



ΕΛΛΗΝΙΚΗ ΔΗΜΟΚΡΑΤΙΑ
ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΙΩΑΝΝΙΝΩΝ
ΠΟΛΥΤΕΧΝΙΚΗ ΣΧΟΛΗ
ΤΜΗΜΑ ΜΗΧΑΝΙΚΩΝ ΕΠΙΣΤΗΜΗΣ ΥΛΙΚΩΝ

**«Ανάπτυξη και χαρακτηρισμός πολυμερικών μεμβρανών για
απελευθέρωση υδροχλωρικής τετρακυκλίνης (ΤΗ).»**

ΕΡΕΥΝΗΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ ΔΙΠΛΩΜΑΤΟΣ ΕΙΔΙΚΕΥΣΗΣ
Δ.Π.Μ.Σ.: «ΧΗΜΕΙΑ & ΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑ ΥΛΙΚΩΝ»
ΕΠΙΒΛΕΠΩΝ ΚΑΘΗΓΗΤΗΣ: Ν. ΖΑΦΕΙΡΟΠΟΥΛΟΣ

ΠΟΡΦΥΡΙΑΔΟΥ ΓΛΥΚΕΡΙΑ (Α.Μ. 393)

Ιωάννινα , Φεβρουάριος 2022

Υπεύθυνη Δήλωση

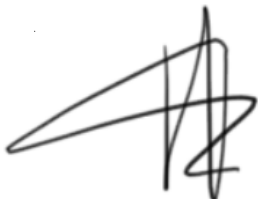
Δηλώνω υπεύθυνα ότι:

- 1) Είμαι συγγραφέας αυτής της διπλωματικής εργασίας και ότι κάθε βοήθεια την οποία είχα για την προετοιμασία της, είναι πλήρως αναγνωρισμένη και αναφέρεται στην διπλωματική εργασία. Επίσης έχω αναφέρει τις όποιες πηγές από τις οποίες έκανα χρήση δεδομένων, ιδεών ή λέξεων, είτε αυτές αναφέρονται ακριβώς είτε παραφρασμένες. Επίσης, βεβαιώνω ότι αυτή η διπλωματική εργασία προετοιμάστηκε από εμένα προσωπικά, ειδικά για τις απαιτήσεις του προγράμματος σπουδών του Τμήματος Μηχανικών Επιστήμης Υλικών του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων.
- 2) Το περιεχόμενο αυτής της εργασίας δεν απηχεί απαραίτητα τις απόψεις του Τμήματος, του Επιβλέποντα, ή της επιτροπής που την ενέκρινε.

Η Δηλούσα

Πορφυριάδου Γλυκερία

(υπογραφή)



Η παρούσα Διπλωματική Μεταπτυχιακή Εργασία εκπονήθηκε στο Εργαστήριο Επιστήμης και Τεχνολογίας Πολυμερών του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων ως τμήμα της αδημοσίευτης διδακτορικής διατριβής του Διδάκτορα Ανδρέα Καρύδη-Μεσσήνη.

Επιβλέπων καθηγητής της εργασίας είναι ο καθηγητής Νικόλαος Ζαφειρόπουλος και μέλη της τριμελούς εξεταστικής επιτροπής ο καθηγητής Απόστολος Αυγερόπουλος και ο αναπληρωτής καθηγητής Δημοσθένης Φωκάς.

Η επιτροπή συνήλθε σε συνεδρίαση στο Πανεπιστήμιο Ιωαννίνων, όπου παρακολούθησε την υποστήριξη της διατριβής με τίτλο:
«Ανάπτυξη και χαρακτηρισμός πολυμερικών μεμβρανών για απελευθέρωση υδροχλωρικής τετρακυκλίνης (ΤΗ).»

Η επιτροπή έκρινε ομόφωνα ότι η διπλωματική μεταπτυχιακή εργασία είναι πρωτότυπη και αποτελεί ουσιαστική συμβολή στην πρόοδο της Επιστήμης.

ΕΞΕΤΑΣΤΙΚΗ ΕΠΙΤΡΟΠΗ

ΚΑΘΗΓΗΤΗΣ

ΝΙΚΟΛΑΟΣ ΖΑΦΕΙΡΟΠΟΥΛΟΣ

ΚΑΘΗΓΗΤΗΣ

ΑΠΟΣΤΟΛΟΣ ΑΥΓΕΡΟΠΟΥΛΟΣ

ΑΝΑΠΛΗΡΩΤΗΣ ΚΑΘΗΓΗΤΗΣ

ΔΗΜΟΣΘΕΝΗΣ ΦΩΚΑΣ

Στους γονείς μου, Αθηνά και Απόστολο.

Ευχαριστίες

Η μεταπτυχιακή αυτή εργασία εκπονήθηκε στο Τμήμα Μηχανικών Επιστήμης Υλικών του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων κατά την χρονική περίοδο από τον Ιούλιο του 2020, μέχρι το Φεβρουάριο του 2022.

Με την ολοκλήρωση της διπλωματικής αισθάνομαι την ανάγκη να ευχαριστήσω θερμά τον επιβλέποντα Καθηγητή μου κ. Ν. Ζαφειρόπουλο για την εμπιστοσύνη που μου έδειξε με την ανάθεση της εργασίας αυτής και τη δυνατότητα να ασχοληθώ με την έρευνα σε αυτήν τη επιστημονική περιοχή. Επίσης νιώθω την υποχρέωση να ευχαριστήσω θερμά τους καθηγητές της τριμελούς επιτροπής κύριους Α. Αυγερόπουλο και Δ. Φωκά για την χαρά και την τιμή να παρευρίσκονται στην παρουσίαση της διπλωματικής μου εργασίας και να την αξιολογήσουν με την άψογη κρίση τους και τις γνώσεις τους. Ευχαριστώ επίσης τον Μεταδιδακτορικό ερευνητή Δρ. Α. Καρύδη-Μεσσήνη για την αμέριστη βοήθεια που μου παρείχε καθόλη τη διάρκεια της εκπόνησης της παρούσας εργασίας καθώς και για τις επιστημονικές μου αναζητήσεις και ανησυχίες, για τις γνώσεις που μου προσέφερε, την υπομονή αλλά κυρίως για τις ανεκτίμητες εμπειρίες που αποκόμισα όλα αυτά τα χρόνια στο Εργαστήριο Πολυμερών.

Ευχαριστώ θερμά όλους τους συνεργάτες του εργαστηρίου, που όλα αυτά τα χρόνια ο κάθε ένας με το μοναδικό του τρόπο, συνέβαλλαν στην περάτωση αυτής της εργασίας σε ένα ευχάριστο και αρμονικό περιβάλλον συναδελφικότητας και φιλίας. Σημαντική ήταν η βοήθεια, η συμπαράσταση και η εξυπηρέτηση που μου παρείχαν οι Διδακτροτικοί ερευνητές Γ. Ντούλας, Χ. Μπρακατσέλος και Η. Γιωτοπούλου τους οποίους και ευχαριστώ. Ευχάριστη και τελέσφορη ήταν η συνεργασία μου με τον Μεταδιδακτορικό ερευνητή Δρ. Δ. Μοσχόβα. Βέβαια, πολύ σημαντική ήταν η ηθική υποστήριξη του Χ. Τυρπένου και Β. Καραμαλίνγκα. Τέλος, θα ήθελα να ευχαριστήσω την οικογένεια μου για την πίστη τους, την αγάπη τους και την συμπαράσταση τους σε ό,τι επιδιώκω στη ζωή μου και για τη ουσιαστική βοήθεια τους σε ό,τι έχω καταφέρει μέχρι τώρα, όπως είναι η περάτωση της μεταπτυχιακής εργασίας μου.

Περιεχόμενα

Περιεχόμενα

Περίληψη	1
Abstract	2
<i>I. ΘΕΩΡΗΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ</i>	3
Κεφάλαιο 1 ^ο	4
Το δέρμα	4
1. Η ανατομία του δέρματος	4
1.1. Συστατικά στοιχεία του δέρματος.....	6
1.1.1. Ίνες του δέρματος.....	6
1.1.2. Χρωστικές του δέρματος.....	7
1.2. Προστασία του Δέρματος.....	8
1.3. Παθήσεις δέρματος.....	8
1.3.1. Εγκαύματα.....	8
1.4. Επούλωση εγκαυμάτων με υποκατάστατα δέρματος.....	9
Κεφάλαιο 2 ^ο	12
Χιτοζάνη	12
2. Ιστορική αναδρομή	12
2.1. Εισαγωγή	12
2.2. Πηγές και παραγωγή χιτίνης.....	13
2.3. Παραγωγή χιτοζάνης	14
2.4. Ιδιότητες	14
2.4.1. Διαλυτότητα	15
2.4.2. Μοριακό Βάρος.....	15
2.5. Εφαρμογές χιτοζάνης	16
Κεφάλαιο 3 ^ο	17
Υδροπηκτές.....	17
3. Εισαγωγή	17
3.1. Εφαρμογές σε συστήματα ελεγχόμενης αποδέσμευσης δραστικών ουσιών	18
3.1.1. Παρασκευή / Μέθοδοι διασταύρωσης.....	18
3.1.2. Φυσικώς διασταυρωμένες Υδροπηκτές.....	18
3.1.3. Αλληλεπιδράσεις φορτίων	19
3.1.2. Μηχανισμός διόγκωσης.....	20
3.1.3. Συμπεριφορά νερού στις Υδροπηκτές.....	20
Κεφάλαιο 4 ^ο	21

Ελεγχόμενη αποδέσμευση δραστικής ουσίας	21
4. Εισαγωγή	21
4.1. Στόχοι και Πλεονεκτήματα.....	23
4.2. Μηχανισμοί ελεγχόμενης αποδέσμευσης	24
4.2.2. Διάχυση.....	24
4.2.3. Διόγκωση ακολουθούμενη από διάχυση.	25
Κεφάλαιο 5°.....	28
Συστήματα διαδερμικής χορήγησης δραστικών ουσιών.....	28
5. Εισαγωγή	28
5.1. Κατασκευή και σχεδιασμός συστημάτων διαδερμικής χορήγησης.....	28
5.2. Η χιτοζάνη ως ενισχυτικό διαπέρασης	29
Κεφάλαιο 6°.....	31
Υδροχλωρική Τετρακυκλίνη (ΤΗ).....	31
6. Εισαγωγή	31
6.1. Ενδείξεις Υδροχλωρικής Τετρακυκλίνης	31
6.2. Φαρμακολογία.....	32
6.3. Φαρμακοδυναμική.....	32
6.4. Φαρμακοκινητική.....	32
6.5. Παρενέργειες Υδροχλωρικής τετρακυκλίνης	34
Κεφάλαιο 7°.....	35
Οι μεμβράνες.....	35
7. Γενικά Στοιχεία Μεμβρανών.....	35
7.1. Ταξινόμηση των Μεμβρανών	35
7.2. Παρασκευή Μεμβρανών.....	36
7.2.1. Φυσική κατάσταση πολυμερών	37
Κεφάλαιο 8°.....	39
Πειραματικές τεχνικές και μέθοδοι χαρακτηρισμού.....	39
8.1. Ηλεκτρονική Μικροσκοπία Σάρωσης (SEM)	39
8.2. Φασματοσκοπία Υπερύθρου μετασχηματισμού Fourier (FTIR)	40
8.3. Περίθλαση ακτίνων Χ (XRD).....	42
8.4. Δυναμική Μηχανική Ανάλυση (DMA).....	43
8.5. Φασματοφωτομετρία (ELISA).....	45
II. Πειραματικό Μέρος	46
Κεφάλαιο 9°.....	47
Πειραματική Διαδικασία.....	47
9.1. Υλικά.....	47
9.2. Σύνθεση Μεμβρανών Χιτοζάνης και Ζελατίνης Ιχθύων.	47
9.2.1. Σύνθεση Μεμβρανών CH-0.5FG.	47
9.2.2. Σύνθεση Μεμβρανών CH-1 FG.....	49

9.2.3. Σύνθεση Μεμβρανών CH-2FG.....	49
9.2.4. Σύνθεση Μεμβρανών CH-4 FG.....	51
9.2.5. Επιλογή Μεμβράνης.....	54
9.3. 1 ^η Δοκιμή -Σύνθεση μεμβρανών με ενσωμάτωση TH.....	54
9.3.1. Σύνθεση CH-FG-Control.....	54
9.3.2. Σύνθεση CH-FG-TH	55
9.3.3. Μελέτη Αποδέσμευσης <i>in vitro</i>	56
9.4. 2 ^η Δοκιμή -Σύνθεση μεμβρανών με ενσωμάτωση TH.....	57
9.4.1. Σύνθεση CH-FG-TH και Σύνθεση CH-FG-Control.....	57
9.4.2. Μελέτη Αποδέσμευσης <i>in vitro</i>	58
9.5. 3 ^η Δοκιμή -Σύνθεση μεμβρανών με ενσωμάτωση TH.....	59
9.5.1. Σύνθεση CH-FG-TH και Σύνθεση CH-FG-Control.....	59
9.5.2. Μελέτη Αποδέσμευσης <i>in vitro</i>	60
III. Αποτελέσματα	62
Κεφάλαιο 10 ^ο	63
Αποτελέσματα	63
10.1. Αποτελέσματα Φασμάτων Υπερύθρου (ATR-IR).....	63
10.2. Αποτελέσματα περίθλασης ακτίνων –X (XRD).....	68
10.3. Αποτελέσματα Δυναμικής Μηχανική Ανάλυσης (DMA).....	71
10.4. Αποτελέσματα Ηλεκτρονικής Μικροσκοπίας Σάρωσης (SEM)	76
10.5. Αποτελέσματα Μετρήσεων Λόγου Διόγκωσης.....	78
10.6. Αποτελέσματα Ρυθμού Αποδόμησης.....	80
10.7. Αποτελέσματα Αποδέσμευσης Υδροχλωρικής Τετρακυκλίνης.....	82
Συμπεράσματα	87
Μελλοντικοί Στόχοι.....	88
Βιβλιογραφία.....	89

Κατάλογος Εικόνων

Εικόνα 1. 1. Συστατικά στοιχεία του δέρματος και ανατομία αυτού.....	5
Εικόνα 2. 1 Χημική δομή της χιτοζάνης.....	13
Εικόνα 2. 2 Πηγές α-χιτίνης (α) αστακός, (β) καβούρι, (γ) γαρίδα, (δ) krill , (ε) κωνικό σαλιγκάρι, (ζ) σκουλίκι βέλος και (η) φύκι Phaeocystis.....	13
Εικόνα 3. 1 Διαφορετική συμπεριφορά υδροπηκτών και γελών στο νερό. Οι γεμάτοι κύκλοι αντιπροσωπεύουν πραγματικούς σταυροδεσμούς, ενώ οι κενοί σταυροδεσμούς από εμπλοκή παρακείμενων αλυσίδων.....	17
Εικόνα 3. 2 Φυσική διασταύρωση, βασισμένη σε αλληλεπίδραση φορτίων, ιοντικού πολυμερούς με προσθήκη πολυμερούς ή μικρού μορίου αντίθετου φορτίου.....	19
Εικόνα 3. 3 Φυσική διασταύρωση με σχηματισμό δεσμών υδρογόνου μεταξύ γεωμετρικά συμβατών πολυμερών (μεθυλοκυτταρίνη και υαλουρονικό οξύ).....	19
Εικόνα 4. 1 Οι γραφικές παραστάσεις της συγκέντρωσης του φαρμάκου στο αίμα συναρτήσει του χρόνου (a) για ένα συμβατικό σύστημα χορήγησης φαρμάκου και (b) για ένα σύστημα βασισμένο στην τεχνολογία ελεγχόμενης χορήγησης.....	22
Εικόνα 4. 2 Σύγκριση παραδοσιακών φαρμακευτικών μορφών και συστημάτων ελεγχόμενης αποδέσμευσης.....	23
Εικόνα 4. 3 Σχηματική αναπαράσταση των τεσσάρων κατηγοριών (όσον αφορά στο τρόπο λειτουργίας) των συστημάτων ελεγχόμενης αποδέσμευσης που αναφέρονται πιο πάνω.....	24
Εικόνα 4. 4 Αποδέσμευση δραστικής ουσίας, ελεγχόμενη από διάχυση: (α) ΣΕΑΔΟ μήτρας, (β) ΣΕΑΔΟ αποθέματος.....	25
Εικόνα 4. 5 Αποδέσμευση δραστικής ουσίας από σύστημα ευαίσθητο σε περιβαλλοντικά ερεθίσματα.....	25
Εικόνα 5. 1 Σύστημα διαδερμικής χορήγησης δραστικής ουσίας τύπου αποθέματος (reservoir). ...	29
Εικόνα 5. 2 Σύστημα διαδερμικής χορήγησης δραστικής ουσίας τύπου μήτρας (matrix).	29
Εικόνα 5. 3 Διαπέραση του δέρματος από δραστική ουσία, μέσω της παρακυτταρικής οδού.....	30
Εικόνα 6. 1 Χημική δομή υδροχλωρικής τετρακυκλίνης (TH)	31
Εικόνα 8. 1 Γενικό σχεδιάγραμμα της τεχνικής SEM. Οι επιτυγχανόμενες αναλύσεις με διάφορες μικροσκοπικές τεχνικές μαζί με μερικές μορφολογικές λεπτομέρειες σε πολυμερή.....	39
Εικόνα 8. 2 Μερικές επιτρεπτές μορφές δονήσεων και κάμψεων.....	41
Εικόνα 8. 3 Σχηματική αναπαράσταση ενός γωνιομέτρου Bragg-Brentano δύο κύκλων $\theta:2\theta$ με κοινό άξονα στροφής, τον άξονα του περιθλασίμετρου.....	42
Εικόνα 8. 4 Οργανολογία της συσκευής DMA.....	44
Εικόνα 8. 5 Φασματοφωτομετρία (ELISA).....	45
Εικόνα 9. 1 Εισαγωγή 0,5g FG σε ποτήρι ζέσεως των 100ml.....	48
Εικόνα 9. 2 Προσθήκη του υδατικού διαλύματος σε καλούπια σχήματος T-bone.(δεξιά) -και σε τρυβλία Petri.(αριστερά).....	48
Εικόνα 9. 3 Εισαγωγή 1g FG σε ποτήρι ζέσεως των 100ml.(αριστερά) προσθήκη αυτού σε τρυβλία Petri..(δεξιά).....	49

.Εικόνα 9. 4 Εισαγωγή 2g FG σε ποτήρι ζέσεως των 100ml (αριστερά) . Εισαγωγή απιονισμένου νερού (δεξιά).....	50
Εικόνα 9. 5 Εισαγωγή οξικού οξέος.	50
Εικόνα 9. 6 Εισαγωγή 4g FG σε ποτήρι ζέσεως των 100ml.(αριστερά)- Λουτρό υπερήχων, για την πλήρη διαλυτοποίησή τους. (δεξιά)	51
Εικόνα 9. 7 Εισαγωγή γλυκερόλης σε ποσότητα με πιπέτα.	51
.Εικόνα 9. 8 Οι παρασκευές ζελατίνης για τις αντίστοιχες συγκεντρώσεις ζελατίνης. Ανάλογα με την συγκέντρωση ζελατίνης παρατηρούμε διαφοροποίηση στο χρώμα των υδατικών διαλυμάτων που παρασκευάστηκαν μετά την πλήρη ανάδυσή της ζελατίνης.....	52
Εικόνα 9. 9 Τελική εικόνα όλων των υδατικών διαλυμάτων χιτοζάνης ζελατίνης ιχθύων	52
Εικόνα 9. 10 Τελική εικόνα όλων των ζελατινών των διαφορετικών συστάσεων ζελατίνης ιχθύων σε σχήμα T-bone και τριβίων Petri.	52
Εικόνα 9. 11 Τελική μορφή των μεμβρανών μέσα στα τρυβλία Petri πριν την χρήση τους.	55
Εικόνα 9. 12 Μεμβράνη κατά την διαδικασία κοπής της σε δείγματα με την βοήθεια ειδικού κοπτήρα. (αριστερά) - Γυάλινα φιαλίδια για εμφύσηση των δειγμάτων των μεμβρανών.(δεξιά)	56
Εικόνα 9. 13. Χρωματική διαφοροποίηση των μεμβρανών υδροχλωρικής τετρακυκλίνης.	57
.Εικόνα 9. 14 Plate ELISA με μούχλα λόγω επιμόλυνσης.	58
Εικόνα 9. 15 Πειραματική διαδικασία της εμφύσησης των δειγμάτων μετά την κοπή τους.	58
Εικόνα 9. 16 Πειραματική διαδικασία σύνθεσης των μεμβρανών.	59
Εικόνα 9. 17. Χρωματική αναπαράσταση των μεμβρανών με αυξανόμενη ποσότητα υδροχλωρικής τετρακυκλίνης.	60
Εικόνα 9. 18 Μεμβράνη κατά την διαδικασία κοπής της. (επάνω) - Πειραματική διαδικασία σε αποστειρωμένο περιβάλλον.(κάτω)	61
Εικόνα 9. 19 Πειραματική διαδικασία της εμφύσησης των δειγμάτων (επάνω) - Plate ELISA στα οποία έχει γίνει εμφύσηση μεμβρανών. (κάτω).....	61

Περίληψη

Οι συνεχείς μελέτες και οι αυξανόμενες αιτήσεις για γρηγορότερη, ασφαλέστερη και πιο ανώδυνη επούλωση των τραυματισμών του δέρματος καθιστούν αναγκαία την δημιουργία μεμβρανών υψηλών προδιαγραφών. Προς αρωγή της ίασης είναι σημαντική η μέγιστη βιοσυμβατότητα της μεμβράνης με το τραυματισμένο τμήμα του δέρματος και η βέλτιστη θεραπεία του μέσω της σταδιακής ή ελεγχόμενης αποδέσμευσης φαρμάκου στην περιοχή που χρήζει ανάγκης.

Η παρούσα μεταπτυχιακή διατριβή ασχολείται με την παρασκευή βιοπολυμερικών υδροπηκτών χιτοζάνης και γλυκερόλης με την προσθήκη υδρολυμένης ζελατίνης, το οποίο έχει παραχθεί από οστά ιχθύων και συγκεκριμένα οστά πέστροφας, σε τέσσερεις παρασκευές με διαφορετικές αναλογίες ζελατίνης ιχθύων. Αρχικά γίνεται μια βιβλιογραφική εισαγωγική αναφορά στην χρήση μεμβρανών ως επουλωτικά μέσα και στα δερματικά τραύματα τα οποία προέρχονται κυρίως από εγκαύματα. Κατόπιν γίνεται αναφορά στην ελεγχόμενη αποδέσμευση δραστικών ουσιών μέσω υδροπηκτών στην πληγείσα περιοχή και πιο συγκεκριμένα για την χρήση υδροχλωρικής τετρακυκλίνης. και τέλος ανάλυση των συστατικών των συγκεκριμένων μεμβρανών και οι τεχνικές με τις οποίες χαρακτηρίστηκαν αυτά τα μίγματα.

Η πειραματική πορεία η οποία ακολουθήθηκε για την εργαστηριακή εκπόνηση της παρούσας διπλωματικής εργασίας αφορά την παρασκευή μεμβρανών χιτοζάνης, ζελατίνης ιχθύων και γλυκερόλης και την τροποποίησή τους με την εισαγωγή υδροχλωρικής τετρακυκλίνης αλλά και την σταδιακή αποδέσμευση αυτού του φαρμάκου. Έπειτα γίνεται χαρακτηρισμός και μελέτη της σύστασης αλλά και των ιδιοτήτων αυτών των μεμβρανών οι οποίες απαρτίζονται από τις τεχνικές ηλεκτρονικής μικροσκοπίας σάρωσης (SEM), την δυναμική μηχανική ανάλυση δείγματος (DMA), την φασματοσκοπία υπερύθρου (FT-IR), την περίθλαση μονοχρωματικής ακτινοβολίας ακτινών-X (XRD), και τέλος η μελέτη ελεγχόμενης αποδέσμευσης φαρμάκου μέσω φασματοφωτομετρίας (ELISA). Εν κατακλείδι, παρουσιάζονται αναλυτικά τα τελικά εργαστηριακά αποτελέσματα και οι μετρήσεις καθώς και οι μελλοντικοί στόχοι που αφορούν την παρούσα διπλωματική εργασία.

Abstract

Continuous studies and increasing demands for faster, safer and painlessness healing of skin injuries make it necessary to create high quality membranes to assist and speed this process. The purpose of these membranes is the maximum biocompatibility of the membrane with the injured part of the skin and its optimal treatment through the gradual or controlled release of a drug in the area where it is needed.

The present dissertation deals with the preparation of biopolymeric hydrogels of chitosan and glycerol with the addition of hydrolyzed gelatin, which has been produced by fish bones and in particular trout bones, in four different routes with different percentages of fish gelatin.

In the beginning the preparation of chitosan, fish gelatin and glycerol membranes and their modification with the introduction of tetracycline hydrochloride and the gradual release of this drug were studied. Consequently, the composition and properties of these membranes were then characterized with the use of scanning electron microscopy (SEM), dynamic thermal analysis (DMA), infrared spectroscopy (FT-IR), X-ray diffraction (XRD), and the study of controlled drug release by spectrophotometry (ELISA). Finally, the experimental results are discussed in detail, as well as the future objectives related to the present dissertation.

I. ΘΕΩΡΗΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

Κεφάλαιο 1^ο

Το δέρμα

1. Η ανατομία του δέρματος

Το δέρμα αποτελεί μεγαλύτερο σε έκταση ανθρώπινο όργανο, τόσο ως προς το βάρος του όσο και ως προς την επιφάνεια σώματος που καλύπτει. Διακρίνεται ανατομικά σε 3 βασικές κυτταρικές στιβάδες, την επιδερμίδα, το χόριο και τον υποδόριο ή λιπώδη ιστό. Κάθε μια στιβάδα έχει διαφορετική κυτταρική δομή και κατά συνέπεια διαφορετική σύσταση και λειτουργία. Το δέρμα ενός ενήλικα έχει έκταση περίπου 160 m² και αποτελεί το 8% του σωματικού του βάρους[1].

Στην επιφάνεια του δέρματος υπάρχουν λιπίδια, τρίχες, λεπτές ρυτιδώσεις και άλλα στοιχεία του όπως επίσης φακίδες, σπίλους και πόρους. Η επιδερμίδα είναι το εξωτερικό στρώμα του δέρματος. Το πάχος της είναι περίπου 0.2mm κατά μέσο όρο και ποικίλει ανά τη θέση του στο σώμα. Επιπλέον, το πάχος ποικίλλει αναλόγως τον όγκο του νερού που την συκρατεί.[2] Στην επιδερμίδα συναντούμε και έναν πολύ μεγάλο αριθμό λιπιδίων τα οποία δίνουν ανακλαστική ικανότητα αλλά έχουν επίσης στηρικτικό ρόλο. Η επιδερμίδα διαιρείται περαιτέρω σε 5 υποστιβάδες: Από τα έξω προς το έσω μέρος της, είναι η κεράτινη στιβάδα (stratum corneum), η διαυγής στιβάδα (stratum lucidum), η κοκκώδης στιβάδα (stratum granulosum), η ακανθωτή στιβάδα (stratum spinosum) αλλά και η βασική στιβάδα (stratum basale).

Η βασική στιβάδα (Stratum Basale): Αποτελεί την βαθύτερη υποστιβάδα της επιδερμίδας και αποτελείται μόνο από ένα στρώμα κυττάρων. Σε αυτή τη στιβάδα παράγονται τα κερατινοκύτταρα και διαθέτει επίσης μελανοκύτταρα. Είναι το όριο ανάμεσα σε χόριο και την επιδερμίδα. Κατέχει σχεδόν το 8% του νερού που βρίσκεται αποθηκευμένο στην επιδερμίδα.

Η ακανθωτή στιβάδα (Stratum Spinosum): Σε αυτή την υποστιβάδα τα βασικά κύτταρα γίνονται πιο επίπεδα και συγκροτούν έτσι 14 στρώματα. Αυτά τα κύτταρα ονομάζονται ακανθωτά καθώς έχουν μικρά αγκάθια στο εξωτερικό τους τμήμα. Το πάχος της υποστιβάδας είναι τυπικά από 50μm έως 150μm.

Η κοκκώδης στιβάδα (Stratum Granulosum): Αυτή η υποστιβάδα αποτελείται από 2 έως 4 στρώματα κυττάρων και έχει πάχος συνήθως 3μm. Σε αυτή την υποστιβάδα ξεκινά η κερατινοποίηση των κερατινοκυττάρων, σε αυτή την περίπτωση λύνονται τα οργανίδια όπως ο πυρήνας και τα μιτοχόνδρια.

Η διαυγής στιβάδα (Stratum Lucidum): Βρίσκεται μόνο σε περιοχές που καλύπτουν τα πέλματα ή τις παλάμες και έχει μεγάλη διαθλαστική ικανότητα. Τα κύτταρα σε αυτή τη φάση στοιβάζονται ακόμη πιο πυκνά.

Η κεράτινη στιβάδα (Stratum Corneum): Είναι η εξωτερική υποστιβάδα με πάχος 8-15μm. Συγκροτείται με αρκετά στρώματα εξαγωγικών επιπέδων των κερατινοκυττάρων, περιβαλλόμενα από λιπίδια. Τα κερατινοκύτταρα αυτής της στιβάδας είναι αφυδατωμένα,

χωρίς οργανίδια και με ίνες κερατίνης. Επιπλέον η κεράτινη στιβάδα κατέχει το 10% με 15% της συνολικής ποσότητας του νερού που είναι αποθηκευμένο στην επιδερμίδα.[2][4]

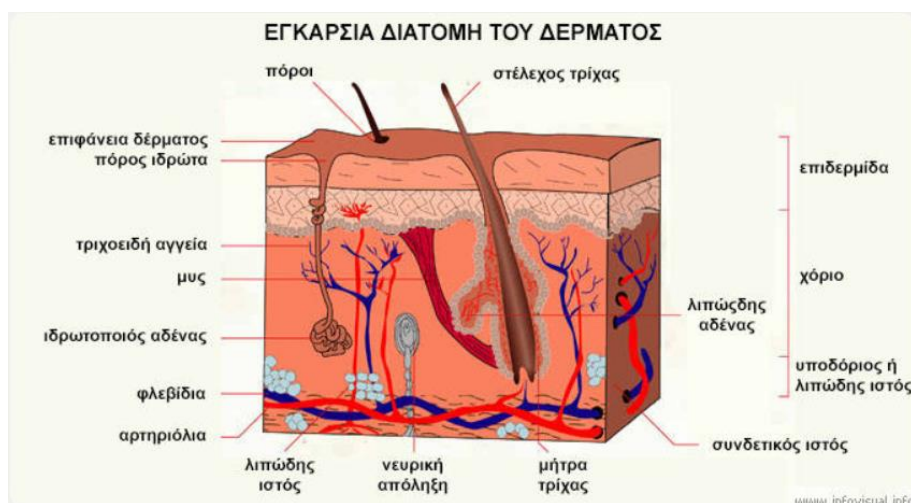
Η επιδερμίδα είναι ο μεταβολικά ενεργός ιστός. Τα κερατινοκύτταρα που παράγονται στη βασική στιβάδα του δέρματος κινούνται προς την εξωτερική επιφάνεια του δέρματος. Έτσι μέσω της διαδικασίας turn-over τα κερατινοκύτταρα αλλάζουν τη δομή τους και έτσι αποδίδονται οι φυσιολογικές τους λειτουργίες. Επίσης ο κύκλος της διαδικασίας turn-over διαρκεί περίπου 28 ημέρες.[1]

Η δεύτερη κύρια στιβάδα του δέρματος, δηλαδή το χόριο, βρίσκεται κάτω από την επιδερμίδα. Είναι πολύ παχύτερη στιβάδα από την επιδερμίδα, περίπου 1mm-4mm, και αποτελείται κυρίως από ίνες κολλαγόνου και ελαστίνης. Διαιρείται σε δύο υποστιβάδες, τη θηλώδη, η οποία περιέχει το αγγειακό δίκτυο και τη δικτυωτή, στην οποία βρίσκονται τριχοφυΐες αδένες, οι θύλακες των τριχών και εκκριτικοί αδένες.

Η θηλώδης υποστιβάδα (Papillary layer): Είναι η ανώτερη στιβάδα του χόριου και συγκροτείται από χαλαρό συνδετικό ιστό περιέχοντας μεγάλο αριθμό νευρικών ινών, τριχοειδή αγγεία, νερό αλλά και κύτταρα. Εδώ οι ίνες κολλαγόνου σχηματίζουν ένα πιο αραιό δίκτυο σε σχέση με την δικτυωτή υποστιβάδα.

Η δικτυωτή υποστιβάδα (Reticular layer): Το βαθύτερο τμήμα στο χόριο το οποίο παρουσιάζει συνέχεια στη δομή του με τον υποδόριο ιστό, σε αντίθεση με την επιδερμίδα που δεν έχει ομοιότητες με το χόριο. Συγκροτείται έτσι από ένα πυκνότερο και λεπτότερο δίκτυο με λιγότερες νευρικές ίνες και λιγότερα τριχοειδή αγγεία από τη θηλώδη υποστιβάδα. Σε αυτή την στιβάδα οι ίνες κολλαγόνου συγκροτούν παχιά δεμάτια, που διατάσσονται παράλληλα στην επιφάνεια του δέρματος.

Ο λιπώδης ή υποδόριος Ιστός (Subcutaneous Tissue): Αυτή είναι η τρίτη κύρια στιβάδα η οποία συχνά δεν κατηγοριοποιείται στον δερματικό ιστό. Είναι μια ελαστική στιβάδα με μεγάλη ποσότητα λιπωδών κυττάρων τα οποία απορροφούν επίσης κραδασμούς, προστατεύοντας τα αγγεία του αίματος και έχουν νευρικές απολήξεις. Έχει πάχος περίπου 4mm – 9mm κατά μέσο όρο, το οποίο διαφέρει ανάμεσα ανά άνθρωπο και εξαρτάται από την κατανομή λίπους στο σώμα.[4]



Εικόνα 1. 1. Συστατικά στοιχεία του δέρματος και ανατομία αυτού.[3]

1.1. Συστατικά στοιχεία του δέρματος

Τα κύτταρα που συγκροτούν τον δερματικό ιστό είναι τα κερατινοκύτταρα, οι ινοβλάστες, τα λιπόδη κύτταρα, τα μελανοκύτταρα και τα ερυθροκύτταρα. Τα βρίσκουμε σε διαφορετικές στιβάδες και έχουν διαφορετικές δομές αλλά και λειτουργίες.

Τα κερατινοκύτταρα είναι ο κύριος τύπος κυττάρου της επιδερμίδας. Παράγουν μια ινώδη πρωτεΐνη η οποία ονομάζεται κερατίνη, συμβάλλοντας έτσι στην ακαμψία του εξωτερικού στρώματος του δέρματος. Πραστατεύουν το σώμα από το εξωτερικό περιβάλλον, για παράδειγμα από την τριβή και τους παθογόνους εξωτερικούς παράγοντες, ενώ παράλληλα διατηρούν την υγρασία. Παράγονται στη βασική στιβάδα, όπου και εμφανίζουν τη μέγιστη μιτωτική δραστηριότητα. Στη συνέχεια βρίσκονται οι εξωτερικές στιβάδες σε κάθε μια από τις οποίες υφίστανται διάφορες μεταβολικές διεργασίες, με διάρκεια περίπου 28 ημέρες, για να καταλήξουν έπειτα νεκρά, στην κεράτινη στιβάδα.[1][4]

Τα μελανοκύτταρα βρίσκονται στην επιδερμίδα και ο ρόλος τους είναι να παράγουν και να μεταφέρουν μελανίνη, η οποία είναι μία από τις κύριες χρωστικές ουσίες του δέρματος που απορροφούν το φως. Περιέχουν εξειδικευμένα οργανίδια, τα μελανοσώματα. Όταν όμως το δέρμα εκτίθεται στο ηλιακό φως, τα μελανοσώματα ενεργοποιούνται και παράγουν την μελανίνη. Η πυκνότητα των μελανοσωμάτων εξαρτάται από την περιοχή του σώματος. Για παράδειγμα, συναντώνται σε μεγαλύτερη ποσότητα στις περιοχές του σώματος που εκτίθενται συχνά στο ηλιακό φως, όπως για παράδειγμα στο πρόσωπο.

Τα μελανοκύτταρα είναι κύτταρα νευρογενούς προέλευσης και φέρουν δενδρίτες οι οποίοι διακλαδίζονται μεταξύ των επιθηλιακών κυττάρων. Στα μελανοσώματα που βρίσκονται επίσης δενδρίτες των μελανοκυττάρων, φαγοκυτταρώνονται από τα κερατινοκύτταρα (επιθηλιακά κύτταρα), που περιβάλλουν τον πυρήνα και τα πραστατεύουν από την υπεριώδη ακτινοβολία.

Οι ινοβλάστες είναι μακρόστενα κύτταρα που συναντώνται στο χόριο. Παράγουν ίνες κολλαγόνου και ελαστίνης οι οποίες αποτελούν κύρια δομικά συστατικά του χορίου.

Τα ερυθροκύτταρα (ή ερυθρά αιμοσφαίρια) είναι φορείς της αιμοσφαιρίνης, η οποία επίσης λειτουργεί ως χρωστική απορροφώντας το φως που προσπίπτει στο δέρμα. Τα κύτταρα αυτά μεταφέρουν το οξυγόνο από τους πνεύμονες στους ιστούς και το διοξείδιο του άνθρακα από τους ιστούς στον πνεύμονα.

Τα λιπόδη κύτταρα βρίσκονται σε αφθονία στο χόριο. Μπορούν να συσσωρεύουν λίπος και το μέγεθός τους ποικίλει ανάλογα με τον όγκο του λίπους που περιέχουν. Αυτά τα κύτταρα δεν απορροφούν πολύ φως, σε αντίθεση με τα μελανοκύτταρα και τα ερυθροκύτταρα.[5]

1.1.1. Ίνες του δέρματος.

Το δέρμα περιέχει διάφορους τύπους ινών. Οι βασικότερες είναι αυτές επίσης κερατίνης, του κολλαγόνου και επίσης ελαστίνης.

Οι ίνες κερατίνης βρίσκονται κυρίως στα κύτταρα των εξωτερικών στιβάδων επίσης επιδερμίδας, συμπεριλαμβανομένων των κερατινοκυττάρων. Αυτές οι ίνες προστατεύουν το εσωτερικό του δέρματος από το εξωτερικό περιβάλλον. Επίσης, συγκρατούν το νερό,

συμβάλλοντας έτσι στην διατήρηση της υγρασίας του δέρματος. Το μήκος και η διάμετρος επίσης εξαρτάται από την ποσότητα νερού που περιέχουν.

Οι ίνες κολλαγόνου είναι τα κύρια συστατικά του χορίου. Αντιπροσωπεύουν περίπου το 70% του ξηρού βάρους του. Σχηματίζουν έτσι, μεγάλα και σκληρά δίκτυα που παρέχουν στο δέρμα αντοχή αλλά και ελαστικότητα. Μια ίνα κολλαγόνου αποτελεί ένα νήμα των μικρότερων ινιδίων κολλαγόνου. Ένα ινίδιο κολλαγόνου αποτελείται από τρία μόρια κολλαγόνου, δηλαδή τρεις πολυπεπτιδικές αλυσίδες, τυλιγμένες η μία γύρω από την άλλη σχηματίζοντας μια τριπλή έλικα. Η δομή των ινών του κολλαγόνου αρχίζει να μετουσιώνεται, δηλαδή να αποδιατάσσεται, από την ηλικία των τριάντα χρόνων ή λόγω παραγόντων όπως η υπεριώδης ακτινοβολία και το κάπνισμα. Οι μορφολογικές μεταβολές στο δίκτυο των ινών κολλαγόνου, οδηγούν σε απώλεια της ελαστικότητας του δέρματος που τελικά προκαλεί ρυτίδωση.

Οι ίνες της ελαστίνης είναι τυχαία περιελιγμένες πρωτεΐνες που βρίσκονται στο χόριο. Είναι λεπτότερες από τα νήματα κολλαγόνου. Καταλαμβάνουν από 2 έως 4% του συνολικού βάρους του χορίου. Μια ίνα ελαστίνης αποτελείται από δύο συστατικά, τα μικρο-ινίδια και τη μήτρα ελαστίνης. Τα μικρο-ινίδια βρίσκονται στην περιφέρεια της ίνας και στο εσωτερικό των ινών, ευθυγραμμισμένα κατά μήκος της. Οι ίνες ελαστίνης παρέχουν στο δέρμα επίσης αντοχή και ελαστικότητα. Παρόλο που ο όγκος της είναι μικρότερος από αυτόν των ινών κολλαγόνου, παίζουν σπουδαίο ρόλο στη στήριξη του χορίου. Είναι ελαστικές και επιστρέφουν στο αρχικό επίσης σχήμα μετά από την έκτασή τους. [6][7][4]

1.1.2. Χρωστικές του δέρματος.

Το δέρμα περιλαμβάνει διάφορους τύπους χημικών ενώσεων που απορροφούν το φως και ονομάζονται χρωστικές. Η μελανίνη και η αιμοσφαιρίνη παίζουν ίσως τον σπουδαιότερο ρόλο στην απορρόφηση κυρίως του ορατού φωτός και στην όψη του δέρματος.

Η μελανίνη είναι η κυρίαρχη χρωστική επίσης επιδερμίδας. Μπορεί να βρεθεί επίσης και στα μαλλιά. Παράγεται στα μελανοσώματα, και έπειτα διαχέεται στην επιδερμίδα. Μέσα από αυτή την ανοδική πορεία προς την επιφάνεια της επιδερμίδας, το χρώμα της μελανίνης αλλάζει από μαύρο σε λευκό. Η μελανίνη υφίσταται σε δύο τύπους, την ευμελανίνη και τη φαιομελανίνη, που διαφέρουν ως προς τη χημική τους δομή. Η ευμελανίνη είναι μια μαύρη ή σκούρα καφέ χρωστική που βρίσκεται συνήθως στα μαλλιά και τα μάτια σκούρου χρώματος. Η φαιομελανίνη είναι κίτρινη ή κοκκινωπή χρωστική που παρατηρείται στα μαλλιά κόκκινου χρώματος. Η φυσιολογική λειτουργία της μελανίνης είναι να προστατεύει το εσωτερικό του δέρματος απορροφώντας ή σκεδάζοντας το υπεριώδες φως. Όταν εκτίθενται στο ηλιακό φως, τα μελανοκύτταρα αρχίζουν να παράγουν μελανίνη. Σε αυτή τη βιολογική αντίδραση οφείλεται το μαύρισμα του δέρματός το οποίο εξαρτάται από την ποσότητα των μελανοσωμάτων. Η μελανίνη συνήθως μεταβολίζεται και έπειτα απομακρύνεται από την επιφάνεια του δέρματος. Ωστόσο, πολλές φορές, λόγω μεταβολικών δυσλειτουργιών που προκαλούνται από το υπεριώδες φως ή τη γήρανση η μελανίνη παραμένει στην επιδερμίδα ή διεισδύει μέσα στο χόριο και σχηματίζει χρωστικές αποθέσεις, τις φακίδες.[8][1][4]

Η αιμοσφαιρίνη συντίθεται και βρίσκεται στα ερυθροκύτταρα. Αποτελεί το 40% με 45% του ολικού αίματος και ο ρόλος τους είναι η δέσμευση και η μεταφορά του οξυγόνου σε κάθε σημείο του σώματος μέσω των αιμοφόρων αγγείων. Η αιμοσφαιρίνη αποτελείται από την πρωτεϊνική σφαιρίνη που συνδέεται με τέσσερις ομάδες αίμης. Κάθε ομάδα αίμης περιέχει ένα άτομο σιδήρου. Όταν η αιμοσφαιρίνη έχει δεσμεύσει οξυγόνο, ονομάζεται οξυαιμοσφαιρίνη. Στην αποξυγονωμένη μορφή της, όταν δεν έχει δεσμευμένο οξυγόνο ονομάζεται και δεοξυαιμοσφαιρίνη.

1.2. Προστασία του Δέρματος.

Προστασία από μικροοργανισμούς στο δέρμα παρέχει ο ανοσιακός φραγμός. Στο δέρμα απαντώνται κύτταρα ανοσίας τα οποία είναι προσαρμοσμένα να υπάρχουν μόνο σε αυτόν. Κύρια κύτταρα επίσης ανοσίας του δέρματος είναι:

- Αντιγονοπαρουσιαστικά κύτταρα (επιδερμίδα: Langerhans, χόριο: πλασματοειδή και μυελοειδή δενδριτικά κύτταρα)
- Λεμφοκύτταρα
- Μαστοκύτταρα

Το δέρμα έχει την ικανότητα να δρα αμέσως σε ένα ερέθισμα (φυσική ανοσία) αλλά και να ενεργοποιεί ακόμα και την επίκτητη ανοσία. Η ικανότητα του δέρματος να απορροφά κρέμες ή αλοιφές έχει κυρίαρχο ρόλο στην θεραπευτική οδό της δερματολογίας. Η ηλικία του δέρματος καθώς και η θέση επάλειψης παίζει ρόλο στην απορρόφηση. Σημαντική είναι και η κατάσταση της κεράτινης στιβάδας (ακέραια ή μη) και η περιεκτικότητα ή μη επίσης σε νερό. Σημαντικό ρόλο παίζει και η σύσταση του θεραπευτικού σκευάσματος (υδροδιαλυτό, λιποδιαλυτό κ.τ.λ.) [10][7][11]

1.3. Παθήσεις δέρματος.

1.3.1. Εγκαύματα.

Το έγκαυμα είναι ένα είδος τραυματισμού στο δέρμα που προκαλείται από τη θερμότητα, τον ηλεκτρισμό, τις χημικές ουσίες, την τριβή ή την ακτινοβολία. Τα εγκαύματα που επηρεάζουν μόνο την επιφανειακή επιδερμίδα είναι γνωστά ως επιφανειακά ή εγκαύματα πρώτου βαθμού. Όταν η ζημιά εισχωρεί σε κάποια από τα υποκείμενα στρώματα, τότε υπάρχει ένα εν τω βάθει μερικού πάχους έγκαυμα ή έγκαυμα δεύτερου βαθμού. Σε ένα ολικού πάχους έγκαυμα ή αλλιώς έγκαυμα τρίτου βαθμού, ο τραυματισμός επεκτείνεται σε όλα τα στρώματα της επιδερμίδας. Ένα έγκαυμα τέταρτου βαθμού περιλαμβάνει, επιπρόσθετα, τραυματισμό σε βαθύτερους ιστούς, όπως τους μύες ή τα κόκκαλα. Η απαιτούμενη θεραπεία εξαρτάται από την σοβαρότητα του εγκαύματος. Τα επιφανειακά εγκαύματα μπορούν να αντιμετωπιστούν μόνο με απλά αναλγητικά πόνου, ενώ για τα βαριά ή μεγαλύτερου βαθμού εγκαύματα ενδέχεται να απαιτηθεί παρατεταμένη θεραπεία.

Δροσίζοντας το έγκαυμα με λίγο νερό βρύσης ενδέχεται να ανακουφιστεί ο πόνος και να μειωθεί η ζημιά, ωστόσο η παρατεταμένη έκθεση μπορεί να οδηγήσει σε υποθερμία. Για τα εν τω βάθει εγκαύματα μπορεί να χρειάζεται καθαρισμός. Για τα ολικού πάχους εγκαύματα συνήθως απαιτείται κάποια χειρουργική επέμβαση ή ακόμα και μεταμόσχευση δέρματος.[12]

Για τα εκτεταμένα εγκαύματα συνήθως απαιτούνται μεγάλες δόσεις ενδοφλέβιων υγρών γιατί η φλεγμονώδης αντίδραση που ακολουθεί θα έχει ως αποτέλεσμα τη σημαντική διαρροή υγρού και οίδημα. Οι πιο συνηθισμένες επιπλοκές των εγκαυμάτων σχετίζονται με την μόλυνση. Παρόλο που τα εκτεταμένα εγκαύματα μπορούν να αποβούν μοιραία, οι σύγχρονες θεραπείες που έχουν αναπτυχθεί από το 1960 και έπειτα έχουν βελτιώσει σημαντικά τα αποτελέσματα, κυρίως σε παιδιά και έφηβους. Περίπου 11 εκατομμύρια άνθρωποι παγκοσμίως καταφεύγουν σε κάποια ιατρική θεραπεία, ενώ 300,000 άνθρωποι πεθαίνουν από τα εγκαύματα κάθε χρόνο. [9][6][13]

1.4. Επούλωση εγκαυμάτων με υποκατάστατα δέρματος.

Η αντιμετώπιση των θερμικών εγκαυμάτων μπορεί να αποτελεί ένα σημαντικό χειρουργικό πρόβλημα. Όταν τα εκτεταμένα αλλά και ολικού πάχους εγκαύματα δεν επικαλύπτονται άμεσα με δερματικά μοσχεύματα, μπορεί να οδηγήσουν πολύ γρήγορα σε θάνατο λόγω σήψης ή πολυοργανικής ανεπάρκειας. Η απώλεια υγρών, οι ηλεκτρολυτικές διαταραχές, ο πόνος, η τοξιναιμία αλλά και η σηψαιμία είναι ορισμένες μόνο από τις πιο πιθανές συστηματικές επιπλοκές σε εγκαυματίες. Παράλληλα, η διαδικασία της επούλωσης ενέχει πολλούς ανασταλτικούς παράγοντες, που οδηγούν συχνά στη δημιουργία ουλώδους και ρικνωτικού ιστού, με απώλεια της φυσιολογικής δομής και της λειτουργικότητας του δέρματος (όπως η ελαστικότητα, η θερμορύθμιση, η αφή, η εφίδρωση, η σύνθεση βιταμίνης D κ.ά.). Η ανεπάρκεια σε δότριες επιφάνειες δερματικών μοσχευμάτων και κυρίως στα εκτεταμένα εγκαύματα αποτελεί ένα πολύ σημαντικό πρόβλημα, εφόσον η θεραπευτική αντιμετώπιση των ασθενών αυτών είναι άμεσα συνυφασμένη με την εφαρμογή των δερματικών αυτομοσχευμάτων. Το πρόβλημα αυτό και η επιτακτική του ανάγκη για επίλυση του οδήγησαν στην αναζήτηση μιας εναλλακτικής λύσης και στη δημιουργία των πρώτων βιοσυνθετικών δερματικών υποκατάστατων. [14][12]

Ο όρος «υποκατάστατο δέρματος» ο οποίος χρησιμοποιήθηκε για πρώτη φορά το 1980, ενώ το πρώτο μεγάλο βήμα στον τομέα αυτό είχε ήδη πραγματοποιηθεί από το 1969, όταν δημιουργήθηκε το πρώτο «τεχνητό δέρμα». Έτσι μέσα στο 2000, η χρήση του τεχνητού δέρματος πέτυχε να μειώσει το ποσοστό θανάτων των ασθενών με εγκαύματα πάνω του 70% της συνολικής επιφάνειας σώματος. Μία εξίσου σημαντική πρόκληση, για την επιστήμη της επανορθωτικής χειρουργικής, αφορά την διαχείριση των χρόνιων ανοιχτών τραυμάτων, που αποτελούν ένα γιγάντιο κοινωνικό και οικονομικό πρόβλημα στην εποχή μας. Η κατακόρυφη αύξηση του ποσοστού ορισμένων ασθενειών που ευθύνονται για τη δημιουργία δερματικών ελκώσεων (π.χ. διαβητικό πόδι, φλεβικά έλκη) οδήγησε σε αντίστοιχη αύξηση του κόστους λόγω των χρόνιων τοπικών θεραπειών με φάρμακα και επιδέσμους. Οι παραπάνω λόγοι, αλλά και η αλματώδης ανάπτυξη των επιστημών υγείας, νάνο-βιοτεχνολογίας, της μηχανικής ιστών αλλά και των βιο-υλικών άνοιξαν νέα

ερευνητικά πεδία και ορίζοντες εφαρμογών στον τομέα των υποκατάστατων δέρματος και επούλωσης των τραυμάτων.

Όταν τα τραύματα συνδέονται με κάποια πολυοργανική νόσο (όπως αρτηριοσκλήρυνση, θρομβοφλεβίτιδα, διαβήτης), η παραδοσιακή ιατρική επιστήμη προσανατολίζεται συνήθως στη συστηματική θεραπεία, ενώ η αντιμετώπιση τους σε τοπικό επίπεδο παραμένει συχνά συντηρητική. Από την άλλη πλευρά, οι καινοτομικές εφαρμογές του τεχνητού δέρματος, παράλληλα με τη συστηματική αγωγή, στοχεύουν στην ενεργητική θεραπευτική αντιμετώπιση της επούλωσης. Τα χαρακτηριστικά, επομένως, που πρέπει να αντιπροσωπεύουν τα δερματικά υποκατάστατα, καθορίζονται από τοπικούς θεραπευτικούς στόχους στο επίπεδο του δέρματος και επικεντρώνονται κατά κύριο λόγο σε :[15][12]

- Στον έλεγχο των μολύνσεων, επίσης αφυδάτωσης και των παραγόντων που καθυστερούν την επούλωση, με ένα προστατευτικό περίβλημα που υποκαθιστά τη λειτουργία επίσης επιδερμίδας (ανάλογο επιδερμίδας).
- Στη βέλτιστη επούλωση με την κυτταρική καθοδήγηση από τα αντίστοιχα συστατικά του ιδίως δέρματος (ανάλογο χορίου). Επομένως, οι ιδιότητες του ιδανικού υποκατάστατου δέρματος, εξαρτώνται από επίσης παρακάτω παραμέτρους:
- Ανθεκτικότητα (αντοχή στην πίεση και ρήξη), ελαστικότητα και ταχύτητα επικόλλησης στην επιφάνεια του τραύματος.
- Διαπερατότητα υγρού και ατμών αντίστοιχη με του δέρματος, ώστε να παρέχει έναν φραγμό στην απώλεια υγρών, ηλεκτρολυτών, πρωτεϊνών και θερμότητας αλλά και μείωση των ενεργειακών αναγκών όπως η διατήρηση της επιφανειακής υγρασίας και συγχρόνως την αποφυγή της διαβροχής και της αποδόμησης.
- Χαμηλή διαπερατότητα σε βακτήρια και επίσης ανεπιθύμητους παράγοντες και πρόληψη της μετάδοσης μολύνσεων και επίσης φλεγμονής του τραύματος.
- Διατήρηση της φυσιολογικής δομικής και λειτουργικής σύστασης του δέρματος και της επιδερμίδας.
- Δυνατότητα ανάπτυξης νέου ιστού, ευνοώντας έτσι τις διαδικασίες ανάπλασης και αποφεύγοντας παράλληλα τη δημιουργία ουλώδους ιστού και την υποξία.
- Μείωση του πόνου.
- Απουσία τοξικότητας, καρκινογενετικότητας και δημιουργίας αντιγόνων άρα και ιστοσυμβατότητα.
- Υψηλή αποτελεσματικότητα και χαμηλό προφίλ ανεπιθύμητων ενεργειών.
- Χαμηλό κόστος.
- Ευκολία παρασκευής και χρήσης τους για απεριόριστη και άμεση διαθεσιμότητα.
- Δυνατότητα για αποστείρωση, χαμηλές απαιτήσεις συντήρησης, μεγάλη διάρκεια ζωής και εφαρμογής τους.
- Βελτίωση της εξωτερικής τους εμφάνισης και επομένως της ψυχολογικής κατάστασης του ασθενούς.
- Θερμικά εγκαύματα.
- Ελκώσεις του δέρματος λόγω δερματικών ή συστηματικών νόσων (πχ. Διαβητικό πόδι, φλεβικά έλκη, σκληροδερμία, υποδερματίτιδες, πομφολυγώδης επιδερμόλυση, νεκρωτική φασιίτιδα κ.ά.)
- Κατακλίσεις.

- Τραύματα χειρουργικά ή από άλλα αίτια (π.χ. αφαίρεση όγκων, ατυχήματα).

Τα υποκατάστατα δέρματος ταξινομούνται επίσης παρακάτω κατηγορίες, ανάλογα με τη:

- Χρήση (Προσωρινά – Μόνιμα – Ημιμόνιμα)
- Προέλευση (Βιολογικά μοσχεύματα, μοσχεύματα, ξενομοσχεύματα και καλλιεργημένα δερματικά μοσχεύματα)
- Συνθετική επιδερμίδα - Τεχνητό δέρμα (ημισυνθετικό ανάλογο χορίου)
- Βιοσυνθετικά υποκατάστατα για προσωρινή κάλυψη (συνθετικά υλικά και βιολογικά ενεργές ουσίες)
- Δομή (Χοριακά - Επιδερμικά - Χοριο-επιδερμικά)
- Σύσταση (Κυτταρικά, Ακυτταρικά).

Τα ακυτταρικά μοσχεύματα υποστηρίζουν τον εποικισμό από αυτόλογα κύτταρα και το σχηματισμό νέου δέρματος. Τα κυτταρικά υποκατάστατα όμως, παρέχουν άμεση λειτουργική αποκατάσταση του δέρματος. Ανάλογα με τη φυσικοχημική τους σύσταση, τα δερματικά υποκατάστατα διακρίνονται σε:

- Βιολογικά (π.χ. μοσχεύματα, καλλιέργειες)
- Συνθετικά (π.χ. συνθετική επιδερμίδα)
- Βιοσυνθετικά (π.χ. τεχνητό δέρμα κ.ά.).[14][17][12]

Κεφάλαιο 2^ο

Χιτοζάνη

2. Ιστορική αναδρομή

Η χιτίνη (chitin) ήταν γνωστή από τις αρχές του 19^{ου} αιώνα, ενώ οι χημικές πληροφορίες που ήταν διαθέσιμες, εκείνη την εποχή, ήταν ελάχιστες. Η πρώτη ιστορική αναφορά για τη χιτίνη θα μπορούσε να φτάσει μέχρι το 1811, όταν ο Henri Braconnot, καθηγητής Χημείας στη Γαλλία, έτσι κατά τη διάρκεια ερευνών του σε μανιτάρια απομόνωσε μια ουσία που την ονόμασε “Fungine. Ιστορικά, είναι η πρώτη απομόνωση ενός πολυσακχαρίτη. [18] Περίπου είκοσι χρόνια αργότερα, δημοσιεύτηκε ένα επιστημονικό άρθρο, στο οποίο ήταν παρούσα η ίδια χημική ουσία σε δομές εντόμων και φυτών και την ονόμασε “Χιτίνη”, από την Ελληνική λέξη χιτώνας.

Με την ανακάλυψη της χιτίνης άνοιξε και ο δρόμος για την ανακάλυψη της χιτοζάνης. Το 1859 ο Γάλλος Φυσιολόγος Charles Marie Benjamin Rouget ανακάλυψε ότι όταν η χιτίνη θερμανθεί σε συμπυκνωμένο διάλυμα καυστικού νατρίου γίνεται διαλυτή. Το 1894 ο Γερμανός Χημικός Felix Hoppe-Seyler ονόμασε αυτή την ουσία “Χιτοζάνη” (chitosan).[19]

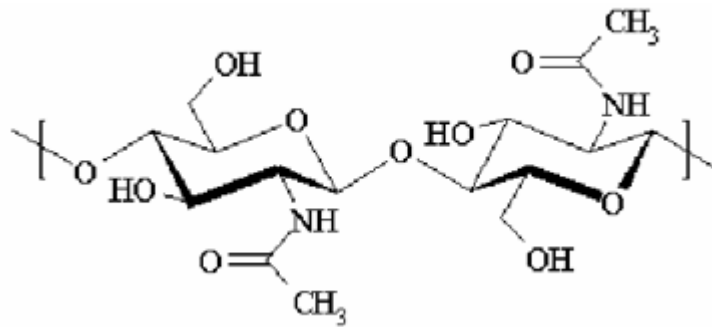
Οι πρώτες πληροφορίες χημείας για το μόριο της χιτίνης αποκτήθηκαν το 1843 από τον Γάλλο Χημικό Jean Louis Lassaigne, ο οποίος απέδειξε την παρουσία αζώτου στη χιτίνη. Το 1878 ο Γερμανός χειρουργός George Ledderhose απέδειξε ότι η χιτίνη αποτελείται από γλυκοζαμίνη και οξικό οξύ οπότε και κατέστη δυνατή η ακριβής ταυτοποίησή της δομής της με περίθλαση ακτίνων X (XRD).[18]

Την ίδια δεκαετία η χιτίνη ξεκίνησε να προσελκύει το ενδιαφέρον πολλών χημικών ανά τον κόσμο, καθώς έγινε αντιληπτό ότι ήταν μια ανεξάντλητη πηγή χιτοζάνης, τον μοναδικό ψευδο-φυσικό κατιονικό πολυσακχαρίτη, και ως έτσι κατέστη ανώτερο από τα τεχνικά κατιονικά παράγωγα της κυτταρίνης και του αμύλου. Επιπλέον, η βιοαποικοδομησιμότητα της χιτοζάνης ερμηνεύτηκε ως ένα ενδιαφέρον χαρακτηριστικό, παρά ως ελάττωμα, σε μία εποχή όπου τεχνητά πολυμερή όπως το νάιλον είναι πλήρως αδρανή.[18]

2.1. Εισαγωγή

Η χιτοζάνη, πολυ(β-(1→4)-D-γλυκοζαμίνη), είναι το (μερικώς) αποακετυλιωμένο παράγωγο της χιτίνης. Όταν, όμως ο βαθμός αποακετυλίωσης της χιτίνης γίνει πάνω από 50% (ανάλογα με την προέλευση του αρχικού πολυσακχαρίτη), η χιτίνη θα ονομάζεται χιτοζάνη και θα καθίσταται διαλυτή σε όξινα υδατικά διαλύματα. Η διαλυτοποίηση αυτή συμβαίνει με πρωτονίωση των αμινομάδων και των επαναλαμβανόμενων δομικών μονάδων της γλυκοζαμίνης, οπότε ο πολυσακχαρίτης μετατρέπεται σε ηλεκτρολύτη. Η

χιτοζάνη είναι το μόνο κατιονικό ψευδο-φυσικό πολυμερές στον κόσμο και για αυτό το λόγο έχει πολλές εφαρμογές. [20]

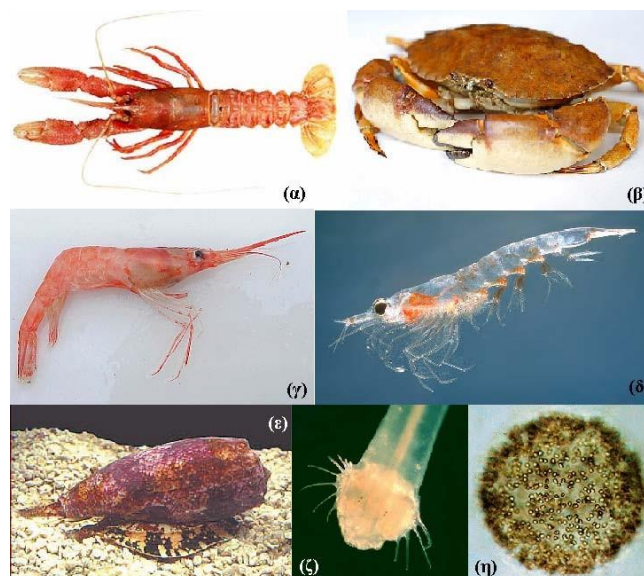


Εικόνα 2. 1 Χημική δομή της χιτοζάνης.[18]

2.2. Πηγές και παραγωγή χιτίνης

Ανάλογα με την πηγή της, η χιτίνη απαντάται σε δύο αλλομορφές, την α και β, ενώ έχει αναφερθεί και μια τρίτη αλλομορφή, η γ-χιτίνη, η οποία φαίνεται ότι απλά πρόκειται απλά για διαφοροποίηση της α αλλομορφής.

Η α-χιτίνη είναι με διαφορά η πιο άφθονη και βρίσκεται στον εξωσκελετό και στους τένοντες των καρκινοειδών, κυρίως στους αστακούς, στα καβούρια, στις γαρίδες κ.α., στα κυτταρικά τοιχώματα μυκήτων, καθώς και στην επιδερμίδα των εντόμων. Ακόμα, απαντάται και σε πληθώρα άλλων θαλάσσιων οργανισμών, όπως τα κωνικά σαλιγκάρια, το σκουλήκι βέλος και στο φύκι *Phaeocystis*. [20]



Εικόνα 2. 2 Πηγές α-χιτίνης (α) αστακός, (β) καβούρι, (γ) γαρίδα, (δ) krill, (ε) κωνικό σαλιγκάρι, (ζ) σκουλήκι βέλος και (η) φύκι *Phaeocystis*. [20]

Παρά την αυξημένη παρουσία της χιτίνης στη φύση, οι κύριες εμπορικές της πηγές είναι τα κελύφη των καβουριών και των γαρίδων, όπου βρίσκεται μαζί με ανθρακικό ασβέστιο και τις πρωτεΐνες. Σε βιομηχανικό επίπεδο, η χιτίνη απομονώνεται από τα καρκινοειδή με όξινη επεξεργασία για τη διάλυση και απομάκρυνση του ανθρακικού ασβεστίου και έτσι στη συνέχεια με αλκαλική επεξεργασία ώστε να γίνει διαλυτοποίηση και απομάκρυνση των πρωτεϊνών. Συχνά προστίθεται και ένα στάδιο αποχρωματισμού για την παραλαβή ενός άχρωμου τελικού προϊόντος. Το τελικό προϊόν αξιολογείται ως προς την καθαρότητά και το χρώμα του, καθώς τυχόν κατάλοιπα πρωτεϊνών τα οποία μπορούν να προκαλέσουν λειτουργικά προβλήματα στην μετέπειτα αξιοποίησή του. [18][20]

2.3. Παραγωγή χιτοζάνης

Η χιτοζάνη παραλαμβάνεται με μερική αποακετυλίωση της χιτίνης σε στερεή κατάσταση υπό ισχυρά αλκαλικές συνθήκες δηλαδή σε συμπυκνωμένο υδατικό ή αλκοολικό διάλυμα NaOH ή με ενζυμική υδρόλυση. Η απομάκρυνση των ακετυλομάδων αποτελεί μια σκληρή επεξεργασία, καθιστώντας έτσι απαραίτητη την προστασία τους από το οξυγόνο, με εφαρμογή αδρανούς ατμόσφαιρας αζώτου ή με προσθήκη βοριοϋδριδίου στο αλκαλικό διάλυμα. Σκοπός αυτής της προστασίας από το οξυγόνο είναι η αποφυγή αντιδράσεων όπως ο πολυμερισμός και η οξειδωση. [18][20]

Εξαιτίας της ημικρυσταλλικής δομής που έχει η χιτίνη, η χιτοζάνη που αποκτάται με αποακετυλίωση σε στερεά κατάσταση έχει ετερογενή διασπορά των ακετυλομάδων κατά μήκος της πολυμερικής της αλυσίδας. Η διασπορά αυτή, τυχαία ή συσταδική, αποτελεί έναν πολύ σημαντικό παράγοντα για τη διαλυτότητα του πολυμερούς. [20]

Οι μέθοδοι βιομηχανικής παραγωγής, αν και είναι καλώς εδραιωμένες, παρουσιάζουν αρκετά προβλήματα. Τα προβλήματα αυτά έχουν να κάνουν με την εποχιακή διαθεσιμότητα των πρώτων υλών της χιτίνης, το πολύ υψηλό κόστος επεξεργασίας για τη χημική μετατροπή της χιτίνης σε χιτοζάνη αλλά και την ετερογένεια στο τελικό προϊόν, κάτι που έχει σημαντική επίπτωση στις φυσικοχημικές ιδιότητές του. [18][20]

2.4. Ιδιότητες

Η χιτοζάνη είναι κατιονικό πολυμερές με pH περίπου 6.3. Η χιτοζάνη έχει την ικανότητα να σχηματίζει πολυηλεκτρολύτες, ενώ η ικανότητά της να δημιουργεί φιλμ με πολύ καλές μηχανικές ιδιότητες είναι αξιοσημείωτη. [21]

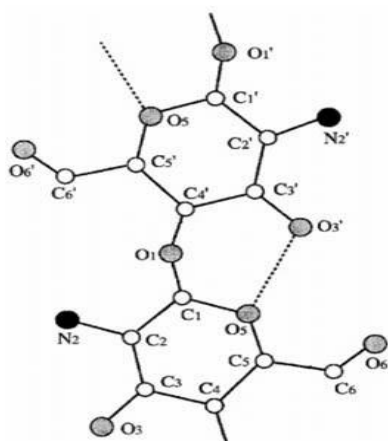
2.4.1. Διαλυτότητα

Η χιτοζάνη είναι αδιάλυτη σε υδατικούς αλλά και οργανικούς διαλύτες. Ως πολυαμίνη είναι διαλυτή σε αραιά υδατικά διαλύματα οξέων. Διαλύεται σε υδροχλωρικό οξύ καθώς και σε υδατικά διαλύματα οργανικών οξέων όπως το οξικό οξύ, οξαλικό οξύ αλλά και το γαλακτικό οξύ. Ο βαθμός της διαλυτότητας εξαρτάται από τη συγκέντρωση της χιτοζάνης αλλά και τον τύπο του οξέος. Η διαλυτότητα μειώνεται με την αύξηση της συγκέντρωσης του οξέος, αυτό συμβαίνει λόγω του φαινομένου της εξαλάτωσης (salting-out effect). Έτσι υδατικά διαλύματα του φωσφορικού, θειικού, κιτρικού και σεβακικού οξέος δεν αποτελούν καλούς διαλύτες.[22]

2.4.2. Μοριακό Βάρος

Η περιορισμένη διαλυτότητα της χιτοζάνης και οι δομικές ασάφειες, σε συνδυασμό με το περιεχόμενο αλλά και τη διασπορά των ακετυλομάδων, αποτελούν σημαντικό εμπόδιο στον ακριβή προσδιορισμό του μοριακού βάρους της χιτοζάνης. Το μοριακό της βάρος μπορεί να προσδιοριστεί με ιξωδομετρία. Διάφορες εξισώσεις όπως η Mark-Houwink έχουν προταθεί για τον ιξωδομετρικό προσδιορισμό του μέσου μοριακού βάρους της χιτοζάνης σε υδατικά διαλύματα οξικού οξέος. Η χιτοζάνη μπορεί ακόμα να μετατραπεί σε χιτίνη με ακυλίωση κάτω από ήπιες συνθήκες, και έτσι να υπολογιστεί το μοριακό της βάρος. Μετρήσεις ιξώδους της χιτοζάνης έδειξαν ότι έχει μέσο μοριακό βάρος το οποίο μπορεί να κυμαίνεται από 1×10^5 έως 5×10^5 g/mol.[22]

Η χιτοζάνη, παρόλο τις αλλαγές στο μόριό της, διατηρεί μία ημικρυσταλλική δομή. Η κρυσταλλική της δομή βέβαια, έχει ερευνηθεί εκτεταμένα και έτσι έχουν αναφερθεί πολλές αλλοτροπικές μορφές. Οι κρυσταλλογραφικές μελέτες πραγματοποιήθηκαν σε κρυστάλλους χιτοζάνης με χαμηλό μοριακό βάρος σε πλήρως αποακετυλιωμένη μορφή, και έδειξαν ότι αυτή ανήκει στο ορθορομβικό κρυσταλλικό σύστημα με βασικά διανύσματα $a=0.807$ nm, $b=0.844$ nm και $c=1.034$ nm. Η κυψελίδα του αποτελείται από τέσσερις μονάδες γλυκοζαμίνης, ενώ δύο ακόμα αλυσίδες περνούν από την κυψελίδα με αντιπαράλληλη διάταξη. Οι κύριοι δεσμοί του υδρογόνου είναι οι $O_3 \cdots O_5$ (ενδομοριακός) και ο $N_2 \cdots O_6$ (διαμοριακός).[23][18][20][24]



Εικόνα 2. 3 Σχηματισμός δεσμών υδρογόνου στο μόριο της χιτοζάνης. Οι κύριοι δεσμοί είναι οι $O_3 \cdots O_5$ (ενδομοριακός) και $N_2 \cdots O_6$ (διαμοριακός). [18]

2.5. Εφαρμογές χιτοζάνης

Ο κατιοντικός χαρακτήρας της χιτοζάνης είναι μοναδικός. Έτσι η ικανότητα σχηματισμού φιλμ και η βιολογική της δραστηριότητα την καθιστά κατάλληλη για έναν μεγάλο αριθμό εφαρμογών, οι κυριότερες από τις οποίες συνοψίζονται στο παρακάτω πίνακα. Από αυτές, οι πλέον σημαντικές είναι εκείνες που ανήκουν στο πεδίο της φαρμακευτικής, της βιοϊατρικής και των καλλυντικών. Με σημαντικότερη εφαρμογή την αποδέσμευση δραστικής ουσίας μέσω της στοματικής, ρινικής, παρεντερικής και διαδερμικής χορήγησης, αλλά και μέσω μοσχευμάτων. [20][23]

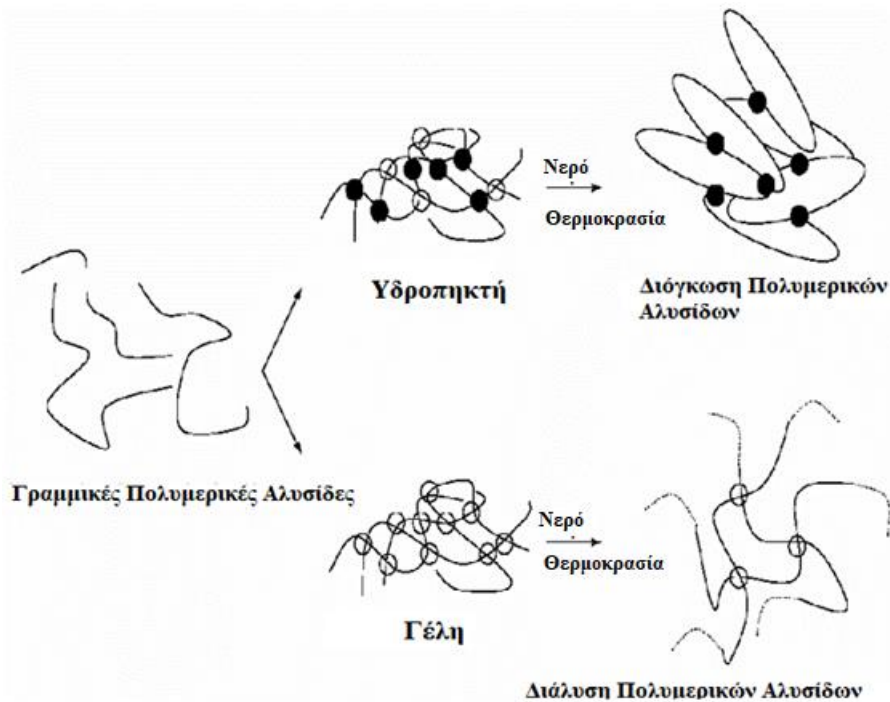
Πεδίο	Εφαρμογή
<i>Βιοϊατρική</i>	Ελεγχόμενη αποδέσμευση δραστικών ουσιών Χειρουργικά ράμματα Φακοί επαφής κερατοειδούς Οδοντικά μοσχεύματα Τεχνητό δέρμα Επανοικοδόμηση κοκάλου
<i>Βιοφαρμακευτική</i>	Ανοσοποιητικό Αντικαρκινικό Αιμοστατικό Βακτηριοστατικό Αντιθρομβωτικό
<i>Καλλυντικά</i>	Ενυδάτωση δέρματος Αντιμετώπιση ακμής Βελτίωση ελαστικότητας μαλλιών Στοματική φροντίδα (οδοντόπαστα, τσίγλα)
<i>Τρόφιμα</i>	Φυσική δέσμευση λιπιδίων (μείωση χοληστερόλης) Διαιτητική ίνα Συντηρητικό
<i>Γεωργία</i>	Ενίσχυση αμυντικών μηχανισμών στα φυτά Υποκίνηση ανάπτυξης φυτών Ελεγχόμενη απελευθέρωση λιπασμάτων και θρεπτικών συστατικών στο έδαφος

Πιν. 1. Κυριότερες εφαρμογές χιτοζάνης ανά πεδίο εφαρμογής.[21]

Υδροπηκτές

3. Εισαγωγή

Μία υδροπηκτική (hydrogel) είναι ένα διασταυρωμένο δίκτυο υδρόφιλου πολυμερούς ή πολυμερών το οποίο έχει την ικανότητα να απορροφά μεγάλες ποσότητες νερού δηλαδή περισσότερο από τουλάχιστον του 20% του βάρους της, κάτι που έχει ως αποτέλεσμα τη διόγκωσή της, διατηρώντας ταυτόχρονα μία διακριτή τρισδιάστατη δομή. Αυτή η ιδιότητα της υδροπηκτής την διαφοροποιεί από τις απλές γέλες (gels), οι οποίες είναι πολυμερικά δίκτυα ήδη διογκωμένα σε ένα βαθμό, όπου η περαιτέρω προσθήκη υγρών έχει ως αποτέλεσμα τη διάλυση του πολυμερικού πλέγματος.[26] Η ικανότητα των υδροπηκτών να παραμένουν αδιάλυτες στο νερό οφείλεται στην ύπαρξη φυσικών ή χημικών σταυροδεσμών, οι οποίοι και παρέχουν την τρισδιάστατη πλεγματοειδή δομή. Οι συμβατικές γέλες είναι επίσης ικανές να σχηματίσουν μικρό αριθμό σταυροδεσμών, για παράδειγμα με αλληλεπιδράσεις ή εμπλοκή άλλων πολυμερικών αλυσίδων, βέβαια το αποτέλεσμα αυτό είναι αντιστρεπτό, καθώς στο σχηματισμό ενεπλέκονται μόνο ασθενείς φυσικές δυνάμεις.



Εικόνα 3. 1 Διαφορετική συμπεριφορά υδροπηκτών και γελών στο νερό. Οι γεμάτοι κύκλοι αντιπροσωπεύουν πραγματικούς σταυροδεσμούς, ενώ οι κενοί σταυροδεσμούς από εμπλοκή παρακείμενων αλυσίδων[26]

3.1. Εφαρμογές σε συστήματα ελεγχόμενης αποδέσμευσης δραστικών ουσιών

Οι υδροπηκτές είναι εξαιρετικά βιοσυμβατές.[20] Η βιοσυμβατότητά τους οφείλεται στην υψηλή περιεκτικότητά τους σε νερό και τη φυσικοχημική τους ομοιότητά με το εξωκυτταρικό υλικό, εφόσον παρουσιάζουν απαλή και ελαστική υφή. Επιπλέον, παρουσιάζουν ελάχιστη τάση ώστε να απορροφούν πρωτεΐνες από τα σωματικά υγρά, λόγω της χαμηλής διεπιφανειακής τους τάσης. Τα παραπάνω, σε συνδυασμό με την ικανότητα των μορίων των δραστικών ουσιών να εισχωρούν μέσα στο πολυμερικό δίκτυο των υδροπηκτών, τις καθιστά ιδανικές για χρήση στα συστήματα ελεγχόμενης απελευθέρωσης δραστικών ουσιών (drug release) .[26]

Εκτός από την ικανότητα των υδροπηκτών να παρουσιάζουν διόγκωση και ελεγχόμενη απελευθέρωση δραστικών ουσιών, παρουσιάζουν ακόμα, αλλαγές στη δομή του δικτύου τους, με αποτέλεσμα έτσι την απελευθέρωση δραστικών ουσιών σε καθορισμένα σημεία του οργανισμού. Εφόσον ο ανθρώπινος οργανισμός παρουσιάζει σημαντικές μεταβολές όπως το pH και η θερμοκρασία τόσο σε φυσιολογικές αλλά και σε παθολογικές καταστάσεις.[26]

3.1.1. Παρασκευή / Μέθοδοι διασταύρωσης

Η παρασκευή της υδροπηκτής μπορεί να πραγματοποιηθεί είτε με διασταύρωση γραμμικών πολυμερών, είτε με πολυμερισμό μονομερών με πολυδραστικά μονομερή. Μια μέθοδος διασταύρωσης είναι γενικά χρήσιμη μόνο εάν τυχόν τοξικά αντιδραστήρια έχουν την ικανότητα να απομακρυνθούν πλήρως πριν τη χορήγηση της υδροπηκτής, κάτι που πολλές φορές είναι δύσκολο να επιτευχθεί χωρίς σημαντικές απώλειες πιθανά φορτωμένης δραστικής ουσίας στην υδροπηκτή.

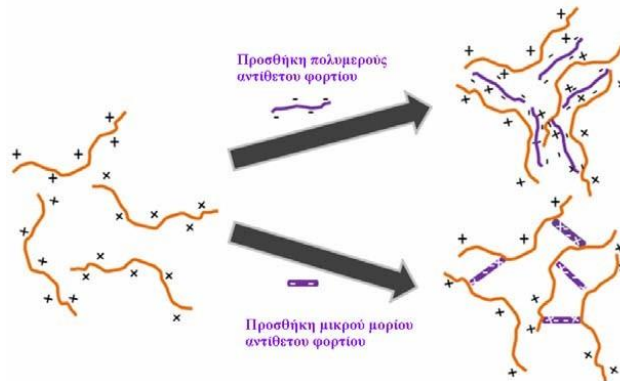
Για την επίτευξη της διασταύρωσης έχουν χρησιμοποιηθεί φυσικές και χημικές μέθοδοι. Οι φυσικά διασταυρωμένες υδροπηκτές έχουν το κύριο πλεονέκτημα ότι ο σχηματισμός του δικτύου πραγματοποιείται χωρίς χημικές τροποποιήσεις ή τυχόν κατάλοιπα από πιθανώς τοξικούς παράγοντες διασταύρωσης, βέβαια μειονεκτεί στο γεγονός ότι το δίκτυο θα είναι περισσότερο ασταθές.[26]

3.1.2. Φυσικώς διασταυρωμένες Υδροπηκτές

Η φυσική διασταύρωση των πολυμερικών αλυσίδων θα μπορούσε να πραγματοποιηθεί με μεγάλη ποικιλία φυσικοχημικών αλληλεπιδράσεων όπως για παράδειγμα οι υδροφοβικές αλληλεπιδράσεις, οι αλληλεπιδράσεις φορτίων, ο σχηματισμός δεσμών υδρογόνου, ο σχηματισμός στερεού συμπλόκου και τέλος, με χρήση υπερμοριακής χημείας .[27][28][29]

3.1.3. Αλληλεπιδράσεις φορτίων

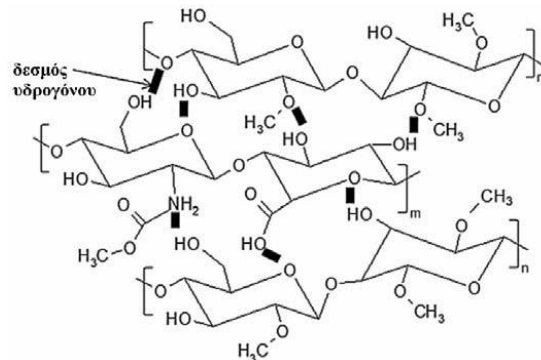
Η φυσική διασταύρωση των πολυμερικών αλυσίδων με αλληλεπιδράσεις φορτίων μπορεί να πραγματοποιηθεί με την προσθήκη ενός αντίθετα φορτισμένου ατόμου δηλαδή με ιοντική διασταύρωση. Όσον αφορά την ιοντική διασταύρωση της χιτοζάνης, που είναι ένα πολυκατιονικό πολυμερές, χρησιμοποιούνται μεταλλικά κατιόντα. Τέλος για την σύμπλεξη της χιτοζάνης με πολυμερή συνήθως χρησιμοποιούνται πολυσακχαρίτες με καρβοξυλικές ομάδες.[27][29]



Εικόνα 3. 2 Φυσική διασταύρωση, βασισμένη σε αλληλεπίδραση φορτίων, ιοντικού πολυμερούς με προσθήκη πολυμερούς ή μικρού μορίου αντίθετου φορτίου.[29]

3.1.3.1. Σχηματισμός δεσμών υδρογόνου

Ο σχηματισμός των δεσμών υδρογόνου μπορεί να πραγματοποιηθεί είτε με διαδικασία παγώματος-ξεπαγώματος (freeze-thawing), είτε με ανάμιξη δύο ή περισσότερων πολυμερών, τα οποία όμως παρουσιάζουν ρεολογικό συνεργισμό. Αυτό σημαίνει ότι οι ιξωδοελαστικές ιδιότητες του πολυμερικού μίγματος που παρασκευάζεται πλησιάζουν περισσότερο σε εκείνες μίας γέλης, παρά σε εκείνες των αρχικών πολυμερών. Επίσης, ο συνεργισμός είναι αποτέλεσμα σχηματισμού των δεσμών υδρογόνου ανάμεσα στα αρχικά πολυμερή. Τέτοια μίγματα παρουσιάζουν εξαιρετική βιοσυμβατότητα, αλλά διαλύονται μέσα στις πρώτες μέρες χορήγησης, περιορίζοντας έτσι τη χρήση τους σε σύντομης διάρκειας απελευθερώσεις δραστικών ουσιών [27]



Εικόνα 3. 3 Φυσική διασταύρωση με σχηματισμό δεσμών υδρογόνου μεταξύ γεωμετρικά συμβατών πολυμερών (μεθυλοκυτταρίνη και βαλουρονικό οξύ).[28]

3.1.2. Μηχανισμός διόγκωσης

Οι περισσότερες υδροπηκτές είναι άμορφες στην άυδρη μορφή τους. Η απελευθέρωση της όποιας δραστικής ουσίας πραγματοποιείται με την απορρόφηση του νερού και επομένως την αποβολή του δραστικής ουσίας μέσω ενός μηχανισμού που ελέγχεται από τη διόγκωση του πολυμερούς.

Ένα άμορφο πολυμερές όταν έρχεται σε επαφή με το νερό επιτρέπει τη διείδυση του διαλύτη στον χώρο ανάμεσα στις μακρομοριακές αλυσίδες του πολυμερούς. Η παρουσία του διαλύτη στο πολυμερές προκαλεί τη δημιουργία νέων τάσεων οι οποίες συνοδεύονται με αύξηση της γυροσκοπικής ακτίνας, όπως και της απόστασης των μακρομορίων του πολυμερούς από άκρο σε άκρο, κάτι που παρατηρείται οπτικά ως διόγκωση.

Τις περισσότερες φορές, η απελευθέρωση της δραστικής ουσίας συμβαίνει κατά τη διόγκωση της υδροπηκτής. Ο μηχανισμός ο οποίος είναι υπεύθυνος για τις αλλαγές στη πλεγματική δομή της υδροπηκτής είναι δυνατό να είναι απολύτως αναστρέψιμος. Αυτό προσδίδει στις υδροπηκτές ελαστική παραμόρφωση με συμπεριφορά μνήμης και σχήματος που σημαίνει ότι οι υδροπηκτές έχουν την ικανότητα να επιστρέφουν στο αρχικό τους σχήμα μετά το πέρας της συνθήκης που προκάλεσε τη διόγκωσή τους.[26]

3.1.3. Συμπεριφορά νερού στις Υδροπηκτές

Το νερό στις υδροπηκτές μπορεί γενικότερα να κατηγοριοποιηθεί σε τρία είδη: μη δεσμευμένο νερό με δυνατότητα να παγώσει, δεσμευμένο νερό που δεν έχει την δυνατότητα να παγώσει, και δεσμευμένο νερό με την δυνατότητα να παγώσει .

Κατά τη διαδικασία της διόγκωσης, τα μόρια του νερού αρχικά διασπών τους διαμοριακούς δεσμούς υδρογόνου, ενώ έπειτα δεσμεύονται στις υδρόφιλες περιοχές. Έτσι αυτά τα μόρια νερού είναι απομονωμένα και ομοιόμορφα διανεμημένα σε όλη την έκταση του πολυμερούς, ώστε να έχουν σημαντικά περιορισμένη κινητικότητα, και αναφέρονται δεσμευμένο ή μη δεσμευμένο νερό.

Πάνω από μια συγκεκριμένη ποσότητα δεσμευμένου νερού, το περίσσιο νερό που εισχωρεί στο πολυμερές προσανατολίζεται ώστε να σχηματιστούν τα δευτεροταγή και τριτοταγή στρώματα ενυδάτωσης, τα οποία ονομάζονται και συστάδες (clusters). Αυτές οι δομές μπορούν να προκύψουν από τη τάση των μορίων του νερού να σχηματίζουν τον μέγιστο αριθμό δεσμών υδρογόνου μεταξύ αυτών στον διαθέσιμο χώρο. Αυτού του είδους το νερό ονομάζεται νερό με δυνατότητα να παγώσει.

Μελέτες απέδειξαν ότι υπάρχουν δύο φάσεις, του δεσμευμένου και του μη δεσμευμένου νερού με δυνατότητα να παγώσει. Το μεν δεσμευμένο νερό με δυνατότητα να παγώσει παρουσιάζει χαμηλότερες θερμοκρασίες τήξεως αλλά υψηλότερες θερμοκρασίες παγώματος από το μη δεσμευμένο νερό.[30][29]

Κεφάλαιο 4^ο

Ελεγχόμενη αποδέσμευση δραστικής ουσίας

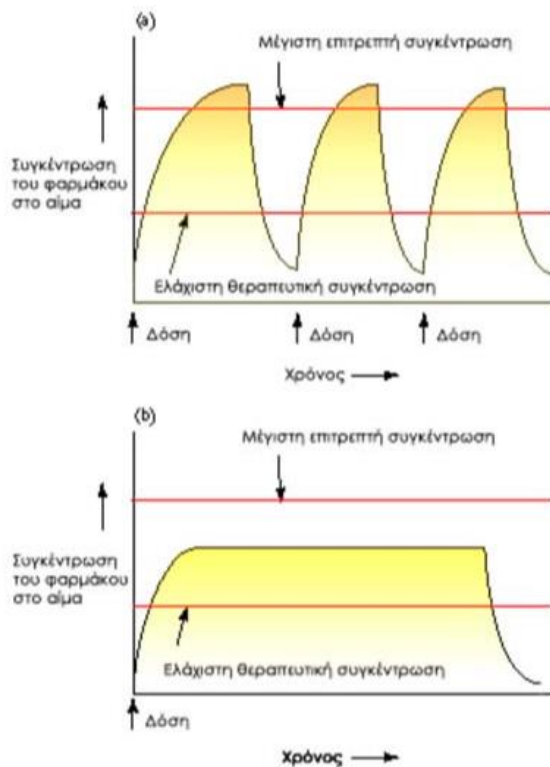
4. Εισαγωγή

Εδώ και πολλές δεκαετίες η θεραπευτική οδός μιας οξείας ή χρόνιας ασθένειας βασίζεται κυρίως στην πολύ συχνή λήψη φαρμάκων από τους ασθενείς σε διάφορες μορφές όπως κάψουλες, δισκία, ενέσεις είτε κρέμες. Έως σήμερα, τα συμβατικά αυτά συστήματα μεταφοράς δραστικών ουσιών φαίνεται να κυριαρχούν στην αγορά. Ωστόσο, για την επίτευξη αλλά και την διατήρηση της συγκέντρωσης της ενεργού φαρμακευτικής ουσίας στον ανθρώπινο οργανισμό είναι συχνά απαραίτητη η λήψη φαρμάκων αρκετές φορές την ημέρα, το οποίο είναι κάτι το οποίο έχει ως αποτέλεσμα μια ανεπιθύμητη αυξομείωση στα επίπεδα της φαρμακευτικής δραστικής ουσίας στο αίμα. Αυτή η διακύμανση της συγκέντρωσης μπορεί να προκαλέσει τοξικότητα αν ξεπεραστεί το μέγιστο επιτρεπτό επίπεδο ενώ χάνεται η φαρμακευτική χρησιμότητα εάν η συγκέντρωση πέσει κάτω από το επιθυμητό ελάχιστο όριο εάν φερ ειπείν ο ασθενής για κάποιο λόγο παραλείψει να λάβει μια δόση. Το ενδιαφέρον μετατοπίζεται σήμερα σε πιο πολύπλοκα συστήματα χορήγησης φαρμάκων.

Έτσι έχει γίνει προσπάθεια αντικατάστασης των ενέσιμων χορηγήσεων φαρμακευτικών σκευασμάτων. Για την υλοποίηση τους, έχει γίνει προσπάθεια για ελεγχόμενη χορήγηση φαρμάκων (controlled drug delivery). Η τεχνολογία της ελεγχόμενης αποδέσμευσης φαρμάκων, (ΕΧΦ), η οποία οφείλεται στην σύμπραξη της φαρμακευτικής επιστήμης με τη χημεία πολυμερών, καλείται να λύσει πολλά προβλήματα. Βασική της ιδέα της είναι ο συνδυασμός μιας δραστικής φαρμακευτικής ουσίας με ένα κατάλληλο πολυμερικό φορέα και η αποδέσμευσή της ώστε να μεγιστοποιείται η δράση της.

Το σύστημα αποδέσμευσης ως προς τη σύστασή του μπορεί να αποτελείται από βιοδιασπώμενα, μη-βιοδιασπώμενα, βιοσυμβατά ή και ανόργανα υλικά, ενώ η μορφή του μπορεί να ποικίλλει. Σε όλες τις περιπτώσεις, βέβαια, εμπλέκεται κάποιος μηχανισμός ελεγχόμενης αποδέσμευσης της δραστικής ουσίας από το πλέγμα το οποίο την εμπεριέχει. Ο μηχανισμός αυτός μπορεί, βέβαια να ελέγχεται από διάχυση που οφείλεται στη συγκέντρωση, μέσω της διόγκωσης του πολυμερικού δικτύου.

Δύο όροι που χρησιμοποιούνται για να περιγράψουν τις νέες τεχνικές μεταφοράς φαρμάκων, είναι η «παρατεταμένη αποδέσμευση» και η «ελεγχόμενη αποδέσμευση». Ο μεν πρώτος όρος αναφέρεται στα φαρμακοσκευάσματα που έχουν την ικανότητα να επιβραδύνουν την απελευθέρωση της φαρμακευτικής δραστικής ουσίας έτσι ώστε να αυξάνεται η θεραπευτική της δράση. Ο όρος «ελεγχόμενη αποδέσμευση» εκφράζει συστήματα μεταφοράς με προκαθορισμένο ρυθμό αποδέσμευσης του φαρμάκου.[31]



Εικόνα 4. 1 Οι γραφικές παραστάσεις της συγκέντρωσης του φαρμάκου στο αίμα συναρτήσει του χρόνου (a) για ένα συμβατικό σύστημα χορήγησης φαρμάκου και (b) για ένα σύστημα βασισμένο στην τεχνολογία ελεγχόμενης χορήγησης. [31]

Η συμβατική χορήγηση φαρμάκου απαιτεί συχνά υψηλές δόσεις ή επαναλαμβανόμενη χορήγηση για να αποφέρει ένα σημαντικό θεραπευτικό αποτέλεσμα. Αυτό μπορεί να μειώσει τη συνολική αποτελεσματικότητα και τη συμμόρφωση του ασθενούς και να οδηγήσει σε σοβαρές παρενέργειες και ακόμη και τοξικότητα. Για την αντιμετώπιση αυτών των ζητημάτων, η έρευνα τις τελευταίες δεκαετίες επικεντρώθηκε σε συστήματα ελεγχόμενης χορήγησης φαρμάκων, συμπεριλαμβανομένων των μεμβρανών. Αυτά τα συστήματα χορήγησης φαρμάκων μπορούν να ελέγχουν πώς τα φάρμακα είναι διαθέσιμα σε κύτταρα και ιστούς με την πάροδο του χρόνου και στο χώρο. Μπορούν, καταρχήν, να αξιοποιήσουν τα ευεργετικά αποτελέσματα των θεραπευτικών σκευασμάτων ενισχύοντας την αποτελεσματικότητά τους και μειώνοντας την τοξικότητά τους και την απαιτούμενη δοσολογία. Η κλινική χρήση των συστημάτων χορήγησης φαρμάκων είναι αξιοσημείωτη, με μια παγκόσμια αγορά άνω των 150 δισεκατομμυρίων δολαρίων. Οι υδροπηκτές είναι ένας ιδιαίτερα ελκυστικός τύπος συστήματος χορήγησης φαρμάκων και έχουν χρησιμοποιηθεί σε πολλούς κλάδους της ιατρικής, συμπεριλαμβανομένης της καρδιολογίας, της ογκολογίας, της ανοσολογικής, επούλωση πληγών και διαχείριση πόνου. Οι υδροπηκτές αποτελούνται από μεγάλη ποσότητα νερού και ένα διασυνδεδεμένο δίκτυο πολυμερών. Η υψηλή περιεκτικότητα σε νερό (τυπικά 70-99%) παρέχει φυσική ομοιότητα με τους ιστούς και μπορεί να δώσει στις υδροπηκτές εξαιρετική βιοσυμβατότητα και την ικανότητα να ενθυλακώνουν εύκολα τα υδρόφιλα φάρμακα.

4.1. Στόχοι και Πλεονεκτήματα

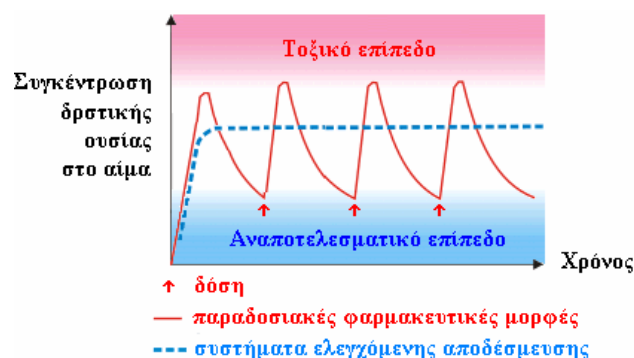
Η ελεγχόμενη αποδέσμευση πραγματοποιείται όταν το πολυμερές, είτε φυσικό είτε συνθετικό, συνδυάζεται κατάλληλα με μια δραστική ουσία ώστε η αποδέσμευση αυτής της δραστικής ουσίας να πραγματοποιείται με ένα προσχεδιασμένο τρόπο. Ωστόσο, ο στόχος πίσω από την ελεγχόμενη αποδέσμευση δραστικής ουσίας είναι η επίτευξη των πλέον αποτελεσματικών θεραπειών, εξαφανίζοντας έτσι την πιθανότητα ελλιπούς ή υπερβολικής δοσολογίας.

Άλλα πλεονεκτήματα αυτών των συστημάτων ελεγχόμενης αποδέσμευσης δραστικών ουσιών (ΣΕΑΔΟ) συμπεριλαμβάνουν τη διατήρηση της δραστικής ουσίας στον οργανισμό σε επιθυμητά επίπεδα, την ανάγκη λιγότερων χορηγήσεων και την βέλτιστη χρήση της εκάστοτε δραστικής ουσίας. Παρόλα αυτά, τα μειονεκτήματα δε μπορούν να εκλείψουν, όπως η πιθανή τοξικότητα ή μη βιοσυμβατότητα των χρησιμοποιηθέντων υλικών, όπως και το υψηλό κόστος των ΣΕΑΔΟ, σε σύγκριση με αυτό των παραδοσιακών φαρμακευτικών σκευασμάτων.

Ένα ιδανικό ΣΕΑΔΟ πρέπει να είναι αδρανές, βιοσυμβατό, αλλά και μηχανικά ανθεκτικό, να μην ενοχλεί τον ασθενή, να είναι ικανό να φέρει υψηλό φορτίο δραστικής ουσίας, να είναι ασφαλές από τυχαία απελευθέρωση της δραστικής ουσίας και τέλος να είναι εύκολη η κατασκευή και αποστείρωσή του.

Ο στόχος των ΣΕΑΔΟ είναι η άμεση χορήγηση σταθερών και αποτελεσματικών ποσοτήτων της δραστικής ουσίας κατά τη διάρκεια μιας χρονικής περιόδου. Η συγκέντρωση δραστικής ουσίας στο αίμα πρέπει να κυμαίνεται μεταξύ μιας συγκεκριμένης ελάχιστης τιμής, κάτω από την οποία η δραστική ουσία παύει πλέον να είναι αποτελεσματική, και μιας όμως μέγιστης τιμής, πάνω από την οποία οι συγκεντρώσεις της δραστικής ουσίας θεωρούνται τοξικές. Με ισχύουσες φαρμακευτικές μορφές η συγκέντρωση μίας φαρμακευτικής δραστικής ουσίας στον οργανισμό αυξάνεται μετά από κάθε χορήγηση, με κίνδυνο βέβαια να φτάσει σε τοξικές συγκεντρώσεις, ενώ στη συνέχεια μειώνεται μέχρι στιγμή της επόμενης χορήγησης, με κίνδυνο να πέσει σε αναποτελεσματικές συγκεντρώσεις. Στα ΣΕΑΔΟ, αντίθετα, η συγκέντρωση της δραστικής ουσίας στο αίμα μπορεί να παραμένει συνεχώς σταθερή.

Τα τελευταία χρόνια, τα ΣΕΑΔΟ αλλά και τα πολυμερή τα οποία χρησιμοποιούνται σε αυτά γίνονται όλο και πιο εξελιγμένα. Για παράδειγμα, τα σημερινά ΣΕΑΔΟ έχουν την ικανότητα να μπορούν να αντιδρούν σε αλλαγές στο βιολογικό τους περιβάλλον, αποδεσμεύοντας έτσι δραστικές ουσίες[31]

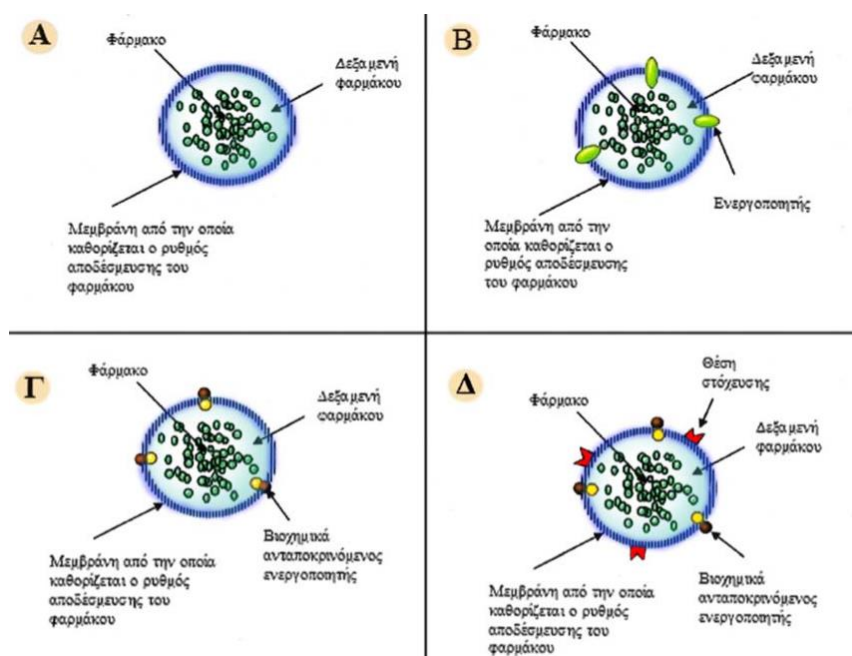


Εικόνα 4. 2 Σύγκριση παραδοσιακών φαρμακευτικών μορφών και συστημάτων ελεγχόμενης αποδέσμευσης.[31]

4.2. Μηχανισμοί ελεγχόμενης αποδέσμευσης

Υπάρχουν τρεις βασικοί μηχανισμοί με τους οποίους μία δραστική ουσία μπορεί να αποδεσμευτεί από ένα ΣΕΑΔΟ αυτά είναι: η διάχυση, η διόγκωση αλλά και η αποσύνθεση. Η κατηγοριοποίηση των συστημάτων ελεγχόμενης χορήγησης δραστικών ουσιών μπορεί να πραγματοποιηθεί αρχικά ως προς την οδό χορήγησης τους (πχ. εντερική, παρεντερική, οφθαλμική, ρινική κτλ.), έπειτα το μέγεθος των συστημάτων (πχ. μακροσκοπικά, μικροσκοπικά, νανοσκοπικά συστήματα διασποράς) και τέλος ως προς την αρχή λειτουργίας τους σε:

- Συστήματα προκαθορισμένου ρυθμού αποδέσμευσης.
- Συστήματα ενεργοποιούμενης αποδέσμευσης.
- Συστήματα στα οποία η αποδέσμευση ελέγχεται από μηχανισμό ανάδρασης.
- Συστήματα στόχευσης [31]

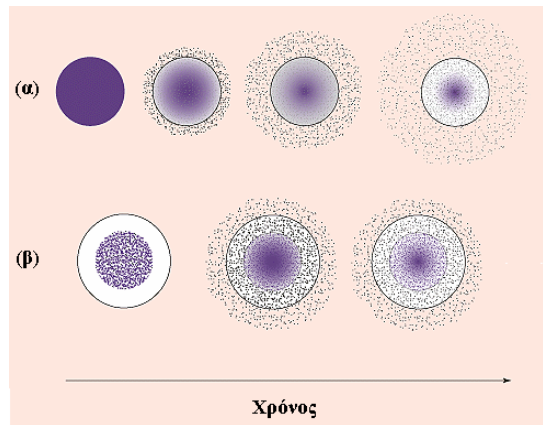


Εικόνα 4. 3 Σχηματική αναπαράσταση των τεσσάρων κατηγοριών (όσον αφορά στο τρόπο λειτουργίας) των συστημάτων ελεγχόμενης αποδέσμευσης που αναφέρονται πιο πάνω. [3]

4.2.2. Διάχυση

Η διάχυση συμβαίνει όταν η δραστική ουσία περνά μέσα από το πολυμερές που συνθέτει το ΣΕΑΔΟ. Η διάχυση μπορεί να πραγματοποιείται είτε μακροσκοπικά, μέσω του πορώδους του πολυμερικού υποστρώματος, είτε σε μοριακό επίπεδο, ανάμεσα από

τις μακρομοριακές αλυσίδες του εκάστοτε πολυμερούς. Όπως φαίνεται και παρακάτω.



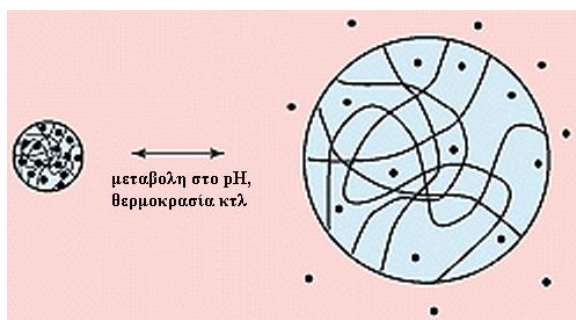
Εικόνα 4. 4 Αποδέσμευση δραστικής ουσίας, ελεγχόμενη από διάχυση: (α) ΣΕΑΔΟ μήτρας, (β) ΣΕΑΔΟ αποθέματος.[3]

Στην περίπτωση των ΣΕΑΔΟ μήτρας η ταχύτητα της διάχυσης και κατά συνέπεια και της αποδέσμευσης προοδευτικά μπορεί να ελαττώνεται, αυτό συμβαίνει διότι με την πάροδο του χρόνου η δραστική ουσία θα έχει μεγαλύτερη απόσταση να διανύσει ώστε να μπορέσει να περάσει από την πολυμερική μήτρα στο εξωτερικό περιβάλλον. Στα ΣΕΑΔΟ αποθέματος, αντιθέτως, αν και εφόσον το πάχος της πολυμερικής μεμβράνης είναι βέβαια ομοιόμορφο, η ταχύτητα της διάχυσης και κατά συνέπεια και η αποδέσμευση της δραστικής ουσίας μπορεί να διατηρηθεί σταθερή.

Τέλος στα παραπάνω ΣΕΑΔΟ η επιλογή των υλικών γίνεται με γνώμονα την σταθερότητα αυτών στο βιολογικό περιβάλλον για το οποίο προορίζονται και έτσι να μην αλλάζουν σχήμα ή μέγεθος μέσω μηχανισμών διόγκωσης ή αποσύνθεσης.[32]

4.2.3. Διόγκωση ακολουθούμενη από διάχυση.

Ένα από τα πιο ενδιαφέροντα και χρήσιμα χαρακτηριστικά της διόγκωσης ενός πολυμερούς είναι ότι μπορεί να προκληθεί από αλλαγές στο περιβάλλον του συστήματος. Έτσι, είναι δυνατό ένα ΣΕΑΔΟ να διαμορφωθεί ώστε να μην είναι δυνατή η απελευθέρωση της δραστικής του ουσίας έως την στιγμή που αυτό θα βρεθεί στο κατάλληλο βιολογικό περιβάλλον. Τέτοια συστήματα μπορούν να κατασκευαστούν από υλικά τα οποία παρουσιάζουν διόγκωση προκαλούμενη κυρίως από περιβαλλοντικά ερεθίσματα, τα οποία στην πλειοψηφία τους είναι υδροφιτικές.



Εικόνα 4. 5 Αποδέσμευση δραστικής ουσίας από σύστημα ευαίσθητο σε περιβαλλοντικά ερεθίσματα.[3]

Ανάλογα με την φύση του πολυμερούς, το ερέθισμα το οποίο θα ξεκινήσει την απελευθέρωση της δραστικής ουσίας, μπορεί να είναι κάποια μεταβολή στο pH ή στη θερμοκρασία. Έτσι το ΣΕΑΔΟ μπορεί είτε να συρρικνώνεται, είτε και να διογκώνεται σε οποιοδήποτε περιβαντολλογικό ή μη ερέθισμα. [32][31]

Ερέθισμα	Υδροπηκτή	Μηχανισμός
pH	Όξινη ή βασική υδροπηκτή	Μεταβολή στο pH → διόγκωση → αποδέσμευση
Ιονική ισχύς	Ιονική υδροπηκτή	Μεταβολή στην ιονική ισχύ → αλλαγή στη συγκέντρωση ιόντων στην υδροπηκτή → διόγκωση → αποδέσμευση
Χημικό	Υδροπηκτή που περιέχει ομάδεςδέκτες ηλεκτρονίων	Παρουσία ενώσεων δοτών ηλεκτρονίων → σχηματισμός συμπλόκου μεταφοράς φορτίου → διόγκωση → αποδέσμευση
Αλληλεπίδραση ένζυμου / υποστρώματος	Υδροπηκτή που περιέχει ακινητοποιημένα ένζυμα	Παρουσία υποστρώματος → ενζυμική μετατροπή → το προϊόν προκαλεί διόγκωση → αποδέσμευση
Μαγνητικό	Μαγνητικά σωματίδια διεσπαρμένα σε μικροσφαίρες αλγινικού οξέος	Εφαρμογή μαγνητικού πεδίου → αλλαγή στο πορώδες της υδροπηκτής → διόγκωση → αποδέσμευση
Θερμικό	Θερμοευαίσθητη υδροπηκτή Πολυ(N-Ισοπροπυλακρυλαμίδιο) (PNIPAm)	Μεταβολή στη θερμοκρασία → μεταβολή αλληλεπιδράσεων πολυμερούς-πολυμερούς και πολυμερούς-νερού → διόγκωση → αποδέσμευση
Ηλεκτρικό πολυηλεκτρολύτη	Υδροπηκτή	Εφαρμογή ηλεκτρικού πεδίου → ιονισμός μεμβράνης →

		ηλεκτροφόρηση φορτισμένης δραστικής ουσίας → διόγκωση → αποδέσμευση
Ακτινοβολία υπερήχων	Υδροπηκτική συμπολυμερούς βινυλικής αλκοόλης (EVOH)	Ακτινοβολία υπερήχων → αύξηση θερμοκρασίας → διόγκωση → αποδέσμευση

Πίν. 2. Ευαίσθητα σε περιβαλλοντικά ερεθίσματα πολυμερή για ελεγχόμενη αποδέσμευση
δραστικής ουσίας.

Κεφάλαιο 5^ο

Συστήματα διαδερμικής χορήγησης δραστικών ουσιών

5. Εισαγωγή

Η διαδερμική χορήγηση των δραστικών ουσιών έχει μελετηθεί συστηματικά τις τελευταίες δεκαετίες. Αυτά τα συστήματα διαδερμικής χορήγησης φαρμακευτικών δραστικών ουσιών (ΣΔΧΔΟ) εφαρμόζουν την αρχή της ελεγχόμενης αποδέσμευσης από ένα φορέα όπως για παράδειγμα ένα πολυμερές, και χρησιμοποιούνται για μακροπρόθεσμες ίσως και για χρόνιες θεραπείες οι οποίες απαιτούν συνεχή παροχή κάποιου θεραπευτικού παράγοντα. Για πρακτικούς λόγους δε μπορούν να χρησιμοποιηθούν για πρώτες βοήθειες, διότι η δράση τους πραγματοποιείται μετά το πέρας κάποιου χρονικού διαστήματος από την εφαρμογή τους. [33]

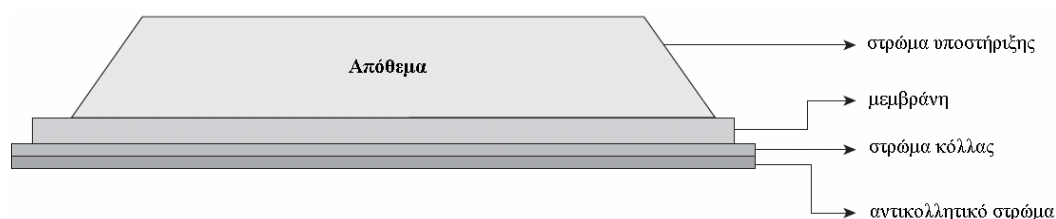
Τα ΣΔΧΔΟ μπορούν να προσφέρουν πολλά πλεονεκτήματα σε σχέση με τις συμβατικά συστήματα χορήγησης δραστικών ουσιών, αλλά και τα συστήματα ελεγχόμενης αποδέσμευσης. Το κόστος, ανά γραμμάριο δραστικής ουσίας χορηγούμενης διαδερμικά, είναι πολύ αυξημένο σε σχέση με τη συμβατική στοματική χορήγηση. [30] Παρόλο αυτά, το κόστος αυτό μπορεί να δικαιολογηθεί, καθώς αυτά τα ΣΔΧΔΟ έχουν τη δυνατότητα να παρέχουν σταθερή συγκέντρωση δραστικής ουσίας για έως και μία εβδομάδα.[18]

5.1. Κατασκευή και σχεδιασμός συστημάτων διαδερμικής χορήγησης

Ένα τυπικό ΣΔΧΔΟ αποτελείται από μία πολυστρωματική δομή σε πολύ στενή και σταθερή επαφή με το δέρμα, η οποία και διασφαλίζει τη διάχυση της δραστικής από το ΣΔΧΔΟ, μέσω του δέρματος, στο κυκλοφορικό σύστημα. Τα υπάρχοντα ΣΔΧΔΟ μπορούν να διαχωριστούν σε δύο κύριες κατηγορίες: τα ΣΔΧΔΟ μήτρας και τα ΣΔΧΔΟ αποθέματος.[33][34]

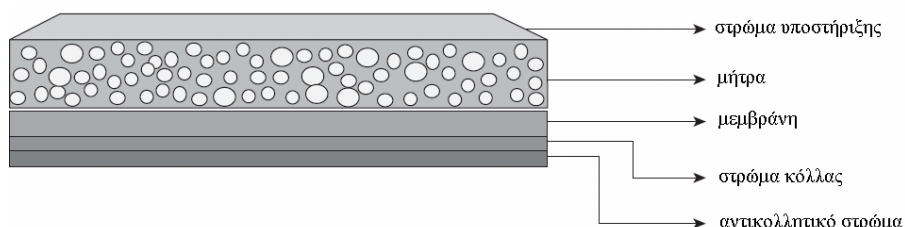
Ένα ΣΔΧΔΟ αποθέματος μπορεί να αποτελείται από ένα στρώμα υποστήριξης το οποίο συγκρατεί μηχανικά όλο το σύστημα ενώ μπορεί να αποτρέπει την απώλεια της δραστικής ουσίας. Βέβαια το απόθεμα το οποίο περιέχει τη δραστική ουσία όπως για παράδειγμα μία μεμβράνη η οποία διαχέει την δραστική ουσία από το απόθεμα για την εφαρμογή του ΣΔΧΔΟ στο δέρμα, και ένα αντικολλητικό στρώμα που αφαιρείται αμέσως πριν την εφαρμογή. Αυτού του τύπου τα συστήματα συνήθως χρησιμοποιούνται για τη

παροχή δραστικής ουσίας διαλυμένης σε υγρή φάση, ή περιέχουν κάποια δραστική ουσία με την μορφή γέλης.



Εικόνα 5. 1 Σύστημα διαδερμικής χορήγησης δραστικής ουσίας τύπου αποθέματος (reservoir).

Στα ΣΔΧΔΟ μήτρας η δραστική ουσία είναι διαλυμένη ή διεσπαρμένη σε ένα πολυμερικό υπόστρωμα, το στρώμα κόλλας θεωρείται απαραίτητο μόνο σε περίπτωση που το υπόστρωμα δεν κολλάει στο δέρμα και συνήθως αποφεύγεται. Σε περίπτωση που το υπόστρωμα είναι υδρόφιλο, τότε μπορεί να εγκιβωτισθεί στο κέντρο του ένα λεπτό στρώμα υλικού το οποίο θα βοηθήσει την απορρόφηση της υδατικής φάσης. Στην περίπτωση που το ΣΔΧΔΟ δεν προορίζεται για χρήση πάνω από δύο μέρες, κάτι τέτοιο δεν είναι απαραίτητο. Ο κύριος ρόλος της μεμβράνης είναι να διασφαλίζει μια σταθερή παροχή δραστικής ουσίας από αυτή στον οργανισμό, αλλά και η συγκράτηση του διαλύματος στο απόθεμα.[34]



Εικόνα 5. 2 Σύστημα διαδερμικής χορήγησης δραστικής ουσίας τύπου μήτρας (matrix).

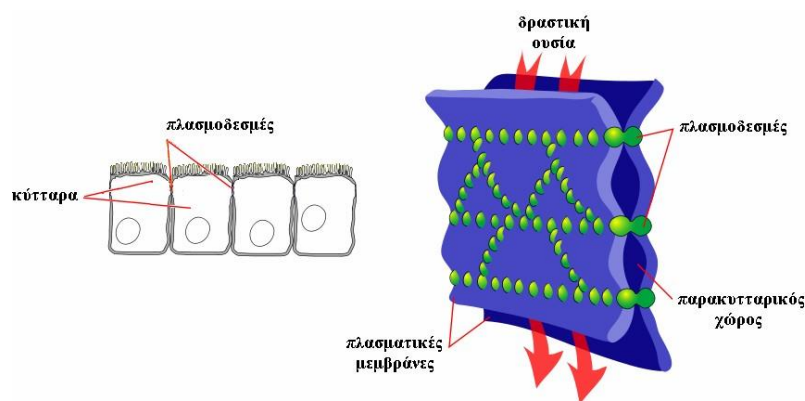
Ο ρόλος του τμήματος το οποίο περιέχει κόλλα είναι προφανώς η διασφάλιση της καλής επαφής του ΣΔΧΔΟ με το δέρμα. Η κόλλα θα πρέπει να είναι απόλυτα βιοσυμβατή ή μη τοξική προς ερεθισμούς ή αλλεργικές αντιδράσεις, ενώ ο συντελεστής διάχυσης της δραστικής ουσίας από το στρώμα της κόλλας θα πρέπει να είναι σημαντικά υψηλότερος από αυτόν της μεμβράνης.

[33]

5.2. Η χιτοζάνη ως ενισχυτικό διαπέρασης

Η χιτοζάνη και παράγωγά της έχουν ερευνηθεί εκτενώς σε ΣΔΧΔΟ. Παράγωγά της έχουν χρησιμοποιηθεί ως φορείς δραστικών ουσιών, αλλά και ως μεμβράνες διάχυσης. Η δράση της χιτοζάνης ως βοηθητικό διαπέρασης φαρμακευτικών δραστικών ουσιών σε ΣΔΧΔΟ έχει επιβεβαιωθεί από *in vivo* και *in vitro* μελέτες. Ο

μηχανισμός με τον οποίο η χιτοζάνη αυξάνει τη διαπερατότητα της επιδερμίδας δεν έχει πλήρως διευκρινιστεί. Πιστεύεται ότι πιθανότατα οφείλεται στην ενυδάτωση της από τη χιτοζάνη, καθώς και σε ιοντικές αλληλεπιδράσεις της χιτοζάνης με το δίκτυο των φορτισμένων πολυσακχαριτών που βρίσκεται στο εξωτερικό των κυττάρων. Επιπλέον, η χιτοζάνη έχει την ικανότητα να διασπά τους πλασμοδεσμούς των κυττάρων απενεργοποιώντας την πρωτεΐνη αυξάνοντας και έτσι και τη διαπερατότητα της δραστικής ουσίας μέσω της παρακυτταρικής οδού[35].



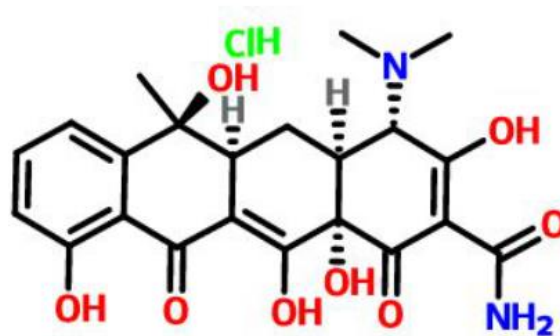
Εικόνα 5. 3 Διαπέραση του δέρματος από δραστική ουσία, μέσω της παρακυτταρικής οδού[3].

Κεφάλαιο 6^ο

Υδροχλωρική Τετρακυκλίνη (ΤΗ)

6. Εισαγωγή

Η υδροχλωρική τετρακυκλίνη είναι ένα αντιβακτηριακό φάρμακο για συστηματική χρήση περιλαμβάνεται στην υποομάδα συστηματικών αντιβιοτικών της τετρακυκλίνης.



Εικόνα 6. 1 Χημική δομή υδροχλωρικής τετρακυκλίνης (ΤΗ) .[3]

Ένα θεραπευτικό φάρμακο επηρεάζει κυρίως το σώμα αναστέλλοντας τις διαδικασίες σύνδεσης πρωτεΐνης μέσα στα ριβοσώματα των βακτηριακών κυττάρων. Η επίδραση του φαρμάκου καλύπτει ένα ευρύ φάσμα διαφορετικών μικροβίων. Μαζί με αυτό, το φάρμακο επιδεικνύει βακτηριοστατική δράση (όταν χρησιμοποιούνται τυπικές δόσεις του φαρμάκου).

[36]

6.1. Ενδείξεις Υδροχλωρικής Τετρακυκλίνης

Χρησιμοποιείται για θεραπεία με τέτοιες ασθένειες φλεγμονώδους και μολυσματικής φύσης:

- πνευμονία με βρογχίτιδα, υποξεία μορφή σηπτικής ενδοκαρδίτιδας και πυώδη πλευρίτιδα.
- Δυσεντερία ιβικού ή βακτηριακού τύπου.
- στηθάγχη, κοκκύτης ή ερυθρός πυρετός
- τουλαρεμία, ψιττακόζωση, βρουκέλλωση και τυφοειδής πυρετός υποτροπιάζοντος ή τύφο.

- πυώδης μηνιγγίτιδα
- με πυώδη μορφή βλάβης στο υποδόριο στρώμα με την επιδερμίδα.

Επιπλέον, μπορεί να χρησιμοποιηθεί για την πρόληψη της ανάπτυξης λοιμώξεων μετά από χειρουργική επέμβαση.[37][36]

6.2. Φαρμακολογία

Υδροχλωρική τετρακυκλίνη, είναι μια ουσία που προέρχεται συνθετικά από οξυτετρακυκλίνη ή που λαμβάνεται από *Streptomyces aureofaciens*. Οι τετρακυκλίνες, λειτουργούν γενικά ως βακτηριοστατικοί παράγοντες ευρέος φάσματος που αναστέλλουν την πρωτεϊνική σύνθεση με αναστρέψιμη σύνδεση με την υπομονάδα 30S του βακτηριακού ριβοσώματος. με τον τρόπο αυτό θα παρεμποδίζει την πρόσβαση του αμινοακυλο-tRNA στη θέση δέκτη επί του συμπλόκου mRNA-ριβοσώματος που παρεμποδίζει την ανάπτυξη ευπαθών βακτηριδιακών κυττάρων. Επίσης μελέτες έδειξαν ότι δεσμεύονται αντιστρεπτά τα ριβοσώματα 50S, μεταβάλλοντας τη διαπερατότητα της κυτταροπλασματικής μεμβράνης σε ευαίσθητους οργανισμούς.[38]

6.3. Φαρμακοδυναμική

Τα αντιβιοτικά από την υποομάδα τετρακυκλίνης έχουν ένα ευρύ φάσμα θεραπευτικών αποτελεσμάτων. Έχουν επίδραση στη θετική κατά gram χλωρίδα (στρεπτόκοκκους, κλωστρίδια, σταφυλόκοκκους, E. Coli, Klebsiella, Gonococcus, Shigella με Bordetella, Salmonella και Enterobacteriaceae) και απομονώνονται από τους εκπροσώπους της gram-αρνητικής χλωρίδας, επιδεκτικούς στην επίδραση του φαρμάκου.

Η υδροχλωρική τετρακυκλίνη δεν εμφανίζει δραστηριότητα ή δρα πολύ αδύναμα έναντι οδοντωτών, πρωτεϊνών, *Pseudomonas aeruginosa*, ανθεκτικών στα οξέα μικροβίων, των περισσότερων στελεχών των βακτηριοειδών *Fragilis*, του ιού της γρίπης, της ιλαράς και της πολιομυελίτιδας, καθώς και των μυκητιακών βακτηρίων.[39][40]

6.4. Φαρμακοκινητική

Όταν χρησιμοποιείται από το στόμα, το φάρμακο απορροφάται με μεγάλη ταχύτητα στο εσωτερικό του γαστρεντερικού σωλήνα (κατά 75-77%). Ταυτόχρονα, η

τροφή μειώνει την απορρόφηση. Το φάρμακο συντίθεται επίσης καλά με πρωτεΐνη πλάσματος.

Το φάρμακο διανέμεται με μεγάλη ταχύτητα στα περισσότερα υγρά, συμπεριλαμβανομένης της χολής. Έπειτα συσσωρεύεται μέσα στα νεοπλάσματα, τη σπλήνα και τα κύτταρα του ήπατος, καθώς και τα δόντια. Φτάνει σε φυσιολογικές θεραπευτικές τιμές μετά από 2-3 ημέρες.

Αποβάλλεται μέσω των νεφρών, καθώς και με τα κόπρανα (μέσω των νεφρών και μαζί με τη χολή - κατά 60%). Ο χρόνος ημίσειας ζωής υπό κανονικές συνθήκες είναι 6-11 ώρες και σε άτομα με ανουρία-57-108 ώρες. Σε διαταραχές της νεφρικής έκκρισης, το επίπεδο τετρακυκλίνης στο αίμα μπορεί να αυξηθεί.[39]

Στοιχεία	ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ	ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑ
Εμφάνιση Τετρακυκλίνη Hcl	Κίτρινη κρυσταλλική σκόνη	Συμμορφώνεται
Διαλυτότητα	Διαλυτό στο νερό, ελαφρώς διαλυτό σε αλκοόλη, πρακτικά αδιάλυτο σε ακετόνη και αιθέρα.	Συμμορφώνεται
Ταυτοποίηση Υδροχλωρική τετρακυκλίνη	Ένα παρόμοιο. B, Γ Θετική	Συμμορφώνεται
Απώλεια στο στέγνωμα	≤2,0%	0,35%
pH	1.8-2.8	2.6
Ειδική οπτική περιστροφή	-240-- -255	-247
Βαριά μέταλλα	Συμμορφώνεται με τη δοκιμή ορίου (50ppm)	Πέρασμα
Θευκή τέφρα	≤0,5%	0,09%
Σχετική ουσία	4-επιτετρακυκλίνη ≤3.0%	1,5%
	Ανυδροτετρακυκλίνη ≤0,5%	0,15%
	4-πενυδροτετρακυκλίνη ≤0,5%	0,04%
	2-ακετυλ-2-δεκαρβαμυλτετρακυκλίνη \diamond	0,70%
Υπολειμματικοί διαλύτες	1-βουτανόλη ≤5000ppm	2381ppm

	Ακετόνη ≤5000ppm	ppm
Χημική δοκιμή Τετρακυκλίνη Hcl	95,0% -102,0% Υδροχλωρική τετρακυκλίνη	97,2%

Πιν. 3. Πιστοποιητικό ανάλυσης (υδροχλωρική τετρακυκλίνη)

Συμπέρασμα: Συμμορφώνεται με το πρότυπο BP2012 Standard

6.5. Παρενέργειες Υδροχλωρικής τετρακυκλίνης

Συνήθως, το φάρμακο είναι ανεκτό χωρίς επιπλοκές (όταν χορηγείται στις συνιστώμενες δόσεις). Οι κύριες παρενέργειες είναι:

- ναυτία, δυσκοιλιότητα, ανορεξία, ξεροστομία, δυσφορία ή πόνος στην κοιλιακή χώρα, καούρα, έμετο, γλωσσίτιδα ή στοματίτιδα.
- έλκη στο γαστρεντερικό σωλήνα, δυσφαγία, οισοφαγίτιδα, γαστρίτιδα, εντερική δυσβίωση, ηπατοτοξική δράση, κολίτιδα ψευδομεμβρανώδους τύπου και σταφυλοκοκκική εντεροκολίτιδα.
- βραχνή φωνή και πόνος στο λαιμό.
- αστάθεια στο βάδισμα, φωτοφοβία, πονοκέφαλοι και ζάλη. η παρατεταμένη χρήση προκαλεί αύξηση του επιπέδου ICP (έμετος, οπτικές αλλαγές, πονοκέφαλοι και οίδημα στο οπτικό νεύρο), διαταραχές ακοής και παροδική απώλεια όρασης.
- θρομβοπενία ή ουδετεροπενία, ηωσινοφιλία, αιμολυτική αναιμία, ακοκκιοκυτταραιμία και ασθένεια Moshkovich.
- νεφρίτιδα, οξεία νεφρική ανεπάρκεια, αζωτεμία, κολπίτιδα και υπερκρεατιναιμία.
- Οίδημα του Quincke, TEN, εξανθήματα της ωχράς κηλίδας, αναφυλακτοειδή συμπτώματα, επιδερμική υπεραίμια, φωτοευαισθησία, κνίδωση και αναφυλαξία.
- βρογχικός σπασμός.[39]

Κεφάλαιο 7^ο

Οι μεμβράνες

7. Γενικά Στοιχεία Μεμβρανών

Στο παρόν κεφάλαιο συνοψίζονται οι βασικές θεωρητικές αρχές των πολυμερικών μεμβρανών. Αρχικά, παρουσιάζονται τα χαρακτηριστικά, η μορφολογία και οι μέθοδοι παρασκευής πολυμερικών μεμβρανών κατάλληλων για ιατρικές χρήσεις.[41]

Η τεχνολογία μεμβρανών κατέχει εξέχουσα θέση στον κλάδο της ιατρικής. Τα τελευταία χρόνια, ειδικά κατασκευασμένες μεμβράνες χρησιμοποιούνται για τη διοχέτευση φαρμακευτικών ουσιών στον οργανισμό, καθώς και για τη δημιουργία τεχνητών οργάνων.

Σε όλες τις προαναφερθείσες περιπτώσεις, οι μεμβράνες πρέπει να είναι κατασκευασμένες από υλικά βιοσυμβατά, δηλαδή να μην απορρίπτονται από τον οργανισμό, και κάποιες φορές βιοαποδομήσιμα, δηλαδή να είναι εφικτή η αποδόμησή τους από το ίδιο το σώμα μετά το πέρας της λειτουργίας τους. Πλήθος πολυμερικών υλικών χρησιμοποιείται για τη σύνθεση βιοσυμβατών και βιοαποδομήσιμων μεμβρανών. [41]

7.1. Ταξινόμηση των Μεμβρανών

Οι μεμβράνες μπορούν να είναι αέριες, υγρές, στερεές ή και συνδυασμός αυτών. Μια ταξινόμηση των μεμβρανών είναι δυνατόν να γίνει σύμφωνα με το υλικό κατασκευής και σύμφωνα με την δομή τους όπως φαίνεται και στον παρακάτω πίνακα:

Υλικό Κατασκευής	Δομή
Πολυμερικές Μεμβράνες : Αφορούν μεγάλο αριθμό των διαθέσιμων πολυμερών, όπως μεμβράνες οξικής κυτταρίνης, πολυαμιδικές μεμβράνες, ελαστικά σιλικόνης, κ.α.	Διακρίνονται δύο τύποι δομών για τις στερεές μεμβράνες, οι συμμετρικές και οι ασύμμετρες.

Μεμβράνες από φυσικά τροποποιημένα προϊόντα βασισμένα στην κυτταρίνη.	Οι συμμετρικές μεμβράνες διακρίνονται σε πορώδεις και μη πορώδεις.
Κεραμικές και μεταλλικές μεμβράνες.	Οι ασύμμετρες μεμβράνες διακρίνονται από μη ομοιόμορφη και από ανομοιόμορφη δομή αποτελούμενη από ένα ενεργό στρώμα υποστηριζόμενο από πορώδες υπόστρωμα.

Πιν. 4 Ταξινόμηση Μεμβρανών[40]

7.2. Παρασκευή Μεμβρανών

Το 1845 ο Schoenbein παρασκεύασε την πρώτη συνθετική μεμβράνη από νιτροκυτταρίνη έτσι από τότε διάφορα υλικά από ανόργανες ουσίες μικρού μοριακού βάρους μέχρι και οργανικά πολυμερή χρησιμοποιήθηκαν κατά καιρούς για την παρασκευή μεμβρανών. Κάποια χαρακτηριστικά παραδείγματα τέτοιων υλικών είναι το οξείδιο του αλουμινίου, οι πυριτικές ενώσεις, το γυαλί, τα παράγωγα της κυτταρίνης, το παλλάδιο, το τεχνητό καουτσούκ κ.ά.[41]

Η παρασκευή των μεμβρανών μπορεί να γίνει με την χρησιμοποίηση φυσικών ή χημικών μεθόδων και ανάλογα με την περίπτωση μπορούν να ληφθούν μη πορώδεις μεμβράνες ή πορώδεις μεμβράνες συγκεκριμένου μεγέθους.

Κατά την χρήση φυσικών μεθόδων οι μεμβράνες παρασκευάζονται κυρίως από ένα αρχικό διάλυμα πολυμερούς ή από ένα τήγμα πολυμερούς, ακόμη και από μια εύπλαστη πολυμερική μάζα χωρίς την χρήση κάποιας χημικής αντίδρασης. Οι μέθοδοι διακρίνονται στις παρακάτω :

- Διεργασία αντίστροφης φάσης

Αναφέρεται αυτή η μέθοδος στην παρασκευή ασύμμετρων μεμβρανών που προκύπτουν από το αρχικό διάλυμα του πολυμερούς και οφείλουν το πορώδες τους στην ακινητοποίηση του gel του πολυμερούς πριν από τη πλήρη εξάτμιση ή την απομάκρυνση του διαλύτη. Τα πολυμερή αυτά προέρχονται από τα εξής υλικά : οξική κυτταρίνη, πολυπροπυλένιο, πολυαμίδιο, νιτροκυτταρίνη, πολυσουλφόνη κ.ά.. Επίσης υπάρχουν και οι παρακάτω παραλλαγές.

1. Εξάτμιση του διαλύτη (Solvent evaporation)

Σε αυτή την μέθοδο το διηθημένο παχύρευστο διάλυμα επιστρώνεται σε μια βάση η οποία μπορεί να είναι μια λεία γυάλινη πλάκα. Εν συνεχεία ο διαλύτης απομακρύνεται σε θερμοκρασία δωματίου ή υψηλότερη με την χρήση ξηραντήρα. Η παρασκευή της μεμβράνης μπορεί να γίνει και με γρήγορη εμβάπτιση ενός κατάλληλου υποστρώματος

στο αρχικό διάλυμα του πολυμερούς, έπειτα ακολουθεί εξάτμιση του διαλύτη και τελικά αποκόλληση της μεμβράνης από το υπόστρωμα. Με αυτήν την μέθοδο παρασκευάζονται κυρίως μη πορώδεις μεμβράνες.

2. Μεταβολή θερμοκρασίας (Temperature change)

Με αυτή τη μέθοδο παρασκευάζονται οι μεμβράνες πολυαιθυλενίου και πολυβινυλοχλωριδίου. Το πολυμερές σε αυτή τη μέθοδο διαλύεται σε υψηλή θερμοκρασία και εν συνεχεία το διάλυμα ψύχεται ώστε να κατακρημνιστεί το πολυμερές και να διευκολυνθεί ο διαχωρισμός φάσης. Η εξάτμιση του διαλύτη επιτρέπει το σχηματισμό λεπτής μεμβράνης.

3. Προσθήκη μέσου κατακρήμνισης (Precipitant addition)

Με αυτή την μέθοδο παρασκευάζονται ασύμμετρες μεμβράνες οξικής κυτταρίνης και πολυσουλφόνης. Η μεμβράνη επιστρώνεται σε μια γυάλινη πλάκα και εν συνεχεία γίνεται εμβάπτιση σε ένα μέσο κατακρήμνισης όπως για παράδειγμα το νερό, έτσι ώστε να γίνει εναλλαγή του διαλύτη με το μέσο κατακρήμνισης και δημιουργείται με συσσωμάτωση (κροκίδωση) η μεμβράνη με την μορφή πηκτής.[40]

7.2.1. Φυσική κατάσταση πολυμερών

Οι ιδιότητες μιας μεμβράνης διάλυσης-διάχυσης καθορίζονται σε μεγάλο βαθμό από τη φυσική κατάσταση του πολυμερούς από το οποίο είναι παρασκευασμένη. Στη στερεά φάση, τα πολυμερή είναι συνήθως μερικώς ή πλήρως άμορφα υλικά. Η θερμοκρασία ή το σημείο υαλώδους μετάπτωσης, T_g , αντιπροσωπεύει τη θερμοκρασιακή περιοχή όπου ένα άμορφο πολυμερές μετασχηματίζεται από δύσκαμπτο και υαλώδες, σ' ένα ανθεκτικό και ελαστικό υλικό, το οποίο εξίσου δίκαια μπορεί να χαρακτηριστεί είτε ως στερεό είτε ως υγρό. Έτσι, ένα πολυμερές χαρακτηρίζεται ως υαλώδες ή ελαστομερές, όταν η θερμοκρασία στην οποία βρίσκεται είναι αρκετά μικρότερη ή μεγαλύτερη, αντίστοιχα, από το σημείο υαλώδους μετάπτωσης. [40]

Η θερμοκρασία υαλώδους μετάπτωσης καθορίζεται από χαρακτηριστικά της μοριακής δομής του πολυμερούς, όπως είναι η ευκαμψία (flexibility) των αλυσίδων, η πολικότητα (polarity) και η cis-, trans- ισομέρεια των χαρακτηριστικών ομάδων, η χωροταξική διεύθυνση (steric effects), η στερεοκανονικότητα (tacticity), η ύπαρξη διακλαδώσεων (branching) και σταυροδεσμών (crosslinking) και η μοριακή μάζα. Επιγραμματικά μπορεί να διατυπωθεί ότι, όσο ισχυρότερη είναι η διαμοριακή αλληλεπίδραση τόσο πιο δύσκαμπτες είναι οι μακροάλυσοι, με αποτέλεσμα το πολυμερές να εμφανίζει υψηλό μέτρο ελαστικότητας (μέτρο Young) και υψηλή θερμοκρασία υαλώδους μετάπτωσης.[41]

Η υαλώδης μετάπτωση συνοδεύεται από πολύ σημαντικές αλλαγές στις φυσικές ιδιότητες του πολυμερούς, οι οποίες ωστόσο είναι πλήρως αντιστρεπτές αφού

σχετίζονται με τις μοριακές κινήσεις και όχι με τη χημική δομή. Η υπέρβαση της θερμοκρασίας υαλώδους μετάπτωσης σηματοδοτεί την έναρξη εκτεταμένων συνεργατικών κινήσεων πολλών διαδοχικών τμημάτων των πολυμερικών αλυσίδων, οι οποίες πραγματοποιούνται με αρκετά μεγάλη συχνότητα ($> 1 \text{ Hz}$). Η μετάπτωση ενός ελαστομερούς πολυμερούς σε υαλώδες, χαρακτηρίζεται από την απότομη (ασυνεχή) μείωση της ειδικής θερμότητας, του συντελεστή θερμικής διαστολής και της συμπιεστότητας του υλικού. Σε θερμοκρασίες κάτω από το σημείο T_g οι θερμικές κινήσεις των πολυμερικών αλυσίδων περιορίζονται δραστικά, με αποτέλεσμα οι χρόνοι που απαιτούνται για την προσέγγιση των θέσεων ισορροπίας τους (relaxation times) να αυξάνονται ραγδαία. Έτσι, οι μακροάλυσοι “παγώνουν” και παγιδεύονται σε λιγότερο πυκνές αλλά περισσότερο δύσκαμπτες στερεοχημικές δομές, υψηλότερου ενεργειακού περιεχομένου σε σύγκριση με τις διαμορφώσεις ισορροπίας που θα προέκυπταν από απείρως αργό ρυθμό ψύξης, Συνεπώς, η φυσική κατάσταση των υαλωδών πολυμερών είναι μία κατάσταση ελλιπούς ισορροπίας, εξαιτίας της οποίας η ενθαλπία, η εντροπία και ο μοριακός όγκος έχουν τιμές μεγαλύτερες από αυτές της αντίστοιχης κατάστασης ισορροπίας. Αντίθετα, τα ελαστομερή πολυμερή βρίσκονται σε κατάσταση θερμοδυναμικής ισορροπίας. [40][41]

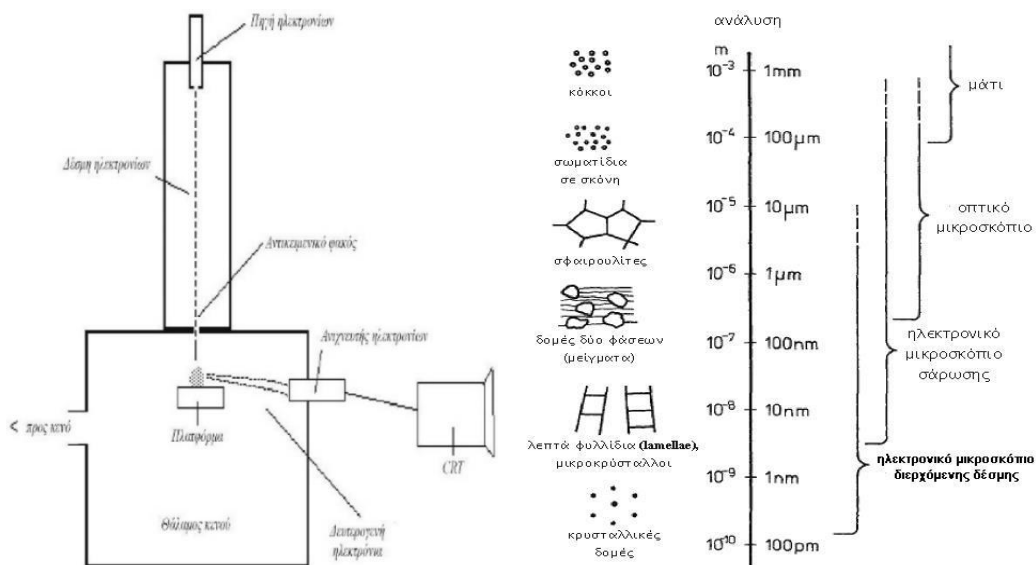
Κεφάλαιο 8^ο

Πειραματικές τεχνικές και μέθοδοι χαρακτηρισμού

8.1. Ηλεκτρονική Μικροσκοπία Σάρωσης (SEM)

Η ηλεκτρονική μικροσκοπία σάρωσης, ως μέθοδος για την άμεση απεικόνιση υπομικροσκοπικών δομών, έχει αποκτήσει σημαντική και συνεχώς αυξανόμενη σημασία τις τελευταίες δεκαετίες. Στο παρελθόν, ο κεντρικός στόχος της χρήσης της ηλεκτρονικής μικροσκοπίας ήταν ο προσδιορισμός της δομής, αλλά πρόσφατα έχει αποκτήσει όλο και μεγαλύτερη αξία για την εξέταση διαφόρων διεργασιών, όπως αλλαγές σε υλικά κατά την αλληλεπίδραση με διάφορους παράγοντες όπως π.χ. θερμότητα, ηλεκτρικά και μαγνητικά πεδία, μηχανική φόρτιση κ.λπ. Ιδιαίτερο ενδιαφέρον παρουσιάζει η μελέτη των μικρομηχανικών διεργασιών της παραμόρφωσης και της θραύσης.

Η ηλεκτρονική μικροσκοπία μπορεί να χωριστεί στις τεχνικές της ηλεκτρονικής μικροσκοπίας διερχόμενης δέσμης και της άμεσης απεικόνισης των επιφανειών [42]. Έτσι η κύρια τεχνική που χρησιμοποιείται για την άμεση εξέταση επιφανειών είναι η ηλεκτρονική μικροσκοπία σάρωσης (SEM). Μια εστιασμένη δέσμη ηλεκτρονίων, σαρώνει γραμμή προς γραμμή την επιφάνεια του δείγματος. Στο προσπίπτον σημείο των αρχικών ηλεκτρονίων, εκπέμπονται δευτερογενή ηλεκτρόνια, όπως φαίνεται παρακάτω.[43]



Εικόνα 8. 1 Γενικό σχεδιάγραμμα της τεχνικής SEM. Οι επιτυγχανόμενες αναλύσεις με διάφορες μικροσκοπικές τεχνικές μαζί με μερικές μορφολογικές λεπτομέρειες σε πολυμερή.

Η ένταση των δευτερογενών ηλεκτρονίων εξαρτάται από την τοπογραφία της επιφάνειας, όπως τη γωνία μεταξύ της κατεύθυνσης της αρχικής δέσμης των ηλεκτρονίων και της επιφάνειας. Ο αριθμός των δευτερογενών ηλεκτρονίων καθορίζουν τη λαμπρότητα μιας οθόνης προβολής, η οποία ελέγχεται από την ίδια γεννήτρια σάρωσης όπως και η δέσμη των αρχικών ηλεκτρονίων. Έτσι, περιοχές με μεγαλύτερη ένταση δευτερογενών ηλεκτρονίων εμφανίζονται λαμπρότερα στην οθόνη προβολής από άλλες. Αυτό αποφέρει εικόνες SEM με ένα καλό βαθμό διαφοράς σκοτεινού και σκούρου, μια πολύ καλή ορατότητα των λεπτομερειών στο χώρο και μεγάλο βάθος εστίασης, κατά ένα παράγοντα περίπου εκατό μεγαλύτερο, από ότι στην οπτική-φωτός απεικόνιση.[44]

Η μεγέθυνση επιτυγχάνεται από την αναλογία του μεγέθους της οθόνης προβολής σε σχέση με το μέγεθος της επιφανειακής περιοχής του δείγματος που σαρώνεται, και μπορεί να μεταβληθεί εύκολα από περίπου 5 έως 200000. Συνεπώς η διακριτική ικανότητα της SEM βρίσκεται μεταξύ αυτής της οπτικής μικροσκοπίας φωτός και της TEM, όπως παρουσιάζεται στο παραπάνω σχήμα, μαζί με μερικές μορφολογικές λεπτομέρειες των πολυμερών

Η τεχνική SEM παρουσιάζει ένα βασικό πλεονέκτημα, διότι, γενικά δεν απαιτούνται ιδιαίτερες προετοιμασίες για την πραγματοποίηση μορφολογικών εξετάσεων στα δείγματα. Εν τούτοις, για μη αγωγικά υλικά, όπως πολυμερή, είναι αναγκαία η απόθεση ενός λεπτού αγωγικού στρώματος μετάλλου ή άνθρακα, με εξάτμιση υπό κενό ή βομβαρδισμό με τα σωματίδια.

Εξαιτίας της αλληλεπίδρασης της αρχικής δέσμης ηλεκτρονίων και του δείγματος, ένας αριθμός και άλλων σημάτων, εκτός της εκπομπής δευτεροταγών ηλεκτρονίων, είναι δυνατό να εμφανιστούν, και να αποφέρουν συγκεκριμένες πληροφορίες για το δείγμα. Πιο σημαντικό είναι ο προσδιορισμός των ακτίνων X, επιτρέποντας έτσι την ποιοτική και ποσοτική ανάλυση των στοιχείων (EDX, Energy Dispersive analysis of X-rays, ανάλυση διασποράς ενέργειας των ακτίνων X).

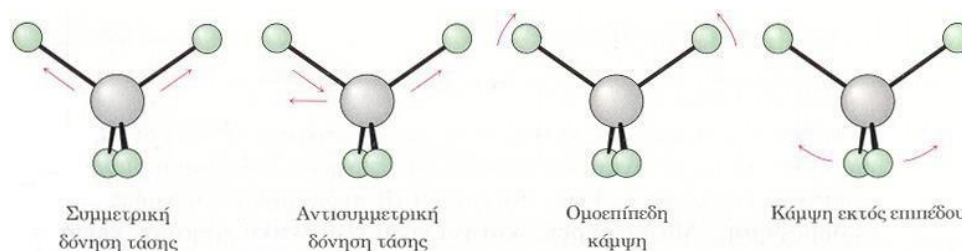
Η χρήση επιπρόσθετων σημάτων και πληροφοριών, όπως επανασκεδαζόμενα ηλεκτρόνια, απορροφημένα ηλεκτρόνια, ενεργειακή απώλεια εκπεμπόμενων ηλεκτρονίων, αποτελούν το πεδίο της αναλυτικής ηλεκτρονικής μικροσκοπίας.[44][45]

8.2. Φασματοσκοπία Υπερύθρου μετασχηματισμού Fourier (FTIR)

Η βασική αρχή της φασματοσκοπίας υπερύθρου 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 σαν συνάρτηση του μήκους κύματος ή της συχνότητας, λαμβάνεται αυτό που καλείται φάσμα απορρόφησης. Η απορροφημένη

ακτινοβολία αντιστοιχεί στην ενέργεια που απαιτείται για 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 υπέρυθη ακτινοβολία που απορροφάται από ένα μόριο σε συχνότητες μικρότερες των 100 cm^{-1} , μετατρέπεται σε ενέργεια μοριακής περιστροφής δεσμών (energy of molecular rotation). Αντίστοιχα η υπέρυθη ακτινοβολία που απορροφάται από ένα μόριο μεταξύ $10000\text{-}100 \text{ cm}^{-1}$ μετατρέπεται σε ενέργεια μοριακής δόνησης δεσμών (energy of molecular vibration).[46][47]



Εικόνα 8. 2 Μερικές επιτρεπτές μορφές δονήσεων και κάμψεων.[3]

Η συχνότητα ή το μήκος κύματος μιας απορρόφησης εξαρτώνται από τις σχετικές μάζες των ατόμων, τις σταθερές ισχύος δεσμών και τη γεωμετρία των ατόμων. Οι διάφορες θέσεις στο φάσμα IR χαρακτηρίζονται ως μονάδες μήκους κύματος, η μονάδα των οποίων είναι το cm^{-1} (κυματαριθμός).

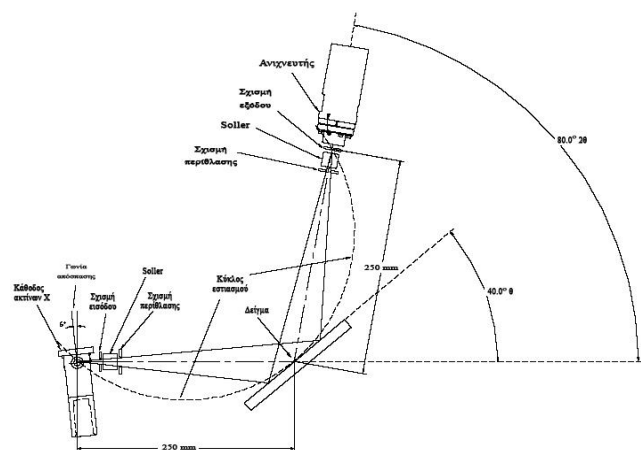
Υπάρχουν δύο τύποι μοριακών δονήσεων: η δόνηση τάσης και δόνηση κάμψης. Η δόνηση τάσης περιλαμβάνει τη ρυθμική κίνηση κατά μήκος του άξονα του δεσμού, έτσι ώστε η απόσταση μεταξύ των ατόμων να αυξάνεται ή να μειώνεται υπό μορφή ταλάντωσης. Κατά τη δόνηση κάμψης παρατηρείται είτε μεταβολή στη γωνία δύο δεσμών με κοινό άτομο, είτε 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.[48][49]

Η περιοχή εφαρμογών της φασματοσκοπίας υπέρυθρου έχει επεκταθεί σημαντικότερα τις τελευταίες δεκαετίες λόγω της ανάπτυξης της φασματοσκοπίας υπέρυθρου με μετασχηματισμό Fourier. Τούτο οφείλεται κατά κύριο λόγο στη θεαματική ανάπτυξη των υπολογιστών και στη βαθμιαία χρήση τους και σε θέματα φασματοσκοπίας. Στη συνήθη φασματοσκοπία υπέρυθρου η πολυχρωματική ακτινοβολία της πηγής αναλύεται με χρήση μονοχρώματα (πρίσμα ή φράγμα) και ανιχνεύεται κατά συχνότητες $\nu + \Delta\nu$, όπου το $\Delta\nu$ καθορίζεται από το εύρος των σχισμών του φωτόμετρου. Στη φασματοσκοπία υπέρυθρου με μετασχηματισμό Fourier (FTIR) το συμβολόμετρο Michelson, γνωστό ήδη από τα τέλη του 19ου αιώνα, αποτελεί το βασικό τμήμα της τεχνικής. Σύμφωνα με την αρχή των συμβολόμετρων Michelson, η ακτινοβολία αρχικά καταφθάνει σε κατανεμητή ακτινοβολίας και οι δύο επιμέρους ακτίνες συμβάλλουν μετά την ανάκλαση τους σε κάτοπτρο. Η ένταση της ακτινοβολίας μετράται συναρτήσει της μετατόπισης του

κατόπτρου. Τα λαμβανόμενα συμβολογραφήματα (interferogram) δίνουν πληροφορίες σχετικά με τη συνολική απορρόφηση της ακτινοβολίας του δείγματος ανά μήκος κύματος και ένταση ως άθροισμα Fourier όλων των φασματικών γραμμών.[46]

8.3. Περίθλαση ακτίνων X (XRD)

Οι ακτίνες-X ανήκουν στην κατηγορία των ηλεκτρομαγνητικών ακτινοβολιών και με μήκη κύματος μεταξύ 0,1 και 100 Å, βρίσκονται στο ηλεκτρομαγνητικό φάσμα μεταξύ της υπεριώδους και της ακτινοβολίας γ. Η παραγωγή τους είναι αποτέλεσμα της διέγερσης που υφίστανται άτομα ή ιόντα στερεών, η οποία και συνοδεύεται από εκπομπή ακτινοβολίας πολύ μικρού μήκους κύματος (ακτίνες-X).[50][52]



Εικόνα 8. 3 Σχηματική αναπαράσταση ενός γωνιομέτρου Bragg-Brentano δύο κύκλων $\theta:2\theta$ με κοινό άξονα στροφής, τον άξονα του περιθλασίμετρου[50]

Η λυχνία Coolidge είναι η πιο συχνά χρησιμοποιούμενη πηγή ακτίνων-X, οι οποίες και παράγονται όταν στην άνοδο προσπέσουν ηλεκτρόνια που προέρχονται από το πυρακτωμένο νήμα της καθόδου με πολύ μεγάλη ταχύτητα. Τα ηλεκτρόνια στη συνέχεια επιταχύνονται μέσα σε ηλεκτρικό πεδίο υψηλής διαφοράς δυναμικού μεταξύ καθόδου και ανόδου, ούτως ώστε να αποκτήσουν υψηλές ταχύτητες.

Η βασική εξίσωση που περιγράφει την ανάκλαση των ακτίνων-X από τους κρυστάλλους, είναι η εξίσωση Bragg:

$$n\lambda = 2d\eta\mu\theta \quad (\text{Εξίσωση 1})[53]$$

όπου n η τάξη ανάκλασης, λ το μήκος κύματος της χρησιμοποιούμενης ακτινοβολίας, d η ισοαπόσταση των δικτυωτών επιπέδων (hkl) του κρυστάλλου που προκαλούν την ανάκλαση και θ η γωνία Bragg, το συμπλήρωμα της γωνίας προσπτώσεως.[51][52][54]

8.4. Δυναμική Μηχανική Ανάλυση (DMA)

Η δυναμική μηχανική ανάλυση (DMA) είναι μια μη καταστρεπτική μηχανική μέθοδος που χαρακτηρίζει τις γραμμικές ιξωδοελαστικές ιδιότητες του υλικού μέσω της εφαρμογής μιας ταλαντούμενης τάσης ή παραμόρφωσης, η οποία επιλέγεται ώστε να βρίσκεται μέσα στην περιοχή γραμμικής ιξωδοελαστικής συμπεριφοράς (Linear Viscoelastic Region, LVR). Έτσι, η αύξηση της τάσης οδηγεί σε ανάλογη αύξηση στην παραμόρφωση και έτσι η σχέση μεταξύ της τάσης – παραμόρφωσης μπορεί και να παραμένει σταθερή, παρά τη διακύμανση της τάσης με το χρόνο. Τα πολυμερικά υλικά που χρησιμοποιούνται πιο συχνά για την παρασκευή βιοϋλικών και φαρμάκων είναι ιξωδοελαστικά. Ως εκ τούτου, μετά την εφαρμογή σταθερής τάσης, τα ιξωδοελαστικά συστήματα παρουσιάζουν μια χρονικά εξαρτώμενη, παραμόρφωση, χαρακτηριστική τόσο των ελαστικών υλικών όσο και των ιξώδων. Ειδικότερα, τα ιξωδοελαστικά συστήματα θα συνεχίσουν να παραμορφώνονται σε συνάρτηση με τον χρόνο (συμπεριφορά ερπυσμού) και μετά την εφαρμογή της σταθερής τάσης. Μετά την αφαίρεση της εφαρμοζόμενης τάσης, μερική από την ενέργεια θα χαθεί λόγω της τυρβώδους ροής της ενέργειας, ωστόσο μέρος αυτής αποθηκεύεται και χρησιμοποιείται για να επανέλθει μέρος από την παραμόρφωση που προκαλεί η τάση.[55]

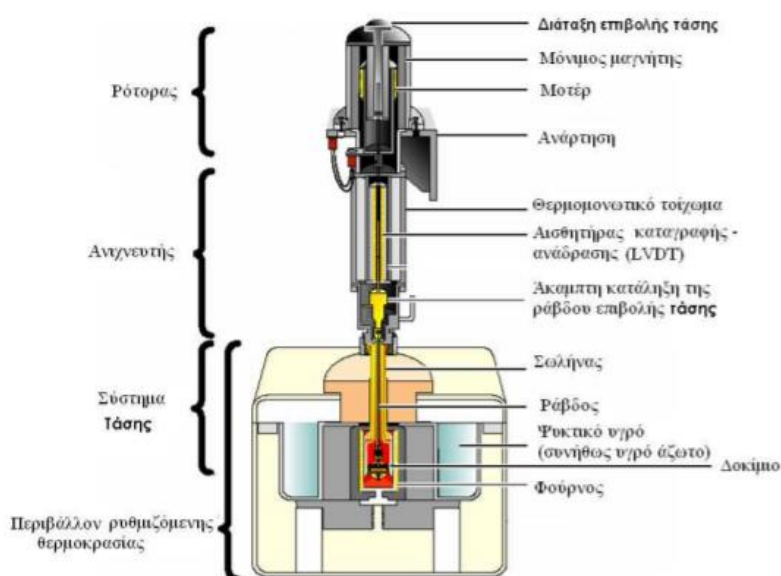
Η ιξωδοελαστική συμπεριφορά γενικά μπορεί να εξηγηθεί με την βοήθεια δύο ιδανικών υλικών: του ελαστικού στερεού και του ιξώδους υγρού. Ο νόμος του Hooke αναφέρει ότι ο λόγος της τάσης (σ) προς την παραμόρφωση (γ) για ιδανικό ελαστικό υλικό είναι σταθερός, μέχρι ένα ειδικό ελαστικό όριο. Η σταθερά αναλογίας ορίζεται ως μέτρο ελαστικότητας (Young modulus) (E).

Η συμπεριφορά των ελαστικών στερεών μπορεί να αναπαρασταθεί με τη βοήθεια ελατηρίου. Το φορτίο που εφαρμόζεται στο ελατήριο αντιπροσωπεύει την τάση και η επιμήκυνση την παραμόρφωση. Το φορτίο που ασκείται στο ελατήριο είναι ευθέως ανάλογο της παραμόρφωσης η οποία για ελαστικά υλικά είναι στιγμιαία και ανεξάρτητη του χρόνου. Με την αφαίρεση του φορτίου, η αποθηκευμένη ενέργεια ελαστικότητας χρησιμοποιείται για να επιστρέψει το ελατήριο στην αρχική του θέση η απόκριση αυτή είναι επίσης στιγμιαία. Αντίθετα, η απόκριση του ιξώδους υγρού είναι η ακριβώς αντίθετη από την συμπεριφορά του ελαστικού στερεού. Κατά συνέπεια τα υγρά θεωρούνται ότι ρέουν κατά την επίδραση τάσης και πως η ενέργεια που εφαρμόζεται στο σύστημα, χάνεται. Αυτή η συμπεριφορά ονομάζεται ιξώδης ροή και η αντίσταση στην παραμόρφωση είναι γνωστή ως ιξώδες. Σύμφωνα με τον νόμο του Νεύτωνα το ποσοστό της παραμόρφωσης είναι ευθέως ανάλογο της εξωτερικά εφαρμοζόμενης τάσης (σ). Η απόκριση ενός ιδανικού υγρού στην εφαρμοζόμενη τάση εξαρτάται από τον χρόνο. Εξαρτάται δηλαδή από τον ρυθμό παραμόρφωσης και όχι από την ίδια την παραμόρφωση.[56][57]

Το ακριβώς αντίθετο φαινόμενο παρατηρείται από την εφαρμογή τάσης ή παραμόρφωσης σε ιδανικό (Νευτώνειο) υγρό. Η σχέση μεταξύ τάσης παραμόρφωσης θα είναι και πάλι γραμμική αλλά θα παρατηρείται διαφορά. Ο λόγος του ορίου παραμόρφωσης προς το όριο ελαστικότητας είναι η εφαπτομένη της διαφοράς φάσης

δ μεταξύ τάσης και παραμόρφωσης και αποτελεί χαρακτηριστική παράμετρο της ικανότητας απόσβεσης του υλικού. Ονομάζεται δε συντελεστής απόσβεσης. Άμορφα πολυμερή παρουσιάζουν μια βασική χαλάρωση της δομής του υλικού η οποία είναι γνωστή ως θερμοκρασία υαλώδους μετάβασης (T_g) σε χαρακτηριστική για κάθε υλικό θερμοκρασία. Ορίζεται συνήθως ως η θερμοκρασία που παρατηρείται το μέγιστο της απόσβεσης ($\tan\delta$) ή του ορίου παραμόρφωσης. Η μετάβαση αυτή είναι αποτέλεσμα της κίνησης της κύριας ανθρακικής αλυσίδας του πολυμερούς (ραχοκοκαλιά). Είναι γνωστή και ως αμετάβαση. Στο σημείο αυτό το πολυμερές παύει να συμπεριφέρεται ως υαλώδες και αρχίζει να συμπεριφέρεται ως ελαστικό.[58][60]

Τα σύγχρονα όργανα της DMA αποτελούνται από έναν ρότορα, ένα περιβάλλον ελεγχόμενης ρύθμισης θερμοκρασίας, ένα σύστημα εφαρμογής τάσης, τον ανιχνευτή ανάδρασης και σύνδεση με Η/Υ. Ένα σκαρίφημα τυπικού οργάνου φαίνεται στην παρακάτω εικόνα.



Εικόνα 8. 4 Οργανολογία της συσκευής DMA.[3]

Τα σύγχρονα όργανα προσφέρουν διάφορες διατάξεις με υποδοχείς διαφορετικού μεγέθους και γεωμετρία για να δέχονται πολλών τύπων δοκίμια τα οποία από την στιγμή που η DMA δεν αποτελεί καταστροφική τεχνική, μπορούν να χρησιμοποιηθούν στη συνέχεια και σε περαιτέρω δοκιμασίες.

Καθώς ο συντελεστής απόσβεσης $\tan\delta$ εξαρτάται από την γεωμετρία του δοκιμίου, οι δοκιμές για τον χαρακτηρισμό υλικών μπορούν να ληφθούν με την βοήθεια υποδοχέα. Με την βοήθεια της συγκεκριμένης τεχνικής μπορούν να υπολογιστούν οι παρακάτω παράμετροι :

- Ποσοτικά όρια, για παράδειγμα όριο ελαστικότητας και όριο παραμόρφωσης.
- Θερμοκρασίες μετάπτωσης.
- Ρυθμός και βαθμός σκλήρυνσης πολυμερούς.
- Ποσοτικοποίησης της δημιουργίας πηκτής (sol-gel).
- Ιδιότητες απόσβεσης
- Αλληλεπιδράσεις συστατικών σύνθετων πολυμερών ή πολυμερούς μήτρας με δραστικές φαρμακευτικές ουσίες και βιοϋλικά[59][61]

8.5. Φασματοφωτομετρία (ELISA)

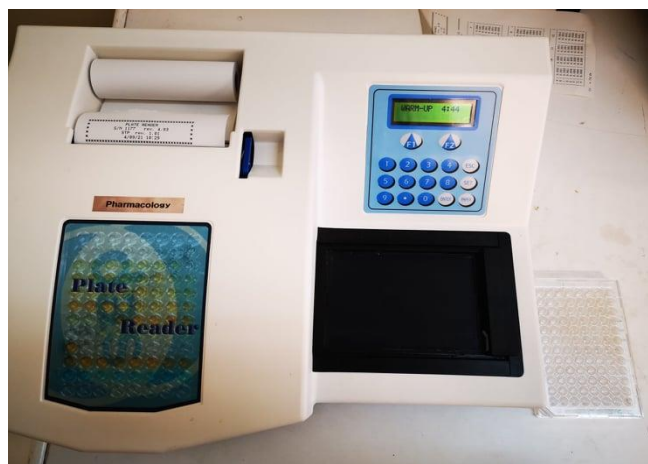
Το φασματοφωτόμετρο ELISA είναι μια ενζυμική ανοσοπροσοφητική δοκιμασία. Εν ολίγοις, είναι μια δοκιμή για την ανοσολογική απόκριση σε ξένα σώματα που επιτίθενται στο σώμα, όπως ιούς, βακτήρια και αλλεργιογόνα. Η δοκιμή γίνεται σε πλάκα ειδική για το φασματοφωτόμετρο ELISA, γνωστή και ως πλάκα 96 θέσεων ή μικροπλάκα. Ο αναγνώστης ELISA έχει την δυνατότητα να διαβάσει το πιάτο και να μπορεί να δώσει αποτελέσματα ακριβείας.

Ένα φασματοφωτόμετρο ELISA μετρά και ποσοτικοποιεί τις χρωματικές διαφορές στα 12 κελιά της πλάκας. Το ELISA ή οι συσκευές ανάγνωσης μικροπλακών. εκπέμπουν φως σε ένα συγκεκριμένο μήκος κύματος και μετρά την ποσότητα φωτός που απορροφάται και ανακλάται από ένα αντικείμενο όπως μια πρωτεΐνη. Ένα φασματοφωτόμετρο μετρά το υπεριώδες και το ορατό φως.

Επιπλέον, οι συσκευές ανάγνωσης πλακών ELISA μπορούν επίσης να μετρήσουν τον φθορισμό και τη φωταύγεια. Οι χημικές βαφές φθορίζουν ή εκπέμπουν ένα χρώμα ή ένα μήκος κύματος όταν εκτίθενται στο φως. Η ποσότητα της ανάκλασης, της απορρόφησης και του χρώματος προσδιορίζουν και μετρούν την ποσότητα μιας ουσίας.

Τα πλεονεκτήματα του φασματοφωτόμετρου ELISA είναι ότι απαιτούν λιγότερο δείγμα ανά μέτρηση. Σε ένα φασματοφωτόμετρο ή συσκευή ανάγνωσης πλακών ELISA, το δείγμα πρέπει να διαλυθεί σε διάλυμα. Ένα φασματοφωτόμετρο απαιτεί από 400 μικρολίτρα έως τέσσερα χιλιοστόλιτρα, ανάλογα με τον κατασκευαστή και το μοντέλο. Ένας αναγνώστης πλακών ELISA χρειάζεται περίπου δύο έως 100 μικρολίτρα. Οι συσκευές ανάγνωσης πλακών ELISA χρησιμοποιούν πολύ λιγότερο δείγμα για να λάβουν ένα αποτέλεσμα.

Οι συσκευές ανάγνωσης πλακών ELISA μετρούν περισσότερα δείγματα σε μικρότερο χρονικό διάστημα. Ένα φασματοφωτόμετρο μετρά ένα έως έξι δείγματα κάθε φορά. Συνήθως, μια πλάκα ELISA μετρά 96 κελιά σε ισοδύναμο χρονικό διάστημα.[62]



Εικόνα 8. 5 Φασματοφωτόμετρο (ELISA)

II. Πειραματικό Μέρος

Κεφάλαιο 9^ο

Πειραματική Διαδικασία

9.1. Υλικά

- Υδρολυμένη Ζελατίνη Ιχθύων, υψηλής καθαρότητα, της εταιρίας SIGMA
- Καθαρή Χιτοζάνη, χαμηλού μοριακού βάρους, της εταιρίας SIGMA
- Γλυκερόλη διπλά απεσταγμένη, της εταιρίας SERVA
- Οξικό οξύ
- Υδροχλωρική Τετρακυκλίνη (TH), της εταιρίας SIGMA

9.2. Σύνθεση Μεμβρανών Χιτοζάνης και Ζελατίνης Ιχθύων.

9.2.1. Σύνθεση Μεμβρανών CH-0.5FG.

Για την σύνθεση της μεμβράνης χιτοζάνη και 0.5 ζελατίνη ιχθύων, παρασκευάστηκε σε ποτήρι ζέσεως των 100 ml υδατικό διάλυμα με 25 ml δισαπεσταγμένο νερό και 0,5 gr ζελατίνης ιχθύων σε αναλογία 2 % w/v. Το υδατικό διάλυμα αφήνεται υπό ανάδευση για 9 λεπτά μέχρι την πλήρη ομογενοποίηση των συστατικών χωρίς θέρμανση. Έπειτα προστέθηκε 0,5 gr χιτοζάνης με σύσταση 2 % w/v και στάγδην έγινε η προσθήκη του οξικού οξέος σύστασης 4 % v/v και έγινε ανάδευση για περίπου 30 λεπτά. Αφού έγινε πλήρης ανάμιξη μεταφέρθηκε σε λουτρό για να πετύχουμε την πλήρη διαύγεια για 10 λεπτά και έπειτα έγινε προσθήκη 0,5 gr γλυκερόλης με σύσταση 2% w/v και αφέθηκε ξανά για ανάδευση για περίπου 10 λεπτά.

Το ιζώδες διάλυμα μεταφέρεται ξανά σε λουτρό για την πλήρη ομογενοποίησή του, εφόσον παρατηρήσουμε στα διαλύματα ότι υπάρχει πλήρης ομογενοποίηση μπορεί να σταματήσει η ανάδευση. Αφού έγινε η παραγωγή του υδατικού διαλύματος χιτοζάνης-ζελατίνης ιχθύων, έγινε προσθήκη αυτού σε καλούπια σχήματος T-bone, επίσης έγινε προσθήκη αυτού σε καλούπια σχήματος τρυβλίου Petri σε θερμοκρασία δωματίου ώστε να στεγνώσει και να δημιουργηθεί η μεμβράνη.[63]



Εικόνα 9. 1 Εισαγωγή 0,5g FG σε ποτήρι ζέσεως των 100ml.



Εικόνα 9. 2 Αφού έγινε η παραγωγή του υδατικού διαλύματος χιτοζάνης-ζελατίνης ιχθύων, έγινε προσθήκη αυτού σε καλούπια σχήματος τρυβλίου Petri (αριστερά) - Αφού έγινε η παραγωγή του υδατικού διαλύματος χιτοζάνης-ζελατίνης ιχθύων, έγινε προσθήκη αυτού σε καλούπια σχήματος T-bone. (δεξιά).

9.2.2. Σύνθεση Μεμβρανών CH-1 FG.

Για την σύνθεση της μεμβράνης χιτοζάνη και 1g ζελατίνη ιχθύων, παρασκευάστηκε σε ποτήρι ζέσεως των 100 ml υδατικό διάλυμα με 25 ml δισαπεσταγμένο νερό και 1 gr ζελατίνης ιχθύων σε αναλογία 4 % w/v. Το υδατικό διάλυμα αφήνεται υπό ανάδευση για 12 λεπτά μέχρι την πλήρη ομογενοποίηση των συστατικών χωρίς θέρμανση. Έπειτα προστέθηκε 0,5 gr χιτοζάνης με σύσταση 2 % w/v και στάγδην έγινε η προσθήκη του οξικού οξέος σύστασης 4 % v/v και έγινε ανάδευση για περίπου 30 λεπτά. Αφού έγινε πλήρης ανάμιξη μεταφέρθηκε σε λουτρό για να πετύχουμε την πλήρη διαύγεια για 10 λεπτά και έπειτα έγινε προσθήκη 0,5 gr γλυκερόλης με σύσταση 2% w/v και αφέθηκε ξανά για ανάδευση για περίπου 10 λεπτά. Το ιξώδες διάλυμα μεταφέρεται ξανά σε λουτρό για την πλήρη ομογενοποίησή του. Τέλος μεταφέρεται σε πλαστικά τριβλία Petri σε θερμοκρασία δωματίου ώστε να στεγνώσει και να δημιουργηθεί η μεμβράνη.[63]

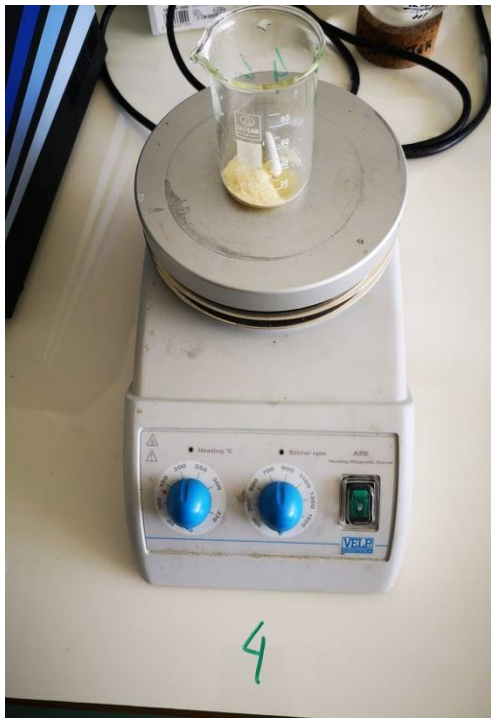


Εικόνα 9. 2 Εισαγωγή 1g FG σε ποτήρι ζέσεως των 100ml (αριστερά) προσθήκη αυτού σε τριβλία Petri. (δεξιά)

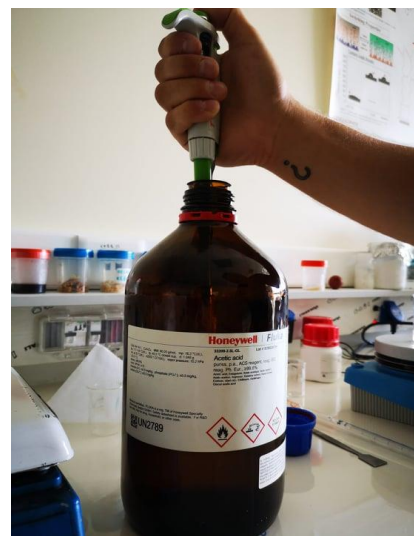
9.2.3. Σύνθεση Μεμβρανών CH-2FG.

Για την σύνθεση της μεμβράνης χιτοζάνη και 2 g ζελατίνη ιχθύων, παρασκευάστηκε σε ποτήρι ζέσεως των 100 ml υδατικό διάλυμα με 25 ml δισαπεσταγμένο νερό και 2 gr ζελατίνης ιχθύων σε αναλογία 8 % w/v. Το υδατικό διάλυμα αφήνεται υπό ανάδευση για 15 λεπτά μέχρι την πλήρη ομογενοποίηση των συστατικών χωρίς θέρμανση. Έπειτα προστέθηκε 0,5 gr χιτοζάνης με σύσταση 2 % w/v και στάγδην έγινε η προσθήκη του οξικού οξέος σύστασης 4 % v/v και έγινε ανάδευση για περίπου 30 λεπτά. Αφού έγινε πλήρης ανάμιξη μεταφέρθηκε σε λουτρό για να πετύχουμε την πλήρη διαύγεια για 10 λεπτά και έπειτα έγινε προσθήκη 0,5 gr γλυκερόλης με σύσταση 2% w/v και αφέθηκε για ανάδευση για περίπου 10 λεπτά. Το ιξώδες διάλυμα μεταφέρεται ξανά σε λουτρό για την πλήρη ομογενοποίησή του.

Τέλος μεταφέρεται σε πλαστικά τριβλία Petri σε θερμοκρασία δωματίου ώστε να στεγνώσει και να δημιουργηθεί η μεμβράνη.[63]



.Εικόνα 9. 3 Εισαγωγή 2g FG σε ποτήρι ζέσεως των 100ml (αριστερά) . Εισαγωγή αποιονισμένου νερού (δεξιά)



Εικόνα 9.5 Εισαγωγή οξικού οξέος.

9.2.4. Σύνθεση Μεμβρανών CH-4 FG.

Για την σύνθεση της μεμβράνης χιτοζάνης και 4 g ζελατίνη ιχθύων, παρασκευάστηκε σε ποτήρι ζέσεως των 100 ml υδατικό διάλυμα με 25 ml δισαπεσταγμένο νερό και 4 gr ζελατίνης ιχθύων σε αναλογία 16 % w/v. Το υδατικό διάλυμα αφήνεται υπό ανάδευση για 22 λεπτά μέχρι την πλήρη ομογενοποίηση των συστατικών χωρίς θέρμανση. Έπειτα προστέθηκε 0,5 gr χιτοζάνης με σύσταση 2 % w/v και στάγδην έγινε η προσθήκη του οξικού οξέος σύστασης 4 % v/v και έγινε ανάδευση για περίπου 30 λεπτά. Αφού έγινε πλήρης ανάμιξη μεταφέρθηκε σε λουτρό για να πετύχουμε την πλήρη διαύγεια για 10 λεπτά και έπειτα έγινε προσθήκη 0,5 gr γλυκερόλης με σύσταση 2% w/v και αφέθηκε για ανάδευση για περίπου 10 λεπτά. Το ιζώδες διάλυμα μεταφέρεται ξανά σε λουτρό για την πλήρη ομογενοποίησή του. Τέλος μεταφέρεται σε πλαστικά τριβλία Petri σε θερμοκρασία δωματίου ώστε να στεγνώσει και να δημιουργηθεί η μεμβράνη.[63]



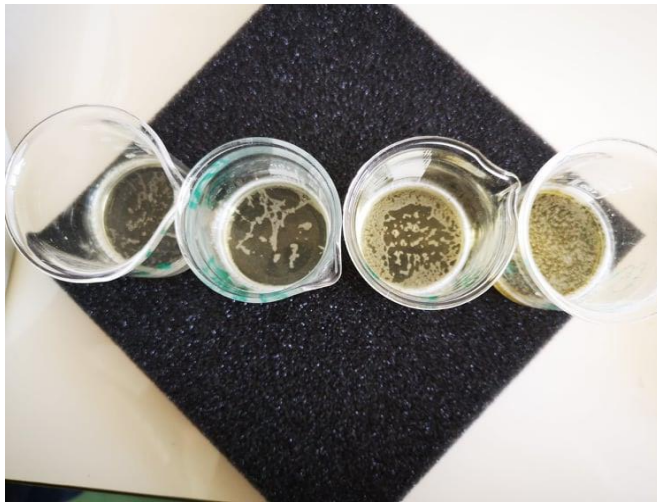
Εικόνα 9. 4 Εισαγωγή 4g FG σε ποτήρι ζέσεως των 100ml.(αριστερά)- Λουτρό υπερήχων, για την πλήρη διαλυτοποίηση τους. (δεξιά)



Εικόνα 9. 7 Εισαγωγή γλυκερόλης σε ποσότητα με πιπέτα.



.Εικόνα 9. 8 Οι παρασκευές ζελατίνης για τις αντίστοιχες συγκεντρώσεις ζελατίνης. Ανάλογα με την συγκέντρωση ζελατίνης παρατηρούμε διαφοροποίηση στο χρώμα των υδατικών διαλυμάτων που παρασκευάστηκαν μετά την πλήρη ανάδευσή της ζελατίνης.



Εικόνα 9. 9 Τελική εικόνα όλων των υδατικών διαλυμάτων χιτοζάνης ζελατίνης ιχθύων .



Εικόνα 9. 10 Τελική εικόνα όλων των ζελατινών των διαφορετικών συστάσεων ζελατίνης ιχθύων σε σχήμα T-bone και τριβλίων Petri.

CH- 0,5FG- Gly	CH- 1FG- Gly	CH- 2FG- Gly	CH- 4FG- Gly
2% w/v Χιτοζάνη	2% w/v Χιτοζάνη	2% w/v Χιτοζάνη	2% w/v Χιτοζάνη
4% v/v Οξικού Οξέος	4% v/v Οξικού Οξέος	4% v/v Οξικού Οξέος	4% v/v Οξικού Οξέος
2% w/v Γλυκερόλη	2% w/v Γλυκερόλη	2% w/v Γλυκερόλη	2% w/v Γλυκερόλη
2% w/v Ζελατίνης Ιχθύων	4% w/v Ζελατίνης Ιχθύων	8% w/v Ζελατίνης Ιχθύων	16% w/v Ζελατίνης Ιχθύων

Πιν. 5 Σύσταση μεμβρανών με διαφοροποίηση ζελατίνης ιχθύων. [63]

Μεμβράνη	CH (g)	FG (g)	DI (ml)	Οξικό οξύ (ml)	GLY (ml)
0,5CH-0,5FG	0,5	0,5	25	1	-
0,5CH-1FG	0,5	1	25	1	-
0,5CH-2FG	0,5	2	25	1	-
0,5CH-4FG	0,5	4	25	1	-
0,5CH-0,5FG-1GLY	0,5	0,5	25	1	1
0,5CH-1FG-1GLY	0,5	1	25	1	1
0,5CH-2FG-1GLY	0,5	2	25	1	1
0,5CH-4FG-1GLY	0,5	4	25	1	1

Πιν. 7. Συστατικά μεμβρανών με την προσθήκη γλυκερόλης.[63]

9.2.5. Επιλογή Μεμβράνης

Πριν προχωρήσουμε στην σύνθεση της μεμβράνης για την ενσωμάτωση υδροχλωρικής τετρακυκλίνης έγινε επιλογή μεταξύ των τεσσάρων αρχικών μεμβρανών. Η πρώτη σύνθεση μεμβράνης η οποία περιέχει 0,5gr ζελατίνης ιχθύων κρίνεται καταλληλότερη για χρήση και αυτό οφείλεται στον μηχανισμό σχηματισμού υδροπηκτής. Αυτό συμβαίνει διότι μεταξύ ζελατίνης ιχθύων και χιτοζάνης υπάρχουν δεσμοί υδρογόνου και ηλεκτροστατικές αλληλεπιδράσεις. Ο βασικός μηχανισμός αφορά τις αλληλεπιδράσεις μεταξύ των αμινομάδων της χιτοζάνης και των καρβοξυλομάδων της ζελατίνης. Ακόμα υπάρχουν αλληλεπιδράσεις μεταξύ των πλευρικών πολυμερικών αλυσίδων οι οποίες διαθέτουν καρβονυλικές, υδροξυλικές ομάδες αλλά και αμινομάδες. Αυτές οι ισχυρές θετικές και αρνητικές αλληλεπιδράσεις από την μια πλευρά διευκολύνουν τον σχηματισμό πολλαπλών συμπλόκων με αποτέλεσμα μια καλή ανάμιξη της χιτοζάνης και της ζελατίνης.

Τέλος λόγω του ρυθμού αποδόμησης της μεμβράνης που θα εξετάσουμε περαιτέρω καταλήξαμε σε αυτή την επιλογή μεμβράνης διότι πέραν του καλού σχηματισμού δεσμών έχει πιο αργή αποδόμηση από τις υπόλοιπες.[44]

9.3. 1^η Δοκιμή -Σύνθεση μεμβρανών με ενσωμάτωση TH

9.3.1.Σύνθεση CH-FG-Control

Αρχικά ζυγίσθηκαν σε ζυγό ακριβείας 0,5gr χιτοζάνης (CH) και 0,5gr ζελατίνης ιχθύων (FG), έπειτα σε ποτήρι ζέσεως προστέθηκε η μισή ποσότητα από τα 24ml του απιονισμένου νερού και η ποσότητα της ζελατίνης με αργό ρυθμό και αφήνεται για ανάδευση για 15 λεπτά. Εν συνεχεία προσθέτουμε την υπόλοιπη ποσότητα απιονισμένου νερού και με επίσης αργό ρυθμό προσθέτουμε την χιτοζάνη παρατηρώντας μια σταδιακή αύξηση του ιξώδους του διαλύματος. Έπειτα με μια αυτόματη πιπέτα προστίθεται στάγδην 1ml οξικού οξέος και το διάλυμα αφήνεται για ανάδευση 30 λεπτών και ύστερα από αυτό το χρονικό διάστημα γίνεται στάγδην η προσθήκη 1ml γλυκερόλης ώστε να αφηθεί για τελική ανάδευση 2,5 ωρών.

Τέλος μεταφέρουμε το διάλυμα σε τρυβλία Petri διάστασης 60mm για τουλάχιστον δύο με τρεις ημέρες ώστε να εξατμιστεί πλήρως ο διαλύτης και να παραλάβουμε μια μεμβράνη. Ο χρόνος μπορεί να μεταβάλλεται ανάλογα με τις συνθήκες θερμοκρασίας και υγρασίας στον χώρο.[63]

9.3.2. Σύνθεση CH-FG-TH

Σε αυτή την περίπτωση συντέθηκαν τέσσερις μεμβράνες με την ίδια σύσταση ποσοτήτων χιτοζάνης και ζελατίνης αλλά με μόνη διαφοροποίηση την αναλογική αυξανόμενη προσθήκη υδροχλωρικής τετρακυκλίνης.

Σε τέσσερα διαφορετικά ποτήρια ζέσεως προστέθηκαν στο καθένα ξεχωριστά η μισή ποσότητα από τα 24 ml απιονισμένου νερού και σταδιακά 0,5gr ζελατίνης ιχθύων για ανάδευση 15 λεπτών. Έπειτα προσθέτουμε την υπόλοιπη ποσότητα απιονισμένου νερού και σε κάθε ποτήρι ζέσεως προσθέτουμε διαδοχικά μια από τις επόμενες ποσότητες υδροχλωρικής τετρακυκλίνης : 0,00036gr, 0,00074gr, 0,00114gr και 0,0029gr TH και αφήνεται για ανάδευση λίγων λεπτών. Εν συνεχεία προστέθηκαν σταδιακά σε κάθε ποτήρι ζέσεως ξεχωριστά 0,5gr χιτοζάνης με αργό ρυθμό και στάγδην 1ml οξικού οξέος και αφήνονται τα διαλύματα για ανάδευση 30 λεπτών. Κατόπιν, γίνεται και στα τέσσερα διαλύματα προσθήκη 1ml γλυκερόλης, επίσης στάγδην, και αφήνονται ξανά για ανάδευση 2,5 ωρών.

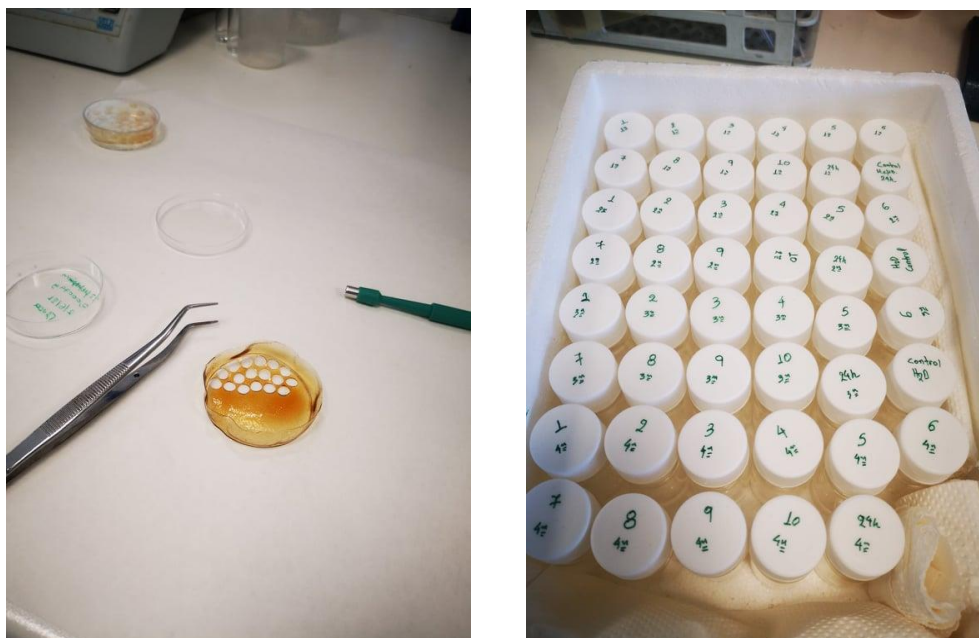
Τέλος μεταφέρονται τα τέσσερα διαλύματα σε τέσσερα, αντίστοιχα, τρυβλία Petri διαμέτρου 60mm και αφήνονται περίπου για δύο με τρεις ημέρες ώστε να γίνει πλήρης εξάτμιση του διαλύτη. Ο χρόνος, επίσης, μπορεί να διαφέρει ανάλογα με τις συνθήκες θερμοκρασίας και υγρασίας του εκάστοτε χώρου εφόσον η εξάτμιση γίνεται χωρίς την ενίσχυση από κάποιον εξωτερικό παράγοντα ή μέσο.[63]



Εικόνα 9. 11 Τελική μορφή των μεμβρανών μέσα στα τρυβλία Petri πριν την χρήση τους.

9.3.3. Μελέτη Αποδέσμευσης *in vitro*

Κατά την προετοιμασία των δειγμάτων για την μελέτη αποδέσμευσης μέσω φασματοφωτομετρίας, αφαιρέθηκαν με προσοχή οι μεμβράνες από τα τρυβλία Petri και έπειτα κόπηκαν σε κυκλικό ,ομοιόμορφο σχήμα με την βοήθεια ειδικού κοπτήρα όπως φαίνεται στην εικόνα παρακάτω.



Εικόνα 9. 12 Μεμβράνη κατά την διαδικασία κοπής της σε δείγματα με την βοήθεια ειδικού κοπτήρα. (αριστερά) - Γυάλινα φιαλίδια για εμφύπτιση των δειγμάτων των μεμβρανών. (δεξιά)

Εν συνεχεία σε 55 γυάλινα φιαλίδια προστέθηκε ποσότητα 5ml δισαπεσταγμένου νερού. Σε αυτά έγινε εμφύπτιση των δειγμάτων για την κάθε μια από τις πέντε μεμβράνες που συντέθηκαν. Από την ώρα που εισαγάγαμε το δείγμα της μεμβράνης στο φιαλίδιο που περιέχει δισαπεσταγμένο νερό μετρήθηκε χρόνος εμφύπτισης από μισή ώρα έως πέντε ώρες ανά μισή ώρα και μια ακόμη εμφύπτιση για 24 ώρες, δηλαδή σε κάθε μεμβράνη αντιστοιχεί σε 11 δείγματα.

Τα τελικά υδατικά διαλύματα φαίνονται στην εικόνα παρακάτω και μετρήθηκαν με την μέθοδο της φασματοφωτομετρίας NanoDrop ώστε να μπορέσουμε να λάβουμε την απελευθέρωση υδροχλωρικής τετρακυκλίνης σε αυτά. Τα δείγματα μετρήθηκαν με φασματοφωτόμετρο NanoDrop χωρίς όμως να λάβουμε αξιόπιστα αποτελέσματα απελευθέρωσης υδροχλωρικής τετρακυκλίνης. Ενώ μπορούσαμε να εντοπίσουμε μέσω της φασματοφωτομετρίας το διάλυμα το οποίο περιείχε την καθαρή υδατοδιαλυτή υδροχλωρική τετρακυκλίνη τα υπόλοιπα δείγματα είχαν μηδενική απελευθέρωση Αυτό μπορεί να οφείλεται είτε στην μικρή ποσότητα φαρμάκου η οποία χρησιμοποιήθηκε είτε στην μεγάλη ποσότητα δισαπεσταγμένου νερού στην οποία έγιναν οι εμφύπτισεις των δειγμάτων. Γι' αυτόν τον λόγο τα δείγματα και κα επέκταση τα αποτελέσματα απορρίφθηκαν και έγινε εκ νέου σύνθεση μεμβρανών.

9.4. 2^η Δοκιμή -Σύνθεση μεμβρανών με ενσωμάτωση TH

9.4.1. Σύνθεση CH-FG-TH και Σύνθεση CH-FG-Control

Σε αυτή την περίπτωση συντέθηκαν ξανά τέσσερις μεμβράνες με την ίδια σύσταση ποσοτήτων χιτοζάνης και ζελατίνης αλλά με μόνη διαφοροποίηση την αναλογική αυξανόμενη προσθήκη υδροχλωρικής τετρακυκλίνης. Οι ποσότητες φαρμάκων διπλασιάστηκαν για κάθε μια σύνθεση και ακολουθήθηκε η ίδια ακριβώς διαδικασία.

Σε τέσσερα διαφορετικά ποτήρια ζέσεως προστέθηκαν στο καθένα ξεχωριστά η μισή ποσότητα από τα 24 ml απιονισμένου νερού και σταδιακά 0,5gr ζελατίνης ιχθύων για ανάδευση 15 λεπτών. Έπειτα προσθέτουμε την υπόλοιπη ποσότητα απιονισμένου νερού και σε κάθε ποτήρι ζέσεως προσθέτουμε διαδοχικά μια από τις επόμενες ποσότητες υδροχλωρικής τετρακυκλίνης : 0,0029gr, 0,0058gr, 0,0116gr και 0,0232gr TH και αφήνεται για ανάδευση λίγων λεπτών. Εν συνεχεία προστέθηκαν σταδιακά σε κάθε ποτήρι ζέσεως ξεχωριστά 0,5gr χιτοζάνης με αργό ρυθμό και στάγδην 1ml οξικού οξέος και αφήνονται τα διαλύματα για ανάδευση 30 λεπτών. Κατόπιν, γίνεται και στα τέσσερα διαλύματα προσθήκη 1ml γλυκερόλης, επίσης στάγδην, και αφήνονται ξανά για ανάδευση 2,5 ωρών.

Τέλος μεταφέρονται τα τέσσερα διαλύματα σε τέσσερα, αντίστοιχα, τρυβλία Petri διαμέτρου 60mm και αφήνονται περίπου για δύο με τρεις ημέρες ώστε να γίνει πλήρης εξάτμιση του διαλύτη. Ο χρόνος, επίσης, μπορεί να διαφέρει ανάλογα με τις συνθήκες θερμοκρασίας και υγρασίας του εκάστοτε χώρου εφόσον η εξάτμιση γίνεται χωρίς την ενίσχυση από κάποιον εξωτερικό παράγοντα ή μέσο.

Η διαδικασία σύνθεσης της μεμβράνης control, δηλαδή εκείνης δεν περιέχει υδροχλωρική τετρακυκλίνη παραμένει ακριβώς ίδια με την σύνθεση της πρώτης δοκιμής.[63]



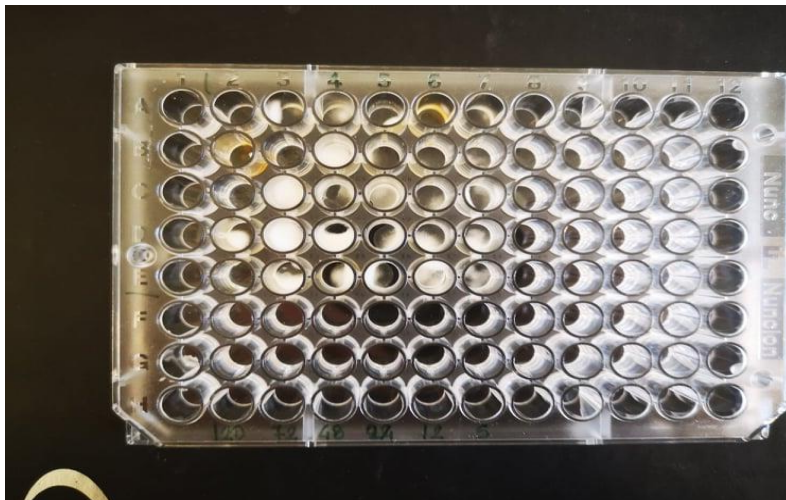
Εικόνα 9. 13 Χρωματική διαφοροποίηση των μεμβρανών υδροχλωρικής τετρακυκλίνης.

9.4.2. Μελέτη Αποδέσμευσης *in vitro*

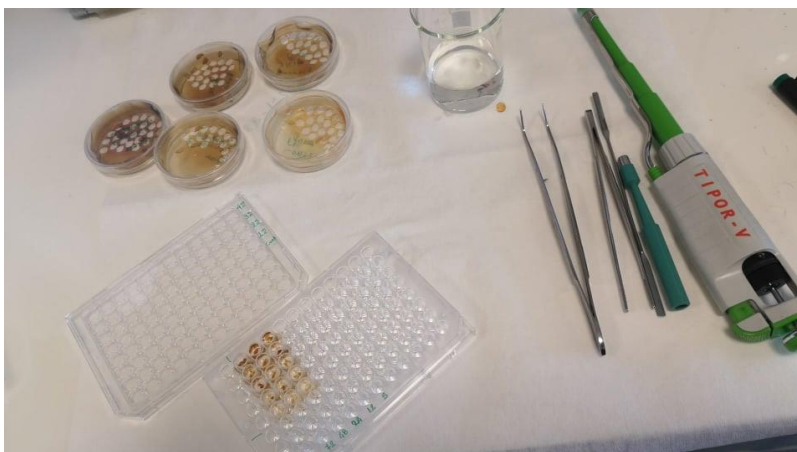
Τα δείγματα κόπηκαν ξανά στην ίδια διάσταση με την προηγούμενη δοκιμή και αυτή την φορά τα δείγματα προστέθηκαν σε ειδικό πιάτο για χρήση του μηχανήματος ELISA. Σε αυτή την δοκιμή η ποσότητα του διασπεσταγμένου νερού ήταν 0,02 ml και αυξήθηκε ο χρόνος της εμφάνισης. Τα δείγματα εμφαπτίστηκαν για 30 λεπτά έως 5 ώρες με βήμα μισής ώρα για κάθε μέτρηση και έπειτα για 12, 24, 48, 72 και 120 ώρες για τα δείγματα της κάθε μεμβράνης.

Τα τελικά υδατικά διαλύματα φαίνονται στην εικόνα παρακάτω και μετρήθηκαν με την μέθοδο της φασματοφωτομετρίας ELISA ώστε να μπορέσουμε να λάβουμε την απελευθέρωση υδροχλωρικής τετρακυκλίνης σε αυτά.

Σε αυτήν την δοκιμή δεν έγινε λήψη αποτελεσμάτων μέσω φασματοφωτόμετρου ELISA διότι τα δείγματα ανέπτυξαν μούχλα πριν προλάβουν να ολοκληρώσουν τον κύκλο των εμφαπτίσεων και έτσι δεν κατέστη δυνατόν να παρθούν αξιόπιστες μετρήσεις. Το πρόβλημα ίσως να έγκειται στην χρήση του διασπεσταγμένου νερού είτε σε κάποια επιμόλυνση των αναλώσιμων που χρησιμοποιήθηκαν. Γι' αυτόν τον λόγο ακολούθησε εκ νέου δοκιμή κατά την οποία θα γίνει αντικατάσταση του διασπεσταγμένου νερού με φυσιολογικό ορό και χρήση αποστειρωμένων αναλώσιμων ειδών. Έτσι έγινε μια πρώτη μελέτη κατά την οποία χρησιμοποιήθηκαν αποστειρωμένα έπεντορφ για να αποφευχθεί η επιμόλυνση όπως φαίνεται παρακάτω.



Εικόνα 9. 14 Plate ELISA με μούχλα λόγω επιμόλυνσης.



Εικόνα 9. 15 Πειραματική διαδικασία της εμφαπτίσης των δειγμάτων μετά την κοπή τους.

9.5. 3^η Δοκιμή -Σύνθεση μεμβρανών με ενσωμάτωση TH

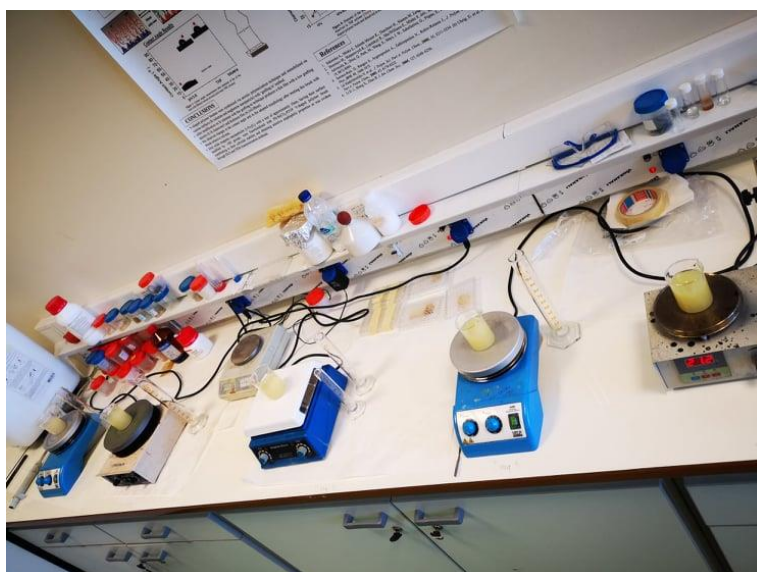
9.5.1. Σύνθεση CH-FG-TH και Σύνθεση CH-FG-Control

Σε αυτή την προσέγγιση συντέθηκαν τέσσερις μεμβράνες με ενσωμάτωση υδροχλωρικής τετρακυκλίνης και μια μεμβράνη χωρίς την ενσωμάτωση φαρμάκου (Control). Η διαφοροποίηση σε αυτή την σύνθεση έγκειται στο γεγονός ότι οι ποσότητες ζελατίνης ιχθύων, χιτοζάνης, γλυκερόλης, οξικού οξέος, υδροχλωρικής τετρακυκλίνης και δισαπεσταγμένου νερού τριπλασιάστηκαν ώστε να παραλάβουμε μεγαλύτερη ποσότητα μεμβράνης και κατ' επέκταση και περισσότερα δείγματα.

Σε τέσσερα διαφορετικά ποτήρια ζέσεως προστέθηκαν στο καθένα ξεχωριστά η μισή ποσότητα από τα 72 ml απιονισμένου νερού και σταδιακά 1,5gr ζελατίνης ιχθύων για ανάδευση 15 λεπτών. Έπειτα προσθέτουμε την υπόλοιπη ποσότητα απιονισμένου νερού και σε κάθε ποτήρι ζέσεως προσθέτουμε διαδοχικά μια από τις επόμενες ποσότητες υδροχλωρικής τετρακυκλίνης : 0,0087gr, 0,0174gr, 0,0348gr και 0,0696gr TH και αφήνεται για ανάδευση λίγων λεπτών. Εν συνεχεία προστέθηκαν σταδιακά σε κάθε ποτήρι ζέσεως ξεχωριστά 1,5gr χιτοζάνης με αργό ρυθμό και στάγδην 3ml οξικού οξέος και αφήνονται τα διαλύματα για ανάδευση 30 λεπτών. Κατόπιν, γίνεται και στα τέσσερα διαλύματα προσθήκη 3ml γλυκερόλης, επίσης στάγδην, και αφήνονται ξανά για ανάδευση 2,5 ωρών.

Τέλος μεταφέρονται τα τέσσερα διαλύματα σε τέσσερα, αντίστοιχα, τρυβλία Petri διαμέτρου 60mm και αφήνονται περίπου για δύο με τρεις ημέρες ώστε να γίνει πλήρης εξάτμιση του διαλύτη. Ο χρόνος, επίσης, μπορεί να διαφέρει ανάλογα με τις συνθήκες θερμοκρασίας και υγρασίας του εκάστοτε χώρου εφόσον η εξάτμιση γίνεται χωρίς την ενίσχυση από κάποιον εξωτερικό παράγοντα ή μέσο.

Η διαδικασία σύνθεσης της μεμβράνης control, δηλαδή εκείνης δεν περιέχει υδροχλωρική τετρακυκλίνη παραμένει ακριβώς ίδια με την σύνθεση της πρώτης δοκιμής επίσης με τριπλασιασμό όλων των συστατικών όπως προαναφέρθηκε.[63]



Εικόνα 9. 16
Πειραματική διαδικασία
σύνθεσης των
μεμβρανών.



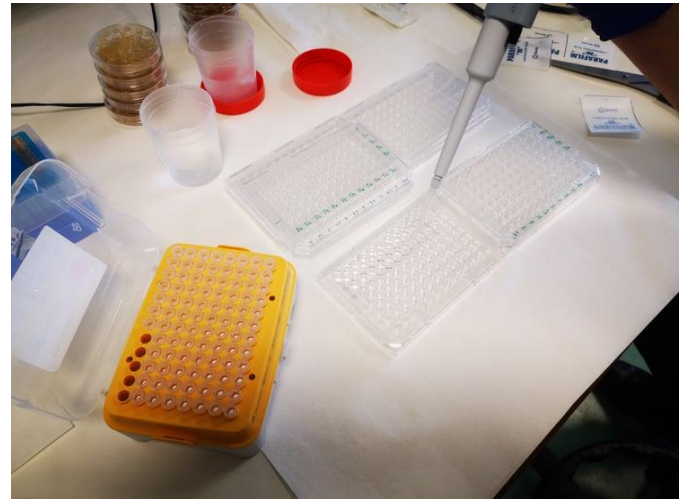
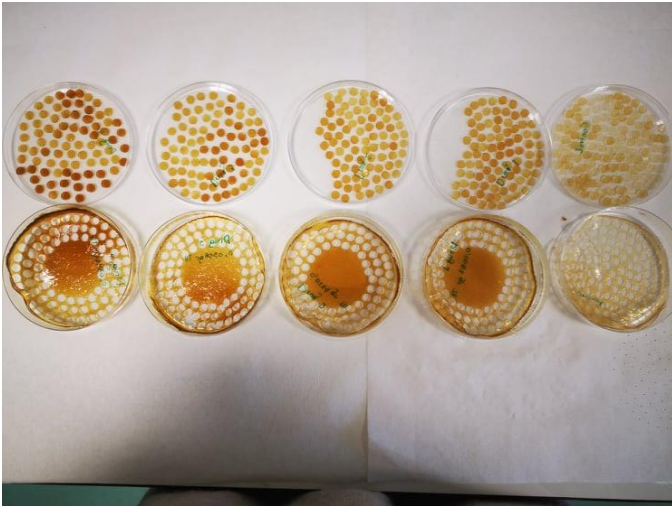
Εικόνα 9.17. Χρωματική αναπαράσταση των μεμβρανών με αυξανόμενη ποσότητα υδροχλωρικής τετρακυκλίνης.

9.5.2. Μελέτη Αποδέσμευσης *in vitro*

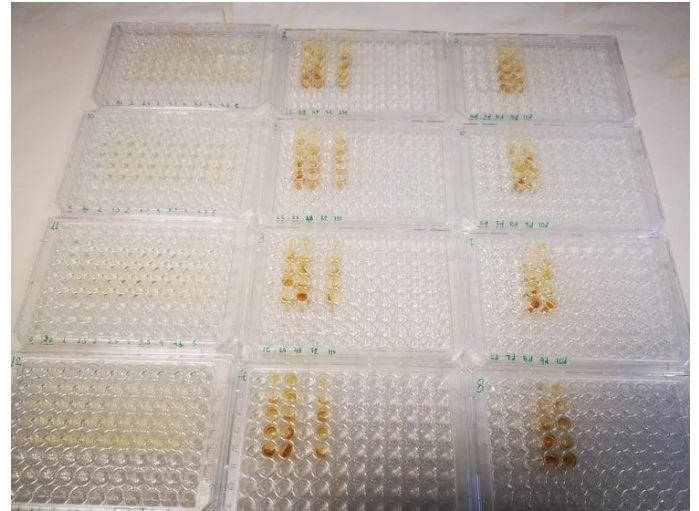
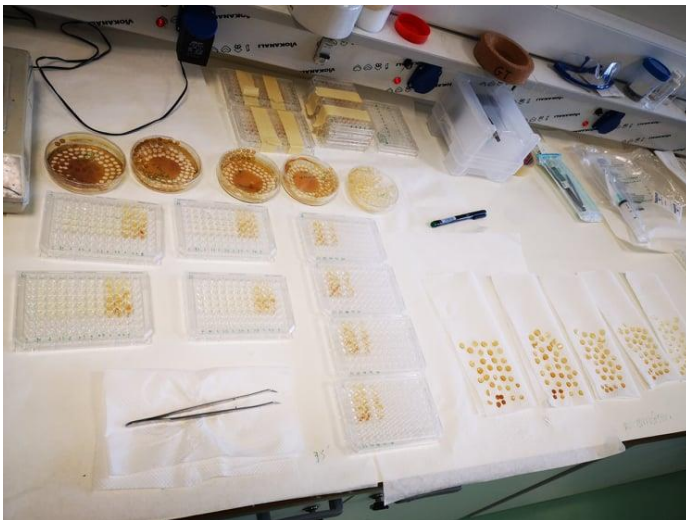
Τα δείγματα κόπηκαν στις ίδιες διαστάσεις χρησιμοποιώντας ειδικό κοπτήρα όπως φαίνεται στην εικόνα παρακάτω. Σε αυτή τη δοκιμή ο κοπτήρας αλλά και οι λαβίδες που χρησιμοποιήθηκαν αποστειρώθηκαν ώστε να αποφευχθεί οποιαδήποτε επιμόλυνση. Σε αυτή την δοκιμή έγινε αντικατάσταση του διασπασμένου νερού με φυσιολογικό ορό και αντί για ποτήρια ζέσεως έγινε χρήση αποστειρωμένων ουροσυλλεκτών. Επίσης αντί για χρήση αυτόματης πιπέτας επιλέχθηκαν αποστειρωμένες σύριγγες και όπου ήταν απαραίτητη η χρήση της αυτόματης πιπέτας χρησιμοποιήθηκαν αποστειρωμένα tips με φίλτρο.

Τα δείγματα τοποθετήθηκαν σε 12 plate ELISA με 0,02ml φυσιολογικού ορού σε κάθε κυψελίδα. Χρησιμοποιήθηκαν τέσσερα plate για κάθε μέτρηση ώστε να μπορεί να γίνει στατιστική ανάλυση αλλά και να αποδειχθεί η επαναληψιμότητα των μετρήσεων. Στην πρώτη σειρά έγιναν εμβαπτίσεις των μεμβρανών από μισή ώρα έως πέντε ώρες, στην δεύτερη σειρά πιάτων ELISA έγιναν εμβαπτίσεις των μεμβρανών από 12 ώρες έως 120 ώρες και τέλος στην τρίτη σειρά έγιναν εμβραπτίσεις των μεμβρανών από 144 ώρες έως 240 ώρες.

Σε αυτό το σημείο είναι σημαντικό να τονίσουμε ότι σε αυτή την πειραματική δοκιμή δεν αναπτύχθηκε μούχλα λόγω επιμόλυνσης και πάρθηκαν μετρήσεις μέσω φασματοφωτομετρίας ELISA, εκ των οποίων τα αποτελέσματα θα παρατεθούν στο επόμενο κεφάλαιο.



Εικόνα 9. 18 Μembrάνη κατά την διαδικασία κοπής της. (αριστερά) - Πειραματική διαδικασία σε αποστειρωμένο περιβάλλον. (δεξιά)



Εικόνα 9. 19 Πειραματική διαδικασία της εμφάνισης των δειγμάτων (αριστερά) - Plate ELISA στα οποία έχει γίνει εμφάνιση μεμβρανών. (δεξιά)

III. Αποτελέσματα

Κεφάλαιο 10^ο

Αποτελέσματα

10.1. Αποτελέσματα Φασμάτων Υπερύθρου (ATR-IR)

Το διάγραμμα 1 δείχνει τα φάσματα FTIR/ATR καθαρής χιτοζάνης και καθαρής ζελατίνης. Εξαιτίας των κοινών λειτουργικών ομάδων οι οποίες βρίσκονται και στη χιτοζάνη και τη ζελατίνη, υπάρχουν πολλές παρόμοιες κορυφές που παρατηρούνται στα φάσματα FTIR/ATR.

Στο διάγραμμα 1a) για το φάσμα που αναφέρεται στην ζελατίνη παρουσιάζεται μια ευρεία κορυφή από 3500 cm^{-1} έως 3200 cm^{-1} η οποία οφείλεται σε δονήσεις έκτασης των υδροξυλομάδων (O-H) και των αμινομάδων ενώ και σε αυτήν την περίπτωση υπάρχει αλληλοεπικάλυψη των κορυφών.[41] Ακόμα, εμφανίζονται κορυφές στα 1635 cm^{-1} , 1533 cm^{-1} και 1240 cm^{-1} που αποδίδονται στις ζώνες αμιδίων I, II και III αντίστοιχα. Η ζώνη αμιδίου I (1635 cm^{-1}) αποδίδεται στην δόνηση έκτασης του δεσμού C=O (καρβονύλιο) ενώ το αμίδιο II αναφέρεται στη δόνηση κάμψης N-H (1533 cm^{-1}) και το αμίδιο III επίσης στην δόνηση κάμψης του N-H (1240 cm^{-1}).

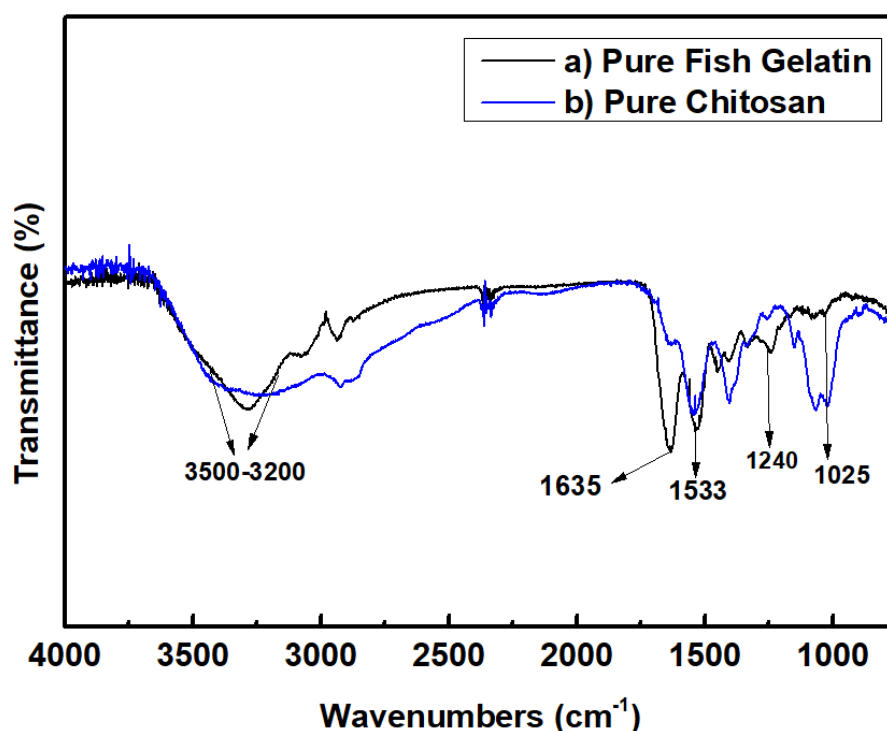
Στο διάγραμμα 1b) για το φάσμα που αναφέρεται στην χιτοζάνη παρουσιάζεται μια ευρεία κορυφή από 3500 cm^{-1} 3200 cm^{-1} η οποία οφείλεται σε δονήσεις έκτασης των υδροξυλομάδων (O-H) και των αμινομάδων ενώ, οι κορυφές αλληλεπικαλύπτονται.[41] Ακόμα, εμφανίζονται κορυφές στα 1635 και 1553 cm^{-1} που αποδίδονται στις ζώνες αμιδίων I και II αντίστοιχα. Η ζώνη αμιδίου I (1635 cm^{-1}) αποδίδεται στην δόνηση έκτασης του δεσμού C=O (καρβονύλιο) ενώ το αμίδιο II αναφέρεται στη δόνηση κάμψης N-H (1553 cm^{-1}). Τέλος εμφανίζονται δύο κορυφές στα 1060 cm^{-1} και στα 1025 cm^{-1} οι οποίες αποδίδονται στην δόνηση έκτασης της ομάδας C-O. [49][64]

Το διάγραμμα 2 δείχνει τα φάσματα FTIR/ATR καθαρής ζελατίνης και του υλικού ζελατίνης και χιτοζάνης. Εξαιτίας των κοινών λειτουργικών ομάδων οι οποίες βρίσκονται και στη χιτοζάνη και τη ζελατίνη, υπάρχουν πολλές παρόμοιες κορυφές που παρατηρούνται στα φάσματα FTIR/ATR.

Στο φάσμα που αναφέρεται στην καθαρή ζελατίνη (Διάγραμμα 2a) παρουσιάζεται μια ευρεία κορυφή από 3500 cm^{-1} έως 3200 cm^{-1} η οποία οφείλεται σε δονήσεις έκτασης των υδροξυλομάδων (O-H) και των αμινομάδων (N-H). Σε αυτήν την περίπτωση υπάρχει αλληλοεπικάλυψη των κορυφών οι οποίες αποδίδονται στις αμινομάδες και στις υδροξυλομάδες.

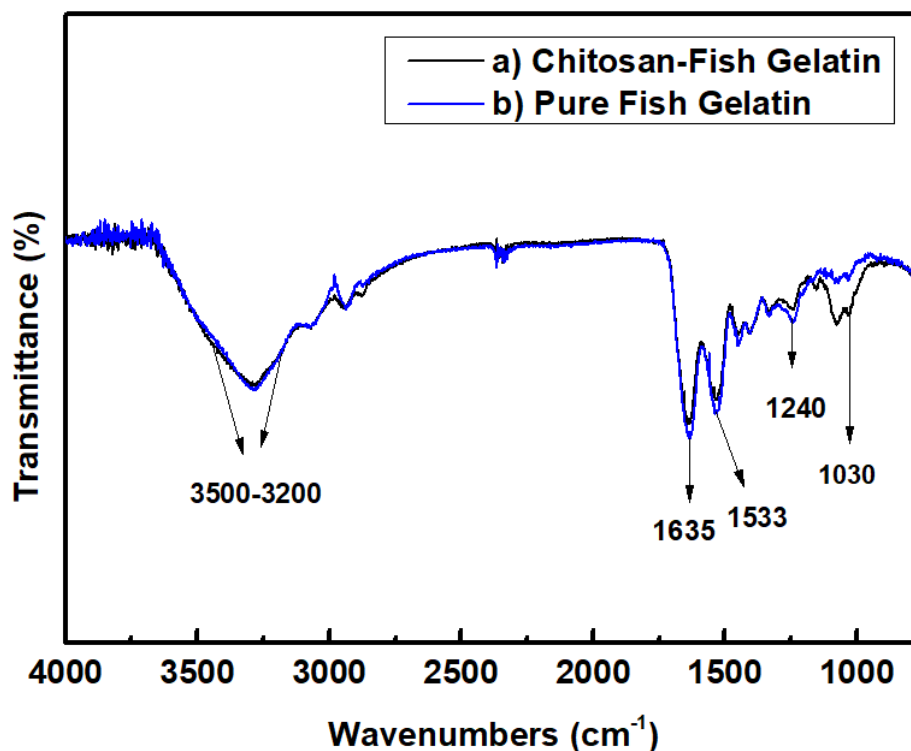
Ακόμα, εμφανίζονται κορυφές στα 1635 cm^{-1} , 1533 cm^{-1} που αποδίδονται στις ζώνες αμιδίων I και II αντίστοιχα. Η ζώνη αμιδίου I (1635 cm^{-1}) αποδίδεται στην δόνηση έκτασης των ομάδων C=O (καρβονύλιο) ενώ το αμίδιο II αναφέρεται στη

δόνηση κάμψης N-H (1553 cm^{-1}) και το αμίδιο III επίσης στην δόνηση κάμψης του N-H (1240 cm^{-1}). [44][49]



Διάγραμμα 1 : Φάσματα υπερόθρου : a) καθαρή ζελατίνη και b) καθαρή χιτοζάνη.

Στο διάγραμμα 2b) παρουσιάζονται τα μίγματα ζελατίνης και χιτοζάνης που εμφανίζουν και τα δύο κορυφές χιτοζάνης στα 1030 cm^{-1} η οποία αποδίδεται στην δόνηση έκτασης των ομάδων C-O και ζελατίνης στα 1635 cm^{-1} , 1533 cm^{-1} και 1240 cm^{-1} οι οποίες οφείλονται στα αμίδια I, II και στο αμίδιο III αντίστοιχα, για να αποδειχθεί η ύπαρξη και των δύο, δηλαδή και της ζελατίνης και της χιτοζάνης στο υλικό. Ακόμα υπάρχουν προφανείς ενδείξεις για έναν συνδυασμό αυτών των δύο (ζελατίνης και χιτοζάνης) έχοντας ιοντική αλληλεπίδραση μεταξύ της θετικά φορτισμένης χιτοζάνης και της αρνητικά φορτισμένης ζελατίνης, δηλαδή έχουμε σχηματισμό δεσμών υδρογόνου μεταξύ των δύο συστατικών στην οποία αποδίδονται τα μίγματα ζελατίνης και χιτοζάνης. Στο διάγραμμα 2 φαίνεται ότι στο εύρος των 3500 cm^{-1} 3200 cm^{-1} κυματάριθμων που αναφέρεται στο μίγμα του υλικού χιτοζάνης/ζελατίνης και αποδίδονται σε δονήσεις έκτασης υδροξυλομάδων ζελατίνης και αμινομάδων N-H χιτοζάνης με αποτέλεσμα δεσμούς υδρογόνου. Τέλος βλέπουμε μεταβολές στην ένταση των κορυφών οι οποίες αποδίδονται σε αλλαγές οι οποίες οφείλονται στην ύπαρξη της χιτοζάνης στο μίγμα ζελατίνης/ χιτοζάνης.[65]



Διάγραμμα 2. Φάσματα υπερύθρου: a) μίγματος ζελατίνη/ χιτοζάνη και b) καθαρής ζελατίνης.

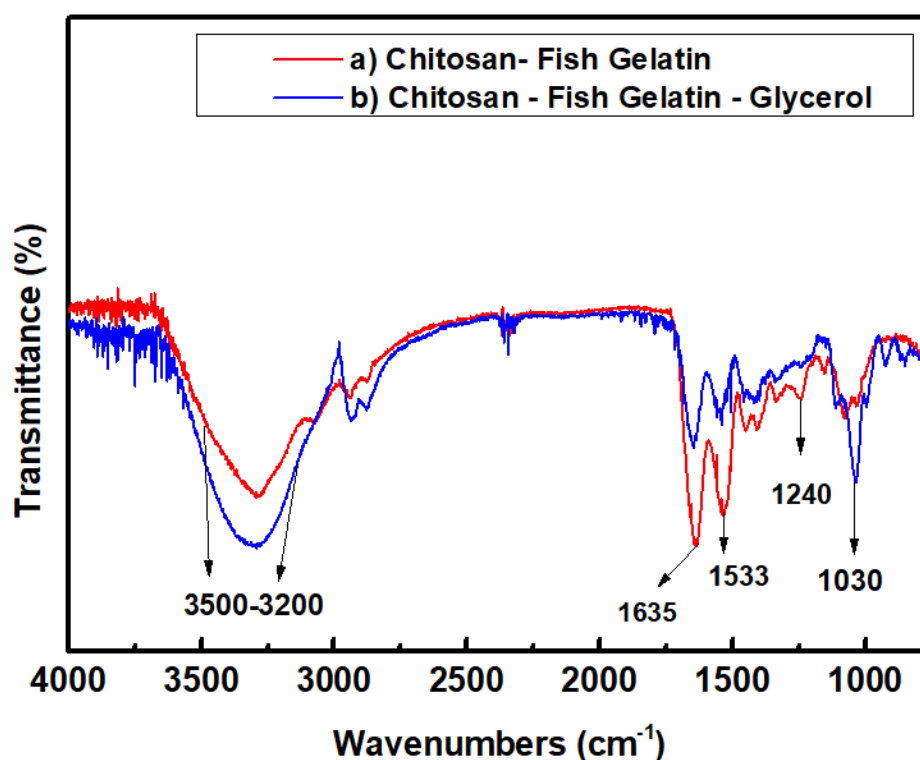
Το διάγραμμα 3 δείχνει τα φάσματα ATR-IR του μίγματος χιτοζάνης- ζελατίνης και του μίγματος υλικού χιτοζάνης-ζελατίνης-γλυκερόλης. Στο διάγραμμα παρατίθενται τα αποτελέσματα που ελήφθησαν μέσω της φασματοσκοπίας υπερύθρου. Εξαιτίας των κοινών λειτουργικών ομάδων οι οποίες βρίσκονται και στη χιτοζάνη και τη ζελατίνη, υπάρχουν πολλές παρόμοιες κορυφές που παρατηρούνται στα φάσματα FTIR.

Αν και υπάρχουν κάποιες παρόμοιες κορυφές σε αυτά τα πολυμερή, τα φάσματα που αναφέρονται στα μίγματα εμφανίζουν κορυφές οι οποίες αποδίδονται σε δονήσεις έκτασης ομάδων C-O και αμινομάδων N-H. Δηλαδή αποδίδονται οι κορυφές στην χιτοζάνη στους 1030 cm^{-1} κυματάριθμους και αποδίδονται στην δόνηση έκτασης των ομάδων C-O. Ακόμα στους 1635 cm^{-1} , 1533 cm^{-1} και 1240 cm^{-1} κυματάριθμους οι οποίοι αποδίδονται στα αμίδια I, II και III, δείχνουν την ύπαρξη και των δύο, δηλαδή και της ζελατίνης και της χιτοζάνης στο υλικό. Υπάρχουν προφανείς ενδείξεις για έναν συνδυασμό αυτών των δύο πολυμερών με ιοντική αλληλεπίδραση μεταξύ θετικά φορτισμένης χιτοζάνης και αρνητικά φορτισμένης ζελατίνης. Με άλλα λόγια, το ATR-IR επαληθεύει τη χημική δομή και αποδεικνύει την αναμιξιμότητα των δομών χιτοζάνης και ζελατίνης. Στο διάγραμμα 3 δείχνει ότι στο φάσμα που αναφέρεται της χιτοζάνης/ζελατίνης, έχουμε υδροξυλομάδες οι οποίες αποδίδονται στην ζελατίνη και ομάδες N-H οι οποίες αποδίδονται στην χιτοζάνη με αποτέλεσμα δεσμούς υδρογόνου.

Όπως φαίνεται στο διάγραμμα 3a), έχει χαρακτηριστικά μήκη κύματος, στην ευρεία κορυφή από 3500 cm^{-1} έως 3200 cm^{-1} κυματάριθμων αποδίδονται σε δονήσεις

έκτασης των υδροξυλομάδων (O-H) και των αμινομάδων (N-H). Έτσι, όπως φαίνεται στο διάγραμμα, υπάρχουν χαρακτηριστικοί δεσμοί χιτοζάνης στην περιοχή από 3500–2500 cm^{-1} . Οι χαρακτηριστικές κορυφές διαπερατότητας στα 1553 cm^{-1} αποδίδεται σε δόνηση κάμψης του αμιδίου II, ακόμα στο εύρος των 3500 cm^{-1} έως 3200 cm^{-1} κυματάρθμων παρουσιάζεται δόνηση κάμψης αμιδικών δεσμών (N-H) και στους 1025 cm^{-1} παρουσιάζεται δόνηση έκτασης της ομάδας (C-O) οι οποίοι δεσμοί επικαλύπτονται. [44][49]

Όπως φαίνεται και στο διάγραμμα 3b) υπάρχει μια κορυφή στα 1030 cm^{-1} η οποία αποδίδεται σε χαρακτηριστική δόνηση έκτασης της ομάδας (C-O) και παρατηρούμε ότι υπάρχει μια υψηλότερη διαπερατότητα. Η κορυφή της δόνησης έκτασης του δεσμού C-O είναι πολύ ισχυρότερη λόγω της προσθήκης της γλυκερόλης. [66]

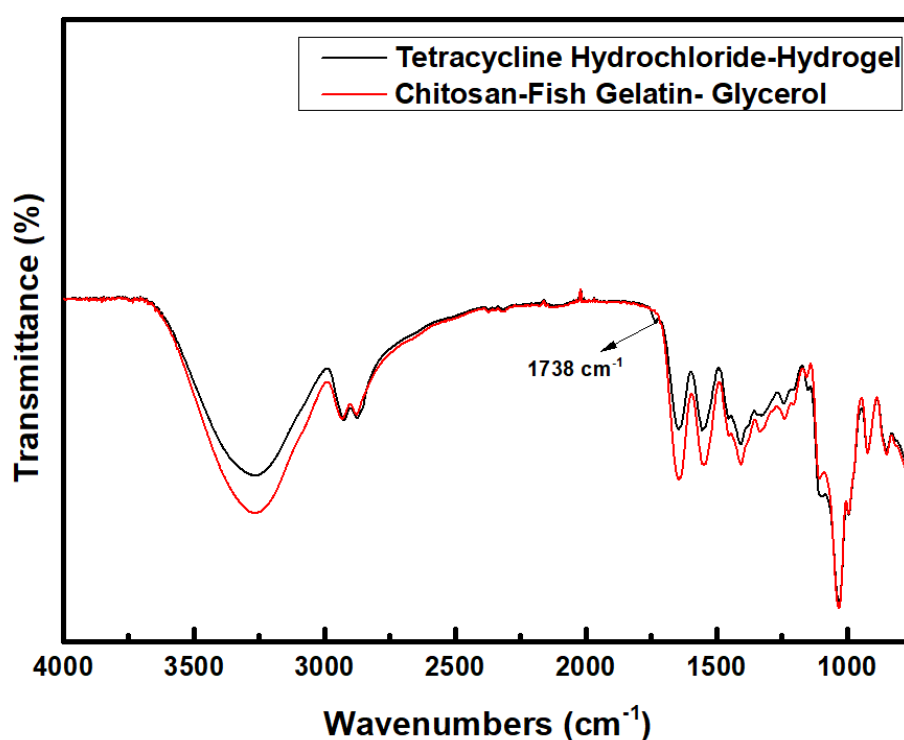


Διάγραμμα 3 : Φάσματα υπέρυθρου: a) του μίγματος χιτοζάνη/ ζελατίνη και b) το μίγμα του υλικού χιτοζάνης/ ζελατίνης/ γλυκερόλης.

Το διάγραμμα 4 παρουσιάζει τα φάσματα ATR-IR των μιγμάτων Χιτοζάνης/Ζελατίνης/Γλυκερόλης και το αντίστοιχο μίγμα με την προσθήκη της δραστικής ουσίας, υδροχλωρικής τετρακυκλίνης. Στην περίπτωση του απλού μίγματος, υπάρχει μια κορυφή στα 1030 cm^{-1} η οποία αποδίδεται σε χαρακτηριστική δόνηση έκτασης της ομάδας (C-O) και παρατηρούμε ότι υπάρχει μια υψηλότερη διαπερατότητα. Η κορυφή της δόνησης έκτασης του δεσμού C-O είναι πολύ ισχυρότερη λόγω της προσθήκης της γλυκερόλης και το κυρίαρχο σήμα είναι στα

3200-3500 cm^{-1} , που αντιστοιχεί στον ενδομοριακό δεσμό υδρογόνου και την ομάδα υδροξυλίου. [44][49]

Οι αναγνωρίσιμες κορυφές της υδροχλωρικής τετρακυκλίνης (TH) είναι η ασυμμετρική δόνηση έκτασης του διπλού δεσμού C=O στους 1738 cm^{-1} κυματάρθμους, η οποία είναι χαρακτηριστική κορυφή για την υδροχλωρική τετρακυκλίνη εφόσον δεν εμπεριέχεται στο μίγμα της υδροπηκτής παρά μόνο στην δραστική ουσία. Ακόμη παρατηρείται μια παραμόρφωση του αμιδίου II στους 1550 cm^{-1} και η δόνηση διπλού δεσμού C=C του αρωματικού δακτυλίου στους 1420 cm^{-1} κυματάρθμους. Για το μίγμα του υλικού χιτοζάνη/ζελατίνη/γλυκερόλη οι μέγιστες εντάσεις γίνονται πιο εμφανείς κάτι το οποίο επαληθεύει την ύπαρξη TCH σε σύνθετες μεμβράνες. [66]



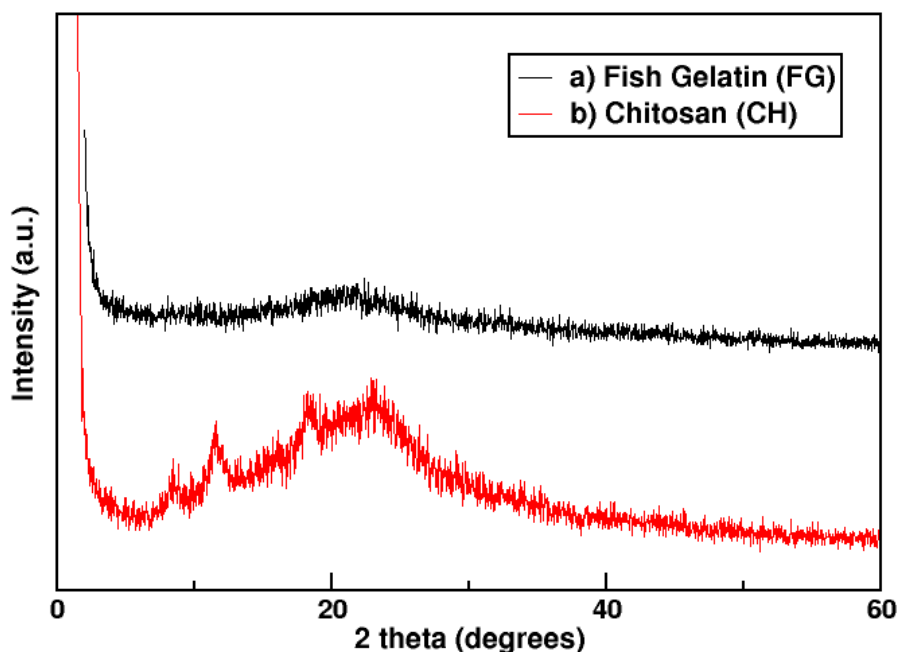
Διάγραμμα 4. Φάσματα υπέρυθρου: a) του αναμίγματος χιτοζάνη/ ζελατίνη /γλυκερόλη με TH (υδροχλωρική τετρακυκλίνη) και b) το μίγμα του υλικού χιτοζάνης/ ζελατίνης/ γλυκερόλης.

10.2. Αποτελέσματα περίθλασης ακτίνων -X (XRD)

Το διάγραμμα 5 δείχνει μια ευρεία κορυφή με επίκεντρο τις περίπου 20° για το XRD της καθαρής ζελατίνης (5a) και της καθαρής χιτοζάνης (5b). Η ταυτοποίηση φάσεων για το εκάστοτε δείγμα πραγματοποιήθηκε συγκρίνοντας τις κορυφές των διαγραμμάτων που προέκυψαν για την καθαρή ζελατίνη και την καθαρή χιτοζάνη. Οι κορυφές που εμφανίζονται στα λαμβανόμενα περιθλασογράμματα αντιστοιχούν στο κρυσταλλικό πλέγμα της ζελατίνης (5a) και της χιτοζάνης 5b). [52] [66]

Τα περιθλασογράμματα a) και b) στο διάγραμμα 5 δείχνουν ότι η χιτοζάνη έχει κρυσταλλική δομή και η ζελατίνη άμορφη.[52] Βάσει της θέσης της γωνίας (2θ), διεξάγονται συμπεράσματα σχετικά με την κρυσταλλική δομή μιας συγκεκριμένης φάσης του υλικού και κατ' επέκταση χρησιμεύει για την αναγνώριση αυτής, βάσει του ύψους της, διεξάγονται συμπεράσματα σχετικά με το ποσοστό της κρυσταλλικότητας και με το πλάτος των κορυφών προσδιορίζεται το μέγεθος των κρυσταλλιτών.

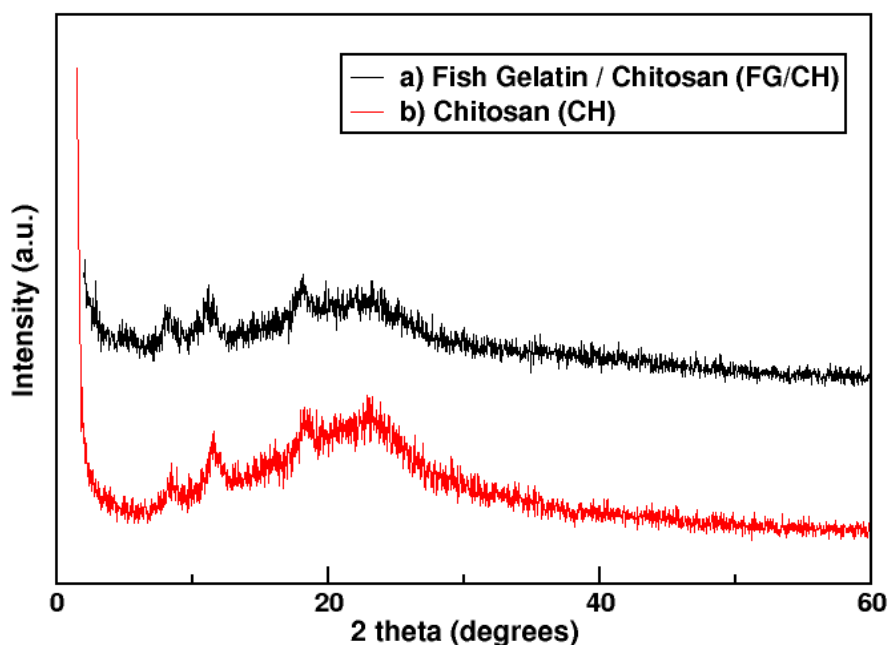
Πιο συγκεκριμένα, εάν ένα υλικό έχει υψηλή κρυσταλλικότητα, οι ανακλάσεις του είναι καλά σχεδιασμένες και αποτυπώνονται ξεκάθαρα στο περιθλασόγραμμα (αμφίκυκλες κορυφές) και ενίοτε πολλές σε αριθμό, διότι οι μεταβολές των αποστάσεων μεταξύ των πλεγματικών επιπέδων δεν είναι πολύ σημαντικές. Αντίθετα, στην περίπτωση ενός υλικού που δεν είναι καλά κρυσταλλωμένο, αυτές οι μεταβολές είναι σημαντικές, οι ανακλάσεις έχουν ευρεία και αποστρογγυλωμένη μορφή (αμφίκυρτες κορυφές).[52][66]



Διάγραμμα 5: Διάγραμμα περίθλασης ακτίνων-X για : a) την καθαρή ζελατίνη και b) για την καθαρή χιτοζάνη.

Στο διάγραμμα 6 φαίνεται ότι οι κορυφές περίθλασης οι οποίες βρίσκονται στις περίπου στις 20° (για $2\theta^\circ$) υποδηλώνουν καλή αλληλεπίδραση και συμβατότητα μεταξύ της ζελατίνης και της χιτοζάνης στην μεμβράνη. Ταυτόχρονα, ο λόγος έντασης των κορυφών της μεμβράνης η οποία περιέχει το μίγμα του υλικού ζελατίνης και χιτοζάνης μειώνεται με την προσθήκη ζελατίνης όπως φαίνεται στο διάγραμμα 6a). Αυτό έχει σαν αποτέλεσμα τη μείωση του βαθμού κρυσταλλικότητας, λόγω της ενσωμάτωσης της άμορφης ζελατίνης στο μίγμα του υλικού ζελατίνης/χιτοζάνης, η οποία ενσωμάτωση οφείλεται και στις αλληλεπιδράσεις δεσμών υδρογόνου μεταξύ αυτών.

Τα αποτελέσματα περίθλασης ακτίνων-X (XRD) υποδηλώνουν ότι υπήρχε αλληλεπίδραση μεταξύ των μορίων της ζελατίνης και των μορίων της χιτοζάνης στις μεμβράνες. Έτσι η ανάμειξη των δύο συστατικών προς το σχηματισμό αναμίγματος οδηγεί σε υλικό με χαμηλότερη κρυσταλλικότητα από το αρχικό μίγμα.[50][65]



Διάγραμμα 6: Διάγραμμα περίθλασης ακτίνων-X για : a) το μίγμα του υλικού ζελατίνης και χιτοζάνης και b) για την καθαρή χιτοζάνη.

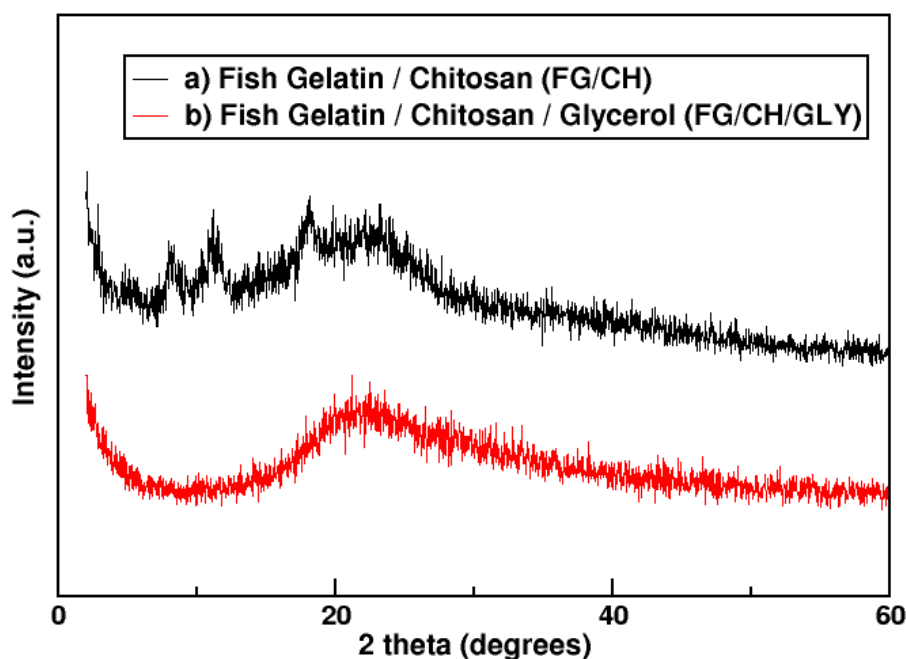
Στο περιθλασόγραμμα 7 φαίνεται ότι οι κορυφές περίθλασης οι οποίες βρίσκονται στις περίπου στις 20° (για $2\theta^\circ$) υποδηλώνουν καλή αλληλεπίδραση και συμβατότητα μεταξύ της ζελατίνης και της χιτοζάνης στην μεμβράνη. Στην ευρεία κορυφή με επίκεντρο τις περίπου 20° περιγράφεται η άμορφη ζελατίνη. Γι' αυτό το λόγο, υπάρχει μια μικρή μείωση της κρυσταλλικότητας του μίγματος του υλικού χιτοζάνης ζελατίνης, η οποία μπορεί να οφείλεται στις αλληλεπιδράσεις δεσμών υδρογόνου μεταξύ αυτών. Λόγω της προσθήκης γλυκερόλης παρατηρούμε μια μετατόπιση των κορυφών μετά τις 20° η οποία υποδηλώνει την ύπαρξη της γλυκερόλης στο μίγμα. Τα αποτελέσματα XRD υποδηλώνουν ότι υπήρχε καλή συμβατότητα και

αλληλεπίδραση μεταξύ των μορίων ζελατίνης και των μορίων της χιτοζάνης στις μεμβράνες. Εφόσον προστέθηκε η ζελατίνη σε μεμβράνες χιτοζάνης, η αναλογία μέγιστης έντασης του μειώθηκε σημαντικά.[52]

Η κύρια διαφορά στα δείγματα της χιτοζάνης και της ζελατίνης είναι ότι υπάρχει μερική επικάλυψη των μεταβατικών κορυφών ενώ εκεί που υπάρχει ο πλαστικοποιητής η γλυκερίνη δηλαδή διαφοροποιείται με αύξηση των κορυφών η οποία αποδίδεται στην ενισχυμένη μοριακή κινητικότητα των μορίων.

Στην πραγματικότητα, το νερό λειτουργεί ως πλαστικοποιητής των δύο ενώσεων χαμηλού μοριακού βάρους. Επίσης η γλυκερόλη είναι πιο υδρόφιλη από το μίγμα χιτοζάνης/ζελατίνης.

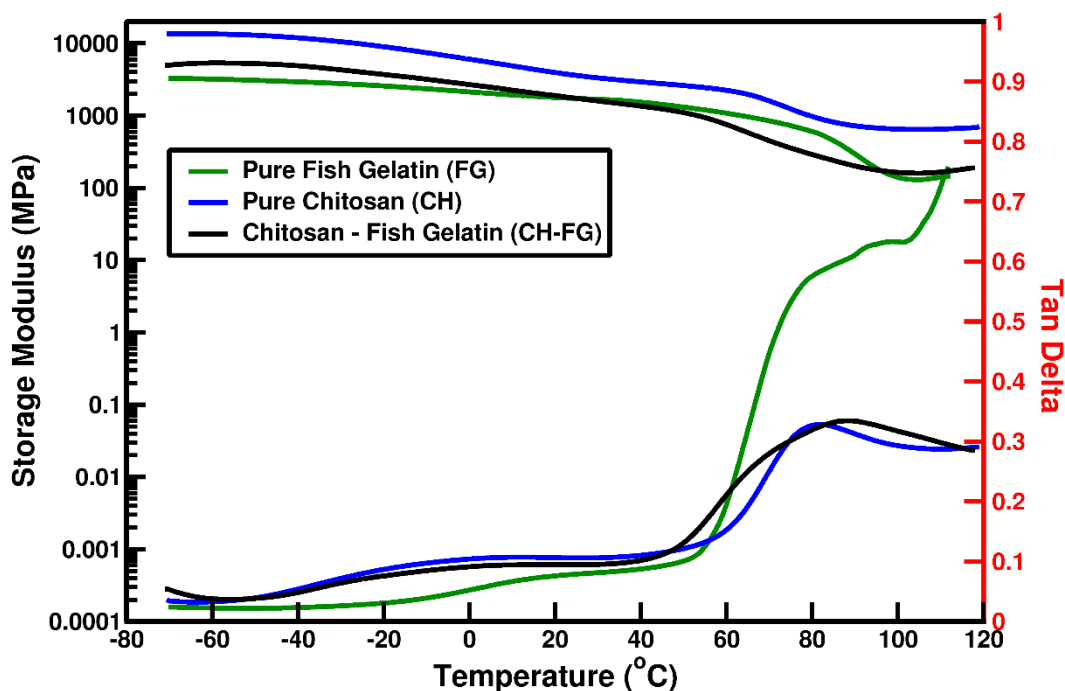
Το μίγμα χιτοζάνης/ζελατίνης ήταν αρχικά άμορφο και αποτελούνταν κυρίως από απλές αλυσίδες ζελατίνης. Ο σχηματισμός τους συνδέεται άμεσα με την εξάτμιση του νερού κατά την οποία η τυχαία φύση των μορίων ζελατίνης στο διάλυμα παραμένει μέχρις ότου το ιξώδες να γίνει πολύ υψηλό και η τυχαία διαμόρφωση να παγώσει αμέσως. Ωστόσο, το συγκεκριμένο μίγμα μπορεί να αποκτήσει αυξημένη κινητικότητα με αποτέλεσμα έναν νέο τύπο δικτύου όπου γίνεται ένωση των μορίων ζελατίνης μονής αλυσίδας για την δημιουργία κρυσταλλιτών. Αυτοί οι κρυσταλλίτες λειτουργούν ως κινητές ή μη μόνιμες διασταυρώσεις αφού σχηματίσουν ένα ημικρυσταλλικό δίκτυο. [44][52][65]



Διάγραμμα 7 : Διάγραμμα περίθλασης ακτίνων-X για : a) το μίγμα του υλικού ζελατίνης και χιτοζάνης και b) για το μίγμα του υλικού ζελατίνης/ χιτοζάνης/ γλυκερόλης.

10.3. Αποτελέσματα Δυναμικής Μηχανική Ανάλυσης (DMA)

Αρχικά το συγκεκριμένο διάγραμμα μας παρέχει πληροφορίες για το ποσό της ελαστικής συμπεριφοράς, δηλαδή ανάλογα με το πόσο ενέργεια έχει αποθηκευτεί κατά την δυναμική μηχανική καταπόνηση η κάθε μεμβράνη βρίσκουμε εάν έχει μεγάλη ελαστική περιοχή ή όχι. Η ενέργεια – δύναμη που θα αποθηκευτεί (storage modulus) δηλώνει και πόσο μπορεί να αντέξει ή να επιμηκυνθεί η κάθε μεμβράνη. Όσο μεγαλύτερο είναι αυτό το ποσό στον άξονα ψ τόσο καλύτερη ελαστική απόκριση θα έχει.[55]



Διάγραμμα 8 : Διάγραμμα δυναμικής μηχανικής καταπόνησης (DMA), μέτρου αποθήκευσης και εφαπτομένης $\tan\delta$ συναρτήσει της θερμοκρασίας για την καθαρή χιτοζάνη, την καθαρή ζελατίνη ιχθύων και για το μίγμα χιτοζάνη/ζελατίνη.

Στο παραπάνω διάγραμμα παρουσιάζεται η μέτρηση δυναμικής μηχανικής καταπόνησης σε συνάρτηση με την θερμοκρασία. Πιο συγκεκριμένα, στον άξονα x έχουμε τη θερμοκρασία η οποία αφορά την σάρωση θερμοκρασιών κατά την δυναμική μηχανική καταπόνηση για να δούμε την μηχανική απόκριση των δειγμάτων των μεμβρανών. Στον άξονα y έχουμε το μέτρο ελαστικότητας της αποθηκευμένης ενέργειας της δύναμης που ασκείται στην εκάστοτε μεμβράνη. Η τάση η οποία βρίσκεται σε φάση με την παραμόρφωση ή την διάταση που εφαρμόζεται χρησιμοποιείται για να προσδιορίσει το μέτρο ελαστικότητας ή μέτρο αποθήκευσης E'

το οποίο αποτελεί έναν δείκτη ελαστικής συμπεριφοράς και αποκαλύπτει την ικανότητα του υλικού να αποθηκεύει ελαστική ενέργεια η οποία σχετίζεται με την ανακτήσιμη ελαστική παραμόρφωση.

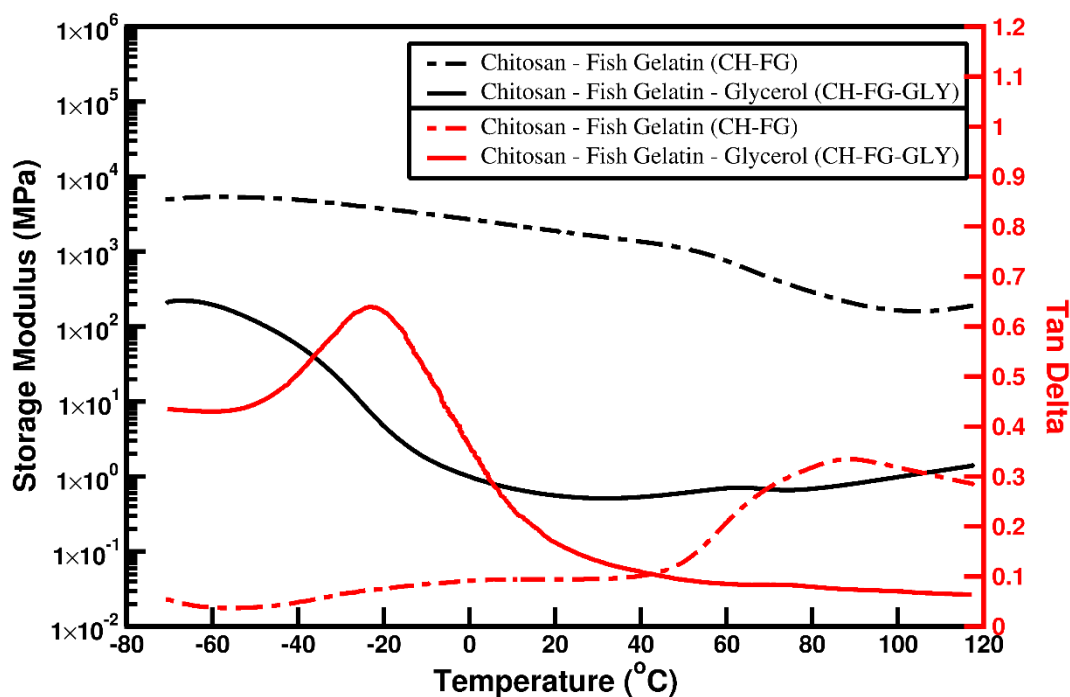
Από τα δεξιά του διαγράμματος με κόκκινο χρώμα παρατηρούμε την εφαπτόμενη απώλειας $\tan\delta$ ή αλλιώς το λόγο απόσβεσης όπου δ είναι η γωνία φάσης μεταξύ της δυναμικής παραμόρφωσης και της τάσης στην μέτρηση ταλάντωσης. Είναι ένα αδιάστατο μέγεθος και δίνεται από την αναλογία του μέτρου απώλειας ως προς το μέτρο ελαστικότητας. Αυτή η ιξωδοελαστική ιδιότητα είναι ένα μέτρο της της απώλειας της μηχανικής ενέργειας εντός των μεμβρανών με την μορφή θερμότητας λόγω της ιξώδους παραμόρφωσης. Η μέγιστη τιμή της $\tan\delta$ είναι συχνά σε σύνδεση με την θερμοκρασία υαλώδους μετάπτωσης και η θέση των συγκεκριμένων κορυφών απώλειας μας παρέχει πληροφορίες σχετικά με την εσωτερική μοριακή κινητικότητα. Άρα όσο χαμηλότερη είναι η τιμή της $\tan\delta$ τόσο γρηγορότερα οι μεμβράνες θα ανταποκριθούν στο φορτίο και θα έχουν ταχύτερη επιστροφή στο αρχικό τους σχήμα, ενώ όσο πιο υψηλή είναι η τιμή αυτή τόσο υψηλότερο είναι το ποσό της ενέργειας που θα χαθεί με την μορφή της θερμότητας.[57][59][65]

Αναλυτικότερα στο διάγραμμα 8 παρατηρούμε ότι η μεταβολή του μέτρου αποθήκευσης ενέργειας (ή μέτρου ελαστικότητας) E' σε σχέση με τη θερμοκρασία μειώνεται. Ξεκινώντας από χαμηλή θερμοκρασία το μέτρο αποθήκευσης μειώνεται καθώς τα μόρια κερδίζουν περισσότερο ελεύθερο όγκο που έχει ως αποτέλεσμα μεγαλύτερη κινητικότητα των μορίων. [60][61] Παρατηρούμε πως η καθαρή χιτοζάνη (μπλε) έχει μεγαλύτερο μέτρο αποθήκευσης και άρα και μεγαλύτερο μέτρο ελαστικότητας από την καθαρή ζελατίνη ιχθύος (πράσινο) και το μίγμα της χιτοζάνης και της ζελατίνης (μαύρο) έχει όπως είναι αναμενόμενο μία ενδιάμεση τιμή των καθαρών συστατικών και αυτό αποδεικνύει και την αναμιξιμότητα των συστατικών στο μίγμα. Τυπικά στην περιοχή μετά τους 40°C το μέτρο ελαστικότητας μπορεί να πέσει κατά αρκετές τάξεις μεγέθους αφού περνά από την υαλώδη στην κομμώδη φάση, για το συγκεκριμένο υλικό, και έως ότου φτάσει να έχει πλατό που υποδηλώνει την συντονισμένη κίνηση του άμορφου μέρους της αλυσίδας, χωρίς να φτάνει ποτέ στην περιοχή της τήξης.[56][58]

Όσον αφορά την εφαπτόμενη $\tan\delta$ (κόκκινο χρώμα) παρατηρούμε πως η εφαπτόμενη της γωνίας δ σε συνάρτηση με το χρόνο αρχικά παρουσιάζει μια ευρεία καμπύλη και αποδίδεται σε τοπικές κινήσεις των αλυσίδων, στην έκταση και την στρέψη των δεσμών, στην κίνηση των πλευρικών ομάδων των αλύσεων ή στην μεταβολή της κινητικότητας της κύριας πολυμερικής αλυσίδας. Αυτή η ευρεία καμπύλη αντιστοιχεί στην β - χαλάρωση τάσης και αντιστοιχεί περίπου στους -20°C για την καθαρή χιτοζάνη και για το μίγμα χιτοζάνης/ ζελατίνης, για την καθαρή ζελατίνη ιχθύων παρατηρείται η β - χαλάρωση τάσης περίπου στους 20°C και αυτό αποδεικνύει ότι η χαλάρωση τάσης στο μίγμα οφείλεται στην κίνηση των πλευρικών ομάδων ή των αλύσεων της χιτοζάνης. [44] [57]

Στη συνέχεια παρατηρείται μια απότομη αύξηση στα διαγράμματα τα οποία αντιστοιχούν στην εφαπτόμενη δ . Η κορυφές αυτών των διαγραμμάτων μας δίνουν τις θερμοκρασίες υαλώδους μετάπτωσης για την καθαρή ζελατίνη ιχθύων, για την καθαρή χιτοζάνη και για το μίγμα αυτών των συστατικών.[56] Για την καθαρή χιτοζάνη η τιμή

της υαλώδους μετάπτωσης είναι περίπου 80 °C ενώ για της καθαρής ζελατίνη η τιμή της υαλώδους μετάπτωσης προσεγγίζει τους 95° C. Σε αυτή την περίπτωση η εφαπτομένη της γωνίας δ δεν σταθεροποιείται όμως συνεχίζει μια ανοδική πορεία πιθανόν λόγω μετουσίωσης της πρωτεΐνης κατά την αύξηση της θερμοκρασίας και έτσι παρατηρείται μια αλλαγή στην δομή της ζελατίνης ιχθύων.[56][59] Για το μίγμα χιτοζάνης/ ζελατίνης η τιμή της υαλώδους μετάπτωσης αντιστοιχεί στην ευρεία κορυφή των περίπου 85 °C.[44] [66][69]



Διάγραμμα 9 : Διάγραμμα δυναμικής μηχανικής καταπόνησης (DMA), μέτρου αποθήκευσης και εφαπτομένης $\tan\delta$ συναρτήσεως της θερμοκρασίας για το μίγμα ζελατίνη χιτοζάνη και για το μίγμα χιτοζάνη, ζελατίνη και γλυκερόλης .

Στο διάγραμμα παρουσιάζεται η δυναμική μηχανική καταπόνηση (DMA), δηλαδή το μέτρο αποθήκευσης (μαύρο) και η εφαπτομένη $\tan\delta$ (κόκκινο) συναρτήσεως της θερμοκρασίας για το μίγμα ζελατίνη χιτοζάνη και για το μίγμα ζελατίνη/ χιτοζάνη με την προσθήκη της γλυκερόλης. Το παραπάνω διάγραμμα μας παρέχει πληροφορίες για το ποσό της ελαστικής συμπεριφοράς, δηλαδή ανάλογα με το πόσο ενέργεια έχει αποθηκευτεί κατά την δυναμική μηχανική καταπόνηση η κάθε μεμβράνη βρίσκουμε εάν έχει μεγάλη ελαστική περιοχή ή όχι. Με κόκκινο χρώμα στα δεξιά παρατηρούμε την εφαπτόμενη απώλειας $\tan\delta$ ή αλλιώς το λόγο απόσβεσης όπου δ είναι η γωνία φάσης μεταξύ της δυναμικής παραμόρφωσης και της τάσης στην μέτρηση ταλάντωσης. Αυτή η ιξωδοελαστική ιδιότητα είναι ένα μέτρο της απώλειας της μηχανικής ενέργειας εντός των μεμβρανών με την μορφή θερμότητας λόγω της ιξώδους

παραμόρφωσης. Η μέγιστη τιμή της $\tan\delta$ είναι συχνά σε σύνδεση με την θερμοκρασία υαλώδους μετάπτωσης.[55][56]

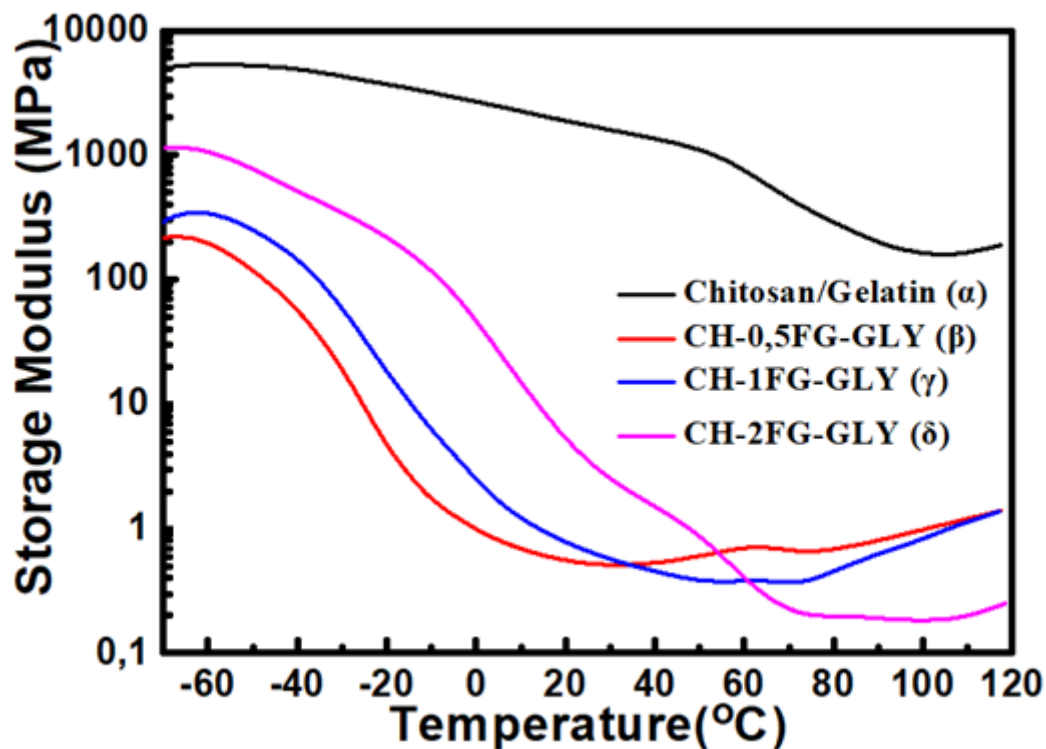
Πιο συγκεκριμένα στο διάγραμμα 9 παρατηρούμε ότι η μεταβολή του μέτρου αποθήκευσης ενέργειας (ή μέτρου ελαστικότητας) E' σε σχέση με τη θερμοκρασία μειώνεται αρκετές τάξεις μεγέθους για το μίγμα χιτοζάνης ζελατίνης ιχθύων με την προσθήκη γλυκερόλης. Ξεκινώντας από χαμηλή θερμοκρασία το μέτρο αποθήκευσης μειώνεται καθώς τα μόρια κερδίζουν περισσότερο ελεύθερο όγκο που έχει ως αποτέλεσμα μεγαλύτερη κινητικότητα των μορίων. [44]

Από τα δεξιά του διαγράμματος 9 φαίνεται η εφαπτομένη $\tan\delta$ (κόκκινο χρώμα) και παρατηρούμε πως η εφαπτομένη της γωνίας δ σε συνάρτηση με το χρόνο αρχικά παραμένει σταθερή για το απλό μίγμα χιτοζάνης και ζελατίνης ιχθύων, στη συνέχεια παρατηρείται μια απότομη αύξηση που δημιουργεί μια κορυφή. Η κορυφή αυτή μας δίνει τη θερμοκρασία υαλώδους μετάβασης που στη συγκεκριμένη περίπτωση αντιστοιχεί σε ένα εύρος θερμοκρασιών από 85 έως 95° C η οποία αποδίδεται στην πλήρη ανάμιξη των δυο συστατικών. Για το μίγμα χιτοζάνης, ζελατίνης ιχθύων το οποίο περιέχει γλυκερόλη παρατηρούμε ότι η θερμοκρασία υαλώδους μετάπτωσης μειώνεται δραματικά και φτάνει περίπου τους -20° C [58] [67]

Η ζελατίνη αποτελείται από κρυσταλλικές και άμορφες περιοχές τυχαία διεσπαρμένες εντός του σύνθετου πολυμερούς. Η συνοχή των μιγμάτων χιτοζάνης/ζελατίνης αυξάνεται παρουσία δεσμών μεταξύ των μορίων, όπως οι δεσμοί υδρογόνου. Σε μια σταθερή περιεκτικότητα σε υγρασία η θερμοκρασία υαλώδους μετάπτωσης (T_g) για την α -μετάβαση των μιγμάτων χιτοζάνης/ζελατίνης βρέθηκε ότι μειώνεται αναλογικά με την αύξηση του πλαστικοποιητή. Έτσι ο συντελεστής αποθήκευσης φαίνεται να περνά μέσα από την υαλώδη, την δερματοειδή και την ελαστική κατάσταση για μίγματα χιτοζάνης/ζελατίνης πλαστικοποιημένα με γλυκερόλη. [44][59]

Στο διάγραμμα 10 παρουσιάζεται η δυναμική μηχανική καταπόνηση (DMA), δηλαδή το μέτρο αποθήκευσης. Αρχικά το συγκεκριμένο διάγραμμα μας παρέχει πληροφορίες για το ποσό της ελαστικής συμπεριφοράς, δηλαδή ανάλογα με το πόσο ενέργεια έχει αποθηκευτεί κατά την δυναμική μηχανική καταπόνηση η κάθε μεμβράνη βρίσκουμε εάν έχει μεγάλη ελαστική περιοχή ή όχι. Η ενέργεια – δύναμη που θα αποθηκευτεί (storage modulus) δηλώνει και πόσο μπορεί να αντέξει ή να επιμηκυνθεί το εκάστοτε δείγμα. [57][65]

Πιο συγκεκριμένα στο διάγραμμα 10 παρατηρούμε ότι η μεταβολή του μέτρου αποθήκευσης ενέργειας (ή μέτρου ελαστικότητας) E' σε σχέση με τη θερμοκρασία μειώνεται για τα δείγματα τα οποία περιέχουν γλυκερόλη. Όσο αυξάνεται η ποσότητα της γλυκερόλης η οποία δρα σαν πλαστικοποιητής στο μίγμα η αποθηκευμένη ενέργεια μειώνεται σε συνάρτηση με την θερμοκρασία και συνεπώς το μέτρο ελαστικότητας μειώνεται σημαντικά στο θερμοκρασιακό εύρος που διερευνείται, δηλαδή την θερμοκρασία του σώματος.

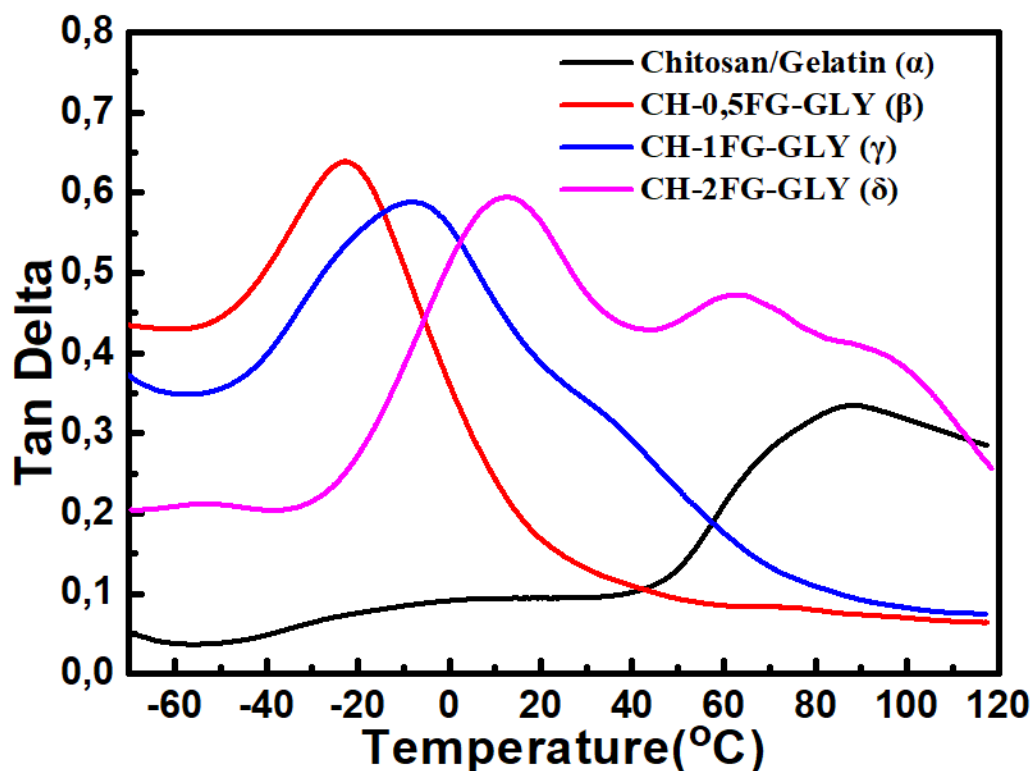


Διάγραμμα 10 : Διάγραμμα δυναμικής μηχανικής καταπόνησης (DMA), μέτρου αποθήκευσης συναρτήσει της θερμοκρασίας για CH-FG(a), CH-0,5FG-GLY (b), CH-1FG-GLY (c), CH-2FG-GLY (d).

Όσον αφορά την τελική ανοδική πορεία των κορυφών, οφείλεται στο γεγονός ότι η γλυκερόλη η οποία δρα σαν πλαστικοποιητής, είναι υδρόφιλη και αυξάνει την ρευστότητα του μίγματος χιτοζάνης/ ζελατίνης ιχθύων. Σε αυτή, όμως, την περίπτωση το νερό παρομοιάζεται σε ιδιότητες με την γλυκερόλη και δρα και αυτό σαν πλαστικοποιητής έτσι άνω των 100 °C έχουμε απώλεια νερού λόγω εξάτμισης άρα αύξηση των μηχανικών ιδιοτήτων των υδροπηκτών, σε αυτό το φαινόμενο αποδίδεται η ανοδική πορεία των διαγραμμάτων μετά το πέρας των 100 °C.[68][69][70]

Στο παρακάτω διάγραμμα 11 φαίνεται η εφαπτομένη $\tan\delta$ για το μίγμα χιτοζάνης ζελατίνης χωρίς την προσθήκη γλυκερόλης (μαύρο) και για τα μίγματα χιτοζάνης και ζελατίνης παρουσία γλυκερόλης για τις διαφορετικές ποσότητες ζελατίνης ιχθύων. Παρατηρούμε πως η εφαπτομένη της γωνίας δ σε συνάρτηση με το χρόνο για το απλό μίγμα χιτοζάνης και ζελατίνης ιχθύων αρχικά παραμένει σταθερή και εμφανίζει μια ευρεία κορυφή η οποία αποδίδεται στην β -χαλάρωση τάσης και αφορά είτε την κίνηση των μορίων του μίγματος είτε την στρέψη των πλευρικών ομάδων είτε την κίνηση της συνολικής ή μέρους της αλυσίδας, στη συνέχεια παρατηρείται μια απότομη αύξηση που δημιουργεί μια κορυφή. Η κορυφή αυτή μας δίνει τη θερμοκρασία υαλώδους μετάβασης που στη συγκεκριμένη περίπτωση αντιστοιχεί σε ένα εύρος θερμοκρασιών από 85 έως 95° C η οποία αποδίδεται στην πλήρη ανάμιξη των δυο συστατικών. Για το μίγμα χιτοζάνης, ζελατίνης ιχθύων το οποίο περιέχει γλυκερόλη παρατηρούμε ότι η θερμοκρασία υαλώδους μετάπτωσης

μειώνεται δραματικά και φτάνει περίπου τους -20°C για την μικρότερη ποσότητα ζελατίνης ιχθύων και φτάνει μέχρι στους περίπου 20°C για την μέγιστη ποσότητα ζελατίνης ιχθύων.[44]



Διάγραμμα 11 : Διάγραμμα δυναμικής μηχανικής καταπόνησης (DMA), εφαπτομένης δ συναρτήσεως της θερμοκρασίας για CH-FG(a), CH-0,5FG-GLY (b), CH-1FG-GLY (c), CH-2FG-GLY (d).

Η γλυκερόλη η οποία δρα σαν πλαστικοποιητής έχει την ιδιότητα να ενσωματώνεται εντός των αλύσεων του πολυμερούς διατάσσοντάς τες μακριά και αυξάνοντας τον "ελεύθερο όγκο", γι' αυτό το λόγο παρατηρούμε μεγάλη μείωση στην θερμοκρασία ναλώδους μετάπτωσης για τα μίγματα τα οποία περιέχουν γλυκερόλη.[56][59]

10.4. Αποτελέσματα Ηλεκτρονικής Μικροσκοπίας Σάρωσης (SEM)

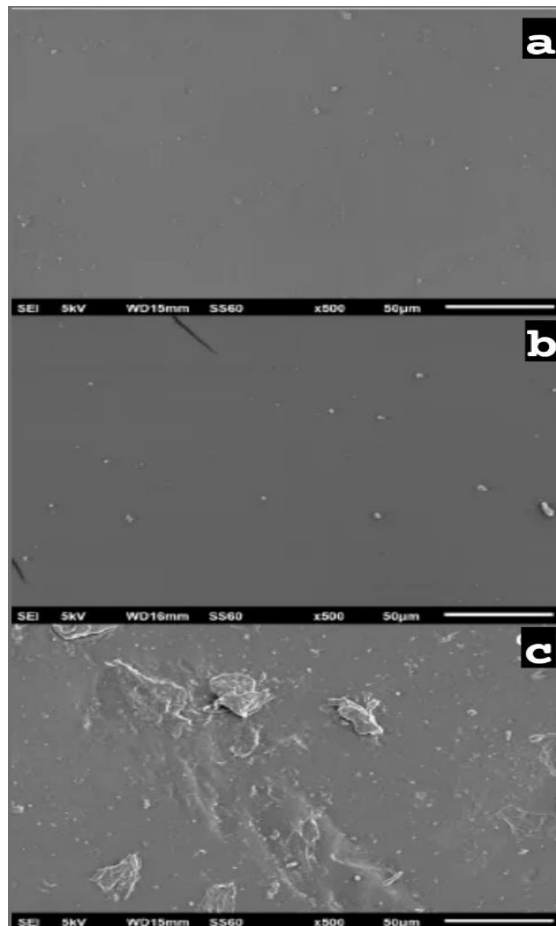
Οι επιφανειακές ιδιότητες των βιοϋλικών, όπως η μικροδομή, η τραχύτητα, η υδροφιλία και τα επιφανειακά φορτία, είναι σημαντικές παράμετροι για την επιτυχή υποστήριξη της κυτταρικής ανάπτυξης και διαφοροποίησης. Η μορφολογία της επιφάνειας υδροπηκτών CH-FG μελετήθηκε με μικρογραφίες SEM που

παρουσιάζονται παρακάτω. Όλες οι μεμβράνες παρατηρείται ότι δεν είχαν πορώδη δομή. [45]

Το SEM χρησιμοποιήθηκε για να παρατηρηθεί η επίδραση της μεθόδου παρασκευής και του πλαστικοποιητή στις επιφανειακές ιδιότητες των μεμβρανών. Το ακανόνιστο σχήμα και η δομή της άνω επιφάνειας της μεμβράνης μπορεί να έχει επίδραση στις ιδιότητες των μεμβρανών.[45]

Επιπλέον, τα μίγματα των μεμβρανών που έχουν αυξημένη ποσότητα ζελατίνης ιχθύων παρουσιάζουν μία τραχύτερη μορφολογία επιφάνειας, σε σχέση με εκείνα με την μικρότερη ποσότητα ζελατίνης ιχθύων οι οποίες έχουν πιο λεία επιφάνεια. Οι εικόνες SEM παρουσίασαν παρόμοιες μορφολογίες επιφάνειας για τις μεμβράνες χιτοζάνης με διαφορετική περιεκτικότητα σε ζελατίνη, υποδεικνύεται έτσι η πυκνή και συνεχής μικροδομή γλυκερόλης/χιτοζάνης/ζελατίνης.

Τέλος, όπως είναι φανερό η πολυμερική υδροπηκτική CH-FG-GLY δεν εμφανίζει πόρους και διαπιστώνεται ότι υπάρχουν διάσπαρτα σωματίδια τα οποία πιθανόν να οφείλονται σε αύξηση της ζελατίνης ιχθύων. [44][66]



Εικόνα 10.1. Αποτελέσματα SEM της επιφάνειας των υδροπηκτών CH-0,5FG-GLY (a), CH-1FG-GLY (b), CH-2FG-GLY (c).

10.5. Αποτελέσματα Μετρήσεων Λόγου Διόγκωσης

Λαμβάνοντας υπόψιν ότι πληθώρα δικτύων τα οποία χαρακτηρίζονται ως υδροπηκτές έχουν σχεδιαστεί και κατασκευαστεί ως έξυπνοι φορείς φαρμάκων, γι' αυτό θα πρέπει να μελετηθεί εκτενώς η διόγκωση των υδροπηκτών. Η υδρόφιλη/υδρόφοβη ισορροπία των υδροπηκτών, ο βαθμός διασύνδεσης και ιδιαίτερα ο βαθμός ιονισμού και η αλληλεπίδρασή του με αντίθετα ιόντα είναι σημαντικοί παράμετροι που ελέγχουν τη διόγκωση ισορροπίας, την αλλαγή διαστάσεων και τα πρότυπα απελευθέρωσης φαρμάκων από αυτούς τους φορείς. Ως εκ τούτου, η μαθηματική μοντελοποίηση της διόγκωσης υδροπηκτής και η προβλεψιμότητα της συμπεριφοράς διόγκωσης έχει κερδίσει μεγάλη προσοχή τις τελευταίες δεκαετίες.[27]

Η απορρόφηση νερού αποτελεί ένα σημαντικό κομμάτι στις πρακτικές εφαρμογές των υδροπηκτών που αφορούν τα τραύματα του δέρματος. Για παράδειγμα ένας επίδεσμος πρέπει να έχει την ικανότητα να διατηρεί ένα υγρό περιβάλλον επούλωσης για την πληγή, αλλά και να αποτρέπει την υπερβολική αφυδάτωση και τη συσσώρευση εκκρινμάτων. Με βάση αυτά, η απορρόφηση νερού των μεμβρανών αξιολογήθηκαν κατά τη μελέτη αυτή.[72]

Αυτή η ιδιότητα των υδροπηκτών να διογκώνονται όταν έρθουν σε επαφή με έναν θερμοδυναμικά συμβατό διαλύτη προέρχεται λόγω του ότι τα μόρια του διαλύτη διεισδύουν στο πολυμερικό δίκτυο. Το πολυμερικό πλέγμα επεκτείνεται και επιτρέπει στα μόρια του διαλύτη να διεισδύσουν σε αυτό. Στην περίπτωση των απλών γελών η απώθηση μεταξύ αλυσίδων προκαλείται από τις αλληλεπιδράσεις Van der Waals και περιορίζεται από την εφαρμοζόμενη πίεση και έτσι έχει ως αποτέλεσμα σε μείωση του όγκου της γέλης. Στην περίπτωση των υδροπηκτών η εφαρμοζόμενη πίεση θα περιοριστεί από την οσμωτική πίεση των αντίθετων ιόντων. Ο ρυθμός διόγκωσης προσδιορίζεται και από διάφορες φυσικοχημικές παραμέτρους ιδιαίτερα την ύπαρξη ή μη πορώδους.[72]

Ένα εντελώς στεγνό, προζυγισμένο σε σχήμα δίσκου δείγμα ζυγίστηκε και μετά βυθίστηκε σε περίσσεια διογκωτικού μέσου και πιο συγκεκριμένα σε απεσταγμένο νερό. Σε διάφορα χρονικά διαστήματα, η υδροπηκτική απομακρύνθηκε από το διάλυμα και ζυγίστηκε αφού στυπώθηκε το υπερβολικό διάλυμα στην επιφάνεια. Τα αποτελέσματα υπολογίστηκαν σύμφωνα με την ακόλουθη εξίσωση:

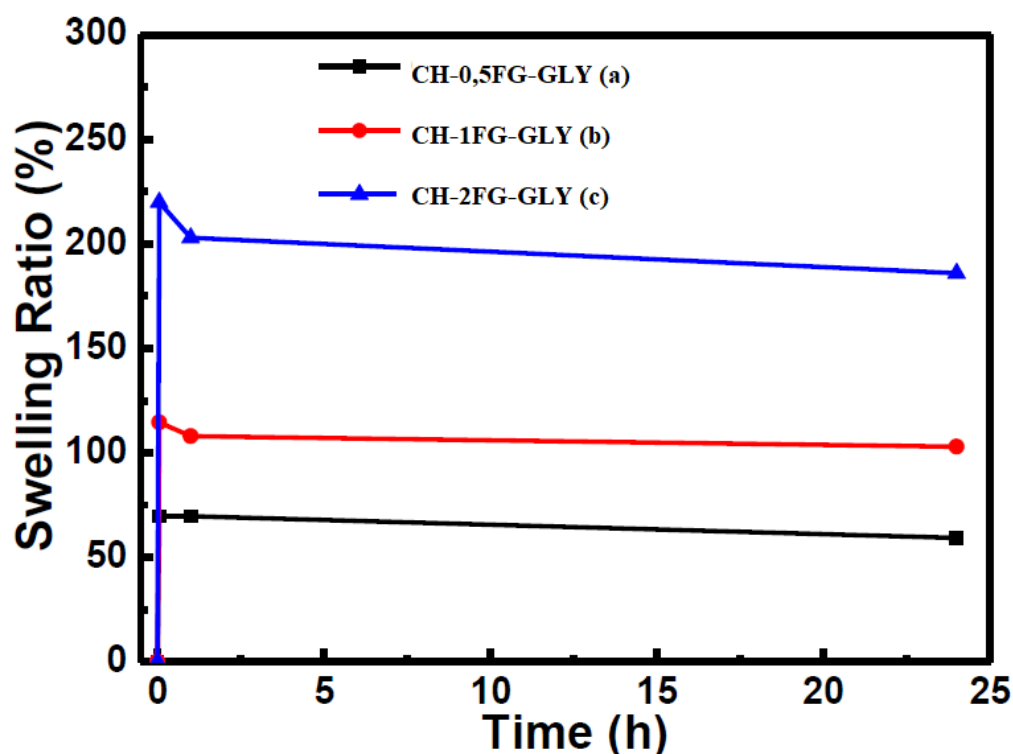
$$WU = (Ws - Wd) / Wd \quad (\text{Εξίσωση 2})$$

Στην παραπάνω εξίσωση (Εξίσωση 2) το WU αναφέρεται ως ο λόγος διόγκωσης, Ws είναι η μάζα σε διογκωμένη κατάσταση και Wd είναι η μάζα σε ξηρή κατάσταση.[44]

Η διόγκωση της υδροπηκτής σε απεσταγμένο νερό φαίνεται στο παρακάτω διάγραμμα αποτελεσμάτων. Τα δείγματα εμφάνισαν υψηλή αναλογία διόγκωσης ισορροπίας, υποδεικνύοντας ότι όλα τα δείγματα ήταν υπεραπορροφητικές υδροπηκτές. Όπως αναμενόταν, η αναλογία διόγκωσης ισορροπίας των υδροπηκτών αυξήθηκε γρήγορα με αύξηση της ζελατίνης ιχθύων στα μίγματα. Αυτό επιβεβαίωσε

περαιτέρω την εξαιρετικά υδρόφιλη δομή αυτής, καθώς θα μπορούσε να απορροφήσει πολύ νερό για να ενισχύσει τον χώρο στις υδροπηκτές. Έτσι, οι εμπλοκές των αλυσίδων μέσω δεσμών υδρογόνου θα μπορούσαν να συμβούν εύκολα σε διαλύματα υψηλής συγκέντρωσης ζελατίνης, οδηγώντας σε αύξηση του λόγου διόγκωσης ισορροπίας με αύξηση της περιεκτικότητας. Η μέγιστη αναλογία διόγκωσης των υδροπηκτών ήταν μεγαλύτερη από 200%, η οποία ήταν σαφώς υψηλότερη από αυτή που παρασκευάστηκε με μικρότερη ποσότητα ζελατίνης ιχθύων. Είναι σημαντικό τα βιοαποδομήσιμα υλικά να έχουν υψηλή αναλογία διόγκωσης για ευρεία εφαρμογή στον βιοϊατρικό τομέα.[26][27]

Παρατηρούμε ότι το ποσοστό διόγκωσης των συγκεκριμένων μιγμάτων μειώνεται με την μείωση της ποσότητας της ζελατίνης ιχθύων, με μία σημαντική πτώση κάτι που μπορεί να αποδοθεί στην διαλυτότητα που προσδίδει η ύπαρξη αυτής.[70][71] Τα αποτελέσματα του ρυθμού διόγκωσης επιβεβαίωσαν τη σημαντική επίδραση της γλυκερόλης στο νερό και την απορρόφηση των μεμβρανών χιτοζάνης/ ζελατίνης. Ο ρυθμός διόγκωσης της μεμβράνης CH-2FG-GLY(c) ήταν 200% ενώ για την μεμβράνη CH-1FG-GLY ήταν 115% και τέλος για την μεμβράνη CH-0,5FG-GLY ήταν 70%.



Διάγραμμα 12. Αποτελέσματα διόγκωσης των υδροπηκτών CH-0,5FG-GLY (a), CH-1FG-GLY (b), CH-2FG-GLY (c).

Οι παραπάνω χαρακτηρισμοί ευαισθησίας στο νερό είχαν παρόμοια χαρακτηριστικά σε σχέση με την προσθήκη ζελατίνης. Η αλλοίωση της απόδοσης θα μπορούσε να αποδοθεί στα εγγενή χαρακτηριστικά της ζελατίνης για τη διατήρηση της υγρασίας και τις αλληλεπιδράσεις μεταξύ χιτοζάνης και ζελατίνης. Όπως είναι γνωστό η χιτοζάνη περιέχει υδρόφιλες ομάδες $-NH_2$ και $-OH$, γεγονός που δείχνει τη

δυνατότητα αύξησης της συγγένειας με το νερό σχηματίζοντας δεσμούς υδρογόνου.[70][71][72]

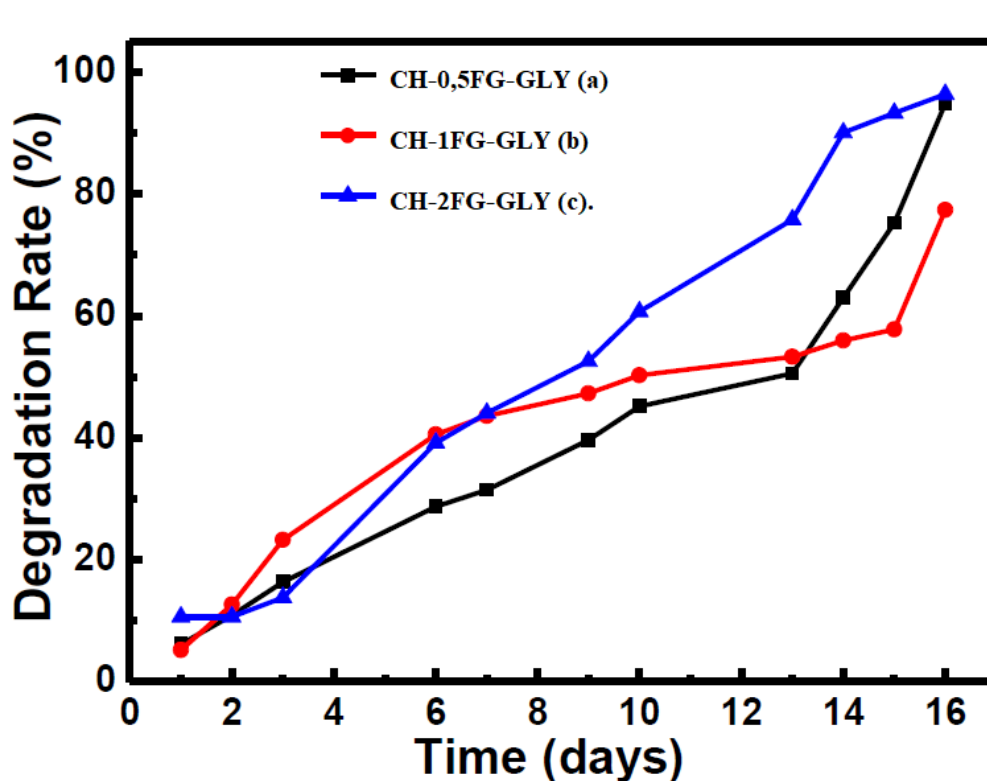
Τέλος, τα περισσότερα από τα υδρόφιλα μόρια του μίγματος έχουν καταληφθεί, οδηγώντας στην έλλειψη ελεύθερων ομάδων για δέσμευση με το νερό. Με την εισαγωγή του μικρομορίου της γλυκερόλης στο μίγμα, η απόσταση από την αλυσίδα χιτοζάνης αυξήθηκε, ελευθερώνοντας έτσι περισσότερες ελεύθερες αμινομάδες για να συνδεθούν με το νερό. Αυτό έχει σαν αποτέλεσμα, την υδροφιλικότητα των μεμβρανών και έτσι ο ρυθμός διόγκωσης βελτιώθηκε σημαντικά με την προσθήκη της ζελατίνης ιχθύων. [68][69]

10.6. Αποτελέσματα Ρυθμού Αποδόμησης

Ο τρόπος με τον οποίο η υδροπηκτική απελευθερώνει το φάρμακο είναι συχνά απαραίτητος για την επίτευξη επιθυμητών θεραπευτικών αποτελεσμάτων και η απαιτούμενη διάρκεια διαθεσιμότητας του φαρμάκου και το προφίλ απελευθέρωσής του εξαρτώνται από τη συγκεκριμένη εφαρμογή. Όταν το φάρμακο εξαντληθεί, η υδροπηκτική θα πρέπει να έχει σχεδιαστεί είτε για αποικοδόμηση για να αποφευχθεί η χειρουργική αφαίρεση είτε για επαναχρησιμοποίηση με επαναπλήρωση φαρμάκου.[73][74] Η αποικοδόμηση της υδροπηκτικής μπορεί επίσης να χρειαστεί να προσαρμοστεί ώστε να συντονίζεται με την αναγέννηση των ιστών. Εκτός από τις γενικές απαιτήσεις, υπάρχουν και άλλες απαιτήσεις που βασίζονται σε εφαρμογές της. Για παράδειγμα, στη θεραπεία τραυμάτων του δέρματος, οι υδροπηκτές τοποθετούνται σε δυναμικές επιφάνειες και πρέπει να προσκολλώνται και να προσαρμόζονται σε τέτοιες επιφάνειες ενώ είναι αρκετά σκληρές ώστε να ανέχονται την κίνηση της επιφάνειας και παραμόρφωση που προέρχεται από το περιβάλλον (για παράδειγμα, συμπίεση και ξύσιμο). Οι ιδιότητες πολλαπλής κλίμακας των υδροπηκτών είναι απαραίτητες για τις λειτουργίες τους, οι οποίες είναι η προστασία, η στόχευση και η τοπική παροχή φαρμάκων με ελεγχόμενο τρόπο. [74]

Υπάρχουν περιπτώσεις στις οποίες η αργή αποικοδόμηση της υδροπηκτικής μπορεί να είναι χρήσιμη, όπως η χορήγηση φαρμάκου και οι εφαρμογές αντικατάστασης μαλακών ιστών, μεταξύ άλλων. Σε τέτοια υλικά μπορούν να ενσωματωθούν βιοαποδομήσιμα μέσα σταυροδεσμών σε υδροπηκτών για να διευκολύνουν και να ελέγξουν την αποικοδόμηση. Μερικά παραδείγματα περιλαμβάνουν εγκλωβισμένα μόρια φιλοξενούμενων φαρμάκων μέσα στη μήτρα. Αυτό στη συνέχεια επέτρεψε να ελέγχεται πλήρως η απελευθέρωση του μορίου του φαρμάκου από την αποικοδόμηση της μήτρας. Η ποσότητα του παράγοντα διασύνδεσης που χρησιμοποιείται στη σύνθεση υδροπηκτικής μπορεί να επηρεάσει τον ρυθμό αποικοδόμησης, μια αύξηση στον αποικοδομήσιμο παράγοντα διασταύρωσης αυξάνει τον αριθμό των αποικοδομήσιμων τμημάτων επιπλέον της αύξησης της πυκνότητας σταυροδεσμών. Ο ρυθμός αποικοδόμησης επηρεάζεται από τον όγκο και την υδροφοβικότητα των πλευρικών αλυσίδων του πολυμερούς.[73]

Για να ταυτοποιηθεί η επίδραση της αντοχής των μεμβρανών, για τα δείγματα χιτοζάνης/γλυκερόλης και αυξανόμενης ποσότητας ζελατίνης ιχθύων αξιολογήθηκε ο ρυθμός αποδόμησης αυτών. Στο διάγραμμα 13 φαίνεται επίσης ότι καθώς αυξάνεται η συγκέντρωση ζελατίνης στο διάλυμα, ο ρυθμός αποικοδόμησης αυξάνεται. Κατά τη διάρκεια των 16 ημερών αποικοδόμησης, το σύστημα με 2gr ζελατίνης αποικοδομήθηκε γρηγορότερα σε σχέση με εκείνο που περιείχε 0,5gr ζελατίνης, ενώ το μίγμα με 1g ζελατίνης είχε μια πτώση της ταχύτητας αποικοδόμησης και έπειτα παρουσίασε ξανά ανοδική πορεία. Αυτό σημαίνει ότι ο ρυθμός αποικοδόμησης των υδροπηκτών χιτοζάνης/ ζελατίνης με χαμηλότερη συγκέντρωση ήταν μικρότερος από αυτούς με υψηλότερες συγκεντρώσεις.



Διάγραμμα 13. Αποτελέσματα αποδόμησης των υδροπηκτών CH-0,5FG-GLY (a), CH-1FG-GLY (b), CH-2FG-GLY (c).

Ο γρήγορος ρυθμός αποικοδόμησης που παρατηρήθηκε για τα δείγματα σε αυτή τη μελέτη μπορεί να αποδοθεί στη χαμηλή κρυσταλλικότητά τους. Αυτό το αποτέλεσμα είναι σύμφωνο με τις προηγούμενες έρευνες που υποδεικνύουν ότι η κρυσταλλωμένη περιοχή στα δείγματα απαγορεύει τη διείσδυση μορίων και προκαλεί λιγότερη αποικοδόμηση. Ο ενισχυμένος ρυθμός αποικοδόμησης του δείγματος με υψηλότερες συγκεντρώσεις θα μπορούσε να εξηγηθεί από τα μορφολογικά χαρακτηριστικά των υδροπηκτών χιτοζάνης/ζελατίνης. [73][74]

Η βιοαποικοδόμηση των μεμβρανών για αντιμετώπιση τραυμάτων είναι μείζονος σημαίας κατά την αναγέννηση του δέρματος, καθώς αποτελεί τη βάση για την

αναδιαμόρφωση και την μορφογένεση για το σχηματισμό λειτουργικού ιστού. Η *in vitro* ενζυματική αποικοδόμηση των μεμβρανών χιτοζάνης/ζελατίνης/γλυκερόλης με διαφορετικό ποσοστό ζελατίνης παρακολούθηθηκαν ως συνάρτηση του χρόνου επώασης, όπως φαίνεται στο διάγραμμα 13. Οι τιμές που μετρήθηκαν ήταν ταυτόσημες με τα αποτελέσματα της δοκιμής διόγκωσης, όπου η αναλογία μάζας αυξήθηκε σημαντικά με την αύξηση της γλυκερόλης. Συνολικά, οι καμπύλες αποικοδόμησης όλων των δειγμάτων δεν είχαν εμφανείς διακυμάνσεις εντός του χρόνου μέτρησης, πράγμα που σημαίνει ότι οι μεμβράνες έχουν καλή σταθερότητα. [44][74]

Παρόλο που η χιτοζάνη αναφέρεται συνήθως ως βιοαποικοδομήσιμη έχει χαμηλές τιμές αποδόμησης με άλλα λόγια η υψηλή σταθερότητα της μεμβράνης χιτοζάνης/ζελατίνης μπορεί να εξηγηθεί από τα φυσικά χαρακτηριστικά της. Επίσης, οι πυκνές μεμβράνες με μεγάλη αναλογία ζελατίνης έχουν συμπαγή δομή δικτύου σε σύγκριση με την δομή ένυδρης υδροπηκτικής. Τα αποτελέσματα της βιοαποικοδόμησης έδειξαν ότι οι μεμβράνες που ελήφθησαν είχαν σχετικά μακροπρόθεσμες σταθερότητες και ήταν κατάλληλο για εξωτερική εφαρμογή σε πληγές δέρματος.[44]

10.7. Αποτελέσματα Αποδέσμευσης Υδροχλωρικής Τετρακυκλίνης

Η συμβατική χορήγηση φαρμάκου απαιτεί συχνά υψηλές δόσεις ή επαναλαμβανόμενη χορήγηση για να αποφέρει ένα σημαντικό θεραπευτικό αποτέλεσμα. Αυτό μπορεί να μειώσει τη συνολική αποτελεσματικότητα και λόγω της μη συμμόρφωσης του ασθενούς να οδηγήσει σε σοβαρές παρενέργειες και ακόμη και σε τοξικότητα. Για την αντιμετώπιση αυτών των ζητημάτων, η έρευνα τις τελευταίες δεκαετίες επικεντρώθηκε σε συστήματα ελεγχόμενης χορήγησης φαρμάκων, συμπεριλαμβανομένων των μεμβρανών. Η υψηλή περιεκτικότητα σε νερό παρέχει φυσική ομοιότητα με τους ιστούς και μπορεί να δώσει στις υδροπηκτές εξαιρετική βιοσυμβατότητα και την ικανότητα να ενθυλακώνουν εύκολα τα υδρόφιλα φάρμακα.[74][75]

Επιπλέον, είναι σημαντικό ότι το μέγεθος του πλέγματος καθορίζει τον τρόπο με τον οποίο τα φάρμακα διαχέονται μέσα στο δίκτυο υδροπηκτικής. Σε μοριακή κλίμακα, μπορεί να συμβούν διάφορες χημικές αλληλεπιδράσεις μεταξύ των φαρμάκων και των πολυμερών αλυσίδων. Οι πολυμερείς αλυσίδες μπορούν να διαθέτουν πολυάριθμες θέσεις για αλληλεπιδράσεις δέσμευσης με τα φάρμακα. [75]

Ο τρόπος με τον οποίο η υδροπηκτική απελευθερώνει το φάρμακο είναι συχνά απαραίτητος για την επίτευξη επιθυμητών θεραπευτικών αποτελεσμάτων και η απαιτούμενη διάρκεια διαθεσιμότητας του φαρμάκου και το προφίλ απελευθέρωσης του εξαρτώνται από τη συγκεκριμένη εφαρμογή. [75] Άλλοι μηχανισμοί διόγκωσης που ανταποκρίνονται σε ερεθίσματα έχουν επίσης αξιοποιηθεί για απελευθέρωση φαρμάκου κατ' απαίτηση. Ένας περιορισμός των συστημάτων ελεγχόμενης διόγκωσης

είναι ότι η απόκριση είναι σχετικά αργή για μακροσκοπικές υδροπηκτές λόγω της αργής διάχυσης του νερού. Για να επιτευχθεί ταχύτερη απόκριση, το μήκος διάχυσης μπορεί να μειωθεί μειώνοντας το μέγεθος της υδροπηκτής ή κατασκευάζοντας διασυνδεδεμένους μακροπόρους μέσα στην υδροπηκτική. Ως εναλλακτική λύση για την αλλαγή της δομής του όγκου μιας υδροπηκτής, έχουν διερευνηθεί επιφανειακά στρώματα που μπορούν γρήγορα να διογκωθούν για τον έλεγχο της διάχυσης του φαρμάκου. [76][77]

Ο μηχανισμός ηλεκτροστατικών αλληλεπιδράσεων έχει μελετηθεί επίσης για να εξηγήσει την αλληλεπίδραση μεταξύ φαρμάκου και πολυμερικών αλυσίδων. Τα φάρμακα απελευθερώνονται όταν η υδροπηκτική είτε αποικοδομείται είτε διογκώνεται ή όταν η ηλεκτροστατική αλληλεπίδραση ελέγχεται από κινητά ιόντα από το περιβάλλον.[75]

Επειδή η απελευθέρωση φαρμάκου από υδροπηκτές μπορεί να περιλαμβάνει διάφορες χημικές, φυσικές και βιολογικές αλληλεπιδράσεις, αυτό περιπλέκει τη θεωρητική πρόβλεψη των προφίλ απελευθέρωσης φαρμάκου. Ωστόσο, καθώς έχουν συλλεχθεί σημαντικά πειραματικά δεδομένα, έχει προκύψει μια πιο θεμελιώδης κατανόηση των μηχανισμών απελευθέρωσης φαρμάκων. Τα πειραματικά δεδομένα σχετικά με την κινητική απελευθέρωσης παρουσιάζονται συνήθως ως η ποσότητα του φαρμάκου που απελευθερώνεται ως συνάρτηση του χρόνου. Τα γενικά προφίλ απελευθέρωσης μπορούν να περιγραφούν με μια εμπειρική εξίσωση Ritger-Peppas:

$$M_t / M_\infty = k * t^n \quad (\text{Εξίσωση 3})[79]$$

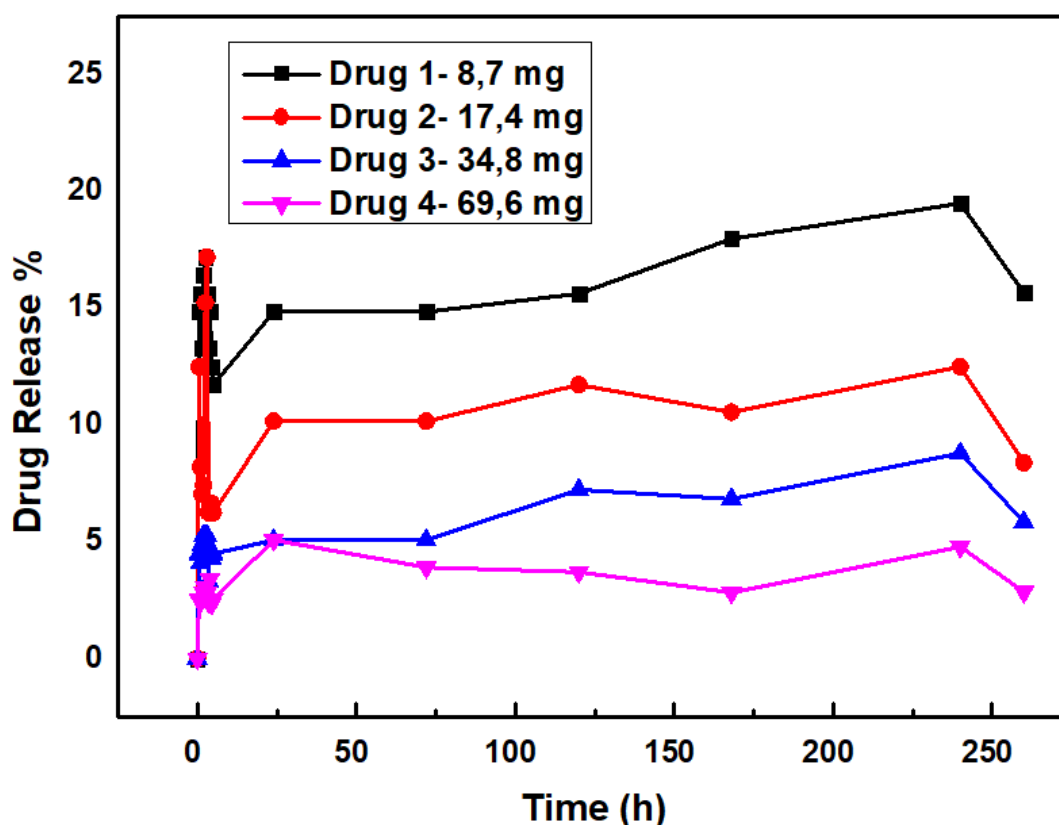
όπου M_t είναι η μάζα του φαρμάκου που απελευθερώνεται τη στιγμή t , M_∞ είναι η συνολική μάζα του απελευθερωμένου φαρμάκου, k είναι ένα κινητική σταθερά, και n είναι ο εκθέτης διάχυσης. Σε αυτή την εξίσωση, το κλάσμα μάζας του φαρμάκου που απελευθερώνεται με το χρόνο ακολουθεί μια σχέση νόμου ισχύος. Η ισχύς n εξαρτάται από τον τύπο μεταφοράς, τη γεωμετρία της υδροπηκτής και τη θέση πολυδιασποράς του πολυμερούς, για $n = 0,5$ το φάρμακο απελευθερώνεται με διάχυση Fickian. και για $n = 1,0$ όταν η επιφανειακή διάβρωση κυριαρχεί στην απελευθέρωση. Σε πολλά συστήματα, η τιμή του n είναι μεταξύ 0,5 και 1,0 επειδή περισσότεροι από ένας μηχανισμοί ελέγχουν την απελευθέρωση σε ένα δεδομένο σύστημα. Η εξίσωση 3 μας επιτρέπει να αναλύσουμε εκ νέου ένα ευρύ φάσμα πειραματικών δεδομένων που υπάρχουν στη βιβλιογραφία. Για να λύσουμε την εξίσωση Ritger-Peppas, πρέπει να προσδιορίσουμε ένα ζεύγος παραμέτρων: την τιμή του k , η οποία προσδιορίζεται μετρώντας το κλάσμα απελευθέρωσης σε μία μονάδα χρόνου (για παράδειγμα, 1 ημέρα) και παρέχει μια ένδειξη της αρχικής κινητικής απελευθέρωσης φαρμάκου και ο χρόνος ημιζωής της απελευθέρωσης ($t_{1/2}$), ο οποίος ορίζεται ως ο χρόνος κατά τον οποίο το κλάσμα μάζας του φαρμάκου που απελευθερώνεται (M_t/M_∞) είναι ίσο με 50% και παρέχει μια ένδειξη παρατεταμένης απελευθέρωσης φαρμάκου σε ένα συγκεκριμένο σύστημα. Αυτές οι δύο παράμετροι μας επιτρέπουν να συγκρίνουμε τις ιδιότητες απελευθέρωσης φαρμάκων διαφορετικών συστημάτων. Η απελευθέρωση μπορεί να επιβραδυνθεί με διάφορους μηχανισμούς. [79] Οι ηλεκτροστατικές αλληλεπιδράσεις και οι υδρόφοβοι συσχετισμοί συνήθως οδηγούν σε χρόνο ημιζωής

περίπου 2-3 ημέρων, λόγω της σχετικά ασθενούς αντοχής δεσμού μεταξύ του φαρμάκου και του πολυμερούς. Χαμηλότεροι ρυθμοί απελευθέρωσης (έως και μια εβδομάδα) μπορούν να επιτευχθούν με τη χρήση διασπώμενων ομοιοπολικών δεσμών ή ελεγχόμενων μηχανισμών αποκωδόμενης. [78][79]

Ως προς την πειραματική διαδικασία τα δείγματα που χρησιμοποιήθηκαν για τη δοκιμή απελευθέρωσης φαρμάκου παρασκευάστηκαν με την προσθήκη διαφορετικών ποσοτήτων ΤΗ στις υδροπηκτές χιτοζάνης/ζελατίνης. Η ικανότητα φόρτωσης φαρμάκου των μεμβρανών υπολογίστηκε ως εξής:

$$DLR = \frac{M_d}{M} \times 100\% \quad (\text{Εξίσωση 4})$$

όπου M_d είναι το βάρος του φαρμάκου που υπάρχει στο δείγμα και M είναι το βάρος του δείγματος. [44]



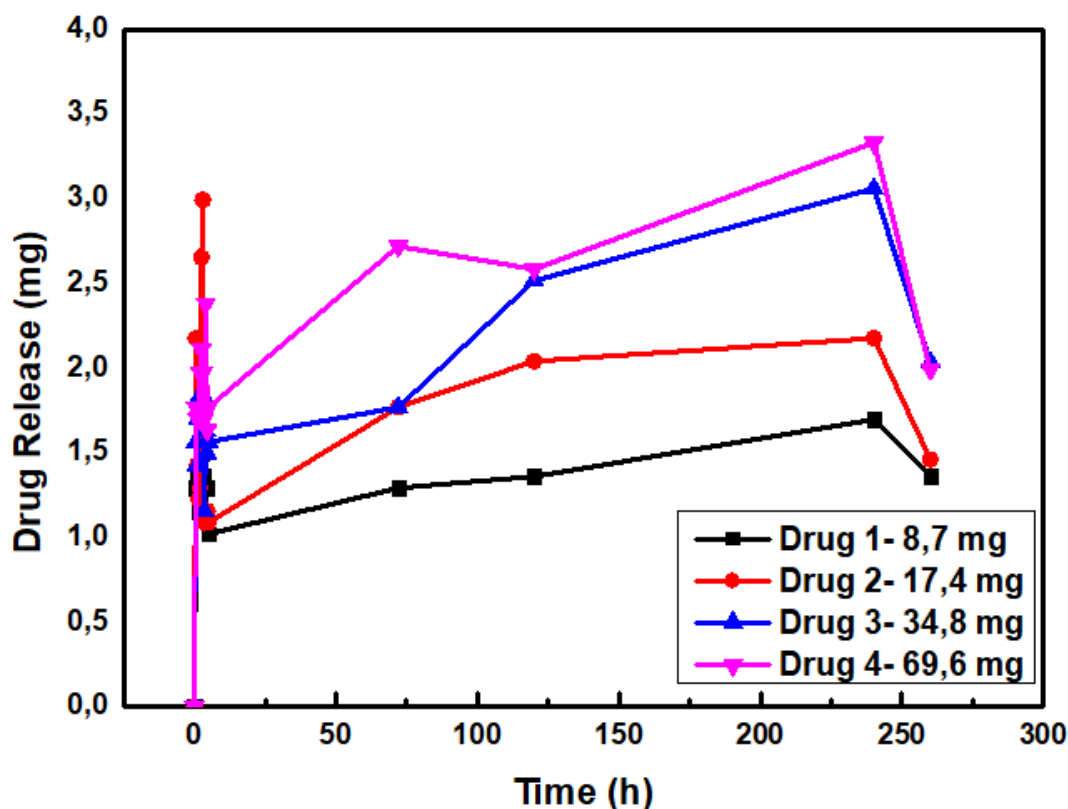
Διάγραμμα 14. Αποτελέσματα ποσοστού απελευθέρωσης υδροχλωρικής τετρακυκλίνης CH-0,5FG-GLY (a), CH-1FG-GLY (b), CH-2FG-GLY (c).

Η δοκιμή απελευθέρωσης πραγματοποιήθηκε με εμβάπτιση δειγμάτων σε 0,02 mL φυσιολογικού ορού με επώαση σε θερμοκρασία δωματίου και σε προκαθορισμένα χρονικά όρια. Η συγκέντρωση του μέσου απελευθέρωσης μετρήθηκε χρησιμοποιώντας φασματοφωτόμετρο ELISA.

Ένα σημαντικό ζήτημα για τις υδροπηκτές οι οποίες προορίζονται για επούλωση τραυμάτων είναι η χορήγηση των δραστικών ουσιών με ελεγχόμενη

αποδεσμευσή τους. Υποθέτουμε ότι οι μεμβράνες χιτοζάνης μπορούν παρέχουν πολλές βιοχημικές ενδείξεις για τη δημιουργία μιας τεχνητής θέσης για ελεγχόμενη αποδέσμευση.[44]

Με βάση την παραπάνω ανάλυση, η μεμβράνη χιτοζάνης με 0,5g ζελατίνης θεωρήθηκε ότι είχε σχετικά καλές επιδόσεις και υιοθετήθηκε ως φορέας για μέτρηση απελευθέρωσης φαρμάκου. Το διάγραμμα 14 έδειξε τα προφίλ απελευθέρωσης υδροχλωρικής τετρακυκλίνης (TH) για διαφορετικές ποσότητες φαρμάκου. Οι μεμβράνες με την μικρότερη ποσότητα φαρμάκου είχαν υψηλότερες τιμές αποδέσμευσης από εκείνες με την μεγαλύτερη ποσότητα φαρμάκου. Για την αποδέσμευση της υδροχλωρικής τετρακυκλίνης TH, οι μέγιστες τιμές ήταν περίπου 22% για την μικρότερη περιεκτικότητα σε TH και 5% για την μέγιστη περιεκτικότητα αντίστοιχα.[44][78]



Διάγραμμα 15. Αποτελέσματα απελευθέρωσης μάζας υδροχλωρικής τετρακυκλίνης CH-0,5FG-GLY (a), CH-1FG-GLY (b), CH-2FG-GLY (c).

Η αθροιστική απελευθέρωση φαρμάκων από μεμβράνες χιτοζάνης/ζελατίνης παρουσίασε εμφανή έκρηξη εντός 24 ωρών, λόγω της ταχείας απελευθέρωσης από τις επιφανειακές ζώνες. Αυτά τα αποτελέσματα έδειξαν ότι αυτή η μεμβράνη χιτοζάνης/ζελατίνης ήταν ικανή για ελεγχόμενη χορήγηση φαρμάκου με καλές ιδιότητες και αργή απελευθέρωση. Αυτό συμβαίνει λόγω της διαφοράς δυναμικού η οποία είναι η κινητήριος δύναμη για μεταφορά της δραστικής ουσίας και κατ' επέκταση αλλαγή στην συγκέντρωση της υδροχλωρικής τετρακυκλίνης μέσω

διάχυσης. Έτσι οι εκκρίσεις του εγκαύματος που δεν περιέχουν την δραστική ουσία έχουν μηδενικό δυναμικό και μέγιστο δυναμικό η υδροπηκτή η οποία περιέχει υδροχλωρική τετρακυκλίνη και λόγω αυτής της διαφοράς δυναμικού απελευθερώνεται η δραστική ουσία στο τραύμα.[44][78]

Οι υδροπηκτές έχουν χρησιμοποιηθεί για την παροχή υδρόφιλων, μικρών μορίων φαρμάκων που έχουν υψηλές διαλυτότητες τόσο στην υδρόφιλη μήτρα υδροπηκτής όσο και στον υδατικό διαλύτη στον οποίο διογκώνεται. Σε αυτή την περίπτωση, είναι σχετικά απλό να φορτωθεί μια μεγάλη ποσότητα φαρμάκου σε μια διογκωμένη υδρογέλη με απλή κατανομή από ένα συμπυκνωμένο υδατικό διάλυμα φαρμάκου και στη συνέχεια να απελευθερωθεί το ωφέλιμο φορτίο του υδρόφιλου φαρμάκου σε ένα υδατικό περιβάλλον. Ωστόσο, αυτή η διαδικασία είναι σχετικά αναποτελεσματική στην περίπτωση μεγάλων μακρομοριακών φαρμάκων που έχουν διαχυτικούς περιορισμούς. [78]

Στην παρούσα πειραματική διαδικασία ναι μεν η μικρότερη ποσότητα φαρμάκου αποδίδει σε ποσοστό μεγαλύτερη απελευθέρωση δραστικής ουσίας επι της εκατό. Βέβαια, όπως παρατηρούμε στο διάγραμμα 15 η ποσότητα μάζας δραστικής ουσίας η οποία απελευθερώθηκε δείχνει ότι η υδροπηκτή η οποία περιείχε την μεγαλύτερη ποσότητα υδροχλωρικής τετρακυκλίνης αναλογικά απελευθέρωσε περισσότερη ποσότητα σε σχέση με την αρχική ποσότητα. Οπότε η απελευθέρωση εξαρτάται από την ποσότητα δραστικής ουσίας που περιλαμβάνει η εκάστοτε μεμβράνη. [75][78]

Συμπεράσματα

Στην παρούσα διπλωματική εργασία έγινε ανάπτυξη και χαρακτηρισμός πολυμερικών υδροπηκτών ώστε να γίνει ενσωμάτωση δραστικής ουσίας και συγκεκριμένα της υδροχλωρικής τετρακυκλίνης (ΤΗ).

Αρχικά έγινε σύνθεση τεσσάρων πολυμερικών μεμβρανών χιτοζάνης/γλυκερόλης με διαφορετικές συγκεντρώσεις ζελατίνης ιχθύων. Κατά τον χαρακτηρισμό αυτών των υδροπηκτών παρατηρήθηκε ότι η μεμβράνη με συγκέντρωση 0,5gr ζελατίνης ιχθύων ήταν η καταλληλότερη για την ενσωμάτωση της δραστικής ουσίας διότι έχει πιο αργό ρυθμό αποδόμησης από όλες τις υπόλοιπες συνθέσεις υδροπηκτών. Εν συνεχεία έγινε ενσωμάτωση υδροχλωρικής τετρακυκλίνης ώστε να μελετηθεί η απελευθέρωση δραστικής ουσίας από την υδροπηκτική στο τραυματισμένο δέρμα.

Ο χαρακτηρισμός απέδειξε αλληλεπίδραση της χιτοζάνης με την ζελατίνη ιχθύων και λόγω της γλυκερόλης οι μεμβράνες απέκτησαν ελαστικότητα. Έτσι ο υδρόφιλος χαρακτήρας της γλυκερόλης η οποία δρα σαν πλαστικοποιητής, έχει την ίδια ικανότητα με το νερό, γι' αυτό το λόγο όσο μειώνεται το ποσοστό του νερού αυξάνονται και οι μηχανικές ιδιότητες της υδροπηκτικής.

Τα δείγματα που χρησιμοποιήθηκαν για τη δοκιμή απελευθέρωσης φαρμάκου παρασκευάστηκαν με την προσθήκη διαφορετικών ποσοτήτων ΤΗ στις υδροπηκτές χιτοζάνης/ζελατίνης. Η δοκιμή απελευθέρωσης πραγματοποιήθηκε με εμβάπτιση δειγμάτων σε 0,02 mL φυσιολογικού ορού με επώαση σε θερμοκρασία δωματίου και σε προκαθορισμένα χρονικά όρια. Η συγκέντρωση του μέσου απελευθέρωσης μετρήθηκε χρησιμοποιώντας ένα φασματοφωτόμετρο ELISA.

Οι μεμβράνες με την μικρότερη ποσότητα φαρμάκου είχαν υψηλότερες τιμές αποδέσμευσης από εκείνες με την μεγαλύτερη ποσότητα φαρμάκου. Για την αποδέσμευση της υδροχλωρικής τετρακυκλίνης ΤΗ, οι μέγιστες τιμές ήταν περίπου 22% για την μικρότερη περιεκτικότητα σε ΤΗ και 5% για την μέγιστη περιεκτικότητα αντίστοιχα. Επειδή η απελευθέρωση φαρμάκου από υδροπηκτές μπορεί να περιλαμβάνει διάφορες χημικές, φυσικές και βιολογικές αλληλεπιδράσεις, αυτό περιπλέκει τη θεωρητική πρόβλεψη των προφίλ απελευθέρωσης φαρμάκου, αυτό συμβαίνει διότι το φάρμακο απελευθερώνεται με διάχυση Fickian. Βέβαια η ποσότητα μάζας δραστικής ουσίας η οποία απελευθερώθηκε δείχνει ότι η υδροπηκτική η οποία περιείχε την μεγαλύτερη ποσότητα υδροχλωρικής τετρακυκλίνης αναλογικά απελευθέρωσε περισσότερη ποσότητα σε σχέση με την αρχική ποσότητα που περιείχε η εκάστοτε μεμβράνη. Οπότε η απελευθέρωση εξαρτάται από την ποσότητα δραστικής ουσίας που περιλαμβάνει η εκάστοτε μεμβράνη.

Μελλοντικοί Στόχοι

Με βάση τα πειραματικά δεδομένα που αποκομήθηκαν από την παρούσα διπλωματική εργασία παρατηρήθηκε ότι υπάρχει μια πολύ καλή πρώτη εικόνα ως προς την ανάπτυξη πολυμερικών μεμβρανών και μια αξιόλογη απελευθέρωση δραστικής ουσίας και πιο συγκεκριμένα της υδροχλωρικής τετρακυκλίνης. Παρόλα αυτά οι μηχανισμοί διάγκωσης και συνεπώς απελευθέρωσης της υδροχλωρικής τετρακυκλίνης χρήζουν περαιτέρω μελέτης, όπως για παράδειγμα άλλοι μηχανισμοί διάγκωσης που ανταποκρίνονται σε ερεθίσματα οι οποίοι έχουν επίσης αξιοποιηθεί για απελευθέρωση φαρμάκου κατ' απαίτηση. Ένας περιορισμός των συστημάτων ελεγχόμενης διάγκωσης είναι ότι η απόκριση είναι σχετικά αργή για μακροσκοπικές υδροπηκτές λόγω της αργής διάχυσης του νερού. Γι' αυτό το λόγο θα χρήζει έρευνας, το μήκος διάχυσης το οποίο μπορεί να μειωθεί μειώνοντας το μέγεθος της υδροπηκτής ή κατασκευάζοντας διασυνδεδεμένους μακροπόρους μέσα στην υδροπηκτική. Ως εναλλακτική λύση για την αλλαγή της δομής του όγκου μιας υδροπηκτής, μπορούν να αναπτυχθούν επιφανειακά στρώματα που μπορούν γρήγορα να διογκωθούν για τον έλεγχο της διάχυσης του φαρμάκου.

Έπειτα σημαντική μελέτη θα αποτελούσε η αύξηση της θερμοκρασίας για την εξάτμιση του διαλύτη και η μελέτη του συστήματος των μεμβρανών που θα προκύψουν αλλά και η αποδέσμευση δραστικής ουσίας σε περιβάλλον το οποίο εκλύει θερμότητα. Μια τελική προσέγγιση για την απελευθέρωση παγιδευμένων μορίων φαρμάκου είναι η μηχανική παραμόρφωση του δικτύου, καθώς αυτό μπορεί να αυξήσει το μέγεθος του πλέγματος αλλάζοντας τη δομή του δικτύου και να ενεργοποιήσει τη ροή μεταφοράς εντός του δικτύου. Αυτή η στρατηγική μπορεί να δημιουργήσει μοτίβα παλμικής απελευθέρωσης με λεπτό έλεγχο του μεγέθους του ρυθμού στιγμιαίας απελευθέρωσης. Η παραμόρφωση του δικτύου μπορεί να επιτευχθεί χρησιμοποιώντας διάφορες προσεγγίσεις, συμπεριλαμβανομένων καθαρά μηχανικών παραμορφώσεων ή παραμορφώσεων που προκαλούνται από υπερήχους και μαγνητικό πεδίο το οποίο όμως μπορεί να οδηγήσει σε καταστροφή των υδροπηκτών. Αυτό το πρόβλημα μπορεί ενδεχομένως να αντιμετωπιστεί με αυτοθεραπευόμενες υδροπηκτές.

Παρόλα αυτά η απελευθέρωση της υδροχλωρικής τετρακυκλίνης χρήζει περαιτέρω μελέτης ως προς την αύξηση της ελεγχόμενης αποδέσμευσής της και η μελέτη της συνιστώμενης δοσολογίας η οποία πρέπει να αναλυθεί με βάση το ιστορικό του ασθενούς και το μέγεθος του διαδερμικού τραύματος από τον θεράποντα ιατρό. Έτσι πολύ βασικό μελλοντικό στόχο αποτελεί η περαιτέρω μελέτη των μεμβρανών οι οποίες περιέχουν υδροχλωρική τετρακυκλίνη σε κλινικά διαδερμικά τραύματα σε συνεργασία με εξειδικευμένο ιατρικό προσωπικό το οποίο θα καθορίσει και την αποτελεσματικότητα αυτών.

Βιβλιογραφία

- [1] Takanori Igarashi, Ko Nishino, Shree K. Nayar. The Appearance of Human Skin. Technical Report: CUCS-024-05, June 2005; Department of Computer Science, Columbia University, New York, NY 10027, USA.
- [2] Ulrich F. Schaefer, Steffi Hansen, Marc Schneider, Javiana Luengo Contreras, Claus-Michael Lehr. Drug Absorption Studies; Biotechnology: Pharmaceutical Aspects 2008;7:pp 3-33. Models for Skin Absorption and Skin Toxicity Testing. Book: Drug Absorption Studies.Springer US
- [3] infovisual.info
- [4] Structure and function of human skin. Pharmaceutical Press. 2003
- [5] Gladimir V. G. Baranoski, Aravind Krishnaswamy. An Introduction to Light Interaction with Human Skin. RITA,2004;11(1).
- [6] Feng Xu, Tianjian Lu. Introduction to Skin Biothermomechanics and Thermal Pain, Chapter 2:Skin Structure and Skin Blood Flow. Science Press Beijing and Springer-Verlag Berlin Heidelberg 2011.
- [7] R. Rox Anderson, John A. Parrish. The optics of human skin. The journal of Investigative Dermatology. 1981;77:13-19.
- [8] Nava Dayan. Stratum Corneum: The Role of Lipids and Ceramides. Lipo Chemicals Inc, Paterson, N.J, USA
- [9] www.medphys.ucl.ac.uk/research/borg/.../thesis/chapter2.pdf. Chapter2: Light Transport in Biological Tissue.pp:28-52.
- [10] Antony R Young. Chromophores in human skin. Physics in Medicine and Biology. 1997;42:789–802.
- [11] Norimichi Tsumura, Miki Kawabuchi, Hideaki Haneishi, Yoichi Miyake. Mapping Pigmentation in Human Skin from a Multi-Channel VisibleSpectrum Image by Inverse Optical Scattering Technique. Journal Of Imaging Science And Technology. 2001;45(5):444-450.
- [12] ΕΛΛΗΝΙΚΗ ΔΕΡΜΑΤΟΧΕΙΡΟΥΡΓΙΚΗ, Τόμος 6, (1):32-51, 2009, Υποκατάστατα Δέρματος, Skin Substitutes.
- [13] Komgova R. Burn wound coverage and burn wound closure. Acta Chir Plast. 2000; 42:64-68.
- [14] Jones L, Currie L, Martin R. A guide to biological skin substitutes. Br J Plast Surg. 2002; 55(3):185-193.
- [15] Brown AS, Barot LR. Biological dressings and skin substitutes. Clin Plast Reconstr Surg. 1986; 13:69-74.
- [16] Behar D, Juszynski M, Ben Hur N, Golan J, Eldad A, Tuchman Y, Sterenberg N, Rudensky B. Omiderm, a new synthetic wound covering: Physical properties and drug permeability studies. Journal of biomedical materials research. 2004 Sep 13; 20(6):731–738.
- [17] Nowicki CR, Sprenger C. Temporary skin substitutes for burn patients: a nursing perspective. J Burn Care Rehab. 1988; 9(2):209-215.

- [18] Ravi Kumar M. N. V., Muzzarelli R. A. A., Muzzarelli C., Sashiwa H., Domb A. J. Chitosan Chemistry and Pharmaceutical Perspectives. *Chemical Reviews*, 2004, 104, 6017-6084.
- [19] Chitosan History., <http://healthy-line.com/articles/new/the-history-of-chitosan.html>
- [20] Rinaudo M. Chitin and chitosan: Properties and applications. *Progress in Polymer Science* 2006, 31, 603-632.
- [21] Mourya V. K., Inamdar N. N. Chitosan-modifications and applications: Opportunities galore. *Reactive & Functional Polymers* 2008, 68, 1013-1051.
- [22] Kurita K. Controlled functionalization of the polysaccharide chitin. *Progress in Polymer Science* 2001, 26, 1921-1971.
- [23] Ravi Kumar M. N. V. A review of chitin and chitosan applications. *Reactive & Functional Polymers* 2000, 46, 1-27.
- [24] Liu X. F., Guan Y. L., Yang D. Z., Li Z., Yao K. D. Antibacterial action of chitosan and carboxymethylated chitosan. *Journal of Applied Polymer Science* 2001, 79, 1324-1335.
- [25] Jayakumar R., Prabakaran M., Reis R. L., Mano J. F. Graft copolymerized chitosan—present status and applications. *Carbohydrate Polymers* 2005, 62, 142-158
- [26] Gupta P., Vermani K., Garg S. Hydrogels: from controlled release to pH-responsive drug delivery. *Drug Discovery Today* 2002, 7, 569-579.
- [27] Hoare T. R., Kohane D. S. Hydrogels in drug delivery: Progress and challenges. *Polymer* 2008, 49, 1993-2007.
- [28] Berger J., Reist M., Mayer J. M., Felt O., Peppas N. A., Gurny R. Structure and interactions in covalently and ionically crosslinked chitosan hydrogels for biomedical applications. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics* 2004, 57, 19-34.
- [29] Qu X., Wirse'n A., Albertsson C. Novel pH-sensitive chitosan hydrogels: swelling behaviour and states of water. *Polymer* 2000, 41, 4589-4598.
- [30] Klumb L. A., Horbett T. A. Design of insulin delivery devices based on glucose sensitive membranes. *Journal of Controlled Release* 1992, 18, 59-80.
- [31] Brannon-Peppas L. *Polymers in Controlled Drug Delivery* <http://www.devicelink.com/mpb/archive/97/11/003.html>
- [32] Orive G., Gascón A. R., Hernández R. M., Domíndez-Gil A., Pedraz J. L. Techniques: New approaches to the delivery of biopharmaceuticals. *Trends in Pharmacological Sciences* 2004, 25, 382-387.
- [33] Vasil'ev A. E., Krasnyuk I. I., Ravikumar S., Tokhmakhchi V. N. Transdermal Therapeutic Systems for Controlled Drug Release. *Pharmaceutical Chemistry Journal* 2001, 35, 613-626.
- [34] Marier J., Lor M., Potvin D., DiMarco M., Morelli G., Sædder E. A. Pharmacokinetics, Tolerability and Performance of a Novel Matrix Transdermal Delivery System. *The Journal of Clinical Pharmacology* 2006, 46, 642-653.

- [35] Valenta C., Auner B. G. The use of polymers for dermal and transdermal delivery. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics* 2004, 58, 279-289.
- [36] El-Refaie Kenawy , Gary L. Bowlin , Kevin Mansfield , John Layman , David G. Simpson , Elliot H. Sanders , Gary E. Wnek , Release of tetracycline hydrochloride from electrospun poly(ethylene-co-vinylacetate), poly(lactic acid), and a blend, *Journal of Controlled Release* 81 (2002) 57–64
- [37] Prasad, A. R. ., & Rao, V. ., Spectrophotometric methods for the microdetermination of oxytetracycline and hostacycline., *Science World Journal*, 5, 1, 1597-6343
- [38] P Karuppuswamy, JR Venugopal, B Navaneethan- Polycaprolactone nanofibers for the controlled release of tetracycline hydrochloride, *Materials Letters*, 141, 15, 180-186
- [39] Wei Shao Hui Liu Shuxia Wang Jimin Wu Min, Huang Huihua Min Xiufeng Liu, Controlled release and antibacterial activity of tetracycline hydrochloride-loaded bacterial cellulose composite membranes, *Carbohydrate Polymers*, 145, 2016, 114-120
- [40] Sadaf Samimi Gharai, Sima Habibi and Hosein Nazockdast, Fabrication and characterization of chitosan/gelatin/thermoplastic polyurethane blend nanofibers *Journal of Textiles and Fibrous Materials*, 1, 1–8.
- [41] A. Skoog, D., F.J. Holler, and T. A. Nieman, *Principles of instrumental analysis*, 5th ed, Philadelphia, 1998.
- [42] Sofia G., Caridade Esther G, .Merino Natália M. Alves Verónica de Zea Bermudez Aldo R, .Boccaccini João F. Mano, Chitosan membranes containing micro or nano-size bioactive glass particles: evolution of biomineralization followed by in situ dynamic mechanical analysis, *Journal of the Mechanical Behavior of Biomedical Materials* , Volume 20, April 2013, Pages 173-183
- [43] Ioannis S.Arvanitoyannis, Atsuyoshi Nakayama Sei-ichi Aiba, Chitosan and gelatin based edible films: state diagrams, mechanical and permeation properties, *Carbohydrate Polymers*, Volume 37, Issue 4, December 1998, Pages 371-382
- [44] Ye Ma, Lian Xin, Huaping Tan, Ming Fan, Jianliang Li, Yang Jia, Zhonghua Ling, Yong Chen, Xiaohong Hu, ,Chitosan membrane dressings toughened by glycerol to load antibacterial drugs for wound healing, *Materials Science & Engineering C* , 81, 2017, 522-531.
- [45] Φιλομήλα Κομνηνού, «Δομικός χαρακτηρισμός υλικών με τις τεχνικές της ηλεκτρονικής μικροσκοπίας», ΑΠΘ, 200
- [46] Φασματοσκοπία και Μικροσκοπία, in *Αρχές Ενόργανης Ανάλυσης*. 2002, Εκδόσεις Κωσταράκης.
- [47] A. Skoog, D., F.J. Holler, and T. A. Nieman, Θερμικές μέθοδοι, in *Αρχές Ενόργανης Ανάλυσης*. 2002, Εκδόσεις Κωσταράκης.
- [48] A. Skoog, D., F.J. Holler, and T. A. Nieman, Εισαγωγή στη Φασματομετρία Μοριακής Απορρόφησης στο Υπεριώδες/Ορατό (UV/Vis), in *Αρχές Ενόργανης Ανάλυσης*. 2002, Εκδόσεις Κωσταράκης

- [49] http://www.chemistry.uoc.gr/aspyros/AnalChem2/AC2_pres6.pdf
- [50] Δεληγιαννάκης, Ι., 2014. Δομικός και Χημικός Χαρακτηρισμός των Υλικών. Περίθλαση Ακτίνων Χ Νετρονίων Ηλεκτρονίων. <http://ecourse.uoi.gr/course/view.php?id=1356>. Παρουσίαση, Πανεπιστήμιο Ιωαννίνων.
- [51] Ηλιόπουλος, Ι., 2017. Περιθλασιμετρία Ακτίνων Χ. Παρουσίαση, Πανεπιστήμιο Πατρών
- [52] Γ. Στεργιούδης, «Ακτίνες Χ (XRD)», ΑΠΘ, 2007-2008.
- [53] Εργαστήριο Υλικών Ι : Τεχνικές Χαρακτηρισμού Υλικών", Δ. Αναγνωστόπουλος, Δ. Γουρνής, Μ.Α. Καρακασίδης και Δ. Παπαγιάννης, Ιωάννινα 2019, Άσκηση 10
- [54] K. Janssens, F. Adams and A. Rindby, Microscopic X-Ray Fluorescence Analysis. Wiley, Chichester, 2004.
- [55] Menard K., "Dynamic Mechanical Analysis – an introduction", CRC Press, Boca Raton 2008.
- [56] Sepe M., "Dynamic Mechanical Analysis for Plastics Engineering", Plastics Design Library, Norwich 2008.
- [57] R. Karl Malcolm, «A dynamic mechanical method for determining the silicone elastomer solubility of drugs and pharmaceutical excipients in silicone intravaginal drug delivery rings,» Biomaterials, τόμ. 23, p. 3589–3594, 2002.
- [58] M. Akbar Afaghi-Khatibi, «Characterisation of fibre/matrix interfacial degradation under cyclic fatigue loading using dynamic mechanical analysis,» Composites: Part A, τόμ. 33, pp. 1585-1592, 2002.
- [59] D. Jones, «Dynamic mechanical analysis of polymeric systems of pharmaceutical and biomedical significance,» International Journal of Pharmaceutics, τόμ. 179, p. 167–178, 1999.
- [60] M. Cespi, G. Bonacucina, G. Mencarelli, L. Casettari και G. F. Palmieri, «Dynamic mechanical thermal analysis of hypromellose 2910 free films,» European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics, τόμ. 79, pp. 458-463, 2011.
- [61] H. Fadda, M. Khanna, J. Santos, D. Osman, S. Gaisford και A. Basit, «The use of dynamic mechanical analysis (DMA) to evaluate plasticization of acrylic polymer films under simulated gastrointestinal conditions,» European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics, τόμ. 76, pp. 493-497, 2010.
- [62] <http://cepclab.org.in/?p=436>
- [63] Αδημοσίευτα πειραματικά δεδομένα της διδακτορικής διατριβής του Διδακτορικού ερευνητή Ανδρέα Καρύδη-Μεσσίνη, 2021.
- [64] Hideaki Nagahama, Hosei University, H. Maeda, T. Kashiki, R. Jayakumar, Preparation and characterization of novel chitosan/gelatin membranes using chitosan hydrogel, 2009 Carbohydrate Polymers 76(2):255-260.
- [65] Chau Tran Thi Bich Vo, Tien Tran Trung, Nguyen Sinh, Fabrication and Characterization of Gelatin/Chitosan Hydrogel Membranes, Journal of the Turkish Chemical Society Section A: Chemistry, 2021, 8, 4, 1045 – 1056.

- [66] Qiang-Song Wang, Yun Qi, Yuan-Lu Cui, Preparation, characterization, and evaluation of genipin crosslinked chitosan/gelatin three-dimensional scaffolds for liver tissue engineering applications, Article in Journal of Biomedical Materials Research Part A, 2016.
- [67] Lin-Chen Lva, Qing-Yun Huanga, Wen Dinga, Xing-Hua Xiaoa, Hong-Yan Zhangb, Li-Xia Xiong, Fish gelatin: The novel potential applications, Journal of Functional Foods, 63, 2019, 103581.
- [68] Giuseppe Bagnato, Adolfo Iulianelli, Aimaro Sanna, Angelo Basile, Glycerol Production and Transformation: A Critical Review with Particular Emphasis on Glycerol Reforming Reaction for Producing Hydrogen in Conventional and Membrane Reactors, Special Issue Ceramic Membranes and Applications, 2017, 7(2), 17
- [69] Yuanmeng Xia, Yuanpeng Wu, Tian Yu, Shishan Xue, Meiling Guo, Jingliang Li and Zhenyu Li, Multifunctional Glycerol–Water Hydrogel for Biomimetic Human Skin with Resistance Memory Function , 2019, 11, 23, 21117-21125
- [70] Xiaofeng Pan, Qinhua Wang, Dengwen Ning, Lei Dai, Kai Liu, Yonghao Ni, Lihui Chen, and Liulian Huang, Ultraflexible Self-Healing Guar Gum-Glycerol Hydrogel with Injectable, Antifreeze, and Strain-Sensitive Properties, 2018, 4, 9, 3397–3404
- [71] Ponsubha S, Amit Kumar Jaiswal, Effect of interpolymer complex formation between chondroitin sulfate and chitosan-gelatin hydrogel on physico-chemical and rheological properties, Carbohydrate Polymers 238 (2020) 116179
- [72] ChunyuChangBoDuanJieCaiLinaZhang, Superabsorbent hydrogels based on cellulose for smart swelling and controllable delivery, European Polymer Journal , 46, 1, 2010, 92-100
- [73] F. Ganji · M. J. Abdekhodaie · A. Ramazani S.A., Gelation time and degradation rate of chitosan-based injectable hydrogel, J Sol-Gel Sci Techn (2007) 42:47–53
- [74] Ryan A. McBath and Devon A. Shipp, Swelling and degradation of hydrogels synthesized with degradable poly(b-amino ester) crosslinkers, Polym. Chem., 2010, 1, 860–865.
- [75] Jianyu Li, David J. Mooney, Designing hydrogels for controlled drug delivery, Nature 1, (2016), 1, 16071.
- [76] Fariba Ganji, Samira Vasheghani Farahani, Ebrahim Vasheghani-Farahani, Theoretical Description of Hydrogel Swelling: A Review, Iranian Polymer Journal 19(5):375-398.
- [77] N. Vishal Gupta and H.G. Shivakumar, Investigation of Swelling Behavior and Mechanical Properties of a pH-Sensitive Superporous Hydrogel Composite, Iran J Pharm Res. 2012, 11(2): 481–493.

- [78] Tse-Ying Liu ,San-Yuan Chena, Jo-Hao Li ,Dean-Mo Liu, Study on drug release behaviour of CDHA/chitosan nanocomposites—Effect of CDHA nanoparticles, *Journal of Controlled Release*, Volume 112, Issue 1, 1 May 2006, Pages 88-95
- [79] Philip L.Ritger, Nikolaos A.Peppas, A simple equation for description of solute release I. Fickian and non-fickian release from non-swellable devices in the form of slabs, spheres, cylinders or discs, *Journal of Controlled Release*, 5, 1, 1987, 23-36.