ η πολυαιθυλενογλυκόλη προτέθηκε για τον σχηματισμό πόρων. [87]. Στην ερευνητική εργασία των Yu et al., το 2006, αναφέρεται η ανάπτυξη υδροπηκτικής αποτελούμενης από συνθετικά πολυμερή και χιτοζάνη που περιείχε αντιβιοτικό. Η μεμβράνη αποδείχθηκε ότι απελευθέρωνε αρχικά γρήγορα το αντιβιοτικό ενώ με το πέρασμα του χρόνου ο ρυθμός απελευθέρωσης μειώθηκε. Αξιολογήθηκε ως κατάλληλο υλικό για χρήση ως επίθεμα, ενώ διέθετε και ικανοποιητική μηχανική σταθερότητα [104]. Στην ερευνητική εργασία

των Samah et al., αναφέρεται η ανάπτυξη επιδέσμου γάζας επικαλυμμένου με χιτοζάνη, αξιολογήθηκαν οι φυσικοχημικές του ιδιότητες ενώ μελετήθηκε και η αντιμικροβιακή του δραστηριότητα κατά των μικροοργανισμών *Escherichia coli* και *Lactobacillus* [105]. Ο Wang και οι συνεργάτες του ανέπτυξαν μεμβράνες χιτοζάνης με αλγινικό με σκοπό τη χρήση τους ως επιθέματα επούλωσης. Οι μεμβράνες χρησιμοποιήθηκαν σε ποντίκια και αποδείχθηκε ότι αύξησαν τον ρυθμό επούλωσης. Επίσης παρατηρήθηκε βελτιωμένη απορροφητική ικανότητα των εκκρίσεων, σε σχέση με τις εμπορικές γάζες [106]. Στην ερευνητική εργασία των Cascone et al., το 1999, αναφέρεται η ανάπτυξη υδροπηκτής αποτελούμενης από πολυβινυλική αλκοόλη και χιτοζάνη με πορώδη μορφολογία [107]. Η ερευνητική εργασία των Yang et al., το 2008 και το 2010, αναφέρεται στην ανάπτυξη νέων μεθόδων για δημιουργία σταυροδεσμών μεταξύ της χιτοζάνης και συνθετικού πολυμερούς [108,109]. Στην ερευνητική εργασία των El-Salmawi et al., προτείνεται η χρήση ακτίνων γ για την δημιουργία σταυροδεσμών σε μεμβράνες χιτοζάνης-πολυβινυλικής αλκοόλης. Παρατηρήθηκε βελτίωση των μηχανικών ιδιοτήτων ενώ η διαπερατότητα των μεμβρανών σε βακτήρια μειώνονταν αυξάνοντας τη συγκέντρωση της πολυβινυλικής αλκοόλης ή τη δόση ακτίνων γ . Επίσης διαπιστώθηκε ότι η αύξηση της συγκέντρωσης της χιτοζάνης αύξησε την αντιμικροβιακή δραστηριότητα των μεμβρανών αλλά και την απορροφητική τους ικανότητα [110]. Νέα μέθοδος εμβολιασμού χρησιμοποιήθηκε στην ερευνητική εργασία των Don et al., για τη σύνθεση υδροπηκτών χιτοζάνης-συνθετικού πολυμερούς. Αποδείχθηκε ότι το σύνθετο υλικό ήταν συμβατό με το αίμα ενώ η σκέτη χιτοζάνη παρουσίασε μειωμένη βιοσυμβατότητα [111]. Στην ερευνητική εργασία των Sung et al., το 2010, προτείνεται η χρήση υδροπηκτής χιτοζάνης-πολυβινυλικής αλκοόλης με ενσωματωμένη μινोकυκλίνη. Η προσθήκη της χιτοζάνης οδήγησε σε αύξηση της απορροφητικής ικανότητας των υλικών και του ρυθμό μετάδοσης υδρατμών. Ωστόσο το υλικό υποβαθμίστηκε μηχανικά. Η ενσωμάτωση της μινोकυκλίνης στις μεμβράνες επιτάχυνε την διαδικασία της επούλωσης ραχιαίων πληγών σε ποντίκια σε σχέση με τις μεμβράνες που δεν περιείχαν αντιβιοτικό [112]. Το 2015, στην ερευνητική εργασία των Zhang et al., περιγράφεται η σύνθεση μεμβρανών χιτοζάνης-πολυβινυλικής αλκοόλης που περιείχαν το γενταμικίνη (αντιβιοτικό). Οι μεμβράνες αποδείχθηκε ότι περιορίζουν τον βακτηριακό πολλαπλασιασμό και προστατεύουν την πληγή από μολύνσεις [113]. Στην ερευνητική εργασία των Ma et al., το 2017, περιγράφηκε η ανάπτυξη μεμβρανών χιτοζάνης-γλυκερόλης μέσω απλής διαδικασίας. Στη συνέχεια ενσωμάτωσαν

αντιβιοτικά τοπικής εφαρμογής. Η προσθήκη της γλυκερόλης βελτίωσε την απορροφητική ικανότητα των μεμβρανών, ενώ η προσθήκη των αντιμικροβιακών παραγόντων προσέδωσε αντιβακτηριακές ιδιότητες στα υλικά [57].



Σχήμα 3.6. Δομική μονάδα χιτοζάνης.

3.3.1.3. Κολλαγόνο

Το κολλαγόνο αποτελεί το παλαιότερο και πιο συχνά χρησιμοποιούμενο υλικό σε επιθέματα μέχρι σήμερα. Είναι μια πρωτεΐνη που υπάρχει σε αφθονία στους συνδετικούς ιστούς του σώματος. Το κολλαγόνο χρησιμοποιήθηκε για πρώτη φορά σε ενέσιμη μορφή στο ανθρώπινο σώμα, από την ερευνητική ομάδα του Knapp, το 1977 [114]. Στην διεθνή βιβλιογραφία έχουν αναφερθεί διάφορα υλικά με βάση το κολλαγόνο (αφροί, ράμματα, σπόγγοι και πηκτές), αλλά ποτέ δεν έχει χρησιμοποιηθεί μόνο του σε επιθέματα επούλωσης [9]. Το 2004, στην ερευνητική εργασία των Park et al. αναφέρεται η σύνθεση υλικού αποτελούμενου από κολλαγόνο και υαλουρονικό οξύ, στο οποίο είχε ενσωματωθεί αντιβιοτικό [115]. Αργότερα, χρησιμοποιήθηκαν βιοαποικοδομήσιμες μεμβράνες κολλαγόνου για την ταχεία επιθηλιοποίηση χειρουργικού τραύματος στη στοματική κοιλότητα [116,117], για εγκαύματα και χρόνιες πληγές [118] και για επιφανειακά εγκαύματα μερικού πάχους σε παιδιά [119]. Το κολλαγόνο διαδραματίζει σημαντικό ρόλο στην αιμόσταση, προάγει την επουλωτική διαδικασία υποστηρίζοντας την ανάπτυξη ινοβλαστών, την προσκόλληση, την διαφοροποίηση και την μετανάστευση των κερατινοκυττάρων. Στο παρελθόν έχει συνδυαστεί με διάφορα άλλα πολυμερή με σκοπό την ανάπτυξη επιθεμάτων αναγέννησης ιστού [9]. Έχουν επίσης αναπτυχθεί αναμίγματα κολλαγόνου-χιτοζάνης-πολυαιθυλενογλυκόλης μέσω της μεθόδου της ηλεκτροστατικής ινοποίησης [120]. Το

μειονέκτημα που περιορίζει τη χρήση του, είναι η διαπερατότητά του σε βακτήρια και μικροοργανισμούς [9].

3.3.1.4. Αλγινικό οξύ και αλγινικό νάτριο

Το αλγινικό οξύ είναι ένας φυσικός γραμμικός πολυσακχαρίτης που εξάγεται από θαλάσσια φύκια (είδη *Laminaria* και *Ascophyllum*.) Κατοχυρώθηκε από τον Stanford το 1880, και αναφέρθηκε στη βιβλιογραφία, το 1883 [121]. Το αλγινικό οξύ και το αλγινικό νάτριο χρησιμοποιήθηκαν πρώτη φορά ως επιθέματα τραυμάτων με τη μορφή πηκτών και σπόγγων από τον Thomas, το 2000. Από τη μελέτη διαπιστώθηκε ότι τα επιθέματα αλγινικού οξέος, βελτίωσαν τον ρυθμό επούλωσης, την κυτταρική προσκόλληση και τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό [9,122]. Στην ερευνητική εργασία του Kim et al. αναφέρεται η σύνθεση υδροπηκτών από αλγινικό νάτριο και πολυβινυλική αλκοόλη που περιείχαν νιτροφουραζόνη, αμπικιλίνη και κλινδαμυκίνη, για να χρησιμοποιηθούν σε εφαρμογές επούλωσης. Διαπιστώθηκε ότι η προσθήκη αλγινικού, αύξησε την ικανότητα διόγκωσης και την θερμική σταθερότητα ενώ μείωσε την μηχανική σταθερότητα των μεμβρανών. Επίσης η προσθήκη του αλγινικού είχε σημαντική επίδραση στην απελευθέρωση της αμπικιλίνης και της κλινδαμυκίνης από τις μεμβράνες [123]. Στην ερευνητική εργασία των Nam et al., το 2004, παρουσιάζεται η σύνθεση υδροπηκτής από αλγινικό και πολυβινυλική αλκοόλη χρησιμοποιώντας ακτίνες γ. Αποδείχθηκε ότι η αύξηση της συγκέντρωσης του αλγινικού οξέος βελτίωσε την ικανότητα διόγκωσης των υλικών. Οι μεμβράνες εμφυτεύτηκαν σε αρουραίους και βοήθησαν στην επουλωτική διαδικασία αποτρέποντας μάλιστα την δημιουργία ουλής. Το αποτέλεσμα αυτό αποδόθηκε στην καλή αιμοστατική, προσκολλητική και απορροφητική ικανότητα των μεμβρανών [124]. Το 2012, οι Tarum και Gobi, προχώρησαν στην σύνθεση ενός υλικού από αλγινικό ασβέστιο και πολυβινυλική αλκοόλη, με τη μέθοδο της ηλεκτροστατικής ινοποίησης. Οι σύνθετες ίνες, παρείχαν υγρό περιβάλλον στο τραύμα προάγοντας και επιταχύνοντας τον ρυθμό επούλωσης. Ο Thomas κατηγοριοποίησε τις μεμβράνες αλγινικού- πολυβινυλικής αλκοόλης σε τρεις κατηγορίες, αναφέροντας ως σημαντικότερη αυτή που βασίζεται στην επαφή της μεμβράνης με την πληγή όπου πραγματοποιείται ιοντοανταλλαγή μεταξύ του ιόντων Ca^{2+} της μεμβράνης και του ιόντος Na^{+} του ορού του αίματος ή των εκκρίσεων της πληγής [122,125].

3.3.1.5. Άμυλο και παράγωγα

Το άμυλο είναι πολυσακχαρίτης που αποτελείται από περίπου 30% αμυλόζη και 70% αμυλοπηκτίνη. Παρότι είναι οικονομικό, δεν είναι ιδιαίτερα υδρόφιλο κάτι το οποίο περιορίζει τη χρήση του σε εφαρμογές επιθεμάτων επούλωσης διότι δεν παρέχει τις συνθήκες (υγρό περιβάλλον) που απαιτούνται για την επούλωση της πληγής [9,126]. Ο Zhai με τους συνεργάτες του, ανέπτυξαν μεμβράνες αμύλου-πολυβινυλικής αλκοόλης χρησιμοποιώντας ακτίνες γ και ακτινοβόληση ηλεκτρονίων. Η περιεκτικότητα του αμύλου σε αμυλόζη και η δόση της ακτινοβολίας αποδείχθηκε ότι διαδραματίζουν σημαντικό ρόλο στον εμβολιασμό του αμύλου στις υδροπηκτές πολυβινυλικής αλκοόλης [126].

3.3.1.6. Δεξτράνη

Η δεξτράνη είναι πολυσακχαρίτης που απομονώνεται από το βακτήριο *Leuconostoc mesenteroides*. Στο παρελθόν έχει χρησιμοποιηθεί για μεταφορά φαρμάκων [127]. Η ερευνητική εργασία των Cascone et al., αναφέρεται στην ανάπτυξη αναμίγματος αποτελούμενο από δεξτράνη και συνθετικό πολυμερές, λαμβάνοντας ένα φυσικά διασταυρωμένο υλικό. Οι μεμβράνες διέθεταν καλή ικανότητα διόγκωσης και ικανοποιητικές ιδιότητες απελευθέρωσης φαρμάκου λόγω της εξαιρετικής αναμιξιμότητας μεταξύ των συστατικών της μεμβράνης, σε σχέση με μεμβράνες χιτοζάνης-πολυβινυλικής αλκοόλης [107]. Στην ερευνητική εργασία των Fathi et al., το 2011, αναφέρεται η σύνθεση φυσικά διασταυρωμένης υδροπηκτής, αποτελούμενης από πολυβινυλική αλκοόλη-δεξτράνη-γενταμικίνη και υλικό πολυβινυλικής αλκοόλης-δεξτράνης με απώτερο σκοπό, τη χρήση τους ως επιθέματα. Ανέφεραν ότι η προσθήκη της δεξτράνης επηρέασε τις ιδιότητες των λαμβανόμενων υλικών, δηλαδή αυξήθηκε η *in vitro* απορρόφηση πρωτεϊνών, η ικανότητα διόγκωσης και τέλος ο ρυθμός μετάδοσης υδρατμών. Επίσης οι μεμβράνες που περιείχαν γενταμικίνη, διέθεταν καλύτερη επουλωτική δράση, όταν δοκιμάστηκαν σε ραχιαίες πληγές αρουραίων, σε σχέση με τις μεμβράνες που δεν περιείχαν. Τέλος αποδείχθηκε ότι η προσθήκη της δεξτράνης δεν είχε σαφή επίδραση στη θερμική σταθερότητα, όμως έπαιξε σημαντικό ρόλο στην επιφανειακή μορφολογία του τελικού υλικού [9,128]. Τα βασικά

μειονεκτήματα που περιορίζουν τη χρήση της είναι το υψηλό κόστος και η περιορισμένη διαθεσιμότητα στην αγορά [9].

3.3.1.7. Γλυκάνη

Η γλυκάνη είναι υδατοδιαλυτό βιοαποικοδομήσιμο πολυμερές που προέρχεται από ζύμωση φυτών. Στην ερευνητική εργασία των Lee et al., το 2003, παρουσιάζεται η ανάπτυξη φιλμ αποτελούμενου από ζελατίνη και γλυκάνη αποδεικνύοντας μέσω μελετών ότι το υλικό διαθέτει αντιβακτηριακή, αντίδικη και αντιφλεγμονώδη δράση [98]. Οι Huang και Yang αργότερα, ανέπτυξαν συστήματα πολυβινυλικής αλκοόλης-γλυκάνης, αναμιγνύοντας τα δύο συστατικά ενώ στη συνέχεια ακολούθησε ξήρανση στους 110 °C. Πραγματοποιήθηκαν πειράματα σε ποντίκια και παρατηρήθηκε επούλωση του τραύματος κατά 50 % σε πολύ σύντομο χρονικό διάστημα, λόγω της απελευθέρωσης της γλυκάνης στην πληγή. Η απελευθέρωση της γλυκάνης υπέδειξε ότι δεν υπήρχε ομοιοπολική σύνδεση μεταξύ της γλυκάνης και της πολυβινυλικής αλκοόλης [129]. Η γλυκάνη θεωρείται σημαντικός επουλωτικός παράγοντας, επιταχύνει την επουλωτική διαδικασία και μπορεί να χρησιμοποιηθεί σε επιθέματα πληγών [9].

3.3.1.8. Πολυ-N-ακετυλο γλυκοζαμίνη

Η πολυ-N-ακέτυλο γλυκοζαμίνη είναι βιοαποικοδομήσιμο πολυμερές που εξάγεται από μικροάλγη. Στο παρελθόν έχει χρησιμοποιηθεί στον τομέα της επούλωσης πληγών, αποτελεί εξαιρετικό αιμοστατικό υλικό ενώ διαθέτει αντιβακτηριακές ιδιότητες. Μελετήθηκε η επίδρασή του στην επιτάχυνση της επουλωτικής διαδικασίας και αποδείχθηκε ότι η εφαρμογή του σε κοκκώδη τραύματα ποντικών για 1 h οδήγησε σε αύξηση του ρυθμού του κυτταρικού πολλαπλασιασμού [130]. Το υλικό αυτό σπανίως αναφέρεται στη βιβλιογραφία, λόγω του υψηλού κόστους εξαγωγής του αλλά και λόγω της σπανιότητας των πηγών από όπου εξάγεται [9]. Οι εξαιρετικές όμως βιολογικές ιδιότητες που διαθέτει, το καθιστούν ελκυστικό για την ανάπτυξη επιθεμάτων.

3.3.1.9. Υαλουρονικό οξύ

Το υαλουρονικό οξύ είναι φυσικό βιοαποικοδομήσιμο πολυμερές και προέρχεται από συνδετικούς ιστούς και αρθρικά υγρά θηλαστικών [131]. Χρησιμοποιείται για την αποκατάσταση χόνδρου και ιστών από το 1934, όταν και ανακαλύφθηκε. Το 2003, στην ερευνητική εργασία των Park et al., αναφέρεται ότι το υαλουρονικό οξύ μπορεί να αλληλοεπιδρά με όλα τα συστατικά των ιστών, όπως πρωτεΐνες και αυξητικούς παράγοντες, βελτιώνοντας το ρυθμό επούλωσης στους περισσότερους τύπους τραυμάτων, οδηγώντας στην αποκατάσταση του ιστού [132]. Στην ερευνητική εργασία των Price et al., προτείνεται η χρήση υαλουρονικού οξέος για την προώθηση της αγγειογένεσης [133]. Ο Miller με τους συνεργάτες του, αναφέρουν ότι η εφαρμογή υαλουρονικού οξέος σε ρινικό επίθεμα πληγής, προστατεύει την τραυματισμένη περιοχή από τα βακτήρια και άλλες πιθανές λοιμώξεις [134]. Η ερευνητική εργασία των Fahmy et al., το 2015, αναφέρει τη σύνθεση υδροπηκτών πολυβινυλικής αλκοόλης-υαλουρονικού οξέος που περιείχαν αμπικιλίνη. Η αξιολόγηση του υλικού επέδειξε προστασία έναντι του μύκητα *Candida albicans* λόγω του υαλουρονικού οξέος [135].

3.3.1.10. Βακτηριακή κυτταρίνη

Η βακτηριακή κυτταρίνη είναι κυτταρίνη φυσικής προέλευσης, που παράγεται από το βακτήριο *Acetobacter xylinum* χρησιμοποιώντας γλυκόζη. Οι μεμβράνες βακτηριακής κυτταρίνης διαθέτουν καλή μηχανική αντοχή και υψηλή απορροφητική ικανότητα των εκκρίσεων της πληγής. Είναι βιοσυμβατή, βιοαποικοδομήσιμη και έχει ινώδη μορφολογία [136,137]. Τα τελευταία χρόνια έχουν αναπτυχθεί υλικά με βάση την βακτηριακή κυτταρίνη με σκοπό την εφαρμογή τους στον τομέα των επιθεμάτων [138-140]. Ωστόσο δεν διαθέτει εγγενή αντιμικροβιακή δραστηριότητα, περιορίζοντας την χρήση της σε τέτοιες εφαρμογές [9].

3.3.1.11. Κερατίνη

Η κερατίνη είναι ινώδης δομική πρωτεΐνη που ανήκει στην οικογένεια των σκληροπρωτεϊνών. Είναι το βασικό δομικό συστατικό των τριχών, των νυχιών, των

φτερών, των κεράτων, των οπλών και του εξωτερικό στρώματος του δέρματος (στρώμα κεράτινης στιβάδας) των σπονδυλωτών. Προστατεύει τα επιθηλιακά κύτταρα από βλάβες ή καταπόνηση. Σχηματίζει σκληρά ινίδια, δημιουργώντας τις επιδερμικές επιφάνειες που απαντώνται σε ερπετά, πτηνά, αμφίβια και θηλαστικά [141,142]. Ταξινομείται σε μαλακή και σκληρή, βάσει της περιεκτικότητάς θείου στην δομή της και της αλληλουχίας των αμινοξέων. Λόγω της χαμηλής διαλυτότητάς της, χρησιμοποιείται σε επιθέματα πληγών, με την μορφή αφρών ή πηκτών για την απορρόφηση των εκκρίσεων της πληγής. Χρησιμοποιείται ως επουλωτικός παράγοντας, λόγω του υποστηρικτικού ρόλου που παρέχει στον σχηματισμό ινοβλαστών, προωθώντας την αναγέννηση τραυματισμένου δερματικού ιστού [9].

3.3.1.12. Μετάξι

Οι ίνες μεταξιού είναι μίγμα άμορφων και κρυσταλλικών πρωτεϊνών που προέρχονται από το μεταξοσκώληκα. Το μετάξι αποτελείται από μίγμα αμινοξέων γλυκίνης και αλανίνης. Διαθέτει αξιοσημείωτες ιδιότητες όπως, υψηλή μηχανική αντοχή, εξαιρετική ελαστικότητα ενώ είναι βιοσυμβατό και βιοδιασπώμενο. Οι αναφορές στη βιβλιογραφία που πραγματεύονται τη χρήση μεταξιού σε επιθέματα τραυμάτων είναι περιορισμένες [9]. Στην ερευνητική εργασία των Padol et al. αξιολογήθηκε μεμβράνη μεταξιού μελετώντας την ως προς την τοξικότητα και τον ερεθισμό του δέρματος. Το υλικό αποδείχτηκε ότι λειτουργεί αποτελεσματικά ως επίθεμα τραύματος σε περιπτώσεις οξέων τραυμάτων [143]. Στην ερευνητική εργασία των Roh et al., αναπτύχθηκε υλικό με μορφή σπόγγου αποτελούμενο από ίνες μεταξιού και αλγινικό για εφαρμογή σε τραύματα αρουραίων. Τα υλικά προάγει τον πολλαπλασιασμό των επιθηλιακών κυττάρων και των ινοβλαστών, καθιστώντας κατάλληλο για χρήση ως επίθεμα πληγής [144].

3.3.2. Συνθετικά πολυμερή

3.3.2.1. Πολυαιθυλενογλυκόλη

Η πολυαιθυλενογλυκόλη είναι συνθετικό πολυμερές με ευρύ φάσμα εφαρμογών. Χρησιμοποιείται σε διάφορους τομείς της βιομηχανίας αλλά και στην

ιατρική. Λόγω των βιολογικών χαρακτηριστικών που διαθέτει, όπως η βιοσυμβατότητα, η βιοαποικοδομησιμότητα και το χαμηλό κόστος, την καθιστούν κατάλληλη για χρήση σε βιοϊατρικές εφαρμογές [9]. Ο Dutta [145], το 2012, αναφέρει τη σύνθεση υλικού αποτελούμενου από πολυαιθυλενογλυκόλη, πολυβινυλική αλκοόλη και χλωριούχο ασβέστιο, χρησιμοποιώντας ακτινοβολία γ για την δημιουργία σταυροδεσμών. Η προσθήκη της πολυαιθυλενογλυκόλης οδήγησε σε βελτίωση της θερμικής σταθερότητας του υλικού. Το υλικό αποδείχθηκε ότι διαθέτει ικανοποιητικά βιολογικά χαρακτηριστικά, προάγει τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό ενώ η χρήση της πολυαιθυλενογλυκόλης επιτάχυνε το ρυθμό της επούλωσης [9,145].

3.3.2.2. Πολυκαπρολακτόνη

Μεταξύ των συνθετικών πολυμερών, η πολυκαπρολακτόνη λόγω της καλής μηχανικής της συμπεριφοράς, της βιοσυμβατότητας και της βιοαποικοδομησιμότητας που διαθέτει έχει προσελκύσει το ενδιαφέρον των επιστημόνων. Ωστόσο, όπως και οι υπόλοιποι αλειφατικοί πολυεστέρες, λόγω της υδρόφοβης φύσης της, περιορίζει τη χρήση της σε εφαρμογές επιθεμάτων επούλωσης [146]. Για να ξεπεραστεί αυτό, η πολυκαπρολακτόνη πρέπει να συνδυαστεί με άλλα πολυμερή, φυσικά, συνθετικά ή συνδυασμό τους, ώστε να συνδυαστούν οι ιδιότητες τους και να προκύψουν υλικά που καλύπτουν τις απαιτήσεις των επιθεμάτων [9]. Το 2014, στην ερευνητική εργασία των Gautam et al., αναφέρεται η ανάπτυξη αναμίγματος αποτελούμενου από πολυκαπρολακτόνη, χιτοζάνη και ζελατίνη με σκοπό τη χρήση του στον τομέα της ιστομηχανικής. Παρατηρήθηκε υψηλή κυτταρική προσκόλληση και ικανοποιητικός ρυθμός πολλαπλασιασμού, στο υλικό, καθιστώντας το κατάλληλο για χρήση στον τομέα της ιστομηχανικής [147]. Το 2018, ο Ezati και οι συνεργάτες του, αναφέρουν τη σύνθεση μεμβράνης από πολυκαπρολακτόνη, χιτοζάνη και ζελατίνη με διαφορετικά ποσοστά β -tricalcium phosphate, για τη βελτίωση της βιοσυμβατότητας, των μηχανικών ιδιοτήτων και της αντιμικροβιακής δραστηριότητας των μεμβρανών. Τα υλικά συντέθηκαν μέσω ηλεκτροστατικής ινοποίησης ενώ αποδείχθηκε ότι είναι κατάλληλα για εφαρμογές αναγέννησης οστών [148]. Την ίδια χρονολογία, ο Ehterami με τους συνεργάτες του, συνέθεσαν νανοσωματίδια χιτοζάνης που περιείχαν ινσουλίνη και ενσωματώθηκαν σε ίνες πολυκαπρολακτόνης-κολλαγόνου με σκοπό την ανάπτυξη υλικού για φροντίδα τραύματος. Τα υλικά αξιολογήθηκαν in vivo σε αρουραίους και

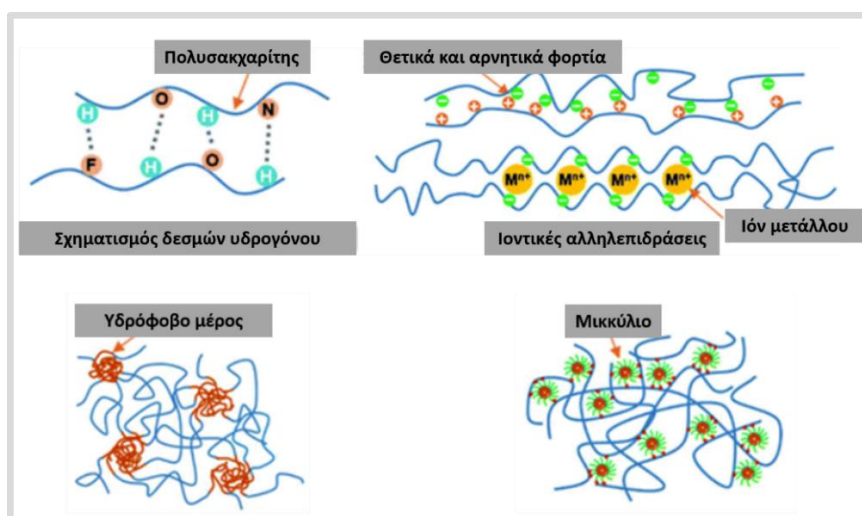
παρατηρήθηκε σχεδόν πλήρης επούλωση ύστερα από εφαρμογή 14 ημερών. ενώ η χρήση αποστειρωμένης γάζας οδήγησε σε μόλις 45 % μείωση του μεγέθους της πληγής [149].

3.4.ΜΕΘΟΔΟΙ ΔΗΜΙΟΥΡΓΙΑΣ ΣΤΑΥΡΟΔΕΣΜΩΝ ΣΤΙΣ ΥΔΡΟΠΗΚΤΕΣ

Τα χαρακτηριστικά των υδροπηκτών εξαρτώνται σημαντικά από τα χρησιμοποιούμενα πολυμερή (φυσικά, συνθετικά ή συνδυασμό των δύο) και των μεταξύ τους αλληλεπιδράσεων [24]. Οι μέθοδοι δημιουργίας σταυροδεσμών που εφαρμόζονται κατά την σύνθεση υδροπηκτών κατηγοριοποιούνται σε φυσικές και χημικές [24,150]. Η δημιουργία σταυροδεσμών χημικά, επιτυγχάνεται με σχηματισμό ισχυρών δεσμών (ομοιοπολικών). Η δημιουργία ομοιοπολικών δεσμών είναι πιθανό να βελτιώνει τις μηχανικές ιδιότητες, ωστόσο οδηγεί σε μείωση του ρυθμού αποικοδόμησης, επηρεάζοντας την βιοσυμβατότητα των παραγόμενων υλικών [150,151]. Η δημιουργία σταυροδεσμών με φυσικό τρόπο δεν δημιουργεί τόσο ισχυρό δίκτυο. Η φυσική δημιουργία σταυροδεσμών, μπορεί να περιλαμβάνει μοριακές αλληλοεμπλοκές ή/και δευτερογενείς αλληλεπιδράσεις όπως ηλεκτροστατικές αλληλεπιδράσεις, δεσμούς υδρογόνου και ελκτικές δυνάμεις μεταξύ υδρόφοβων μορίων (υδρόφοβες αλληλεπιδράσεις) [24,152]. Οι ασθενείς αλληλεπιδράσεις προσδίδουν τη δυνατότητα αυτοθεραπείας τυχών αστοχιών και ενέσιμης χορήγησης, στις υδροπηκτές [150]. Είναι συνήθως αντιστρεπτές και προέρχονται από την αποδιοργάνωση του δικτύου τους. Η αποδιοργάνωση του δικτύου μπορεί να προέλθει από μεταβολή διαφόρων συνθηκών (pH, θερμοκρασία, διαλύτης κτλ.) [24,150,153]. και προσδίδει στα υλικά αυτά εξαιρετικές ιδιότητες (ελεγχόμενη απελευθέρωση βιοδραστικών παραγόντων, φαρμάκων κ.τ.λ.). Η βιοσυμβατότητα αποτελεί πλεονέκτημα των υδροπηκτών που συντίθενται μέσω φυσικής δημιουργίας σταυροδεσμών. Τα υλικά με βάση πολυσακχαρίτες, διαθέτουν λειτουργικές ομάδες, όπως υδρξυλομάδες, καρβοξυλομάδες και αμινομάδες, παρέχοντας θέσεις πρόσδεσης για την δημιουργία σταυροδεσμών με φυσικό ή χημικό τρόπο. Ο τύπος του διασταυρωτή που χρησιμοποιείται, όπως και η μέθοδος που δημιουργούνται οι σταυροδεσμοί καθορίζουν τις φυσικοχημικές ιδιότητες των υλικών [24,150].

3.4.1. Φυσική δημιουργία σταυροδεσμών

Οι φυσικά διασταυρωμένες υδροπηκτές, προέρχονται από φυσικές αλληλεπιδράσεις, όπως δεσμούς υδρογόνου, ιοντικές αλληλεπιδράσεις, αλληλοεμπλοκές αλυσίδων και υδρόφοβες αλληλεπιδράσεις (Σχήμα 3.7). Ο σχηματισμός τους επιτυγχάνεται θερμαίνοντας ή ψύχοντας το διάλυμα, χαμηλώνοντας τις τιμές του pH και χρησιμοποιώντας πολυμερή με αντίθετα φορτία [150,154,155]. Το βασικότερο πλεονέκτημα των τεχνικών φυσικής διασύνδεσης είναι, ότι δεν απαιτείται διασταυρωτής για την δημιουργία δικτύου. Έτσι αποφεύγονται τα πιθανά προβλήματα τοξικότητας που μπορεί να προκαλέσει η χρήση διασταυρωτών (γενιπίνη, γλουταραλδεΰδη κτλ.) που χρησιμοποιούνται κατά την χημική διασύνδεση. Οι ασθενείς αλληλεπιδράσεις που δημιουργούνται μέσω της φυσικής διασύνδεσης σταθεροποιούν το δίκτυο και αποφεύγεται η υπερδιόγκωση/διάλυση της υδροπηκτής. Ωστόσο, οι φυσικά διασυνδεδεμένες υδροπηκτές δεν διαθέτουν πάντα ικανοποιητικές μηχανικές ιδιότητες [150].



Σχήμα 3.7. Αλληλεπιδράσεις κατά την φυσική δημιουργία σταυροδεσμών [150].

3.4.1.1. Δεσμοί υδρογόνου μεταξύ των αλυσίδων

Οι δεσμοί υδρογόνου διαδραματίζουν σημαντικό ρόλο στη σύνθεση υδροπηκτών με βάση πολυσακχαρίτες και πρωτεΐνες. Οι πολυσακχαρίτες διαθέτουν

πληθώρα ομάδων δεκτών και δοτών υδρογόνου (-OH,-COOH, -NH₂), που τους παρέχουν τη δυνατότητα σχηματισμού δεσμών υδρογόνου. Οι δεσμοί υδρογόνου ανήκουν στις δευτερογενείς ασθενείς αλληλεπιδράσεις. Η καταστροφή και ο επανασηματισμός των δεσμών υδρογόνου μπορεί να συμβεί κατά την αλλαγή του pH, της θερμοκρασίας ή του διαλύτη. Οι υδροπηκτές που είναι διασταυρωμένες μόνο με δεσμούς υδρογόνου, συνήθως δεν καλύπτουν τα κριτήρια της μηχανικής αντοχής για χρήση σε επιθέματα τραυμάτων. Ωστόσο, μπορούν εύκολα να συνδυαστούν και με άλλους τρόπους φυσικής διασύνδεσης ώστε να βελτιωθούν οι ιδιότητές τους [150]. Για παράδειγμα, στην ερευνητική εργασία των Kumbara et al., το 2017, συντέθηκαν υδροπηκτές ξανθάνης-χιτοζάνης ενισχυμένες με νανοκρυστάλλους κυτταρίνης μέσω ηλεκτροστατικών αλληλεπιδράσεων και δεσμών υδρογόνου [150,156]. Την ίδια χρονολογία, ο Liu και οι συνεργάτες του, συνέθεσαν υδροπηκτές αποτελούμενες από οξειδωμένο αλγινικό νάτριο και πολυακρυλαμίδιο, που επέδειξαν εξαιρετικές αυτοθεραπευτικές ιδιότητες λόγω των ηλεκτροστατικών αλληλεπιδράσεων [157]. Στην ερευνητική εργασία των Ma et al., αναφέρεται η ανάπτυξη μεμβρανών χιτοζάνης-γλυκερόλης μέσω δημιουργίας δεσμών υδρογόνου με σκοπό την βελτίωση της ικανότητας απορρόφησης νερού των υλικών και την ενσωμάτωση αντιβιοτικών παραγόντων [57]. Το υλικό συντέθηκε με σκοπό να χρησιμοποιηθεί ως επίθεμα πληγής.

3.4.1.2. Ιοντικές αλληλεπιδράσεις

Υπάρχουν δύο είδη ιοντικών αλληλεπιδράσεων για τη σύνθεση υδροπηκτών, 1) ιοντικές αλληλεπιδράσεις μεταξύ πολυανιονικών πολυμερών και μεταλλικών ιόντων και 2) δημιουργία πολυηλεκτρολυτών μεταξύ αντίθετα φορτισμένων πολυμερών [158-160]. Η μέθοδος αυτή είναι η πιο χρήσιμη για την φυσική δημιουργία σταυροδεσμών σε υλικά με βάση το αλγινικό νάτριο. Έχει αναφερθεί η σύνθεση υδροπηκτών χιτοζάνης - αλγινικού μέσω ηλεκτροστατικών αλληλεπιδράσεων, "φορτωμένες" με επιδερμικό αυξητικό παράγοντα, με σκοπό την προώθηση του κυτταρικού πολλαπλασιασμού και της επούλωσης της πληγής [161]. Το 2019, η Sharma με τους συνεργάτες της, βασίζόμενοι στον ανιοντικό χαρακτήρα της χονδροϊτίνης και στον κατιοντικό χαρακτήρα της χιτοζάνης, ανέπτυξαν υλικό (πολυηλεκτρολύτη) από τα δύο αυτά φυσικά πολυμερή. Το υλικό αξιολογήθηκε και αποδείχθηκε ότι διαθέτει αντιμικροβιακές ιδιότητες κατά των θετικά και των αρνητικά κατά gram βακτηρίων.

Αναφέρθηκε επίσης ότι είναι βιοσυμβατό και προάγει την ανάπτυξη των ινοβλαστών, καθιστώντας το κατάλληλο για πιθανή εφαρμογή ως επίθεμα τραύματος [162].

3.4.1.3. Κρυστάλλωση

Οι μικροκρύσταλλοι μπορούν να λειτουργήσουν ως σημεία σύνδεσης στο σχηματισμό τρισδιάστατων δικτύων. Η τεχνική ψύξης-απόψυξης (freeze-thawing) αποτελεί τον πιο κοινό τρόπο για την λήψη μικροκρυστάλλων. Κατά τη διαδικασία ψύξης-απόψυξης, προκαλείται διαχωρισμός φάσης κατά την ψύξη του νερού, οδηγώντας στον σχηματισμό μικροκρυστάλλων [163]. Οι επαναλαμβανόμενοι κύκλοι ψύξης-απόψυξης, ενισχύουν τη δομή των υπαρχόντων κρυστάλλων προσδίδοντας υψηλότερη κρυσταλλικότητα και σταθερότητα [164]. Οι υδροπηκτές με βάση πολυσακχαρίτες, είναι εφικτό να συντεθούν είτε μόνο από πολυσακχαρίτες ή και με μίξη άλλων φυσικών και συνθετικών πολυμερών. Οι Χiao και Gao, συνέθεσαν υδροπηκτές από καρβοξυμεθυλοκυτταρίνη νατρίου και πολυβινυλική αλκοόλη, όπου οι κρυσταλλικές περιοχές της πολυβινυλικής αλκοόλης λειτούργησαν ως φυσικοί διασταυρωτές. Η αλληλεπίδραση μεταξύ της καρβοξυμεθυλοκυτταρίνης και της πολυβινυλικής αλκοόλης, οδήγησαν σε ενδομοριακές εμπλοκές [150,165]. Σχεδόν όλοι οι πολυσακχαρίτες μπορούν να σχηματίσουν πηκτές μέσω της τεχνικής ψύξης-απόψυξης. Η τεχνική αυτή είναι απλή στη χρήση, αλλά χρονοβόρα. Ο βαθμός δημιουργίας σταυροδεσμών (crosslinking), σχετίζεται στενά τόσο με την θερμοκρασία και το χρόνο ψύξης και τους κύκλους της ψύξης απόψυξης (freeze-thaw) [150].



Σχήμα 3.8. Διαδικασία σχηματισμού υδροπηκτών μέσω της τεχνικής ψύξης-απόψυξης [150].

3.4.1.4. Υδρόφοβες αλληλεπιδράσεις

Τα αμφίφιλα πολυμερή μέσω υδρόφοβων αλληλεπιδράσεων αυτό-οργανώνονται σε πηκτές όταν βρεθούν σε υδατικά διαλύματα λόγω θερμοδυναμικής ασυμβατότητας των υδρόφιλων και των υδρόφοβων τμημάτων. Οι βασικές μέθοδοι που χρησιμοποιούνται για την σύνθεση υδροπηκτών μέσω υδρόφοβων αλληλεπιδράσεων είναι δύο. Η πρώτη μέθοδος εμπεριέχει τη χρήση μικυλλίων σαν διασταυρωτές. Τα μικύλλια μπορούν να "φορτωθούν" με υδρόφοβα φάρμακα ενώ ταυτόχρονα μπορούν να λειτουργούν και σαν σημεία δημιουργίας σταυροδεσμών [150]. Ο Yan [166] και οι συνεργάτες του το 2018, συνέθεσαν υδροπηκτική αποτελούμενη από μικύλλια μαλτοδεξτρίνης, τροποποιημένα με αλδεϋδη με σκοπό την ενθυλάκωση σιμβαστατίνης (φάρμακο μείωσης των λιπιδίων). Τα μικύλλια λειτούργησαν σαν διασταυρωτές στο δίκτυο του πολυσακχαρίτη. Ο χρόνος που απαιτούνταν για την δημιουργία πηκτώματος, μπορούσε εύκολα να ρυθμιστεί, ελέγχοντας τον βαθμό οξείδωσης της μαλτοδεξτρίνης [150]. Η δεύτερη μέθοδος, είναι ο εμβολιασμός υδρόφοβων τμημάτων στην υδρόφιλη πρόδρομη ένωση. Το 2019, ο Fredrick [167] με τους συνεργάτες του, συνέθεσαν υδροπηκτική, εμβολιάζοντας ένα υδρόφοβο τμήμα διοκυλαμίνης στην υδρόφιλη ένωση καρβοξυμεθυλοκυτταρίνης μέσω δημιουργίας αμιδικού δεσμού. Η ενσωμάτωση υδρόφοβων ομάδων στις υδρόφιλες αλυσίδες πολυσακχαριτών οδηγεί στην δημιουργία αμφίφυλων πολυσακχαριτών με προσαρμοστικές ιδιότητες [150].

3.4.1.5. Δημιουργία σταυροδεσμών μέσω αφυδάτωσης

Η αφυδάτωση αποτελεί άλλη μια μέθοδο φυσικής δημιουργίας σταυροδεσμών, και χρησιμοποιείται για την βελτίωση διαφόρων ιδιοτήτων των υλικών με βάση το κολλαγόνο ή την ζελατίνη (αύξηση του χρόνου αποδόμησης, βελτίωση μηχανικών ιδιοτήτων) χωρίς την προσθήκη κάποιου διασταυρωτή ή άλλης χημικής ουσίας [168]. Στη μέθοδο αυτή, υλικά με βάση το κολλαγόνο/ζελατίνη εκτίθενται σε υψηλή θερμοκρασία υπό κενό, με σκοπό την απομάκρυνση του νερού και την δημιουργία σταυροδεσμών [169]. Οι ερευνητικές ομάδες των Yannas και Silver αναφέρουν ότι η δημιουργία σταυροδεσμών είναι αποτέλεσμα αντίδρασης συμπύκνωσης [169-171].

Επιπρόσθετα, η απομάκρυνση του νερού, είναι πιθανό να καταστρέφει τους δεσμούς υδρογόνου του κολλαγόνο, οδηγώντας στην δημιουργία δεσμού υδρογόνου αμιδίου-αμιδίου που είναι ισχυρότερος από το δεσμό υδρογόνου αμιδίου-νερού, βελτιώνοντας έτσι τις ιδιότητες των υλικών [172,173]. Η κατανόηση του μηχανισμού σχηματισμού σταυροδεσμών είναι απαραίτητη για την εφαρμογή αυτής της κατεργασίας ώστε να αποκτήσει τις επιθυμητές ιδιότητες το υλικό. Η θερμοκρασία και ο χρόνος εφαρμογής της κατεργασίας αποτελούν σημεία κλειδιά, ώστε να επιτευχθεί η βελτίωση των ιδιοτήτων του λαμβανόμενου υλικού [169]. Σύμφωνα με την ερευνητική εργασία των Haugh et al., η πυκνότητα των σταυροδεσμών αυξήθηκε, αυξάνοντας την θερμοκρασία της κατεργασίας ενώ ο χρόνος δεν έπαιξε σημαντικό ρόλο. Η μετουσίωση της πρωτεΐνης αυξήθηκε τόσο με την αύξηση της θερμοκρασίας αλλά και με την αύξηση του χρόνου έκθεσης του υλικού σε υψηλή θερμοκρασία. [174].

3.4.2. Χημική δημιουργία σταυροδεσμών

Για τη βελτίωση των μορφολογικών χαρακτηριστικών και των μηχανικών ιδιοτήτων των υδροπηκτών με βάση πολυσακχαρίτες, χρησιμοποιούνται διασταυρωτές και διάφορες τεχνικές για την χημική δημιουργία σταυροδεσμών. Οι υδροπηκτές με μόνιμους ομοιοπολικούς δεσμούς εμφανίζουν υψηλή μηχανική αντοχή, όμως τόσο η ικανότητα παραμόρφωσής τους όσο και η ικανότητά τους να αυτοθεραπεύουν τυχόν βλάβες, περιορίζονται. Η χημική δημιουργία σταυροδεσμών μπορεί να επιτευχθεί μέσω χημικών αντιδράσεων των συμπληρωματικών ομάδων, με ακτινοβολία και με χρήση ενζύμου [150].

3.4.2.1. Δημιουργία σταυροδεσμών με χημικές αντιδράσεις των συμπληρωματικών ομάδων

Οι δραστικές ομάδες, -OH, -COOH, και -NH₂ που απαντώνται στους πολυσακχαρίτες μπορούν να αξιοποιηθούν, για την δημιουργία δικτύου στις υδροπηκτές. Οι συμπληρωματικές ομάδες μπορεί να βρίσκονται στις αλυσίδες των πολυμερών ή στο μόριο του διασταυρωτή που χρησιμοποιείται. Το τρισδιάστατο δίκτυο, θα σχηματιστεί μέσω χημικών αντιδράσεων των συμπληρωματικών ομάδων,

όπως $\text{NH}_2/\text{-COOH}$, $\text{-OH}/\text{-NH}_2$, και σχηματισμό βάσης του Schiff [175]. Η αντίδραση βάσης του Schiff αποτελεί την πιο συχνά χρησιμοποιούμενη μέθοδο για τη σύνθεση υδροπηκτών με βάση τη χιτοζάνη [176,177]. Οι βάσεις του Schiff υδρολύονται υπό όξινες συνθήκες και αυτό σχετίζεται με την αποδόμηση των υδροπηκτών και την ελεγχόμενη απελευθέρωση φαρμάκων. Οι ομάδες αλδεϋδης είναι τοξικές για τα κύτταρα και προκαλούν φλεγμονές στο σώμα. Αν χρησιμοποιούνται μικρά μόρια διασταυρωτών (γλουταραλδεϋδη, φορμαλδεϋδη) που περιέχουν ομάδα αλδεϋδης πρέπει να ακολουθεί σχολαστική απομάκρυνση της ποσότητας του διασταυρωτή που δεν αντέδρασε [150]. Για παράδειγμα, οι καρβοξυλομάδες του υαλουρονικού οξέος μπορούν να δημιουργήσουν σταυροδεσμούς μέσω αντιδράσεων συμπύκνωσης μεταξύ των ομάδων $\text{-COOH}/\text{-OH}$ ή $\text{-COOH}/\text{-NH}_2$. Οι εστερικοί ή αμιδικοί δεσμοί δρουν σαν συνδέτες για την δημιουργία σταυροδεσμών στις πολυμερικές αλυσίδες του υαλουρονικού οξέος [178]. Το υαλουρονικό οξύ μπορεί επίσης να τροποποιηθεί με σκοπό τον σχηματισμό άλλων δραστικών ομάδων [150]. Για παράδειγμα, η ντοπαμίνη μπορεί να εμβολιαστεί στο υαλουρονικό οξύ χρησιμοποιώντας EDC και NHS [179]. Ο πιο κοινός τρόπος δημιουργίας σταυροδεσμών στο αλγινικό οξύ είναι μέσω ιοντικών αλληλεπιδράσεων, αλλά η καρβοξυλομάδα του μπορεί επίσης να τροποποιηθεί [180]. Η κυτταρίνη, η δεξτράνη και το άμυλο, δημιουργούν σταυροδεσμούς μέσω αντιδράσεων των υδροξυλομάδων. Έχει επίσης αναφερθεί η σύνθεση υλικών ζελατίνης-χιτοζάνης, όπου χρησιμοποιήθηκε EDC και NHS για την δημιουργία σταυροδεσμών [181,182].

3.4.2.2. Δημιουργία σταυροδεσμών μέσω ακτινοβολίας

Η δημιουργία σταυροδεσμών μέσω ακτινοβολίας μπορεί να επιτευχθεί με δύο τρόπους, 1) με χρήση υπεριώδους ακτινοβολίας (UV) [183,184] και 2) με χρήση ακτινοβολιών υψηλής ενέργειας (ακτινοβολία γ , ακτινοβολία δέσμης ηλεκτρονίων (beam electron) [150,185-188]. Η έκθεση των υλικών σε ακτινοβολία, μπορεί να οδηγήσει στην δημιουργία ριζών στις πολυμερικές αλυσίδες, που λειτουργούν ως εκκινητές του πολυμερισμού ακόρεστων δεσμών, ή την μετατροπή των αδρανών ομάδων σε δραστικές. Η χρήση ακτινοβολίας αποτελεί πράσινη μέθοδο σύνθεσης υδροπηκτών, λόγω του ότι δεν χρησιμοποιείται διασταυρωτής ή κάποια άλλη ουσία, ενώ ταυτόχρονα με την δημιουργία της πηκτής, λαμβάνει χώρα και αποστείρωση του υλικού. Ωστόσο

η ακτινοβολία μπορεί να προκαλέσει καταστροφή ή μετουσίωση του πολυσακχαρίτη. Η ισορροπία μεταξύ της πρόκλησης μετουσίωσης και της δημιουργίας σταυροδεσμών που προκαλείται από την χρήση ακτινοβολίας, αποτελεί κρίσιμο σημείο που πρέπει πάντα να λαμβάνεται υπόψιν κατά τη σύνθεση υδροπηκτών με βάση πολυσακχαρίτες [150,151]. Ένα σημαντικό πλεονέκτημα αυτής της μεθόδου για την δημιουργία επιθεμάτων, είναι ο γρήγορος και ελεγχόμενος ρυθμός δημιουργίας της πηκτής. Ο Obara [184] και οι συνεργάτες του, το 2019, ανέπτυξαν υδροπηκτική υαλουρονικού οξέος-ζελατίνης χρησιμοποιώντας υπεριώδη ακτινοβολία. Την ίδια χρονολογία, στην ερευνητική εργασία των Acevedo et al. [189], αναφέρεται η ανάπτυξη μεμβράνης χιτοζάνης-ζελατίνης με χρήση υπεριώδους ακτινοβολίας για εφαρμογές αναγέννησης ιστού. Το 2012, ο Dutta [145], συνέθεσε υδροπηκτική αποτελούμενη συνθετικά πολυμερή και χλωριούχο ασβέστιο χρησιμοποιώντας ακτινοβολία γ. Πέραν της χρήσης της για δημιουργία σταυροδεσμών, η υπεριώδης ακτινοβολία μπορεί να χρησιμοποιηθεί και για την αποστείρωση ήδη δημιουργημένων υλικών. Ωστόσο, το υψηλό κόστος και οι απαιτήσεις εξοπλισμού περιορίζουν την ευρεία χρήση αυτής της τεχνικής [150].

3.4.2.3. Δημιουργία σταυροδεσμών με χρήση ενζύμων

Άλλη μια μέθοδος για δημιουργία σταυροδεσμών κατά την σύνθεση υδροπηκτών με βάση πολυσακχαρίτες, είναι η χρήση ενζύμου, σε αντιδράσεις που πραγματοποιούνται υπό ήπιες συνθήκες [176,190]. Η τροποποίηση των ιδιοτήτων των πρωτεϊνών μέσω σχηματισμού σταυροδεσμών είναι σημαντική για εφαρμογές σε πολλούς τομείς όπως η επεξεργασία τροφίμων, η κατασκευή δέρματος και υφασμάτων, η μηχανική ιστών καθώς και οι βιοϊατρικές εφαρμογές [191]. Οι τρανσφεράσες, οι υδρολάσες και οι οξειδοοξειδάσες μπορούν να χρησιμοποιηθούν ως καταλύτες για τη σύνθεση διασταυρωμένων πρωτεϊνών [191]. Η υπεροξειδάση του χρένου (HRP) μπορεί να καταλύσει τη σύζευξη του παραγωγού φαινόλης ή ανιλίνης μέσω αποσύνθεσης του υπεροξειδίου του υδρογόνου [192]. Η μικροβιακή τρανσλουταμινάση (MTGase) δρα ως καταλύτης σε αντιδράσεις μεταφοράς αλκυλίου μεταξύ της ομάδας γ-καρβονυλίου υπολείμματος γλουταμίνης και της ε-αμινομάδας υπολείμματος λυσίνης [190]. Ωστόσο το υψηλό κόστος περιορίζει την εφαρμογή της δημιουργίας σταυροδεσμών με αυτή την μέθοδο [150].

3.5 ΕΠΙΛΟΓΗ ΤΩΝ ΦΥΣΙΚΩΝ ΠΟΛΥΜΕΡΩΝ ΓΙΑ ΤΗΝ ΑΝΑΠΤΥΞΗ ΤΩΝ ΥΛΙΚΩΝ ΤΗΣ ΠΑΡΟΥΣΗΣ ΔΙΑΤΡΙΒΗΣ

Στο παρόν υποκεφάλαιο περιγράφονται οι λόγοι που χρησιμοποιήθηκαν η ζελατίνη, η χιτοζάνη και η χονδροϊτίνη για την ανάπτυξη των υλικών που συντέθηκαν στα πλαίσια διατριβής.

- Ζελατίνη: χρησιμοποιήθηκε λόγω της βιοσυμβατότητάς της και του χαμηλού κόστους. Άλλος ένας παράγοντας που οδήγησε στη χρήση της είναι η ιδιότητα της προαγωγής τόσο της προσκόλλησης αλλά και της ανάπτυξης των κυττάρων [193].
- Χιτοζάνη: βιοσυμβατό και βιοαποικοδομήσιμο πολυμερές, κρίθηκε απαραίτητο να χρησιμοποιηθεί λόγω της αιμοστατικής της ιδιότητας και του χαμηλού κόστους [193].
- Χονδροϊτίνη: χρησιμοποιήθηκε λόγω της αντιοξειδωτικής και αντιφλεγμονώδους δράσης που διαθέτει ενώ έχει αποδειχθεί ότι δραματίζει ουσιώδη ρόλο στην επούλωση [194,195].

Τα φυσικά αυτά πολυμερή αλληλεπιδρούν μεταξύ τους μέσω δευτερογενών αλληλεπιδράσεων οδηγώντας στην ανάπτυξη δικτύου (φυσικός σχηματισμός σταυροδεσμών) και στη λήψη υλικών με ικανοποιητικές ιδιότητες για εφαρμογή στον τομέα της επούλωσης τραυμάτων.

Στόχος είναι η λήψη υλικών που:

- Χρησιμοποιούνται ανάλογα τη φύση και τις ανάγκες της πληγής.
- Διαθέτουν εύρος ικανότητας απορρόφησης νερού και διαφορετικούς ρυθμούς αποδόμησης.
- Επαναχρησιμοποιούνται.
- Προστατεύουν την πληγή από παθογόνους μικροοργανισμούς.
- Υποστηρίζουν την κυτταρική προσκόλληση και τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 4. ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΕΣ ΤΕΧΝΙΚΕΣ ΕΝΟΡΓΑΝΗΣ ΑΝΑΛΥΣΗΣ

Στο κεφάλαιο αυτό περιγράφονται οι τεχνικές ενόργανης ανάλυσης που χρησιμοποιήθηκαν για το χαρακτηρισμό των πρώτων υλών και των αναμιγμάτων.

4.1. ΦΑΣΜΑΤΟΣΚΟΠΙΑ FT-IR

Η βασική αρχή της φασματοσκοπίας υπέρυθρου είναι η ολική ή μερική απορρόφηση ορισμένων συχνοτήτων του φωτός, όταν αυτό διέλθει μέσω ενός δείγματος. Συνεπώς, μετρώντας τις % μεταβολές στο υπέρυθρο φως που εξέρχεται από το δείγμα συναρτήσει του μήκους κύματος ή της συχνότητας, λαμβάνεται το φάσμα απορρόφησης. Η απορροφώμενη ακτινοβολία αντιστοιχεί στην ενέργεια που απαιτείται για τις δονήσεις των ατόμων που συνιστούν το μόριο. Άρα, κάθε διαφορετικό μόριο δίνει το δικό του χαρακτηριστικό φάσμα απορρόφησης, το οποίο μπορεί να παρομοιαστεί με το δακτυλικό αποτύπωμα του μορίου. Η υπέρυθρη ακτινοβολία που απορροφάται από ένα μόριο μεταξύ $10000-100\text{ cm}^{-1}$ μετατρέπεται σε ενέργεια μοριακής δόνησης δεσμών. Υπάρχουν δύο τύποι μοριακών δονήσεων, η δόνηση κάμψης και η δόνηση έκτασης. Η δόνηση έκτασης περιλαμβάνει τη ρυθμική κίνηση κατά μήκος του άξονα του δεσμού, έτσι ώστε η απόσταση μεταξύ των ατόμων να αυξάνεται ή να μειώνεται υπό μορφή ταλάντωσης. Κατά τη δόνηση κάμψης παρατηρείται είτε μεταβολή στη γωνία δύο δεσμών με κοινό άτομο, ή μετακίνηση μιας ομάδας ατόμων ως προς το υπόλοιπο του μορίου υπό την προϋπόθεση ότι τα άτομα της εν κινήσει ομάδας μένουν ακίνητα το ένα ως προς το άλλο [196].

4.2. ΠΕΡΙΘΛΑΣΗ ΑΚΤΙΝΩΝ -X (XRD)

Η τεχνική αυτή χρησιμοποιείται για τη μελέτη της κρυσταλλικότητας ενός υλικού. Επίσης, με την XRD μπορεί να γίνει και ταυτοποίηση ενός άγνωστου υλικού. Η συσκευή που χρησιμοποιείται για τη μέτρηση της κρυσταλλικότητας αποτελείται από μια πηγή ακτίνων X, με ακτινοβολία η οποία συνήθως προέρχεται από μια λυχνία Cu ή Mo, έναν δειγματοφόρα και έναν ανιχνευτή στερεάς κατάστασης. Ο πιο

συνηθισμένος τρόπος παραγωγής ακτίνων X είναι μέσω επιτάχυνσης ηλεκτρονίων από δυναμικό τάξης μεγέθους δεκάδων χιλιάδων βολτ και πρόσπτωσή τους σε στόχο, ο οποίος αποτελείται από μεταλλικό υλικό σχετικά μεγάλου ατομικού αριθμού. Τα ηλεκτρόνια που προσπίπτουν στο στόχο χάνουν σταδιακά την ενέργειά τους, εφόσον υφίστανται επιβράδυνση από τα άτομα του υλικού του στόχου. Η ενέργεια που αποδίδουν στα άτομα του στόχου είναι αρκετή για να διεγείρει και ηλεκτρόνια των εσωτερικών στοιβάδων των ατόμων. Αποτέλεσμα αυτού είναι η συμπλήρωση αυτών των στοιβάδων με ηλεκτρόνια από υψηλότερη στάθμη και έτσι παράγονται χαρακτηριστικές ακτίνες X. Η διαδικασία προετοιμασίας του δείγματος περιλαμβάνει την κονιοποίηση του δείγματος, με στόχο τον προσανατολισμό των μικροκρυσταλλιτών του δείγματος προς κάθε δυνατή κατεύθυνση. Έτσι διασφαλίζεται η ανάκλαση κατά Bragg της δέσμης από μεγάλο αριθμό μικροκρυσταλλιτών. Το δείγμα τοποθετείται πάνω σε ειδικούς υποδοχείς από μη κρυσταλλικό υλικό, ώστε να μην επηρεάζει τη μέτρηση μέσα σε έναν ειδικό θάλαμο και αρχίζει να περιστρέφεται με τη βοήθεια ενός γωνιομέτρου, με σταθερό ρυθμό. Κατά την περιστροφή του δείγματος, δημιουργείται συνεχώς καινούρια γωνία πρόσπτωσης των ακτίνων X. Η δέσμη των ακτίνων που περιθλάται, συλλέγεται μέσω του ανιχνευτή και αναλύεται, δίνοντας το τελικό φάσμα περίθλασης, το οποίο αποτυπώνεται στην οθόνη ενός ηλεκτρονικού υπολογιστή. Από τα φάσματα περίθλασης, εξάγεται η κρυσταλλική μορφή του στερεού υλικού. Όσο πιο οξείες είναι οι κορυφές, δηλαδή όσο μεγαλύτερη είναι η ένταση, τόσο μεγαλύτεροι είναι και οι κρύσταλλοι του υλικού. Η απαραίτητη συνθήκη για την εμφάνιση του φαινομένου της περίθλασης εκφράστηκε από τον Bragg και η μαθηματική έκφραση αυτής δίνεται από την παρακάτω σχέση, γνωστός και ως νόμος του Bragg:

$$n\lambda = 2 d \sin\theta \quad (\text{όπου } n = 1,2,3,4\dots)$$

όπου n είναι ακέραιος αριθμός που δηλώνει την τάξη της σκεδαζόμενης ακτινοβολίας, λ το μήκος κύματος της ακτινοβολίας, d η απόσταση μεταξύ των πλεγματικών επιπέδων στην εξεταζόμενη κρυσταλλική διεύθυνση και θ η γωνία πρόσπτωσης.

4.3. ΘΕΡΜΙΚΗ ΣΤΑΘΜΙΚΗ ΑΝΑΛΥΣΗ (TGA)

Η θερμική ανάλυση των στερεών καταγράφει τη μεταβολή ορισμένων φυσικών και χημικών ιδιοτήτων τους (ενθαλπία, μάζα κ.τ.λ.), συναρτήσει της θερμοκρασίας. Αυτές οι μεταβολές μπορούν να γίνουν αντιληπτές, μελετώντας τις αντιδράσεις των στερεών, την αποσύνθεσή τους και τη μεταβολή των στερεών φάσεων.

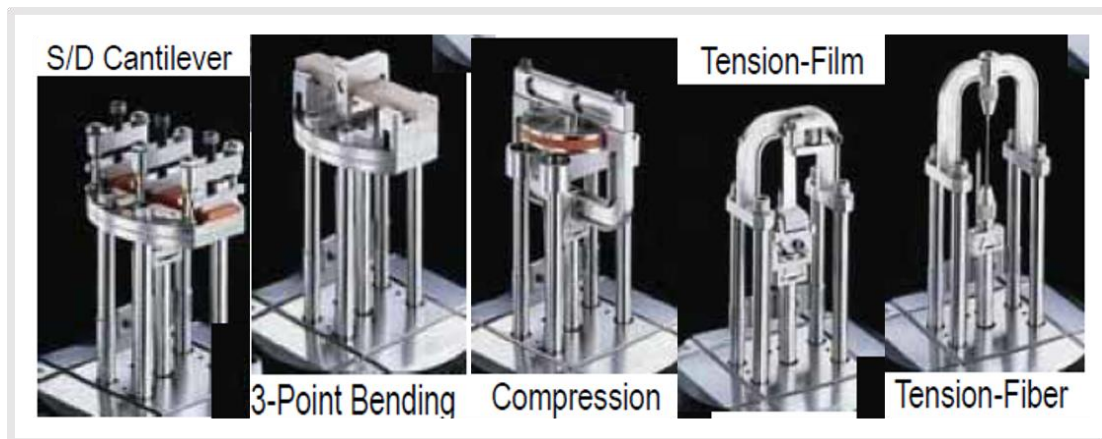
Κατά τη διάρκεια των μετρήσεων TGA καταγράφεται η μεταβολή του βάρους του υπό εξέταση δείγματος ως συνάρτηση της θερμοκρασίας. Πιο συγκεκριμένα, η μέθοδος αυτή βασίζεται στη μέτρηση της αλλαγής της μάζας της μετασχηματιζόμενης ουσίας, συναρτήσει της θερμοκρασίας. Προσδιορίζονται η χημική σύσταση και η αναλογία των φάσεων του ενός στερεού δείγματος και παρέχει τη δυνατότητα μελέτης της κινητικής μετασχηματισμού των φάσεων.

4.4. ΔΥΝΑΜΙΚΗ ΜΗΧΑΝΙΚΗ ΑΝΑΛΥΣΗ (DMA)

Η δυναμική μηχανική ανάλυση (DMA) αποτελεί μια αναλυτική μέθοδο κατά την οποία εφαρμόζεται μια ημιτονοειδής μηχανική τάση σε ένα δείγμα και η προκύπτουσα ημιτονοειδής μεταβολή της παραμόρφωσης με τον χρόνο εκφράζεται ως ρυθμός παραμόρφωσης ο οποίος καθορίζεται από τη συχνότητα. Η τεχνική DMA μπορεί να χρησιμοποιηθεί για τη θερμομηχανική μελέτη αρκετών υλικών. Οι όροι E' και E'' αναφέρονται ως μέτρο αποθήκευσης και μέτρο απωλειών αντίστοιχα. Για ένα πολυμερές, το E' χαρακτηρίζει την ικανότητα του να αποθηκεύει ενέργεια (ελαστική συμπεριφορά) και υπολογίζεται από τη σχέση $E' = (\text{stress/strain})\cos\delta$, ενώ το E'' εκφράζει την τάση του υλικού να διαχέει ενέργεια (ιξώδης συμπεριφορά) και υπολογίζεται από τη σχέση $E'' = (\text{stress/strain})\sin\delta$. Ο παράγοντας απώλειας ($\tan \delta$) μετρά την ικανότητα απόσβεσης δονήσεων του υλικού και ισούται με $\tan(\delta) = E''/E'$. Κάποιες παράμετροι που μπορούν να υπολογιστούν μέσω της δυναμικής μηχανικής ανάλυσης είναι [197,198]:

- Μεταβάσεις που προέρχονται από μοριακές κινήσεις.
- Προσδιορισμός του μέτρου αποθήκευσης (E'), του μέτρου απωλειών (E'') και της επαπτομένης των απωλειών ($\tan \delta$) συναρτήσει της θερμοκρασίας ή/και της συχνότητας.

- Μελέτη σχέσεων δομής-ιδιοτήτων.
- Προσδιορισμός θερμοκρασίας υαλώδους μετάπτωσης (T_g) και δευτερευουσών μεταβάσεων.
- Διαχωρισμός φάσεων πολυμερικών μειγμάτων.
- Γήρανση (φυσική ή χημική).
- Επίδραση πλαστικοποιητών και υγρασίας.



Σχήμα 4.1. Απεικόνιση διαφόρων αρπαγών που χρησιμοποιούνται κατά τις μετρήσεις DMA [197].

Κατά το θερμομηχανικό έλεγχο προσδιορίζεται η απόκριση του υλικού σε ημιτονοειδή παραμόρφωση είτε υπό συγκεκριμένη θερμοκρασία για διάφορες τιμές συχνοτήτων, είτε σε συγκεκριμένη συχνότητα για ένα εύρος θερμοκρασιών. Ανάλογα το είδος του υλικού που πρόκειται να εξεταστεί χρησιμοποιείται και η ανάλογη αρπάγη. Οι άρπαγες φαίνονται στο σχήμα 4.1.

4.5. ΗΛΕΚΤΡΟΝΙΚΗ ΜΙΚΡΟΣΚΟΠΙΑ ΣΑΡΩΣΗΣ (SEM)

Μέσω της ηλεκτρονιακής μικροσκοπίας σάρωσης (SEM) παρέχεται η δυνατότητα παρατήρησης και χαρακτηρισμού υλικών με σάρωση της επιφάνειας [199]. Το δείγμα προσβάλλεται με δέσμη ηλεκτρονίων ορισμένης ενέργειας από 5 ως 40 keV. Κατά την έκθεση του παράγονται δευτερογενή ηλεκτρόνια, σκεδαζόμενα ηλεκτρόνια, ηλεκτρόνια Auger και ακτίνες-X. Στη συγκεκριμένη μελέτη σημασία έχουν τα δευτερογενή ηλεκτρόνια και τα σκεδαζόμενα ηλεκτρόνια γιατί από αυτά παράγεται η εικόνας που παρατηρούμε με μεγάλη διακριτική ικανότητα. Τα δευτερογενή ηλεκτρόνια παράγονται μέσω ανελαστικής σκέδασης ανάμεσα στα ηλεκτρόνια της δέσμης και τα άτομα του στόχου. Κατά τη σάρωση γίνεται μετακίνηση της δέσμης σε δύο διαστάσεις X, Y για τη μικροσκοπική μελέτη του δείγματος. Η διαφορά ενέργειας που υπάρχει με τη μετακίνηση του ηλεκτρονίου από υψηλότερες ενεργειακά στοιβάδες σε χαμηλότερες, ισοσταθμίζεται με την εκπομπή φωτονίων (ακτίνες-X) και των ηλεκτρονίων Auger, που έχουν ορισμένο μήκος κύματος λ (nm) και το οποίο προσδιορίζεται από την παρακάτω σχέση.

$$\lambda = \frac{hc}{eE}$$

Όπου, h: σταθερά Plank, c: ταχύτητα του φωτός, e: φορτίο ηλεκτρονίου, E: ενέργεια (keV). Τα οπισθοσκεδαζόμενα ηλεκτρόνια και οι ακτίνες X, δίνουν πληροφορίες για την χημική σύσταση του δείγματος.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 5. ΑΝΑΠΤΥΞΗ ΚΑΙ ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΜΟΣ ΥΔΡΟΠΗΚΤΩΝ ΧΙΤΟΖΑΝΗΣ (Chi)-ΖΕΛΑΤΙΝΗΣ ΙΧΘΥΩΝ (FG)

5.1 ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Η ζελατίνη ιχθύων, ως εναλλακτική πηγή έχει προσελκύσει το ενδιαφέρον της επιστημονικής κοινότητας τα τελευταία χρόνια. Οι λόγοι που έχουν κάνει δημοφιλή τη χρήση της είναι κυρίως οι ασθένειες των θηλαστικών και η αξιοποίηση των αποβλήτων των βιομηχανιών επεξεργασίας ιχθύων (δέρμα, οστά κ.τ.λ.) [200]. Η ζελατίνη προέρχεται από μερική υδρόλυση του κολλαγόνου, είναι βιοδιασπώμενο, βιοσυμβατό, μη τοξικό και χαμηλού κόστους φυσικό πολυμερές. Άλλο ένα πλεονέκτημα του υλικού, είναι η ιδιότητα του να δημιουργεί υμένα/μεμβράνες. Βασικά μειονεκτήματα αποτελούν η άμεση διάλυση όταν έρχεται σε επαφή με το νερό και οι κακές μηχανικές ιδιότητες των λαμβανόμενων υλικών περιορίζοντας τις εφαρμογές της (υλικά συσκευασίας, βιοϊατρικές εφαρμογές κ.τ.λ.) [201-203].

Η τροποποίηση των μεμβρανών ζελατίνης κρίνεται αναγκαία με σκοπό τη βελτίωση των μηχανικών ιδιοτήτων (αναλόγως την εφαρμογή) και τη μείωση του ρυθμού αποδόμησης όταν έρχονται σε επαφή με το νερό. Στη διεθνή βιβλιογραφία υπάρχουν αρκετές εργασίες όπου μέσω χημικών τροποποιήσεων και διαφόρων άλλων διαδικασιών έχουν γίνει προσπάθειες ώστε να ξεπεραστούν τα προαναφερθέντα μειονεκτήματα και να βελτιωθούν οι ιδιότητες των λαμβανόμενων υλικών [204-207], όμως πολλές φορές η χρήση τοξικών ενώσεων (συνήθως είναι ενώσεις που βοηθούν στη δημιουργία σταυροδεσμών) και το υψηλό κόστος περιορίζει τα πεδία εφαρμογής των υλικών με βάση τη ζελατίνη. Όταν πρόκειται τα υλικά αυτά να χρησιμοποιηθούν σε βιοϊατρικές εφαρμογές αλλά και στην ανάπτυξη υλικών συσκευασίας, είναι πολύ πιθανό η απελευθέρωση του διασταυρωτή που δεν έχει αντιδράσει να προκαλέσει προβλήματα κυτταροτοξικότητας στις *in vitro* δοκιμές [99,208], οπότε η χρήση του κατά τη σύνθεση του υλικού πρέπει να γίνεται προσεκτικά και σε συγκεκριμένες συγκεντρώσεις περιπλέκοντας τη σύνθεση. Ο συνδυασμός της με άλλα βιοπολυμερή, στις σωστές αναλογίες, αποτελεί μια αποτελεσματική προσέγγιση με σκοπό τη βελτίωση των ιδιοτήτων των αρχικών υλικών [209,210] αναλόγως την εφαρμογή.

Η χιτοζάνη, ένα βιοπολυμερές που λαμβάνεται από αποακετυλίωση της χιτίνης, είναι φυσικός πολυσακχαρίτης, συχνά χρησιμοποιούμενος σε βιοϊατρικές εφαρμογές, καλλυντικά, υλικά συσκευασίας και πολλές άλλες εφαρμογές. Οι λόγοι χρήσης της σε βιοϊατρικές εφαρμογές είναι η βιασυμβατότητά της, η βιοαποικοδομησιμότητα της, η αντιμικροβιακή της δράση και η απουσία τοξικότητας [211]. Επίσης έχει αποδειχθεί ότι διαθέτει αιμοστατικές [212,213] και αντιοξειδωτικές ιδιότητες [214-216]. Τέλος έχει μελετηθεί και ως αντικαρκινικός παράγοντας [217-219]. Η χιτοζάνη δεν είναι υδατοδιαλυτή και αυτό αποτελεί βασικό μειονέκτημα [220,221], όμως με την κατάλληλη επεξεργασία και με συνδυασμό άλλων φυσικών και συνθετικών πολυμερών μπορεί να χρησιμοποιηθεί σε ένα ευρύ πεδίο εφαρμογών.

Έχει αποδειχθεί ότι ο συνδυασμός χιτοζάνης και ζελατίνης οδηγεί σε υλικά με βελτιωμένες ιδιότητες σε σύγκριση με τα υμένα που αποτελούνται μόνο από ζελατίνη ή χιτοζάνη [203,222-224]. Αν και έχουν πραγματοποιηθεί αρκετές μελέτες με αυτά τα φυσικά πολυμερή, στην πλειοψηφία τους έχει χρησιμοποιηθεί ζελατίνη που έχει εξαχθεί από θηλαστικά. Επίσης ο συνδυασμός τους κατά κύριο λόγο, έχει γίνει με σκοπό τη δημιουργία υλικών συσκευασίας και βρώσιμων μεμβρανών [203,225,226] είτε σε ανάπτυξη πορωδών υλικών (σπόγγοι και αφροί) για βιοϊατρικές εφαρμογές.

Στην παρούσα διατριβή συντέθηκαν μεμβράνες, διατηρώντας σταθερή τη συγκέντρωση της χιτοζάνης, μεταβάλλοντας τη συγκέντρωση της ζελατίνης, με σκοπό την ανάπτυξη υλικών για χρήση ως επιθέματα επούλωσης τραυμάτων. Η χιτοζάνη και η ζελατίνη που χρησιμοποιήθηκαν στην παρούσα διατριβή, προέρχονται από ιχθύες.

5.2. ΣΥΝΘΕΣΗ ΥΔΡΟΠΗΚΤΩΝ ΧΙΤΟΖΑΝΗΣ-ΖΕΛΑΤΙΝΗΣ ΙΧΘΥΩΝ

5.2.1. Αντιδραστήρια

- Χιτοζάνη (μέσου μοριακού βάρους), Sigma-Aldrich, Βαθμός αποακετυλίωσης 75-85 %, M.B. = 190.000 Da-310.000 Da, Lot #STBH6274
- Ζελατίνη Ιχθύων (Gelatin from cold water fish skin), Sigma-Aldrich, M.B.=60.000 Da
- Οξικό οξύ (CH₃COOH), Honeywell, ≥99,8 %, M.B. = 60,052 g/mol, d = 1,05 g/ml
- Απεσταγμένο νερό

5.2.2. Περιγραφή της συνθετικής πορείας

Ακολουθεί περιγραφή της συνθετικής πορείας της υδροπηκτής Chi₅₀FG₅₀. Οι ποσότητες που χρησιμοποιήθηκαν για τη σύνθεση των μεμβρανών χιτοζάνης, ζελατίνης, Chi₃₀FG₇₀, και Chi₂₀FG₈₀ αναγράφονται στον πίνακα 5.1.

5.2.2.1 Σύνθεση της υδροπηκτής Chi₅₀FG₅₀

Για τη σύνθεση της μεμβράνης Chi₅₀FG₅₀, σε ποτήρι ζέσεως των 100 ml που περιέχει 24 ml απεσταγμένου νερού, προστίθεται 0.5 g (2 % w/v) ζελατίνης ιχθύων και αφήνεται υπό ανάδευση (400 rpm) μέχρι την πλήρη διάλυση της. Στη συνέχεια και ενώ το διάλυμα βρίσκεται υπό ανάδευση, προστίθεται 0.5 g (2 % w/v) χιτοζάνης. Κατόπιν ακολουθεί η προσθήκη οξικού οξέος 4 % (v/v), και παραμένει υπό ανάδευση (400 rpm) για 2 ώρες με σκοπό την πλήρη ομογενοποίησή του. Αφού ομογενοποιήθηκε το διάλυμα, μεταφέρθηκε σε πλαστικό τρυβλίο Petri και αφέθηκε περίπου 18 ώρες σε θερμοκρασία δωματίου με σκοπό την εξάτμιση του διαλύτη και την παραλαβή της μεμβράνης.

Αντίστοιχη διαδικασία ακολουθήθηκε και για την σύνθεση των μεμβρανών Chi₃₀FG₇₀ και Chi₂₀FG₈₀ ενώ με παρόμοιο τρόπο συντέθηκαν και οι μεμβράνες χιτοζάνης και ζελατίνης. Η διαφορά, όπως είναι φυσιολογικό, έγκειται στην αύξηση του χρόνου διάλυσης της ζελατίνης και της ομογενοποίησης του διαλύματος, όσο αυξάνεται η συγκέντρωσή της ζελατίνης. Η αύξηση της συγκέντρωσης της ζελατίνης, επιφέρει επίσης αύξηση του χρόνου παραμονής του διαλύματος στα τρυβλία, μέχρι την παραλαβή των μεμβρανών.

Πίνακας 5.1. Ποσότητες αντιδραστηρίων που χρησιμοποιήθηκαν για τη σύνθεση των υδροπηκτών χιτοζάνης, ζελατινής ιχθύων και των αναμιγμάτων.

ΥΔΡΟΠΗΚΤΕΣ ΧΙΤΟΖΑΝΗΣ-ΖΕΛΑΤΙΝΗΣ ΙΧΘΥΩΝ				
Χιτοζάνη	Ζελατίνη Ιχθύων	Chi₅₀FG₅₀ (% wt. 50/50)	Chi₃₀FG₇₀ (% wt. 30/70)	Chi₂₀FG₈₀ (% wt. 20/80)
0.5 gr (2 % w/v) χιτοζάνη	0.5 gr ζελατίνη ιχθύων (2% w/v)	0.5 gr (2 % w/v) χιτοζάνη	0.5 gr (2 % w/v) χιτοζάνη	0.5 gr (2 % w/v) χιτοζάνη
24 ml H ₂ O	24 ml H ₂ O	0.5 gr ζελατίνη ιχθύων (2% w/v)	1 gr ζελατίνη ιχθύων (4 % w/v)	2 gr ζελατίνη ιχθύων (8 % w/v)
1 ml (4 % v/v) HAc	-	24 ml H ₂ O	24 ml H ₂ O	24 ml H ₂ O
-	-	1 ml (4 % v/v) HAc	1 ml (4 % v/v) HAc	1 ml (4 % v/v) HAc

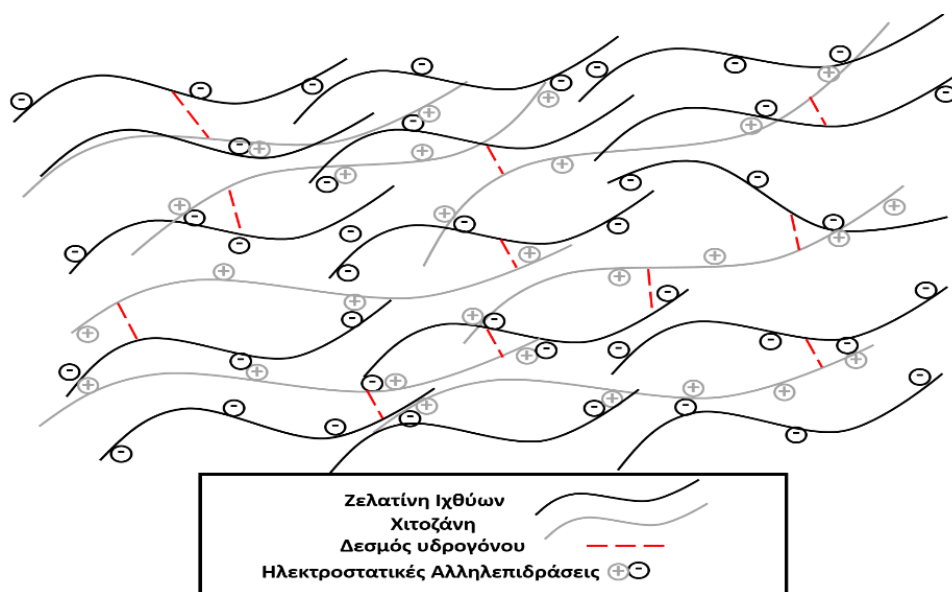
Παρατηρήσεις

Η συγκέντρωση οξικού οξέος (4 % v/v) που χρησιμοποιήθηκε, είναι υψηλότερη σε σχέση με τη βιβλιογραφία που κυμαίνεται από 1 % v/v έως 3 % v/v [57,99,203,227]. Δοκιμάστηκαν και χαμηλότερες συγκεντρώσεις όμως χρησιμοποιήθηκε αυτή η συγκέντρωση διότι η χιτοζάνη που χρησιμοποιήθηκε είχε βαθμό αποακετυλίωσης 75 %-85 % με μεγάλο εύρος μοριακού βάρους (190.000-310.000 Da), καθιστώντας δύσκολή την διάλυσή της σε χαμηλότερες συγκεντρώσεις οξικού οξέος. Όταν αποφασίσει κανείς να χρησιμοποιήσει χιτοζάνη με αντίστοιχο βαθμό αποακετυλίωσης, θα πρέπει να γνωρίζει ότι η συνθετική πορεία που πρόκειται να ακολουθήσει, θα μεταβάλλεται. Όμως αυτό δεν αποτελεί πρόβλημα αν αναλογιστεί κανείς το υψηλότερο κόστος της χιτοζάνης με υψηλότερο βαθμό αποακετυλίωσης.

5.2.2.2. Μηχανισμός σχηματισμού υδροπηκτής

Η χιτοζάνη, σε όξινα pH πρωτονιώνεται, επομένως είναι θετικά φορτισμένη. Επιπρόσθετα, στη δομή της ζελατινής περιέχονται αρκετές δραστικές ομάδες όπως -COOH, -NH₂ και -OH, ικανές να δημιουργήσουν δεσμούς υδρογόνου με τις ομάδες -NH₂ και -OH, που υπάρχουν στις αλυσίδες της χιτοζάνης [209]. Οι μεταξύ τους

αλληλεπιδράσεις αποδίδονται σε ηλεκτροστατικές αλληλεπιδράσεις και σχηματισμό δεσμών υδρογόνου [203]. Μεταξύ των αμινομάδων της χιτοζάνης και των καρβονυλομάδων της ζελατίνης ιχθύων λαμβάνουν χώρα ηλεκτροστατικές αλληλεπιδράσεις ενώ μεταξύ των πολυμερικών αλυσίδων σχηματίζονται δεσμοί υδρογόνου μέσω ενδομοριακών και διαμοριακών αλληλεπιδράσεων. Στις αλληλεπιδράσεις αυτές εμπλέκονται οι καρβονυλομάδες, οι υδροξυλομάδες και οι αμινομάδες που εμπεριέχονται στα φυσικά πολυμερή.



Σχήμα 5.1. Απλουστευμένη απεικόνιση των αλληλεπιδράσεων μεταξύ της χιτοζάνης και της ζελατίνης ιχθύων.



Σχήμα 5.2. Υδροπηκτές Chi₅₀FG₅₀ και Chi₂₀FG₈₀ από αριστερά προς τα δεξιά.

5.3 ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΜΟΣ ΥΔΡΟΠΗΚΤΩΝ ΧΙΤΟΖΑΝΗΣ (Chi)-ΖΕΛΑΤΙΝΗΣ ΙΧΘΥΩΝ (FG)

5.3.1. Φασματοσκοπία FT-IR

5.3.1.1. Πειραματική διαδικασία

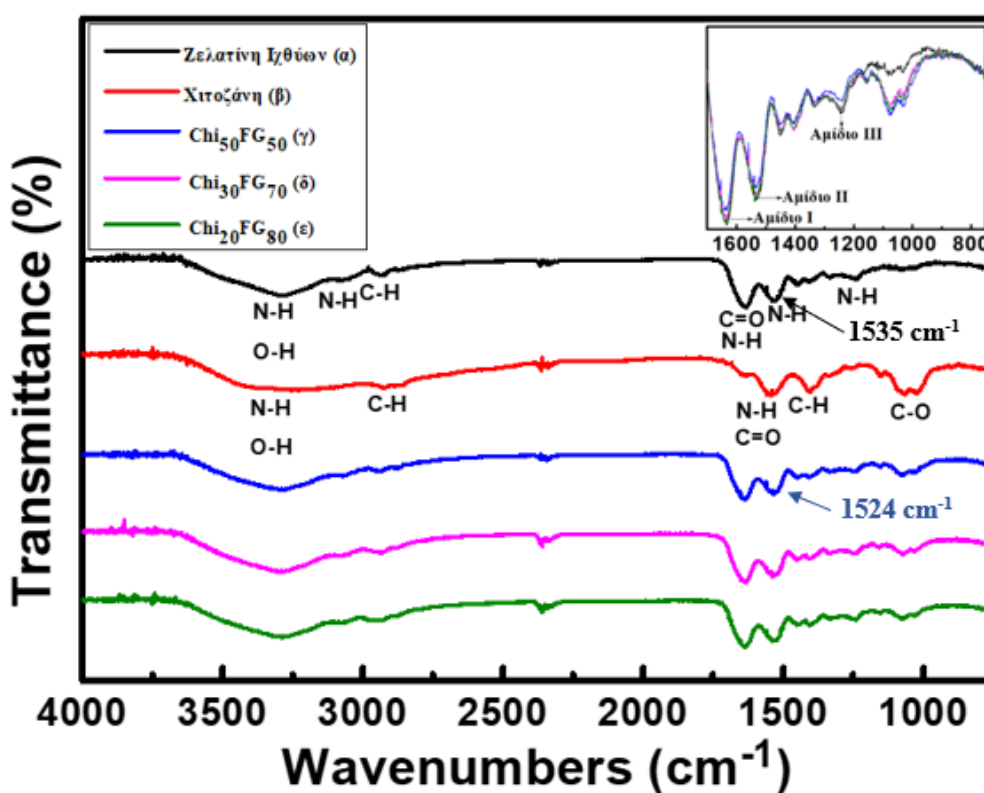
Οι μετρήσεις φασματοσκοπίας μέσω υπερύθρου πραγματοποιήθηκαν με φασματοφωτόμετρο FT / IR-4100 της εταιρίας Jasco. Τα φάσματα καταγράφηκαν στην περιοχή των $4000-750\text{ cm}^{-1}$. Για την πραγματοποίηση των μετρήσεων κόπηκε κομμάτι από τις υδροπηκτές ενώ δεν πραγματοποιήθηκε περαιτέρω επεξεργασία.

5.3.1.2. Αποτελέσματα και συζήτηση

Τα αποτελέσματα της φασματοσκοπίας FT-IR παρουσιάζονται στο σχήμα 5.3. Στο φάσμα που αναφέρεται στην ζελατίνη ιχθύων (α), ο ώμος στην περιοχή από 3500 cm^{-1} έως 3200 cm^{-1} αποδίδεται σε δονήσεις έκτασης των υδροξυλομάδων (-OH) και των αμινομάδων (-NH) (οι κορυφές επικαλύπτονται) και υποδεικνύουν τον σχηματισμό ενδομοριακών δεσμών υδρογόνου, ενώ η κορυφή στα 3074 cm^{-1} αποδίδεται σε δονήσεις έκτασης των αμινομάδων (-NH). Η κορυφή στους 2935 cm^{-1} αποδίδεται σε ασύμμετρες και συμμετρικές δονήσεις έκτασης των ομάδων C-H. Επίσης εμφανίζονται και οι χαρακτηριστικές κορυφές στους 1638 cm^{-1} , στους 1535 cm^{-1} και στους 1238 cm^{-1} που αποδίδονται στο αμίδιο I (δονήσεις έκτασης των ομάδων C=O), στο αμίδιο II (κάμψης των ομάδων N-H) και στο αμίδιο III (δονήσεις κάμψης των ομάδων N-H) αντίστοιχα [228-234].

Στο φάσμα που αναφέρεται στην μεμβράνη χιτοζάνης (β), η ευρεία κορυφή μεταξύ των $3600-3000\text{ cm}^{-1}$ αποδίδεται σε δονήσεις έκτασης των ομάδων O-H, που υπερκαλύπτουν τις δονήσεις έκτασης των ομάδων N-H [235]. Οι κορυφές που εμφανίζονται στους 2924 cm^{-1} και στους 2870 cm^{-1} αποδίδονται σε τυπικές δονήσεις έκτασης των ομάδων C-H. Οι κορυφές που εμφανίζονται στους 1635 cm^{-1} και στους 1555 cm^{-1} , αποδίδονται σε δονήσεις έκτασης των ομάδων C=O και κάμψης των ομάδων N-H αντίστοιχα. Οι κορυφές στους 1067 cm^{-1} και στους 1020 cm^{-1} , αποδίδονται σε δονήσεις έκτασης των ομάδων C-O [57,236-239].

Όταν αναμιγνύεται η χιτοζάνη με τη ζελατίνη ιχθύων, παρατηρείται μετακίνηση της κορυφής από τους 3284 cm^{-1} στο διάγραμμα (α) στους 3268 cm^{-1} στο διάγραμμα (γ). Η μετακίνηση της κορυφής υποδεικνύει σχηματισμό διαμοριακών δεσμών υδρογόνου μεταξύ των δύο συστατικών [203,228,240]. Επιπλέον, ύστερα από την προσθήκη της χιτοζάνης παρατηρήθηκε μείωση της έντασης των κορυφών στο διάγραμμα (γ) σε σχέση με το (α), του αμιδίου I, του αμιδίου II και του αμιδίου III. Η μείωση της έντασης του αμιδίου I, που παρατηρείται στα διαγράμματα (γ),(δ) και (ε) σε σχέση με το διάγραμμα (α) υποδεικνύει ότι η προσθήκη της χιτοζάνης οδήγησε σε μείωση της περιεκτικότητας της έλικας της ζελατίνης στα αναμίγματα [203,226,241].



Σχήμα 5.3. Συγκεντρωτικά φάσματα FT-IR των υδροπηκτών ζελατίνης ιχθύων (α), χιτοζάνης (β), $\text{Chi}_{50}\text{FG}_{50}$ (γ), $\text{Chi}_{30}\text{FG}_{70}$ (δ) και $\text{Chi}_{20}\text{FG}_{80}$ (ε).

Οι αλλαγές που παρατηρούνται στην ένταση των κορυφών του αμιδίου III στα διαγράμματα (γ),(δ) και (ε) σε σχέση με το διάγραμμα (α) μεταβάλλοντας τις αναλογίες των συστατικών, συνιστούν ότι οι αμινομάδες της χιτοζάνης αλληλεπιδρούν κυρίως με τις καρβοξυλομάδες της ζελατίνης μέσω ηλεκτροστατικών αλληλεπιδράσεων

[203,210,241,242]. Επιπρόσθετα παρατηρείται μια μικρή μετακίνηση της κορυφής του αμιδίου II στο διάγραμμα (γ) στους 1524 cm^{-1} σε σχέση με το διάγραμμα (α) που η κορυφή τοποθετείται στους 1535 cm^{-1} , γεγονός που υποδεικνύει πιθανό σχηματισμό δεσμών υδρογόνου όπου ενεπλάκησαν οι ομάδες -NH της ζελατίνης ιχθύων [203,228].

5.3.2. Περίθλαση Ακτίνων -X (XRD)

5.3.2.1. Πειραματική διαδικασία

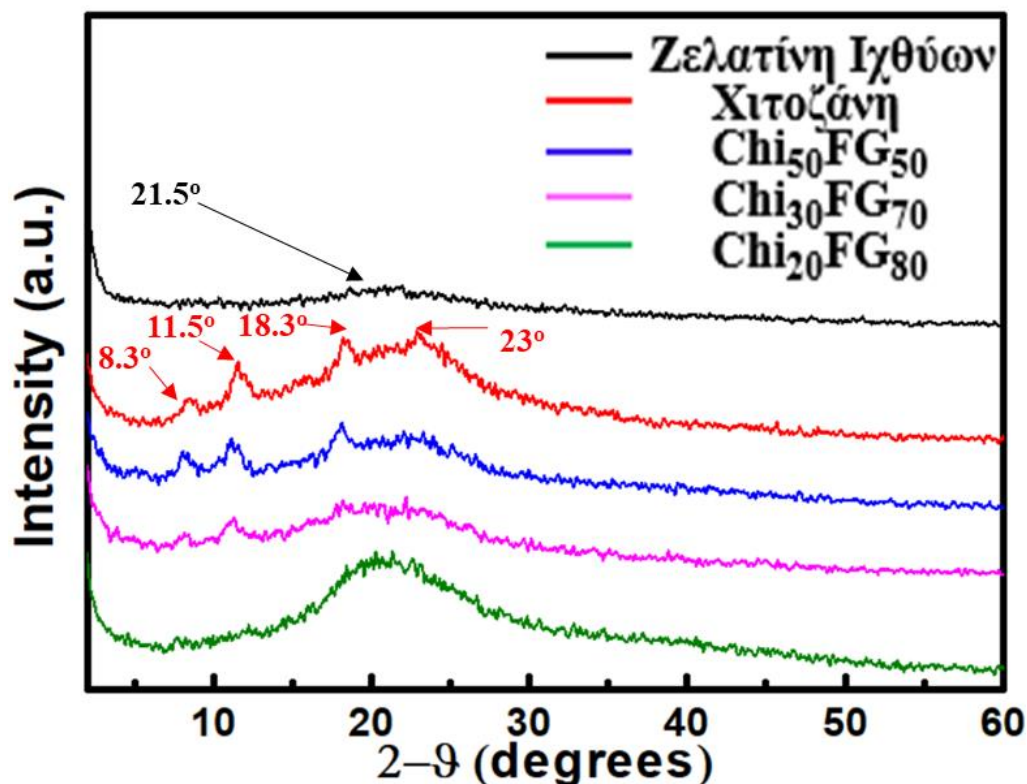
Οι μετρήσεις της περίθλασης ακτίνων X πραγματοποιήθηκαν με το περιθλασίμετρο D8Advance Bruker, χρησιμοποιώντας σύστημα μονοχρωμάτορα περιθλωμένης δέσμης και ακτινοβολία Cu με $\lambda_{K\alpha} = 1,54\text{ \AA}$. Τα διαγράμματα περίθλασης καταγράφηκαν σε εύρος γωνιών (2θ) από 2° έως 60° , με κανονικό βήμα. Για τη λήψη της μέτρησης, χρησιμοποιήθηκε η μεμβράνη χωρίς περαιτέρω επεξεργασία.

5.3.2.2. Αποτελέσματα και συζήτηση

Στο σχήμα 5.4. απεικονίζονται τα αποτελέσματα της περίθλασης ακτίνων-X. Στο διάγραμμα περίθλασης ακτίνων X που αναφέρεται στη ζελατίνη ιχθύων (α) παρατηρείται μια ευρεία κορυφή στις $2\theta = 21.5^\circ$, που αποδίδεται στη άμορφη φάση της ζελατίνης και επαληθεύει την τυχαία διαμόρφωση των μακρομοριακών αλυσίδων [203].

Αντίστοιχα στο διάγραμμα περίθλασης ακτίνων-X που αναφέρεται στην χιτοζάνη (β), παρατηρείται μια κορυφή στις $2\theta = 8.3^\circ$, στις $2\theta = 11.5^\circ$ στις $2\theta = 18.3^\circ$ που σχετίζονται με δύο διαφορετικούς τύπους κρυστάλλων [243] μια ευρεία κορυφή με επίκεντρο στις $2\theta = 23^\circ$ που αποδίδεται στο άμορφο τμήμα της χιτοζάνης [222,244].

Τέλος, στα διαγράμματα (γ), (δ) και (ϵ) που ανήκουν στα αναμίγματα, παρατηρείται ότι όσο αυξάνεται η περιεκτικότητα της ζελατίνης ιχθύων στις μεμβράνες, μειώνονται οι εντάσεις των κορυφών που αποδίδονται στην κρυσταλλικότητα της χιτοζάνης. Πιο συγκεκριμένα παρατηρώντας τα διαγράμματα των αναμιγμάτων, φαίνεται ότι το υλικό Chi₅₀FG₅₀ (γ), όπου η αναλογία των συστατικών είναι % wt 50/50, εμφανίζει υψηλότερη κρυσταλλικότητα σε σχέση με το υλικό (δ) και (ϵ) [203,209,245].



Σχήμα 5.4. Συγκεντρωτικά διαγράμματα XRD των υδροπηκτών ζελατίνης ιχθύων (α), χιτοζάνης (β), Chi₅₀FG₅₀ (γ), Chi₃₀FG₇₀ (δ) και Chi₂₀FG₈₀ (ε).

5.3.3. Θερμική Σταθμική Ανάλυση (TGA)

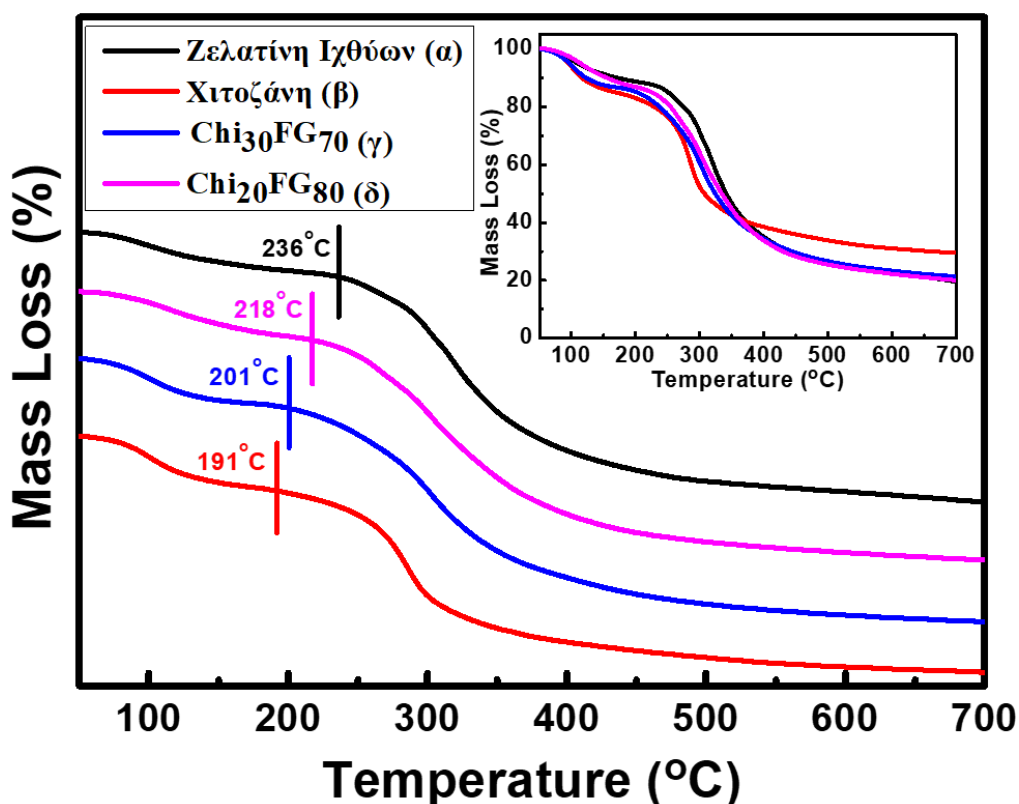
5.3.3.1. Πειραματική διαδικασία

Η διάταξη που χρησιμοποιήθηκε για τη διενέργεια των πειραμάτων θερμικής σταθερότητας, είναι της εταιρίας SETARAM, μοντέλο SETSYS ενo. Οι μετρήσεις διεξήχθησαν σε ατμόσφαιρα αζώτου με ρυθμό 10 K/ min, σε θερμοκρασιακό εύρος από 20 έως 700 °C. Κομμάτι της μεμβράνης τοποθετήθηκε σε καψίδιο χωρίς περαιτέρω επεξεργασία.

5.3.3.2. Αποτελέσματα και συζήτηση

Στο σχήμα 5.5. παρατίθενται τα αποτελέσματα των μετρήσεων θερμικής σταθμικής ανάλυσης της ζελατίνης ιχθύων, της χιτοζάνης και των αναμιγμάτων. Στο θερμογράφημα που αναφέρεται στην ζελατίνη ιχθύων (α), περίπου στους 100 °C παρατηρείται μια απώλεια περίπου 10 %, που αποδίδεται στην απομάκρυνση του νερού από το υλικό. Η δεύτερη και σημαντική απώλεια (70 %) που παρατηρείται μεταξύ των 250 °C και 400 °C, αποδίδεται στην αποσύνθεση της ζελατίνης μέσω απομάκρυνσης των λειτουργικών ομάδων [203,246,247]. Το 20 % της μάζας που παραμένει οφείλεται σε παραμένονσα τέφρα.

Στο θερμογράφημα που αναφέρεται στη χιτοζάνη (β), παρατηρείται παρόμοια συμπεριφορά αποσύνθεσης με τη ζελατίνη ιχθύων, δηλαδή παρατηρείται μια μικρή απώλεια μάζας που οφείλεται στη απομάκρυνση του νερού και μια μεγάλη απώλεια μάζας στο θερμοκρασιακό εύρος από τους 200 °C έως 350 °C, που αποδίδεται στην αποσύνθεση των λειτουργικών ομάδων της χιτοζάνης [203,247,248].



Σχήμα 5.5. Συγκεντρωτικά αποτέλεσμα θερμικής ανάλυσης για τη μεμβράνη ζελατίνης ιχθύων (α), χιτοζάνης (β), Chi30FG70 (γ) και Chi20FG80 (δ).

Αντίστοιχη συμπεριφορά επέδειξαν και τα αναμίγματα ενώ η θερμοκρασία που ξεκινά η αποσύνθεση φαίνεται να αυξάνεται όσο αυξάνεται η συγκέντρωση της ζελατίνης ιχθύων. Παρόμοια αποτελέσματα αναφέρθηκαν από τον Qiao και τους συνεργάτες του, το 2017 [203].

5.3.4. Δυναμική Μηχανική Ανάλυση (DMA)

5.3.4.1. Πειραματική διαδικασία

Το όργανο που χρησιμοποιήθηκε για τις μετρήσεις δυναμικής μηχανικής ανάλυσης (DMA) ήταν της εταιρίας TA Instruments, μοντέλο Q800. Η μέτρηση πραγματοποιήθηκε στο θερμοκρασιακό εύρος από -70 έως 120 °C. Ο ρυθμός αύξησης της θερμοκρασίας ήταν 3 K/min και η συχνότητα 1 Hz, ενώ χρησιμοποιήθηκε διάταξη αρπαγών εφελκυσμού για μεμβράνες (film tension clamp). Για την πραγματοποίηση των μετρήσεων προετοιμάστηκαν δοκίμια μήκους ~30 mm και πλάτους ~6.5 mm.

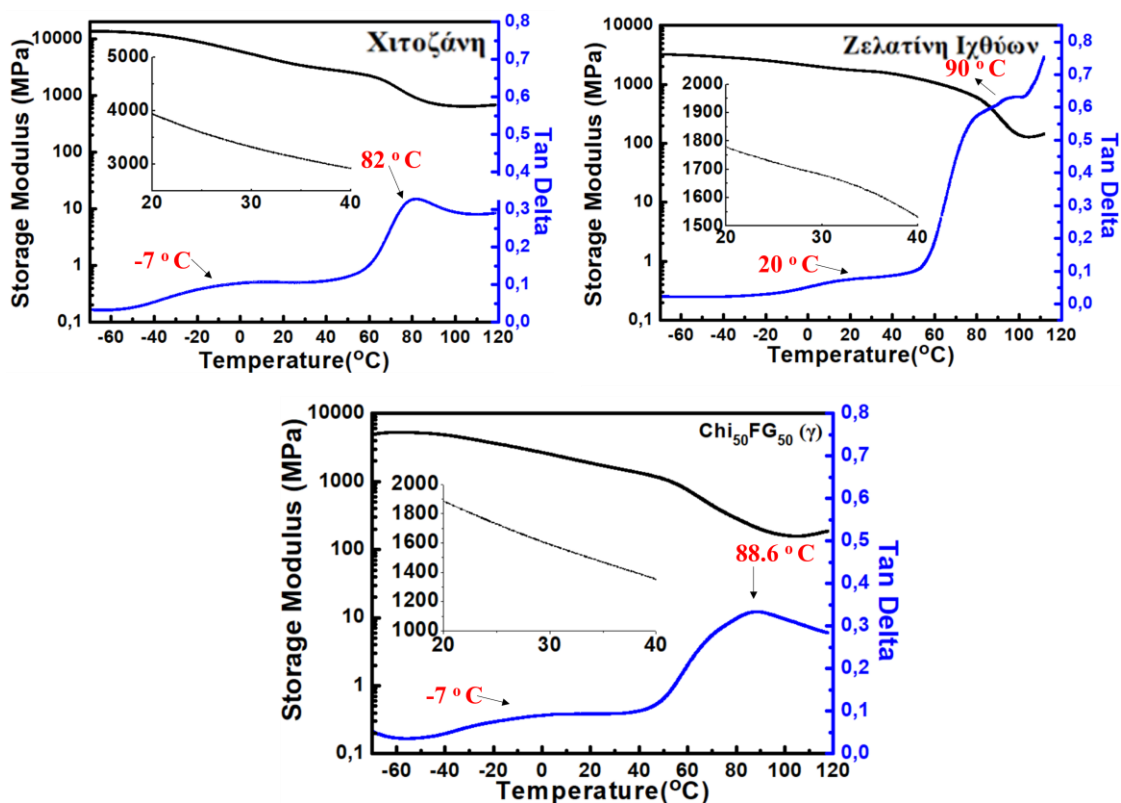
5.3.4.2. Αποτελέσματα και συζήτηση

Στο σχήμα 5.6. απεικονίζονται τα αποτελέσματα των μετρήσεων DMA, για την μεμβράνη χιτοζάνης, ζελατίνης ιχθύων και Chi₅₀FG₅₀. Τα υλικά Chi₃₀FG₇₀ και Chi₂₀FG₈₀ δεν κατέστη δυνατό να μετρηθούν, διότι ήταν αρκετά ψαθυρά και δημιουργούνταν ρωγμές τόσο κατά την κοπή των δοκιμίων όσο και κατά την τοποθέτησή τους στις αρπάγες.

Στο γράφημα (α), παρατηρείται ότι το μέτρο αποθήκευσης (E') της χιτοζάνης μειώνεται όσο αυξάνεται η θερμοκρασία, ενώ στους 25 °C η τιμή του είναι E'=3588 MPa. Στο ίδιο γράφημα, η καμπύλη που αναφέρεται στον παράγοντα απώλειας (tan delta), εμφανίζονται δύο χαλαρώσεις με την αύξηση της θερμοκρασίας, η β και η α. Η β χαλάρωση τοποθετείται περίπου στους -7 °C μπορεί να αποδοθεί σε κινήσεις των πλευρικών ομάδων NH₃⁺ και NH₂, της χιτοζάνης. Οι αμινομάδες καθορίζουν το ποσοστό των δεσμευμένων μορίων νερού και τη φύση του σχηματιζόμενου δικτύου δεσμών υδρογόνου μεταξύ της χιτοζάνης και του νερού [249-252]. Αντίστοιχα αποτελέσματα αναφέρονται τόσο στην ερευνητική εργασία του Neto et al. [253] όσο και από τους Mucha και Pawlak [254] που αναφέρουν την εμφάνιση αυτής της κορυφής

μεταξύ των -20 έως -10 °C. Η α χαλάρωση σχετίζεται με την T_g του υλικού και τοποθετείται περίπου στους 82 °C.

Στο γράφημα (β), το μέτρο αποθήκευσης (E') μειώνεται με την αύξηση της θερμοκρασίας. Στους 25 °C η τιμή του είναι $E' = 1725$ MPa. Ο παράγοντας απώλειας ($\tan \delta$), εμφανίζει και σε αυτή την περίπτωση δύο χαλαρώσεις. Η β χαλάρωση τοποθετείται περίπου στους 20 °C και αφορά πιθανότατα κινήσεις των πλευρικών ομάδων της ζελατίνης και στα φαινόμενα που περιγράφηκαν παραπάνω ενώ η κορυφή της χαλάρωσης α (T_g) εμφανίζεται περίπου στους 90 °C.



Σχήμα 5.6. Αποτελέσματα δυναμικής μηχανικής ανάλυσης, μέτρο αποθήκευσης (E') και παράγοντας απώλειας ($\tan \delta$) των μεμβρανών χιτοζάνης (α), ζελατίνης ιχθύων (β) και Chi₅₀FG₅₀ (γ).

Η T_g της χιτοζάνης και την ζελατίνης έχει μελετηθεί από αρκετές ερευνητικές ομάδες, με διάφορες τεχνικές και οι τιμές που έχουν προσδιοριστεί ποικίλουν πολύ [203,226,255,256]. Οι διαφορές αυτές πιθανότατα οφείλονται, στον διαφορετικό βαθμό

αποακετυλίωσης της χιτοζάνης, στο μοριακό βάρος των φυσικών πολυμερών, αλλά και στην δράση του νερού ως πλαστικοποιητή που περιγράφεται και μελετάται διεξοδικότερα σε επόμενο κεφάλαιο.

Τέλος, στο γράφημα (γ) που αναφέρεται στο ανάμιγμα Chi₅₀FG₅₀, η τιμή του μέτρου αποθήκευσης είναι $E' = 1728$ MPa, στους 25 °C. Επιπρόσθετα εμφανίζονται δυο χαλαρώσεις στην καμπύλη της εφαπτομένης απωλειών, στους -7 °C (β χαλάρωση) και στους 88.6 °C (T_g). Η τιμή της T_g του αναμίγματος παρουσίασε μικρή μείωση σε σχέση με την T_g της μεμβράνης ζελατίνης ιχθύων. Παρόμοια αποτελέσματα (σε ποιοτικό επίπεδο) αναφέρονται και σε αντίστοιχη μελέτη της T_g , με διαφορική θερμιδομετρία σάρωσης (DSC) που πραγματοποιήθηκε στην ερευνητική εργασία του Qiao et al. [203].

Παρατηρήσεις

Οι μεμβράνες που συντέθηκαν ήταν πολύ ψαθυρές και ακατάλληλες για χρήση ως επιθέματα επούλωσης τραυμάτων. Τα επιθέματα που προάγουν την επούλωση πρέπει να προσαρμόζονται σε όλα τα σημεία του σώματος ενώ ταυτόχρονα να εφαρμόζονται και να αφαιρούνται εύκολα [49], ιδιότητες τις οποίες όπως φαίνεται και στο σχήμα 5.2. δεν διαθέτουν τα συγκεκριμένα υλικά καθώς είναι αρκετά ψαθυρά με σχεδόν μηδενική ανοχή παραμόρφωσης στη θραύση.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 6. ΑΝΑΠΤΥΞΗ ΚΑΙ ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΜΟΣ ΥΔΡΟΠΗΚΤΩΝ ΧΙΤΟΖΑΝΗΣ (Chi)-ΖΕΛΑΤΙΝΗΣ ΙΧΘΥΩΝ (FG) - ΓΛΥΚΕΡΟΛΗΣ (Gly)

6.1 ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Οι υδροπηκτές χιτοζάνης-ζελατίνης ιχθύων που συντέθηκαν στο προηγούμενο κεφάλαιο ήταν ψαθυρές και ακατάλληλες για χρήση ως επιθέματα τραυμάτων. Επίσης η αποδόμησή τους ήταν άμεση όταν έρχονται σε επαφή με το νερό, περιορίζοντας την χρήση τους σε βιοϊατρικές εφαρμογές. Στο παρόν κεφάλαιο περιγράφεται η σύνθεση υλικών χρησιμοποιώντας γλυκερόλη σαν πλαστικοποιητή με σκοπό τόσο τη λήψη λιγότερο ψαθυρών υλικών όσο και τη μείωση του ρυθμού αποδόμησης των υλικών με ταυτόχρονη διατήρηση του σχήματός τους μετά την απορρόφηση νερού.

Στο παρελθόν έχουν συντεθεί αρκετά υλικά από χιτοζάνη και ζελατίνη για διάφορες εφαρμογές, όπως υλικά συσκευασίας, υλικά για βιοϊατρικές εφαρμογές και σύνθεση βρώσιμων μεμβρανών [226,242,257-259].

Στην ερευνητική εργασία του Huang et al., αναφέρεται η σύνθεση ικρίωματος χιτοζάνης-ζελατίνης, ενώ μελετήθηκαν οι αλληλεπιδράσεις των κυττάρων με το υλικό συναρτήσει της αποδόμησης και των μηχανικών ιδιοτήτων [224]. Το 2007, στην ερευνητική εργασία του Jiankang et al., περιγράφεται η ανάπτυξη ποροδών υλικών από χιτοζάνη και ζελατίνη με σκοπό τη χρήση τους σε βιοϊατρικές εφαρμογές [260]. Δύο χρόνια μετά, η ίδια ερευνητική ομάδα αναπτύσσει πορώδη υλικά με υψηλό ποσοστό πορώδους (>90 %) για καλλιέργεια κυττάρων ήπατος αποδεικνύοντας ότι το υλικό επιστρώθηκε πλήρως με ηπατικά κύτταρα, ύστερα από κυτταρική καλλιέργεια 7 ημερών [258]. Αργότερα, στην ερευνητική εργασία του Papadogiannis et al., αναπτύχθηκαν και αξιολογήθηκαν ικρίωματα χιτοζάνης-ζελατίνης με σκοπό την υποστήριξη της οστεογονικής διαφοροποίησης βλαστικών/στρωματικών κυττάρων ανθρώπινου μυελού των οστών [261]. Το 2018, στην ερευνητική εργασία του Patel et al., αναφέρεται η σύνθεση μεμβρανών χιτοζάνης-ζελατίνης για μεταφορά λουπεόλης με σκοπό την χρήση τους σε εφαρμογές επούλωσης τραυμάτων [101].

Στις προαναφερθείσες ερευνητικές εργασίες [101,224,258,260,261], για τη βελτίωση της διαλυτότητας των υλικών χρησιμοποιήθηκε γλουταραλδεΐδη με σκοπό

τη δημιουργία σταυροδεσμών και τη λήψη των επιθυμητών ιδιοτήτων. Η γλουταραλδεϋδη είναι ο πιο συχνά χρησιμοποιούμενος διασταυρωτής. Η έκθεση ωστόσο σε γλουταραλδεϋδη μπορεί να επιφέρει πολλές αρνητικές επιπτώσεις στην υγεία, συμπεριλαμβανομένων συμπτωμάτων άσθματος, ρινίτιδας και ερεθισμό του δέρματος [262,263]. Μάλιστα στην ερευνητική εργασία του Umashankar et al., αναφέρεται ότι η κατεργασία περικαρδίου βοοειδών με γλουταραλδεϋδη προκαλεί τοξική απόκριση [264]. Άλλοι χημικοί διασταυρωτές που έχουν χρησιμοποιηθεί σε αντίστοιχα συστήματα εκτός από την γλουταραλδεϋδη, είναι το EDC [207,265] και η γενιπίνη [266] ωστόσο η κυτταροτοξικότητα που προκαλούν περιορίζει τη χρήση σε εφαρμογές επούλωσης τραυμάτων [57].

Στην ερευνητική εργασία του Arvanitoyannis et al., το 1998, αναφέρεται η σύνθεση και ο χαρακτηρισμός βρώσιμων μεμβρανών αποτελούμενων από χιτοζάνη, ζελατίνη και γλυκερόλη. Ο στόχος της συγκεκριμένης εργασίας ήταν η μελέτη των ιδιοτήτων των υλικών που έχουν ως μήτρα πρωτεΐνες και πολυσακχαρίτες ενώ τα αποτελέσματα συσχετίστηκαν με αυτά της διεθνούς βιβλιογραφίας για παρόμοια υλικά [267]. Αργότερα, στην ερευνητική εργασία του Rivero et al., αναπτύχθηκαν και χαρακτηρίστηκαν βιοαποικοδομήσιμα αναμίγματα αποτελούμενα από χιτοζάνη, ζελατίνη και γλυκερόλη [210]. Το 2011, στην ερευνητική εργασία του Pereda et al., αναφέρεται επίσης η σύνθεση βιοαποικοδομήσιμων βρώσιμων υλικών με τα ίδια συστατικά. Μελετήθηκαν τόσο οι φυσικοχημικές ιδιότητες των υλικών, όσο και η αντιμικροβιακή τους δραστηριότητα [242]. Στην ερευνητική εργασία του Hosseini et al., αναπτύχθηκαν και χαρακτηρίστηκαν βρώσιμες μεμβράνες αποτελούμενες από χιτοζάνη και ζελατίνη ιχθύων, ενώ χρησιμοποιήθηκε γλυκερόλη με σκοπό την βελτίωση των φυσικοχημικών ιδιοτήτων των υλικών [226]. Οι Ahmed και Ikram, αναφέρουν τη σύνθεση υλικών συσκευασίας, από χιτοζάνη και ζελατίνη ενώ χρησιμοποίησαν πολυαιθυλενογλυκόλη ως πλαστικοποιητή [268]. Ο Cardoso με τους συνεργάτες του, συνέθεσαν υλικό από χιτοζάνη, ζελατίνη και γλυκερόλη με σκοπό να χρησιμοποιηθεί ως επίστρωση σε κρέας για να διατηρείται το χρώμα του [269]. Το 2017, στην ερευνητική εργασία του Ma et al., αναφέρεται η σύνθεση και ο χαρακτηρισμός μεμβρανών από χιτοζάνη και γλυκερόλη με σκοπό την ενσωμάτωση αντιβιοτικών και την πιθανή χρήση σε εφαρμογές επούλωσης τραυμάτων [57]. Το 2020, στην ερευνητική εργασία του Caroni et al., αναφέρεται η σύνθεση μεμβρανών χρησιμοποιώντας τα ίδια

συστατικά με σκοπό την παραλαβή ενός βιοσυμβατού υλικού με πιθανή εφαρμογή στον τομέα της επούλωσης τραυμάτων [270].

Από τα παραπάνω συμπεραίνεται ότι για τον έλεγχο της διαλυτότητας των συστημάτων χιτοζάνης/ζελατίνης έχουν χρησιμοποιηθεί χημικοί διασταυρωτές που περιπλέκουν τη σύνθεση και πολλές φορές προκαλούν προβλήματα κυτταροτοξικότητας. Σκοπός του παρόντος κεφαλαίου είναι η μελέτη του ρόλου της γλυκερόλης στα συστήματα αυτά και η αριστοποίηση των ιδιοτήτων των συστημάτων που περιγράφηκαν στο κεφάλαιο 5. Υπάρχουν κάποιες ερευνητικές εργασίες στην διεθνή βιβλιογραφία που αναφέρονται στη σύνθεση μεμβρανών χιτοζάνης-γλυκερόλης για βιοϊατρικές εφαρμογές [57,270]. Η μελέτη των συστημάτων χιτοζάνης-ζελατίνης για βιοϊατρικές εφαρμογές έχει επικεντρωθεί σε πορώδη ικρίωματα [224,247,258,260,261] ενώ οι μη πορώδεις (dense) μεμβράνες αποτελούν ένα σύστημα που η χρήση του έχει περιοριστεί σχεδόν αποκλειστικά σε δημιουργία βρώσιμων μεμβρανών και υλικών συσκευασίας [210,226,242,257,268,269].

6.2 ΣΥΝΘΕΣΗ ΤΩΝ ΥΔΡΟΠΗΚΤΩΝ

6.2.1. Αντιδραστήρια

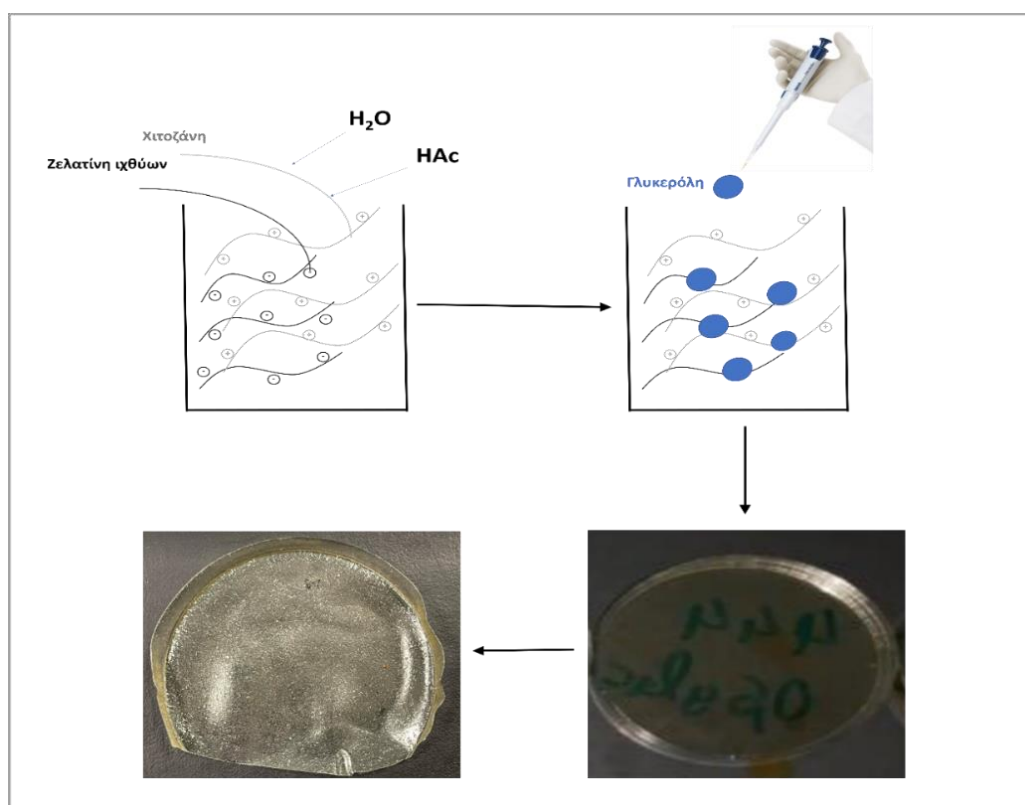
- Χιτοζάνη (μέσου μοριακού βάρους), Sigma-Aldrich, Deacetylation Degree 75-85 %, M.B. = 190.000 Da-310.000 Da, Lot #STBH6274
- Ζελατίνη Ιχθύων (Gelatin from cold water fish skin), Sigma-Aldrich, M.B.=60.000 Da
- Γλυκερόλη (USP, BP, Ph. Eur.) pure, pharma grade, AppliChem Panreac, M.B.=92.1 g/mol, d = 1.26 g/ml
- Οξικό οξύ (CH₃COOH), Honeywell, ≥99,8 %, M.B. = 60.052 g/mol, d = 1.05 g/ml
- Απεσταγμένο νερό

6.2.2. Περιγραφή της συνθετικής πορείας

Παρακάτω περιγράφεται η συνθετική πορεία της υδροπηκτής $Chi_{30}FG_{30}Gly_{40}$. Οι ποσότητες που χρησιμοποιήθηκαν για τη σύνθεση των υπόλοιπων υδροπηκτών των ομάδων Α και Β περιγράφονται στους πίνακες 6.1. και 6.2.

6.2.2.1. Σύνθεση της υδροπηκτής $Chi_{30}FG_{30}Gly_{40}$

Για τη σύνθεση της υδροπηκτής $Chi_{30}FG_{30}Gly_{40}$, σε ποτήρι ζέσεως των 100 ml το οποίο περιέχει 24 ml απεσταγμένου νερού, προστίθεται 0.5 g (2 % w/v) ζελατίνης ιχθύων και αφήνεται υπό ανάδευση μέχρι την πλήρη διάλυση της. Στη συνέχεια και ενώ το διάλυμα βρίσκεται υπό ανάδευση, προστίθεται 0.5 g (2 % w/v) χιτοζάνης. Κατόπιν ακολουθεί η προσθήκη οξικού οξέος 4 % (v/v), με σκοπό την πρωτονίωση της χιτοζάνης, και παραμένει υπό ανάδευση για 10 λεπτά.



Σχήμα 6.1. Σχηματική απεικόνιση της συνθετικής διαδικασίας που ακολουθήθηκε για την σύνθεση των υδροπηκτών.

Τέλος προστίθενται στο διάλυμα 0.63 g γλυκερόλης και το διάλυμα παραμένει υπό ανάδευση για 4 ώρες ώστε να ομογενοποιηθεί πλήρως. Στη συνέχεια, μεταφέρεται σε τρυβλίο πολυστυρενίου (διαμέτρου 60mm) και παραμένει για περίπου 48 ώρες σε θερμοκρασία δωματίου με σκοπό την εξάτμιση του διαλύτη και την παραλαβή της μεμβράνης. Αντίστοιχη διαδικασία ακολουθήθηκε και για την σύνθεση των υπόλοιπων υλικών.

Παρατηρήσεις

Οι συγκεκριμένες ποσότητες γλυκερόλης επελέγησαν ώστε να ελεγχθεί ο ρυθμός της διαλυτότητας των υλικών στο νερό. Χρησιμοποιήθηκαν και χαμηλότερες ποσότητες γλυκερόλης όμως η αποδόμηση ήταν άμεση.

Πίνακας 6.1. Ονόματα υλικών και ποσότητες αντιδραστηρίων που χρησιμοποιήθηκαν για την σύνθεση των υδροπηκτών χιτοζάνης-γλυκερόλης και ζελατίνης ιχθύων-γλυκερόλης.

ΥΔΡΟΠΗΚΤΕΣ ΧΙΤΟΖΑΝΗΣ/ΓΛΥΚΕΡΟΛΗΣ-ΖΕΛΑΤΙΝΗΣ ΙΧΘΥΩΝ/ΓΛΥΚΕΡΟΛΗΣ			
Α΄ Ομάδα		Β΄ Ομάδα	
Chi₄₅Gly₅₅ (% wt. 45/55)	FG₇₅Gly₂₅ (% wt. 75/25)	Chi₃₀Gly₇₀ (% wt. 30/70)	FG₆₀Gly₄₀ (% wt. 60/40)
0.5 gr (2 % w/v) χιτοζάνη	2 gr (8 % w/v) ζελατίνη ιχθύων	0.5 gr (2 % w/v) χιτοζάνη	2 gr (8 % w/v) ζελατίνη ιχθύων
0.63 g (2% v/v) γλυκερόλη	0.63 g (2% v/v) γλυκερόλη	1.26 g (4% v/v) γλυκερόλη	1.26 g (4% v/v) γλυκερόλη
24 ml H ₂ O	24 ml H ₂ O	24 ml H ₂ O	24 ml H ₂ O
1 ml (4 % v/v) HAc	-	1 ml (4 % v/v) HAc	-

Πίνακας 6.2. Ονόματα υλικών και ποσότητες αντιδραστηρίων που χρησιμοποιήθηκαν για τη σύνθεση των υδροπηκτών χιτοζάνης-ζελατίνης ιχθύων-γλυκερόλης.

ΥΔΡΟΠΗΚΤΕΣ ΧΙΤΟΖΑΝΗΣ/ΖΕΛΑΤΙΝΗΣ ΙΧΘΥΩΝ/ΓΛΥΚΕΡΟΛΗΣ					
Α΄ Ομάδα			Β΄ Ομάδα		
Chi₃₀FG₃₀Gly₄₀	Chi₂₅FG₄₅Gly₃₀	Chi₁₅FG₆₅Gly₂₀	Chi_{22.5}FG_{22.5}Gly₅₅	Chi₂₀FG₃₅Gly₄₅	Chi₁₅FG₅₀Gly₃₅
(% wt. 30/30/40)	(% wt. 25/45/30)	(% wt. 15/65/20)	(% wt.22.5/22.5/55)	(% wt. 20/35/45)	(% wt. 15/50/35)
0.5 gr (2 % w/v) χιτοζάνη	0.5 gr (2 % w/v) χιτοζάνη	0.5 gr (2 % w/v) χιτοζάνη	0.5 gr (2 % w/v) χιτοζάνη	0.5 gr (2 % w/v) χιτοζάνη	0.5 gr (2 % w/v) χιτοζάνη
0.5 gr (2% w/v) ζελατίνη ιχθύων	1 gr (4 % w/v) ζελατίνη ιχθύων	2 gr (8 % w/v) ζελατίνη ιχθύων	0.5 gr (2% w/v) ζελατίνη ιχθύων	1 gr (4 % w/v) ζελατίνη ιχθύων	2 gr (8 % w/v) ζελατίνη ιχθύων
0.63 g (2% v/v) γλυκερόλη	0.63 g (2% v/v) γλυκερόλη	0.63 g (2% v/v) γλυκερόλη	1.26 g (4% v/v) γλυκερόλη	1.26 g (4% v/v) γλυκερόλη	1.26 g (4% v/v) γλυκερόλη
24 ml H ₂ O	24 ml H ₂ O	24 ml H ₂ O	24 ml H ₂ O	24 ml H ₂ O	24 ml H ₂ O
1 ml (4 % v/v) HAc	1 ml (4 % v/v) HAc	1 ml (4 % v/v) HAc	1 ml (4 % v/v) HAc	1 ml (4 % v/v) HAc	1 ml (4 % v/v) HAc

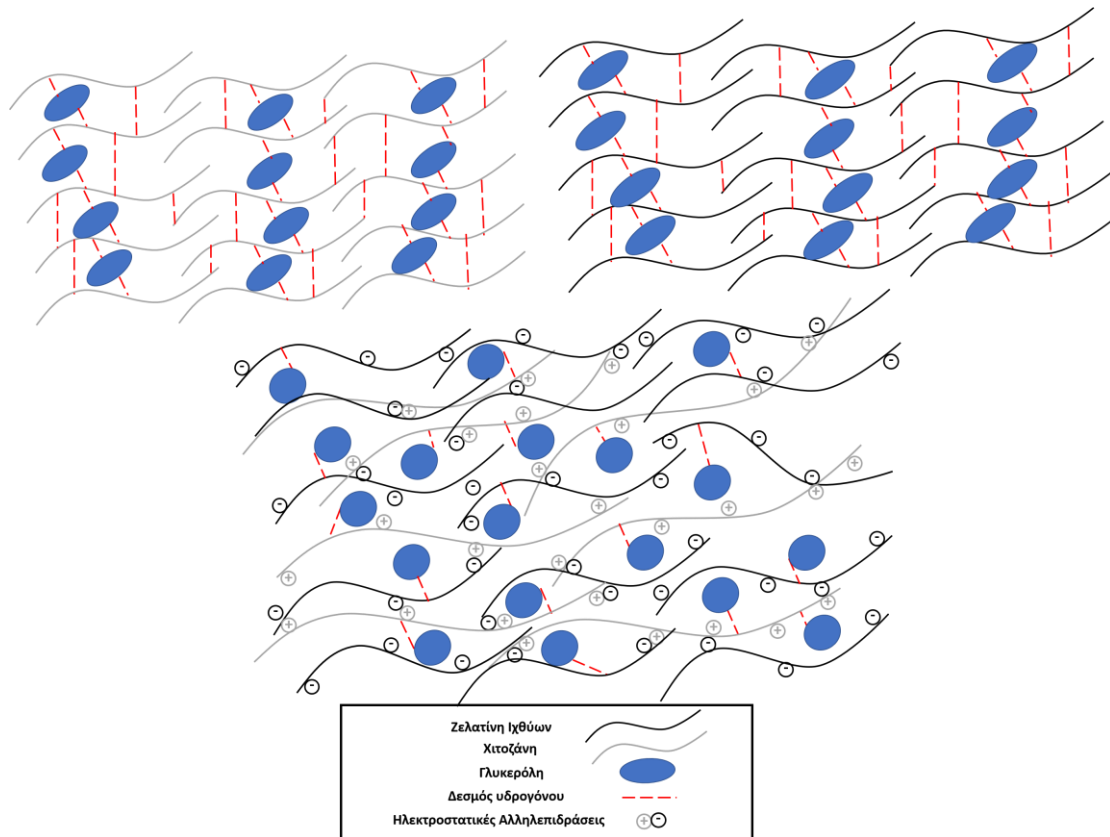
6.2.2.2. Μηχανισμός σχηματισμού υδροπηκτών

Ο σχηματισμός της υδροπηκτής χιτοζάνης-γλυκερόλης αποδίδεται στο σχηματισμό διαμοριακών και ενδομοριακών δεσμών υδρογόνου μεταξύ των δύο συστατικών. Οι ομάδες -NH_2 και -OH που υπάρχουν σε κάθε επαναλαμβανόμενη μονάδα N-γλυκοζαμίνης σχηματίζουν δεσμούς υδρογόνου μεταξύ των μορίων της χιτοζάνης. Η προσθήκη της γλυκερόλης προάγει πιθανότατα τον σχηματισμό δεσμών υδρογόνου μεταξύ των ομάδων -NH_3^+ της χιτοζάνης και των ομάδων -OH της γλυκερόλης. Οι δεσμοί υδρογόνου που σχηματίζονται μεταξύ των δύο συστατικών, οδηγούν σε χαλάρωση των αλυσίδων [57,271]. Η αλληλεπίδραση της χιτοζάνης με τη γλυκερόλη πιθανότατα οδηγεί σε μείωση των διαμοριακών αλληλεπιδράσεων των αλυσίδων της χιτοζάνης μεταξύ τους, γι' αυτό πιθανότατα το τελικό υλικό (χιτοζάνης-γλυκερόλης) είναι πολύ πιο εύπλαστο σε σύγκριση με την μεμβράνη χιτοζάνης.

Κατά την αλληλεπίδραση της ζελατίνης ιχθύων με τη γλυκερόλη είναι πιθανό να διασπώνται οι ενδομοριακοί δεσμοί υδρογόνου ($\text{C=O}\cdots\text{H-N}$) της ζελατίνης ιχθύων και να σχηματίζονται ισχυρότεροι δεσμοί υδρογόνου ($\text{C=O}\cdots\text{H-O}$) μεταξύ της ζελατίνης ιχθύων και της γλυκερόλης [272], οδηγώντας στον σχηματισμό του αναμίγματος.

Αναμιγνύοντας τη χιτοζάνη και τη ζελατίνη ιχθύων, αλληλεπιδρούν μεταξύ τους μέσω ηλεκτροστατικών αλληλεπιδράσεων και δεσμών υδρογόνου [203] όπως αναφέρθηκε και σε προηγούμενο κεφάλαιο. Η προσθήκη της γλυκερόλης στο σύστημα οδηγεί σε σχηματισμό δεσμών υδρογόνου τόσο με τις -NH_3^+ της χιτοζάνης όσο και με τις ομάδες C=O και -NH_2 της ζελατίνης.

Ακολουθεί απλοποιημένη σχηματική απεικόνιση των αλληλεπιδράσεων που λαμβάνουν χώρα μεταξύ των συστατικών των υδροπηκτών στο σχήμα 6.2.



Σχήμα 6.2. Απλουστευμένη απεικόνιση των αλληλεπιδράσεων μεταξύ χιτοζάνης-γλυκερόλης (πάνω αριστερά), ζελατίνης ιχθύων-γλυκερόλης (πάνω δεξιά) και χιτοζάνης-ζελατίνης ιχθύων γλυκερόλης (κάτω).

6.3. ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΜΟΣ ΥΔΡΟΠΗΚΤΩΝ ΧΙΤΟΖΑΝΗΣ (Chi)-ΖΕΛΑΤΙΝΗΣ ΙΧΘΥΩΝ (FG) -ΓΛΥΚΕΡΟΛΗΣ (Gly)

6.3.1. Φασματοσκοπία FT-IR

6.3.1.1. Πειραματική διαδικασία

Η διαδικασία έχει περιγραφεί στο υποκεφάλαιο 5.3.1.1. Οι μεμβράνες μετρήθηκαν χωρίς περαιτέρω επεξεργασία.

6.3.1.2. Αποτελέσματα και συζήτηση

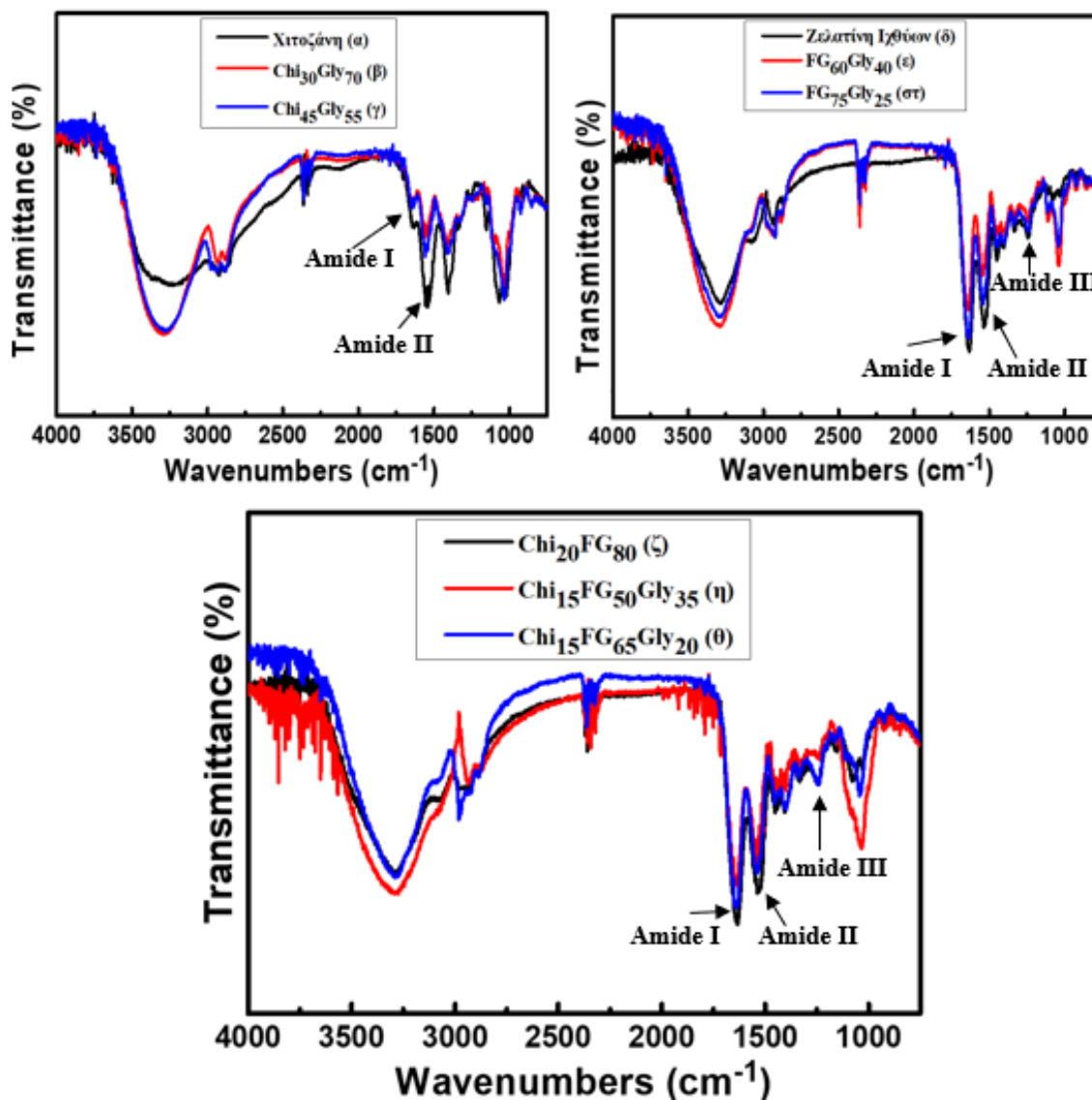
Στο φάσμα που αναφέρεται στην μεμβράνη χιτοζάνης (α), η ευρεία κορυφή μεταξύ των 3600 cm^{-1} - 3000 cm^{-1} αποδίδεται σε δονήσεις έκτασης των ομάδων O-H, που υπερκαλύπτουν τις δονήσεις έκτασης των ομάδων N-H [235]. Οι κορυφές που εμφανίζονται στους 2924 cm^{-1} και στους 2870 cm^{-1} αποδίδονται σε τυπικές δονήσεις έκτασης των ομάδων C-H. Οι κορυφές που εμφανίζονται στους 1635 cm^{-1} (αμίδιο I) και στους 1555 cm^{-1} (αμίδιο II), αποδίδονται σε δονήσεις έκτασης των ομάδων C=O και κάμψης των ομάδων N-H αντίστοιχα. Οι κορυφές στους 1067 cm^{-1} και στους 1020 cm^{-1} , αποδίδονται σε δονήσεις έκτασης των ομάδων C-O [57,236-239]. Οι κορυφές στους 1404 cm^{-1} και 1382 cm^{-1} αποδίδονται σε δονήσεις κάμψης των ομάδων CH₂ και δονήσεις παραμόρφωσης των ομάδων CH₃ αντίστοιχα [57,236,273]. Στα φάσματα χιτοζάνης-γλυκερόλης (β) και (γ), δεν παρατηρήθηκε εμφάνιση νέων κορυφών, ενώ η ένταση των κορυφών σε σχέση με το φάσμα (α) αυξήθηκε στην περιοχή μεταξύ 3600 cm^{-1} και 3200 cm^{-1} . Η μεταβολή αυτή υποδεικνύει πιθανότατα σχηματισμό διαμοριακών δεσμών υδρογόνου μεταξύ των δύο συστατικών [203,228,240]. Στην περιοχή που αποδίδονται οι δονήσεις έκτασης των ομάδων C=O και κάμψης των ομάδων N-H παρατηρήθηκε μείωση της έντασης των κορυφών του αμιδίου I και II σε σχέση με το φάσμα (α). Μάλιστα η ένταση των κορυφών στα αμίδια I και II παρουσιάζει μεγαλύτερη ένταση στο φάσμα (γ) σε σχέση το φάσμα (β). Οι μεταβολές της έντασης των κορυφών υποδεικνύουν την αλληλεπίδραση των δύο συστατικών προς σχηματισμό δεσμών υδρογόνου.

Στο φάσμα που αναφέρεται στην μεμβράνη ζελατίνης ιχθύων (δ), οι κορυφές που εμφανίζονται μεταξύ των 3600 cm^{-1} και των 3000 cm^{-1} αποδίδονται σε δονήσεις έκτασης των ομάδων O-H και N-H (οι κορυφές επικαλύπτονται), και υποδεικνύουν το σχηματισμό ενδομοριακών δεσμών υδρογόνου. Επίσης εμφανίζονται και οι χαρακτηριστικές κορυφές στους 1638 cm^{-1} , στου 1531 cm^{-1} και στους 1238 cm^{-1} που αποδίδονται στο αμίδιο I (δονήσεις έκτασης των ομάδων C=O), στο αμίδιο II (δονήσεις έκτασης των ομάδων C-N και κάμψης των ομάδων N-H) και στο αμίδιο III (δονήσεις κάμψης των ομάδων N-H) αντίστοιχα [233,234].

Στο φάσμα ($\sigma\tau$) που αναφέρεται στην υδροπηκτική ζελατίνης ιχθύων-γλυκερόλης FG₇₅Gly₂₅, εμφανίζεται η χαρακτηριστική κορυφή στους 1038 cm^{-1} που αποδίδεται σε

δονήσεις έκτασης των ομάδων C-O [57,234,274], με μειωμένη ένταση σε σχέση με το φάσμα (ϵ) που αναφέρεται στην υδροπηκτική FG₆₀Gly₄₀. Η αυξημένη ένταση της κορυφής, αποδίδεται στην διπλάσια ποσότητα γλυκερόλης που περιέχει η μεμβράνη FG₆₀Gly₄₀. Οι εντάσεις των κορυφών που αποδίδονται στις δονήσεις έκτασης των ομάδων C=O και κάμψης των ομάδων N-H, έχουν υψηλότερη ένταση στην υδροπηκτική FG₇₅Gly₂₅ (σ) σε σχέση με την υδροπηκτική FG₆₀Gly₄₀ (ϵ). Ο Tian με τους συνεργάτες του, αναφέρουν ότι κατά την αλληλεπίδραση της ζελατίνης ιχθύων με την γλυκερόλη είναι πιθανό να διασπώνται οι ενδομοριακοί δεσμοί υδρογόνου (C=O \cdots H-N) της ζελατίνης και να σχηματίζονται ισχυρότεροι δεσμοί υδρογόνου (C=O \cdots H-O) μεταξύ της ζελατίνης και της γλυκερόλης [272].

Το φάσμα (ζ) που αναφέρεται στην υδροπηκτική Chi₂₀FG₈₀, έχει περιγραφεί και στο κεφάλαιο 5. Η ζελατίνη ιχθύων που αποτελεί το κυρίαρχο συστατικό της μεμβράνης, αναγνωρίζεται από τις χαρακτηριστικές κορυφές που αποδίδονται στα αμίδια I,II και III, ενώ η χιτοζάνη κυρίως από τη ζώνη που εμφανίζεται ο σακχαρίτης. Στην περιοχή από τους 1700 έως τους 900 cm⁻¹, παρατηρείται μείωση της έντασης των κορυφών που αποδίδονται στα αμίδια I,II και III, σε σχέση με το φάσμα της ζελατίνης ιχθύων (δ). Όσον αφορά την ένταση των κορυφών που αφορούν τον σακχαρίτη στους 1079 cm⁻¹ και στους 1026 cm⁻¹, αυξήθηκαν σε ένταση σε σχέση με το φάσμα που αφορά την ζελατίνη ιχθύων [228]. Στα φάσματα (η) και (θ), παρατηρείται μετακίνηση της κορυφής του αμιδίου II, σε σχέση με το φάσμα (ζ) που πιθανότατα υποδεικνύει ηλεκτροστατικές αλληλεπιδράσεις μεταξύ των καρβοξυλομάδων της ζελατίνης ιχθύων με τις πρωτονιωμένες αμινομάδες της χιτοζάνης, ενώ η γλυκερόλη είναι πιθανόν να σχηματίζει δεσμούς υδρογόνου τόσο με τη χιτοζάνη όσο και τη ζελατίνη ιχθύων. Επιπρόσθετα παρατηρείται μετακίνηση των κορυφών του αμιδίου II προς χαμηλότερους κυματάρθμους σε σχέση με τα φάσματα (β) και (γ) που σημαίνει ότι οι αμινομάδες της χιτοζάνης συμμετείχαν στο σχηματισμό δεσμών υδρογόνου [228]. Τέλος, η ενσωμάτωση της γλυκερόλης στο υλικό αποδεικνύεται από την χαρακτηριστική κορυφή στους 1032 cm⁻¹, που αποδίδεται σε δονήσεις έκτασης των ομάδων C-O [57,234].



Σχήμα 6.3. Συγκεντρωτικά φάσματα FT-IR των υδροποιητών χιτοζάνης (α), ζελατίνης ιχθύων (δ), χιτοζάνης-ζελατίνης ιχθύων (ζ), χιτοζάνης-γλυκερόλης (β, γ), ζελατίνης ιχθύων-γλυκερόλης (ε, στ) και χιτοζάνης-ζελατίνης ιχθύων-γλυκερόλης (η, θ).

6.3.2. Περίθλαση Ακτίνων-X (XRD)

6.3.2.1. Πειραματική διαδικασία

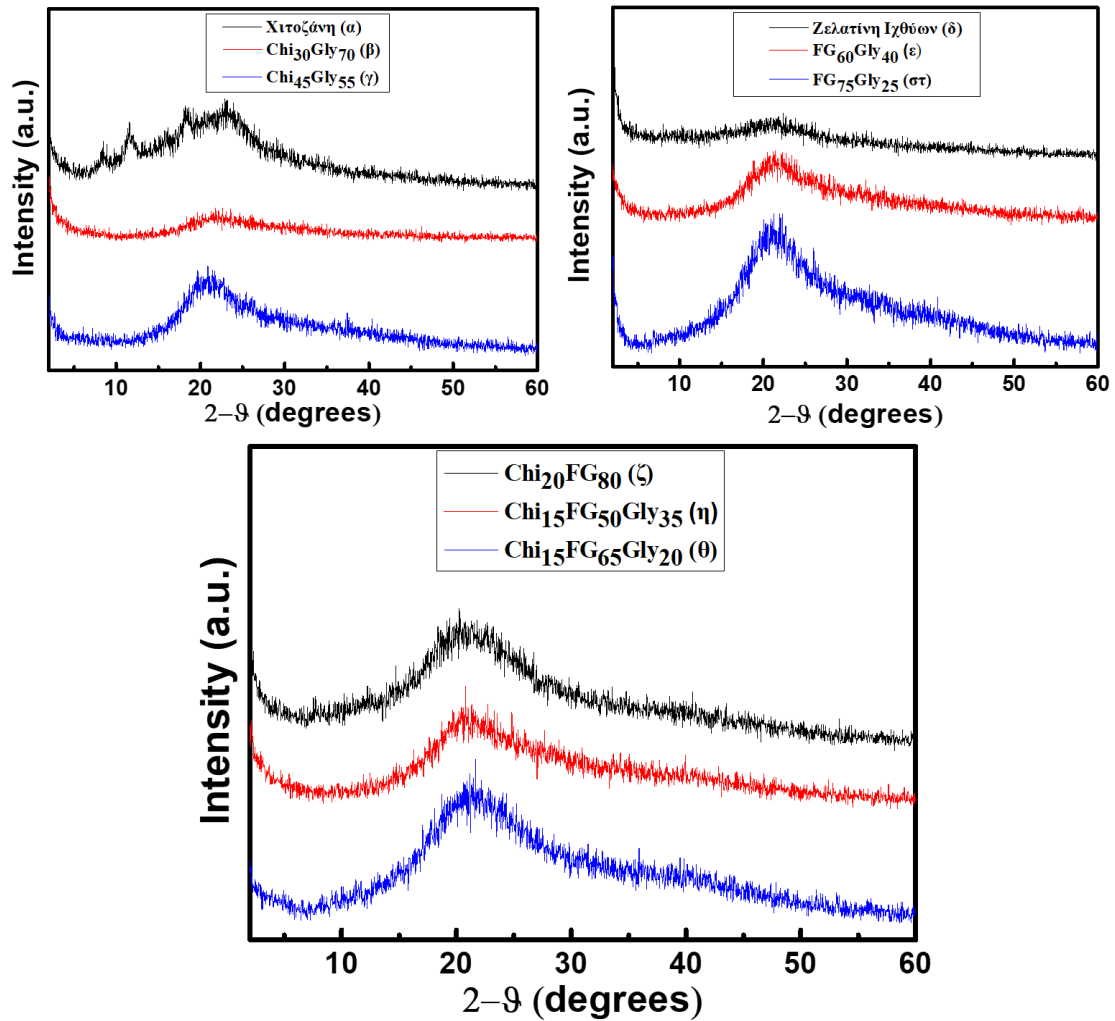
Η διαδικασία έχει περιγραφεί στο υποκεφάλαιο 5.3.2.1. Οι υδροποιητές μετρήθηκαν χωρίς καμία περαιτέρω επεξεργασία.

6.3.2.2. Αποτελέσματα και συζήτηση

Το διάγραμμα (α) που αναφέρεται στην χιτοζάνη έχει περιγραφεί και στο προηγούμενο κεφάλαιο. Παρατηρούνται κορυφές στις $2\theta=8.3^\circ$, στις $2\theta=11.5^\circ$ στις $2\theta=18.3^\circ$ που σχετίζονται με δύο διαφορετικούς τύπους κρυστάλλων [243] και μια ευρεία κορυφή με επίκεντρο στις $2\theta=23^\circ$. Η προσθήκη της γλυκερόλης και στις δύο συγκεντρώσεις που χρησιμοποιήθηκαν οδήγησαν σε μείωση της κρυσταλλικότητας των υλικών σε σχέση με την καθαρή μεμβράνη χιτοζάνης. Μάλιστα παρατηρώντας κανείς το διάγραμμα (β) που αναφέρεται στην μεμβράνη χιτοζάνης όπου έχει χρησιμοποιηθεί μεγαλύτερη ποσότητα γλυκερόλης λαμβάνεται ένα πλήρως άμορφο υλικό. Το φαινόμενο κατά το οποίο η προσθήκη υψηλών ποσοτήτων πλαστικοποιητή οδηγεί σε μείωση της κρυσταλλικότητας σε αντίστοιχα συστήματα έχει αναφερθεί και στις ερευνητικές εργασίες των Arvanitoyannis et al. [267] και της Nady et al. [247]. Τα αποτελέσματα είναι συγκρίσιμα με αυτά που αναφέρονται στις ερευνητικές εργασίες των Menezes et al. [275] και των Peng et al. [276], ενώ στα αποτελέσματα που παρατίθενται στην ερευνητική εργασία των Leceta et al., η κορυφή που εμφανίζεται στις $2\theta=11^\circ$ παραμένει και ύστερα από την δημιουργία φιλμ που αποτελείται από 30 % γλυκερόλη [277].

Το διάγραμμα (δ) που αναφέρεται στην ζελατίνη ιχθύων έχει περιγραφεί και στο κεφάλαιο 5. Παρατηρήθηκε αύξηση της έντασης του ευρύ ώμου που εμφανίζεται περίπου στις $2\theta=21.5^\circ$. Η αύξηση της έντασης του ώμου (διαγράμματα ε και στ) που αποδίδεται στην άμορφη φάση της ζελατίνης είναι πιθανό να οφείλεται στην αυξημένη συγκέντρωση ζελατίνης που χρησιμοποιήθηκε στα συστήματα ζελατίνης ιχθύων/γλυκερόλης σε σχέση με την ποσότητα που χρησιμοποιήθηκε για την μεμβράνη σκέτης ζελατίνης ιχθύων.

Το διάγραμμα (ζ) αναφέρεται στην μεμβράνη Chi₂₀FG₈₀ και έχει περιγραφεί στο προηγούμενο κεφάλαιο ενώ παρόμοια συμπεριφορά παρουσιάζουν τα αποτελέσματα της περίθλασης ακτίνων-X που αναφέρονται στις υδροπηκτές Chi₁₅FG₅₀Gly₃₅ (η) και Chi₁₅FG₆₅Gly₂₀ (θ), που ελήφθησαν άμορφα υλικά.



Σχήμα 6.4. Συγκεντρωτικά διαγράμματα XRD των υδροπηκτών χιτοζάνης (α), ζελατίνης ιχθύων (δ), χιτοζάνης-ζελατίνης ιχθύων (ζ), χιτοζάνης-γλυκερόλης (β, γ), ζελατίνης ιχθύων-γλυκερόλης (ε, στ) και χιτοζάνης-ζελατίνης ιχθύων-γλυκερόλης (η, θ).

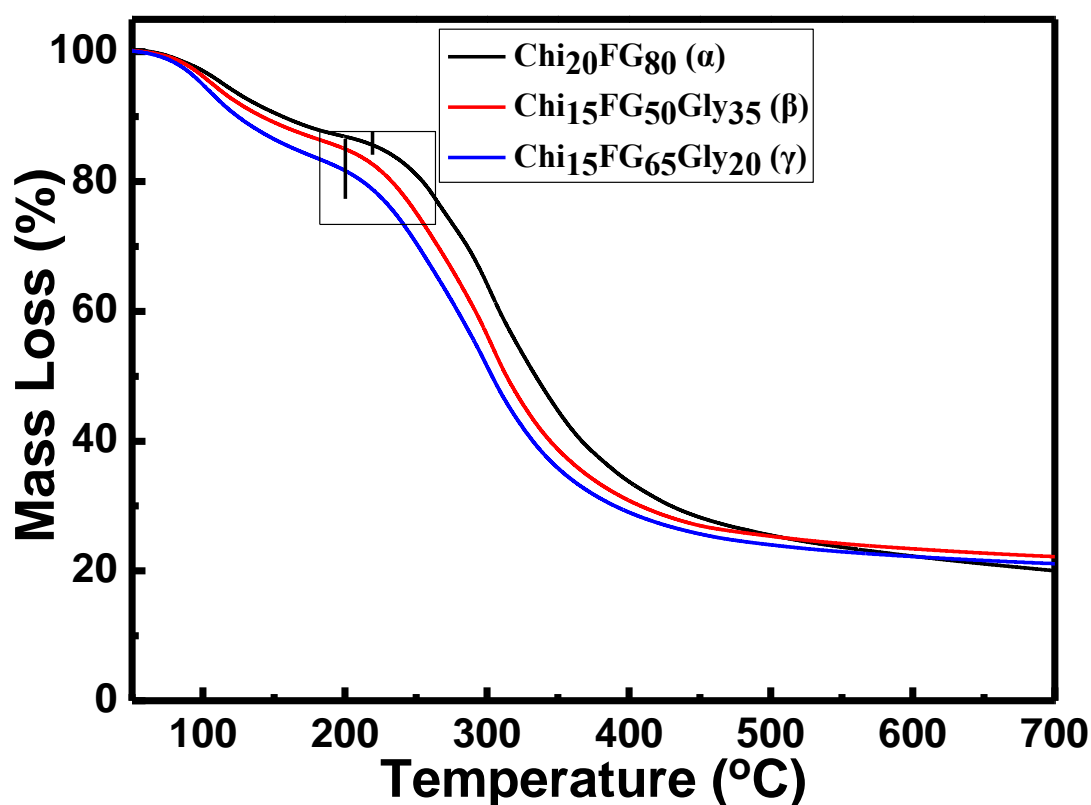
6.3.3. Θερμική Σταθμική Ανάλυση (TGA)

6.3.3.1. Πειραματική διαδικασία

Η πειραματική διαδικασία είναι ίδια με αυτή που περιγράφηκε στο υποκεφάλαιο 5.3.3.1.

6.3.3.2. Αποτελέσματα και συζήτηση

Στο σχήμα 6.5. παρουσιάζονται τα αποτελέσματα των μετρήσεων θερμικής ανάλυσης. Η αρχική απώλεια που παρατηρείται και στα τρία θερμογραφήματα αποδίδεται στην απομάκρυνση της υγρασίας από τα υλικά. Η προσθήκη της γλυκερόλης (θερμογραφήματα β και γ) φαίνεται ότι οδήγησε σε αύξηση του ποσοστού υγρασίας σε σχέση με το αρχικό υλικό (θερμογράφημα α). Επίσης παρατηρείται ότι στο σύστημα με τη χαμηλότερη συγκέντρωση γλυκερόλης (θερμογράφημα γ) η απώλεια υγρασίας είναι περισσότερη σε σχέση με το υλικό που περιέχει υψηλότερη συγκέντρωση γλυκερόλης (θερμογράφημα β). Αυτό το φαινόμενο μένει να επιβεβαιωθεί και από τις μελέτες απορρόφησης νερού των υλικών που θα περιγραφούν παρακάτω. Η δεύτερη και σημαντική απώλεια μάζας που παρατηρείται στο εύρος περίπου από 250 °C έως 400 °C αποδίδεται στην αποσύνθεση των υλικών μέσω απομάκρυνσης των λειτουργικών ομάδων [203,247].



Σχήμα 6.5. Αποτελέσματα θερμικής ανάλυσης των υδροπηκτών Chi₂₀FG₈₀ (α), Chi₁₅FG₅₀Gly₃₅ (β) και Chi₁₅FG₆₅Gly₂₀ (γ).

Η θερμική αποδόμηση των υλικών που περιέχουν γλυκερόλη ξεκινά περίπου από τους 200 °C, ενώ η αποδόμηση του υλικού που δεν περιέχει γλυκερόλη ξεκινά περίπου στους 220 °C. Η προσθήκη της γλυκερόλης στο σύστημα φαίνεται ότι επηρέασε τη θερμική σταθερότητα του υλικού. Έχει αναφερθεί ότι η προσθήκη υψηλών συγκεντρώσεων πλαστικοποιητή οδηγεί σε μείωση των τιμών των θερμοκρασιακών μεταπτώσεων [267].

6.3.4. Δυναμική Μηχανική Ανάλυση (DMA)

Λόγω του όγκου των πληροφοριών, τα υλικά χωρίστηκαν στην Α' και Β' ομάδα σύμφωνα με τους πίνακες 6.1. και 6.2. Στην Α' ομάδα ανήκουν τα υλικά που κατά τη σύνθεση χρησιμοποιήθηκε χαμηλότερη συγκέντρωση γλυκερόλης (Chi₃₀FG₃₀Gly₄₀, Chi₂₅FG₄₅Gly₃₀, Chi₁₅FG₆₅Gly₂₀, Chi₄₅Gly₅₅ και FG₇₅Gly₂₅), ενώ στην ομάδα Β' ανήκουν τα υλικά που χρησιμοποιήθηκε υψηλότερη συγκέντρωση γλυκερόλης (Chi_{22.5}FG_{22.5} Gly₅₅, Chi₂₀FG₃₅Gly₄₅, Chi₁₅FG₅₀Gly₃₅, Chi₃₀Gly₇₀ και FG₆₀Gly₄₀). Συνάμα πραγματοποιήθηκε σύγκριση μεταξύ των υλικών με και χωρίς (Chi₅₀FG₅₀) γλυκερόλη. Η μέτρηση των υλικών Chi₃₀Gly₇₀ και FG₆₀Gly₄₀ δεν κατέστη δυνατή λόγω θρυμματισμού των δοκιμίων κατά την τοποθέτησή τους στις αρπάγες λόγω της υψηλής συγκέντρωσης γλυκερόλης που χρησιμοποιήθηκε.

6.3.4.1. Πειραματική διαδικασία

Η διαδικασία έχει περιγραφεί στο υποκεφάλαιο 5.3.4.1. Οι μετρήσεις πραγματοποιήθηκαν χωρίς περαιτέρω επεξεργασία των υλικών.

6.3.4.2. Αποτελέσματα και συζήτηση

6.3.4.2.1. Υλικά Α' ομάδας

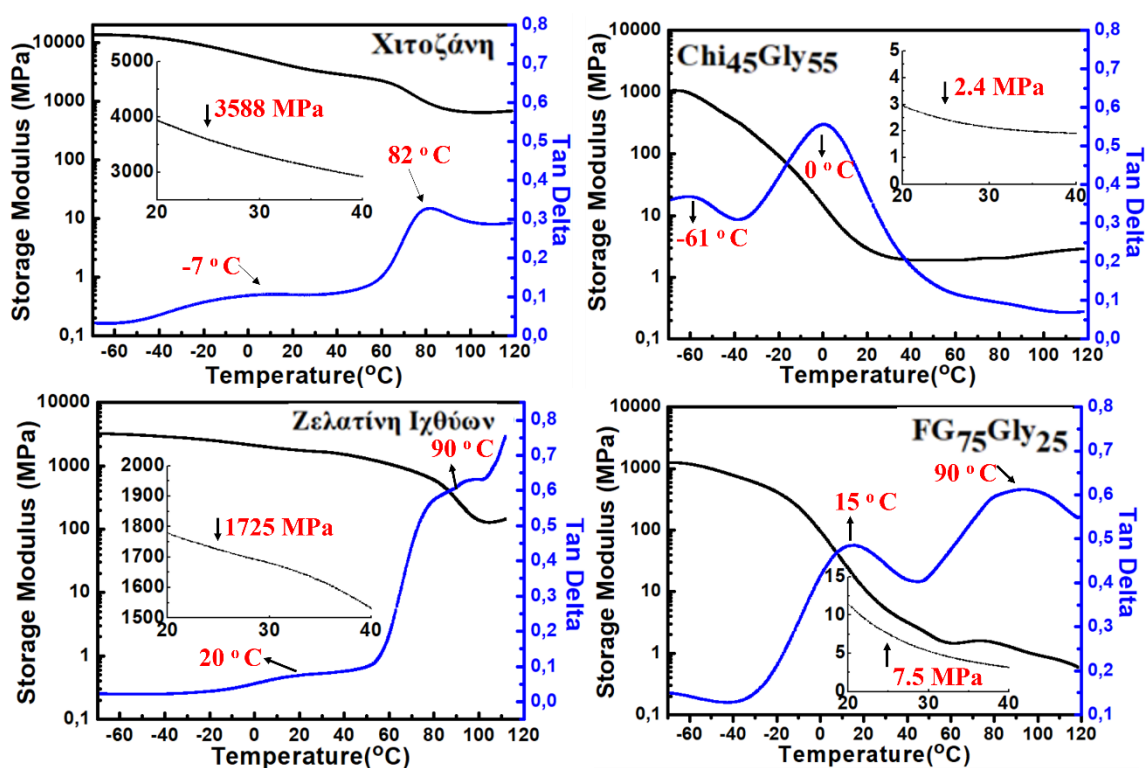
Στο Σχήμα 6.6 παρουσιάζονται τα αποτελέσματα των μετρήσεων DMA. Τα διαγράμματα (α) και (γ) έχουν περιγραφεί στο κεφάλαιο 5 αλλά εμπεριέχονται στο σχήμα 6.6. ώστε να μελετηθεί η επίδραση της γλυκερόλης στα συστήματα. Από τα

διαγράμματα (α) και (β), γίνεται αντιληπτό ότι η προσθήκη του πλαστικοποιητή οδήγησε σε μεγάλη μείωση του μέτρου αποθήκευσης. Πιο συγκεκριμένα, το μέτρο αποθήκευσης της μεμβράνης χιτοζάνης (α) στους 25 °C είναι $E' = 3588$ MPa, ενώ στο διάγραμμα του υλικού Chi₄₅Gly₅₅ (β) στην ίδια θερμοκρασία, ή τιμή του μέτρου αποθήκευσης είναι μόλις $E' = 2.4$ MPa. Στα ίδια διαγράμματα, στην καμπύλη του παράγοντα απώλειας ($\tan \delta$), εμφανίζονται δύο κορυφές με την αύξηση της θερμοκρασίας. Η β χαλάρωση στο διάγραμμα (α) τοποθετείται περίπου στους -7 °C ενώ στο διάγραμμα (β) εμφανίζεται η T_g της γλυκερόλης περίπου στους -61 °C. Η μετατόπιση αυτή αποδίδεται σε κινήσεις που οφείλονται σε αλληλεπιδράσεις της χιτοζάνης με τα μόρια της γλυκερόλης μέσω δεσμών υδρογόνου μεταξύ των λειτουργικών ομάδων NH₂, -CH₂OH, -NH-CO-CH₃ [278]. Επίσης, παρατηρήθηκε μετατόπιση και στην α χαλάρωση που σχετίζεται με την T_g , όπου στο διάγραμμα (α) τοποθετείται στους 82 °C ενώ στο διάγραμμα (β) η T_g τοποθετείται περίπου στους 0 °C. Η μείωση αυτή αποδίδεται στην προσθήκη του πλαστικοποιητή, που έχει την ιδιότητα να διεισδύει ανάμεσα στις πολυμερικές αλυσίδες [226,279]. Τα αποτελέσματα μπορούν να συγκριθούν ποιοτικά με τη μελέτη που πραγματοποιήθηκε στην ερευνητική εργασία των Rivero et al., το 2016 [280]. Όμως οι μετατοπίσεις είναι αρκετά μεγαλύτερες, καθώς η ποσότητα της γλυκερόλης που χρησιμοποιήθηκε στην παρούσα διατριβή είναι επίσης αρκετά μεγαλύτερη.

Το μέτρο αποθήκευσης της μεμβράνης ζελατίνης ιχθύων (γ) στους 25 °C είναι $E' = 1725$ MPa. Η β χαλάρωση στο διάγραμμα (γ) τοποθετείται περίπου στους 20 °C και η α χαλάρωση (T_g), στους 90 °C. Το μέτρο αποθήκευσης του υλικού FG₇₅Gly₂₅ (διάγραμμα δ) στους 25 °C είναι $E' = 7.5$ MPa ενώ στην καμπύλη του παράγοντα απώλειας ($\tan \delta$) παρατηρούνται δύο διαφορετικά T_g καθώς δεν προέκυψε μονοφασικό σύστημα. Η T_g στους 15 °C οφείλεται στην αλληλεπίδραση των συστατικών ζελατίνης ιχθύων-γλυκερόλης (δεσμοί υδρογόνου μεταξύ των αμινομάδων της ζελατίνης και των υδροξυλομάδων της γλυκερόλης) ενώ η T_g που εμφανίζεται περίπου στους 90 °C αποδίδεται στη ζελατίνη ιχθύων που δεν αντέδρασε με τη γλυκερόλη. Η εμφάνιση δύο διαφορετικών T_g είναι φυσιολογική καθώς χρησιμοποιήθηκε αρκετά μεγαλύτερη ποσότητα ζελατίνης ιχθύων σε σχέση με την γλυκερόλη (βλέπε Πίνακα 6.1) διότι χρησιμοποιώντας χαμηλότερη ποσότητα ζελατίνης δεν σχηματιζόταν υδροπηκτική. Στο σύστημα χιτοζάνης-γλυκερόλης δεν ίσχυε

κάτι τέτοιο υποδεικνύοντας ισχυρότερες αλληλεπιδράσεις μεταξύ των συστατικών σε σχέση με το σύστημα ζελατίνης-γλυκερόλης.

Σύμφωνα με τον Bergo και την ομάδα του, η μείωση της T_g είναι πλήρως εξαρτώμενη από την συγκέντρωση και την μοριακή δομή του πλαστικοποιητή που χρησιμοποιείται [281,282]. Όπως προαναφέρθηκε, αυτό δεν ήταν εφικτό να αποδειχθεί πειραματικά καθώς όταν αυξήθηκε η ποσότητα της γλυκερόλης τα δοκίμια αστοχούσαν λόγω αδυναμίας σχηματισμού σταθερής πηκτής (κακή αναμιξιμότητα) κατά την τοποθέτησή τους στις αρπάγες ενώ η χρήση χαμηλότερων συγκεντρώσεων γλυκερόλης οδηγούσε σε γρήγορη αποδόμηση του υλικού οπότε δεν αξιολογήθηκαν.

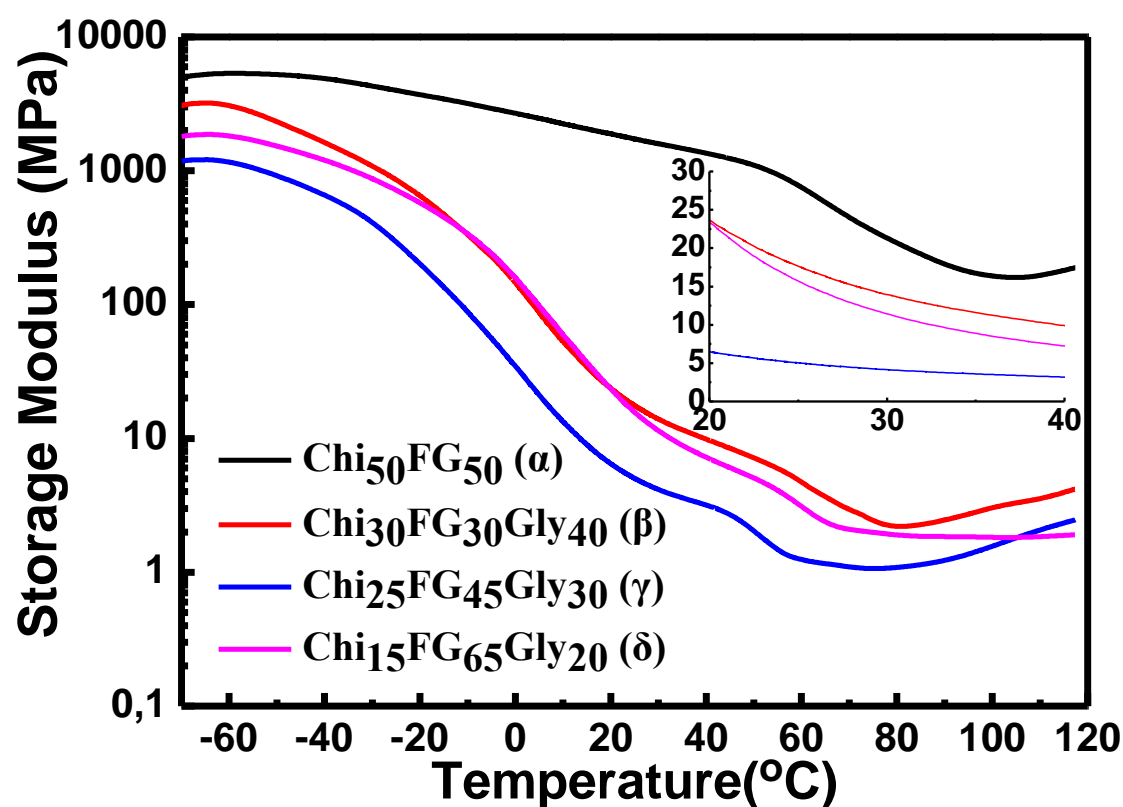


Σχήμα 6.6. Αποτελέσματα δυναμικής μηχανικής ανάλυσης, μέτρο αποθήκευσης (—) και παράγοντας απώλειας (—) των υδροπηκτών χιτοζάνης (α), Chi₄₅Gly₅₅ (β) ζελατίνης ιχθύων (γ) και FG₇₅Gly₂₅ (δ).

Στο Σχήμα 6.7 απεικονίζονται τα αποτελέσματα από τις μετρήσεις DMA-μέτρο αποθήκευσης των αναμιγμάτων Chi₃₀FG₃₀Gly₄₀, Chi₂₅FG₄₅Gly₃₀, Chi₁₅FG₆₅Gly₂₀ και Chi₅₀FG₅₀. Το μέτρο αποθήκευσης στα διαγράμματα (β), (γ) και (δ) έχει μειωθεί κατά

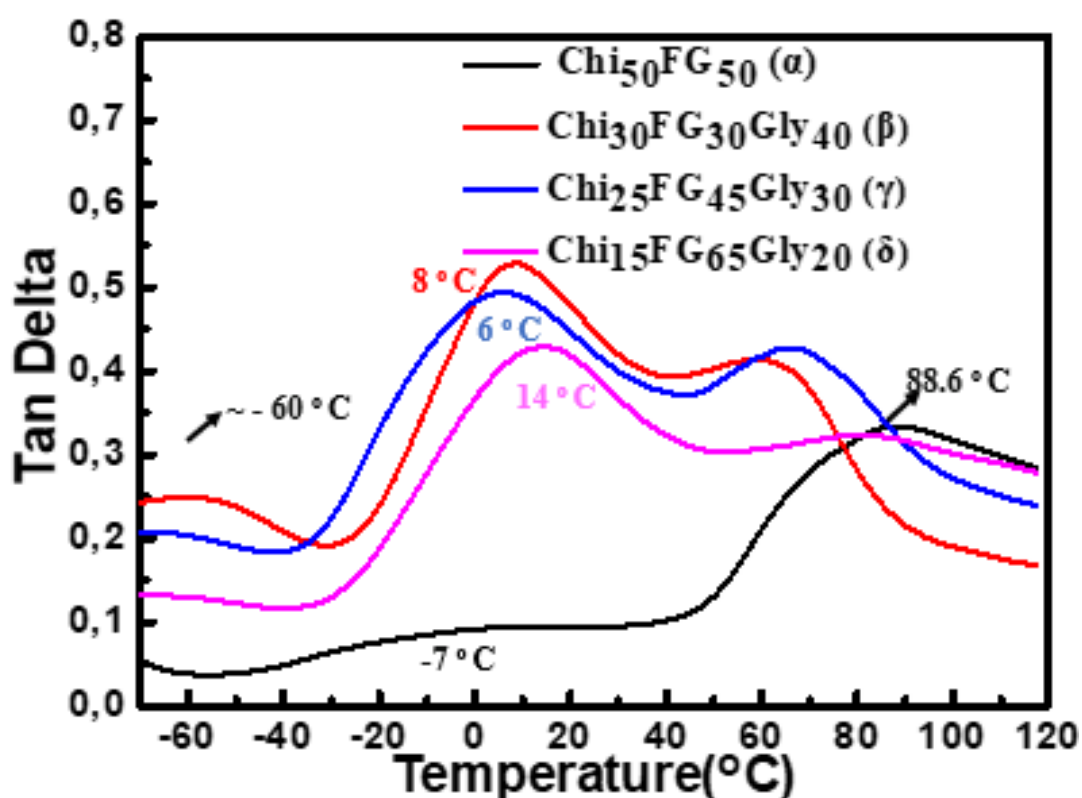
πολύ σε σχέση με το διάγραμμα (α). Το φαινόμενο αυτό αποδίδεται στην ενσωμάτωση του πλαστικοποιητή στα υλικά.

Στα διαγράμματα (α), (β), (γ) και (δ) του σχήματος 6.8 παρουσιάζονται οι καμπύλες του παράγοντα απώλειας για τα ίδια υλικά. Στο διάγραμμα (α), όπως ήδη έχει αναφερθεί εμφανίζεται η β χαλάρωση στους $-7\text{ }^{\circ}\text{C}$ και η κορυφή της α χαλάρωσης στους $\sim 88.6\text{ }^{\circ}\text{C}$ (T_g). Στα διαγράμματα (β), (γ) και (δ) εμφανίζονται τρεις T_g . Η T_g που τοποθετείται περίπου στους $-60\text{ }^{\circ}\text{C}$ αποδίδεται στην T_g της γλυκερόλης [283]. Ως βασικές T_g των τριαδικών (ternary) συστημάτων, ορίζονται οι ευρείες κορυφές που εμφανίζονται στο θερμοκρασιακό εύρος από τους -40 έως τους $40\text{ }^{\circ}\text{C}$ με επίκεντρο κορυφών τους $6\text{ }^{\circ}\text{C}$ ($\text{Chi}_{25}\text{FG}_{45}\text{Gly}_{30}$), τους $8\text{ }^{\circ}\text{C}$ ($\text{Chi}_{30}\text{FG}_{30}\text{Gly}_{40}$) και τους $14\text{ }^{\circ}\text{C}$ ($\text{Chi}_{15}\text{FG}_{65}\text{Gly}_{20}$) που ορίζονται και ως η βασική T_g του τριαδικού (ternary) συστήματος.



Σχήμα 6.7. Αποτελέσματα δυναμικής μηχανικής ανάλυσης-μέτρο αποθήκευσης των υδροπηκτών $\text{Chi}_{50}\text{FG}_{50}$ (α), $\text{Chi}_{30}\text{FG}_{30}\text{Gly}_{40}$ (β), $\text{Chi}_{25}\text{FG}_{45}\text{Gly}_{30}$ (γ) και $\text{Chi}_{15}\text{FG}_{65}\text{Gly}_{20}$ (δ).

Οι κορυφές χαμηλότερης έντασης που εμφανίζονται στα διαγράμματα (β), (γ) και (δ) στο θερμοκρασιακό εύρος από τους 65 έως τους 85 °C, οφείλονται πιθανότατα σε κακή αναμιξιμότητα της χιτοζάνης και της ζελατίνης με την γλυκερόλη. Παρατηρήθηκε ότι αυξάνοντας την ποσότητα της ζελατίνης στο σύστημα αυξάνεται και η θερμοκρασία αυτής της μετάπτωσης που φτάνει πολύ κοντά στην θερμοκρασία υαλώδους μετάπτωσης του αρχικού συστήματος (α), που δεν περιέχει γλυκερόλη. Αυτό επιβεβαιώνει και τα αποτελέσματα που παρουσιάζονται διάγραμμα (δ) του σχήματος 6.6, αποδεικνύοντας ότι οι αλληλεπιδράσεις μεταξύ ζελατίνης ιχθύων-γλυκερόλης είναι πιο περιορισμένες σε σχέση με το σύστημα χιτοζάνης-γλυκερόλης που απεικονίζεται στο διάγραμμα (β) του σχήματος 6.6.



Σχήμα 6.8. Αποτελέσματα δυναμικής μηχανικής ανάλυσης-παράγοντας απώλειας των υδροπηκτών Chi₅₀FG₅₀ (α), Chi₃₀FG₃₀Gly₄₀ (β), Chi₂₅FG₄₅Gly₃₀ (γ) και Chi₁₅FG₆₅Gly₂₀ (δ).

Κλείνοντας, συμπεραίνεται ότι υπάρχει έντονη διχογνωμία στην διεθνή βιβλιογραφία τόσο ως προς την απόδοση της T_g της χιτοζάνης και της ζελατίνης αλλά και ως προς το που οφείλονται οι χαλαρώσεις στα συστήματα χιτοζάνης-γλυκερόλης. Για παράδειγμα, στην ερευνητική εργασία των Einfeldt et al. η β χαλάρωση αποδίδεται

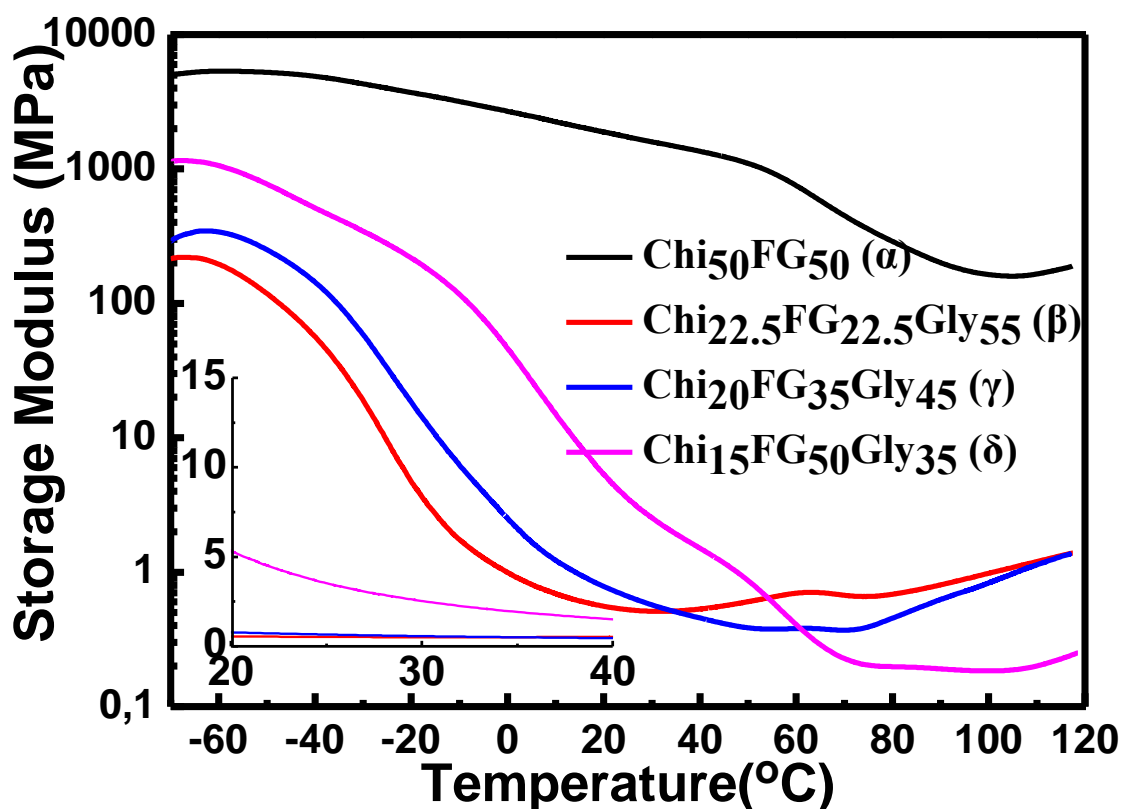
σε τοπικές κινήσεις αλυσίδων [284], ενώ στην ερευνητική εργασία των Montès et al. [285] η β χαλάρωση αποδίδεται σε κινήσεις των πλευρικών ομάδων. Μπορεί όμως να επιβεβαιωθεί ότι οι χαλαρώσεις που συναντώνται στη χιτοζάνη είναι συγκρίσιμες με αυτές που απαντώνται και σε άλλους πολυσακχαρίτες αλλά και πρωτεΐνες, όπως προκύπτει και από τα αποτελέσματα της παρούσης διατριβής [278,284-289]. Όσον αφορά το σύστημα ζελατίνης όσο και τα συστήματα χιτοζάνης-ζελατίνης-γλυκερόλης, η μελέτη τους μέσω DMA (θερμοκρασιακή μελέτη) είναι πολύ περιορισμένη. Το 1998, στην ερευνητική εργασία του Arvanitoyannis et al. μελετήθηκε η επίδραση της γλυκερόλης διατηρώντας σταθερές τις ποσότητες της χιτοζάνης και της ζελατίνης στο σύστημα, συμπεραίνοντας ότι η αύξηση της γλυκερόλης στο σύστημα, οδηγεί σε μείωση της θερμοκρασίας υαλώδους μετάπτωσης του συστήματος [267]. Το 2011, ο Pereda και οι συνεργάτες του μελέτησαν επίσης την θερμομηχανική συμπεριφορά μεμβρανών χιτοζάνης-ζελατίνης-γλυκερόλης [242]. Στην παρούσα διατριβή, για πρώτη φορά μελετήθηκε η συμπεριφορά του προαναφερόμενου συστήματος μεταβάλλοντας τόσο τις ποσότητες της ζελατίνης στο σύστημα όσο και τις ποσότητες της γλυκερόλης. Τέλος πραγματοποιήθηκε σύγκριση με υλικά που δεν περιείχαν καθόλου πλαστικοποιητή.

6.3.4.2.2. Υλικά Β' ομάδας

Στο σχήμα 6.9. παρουσιάζονται τα αποτελέσματα που προέκυψαν από τις μετρήσεις DMA-μέτρο αποθήκευσης για τα υλικά της ομάδας Β. Στα διαγράμματα (α), (β), (γ) και (δ) απεικονίζεται το μέτρο αποθήκευσης συναρτήσει της θερμοκρασίας. Στα διαγράμματα (β), (γ) και (δ) παρατηρείται ραγδαία μείωση του μέτρου αποθήκευσης σε σχέση με το διάγραμμα (α). Η παρατηρούμενη μείωση οφείλεται στην προσθήκη του πλαστικοποιητή. Στην συγκεκριμένη ομάδα υλικών χιτοζάνης-ζελατίνης ιχθύων-γλυκερόλης αποδείχθηκε ότι η αύξηση της συγκέντρωσης της ζελατίνης ιχθύων στο σύστημα, οδήγησε σε μικρή μεν αλλά αυξημένη του μέτρου αποθήκευσης των υλικών. Στο διάγραμμα (β), το μέτρο αποθήκευσης στους 25 °C, είναι 0.5 MPa, στο διάγραμμα (γ), είναι 0.7 MPa και στο διάγραμμα (δ) που αναφέρεται στην μεμβράνη με την υψηλότερη συγκέντρωση ζελατίνης, είναι 3.5 MPa. Βελτίωση των μηχανικών ιδιοτήτων αναφέρθηκε και στην ερευνητική εργασία του Hosseini et al. [226], αυξάνοντας το ποσοστό της ζελατίνης ιχθύων στο τελικό υλικό. Στην παρούσα

ομάδα υλικών δεν συμπεριλαμβάνονται αποτελέσματα DMA από τα υλικά Chi₃₀Gly₇₀ και FG₆₀Gly₄₀ διότι όπως προαναφέρθηκε τα δοκίμια αστοχούσαν κατά την τοποθέτησή τους στις αρπάγες του οργάνου.

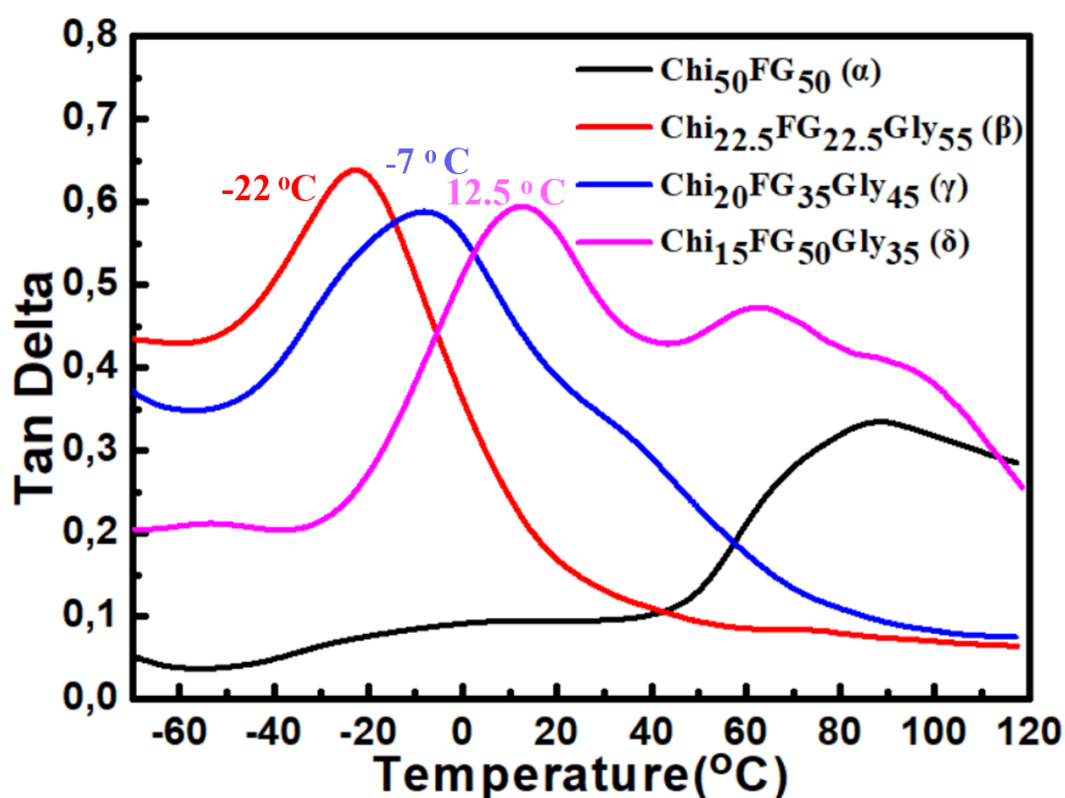
Στο σχήμα 6.10 απεικονίζονται τα αποτελέσματα του παράγοντα απώλειας συναρτήσει της θερμοκρασίας. Παρατηρήθηκε μείωση της T_g όλων των υλικών που περιγράφονται στα διαγράμματα (β), (γ) και (δ) σε σχέση με το υλικό που δεν περιέχει πλαστικοποιητή και περιγράφεται στο διαγράμμα (α). Επίσης παρατηρήθηκε μείωση της θερμοκρασίας υαλώδους μετάπτωσης και σε σχέση με υλικά που περιγράφηκαν στο σχήμα 6.8. Το φαινόμενο αυτό είναι φυσιολογικό καθώς χρησιμοποιήθηκαν υψηλότερες συγκεντρώσεις πλαστικοποιητή οδηγώντας σε περαιτέρω μείωση της T_g [267,281,282].



Σχήμα 6.9. Αποτελέσματα δυναμικής μηχανικής ανάλυσης-μέτρο, αποθήκευσης των υδροπηκτών Chi₅₀FG₅₀ (α), Chi_{22.5}FG_{22.5}Gly₅₅ (β), Chi₂₀FG₃₅Gly₄₅ (γ) και Chi₁₅FG₅₀Gly₃₅ (δ).

Οι T_g που εμφανίζονταν περίπου στους -60 °C στα υλικά της προηγούμενης ομάδας (σχήμα 6.8.) παύουν να εμφανίζονται με εξαίρεση το υλικό που απεικονίζεται

στο διάγραμμα (δ). Επίσης οι T_g που αποδίδονται σε ελλιπή ανάμιξη των συστατικών και τοποθετούνται στο θερμοκρασιακό εύρος μεταξύ 65 και 85 °C, έχουν και αυτές μετατοπιστεί προς χαμηλότερες θερμοκρασίες, ενώ η έντασή τους είναι πολύ μειωμένη. Μάλιστα στο διάγραμμα (β) που αναφέρεται στην υδροπηκτική Chi_{22.5}FG_{22.5}Gly₅₅ παρατηρείται μόνο μία T_g .



Σχήμα 6.10. Αποτελέσματα δυναμικής μηχανικής ανάλυσης-παράγοντας απώλειας των υδροπηκτών Chi₅₀FG₅₀ (α), Chi_{22.5}FG_{22.5}Gly₅₅ (β), Chi₂₀FG₃₅Gly₄₅ (γ) και, Chi₁₅FG₅₀Gly₃₅ (δ).

Από όλα τα παραπάνω συμπεραίνεται ότι οι αναλογίες που χρησιμοποιήθηκαν στην παρούσα ομάδα υλικών οδήγησαν στην βέλτιστη δυνατή αναμιξιμότητα των συστημάτων. Η σταδιακή αύξηση του μέτρου αποθήκευσης που παρατηρήθηκε αυξάνοντας την ποσότητα της ζελατίνης ιχθύων, αποδίδεται πιθανότατα στην καλύτερη αναμιξιμότητα των συστημάτων σε σχέση με τα συστήματα που περιγράφηκαν στο σχήμα 6.8., όπου δεν υπήρχε σαφής επίδραση στο μέτρο αποθήκευσης, αυξάνοντας την ποσότητα της ζελατίνης ιχθύων. Οι T_g των τριαδικών

συστημάτων τοποθετούνται στους $-22\text{ }^{\circ}\text{C}$ ($\text{Chi}_{22.5}\text{FG}_{22.5}\text{Gly}_{55}$), στους $-7\text{ }^{\circ}\text{C}$ ($\text{Chi}_{20}\text{FG}_{35}\text{Gly}_{45}$) και στους $12.5\text{ }^{\circ}\text{C}$ ($\text{Chi}_{15}\text{FG}_{50}\text{Gly}_{35}$) στα διαγράμματα (β), (γ) και (δ) αντίστοιχα.

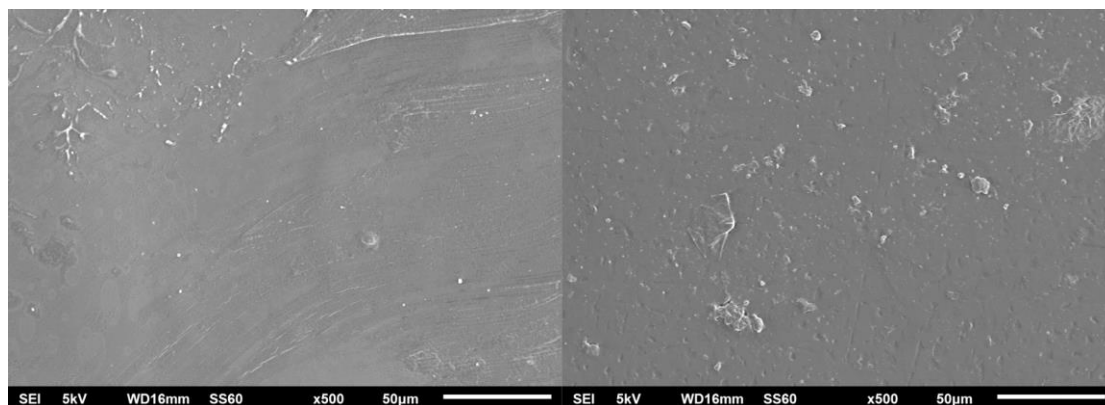
6.3.5. Ηλεκτρονική μικροσκοπία σάρωσης (SEM)

6.3.5.1. Πειραματική διαδικασία

Για την εξέταση της μορφολογίας χρησιμοποιήθηκε Ηλεκτρονικό Μικροσκόπιο Σάρωσης (Scanning Electron Microscope) της εταιρίας JEOL, μοντέλο JSM6510-LV με νήμα από εξαβοριούχο λανθάνιο (LaB_6). Τα δείγματα μελετήθηκαν σε διαφορετικές μεγεθύνσεις ενώ χρησιμοποιήθηκε επιταχυνόμενη τάση 5kV.

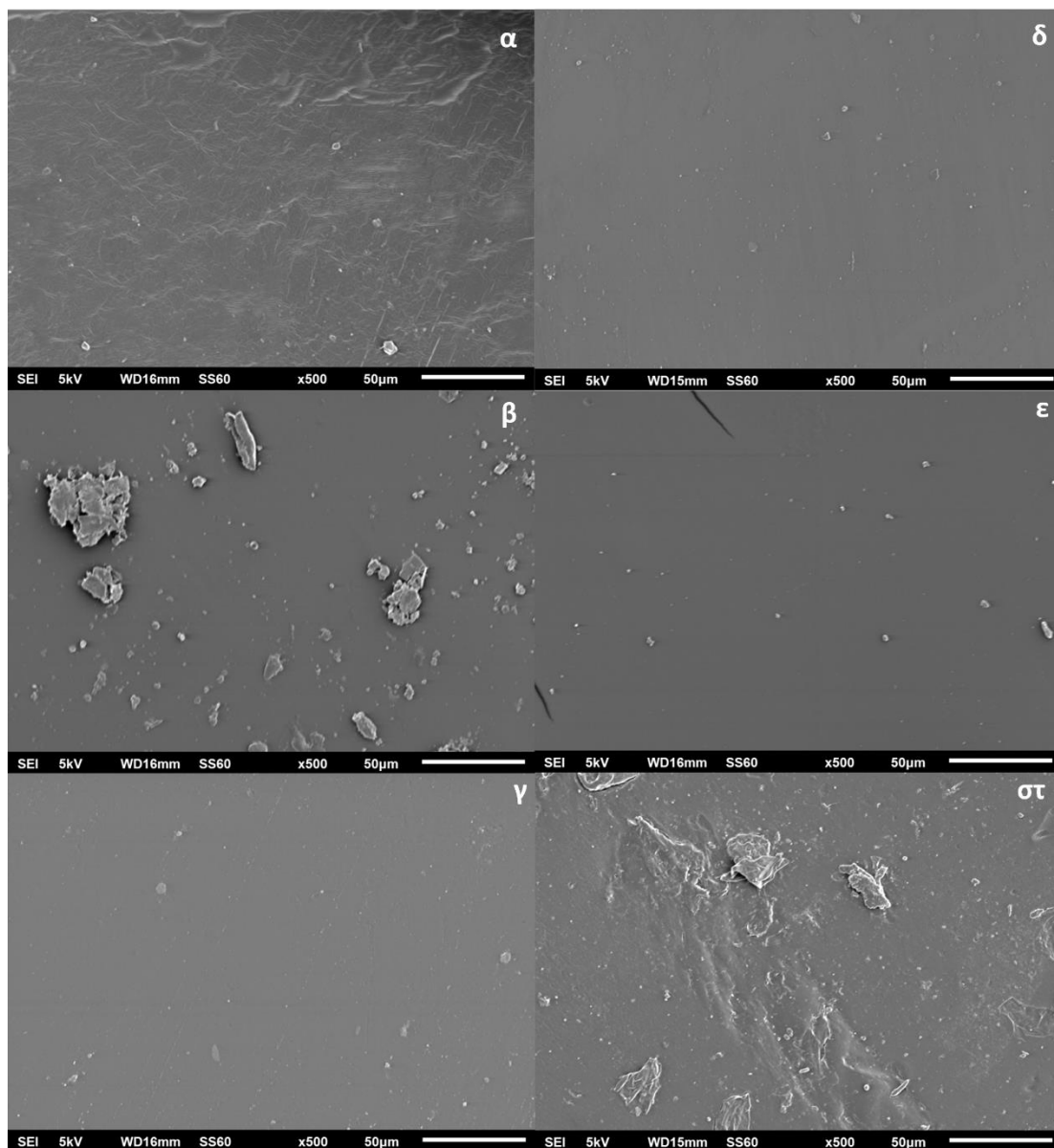
6.3.5.2. Αποτελέσματα και συζήτηση

Στο σχήμα 6.11. απεικονίζονται τα αποτελέσματα που ελήφθησαν μέσω της μικροσκοπίας SEM από την επιφάνεια των υδροπηκτών $\text{Chi}_{45}\text{Gly}_{55}$ (αριστερά) και $\text{FG}_{75}\text{Gly}_{25}$ (δεξιά). Γενικά παρατηρείται ομοιόμορφη μορφολογία επιφάνειας και συνεχής μη πορώδης δομή και στα δύο υλικά. Τα στίγματα οφείλονται πιθανότατα σε αδιάλυτο πολυμερές.



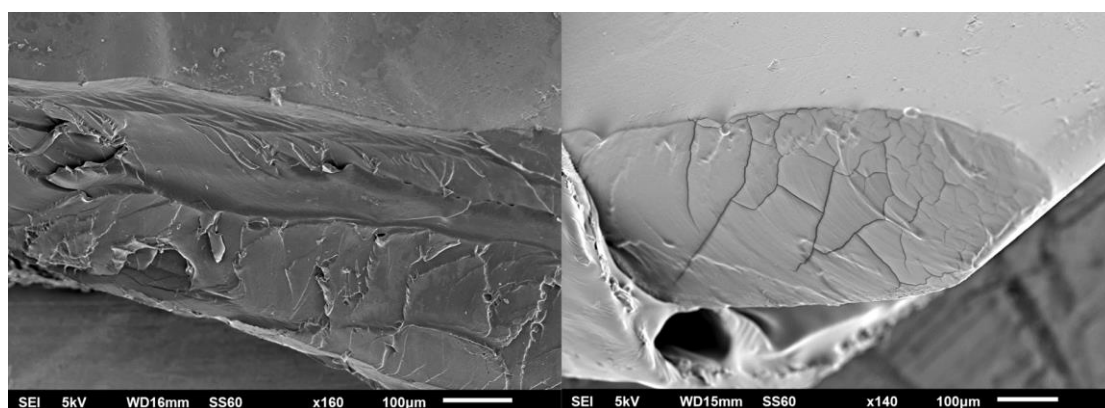
Σχήμα 6.11. Εικόνες SEM από την επιφάνεια των υδροπηκτών $\text{Chi}_{45}\text{Gly}_{55}$ (αριστερά) και $\text{FG}_{75}\text{Gly}_{25}$ (δεξιά).

Στο σχήμα 6.12, παρουσιάζονται οι εικόνες που ελήφθησαν μέσω της ηλεκτρονικής μικροσκοπίας για τα αναμίγματα. Τα υλικά παρουσιάζουν στο σύνολό τους συνεχή, συμπαγή και μη πορώδη δομή. Τα στίγματα που φαίνονται στις εικόνες πιθανότατα οφείλονται σε αδιάλυτο πολυμερές.



Σχήμα 6.12. Εικόνες SEM επιφάνειας των υδροπηκτών $\text{Chi}_{30}\text{FG}_{30}\text{Gly}_{40}$ (α), $\text{Chi}_{25}\text{FG}_{45}\text{Gly}_{30}$ (β) και $\text{Chi}_{15}\text{FG}_{65}\text{Gly}_{20}$ (γ), $\text{Chi}_{22.5}\text{FG}_{22.5}\text{Gly}_{55}$ (δ), $\text{Chi}_{20}\text{FG}_{35}\text{Gly}_{45}$ (ε) και $\text{Chi}_{15}\text{FG}_{50}\text{Gly}_{35}$ (στ).

Στο σχήμα 6.13. παρουσιάζονται οι εικόνες SEM των υδροπηκτών αφού υποβλήθηκαν σε εγκάρσια τομή. Στην εικόνα που αναφέρεται στην υδροπηκτική Chi₄₅Gly₅₅ επιβεβαιώνεται η συνεχής, μη πορώδης δομή ενώ στην υδροπηκτική FG₇₅Gly₂₅ παρατηρούνται κάποιες ρηγματώσεις οι οποίες είναι πιθανόν να αποδίδονται σε ελλiptή αναμιξιμότητα των δύο συστατικών.



Σχήμα 6.13. Εικόνες SEM των υδροπηκτών Chi₄₅Gly₅₅ (αριστερά) και FG₇₅Gly₂₅ (δεξιά) αφού υποβλήθηκαν σε εγκάρσια τομή.

6.3.6. Μελέτη απορρόφησης νερού

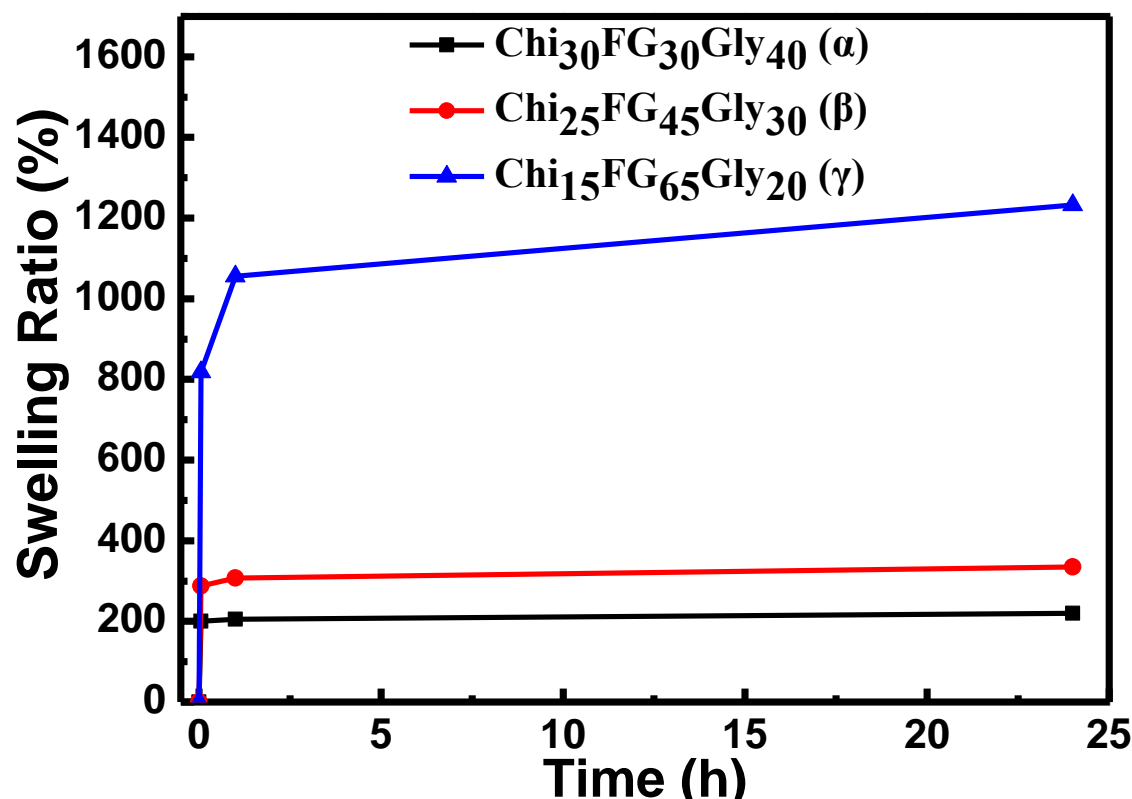
6.3.6.1. Πειραματική διαδικασία

Για τη μελέτη απορρόφησης νερού, κόπηκαν τμήματα υδροπηκτών διαμέτρου 12 mm, χρησιμοποιώντας ειδικό κοπίδι. Αφού ζυγίστηκαν (ξηρή κατάσταση), τοποθετήθηκαν σε τρυβλίο και προστέθηκε νερό. Στη συνέχεια απομακρύνονταν από το νερό σε τρεις διαφορετικούς χρόνους (t=3 min, 1 h και 24 h) και αφού απομακρυνόταν η περίσσεια νερού με διηθητικό χαρτί, ακολουθούσε ζύγιση (διογκωμένη κατάσταση) με σκοπό τον υπολογισμό της απορρόφησης νερού. Η απορρόφηση νερού υπολογίστηκε από την εξίσωση 6.1 [57].

$$\text{Απορρόφηση νερού (\%)} = \frac{m_{\text{διογκ. υδροπηκτής}} - m_{\text{ξηρής υδροπηκτής}}}{m_{\text{ξηρής υδροπηκτής}}} \times 100 \quad (6.1.)$$

6.3.6.2. Αποτελέσματα και συζήτηση

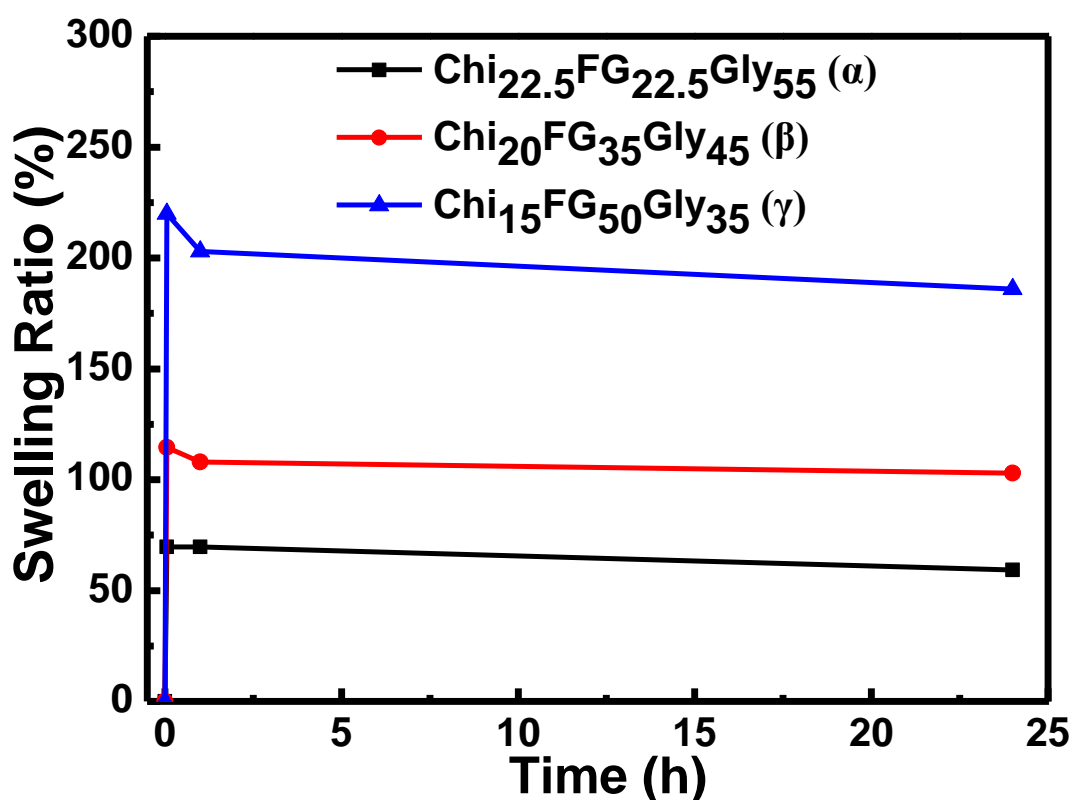
Στα σχήματα 6.14 και 6.15 παρουσιάζονται τα αποτελέσματα που προέκυψαν από τη μελέτη απορρόφησης νερού των υλικών της Α' και Β' ομάδας (για λεπτομέρειες βλ. Πίνακα 6.2). Μια γενική διαπίστωση είναι ότι η αύξηση της συγκέντρωσης της ζελατίνης ιχθύων στο υλικό επιφέρει αύξηση της ικανότητας απορρόφησης νερού. Σύμφωνα με τον Peng [290], η προσθήκη 10 % wt ζελατίνης ιχθύων στο σύστημα, οδήγησε σε 30 % αύξηση της απορρόφησης νερού σε σχέση με την καθαρή χιτοζάνη. Συγκρίνοντας τα αποτελέσματά της παρούσης διατριβής με αυτά που παρατίθενται στην ερευνητική εργασία του Ma [57] γίνεται σαφές ότι η προσθήκη της ζελατίνης ιχθύων στο σύστημα αύξησε το βαθμό της απορρόφησης νερού.



Σχήμα 6.14. Αποτελέσματα μελέτης απορρόφησης νερού των υδροπηκτών Chi₃₀FG₃₀Gly₄₀ (α), Chi₂₅FG₄₅Gly₃₀ (β), Chi₁₅FG₆₅Gly₂₀ (γ).

Ο μέγιστος βαθμός διόγκωσης που αναφέρεται στην συγκεκριμένη έρευνα είναι 180 % ενώ στην παρούσα διατριβή ο μέγιστος βαθμός διόγκωσης παρατηρήθηκε στο υλικό Chi₁₅FG₆₅Gly₂₀ και είναι περίπου 1200 %. Βέβαια το συγκεκριμένο υλικό

οδηγείται σε άμεση αποδόμηση σε σχέση με το υλικό χιτοζάνης/γλυκερόλης που αναφέρεται στην ερευνητική εργασία του Ma [57]. Ο λόγος που συμβαίνει αυτό είναι ότι το υλικό $\text{Chi}_{15}\text{FG}_{65}\text{Gly}_{20}$ περιέχει υψηλή συγκέντρωση ζελατίνης η οποία είναι υδατοδιαλυτή [291]. Άλλες ερευνητικές ομάδες που έχουν ασχοληθεί με αντίστοιχα συστήματα είναι αυτή του Qiao [203] και του Hosseini [226]. Η ερευνητική εργασία του Qiao δεν εμπεριέχει μελέτη απορρόφησης νερού ενώ στην ερευνητική εργασία του Hosseini εμπεριέχεται μελέτη μόνο του ρυθμού αποδόμησης, οπότε δεν μπορεί να πραγματοποιηθεί σύγκριση.



Σχήμα 6.15. Αποτελέσματα μελέτης απορρόφησης νερού των υδροπηκτών $\text{Chi}_{22.5}\text{FG}_{22.5}\text{Gly}_{55}$ (α), $\text{Chi}_{20}\text{FG}_{35}\text{Gly}_{45}$ (β) και $\text{Chi}_{15}\text{FG}_{50}\text{Gly}_{35}$ (γ).

Από τα αποτελέσματα, διαφαίνεται ότι η ομάδα υλικών που περιείχε υψηλότερη συγκέντρωση γλυκερόλης (ομάδα Β') επέδειξε χαμηλότερο βαθμό διόγκωσης. Στο παρελθόν θεωρούνταν ότι οι πλαστικοποιητές λειτουργούσαν διεισδύοντας μεταξύ των πολυμερικών αλυσίδων απομακρύνοντάς τες (αύξηση του "ελεύθερου όγκου") [292]. Ωστόσο αργότερα αποδείχθηκε ότι αυτό δεν ισχύει για όλες τις περιπτώσεις πλαστικοποίησης [293]. Στην περίπτωση μάλιστα που ο πλαστικοποιητής ή το νερό

(που δρα ως πλαστικοποιητής σε ορισμένα συστήματα) δημιουργεί δεσμούς υδρογόνου με τα υδρόφιλα μέρη του πολυμερικού συστήματος, ο ελεύθερος όγκος μπορεί να μειωθεί [294]. Το φαινόμενο αυτό είναι η πιθανότερη εξήγηση της μείωσης του βαθμού διόγκωσης που παρατηρήθηκε, με την αύξηση της συγκέντρωσης της γλυκερόλης, υποδεικνύοντας ότι η αύξηση της συγκέντρωσης του πλαστικοποιητή οδήγησε πιθανότατα σε μείωση του ελεύθερου όγκου εμποδίζοντας τις αλυσίδες να διογκωθούν.

Τέλος, τα αποτελέσματα της παρούσας μελέτης επιβεβαιώνονται ποιοτικά και από τα αποτελέσματα θερμικής ανάλυσης του σχήματος 6.5. Συμπεραίνεται ότι η απώλεια μάζας στο θερμοκρασιακό εύρος που αναφέρεται στην απώλεια της υγρασίας είναι υψηλότερη στο υλικό όπου χρησιμοποιήθηκε χαμηλότερη ποσότητα γλυκερόλης. Αποτελεί ουσιαστικά έναν έμμεσο τρόπο υπολογισμού του ποσοστού της υγρασίας του συστήματος και εν τέλει της υδροφιλικότητάς του.

6.3.7. Μελέτη ρυθμού αποδόμησης

6.3.7.1. Πειραματική διαδικασία

Η μελέτη του ρυθμού αποδόμησης αποτελεί συνέχεια της μελέτης απορρόφησης νερού. Οι υδροπηκτές παρέμειναν σε υδατικό διάλυμα για 16 ημέρες ενώ πραγματοποιούνταν ζυγίσεις σε διάφορους χρόνους ($t=1^{\text{η}}, 2^{\text{η}}, 3^{\text{η}}, 6^{\text{η}}, 7^{\text{η}}, 9^{\text{η}}, 10^{\text{η}}, 13^{\text{η}}, 14^{\text{η}}, 15^{\text{η}}$ και $16^{\text{η}}$ μέρα). Ο ρυθμός αποδόμησης υπολογίστηκε από την εξίσωση 6.2,

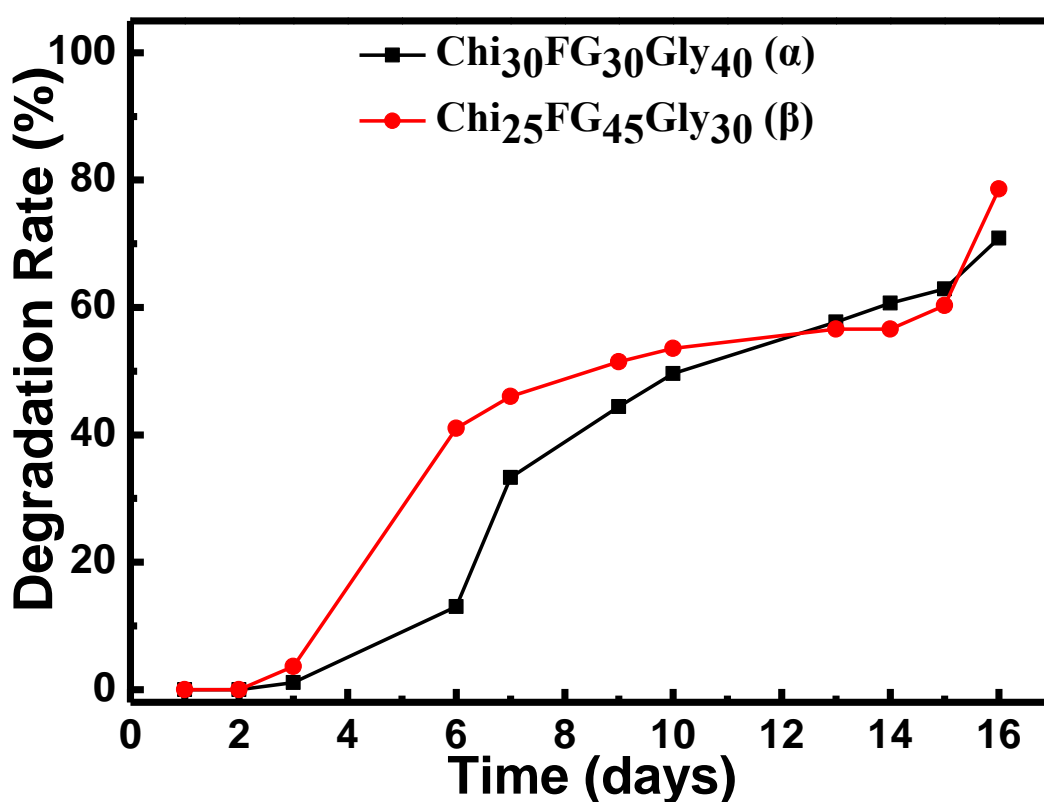
$$\text{Ρυθμός αποδόμησης (\%)} = \frac{m_{\text{διογκ. υδροπηκτ. (day 1)}} - m_{\text{διογκ. υδροπηκτ. (i)}}}{m_{\text{διογκ. υδροπηκτ. (day 1)}}} \times 100 \quad (6.2)$$

όπου i είναι η μάζα της υδροπηκτής την $2^{\text{η}}, 3^{\text{η}}, 6^{\text{η}}, 7^{\text{η}}, 9^{\text{η}}, 10^{\text{η}}, 13^{\text{η}}, 14^{\text{η}}, 15^{\text{η}}$ και $16^{\text{η}}$ μέρα.

6.3.7.2. Αποτελέσματα και συζήτηση

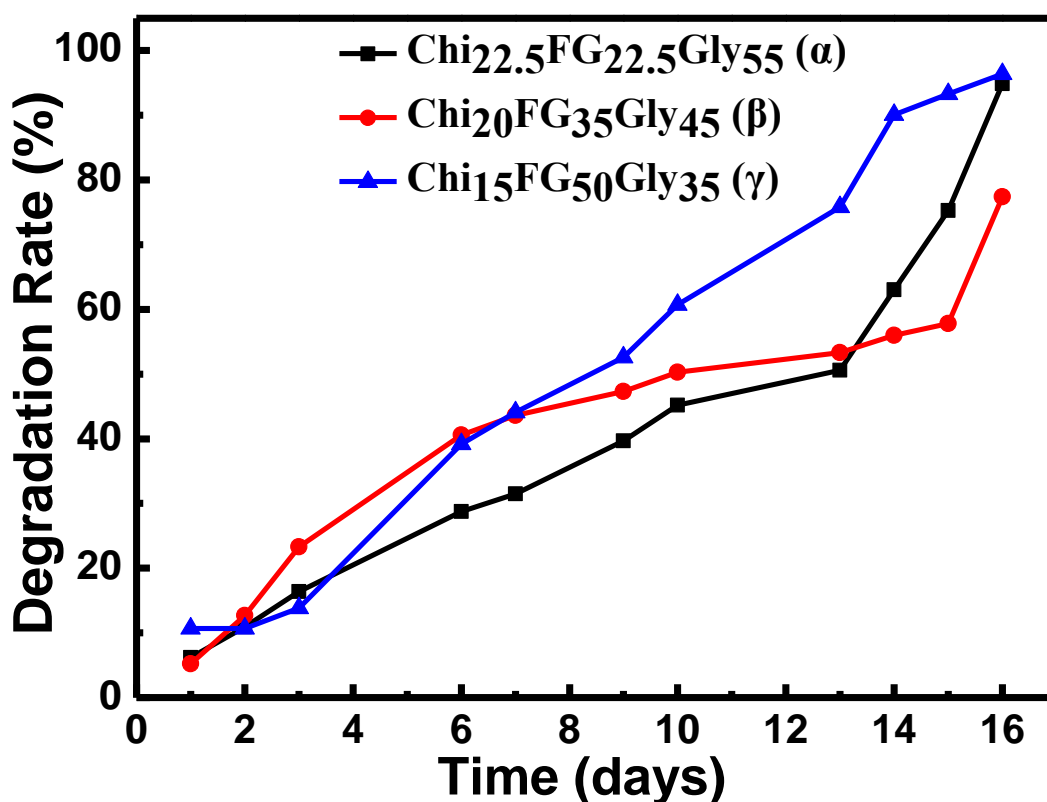
Στο Σχήμα 6.16, δίνονται τα αποτελέσματα που προέκυψαν από την μελέτη του ρυθμού αποδόμησης των υλικών της Ά ομάδας για χρονικό διάστημα 16 ημερών. Από τα διαγράμματα α και β , γίνεται αντιληπτό ότι το υλικό που περιέχει περισσότερη

ζελατίνη παρουσιάζει υψηλότερο ρυθμό αποδόμησης λόγω της υψηλής διαλυτότητας της ζελατίνης στο νερό [291]. Το ίδιο φαινόμενο παρατηρείται και στα υλικά της Β' ομάδας (σχήμα 6.17), όπου η αύξηση της συγκέντρωσης της ζελατίνης στο σύστημα οδηγεί σε αύξηση του ρυθμού αποδόμησης. Συγκρίνοντας το διάγραμμα (α) του σχήματος 6.16 με το διάγραμμα (α) του σχήματος 6.17 και το διάγραμμα (β) του σχήματος 6.16 με το διάγραμμα (β) του σχήματος 6,17, γίνεται σαφές ότι ο ρυθμός αποδόμησης των υλικών της Β' ομάδας (υλικά που περιέχουν υψηλότερη συγκέντρωση πλαστικοποιητή) είναι χαμηλότερος. Μάλιστα στα αποτελέσματα του ρυθμού αποδόμησης των υλικών της ομάδας Α' δεν γίνεται αναφορά στο υλικό Chi₁₅FG₆₅Gly₂₀ διότι αφότου διογκώθηκε η μεμβράνη, άρχισε να διαμερίζεται καθιστώντας την μελέτη του ρυθμού αποδόμησης αδύνατη. Η μεμβράνη Chi₁₅FG₅₀Gly₃₅ δεν παρουσίασε την ίδια συμπεριφορά όπως φαίνεται και στο σχήμα 6.18. Αυτό πιθανότατα οφείλεται στη διπλάσια ποσότητα γλυκερόλης που χρησιμοποιήθηκε στο σύστημα αυξάνοντας τις θέσεις πρόσδεσης (binding sites), προάγοντας το σχηματισμό δεσμών υδρογόνου μεταξύ της γλυκερόλης και των άλλων δύο συστατικών.



Σχήμα 6.16. Αποτελέσματα μελέτης ρυθμού αποδόμησης των υδροπηκτών Chi₃₀FG₃₀Gly₄₀ (α) και Chi₂₅FG₄₅Gly₃₀ (β).

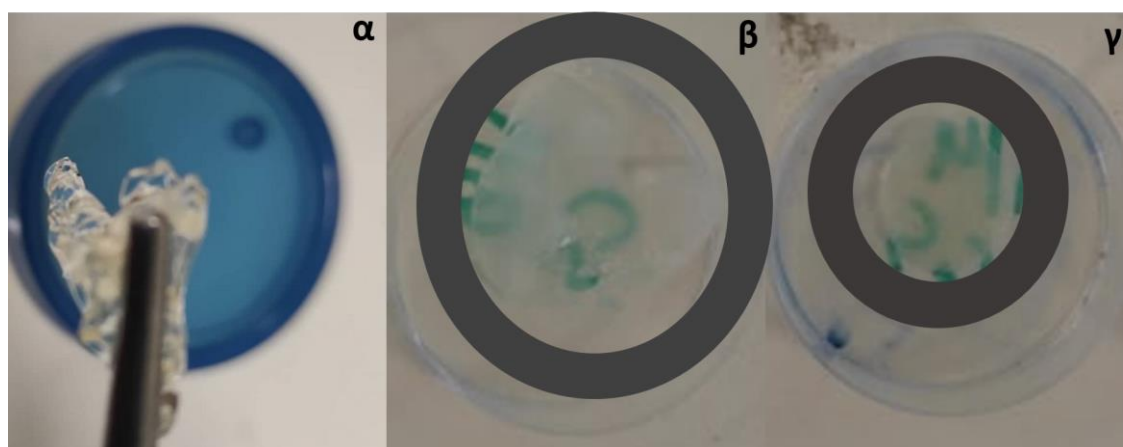
Τέλος, από τα διαγράμματα (α) και (β) του σχήματος 6.16, φαίνεται ότι τα υλικά τις 2 πρώτες μέρες της δοκιμής παρουσιάζουν μηδενικό ρυθμό αποδόμησης. Το αποτέλεσμα αυτό είναι πλασματικό καθώς το υλικό συνέχισε να απορροφά νερό τις δύο αυτές μέρες (εμπεριέχει αποδόμηση η οποία υπερκαλύπτεται λόγω της συνέχισης της διόγκωσης). Αυτό φαίνεται εξετάζοντας τις καμπύλες απορρόφησης νερού του σχήματος 6.14 που έχουν ανοδική τάση σε αντίθεση με τα υλικά της Β' ομάδας (σχήμα 6.1) όπου οι καμπύλες παρουσιάζουν πτωτική τάση.



Σχήμα 6.17. Αποτελέσματα μελέτης ρυθμού αποδόμησης των υδροπηκτών Chi_{22.5}FG_{22.5}Gly₅₅ (α), Chi₂₀FG₃₅Gly₄₅ (β) και Chi₁₅FG₅₀Gly₃₅ (γ).

Συγκρίνοντας τα αποτελέσματα της παρούσης διατριβής με αυτά που αναφέρονται στην ερευνητική εργασία του Hosseini et. al [226], όπου πραγματοποιήθηκε μελέτη αποδόμησης αντίστοιχων υλικών και σημειώθηκε αποδόμηση 36 % σε 24 ώρες για ανάλογο υλικό με αυτά που παρουσιάζονται στο διάγραμμα 6.16.β και 6.17.β και στις δύο περιπτώσεις τα υλικά της παρούσης διατριβής επέδειξαν αρκετά χαμηλότερο ρυθμό αποδόμησης. Το παράδοξο είναι ότι υλικά που

αναφέρει η ομάδα του Hosseini έχουν υποστεί θερμική κατεργασία στους 100 °C για 24 h πριν την δοκιμή αποδόμησης, που σημαίνει ότι έχουν δημιουργηθεί σταυροδεσμοί (ακολουθεί περιγραφή για το συγκεκριμένο θέμα στο επόμενο κεφάλαιο). Η πιθανότερη εξήγηση είναι ότι η μελέτη αποδόμησης πραγματοποιήθηκε υπό ανάδευση (και όχι στατικά) οδηγώντας στην αύξηση του ρυθμού αποδόμησης. Η ομάδα του Qiao [203] που ασχολήθηκε με αντίστοιχο σύστημα δεν παρουσιάζει αποτελέσματα μελετών αποδόμησης, ενώ στην ερευνητική εργασία των Pulieri et al. [99] αναφέρονται αρκετά υψηλότεροι ρυθμοί αποδόμησης για υλικά χιτοζάνης/ζελατίνης από αυτούς που αναφέρονται στην παρούσα διατριβή. Αυτό πιθανότατα αποδίδεται στην απουσία γλυκερόλης στο σύστημα του Pulieri ώστε να προαχθεί η δημιουργία δεσμών υδρογόνου στο σύστημα βελτιώνοντας έτσι τον ρυθμό διαλυτοποίησης του υλικού. Τα αποτελέσματα αυτά επιβεβαιώνονται και από το κεφάλαιο 5 της διατριβής για συστήματα που δεν περιέχουν γλυκερόλη όπου η αποδόμηση των υλικών ήταν πολύ άμεση γι' αυτό και δεν παρουσιάζονται αποτελέσματα (σχήμα 6.18.α).



Σχήμα 6.18. Απεικόνιση των υδροπηκτών $\text{Chi}_{20}\text{FG}_{80}$ (α) $\text{Chi}_{15}\text{FG}_{65}\text{Gly}_{20}$ (β) και $\text{Chi}_{15}\text{FG}_{50}\text{Gly}_{35}$ (γ) ύστερα από παραμονή σε νερό.

Στο σχήμα 6.18.α παρατηρείται ανεξέλεγκτη διόγκωση και συρρίκνωση με ρηγματώσεις της υδροπηκτής $\text{Chi}_{20}\text{FG}_{80}$ που δεν περιέχει γλυκερόλη, υπερδιόγκωση και θρυμματοποίηση της υδροπηκτής $\text{Chi}_{15}\text{FG}_{65}\text{Gly}_{20}$ (σχήμα 6.18.β) και διόγκωση με διατήρηση του σχήματος, της υδροπηκτής $\text{Chi}_{15}\text{FG}_{50}\text{Gly}_{35}$ (σχήμα 6.18.γ).

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 7. ΑΝΑΠΤΥΞΗ ΚΑΙ ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΜΟΣ ΧΙΤΟΖΑΝΗΣ (Chi) - ΖΕΛΑΤΙΝΗΣ ΙΧΘΥΩΝ (FG) - ΓΛΥΚΕΡΟΛΗΣ (Gly) ΥΣΤΕΡΑ ΑΠΟ ΘΕΡΜΙΚΗ ΚΑΤΕΡΓΑΣΙΑ (TH)

7.1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Στο παρόν κεφάλαιο μελετήθηκε η επίδραση της θερμικής κατεργασίας στις ιδιότητες της υδροπηκτής χιτοζάνης/ζελατίνης /γλυκερόλης, αντικείμενο που ελάχιστα αναφέρεται στη διεθνή βιβλιογραφία. Το πλεονέκτημα αυτής της μεθόδου είναι η βελτίωση του ρυθμού αποδόμησης και των μηχανικών ιδιοτήτων του τελικού υλικού χωρίς την προσθήκη διασταυρωτή (π.χ. γλουταραλδεϋδη), αποφεύγοντας τυχόν προβλήματα κυτταροτοξικότητας που οδηγούν σε περιορισμό του εύρους εφαρμογών του λαμβανόμενου υλικού [150].

Το 1995, ο Weadock και οι συνεργάτες του αναφέρουν τη φυσική δημιουργία σταυροδεσμών με χρήση υπεριώδους ακτινοβολίας και θερμικής κατεργασίας σε ίνες κολλαγόνου. Οι μέθοδοι αυτές, οδηγούν σε μερικό κατακερματισμό των α-ελικών του μορίου του κολλαγόνου και σκοπός της μελέτης του Weadock ήταν να μελετηθεί αν ο κατακερματισμός επηρεάζει τη βιοσυμβατότητα [295]. Το 2007, στην ερευνητική εργασία του Pulieri et al., αναφέρεται η σύνθεση υλικών αποτελούμενων από χιτοζάνη και ζελατίνη για βιοϊατρικές εφαρμογές. Αφού παραλήφθηκαν τα υλικά στην συνέχεια ακολούθησε θερμική κατεργασία στους 130 °C για 5 ώρες [99]. Στην ερευνητική εργασία του Haugh et al., το 2008, μελετήθηκε η επίδραση της θερμικής κατεργασίας σε υλικά αποτελούμενα από κολλαγόνο και γλυκοζαμινογλυκάνες αποδεικνύοντας ότι η θερμοκρασία της κατεργασίας επηρεάζει σημαντικά τις μηχανικές ιδιότητες και την μετουσίωση. Μάλιστα, τα αποτελέσματα υποδεικνύουν συσχέτιση της αύξησης του μέτρου ελαστικότητας και του βαθμού μετουσίωσης [174]. Στην ερευνητική εργασία του Xu et al., αναφέρεται η ανάπτυξη συστημάτων χιτοζάνης/ζελατίνης μέσω της μεθόδου της ηλεκτροστατικής ινοποίησης. Αφού συντέθηκαν τα υλικά ακολούθησε θερμική κατεργασία στους 100 °C για 30 λεπτά [296]. Τέλος, το 2020, στην ερευνητική εργασία του Chen et al., μελετήθηκε η επίδραση της θερμικής κατεργασίας στις δομικές και μηχανικές ιδιότητες μεμβράνης κολλαγόνου ενώ μελετήθηκε και η μετουσίωση μέσω FT-IR και άλλων τεχνικών [169].

Στην παρούσα διατριβή, εξετάστηκε για πρώτη φορά η επίδραση της θερμικής κατεργασίας σε σύστημα χιτοζάνης/ζελατίνης ιχθύων/γλυκερόλης. Το 2013, στην ερευνητική εργασία του Hosseini et al. [226] αναφέρεται θερμική κατεργασία των υλικών τους στους 105 °C για 24 ώρες, πριν πραγματοποιήσουν μελέτες διαλυτότητας σε νερό, ακολουθώντας το πρωτόκολλο του Gontard [297]. Επίσης για πρώτη φορά θα περιγραφεί ο ρόλος του νερού ως πλαστικοποιητής, κάτι που δεν έχει αναφερθεί στην βιβλιογραφία για το συγκεκριμένο σύστημα. Το υλικό αυτό σε αντίθεση με αυτό που περιγράφηκε στην ερευνητική εργασία των Pulieri et al. [99], δεν είναι ψαθυρό και προσαρμόζεται εύκολα στο τραύμα, κάτι που το καθιστά ικανό υποψήφιο για χρήση στον τομέα της επούλωσης [49]. Άλλο ένα πλεονέκτημα που διαθέτει, είναι ότι μπορεί να χρησιμοποιηθεί αρκετές φορές σε σχέση με τα υλικά που περιγράφηκαν στο κεφάλαιο 7 λόγω του χαμηλού ρυθμού αποδόμησης που εμφανίζει. Τέλος, πραγματοποιήθηκε συγκριτική μελέτη μεταξύ των ιδιοτήτων του υλικού πριν ($\text{Chi}_{15}\text{FG}_{50}\text{Gly}_{35}$) και μετά ($\text{Chi}_{15}\text{FG}_{50}\text{Gly}_{35}$ (TH)) τη θερμική κατεργασία.

7.2. ΣΥΝΘΕΣΗ ΥΔΡΟΠΗΚΤΗΣ $\text{Chi}_{15}\text{FG}_{50}\text{Gly}_{35}$ (TH)

Για την εφαρμογή της θερμικής κατεργασίας επιλέχθηκε η υδροπηκτική $\text{Chi}_{15}\text{FG}_{50}\text{Gly}_{35}$ καθώς επέδειξε ικανοποιητικό βαθμό διόγκωσης και ρυθμό αποδόμησης αλλά και καλύτερη ικανότητα κυτταρικής προσκόλλησης. Επίσης από τη συγκεκριμένη ομάδα υλικών διέθετε το υψηλότερο μέτρο αποθήκευσης (βλέπε σχήμα 6.9.δ).

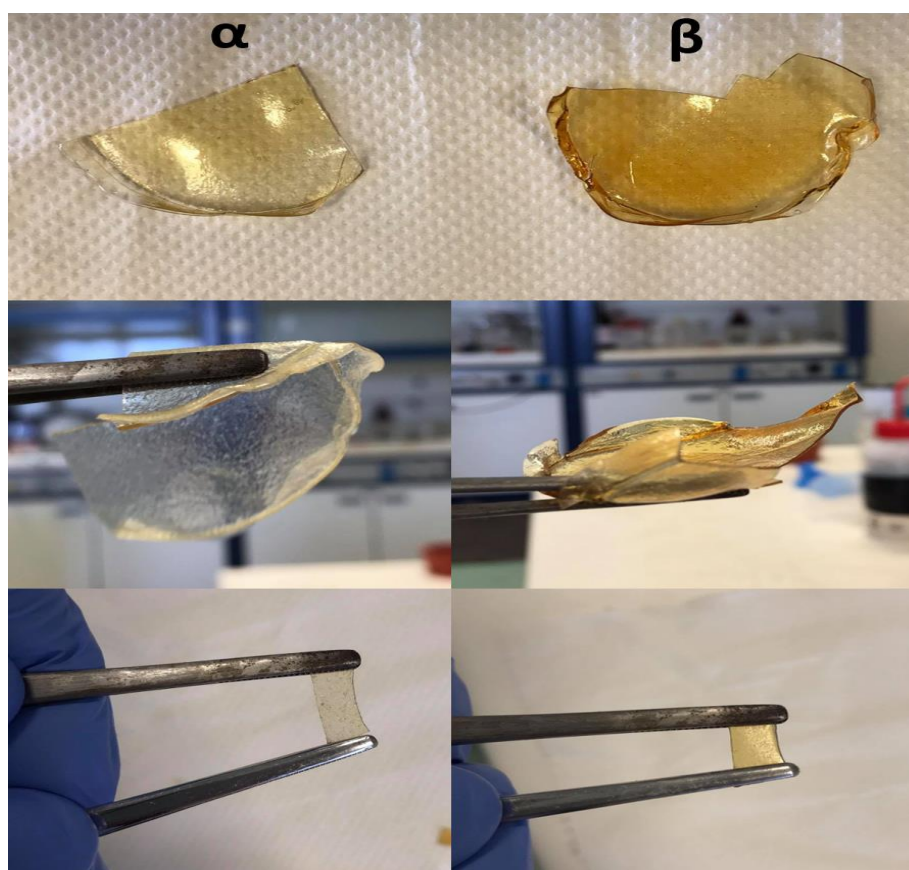
7.2.1. Αντιδραστήρια

Τα αντιδραστήρια που χρησιμοποιήθηκαν έχουν αναφερθεί στο υποκεφάλαιο 6.2.1.

7.2.2. Περιγραφή της συνθετικής διαδικασίας

Η πειραματική πορεία που ακολουθήθηκε για τη σύνθεση της υδροπηκτικής $\text{Chi}_{15}\text{FG}_{50}\text{Gly}_{35}$ (TH) περιγράφηκε στο κεφάλαιο 6. Αφού παραλήφθηκε, ακολούθησε θερμική κατεργασία σε φούρνο κενού για πέντε ώρες, στους 90 °C. Η θερμοκρασία

αυτή επιλέχτηκε ώστε να αποφευχθεί το υψηλό ποσοστό μετουσίωσης [169,174] της ζελατίνης ιχθύων, που είναι πιθανό να οδηγήσει σε δραστική μείωση της προσκόλλησης των κυττάρων. Επιπρόσθετα επιλέχτηκε σχετικά χαμηλή θερμοκρασία λόγω απελευθέρωσης τοξικών ενώσεων (που θα μπορούσαν να οδηγήσουν σε προβλήματα κυτταροτοξικότητας) που παρατηρείται κατά την έκθεση της γλυκερόλης σε υψηλές θερμοκρασίες. Στην ερευνητική εργασία του Qadariyah et al. [298], ύστερα από έκθεση της γλυκερόλης στους 200 °C ξεκινά να εκλύεται ακεταλδεΐδη, ενώ αυξάνεται η έκλυση όσο αυξάνεται ο χρόνος της αντίδρασης. Η ίδια συμπεριφορά παρατηρήθηκε και ως προς την έκλυση ακρολεΐνης στο θερμοκρασιακό εύρος από 200 έως 250 °C. Ξεπερνώντας μάλιστα αυτές τις θερμοκρασίες, η απελευθέρωση των δύο ενώσεων αυξήθηκε πολύ.



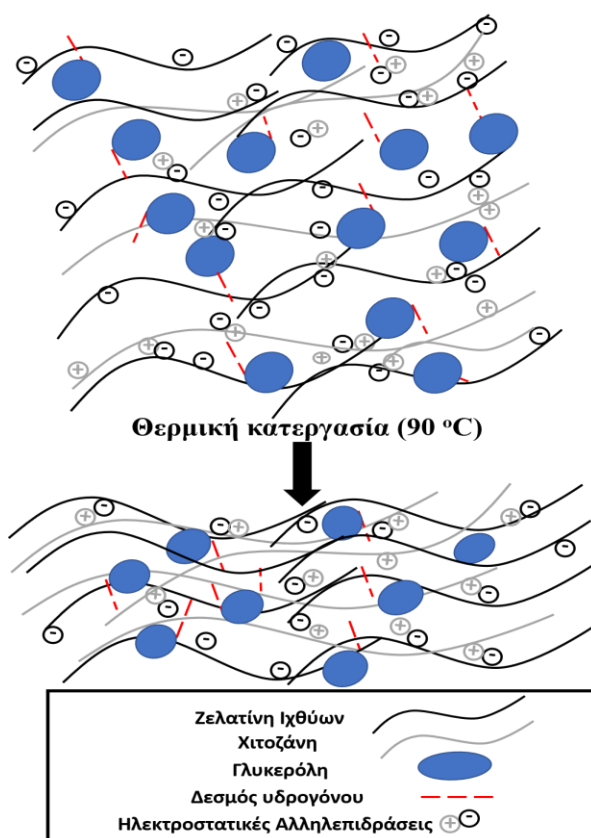
Σχήμα 7.1. Υδροπηκτική Chi₁₅FG₅₀Gly₃₅ (α) και Chi₁₅FG₅₀Gly₃₅ (TH) (β).

Η επιλογή λοιπόν των 90 °C για την πραγματοποίηση της κατεργασίας έγινε ώστε να μην επηρεαστεί η κυτταρική προσκόλληση, η διεργασία να είναι ασφαλής και

εύκολα εφαρμόσιμη ενώ ταυτόχρονα να μην δαπανάται χρόνος και ενέργεια. Όλα τα παραπάνω συνιστούν στη λήψη ενός υλικού με βελτιωμένες ιδιότητες σε σχέση με το αρχικό.

7.2.3. Μηχανισμός σχηματισμού υδροπηκτής

Ο μηχανισμός σχηματισμού του αρχικού υλικού έχει περιγραφεί στο κεφάλαιο 6. Κατά τη θερμική κατεργασία, απομακρύνεται το νερό, οι αλυσίδες χαλαρώνουν και κινούνται διευκολύνοντας τη σύζευξη. Η διαδικασία αυτή ενισχύει την έλξη των αντίθετα φορτισμένων φυσικών πολυμερών. Πιθανότατα μέσω της θερμικής κατεργασίας, παρέχεται η απαιτούμενη ενέργεια, αναδιαμορφώνεται το σύστημα και πακετάρονται καλύτερα οι μακρομοριακές αλυσίδες μέσω ενίσχυσης των ηλεκτροστατικών αλληλεπιδράσεων και μετασχηματισμού των δεσμών υδρογόνου.



Σχήμα 7.2. Σχηματική απεικόνιση του μηχανισμού σχηματισμού της υδροπηκτής Chi₁₅FG₅₀Gly₃₅ (TH).

7.3. ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΜΟΣ ΥΔΡΟΠΗΚΤΗΣ ΧΙΤΟΖΑΝΗΣ (Chi) - ΖΕΛΑΤΙΝΗΣ ΙΧΘΥΩΝ (FG) - ΓΛΥΚΕΡΟΛΗΣ (Gly) ΥΣΤΕΡΑ ΑΠΟ ΘΕΡΜΙΚΗ ΚΑΤΕΡΓΑΣΙΑ (TH)

7.3.1. Φασματοσκοπία FT-IR

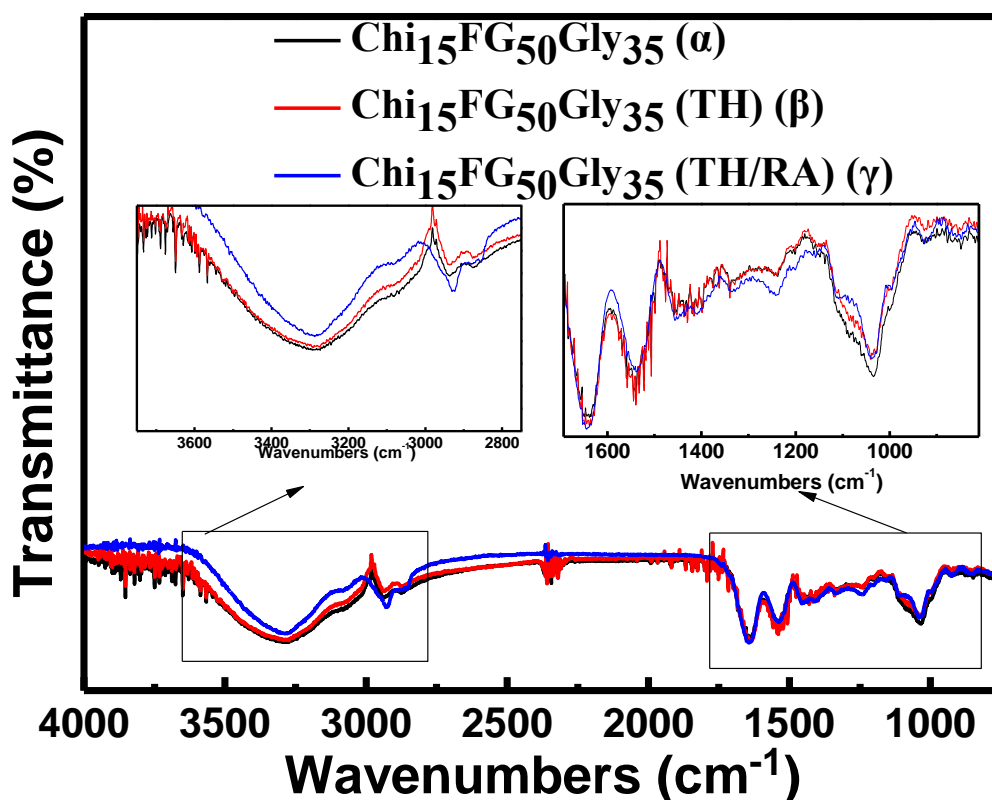
7.3.1.1. Πειραματική διαδικασία

Η διαδικασία είναι αντίστοιχη με αυτή που περιγράφηκε στο υποκεφάλαιο 5.3.1.1. Η μόνη διαφορά είναι ότι το υλικό Chi₁₅FG₅₀Gly₃₅ (TH/RA) (σχήμα 7.3.γ) μετρήθηκε αμέσως αφότου βγήκε από το φούρνο.

7.3.1.2. Αποτελέσματα και συζήτηση

Το διάγραμμα (α) έχει περιγραφεί σε προηγούμενο κεφάλαιο. Η κορυφή στην περιοχή κυματάρθμων από 3500 cm⁻¹ έως 3200 cm⁻¹, αποδίδεται σε δονήσεις έκτασης των υδροξυλομάδων (-OH) και των αμινομάδων (-NH) αλλά οι κορυφές επικαλύπτονται [235]. Παρατηρώντας το διάγραμμα (β) φαίνεται ότι η ένταση της κορυφής έχει μειωθεί ελάχιστα σε σχέση με το διάγραμμα (α), διότι το υλικό μετρήθηκε αρκετές μέρες μετά την θερμική κατεργασία οπότε απορρόφησε ξανά υγρασία. Στο διάγραμμα (γ) παρατηρήθηκε έντονη μείωση της έντασης της ευρείας κορυφής μεταξύ 3500 cm⁻¹ έως 3200 cm⁻¹. Αυτό είναι απόλυτα φυσιολογικό διότι το διάγραμμα (γ) αναφέρεται στο υλικό που μετρήθηκε αμέσως μετά την θερμική κατεργασία, οπότε η υγρασία έχει απομακρυνθεί. Μεταξύ των 1700 cm⁻¹ και των 1200 cm⁻¹ δεν παρατηρήθηκε εμφάνιση κάποιας νέας κορυφής. Στην κορυφή που αναφέρεται στο αμίδιο I στους 1636 cm⁻¹, δεν παρουσιάστηκε μείωση στην ένταση. Το φαινόμενο αυτό υποδεικνύει ότι πιθανότατα δεν έλαβε χώρα μετουσίωση της πρωτεΐνης ύστερα από τη θερμική κατεργασία [169]. Η κορυφή του αμιδίου III στο διάγραμμα (γ), αποδίδεται πιθανότατα στις ηλεκτροστατικές αλληλεπιδράσεις μεταξύ των αμινομάδων της χιτοζάνης κυρίως με της καρβοξυλομάδες της ζελατίνης [203], ενώ η παρατηρούμενη αύξηση της έντασης της κορυφής της είναι πιθανό να αποδίδεται σε ενίσχυση των αλληλεπιδράσεων αυτών. Στην ελάχιστη βιβλιογραφία πάνω στο αντικείμενο υπάρχει

διχογνωμία. Στην ερευνητική εργασία του Xu et al. [296], αναφέρεται η αύξηση της έντασης της κορυφής που αναφέρεται στο αμίδιο II αποδίδοντας το φαινόμενο σε ενίσχυση των αλληλεπιδράσεων μεταξύ των αμινομάδων της χιτοζάνης και των καρβοξυλομάδων της ζελατίνης, ενώ στην ερευνητική εργασία του Chen et al. [169] παρατηρείται μείωση της έντασης της κορυφής που αντιστοιχεί στο αμίδιο I, αποδίδοντας το φαινόμενο σε μετουσίωση του κολλαγόνου. Βέβαια στην ερευνητική εργασία του Chen et al. γίνεται αναφορά σε φιλμ κολλαγόνου ενώ στην ερευνητική εργασία του Xu et al. σε ικρίωματα ινών χιτοζάνης/ζελατίνης, οπότε δεν μπορούν τα αποτελέσματα να είναι απόλυτα συγκρίσιμα [169,296]. Η κορυφή στο 1031 cm^{-1} , αποδίδεται σε δονήσεις έκτασης των ομάδων C-O [57,234] και είναι χαρακτηριστική για την γλυκερόλη. Παρατηρείται μείωση της έντασης αυτής της κορυφής ύστερα από τη θερμική κατεργασία που οφείλεται είτε σε απομάκρυνση μέρους της γλυκερόλης κατά την θερμική κατεργασία είτε εμπλοκή της προς σχηματισμό δεσμών υδρογόνου.



Σχήμα 7.3. Συγκεντρωτικά φάσματα FT-IR των υδροπηκτών Chi₁₅FG₅₀Gly₃₅ (α), Chi₁₅FG₅₀Gly₃₅ (TH) (β) και Chi₁₅FG₅₀Gly₃₅ (TH/RA) (γ).

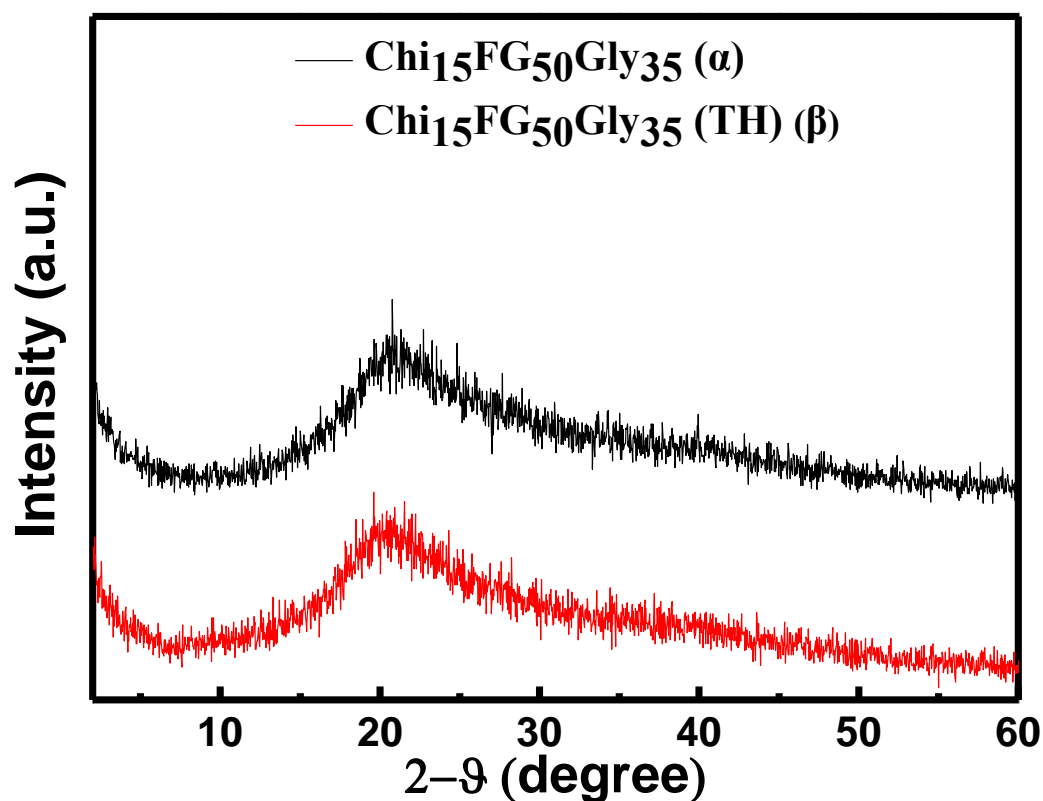
7.3.2. Περίθλαση Ακτίνων-X (XRD)

7.3.2.1. Πειραματική διαδικασία

Η διαδικασία έχει περιγραφεί στο υποκεφάλαιο 5.3.2.1.

7.3.2.2. Αποτελέσματα και συζήτηση

Στο Σχήμα 7.4 παρατίθενται τα αποτελέσματα από την περίθλαση ακτίνων-X. Το διάγραμμα (α) έχει περιγραφεί σε προηγούμενο κεφάλαιο, ενώ στο διάγραμμα (β) δεν παρατηρείται κάποια διαφορά. Οι ευρείες κορυφές που εμφανίζονται περίπου στις $2\theta=21^\circ$ αποδίδονται στην άμορφη δομή του υλικού.



Σχήμα 7.4. Αποτελέσματα περίθλασης ακτίνων-X των υδροπηκτών Chi₁₅FG₅₀Gly₃₅ (α) και Chi₁₅FG₅₀Gly₃₅ (TH) (β).

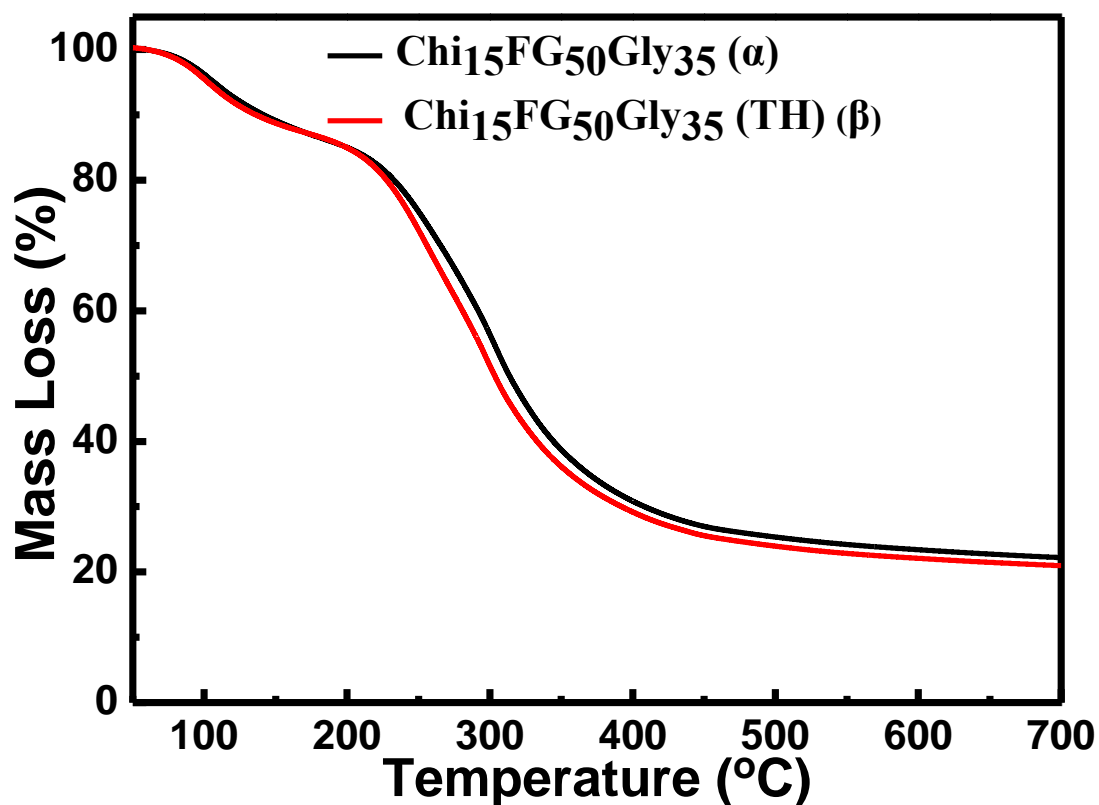
7.3.3. Θερμική Σταθμική Ανάλυση (TGA)

7.3.3.1. Πειραματική διαδικασία

Η διαδικασία έχει περιγραφεί σε προηγούμενο υποκεφάλαιο 5.3.3.1.

7.3.3.2. Αποτελέσματα και συζήτηση

Στο διάγραμμα, παρουσιάζονται τα γραφήματα από τις μετρήσεις θερμικής σταθμικής ανάλυσης που αναφέρονται στη υδροπηκτική Chi₁₅FG₅₀Gly₃₅, πριν και μετά την θερμική κατεργασία. Φαίνεται ότι η θερμική κατεργασία δεν επηρέασε τις ιδιότητες του υλικού.



Σχήμα 7.5. Αποτελέσματα θερμικής ανάλυσης των υδροπηκτών Chi₁₅FG₅₀Gly₃₅ (α) και Chi₁₅FG₅₀Gly₃₅ (TH) (β).

7.3.4. Δυναμική Μηχανική Ανάλυση (DMA)

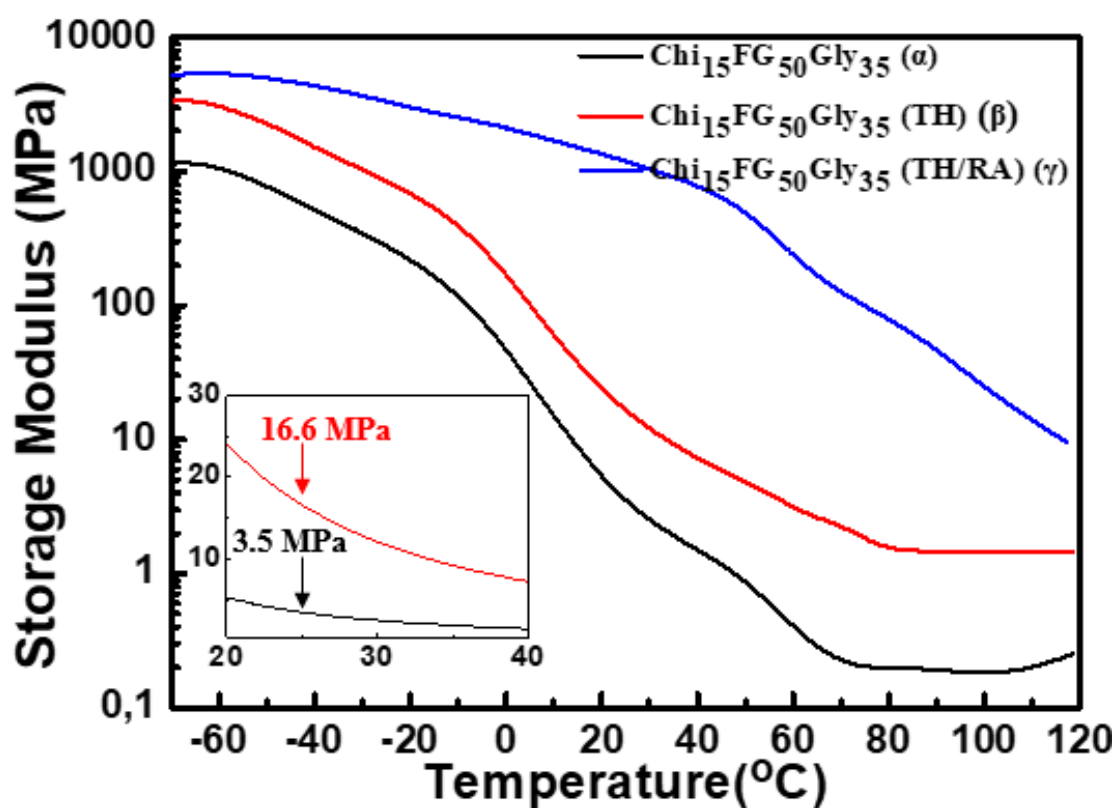
7.3.4.1. Πειραματική διαδικασία

Η πειραματική διαδικασία είναι αντίστοιχη με αυτή που περιγράφηκε στο υποκεφάλαιο 5.3.4.1. Η διαφορά είναι ότι το υλικό Chi₁₅FG₅₀Gly₃₅ (TH/RA) μετρήθηκε αμέσως αφότου βγήκε από το φούρνο.

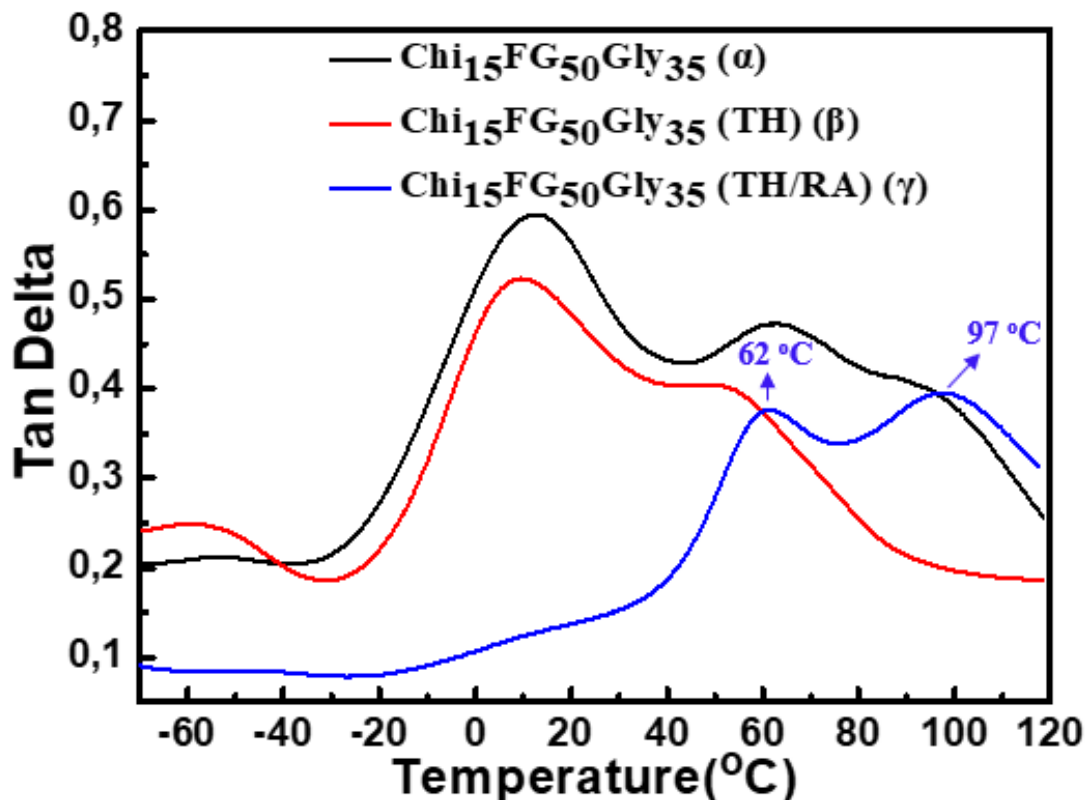
7.3.4.2. Αποτελέσματα και συζήτηση

Στο σχήμα 7.6 παρατίθενται τα αποτελέσματα που προέκυψαν από τις μετρήσεις DMA (μέτρο αποθήκευσης) για το ίδιο υλικό πριν από την θερμική κατεργασία Chi₁₅FG₅₀Gly₃₅ (7.6.α), ύστερα από θερμική κατεργασία και παραμονή σε συνθήκες δωματίου για 7 ημέρες Chi₁₅FG₅₀Gly₃₅ (TH) (7.6.β) και αμέσως μετά την θερμική κατεργασία Chi₁₅FG₅₀Gly₃₅ (TH/RA) (7.6.γ). Από τα διαγράμματα (α), (β) και (γ) του μέτρου αποθήκευσης συναρτήσει της θερμοκρασίας παρατηρείται ότι το μέτρο αποθήκευσης αυξήθηκε ύστερα από την θερμική κατεργασία. Στους 25 °C, το μέτρο αποθήκευσης του υλικού πριν την θερμική κατεργασία (α) είναι 3.5 MPa, ενώ το μέτρο αποθήκευσης του υλικού ύστερα από τη θερμική κατεργασία και παραμονή σε συνθήκες δωματίου για μια βδομάδα (β) υπολογίστηκε σε 16.6 MPa, δηλαδή αυξήθηκε κατά 5 φορές. Το μέτρο αποθήκευσης του υλικού που μετρήθηκε αμέσως μετά την θερμική κατεργασία (γ), είναι 1186 MPa. Το διάγραμμα 7.7.γ αναφέρεται στον παράγοντα απώλειας του υλικού Chi₁₅FG₅₀Gly₃₅ (TH/RA) που μετρήθηκε απευθείας μετά την θερμική κατεργασία και οι T_g του συστήματος αυτού εμφανίζονται στους ~62 και στους ~97 °C. Από το διάγραμμα του παράγοντα απώλειας του υλικού Chi₁₅FG₅₀Gly₃₅, διαπιστώνεται ότι οι T_g του υλικού πριν τη θερμική κατεργασία (7.7.α), εμφανίζονται στους ~12 °C και στους ~62 °C. Η μετατόπιση των T_g σε χαμηλότερες θερμοκρασίες πιθανότατα οφείλεται στον ρόλο που διαδραματίζει το νερό ως πλαστικοποιητής. Σύμφωνα με τον Matveev [299], η T_g των βιοπολυμερών αυξάνεται με την αύξηση της ακαμψίας των αλυσίδων και την ένταση των διαμοριακών και ενδομοριακών αλληλεπιδράσεων, συμπεριλαμβανομένης και της παρεμπόδισης της εσωτερικής περιστροφής κατά μήκος της μακρομοριακής αλυσίδας. Το φαινόμενο της πλαστικοποίησης οδηγεί σε μείωση του μέτρου ελαστικότητας. Η παρουσία του

νερού, οδηγεί σε μείωση της θερμοκρασίας υαλώδους μετάπτωσης λόγω εξασθένησης των διαμοριακών και ενδομοριακών δυνάμεων. Οι βασικές ιδιότητες που προσδίδουν στο νερό την ιδιότητα να δρα ως πλαστικοποιητής, είναι η ιδιότητα/ικανότητα σχηματισμού ισχυρών αλληλεπιδράσεων με άλλα μόρια μέσω σχηματισμού δεσμών υδρογόνου. Για παράδειγμα τα μόρια νερού μπορούν να σχηματίζουν δεσμούς υδρογόνου με πολλές υδρόφιλες ομάδες βιοπολυμερών, όπως $-NH_2$, $-OH$, $-COOH$, $-COO^-$. Η ιδιότητα του νερού να δρα ως πλαστικοποιητής, είναι πιθανό να βασίζεται στην εξασθένηση των ενδομοριακών και διαμοριακών δεσμών υδρογόνου και δυνάμεων διπόλου-διπόλου [281,299,300].



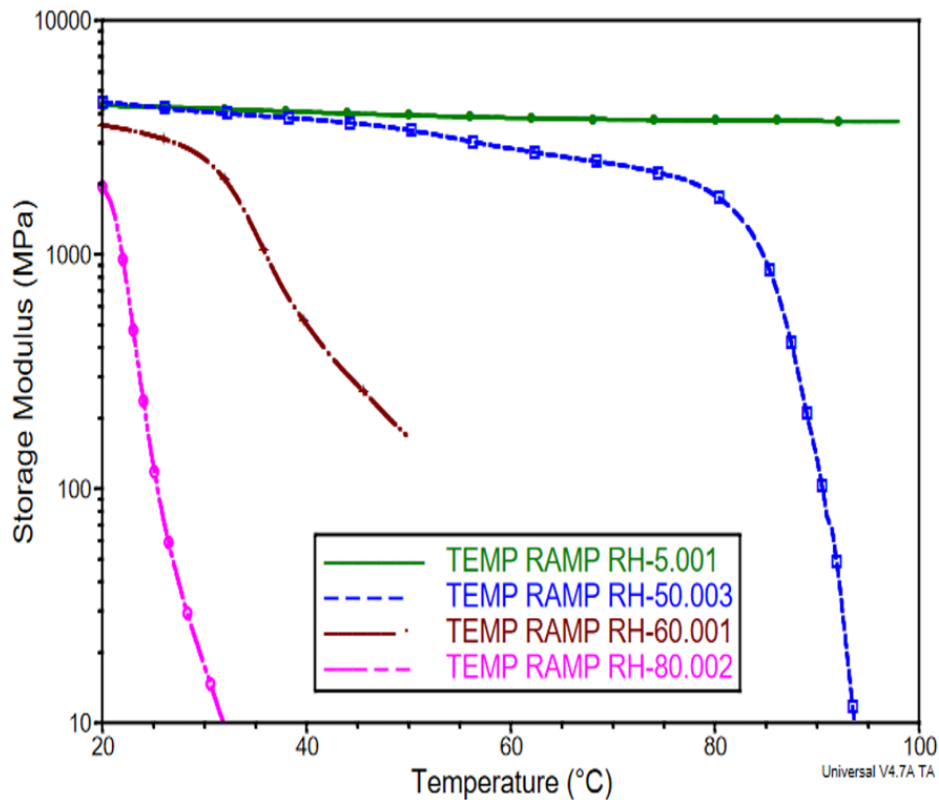
Σχήμα 7.6. Αποτελέσματα δυναμικής μηχανικής ανάλυσης-μέτρο αποθήκευσης των υδροπηκτών Chi₁₅FG₅₀Gly₃₅ (α), Chi₁₅FG₅₀Gly₃₅ (TH) (β) και Chi₁₅FG₅₀Gly₃₅ (TH/RA) (γ).



Σχήμα 7.7. Αποτελέσματα δυναμικής μηχανικής ανάλυσης-παράγοντας απώλειας των υδροπηκτών Chi₁₅FG₅₀Gly₃₅ (α), Chi₁₅FG₅₀Gly₃₅ (TH) (β) και Chi₁₅FG₅₀Gly₃₅ (TH/RA) (γ).

Το φαινόμενο αυτό, θα μπορούσε να περιγραφεί αναλυτικότερα, αν το πείραμα πραγματοποιούνταν υπό ελεγχόμενες συνθήκες υγρασίας, όπου με την αύξηση του ποσοστού υγρασίας, θα αναμένονταν μείωση της T_g . Αναμένεται λοιπόν ότι όσο θα μειώνεται το ποσοστό της υγρασίας θα αυξάνεται το μέτρο αποθήκευσης και η T_g . Στο σχήμα 7.8 απεικονίζονται αποτελέσματα όπως δημοσιεύθηκαν από την TA Instruments [301], όπου μελετήθηκε η επίδραση του ποσοστού υγρασίας σε υλικό ζελατίνης.

Αποδείχθηκε ότι όσο αυξάνεται το ποσοστό υγρασίας μειώνεται το μέτρο αποθήκευσης του υλικού. Δεν έχουν αναφερθεί άλλες έρευνες στη διεθνή βιβλιογραφία πάνω στο συγκεκριμένο αντικείμενο και είναι η πρώτη φορά που μελετάται τόσο η επίδραση της υγρασίας αλλά και της θερμικής κατεργασίας σε συστήματα χιτοζάνης-ζελατίνης ιχθύων-γλυκερόλης.



Σχήμα 7.8. Αποτελέσματα όπως ελήφθησαν από την TA Instruments [301] όπου απεικονίζεται η επίδραση της υγρασίας στο μέτρο αποθήκευσης μεμβράνης ζελατίνης.

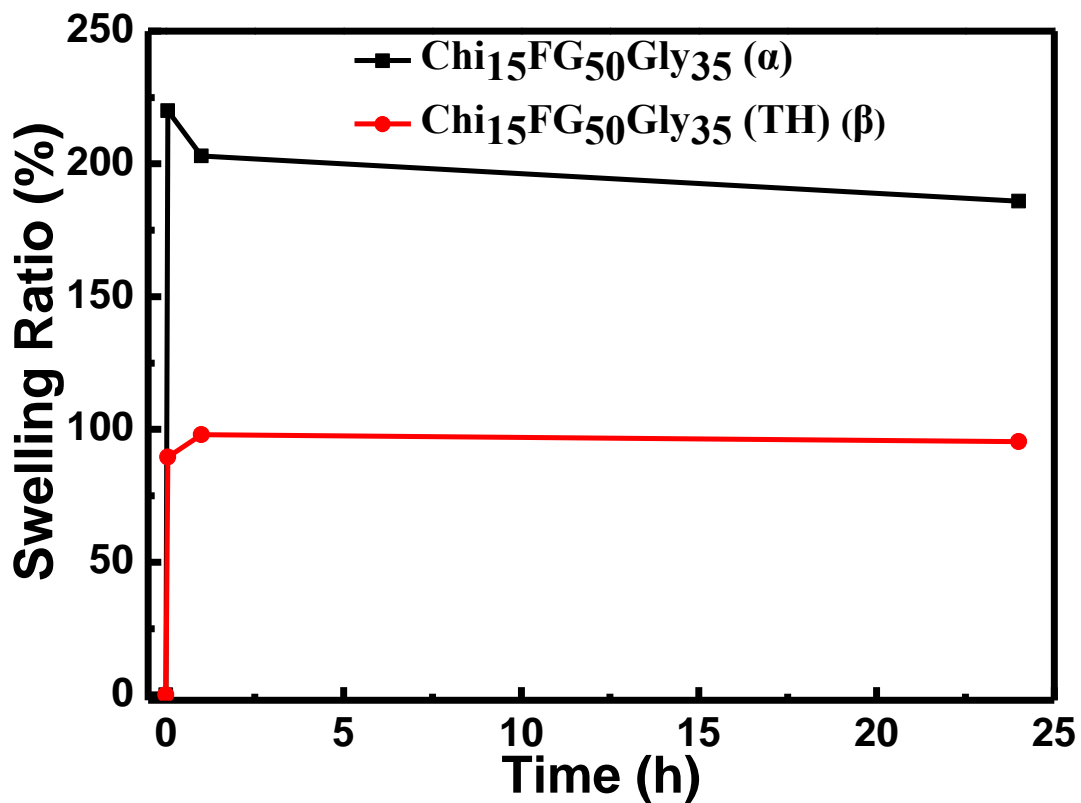
7.3.5. Μελέτη απορρόφησης νερού

7.3.5.1. Πειραματική διαδικασία

Η διαδικασία έχει περιγραφεί στο υποκεφάλαιο 6.3.6.1.

7.3.5.2. Αποτελέσματα και συζήτηση

Στο Σχήμα 7.9 παρουσιάζονται τα αποτελέσματα που προέκυψαν από τη μελέτη απορρόφησης νερού του υλικού πριν (α) και μετά (β) την θερμική κατεργασία. Τα αποτελέσματα επιβεβαιώνουν ότι η θερμική κατεργασία οδήγησε σε αναδιαμόρφωση του συστήματος και καλύτερο πακετάρισμα των μακρομοριακών αλυσίδων. Αυτό είχε ως αποτέλεσμα να μειωθεί η ικανότητα απορρόφησης νερού.



Σχήμα 7.9. Αποτελέσματα μελέτης απορρόφησης νερού των υδροπηκτών Chi₁₅FG₅₀Gly₃₅ (α) και Chi₁₅FG₅₀Gly₃₅ (TH) (β).

Ο βαθμός διόγκωσης για το υλικό πριν την κατεργασία υπολογίστηκε 220 % ενώ μετά την θερμική κατεργασία υπολογίστηκε σε μόλις 98 %. Σε σύστημα θερμικά κατεργασμένου υλικού χιτοζάνης/ζελατίνης, απουσία γλυκερόλης ο βαθμός διόγκωσης είναι αρκετά υψηλότερος σε σύγκριση με το μελετώμενο υλικό που δικαιολογεί και τον αυξημένο ρυθμό αποδόμησης που θα περιγραφεί παρακάτω [99] ενώ υψηλότερος βαθμός διόγκωσης (380 %) αναφέρθηκε και στην ερευνητική εργασία του Xu et al. [296].

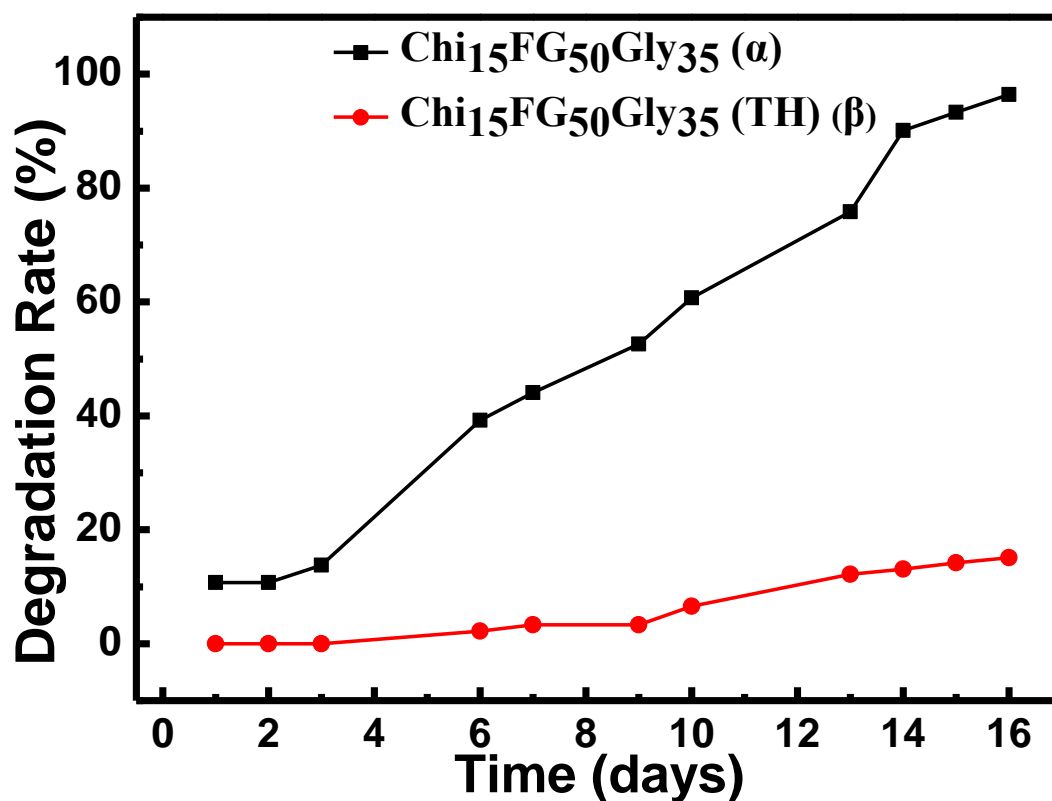
7.3.6. Μελέτη ρυθμού αποδόμησης

7.3.6.1. Πειραματική διαδικασία

Η διαδικασία έχει περιγραφεί στο υποκεφάλαιο 6.3.7.1.

7.3.6.2. Αποτελέσματα και συζήτηση

Στο σχήμα 7.10 παρουσιάζονται τα αποτελέσματα που προέκυψαν από τη μελέτη του ρυθμού αποδόμησης του υλικού πριν (α) και μετά (β) την θερμική κατεργασία.



Σχήμα 7.10. Αποτελέσματα μελέτης του ρυθμού αποδόμησης των υδροπηκτών Chi₁₅FG₅₀Gly₃₅ (α) και Chi₁₅FG₅₀Gly₃₅ (TH) (β).

Παρατηρώντας το διάγραμμα α φαίνεται ότι η αποδόμηση του υλικού έχει ήδη ξεκινήσει από την 1^η μέρα που τοποθετήθηκε στο νερό με μια απώλεια μάζας περίπου

10 % ενώ την 9^η μέρα παρατηρείται απώλεια μάζας 50 %. Την 16^η μέρα, η απώλεια μάζας υπολογίστηκε σε 96 %. Για το υλικό που υπέστη θερμική κατεργασία (β), η απώλεια μάζας είναι μηδενική τις 3 πρώτες μέρες, ενώ την τελευταία ημέρα της δοκιμής η απώλεια μάζας ήταν μόλις 15 %. Διαφαίνεται ότι μέσω της θερμικής κατεργασίας μειώθηκε κατά πολύ ο ρυθμός αποδόμησης. Δεν υπάρχει αντίστοιχη επιστημονική εργασία στη διεθνή βιβλιογραφία σε σύστημα χιτοζάνης/ζελατίνης ιχθύων/γλυκερόλης που να περιγράφει την επίδραση της θερμικής κατεργασίας στον ρυθμό αποδόμησης και τον βαθμό διόγκωσης ώστε να μπορεί να πραγματοποιηθεί σύγκριση, αλλά εξετάζοντας την επιστημονική εργασία της Pulieri [99] όπου μελετήθηκαν συστήματα χιτοζάνης/ζελατίνης πριν και μετά την θερμική κατεργασία, παρατηρήθηκε ότι η θερμική κατεργασία μείωσε τον ρυθμό αποδόμησης των εξεταζόμενων υλικών. Βέβαια παρατηρήθηκε ότι η απώλεια μάζας στις 48 ώρες ήταν 70 % (στην ίδια αναλογία χιτοζάνης/ζελατίνης, απουσία γλυκερόλης), ρυθμός αποδόμησης αρκετά υψηλότερος από αυτόν που προέκυψε στην παρούσα διατριβή. Στην ερευνητική εργασία του Xu et al. [296], μελετήθηκε μόνο ο βαθμός διόγκωσης του υλικού αλλά παρατηρώντας προσεκτικά τα αποτελέσματα, γίνεται κατανοητό ότι η αποδόμηση ξεκινά πολύ άμεσα. Στην υδροπηκτική $\text{Chi}_{15}\text{FG}_{50}\text{Gly}_{35}$ (TH), η απώλεια ήταν μηδενική τις τρεις πρώτες μέρες. Το φαινόμενο αυτό μπορεί να αποδοθεί στις αλληλεπιδράσεις της γλυκερόλης με τα δύο φυσικά πολυμερή προς τον σχηματισμό ενός πιο σταθερού υλικού όπως έχει περιγραφεί και στο κεφάλαιο 6.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 8. ΑΝΑΠΤΥΞΗ ΚΑΙ ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΜΟΣ ΥΔΡΟΠΗΚΤΩΝ ΧΙΤΟΖΑΝΗΣ (Chi) - ΖΕΛΑΤΙΝΗΣ ΙΧΘΥΩΝ (FG) - ΧΟΝΔΡΟΪΤΙΝΗΣ (ChS) - ΓΛΥΚΕΡΟΛΗΣ (Gly)

8.1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Η μηχανική των ιστών προωθεί την ανάπτυξη βιοϋλικών με παρόμοιες δομικές και λειτουργικές ιδιότητες με αυτές της φυσικής εξωκυτταρικής μήτρας (ECM) με σκοπό την αναγέννηση ιστών και αποκατάσταση των ήδη κατεστραμμένων [195,302,303]. Η χρήση συνθετικών πολυμερών είναι πιθανό σε κάποιες περιπτώσεις να οδηγήσει σε αποτυχημένη εφαρμογή του μοσχεύματος/υλικού [304,305]. Για το λόγο αυτό η χρήση είτε μόνο φυσικών πολυμερών είτε συνδυασμό αυτών έχει περισσότερες πιθανότητες να οδηγήσει σε εφαρμογή στον τομέα της αναγεννητικής ιατρικής. Στα προηγούμενα κεφάλαια περιγράφηκαν συστήματα υδροπηκτών χιτοζάνης-ζελατίνης ιχθύων και χιτοζάνης-ζελατίνης ιχθύων-γλυκερόλης. Στο παρόν κεφάλαιο θα περιγραφεί η σύνθεση και ο φυσικοχημικός χαρακτηρισμός μεμβρανών υδροπηκτών αποτελούμενων από χιτοζάνη, ζελατίνη ιχθύων, χονδροϊτίνη και γλυκερόλη.

Η θειική χονδροϊτίνη, είναι μια υδατοδιαλυτή γλυκοζαμινογλυκάνη αποτελούμενη από μια επαναλαμβανόμενη μονάδα D-γλυκουρονικού οξέος και N-ακετυλογαλακτοζαμίνης [306]. Λόγω της πολυανιονικής της φύσης, βελτιώνει την επιφανειακή προσρόφηση των πρωτεϊνών και των αυξητικών παραγόντων (εκκρινόμενα βιολογικά ενεργά μόρια που επηρεάζουν την ανάπτυξη των κυττάρων) και διαδραματίζει ζωτικό ρόλο στη ρύθμιση της λειτουργίας τους [307-309]. Τα πλεονεκτήματα που εμφανίζει η χονδροϊτίνη όπως η αντιοξειδωτική και αντιφλεγμονώδης δράση [195,307], η αντι-αποπτωτική ιδιότητα [310] και η καλή μηχανική αντοχή [311] την καθιστούν ελκυστικό υλικό για χρήση σε βιοϊατρικές εφαρμογές. Μάλιστα στην ερευνητική εργασία της Fialkova et al. [194] το 1989, αναφέρει ότι η τοπική εφαρμογή χονδροϊτίνης στην επιφάνεια πληγής αρουραίων ύστερα από επέμβαση, οδήγησε σε σημαντική μείωση του οιδήματος του ιστού που περιβάλλει το τραύμα σε σχέση με την πληγή όπου δεν χρησιμοποιήθηκε χονδροϊτίνη. Επίσης αποδείχθηκε ότι η εφαρμογή χονδροϊτίνης οδήγησε σε μείωση της υπεραιμίας και των εκκρίσεων των τραυμάτων σε σχέση με τις πληγές που δεν χρησιμοποιήθηκε

χονδροϊτίνη. Ωστόσο η χρήση χονδροϊτίνης σε εφαρμογές επούλωσης τραυμάτων είναι έως σήμερα περιορισμένη.

Το 2007 στην ερευνητική εργασία του Machado et al. [312] αναφέρεται η σύνθεση πορωδών ικριωμάτων αποτελούμενων από χιτοζάνη, ζελατίνη και χονδροϊτίνη με σκοπό την υποστήριξη και ενδυνάμωση της οστεογονικής διαφοροποίησης μεσεγχυματικών βλαστοκυττάρων. Αργότερα, στην ερευνητική εργασία της Silva et al. [313], περιγράφεται η ανάπτυξη τρισδιάστατου ικριώματος χιτοζάνης-χονδροϊτίνης με σκοπό τη χρήση του σε εφαρμογές μηχανικής ιστών χόνδρου. Τα αποτελέσματα της μελέτης έδειξαν ότι η το υλικό μπορεί να χρησιμοποιηθεί σε μερικού πάχους χονδρικές βλάβες. Στην ερευνητική εργασία του Kuo et al. [314] το 2014 αναφέρεται η σύνθεση βιομιμητικής κρυοπηκτής ζελατίνης, χονδροϊτίνης και υαλουρονικού νατρίου με σκοπό τη χρήση της σε εφαρμογές ιστομηχανικής χόνδρου αποδεικνύοντας ότι το υλικό διαθέτει συγκρίσιμες βιολογικές και μηχανικές ιδιότητες με τον χόνδρο και μπορεί να χρησιμοποιηθεί στο πεδίο της ιστομηχανικής. Το 2017, στην ερευνητική εργασία του Cahú et al. [315] αξιολογήθηκαν φίλμς με βάση τη χιτοζάνη που περιείχαν χονδροϊτίνη και ζελατίνη με και χωρίς σωματίδια οξειδίου του ψευδαργύρου, σε εφαρμογές επούλωσης πληγής. Στη συγκεκριμένη επιστημονική εργασία δεν πραγματοποιήθηκαν φυσικοχημικοί χαρακτηρισμοί των υλικών παρά μόνο εφαρμογή σε τραύματα αρουραίων Wistar, ιστολογική ανάλυση και μελέτη των αντιμικροβιακών ιδιοτήτων. Την ίδια χρονολογία στην ερευνητική εργασία του Fan et al. [316] αναφέρεται η δημιουργία ενέσιμων υδροπηκτών χιτοζάνης-θεικής χονδροϊτίνης με σκοπό να χρησιμοποιηθούν για μεταφορά φαρμάκων και πιθανόν σε άλλες εφαρμογές ιστομηχανικής. Στην ερευνητική εργασία του Pan et al. [317] δυο χρόνια μετά αναφέρεται η σύνθεση ενέσιμων υδροπηκτών χιτοζάνης-θεικής χονδροϊτίνης που περιείχε σύστημα μικροσφαιριδίων ζελατίνης/ηπαρίνης με σκοπό να χρησιμοποιηθεί σε εφαρμογές ιστομηχανικής. Το 2019 στην ερευνητική εργασία της Sharma et al. [162] αναφέρεται η ανάπτυξη και ο χαρακτηρισμός υλικού αποτελούμενου από χιτοζάνη και θεική χονδροϊτίνη με σκοπό την αποτελεσματική διαχείριση χρόνιων τραυμάτων. Τα αποτελέσματα από τη συνολική αξιολόγηση του υλικού υποδεικνύουν ότι η πιθανότητα χρήσης του ως επίθεμα πληγής είναι υψηλή. Ο Thomas [318] με τους συνεργάτες του, το 2020 δημοσίευσαν επιστημονική εργασία όπου με τη βοήθεια υπολογιστή προσπάθησαν να προβλέψουν τον ρόλο του άγαρ, της χιτοζάνης και της θεικής χονδροϊτίνης στην

επούλωση πληγών. Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι οι ενώσεις αυτές ενδυναμώνουν τη διαδικασία της επούλωσης, ενώ δεν προκαλούν βλάβες στο δέρμα. Το 2020, ο Ponsubha [195] ανέφερε τη σύνθεση πορωδών πολυμερικών υδροπηκτών αποτελούμενων από χιτοζάνη, ζελατίνη και θειική χονδροϊτίνη. Η συγκέντρωση της θειικής χονδροϊτίνης μεταβάλλονταν ενώ κατά τη σύνθεση χρησιμοποιήθηκε β-φωσφορική γλυκερόλη.

Στην παρούσα διατριβή περιγράφεται η απευθείας σύνθεση μεμβρανών υδροπηκτών και πορώδους ικρίωματος, αποτελούμενων από χιτοζάνη, ζελατίνη ιχθύων, θειική χονδροϊτίνη και γλυκερόλη. Συντέθηκαν υλικά μεταβάλλοντας τις ποσότητες της ζελατίνης ιχθύων στο σύστημα χωρίς να μεταβάλλονται οι συγκεντρώσεις των υπόλοιπων συστατικών ενώ προέκυψαν και υλικά με διαφορετική μορφολογία. Τέλος ακολούθησε φυσικοχημικός χαρακτηρισμός των υλικών.

8.2. ΣΥΝΘΕΣΗ ΤΩΝ ΥΔΡΟΠΗΚΤΩΝ

8.2.1. Αντιδραστήρια

- Χιτοζάνη (μέσου μοριακού βάρους), Sigma-Aldrich, Deacetylation Degree 75-85 %, M.B. = 190.000 Da-310.000 Da, Lot #STBH6274
- Ζελατίνη Ιχθύων (Gelatin from cold water fish skin), Sigma-Aldrich, M.B.=60.000 Da
- Θειική Χονδροϊτίνη, Acros Organics, M.B.= 463.36 g/mol
- Γλυκερόλη (USP, BP, Ph. Eur.) pure, pharma grade, AppliChem Panreac, M.B.=92.1 g/mol, d = 1.26 g/ml
- Οξικό οξύ (CH₃COOH), Honeywell, ≥99,8 %, M.B. = 60.052 g/mol, d = 1.05 g/ml
- Απεσταγμένο νερό

8.2.2. Περιγραφή της συνθετικής πορείας

Παρακάτω περιγράφεται η συνθετική πορεία της υδροπηκτικής Chi₂₀FG₂₀ChS₅Gly₅₅. Οι ποσότητες που χρησιμοποιήθηκαν για τη σύνθεση των υδροπηκτών Chi₁₇FG₃₄ChS₄Gly₄₅ και Chi₁₃FG₅₀ChS₃Gly₃₄ αναφέρονται στον πίνακα 8.1.

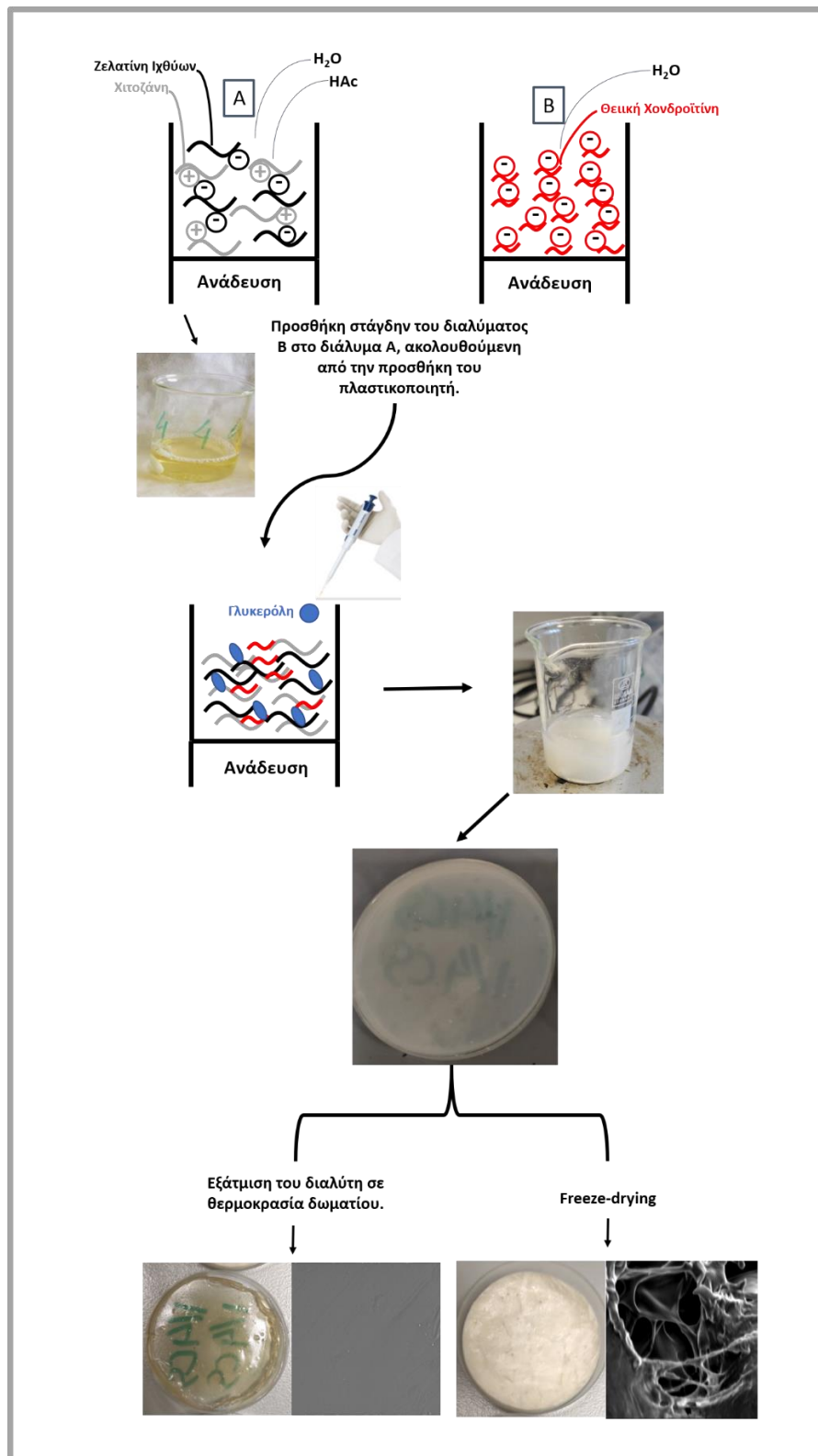
8.2.2.1. Σύνθεση της υδροπηκτικής Chi₂₀FG₂₀ChS₅Gly₅₅

Για τη σύνθεση της υδροπηκτικής Chi₂₀FG₂₀ChS₅Gly₅₅, σε ποτήρι ζέσεως (A) των 100 ml που περιέχει 19 ml απεσταγμένου νερού, προστίθεται 0.5 gr ζελατίνης ιχθύων και αφήνεται υπό ανάδευση μέχρι την πλήρη διάλυση της. Στη συνέχεια και ενώ το διάλυμα βρίσκεται υπό ανάδευση, προστίθεται 0.5 g χιτοζάνης. Κατόπιν ακολουθεί η προσθήκη οξικού οξέος 4 % (v/v) και το διάλυμα παραμένει υπό ανάδευση για 10 λεπτά. Ταυτόχρονα σε ποτήρι ζέσεως (B) των 100 ml, προστίθενται 0.125 g θειικής χονδροϊτίνης και 5 ml νερού με σκοπό την πλήρη διάλυσή της. Στη συνέχεια το διάλυμα (B) προστίθεται στάγδην στο ποτήρι (A) ενώ το διάλυμα βρίσκεται υπό ανάδευση. Κατά την προσθήκη του διαλύματος που περιέχει θειική χονδροϊτίνη στο ποτήρι (A) το διάλυμα από υποκίτρινο και διαυγές μετατρέπεται σε λευκό ημιδιαφανές. Η μετατροπή του διαλύματος από διαυγές σε ημιδιαφανές αποδίδεται πιθανότατα στον σχηματισμό πολυηλεκτρολύτη [162]. Ύστερα ακολουθεί προσθήκη 1.26 g γλυκερόλης και το διάλυμα παραμένει υπό ανάδευση για 4 ώρες ώστε να ομογενοποιηθεί. Άρα το τελικό διάλυμα περιέχει 0.5 gr (2 % w/v) ζελατίνης ιχθύων, 0.5 g (2 % w/v) χιτοζάνης, 0.125 g (0.031 % w/v) χονδροϊτίνης και 1.26 g (4% v/v) γλυκερόλης. Αφού ολοκληρώθηκε η ανάδευση το διάλυμα τοποθετείται σε λουτρό υπερήχων για 30 min σε λειτουργία απαέρωσης με σκοπό την απομάκρυνση των φυσαλίδων. Στη συνέχεια μεταφέρεται σε τρυβλία πολυστυρενίου με σκοπό την εξάτμιση του διαλύτη και την παραλαβή του τελικού υλικού.

Για τη σύνθεση του πορώδους υλικού ακολουθήθηκε ακριβώς η ίδια διαδικασία μέχρι το σημείο της μεταφοράς στο τρυβλίο. Στη συνέχεια το τρυβλίο τοποθετήθηκε για 24 ώρες στους -20 °C και ακολούθησε η διεργασία freeze drying για 48 ώρες με σκοπό την απομάκρυνση του διαλύτη και την παραλαβή του πορώδους ικρίωματος. Τέλος ακολούθησε θερμική κατεργασία του υλικού στους 90 °C για πέντε ώρες με σκοπό την μείωση του ρυθμού διαλυτότητας του υλικού όπως περιγράφηκε στο προηγούμενο κεφάλαιο.

Πίνακας 8.1. Ονομασίες υδροπηκτών και ποσότητες συστατικών που χρησιμοποιήθηκαν για την σύνθεση του κάθε υλικού.

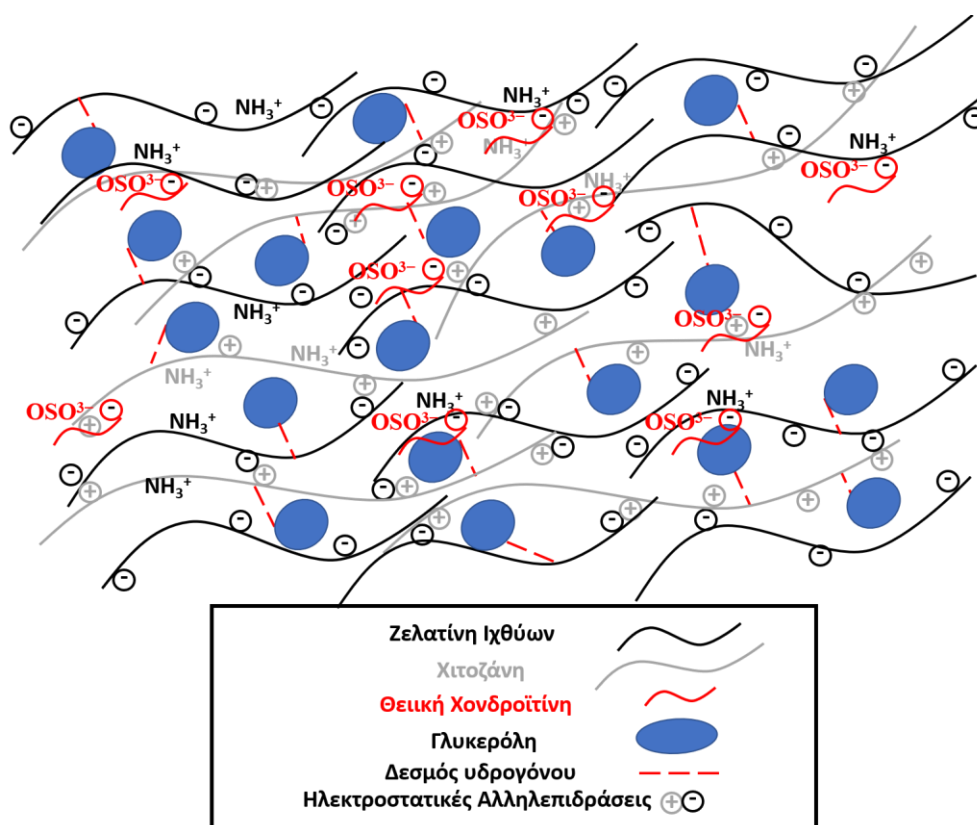
MEMBRANES ΧΙΤΟΖΑΝΗΣ/ΖΕΛΑΤΙΝΗΣ ΙΧΘΥΩΝ/ΧΟΝΔΡΟΪΤΙΝΗΣ/ΓΛΥΚΕΡΟΛΗΣ		
Chi₂₀FG₂₀ChS₅ Gly₅₅ (% wt. 20/20/5/55)	Chi₁₇FG₃₄ChS₄ Gly₄₅ (% wt. 17/34/4/45)	Chi₁₃FG₅₀ChS₃ Gly₃₄ (% wt. 13/50/3/34)
0.5 gr (2 % w/v) χιτοζάνη	0.5 gr (2 % w/v) χιτοζάνη	0.5 gr (2 % w/v) χιτοζάνη
0.5 gr (2% w/v) ζελατίνη ιχθύων	1 gr (4 % w/v) ζελατίνη ιχθύων	2 gr (8 % w/v) ζελατίνη ιχθύων
0.125 gr (0.5 % w/v) θειική χονδροϊτίνη	0.125 gr (0.5 % w/v) θειική χονδροϊτίνη	0.125 gr (0.5 % w/v) θειική χονδροϊτίνη
1.26 g (4% v/v) γλυκερόλη	1.26 g (4% v/v) γλυκερόλη	1.26 g (4% v/v) γλυκερόλη
24 ml H ₂ O	24 ml H ₂ O	24 ml H ₂ O
1 ml (4 % v/v) HAc	1 ml (4 % v/v) HAc	1 ml (4 % v/v) HAc



Σχήμα 8.1. Σχηματική περιγραφή της πειραματικής διαδικασίας και απεικόνιση των υλικών διαφορετικής μορφολογίας που προκύπτουν ύστερα από εξάτμιση του διαλύτη σε θερμοκρασία δωματίου και μετά από Freeze-drying.

8.2.2.2. Μηχανισμός σχηματισμού υδροπηκτής

Αρχικά οι C=O της ζελατίνης ιχθύων αλληλεπιδρούν με τις ομάδες N-H της χιτοζάνης οδηγώντας στον σχηματισμό δεσμών υδρογόνου. Η προσθήκη οξικού οξέος οδηγεί σε διάλυση της χιτοζάνης και πρωτονίωση των αμινομάδων της (NH_3^+) [195,319]. Επιπρόσθετα στη δομή της ζελατίνης περιέχονται δραστικές ομάδες όπως -COOH, -NH₂ και -OH όπως επίσης και στην δομή της χιτοζάνης περιέχονται -NH₂ και -OH [209]. Η προσθήκη της πολυανιονικής χονδροϊτίνης οδηγεί στην ανάπτυξη ηλεκτροστατικών αλληλεπιδράσεων με την ζελατίνη και τη χιτοζάνη. Πιο συγκεκριμένα ύστερα από την προσθήκη του οξικού οξέος οι αμινομάδες της ζελατίνης και της χιτοζάνης έχουν πρωτονιωθεί (NH_3^+) σχηματίζοντας ηλεκτροστατικές αλληλεπιδράσεις μεταξύ των καρβονυλομάδων (C=O) και των σουλφονυλίων ($-\text{OSO}_3^-$) της χονδροϊτίνης [195]. Η προσθήκη της γλυκερόλης οδηγεί σε σχηματισμό δεσμών υδρογόνου με τη χιτοζάνη και τη ζελατίνη ιχθύων, όπως έχει ήδη περιγραφεί και σε προηγούμενο κεφάλαιο [57,271,272].



Σχήμα 8.2. Σχηματική απεικόνιση του μηχανισμού σχηματισμού της υδροπηκτής Chi₂₀FG₂₀ChS₅ Gly₅₅.

8.3. ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΜΟΣ ΜΕΜΒΡΑΝΩΝ ΧΙΤΟΖΑΝΗΣ/ΖΕΛΑΤΙΝΗΣ ΙΧΘΥΩΝ/ΧΟΝΔΡΟΪΤΙΝΗΣ/ΓΛΥΚΕΡΟΛΗΣ

8.3.1. Φασματοσκοπία FT-IR

8.3.1.1. Πειραματική διαδικασία

Η διαδικασία έχει περιγραφεί στο υποκεφάλαιο 5.3.1.1.

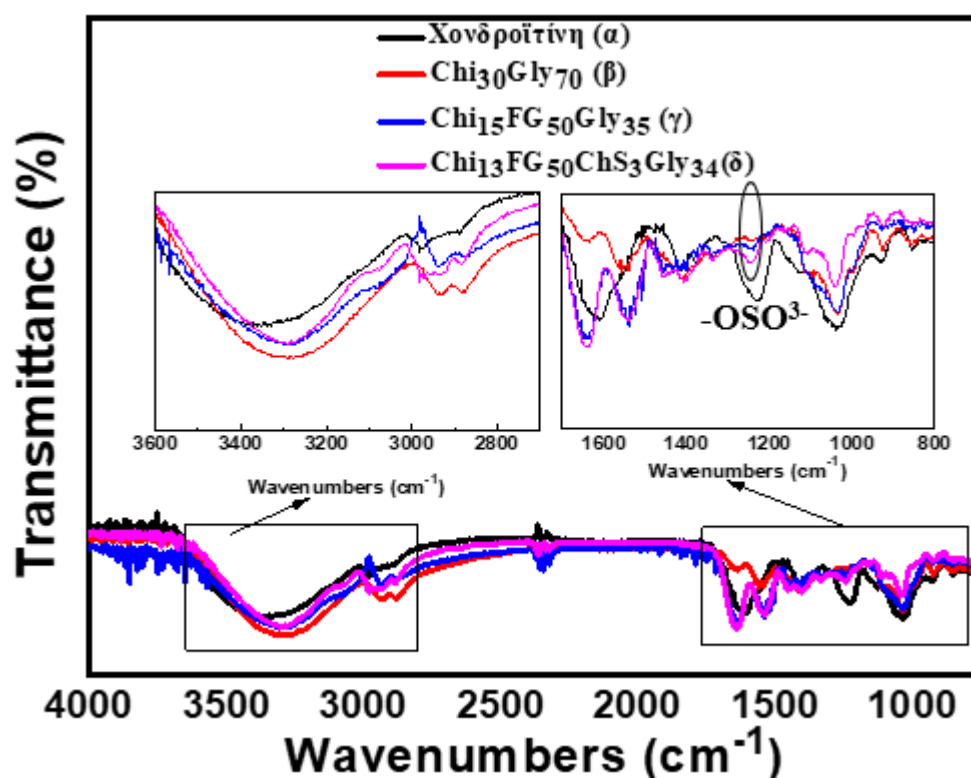
8.3.1.2. Αποτελέσματα και συζήτηση

Στο φάσμα που αναφέρεται στην χονδροϊτίνη (α), εμφανίζεται μια ευρεία κορυφή μεταξύ των 3600 cm^{-1} και 3200 cm^{-1} που αποδίδεται σε δονήσεις έκτασης των ομάδων N-H και OH [317]. Στους 1610 cm^{-1} , εμφανίζεται η κορυφή των καρβονυλικών ομάδων (C=O). Η κορυφή που εμφανίζεται στους 1228 cm^{-1} , αποδίδεται σύμφωνα με την ερευνητική εργασία της Sharma et al. [162], στην αρνητικά φορτισμένη ομάδα -OSO³⁻, της χονδροϊτίνης. Η ίδια κορυφή εμφανίζεται και στο φάσμα που αναφέρεται στη χονδροϊτίνη στην ερευνητική εργασία του Pan et al. [317] και του Fan et al. [316] χωρίς όμως να αποδίδεται σε κάποια ομάδα.

Οι κορυφές στους 1631 cm^{-1} , στους 1637 cm^{-1} και στους 1637 cm^{-1} που εμφανίζονται στα διαγράμματα (β), (γ) και (δ) αντίστοιχα, αποδίδονται σε δονήσεις έκτασης των ομάδων C=O του αμιδίου I. Οι κορυφές που εμφανίζονται στους 1553 cm^{-1} , στους 1543 cm^{-1} και στους 1543 cm^{-1} , αποδίδονται σε δονήσεις κάμψης των ομάδων N-H, του αμιδίου II, ενώ οι κορυφές που εμφανίζονται στους 1240 cm^{-1} , 1238 cm^{-1} και στους 1244 cm^{-1} υποδεικνύουν δονήσεις κάμψης των ομάδων N-H, του αμιδίου III [195].

Οι μετατοπίσεις των κορυφών στο φάσμα (γ) σε σχέση με το (β), υποδεικνύουν το σχηματισμό δεσμών υδρογόνου μεταξύ της χιτοζάνης και της ζελατίνης ιχθύων [195,320,321]. Οι μετατοπίσεις των κορυφών στο φάσμα (δ) σε σχέση με το φάσμα (β), υποδεικνύουν το σχηματισμό CONH₂ (αλληλεπιδράσεις μεταξύ της χιτοζάνης και χονδροϊτίνης). Επίσης η ένταση της κορυφής στους 1248 cm^{-1} στο φάσμα (δ) είναι αυξημένη σε σχέση με τα φάσματα (β) και (γ), το οποίο επίσης επιβεβαιώνει τις

αλληλεπιδράσεις μεταξύ της χονδροϊτίνης και της χιτοζάνης [162,195]. Επίσης οι μετατοπίσεις των κορυφών υποδεικνύουν ιοντικές αλληλεπιδράσεις μεταξύ των φυσικών πολυμερών και σχηματισμό μεμβρανών υδροπηκτών από πολυηλεκτρολύτες. Οι βασικές κορυφές που αποδίδονται στα αμίδια I, II και III, περιγράφηκαν παραπάνω. Οι κορυφές που εμφανίζονται στους 2926 cm^{-1} (β), στους 2936 cm^{-1} (γ) και στους 2934 cm^{-1} (δ), αποδίδονται σε ασύμμετρες δονήσεις έκτασης των ομάδων C-H, ενώ οι κορυφές που εμφανίζονται στους 2879 cm^{-1} (β), στους 2876 cm^{-1} (γ) και στους 2883 cm^{-1} (δ), αποδίδονται σε συμμετρικές δονήσεις έκτασης των ομάδων C-H, της χιτοζάνης. Οι κορυφές αυτές υποδηλώνουν την ύπαρξη του δακτυλίου πυρανόζης στη χιτοζάνη. Οι κορυφές που εμφανίζονται μεταξύ των 3500 cm^{-1} και των 3200 cm^{-1} αποδίδονται σε δονήσεις έκτασης των ομάδων O-H και N-H, που υποδεικνύουν τον σχηματισμό των ενδομοριακών δεσμών υδρογόνου [195].



Σχήμα 8.3. Φάσματα FT-IR των υλικών Χονδροϊτίνη (α), Chi₃₀Gly₇₀ (β), Chi₁₅FG₅₀Gly₃₅ (γ) και Chi₁₃FG₅₀ChS₃Gly₃₄ (δ).

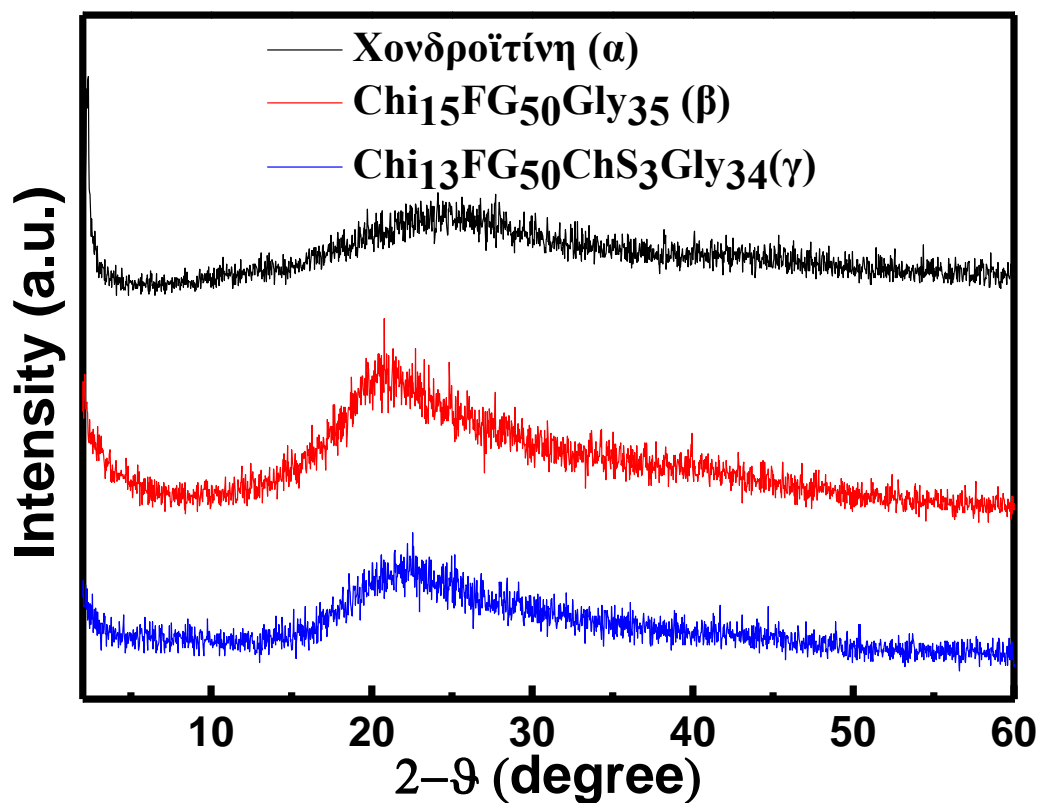
8.3.2. Περίθλαση Ακτίνων-X (XRD)

8.3.2.1. Πειραματική διαδικασία

Η διαδικασία έχει περιγραφεί στο υποκεφάλαιο 6.3.2.1.

8.3.2.2. Αποτελέσματα και συζήτηση

Στο Σχήμα 8.4 παρουσιάζονται τα αποτελέσματα της περίθλασης ακτίνων-X για τη θεική χονδροϊτίνη (α), την υδροπηκτική $\text{Chi}_{15}\text{FG}_{50}\text{Gly}_{35}$ (β) και την $\text{Chi}_{13}\text{FG}_{50}\text{ChS}_3\text{Gly}_{34}$ (γ).



Σχήμα 8.4. Αποτελέσματα περίθλασης ακτίνων-X για τη θεικής χονδροϊτίνης (α), την υδροπηκτική $\text{Chi}_{15}\text{FG}_{50}\text{Gly}_{35}$ (β) και την $\text{Chi}_{13}\text{FG}_{50}\text{ChS}_3\text{Gly}_{34}$ (γ).

Στο διάγραμμα (α) που αναφέρεται στην χονδροϊτίνη παρουσιάζεται μια ευρεία κορυφή στις $2\theta=24^\circ$ που αποδίδεται στην άμορφη φύση του πολυσακχαρίτη. Παρόμοια

αποτελέσματα έχουν αναφερθεί στην ερευνητική εργασία του Venkatesan et al. [322] και του Wang et al. [323]. Στην ερευνητική εργασία του Criado et al. [324] αναφέρεται επίσης η ευρεία κορυφή στις $2\theta=22^\circ$ ενώ στα αποτελέσματα παρουσιάζεται και ένας ώμος στις $2\theta=11.5^\circ$ που δεν επεξηγείται. Η άμορφη φύση της χονδροϊτίνης αποδίδεται στο χαμηλό κρυσταλλικό προφίλ της κύριας αλυσίδας του φυσικού πολυμερούς [322,324].

Το διάγραμμα (β) έχει περιγραφεί και σε προηγούμενο κεφάλαιο ενώ η προσθήκη της χονδροϊτίνης στο σύστημα (γ) φαίνεται ότι οδήγησε σε μετατόπιση της ευρείας κορυφής στο σύστημα από τις $2\theta=20.7^\circ$ στο διάγραμμα (β) στις $2\theta=22.5^\circ$ στο διάγραμμα (γ). Δεν υπάρχει στην βιβλιογραφία παρόμοια ερευνητική εργασία με σύστημα και των τεσσάρων συστατικών ώστε να μπορεί να πραγματοποιηθεί κάποια σύγκριση, αλλά αυτό που μπορεί να αναφερθεί με βεβαιότητα είναι ότι τόσο η άμορφη φύση των φυσικών πολυμερών που χρησιμοποιήθηκαν (ζελατίνη ιχθύων, χονδροϊτίνη) όσο και η υψηλή συγκέντρωση πλαστικοποιητή που χρησιμοποιήθηκε είναι οι λόγοι που οδήγησαν στην λήψη άμορφων υλικών [267].

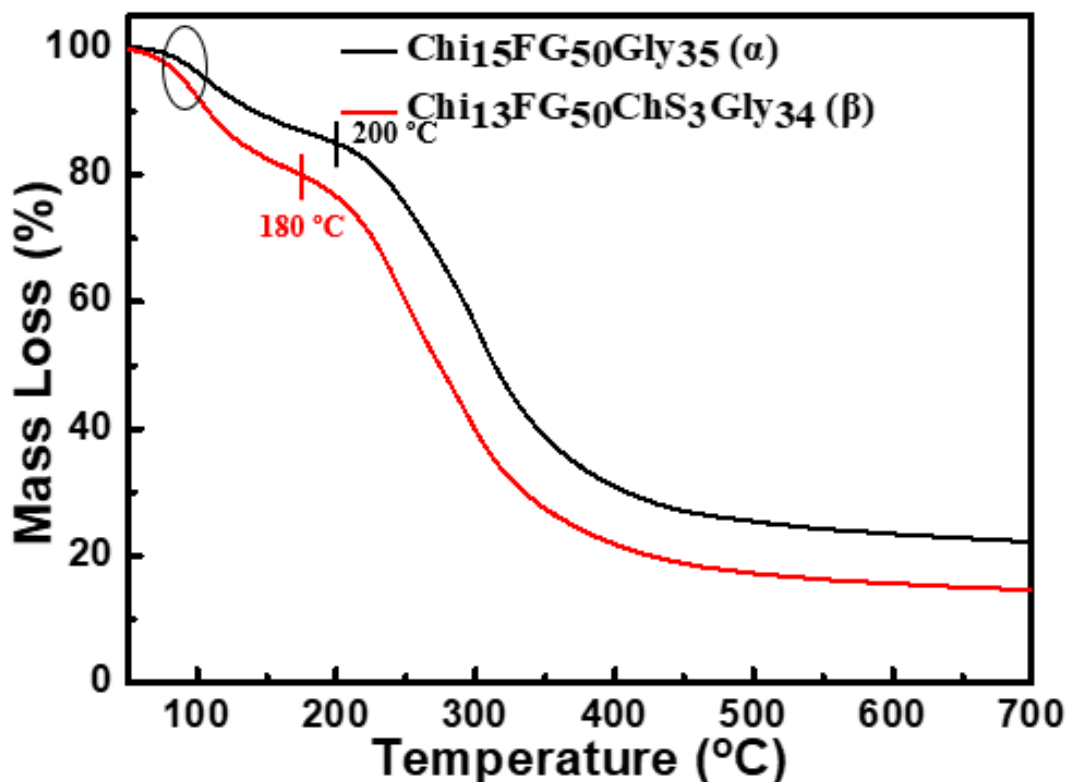
8.3.3. Θερμική Σταθμική Ανάλυση (TGA)

8.3.3.1 Πειραματική διαδικασία

Η διαδικασία που ακολουθήθηκε είναι αντίστοιχη με αυτή που αυτή που περιγράφηκε στο υποκεφάλαιο 5.3.3.1.

8.3.3.2. Αποτελέσματα και συζήτηση

Στο σχήμα 8.5 απεικονίζονται τα αποτελέσματα των μετρήσεων θερμικής ανάλυσης για τα υλικά $\text{Chi}_{15}\text{FG}_{50}\text{Gly}_{35}$ (α) και $\text{Chi}_{13}\text{FG}_{50}\text{ChS}_3\text{Gly}_{34}$ (β). Η αρχική απώλεια που παρατηρείται και στις δύο καμπύλες, αποδίδεται στην απομάκρυνση της υγρασίας από το υλικό. Η ενσωμάτωση της χονδροϊτίνης στο υλικό (β) φαίνεται ότι αύξησε το ποσοστό της υγρασίας σε σχέση με το αρχικό υλικό (α). Παρατηρείται αυξημένη απώλεια μάζας (στην περιοχή που αναφέρεται στην απώλεια υγρασίας) στο σύστημα που περιέχει χονδροϊτίνη.



Σχήμα 8.5. Αποτελέσματα θερμικής ανάλυσης των υδροπηκτών Chi₁₅FG₅₀Gly₃₅ (α) και Chi₁₃FG₅₀ChS₃Gly₃₄ (β).

Η αποσύνθεση της υδροπηκτικής που περιέχει χονδροϊτίνη (διάγραμμα β) φαίνεται να ξεκινά από χαμηλότερη θερμοκρασία (~ 180 °C) σε σχέση με το αρχικό υλικό που η αποδόμηση του ξεκινά περίπου στους 200 °C. Άρα η ενσωμάτωση της χονδροϊτίνης φαίνεται ότι επηρέασε τη θερμική σταθερότητα του υλικού, αν και ο ακριβής μηχανισμός δεν είναι ξεκάθαρος.

Δεν υπάρχει αντίστοιχη επιστημονική μελέτη στη διεθνή βιβλιογραφία οπότε δεν μπορεί να πραγματοποιηθεί σύγκριση με κάποιο ανάλογο υλικό.

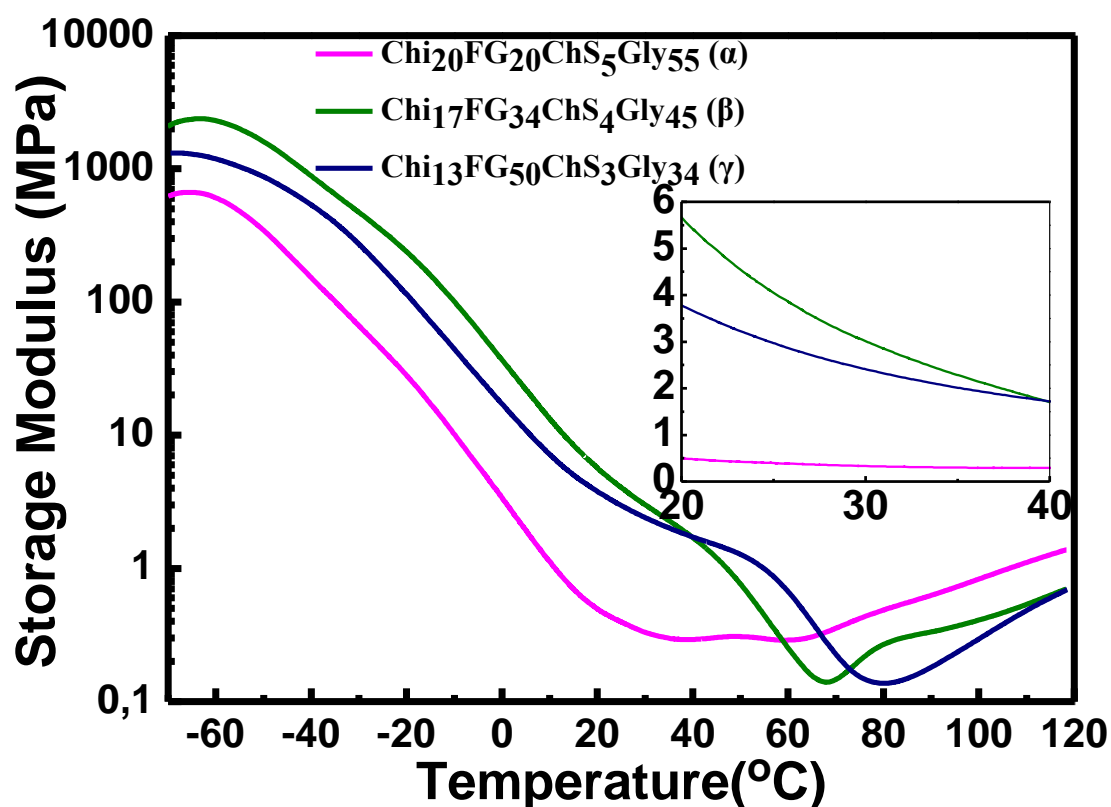
8.3.4. Δυναμική Μηχανική Ανάλυση (DMA)

8.3.4.1. Πειραματική διαδικασία

Η διαδικασία έχει περιγραφεί στο κεφάλαιο 5.3.4.1.

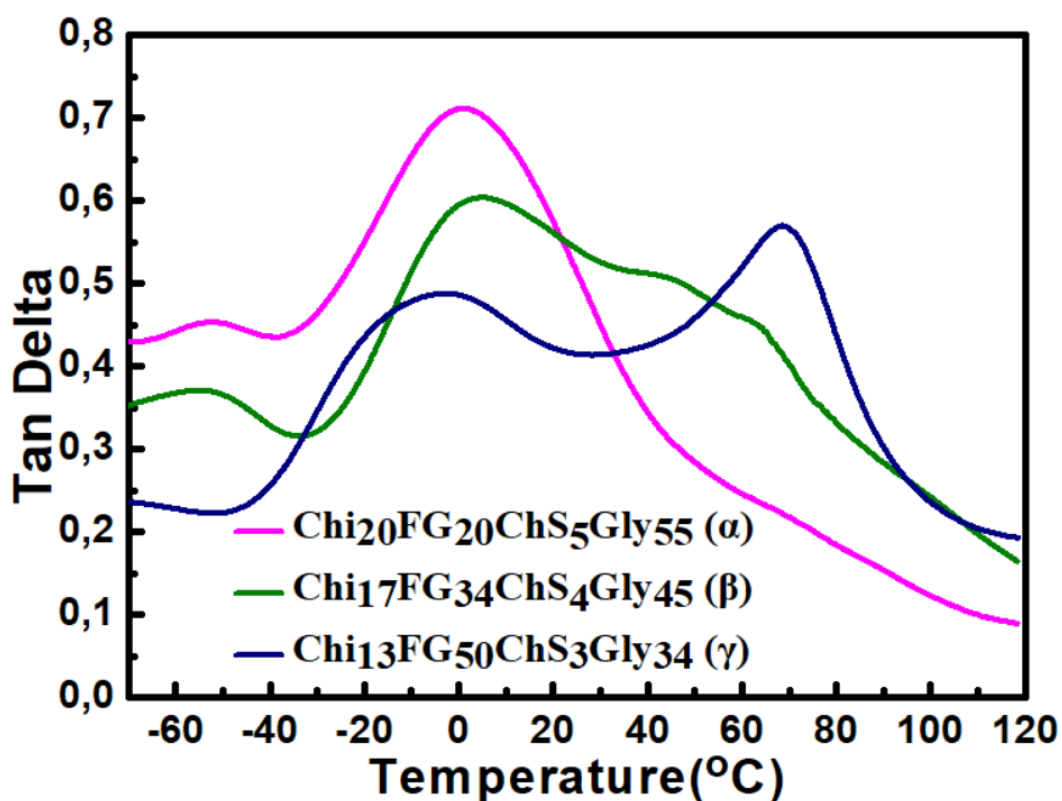
8.3.4.2. Αποτελέσματα και συζήτηση

Στο σχήμα 8.6 παρουσιάζονται τα αποτελέσματα των μετρήσεων DMA που αναφέρονται στο μέτρο αποθήκευσης συναρτήσει της θερμοκρασίας ενώ στο σχήμα 8.7 παρουσιάζονται τα αποτελέσματα του παράγοντα απώλειας συναρτήσει της θερμοκρασίας για τα υλικά $\text{Chi}_{20}\text{FG}_{20}\text{ChS}_5\text{Gly}_{55}$, $\text{Chi}_{17}\text{FG}_{34}\text{ChS}_4\text{Gly}_{45}$ και $\text{Chi}_{13}\text{FG}_{50}\text{ChS}_3\text{Gly}_{34}$ αντίστοιχα.



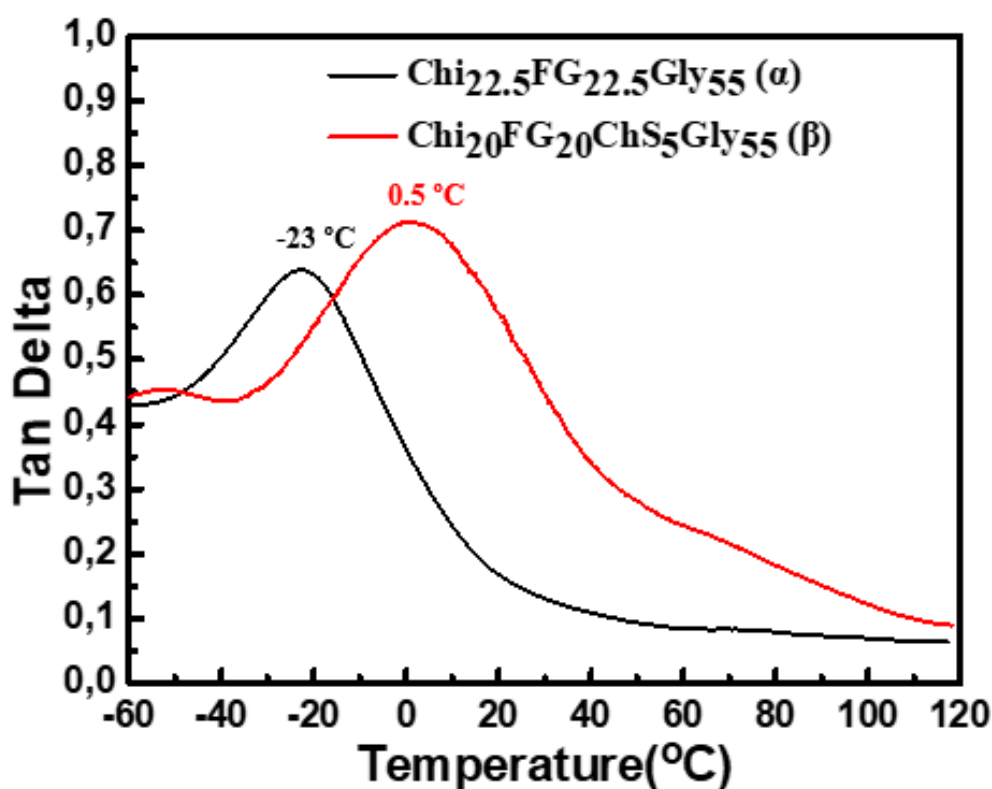
Σχήμα 8.6. Αποτελέσματα δυναμικής μηχανικής ανάλυσης-μέτρο αποθήκευσης των υδροπηκτών $\text{Chi}_{20}\text{FG}_{20}\text{ChS}_5\text{Gly}_{55}$ (α), $\text{Chi}_{17}\text{FG}_{34}\text{ChS}_4\text{Gly}_{45}$ (β) και $\text{Chi}_{13}\text{FG}_{50}\text{ChS}_3\text{Gly}_{34}$ (γ).

Το μέτρο αποθήκευσης της υδροπηκτής $\text{Chi}_{20}\text{FG}_{20}\text{ChS}_5\text{Gly}_{55}$ (διάγραμμα 8.6.α) υπολογίστηκε στα 0.39 MPa στους 25 °C, της υδροπηκτής $\text{Chi}_{17}\text{FG}_{34}\text{ChS}_4\text{Gly}_{45}$ (διάγραμμα 8.6.β) στα 3.97 MPa και της υδροπηκτής $\text{Chi}_{13}\text{FG}_{50}\text{ChS}_3\text{Gly}_{34}$ (διάγραμμα 8.6.γ) στα 2.96 MPa. Ανατρέχοντας στα αποτελέσματα των συστημάτων χιτοζάνης-ζελατίνης ιχθύων-γλυκερόλης (σχήμα 6.9, σελίδα 91) που δεν περιείχαν χονδροϊτίνη, γίνεται σαφές ότι δεν παρατηρείται η ίδια συμπεριφορά. Εκεί παρατηρήθηκε ότι η αύξηση της συγκέντρωσης της ζελατίνης ιχθύων οδήγησε σε μικρή μεν αλλά αισθητή αύξηση του μέτρου αποθήκευσης. Στο παρόν σύστημα και στις συγκεκριμένες αναλογίες που χρησιμοποιήθηκαν δεν υπήρξε σαφής επίδραση και αυτό πιθανότατα μπορεί να οφείλεται στην ελλιπή αναμιξιμότητα των συστημάτων που οδήγησε η προσθήκη της χονδροϊτίνης.



Σχήμα 8.7. Αποτελέσματα δυναμικής μηχανικής ανάλυσης-παράγοντας απώλειας των υδροπηκτών $\text{Chi}_{20}\text{FG}_{20}\text{ChS}_5\text{Gly}_{55}$ (α), $\text{Chi}_{17}\text{FG}_{34}\text{ChS}_4\text{Gly}_{45}$ (β) και $\text{Chi}_{13}\text{FG}_{50}\text{ChS}_3\text{Gly}_{34}$ (γ).

Συγκρίνοντας τα αποτελέσματα του παράγοντα απωλειών που περιείχαν χονδροϊτίνη με τα αποτελέσματα των υλικών που περιγράφηκαν στο Κεφάλαιο 6, φαίνεται ότι η ενσωμάτωση της χονδροϊτίνης οδήγησε σε αύξηση της T_g . Στην ερευνητική εργασία της Oliveira υπολογίστηκε μέσω διαφορικής θερμιδομετρίας σάρωσης σε 128 °C [325]. Η υψηλότερη θερμοκρασία υαλώδους μετάπτωσης της χονδροϊτίνης πιθανότατα οδήγησε σε αύξηση της κύριας T_g του συστήματος. Βέβαια αυτό ισχύει για τα συστήματα όπου υπήρξε καλή ή σχετικά καλή αναμιξιμότητα. Σύμφωνα με τη θεωρία [326,327] στην περίπτωση πλήρους αναμιξιμότητας το μίγμα των πολυμερών εμφανίζει μια T_g . Η εμφάνιση μάλιστα μιας μόνο πειραματικής T_g από το μίγμα των πολυμερών χρησιμοποιείται σαν ένα από τα ισχυρότερα κριτήρια για την αναμιξιμότητα τους.



Σχήμα 8.8. Παράγοντας απώλειας (tan delta) των υδροπηκτών $\text{Chi}_{22.5}\text{FG}_{22.5}\text{Gly}_{55}$ (α) και $\text{Chi}_{20}\text{FG}_{20}\text{ChS}_5\text{Gly}_{55}$ (β).

Για να μελετηθεί η επίδραση της χονδροϊτίνης στην T_g του συστήματος θα πρέπει οι αναλογίες που χρησιμοποιήθηκαν να οδηγούν σε επίτευξη ομογενούς

μονοφασικού συστήματος. Γι' αυτό η σύγκριση πραγματοποιήθηκε μεταξύ των υλικών Chi₁₅FG₅₀Gly₃₅ (α) και Chi₂₀FG₂₀ChSGly₅₅ (β) ενώ τα αποτελέσματα του παράγοντα απώλειας πριν και μετά την ενσωμάτωση της χονδροϊτίνης παρατίθενται στο σχήμα 8.8. Η T_g του συστήματος πριν την ενσωμάτωση ήταν -23 °C και μετά 0.5 °C. Δεν υπάρχουν παρόμοια πειραματικά δεδομένα στη διεθνή βιβλιογραφία ώστε να πραγματοποιηθεί σύγκριση.

8.3.5. Ηλεκτρονική μικροσκοπία σάρωσης (SEM)

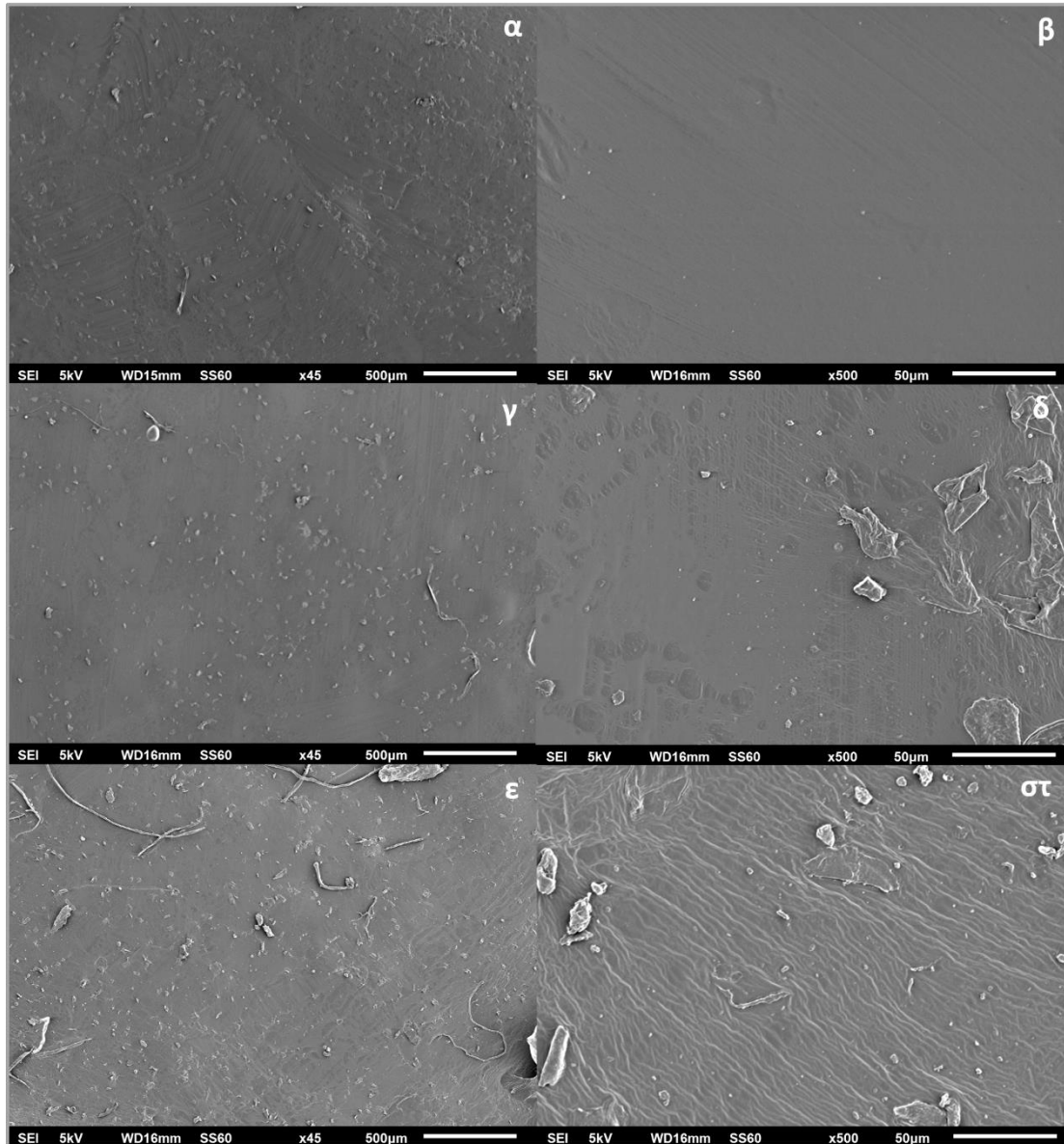
8.3.5.1. Πειραματική διαδικασία

Η διαδικασία έχει περιγραφεί στο υποκεφάλαιο 6.3.5.1.

8.3.5.2. Αποτελέσματα και συζήτηση

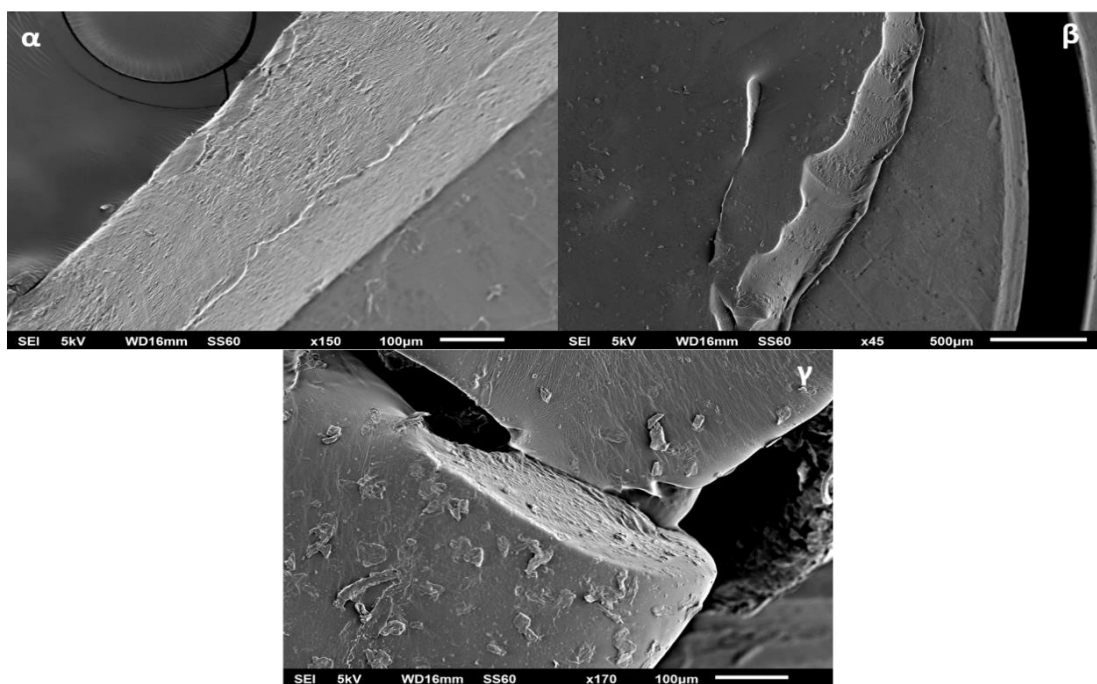
Στο Σχήμα 8.9, διακρίνονται οι εικόνες που ελήφθησαν μέσω του ηλεκτρονικού μικροσκοπίου σάρωσης. Η τεχνική αυτή χρησιμοποιήθηκε για την εξέταση της μορφολογίας των συστημάτων. Τα δείγματα μετρήθηκαν σε δύο διαφορετικές μεγεθύνσεις για να υπάρχει σαφής εικόνα της επιφανειακής μορφολογίας.

Οι εικόνες 8.9.α και 8.9.β, αναφέρονται στο υλικό Chi₂₀FG₂₀ChS₅Gly₅₅, οι 8.9.γ και 8.9.δ στο υλικό Chi₁₇FG₃₄ChS₄Gly₄₅ και οι 8.9.ε και 8.9.στ στην υδροπηκτική Chi₁₃FG₅₀ChS₃Gly₃₄ (για λεπτομέρειες βλέπε Πίνακα 9.1). Παρατηρώντας τις εικόνες γίνεται σαφές ότι η αύξηση της συγκέντρωσης της ζελατίνης ιχθύων οδηγεί σε λιγότερο ομοιόμορφη και ομαλή μορφολογία επιφάνειας. Αυτό πιθανότατα αποδίδεται στο ότι μέρος της ζελατίνης ιχθύων δεν αντέδρασε με τα άλλα συστατικά του μίγματος λόγω έλλειψης θέσεων πρόσδεσης. Στις εικόνες 8.9.α και 8.9.β παρατηρείται σχετικά πιο ομοιόμορφη και ομαλή μορφολογία επιφάνειας σε σχέση με τα άλλα δύο υλικά. Ωστόσο στο σύνολο των υλικών παρατηρήθηκε μη πορώδης, συνεχής και συμπαγής δομή.

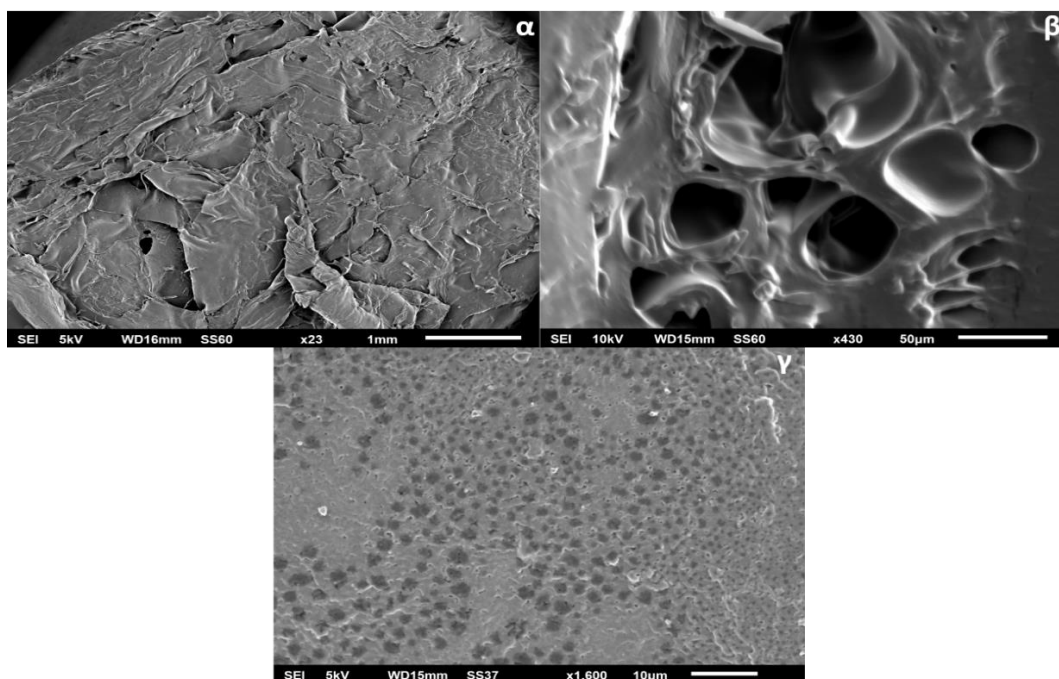


Σχήμα 8.9. Εικόνες ηλεκτρονικής μικροσκοπίας σάρωσης (SEM) των υδροπηκτών $\text{Chi}_{20}\text{FG}_{20}\text{ChS}_5\text{ Gly}_{55}$ (α, β), $\text{Chi}_{17}\text{FG}_{34}\text{ChS}_4\text{ Gly}_{45}$ (γ, δ) και $\text{Chi}_{13}\text{FG}_{50}\text{ChS}_3\text{ Gly}_{34}$ (ε, στ).

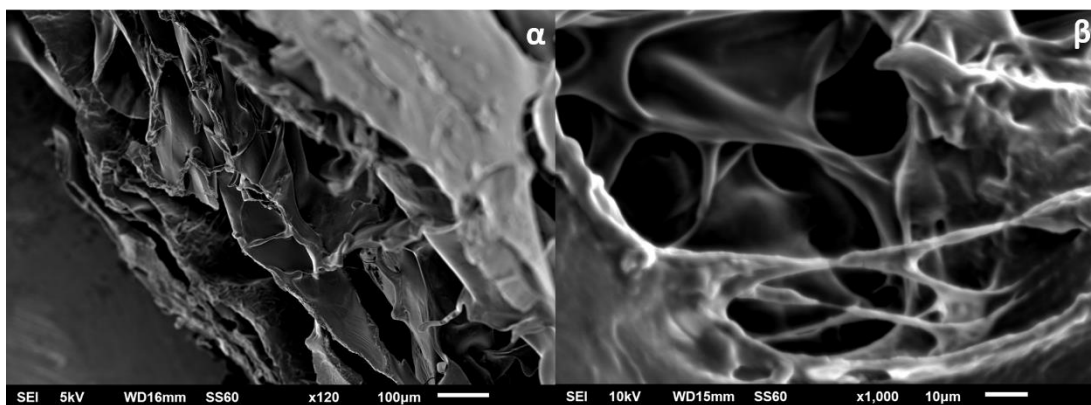
Στο Σχήμα 8.10, παρουσιάζονται οι εικόνες που ελήφθησαν μέσω ηλεκτρονικής μικροσκοπίας σάρωσης (SEM) για τα ίδια υλικά αφού υποβλήθηκαν σε εγκάρσια τομή. Τα αποτελέσματα επιβεβαιώνουν τη μη πορώδη και συμπαγή δομή του συνόλου των υλικών.



Σχήμα 8.10. Εικόνες ηλεκτρονικής μικροσκοπίας σάρωσης (SEM) των υδροπηκτών $\text{Chi}_{20}\text{FG}_{20}\text{ChS}_5 \text{Gly}_{55}$ (α), $\text{Chi}_{17}\text{FG}_{34}\text{ChS}_4 \text{Gly}_{45}$ (β) και $\text{Chi}_{13}\text{FG}_{50}\text{ChS}_3 \text{Gly}_{34}$ (γ) αφού υπεβλήθησαν σε εγκάρσια τομή.



Σχήμα 8.11. Εικόνες ηλεκτρονικής μικροσκοπίας σάρωσης (SEM) σε διαφορετικές μεγεθύνσεις ικρίωματος $\text{Chi}_{20}\text{FG}_{20}\text{ChS}_5 \text{Gly}_{55} \text{FD-TH}$.



Σχήμα 8.12. Εικόνες ηλεκτρονικής μικροσκοπίας σάρωσης (SEM) της υδροπηκτής $\text{Chi}_{20}\text{FG}_{20}\text{ChS}_5\text{Gly}_{55}\text{FD-TH}$ αφού υποβλήθηκε σε εγκάρσια τομή.

Στο Σχήμα 8.11, διακρίνονται οι εικόνες που ελήφθησαν μέσω της ηλεκτρονικής μικροσκοπίας σάρωσης για το υλικό που προέκυψε ύστερα από την κατεργασία freeze drying και τη θερμική κατεργασία. Οι εικόνες έχουν ληφθεί από την επιφάνεια του υλικού. Στην εικόνα 8.11.α παρατηρείται ανομοιόμορφη και μη ομαλή επιφάνεια που παρουσιάζει ασυνέχεια. Στην εικόνα 8.11.β παρατηρούνται αρκετά μεγάλοι πόροι (~50 µm), ενώ στην περιοχή που απεικονίζεται στην εικόνα 8.11.γ παρατηρούνται αρκετά μικρότεροι πόροι. Διαπιστώνεται ότι δεν υπάρχει ομοιόμορφη κατανομή μεγέθους πόρων ενώ μέρος της περιοχής φαίνεται να μη διαθέτει καθόλου πόρους.

Στο Σχήμα 8.12, παρατίθενται εικόνες του υλικού αφού υποβλήθηκε σε εγκάρσια τομή. Στην εικόνα 8.12.β παρατηρείται ότι το ικρίωμα διαθέτει τρισδιάστατη δομή με διασυνδεδεμένο πορώδες δίκτυο. Οι μεγαλύτεροι πόροι του πολυμερικού ικρίωματος είναι ικανοί να υποστηρίξουν την κυτταρική ανάπτυξη και πολλαπλασιασμό ενώ οι μικρότεροι βοηθούν στη μεταφορά θρεπτικών συστατικών μέσα στο ικρίωμα. Οι πόροι που υπάρχουν βαθιά μέσα στο τρισδιάστατο δίκτυο διαδραματίζουν ουσιώδη ρόλο στην κυτταρική μετανάστευση [328].

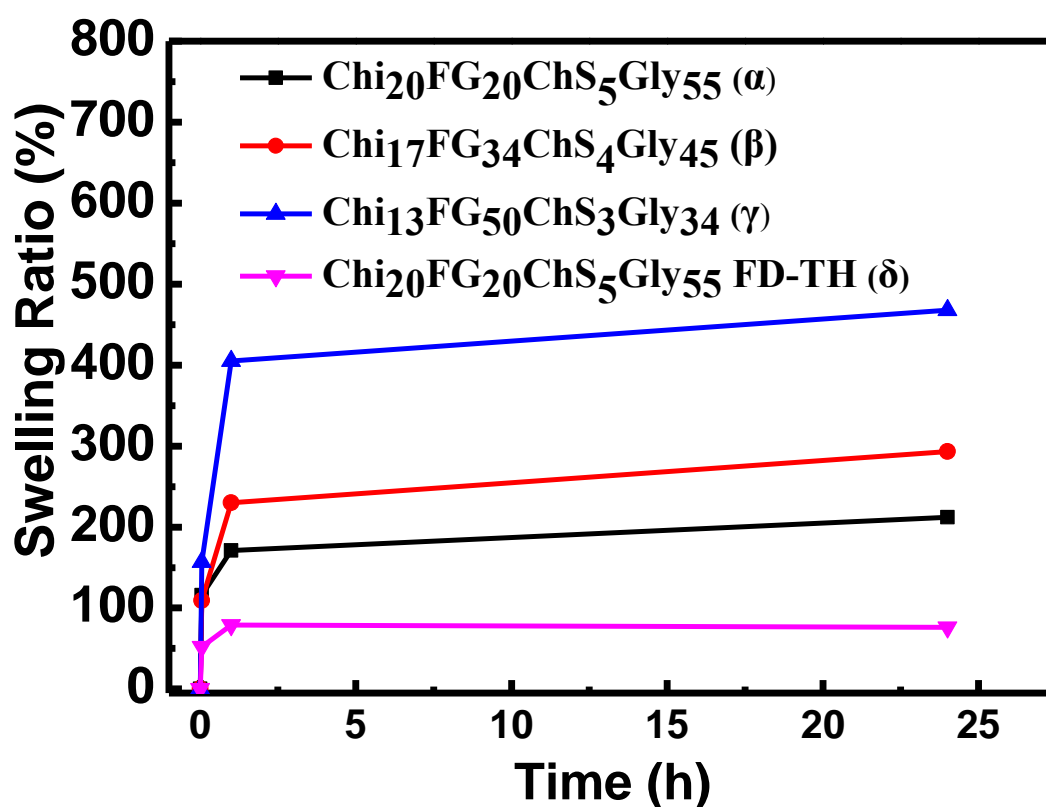
8.3.6. Μελέτη απορρόφησης νερού

8.3.6.1 Πειραματική διαδικασία

Η διαδικασία έχει περιγραφεί στο υποκεφάλαιο 6.3.6.1.

8.3.6.2. Αποτελέσματα και συζήτηση

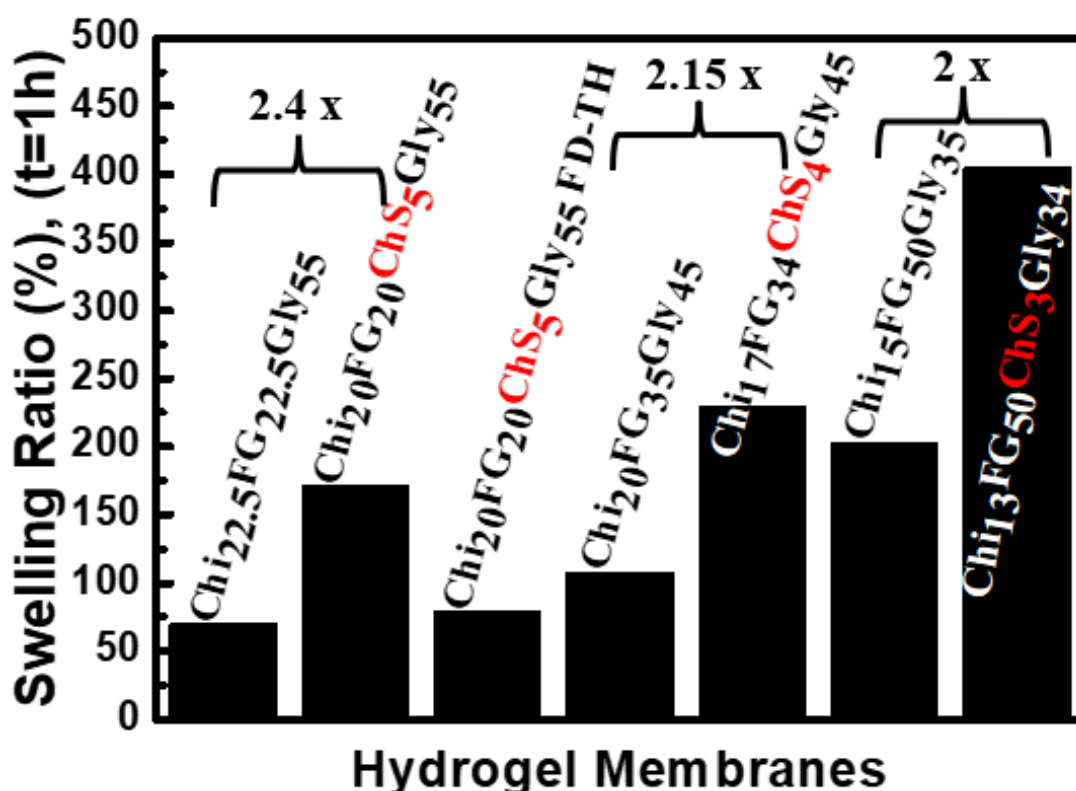
Στο σχήμα 8.13 παρουσιάζονται τα αποτελέσματα της μελέτης απορρόφησης νερού για τα υλικά που περιέχουν χονδροϊτίνη. Η αύξηση της συγκέντρωσης της ζελατίνης ιχθύων στο σύστημα οδηγεί σε αύξηση του βαθμού απορρόφησης νερού [290].



Σχήμα 8.13. Αποτελέσματα μελέτης απορρόφησης νερού υδροπηκτών που περιέχουν χονδροϊτίνη.

Η απορρόφηση νερού των υλικών που περιείχαν χονδροϊτίνη ύστερα από τοποθέτησή τους για μια ώρα σε τρυβλίο που περιείχε νερό έχει τουλάχιστον

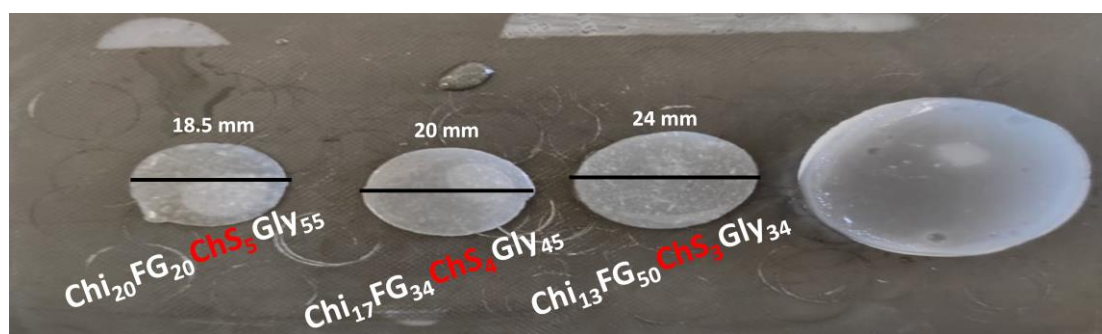
διπλασιαστεί σε σχέση τα υλικά που δεν περιείχαν (Σχήμα 8.14). Στο Σχήμα 8.14 όπου απεικονίζεται ο βαθμός διόγκωσης σε χρόνο $t=1h$ για όλα τα υλικά (με και χωρίς χονδροϊτίνη). Ο βαθμός απορρόφησης νερού της υδροπηκτής $Chi_{20}FG_{20}ChS_5Gly_{55}$ είναι 2.4 φορές υψηλότερος σε σχέση με την υδροπηκτική $Chi_{22.5}FG_{22.5}Gly_{55}$, του υλικού $Chi_{17}FG_{34}ChS_4Gly_{45}$ είναι 2.15 φορές υψηλότερος σε σχέση με την υδροπηκτική $Chi_{20}FG_{35}Gly_{45}$ και της υδροπηκτικής $Chi_{13}FG_{50}ChS_3Gly_{34}$ σχεδόν 2 φορές υψηλότερος σε σχέση με την υδροπηκτική $Chi_{15}FG_{50}ChS_{35}Gly_{34}$. Αντίστοιχα αποτελέσματα (σε ποιοτικό επίπεδο) αναφέρονται και στην ερευνητική εργασία του Ponsubha [195] όπου η ενσωμάτωση της χονδροϊτίνης οδήγησε σε αύξηση του βαθμού διόγκωσης του συστήματος. Στην ερευνητική εργασία της Sharma et al. [162] σε σύστημα χιτοζάνης-χονδροϊτίνης αναφέρεται αρκετά υψηλός βαθμός διόγκωσης (περίπου 1000 %) ύστερα από την ενσωμάτωση της χονδροϊτίνης.



Σχήμα 8.14. Σύγκριση αποτελεσμάτων μελέτης απορρόφησης νερού υλικών με και χωρίς (για λεπτομέρειες βλέπε πίνακα 6.2, σελίδα 76, ομάδα Β') χονδροϊτίνη.

Η διαφορά σε σχέση με τα υλικά της παρούσας διατριβής είναι πιθανόν να οφείλεται στη χρήση της γλυκερόλης, η οποία λόγω αλληλεπίδρασης με τα υπόλοιπα συστατικά, σταθεροποίησε τις αλυσίδες χιτοζάνης-χονδροϊτίνης στο χώρο με αποτέλεσμα να οδηγήσει σε μείωση του ελεύθερου όγκου και εν συνεχεία σε χαμηλότερο βαθμό διόγκωσης λόγω παρεμπόδισης του νερού να εισέλθει και των αλυσίδων να διογκωθούν.

Στο σχήμα 8.15 απεικονίζονται οι υδροπηκτές $\text{Chi}_{20}\text{FG}_{20}\text{ChS}_5\text{Gly}_{55}$, $\text{Chi}_{17}\text{FG}_{34}\text{ChS}_4\text{Gly}_{45}$ και $\text{Chi}_{13}\text{FG}_{50}\text{ChS}_3\text{Gly}_{34}$ ύστερα από 1 ώρα παραμονή σε υδατικό διάλυμα. Αρχικά είχαν κοπεί με ειδικό κοπίδι δείγματα διαμέτρου 12 mm ενώ ύστερα από παραμονή στο νερό παρατηρείται αύξηση της διαμέτρου, ανάλογα με τη συγκέντρωση της ζελατίνης ιχθύων που περιείχαν (αύξηση της συγκέντρωσης ζελατίνης από αριστερά προς δεξιά). Η τελευταία μεμβράνη (τέρμα δεξιά) περιείχε την υψηλότερη συγκέντρωση ζελατίνης αλλά δεν μετρήθηκε λόγω των κακών μηχανικών ιδιοτήτων.



Σχήμα 8.15. Απεικόνιση της μεταβολής της διαμέτρου των υδροπηκτών ύστερα από παραμονή σε νερό για 1h.

Η αύξηση της υδροφιλικότητας των συστημάτων ύστερα από την προσθήκη της χονδροϊτίνης επιβεβαιώνεται εμμέσως και από τα δεδομένα θερμικής ανάλυσης που περιγράφηκαν παραπάνω. Δηλαδή η απώλεια μάζας που αναφέρεται στην υγρασία είναι υψηλότερη στο υλικό που περιέχει χονδροϊτίνη.

8.3.7. Μελέτη ρυθμού αποδόμησης

8.3.7.1. Πειραματική διαδικασία

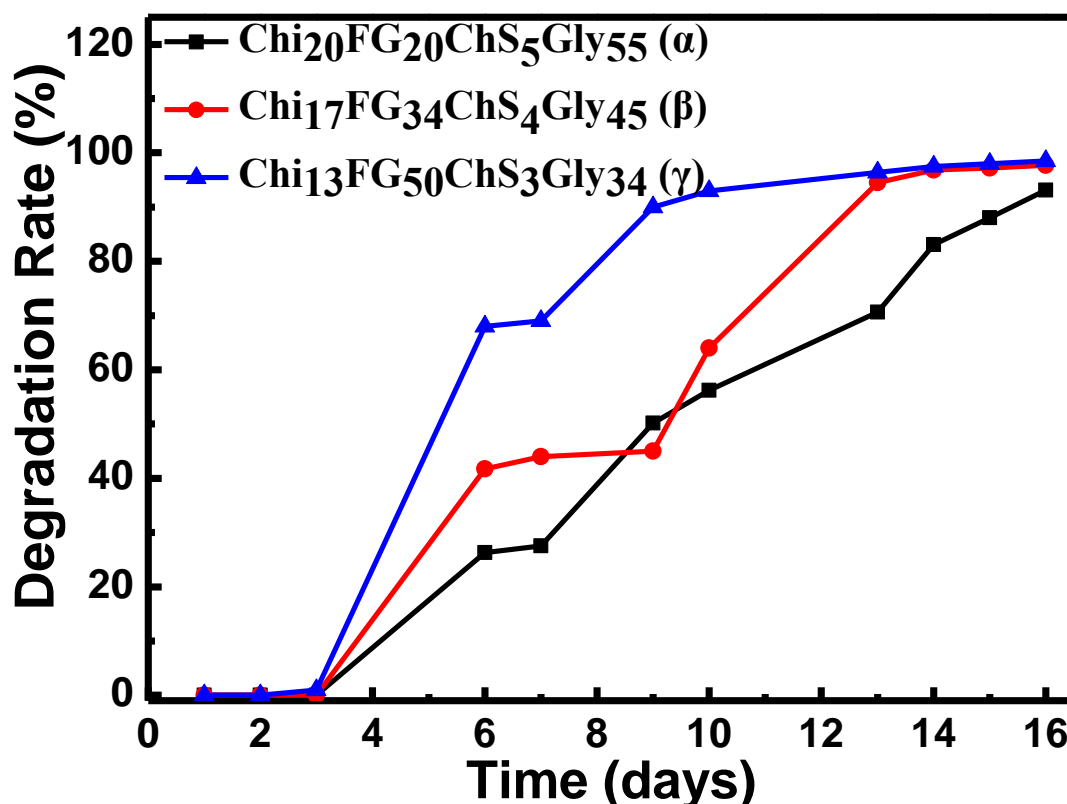
Η διαδικασία έχει περιγραφεί και στο υποκεφάλαιο 6.3.7.1.

8.3.7.2. Αποτελέσματα και συζήτηση

Στο Σχήμα 8.16, παρατίθενται τα αποτελέσματα που προέκυψαν από τη μελέτη του ρυθμού αποδόμησης των υλικών σε χρονικό διάστημα 16 ημερών. Τα αποτελέσματα ακολουθούν την ίδια συμπεριφορά με αυτά της Β' ομάδας (βλέπε σχήμα 6.17, σελίδα 100) του κεφαλαίου 6. Δηλαδή η αύξηση της συγκέντρωσης της ζελατίνης ιχθύων στο σύστημα οδήγησε σε αμεσότερη αποδόμηση του υλικού. Συγκρίνοντας τα υλικά του παρόντος κεφαλαίου (που περιέχουν χονδροϊτίνη) με τα υλικά που δεν περιέχουν γίνεται αντιληπτό ότι η ενσωμάτωση της χονδροϊτίνης στο σύστημα οδήγησε σε αμεσότερη αποδόμηση. Ο ρυθμός αποδόμησης των υλικών που δεν περιείχαν χονδροϊτίνη την 13^η ημέρα υπολογίστηκε σε 50.6%, 53.3 % και 75.8 (διαγράμματα α, β και γ, σχήμα 6.17, σελίδα 100) ενώ τα υλικά του παρόντος κεφαλαίου εμφάνισαν αρκετά υψηλότερους ρυθμούς αποδόμησης (70.6 %, 94.5 % και 96.4 %)

Ο μηδενικός ρυθμός αποδόμησης που παρουσιάζεται τις 3 πρώτες μέρες της δοκιμής είναι πλασματικός. Αυτό επιβεβαιώνεται παρατηρώντας το σχήμα 8.13 της προηγούμενης δοκιμής όπου οι καμπύλες του ρυθμού απορρόφησης έχουν ανοδική τάση που σημαίνει ότι τα υλικά συνεχίζουν να απορροφούν νερό. Αντίστοιχα αποτελέσματα (σε ποιοτικό επίπεδο) αναφέρονται και στην ερευνητική εργασία του Ponshubha et al. [195]. Η ενσωμάτωση της χονδροϊτίνης στο σύστημα φαίνεται ότι οδήγησε σε αύξηση του ρυθμού αποδόμησης. Βέβαια ο ρυθμός αποδόμησης ήταν αρκετά χαμηλότερος σε σχέση με τα υλικά της παρούσας διατριβής (του παρόντος κεφαλαίου). Αυτό πιθανότατα αποδίδεται στη χρήση χαμηλής συγκέντρωσης ζελατίνης που όπως έχει ήδη αναφερθεί αυξάνει το ρυθμό αποδόμησης των υλικών. Μελέτη του ρυθμού αποδόμησης παρουσιάζεται και στην ερευνητική εργασία της Sharma [162] αλλά τα αποτελέσματα δεν είναι συγκρίσιμα καθώς χρησιμοποιήθηκε εντελώς διαφορετική διαδικασία εξέτασης της αποδόμησης. Παρόλα αυτά τα υλικά που

συνέθεσε η συγκεκριμένη ομάδα επέδειξαν πολύ υψηλό ρυθμό αποδόμησης (~45 % σε 1 ώρα) σε σχέση με τα υλικά της παρούσας διατριβής.



Σχήμα 8.16. Αποτελέσματα μελέτης του ρυθμού αποδόμησης των υδροπηκτών Chi₂₀FG₂₀ChS₅ Gly₅₅ (α), Chi₁₇FG₃₄ChS₄ Gly₄₅ (β) και Chi₁₃FG₅₀ChS₃ Gly₃₄ (γ).

Τέλος, μελετήθηκε και ο ρυθμός αποδόμησης του πορώδους ικρίωματος Chi₂₀FG₂₀ChS₅Gly₅₅FD-TH. Το συγκεκριμένο υλικό δεν εμπεριέχεται στα αποτελέσματα του παρακάτω σχήματος καθώς στο αναφερόμενο χρονικό διάστημα ο ρυθμός αποδόμησης ήταν μηδενικός. Αυτό είναι αρκετά σημαντικό καθώς συντέθηκε ένα υλικό με πολύ χαμηλό ρυθμό αποδόμησης χωρίς να έχει χρησιμοποιηθεί διασταυρωτής κάτι το οποίο σημαίνει ότι μπορεί να εφαρμοστεί σε πληθώρα βιοϊατρικών εφαρμογών αποφεύγοντας τυχόν προβλήματα κυτταροτοξικότητας. Το πολυμερικό ικρίωμα που μοιάζει με σπόγγο παρέμεινε για δύο μήνες σε υδατικό διάλυμα. Για ενάμιση μήνα η αποδόμηση ήταν μηδενική ενώ στο τέλος της δοκιμής (2 μήνες) παρατηρήθηκε αποδόμηση 23 %. Πιθανόν η μέθοδος freeze drying και η θερμική κατεργασία που ακολούθησε να βοήθησε στο καλύτερο πακετάρισμα των

αλυσίδων και την ενίσχυση των ηλεκτροστατικών αλληλεπιδράσεων οδηγώντας σε υψηλότερη σταθεροποίηση και δραστική μείωση του ρυθμού αποδόμησης.

8.3.8. Μελέτη ρυθμού εξάτμισης νερού

Στο πλαίσιο της παρούσας διατριβής, για την ομάδα υλικών του συγκεκριμένου κεφαλαίου πραγματοποιήθηκε μελέτη του ρυθμού εξάτμισης νερού. Η δοκιμή αυτή είναι αρκετά σημαντική αν υποθεθεί ότι τα υλικά θα χρησιμοποιηθούν ως προσωρινά επιθέματα επούλωσης/φροντίδας εγκαυμάτων/τραυμάτων καθώς όπως είναι γνωστό [9,49,91] τα επιφανειακά επιθέματα πρέπει να διατηρούν υγρό το περιβάλλον του τραύματος ώστε να επιταχύνεται η επούλωση.

8.3.8.1. Πειραματική διαδικασία

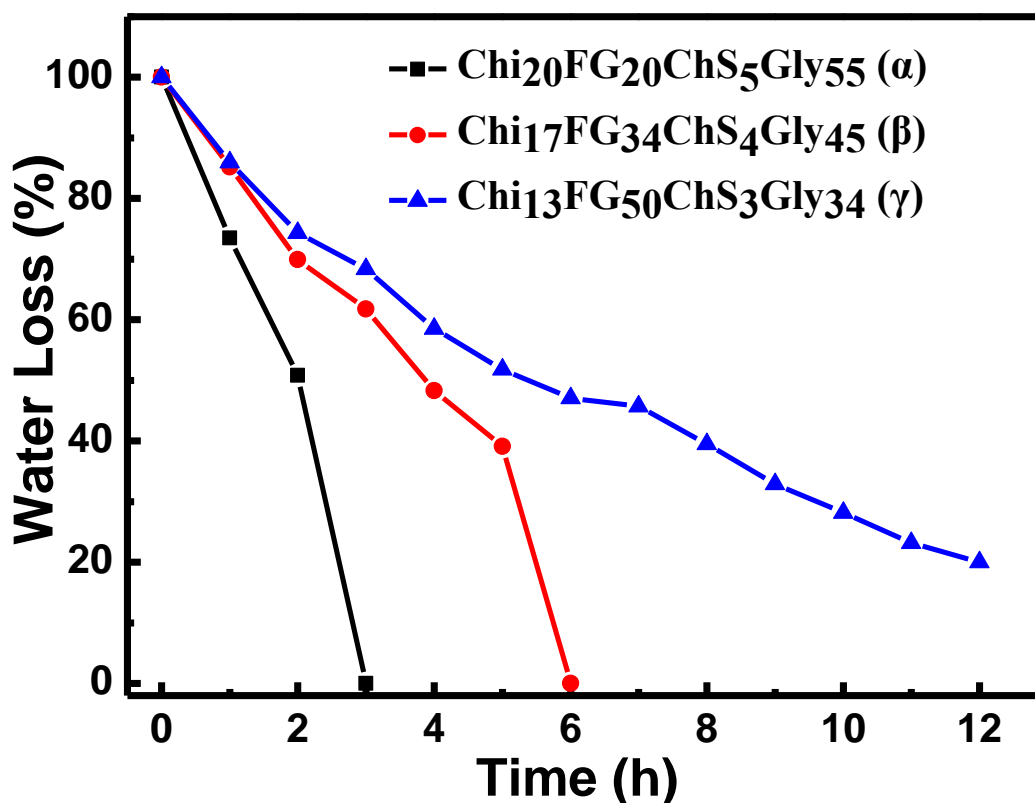
Για να πραγματοποιηθεί η μελέτη, η υδροπηκτική τοποθετήθηκε σε τρυβλίο Petri για μια ώρα ώστε να ενυδατωθεί, ενώ πραγματοποιήθηκε ζύγιση πριν και μετά την ενυδάτωση. Αφού ενυδατώθηκε, αφέθηκε σε θερμοκρασία δωματίου σε καθαρό τρυβλίο (χωρίς νερό) και πραγματοποιούνταν ζυγίσεις κάθε μια ώρα ενώ η μελέτη ολοκληρώθηκε όταν η υδροπηκτική επανήλθε στην αρχική της μάζα (πριν την διόγκωση). Η απώλεια του νερού μέσω εξάτμισης υπολογίστηκε από την εξίσωση 8.1 :

$$\text{Απώλεια νερού (\%)} = \frac{m_{\text{αρχ.}} - m_{\text{τελ.}}}{m_{\text{αρχ.}}} \times 100 \quad (8.1)$$

όπου $m_{\text{αρχ.}}$ είναι η μάζα της διογκωμένης υδροπηκτικής για $t=1h$ και $m_{\text{τελ.}}$ η μάζα της υδροπηκτικής ύστερα από εξάτμιση του νερού σε συγκεκριμένους χρόνους ($t=1h, 2h, 3h$ κ.τ.λ.).

8.3.8.2. Αποτελέσματα και συζήτηση

Στο σχήμα 8.17 απεικονίζονται τα αποτελέσματα της μελέτης του ρυθμού εξάτμισης νερού από τις υδροπηκτές. Από τα αποτελέσματα συμπεραίνεται ότι όσο αυξάνεται η συγκέντρωση της ζελατίνης ιχθύων στο σύστημα μειώνεται και ο ρυθμός εξάτμισης του νερού. Υψηλότερος ρυθμός εξάτμισης παρατηρήθηκε στο υλικό Chi₂₀FG₂₀ChS₅Gly₅₅ (διάγραμμα α), ακολουθεί το υλικό που περιείχε την ενδιάμεση συγκέντρωση ζελατίνης, Chi₁₇FG₃₄ChS₄Gly₄₅ όπου παρατηρήθηκε πλήρης εξάτμιση σε 6 ώρες (διάγραμμα β) και τέλος το υλικό Chi₁₃FG₅₀ChS₃Gly₃₄ με την υψηλότερη συγκέντρωση ζελατίνης ιχθύων όπου ύστερα από 12 ώρες παρατηρήθηκε απώλεια νερού περίπου 80 %.



Σχήμα 8.17. Αποτελέσματα μελέτης του ρυθμού εξάτμισης του νερού από τις υδροπηκτές Chi₂₀FG₂₀ChS₅ Gly₅₅ (α), Chi₁₇FG₃₄ChS₄ Gly₄₅ (β) και Chi₁₃FG₅₀ChS₃ Gly₃₄ (γ).

Στο σχήμα 8.18.α. απεικονίζεται η υδροπηκτική ύστερα από τη μελέτη εξάτμισης νερού, ακολουθεί εμβάπτιση μερικών λεπτών σε νερό (σχήμα 8.18.β.) και επαναφορά υδροπηκτικής σε διογκωμένη κατάσταση (σχήμα 8.18.γ). Από τη δοκιμή αυτή γίνεται ξεκάθαρο ότι μπορεί να ενυδατωθεί και να χρησιμοποιηθεί ξανά ως επίθεμα.



Σχήμα 8.18. Αφυδατωμένη υδροπηκτική ύστερα από την πραγματοποίηση της δοκιμής (α), ολιγόλεπτη εμβάπτιση σε νερό (β) και διογκωμένη υδροπηκτική έτοιμη ξανά προς χρήση (γ).

Κρίνεται ότι όλα τα προαναφερθέντα υλικά μπορούν να χρησιμοποιηθούν ως προσωρινά επιθέματα επούλωσης/φροντίδας τραυμάτων αναλόγως τις ανάγκες της πληγής.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 9. ΜΕΛΕΤΗ ΑΝΤΙΜΙΚΡΟΒΙΑΚΗΣ ΔΡΑΣΤΙΚΟΤΗΤΑΣ ΥΔΡΟΠΗΚΤΩΝ

9.1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Το παρόν κεφάλαιο πραγματεύεται την αντιμικροβιακή δραστηριότητα των υδροπηκτών πριν και μετά την ενσωμάτωση αντιβιοτικών και αιθέριων ελαίων. Στη διεθνή βιβλιογραφία αναφέρεται ότι τα επιθέματα πληγών πρέπει να προστατεύουν το τραύμα από μολύνσεις που προκαλούνται από παθογόνους μικροοργανισμούς [49] όμως υπάρχουν και μικροοργανισμοί οι οποίοι συμμετέχουν στη διαδικασία της επούλωσης. Στην ερευνητική εργασία της Savitskaya et al. [329] αναφέρεται η σύνθεση υλικού αποτελούμενου από βακτηριακή κυτταρίνη και μικροοργανισμό *Bacillus subtilis*, αποδεικνύοντας ότι το ανάμιγμα προάγει τη διαδικασία της επούλωσης. Έχει αποδειχθεί ότι τα προβιοτικά προάγουν την επούλωση δρώντας στην περιοχή της επιδερμίδας και του χορίου ως δέκτες σημάτων ενάντια στους παθογόνους μικροοργανισμούς, ενεργοποιώντας την παραγωγή μικρών πρωτεϊνών (β -defensins), ενδυναμώνοντας έτσι την ιδιότητα του δέρματος ως φραγμό του ανοσοποιητικού συστήματος [330,331].

Ένα από τα πιο κοινά βακτήρια που ευθύνεται για την πρόκληση μολύνσεων σε πληγές είναι το *Escherichia coli* [57]. Αρκετές ερευνητικές ομάδες [57,329,332,333] έχουν ασχοληθεί με την προστασία των τραυμάτων από το συγκεκριμένο βακτήριο ενώ έχουν χρησιμοποιηθεί διάφορες μέθοδοι ώστε να προσδοθούν αντιμικροβιακές ιδιότητες στα υλικά (χρήση αντιβιοτικών κ.τ.λ.).

Στην παρούσα διατριβή επιλέχθηκε μια μεμβράνη και ενσωματώθηκαν δύο αντιβιοτικά και δύο αιθέρια έλαια. Τα αντιβιοτικά που χρησιμοποιήθηκαν είναι η αργυρούχος σουλφαδιαζίνη, που αποτελεί ένα αντιβιοτικό τοπικής εφαρμογής σε μερικού και μεγάλου πάχους εγκαύματα για την αποφυγή λοιμώξεων [334,335] και η υδροχλωρική τετρακυκλίνη που έχει χρησιμοποιηθεί σε εφαρμογές επούλωσης τραυμάτων [57,336]. Επίσης το υλικό εμβαπτίστηκε με αιθέρια έλαια ρίγανης και θυμαριού που έχει αποδειχθεί ότι διαθέτουν αντιμικροβιακές ιδιότητες [337-340].

Αφού συντέθηκαν μεμβράνες με αντιμικροβιακούς παράγοντες, μελετήθηκε η αντιμικροβιακή τους δραστηριότητα έναντι των μικροοργανισμών *Escherichia coli*,

Bacillus subtilis και Streptococcus thermophilus, ενώ μελετήθηκαν και υλικά που δεν περιείχαν αντιμικροβιακούς παράγοντες.

9.2. ΣΥΝΘΕΣΗ ΤΩΝ ΥΔΡΟΠΗΚΤΩΝ

9.2.1 Αντιδραστήρια

- Χιτοζάνη (μέσου μοριακού βάρους), Sigma-Aldrich, Deacetylation Degree 75-85 %, M.B. = 190.000 Da-310.000 Da, Lot #STBH6274
- Ζελατίνη Ιχθύων, Sigma-Aldrich, M.B.=60.000 Da
- Γλυκερόλη (USP, BP, Ph. Eur.) pure, pharma grade, AppliChem Panreac, M.B.=92.1 g/mol, d = 1.26 g/ml
- Αργυρούχος σουλφαδιαζίνη 98 %, Sigma-Aldrich, M.B.= 357.14 g/mol
- Υδροχλωρική τετρακυκλίνη, Sigma-Aldrich, M.B.= 480.90 g/mol
- Αιθέριο έλαιο ρίγανης, Γεύσεις και Αρώματα
- Αιθέριο έλαιο θυμαριού, Γεύσεις και Αρώματα
- Οξικό οξύ (CH₃COOH), Honeywell, ≥99,8 %, M.B. = 60.052 g/mol, d = 1.05 g/ml
- Απεσταγμένο νερό

9.2.2. Περιγραφή της συνθετικής διαδικασίας

Η σύνθεση των υδροπηκτών Chi_{22.5}FG_{22.5}Gly₅₅ και Chi₂₀FG₂₀ChS₅Gly₅₅ που δεν περιείχαν αντιμικροβιακούς παράγοντες έχει περιγραφεί σε προηγούμενα κεφάλαια (6 και 8 αντίστοιχα). Η ενσωμάτωση των αντιβιοτικών και η εμφάνιση σε αιθέρια έλαια έγινε στην υδροπηκτική Chi_{22.5}FG_{22.5}Gly₅₅. Το υλικό αυτό επιλέχθηκε λόγω του χαμηλού ρυθμού αποδόμησης που παρουσίασε.

9.2.2.1. Σύνθεση υδροπηκτής που περιέχει αντιβιοτικά

Η συνθετική πορεία των μεμβρανών που περιέχουν αντιβιοτικά δεν διαφοροποιείται από αυτή που έχει περιγραφεί στο κεφάλαιο 6. Πιο συγκεκριμένα, αφού έχει προστεθεί στο υδατικό διάλυμα η ζελατίνη ιχθύων και η χιτοζάνη και πριν την προσθήκη οξικού οξέος προστίθενται στο διάλυμα 0.0144 g αργυρούχος σουλφαδιαζίνη ή υδροχλωρική τετρακυκλίνη. Η ποσότητα του αντιβιοτικού που χρησιμοποιήθηκε επιλέχθηκε από την βιβλιογραφία [57].

9.3. ΥΠΟΛΟΓΙΣΜΟΣ ΦΟΡΤΩΣΗΣ ΦΑΡΜΑΚΟΥ

Η φόρτωση του φαρμάκου υπολογίστηκε από την εξίσωση 9.1:

$$\text{Φόρτωση φαρμάκου (\%)} = \frac{\text{Μάζα φαρμάκου (g)}}{\text{Μάζα υδροπηκτής (g)}} \times 100 \quad (9.1)$$

Η φόρτωση φαρμάκου στις υδροπηκτές βάσει των ποσοτήτων που χρησιμοποιήθηκαν υπολογίστηκε σε 0.064 %. Η φόρτωση των αιθέριων ελαίων θα μπορούσε να υπολογιστεί ύστερα από υπολογισμό της πυκνότητας των ελαίων αλλά παρεμβάλλεται ο παράγοντας της εξάτμισης οπότε δεν υπολογίστηκε.

9.4. ΜΕΛΕΤΗ ΑΝΤΙΜΙΚΡΟΒΙΑΚΗΣ ΔΡΑΣΤΙΚΟΤΗΤΑΣ

9.4.1. Πειραματική διαδικασία

Για τη μελέτη της αντιμικροβιακής δραστηριότητας, κόπηκαν μεμβράνες διαμέτρου 12 mm, τοποθετήθηκαν σε στερεό θρεπτικό μέσο εμβολιασμένο με βακτήρια (triplicate) και επώαστηκαν στη βέλτιστη για τον μικροοργανισμό θερμοκρασία για 18 ώρες (overnight). Οι μεμβράνες αποστειρώθηκαν με ακτινοβολία UV σε 200 mJ/cm² από κάθε πλευρά. Κατά την απόθεση των μεμβρανών στο στερεό θρεπτικό μέσο προστέθηκαν 25 μl απεσταγμένου αποστειρωμένου H₂O από κάθε πλευρά της μεμβράνης για να διαβραχεί επαρκώς και να τοποθετηθεί ομοιόμορφα στην επιφάνεια. Για τη μελέτη της δραστηριότητας των υλικών με αιθέρια έλαια, στο αρχικό

υλικά προστέθηκαν 25 μl από το κάθε έλαιο. Πραγματοποιήθηκαν 3 πειράματα ενώ κάθε πείραμα πραγματοποιήθηκε 3 φορές. Ο υπολογισμός της ζώνης αναστολής πραγματοποιήθηκε σύμφωνα με τις οδηγίες της NCCLS [341].

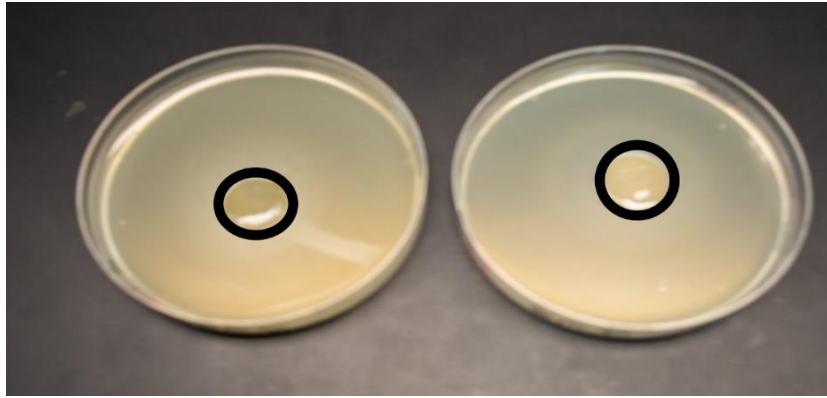
- Πείραμα Α: Σε τρυβλία με στερεό θρεπτικό μέσο L.B. Agar (Luria Bertani Agar) εμβολιασμένο με *Escherichia coli* DH5a 10^7 - 10^8 CFU (colony forming units)/ml
- Πείραμα Β: Σε τρυβλία με στερεό θρεπτικό μέσο L.B. Agar (Luria Bertani Agar) εμβολιασμένο με *Bacillus subtilis* 10^7 - 10^8 CFU (colony forming units) /ml
- Πείραμα Γ: Σε τρυβλία με στερεό θρεπτικό μέσο M17 Agar εμβολιασμένο με *Streptococcus thermophilus* 10^7 - 10^8 CFU (colony forming units) /ml

9.4.2. Αποτελέσματα και συζήτηση

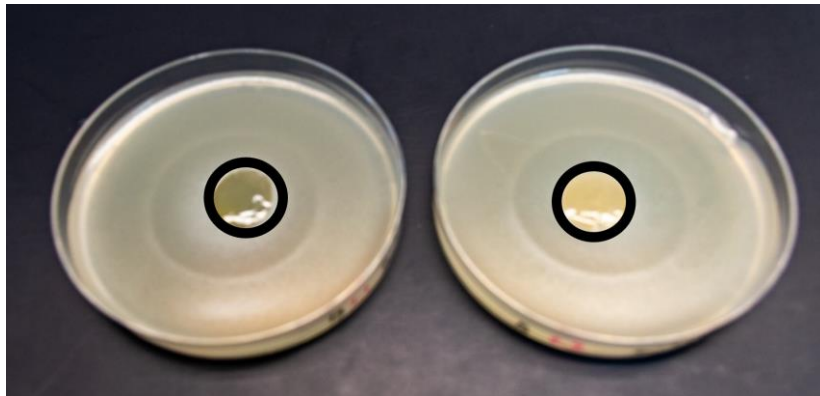
Ακολουθούν τα αποτελέσματα των μελετών αντιμικροβιακής δραστηριότητας των σκέτων υδροπηκτών, των υδροπηκτών με αντιβιοτικά και των υδροπηκτών με αιθέρια έλαια.

9.4.2.1. Υδροπηκτές χωρίς αντιμικροβιακούς παράγοντες

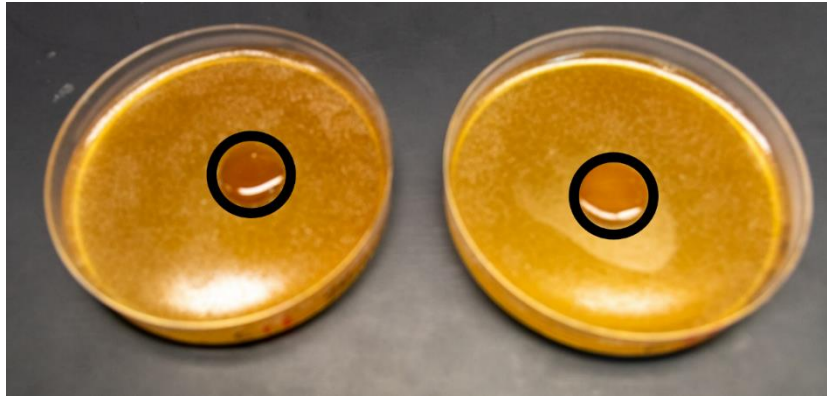
Στο Σχήμα 9.1, παρουσιάζονται τα αποτελέσματα από την δοκιμή για τον μικροοργανισμό *Escherichia coli*, στο σχήμα 9.2 για τον μικροοργανισμό *Bacillus subtilis* και στο σχήμα 9.3 για τον μικροοργανισμό *Streptococcus thermophilus*. Οι υδροπηκτές που χρησιμοποιήθηκαν ήταν οι Chi_{22.5}FG_{22.5}Gly₅₅ και η Chi₂₀FG₂₀ChS₅Gly₅₅. Από τα αποτελέσματα αποδείχθηκε ότι κανένα από τα δύο υλικά δεν διαθέτει αντιμικροβιακή δραστηριότητα σε κανέναν από τους τρεις μικροοργανισμούς που δοκιμάστηκαν. Αντίστοιχα αποτελέσματα αναφέρθηκαν και στην ερευνητική εργασία του Ma et al. [57] για υλικά χιτοζάνης-γλυκερόλης που δεν περιέχουν αντιβιοτικά. Αποδείχθηκε ότι η ενσωμάτωση της χονδροϊτίνης δε προσέδωσε αντιμικροβιακές ιδιότητες στις υδροπηκτές.



Σχήμα 9.1. Υδροπηκτική $\text{Chi}_{22.5}\text{FG}_{22.5}\text{Gly}_{55}$ (αριστερά) και υδροπηκτική $\text{Chi}_{20}\text{FG}_{20}\text{ChS}_5\text{Gly}_{55}$ (δεξιά) σε στερεό θρεπτικό μέσο εμβολιασμένο με *Escherichia coli*.



Σχήμα 9.2. Υδροπηκτική $\text{Chi}_{22.5}\text{FG}_{22.5}\text{Gly}_{55}$ (αριστερά) και υδροπηκτική $\text{Chi}_{20}\text{FG}_{20}\text{ChS}_5\text{Gly}_{55}$ (δεξιά) σε στερεό θρεπτικό μέσο εμβολιασμένο με *Bacillus subtilis*.



Σχήμα 9.3. Υδροπηκτή $Chi_{22.5}FG_{22.5}Gly_{55}$ (αριστερά) και υδροπηκτή $Chi_{20}FG_{20}ChS_5Gly_{55}$ (δεξιά) σε στερεό θρεπτικό μέσο εμβολιασμένο με *Streptococcus thermophilus*.

9.4.2.2. Υδροπηκτές που περιέχουν αντιβιοτικά

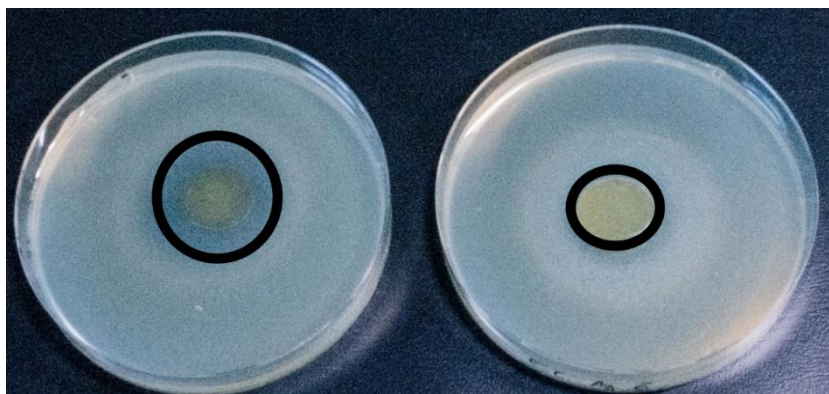
Στα σχήματα 9.4, 9.5 και 9.6 παρουσιάζονται τα αποτελέσματα των αντιμικροβιακών μελετών ύστερα από την ενσωμάτωση των αντιβιοτικών υδροχλωρικής τετρακυκλίνης (Tet.Hyd.) (αριστερά) και αργυρούχου σουλφαδιαζίνης (AgSD) (δεξιά). Τα αποτελέσματα συνοψίζονται στον Πίνακα 9.1.

Πίνακας 9.1. Αντιμικροβιακή δραστηριότητα (mm ζώνης αναστολής) υδροπηκτής $Chi_{22.5}FG_{22.5}Gly_{55}$ με Tet.Hyd. και υδροπηκτής $Chi_{22.5}FG_{22.5}Gly_{55}$ με AgSD έναντι των μικροοργανισμών *Escherichia coli*, *Bacillus subtilis* και *Streptococcus thermophilus*.

	<i>Escherichia coli</i>	<i>Bacillus subtilis</i>	<i>Streptococcus thermophilus</i>
$Chi_{22.5}FG_{22.5}Gly_{55}$ με Tet.Hyd.	5 mm	6 mm	11 mm
$Chi_{22.5}FG_{22.5}Gly_{55}$ με AgSD	0 mm	0 mm	0 mm

Στο Σχήμα 9.4, παρατίθενται τα αποτελέσματα έναντι του μικροοργανισμού *Escherichia coli*. Η μεμβράνη που περιέχει υδροχλωρική τετρακυκλίνη επέδειξε ζώνη

αναστολής 5 mm ενώ αυτή που περιέχει αργγρούχο σουλφαδιαζίνη δεν εμφάνισε αντιμικροβιακή δράση.



Σχήμα 9.4. Υδροπηκτή $Chi_{22.5}FG_{22.5}Gly_{55}$ με Tet.Hyd. (αριστερά) και υδροπηκτή $Chi_{22.5}FG_{22.5}Gly_{55}$ με AgSD (δεξιά) σε στερεό θρεπτικό μέσο εμβολιασμένο με *Escherichia coli*.



Σχήμα 9.5. Υδροπηκτή $Chi_{22.5}FG_{22.5}Gly_{55}$ με Tet.Hyd. (αριστερά) και υδροπηκτή $Chi_{22.5}FG_{22.5}Gly_{55}$ με AgSD (δεξιά) σε στερεό θρεπτικό μέσο εμβολιασμένο με *Bacillus subtilis*.

Στο Σχήμα 9.5, παρατίθενται τα αποτελέσματα για τον μικροοργανισμό *Bacillus subtilis*. Η αριστερή εικόνα αντιστοιχεί στο υλικό που περιέχει Tet.Hyd. και η δεξιά στο υλικό που περιέχει AgSD. Η υδροπηκτή που περιέχει Tet.Hyd. παρουσίασε ζώνη αναστολής 6 mm ενώ η υδροπηκτή με AgSD δεν εμφάνισε αντιμικροβιακή δράση.

Τέλος, στο σχήμα 9.6 εμφανίζονται τα αποτελέσματα της μελέτης για τον μικροοργανισμό *Streptococcus thermophilus* του υλικού με Tet.Hyd. (αριστερά) και με AgSD (δεξιά) ενώ και σε αυτή την περίπτωση αντιμικροβιακή επέδειξε μόνο η υδροπηκτή με Tet.Hyd. , επιδεικνύοντας ζώνη αναστολής 11 mm.



Σχήμα 9.6. Υδροπηκτή $Chi_{22.5}FG_{22.5}Gly_{55}$ με Tet.H (αριστερά) και υδροπηκτή $Chi_{22.5}FG_{22.5}Gly_{55}$ με AgSD (δεξιά) σε στερεό θρεπτικό μέσο εμβολιασμένο με *Streptococcus thermophilus*.

Συμπερασματικά, αποδείχθηκε ότι αντιμικροβιακές ιδιότητες διαθέτει μόνο το υλικό που περιέχει το αντιβιοτικό Tet.Hyd..Αυτό πιθανότατα αποδίδεται στο ότι η υδροχλωρική τετρακυκλίνη είναι υδατοδιαλυτό φάρμακο [57]. Ύστερα από την τοποθέτησή του στο άγαρ και αφού προστεθούν τα 25 μl νερού απελευθερώνεται άμεσα από την υδροπηκτή. Στην περίπτωση της αργυρούχου σουλφαδιαζίνης που δεν είναι υδατοδιαλυτή [57] ίσως η απελευθέρωση της να ξεκινά όταν αρχίζει να αποδομείται η υδροπηκτή.

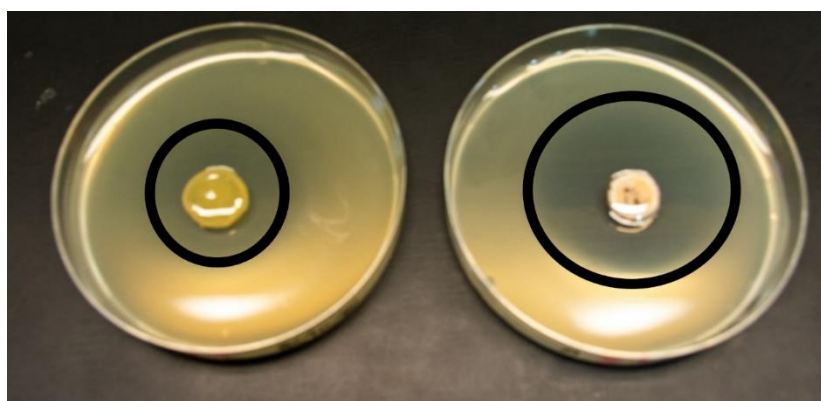
9.4.2.3. Υδροπηκτές που περιέχουν αιθέρια έλαια

Στα σχήματα 9.7, 9.8 και 9.9 παρουσιάζονται τα αποτελέσματα των αντιμικροβιακών μελετών ύστερα από εμβάπτιση των υδροπηκτών σε αιθέρια έλαια θυμαριού και ρίγανης. Τα αποτελέσματα των μελετών συνοψίζονται στον Πίνακα 9.2.

Πίνακας 9.2. Αντιμικροβιακή δραστηριότητα (mm ζώνης αναστολής) υδροπηκτής Chi_{22.5}FG_{22.5}Gly₅₅ ύστερα από προσθήκη θυμαρελαίου και υδροπηκτής Chi_{22.5}FG_{22.5}Gly₅₅ ύστερα από προσθήκη ριγανέλαιου έναντι των μικροοργανισμών *Escherichia coli*, *Bacillus subtilis* και *Streptococcus thermophilus*.

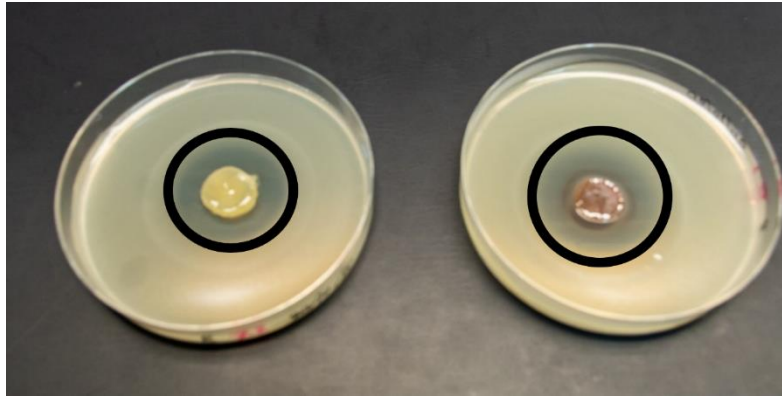
	<i>Escherichia coli</i>	<i>Bacillus subtilis</i>	<i>Streptococcus thermophilus</i>
Chi _{22.5} FG _{22.5} Gly ₅₅ με θυμαρέλαιο	11 mm	6 mm	35 mm (full)
Chi _{22.5} FG _{22.5} Gly ₅₅ με ριγανέλαιο	17 mm	9 mm	35 mm (full)

Στο Σχήμα 9.7, εμφανίζονται τα αποτελέσματα από τη μελέτη αντιμικροβιακής δραστηριότητας της υδροπηκτής ύστερα από εμφύσηση σε αιθέριο έλαιο θυμαριού (αριστερά) και ριγανέλαιο (δεξιά) έναντι του μικροοργανισμού *Escherichia coli*. Η υδροπηκτική που εμφύσηθηκε σε θυμαρέλαιο παρουσίασε ζώνη αναστολής 11 mm ενώ αυτή με το ριγανέλαιο 17 mm.



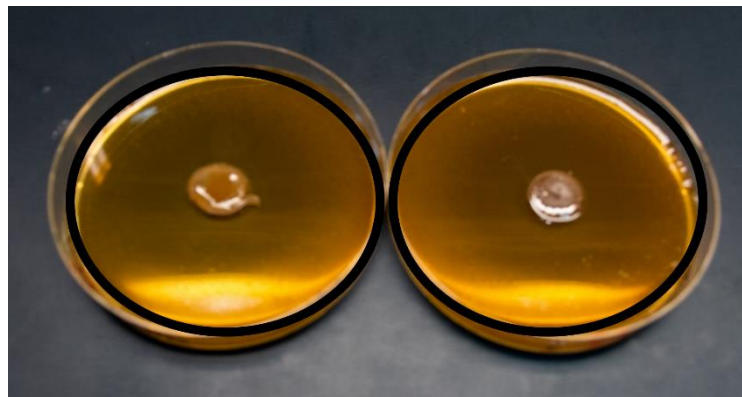
Σχήμα 9.7. Υδροπηκτική Chi_{22.5}FG_{22.5}Gly₅₅ με θυμαρέλαιο (αριστερά) και υδροπηκτική Chi_{22.5}FG_{22.5}Gly₅₅ με ριγανέλαιο (δεξιά) σε στερεό θρεπτικό μέσο εμβολιασμένο με *Escherichia coli*

Στο Σχήμα 9.8, παρουσιάζονται τα αποτελέσματα της μελέτης για τα ίδια υλικά έναντι του μικροοργανισμού *Bacillus subtilis*. Το υλικό που περιέχει θυμαρέλαιο παρουσίασε ζώνη αναστολής 6 mm ενώ αυτό με το ριγανέλαιο 9 mm.



Σχήμα 9.8. Υδροπηκτή $Chi_{22.5}FG_{22.5}Gly_{55}$ με θυμαρέλαιο (αριστερά) και υδροπηκτή $Chi_{22.5}FG_{22.5}Gly_{55}$ με ριγανέλαιο (δεξιά) σε στερεό θρεπτικό μέσο εμβολιασμένο με *Bacillus subtilis*.

Τέλος στο Σχήμα 9.9, απεικονίζονται τα αποτελέσματα της μελέτης των υλικών έναντι του μικροοργανισμού *Streptococcus thermophilus*. Στην περίπτωση αυτή τα υλικά επέδειξαν πολύ ισχυρή αντιμικροβιακή δράση με πλήρη παρεμπόδιση ανάπτυξης του οργανισμού *Streptococcus thermophilus*.



Σχήμα 9.9. Υδροπηκτή $Chi_{22.5}FG_{22.5}Gly_{55}$ με θυμαρέλαιο (αριστερά) και υδροπηκτή $Chi_{22.5}FG_{22.5}Gly_{55}$ με ριγανέλαιο (δεξιά) σε στερεό θρεπτικό μέσο εμβολιασμένο με *Streptococcus thermophilus*.

Καταλήγοντας, η προσθήκη 25 μ l ελαίων αποδείχθηκε ότι προσδίδει αντιμικροβιακές ιδιότητες στα υλικά. Επίσης παρατηρήθηκε ισχυρότερη αντιμικροβιακή δράση στο υλικό που χρησιμοποιήθηκε ριγανέλαιο με εξαίρεση την

περίπτωση του μικροοργανισμού *Streptococcus thermophilus* όπου η ανάπτυξη του μικροοργανισμού παρεμποδίστηκε πλήρως και στις δύο περιπτώσεις ελαίων.

Τέλος συντέθηκαν και υδροπηκτές όπου κατά τη σύνθεση προστέθηκαν ποσότητες των ελαίων αλλά δεν εμφάνισαν αντιμικροβιακή δραστηριότητα (δεν περιλαμβάνονται τα αποτελέσματα). Αυτό πιθανότατα οφείλεται είτε στην εξάτμιση τους καθώς η δοκιμή πραγματοποιήθηκε αρκετό καιρό μετά είτε σε παρεμπόδιση της απελευθέρωσής τους από τις υδροπηκτές. Ίσως με κάποια άλλη μέθοδο μελέτης να επιδείκνυαν και αυτά αντιμικροβιακή δραστηριότητα.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 10. IN VITRO ΕΠΟΙΚΗΣΗ ΤΩΝ ΥΔΡΟΠΗΚΤΩΝ ΑΠΟ ΕΝΔΟΘΗΛΙΑΚΑ ΚΥΤΤΑΡΑ

10.1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Το παρόν κεφάλαιο πραγματεύεται την ικανότητα εποίκησης των υδροπηκτών από ενδοθηλιακά κύτταρα. Τα υλικά που περιγράφονται στην παρούσα διατριβή συντέθηκαν με σκοπό την πιθανή χρήση τους σε βιοϊατρικές εφαρμογές και ειδικότερα στον τομέα της επούλωσης. Όπως έχει ήδη αναφερθεί, το δέρμα αποτελείται από τρεις στιβάδες, την επιδερμίδα, το χόριο και την υποδόρια στιβάδα [6,7]. Το στρώμα του χορίου περιέχει τα αιμοφόρα αγγεία, μέσω των οποίων μεταφέρονται στις στοιβάδες τα απαραίτητα θρεπτικά συστατικά και το οξυγόνο [9,10]. Τα αγγεία που περιέχονται στο στρώμα του χορίου αποτελούνται από δύο τύπους κυττάρων, τα τοιχωματικά και τα ενδοθηλιακά. Τα τοιχωματικά είναι υπεύθυνα για τη σταθεροποίηση, την αναστολή της υποστροφής, τη σύσπαση του αγγείου καθώς και την παραγωγή και εναπόθεση πρωτεϊνών της εξωκυτταρικής μήτρας [342,343] ενώ τα ενδοθηλιακά σχηματίζουν μία λεπτή μονοστιβάδα, στην εσωτερική επιφάνεια των αγγείων και έρχονται σε επαφή με τα συστατικά και τα κύτταρα του αίματος [8].

Κατά τον τραυματισμό καταστρέφεται μέρος των στοιβάδων του δέρματος και προκύπτει η ανάγκη αναγέννησης του κατεστραμμένου ιστού για την εύρυθμη λειτουργία του οργανισμού. Σημαντικό ρόλο στην επούλωση διαδραματίζουν τα ενδοθηλιακά κύτταρα [344] και γι' αυτό μελετήθηκε η ικανότητα εποίκησης τους στις υδροπηκτές.

10.2. ΣΥΝΘΕΣΗ ΤΩΝ ΥΔΡΟΠΗΚΤΩΝ

10.2.1. Πειραματική διαδικασία

Η σύνθεση των υδροπηκτών που χρησιμοποιήθηκαν στις μελέτες εποίκησης ενδοθηλιακών κυττάρων έχει περιγραφεί στα κεφάλαια 6,7 και 8.

10.3. ΜΕΛΕΤΗ ΕΠΟΙΚΗΣΗΣ ΕΝΔΟΘΗΛΙΑΚΩΝ ΚΥΤΤΑΡΩΝ

10.3.1. Πειραματική διαδικασία

10.3.1.1. Καλλιέργεια ενδοθηλιακών κυττάρων απομονωμένων από φλέβα ομφάλιου λώρου

Ενδοθηλιακά κύτταρα από τουλάχιστον 3 ομφάλιους λώρους κάθε φορά απομονώθηκαν [345] και καλλιεργήθηκαν σε τρυβλία των 6 φρεατίων (Corning, 3506), με θρεπτικό μέσο M199 (Gibco, 31150-022) εμπλουτισμένο με 20% FCS, 47μg/ml εκχύλισμα ενδοθηλιακής ανάπτυξης (Endothelial Cell Growth Supplement, ECGS), 4,7U/ml ηπαρίνη (Sigma, H-3149), 1 % πενικιλίνη και 1 % στρεπτομυκίνη και μεταφέρονται σε επωαστήρα των 37 °C. Τα τρυβλία είχαν προηγουμένως καλυφθεί με 25mg/ml κολλαγόνο ουράς αρουραίου τύπου I (Corning, 354236), επωαστεί για 30 λεπτά στους 37 °C και πλυθεί 2 φορές με PBS (dulbecco's Phosphate Buffered Saline, Sigma, D8537). Η ανακαλλιέργεια των κυττάρων γίνεται όταν το 80-90% της επιφάνειας του τρυβλίου είναι καλυμμένο. Τότε πραγματοποιείται μία πλύση με PBS και έπειτα τα κύτταρα επωάζονται για περίπου 1 λεπτό με 0.05 % τρυψίνη, επαναιωρούνται σε πλήρες θρεπτικό μέσο και μεταφέρονται σε νέα τρυβλία με μία αναλογία 1:3.

10.3.1.2. Καλλιέργεια ενδοθηλιακών κυττάρων στις υδροπηκτές

Οι υδροπηκτές που εξετάστηκαν ως προς την εποίκηση ενδοθηλιακών κυττάρων ήταν οι Chi₂₀FG₃₅Gly₄₅, Chi₁₅FG₅₀Gly₃₅, Chi₁₅FG₅₀Gly₃₅(TH) και η Chi₁₃FG₅₀ChS₃Gly₃₄. Για την καλλιέργεια των ενδοθηλιακών κυττάρων στις

υδροπηκτές, αρχικά οι διάφοροι τύποι μεμβρανών κόπηκαν σε τμήματα διαμέτρου 6mm, με τη χρήση του Biopsy punch (Kai medical, BP-60F), αποστειρώθηκαν με χρήση ακτινοβολίας UV, μεταφέρθηκαν σε τρυβλία 24 φρεατίων (SPL, 13485) και πραγματοποιήθηκαν 2 πλύσεις με διάλυμα PBS. Στη συνέχεια, προστέθηκαν 30.000 κύτταρα (μετρήθηκαν με τη χρήση της Neubauer) σε κάθε φρεάτιο με 1ml θρεπτικού μέσου. Για να ελεγχθεί η προσκόλληση των ενδοθηλιακών κυττάρων στους διάφορους τύπους μεμβρανών, 4 ώρες μετά την προσθήκη των κυττάρων πραγματοποιήθηκε αλλαγή του θρεπτικού μέσου, ώστε να μετακινηθούν τα κύτταρα που δεν είχαν προσκολληθεί και στη συνέχεια με τη χρήση μικροσκοπίου φθορισμού Leica DM IRBE μετρήθηκε ο αριθμός των προσκολλημένων κυττάρων. Συγκεκριμένα, για κάθε μεμβράνη μετρήθηκε ο αριθμός των κυττάρων σε πέντε οπτικά πεδία με τη χρήση του λογισμικού ImageJ και υπολογίστηκε ο μέσος όρος αυτών για κάθε ανεξάρτητο πείραμα. Πραγματοποιήθηκαν 3 ανεξάρτητα πειράματα και τα δεδομένα αναλύθηκαν με το πρόγραμμα SPSS 22.0 (SPSS, Inc). Οι μεταβλητές με συνεχή δεδομένα εκφράστηκαν ως μέσοι όροι \pm τις τιμές τυπικής απόκλισης ενώ το $p < 0.05$.

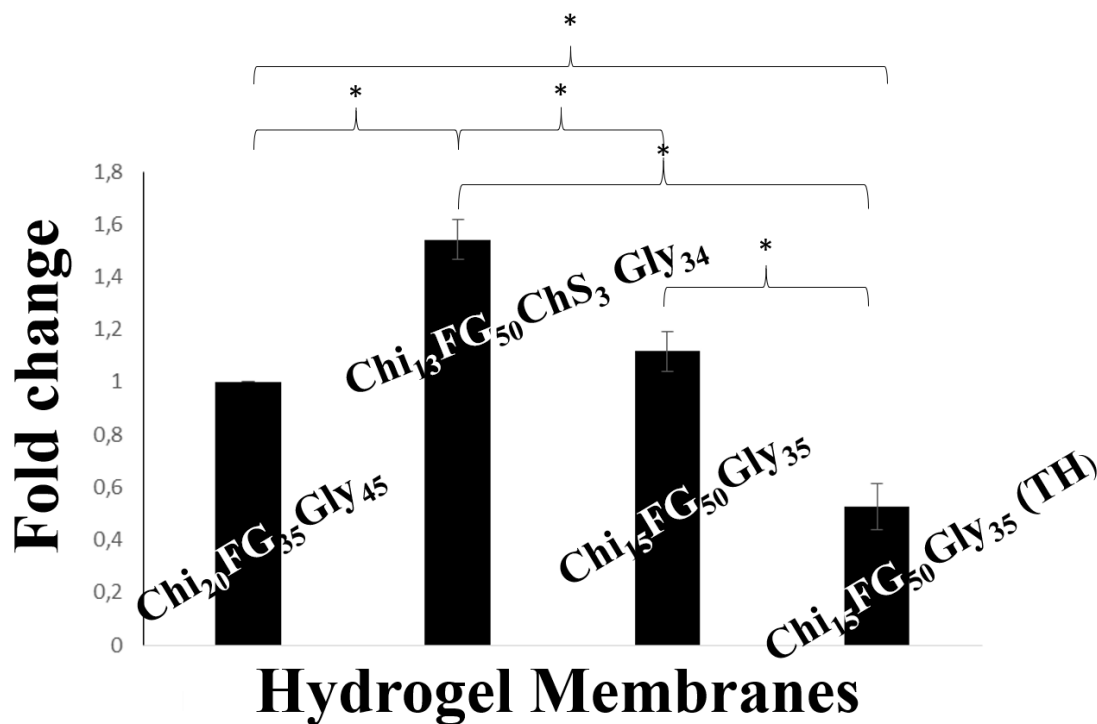
Για την παρατήρηση των ενδοθηλιακών κυττάρων στο μικροσκόπιο φθορισμού χρησιμοποιήθηκαν κύτταρα τα οποία προηγουμένως είχαν διαμολυνθεί με τον λεντι-ιό H2B-mCherry. Ο ιός αυτός σημαίνει τους πυρήνες των κυττάρων προσδίδοντάς τους έναν κόκκινο φθορισμό, χωρίς να επηρεάζει το φαινότυπο ή τη λειτουργία αυτών. Τα ενδοθηλιακά κύτταρα σημάνθηκαν με την προσθήκη καλσεΐνης (eBioscience, 65-0853), μια χρωστική διαπερατή από τη μεμβράνη, η οποία προσδίδει φθορισμό μόνο στα ζωντανά κύτταρα. Για τη χρώση των κυττάρων με προστέθηκαν στο θρεπτικό μέσο των κυττάρων 2 $\mu\text{g/ml}$ καλσεΐνης και επώαστηκαν στους 37 °C για 15 λεπτά.

10.3.2. Αποτελέσματα και συζήτηση

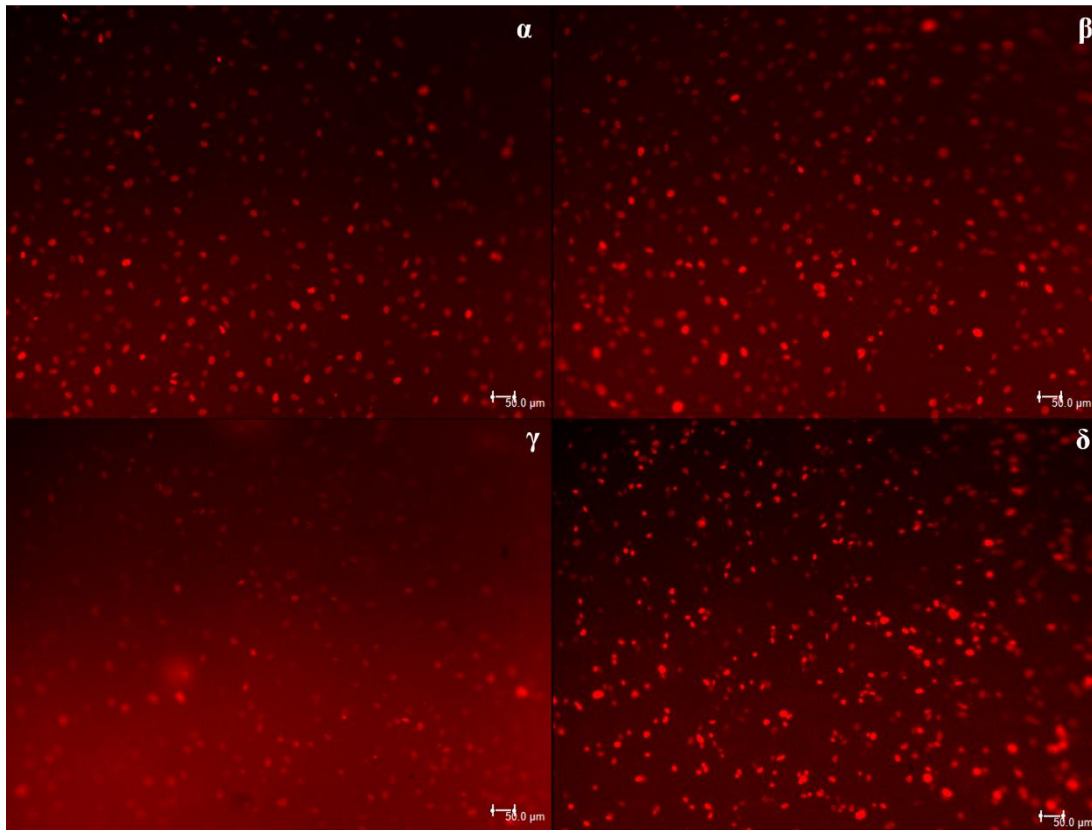
10.3.2.1. Προσκόλληση ενδοθηλιακών κυττάρων στις υδροπηκτές

Στο Σχήμα 10.2, παρουσιάζονται οι εικόνες που ελήφθησαν μέσω μικροσκοπίου φθορισμού. Απεικονίζεται η κυτταρική προσκόλληση στις υδροπηκτές ύστερα από 4 ώρες καλλιέργειας. Ο χρόνος αυτός για τον υπολογισμό της προσκόλλησης επιλέχθηκε διότι μετά τις έξι ώρες ξεκινά ο κυτταρικός πολλαπλασιασμός. Έπειτα από την προσθήκη των κυττάρων στις υδροπηκτές

παρατηρήθηκε προσκόλληση, υποδεικνύοντας επιβίωση των κυττάρων και απουσία κυτταροτοξικών παραγόντων. Από το Σχήμα 10.1, διαφαίνεται ότι η αύξηση της συγκέντρωσης της ζελατίνης ιχθύων στο σύστημα οδήγησε σε αύξηση της κυτταρικής προσκόλλησης. Ωστόσο το υλικό που υπέστη θερμική κατεργασία υπέδειξε χαμηλότερη ικανότητα εποίκησης των ενδοθηλιακών κυττάρων. Επίσης στο υλικό $\text{Chi}_{13}\text{FG}_{50}\text{ChS}_3\text{Gly}_{34}$, που περιέχει χονδροϊτίνη φαίνεται ότι η κυτταρική προσκόλληση είναι αρκετά αυξημένη σε σχέση με όλα τα υπόλοιπα υλικά. Στην ερευνητική εργασία του Ode et al. αναφέρεται ότι παρουσία χονδροϊτίνης βελτιώθηκε η κυτταρική προσκόλληση και ο κυτταρικός πολλαπλασιασμός μεσεγχυματικών βλαστοκυττάρων [346].



Σχήμα 10.1. Αποτελέσματα μελέτης κυτταρικής προσκόλλησης ενδοθηλιακών κυττάρων στις υδροπηκτές $\text{Chi}_{20}\text{FG}_{35}\text{Gly}_{45}$, $\text{Chi}_{13}\text{FG}_{50}\text{ChS}_3\text{Gly}_{34}$, $\text{Chi}_{15}\text{FG}_{50}\text{Gly}_{35}$ και $\text{Chi}_{15}\text{FG}_{50}\text{Gly}_{35}$ (TH) (από αριστερά προς τα δεξιά) ύστερα από καλλιέργεια 4 ωρών.

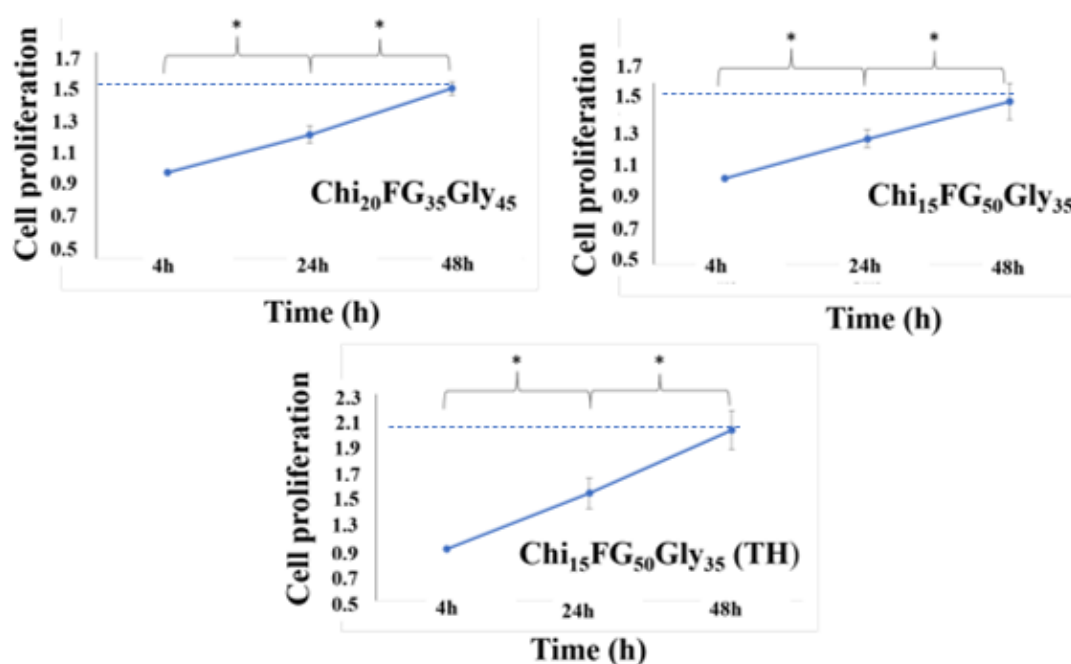


Σχήμα 10.2. Εικόνες όπως ελήφθησαν από μικροσκόπιο φθορισμού ύστερα από εποίκηση ενδοθηλιακών κυττάρων για 4 ώρες στις υδροπηκτές $\text{Chi}_{20}\text{FG}_{35}\text{Gly}_{45}$ (α), $\text{Chi}_{15}\text{FG}_{50}\text{Gly}_{35}$ (β), $\text{Chi}_{15}\text{FG}_{50}\text{Gly}_{35}$ (TH) (γ) και $\text{Chi}_{13}\text{FG}_{50}\text{ChS}_3\text{Gly}_{34}$ (δ).

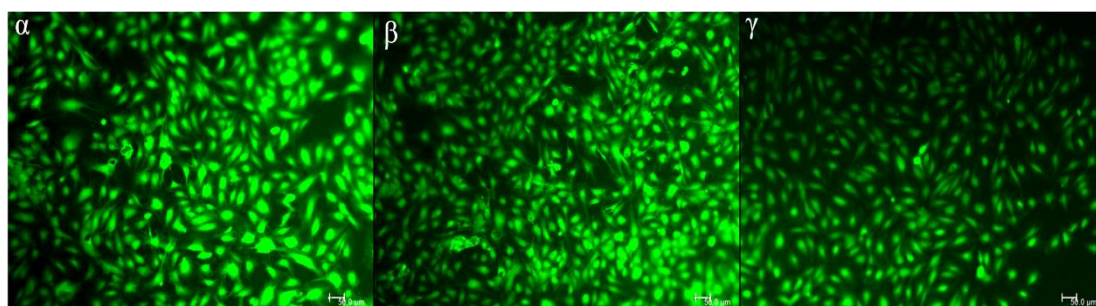
10.3.2.2. Πολλαπλασιασμός ενδοθηλιακών κυττάρων στις υδροπηκτές

Στο Σχήμα 10.3, απεικονίζονται τα αποτελέσματα της μελέτης του κυτταρικού πολλαπλασιασμού ύστερα από 24 και 48 h εποίκησης στις υδροπηκτές. Διαφάνεται ότι ο κυτταρικός πολλαπλασιασμός είναι ελάχιστα αυξημένος στην περίπτωση του υλικού $\text{Chi}_{20}\text{FG}_{35}\text{Gly}_{45}$, που περιέχει χαμηλότερη συγκέντρωση ζελατίνης σε σχέση το υλικό $\text{Chi}_{15}\text{FG}_{50}\text{Gly}_{35}$ ενώ το υλικό $\text{Chi}_{15}\text{FG}_{50}\text{Gly}_{35}$ (TH), που υπέστη θερμική κατεργασία, επέδειξε τον υψηλότερο βαθμό κυτταρικού πολλαπλασιασμού. Δεν περιλαμβάνονται αποτελέσματα από τη μελέτη του κυτταρικού πολλαπλασιασμού για την υδροπηκτική $\text{Chi}_{13}\text{FG}_{50}\text{ChS}_3\text{Gly}_{34}$, που περιέχει χονδροϊτίνη, λόγω της άμεσης αποδόμησής της που κατέστησε αδύνατο τον υπολογισμό. Στο σχήμα 10.4, παρουσιάζονται οι εικόνες που ελήφθησαν από μικροσκόπιο φθορισμού και

απεικονίζουν την κυτταρικό πολλαπλασιασμό στις υδροπηκτές Chi₂₀FG₃₅Gly₄₅, Chi₁₅FG₅₀Gly₃₅ και Chi₁₅FG₅₀Gly₃₅ (TH).

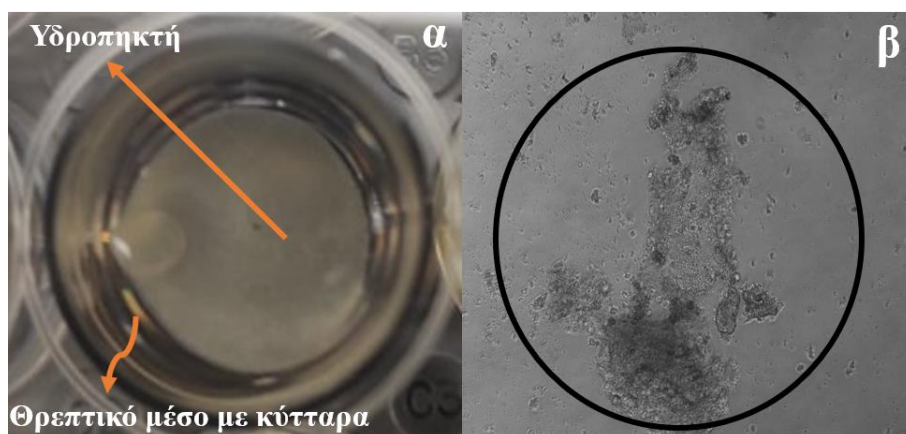


Σχήμα 10.3. Αποτελέσματα μελέτης κυτταρικού πολλαπλασιασμού ύστερα από καλλιέργεια ενδοθηλιακών κυττάρων 24 και 48 ωρών στις υδροπηκτές.



Σχήμα 10.4. Εικόνες όπως ελήφθησαν από μικροσκόπιο φθορισμού ύστερα από εποίκηση ενδοθηλιακών κυττάρων για 48 ώρες στις υδροπηκτές Chi₂₀FG₃₅Gly₄₅ (α), Chi₁₅FG₅₀Gly₃₅ (β) και Chi₁₅FG₅₀Gly₃₅ (TH) (γ).

Όπως φαίνεται και στο Σχήμα 10.5.β, παρατηρώντας το μέρος που δεν καλύπτει η μεμβράνη φαίνονται κάποια θραύσματα πέραν των κυττάρων τα οποία πιθανότατα οφείλονται στην αποδόμηση του υλικού.



Σχήμα 10.5. Υδροπηκτή $\text{Chi}_{13}\text{FG}_{50}\text{ChS}_3\text{Gly}_{34}$ σε θρεπτικό μέσο με ενδοθηλιακά κύτταρα (α) και εικόνα οπτικού μικροσκοπίου από το θρεπτικό μέσο περίξ της υδροπηκτής (β).

Συνοψίζοντας, τα αποτελέσματα του κυτταρικού πολλαπλασιασμού παρουσιάζουν ακριβώς αντίθετη συμπεριφορά από αυτά της κυτταρικής προσκόλλησης. Αν και από τη μελέτη της κυτταρικής προσκόλλησης προέκυψε ότι τόσο η αύξηση της συγκέντρωσης της ζελατίνης όσο και η ενσωμάτωση της χονδροϊτίνης στο σύστημα οδήγησε σε αυξημένη κυτταρική προσκόλληση, στην περίπτωση του πολλαπλασιασμού υψηλότερο βαθμό κυτταρικού πολλαπλασιασμού επέδειξε το υλικό $\text{Chi}_{15}\text{FG}_{50}\text{Gly}_{35}(\text{TH})$, που υπέστη θερμική κατεργασία. Αυτό πιθανότατα οφείλεται στο χαμηλό ρυθμό αποδόμησης που παρουσίασε το υλικό $\text{Chi}_{15}\text{FG}_{50}\text{Gly}_{35}(\text{TH})$, αποτρέποντας έτσι την αποκόλληση τμημάτων και υποστηρίζοντας αποτελεσματικότερα τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 11. ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ ΚΑΙ ΜΕΛΛΟΝΤΙΚΟΙ ΣΤΟΧΟΙ

11.1. ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

Εφαρμόζοντας μια μέθοδο δημιουργίας σταυροδεσμών είναι δύσκολο να ληφθούν υλικά που να καλύπτουν πλήρως τις απαιτήσεις των διαφόρων εφαρμογών [150]. Η συνδυαστική χρήση δύο ή παραπάνω μεθόδων δημιουργίας σταυροδεσμών μπορεί να βελτιώσει την ποιότητα του τελικού προϊόντος, αξιοποιώντας τα πλεονεκτήματα της κάθε μιας. Για παράδειγμα η εφαρμογή μιας μεθόδου δημιουργίας σταυροδεσμών μπορεί να βελτιώνει τις μηχανικές ιδιότητες ενώ μια άλλη μέθοδος να βελτιώνει τον ρυθμό αποδόμησης του υλικού.

Γενικότερα, προτείνεται η φυσική δημιουργία σταυροδεσμών, ειδικά όταν πρόκειται τα υλικά να χρησιμοποιηθούν σε βιοϊατρικές εφαρμογές. Η δημιουργία σταυροδεσμών με χημικές μεθόδους προϋποθέτει τη χρήση διασταυρωτή, οργανικών διαλυτών και άλλων αντιδραστηρίων που τις περισσότερες φορές προκαλούν προβλήματα κυτταροτοξικότητας. Αυτό δυσχεραίνει αρκετά τη σύνθεση των υλικών, η οποία πρέπει να είναι απλή, επαναλήψιμη, οικονομικά συμφέρουσα και να εφαρμόζεται σε μεγάλη κλίμακα. Οι φυσικές μέθοδοι δημιουργίας σταυροδεσμών είναι εξίσου αποτελεσματικές δίνοντας τη δυνατότητα σύνθεσης καινοτόμων υλικών ενώ ταυτόχρονα παραμένουν περιβαλλοντικά φιλικές.

Στο Κεφάλαιο 5 περιγράφηκε η σύνθεση και ο χαρακτηρισμός υδροπηκτών χιτοζάνης-ζελατίνης ιχθύων. Τα υλικά ήταν αρκετά ψαθυρά με ελάχιστη ικανότητα παραμόρφωσης και αποδομούνταν άμεσα σε υδατικό διάλυμα. Κρίθηκαν ακατάλληλα για χρήση ως επιθέματα τραυμάτων γι' αυτό και δεν πραγματοποιήθηκαν μελέτες απορρόφησης νερού, αποδόμησης και *in vitro* επούλωσης ενδοθηλιακών κυττάρων. Όλοι οι υπόλοιποι χαρακτηρισμοί πραγματοποιήθηκαν κανονικά ώστε να υπάρχει δυνατότητα σύγκρισης με τα υπόλοιπα υλικά.

Στο Κεφάλαιο 6 περιγράφεται η σύνθεση και ο χαρακτηρισμός υδροπηκτών χιτοζάνης-ζελατίνης ιχθύων-γλυκερόλης. Πιο συγκεκριμένα πραγματεύεται την αριστοποίηση των ιδιοτήτων των υλικών του προηγούμενου κεφαλαίου. Ύστερα από την προσθήκη της γλυκερόλης στα συστήματα, βελτιώθηκε ο ρυθμός αποδόμησης των

υλικών με ταυτόχρονη διατήρηση του σχήματος της υδροπηκτής. Πραγματοποιήθηκαν επίσης μελέτες απορρόφησης νερού μελετώντας τόσο την επίδραση της συγκέντρωσης της ζελατίνης στο σύστημα όσο και της γλυκερόλης. Από τη μελέτη προέκυψε ότι η αύξηση της συγκέντρωσης της γλυκερόλης οδηγεί σε μείωση της απορρόφησης νερού, κάτι το οποίο αναφέρεται για πρώτη φορά και είναι πιθανό να οφείλεται στη μείωση του ελεύθερου όγκου (παρεμπόδιση των αλυσίδων να διογκωθούν) λόγω των αλληλεπιδράσεων (δεσμοί υδρογόνου) των πολυμερών με τον πλαστικοποιητή. Μέσω των *in vitro* μελετών εποίκησης ενδοθηλιακών κυττάρων στις υδροπηκτές, αποδείχθηκε ότι τα κύτταρα επιβιώνουν, προσκολλώνται και πολλαπλασιάζονται. Μάλιστα η αύξηση της συγκέντρωσης της ζελατίνης φαίνεται ότι οδηγεί σε αυξημένο βαθμό κυτταρικής προσκόλλησης. Οι υδροπηκτές ήταν μη ψαθυρές με ικανότητα προσαρμογής σε διάφορα σημεία του σώματος. Τέλος, μέσω της δυναμικής μηχανικής ανάλυσης, για πρώτη φορά μελετήθηκε η αναμιξιμότητα και η μηχανική απόκριση τέτοιων συστημάτων στις διάφορες αναλογίες που χρησιμοποιήθηκαν.

Στο Κεφάλαιο 7 μελετήθηκε η επίδραση της θερμικής κατεργασίας στο υλικό Chi₁₅FG₅₀Gly₃₅ του 6 κεφαλαίου, η οποία δεν έχει μελετηθεί ξανά στη διεθνή βιβλιογραφία. Ύστερα από τη θερμική κατεργασία παρατηρήθηκε μείωση του ρυθμού αποδόμησης και της ικανότητας απορρόφησης νερού. Επίσης μελετήθηκε η επίδραση του νερού ως πλαστικοποιητή στο υλικό μέσω δυναμικής μηχανικής ανάλυσης, καταδεικνύοντας ότι αυξάνεται η T_g του συστήματος αμέσως μετά τη θερμική κατεργασία. Τέλος, από τις *in vitro* μελέτες, αποδείχθηκε ότι το υλικό είναι βιοσυμβατό, παρουσιάζοντας χαμηλότερη ικανότητα προσκόλλησης των κυττάρων. Ωστόσο, παρατηρήθηκε αυξημένος κυτταρικός πολλαπλασιασμός, που πιθανότατα οφείλεται στο χαμηλό ρυθμό αποδόμησης του υλικού.

Στο κεφάλαιο 8 περιγράφεται η σύνθεση και ο χαρακτηρισμός υδροπηκτών χιτοζάνης-ζελατίνης ιχθύων-χονδροϊτίνης-γλυκερόλης. Στο κεφάλαιο αυτό πέραν της ανάπτυξης μεμβρανών περιγράφεται και η ανάπτυξη πορώδους ικρίωματος ύστερα από λυοφιλίωση, ακολουθούμενη από θερμική κατεργασία. Η ενσωμάτωση της χονδροϊτίνης, οδήγησε σε αύξηση της απορροφητικής ικανότητας νερού και αύξηση του ρυθμού αποδόμησης των υλικών. Επίσης από τις *in vitro* μελέτες παρατηρήθηκε σημαντική αύξηση της κυτταρικής προσκόλλησης. Τέλος το πορώδες ικρίωμα παρουσίασε πολύ χαμηλό ρυθμό αποδόμησης (23 % σε δύο μήνες), αποτέλεσμα πολύ σημαντικό αν αναλογιστεί κανείς ότι δεν χρησιμοποιήθηκαν χημικοί διασταυρωτές.

Δεν κατέστη δυνατή η *in vitro* μελέτη λόγω της αδιαφάνειας του υλικού, αλλά οι πρώτες εκτιμήσεις δείχνουν ότι είναι βιοσυμβατό και ικανό να χρησιμοποιηθεί σε βιοϊατρικές εφαρμογές.

Στο Κεφάλαιο 9 περιγράφεται η αντιμικροβιακή δραστικότητα των υδροπηκτών. Αφού εξετάστηκε μέρος των υλικών των κεφαλαίων 7 και 9, αποδείχθηκε ότι δεν διαθέτουν αντιμικροβιακές ιδιότητες. Ύστερα από την ενσωμάτωση αντιβιοτικών (υδροχλωρική τετρακυκλίνη και αργυρούχος σουλφαδιαζίνη), αποδείχθηκε ότι στην περίπτωση της υδροχλωρικής τετρακυκλίνης το υλικό διαθέτει αντιμικροβιακή δράση έναντι των εξετασθέντων μικροοργανισμών που πιθανότατα αποδίδεται στο ότι η υδροχλωρική τετρακυκλίνη είναι υδατοδιαλυτή και αποδεσμεύεται εύκολα από την υδροπηκτή. Τέλος εξετάστηκε η αντιμικροβιακή δραστικότητα υδροπηκτής ύστερα από απόρριψη σταγόνας (25 μ l) αιθέριου ελαίου ρίγανης και θυμαριού και αποδείχθηκε ότι προσδίδεται στο υλικό αντιμικροβιακή δράση έναντι των εξετασθέντων μικροοργανισμών.

Στο Κεφάλαιο 10, όπως έχει ήδη αναφερθεί, μελετήθηκε η ικανότητα επόικησης ενδοθηλιακών κυττάρων στις υδροπηκτές. Τα αποτελέσματα επέδειξαν επιβίωση των κυττάρων σε όλες τις υδροπηκτές που δοκιμάστηκαν. Τόσο η αύξηση της συγκέντρωσης της ζελατίνης όσο και η ενσωμάτωση της χονδροϊτίνης, οδήγησε σε αυξημένη κυτταρική προσκόλληση. Μεγαλύτερο βαθμό κυτταρικού πολλαπλασιασμού επέδειξε το υλικό που υπέστη θερμική κατεργασία και παρουσιάζει τον χαμηλότερο ρυθμό αποδόμησης.

Στο πλαίσιο της παρούσας διατριβής, αναπτύχθηκαν επιτυχώς ικριώματα πολυμερικών υδροπηκτών για βιοϊατρικές εφαρμογές. Τα ικριώματα μπορούν να χρησιμοποιηθούν στον τομέα της επούλωσης τραυμάτων παρέχοντας κατάλληλες συνθήκες για την επούλωση.

11.2. ΜΕΛΛΟΝΤΙΚΟΙ ΣΤΟΧΟΙ

Ως συνέχεια της έρευνας που εκπονήθηκε στα πλαίσια της παρούσας διατριβής προτείνονται οι τομείς για περαιτέρω μελέτη:

- Μελέτη του ρυθμού μετάδοσης υδρατμών (WVTR) του συνόλου των υλικών.
- Μελέτη των αλληλεπιδράσεων μεταξύ αντιβιοτικών και υδροπηκτής και του ρυθμού αποδέσμευσης των φαρμάκων μέσω φασματοσκοπικών τεχνικών.
- In vitro μελέτη εποίκησης ενδοθηλιακών κυττάρων στο πορώδες πολυμερικό ικρίωμα (μελέτη κυτταρικής προσκόλλησης, πολλαπλασιασμού και μετανάστευσης).
- Περαιτέρω διερεύνηση της μειωμένης κυτταρικής προσκόλλησης στην θερμικά κατεργασμένη υδροπηκτή Chi₁₅FG₅₀Gly₃₅(TH).
- In vivo αξιολόγηση των πολυμερικών ικριωμάτων (ιστολογική ανάλυση).
- Μελέτη αυτοδιάχυσης και δονήσεων των πολυμερικών αλυσίδων και τμημάτων τους μέσω σκέδασης νετρονίων (IQNS) για τον προσδιορισμό και την απεικόνιση της διαμόρφωσης τους.

BIBΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

1. Nussbaum, S.R.; Carter, M.J.; Fife, C.E.; DaVanzo, J.; Haught, R.; Nusgart, M.; Cartwright, D. An Economic Evaluation of the Impact, Cost, and Medicare Policy Implications of Chronic Nonhealing Wounds. *Value in Health* **2018**, *21*, 27-32, doi:<https://doi.org/10.1016/j.jval.2017.07.007>.
2. Human Wounds and Its Burden: An Updated Compendium of Estimates. **2019**, *8*, 39-48, doi:10.1089/wound.2019.0946.
3. Shevchenko, R.V.; James, S.L.; James, S.E. A review of tissue-engineered skin bioconstructs available for skin reconstruction. *J R Soc Interface* **2010**, *7*, 229-258, doi:10.1098/rsif.2009.0403.
4. Alemdaroğlu, C.; Değim, Z.; Çelebi, N.; Zor, F.; Öztürk, S.; Erdoğan, D. An investigation on burn wound healing in rats with chitosan gel formulation containing epidermal growth factor. *Burns : journal of the International Society for Burn Injuries* **2006**, *32*, 319-327, doi:<https://doi.org/10.1016/j.burns.2005.10.015>.
5. <https://www.compoundchem.com/2015/09/24/green-chemistry/>. Available online: (accessed on
6. Balasubramani, M.; Kumar, T.R.; Babu, M. Skin substitutes: a review. *Burns : journal of the International Society for Burn Injuries* **2001**, *27*, 534-544, doi:10.1016/s0305-4179(01)00018-3.
7. Metcalfe, A.D.; Ferguson, M.W.J. Bioengineering skin using mechanisms of regeneration and repair. *Biomaterials* **2007**, *28*, 5100-5113, doi:<https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2007.07.031>.
8. Reiterer, M.; Branco, C.M. Endothelial cells and organ function: applications and implications of understanding unique and reciprocal remodelling. **2020**, 287, 1088-1100, doi:<https://doi.org/10.1111/febs.15143>.
9. Kamoun, E.A.; Kenawy, E.-R.S.; Chen, X. A review on polymeric hydrogel membranes for wound dressing applications: PVA-based hydrogel dressings. *Journal of Advanced Research* **2017**, *8*, 217-233, doi:<https://doi.org/10.1016/j.jare.2017.01.005>.
10. Potts, R. Skin Barrier: Principles of Percutaneous Absorption. *Archives of Dermatology* **1997**, *133*, 924-924, doi:10.1001/archderm.1997.03890430146031 %J Archives of Dermatology.
11. Böttcher-Haberzeth, S.; Biedermann, T.; Reichmann, E. Tissue engineering of skin. *Burns : journal of the International Society for Burn Injuries* **2010**, *36*, 450-460, doi:<https://doi.org/10.1016/j.burns.2009.08.016>.
12. Boucard, N.; Viton, C.; Agay, D.; Mari, E.; Roger, T.; Chancerelle, Y.; Domard, A. The use of physical hydrogels of chitosan for skin regeneration following third-degree burns. *Biomaterials* **2007**, *28*, 3478-3488, doi:<https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2007.04.021>.
13. Clark, R.A.F.; Ghosh, K.; Tonnesen, M.G. Tissue Engineering for Cutaneous Wounds. *Journal of Investigative Dermatology* **2007**, *127*, 1018-1029, doi:<https://doi.org/10.1038/sj.jid.5700715>.
14. Sachs, D.L.; Voorhees, J.J. Age-Reversing Drugs and Devices in Dermatology. **2011**, *89*, 34-43, doi:<https://doi.org/10.1038/clpt.2010.259>.
15. Wikipedia. 3D medical animation skin layers.jpg. Available online: https://commons.wikimedia.org/wiki/File:3D_medical_animation_skin_layers.jpg (accessed on 24/11/2021).

16. Yildirimer, L.; Thanh, N.T.K.; Seifalian, A.M. Skin regeneration scaffolds: a multimodal bottom-up approach. *Trends in Biotechnology* **2012**, *30*, 638-648, doi:<https://doi.org/10.1016/j.tibtech.2012.08.004>.
17. Midwood, K.; Williams, L.; Schwarzbauer, J. Tissue repair and the dynamics of the extracellular matrix. **2004**, *36*, 1031-1037.
18. Boateng, J.S.; Matthews, K.H.; Stevens, H.N.E.; Eccleston, G.M. Wound Healing Dressings and Drug Delivery Systems: A Review. *Journal of Pharmaceutical Sciences* **2008**, *97*, 2892-2923, doi:<https://doi.org/10.1002/jps.21210>.
19. Gurtner, G.C.; Werner, S.; Barrandon, Y.; Longaker, M.T. Wound repair and regeneration. *Nature* **2008**, *453*, 314-321, doi:10.1038/nature07039.
20. Eming, S.A.; Krieg, T.; Davidson, J.M. Inflammation in Wound Repair: Molecular and Cellular Mechanisms. *Journal of Investigative Dermatology* **2007**, *127*, 514-525, doi:<https://doi.org/10.1038/sj.jid.5700701>.
21. Branski, L.K.; Pereira, C.T.; Herndon, D.N.; Jeschke, M.G. Gene therapy in wound healing: present status and future directions. *Gene Therapy* **2007**, *14*, 1-10, doi:10.1038/sj.gt.3302837.
22. Morgado, P.I.; Aguiar-Ricardo, A.; Correia, I.J. Asymmetric membranes as ideal wound dressings: An overview on production methods, structure, properties and performance relationship. *Journal of Membrane Science* **2015**, *490*, 139-151, doi:<https://doi.org/10.1016/j.memsci.2015.04.064>.
23. Auger, F.A.; Lacroix, D.; Germain, L. Skin Substitutes and Wound Healing. *Skin Pharmacology and Physiology* **2009**, *22*, 94-102, doi:10.1159/000178868.
24. Liu, H.; Wang, C.; Li, C.; Qin, Y.; Wang, Z.; Yang, F.; Li, Z.; Wang, J. A functional chitosan-based hydrogel as a wound dressing and drug delivery system in the treatment of wound healing. *RSC Advances* **2018**, *8*, 7533-7549, doi:10.1039/C7RA13510F.
25. Ousey, K., McIntosh, C. *Lower Extremity Wounds: A Problem-Based Approach*; Wiley: 2009.
26. Strodbeck, F. Physiology of wound healing. *Newborn and Infant Nursing Reviews* **2001**, *1*, 43-52, doi:<https://doi.org/10.1053/nbin.2001.23176>.
27. Shaw, T.J.; Martin, P. Wound repair at a glance. **2009**, *122*, 3209-3213, doi:10.1242/jcs.031187 %J Journal of Cell Science.
28. Tsirogianni, A.K.; Moutsopoulos, N.M.; Moutsopoulos, H.M. Wound healing: Immunological aspects. *Injury* **2006**, *37*, S5-S12, doi:<https://doi.org/10.1016/j.injury.2006.02.035>.
29. Thompson, B.J. Developmental control of cell growth and division in Drosophila. *Current Opinion in Cell Biology* **2010**, *22*, 788-794, doi:<https://doi.org/10.1016/j.ceb.2010.08.018>.
30. Neufeld, T.P.; de la Cruz, A.F.A.; Johnston, L.A.; Edgar, B.A. Coordination of Growth and Cell Division in the Drosophila Wing. *Cell* **1998**, *93*, 1183-1193, doi:[https://doi.org/10.1016/S0092-8674\(00\)81462-2](https://doi.org/10.1016/S0092-8674(00)81462-2).
31. Grewal, S.S.; Edgar, B.A. Controlling cell division in yeast and animals: does size matter? *J Biol* **2003**, *2*, 5-5, doi:10.1186/1475-4924-2-5.
32. Conlon, I.; Raff, M. Size Control in Animal Development. *Cell* **1999**, *96*, 235-244, doi:[https://doi.org/10.1016/S0092-8674\(00\)80563-2](https://doi.org/10.1016/S0092-8674(00)80563-2).
33. Enoch, S.; Leaper, D.J. Basic science of wound healing. *Surgery (Oxford)* **2008**, *26*, 31-37, doi:<https://doi.org/10.1016/j.mpsur.2007.11.005>.

34. Rodrigues, A.P.; Saraiva Sanchez, E.M.; da Costa, A.C.; Moraes, Â.M. The influence of preparation conditions on the characteristics of chitosan-alginate dressings for skin lesions. **2008**, *109*, 2703-2710, doi:<https://doi.org/10.1002/app.28203>.
35. Cole-King, A.; Harding, K.G. Psychological Factors and Delayed Healing in Chronic Wounds. **2001**, *63*, 216-220.
36. Vileikyte, L. Stress and wound healing. *Clinics in Dermatology* **2007**, *25*, 49-55, doi:<https://doi.org/10.1016/j.clindermatol.2006.09.005>.
37. McDaniel, J.C.; Browning, K.K. Smoking, chronic wound healing, and implications for evidence-based practice. *J Wound Ostomy Continence Nurs* **2014**, *41*, 415-423; quiz E411-412, doi:10.1097/won.0000000000000057.
38. Guo, S.; DiPietro, L.A. Factors Affecting Wound Healing. **2010**, *89*, 219-229, doi:10.1177/0022034509359125.
39. Parrish, W.R.; Roides, B. Physiology of Blood Components in Wound Healing: an Appreciation of Cellular Co-Operativity in Platelet Rich Plasma Action. 2017.
40. Majno, G. *The healing hand : man and wound in the ancient world*; Harvard University Press: Cambridge, Mass., 1975.
41. Temkin, O. Greek medicine as science and craft. *Isis; an international review devoted to the history of science and its cultural influences* **1953**, *44*, 213-225, doi:10.1086/348221.
42. Dhivya, S.; Padma, V.V.; Santhini, E. Wound dressings - a review. *Biomedicine (Taipei)* **2015**, *5*, 22-22, doi:10.7603/s40681-015-0022-9.
43. Winter, G.D. Formation of the Scab and the Rate of Epithelization of Superficial Wounds in the Skin of the Young Domestic Pig. *Nature* **1962**, *193*, 293-294, doi:10.1038/193293a0.
44. Edwards, J.V.; Yager, D.R.; Cohen, I.K.; Diegelmann, R.F.; Montante, S.; Bertoniere, N.; Bopp, A.F. Modified cotton gauze dressings that selectively absorb neutrophil elastase activity in solution. **2001**, *9*, 50-58, doi:<https://doi.org/10.1046/j.1524-475x.2001.00050.x>.
45. Stashak, T.S.; Farstvedt, E.; Othic, A. Update on wound dressings: Indications and best use. *Clinical Techniques in Equine Practice* **2004**, *3*, 148-163, doi:<https://doi.org/10.1053/j.ctep.2004.08.006>.
46. Abbasipour, M.; Mirjalili, M.; Khajavi, R.; Majidi, M.M. Coated Cotton Gauze with Ag/ZnO/chitosan Nanocomposite as a Modern Wound Dressing. **2014**, *9*, 155892501400900114, doi:10.1177/155892501400900114.
47. Kearney, J.N. Clinical evaluation of skin substitutes. *Burns : journal of the International Society for Burn Injuries* **2001**, *27*, 545-551, doi:[https://doi.org/10.1016/S0305-4179\(01\)00020-1](https://doi.org/10.1016/S0305-4179(01)00020-1).
48. van der Veen, V.C.; van der Wal, M.B.A.; van Leeuwen, M.C.E.; Ulrich, M.M.W.; Middelkoop, E. Biological background of dermal substitutes. *Burns : journal of the International Society for Burn Injuries* **2010**, *36*, 305-321, doi:<https://doi.org/10.1016/j.burns.2009.07.012>.
49. Negut, I.; Dorcioman, G.; Grumezescu, V. Scaffolds for Wound Healing Applications. *Polymers (Basel)* **2020**, *12*, 2010, doi:10.3390/polym12092010.
50. Talikowska, M.; Fu, X.; Lisak, G. Application of conducting polymers to wound care and skin tissue engineering: A review. *Biosensors and Bioelectronics* **2019**, *135*, 50-63, doi:<https://doi.org/10.1016/j.bios.2019.04.001>.

51. Jannesari, M.; Varshosaz, J.; Morshed, M.; Zamani, M. Composite poly(vinyl alcohol)/poly(vinyl acetate) electrospun nanofibrous mats as a novel wound dressing matrix for controlled release of drugs. *Int J Nanomedicine* **2011**, *6*, 993-1003, doi:10.2147/IJN.S17595.
52. Day, R.M. *Advanced Wound Repair Therapies - 1st Edition* Farrar, D., Ed.; Cambridge,UK, 2011; pp. 155-173.
53. Field, C.K.; Kerstein, M.D. Overview of wound healing in a moist environment. *The American Journal of Surgery* **1994**, *167*, S2-S6, doi:[https://doi.org/10.1016/0002-9610\(94\)90002-7](https://doi.org/10.1016/0002-9610(94)90002-7).
54. Agarwal, A., McAnulty, J. F., Schurr, M. J., Murphy, C. J., Abbott, N. L. *Advanced Wound Repair Therapies*; Farrar, D., Ed.; Cambridge, UK, 2011; pp. 186–208.
55. Ovington, L.G. Advances in wound dressings. *Clinics in Dermatology* **2007**, *25*, 33-38, doi:<https://doi.org/10.1016/j.clindermatol.2006.09.003>.
56. Elsner, J.J.; Shefy-Peleg, A.; Zilberman, M. Novel biodegradable composite wound dressings with controlled release of antibiotics: Microstructure, mechanical and physical properties. **2010**, *93B*, 425-435, doi:<https://doi.org/10.1002/jbm.b.31599>.
57. Ma, Y.; Xin, L.; Tan, H.; Fan, M.; Li, J.; Jia, Y.; Ling, Z.; Chen, Y.; Hu, X. Chitosan membrane dressings toughened by glycerol to load antibacterial drugs for wound healing. *Materials Science and Engineering: C* **2017**, *81*, 522-531, doi:<https://doi.org/10.1016/j.msec.2017.08.052>.
58. Howe, L.M. *Soft Tissue Surgery, An Issue of Veterinary Clinics of North America: Small Animal Practice*; Elsevier: Amsterdam, 2015.
59. S, S.; A, S.K.; Nair, P.D.; Thomas, L.V. A nonadherent chitosan-polyvinyl alcohol absorbent wound dressing prepared via controlled freeze-dry technology. *International Journal of Biological Macromolecules* **2020**, *150*, 129-140, doi:<https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2020.01.292>.
60. Salehi, M.; Niyakan, M.; Ehterami, A.; Haghi-Daredeh, S.; Nazarnezhad, S.; Abbaszadeh-Goudarzi, G.; Vaez, A.; Hashemi, S.F.; Rezaei, N.; Mousavi, S.R. Porous electrospun poly(ϵ -caprolactone)/gelatin nanofibrous mat containing cinnamon for wound healing application: in vitro and in vivo study. *Biomedical Engineering Letters* **2020**, *10*, 149-161, doi:10.1007/s13534-019-00138-4.
61. Abdelrahman, T.; Newton, H. Wound dressings: principles and practice. *Surgery (Oxford)* **2011**, *29*, 491-495, doi:<https://doi.org/10.1016/j.mpsur.2011.06.007>.
62. Ruszczak, Z. Effect of collagen matrices on dermal wound healing. *Advanced Drug Delivery Reviews* **2003**, *55*, 1595-1611, doi:<https://doi.org/10.1016/j.addr.2003.08.003>.
63. Simões, D.; Miguel, S.P.; Ribeiro, M.P.; Coutinho, P.; Mendonça, A.G.; Correia, I.J. Recent advances on antimicrobial wound dressing: A review. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics* **2018**, *127*, 130-141, doi:<https://doi.org/10.1016/j.ejpb.2018.02.022>.
64. Chai, Q.; Jiao, Y.; Yu, X. Hydrogels for Biomedical Applications: Their Characteristics and the Mechanisms behind Them. *Gels* **2017**, *3*, 6, doi:10.3390/gels3010006.

65. Sood, A.; Granick, M.S.; Tomaselli, N.L. Wound Dressings and Comparative Effectiveness Data. *Adv Wound Care (New Rochelle)* **2014**, *3*, 511-529, doi:10.1089/wound.2012.0401.
66. Tang, J.D.; Mura, C.; Lampe, K.J. Stimuli-Responsive, Pentapeptide, Nanofiber Hydrogel for Tissue Engineering. *Journal of the American Chemical Society* **2019**, *141*, 4886-4899, doi:10.1021/jacs.8b13363.
67. Liu, W.; Lee, B.-S.; Mieler, W.F.; Kang-Mieler, J.J. Biodegradable Microsphere-Hydrogel Ocular Drug Delivery System for Controlled and Extended Release of Bioactive Aflibercept In Vitro. *Current Eye Research* **2019**, *44*, 264-274, doi:10.1080/02713683.2018.1533983.
68. Sinha, V.; Chakma, S. Advances in the preparation of hydrogel for wastewater treatment: A concise review. *Journal of Environmental Chemical Engineering* **2019**, *7*, 103295, doi:<https://doi.org/10.1016/j.jece.2019.103295>.
69. Barbucci, R. *Hydrogels: Biological Properties and Applications*; Springer: Milan, 2010.
70. Kalia, S. *Polymeric Hydrogels as Smart Biomaterials*; Springer: India, 2016.
71. Slaughter, B.V.; Khurshid, S.S.; Fisher, O.Z.; Khademhosseini, A.; Peppas, N.A. Hydrogels in regenerative medicine. *Adv Mater* **2009**, *21*, 3307-3329, doi:10.1002/adma.200802106.
72. Spicer, C.D. Hydrogel scaffolds for tissue engineering: the importance of polymer choice. *Polymer Chemistry* **2020**, *11*, 184-219, doi:10.1039/C9PY01021A.
73. El-Sherbiny, I.M.; Yacoub, M.H. Hydrogel scaffolds for tissue engineering: Progress and challenges. *Glob Cardiol Sci Pract* **2013**, *2013*, 316-342, doi:10.5339/gcsp.2013.38.
74. Liang, K.; Bae, K.H.; Kurisawa, M. Recent advances in the design of injectable hydrogels for stem cell-based therapy. *Journal of Materials Chemistry B* **2019**, *7*, 3775-3791, doi:10.1039/C9TB00485H.
75. Kousalová, J.; Etrych, T. Polymeric nanogels as drug delivery systems. *Physiological research* **2018**, *67*, S305-s317, doi:10.33549/physiolres.933979.
76. Bjørge, I.M.; Costa, A.M.S.; Silva, A.S.; Vidal, J.P.O.; Nóbrega, J.M.; Mano, J.F. Tuneable spheroidal hydrogel particles for cell and drug encapsulation. *Soft Matter* **2018**, *14*, 5622-5627, doi:10.1039/C8SM00921J.
77. Wakuda, Y.; Nishimoto, S.; Suye, S.-i.; Fujita, S. Native collagen hydrogel nanofibres with anisotropic structure using core-shell electrospinning. *Scientific Reports* **2018**, *8*, 6248, doi:10.1038/s41598-018-24700-9.
78. Yazdi, M.K.; Vatanpour, V.; Taghizadeh, A.; Taghizadeh, M.; Ganjali, M.R.; Munir, M.T.; Habibzadeh, S.; Saeb, M.R.; Ghaedi, M. Hydrogel membranes: A review. *Materials Science and Engineering: C* **2020**, *114*, 111023, doi:<https://doi.org/10.1016/j.msec.2020.111023>.
79. Arefi-Oskoui, S.; Khataee, A.; Safarpour, M.; Orooji, Y.; Vatanpour, V. A review on the applications of ultrasonic technology in membrane bioreactors. *Ultrasonics Sonochemistry* **2019**, *58*, 104633, doi:<https://doi.org/10.1016/j.ultsonch.2019.104633>.
80. Yang, Q.; Adrus, N.; Tomicki, F.; Ulbricht, M. Composites of functional polymeric hydrogels and porous membranes. *Journal of Materials Chemistry* **2011**, *21*, 2783-2811, doi:10.1039/C0JM02234A.
81. Wichterle, O.; LÍM, D. Hydrophilic Gels for Biological Use. *Nature* **1960**, *185*, 117-118, doi:10.1038/185117a0.

82. Gibas, I.; Janik, H. Review: Synthetic Polymer Hydrogels for Biomedical Applications. *Chem. Chem. Technol.* **2010**, *4*, 297-304, doi:10.23939/chcht04.04.297.
83. Lim, F.; Sun, A. Microencapsulated islets as bioartificial endocrine pancreas. **1980**, *210*, 908-910, doi:10.1126/science.6776628 %J Science.
84. I.V. Yannas, P.L.G., C. Huang, F.H. Silver, J.F. Burke. Crosslinked collagen-mucopolysaccharide composite materials. 1981.
85. Biological applications of HEMA hydrogels. Available online: <https://www.cellgs.com/blog/biological-applications-of-hema-hydrogels.html> (accessed on 09/04).
86. Balassa, L.; Prudden, J.J.P.s.I.C.C.C. Chitosan, a wound healing accelerator. **1978**.
87. Gupta, B.; Agarwal, R.; Alam, M.S. Textile-based smart wound dressings. 2010.
88. Razzak, M.T.; Zainuddin; Erizal; Dewi, S.P.; Lely, H.; Taty, E.; Sukirno. The characterization of dressing component materials and radiation formation of PVA–PVP hydrogel. *Radiation Physics and Chemistry* **1999**, *55*, 153-165, doi:[https://doi.org/10.1016/S0969-806X\(98\)00320-X](https://doi.org/10.1016/S0969-806X(98)00320-X).
89. <http://www.medetec.co.uk/slide%20scans%20dressings/Hydrogels/target15.html>. Available online: (accessed on
90. <http://stores.hhd1.com/curasol-trade-gel-wound-dressing-hpt006044cs/>. Available online: (accessed on
91. Kokabi, M.; Sirousazar, M.; Hassan, Z.M. PVA–clay nanocomposite hydrogels for wound dressing. *European Polymer Journal* **2007**, *43*, 773-781, doi:<https://doi.org/10.1016/j.eurpolymj.2006.11.030>.
92. Slideshare. Dressing of burn wound. Available online: <https://www.slideshare.net/PallaviLokhande2/dressing-of-burn-wound> (accessed on 24/11/2021).
93. Mariod, A.A.; Fadul, H. Extraction and characterization of gelatin from two edible Sudanese insects and its applications in ice cream making. *Food science and technology international = Ciencia y tecnologia de los alimentos internacional* **2015**, *21*, 380-391, doi:10.1177/1082013214541137.
94. Widyasari, R.; Rawdkuen, S. Gelatin from chicken feet: papain-assisted extraction, characterization and its application. 2015.
95. Okonkwo, E.; Ezeanyanaso, C.; Ofoegbu, O.; Ali, E.; Iyamu, N.J.G.J.o.P.; Sciences, A. Extraction and characterization of gelatin from cow bones: Using substitute demineralizing agent (H₂SO₄). **2007**, *13*, 189-191.
96. Taslim Ur Rashid, S.S., Shanta Biswas, Tanvir Ahmed, Abul K. Mallik, Md. Shahrzaman, Md. Nurus Sakib, Papia Haque, Mohammed Mizanur Rahman. *Cellulose-Based Superabsorbent Hydrogels* Springer: Switzerland, 2018.
97. Bakravi, A.; Ahamadian, Y.; Hashemi, H.; Namazi, H. Synthesis of gelatin-based biodegradable hydrogel nanocomposite and their application as drug delivery agent. **2018**, *37*, 2625-2635, doi:<https://doi.org/10.1002/adv.21938>.
98. Lee, S.B.; Jeon, H.W.; Lee, Y.W.; Lee, Y.M.; Song, K.W.; Park, M.H.; Nam, Y.S.; Ahn, H.C. Bio-artificial skin composed of gelatin and (1→3), (1→6)-β-glucan. *Biomaterials* **2003**, *24*, 2503-2511, doi:[https://doi.org/10.1016/S0142-9612\(03\)00003-6](https://doi.org/10.1016/S0142-9612(03)00003-6).

99. Pulieri, E.; Chiono, V.; Ciardelli, G.; Vozzi, G.; Ahluwalia, A.; Domenici, C.; Vozzi, F.; Giusti, P. Chitosan/gelatin blends for biomedical applications. **2008**, 86A, 311-322, doi:<https://doi.org/10.1002/jbm.a.31492>.
100. Hago, E.-E.; Li, X. Interpenetrating Polymer Network Hydrogels Based on Gelatin and PVA by Biocompatible Approaches: Synthesis and Characterization. *Advances in Materials Science and Engineering* **2013**, 2013, 328763, doi:10.1155/2013/328763.
101. Patel, S.; Srivastava, S.; Singh, M.R.; Singh, D. Preparation and optimization of chitosan-gelatin films for sustained delivery of lupeol for wound healing. *International Journal of Biological Macromolecules* **2018**, 107, 1888-1897, doi:<https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2017.10.056>.
102. Krajewska, B. Application of chitin- and chitosan-based materials for enzyme immobilizations: a review. *Enzyme and Microbial Technology* **2004**, 35, 126-139, doi:<https://doi.org/10.1016/j.enzmictec.2003.12.013>.
103. Mi, F.L.; Wu, Y.B.; Shyu, S.S.; Schoung, J.Y.; Huang, Y.B.; Tsai, Y.H.; Hao, J.Y. Control of wound infections using a bilayer chitosan wound dressing with sustainable antibiotic delivery. *Journal of biomedical materials research* **2002**, 59, 438-449, doi:10.1002/jbm.1260.
104. Yu, H.; Xu, X.; Chen, X.; Hao, J.; Jing, X. Medicated wound dressings based on poly(vinyl alcohol)/poly(N-vinyl pyrrolidone)/chitosan hydrogels. **2006**, 101, 2453-2463, doi:<https://doi.org/10.1002/app.23344>.
105. Samah, N.A.; Zakaria, S.; Yarmo, M.A.; Ayub, M.K. *Preparation of Chitosan-coated Gauze and Its Morphological and Physical Properties*; University of Malaya: 2002.
106. Wang, L.; Khor, E.; Wee, A.; Lim, L.Y. Chitosan-alginate PEC membrane as a wound dressing: Assessment of incisional wound healing. *Journal of biomedical materials research* **2002**, 63, 610-618, doi:10.1002/jbm.10382.
107. Cascone, M.G.; Maltinti, S.; Barbani, N.; Laus, M. Effect of chitosan and dextran on the properties of poly(vinyl alcohol) hydrogels. *Journal of Materials Science: Materials in Medicine* **1999**, 10, 431-435, doi:10.1023/A:1008983215833.
108. Yang, X.; Yang, K.; Wu, S.; Chen, X.; Yu, F.; Li, J.; Ma, M.; Zhu, Z. Cytotoxicity and wound healing properties of PVA/ws-chitosan/glycerol hydrogels made by irradiation followed by freeze-thawing. *Radiation Physics and Chemistry* **2010**, 79, 606-611, doi:<https://doi.org/10.1016/j.radphyschem.2009.12.017>.
109. Yang, X.; Liu, Q.; Chen, X.; Yu, F.; Zhu, Z. Investigation of PVA/ws-chitosan hydrogels prepared by combined γ -irradiation and freeze-thawing. *Carbohydrate Polymers* **2008**, 73, 401-408, doi:<https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2007.12.008>.
110. El Salmawi, K.M. Gamma Radiation-Induced Crosslinked PVA/Chitosan Blends for Wound Dressing. *Journal of Macromolecular Science, Part A* **2007**, 44, 541-545, doi:10.1080/10601320701235891.
111. Don, T.-M.; King, C.-F.; Chiu, W.-Y.; Peng, C.-A. Preparation and characterization of chitosan-g-poly(vinyl alcohol)/poly(vinyl alcohol) blends used for the evaluation of blood-contacting compatibility. *Carbohydrate Polymers* **2006**, 63, 331-339, doi:<https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2005.08.023>.

112. Sung, J.H.; Hwang, M.-R.; Kim, J.O.; Lee, J.H.; Kim, Y.I.; Kim, J.H.; Chang, S.W.; Jin, S.G.; Kim, J.A.; Lyoo, W.S.; et al. Gel characterisation and in vivo evaluation of minocycline-loaded wound dressing with enhanced wound healing using polyvinyl alcohol and chitosan. *International Journal of Pharmaceutics* **2010**, *392*, 232-240, doi:<https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2010.03.024>.
113. Zhang, D.; Zhou, W.; Wei, B.; Wang, X.; Tang, R.; Nie, J.; Wang, J. Carboxyl-modified poly(vinyl alcohol)-crosslinked chitosan hydrogel films for potential wound dressing. *Carbohydrate Polymers* **2015**, *125*, 189-199, doi:<https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2015.02.034>.
114. Knapp, T.R.; Kaplan, E.N.; Daniels, J.R. Injectable collagen for soft tissue augmentation. *Plastic and reconstructive surgery* **1977**, *60*, 398-405.
115. Park, S.-N.; Kim, J.K.; Suh, H. Evaluation of antibiotic-loaded collagen-hyaluronic acid matrix as a skin substitute. *Biomaterials* **2004**, *25*, 3689-3698, doi:<https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2003.10.072>.
116. Almazrooa, S.A.; Noonan, V.; Woo, S.-B. Resorbable collagen membranes: histopathologic features. *Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology and Oral Radiology* **2014**, *118*, 236-240, doi:<https://doi.org/10.1016/j.oooo.2014.04.006>.
117. Rastogi, S.; Modi, M.; Sathian, B. The Efficacy of Collagen Membrane as a Biodegradable Wound Dressing Material for Surgical Defects of Oral Mucosa: A Prospective Study. *Journal of Oral and Maxillofacial Surgery* **2009**, *67*, 1600-1606, doi:<https://doi.org/10.1016/j.joms.2008.12.020>.
118. Singh, O.; Gupta, S.S.; Soni, M.; Moses, S.; Shukla, S.; Mathur, R.K. Collagen dressing versus conventional dressings in burn and chronic wounds: a retrospective study. *Journal of cutaneous and aesthetic surgery* **2011**, *4*, 12-16, doi:10.4103/0974-2077.79180.
119. Mathangi Ramakrishnan, K.; Babu, M.; Mathivanan; Jayaraman, V.; Shankar, J. Advantages of collagen based biological dressings in the management of superficial and superficial partial thickness burns in children. *Ann Burns Fire Disasters* **2013**, *26*, 98-104.
120. Chen, J.-P.; Chang, G.-Y.; Chen, J.-K. Electrospun collagen/chitosan nanofibrous membrane as wound dressing. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects* **2008**, *313-314*, 183-188, doi:<https://doi.org/10.1016/j.colsurfa.2007.04.129>.
121. Lee, K.Y.; Mooney, D.J. Alginate: properties and biomedical applications. *Prog Polym Sci* **2012**, *37*, 106-126, doi:10.1016/j.progpolymsci.2011.06.003.
122. Thomas, S. Alginate dressings in surgery and wound management: part 3. **2000**, *9*, 163-166, doi:10.12968/jowc.2000.9.4.25973.
123. Kim, J.O.; Choi, J.Y.; Park, J.K.; Kim, J.H.; Jin, S.G.; Chang, S.W.; Li, D.X.; Hwang, M.R.; Woo, J.S.; Kim, J.A.; et al. Development of clindamycin-loaded wound dressing with polyvinyl alcohol and sodium alginate. *Biological & pharmaceutical bulletin* **2008**, *31*, 2277-2282, doi:10.1248/bpb.31.2277.
124. Nam, S.Y.; Nho, Y.; Hong, S.; Chae, G.; Jang, H.; Suh, T.S.; Ahn, W.; Ryu, K.; Chun, H.J. Evaluations of poly(vinyl alcohol)/alginate hydrogels cross-linked by ??-ray irradiation technique. *Macromolecular Research - MACROMOL RES* **2004**, *12*, 219-224, doi:10.1007/BF03218391.

125. Kamoun, E.A.; Chen, X.; Mohy Eldin, M.S.; Kenawy, E.-R.S. Crosslinked poly(vinyl alcohol) hydrogels for wound dressing applications: A review of remarkably blended polymers. *Arabian Journal of Chemistry* **2015**, *8*, 1-14, doi:<https://doi.org/10.1016/j.arabjc.2014.07.005>.
126. Zhai, M.; Yoshii, F.; Kume, T.; Hashim, K. Syntheses of PVA/starch grafted hydrogels by irradiation. *Carbohydrate Polymers* **2002**, *50*, 295-303, doi:[https://doi.org/10.1016/S0144-8617\(02\)00031-0](https://doi.org/10.1016/S0144-8617(02)00031-0).
127. Sidebotham, R.L. Dextrans**The author thanks Professor E. J. Bourne and Drs. H. Weigel, P. Critchley, and R. H. Tilbury for helpful discussions during the preparation of this article, and is indebted to Dr. H. Weigel for permission to include some hitherto unpublished data. In *Advances in Carbohydrate Chemistry and Biochemistry*, Tipson, R.S., Horton, D., Eds.; Academic Press: 1974; Volume 30, pp. 371-444.
128. Fathi, E.; Atyabi, N.; Imani, M.; Alinejad, Z. Physically crosslinked polyvinyl alcohol–dextran blend xerogels: Morphology and thermal behavior. *Carbohydrate Polymers* **2011**, *84*, 145-152, doi:<https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2010.11.018>.
129. Huang, M.-H.; Yang, M.-C. Evaluation of glucan/poly(vinyl alcohol) blend wound dressing using rat models. *International Journal of Pharmaceutics* **2008**, *346*, 38-46, doi:<https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2007.06.021>.
130. Pietramaggiore, G.; Yang, H.J.; Scherer, S.S.; Kaipainen, A.; Chan, R.K.; Alperovich, M.; Newalder, J.; Demcheva, M.; Vournakis, J.N.; Valeri, C.R.; et al. Effects of poly-N-acetyl glucosamine (pGlcNAc) patch on wound healing in db/db mouse. *The Journal of trauma* **2008**, *64*, 803-808, doi:10.1097/01.ta.0000244382.13937.a8.
131. Kirker, K.R.; Luo, Y.; Nielson, J.H.; Shelby, J.; Prestwich, G.D. Glycosaminoglycan hydrogel films as bio-interactive dressings for wound healing. *Biomaterials* **2002**, *23*, 3661-3671, doi:[https://doi.org/10.1016/S0142-9612\(02\)00100-X](https://doi.org/10.1016/S0142-9612(02)00100-X).
132. Park, S.-N.; Lee, H.J.; Lee, K.H.; Suh, H. Biological characterization of EDC-crosslinked collagen–hyaluronic acid matrix in dermal tissue restoration. *Biomaterials* **2003**, *24*, 1631-1641, doi:[https://doi.org/10.1016/S0142-9612\(02\)00550-1](https://doi.org/10.1016/S0142-9612(02)00550-1).
133. Price, R.D.; Myers, S.; Leigh, I.M.; Navsaria, H.A. The Role of Hyaluronic Acid in Wound Healing. *American Journal of Clinical Dermatology* **2005**, *6*, 393-402, doi:10.2165/00128071-200506060-00006.
134. Miller, R.S.; Steward, D.L.; Tami, T.A.; Sillars, M.J.; Seiden, A.M.; Shete, M.; Paskowski, C.; Welge, J. The clinical effects of hyaluronic acid ester nasal dressing (Merogel) on intranasal wound healing after functional endoscopic sinus surgery. *Otolaryngology--head and neck surgery : official journal of American Academy of Otolaryngology-Head and Neck Surgery* **2003**, *128*, 862-869, doi:10.1016/s0194-5998(03)00460-1.
135. Fahmy, A.; Kamoun, E.A.; El-Eisawy, R.; El-Fakharany, E.M.; Taha, T.H.; El-Damhougy, B.K.; Abdelhai, F. Poly(vinyl alcohol)-hyaluronic Acid Membranes for Wound Dressing Applications: Synthesis and in vitro Bio-Evaluations %J Journal of the Brazilian Chemical Society. **2015**, *26*, 1466-1474.

136. Wen, X.; Zheng, Y.; Wu, J.; Yue, L.; Wang, C.; Luan, J.; Wu, Z.; Wang, K. In vitro and in vivo investigation of bacterial cellulose dressing containing uniform silver sulfadiazine nanoparticles for burn wound healing. *Progress in Natural Science: Materials International* **2015**, *25*, 197-203, doi:<https://doi.org/10.1016/j.pnsc.2015.05.004>.
137. Wu, J.; Zheng, Y.; Song, W.; Luan, J.; Wen, X.; Wu, Z.; Chen, X.; Wang, Q.; Guo, S. In situ synthesis of silver-nanoparticles/bacterial cellulose composites for slow-released antimicrobial wound dressing. *Carbohydrate Polymers* **2014**, *102*, 762-771, doi:<https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2013.10.093>.
138. Lin, W.-C.; Lien, C.-C.; Yeh, H.-J.; Yu, C.-M.; Hsu, S.-h. Bacterial cellulose and bacterial cellulose–chitosan membranes for wound dressing applications. *Carbohydrate Polymers* **2013**, *94*, 603-611, doi:<https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2013.01.076>.
139. Qiu, Y.; Qiu, L.; Cui, J.; Wei, Q. Bacterial cellulose and bacterial cellulose–vaccarin membranes for wound healing. *Materials Science and Engineering: C* **2016**, *59*, 303-309, doi:<https://doi.org/10.1016/j.msec.2015.10.016>.
140. Portela, R.; Leal, C.R.; Almeida, P.L.; Sobral, R.G. Bacterial cellulose: a versatile biopolymer for wound dressing applications. **2019**, *12*, 586-610, doi:<https://doi.org/10.1111/1751-7915.13392>.
141. Argyris, T.S. Keratins. Their Composition, Structure and Biosynthesis. R. D. B. Fraser, T. P. MacRae, G. E. Rogers. **1973**, *48*, 378-379, doi:10.1086/407656.
142. Wang, B.; Yang, W.; McKittrick, J.; Meyers, M.A. Keratin: Structure, mechanical properties, occurrence in biological organisms, and efforts at bioinspiration. *Progress in Materials Science* **2016**, *76*, 229-318, doi:<https://doi.org/10.1016/j.pmatsci.2015.06.001>.
143. Padol, A.R.; Jayakumar, K.; Shridhar, N.B.; Narayana Swamy, H.D.; Narayana Swamy, M.; Mohan, K. Safety evaluation of silk protein film (a novel wound healing agent) in terms of acute dermal toxicity, acute dermal irritation and skin sensitization. *Toxicology international* **2011**, *18*, 17-21, doi:10.4103/0971-6580.75847.
144. Roh, D.-H.; Kang, S.-Y.; Kim, J.-Y.; Kwon, Y.-B.; Young Kweon, H.; Lee, K.-G.; Park, Y.-H.; Baek, R.-M.; Heo, C.-Y.; Choe, J.; et al. Wound healing effect of silk fibroin/alginate-blended sponge in full thickness skin defect of rat. *Journal of Materials Science: Materials in Medicine* **2006**, *17*, 547-552, doi:10.1007/s10856-006-8938-y.
145. Dutta, J. Synthesis and Characterization of γ -irradiated PVA/PEG/CaCl₂ Hydrogel for Wound Dressing. *American Journal of Chemistry* **2012**, *2*, 6-11, doi:10.5923/j.chemistry.20120202.02.
146. Bahrami, H.; Keshel, S.H.; Chari, A.J.; Biazar, E. Human unrestricted somatic stem cells loaded in nanofibrous PCL scaffold and their healing effect on skin defects. *Artificial cells, nanomedicine, and biotechnology* **2016**, *44*, 1556-1560, doi:10.3109/21691401.2015.1062390.
147. Gautam, S.; Chou, C.-F.; Dinda, A.K.; Potdar, P.D.; Mishra, N.C. Fabrication and characterization of PCL/gelatin/chitosan ternary nanofibrous composite scaffold for tissue engineering applications. *Journal of Materials Science* **2014**, *49*, 1076-1089, doi:10.1007/s10853-013-7785-8.

148. Ezati, M.; Safavipour, H.; Houshmand, B.; Faghihi, S. Development of a PCL/gelatin/chitosan/ β -TCP electrospun composite for guided bone regeneration. *Prog Biomater* **2018**, *7*, 225-237, doi:10.1007/s40204-018-0098-x.
149. Ehterami, A.; Salehi, M.; Farzamfar, S.; Vaez, A.; Samadian, H.; Sahrapeyma, H.; Mirzaii, M.; Ghorbani, S.; Goodarzi, A. In vitro and in vivo study of PCL/COLL wound dressing loaded with insulin-chitosan nanoparticles on cutaneous wound healing in rats model. *International Journal of Biological Macromolecules* **2018**, *117*, 601-609, doi:<https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2018.05.184>.
150. Hu, H.; Xu, F.-J. Rational design and latest advances of polysaccharide-based hydrogels for wound healing. *Biomaterials Science* **2020**, *8*, 2084-2101, doi:10.1039/D0BM00055H.
151. Oryan, A.; Kamali, A.; Moshiri, A.; Baharvand, H.; Daemi, H. Chemical crosslinking of biopolymeric scaffolds: Current knowledge and future directions of crosslinked engineered bone scaffolds. *International Journal of Biological Macromolecules* **2018**, *107*, 678-688, doi:<https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2017.08.184>.
152. Tabor, R.F.; Grieser, F.; Dagastine, R.R.; Chan, D.Y.C. The hydrophobic force: measurements and methods. *Physical Chemistry Chemical Physics* **2014**, *16*, 18065-18075, doi:10.1039/C4CP01410C.
153. Yang, J.; Xu, F.; Han, C.-R. Metal Ion Mediated Cellulose Nanofibrils Transient Network in Covalently Cross-linked Hydrogels: Mechanistic Insight into Morphology and Dynamics. *Biomacromolecules* **2017**, *18*, 1019-1028, doi:10.1021/acs.biomac.6b01915.
154. Ahmed, E.M. Hydrogel: Preparation, characterization, and applications: A review. *Journal of Advanced Research* **2015**, *6*, 105-121, doi:<https://doi.org/10.1016/j.jare.2013.07.006>.
155. Ullah, F.; Othman, M.B.H.; Javed, F.; Ahmad, Z.; Akil, H.M. Classification, processing and application of hydrogels: A review. *Materials Science and Engineering: C* **2015**, *57*, 414-433, doi:<https://doi.org/10.1016/j.msec.2015.07.053>.
156. Rao, K.M.; Kumar, A.; Han, S.S.J.I.j.o.b.m. Polysaccharide based bionanocomposite hydrogels reinforced with cellulose nanocrystals: drug release and biocompatibility analyses. **2017**, *101*, 165-171.
157. Liu, S.; Kang, M.; Li, K.; Yao, F.; Oderinde, O.; Fu, G.; Xu, L.J.C.E.J. Polysaccharide-templated preparation of mechanically-tough, conductive and self-healing hydrogels. **2018**, *334*, 2222-2230.
158. Park, M.-R.; Seo, B.-B.; Song, S.-C. Dual ionic interaction system based on polyelectrolyte complex and ionic, injectable, and thermosensitive hydrogel for sustained release of human growth hormone. *Biomaterials* **2013**, *34*, 1327-1336, doi:<https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2012.10.033>.
159. Sacco, P.; Borgogna, M.; Travan, A.; Marsich, E.; Paoletti, S.; Asaro, F.; Grassi, M.; Donati, I. Polysaccharide-Based Networks from Homogeneous Chitosan-Tripolyphosphate Hydrogels: Synthesis and Characterization. *Biomacromolecules* **2014**, *15*, 3396-3405, doi:10.1021/bm500909n.

160. Cui, H.; Pan, N.; Fan, W.; Liu, C.; Li, Y.; Xia, Y.; Sui, K. Ultrafast Fabrication of Gradient Nanoporous All-Polysaccharide Films as Strong, Superfast, and Multiresponsive Actuators. **2019**, *29*, 1807692, doi:<https://doi.org/10.1002/adfm.201807692>.
161. Hu, Y.; Zhang, Z.; Li, Y.; Ding, X.; Li, D.; Shen, C.; Xu, F.-J. Dual-Crosslinked Amorphous Polysaccharide Hydrogels Based on Chitosan/Alginate for Wound Healing Applications. **2018**, *39*, 1800069, doi:<https://doi.org/10.1002/marc.201800069>.
162. Sharma, S.; Swetha, K.L.; Roy, A. Chitosan-Chondroitin sulfate based polyelectrolyte complex for effective management of chronic wounds. *International Journal of Biological Macromolecules* **2019**, *132*, 97-108, doi:<https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2019.03.186>.
163. Lozinsky, V.I.; Galaev, I.Y.; Plieva, F.M.; Savina, I.N.; Jungvid, H.; Mattiasson, B. Polymeric cryogels as promising materials of biotechnological interest. *Trends in Biotechnology* **2003**, *21*, 445-451, doi:<https://doi.org/10.1016/j.tibtech.2003.08.002>.
164. Zhang, H.; Zhang, F.; Wu, J. Physically crosslinked hydrogels from polysaccharides prepared by freeze-thaw technique. *Reactive and Functional Polymers* **2013**, *73*, 923-928, doi:10.1016/j.reactfunctpolym.2012.12.014.
165. Xiao, C.; Gao, Y. Preparation and properties of physically crosslinked sodium carboxymethylcellulose/poly(vinyl alcohol) complex hydrogels. **2008**, *107*, 1568-1572, doi:<https://doi.org/10.1002/app.27203>.
166. Yan, S.; Ren, J.; Jian, Y.; Wang, W.; Yun, W.; Yin, J. Injectable Maltodextrin-Based Micelle/Hydrogel Composites for Simvastatin-Controlled Release. *Biomacromolecules* **2018**, *19*, 4554-4564, doi:10.1021/acs.biomac.8b01234.
167. Fredrick, R.; Podder, A.; Viswanathan, A.; Bhuniya, S. Synthesis and characterization of polysaccharide hydrogel based on hydrophobic interactions. **2019**, *136*, 47665, doi:<https://doi.org/10.1002/app.47665>.
168. Zhang, Z.; Ma, Z.; Zhang, Y.; Chen, F.; Zhou, Y.; An, Q. Dehydrothermally crosslinked collagen/hydroxyapatite composite for enhanced in vivo bone repair. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces* **2018**, *163*, 394-401, doi:<https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2018.01.011>.
169. Chen, X.; Zhou, L.; Xu, H.; Yamamoto, M.; Shinoda, M.; Kishimoto, M.; Tanaka, T.; Yamane, H. Effect of the Application of a Dehydrothermal Treatment on the Structure and the Mechanical Properties of Collagen Film. **2020**, *13*, 377.
170. Yannas, I.V.; Tobolsky, A.V. Cross-linking of gelatine by dehydration. *Nature* **1967**, *215*, 509-510, doi:10.1038/215509b0.
171. Silver, F.H.; Yannas, I.V.; Salzman, E.W. In vitro blood compatibility of glycosaminoglycan-precipitated collagens. *Journal of biomedical materials research* **1979**, *13*, 701-716, doi:10.1002/jbm.820130504.
172. Johansson, A.; Kollman, P.; Rothenberg, S.; McKelvey, J. Hydrogen bonding ability of the amide group. *Journal of the American Chemical Society* **1974**, *96*, 3794-3800, doi:10.1021/ja00819a013.
173. Dixon, D.A.; Dobbs, K.D.; Valentini, J.J. Amide-Water and Amide-Amide Hydrogen Bond Strengths. *The Journal of Physical Chemistry* **1994**, *98*, 13435-13439, doi:10.1021/j100102a001.

174. Haugh, M.G.; Jaasma, M.J.; O'Brien, F.J. The effect of dehydrothermal treatment on the mechanical and structural properties of collagen-GAG scaffolds. **2009**, *89A*, 363-369, doi:<https://doi.org/10.1002/jbm.a.31955>.
175. Akhtar, M.F.; Hanif, M.; Ranjha, N.M. Methods of synthesis of hydrogels ... A review. *Saudi Pharmaceutical Journal* **2016**, *24*, 554-559, doi:<https://doi.org/10.1016/j.jsps.2015.03.022>.
176. Bhattarai, N.; Gunn, J.; Zhang, M. Chitosan-based hydrogels for controlled, localized drug delivery. *Advanced Drug Delivery Reviews* **2010**, *62*, 83-99, doi:<https://doi.org/10.1016/j.addr.2009.07.019>.
177. Pellá, M.C.G.; Lima-Tenório, M.K.; Tenório-Neto, E.T.; Guilherme, M.R.; Muniz, E.C.; Rubira, A.F. Chitosan-based hydrogels: From preparation to biomedical applications. *Carbohydrate Polymers* **2018**, *196*, 233-245, doi:<https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2018.05.033>.
178. Collins, M.N.; Birkinshaw, C. Hyaluronic acid based scaffolds for tissue engineering—A review. *Carbohydrate Polymers* **2013**, *92*, 1262-1279, doi:<https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2012.10.028>.
179. Liang, Y.; Zhao, X.; Hu, T.; Chen, B.; Yin, Z.; Ma, P.X.; Guo, B. Adhesive Hemostatic Conducting Injectable Composite Hydrogels with Sustained Drug Release and Photothermal Antibacterial Activity to Promote Full-Thickness Skin Regeneration During Wound Healing. **2019**, *15*, 1900046, doi:<https://doi.org/10.1002/sml.201900046>.
180. Lee, C.; Shin, J.; Lee, J.S.; Byun, E.; Ryu, J.H.; Um, S.H.; Kim, D.-I.; Lee, H.; Cho, S.-W. Bioinspired, Calcium-Free Alginate Hydrogels with Tunable Physical and Mechanical Properties and Improved Biocompatibility. *Biomacromolecules* **2013**, *14*, 2004-2013, doi:10.1021/bm400352d.
181. Cao, H.; Chen, M.-M.; Liu, Y.; Liu, Y.-Y.; Huang, Y.-Q.; Wang, J.-H.; Chen, J.-D.; Zhang, Q.-Q. Fish collagen-based scaffold containing PLGA microspheres for controlled growth factor delivery in skin tissue engineering. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces* **2015**, *136*, 1098-1106, doi:<https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2015.10.022>.
182. Mao, J.S.; liu, H.F.; Yin, Y.J.; Yao, K.D. The properties of chitosan–gelatin membranes and scaffolds modified with hyaluronic acid by different methods. *Biomaterials* **2003**, *24*, 1621-1629, doi:[https://doi.org/10.1016/S0142-9612\(02\)00549-5](https://doi.org/10.1016/S0142-9612(02)00549-5).
183. Hong, Y.; Zhou, F.; Hua, Y.; Zhang, X.; Ni, C.; Pan, D.; Zhang, Y.; Jiang, D.; Yang, L.; Lin, Q.; et al. A strongly adhesive hemostatic hydrogel for the repair of arterial and heart bleeds. *Nature Communications* **2019**, *10*, 2060, doi:10.1038/s41467-019-10004-7.
184. Obara, K.; Ishihara, M.; Ishizuka, T.; Fujita, M.; Ozeki, Y.; Maehara, T.; Saito, Y.; Yura, H.; Matsui, T.; Hattori, H.; et al. Photocrosslinkable chitosan hydrogel containing fibroblast growth factor-2 stimulates wound healing in healing-impaired db/db mice. *Biomaterials* **2003**, *24*, 3437-3444, doi:[https://doi.org/10.1016/S0142-9612\(03\)00220-5](https://doi.org/10.1016/S0142-9612(03)00220-5).
185. Huang, X.; Zhang, Y.; Zhang, X.; Xu, L.; Chen, X.; Wei, S.J.M.S.; C, E. Influence of radiation crosslinked carboxymethyl-chitosan/gelatin hydrogel on cutaneous wound healing. **2013**, *33*, 4816-4824.

186. Singh, B.; Rajneesh. Gamma radiation synthesis and characterization of gentamicin loaded polysaccharide gum based hydrogel wound dressings. *Journal of Drug Delivery Science and Technology* **2018**, *47*, 200-208, doi:<https://doi.org/10.1016/j.jddst.2018.07.014>.
187. Yang, C.; Xu, L.; Zhou, Y.; Zhang, X.; Huang, X.; Wang, M.; Han, Y.; Zhai, M.; Wei, S.; Li, J. A green fabrication approach of gelatin/CM-chitosan hybrid hydrogel for wound healing. *Carbohydrate Polymers* **2010**, *82*, 1297-1305, doi:<https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2010.07.013>.
188. Mozalewska, W.; Czechowska-Biskup, R.; Olejnik, A.K.; Wach, R.A.; Ulański, P.; Rosiak, J.M. Chitosan-containing hydrogel wound dressings prepared by radiation technique. *Radiation Physics and Chemistry* **2017**, *134*, 1-7, doi:<https://doi.org/10.1016/j.radphyschem.2017.01.003>.
189. Acevedo, C.A.; Olgúin, Y.; Briceño, M.; Forero, J.C.; Osses, N.; Díaz-Calderón, P.; Jaques, A.; Ortiz, R. Design of a biodegradable UV-irradiated gelatin-chitosan/nanocomposed membrane with osteogenic ability for application in bone regeneration. *Materials Science and Engineering: C* **2019**, *99*, 875-886, doi:<https://doi.org/10.1016/j.msec.2019.01.135>.
190. Guo, J.; Zhang, Y.; Yang, X.-Q. A novel enzyme cross-linked gelation method for preparing food globular protein-based transparent hydrogel. *Food Hydrocolloids* **2012**, *26*, 277-285, doi:<https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2011.06.005>.
191. Heck, T.; Faccio, G.; Richter, M.; Thöny-Meyer, L. Enzyme-catalyzed protein crosslinking. *Applied Microbiology and Biotechnology* **2013**, *97*, 461-475, doi:10.1007/s00253-012-4569-z.
192. Chen, F.; Yu, S.; Liu, B.; Ni, Y.; Yu, C.; Su, Y.; Zhu, X.; Yu, X.; Zhou, Y.; Yan, D. An Injectable Enzymatically Crosslinked Carboxymethylated Pullulan/Chondroitin Sulfate Hydrogel for Cartilage Tissue Engineering. *Scientific Reports* **2016**, *6*, 20014, doi:10.1038/srep20014.
193. Akhavan-Kharazian, N.; Izadi-Vasafi, H. Preparation and characterization of chitosan/gelatin/nanocrystalline cellulose/calcium peroxide films for potential wound dressing applications. *International Journal of Biological Macromolecules* **2019**, *133*, 881-891, doi:<https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2019.04.159>.
194. Fialkova, M.A.; Smirnova, T.; Ivanova, G.I.; Aboiants, R.K.; Golubeva, V.F. [The effect of chondroitin sulfate preparations on wound healing and the strength of the surgical scar]. *Biulleten' eksperimental'noi biologii i meditsiny* **1989**, *108*, 350-351.
195. S, P.; Jaiswal, A.K. Effect of interpolymer complex formation between chondroitin sulfate and chitosan-gelatin hydrogel on physico-chemical and rheological properties. *Carbohydrate Polymers* **2020**, *238*, 116179, doi:<https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2020.116179>.
196. N., A. *Γενική Οργανική Χημεία*; Εκδόσεις Ζήτη: Θεσσαλονίκη, 1992.
197. TA. *Dynamic Mechanical Analysis, Basic Theory and Applications Training*.
198. Mark, D.H. *Thermal characterization of polymeric materials*, Edith A. Turi, Ed., Academic, New York, 1981, 972 pp. Price: \$98.00. **1982**, *20*, 486, doi:<https://doi.org/10.1002/pol.1982.130200508>.

199. I.M. Watt The principles and practice of electron microscopy. 2nd edition, x, 484p. Cambridge University Press, 1997. Price £80.00, (£29.95 Paperback). *Journal of the Marine Biological Association of the United Kingdom* **1997**, *77*, 920-920, doi:[10.1017/S0025315400036493](https://doi.org/10.1017/S0025315400036493).
200. Badii, F.; Howell, N.K. Fish gelatin: Structure, gelling properties and interaction with egg albumen proteins. *Food Hydrocolloids* **2006**, *20*, 630-640, doi:<https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2005.06.006>.
201. Chiou, B.-S.; Avena-Bustillos, R.J.; Bechtel, P.J.; Jafri, H.; Narayan, R.; Imam, S.H.; Glenn, G.M.; Orts, W.J. Cold water fish gelatin films: Effects of cross-linking on thermal, mechanical, barrier, and biodegradation properties. *European Polymer Journal* **2008**, *44*, 3748-3753, doi:<https://doi.org/10.1016/j.eurpolymj.2008.08.011>.
202. Gómez-Guillén, M.C.; Pérez-Mateos, M.; Gómez-Estaca, J.; López-Caballero, E.; Giménez, B.; Montero, P. Fish gelatin: a renewable material for developing active biodegradable films. *Trends in Food Science & Technology* **2009**, *20*, 3-16, doi:<https://doi.org/10.1016/j.tifs.2008.10.002>.
203. Qiao, C.; Ma, X.; Zhang, J.; Yao, J. Molecular interactions in gelatin/chitosan composite films. *Food Chemistry* **2017**, *235*, 45-50, doi:<https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2017.05.045>.
204. Pranoto, Y.; Lee, C.M.; Park, H.J. Characterizations of fish gelatin films added with gellan and κ -carrageenan. *LWT - Food Science and Technology* **2007**, *40*, 766-774, doi:<https://doi.org/10.1016/j.lwt.2006.04.005>.
205. Spanneberg, R.; Osswald, F.; Kolesov, I.; Anton, W.; Radosch, H.-J.; Glomb, M.A. Model Studies on Chemical and Textural Modifications in Gelatin Films by Reaction with Glyoxal and Glycolaldehyde. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **2010**, *58*, 3580-3585, doi:10.1021/jf9039827.
206. Zhang, X.; Do, M.D.; Casey, P.; Sulistio, A.; Qiao, G.G.; Lundin, L.; Lillford, P.; Kosaraju, S. Chemical Cross-Linking Gelatin with Natural Phenolic Compounds as Studied by High-Resolution NMR Spectroscopy. *Biomacromolecules* **2010**, *11*, 1125-1132, doi:10.1021/bm1001284.
207. Kołodziejaska, I.; Piotrowska, B. The water vapour permeability, mechanical properties and solubility of fish gelatin–chitosan films modified with transglutaminase or 1-ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl) carbodiimide (EDC) and plasticized with glycerol. *Food Chemistry* **2007**, *103*, 295-300, doi:<https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2006.07.049>.
208. Cao, N.; Fu, Y.; He, J. Mechanical properties of gelatin films cross-linked, respectively, by ferulic acid and tannin acid. *Food Hydrocolloids* **2007**, *21*, 575-584, doi:<https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2006.07.001>.
209. Chen, Z.; Mo, X.; He, C.; Wang, H. Intermolecular interactions in electrospun collagen–chitosan complex nanofibers. *Carbohydrate Polymers* **2008**, *72*, 410-418, doi:<https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2007.09.018>.
210. Rivero, S.; García, M.A.; Pinotti, A. Composite and bi-layer films based on gelatin and chitosan. *Journal of Food Engineering* **2009**, *90*, 531-539, doi:<https://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2008.07.021>.
211. Dutta, P.K.; Tripathi, S.; Mehrotra, G.K.; Dutta, J. Perspectives for chitosan based antimicrobial films in food applications. *Food Chemistry* **2009**, *114*, 1173-1182, doi:<https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2008.11.047>.

212. Busilacchi, A.; Gigante, A.; Mattioli-Belmonte, M.; Manzotti, S.; Muzzarelli, R.A.A. Chitosan stabilizes platelet growth factors and modulates stem cell differentiation toward tissue regeneration. *Carbohydrate Polymers* **2013**, *98*, 665-676, doi:<https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2013.06.044>.
213. Okamoto, Y.; Yano, R.; Miyatake, K.; Tomohiro, I.; Shigemasa, Y.; Minami, S. Effects of chitin and chitosan on blood coagulation. *Carbohydrate Polymers* **2003**, *53*, 337-342, doi:[https://doi.org/10.1016/S0144-8617\(03\)00076-6](https://doi.org/10.1016/S0144-8617(03)00076-6).
214. Younes, I.; Rinaudo, M. Chitin and Chitosan Preparation from Marine Sources. Structure, Properties and Applications. **2015**, *13*, 1133-1174.
215. Park, P.-J.; Je, J.-Y.; Kim, S.-K. Free Radical Scavenging Activity of Chitooligosaccharides by Electron Spin Resonance Spectrometry. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **2003**, *51*, 4624-4627, doi:10.1021/jf034039+.
216. Ngo, D.-H.; Kim, S.-K. Chapter Two - Antioxidant Effects of Chitin, Chitosan, and Their Derivatives. In *Advances in Food and Nutrition Research*, Kim, S.-K., Ed.; Academic Press: 2014; Volume 73, pp. 15-31.
217. Qi, L.; Xu, Z. In vivo antitumor activity of chitosan nanoparticles. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters* **2006**, *16*, 4243-4245, doi:<https://doi.org/10.1016/j.bmcl.2006.05.078>.
218. Qin, C.; Du, Y.; Xiao, L.; Li, Z.; Gao, X. Enzymic preparation of water-soluble chitosan and their antitumor activity. *International Journal of Biological Macromolecules* **2002**, *31*, 111-117, doi:[https://doi.org/10.1016/S0141-8130\(02\)00064-8](https://doi.org/10.1016/S0141-8130(02)00064-8).
219. Tokoro, A.; Tatewaki, N.; Suzuki, K.; Mikami, T.; Suzuki, S.; Suzuki, M. Growth-inhibitory effect of hexa-N-acetylchitohexaose and chitohexaose against Meth-A solid tumor. *Chemical & pharmaceutical bulletin* **1988**, *36*, 784-790, doi:10.1248/cpb.36.784.
220. Zhao, D.; Yu, S.; Sun, B.; Gao, S.; Guo, S.; Zhao, K. Biomedical Applications of Chitosan and Its Derivative Nanoparticles. *Polymers (Basel)* **2018**, *10*, 462, doi:10.3390/polym10040462.
221. Ngo, D.-H.; Vo, T.-S.; Ngo, D.-N.; Kang, K.-H.; Je, J.-Y.; Pham, H.N.-D.; Byun, H.-G.; Kim, S.-K. Biological effects of chitosan and its derivatives. *Food Hydrocolloids* **2015**, *51*, 200-216, doi:<https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2015.05.023>.
222. Sionkowska, A.; Wisniewski, M.; Skopinska, J.; Kennedy, C.J.; Wess, T.J. Molecular interactions in collagen and chitosan blends. *Biomaterials* **2004**, *25*, 795-801, doi:[https://doi.org/10.1016/S0142-9612\(03\)00595-7](https://doi.org/10.1016/S0142-9612(03)00595-7).
223. Mao, J.S.; Zhao, L.G.; Yin, Y.J.; Yao, K.D. Structure and properties of bilayer chitosan-gelatin scaffolds. *Biomaterials* **2003**, *24*, 1067-1074, doi:[https://doi.org/10.1016/S0142-9612\(02\)00442-8](https://doi.org/10.1016/S0142-9612(02)00442-8).
224. Huang, Y.; Onyeri, S.; Siewe, M.; Moshfeghian, A.; Madihally, S.V. In vitro characterization of chitosan-gelatin scaffolds for tissue engineering. *Biomaterials* **2005**, *26*, 7616-7627, doi:<https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2005.05.036>.
225. Pereda, M.; Amica, G.; Marcovich, N.E. Development and characterization of edible chitosan/olive oil emulsion films. *Carbohydrate Polymers* **2012**, *87*, 1318-1325, doi:<https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2011.09.019>.
226. Hosseini, S.F.; Rezaei, M.; Zandi, M.; Ghavi, F.F. Preparation and functional properties of fish gelatin-chitosan blend edible films. *Food Chemistry* **2013**, *136*, 1490-1495, doi:<https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2012.09.081>.

227. Li, J.; Zivanovic, S.; Davidson, P.M.; Kit, K. Characterization and comparison of chitosan/PVP and chitosan/PEO blend films. *Carbohydrate Polymers* **2010**, *79*, 786-791, doi:<https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2009.09.028>.
228. Staroszczyk, H.; Sztuka, K.; Wolska, J.; Wojtasz-Pajak, A.; Kołodziejska, I. Interactions of fish gelatin and chitosan in uncrosslinked and crosslinked with EDC films: FT-IR study. *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy* **2014**, *117*, 707-712, doi:<https://doi.org/10.1016/j.saa.2013.09.044>.
229. Muyonga, J.H.; Cole, C.G.B.; Duodu, K.G. Fourier transform infrared (FTIR) spectroscopic study of acid soluble collagen and gelatin from skins and bones of young and adult Nile perch (*Lates niloticus*). *Food Chemistry* **2004**, *86*, 325-332, doi:<https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2003.09.038>.
230. Derkach, S.R.; Kuchina, Y.A.; Baryshnikov, A.V.; Kolotova, D.S.; Voron'ko, N.G. Tailoring Cod Gelatin Structure and Physical Properties with Acid and Alkaline Extraction. *Polymers (Basel)* **2019**, *11*, 1724, doi:10.3390/polym11101724.
231. Saidi, G.; Rahman, M.; Guizani, N. Fourier transform infrared (FTIR) spectroscopic study of extracted gelatin from shaari (*Lithrinus microdon*) skin: Effects of extraction conditions. *International Food Research Journal* **2012**, *19*, 1167-1173.
232. Kumar, D.P.; Chandra, M.V.; Elavarasan, K.; Shamasundar, B.A. Structural properties of gelatin extracted from croaker fish (*Johnius* sp) skin waste. *International Journal of Food Properties* **2017**, *20*, S2612-S2625, doi:10.1080/10942912.2017.1381702.
233. Ramos, Ó.L.; Reinas, I.; Silva, S.I.; Fernandes, J.C.; Cerqueira, M.A.; Pereira, R.N.; Vicente, A.A.; Poças, M.F.; Pintado, M.E.; Malcata, F.X. Effect of whey protein purity and glycerol content upon physical properties of edible films manufactured therefrom. *Food Hydrocolloids* **2013**, *30*, 110-122, doi:<https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2012.05.001>.
234. Bergo, P.; Sobral, P.J.A. Effects of plasticizer on physical properties of pigskin gelatin films. *Food Hydrocolloids* **2007**, *21*, 1285-1289, doi:<https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2006.09.014>.
235. Fajardo, A.R.; Lopes, L.C.; Caleare, A.O.; Britta, E.A.; Nakamura, C.V.; Rubira, A.F.; Muniz, E.C. Silver sulfadiazine loaded chitosan/chondroitin sulfate films for a potential wound dressing application. *Materials Science and Engineering: C* **2013**, *33*, 588-595, doi:<https://doi.org/10.1016/j.msec.2012.09.025>.
236. Fernandes Queiroz, M.; Melo, K.R.T.; Sabry, D.A.; Sasaki, G.L.; Rocha, H.A.O. Does the Use of Chitosan Contribute to Oxalate Kidney Stone Formation? **2015**, *13*, 141-158.
237. Nunthanid, J.; Puttipipatkachorn, S.; Yamamoto, K.; Peck, G.E. Physical Properties and Molecular Behavior of Chitosan Films. *Drug Development and Industrial Pharmacy* **2001**, *27*, 143-157, doi:10.1081/DDC-100000481.
238. Krishna Rao, K.S.V.; Vijaya Kumar Naidu, B.; Subha, M.C.S.; Sairam, M.; Aminabhavi, T.M. Novel chitosan-based pH-sensitive interpenetrating network microgels for the controlled release of cefadroxil. *Carbohydrate Polymers* **2006**, *66*, 333-344, doi:<https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2006.03.025>.

239. Brugnerotto, J.; Lizardi, J.; Goycoolea, F.M.; Argüelles-Monal, W.; Desbrières, J.; Rinaudo, M. An infrared investigation in relation with chitin and chitosan characterization. *Polymer* **2001**, *42*, 3569-3580, doi:[https://doi.org/10.1016/S0032-3861\(00\)00713-8](https://doi.org/10.1016/S0032-3861(00)00713-8).
240. Voron'ko, N.G.; Derkach, S.R.; Kuchina, Y.A.; Sokolan, N.I. The chitosan–gelatin (bio)polyelectrolyte complexes formation in an acidic medium. *Carbohydrate Polymers* **2016**, *138*, 265-272, doi:<https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2015.11.059>.
241. Jridi, M.; Hajji, S.; Ayed, H.B.; Lassoued, I.; Mbarek, A.; Kammoun, M.; Souissi, N.; Nasri, M. Physical, structural, antioxidant and antimicrobial properties of gelatin–chitosan composite edible films. *International Journal of Biological Macromolecules* **2014**, *67*, 373-379, doi:<https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2014.03.054>.
242. Pereda, M.; Ponce, A.G.; Marcovich, N.E.; Ruseckaite, R.A.; Martucci, J.F. Chitosan-gelatin composites and bi-layer films with potential antimicrobial activity. *Food Hydrocolloids* **2011**, *25*, 1372-1381, doi:<https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2011.01.001>.
243. Lima, C.G.A.; de Oliveira, R.S.; Figueiró, S.D.; Wehmann, C.F.; Góes, J.C.; Sombra, A.S.B. DC conductivity and dielectric permittivity of collagen–chitosan films. *Materials Chemistry and Physics* **2006**, *99*, 284-288, doi:<https://doi.org/10.1016/j.matchemphys.2005.10.027>.
244. Lavorgna, M.; Piscitelli, F.; Mangiacapra, P.; Buonocore, G.G. Study of the combined effect of both clay and glycerol plasticizer on the properties of chitosan films. *Carbohydrate Polymers* **2010**, *82*, 291-298, doi:<https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2010.04.054>.
245. Liu, Z.; Ge, X.; Lu, Y.; Dong, S.; Zhao, Y.; Mingyong, Z. Effects of chitosan molecular weight and degree of deacetylation on the properties of gelatine-based films. *Food Hydrocolloids* **2012**, *26*, 311–317, doi:10.1016/j.foodhyd.2011.06.008.
246. An, J.; Gou, Y.; Yang, C.; Hu, F.; Wang, C. Synthesis of a biocompatible gelatin functionalized graphene nanosheets and its application for drug delivery. *Materials Science and Engineering: C* **2013**, *33*, 2827-2837, doi:<https://doi.org/10.1016/j.msec.2013.03.008>.
247. Nady, N.; Kandil, S.H. Novel Blend for Producing Porous Chitosan-Based Films Suitable for Biomedical Applications. *Membranes* **2018**, *8*, doi:10.3390/membranes8010002.
248. Gonil, P.; Sajomsang, W.; Ruktanonchai, U.R.; Pimpha, N.; Sramala, I.; Nuchuchua, O.; Saesoo, S.; Chaleawlert-umpon, S.; Puttipipatkachorn, S. Novel quaternized chitosan containing β -cyclodextrin moiety: Synthesis, characterization and antimicrobial activity. *Carbohydrate Polymers* **2011**, *83*, 905-913, doi:<https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2010.08.080>.
249. Gartner, C.; López, B.L.; Sierra, L.; Graf, R.; Spiess, H.W.; Gaborieau, M. Interplay between Structure and Dynamics in Chitosan Films Investigated with Solid-State NMR, Dynamic Mechanical Analysis, and X-ray Diffraction. *Biomacromolecules* **2011**, *12*, 1380-1386, doi:10.1021/bm200193u.
250. Madian, N.G.; Mohamed, N. Enhancement of the dynamic mechanical properties of chitosan thin films by crosslinking with greenly synthesized silver nanoparticles. *Journal of Materials Research and Technology* **2020**, *9*, 12970-12975, doi:<https://doi.org/10.1016/j.jmrt.2020.09.028>.

251. Mekanik, S.; Dielektrik, D.d.; Chitosan, P.; DiubahsuaiLateks, y.; Asli, G.; Taweepreda, W. Dynamic Mechanical and Dielectric Properties of Modified Surface Chitosan/Natural Rubber Latex. 2014.
252. Agumba, J.; Hanif, J. The α - and β -Relaxation Processes of Polymeric Chitosan from Squid Gladii as Revealed by Dynamic Mechanical Analysis. **2019**, 2, 40-45.
253. Neto, C.G.T.; Giacometti, J.A.; Job, A.E.; Ferreira, F.C.; Fonseca, J.L.C.; Pereira, M.R. Thermal Analysis of Chitosan Based Networks. *Carbohydrate Polymers* **2005**, 62, 97-103, doi:<https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2005.02.022>.
254. Mucha, M.; Pawlak, A. Thermal analysis of chitosan and its blends. *Thermochimica Acta* **2005**, 427, 69-76, doi:<https://doi.org/10.1016/j.tca.2004.08.014>.
255. Dhawade, P.; Jagtap, R.N. Characterization of the glass transition temperature of chitosan and its oligomers by temperature modulated differential scanning calorimetry. *Adv Appl Sci Res* **2012**, 3, 1372-1382.
256. Lazaridou, A.; Biliaderis, C.G. Thermophysical properties of chitosan, chitosan–starch and chitosan–pullulan films near the glass transition. *Carbohydrate Polymers* **2002**, 48, 179-190, doi:[https://doi.org/10.1016/S0144-8617\(01\)00261-2](https://doi.org/10.1016/S0144-8617(01)00261-2).
257. Kumar, S.; Shukla, A.; Baul, P.P.; Mitra, A.; Halder, D. Biodegradable hybrid nanocomposites of chitosan/gelatin and silver nanoparticles for active food packaging applications. *Food Packaging and Shelf Life* **2018**, 16, 178-184, doi:<https://doi.org/10.1016/j.fpsl.2018.03.008>.
258. Jiankang, H.; Dichen, L.; Yaxiong, L.; Bo, Y.; Hanxiang, Z.; Qin, L.; Bingheng, L.; Yi, L. Preparation of chitosan–gelatin hybrid scaffolds with well-organized microstructures for hepatic tissue engineering. *Acta Biomaterialia* **2009**, 5, 453-461, doi:<https://doi.org/10.1016/j.actbio.2008.07.002>.
259. Cheng, Y.-H.; Ko, Y.-C.; Chang, Y.-F.; Huang, S.-H.; Liu, C.J.-I. Thermosensitive chitosan-gelatin-based hydrogel containing curcumin-loaded nanoparticles and latanoprost as a dual-drug delivery system for glaucoma treatment. *Experimental Eye Research* **2019**, 179, 179-187, doi:<https://doi.org/10.1016/j.exer.2018.11.017>.
260. Jiankang, H.; Dichen, L.; Yaxiong, L.; Bo, Y.; Bingheng, L.; Qin, L. Fabrication and characterization of chitosan/gelatin porous scaffolds with predefined internal microstructures. *Polymer* **2007**, 48, 4578-4588, doi:<https://doi.org/10.1016/j.polymer.2007.05.048>.
261. Papadogiannis, F.; Batsali, A.; Klontzas, M.E.; Karabela, M.; Georgopoulou, A.; Mantalaris, A.; Zafeiropoulos, N.E.; Chatzinikolaidou, M.; Pontikoglou, C. Osteogenic differentiation of bone marrow mesenchymal stem cells on chitosan/gelatin scaffolds: gene expression profile and mechanical analysis. *Biomedical materials (Bristol, England)* **2020**, 15, 064101, doi:10.1088/1748-605X/aba325.
262. Takigawa, T.; Endo, Y. Effects of Glutaraldehyde Exposure on Human Health. **2006**, 48, 75-87, doi:<https://doi.org/10.1539/joh.48.75>.
263. Pinheiro, A.; Cooley, A.; Liao, J.; Prabhu, R.; Elder, S. Comparison of natural crosslinking agents for the stabilization of xenogenic articular cartilage. **2016**, 34, 1037-1046, doi:<https://doi.org/10.1002/jor.23121>.

264. Umashankar, P.R.; Mohanan, P.V.; Kumari, T.V. Glutaraldehyde treatment elicits toxic response compared to decellularization in bovine pericardium. *Toxicology international* **2012**, *19*, 51-58, doi:10.4103/0971-6580.94513.
265. Rui, L.; Xie, M.; Hu, B.; Zhou, L.; Yin, D.; Zeng, X. A comparative study on chitosan/gelatin composite films with conjugated or incorporated gallic acid. *Carbohydrate Polymers* **2017**, *173*, 473-481, doi:<https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2017.05.072>.
266. Chiono, V.; Pulieri, E.; Vozzi, G.; Ciardelli, G.; Ahluwalia, A.; Giusti, P. Genipin-crosslinked chitosan/gelatin blends for biomedical applications. *Journal of Materials Science: Materials in Medicine* **2008**, *19*, 889-898, doi:10.1007/s10856-007-3212-5.
267. Arvanitoyannis, I.S.; Nakayama, A.; Aiba, S.-i. Chitosan and gelatin based edible films: state diagrams, mechanical and permeation properties. *Carbohydrate Polymers* **1998**, *37*, 371-382, doi:[https://doi.org/10.1016/S0144-8617\(98\)00083-6](https://doi.org/10.1016/S0144-8617(98)00083-6).
268. Ahmed, S.; Ikram, S. Chitosan and gelatin based biodegradable packaging films with UV-light protection. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology* **2016**, *163*, 115-124, doi:<https://doi.org/10.1016/j.jphotobiol.2016.08.023>.
269. Cardoso, G.P.; Dutra, M.P.; Fontes, P.R.; Ramos, A.d.L.S.; Gomide, L.A.d.M.; Ramos, E.M. Selection of a chitosan gelatin-based edible coating for color preservation of beef in retail display. *Meat Science* **2016**, *114*, 85-94, doi:<https://doi.org/10.1016/j.meatsci.2015.12.012>.
270. Caroni, J.G.; de Almeida Mattos, A.V.; Fernandes, K.R.; Balogh, D.T.; Renno, A.C.M.; Okura, M.H.; Malpass, A.C.G.; Ferraresi, C.; Garcia, L.A.; Sanfelice, R.C.; et al. Chitosan-based glycerol-plasticized membranes: bactericidal and fibroblast cellular growth properties. *Polymer Bulletin* **2020**, doi:10.1007/s00289-020-03310-4.
271. Mohy Eldin, M.; Soliman, E.; Hashem, A.; Tamer, T. Chitosan modified membranes for wound dressing applications: Preparations, characterization and Bio-evaluation. *Trends in Biomaterials and Artificial Organs* **2008**, *22*, 158-168.
272. Tian, M.; Yao, Y.; Liu, S.; Yang, D.; Zhang, L.; Nishi, T.; Ning, N. Separated-structured all-organic dielectric elastomer with large actuation strain under ultra-low voltage and high mechanical strength. *Journal of Materials Chemistry A* **2015**, *3*, 1483-1491, doi:10.1039/C4TA04197F.
273. Hu, H.; Xin, J.H.; Hu, H.; Chan, A.; He, L. Glutaraldehyde-chitosan and poly (vinyl alcohol) blends, and fluorescence of their nano-silica composite films. *Carbohydrate Polymers* **2013**, *91*, 305-313, doi:<https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2012.08.038>.
274. Qiang, X.; Zhou, S.; Zhang, Z.; Quan, Q.; Huang, D. Synergistic Effect of Halloysite Nanotubes and Glycerol on the Physical Properties of Fish Gelatin Films. **2018**, *10*, 1258.
275. Menezes, J.E.S.A.; Santos, H.S.d.; Ferreira, M.K.A.; Magalhães, F.E.A.; da Silva, D.S.; Bandeira, P.N.; Saraiva, G.D.; Pessoa, O.D.L.; Ricardo, N.M.P.S.; Cruz, B.G.; et al. Preparation, structural and spectroscopic characterization of chitosan membranes containing allantoin. *Journal of Molecular Structure* **2020**, *1199*, 126968, doi:<https://doi.org/10.1016/j.molstruc.2019.126968>.

276. Peng, Y.; Wang, Q.; Shi, J.; Chen, Y.; Zhang, X. Optimization and release evaluation for tea polyphenols and chitosan composite films with regulation of glycerol and Tween. *Food Science and Technology* **2019**, *40*, doi:10.1590/fst.34718.
277. Leceta, I.; Guerrero, P.; Ibarburu, I.; Dueñas, M.T.; de la Caba, K. Characterization and antimicrobial analysis of chitosan-based films. *Journal of Food Engineering* **2013**, *116*, 889-899, doi:<https://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2013.01.022>.
278. Quijada-Garrido, I.; Iglesias-González, V.; Mazón-Arechederra, J.M.; Barrales-Rienda, J.M. The role played by the interactions of small molecules with chitosan and their transition temperatures. Glass-forming liquids: 1,2,3-Propantriol (glycerol). *Carbohydrate Polymers* **2007**, *68*, 173-186, doi:<https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2006.07.025>.
279. Su, J.-F.; Huang, Z.; Yuan, X.-Y.; Wang, X.-Y.; Li, M. Structure and properties of carboxymethyl cellulose/soy protein isolate blend edible films crosslinked by Maillard reactions. *Carbohydrate Polymers* **2010**, *79*, 145-153, doi:<https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2009.07.035>.
280. Rivero, S.; Damonte, L.; García, M.A.; Pinotti, A. An Insight into the Role of Glycerol in Chitosan Films. *Food Biophysics* **2016**, *11*, 117-127, doi:10.1007/s11483-015-9421-4.
281. Suderman, N.; Isa, M.I.N.; Sarbon, N.M. The effect of plasticizers on the functional properties of biodegradable gelatin-based film: A review. *Food Bioscience* **2018**, *24*, 111-119, doi:<https://doi.org/10.1016/j.fbio.2018.06.006>.
282. Bergo, P.; Moraes, I.C.F.; Sobral, P.J.A. Effects of plasticizer concentration and type on moisture content in gelatin films. *Food Hydrocolloids* **2013**, *32*, 412-415, doi:<https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2013.01.015>.
283. Wang, Y.-Z.; Li, Y.; Zhang, J.-X. Scaling of the hysteresis in the glass transition of glycerol with the temperature scanning rate. **2011**, *134*, 114510, doi:10.1063/1.3564919.
284. Einfeldt, J.; Meißner, D.; Kwasniewski, A. Contributions to the molecular origin of the dielectric relaxation processes in polysaccharides – the high temperature range. *Journal of Non-Crystalline Solids* **2003**, *320*, 40-55, doi:[https://doi.org/10.1016/S0022-3093\(03\)00086-3](https://doi.org/10.1016/S0022-3093(03)00086-3).
285. Montes, H.; Cavaillé, J.Y.; Mazeau, K. Secondary relaxations in amorphous cellulose. *Journal of Non-Crystalline Solids* **1994**, *172-174*, 990-995, doi:[https://doi.org/10.1016/0022-3093\(94\)90611-4](https://doi.org/10.1016/0022-3093(94)90611-4).
286. Kalichevsky, M.T.; Jaroszkiewicz, E.M.; Blanshard, J.M.V. Glass transition of gluten. 1: Gluten and gluten—sugar mixtures. *International Journal of Biological Macromolecules* **1992**, *14*, 257-266, doi:[https://doi.org/10.1016/S0141-8130\(05\)80038-8](https://doi.org/10.1016/S0141-8130(05)80038-8).
287. Kalichevsky, M.T.; Jaroszkiewicz, E.M.; Ablett, S.; Blanshard, J.M.V.; Lillford, P.J. The glass transition of amylopectin measured by DSC, DMTA and NMR. *Carbohydrate Polymers* **1992**, *18*, 77-88, doi:[https://doi.org/10.1016/0144-8617\(92\)90129-E](https://doi.org/10.1016/0144-8617(92)90129-E).
288. Einfeldt, J.; Meissner, D.; Kwasniewski, A. Polymerdynamics of cellulose and other polysaccharides in solid state-secondary dielectric relaxation processes. *Progress in Polymer Science - PROG POLYM SCI* **2001**, *26*, 1419-1472, doi:10.1016/S0079-6700(01)00020-X.

289. Biliaderis, C.G.; Lazaridou, A.; Arvanitoyannis, I. Glass transition and physical properties of polyol-plasticised pullulan–starch blends at low moisture. *Carbohydrate Polymers* **1999**, *40*, 29-47, doi:[https://doi.org/10.1016/S0144-8617\(99\)00026-0](https://doi.org/10.1016/S0144-8617(99)00026-0).
290. Peng, J.; Wang, X.; Lou, T. Preparation of chitosan/gelatin composite foam with ternary solvents of dioxane/acetic acid/water and its water absorption capacity. *Polymer Bulletin* **2020**, *77*, 5227-5244, doi:10.1007/s00289-019-03016-2.
291. Yue, Y.; Wang, X.; Han, J.; Yu, L.; Chen, J.; Wu, Q.; Jiang, J. Effects of nanocellulose on sodium alginate/polyacrylamide hydrogel: Mechanical properties and adsorption-desorption capacities. *Carbohydrate Polymers* **2019**, *206*, 289-301, doi:<https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2018.10.105>.
292. Maeda, Y.; Paul, D.R. Effect of antiplasticization on gas sorption and transport. III. Free volume interpretation. **1987**, *25*, 1005-1016, doi:<https://doi.org/10.1002/polb.1987.090250503>.
293. Casalini, R.; Ngai, K.L.; Robertson, C.G.; Roland, C.M. α - and β -Relaxations in neat and antiplasticized polybutadiene. **2000**, *38*, 1841-1847, doi:[https://doi.org/10.1002/1099-0488\(20000715\)38:14<1841::AID-POLB20>3.0.CO;2-0](https://doi.org/10.1002/1099-0488(20000715)38:14<1841::AID-POLB20>3.0.CO;2-0).
294. Capponi, S.; Álvarez, F.; Racko, D. Free Volume in a PVME Polymer–Water Solution. *Macromolecules* **2020**, *53*, 4770–4782, doi:10.1021/acs.macromol.0c00472.
295. Weadock, K.S.; Miller, E.J.; Bellincampi, L.D.; Zawadsky, J.P.; Dunn, M.G. Physical crosslinking of collagen fibers: comparison of ultraviolet irradiation and dehydrothermal treatment. *Journal of biomedical materials research* **1995**, *29*, 1373-1379, doi:10.1002/jbm.820291108.
296. Xu, J.; Cai, N.; Xu, W.; Xue, Y.; Wang, Z.; Dai, Q.; Yu, B. Mechanical enhancement of nanofibrous scaffolds through polyelectrolyte complexation. *Nanotechnology* **2012**, *24*, 025701, doi:10.1088/0957-4484/24/2/025701.
297. GONTARD, N.; GUILBERT, S.; CUQ, J.-L. Edible Wheat Gluten Films: Influence of the Main Process Variables on Film Properties using Response Surface Methodology. **1992**, *57*, 190-195, doi:<https://doi.org/10.1111/j.1365-2621.1992.tb05453.x>.
298. Qadariyah, L.; Mahfud; Sumarno; Machmudah, S.; Wahyudiono; Sasaki, M.; Goto, M. Degradation of glycerol using hydrothermal process. *Bioresource Technology* **2011**, *102*, 9267-9271, doi:<https://doi.org/10.1016/j.biortech.2011.06.066>.
299. Matveev, Y.I.; Grinberg, V.Y.; Tolstoguzov, V.B. The plasticizing effect of water on proteins, polysaccharides and their mixtures. Glassy state of biopolymers, food and seeds. *Food Hydrocolloids* **2000**, *14*, 425-437, doi:[https://doi.org/10.1016/S0268-005X\(00\)00020-5](https://doi.org/10.1016/S0268-005X(00)00020-5).
300. Vieira, M.G.A.; da Silva, M.A.; dos Santos, L.O.; Beppu, M.M. Natural-based plasticizers and biopolymer films: A review. *European Polymer Journal* **2011**, *47*, 254-263, doi:<https://doi.org/10.1016/j.eurpolymj.2010.12.011>.
301. Chen, T.T. Humidity Influence to the Thermal and Mechanical Properties of Gelatin Capsules.
302. Zhang, K.; Wang, S.; Zhou, C.; Cheng, L.; Gao, X.; Xie, X.; Sun, J.; Wang, H.; Weir, M.D.; Reynolds, M.A.; et al. Advanced smart biomaterials and constructs for hard tissue engineering and regeneration. *Bone Research* **2018**, *6*, 31, doi:10.1038/s41413-018-0032-9.

303. Hunt, J.A.; Chen, R.; van Veen, T.; Bryan, N. Hydrogels for tissue engineering and regenerative medicine. *Journal of Materials Chemistry B* **2014**, *2*, 5319-5338, doi:10.1039/C4TB00775A.
304. Di Martino, A.; Sittering, M.; Risbud, M.V. Chitosan: A versatile biopolymer for orthopaedic tissue-engineering. *Biomaterials* **2005**, *26*, 5983-5990, doi:<https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2005.03.016>.
305. Manjubala, I.; Woesz, A.; Pilz, C.; Rumpler, M.; Fratzl-Zelman, N.; Roschger, P.; Stampfl, J.; Fratzl, P. Biomimetic mineral-organic composite scaffolds with controlled internal architecture. *Journal of Materials Science: Materials in Medicine* **2005**, *16*, 1111-1119, doi:10.1007/s10856-005-4715-6.
306. Djerbal, L.; Lortat-Jacob, H.; Kwok, J.C.F. Chondroitin sulfates and their binding molecules in the central nervous system. *Glycoconjugate Journal* **2017**, *34*, 363-376, doi:10.1007/s10719-017-9761-z.
307. Zhou, F.; Zhang, X.; Cai, D.; Li, J.; Mu, Q.; Zhang, W.; Zhu, S.; Jiang, Y.; Shen, W.; Zhang, S.; et al. Silk fibroin-chondroitin sulfate scaffold with immunoinhibition property for articular cartilage repair. *Acta Biomaterialia* **2017**, *63*, 64-75, doi:<https://doi.org/10.1016/j.actbio.2017.09.005>.
308. Xu, S.; Yonese, M. Two Dimensional and Three Dimensional Interactions between Bovine Serum Albumin and Chondroitin Sulfate. *Polymer Journal* **2007**, *39*, 298-303, doi:10.1295/polymj.PJ2006123.
309. Stone, W.L.; Leavitt, L.; Varacallo, M. Physiology, Growth Factor. In *StatPearls*; StatPearls Publishing Copyright © 2021, StatPearls Publishing LLC.: Treasure Island (FL), 2021.
310. Charbonneau, C.; Liberelle, B.; Hébert, M.-J.; De Crescenzo, G.; Lerouge, S. Stimulation of cell growth and resistance to apoptosis in vascular smooth muscle cells on a chondroitin sulfate/epidermal growth factor coating. *Biomaterials* **2011**, *32*, 1591-1600, doi:<https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2010.10.055>.
311. Farrugia, B.L.; Lord, M.S.; Whitelock, J.M.; Melrose, J. Harnessing chondroitin sulphate in composite scaffolds to direct progenitor and stem cell function for tissue repair. *Biomaterials Science* **2018**, *6*, 947-957, doi:10.1039/C7BM01158J.
312. Machado, C.B.; Ventura, J.M.G.; Lemos, A.F.; Ferreira, J.M.F.; Leite, M.F.; Goes, A.M. 3D chitosan-gelatin-chondroitin porous scaffold improves osteogenic differentiation of mesenchymal stem cells. *Biomedical Materials* **2007**, *2*, 124-131, doi:10.1088/1748-6041/2/2/010.
313. Silva, J.M.; Georgi, N.; Costa, R.; Sher, P.; Reis, R.L.; Van Blitterswijk, C.A.; Karperien, M.; Mano, J.F. Nanostructured 3D constructs based on chitosan and chondroitin sulphate multilayers for cartilage tissue engineering. *PloS one* **2013**, *8*, e55451, doi:10.1371/journal.pone.0055451.
314. Kuo, C.-Y.; Chen, C.-H.; Hsiao, C.-Y.; Chen, J.-P. Incorporation of chitosan in biomimetic gelatin/chondroitin-6-sulfate/hyaluronan cryogel for cartilage tissue engineering. *Carbohydrate Polymers* **2015**, *117*, 722-730, doi:<https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2014.10.056>.

315. Cahú, T.B.; Silva, R.A.; Silva, R.P.F.; Silva, M.M.; Arruda, I.R.S.; Silva, J.F.; Costa, R.M.P.B.; Santos, S.D.; Nader, H.B.; Bezerra, R.S. Evaluation of Chitosan-Based Films Containing Gelatin, Chondroitin 4-Sulfate and ZnO for Wound Healing. *Applied Biochemistry and Biotechnology* **2017**, *183*, 765-777, doi:10.1007/s12010-017-2462-z.
316. Fan, M.; Ma, Y.; Tan, H.; Jia, Y.; Zou, S.; Guo, S.; Zhao, M.; Huang, H.; Ling, Z.; Chen, Y.; et al. Covalent and injectable chitosan-chondroitin sulfate hydrogels embedded with chitosan microspheres for drug delivery and tissue engineering. *Materials Science and Engineering: C* **2017**, *71*, 67-74, doi:<https://doi.org/10.1016/j.msec.2016.09.068>.
317. Pan, Y.; Xiao, C.; Tan, H.; Yuan, G.; Li, J.; Li, S.; Jia, Y.; Xiong, D.; Hu, X.; Niu, X. Covalently injectable chitosan/chondroitin sulfate hydrogel integrated gelatin/heparin microspheres for soft tissue engineering. *International Journal of Polymeric Materials and Polymeric Biomaterials* **2021**, *70*, 149-157, doi:10.1080/00914037.2019.1695210.
318. Thomas, L.; Mathew, S.; Johnson, S. In-silico prediction of role of chitosan, chondroitin sulphate and agar in process of wound healing towards scaffold development. *Informatics in Medicine Unlocked* **2020**, *20*, 100406, doi:<https://doi.org/10.1016/j.imu.2020.100406>.
319. Samimi Gharai, S.; Habibi, S.; Nazockdast, H. Fabrication and characterization of chitosan/gelatin/thermoplastic polyurethane blend nanofibers. **2018**, *1*, 2515221118769324, doi:10.1177/2515221118769324.
320. Ng, W.L.; Yeong, W.Y.; Win Naing, M. Polyelectrolyte gelatin-chitosan hydrogel optimized for 3D bioprinting in skin tissue engineering. *International Journal of Bioprinting* **2016**, *2*, doi:10.18063/IJB.2016.01.009.
321. Ng, W.L.; Yeong, W.Y.; Naing, M.W. Development of Polyelectrolyte Chitosan-gelatin Hydrogels for Skin Bioprinting. *Procedia CIRP* **2016**, *49*, 105-112, doi:<https://doi.org/10.1016/j.procir.2015.09.002>.
322. Venkatesan, J.; Pallela, R.; Bhatnagar, I.; Kim, S.-K. Chitosan-amylopectin/hydroxyapatite and chitosan-chondroitin sulphate/hydroxyapatite composite scaffolds for bone tissue engineering. *International Journal of Biological Macromolecules* **2012**, *51*, 1033-1042, doi:<https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2012.08.020>.
323. Wang, S.-J.; Wang, B.-B.; Bai, F.-W.; Ma, X.-J. Tumor cell responses to carbon dots derived from chondroitin sulfate. *RSC Advances* **2015**, *5*, 81388-81394, doi:10.1039/C5RA14585F.
324. Criado, M.; Rey, J.M.; Mijangos, C.; Hernández, R. Double-membrane thermoresponsive hydrogels from gelatin and chondroitin sulphate with enhanced mechanical properties. *RSC Advances* **2016**, *6*, 105821-105826, doi:10.1039/C6RA25053J.
325. Vasconcelos Oliveira, A.P.; de Abreu Feitosa, V.; de Oliveira, J.M.; Coelho, A.L.; de Araújo P. Vieira, L.; de Assis Rocha da Silva, F.; de Assis Avelino Figueredo Sobrinho, F.; Duarte, E.B.; de Souza, B.W.; de Sá Moreira de Souza Filho, M. Characteristics of Chondroitin Sulfate Extracted of Tilapia (*Oreochromis niloticus*) Processing. *Procedia Engineering* **2017**, *200*, 193-199, doi:<https://doi.org/10.1016/j.proeng.2017.07.028>.
326. Παναγιώτου, Κ. *Επιστήμη και Τεχνολογία Πολυμερών*, 3 ed.; Εκδόσεις Πήγασος; Θεσσαλονίκη 2006.

327. Sabu Thomas, R.S., Sarath Chandran. *Nanostructured Polymer Blends*; Elsevier: India, 2013.
328. Loh, Q.L.; Choong, C. Three-dimensional scaffolds for tissue engineering applications: role of porosity and pore size. *Tissue engineering. Part B, Reviews* **2013**, *19*, 485-502, doi:10.1089/ten.TEB.2012.0437.
329. Savitskaya, I.S.; Shokatayeva, D.H.; Kistaubayeva, A.S.; Ignatova, L.V.; Digel, I.E. Antimicrobial and wound healing properties of a bacterial cellulose based material containing *B. subtilis* cells. *Heliyon* **2019**, *5*, e02592, doi:<https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2019.e02592>.
330. Fijan, S.; Frauwallner, A.; Langerholc, T.; Krebs, B.; ter Haar, J.A.; Heschl, A.; Mičetić Turk, D.; Rogelj, I. Efficacy of Using Probiotics with Antagonistic Activity against Pathogens of Wound Infections: An Integrative Review of Literature. *BioMed Research International* **2019**, *2019*, 7585486, doi:10.1155/2019/7585486.
331. Reid, G.; Jass, J.; Sebulsky, M.T.; McCormick, J.K. Potential uses of probiotics in clinical practice. *Clin Microbiol Rev* **2003**, *16*, 658-672, doi:10.1128/cmr.16.4.658-672.2003.
332. Kelly, M.J. Wound infection: a controlled clinical and experimental demonstration of synergy between aerobic (*Escherichia coli*) and anaerobic (*Bacteroides fragilis*) bacteria. *Ann R Coll Surg Engl* **1980**, *62*, 52-59.
333. Nagoba, B.S.; Wadher, B.J.; Rao, A.K.; Kore, G.D.; Gomashe, A.V.; Ingle, A.B. A simple and effective approach for the treatment of chronic wound infections caused by multiple antibiotic resistant *Escherichia coli*. *The Journal of hospital infection* **2008**, *69*, 177-180, doi:10.1016/j.jhin.2008.03.014.
334. Yarboro, D.D. A comparative study of the dressings silver sulfadiazine and Aquacel Ag in the management of superficial partial-thickness burns. *Advances in skin & wound care* **2013**, *26*, 259-262, doi:10.1097/01.ASW.0000431084.85141.d1.
335. Ron Walls, R.H., Marianne Gausche-Hill. *Rosen's Emergency Medicine: Concepts and Clinical Practice*; Elsevier: 2017; p. 2688.
336. Chen, H.; Li, B.; Feng, B.; Wang, H.; Yuan, H.; Xu, Z. Tetracycline hydrochloride loaded citric acid functionalized chitosan hydrogel for wound healing. *RSC Advances* **2019**, *9*, 19523-19530, doi:10.1039/C9RA02628B.
337. Negut, I.; Grumezescu, V.; Grumezescu, A.M. Treatment Strategies for Infected Wounds. *Molecules* **2018**, *23*, 2392, doi:10.3390/molecules23092392.
338. Nostro, A.; Blanco, A.R.; Cannatelli, M.A.; Enea, V.; Flamini, G.; Morelli, I.; Sudano Roccaro, A.; Alonzo, V. Susceptibility of methicillin-resistant staphylococci to oregano essential oil, carvacrol and thymol. *FEMS Microbiology Letters* **2004**, *230*, 191-195, doi:10.1016/S0378-1097(03)00890-5 %J FEMS Microbiology Letters.
339. Sarikurkcu, C.; Zengin, G.; Oskay, M.; Uysal, S.; Ceylan, R.; Aktumsek, A. Composition, antioxidant, antimicrobial and enzyme inhibition activities of two *Origanum vulgare* subspecies (subsp. *vulgare* and subsp. *hirtum*) essential oils. *Industrial Crops and Products* **2015**, *70*, 178-184, doi:<https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2015.03.030>.
340. Altiok, D.; Altiok, E.; Tihminlioglu, F. Physical, antibacterial and antioxidant properties of chitosan films incorporated with thyme oil for potential wound healing applications. *Journal of Materials Science: Materials in Medicine* **2010**, *21*, 2227-2236, doi:10.1007/s10856-010-4065-x.

341. Standards, N.C.f.C.L. Performance standards for antimicrobial disk susceptibility tests. **2003**.
342. Chistiakov, D.A.; Orekhov, A.N.; Bobryshev, Y.V. Vascular smooth muscle cell in atherosclerosis. **2015**, *214*, 33-50, doi:<https://doi.org/10.1111/apha.12466>.
343. Shepro, D.; Morel, N.M.L. Pericyte physiology. **1993**, *7*, 1031-1038, doi:<https://doi.org/10.1096/fasebj.7.11.8370472>.
344. Velnar, T.; Gradisnik, L. Tissue Augmentation in Wound Healing: the Role of Endothelial and Epithelial Cells. *Medical archives (Sarajevo, Bosnia and Herzegovina)* **2018**, *72*, 444-448, doi:10.5455/medarh.2018.72.444-448.
345. Crampton, S.P.; Davis, J.; Hughes, C.C.W. Isolation of human umbilical vein endothelial cells (HUVEC). *J Vis Exp* **2007**, 183-183, doi:10.3791/183.
346. Ode, A.; Duda, G.N.; Glaeser, J.D.; Matziolis, G.; Frauenschuh, S.; Perka, C.; Wilson, C.J.; Kasper, G. Toward biomimetic materials in bone regeneration: Functional behavior of mesenchymal stem cells on a broad spectrum of extracellular matrix components. **2010**, *95A*, 1114-1124, doi:<https://doi.org/10.1002/jbm.a.32909>.