



ΕΛΛΗΝΙΚΗ ΔΗΜΟΚΡΑΤΙΑ

Εθνικόν και Καποδιστριακόν
Πανεπιστήμιον Αθηνών

——— ΙΔΡΥΘΕΝ ΤΟ 1837 ———

ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ

ΤΜΗΜΑ ΦΑΡΜΑΚΕΥΤΙΚΗΣ

ΤΟΜΕΑΣ ΦΑΡΜΑΚΟΓΝΩΣΙΑΣ & ΧΗΜΕΙΑΣ ΦΥΣΙΚΩΝ ΠΡΟΪΟΝΤΩΝ

**ΑΠΟΜΟΝΩΣΗ ΚΑΙ ΤΡΟΠΟΠΟΙΗΣΗ
ΒΙΟΠΟΛΥΜΕΡΩΝ ΘΑΛΛΑΣΙΑΣ ΠΡΟΕΛΕΥΣΗΣ
ΚΑΙ ΑΝΑΠΤΥΞΗ ΙΚΡΙΩΜΑΤΩΝ
ΑΠΟ ΜΙΚΡΟ-/NANOΪΝΕΣ
ΓΙΑ ΤΗ ΘΕΡΑΠΕΙΑ ΤΗΣ ΠΕΡΙΟΔΟΝΤΙΤΙΔΑΣ**

ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ

ΚΩΝΣΤΑΝΤΙΝΑ ΗΛΙΟΥ

**ΑΘΗΝΑ
ΟΚΤΩΒΡΙΟΣ 2023**

Η υλοποίηση της διδακτορικής διατριβής συγχρηματοδοτήθηκε από την Ελλάδα και την Ευρωπαϊκή Ένωση (Ευρωπαϊκό Κοινωνικό Ταμείο) μέσω του Επιχειρησιακού Προγράμματος «Ανάπτυξη Ανθρώπινου Δυναμικού, Εκπαίδευση και Διά Βίου Μάθηση», 2014-2020, στο πλαίσιο της Πράξης «Ενίσχυση του ανθρώπινου δυναμικού μέσω της υλοποίησης διδακτορικής έρευνας Υποδράση 2: Πρόγραμμα χορήγησης υποτροφιών ΙΚΥ σε υποψηφίους διδάκτορες των ΑΕΙ της Ελλάδας».



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



ΤΡΙΜΕΛΗΣ ΣΥΜΒΟΥΛΕΥΤΙΚΗ ΕΠΙΤΡΟΠΗ

Βασίλειος Ρούσσης (Επιβλέπων)

Καθηγητής, Τμήμα Φαρμακευτικής, Εθνικό και Καποδιστριακό Πανεπιστήμιο Αθηνών

Ευσταθία Ιωάννου

Αναπλ. Καθηγήτρια, Τμήμα Φαρμακευτικής, Εθνικό και Καποδιστριακό Πανεπιστήμιο Αθηνών

Σπυρίδων Ζηνέλης

Καθηγητής, Τμήμα Οδοντιατρικής, Εθνικό και Καποδιστριακό Πανεπιστήμιο Αθηνών

ΕΠΤΑΜΕΛΗΣ ΕΞΕΤΑΣΤΙΚΗ ΕΠΙΤΡΟΠΗ

Αναστασία Δέτση

Καθηγήτρια, Σχολή Χημικών Μηχανικών, Εθνικό Μετσόβιο Πολυτεχνείο

Σπυρίδων Ζηνέλης

Καθηγητής, Τμήμα Οδοντιατρικής, Εθνικό και Καποδιστριακό Πανεπιστήμιο Αθηνών

Ευσταθία Ιωάννου

Αναπλ. Καθηγήτρια, Τμήμα Φαρμακευτικής, Εθνικό και Καποδιστριακό Πανεπιστήμιο Αθηνών

Ιωάννης Καρούσης

Αναπλ. Καθηγητής, Τμήμα Οδοντιατρικής, Εθνικό και Καποδιστριακό Πανεπιστήμιο Αθηνών

Ευθυμία Κιτράκη

Καθηγήτρια, Τμήμα Οδοντιατρικής, Εθνικό και Καποδιστριακό Πανεπιστήμιο Αθηνών

Βασίλειος Ρούσσης

Καθηγητής, Τμήμα Φαρμακευτικής, Εθνικό και Καποδιστριακό Πανεπιστήμιο Αθηνών

Όλγα Τζάκου

Καθηγήτρια, Τμήμα Φαρμακευτικής, Εθνικό και Καποδιστριακό Πανεπιστήμιο Αθηνών

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Στα πλαίσια της παρούσας διδακτορικής διατριβής εφαρμόζοντας διαφορετικές μεθόδους εκχύλισης πραγματοποιήθηκε η απομόνωση καρραγενανών και φουκοϊδανών από διάφορα δείγματα του ροδοφύκους *Chondracanthus teedei* και του φαιοφύκους *Cystoseira barbata*, αντίστοιχα. Οι θαλάσσιοι θεικοί πολυσακχαρίτες που απομονώθηκαν χαρακτηρίστηκαν ως προς τη δομή τους με βάση την ανάλυση των φασματοσκοπικών τους δεδομένων χρησιμοποιώντας φασματοσκοπία υπερύθρου (FT-IR). Επιπλέον, το ποσοστό των θεικών τους εστέρων προσδιορίστηκε με την θολωσιμετρική μέθοδο, ενώ το μέσο μοριακό τους βάρος μετρήθηκε με χρωματογραφία αποκλεισμού μεγεθών (SEC). Επίσης, πραγματοποιήθηκε μελέτη του ιξώδους υδατικών διαλυμάτων των καρραγενανών, ενώ πραγματοποιήθηκε και θερμική ανάλυση των πολυσακχαριτών με την χρήση θερμοσταθμικής ανάλυσης (TGA) και διαφορικής θερμιδομετρίας σάρωσης (DSC). Ακόμη, οι πολυσακχαρίτες υποβλήθηκαν σε κατεργασία με υπέρηχους υψηλής ισχύος ώστε να μελετηθεί η επίδραση των υπερήχων στο μοριακό τους βάρος και στο ποσοστό των θεικών τους εστέρων.

Στην συνέχεια, παρασκευάστηκαν με επιτυχία δι- και τρι-στρωματικές νανοϊνώδεις μεμβράνες αποτελούμενες από μετ' ασβεστίου ή μετά νατρίου άλας καρραγενανών σε συνδυασμό με άλλα βιοσυμβατά πολυμερή, όπως το μετ' ασβεστίου άλας του πολυ(L-γλουταμικού οξέος), το οξείδιο του πολυ(αιθυλενίου) και η πολυ(εκαπρολακτόνη), ώστε να λειτουργήσουν ως μεμβράνες κατευθυνόμενης ιστικής/οστικής αναγέννησης (GTR/GBR) για την αντιμετώπιση της περιοδοντικής νόσου.

Η μορφολογία των παρασκευασθεισών νανοϊνώδων μεμβρανών εξετάστηκε με ηλεκτρονική μικροσκοπία σάρωσης (SEM), η θερμική σταθερότητα τους προσδιορίστηκε μέσω θερμοσταθμικής ανάλυσης (TGA), ενώ αξιολογήθηκαν και οι μηχανικές τους ιδιότητες. Η αξιολόγηση του χρόνου αποικοδόμησης των μεμβρανών έδειξε ότι όλες οι μεμβράνες που παρασκευάστηκαν παρέμειναν σταθερές για τουλάχιστον 28 ημέρες έπειτα από παραμονή σε διάλυμα προσομοίωσης σιέλου στους 37 °C. Ακόμη, παρουσίασαν παρατεταμένη απελευθέρωση ιόντων ασβεστίου για τουλάχιστον 3 εβδομάδες, υποδεικνύοντας την ικανότητα τους να λειτουργούν ως σταθερή πηγή ιόντων ασβεστίου για να προάγουν τον πολλαπλασιασμό των οστεοβλαστών και την οστεογένεση. Η ικανότητα των παρασκευασθεισών μεμβρανών

να προάγουν την αναγέννηση του περιοδοντίου επιβεβαιώθηκε in vitro σε ανθρώπινα κύτταρα του περιοδοντικού συνδέσμου (PDL). Τέλος, ενσωματώθηκαν επιτυχώς αντιβιοτικοί παράγοντες στις νανοϊνώδεις μεμβράνες και προσδιορίστηκε ο ρυθμός απελευθέρωσης τους.

Τα θετικά αποτελέσματα της μελέτης υποδεικνύουν ότι οι σχεδιασμένες νανοϊνώδεις μεμβράνες με βασικό συστατικό τα μετ' ασβεστίου άλατα καρραγενανών μπορούν να λειτουργήσουν ως μεμβράνες κατευθυνόμενης ιστικής/οστικής αναγέννησης για την αντιμετώπιση της περιοδοντικής νόσου.

ABSTRACT

In the framework of the present PhD thesis carrageenans and fucoidans were isolated from various specimens of the red alga *Chondracanthus teedei* and the brown alga *Cystoseira barbata*, respectively, using different extraction methods. The isolated marine sulfated polysaccharides were characterized based on the analysis of their spectroscopic data using infrared spectroscopy (FT-IR). Additionally, the sulfate content of the isolated polysaccharides was determined using the turbidimetric method and the mean molecular weight was estimated using size exclusion chromatography (SEC). Moreover, the viscosity of the isolated carrageenans was determined, whereas the thermal properties of the polysaccharides were evaluated using thermogravimetric analysis (TGA) and differential scanning calorimetry (DSC). In addition, the effect of high-power ultrasound on the molecular weight and sulfate content of the polysaccharides was investigated.

Subsequently, bi- and tri-layer nanofibrous membranes composed of calcium or sodium carrageenans, as well as of other biodegradable polymers of hydrophilic and hydrophobic nature, such as calcium salt of poly(L-glutamic acid), polyethylene oxide and polycaprolactone, were successfully prepared so as to act as guided tissue/bone regeneration (GTR/GBR) membranes for the treatment of periodontitis.

The fibrous structure of the fabricated membranes was analyzed using scanning electron microscopy (SEM), their thermal stability was determined using thermogravimetric analysis (TGA) and their mechanical properties were evaluated. The study of the degradation rate of the membranes revealed that all membranes remained stable for up to 28 days of incubation at 37 °C in a simulated saliva solution, while exhibiting a sustained release of calcium ions for at least three weeks, demonstrating their potential to act as a constant source of calcium ions for the promotion of the osteoblasts' growth and bone regeneration. The ability of all membranes to promote the regeneration of the periodontal tissue was confirmed in vitro using human periodontal ligament (PDL) cells. Finally, antimicrobial agents were successfully incorporated into the nanofibrous membranes and the drug release profile of the membranes was determined.

The present study demonstrates the potential of the designed membranes based on calcium salts of carrageenans to serve as guided tissue/bone regeneration membranes

for the treatment of periodontitis.

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Θα ήθελα να ευχαριστήσω θερμά τον Καθηγητή Βασίλειο Ρούσση και την Αναπληρώτρια Καθηγήτρια Ευσταθία Ιωάννου για την υποστήριξη και την καθοδήγηση τους καθ' όλη τη διάρκεια εκπόνησης της διδακτορικής μου διατριβής. Θα ήθελα να τους ευχαριστήσω ιδιαίτερα για την εμπιστοσύνη που μου έδειξαν όλα αυτά τα χρόνια, τις ευκαιρίες που μου πρόσφεραν, την υπομονή τους και την διάθεση τους να μοιραστούν τις γνώσεις τους μαζί μου.

Επίσης, θα ήθελα να ευχαριστήσω τον Καθηγητή Σπύρο Ζηνέλη, ως μέλος της τριμελούς συμβουλευτικής επιτροπής μου, για τις χρήσιμες συμβουλές του και τη βοήθεια του όποτε χρειάστηκε.

Ευχαριστώ τα μέλη της επταμελούς εξεταστικής επιτροπής Καθηγήτρια Αναστασία Δέτση, Καθηγητή Σπύρο Ζηνέλη, Αναπληρώτρια Καθηγήτρια Ευσταθία Ιωάννου, Αναπληρωτή Καθηγητή Ιωάννη Καρούση, Καθηγήτρια Ευθυμία Κιτράκη, Καθηγητή Βασίλειο Ρούσση και Καθηγήτρια Όλγα Τζάκου για την ανάγνωση και αξιολόγηση της διατριβής μου.

Ένα μεγάλο ευχαριστώ οφείλω στον μεταδιδακτορικό ερευνητή Δρ. Στέφανο Κικιώνη για την πολύτιμη βοήθεια του, τις συμβουλές και την υποστήριξη του καθ' όλη την διάρκεια εκπόνησης της διδακτορικής μου διατριβής. Ιδιαίτερα θα ήθελα να τον ευχαριστήσω για τις γνώσεις που μου μετέδωσε και την προθυμία του να με βοηθήσει σε πρακτικά ζητήματα του εργαστηρίου όλα αυτά τα χρόνια.

Ευχαριστώ θερμά την μεταδιδακτορική ερευνήτρια Δρ. Κατερίνα Καρρά για την αξιολόγηση της ιστικής αναγεννητικής ικανότητας των παρασκευασθεισών πολυστρωματικών μεμβρανών στο Εργαστήριο Βασικών Ιατροβιολογικών Επιστημών του Τμήματος Οδοντιατρικής του ΕΚΠΑ υπό την επίβλεψη και καθοδήγηση της Καθηγήτριας Ευθυμίας Κιτράκη, καθώς επίσης και για την άριστη συνεργασία και την προθυμία της να μου μεταδώσει τις γνώσεις της.

Ευχαριστώ επίσης τον μεταδιδακτορικό ερευνητή Δρ. Γιώργο Πολυχρόνη για την αξιολόγηση των μηχανικών ιδιοτήτων των παρασκευασθεισών πολυστρωματικών μεμβρανών στο Εργαστήριο Βιοϋλικών του Τμήματος Οδοντιατρικής του ΕΚΠΑ υπό την επίβλεψη και καθοδήγηση του Καθηγητή Σπύρου Ζηνέλη.

Ευχαριστώ τον μεταδιδακτορικό ερευνητή Δρ. Γιάννη Χοινόπουλο για την σύνθεση του μετ' ασβεστίου άλατος πολυ(L-γλουταμικού οξέος) που χρησιμοποιήθηκε

για την παρασκευή των πολυ-στρωματικών μεμβρανών στο Εργαστήριο Βιομηχανικής Χημείας του Τμήματος Χημείας του ΕΚΠΑ υπό την επίβλεψη και καθοδήγηση του Καθηγητή Ερμή Ιατρού.

Ευχαριστώ τα Ιχθυοτροφεία Κεφαλονιάς για την παροχή βιομάζας από το καλλιεργημένο ροδοφύκος *Chondracanthus teedei*, καθώς και την εταιρεία INTERMED ΙΟΥΛΙΑ & ΕΙΡΗΝΗ ΤΣΕΤΗ ΑΒΕΕ για την παροχή των αντιβιοτικών παραγόντων μετρονιδαζόλη και υδροχλωρική σιπροφλοξασίνη.

Ακόμη, ευχαριστώ τους μεταπτυχιακούς φοιτητές, υποψήφιους διδάκτορες, μεταδιδακτορικούς ερευνητές και τεχνικούς του εργαστηρίου μας, τον καθένα ξεχωριστά, για την συνεργασία τους και τη βοήθεια τους καθ' όλη την διάρκεια παραμονής μου στο εργαστήριο.

Ευχαριστώ τη Γενική Γραμματεία Έρευνας και Καινοτομίας για την οικονομική ενίσχυση μέσω του έργου NANOSCAPE (Τ1ΕΔΚ-02499) που εντάσσεται στη Δράση «ΕΡΕΥΝΩ – ΔΗΜΙΟΥΡΓΩ – ΚΑΙΝΟΤΟΜΩ» του Επιχειρησιακού Προγράμματος ΕΠΑΝΕΚ 2014-2020 «Ανταγωνιστικότητα, Επιχειρηματικότητα και Καινοτομία», καθώς και το Ίδρυμα Κρατικών Υποτροφιών για την οικονομική ενίσχυση μέσω της Πράξης «Ενίσχυση του ανθρώπινου δυναμικού μέσω της υλοποίησης διδακτορικής έρευνας Υποδράση 2: Πρόγραμμα χορήγησης υποτροφιών ΙΚΥ σε υποψηφίους διδάκτορες των ΑΕΙ της Ελλάδας».

Τέλος, ευχαριστώ την οικογένεια μου που βρίσκονται πάντα δίπλα μου και με στηρίζουν σε κάθε μου βήμα.

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

ΠΕΡΙΛΗΨΗ.....	i
ABSTRACT	iii
ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ.....	v
ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ	vii
ΣΥΝΤΟΜΟΓΡΑΦΙΕΣ.....	xi
1. ΘΕΩΡΗΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ.....	1
1.1. Θαλάσσια φαρμακογνωσία.....	1
1.2. Φύκη	3
1.2.1. Χλωροφύκη.....	3
1.2.2. Φαιοφύκη	4
1.2.3. Ροδοφύκη	5
1.3. Θαλάσσιοι πολυσακχαρίτες.....	6
1.3.1. Καρραγενάνες	7
1.3.2. Φουκοϊδάνες.....	9
1.3.3. Αλγινικά οξέα και αλγινικά άλατα.....	11
1.3.4. Ουλβάνες.....	12
1.4. Βιοϋλικά από θαλάσσια βιοπολυμερή.....	13
1.5. Μικρο-/νανοΐνες και ηλεκτροϊνοποίηση.....	14
1.5.1. Μικρο-/νανοΐνες.....	14
1.5.2. Εφαρμογές μικρο-/νανοϊνών	15
1.5.3. Ηλεκτροϊνοποίηση	19
1.6. Περιοδοντίτιδα και τρόποι αντιμετώπισης	33
1.6.1. Γενικά στοιχεία για την περιοδοντίτιδα	33
1.6.2. Ανατομία περιοδοντίου	34
1.6.3. Παθογένεση περιοδοντίτιδας	35
1.6.4. Θεραπείες για την αντιμετώπιση της περιοδοντίτιδας.....	36
1.7. Σκοπός της μελέτης.....	41
2. ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ.....	43
2.1. Οργανολογία	43
2.2. Διαλύτες και χημικά αντιδραστήρια	45
2.3. Απομόνωση καρραγενανών από το ροδοφύκος <i>Chondracanthus teedei</i>	47

2.3.1. Απομόνωση μετά νατρίου αλάτων καρραγενανών	48
2.3.2. Απομόνωση μετά καλίου αλάτων καρραγενανών	49
2.3.3. Απομόνωση μετ' ασβεστίου αλάτων καρραγενανών.....	49
2.4. Απομόνωση φουκοϊδανών από το φαιοφύκος <i>Cystoseira barbata</i>	49
2.4.1. Αποχρωματισμός με αιθανόλη	50
2.4.2. Αποχρωματισμός με αιθανόλη/νερό/φορμαλδεΰδη	51
2.4.3. Εκχύλιση με EDTA χωρίς αποχρωματισμό	52
2.5. Τροποποιήσεις πολυσακχαριτών με υπέρηχους υψηλής ισχύος	52
2.6. Προσδιορισμός κατανομής μοριακού βάρους	54
2.6.1. Απομονωμένοι πολυσακχαρίτες.....	54
2.6.2. Τροποποιημένοι πολυσακχαρίτες	57
2.7. Προσδιορισμός θειικών ομάδων.....	60
2.8. Προσδιορισμός ιξώδους.....	61
2.9. Παρασκευή των πολυ-στρωματικών νανοϊνωδών μεμβρανών	62
2.9.1. Παρασκευή εξωτερικού στρώματος.....	64
2.9.2. Προετοιμασία διαλυμάτων ηλεκτροϊνοποίησης.....	64
2.9.3. Συνθήκες ηλεκτροϊνοποίησης	65
2.10. Χαρακτηρισμός των πολυ-στρωματικών νανοϊνωδών μεμβρανών.....	68
2.11. Προσδιορισμός του ρυθμού αποικοδόμησης των πολυ-στρωματικών νανοϊνωδών μεμβρανών.....	68
2.12. Προσδιορισμός του ρυθμού αποδέσμευσης των ιόντων ασβεστίου.....	70
2.13. Ενσωμάτωση μετρονιδαζόλης στο μεσαίο και/ή στο εσωτερικό στρώμα των πολυ-στρωματικών μεμβρανών	71
2.14. Προσδιορισμός του ρυθμού αποδέσμευσης της ενσωματωμένης μετρονιδαζόλης	74
2.15. Ενσωμάτωση υδροχλωρικής σιπροφλοξασίνης στο εξωτερικό στρώμα των πολυ-στρωματικών μεμβρανών	76
2.16. Προσδιορισμός του ποσοστού ενσωμάτωσης και του ρυθμού αποδέσμευσης της υδροχλωρικής σιπροφλοξασίνης	76
3. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ ΚΑΙ ΣΥΖΗΤΗΣΗ	79
3.1. Απομόνωση και χαρακτηρισμός θειικών πολυσακχαριτών από μακροφύκη.....	79
3.1.1. Απομόνωση και ταυτοποίηση καρραγενανών από το ροδοφύκος <i>Chondracanthus teedei</i>	79
3.1.2. Απομόνωση και ταυτοποίηση φουκοϊδανών από το φαιοφύκος <i>Cystoseira</i>	

<i>barbata</i>	85
3.1.3. Προσδιορισμός κατανομής του μοριακού βάρους των απομονωμένων πολυσακχαριτών.....	91
3.1.4. Προσδιορισμός θεικών ομάδων των απομονωμένων πολυσακχαριτών	92
3.1.5. Θερμική ανάλυση των απομονωμένων πολυσακχαριτών.....	93
3.2. Τροποποιήσεις θεικών πολυσακχαριτών με υπέρηχους υψηλής ισχύος	98
3.2.1. Προσδιορισμός κατανομής του μοριακού βάρους των τροποποιημένων πολυσακχαριτών.....	99
3.2.2. Προσδιορισμός θεικών ομάδων των τροποποιημένων πολυσακχαριτών ..	105
3.3. Σχεδιασμός και ανάπτυξη πολυ-στρωματικών νανοϊνωδών μεμβρανών για την θεραπεία της περιοδοντίτιδας	106
3.3.1. Παραγωγή και χαρακτηρισμός των GTR μεμβρανών	107
3.3.2. Προσδιορισμός του ρυθμού αποικοδόμησης των GTR μεμβρανών.....	117
3.3.3. Προσδιορισμός του ρυθμού αποδέσμευσης των ιόντων ασβεστίου από τις GTR μεμβράνες.....	119
3.3.4. Ενσωμάτωση αντιβιοτικών στις GTR μεμβράνες.....	122
3.3.5. Αξιολόγηση των μηχανικών ιδιοτήτων των GTR μεμβρανών	126
3.3.6. Αξιολόγηση της ανάπτυξης και της προσκόλλησης κυττάρων περιοδοντίου στις GTR μεμβράνες	128
3.3.7. Αξιολόγηση των GTR μεμβρανών ως προς την οστεοεπαγωγή των περιοδοντικών κυττάρων	130
ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ	135
ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ	139

ΣΥΝΤΟΜΟΓΡΑΦΙΕΣ

CIP	σιπροφλοξασίνη
CG-Ca	μετ' ασβεστίου άλας καρραγενανών
CG-K	μετά καλίου άλας καρραγενανών
CG-Na	μετά νατρίου άλας καρραγενανών
DCM	διχλωρομεθάνιο (D ichloro m ethane)
dH₂O	απεσταγμένο νερό
ddH₂O	υπερκάθαρο νερό
DMF	διμεθυλοφορμαμίδιο (D imethyl f ormamide)
DSC	διαφορική θερμιδομετρία σάρωσης (D ifferential S canning C alorimetry)
EDTA-2Na-2H₂O	διένυδρο αιθυλενοδιαμινοτετραοξικό οξύ
EtOH	αιθανόλη
FT-IR	φασματοσκοπία υπερύθρου με μετασχηματισμό Fourier
GTR/GBR	κατευθυνόμενη ιστική/οστική αναγέννηση (G uided T issue/ B one R egeneration)
IR	φασματοσκοπία υπερύθρου
MeOH	μεθανόλη
MET	μετρονιδαζόλη
PCL	πολυ(ε-καπρολακτόνη) (p olycaprolactone)
PDL	κύτταρα του περιοδοντικού συνδέσμου (p eriodontal ligament)
PEO	οξείδιο του πολυ(αιθυλενίου) (p olyethylene o xide)
PG-Ca	μετ' ασβεστίου άλας πολυ(L-γλουταμικού οξέος)
SD	τυπική απόκλιση (S tandard D eviation)
SEC	χρωματογραφία αποκλεισμού μεγεθών (S ize E xclusion C hromatography)
SEM	ηλεκτρονική μικροσκοπία σάρωσης (S canning E lectron M icroscopy)
TGA	θερμογραφική ανάλυση (T hermogravimetric A nalysis)
UV	υπεριώδης ακτινοβολία
UV-Vis	φασματοσκοπία υπεριώδους-ορατού
ι-CG	ι-καρραγενάνες (ι -Carrageenan)
κ-CG	κ-καρραγενάνες (κ -Carrageenan)
λ-CG	λ-καρραγενάνες (λ -Carrageenan)

1. ΘΕΩΡΗΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

1.1. Θαλάσσια φαρμακογνωσία

Το θαλάσσιο οικοσύστημα αποτελεί έναν πολύτιμο φυσικό πόρο καθοριστικής σημασίας για την οικονομική πρόοδο και την κοινωνική ευημερία, με την ανθρωπότητα διαχρονικά να προσπαθεί να το εξερευνήσει και να αξιοποιήσει τους διαθέσιμους πόρους του κατά κύριο λόγο για τροφή αλλά και για την παραγωγή ουσιών με υψηλή προστιθέμενη αξία (Castro & Huber, 1999). Εκτός από τα ψάρια και γενικότερα τους πελαγικούς οργανισμούς που είναι το βασικό προϊόν αλιείας και υδατοκαλλιέργειών σε όλο το κόσμο υπάρχουν αναφορές ότι από την αρχαιότητα, στην Κίνα και την Ιαπωνία καταναλώνονταν φύκη πλούσια σε ιώδιο και ορισμένα από αυτά τα είδη χρησιμοποιούνταν ως φάρμακα. Η κινέζικη φαρμακοποιία αναφέρει πληθώρα συνταγών βασισμένες σε φύκη για την θεραπεία διαφόρων παθήσεων όπως οι γαστρεντερικές διαταραχές, τα αποστήματα και ο καρκίνος (Ruggieri, 1976). Στο πέρασμα των χρόνων, η εξέλιξη του τεχνολογικού εξοπλισμού, διευκόλυνε την εξερεύνηση των υποθαλάσσιων οικοσυστημάτων, οδηγώντας σταδιακά στην ανάπτυξη της ερευνητικής δραστηριότητας και την πρόοδο της γνώσης σχετικά με τον θαλάσσιο περιβάλλον και τους οργανισμούς του (Castro & Huber, 1999).

Η ανάγκη εξεύρεσης νέων δραστικών ουσιών για την θεραπεία ασθενειών έστρεψε, τις τελευταίες δεκαετίες, το ερευνητικό ενδιαφέρον και στους θαλάσσιους, κατά κύριο λόγο βενθικούς οργανισμούς (Hamed et al., 2015). Η εντατική μελέτη των θαλάσσιων οργανισμών ξεκίνησε πιο συστηματικά μετά το 1950 με την ανακάλυψη των βιοδραστικών νουκλεοσιδίων σπογγοθυμιδίνη και σπογγοουριδίνη (Lindequist, 2016).

Το θαλάσσιο περιβάλλον καλύπτει το 70% της επιφάνειας της πλανήτη μας και φιλοξενεί 34 από τα 36 φύλα του ζωικού βασιλείου. Η ζωή πρωτοεμφανίστηκε στους ωκεανούς πριν από 3.6 δισεκατομμύρια χρόνια και σε σχέση με τους χερσαίους οργανισμούς οι θαλάσσιοι οργανισμοί είχαν περισσότερο χρόνο για να προσαρμοστούν και να εξελιχθούν (Castro & Huber, 1999; Lindequist, 2016; Ιωάννου, 2016). Οι θαλάσσιοι οργανισμοί εξελίχθηκαν ώστε να μπορούν να επιβιώσουν σε μεγάλη ποικιλία περιβαλλοντικών συνθηκών όπως το μεγάλο εύρος θερμοκρασίας (από τους -1.5 °C στα παγωμένα νερά, έως τους 350 °C στις υδροθερμικές αναβλύσεις), πίεσης (1-1000 atm) διαθεσιμότητας φωτός αλλά και θρεπτικών συστατικών (Lindequist, 2016; Sarker et al.,

2006). Αλλαγές στην αλατότητα και θερμοκρασία του νερού μπορεί επίσης να επηρεάζονται και από την εποχή, τις βροχοπτώσεις και τα θαλάσσια ρεύματα (Castro & Huber, 1999).

Για να μπορέσουν να ανταπεξέλθουν στις οικολογικές πιέσεις και να εξασφαλίσουν την επιβίωση τους οι οργανισμοί έχουν αναπτύξει δευτερογενείς μεταβολικές οδούς μέσω των οποίων παράγουν χημικές ενώσεις με πολύπλοκες δομές (Sarker et al., 2006). Οι δευτερογενείς μεταβολίτες που παράγουν οι θαλάσσιοι οργανισμοί, είναι σημαντικά διαφοροποιημένοι και πολύπλοκότεροι από αυτούς που συναντώνται στους χερσαίους οργανισμούς. Εμφανίζουν συχνά νέους χημικούς σκελετούς ενώ είναι χαρακτηριστική η ύπαρξη αλογονωμένων μεταβολιτών λόγω της υψηλής συγκέντρωσης αλογόνων στο θαλάσσιο περιβάλλον (Ιωάννου, 2016).

Μέχρι σήμερα έχουν απομονωθεί και ταυτοποιηθεί περισσότερα από 40,000 φυσικά προϊόντα από θαλάσσιους οργανισμούς (MarinLit, 2023). Εκτός από το πλήθος των δευτερογενών μεταβολιτών, που είναι μικρού μοριακού μεγέθους, οι θαλάσσιοι οργανισμοί βιοσυνθέτουν επίσης απαραίτητα για την επιβίωση τους βιοπολυμερή. Βιοπολυμερή όπως οι πολυσακχαρίτες και οι πρωτεΐνες βρίσκονται σε αφθονία σε μεγάλη ποικιλία θαλάσσιων οργανισμών όπως τα μακροφύκη, τα ψάρια, τα οστρακόδερμα, τα μαλάκια και οι μικροοργανισμοί και μελετώνται συστηματικά σε διάφορες εφαρμογές (Cardoso et al., 2016; Claverie et al., 2020; Manivasagan & Oh, 2016). Θαλάσσιοι πολυσακχαρίτες όπως οι καρραγενάνες, οι φουκοϊδάνες οι ουλβάνες και το αλγινικό οξύ απομονώνονται από μακροφύκη, ενώ η χιτίνη, από την οποία προέρχεται μέσω αποακετυλίωσης η χιτοζάνη, απομονώνεται κατά κύριο λόγο από τον εξωσκελετό οστρακόδερμων. Θαλάσσιας προέλευσης πρωτεΐνες όπως το κολλαγόνο και η ζελατίνη, απομονώνονται από ψάρια και μαλάκια και αποτελούν εναλλακτική επιλογή έναντι των χερσαίας προέλευσης ζωικών πρωτεϊνών. Αν και δεν είναι ιδιαίτερα μελετημένοι, ενδιαφέρον παρουσιάζουν και οι εξωπολυσακχαρίτες που παράγονται από θαλάσσιους μικροοργανισμούς με πιο γνωστό τον πολυσακχαρίτη μαουράνη. Τα θαλάσσια βιοπολυμερή έχουν μεγάλες προοπτικές σε ένα ευρύ πεδίο βιοϊατρικών εφαρμογών, καθώς έχουν υψηλή βιοσυμβατότητα, είναι βιοδιασπώμενα και εμφανίζουν πολυάριθμες αξιόλογες βιολογικές δράσεις. Επιπλέον, έχουν ιδιαίτερα φυσικοχημικά χαρακτηριστικά, παρουσιάζουν υψηλή υδροφιλικότητα και είναι διαθέσιμα με μικρό κόστος (Claverie et al., 2020; Pliou et al., 2022; Manivasagan & Oh, 2016).

1.2. Φύκη

Τα φύκη είναι μία μεγάλη, πολυφυλετική και ετερογενής ομάδα ευκαρυωτικών οργανισμών που περιλαμβάνουν μονοκύτταρους και πολυκύτταρους οργανισμούς που σχηματίζουν πολύπλοκους θαλλούς (Castro & Huber, 1999). Χωρίζονται σε δύο μεγάλες κατηγορίες: τα μικροφύκη που συναντώνται σε βενθικούς και παράκτιους οικότοπους αλλά και κατά μήκος των ωκεανών, και τα μακροφύκη που συναντώνται συνήθως στην παράκτια ζώνη (Gamal, 2010). Σύμφωνα με το κλασικό σύστημα ταξινόμησης, τα μικροφύκη διακρίνονται σε τέσσερα αθροίσματα: Chrysophyta (Χρυσοφύκη), Euglenophyta (Ευγληνοφύκη), Cryptophyta (Κρυπτοφύκη), Pyrrophyta (Πυρροφύκη), ενώ τα μακροφύκη ταξινομούνται σε τρία αθροίσματα με βάση το χρώμα των φωτοσυνθετικών χρωστικών που διαθέτουν: Chlorophyta (Χλωροφύκη), Phaeophyta (Φαιοφύκη) Rhodophyta (Ροδοφύκη) (Castro & Huber, 1999; Ιωάννου, 2016).

Τα μακροφύκη είναι πλούσια σε ίνες, ανόργανα συστατικά, πολυακόρεστα λιπαρά οξέα, πρωτεΐνες, αμινοξέα, πολυσακχαρίτες και ποικιλία δευτερογενών μεταβολιτών που παράγουν για να ικανοποιήσουν τις οικολογικές πιέσεις (Venugopal, 2019). Το κυτταρικό τοίχωμα τους είναι σακχαριδικής φύσεως αποτελούμενο από πολυσακχαρίτες οι οποίοι διαφέρουν από είδος σε είδος. Επιπλέον, εκτός από τους δομικούς διαθέτουν και πολυσακχαρίτες αποθήκευσης ενέργειας οι οποίοι επίσης διαφέρουν από είδος σε είδος (Kraan, 2012).

1.2.1. Χλωροφύκη

Τα χλωροφύκη έχουν χαρακτηριστικό πράσινο χρώμα που οφείλεται στην παρουσία χλωροφύλλης α και β (Gamal, 2010). Έχουν αναφερθεί περίπου 7500 είδη χλωροφυκών τα περισσότερα εκ των οποίων απαντώνται σε γλυκά νερά και μόνο το 10% συναντάται σε θαλάσσιους βιότοπους. Συνήθως έχουν μικρό μέγεθος που κυμαίνεται από μερικά εκατοστά έως ένα μέτρο (Venugopal, 2019) και θεωρούνται πρόγονοι των ανώτερων φυτών της ξηράς (Castro & Huber, 1999).

Τα χλωροφύκη αποτελούν σημαντική πηγή τροφής και είναι γνωστά ως λαχανικά της θάλασσας. Είδη του γένους *Ulva* (Εικ. 1), γνωστά ως μαρούλι της θάλασσας, είναι πλούσια πηγή υδατανθράκων, βιταμινών, απαραίτητων αμινοξέων, μετάλλων και διαιτητικών ινών (Cunha & Grenha, 2016). Τα είδη του γένους *Ulva* ευδοκιμούν σε ευτροφικές περιοχές και πολλαπλασιάζονται με πολύ γρήγορο ρυθμό σχηματίζοντας πράσινες παλίρροιες (green tides). Έχουν την ικανότητα να προσροφούν

στην βιομάζα τους υψηλές συγκεντρώσεις βαρέων μετάλλων και θρεπτικών αλάτων. Θεωρούνται βιολογικός δείκτης για την αξιολόγηση της ρύπανσης των νερών, αλλά μπορούν να λειτουργήσουν και ως βιοφίλτρα στις υδατοκαλλιέργειες για τον καθαρισμό των επιβαρυνμένων απορροών των εγκαταστάσεων (Castro & Huber, 1999; Kidgell et al., 2019; Malea & Haritonidis, 2000; Simon et al., 2022) Ακόμη, τα είδη του γένους *Ulva* και *Enteromorpha* θεωρούνται ιδιαίτερη σημασίας γιατί κυρίως από αυτά απομονώνονται οι θευκοί πολυσακχαρίτες ουλβάνες (Kidgell et al., 2019). Στην Ελλάδα συναντώνται περισσότερα από 20 είδη του γένους *Ulva* και *Enteromorpha* (Ορφανίδης, 2009).



Εικόνα 1. Το χλωροφύκος *Ulva rigida* (Guiry, 2000-2023).

1.2.2. Φαιοφύκη

Τα φαιοφύκη έχουν χαρακτηριστικό ελαιοπράσινο έως σκούρο καφέ χρώμα το οποίο οφείλεται στην κύρια χρωστική τους την φυκοξανθίνη (Castro & Huber, 1999). Έχουν αναφερθεί περίπου 1500 είδη φαιοφυκών τα οποία περιλαμβάνουν τα μεγαλύτερα και πολυπλοκότερα μακροφύκη. Τα περισσότερα ήδη είναι θαλάσσια και συναντώνται συχνά σε εύκρατες αλλά και πολικές βραχώδεις ακτές. Διαθέτουν μεγάλο εύρος μορφολογικών τύπων που ποικίλλει από έναν απλό διακλαδισμένο νηματοειδή θαλλό έως τις κέλπιες που είναι τα πιο πολύπλοκα και μεγάλα φαιοφύκη τα οποία μπορεί να φτάσουν τα 20 m μήκος (Castro & Huber, 1999; Cunha & Grenha, 2016). Από τα φαιοφύκη απομονώνονται οι πολυσακχαρίτες φουκοϊδάνες, αλγινικό οξύ και λαμιναρίνη (Kraan, 2012).

Για περισσότερα από 2000 χρόνια τα φαιοφύκη χρησιμοποιούνταν στην παραδοσιακή κινέζικη ιατρική για την θεραπεία διαφόρων ασθενειών όπως για παθήσεις του θυρεοειδή. Επιπλέον, χρησιμοποιούνταν παραδοσιακά για την θεραπεία

όγκων, καρδιαγγειακών παθήσεων αρτηριοσκλήρωσης, έλκους, νεφρικών παθήσεων, εκζεμάτων, ψώρας, ψωρίασης και άσθματος, ενώ σήμερα οι δράσεις αυτές έχουν αποδειχθεί και με επιστημονικά κριτήρια (Luthuli et al., 2019).

Το πολυφυλετικό γένος *Cystoseira* ανήκει στην οικογένεια Sargassaceae και βρίσκεται σε αφθονία στις ακτές της Μεσογείου, της Μαύρης Θάλασσας και του Ατλαντικού Ωκεανού (Trica et al., 2019). Το είδος *Cystoseira barbata* (Εικ. 2) κυριαρχεί στην Μεσόγειο και έχει μεγάλη οικολογική σημασία (Dobrinčić et al., 2021). Στην Ελλάδα εντοπίζονται περισσότερα από 15 είδη *Cystoseira*, μεταξύ των οποίων και η *C. barbata*, και συναντώνται κυρίως στο Βόρειο Αιγαίο (Ορφανίδης, 2009). Τα είδη του γένους *Cystoseira* αποτελούν σημαντική πηγή απομόνωσης φουκοϊδανών και αλγινικού οξέος (Dobrinčić et al., 2021; Trica et al., 2019).



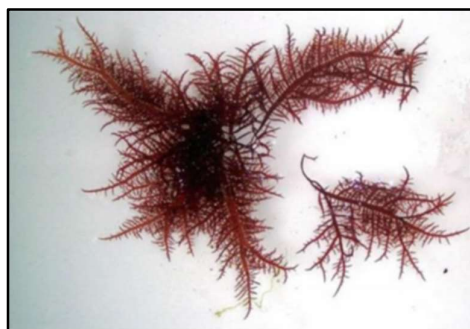
Εικόνα 2. Το φαιοφύκος *Cystoseira barbata* (Guiry & Guiry, 2020).

1.2.3. Ροδοφύκη

Τα ροδοφύκη διακρίνονται για την παρουσία ερυθρών χρωστικών που ονομάζονται φυκοχολίνες. Τα περισσότερα είδη έχουν κόκκινο χρώμα αν και μπορεί να έχουν και διαφορετικό ανάλογα με την ημερήσια έκθεση στο φως. Έχουν αναφερθεί περίπου 4000 είδη ροδοφυκών τα περισσότερα εκ των οποίων είναι θαλάσσια ενώ ορισμένα είδη συναντώνται σε γλυκά νερά (Castro & Huber, 1999). Συνήθως έχουν μικρό μέγεθος που κυμαίνεται από μερικά εκατοστά έως ένα μέτρο (Cunha & Grenha, 2016). Έχουν ιδιαίτερη αξία καθώς χρησιμοποιούνται ως τροφή εδώ και 2800 χρόνια και παράγουν σε υψηλές αποδόσεις πολυσακχαρίτες όπως οι καρραγενάνες, το άγαρ και οι πορφυράνες (Cunha & Grenha, 2016; Venugopal et al., 2019).

Τα είδη του γένους *Chondracanthus* γνωστά και ως *Gigartina* χρησιμοποιούνται ευρέως για την απομόνωση καρραγενανών. Το είδος *Chondracanthus teedei* (Εικ. 3)

βρίσκεται στον Ατλαντικό και Ινδικό Ωκεανό, στην Μεσόγειο και Μαύρη Θάλασσα και θεωρείται κοσμοπολίτικο είδος. Ακόμη, υπάρχουν σημαντικοί πληθυσμοί στην Ελλάδα σε περιοχές όπως ο Θερμαϊκός κόλπος. Το είδος αυτό προσαρμόζεται εύκολα και για αυτό μπορεί να καλλιεργηθεί (Pacheco et al., 2021; Pereira & Silva, 2021; Ορφανίδης, 2009).



Εικόνα 3. Το ροδοφύκος *Chondracathus teedei* (Pereira & Silva, 2021).

1.3. Θαλάσσιοι πολυσακχαρίτες

Οι πολυσακχαρίτες αποτελούν το κύριο δομικό συστατικό των φυκών καθώς συνιστούν περίπου το 70% του ξηρού βάρους τους. Αποτελούνται από μονοσακχαρίτες που συνδέονται μεταξύ τους με γλυκοσιδικό δεσμό και διακρίνονται σε: ομοπολυσακχαρίτες εάν αποτελούνται από ένα είδος σακχάρων και σε ετεροπολυσακχαρίτες εάν έχουν διαφορετικούς μονοσακχαρίτες. Οι πολυσακχαρίτες μπορεί να είναι ευθύγραμμοι ή διακλαδισμένοι ενώ με βάση το φορτίο τους διακρίνονται σε ανιοντικούς, κατιοντικούς και ουδέτερους. Η πιο συνηθισμένη δραστική ομάδα των πολυσακχαριτών είναι τα υδροξύλια τα οποία μπορεί να είναι υποκατεστημένα με την μορφή των θεικών εστέρων. Οι πολυσακχαρίτες που απομονώνονται από φύκη χωρίζονται σε δύο μεγάλες κατηγορίες: τους θεικούς και τους μη θεικούς πολυσακχαρίτες. Οι κυριότεροι θεικοί πολυσακχαρίτες είναι οι καρραγενάνες, οι φουκοϊδάνες και οι ουλβάνες, ενώ από τους μη θεικούς πολυσακχαρίτες την μεγαλύτερη εμπορική αξία έχει το αλγινικό οξύ (Laurienzo et al., 2018; Venugopal, 2019).

Οι πολυσακχαρίτες θαλάσσιας προέλευσης διαφέρουν από αυτούς που απομονώνονται από χερσαίους οργανισμούς κυρίως λόγω της παρουσίας θεικών ομάδων και σπάνιων σακχάρων. Επιπλέον, παρουσιάζουν υψηλή υδατοδιαλυτότητα και

μοναδικές ρεολογικές ιδιότητες. Τα θαλάσσια φύκη συνιστούν μία πλούσια πηγή θεικών πολυσακχαριτών με μοναδικές δομές και αξιόλογες βιολογικές δράσεις που συσχετίζονται με το ποσοστό των θεικών τους εστέρων (Alves et al., 2013).

Στα φύκη, εκτός από δομική στήριξη, οι πολυσακχαρίτες φαίνεται να παρέχουν και προστατευτικό ρόλο διεγείροντας την άμυνα του οργανισμού. Επίσης, οι θεικοί πολυσακχαρίτες θεωρείται ότι βοηθούν τους οργανισμούς να προσαρμοστούν στις ιοντικές συνθήκες της θάλασσας. Για παράδειγμα οι ουλβάνες που βρίσκονται στο κυτταρικό τοίχωμα των χλωροφυκών έχουν οσμωτική λειτουργία ώστε να διατηρούν την ιοντική ισορροπία ενώ λόγω της υγροσκοπικής φύσης τους αποτρέπουν την αφυδάτωση του φύκου (Alves et al., 2013; Venugopal, 2019).

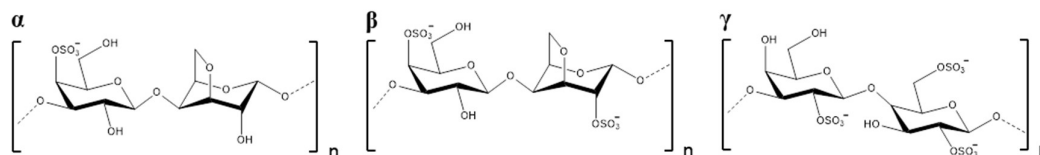
Περισσότερα στοιχεία για τους κυριότερους θαλάσσιους πολυσακχαρίτες από μακροφύκη και ειδικά για αυτούς που αποτέλεσαν αντικείμενο μελέτης της παρούσας διδακτορικής διατριβής παρουσιάζονται παρακάτω.

1.3.1. Καρραγενάνες

Οι καρραγενάνες απομονώθηκαν για πρώτη φορά το 1862 από το *Chondrus crispus* και χρησιμοποιούνται ευρέως στην βιομηχανία τροφίμων από το 1940 (Pereira et al., 2009). Αποτελούν το κύριο συστατικό του κυτταρικού τοιχώματος των ροδοφυκών της τάξης Rhodophyceae. Ο όρος καρραγενάνη χρησιμοποιείται για να περιγράψει μία ομάδα θεικών ανιοντικών γαλακτανών που αποτελούνται από επαναλαμβανόμενες μονάδες D-γαλακτόζης και 3,6-ανυδρο-D-γαλακτόζης συνδεδεμένες με α -1,3 και β -1,4 γλυκοσιδικό δεσμό (Εικ. 4) (Zia et al., 2017). Συνήθως έχουν μοριακό βάρος από 100 έως 1000 kDa (Cunha & Grenha, 2016). Έχουν αναφερθεί τουλάχιστον 15 τύποι καρραγενανών οι οποίοι διαφέρουν στον αριθμό και στην θέση των θεικών ομάδων και στην παρουσία 3,6-ανυδρο-D-γαλακτόζης, εκ των οποίων οι πιο γνωστοί ονομάζονται ι-, κ-, λ-, μ-, ν- και θ-καρραγενάνες (Campo et al., 2009; Cunha & Grenha, 2016). Από αυτούς οι ι-, κ-, και λ-καρραγενάνες είναι οι πιο μελετημένες και έχουν την μεγαλύτερη εμπορική αξία (Campo et al., 2009). Ταξινομούνται ανάλογα με τον αριθμό των θεικών εστέρων και το ποσοστό της 3,6-ανυδρο-D-γαλακτόζης ως εξής: κ-καρραγενάνες (μία 3,6-ανυδρο-γαλακτόζη και μία θεική ομάδα ανά δισακχαρίτη), ι-καρραγενάνες (μία 3,6-ανυδρο-γαλακτόζη και δύο θεικές ομάδες ανά δισακχαρίτη) και λ-καρραγενάνες (καμία 3,6-ανυδρο-D-γαλακτόζης αλλά τρεις θεικές ομάδες) (Zia et al., 2017). Το ποσοστό των θεικών εστέρων στις κ-καρραγενάνες είναι 25-30%, στις ι-καρραγενάνες είναι 28-30% και στις λ-

καρραγενάνες είναι 32-39% (Cunha & Grenha, 2016).

Ωστόσο, στην φύση οι οργανισμοί δεν φαίνεται να παράγουν καρραγενάνες που να αποτελούνται από την επανάληψη μίας μόνο δισακχαριτικής δομής, αλλά παράγουν υβρίδια πολυμερών (Pereira et al., 2009; Pereira et al., 2015). Η δομική ποικιλία των καρραγενανών επηρεάζεται από τον κύκλο ζωής του οργανισμού, η οποία καθορίζει και την βιοσύνθεση των πολυσακχαριτών. Είναι γνωστό ότι σε ένα διπλοειδές τετρασποριόφυτο συναντώνται κυρίως λ-καρραγενάνες, ενώ σε ένα απλοειδές γαμετόφυτο συναντώνται κυρίως κ-καρραγενάνες ή υβρίδια κ/ι-καρραγενανών (Pereira & Mesquita, 2004). Επιπλέον, η 3,6-ανυδρο-γαλακτόζη που βρίσκεται στα γαμετόφυτα παρουσιάζει μεγάλη μεταβλητότητα, καθώς επηρεάζεται από τον βαθμό μετατροπής των πρόδρομων μ- και ν-καρραγενανών σε κ- και ι-καρραγενάνες. Ακόμη, κατά την αλκαλική εκχύλιση οι πρόδρομες μ- και ν-καρραγενάνες μετατρέπονται σε κ- και ι-καρραγενάνες μέσω σχηματισμού γέφυρας 3,6-ανυδρο-D-γαλακτόζης (Pereira et al., 2009; Pereira et al., 2015). Ένας άλλος παράγοντας που επηρεάζει την βιοσύνθεση των διαφόρων τύπων καρραγενανών είναι η εποχιακή και η γεωγραφική διακύμανση που με τη σειρά της μπορεί να οφείλεται, μεταξύ άλλων, σε διαφορές στην ηλιακή ακτινοβολία, τη θερμοκρασία, τα θρεπτικά συστατικά, τη αλατότητα και τα θαλάσσια ρεύματα (Véliz et al., 2017).



Εικόνα 4. Γενική δομή των (α) κ-καρραγενανών, (β) ι-καρραγενανών και (γ) λ-καρραγενανών.

Οι κ- και οι ι-καρραγενάνες σχηματίζουν θερμο-αναστρέψιμη γέλη παρουσία κατιόντων (κυρίως K^+ , Ca^{2+}), ενώ οι λ-καρραγενάνες δεν σχηματίζουν γέλη και δίνουν μόνο πυκνά διαλύματα (Campo et al., 2009). Οι καρραγενάνες είναι εγκεκριμένες από τον Παγκόσμιο Οργανισμό Τροφίμων και Φαρμάκων (FDA) και, λόγω των φυσικοχημικών ιδιοτήτων τους χρησιμοποιούνται ευρέως στην μορφοποίηση φαρμάκων και καλλυντικών. Αν και δεν έχουν θρεπτική αξία και δεν πέπτονται, χρησιμοποιούνται στην βιομηχανία τροφίμων ως πηκτωματοποιητικό, πυκνωτικό και γαλακτωματοποιητικό μέσο (Cunha & Grenha, 2016; Guo et al., 2022; Venugopal, 2019).

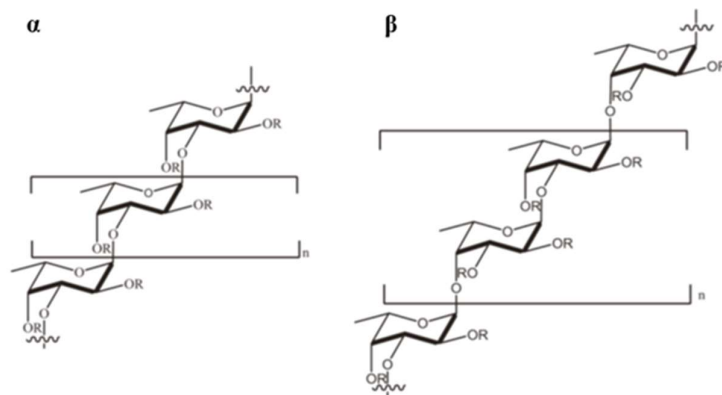
Στην διεθνή βιβλιογραφία αναφέρονται πολλές βιολογικές ιδότητες των καρραγενανών όπως η ανοσοτροποποιητική, η αντικαρκινική και η ανττική δράση. Κλινικές μελέτες έδειξαν ότι οι καρραγενάνες μπορεί να μειώσουν σημαντικά τα επίπεδα χοληστερόλης και τριγλυκεριδίων. Ακόμη, οι καρραγενάνες έχουν την ικανότητα να προάγουν την αναγέννηση των οστών και των χόνδρων. Το ποσοστό θεικών εστέρων έχει αποδειχθεί ότι επηρεάζει σημαντικά την βιολογική δράση των καρραγενανών. Για παράδειγμα οι λ-καρραγενάνες παρουσιάζουν την υψηλότερη αντιπηκτική και αντιοξειδωτική δράση γεγονός που αποδίδεται στο μεγαλύτερο ποσοστό θεικών εστέρων (Cunha & Grenha, 2016; Dinoro et al., 2019; Goonoo et al., 2017; Necas & Bartosikova, 2013).

Επιπλέον, οι ι-καρραγενάνες εμφανίζουν ανττική δράση έναντι διαφόρων ιών και υπάρχει μη συνταγογραφούμενο ανττικό ρινικό σπρέι (Carragelose) με ένδειξη έναντι των πρώιμων συμπτωμάτων γρίπης (Martins et al., 2014). Σε πρόσφατη έρευνα, έχει αναφερθεί ότι η χρήση ι-καρραγενανών υπό μορφή ρινικού σπρέι μπορεί να χρησιμοποιηθεί προφυλακτικά έναντι του COVID-19 με ικανοποιητικά αποτελέσματα. Σε άλλη μελέτη απεδείχθη ότι οι ι-καρραγενάνες είναι 10 φορές πιο αποτελεσματικές από τις κ- και λ-καρραγενάνες έναντι του SARS-CoV-2 και άλλων παραλλαγών του COVID-19. Επίσης σε κλινική μελέτη απεδείχθη ex vivo ότι η κατανάλωση παστίλιων με ι-καρραγενάνες αναστέλλει την αναπαραγωγή του SARS-CoV-2 (Fröba et al., 2021).

1.3.2. Φουκοϊδάνες

Οι φουκοϊδάνες απομονώθηκαν για πρώτη φορά το 1913 και έκτοτε αποτελούν συχνό αντικείμενο μελέτης λόγω της πληθώρας των βιολογικών δράσεων που παρουσιάζουν (Luthuli et al., 2019). Πρόκειται για μία ομάδα θεικών πολυσακχαριτών που εντοπίζεται κυρίως στα φαιοφύκη και σε κάποια θαλάσσια ασπόνδυλα (αχινοί, θαλάσσια αγγούρια) (Li et al., 2008). Οι φουκοϊδάνες στην πραγματικότητα είναι ετερογενείς πολυσακχαρίτες που αποτελούνται κυρίως από α-L-φουκόζη, θεικές ομάδες και σε μικρά ποσοστά ξυλόζη, μαννόζη, γαλακτόζη, ραμνόζη, αραβινόζη, γλυκόζη, ουρονικό οξύ και ακετυλιομένα υδροξύλια (Luthuli et al., 2019). Η χημική σύσταση των φουκοϊδανών ποικίλλει ανάλογα τον οργανισμό, την εποχή συλλογής και την μέθοδο εκχύλισης (Li et al., 2008; Luthuli et al., 2019). Συνήθως αποτελούνται από επαναλαμβανόμενες ομάδες α-1,3-φουκοκυρανόζης ή από εναλλασσόμενες μονάδες α-1,3 και α-1,4- φουκοκυρανόζης που μπορεί να είναι υποκατεστημένες με θεικές ομάδες και ακετυλιομένα υδροξύλια, ενώ μπορεί να φέρουν και διακλαδώσεις (Εικ. 5) (Li et

al., 2008). Συνήθως οι φουκοϊδάνες που απομονώνονται από φύκη είναι διακλαδισμένες με περισσότερες θειικές ομάδες και μεγαλύτερο αριθμό άλλων σακχάρων πέραν της α-L-φουκόζης ενώ από τα εχινόδερμα και τους αχινούς είναι γραμμικές και αποτελούνται κυρίως από α-L-φουκόζη. Οι φουκοϊδάνες που απομονώνονται από φύκη έχουν μεγαλύτερο ενδιαφέρον καθώς λόγω της πολυπλοκότητας της δομής τους εμφανίζουν πιο σημαντικές βιολογικές δράσεις (Zayed et al., 2020).



Εικόνα 5. Γενική δομή των φουκοϊδανών: (α) επαναλαμβανόμενες μονάδες α-1-3-φουκοπυρανόζης (β) εναλλασσόμενες μονάδες α-1,3 και α-1,4- φουκοπυρανόζης, όπου R μπορεί να είναι θειικές ομάδες, φουκοπυρανόζη ή γλυκουρονικό οξύ. Η θέση των σακχάρων ξυλόζη, μαννόζη, γαλακτόζη, ραμνόζη, αραβινόζη, γλυκόζη παραμένει άγνωστη για πολλά είδη (Luthuli et al., 2019).

Η χημική δομή των φουκοϊδανών επηρεάζει τα φυσικοχημικά χαρακτηριστικά του πολυσακχαρίτη και τις βιολογικές του ιδιότητες (Zhao et al., 2018; Venugopal, 2019). Το ποσοστό των θειικών εστέρων επί του πολυσακχαρίτη και ο βαθμός διακλάδωσης καθορίζουν την διαλυτότητα του (Venugopal, 2019). Η βιοδραστικότητα των φουκοϊδανών επηρεάζεται από την χημική σύσταση, το μοριακό βάρος, το ποσοστό θειικών εστέρων καθώς και την θέση των θειικών εστέρων, τα οποία εξαρτώνται από το είδος του οργανισμού, την γεωγραφική τοποθεσία, την εποχή συλλογής αλλά και την μέθοδο εκχύλισης και παραλαβής (Zhao et al., 2018). Ωστόσο, λόγω της πολυπλοκότητας που εμφανίζει η δομή τους είναι δύσκολο να καθοριστεί η ακριβής σχέση δομής-δράσης (Zayed et al., 2020).

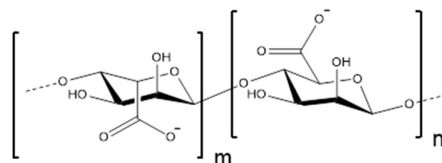
Μία από τις πιο μελετημένες βιολογικές δράσεις των φουκοϊδανών είναι η αντιπηκτική δράση. Σύμφωνα με μελέτες όσο μεγαλύτερο είναι το ποσοστό των θειικών εστέρων τόσο πιο ισχυρή είναι η αντιπηκτική δράση που παρουσιάζουν ενώ φαίνεται να επηρεάζεται και από την θέση των θειικών ομάδων στα σάκχαρα. Είναι

απαραίτητο να έχουν μεγάλο μοριακό βάρος και ευέλικτη διαμόρφωση ώστε να έχουν αντιπηκτική δράση καθώς απαιτείται μακρά αλυσίδα για να δεσμεύει την θρομβίνη. Η αντιθρομβωτική δράση των φουκοϊδανών έχει αποδειχθεί και *in vivo* όπου παρουσιάστηκε δύο φορές ισχυρότερη από αυτή της ηπαρίνης. Συνεπώς, θα μπορούσαν να χρησιμοποιηθούν ως αντιπηκτικό ή αντιθρομβωτικό φάρμακο ή και ως λειτουργικό τρόφιμο (Cunha & Grenha, 2016; Li et al., 2008).

Επιπλέον, έχει αποδειχθεί *in vitro* και *in vivo* ότι διαθέτουν αντιική δράση έναντι πολλών ιών όπως του HIV και του έρπητα (Li et al., 2008; Luthuli et al., 2019). Σύμφωνα με μελέτες η *per os* λήψη φουκοϊδανών μπορεί να αναστείλει την αντιγραφή του ιού και να διεγείρει την ανοσολογική απόκριση. Ακόμη, εμφανίζουν αντικαρκινική, αντιυπερλιπιδαιμική, αντιοξειδωτική, και αντιφλεγμονώδη δράση (Li et al., 2008). Τέλος, οι φουκοϊδάνες έχουν την ικανότητα να ενισχύουν την αναγέννηση του χόνδρου και των οστών (Dinoro et al., 2019).

1.3.3. Αλγινικά οξέα και αλγινικά άλατα

Το αλγινικό οξύ και τα αλγινικά άλατα απομονώθηκαν για πρώτη φορά το 1883 και είναι από τους πιο μελετημένους θαλάσσιους πολυσακχαρίτες (Guo et al., 2020; Ιλιου et al., 2022). Τα αλγινικά οξέα είναι μία ομάδα γραμμικών ανιοντικών πολυσακχαριτών, οι οποίοι εντοπίζονται στο κυτταρικό τοίχωμα των φαιοφυκών, μπορούν όμως να απομονωθούν και από βακτήρια, όπως πχ. του γένους *Azotobacter* και *Pseudomonas* (Taemeh et al., 2020). Η χημική τους δομή αποτελείται από τα ουρονικά οξέα β-D-μαννουρονικό οξύ (M) και α-L-γουλουρονικό οξύ (G) συνδεδεμένα με 1,4 γλυκοσιδικό δεσμό (Εικ. 6).



Εικόνα 6. Γενική δομή των αλγινικών οξέων και αλγινικών αλάτων.

Τα οξέα βρίσκονται στο πολυμέρες υπό μορφή ομογενών ομάδων πολυ-M ή πολυ-G και χωρίζονται από περιοχές όπου εναλλάσσονται (GMGMGM...) (Taemeh et al., 2020; Venugopal, 2019; Yang et al., 2011). Η αναλογία και η αλληλουχία των μονάδων M/G ποικίλλουν ανάλογα το είδος του οργανισμού, την τοποθεσία και την

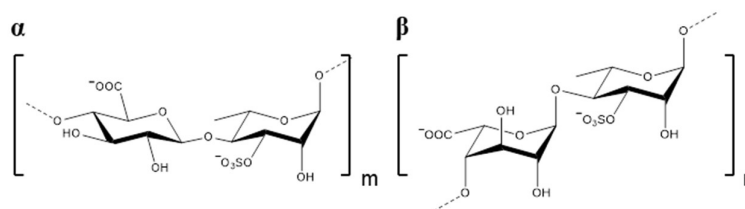
εποχή συλλογής. Η αναλογία και η αλληλουχία των μονάδων M/G επηρεάζουν τα φυσικοχημικά χαρακτηριστικά των αλγινικών οξέων (Lee & Mooney, 2012; Taameh et al., 2020; Venugopal, 2019). Συνήθως τα αλγινικά άλατα που απομονώνονται από φύκη έχουν υψηλό ποσοστό γουλουρονικού οξέος, ενώ αυτά που απομονώνονται από βακτήρια έχουν υψηλό ποσοστό μαννουρονικού οξέος (Taameh et al., 2020). Τα αλγινικά (οξέα ή άλατα) με χαμηλή αναλογία M/G σχηματίζουν συμπαγείς γέλες, ενώ εκείνα με υψηλή αναλογία M/G σχηματίζουν ελαστικές γέλες. Παρουσία δισθενών κατιόντων, όπως το Ca^{2+} , τα αλγινικά οξέα σχηματίζουν θερμικά μη αναστρέψιμη γέλη αδιάλυτη στο νερό (Guo et al., 2020).

Το αλγινικό οξύ είναι εγκεκριμένο από τον FDA για διάφορες εφαρμογές όπως επούλωση πληγών, για υλικά οδοντικών αποτυπωμάτων και ως πρόσθετο τροφίμων καθώς είναι βιοσυμβατό, διαθέσιμο με χαμηλό κόστος και έχει την ικανότητα να σχηματίζει γέλη (Taameh et al., 2020). Στην διεθνή βιβλιογραφία υπάρχει πληθώρα αναφορών για τις βιολογικές δράσεις του αλγινικού οξέος. Πιο συγκεκριμένα, έχει αντι-αναφυλακτικές, αντικαρκινικές, ανοσοτροποιοτικές, αντιφλεγμονώδεις, αντιβακτηριακές και αντιοξειδωτικές ιδιότητες. Επιπρόσθετα, μειώνει την πίεση του αίματος και τα επίπεδα χοληστερόλης, ενώ αποτρέπει την απορρόφηση βαρέων μετάλλων στο σώμα. Τέλος, χρησιμοποιείται σε παθήσεις του πεπτικού για την συμπτωματική αγωγή διαταραχών που οφείλονται σε παθολογική οξύτητα (Guo et al., 2020; Iliou et al., 2022; Kraan, 2012).

1.3.4. Ουλβάνες

Οι ουλβάνες, αν και απομονώθηκαν πρώτη φορά το 1940-1950, είναι ο λιγότερο μελετημένος θειικός πολυσακχαρίτης (Alves et al., 2013). Πρόκειται για ομάδα θεικών πολυσακχαριτών που βρίσκονται στο κυτταρικό τοίχωμα των χλωροφυκών και κυρίως στα γένη *Ulva* και *Enteromorpha* και συνιστούν το 9-45% της ξηρής βιομάζας (Kidgell et al., 2019). Οι ουλβάνες στην πραγματικότητα είναι ετερογενείς πολυσακχαρίτες που αποτελούνται κυρίως από θεική ραμνόζη, ξυλόζη, ιδουρονικό και γλυκουρονικό οξύ. Η κύρια δισακχαριτική μονάδα των ουλβανών είναι το γλυκουρονικό ή ιδουρονικό οξύ και η θεική ραμνόζη με την μορφή αλδοβιουρονικών οξέων γνωστών ως A3s και B3s ουλβανοβιουρονικά οξέα (Εικ. 7). Το ουλβανοβιουρονικό οξύ A3s αποτελείται από γλυκουρονικό οξύ και θεική ραμνόζη ενώ το B3s αποτελείται από ιδουρονικό οξύ και θεική ραμνόζη (Cunha & Grenha, 2016; Tziveleka et al., 2019). Συνήθως έχουν μοριακό βάρος 150 με 2000 kDa. Η ακριβής σύσταση των ουλβανών ποικίλλει ανάλογα

τον οργανισμό, την περιοχή και την εποχή συλλογής, καθώς και την επεξεργασία του οργανισμού μετά την συλλογή του (Wang et al., 2014).



Εικόνα 7. Γενική δομή των ουλβανών αποτελούμενων από ουλβανοβιουρονικό οξύ (α) A3s (β) B3s.

Οι ουλβάνες ξεχωρίζουν από τους υπόλοιπους θαλάσσιους πολυσακχαρίτες λόγω της παρουσίας σπάνιων σακχάρων, όπως το ιδουρονικό οξύ και η θειική ραμνόζη που ομοιάζουν τις γλυκοζαμινογλυκάνες ζωικής προέλευσης. Ως εκ τούτου, θα μπορούσαν να αποτελέσουν ένα οικονομικό και άφθονο υποκατάστατο ηπαρινοειδών ουσιών για βιοϊατρικές εφαρμογές (Chiellini & Morelli, 2011).

Έχει αποδειχθεί ότι εμφανίζουν σημαντικές βιολογικές ιδιότητες όπως αντιοξειδωτική, αντιπηκτική, αντιαγγειογενετική, αντιυπερλιπιδαιμική και ανοσοτροποποιητική, οι οποίες επηρεάζονται από την σύνθεση του πολυσακχαρίτη, το μοριακό βάρος και το ποσοστό των θειικών ομάδων (Alves et al., 2013; Chiellini & Morelli, 2011). Επιπλέον, έχουν την ικανότητα να προάγουν την αναγέννηση των οστών (Dinoro et al., 2019). Ωστόσο παρά τις σπουδαίες βιολογικές δράσεις που παρουσιάζουν δεν έχουν μελετηθεί εκτενώς (Alves et al., 2013).

1.4. Βιοϋλικά από θαλάσσια βιοπολυμερή

Τα τελευταία χρόνια υπάρχει ολοένα και αυξανόμενο ενδιαφέρον για την δημιουργία καινοτόμων βιοϋλικών με μοναδικά χαρακτηριστικά για διάφορες βιοϊατρικές εφαρμογές όπως η επούλωση πληγών, τα συστήματα μεταφοράς φαρμάκων, τα αντιμικροβιακά υλικά, η ιστομηχανική και η αναγεννητική ιατρική (Tziveleka et al., 2019; Wan et al., 2021). Η βιώσιμη εκμετάλλευση και αξιοποίηση των θαλάσσιων φυσικών πόρων συνιστά μία εξαιρετικά ελκυστική επιλογή για την ανάπτυξη καινοτόμων βιοϋλικών υψηλής αξίας με περιβαλλοντικά και οικονομικά οφέλη (Alves et al., 2013). Πολλά θαλάσσια βιοπολυμερή θα μπορούσαν να απομονωθούν από παραπροϊόντα της αλιευτικής βιομηχανίας προσφέροντας σημαντικά οφέλη τόσο στο περιβάλλον όσο και στην βιομηχανία (Claverie et al., 2020; Coppola et

al., 2020).

Απαραίτητη προϋπόθεση για να χαρακτηριστεί ένα υλικό ως βιοϋλικό είναι η βιοσυμβατότητά του (Nair & Laurencin, 2007). Πέρα από την υψηλή βιοσυμβατότητα και τις πολυάριθμες βιολογικές δράσεις που παρουσιάζουν τα θαλάσσια βιοπολυμερή, θεωρούνται ασφαλέστερα από τα βιοπολυμερή ζωικής προέλευσης και δίνουν νέες προοπτικές στον τομέα των βιοϊατρικών εφαρμογών. Τα τελευταία χρόνια έχουν αναπτυχθεί βιοϋλικά από θαλάσσια βιοπολυμερή σε διάφορες μορφές όπως οι υδρογέλες, οι μεμβράνες, τα νανοσωματίδια, οι τρισδιάστατες δομές και οι νανοϊνες (Piou et al., 2022; Manivasagan et al., 2017; Tziveleka et al., 2019).

Η χρήση των θαλάσσιων βιοπολυμερών πολλές φορές περιορίζεται λόγω της χαμηλής διαλυτότητας, του υψηλού ιξώδους και της χαμηλής βιοδιαθεσιμότητας τους. Ιδιαίτερο ενδιαφέρον παρουσιάζει η τροποποίηση τους ώστε να αποκτήσουν τις επιθυμητές ιδιότητες (Zia et al., 2017). Η χημική τροποποίηση των θαλάσσιων βιοπολυμερών είναι αρκετά εύκολη λόγω της παρουσίας των δραστικών τους ομάδων (Piou et al., 2022). Επιπλέον, η διάσπαση των πολυσακχαριτών σε μικρότερου μοριακού βάρους πολυσακχαρίτες ή ολιγοσακχαρίτες μπορεί να επηρεάσει τις φυσικοχημικές ιδιότητες ή/και τις βιολογικές δράσεις τους ή ακόμη και να προσδώσει νέες ιδιότητες που δεν υπήρχαν στο αρχικό υλικό (Guo et al., 2022; Tecson et al., 2021). Σε πολλές βιοϊατρικές εφαρμογές κρίνεται απαραίτητο τα βιοπολυμερή να έχουν συγκεκριμένο μοριακό βάρος προκειμένου να επιδείξουν την επιθυμητή ή ενισχυμένη δραστηριότητα. Χαρακτηριστικά έχει αναφερθεί ότι βιοπολυμερή με μικρό μοριακό βάρος παρουσιάζουν καλύτερη διάχυση στους βιολογικούς ιστούς και στην ροή του αίματος (Guo et al., 2014).

1.5. Μικρο-/νανοϊνες και ηλεκτροϊνοποίηση

1.5.1. Μικρο-/νανοϊνες

Νανοϊνες χαρακτηρίζονται οι ίνες με διάμετρο μικρότερη ή ίση των 1000 nm (Tanioka et al., 2016). Υπάρχουν αρκετοί μέθοδοι για την παραγωγή μικρο-/νανοϊνών, όπως ο διαχωρισμός φάσης, η αυτοδιάταξη και η ηλεκτροϊνοποίηση. Η ηλεκτροϊνοποίηση (electrospinning) πλεονεκτεί έναντι των άλλων καθώς είναι μία συγκριτικά οικονομική-αποδοτική μέθοδος παραγωγής μικρο-/νανοϊνών από μία μεγάλη ποικιλία πρώτων υλών με έναν σχετικά εύκολο, επαναλήψιμο και απλό τρόπο (Schiffman & Schauer, 2008). Έτσι, φαίνεται να είναι η μοναδική μέθοδος η οποία

μπορεί να αναπτυχθεί περαιτέρω για τη μαζική παραγωγή συνεχών μικρο-/νανοϊνών από διάφορα πολυμερή.

Οι ηλεκτροϊνοποιημένες νανοΐνες έχουν προσελκύσει μεγάλο ερευνητικό ενδιαφέρον τα τελευταία χρόνια λόγω των μοναδικών χαρακτηριστικών τους (Iliou et al., 2022). Όταν οι διάμετροι των πολυμερικών ινών μειώνονται από μm σε nm , εμφανίζουν εκπληκτικά χαρακτηριστικά (Huang et al., 2003). Οι ηλεκτροϊνοποιημένες ίνες έχουν εξαιρετικά μεγάλο μήκος το οποίο θα μπορούσε να είναι έως αρκετά χιλιόμετρα καθώς η ηλεκτροϊνοποίηση είναι μία συνεχής διαδικασία. Έχουν πολύ λεπτή διάμετρο και γι' αυτό εμφανίζουν μεγάλη, σε σχέση με τον όγκο τους, επιφάνεια. Ακόμη, έχουν υψηλό πορώδες λόγω της πλέξης των ινών. Οι πόροι μπορεί να βρίσκονται είτε στην επιφάνεια των ινών είτε μεταξύ των ινών μίας μεμβράνης (Li & Xia, 2004). Τέλος, εμφανίζουν βελτιωμένες φυσικοχημικές ιδιότητες καθώς σε αυτή την μέθοδο το διάλυμα και οι παράμετροι της μεθόδου μπορούν εύκολα να ρυθμιστούν προκειμένου να επιτευχθεί η επιθυμητή μορφολογία και μηχανική αντοχή των ινών (Bhardwaj & Kundu, 2010).

1.5.2. Εφαρμογές μικρο-/νανοϊνών

Η μεγάλη ποικιλία των υλικών που μπορούν να ηλεκτροϊνοποιηθούν σε συνδυασμό με τα μοναδικά χαρακτηριστικά των μικρο-/νανοϊνών καθιστούν την τεχνική και τις προκύπτουσες δομές ιδανικές για πληθώρα εφαρμογών, όπως:

- Ελεγχόμενη αποδέσμευση φαρμάκων
- Επούλωση πληγών
- Μηχανική των ιστών
- Προστατευτικές μάσκες
- Φίλτρα
- Παραγωγή ενέργειας
- Αισθητήρες
- Κατάλυση

1.5.2.1. Ελεγχόμενη αποδέσμευση φαρμάκων

Συστήματα ελεγχόμενης αποδέσμευσης φαρμάκων χρησιμοποιούνται για να βελτιώσουν την θεραπευτική αποτελεσματικότητα και ασφάλεια των φαρμάκων με την μεταφορά των θεραπευτικών παραγόντων στο σημείο δράσης τους με καθορισμένο ρυθμό για ένα ορισμένο χρονικό διάστημα. Μια μεγάλη ποικιλία από βιοσυμβατά και βιοαποικοδομήσιμα πολυμερή έχουν χρησιμοποιηθεί για το σκοπό αυτό. Οι

πολυμερικές νανοϊνες μελετώνται για την ικανότητα τους να ενθυλακώνουν και να μεταφέρουν βιοδραστικά μόρια για θεραπευτικές εφαρμογές. Οι νανοϊνες χρησιμοποιούνται ως φορείς φαρμάκων λόγω των υψηλών λειτουργικών χαρακτηριστικών τους και διότι τα συστήματα μεταφοράς φαρμάκων βασίζονται στην αρχή ότι ο ρυθμός διάλυσης των σωματιδίων του φαρμάκου αυξάνεται με την αύξηση του εμβαδού επιφάνειας του φαρμάκου και του αντίστοιχου φορέα. Το μεγάλο εμβαδόν επιφάνειας των νανοϊνών επιτρέπει την γρήγορη και αποτελεσματική εξάτμιση του διαλύτη, η οποία παρέχει στο ενσωματωμένο φάρμακο περιορισμένο χρόνο για να ανακρυσταλλωθεί και ευνοεί έτσι τον σχηματισμό άμορφων διασπορών ή στερεών διαλυμάτων. Ανάλογα με το χρησιμοποιούμενο πολυμερές, η απελευθέρωση της φαρμακευτικής δόσης μπορεί να σχεδιαστεί ως ταχεία, άμεση, καθυστερημένη ή τροποποιημένη διάλυση. Μελέτες έχουν δείξει ότι τα ινώδη ικρίωματα είναι κατάλληλοι φορείς τόσο για υδρόφιλα όσο και για υδρόφοβα φάρμακα και ότι ο ρυθμός αποδέσμευσης τους μπορεί να ρυθμιστεί με διαμόρφωση της μορφολογίας, του πορώδους και της σύστασης των νανοϊνών (Bhardwaj & Kundu, 2010; Vasita & Kati, 2006).

Συστήματα νανοϊνών για ελεγχόμενη απελευθέρωση φαρμάκων (ή δραστικών ενώσεων γενικά) παρουσιάζουν μεγάλο ενδιαφέρον για την θεραπεία όγκων. Έχει δοκιμαστεί η ηλεκτροϊνιοποίηση της ταξόλης με πολυγαλακτικό οξύ (PLA) και έχουν γίνει μελέτες για χρήση των ινωδών ικριωμάτων στην τοπική χημειοθεραπεία. Οι νανοδομές αυτές πρέπει να πληρούν ορισμένες προδιαγραφές. Για παράδειγμα, θα πρέπει να προστατεύουν το φάρμακο από την αποσύνθεση του στην κυκλοφορία του αίματος και θα πρέπει να επιτρέπουν την ελεγχόμενη αποδέσμευση του για ένα ορισμένο χρονικό διάστημα με όσο το δυνατόν πιο σταθερό ρυθμό απελευθέρωσης. Επίσης, θα πρέπει να είναι σε θέση να διαπεράσουν ορισμένες μεμβράνες (για παράδειγμα τον αιματοεγκεφαλικό φραγμό) και να διασφαλίσουν ότι το φάρμακο απελευθερώνεται μόνο στον στοχευόμενο ιστό. Μπορεί ακόμη να είναι απαραίτητο η απελευθέρωση του φαρμάκου να ενεργοποιείται έπειτα από ένα ερέθισμα (είτε εξωτερικό είτε εσωτερικό) και να συνεχίσει μόνο για όσο διάστημα είναι απαραίτητο για την θεραπεία (Greiner & Wendorff, 2007).

1.5.2.2. Επούλωση πληγών

Η επούλωση πληγών είναι μία πολύπλοκη διαδικασία που περιλαμβάνει την αιμόσταση, την φλεγμονή, τον πολλαπλασιασμό κυττάρων και την αναδιαμόρφωση (Memic et al., 2019; Sahana & Rekha, 2018). Ένα ιδανικό υλικό για επούλωση πληγών

θα πρέπει να παρέχει αιμοστατικές και αντιβακτηριακές ιδιότητες, να απορροφά την περίσσεια υγρών και να επιτρέπει την σωστή παροχέτευση υγρών. Οι ηλεκτροϊοντοποιημένες νανοΐνες έχουν προσελκύσει μεγάλο ερευνητικό ενδιαφέρον για την επούλωση πληγών ή εγκαυμάτων καθώς έχουν την ιδιότητα να μιμούνται την δομή της εξωκυττάριας μήτρας και κατά συνέπεια ευνοούν την προσκόλληση, τον πολλαπλασιασμό και την μετανάστευση των ινοβλαστών, και άρα την αναγέννηση του ιστού στην περιοχή του τραύματος. Επιπλέον, μπορούν να λειτουργήσουν ως μέσο μεταφοράς θεραπευτικών παραγόντων στην πληγή ώστε να επιταχύνουν την διαδικασία της επούλωσης (Memici et al., 2019).

Με την βοήθεια ηλεκτρικού πεδίου λεπτές ηλεκτροϊοντοποιημένες ίνες από βιοαποικοδομήσιμα πολυμερή μπορούν να εναποτίθενται απευθείας πάνω στην τραυματισμένη περιοχή του δέρματος ώστε να σχηματιστεί ένα ινώδες στρώμα, το οποίο βοηθά στην επούλωση και την φυσιολογική ανάπτυξη του δέρματος αποτρέποντας τον σχηματισμό ουλώδους ιστού γεγονός που συχνά συμβαίνει με παραδοσιακές θεραπείες. Αυτά τα υποστρώματα από νανοΐνες έχουν μεγέθη πόρων που κυμαίνονται από 500 nm έως 1 μm , και είναι αρκετά μικρά για την προστασία του τραύματος από βακτηριακή διείσδυση (Huang et al., 2003). Πρόσφατα, έχουν κατασκευαστεί και φορητές συσκευές ηλεκτροϊονποίησης (Εικ. 8) (Memici et al., 2019).



Εικόνα 8. Φορητή συσκευή ηλεκτροϊονποίησης για άμεση εφαρμογή στην επούλωση πληγών (Huang et al., 2003).

1.5.2.3. Ιστομηχανική

Η ιστομηχανική αποτελεί ένα διεπιστημονικό πεδίο που συνδυάζει τις αρχές της μηχανικής και των βιοεπιστημών για την ανάπτυξη βιολογικών υποκατάστατων, καθώς επίσης για την αποκατάσταση, την συντήρηση ή την βελτίωση της λειτουργίας ενός

ιστού ή οργάνου. Η έρευνα για τα βιοϋλικά είναι ένα αναδυόμενο πεδίο που διαδραματίζει κεντρικό ρόλο στη μηχανική των ιστών, καθώς λειτουργούν ως μήτρες για την ανάπτυξη κυττάρων, τον πολλαπλασιασμό και τον σχηματισμό νέου ιστού σε τρεις διαστάσεις. Τα βιοαποικοδομήσιμα ικρίωματα (scaffolds) χρησιμοποιούνται στην ιστομηχανική ως προσωρινά εμφυτεύματα για τον εμβολιασμό, την κυτταρική εισβολή, τον πολλαπλασιασμό και την διαφοροποίηση των κυττάρων πριν από την αναγέννηση του βιολογικού ιστού ή του εξωκυτταρικού υλικού (ECM) (Bhardwaj & Kundu, 2010).

Για να είναι κατάλληλο ένα ικρίωμα, θα πρέπει να διαθέτει υψηλό πορώδες, με κατάλληλη κατανομή του μεγέθους των πόρων και να έχει μεγάλη επιφάνεια. Συχνά, χρειάζεται να είναι βιοδιασπώμενο με τον ρυθμό διάσπασης να ταιριάζει με τον ρυθμό σχηματισμού νέων ιστών. Ακόμη, απαιτείται να έχει την απαιτούμενη δομική ακεραιότητα ώστε να μην καταρρεύσουν οι πόροι του κατά την διάρκεια σχηματισμού νέου ιστού. Τέλος, πρέπει να είναι μη τοξικό στα κύτταρα και βιοσυμβατό, αλληλεπιδρώντας θετικά με τα κύτταρα ώστε να προάγει την κυτταρική προσκόλληση, τον πολλαπλασιασμό, την μετανάστευση και την λειτουργία των διαφοροποιημένων κυττάρων (Fang et al., 2008). Τα ανθρώπινα κύτταρα μπορούν να προσκολληθούν και να οργανωθούν γύρω από ίνες με διάμετρο μικρότερη από αυτή των κυττάρων. Έτσι, τα ικρίωματα που είναι κατασκευασμένα από νανοϊνες αποτελούν ιδανικό υπόστρωμα. Έχουν παρασκευαστεί νανοϊνες για το σκοπό αυτό από μια πληθώρα υλικών, όπως από τα φυσικά πολυμερή κολλαγόνο, αλγινικά άλατα, πρωτεΐνες μεταξιού, υαλουρονικό οξύ, χιτοζάνη, άμυλο, και από διάφορα συνθετικά πολυμερή ή και συνδυασμό τους (Huang et al., 2003).

1.5.2.4. Προστατευτικές μάσκες

Η εμφάνιση της πανδημίας του κορωνοϊού (SARS-CoV-2) το 2019 οδήγησε σε ευρεία χρήση προστατευτικών масκών για την μείωση της εξάπλωσης και της μόλυνσης από τον ιό. Σύμφωνα με μελέτες, το μέγεθος του κορωνοϊού κυμαίνεται από 60 έως 140 nm και η μετάδοση του γίνεται μέσω αερολυμάτων ή σταγονιδίων. Ως εκ τούτου, το ερευνητικό ενδιαφέρον στράφηκε στο σχεδιασμό масκών υψηλής προστασίας, δίνοντας έμφαση στη συγκράτηση των σωματιδίων, την διευκόλυνση της αναπνοής, την αντίσταση στην διείσδυση υγρών, το μικρό βάρος, την άνετη χρήση, την δυνατότητα παραγωγής σε μεγάλη κλίμακα και το χαμηλό κόστος (Cimini et al., 2023).

Οι ηλεκτροϊνοποιημένες νανοϊνες αποτελούν ιδανική επιλογή καθώς λόγω του μικρού μεγέθους των πόρων, και της μεγάλης, σε σχέση με τον όγκο τους, επιφάνειας εμφανίζουν υψηλή ικανότητα διήθησης. Επιπλέον, η ενσωμάτωση διαφόρων

αντιμικροβιακών ουσιών στις νανοϊνες δίνει την δυνατότητα να σχεδιαστούν μάσκες με αντιβακτηριακή και αντιϊκή δράση (Cimini et al., 2023; Kchaou et al., 2021). Στην διεθνή βιβλιογραφία υπάρχει μεγάλος αριθμός αναφορών σχετικά με την χρήση των ηλεκτροϊνοποιημένων ινών για την δημιουργία προστατευτικών масκών έναντι της COVID-19 (Cimini et al., 2023; Essa et al., 2021; Kchaou et al., 2021). Κατά την διάρκεια της πρόσφατης πανδημίας, η ανάγκη για προστατευτικές μάσκες υψηλής προστασίας, οδήγησε πολλές εταιρείες στην βιομηχανική παραγωγή масκών από ηλεκτροϊνοποιημένες νανοϊνες (Cimini et al., 2023).

1.5.3. Ηλεκτροϊνοποίηση

Η ηλεκτροϊνοποίηση είναι μια τεχνική παραγωγής πολύ λεπτών ινών από πολυμερή μέσω εφαρμογής ηλεκτροστατικών δυνάμεων. Μπορεί να εφαρμοστεί σε συνθετικά και φυσικά πολυμερή, σε κράματα πολυμερούς και σε πολυμερή που φέρουν δραστικές ουσίες, νανοσωματίδια, καθώς και μέταλλα ή κεραμικά. Πρόκειται για την μόνη μέθοδο που επιτρέπει την κατασκευή συνεχών ινών με διάμετρο μέχρι και μερικά nm και βρίσκει εφαρμογή και σε βιομηχανική κλίμακα σε διάφορους τομείς, όπως τα βιοιατρικά υλικά, η τεχνολογία αισθητήρων, η κατάλυση και η διήθηση (Greiner & Wendorff, 2007).

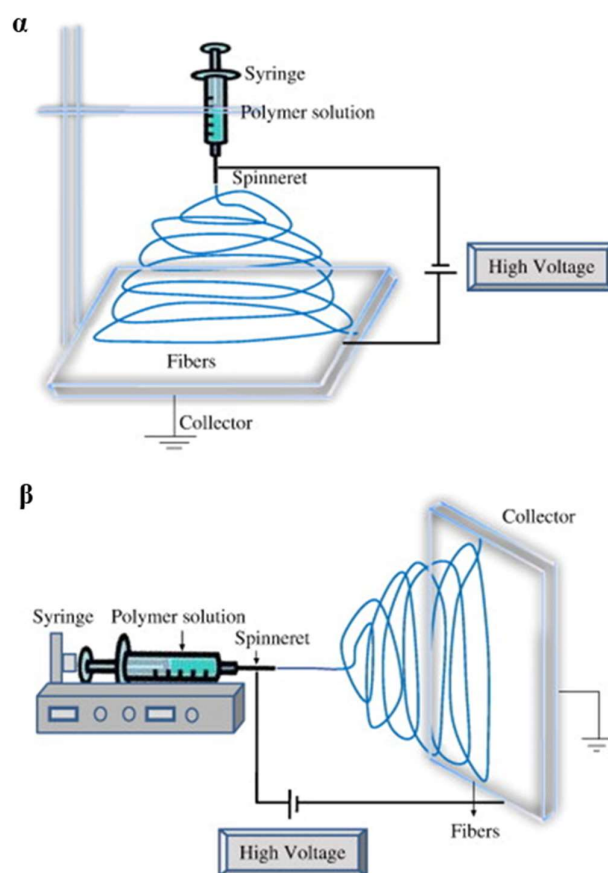
1.5.3.1. Ιστορικά στοιχεία

Η ηλεκτροστατική ινοποίηση (electrostatic spinning) ή αλλιώς ηλεκτροϊνοποίηση θεωρείται μία παραλλαγή του ηλεκτροψεκασμού (electrospraying), ο οποίος πρωτοαναφέρεται το 1745 όταν ο Bose περιέγραψε τα αερολύματα που δημιουργούνται από την εφαρμογή υψηλού ηλεκτρικού δυναμικού σε σταγόνες υγρού. Το 1882 ο λόρδος Rayleigh υπολόγισε το ποσό του φορτίου που χρειάζεται για να υπερβεί την επιφανειακή τάση μιας σταγόνας. Μεταγενέστερα, οι πρώτες διατάξεις ψεκασμού υγρών μέσω της εφαρμογής ηλεκτρικού πεδίου κατοχυρώθηκαν με δίπλωμα ευρεσιτεχνίας από τους Cooley και Morton το 1902 και 1903 (Wang et al., 2013). Το 1929 ο Hagiwaba και η ομάδα του περιέγραψαν την κατασκευή τεχνητού μεταξιού μέσω της εφαρμογής ηλεκτρικού πεδίου (Greiner & Wendorff, 2007). Το 1934 ο Anton Formhals κατοχύρωσε την πρώτη πατέντα για την ηλεκτροϊνοποίηση, καθώς περιέγραψε την διαδικασία και τον εξοπλισμό για την παραγωγή ινών πολυμερούς εκμεταλλευόμενος τις ηλεκτροστατικές απώσεις ανάμεσα στα επιφανειακά φορτία. Η εφεύρεση του Formhals συνέβαλε σημαντικά στο να ξεπεραστούν κάποιες τεχνικές δυσκολίες που υπήρχαν όσον αφορά την ξήρανση και την συλλογή των ινών. Το 1969 ο

Geoffrey Ingram Taylor ασχολήθηκε με το σχήμα της σταγόνας του πολυμερούς που παράγεται στην άκρη της βελόνας όταν εφαρμόζεται ηλεκτρικό πεδίο. Έφτασε στο συμπέρασμα ότι πρόκειται για κώνο και ότι ο πίδακας εκτινάσσεται από τις κορυφές του κώνου. Στην βιβλιογραφία καθιερώθηκε να αναφέρεται ως ο κώνος του Taylor. Ακόμη, υπολόγισε ότι απαιτείται γωνία 49.3° για να εξισορροπηθεί η επιφανειακή τάση του πολυμερούς με τις ηλεκτροστατικές δυνάμεις. Το κωνικό σχήμα του πίδακα είναι ιδιαίτερα σημαντικό, καθώς καθορίζει την έναρξη της εκτατικής βαθμιδωτής ταχύτητας κατά την διαδικασία σχηματισμού των ινών. Τα επόμενα χρόνια στράφηκε η προσοχή στην δομική μορφολογία των νανοϊνών, καθώς και στον τρόπο που αλληλεπιδρούν οι διάφοροι παράμετροι της διαδικασίας στα δομικά χαρακτηριστικά τους. Προκειμένου να χαρακτηρίσουν τις νανοΐνες, οι ερευνητές χρησιμοποίησαν τεχνικές, όπως ευρυγώνια περίθλαση ακτινών X (WADX), ηλεκτρονική μικροσκοπία σάρωσης (SEM), ηλεκτρονική μικροσκοπία διέλευσης (TEM) και διαφορική θερμιδομετρία σάρωσης (DSC) (Subbiah et al., 2005). Το 1970 ο Simm παρήγαγε ίνες με διάμετρο μικρότερη από $1\ \mu\text{m}$ (Greiner & Wendorff, 2007). Το 1971 ο Baumgarten ασχολήθηκε με την ηλεκτροϊονοποίηση ακρυλικών μικρο-/νανοϊνών, των οποίων η διάμετρος ποικίλε από 500 έως 1100 nm. Το 1987 ο Hayati μελέτησε την επίδραση του ηλεκτρικού πεδίου, τις πειραματικές συνθήκες, καθώς και τους παράγοντες που επηρεάζουν την σταθερότητα και την διασπορά των ινών. Κατέληξε στο συμπέρασμα ότι η ειδική αγωγιμότητα του υγρού παίζει κυρίαρχο ρόλο στην ηλεκτροστατική διατάραξη της επιφάνειάς του. Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι τα υψηλής αγωγιμότητας ρευστά με αυξημένη εφαρμοζόμενη τάση παρήγαγαν εξαιρετικά ασταθείς πίδακες, οι οποίοι προσανατολίζονται σε διαφορετικές κατευθύνσεις. Σχετικά σταθεροί πίδακες παρήχθησαν με ημιαγώγιμα και μονωτικά υγρά. Ακόμη, φάνηκε ότι οι ασταθείς πίδακες παράγουν ίνες με μεγαλύτερη διάμετρο (Subbiah et al., 2005). Η προσοχή στράφηκε περισσότερο προς την ηλεκτροϊονοποίηση την δεκαετία του 1990, οπότε κέρδισε μεγάλο ερευνητικό ενδιαφέρον. Αυτό οφείλεται σε μεγάλο βαθμό στην ενασχόληση με την τεχνική διαφόρων επιστημονικών ομάδων, όπως του Reneker. Ο λόγος γι' αυτό είναι ο συνδυασμός θεμελιώδους και εφαρμοσμένης έρευνας από διαφορετικούς επιστημονικούς κλάδους, καθώς και η αυξημένη γνώση που επήλθε σχετικά με την πιθανή εφαρμογή των νανοϊνών και γενικότερα των νανοϋλικών σε εμπορικό επίπεδο. Όλες αυτές οι δυνατότητες που δίνονται από την ηλεκτροϊονοποίηση, αλλά και η μεγάλη ανάπτυξη της αντικατοπτρίζονται σήμερα στον μεγάλο αριθμό επιστημονικών δημοσιεύσεων και διπλωμάτων ευρεσιτεχνίας (Greiner & Wendorff, 2007).

1.5.3.2. Διάταξη ηλεκτροϊνοποίησης

Μια τυπική διάταξη ηλεκτροϊνοποίησης αποτελείται από μία γεννήτρια παροχής υψηλής τάσης, μία προγραμματιζόμενη αντλία πάνω στην οποία εφαρμόζεται η σύριγγα με το πολυμερικό διάλυμα και έναν γειωμένο συλλέκτη (Εικ. 9). Συνήθως χρησιμοποιείται γεννήτρια παροχής συνεχούς ρεύματος (DC), αν και μπορεί να χρησιμοποιηθεί και εναλλασσόμενου ρεύματος (AC). Ο συλλέκτης μπορεί να έχει οποιοδήποτε σχήμα ανάλογα με τις ανάγκες, όπως επίπεδη πλάκα ή περιστρεφόμενος κύλινδρος (Li & Xia, 2004).

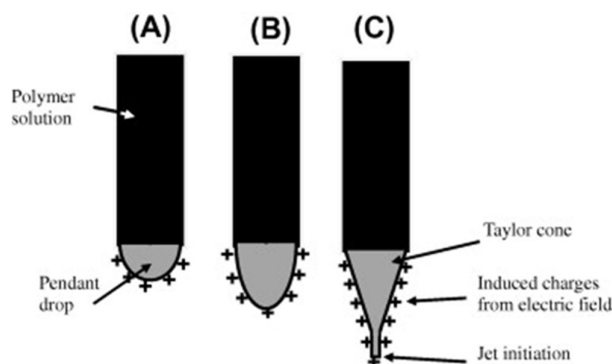


Εικόνα 9. Σχηματική απεικόνιση της διάταξης ηλεκτροϊνοποίησης: (α) κάθετη διάταξη (β) οριζόντια διάταξη (Bhardwaj & Kundu, 2010).

1.5.3.3. Αρχή της μεθόδου

Εκ πρώτης όψεως φαίνεται να πρόκειται για μία απλή και εύκολα ελεγχόμενη τεχνική. Στην πραγματικότητα όμως ο μηχανισμός της είναι ιδιαίτερα περίπλοκος. Αρχικά, διάλυμα πολυμερούς ωθείται με την βοήθεια αντλίας μέσω ενός λεπτού ακροφυσίου με εσωτερική διάμετρο της τάξης των 100 μm . Το ακροφύσιο ταυτόχρονα

λειτουργεί ως ηλεκτρόδιο, στο οποίο εφαρμόζεται υψηλή τάση (1-50 kV). Η σταγόνα του πολυμερικού διαλύματος ηλεκτρίζεται λόγω της εφαρμοζόμενης τάσης και τα επαγόμενα φορτία κατανέμονται ομοιόμορφα στην επιφάνεια. Έτσι, η σταγόνα υφίσταται δύο είδη ηλεκτροστατικών δυνάμεων: την ηλεκτροστατική άπωση μεταξύ των επιφανειακών φορτίων και τις δυνάμεις Coulomb που ασκούνται από το εξωτερικό πεδίο. Κάτω από αυτές τις ηλεκτροστατικές αλληλεπιδράσεις, η σταγόνα παραμορφώνεται σε μορφή κώνου, γνωστή ως κώνος του Taylor (Εικ. 10) με γωνία του κώνου υπολογισμένη στις 49.3° . Όταν η ισχύς του ηλεκτρικού πεδίου ξεπεράσει μια ορισμένη τιμή, οι ηλεκτροστατικές δυνάμεις μπορούν να υπερνικήσουν την επιφανειακή τάση του πολυμερικού διαλύματος με αποτέλεσμα την εκτόξευση ενός φορτισμένου πίδακα από την άκρη του κώνου. Αυτός έχει κατεύθυνση προς το αντίθετο ηλεκτρόδιο, το οποίο είναι σε επαφή με ένα υπόστρωμα όπου συλλέγονται οι ίνες. Η διάμετρος του πίδακα μειώνεται σε μέγεθος με ταυτόχρονη αύξηση σε μήκος πριν την εναπόθεση του στον συλλέκτη. Κατά την πορεία προς τον συλλέκτη, ο διαλύτης εξατμίζεται και οι στερεές ίνες με διαμέτρους που κυμαίνονται από μm έως nm προσκρούουν με υψηλές ταχύτητες ($> 40 \text{ m/sec}$) σε αυτόν (Greiner & Wendorff, 2007; Huang et al., 2003; Li & Xia, 2004).

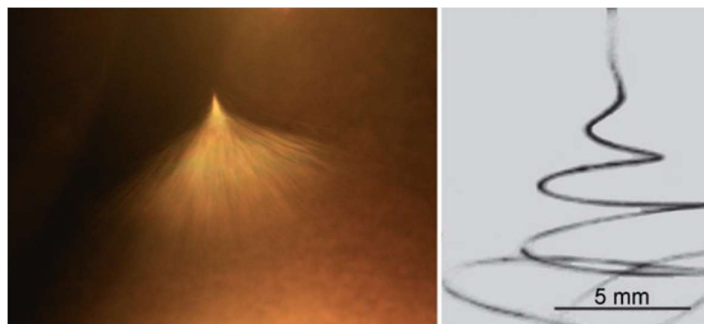


Εικόνα 10. Σχηματική απεικόνιση του σχηματισμού κώνου Taylor: (Α) Τα επαγόμενα φορτία κατανέμονται στη σταγόνα του πολυμερούς λόγω του ηλεκτρικού πεδίου. (Β) Επιμήκυνση της σταγόνας. (Γ) Παραμόρφωση της σταγόνας σε μορφή κώνου λόγω της άπωσης φορτίου-φορτίου. Από εκείνο το σημείο ξεκινά ο πίδακας (Baji et al., 2010).

1.5.3.4. Αστάθεια πίδακα

Ο σχηματιζόμενος πίδακας υφίσταται την επίδραση διαφόρων δυνάμεων με αντίθετες επιδράσεις, με αποτέλεσμα να εμφανίζονται διάφορες αστάθειες. Μέχρι στιγμής έχουν αναφερθεί τρεις τύποι ασταθειών, οι οποίες επηρεάζουν το μέγεθος και

την γεωμετρία των εναποτιθέμενων ινών. Η πρώτη αστάθεια είναι γνωστή ως αστάθεια του Rayleigh, η οποία είναι αξονοσυμμετρική σε σχέση με την κεντρική γραμμή του πίδακα. Η αστάθεια Rayleigh συμβαίνει λόγω των αντίθετων δυνάμεων που δρουν στην επιφάνεια του πίδακα. Η ηλεκτροστατική άπωση των φορτίων στον πίδακα τείνει να αυξήσει το εμβαδόν της επιφάνειάς του. Από την άλλη πλευρά, η επιφανειακή τάση τείνει να το μειώσει. Συνεπώς, παρουσιάζεται αστάθεια, η οποία προκαλεί την διάσπαση του πίδακα σε σταγονίδια, καθένα με εμβαδόν επιφάνειας που ελαχιστοποιεί το σφαιρικό σχήμα. Μία από αυτές τις δύο αντίθετες δυνάμεις κυριαρχεί, ανάλογα με την φύση και τις μηχανικές ιδιότητες του ρευστού, ιδιαίτερα το ιξώδες και την επιφανειακή τάση. Όταν το ιξώδες του πολυμερικού διαλύματος είναι χαμηλό, ο πίδακας διασπάται σε σταγονίδια. Αυτό αποδίδεται στην μικρή εμπλοκή των πολυμερικών αλυσίδων, καθώς και στην ανεπαρκή αντίσταση στο ηλεκτροστατικό πεδίο. Η αστάθεια του Rayleigh καταστέλλεται σε υψηλά ηλεκτρικά πεδία ή όταν χρησιμοποιείται υψηλότερης συγκέντρωσης πολυμερικό διάλυμα (Garg & Bowlin, 2010). Πέρα από αυτήν, ο πίδακας επηρεάζεται από άλλες δύο αστάθειες: την αστάθεια κάμψης (bending instability) (αξονοσυμμετρική) και την αστάθεια χτυπήματος (whipping instability) (μη αξονοσυμμετρική). Αυτές προκύπτουν λόγω της άπωσης ομώνυμων φορτίων μεταξύ των περισσειών φορτίων που υπάρχουν στον πίδακα και ενθαρρύνουν την λέπτυνση και την επιμήκυνση του. Σε υψηλές ηλεκτρικές δυνάμεις, οι δυο αστάθειες επικρατούν στον πίδακα, προκαλώντας την κίνηση του με σχήμα ανεστραμμένου κώνου. Σαν αποτέλεσμα, παράγεται ένα κυματοειδές ή καμπυλωτό μοτίβο στον πίδακα (Εικ. 11). Σε υψηλότερα ηλεκτρικά πεδία και όταν υπάρχει επαρκής πυκνότητα φορτίου στον πίδακα, οι αξονοσυμμετρικές αστάθειες (Rayleigh και κάμψης) καταστέλλονται και ενισχύεται η μη αξονοσυμμετρική αστάθεια. Η αστάθεια χτυπήματος παράγει μια δύναμη κάμψης επί του πίδακα, με αποτέλεσμα την επιμήκυνση του σε μεγάλο βαθμό. Κατά την διάρκεια όλων αυτών των διεργασιών, ο διαλύτης εξατμίζεται και λεπτές ίνες εναποτίθενται στον αγωγίμο συλλέκτη (Baji et al., 2010).



Εικόνα 11. Αριστερά: Απεικονίζεται ο πίδακας που σχηματίζεται κατά την ηλεκτροϊνοποίηση διαλύματος PEO. Δεξιά: Απεικονίζεται το κυματοειδές μοτίβο που παράγεται στον πίδακα λόγω των εμφανιζόμενων ασταθειών (Greiner & Wendorff, 2007).

1.5.3.5. Παράμετροι που επηρεάζουν την ηλεκτροϊνοποίηση

Η μετατροπή των πολυμερικών διαλυμάτων σε νανοΐνες επηρεάζεται από διάφορες παραμέτρους, οι οποίες ταξινομούνται σε τρεις κύριες κατηγορίες: τις ιδιότητες του διαλύματος (πολυμερή, συγκέντρωση, μοριακό βάρος, ιξώδες, επιφανειακή τάση, διαλύτης, αγωγιμότητα), την διαδικασία της μεθόδου (εφαρμοζόμενη τάση, ταχύτητα ροής, απόσταση, συλλέκτης) και τις περιβαλλοντικές συνθήκες (θερμοκρασία διαλύματος, υγρασία). Παρακάτω αναλύονται οι κυριότερες παράμετροι και ο τρόπος με τον οποίο επιδρούν στον σχηματισμό ινών.

➤ Πολυμερικά υλικά

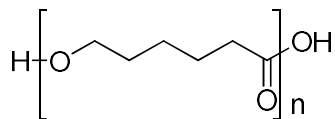
Τα πολυμερή διακρίνονται σε δύο μεγάλες κατηγορίες: στα φυσικά πολυμερή και τα παράγωγά τους (πρωτεΐνες, πολυσακχαρίτες, οξική και νιτρική κυτταρίνη, κ.α.) και στα συνθετικά πολυμερή (πολυαιθυλένιο, πολυστυρένιο, πολυαμίδια, πολυεστέρες, κ.α.) (Χατζηχηρσίδης et al., 2011).

Τα τελευταία χρόνια, όπως έχει αναφερθεί και ανωτέρω, έχει δοθεί μεγάλη έμφαση στην αξιοποίηση πολυμερών φυσικής προέλευσης ως βιοϋλικά σε διάφορες βιοϊατρικές εφαρμογές. Η παραγωγή ηλεκτροϊνοποιημένων νανοϊνών από βιοπολυμερή θαλάσσιας προέλευσης (πολυσακχαρίτες και πρωτεΐνες), συγκεντρώνει διαρκώς αυξανόμενο ερευνητικό ενδιαφέρον, καθώς είναι βιοσυμβατά, βιοδιασπώμενα, μη τοξικά και επιδεικνύουν αξιόλογες και ποικίλες βιολογικές δράσεις (Kumar et al., 2021; Memic et al., 2019; Zhao et al., 2015).

Η ηλεκτροϊνοποίηση των βιοπολυμερών είναι μία αρκετά δύσκολη διαδικασία, κυρίως λόγω του πολυηλεκτρολυτικού τους χαρακτήρα και της χαμηλής εμπλοκής των πολυμερικών τους αλυσίδων. Το υψηλό ιξώδες και η υψηλή επιφανειακή τάση που χαρακτηρίζει τα διαλύματά τους, περιορίζουν συχνά την ηλεκτροϊνοποιητική τους

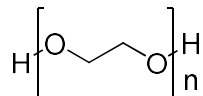
δυνατότητα, ενώ συνήθως οι παραγόμενες από αυτά ίνες χαρακτηρίζονται από ασθενείς μηχανικές ιδιότητες. Για το λόγο αυτό, συνήθως απαιτείται η συν-ηλεκτροϊνοποίηση τους με συνθετικά βιοσυμβατά πολυμερή τα οποία μπορούν εύκολα να ηλεκτροϊνοποιηθούν, όπως πχ. η πολυ(ε-καπρολακτόνη) (PCL), το οξείδιο του πολυ(αιθυλενίου) (PEO), η πολυ(βινυλική αλκοόλη) (PVA), και η πολυ(βινυλοπυρρολιδόνη) (PVP) (Iliou et al., 2022; Jain et al., 2020; Memic et al., 2019). Η επιλογή του πολυμερούς επηρεάζει τις συνθήκες ηλεκτροϊνοποίησης των πολυμερικών διαλυμάτων και την μορφολογία των παραγόμενων ινών.

Η **πολυ(ε-καπρολακτόνη)** (PCL) (Εικ. 12) είναι ένα συνθετικό, ημικρυσταλλικό πολυμερές, το οποίο διαλύεται σε οργανικούς διαλύτες. Βιοαποικοδομείται μέσω υδρόλυσης στο ανθρώπινο σώμα και έχει ελάχιστη ή καθόλου τοξικότητα. Αποικοδομείται με αργό ρυθμό και γι' αυτό χρησιμοποιείται σε πολλές βιοϊατρικές εφαρμογές, κυρίως για μεταφορά φαρμάκων και σε μακροχρόνια εμφυτεύματα (Nair & Laurencin, 2007).



Εικόνα 12. Χημική δομή της πολυ(ε-καπρολακτόνης) (PCL).

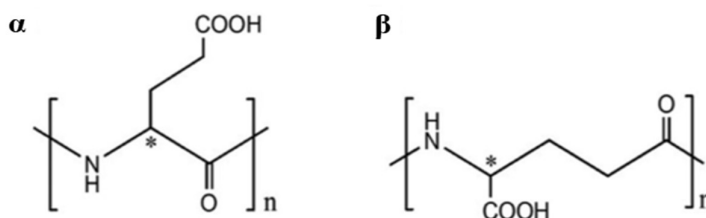
Το **οξείδιο του πολυ(αιθυλενίου)** (PEO) (Εικ. 13) είναι ένα υδρόφιλο συνθετικό πολυμερές μη τοξικό, πλήρως βιοδιασπώμενο και βιοσυμβατό. Χρησιμοποιείται κυρίως σε βιοϊατρικές εφαρμογές για την ελεγχόμενη αποδέσμευση φαρμάκων και στην ιστομηχανική (Wang et al., 2013).



Εικόνα 13. Χημική δομή οξειδίου του πολυ(αιθυλενίου) (PEO).

Από την κατηγορία των πολυαμιδίων το πλέον μελετημένο είναι το **πολυ(γλουταμικό οξύ)** (PGA). Υπάρχουν δύο είδη, το πολυ(γ-γλουταμικό οξύ) (γ-PGA) και το πολυ(α-L-γλουταμικό οξύ) (α-LPGA) που διακρίνονται ανάλογα με τον χημικό δεσμό ανάμεσα στην αμινομάδα, και την καρβοξυλομάδα (Εικ. 14). Το γ-PGA παράγεται κυρίως από βακτήρια που ανήκουν στο γένος *Bacillus* και αποτελείται

συνήθως από D- και L-γλουταμικό οξύ, συνδεδεμένα με αμιδικό δεσμό ανάμεσα στο α-αμινοξύ και γ-καρβοξυλικό οξύ, ενώ το α-LPGA παράγεται συνθετικά και αποτελείται μόνο από μονάδες L-γλουταμικού οξέος συνδεδεμένες με αμιδικό δεσμό ανάμεσα στο α-αμινοξύ και α-καρβοξυλικό οξύ. Τόσο το α-LPGA όσο και το γ-PGA είναι βιοδιασπώμενα και μη τοξικά. Επιπλέον, μπορεί να βρίσκονται με την μορφή υδατοδιαλυτού άλατος παρουσία κατιόντων (Na^+ , K^+ , Mg^{2+} , Ca^{2+}) ή με την μορφή του μη υδατοδιαλυτού ελεύθερου οξέος. Όταν κατέστη δυνατή η παραγωγή του PGA σε βιομηχανική κλίμακα, άρχισε να χρησιμοποιείται ευρέως σε διάφορες βιοϊατρικές εφαρμογές, όπως είναι τα συστήματα μεταφοράς φαρμάκων (Bajaj & Singhal, 2011; Park et al., 2021).



Εικόνα 14. Χημική δομή των (α) πολυ(α-L-γλουταμικού οξέος (α-LPGA) και (β) πολυ(γ-γλουταμικού οξέος) (γ-PGA).

➤ Συγκέντρωση διαλύματος

Η συγκέντρωση του διαλύματος είναι καθοριστικός παράγοντας για να λάβει χώρα ο σχηματισμός των ινών, καθώς επηρεάζει διάφορες ιδιότητες του, όπως το ιξώδες και την επιφανειακή τάση. Με την αύξηση της, το σχήμα των πολυμερικών χαντρών αλλάζει από σφαιρικό σε ατρακτοειδές μέχρι που τελικά σχηματίζονται ομοιόμορφες ίνες με αυξημένη διάμετρο λόγω της μεγαλύτερης αντίστασης του ιξώδους. Σε υψηλή συγκέντρωση δεν μπορούν να σχηματιστούν συνεχείς ίνες λόγω της δυσκολίας να διατηρηθεί η ροή του διαλύματος στην άκρη της βελόνας, με αποτέλεσμα να σχηματίζονται μεγαλύτερες ίνες. Επομένως, για κάθε πολυμερές υπάρχει ένα βέλτιστο εύρος συγκεντρώσεων, στο οποίο μπορούν να ηλεκτροϊνοποιηθούν. Εντός αυτού του εύρους, οι υψηλότερες συγκεντρώσεις οδηγούν σε ίνες με αυξημένη διάμετρο (Bhardwaj & Kundu, 2010; Huang et al., 2011; Subbiah et al., 2005).

➤ Μοριακό βάρος

Το μοριακό βάρος του πολυμερούς έχει σημαντική επίδραση στις ρεολογικές και ηλεκτρικές ιδιότητες του (ιξώδες, επιφανειακή τάση, αγωγιμότητα, διηλεκτρική

δύναμη). Ακόμη, επηρεάζει την μορφολογία των παραγόμενων ινών. Συνήθως προτιμούνται πολυμερικά διαλύματα με υψηλό μοριακό βάρος, καθώς έχουν το επιθυμητό ιξώδες. Διαλύματα με χαμηλό μοριακό βάρος τείνουν να σχηματίσουν πολυμερικές χάντρες αντί για ίνες, ενώ με υψηλό μοριακό βάρος δίνουν ίνες με μεγαλύτερη μέση διάμετρο. Το μοριακό βάρος ενός πολυμερούς καθορίζει τον αριθμό των εμπλεκόμενων πολυμερικών αλυσίδων στο διάλυμα, άρα και το ιξώδες του. Οι εμπλεκόμενες αλυσίδες είναι πολύ σημαντικές για την ηλεκτροϊνοποίηση. Το υψηλό μοριακό βάρος δεν είναι πάντα απαραίτητο για την ηλεκτροϊνοποίηση εφόσον επαρκείς διαμοριακές αλληλεπιδράσεις παρέχουν τις κατάλληλες διασυνδέσεις μέσω εμπλοκής των αλυσίδων (Bhardwaj & Kundu, 2010).

➤ **Ιξώδες**

Το ιξώδες του διαλύματος αποτελεί σημαντικό παράγοντα για την παραγωγή και την μορφολογία των ινών. Όταν το ιξώδες είναι πολύ χαμηλό δεν σχηματίζονται συνεχείς ίνες, καθώς ο πίδακας μπορεί να καταρρεύσει σε σταγονίδια πριν προλάβει να εξατμιστεί ο διαλύτης. Αντίθετα, όταν είναι πολύ υψηλό είναι δύσκολη η εκροή του πίδακα από το πολυμερικό διάλυμα. Για κάθε υλικό απαιτείται διαφορετικό ιξώδες προκειμένου να ηλεκτροϊνοποιηθεί (Li & Wang, 2013), που κυμαίνεται από 1 έως 215 poise. Υπάρχει αλληλεξάρτηση ανάμεσα στην συγκέντρωση του πολυμερούς στο διάλυμα, το μοριακό του βάρος και το ιξώδες. Όταν το ιξώδες ενός πολυμερικού διαλύματος είναι πολύ υψηλό εμφανίζει συνήθως μεγαλύτερο χρόνο χαλάρωσης τάσης, που θα μπορούσε να αποτρέψει το σπάσιμο του πίδακα κατά την ηλεκτροϊνοποίηση. Αύξηση του ιξώδους του διαλύματος ή της συγκέντρωσης του έχει ως αποτέλεσμα να σχηματίζονται μεγαλύτερες και πιο ομοιόμορφες ίνες. Το ιξώδες ενός διαλύματος παίζει καθοριστικό ρόλο στον προσδιορισμό του εύρους των συγκεντρώσεων από τις οποίες μπορούν να ληφθούν συνεχείς ίνες. Για διαλύματα χαμηλού ιξώδους, η επιφανειακή τάση είναι ο κυρίαρχος παράγοντας και σχηματίζονται ίνες με χάντρες, ενώ πάνω από μία κρίσιμη συγκέντρωση λαμβάνονται συνεχείς ίνες και η μορφολογία επηρεάζεται μόνο από την συγκέντρωση του διαλύματος (Bhardwaj & Kundu, 2010).

➤ **Επιφανειακή τάση**

Η επιφανειακή τάση του διαλύματος εξαρτάται κυρίως από τον διαλύτη και παίζει σπουδαίο ρόλο στην διαδικασία της ηλεκτροϊνοποίησης. Διαφορετικοί διαλύτες συμβάλλουν διαφορετικά σε αυτήν. Συνήθως η υψηλή επιφανειακή τάση ενός διαλύματος αναστέλλει την διαδικασία της ηλεκτροϊνοποίησης λόγω αστάθειας του πίδακα και δημιουργίας ψεκαζόμενων σταγονιδίων. Μειώνοντας την μπορούν να

ληφθούν ίνες χωρίς πολυμερικές χάντρες. Ακόμη, μείωση της συνεπάγεται ηλεκτροϊονοποίηση σε χαμηλότερο ηλεκτρικό πεδίο. Παρόλα αυτά, δεν είναι πάντα πιο επιθυμητή η χαμηλότερη επιφανειακή τάση (Bhardwaj & Kundu, 2010).

Η επιφανειακή τάση του διαλύματος μπορεί να μειωθεί προσθέτοντας επιφανειοδραστικές ουσίες στο διάλυμα. Το triton-X-100, το pluronic F127 και η λεκιθίνη είναι ορισμένες από τις επιφανειοδραστικές ουσίες που μελετώνται προκειμένου να μειωθεί η επιφανειακή τάση του διαλύματος, επιτρέποντας την αύξηση της συγκέντρωσης των βιοπολυμερών στο διάλυμα ώστε να παραχθούν ίνες χωρίς “χάντρες” (Elsabee et al., 2012; Taemeh et al., 2020).

➤ **Αγωγιμότητα**

Η αγωγιμότητα του διαλύματος μπορεί να επηρεάσει την μορφολογία των ινών. Καθορίζεται από το πολυμερές, τον χρησιμοποιούμενο διαλύτη και την διαθεσιμότητα σε ιονιζόμενα άλατα. Τα πολυμερή είναι ως επί το πλείστον αγωγιμα, με κάποιες εξαιρέσεις, όπως τα διηλεκτρικά υλικά. Τα φυσικά πολυμερή είναι κατά κύριο λόγο πολυηλεκτρολυτικά. Τα ιόντα που βρίσκονται σε αυτά αυξάνουν την ικανότητα του πίδακα να μεταφέρει φορτίο, με αποτέλεσμα τον φτωχό σχηματισμό ινών συγκριτικά με τα αντίστοιχα συνθετικά (Bhardwaj & Kundu, 2010; Li & Wang, 2013).

Τα υψηλής αγωγιμότητας διαλύματα είναι εξαιρετικά ασταθή παρουσία ισχυρού ηλεκτρικού πεδίου, το οποίο οδηγεί σε μείωση της διαμέτρου των παραγόμενων ινών, καθώς επίσης σε αστάθεια κάμψης και σε ευρεία κατανομή διαμέτρων. Σε γενικές γραμμές η αύξηση της ηλεκτρικής αγωγιμότητας οδηγεί σε μείωση της διαμέτρου των παραγόμενων ινών. Έχει παρατηρηθεί ότι η ακτίνα του πίδακα μεταβάλλεται αντιστρόφως ανάλογα της κυβικής ρίζας της ηλεκτρικής αγωγιμότητας του διαλύματος (Bhardwaj & Kundu, 2010).

Η ηλεκτρική αγωγιμότητα του διαλύματος μπορεί να ρυθμιστεί προσθέτοντας ιοντικά άλατα, όπως KH_2PO_4 , NaCl και ούτω καθεξής. Με την προσθήκη των ιοντικών αλάτων μπορούν να ληφθούν νανοϊνες μικρής διαμέτρου, ενώ αυξάνεται η ομοιομορφία τους και μειώνεται ο σχηματισμός χαντρών. Ακόμη, η υψηλή αγωγιμότητα του διαλύματος μπορεί να επιτευχθεί χρησιμοποιώντας οργανικά οξέα (Bhardwaj & Kundu, 2010; Li & Wang, 2013).

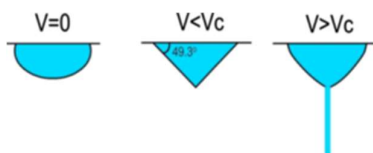
➤ **Διαλύτης**

Κατά την ηλεκτροϊονοποίηση λαμβάνει χώρα ταχεία εξάτμιση του διαλύτη και διαχωρισμός φάσης. Η τάση ατμών του διαλύτη καθορίζει τον ρυθμό εξάτμισης του, ενώ η πτητικότητα του, την διαδικασία διαχωρισμού φάσεων. Ακόμη, ο διαλύτης

επηρεάζει την επιφανειακή τάση του διαλύματος, η οποία όπως προαναφέρθηκε συνδέεται με το μέγεθος και την μορφολογία των παραγόμενων ινών. Οι πολύ πτητικοί διαλύτες μπορεί να εξατμιστούν στην άκρη της βελόνας και να οδηγήσουν σε έμφραξη της ενώ αντίθετα, εάν ο διαλύτης είναι μη πτητικός υπάρχει κίνδυνος να μην προλάβει να εξατμισθεί ο διαλύτης και να στεγνώσουν οι ίνες πριν φτάσουν στον συλλέκτη. Σε πολλές περιπτώσεις χρησιμοποιείται σύστημα διαλυτών ώστε να έχει τις επιθυμητές ιδιότητες (Bhardwaj & Kundu, 2010; Ibrahim & Klingner, 2020).

➤ Εφαρμοζόμενη τάση

Η εφαρμοζόμενη τάση αποτελεί κύριο παράγοντα για την διεργασία της ηλεκτροϊονοποίησης. Μόνο όταν η εφαρμοζόμενη τάση είναι υψηλότερη από μία κρίσιμη τιμή (V_c), αρχίζει η εκτόξευση του πίδακα από τον κώνο του Taylor και ξεκινάει ο σχηματισμός των ινών (Εικ. 15). Αυτή η τιμή ποικίλλει ανάλογα με τον τύπο του πολυμερικού διαλύματος και υπάρχει ένα βέλτιστο εύρος τιμών για δεδομένο σύστημα πολυμερούς-διαλύτη εντός του οποίου είναι δυνατός ο σχηματισμός ινών. Όταν το ηλεκτρικό πεδίο είναι ασθενέστερο ή ισχυρότερο από αυτό θα προκύψουν ίνες με χάντρες ή μπορεί ακόμα και να παρεμποδιστεί ο σχηματισμός πίδακα. Σε γενικές γραμμές αύξηση της εφαρμοζόμενης τάσης οδηγεί αρχικά σε μείωση της διαμέτρου των ινών και μετά από ένα ορισμένο σημείο σε αύξηση. Η αρχική μείωση οφείλεται στην αύξηση της ηλεκτροστατικής απωστικής δύναμης επί του πίδακα, η οποία τελικά ευνοεί την λέπτυνση της διαμέτρου των ινών. Για τιμές εφαρμοζόμενης τάσης πολύ μεγαλύτερες, ο κώνος του Taylor εξαφανίζεται και ο πίδακας φαίνεται να βγαίνει απευθείας από το εσωτερικό της βελόνας. Οι ίνες που παράγονται σε αυτήν την περίπτωση έχουν μεγαλύτερη διάμετρο και εμφανίζουν χάντρες (Pillay et al., 2013).



Εικόνα 15. Αλλαγές στην σταγόνα του πολυμερούς με την εφαρμογή τάσης (Garg & Bowlin, 2010).

➤ Ταχύτητα ροής

Η ταχύτητα ροής του πολυμερικού διαλύματος από την σύριγγα είναι καθοριστική για την ταχύτητα του πίδακα, καθώς και την ποσότητα του υλικού που διατίθεται για ηλεκτροϊονοποίηση. Προτιμάται χαμηλή ταχύτητα ροής, ώστε ο διαλύτης να έχει τον απαραίτητο χρόνο να εξατμιστεί. Στην περίπτωση ινών πολυ(στυρενίου)

παρατηρήθηκε ότι αυξανόμενης της ταχύτητας ροής, αυξανόταν τόσο η διάμετρος των ινών, όσο και το μέγεθος των πόρων τους. Όταν η ταχύτητα ροής είναι πολύ υψηλή σχηματίζονται ίνες με χάντρες και μεγάλη διάμετρο επειδή δεν προλαβαίνουν να στεγνώσουν πριν φτάσουν στον συλλέκτη (Bhardwaj & Kundu, 2010; Subbiah et al., 2005).

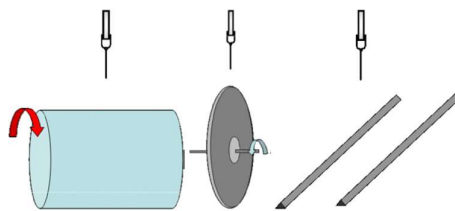
➤ **Απόσταση**

Η απόσταση ανάμεσα στον συλλέκτη και την άκρη της βελόνας μπορεί να επηρεάσει την διάμετρο και την μορφολογία των ινών. Απαιτείται μία ελάχιστη απόσταση προκειμένου οι ίνες να έχουν αρκετό χρόνο να στεγνώσουν πριν φτάσουν στον συλλέκτη, αλλιώς παράγονται υγρές ίνες με χάντρες (Bhardwaj & Kundu, 2010; Li & Wang, 2013). Επομένως, είναι λογικό τα υδατικά διαλύματα να χρειάζονται μεγαλύτερη απόσταση συγκριτικά με τα διαλύματα που έχουν πτητικούς οργανικούς διαλύτες. Ακόμη, σε ορισμένες περιπτώσεις έχει παρατηρηθεί ότι σε μικρές αποστάσεις παράγονται επίπεδες ίνες, ενώ με την αύξηση της απόστασης δημιουργούνται κυλινδρικές ίνες (Subbiah et al., 2005). Συνήθως αύξηση της οδηγεί στην δημιουργία μικρότερων ινών. Σε ακραίες περιπτώσεις, δηλαδή εάν η απόσταση είναι πολύ μικρή ή πολύ μεγάλη, παρατηρούνται ίνες με χάντρες. Συνεπώς, είναι σημαντικό να υπάρχει η βέλτιστη απόσταση μεταξύ του συλλέκτη και της άκρης της βελόνας (Bhardwaj & Kundu, 2010; Li & Wang, 2013).

➤ **Συλλέκτης**

Μία ιδιαίτερα σημαντική παράμετρος της μεθόδου είναι το είδος του συλλέκτη που θα επιλεγεί. Η φύση του συλλέκτη επηρεάζει σημαντικά τα μορφολογικά και φυσικά χαρακτηριστικά των ηλεκτροϋφασμένων ινών. Ο συλλέκτης λειτουργεί ως ένα αγωγίμο υπόστρωμα όπου συλλέγονται οι φορτισμένες ίνες. Το είδος του συλλέκτη που θα επιλεγεί καθορίζει σε μεγάλο βαθμό την διάταξη και την πυκνότητα του πλέγματος των ινών. Η πυκνότητα των ινών ανά μονάδα επιφάνειας επί του συλλέκτη, καθώς και η διάταξη τους επηρεάζονται από τον βαθμό διασποράς του φορτίου κατά την εναπόθεση των ινών. Η χρήση μεταλλικού και αγωγίμου συλλέκτη συμβάλλει στην διασπορά των φορτίων με αποτέλεσμα την αποφόρτιση των ινών και την μείωση της μεταξύ τους άπωσης. Αυτό συνεπάγεται ίνες λείες και πυκνά πακεταρισμένες. Αντιθέτως, σε μη αγωγίμους συλλέκτες οι ίνες δεν διασπείρουν τα φορτία, τα οποία απωθούνται μεταξύ τους. Για τον λόγο αυτό, δημιουργούνται χαλαρά πλέγματα (Baji et al., 2010). Έχει παρατηρηθεί ότι όταν ο χώρος συλλογής είναι λιγότερο αγωγίμος παράγονται ίνες με χάντρες. Στις περισσότερες περιπτώσεις χρησιμοποιείται φύλλο

αλουμινίου σε διάφορες μορφές, λόγω όμως της δυσκολίας σε ορισμένες περιπτώσεις να αποκολληθούν οι ίνες από αυτό και της ανάγκης για ευθυγραμμισμένες ίνες αναπτύχθηκαν και άλλα είδη, όπως αγωγίμο χαρτί, αγωγίμο ύφασμα, συρματόπλεγμα, καρφίτσα, παράλληλη ράβδος, περιστρεφόμενη ράβδος, περιστρεφόμενος τροχός και υγρό λουτρό (Bhardwaj & Kundu, 2010). Τα τελευταία χρόνια δίνεται έμφαση στην λήψη ευθυγραμμισμένων ινών. Αυτό καθορίζεται από το είδος του συλλέκτη και την ταχύτητα περιστροφής του. Για τον σκοπό αυτό, οι συνηθέστεροι συλλέκτες (Εικ. 16) είναι ο περιστρεφόμενος κύλινδρος, ο περιστρεφόμενος δίσκος και τα στατικά παράλληλα ηλεκτρόδια (Baji et al., 2010).



Εικόνα 16. Σχηματική απεικόνιση περιστρεφόμενου κυλίνδρου, περιστρεφόμενου δίσκου και παράλληλων ηλεκτροδίων (Teo & Ramakrishna, 2006).

➤ Περιβαλλοντικές συνθήκες

Οι συνθήκες του περιβάλλοντος όπου διεξάγεται η ηλεκτροϊονοποίηση (θερμοκρασία, υγρασία, κ.λπ.) μπορούν επίσης να επηρεάσουν την διάμετρο και την μορφολογία των ινών. Μελέτες έδειξαν ότι αύξηση της θερμοκρασίας επάγει την μείωση της διαμέτρου των παραγόμενων ινών πιθανόν λόγω της μείωσης του ιξώδους του πολυμερικού διαλύματος. Όσον αφορά την υγρασία, έχει βρεθεί πως επηρεάζει τα μορφολογικά χαρακτηριστικά των ινών. Με την αύξηση της, εμφανίζονται μικροί κυκλικοί πόροι στην επιφάνεια τους. Περαιτέρω αύξηση οδηγεί στην συνένωση των πόρων. Επιπλέον, η χαμηλή υγρασία αυξάνει την ταχύτητα εξάτμισης του διαλύτη. Όταν ο ρυθμός εξάτμισης είναι πολύ πιο γρήγορος συγκριτικά με την απομάκρυνση του διαλύτη από την άκρη της βελόνας, η ηλεκτροϊονοποίηση μπορεί να διεξαχθεί για πολύ λίγο προτού εμφράξει η βελόνα. Τέλος, έχει προταθεί ότι η υψηλή υγρασία συμβάλλει στην εκφόρτιση των ηλεκτροϊονοποιημένων ινών (Bhardwaj & Kundu, 2010).

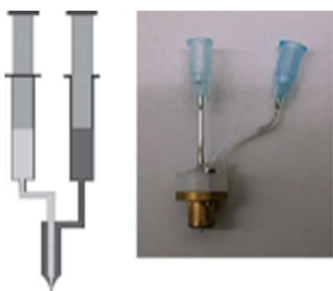
1.5.3.6. Εξελίξεις και καινοτομίες

Έχουν αναπτυχθεί διάφορες παραλλαγές της ηλεκτροϊονοποίησης ώστε να βελτιωθούν οι ιδιότητες και να διευρυνθούν οι εφαρμογές των ινών. Παρακάτω

αναφέρονται εν συντομία οι κυριότερες.

➤ **Ομοαξονική ηλεκτροϊνοποίηση (coaxial electrospinning)**

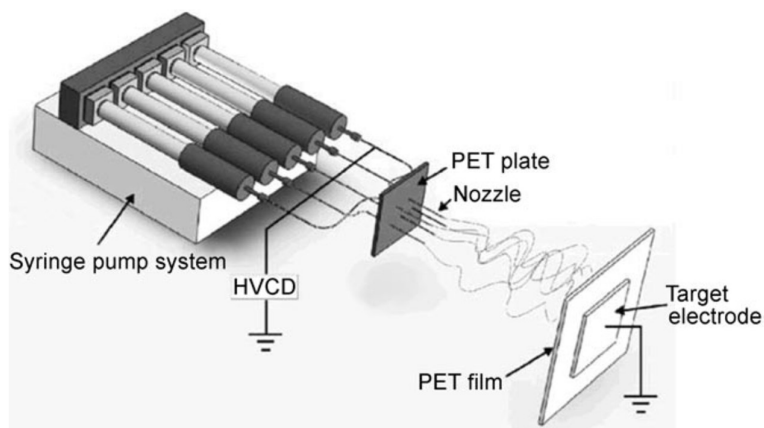
Στην διαδικασία της ομοαξονικής ηλεκτροϊνοποίησης δύο πολυμερικά διαλύματα μπορούν να ηλεκτροϊνοποιηθούν ταυτόχρονα χωρίς άμεση ανάμιξη, χρησιμοποιώντας δύο ομοκεντρικώς ευθυγραμμισμένα ακροφύσια (Εικ. 17). Η ίδια τάση εφαρμόζεται και στα δύο ακροφύσια και παραμορφώνει το σύνθετο σταγονίδιο. Από το παραμορφωμένο σταγονίδιο δημιουργείται ο πίδακας και ιδανικά παράγονται νανοϊνες πυρήνα-κέλυφους (core-shell). Οι νανοϊνες πυρήνα-κέλυφους εμφανίζουν ιδιότητες μεταξύ των δύο μεμονωμένων υλικών. Η τεχνική αυτή μπορεί να είναι χρήσιμη στην παραγωγή διαφόρων ειδών διπλής σύνθεσης νανοϊνών, επιφανειακά τροποποιημένων νανοϊνών, λειτουργικά διαβαθμισμένων νανοςύνθετων και κοίλων ινών. Οι δομές αυτές μπορούν να βρουν διάφορες εφαρμογές, όπως στην ελεγχόμενη αποδέσμευση φαρμάκων, ως βιοδραστικά ικρίσματα ιστών και ως βιοαισθητήρες (Greiner & Wendorff, 2007).



Εικόνα 17. Αριστερά: Διάταξη ομοαξονικής ηλεκτροϊνοποίησης. Δεξιά: Εργαστηριακή διάταξη (Greiner & Wendorff, 2007).

➤ **Πολυστρωματική και μικτή ηλεκτροϊνοποίηση (multilayer and mixed electrospinning)**

Στην μικτή ηλεκτροϊνοποίηση, δύο ή περισσότερα διαφορετικά πολυμερικά διαλύματα μπορούν να ηλεκτροϊνοποιηθούν από διαφορετικές σύριγγες υπό διαφορετικές συνθήκες επεξεργασίας (Εικ. 18). Το τελικό ινώδες στρώμα αποτελείται από στρώματα που συλλέγονται διαδοχικά στον ίδιο συλλέκτη (Garg & Bowlin, 2011).



Εικόνα 18. Πειραματική διάταξη μικτής ηλεκτροϊνιοποίησης (HVCD: γεννήτρια παροχής υψηλής τάσης) (Greiner & Wendorff, 2007).

➤ Ηλεκτροϊνιοποίηση τήγματος (melt electrospinning)

Στην τεχνική αυτή το πολυμερές δεν διαλύεται σε κάποιον διαλύτη, αλλά κατεργάζεται σε υψηλή θερμοκρασία ώστε να τηχθεί. Είναι ιδιαίτερα οικολογική και οικονομική μέθοδος λόγω της αποφυγής χρήσης οργανικών διαλυτών. Παρόλα αυτά, δεν εφαρμόζεται τόσο λόγω του υψηλού ιξώδους του τήγματος, όσο και της πολύ υψηλής θερμοκρασίας επεξεργασίας και της αδυναμίας να παραχθούν ίνες στο εύρος των nm (Bhardwaj & Kundu, 2010).

1.6. Περιοδοντίτιδα και τρόποι αντιμετώπισης

1.6.1. Γενικά στοιχεία για την περιοδοντίτιδα

Η περιοδοντίτιδα είναι μία χρόνια φλεγμονώδης νόσος που προκαλείται από παθογόνους αναερόβιους μικροοργανισμούς και χαρακτηρίζεται από μη αναστρέψιμη καταστροφή του περιοδοντικού συνδέσμου και του φατνιακού οστού, η οποία οδηγεί τελικά στην απώλεια δοντιού (Huang et al., 2021; Rajeshwari et al., 2019). Σύμφωνα με τον Παγκόσμιο Οργανισμό Υγείας, πρόκειται για μία από τις πιο διαδεδομένες χρόνιες ασθένειες που εμφανίζονται μετά τα 35 έτη (Ziřba et al., 2020). Επιπλέον, είναι η δεύτερη πιο συχνή οδοντική νόσος παγκοσμίως και αποτελεί την κυριότερη αιτία απώλειας δοντιών ενώ σύμφωνα με το Κέντρο Πρόληψης και Ελέγχου Ασθενειών το 2010 το 50% των ενήλικων Αμερικανών άνω των 30 ετών παρουσίαζαν περιοδοντίτιδα (Chu et al., 2022; Staples et al., 2020). Λόγω της υψηλής συχνότητας εμφάνισης της, έχει μεγάλη κοινωνικοοικονομική σημασία καθώς, πέρα από την υποβάθμιση της ποιότητας ζωής τους ασθενούς, το ετήσιο κόστος θεραπείας σε παγκόσμιο επίπεδο είναι

τεράστιο, και συνεπώς χρήζει άμεσης αντιμετώπισης (Botelho et al., 2022; Chapple, 2014).

1.6.2. Ανατομία περιοδοντίου

Το περιοδόντιο είναι ένας πολύπλοκος ιστός που αποτελείται από σκληρούς και μαλακούς ιστούς οι οποίοι διαδραματίζουν καίριο ρόλο στην μηχανική υποστήριξη των δοντιών και στην απορρόφηση των μασητικών δυνάμεων. Πιο συγκεκριμένα, αποτελείται από το ούλο, τον περιοδοντικό σύνδεσμο, το περιρρίζιο και το φατνιακό οστό (Staples et al., 2020; Wang et al., 2022).

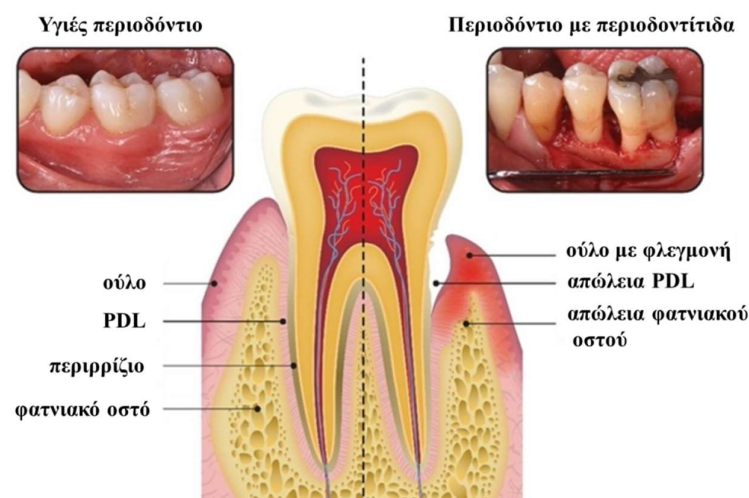
Ο περιοδοντικός σύνδεσμος είναι ένας πολυλειτουργικός συνδετικός ιστός που συνδέει την ρίζα του δοντιού με το φατνιακό οστό. Το πλάτος του περιοδοντικού συνδέσμου γύρω από την ρίζα του δοντιού ποικίλλει ελαφρώς αλλά συνήθως είναι κατά μέσο όρο 0.25 mm (Uskoković et al., 2022). Η δομική αντοχή του περιοδοντικού συνδέσμου οφείλεται στις ίνες κολλαγόνου, οι οποίες αποτελούνται κυρίως από κολλαγόνο τύπου I και σε μικρό ποσοστό κολλαγόνο τύπου III. Οι περισσότερες από τις ίνες κολλαγόνου οργανώνονται σε δέσμες, και ορισμένες δέσμες πυκνών ινών ενσωματώνονται στο περιρρίζιο από την μία πλευρά και στο φατνιακό οστό από την άλλη πλευρά. Ο ρόλος τους είναι να συγκρατούν τις ρίζες του δοντιού σταθερές μέσα στο φατνιακό οστό και να βοηθούν το δόντι να ανθίστανται τις μασητικές δυνάμεις (Guo et al., 2022). Επιπλέον, ο περιοδοντικός σύνδεσμος αποτελείται από έναν ετερογενή κυτταρικό πληθυσμό (γνωστά ως κύτταρα PDL) που περιλαμβάνει τους ινοβλάστες (PDLFs), οι οποίοι αντιπροσωπεύουν τον μεγαλύτερο αριθμό κυττάρων, τα βλαστοκύτταρα (PDLSCs), τους οστεοβλάστες, τους οστεοκλάστες κ.α. (Roato et al., 2022; Uskoković et al., 2022).

Το φατνιακό οστό είναι το τμήμα της άνω και κάτω γνάθου που στηρίζει και προστατεύει τα δόντια. Μορφολογικά αποτελείται από την παρυφή, το φατνιακό πέταλο, τα φατνία και το μεσοδόντιο διάφραγμα. Επιπλέον, αποτελείται από έναν πληθυσμό κυττάρων που περιλαμβάνει τους οστεοβλάστες οι οποίοι είναι υπεύθυνοι για την ενασβεστίωση του φατνιακού οστού, τα οστεοκύτταρα που είναι υπεύθυνα για την διατήρηση του οστού και τους οστεοκλάστες που είναι υπεύθυνα για την οστική απορρόφηση. Σε ένα υγιές δόντι υπάρχει ισορροπία ανάμεσα στους οστεοβλάστες που σχηματίζουν νέο οστό και στους οστεοκλάστες που το καταστρέφουν (Uskoković et al., 2022).

1.6.3. Παθογένεση περιοδοντίτιδας

Η περιοδοντίτιδα είναι μία πολυπαραγοντική νόσος που προκαλείται από τον υποουλικό αποικισμό παθογόνων βακτηρίων (Uskoković et al., 2022). Η παθογένεση της περιοδοντίτιδας είναι ιδιαίτερα πολύπλοκη και φαίνεται να οφείλεται σε αλληλεπιδράσεις ανάμεσα σε γενετικούς και περιβαλλοντικούς παράγοντες. Η παρουσία παθογόνων βακτηρίων στην υποουλική περιοχή σε συνδυασμό με την ανοσο-φλεγμονώδη απόκριση του ξενιστή σε αυτά καθορίζουν την εξέλιξη της νόσου (Chen et al., 2022; Pihlstrom et al., 2005).

Το κυριότερο χαρακτηριστικό της περιοδοντίτιδας είναι η εμφάνιση φλεγμονής η οποία εκτείνεται βαθιά στους ιστούς και οδηγεί σε απώλεια του περιοδοντικού συνδέσμου και του φατνιακού οστού (Εικ. 19). Η ηπιότερη μορφή περιοδοντίτιδας είναι η ουλίτιδα (φλεγμονή ούλων), η οποία προκαλείται από την συσσώρευση βακτηριακής βιομεμβράνης στα δόντια δίπλα από τα ούλα. Ωστόσο, η ουλίτιδα δεν επηρεάζει τις δομές στήριξης των δοντιών και είναι αναστρέψιμη με στοματική υγιεινή (Pihlstrom et al., 2005). Εάν μείνει χωρίς θεραπεία μπορεί να επεκταθεί στον περιοδοντικό σύνδεσμο και το φατνιακό οστό με αποτέλεσμα τον σχηματισμό περιοδοντικού θύλακα ο οποίος οδηγεί σε περιοδοντίτιδα. Ο περιοδοντικός θύλακας παρέχει ένα ευνοϊκό περιβάλλον για την ανάπτυξη παθογόνων αναερόβιων βακτηρίων όπως *Porphyromonas gingivalis*, *Prevotella intermedia*, *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* και *Fusobacterium nucleatum* (Rajeshwari et al., 2019).



Εικόνα 19. Υγιές περιοδόντιο και περιοδόντιο με περιοδοντίτιδα (τροποποιημένη από Daghrery & Bottin, 2022).

Η περιοδοντίτιδα χωρίζεται σε χρόνια ή επιθετική και σε εντοπισμένη ή γενικευμένη ανάλογα με την εξέλιξη και την έκταση της νόσου. Σε γενικές γραμμές, η χρόνια περιοδοντίτιδα είναι αποτέλεσμα μικροβιακής μόλυνσης που οδηγεί σε σταδιακή απώλεια πρόσφυσης των ούλων στα δόντια και απώλεια φατνιακού οστού, ενώ η επιθετική περιοδοντίτιδα οδηγεί σε ταχεία απώλεια πρόσφυσης των ούλων στα δόντια και απώλεια φατνιακού οστού. Στην εντοπισμένη μορφή της, η επιθετική περιοδοντίτιδα εμφανίζεται συνήθως στην εφηβεία, εξελίσσεται με ρυθμό τρεις με τέσσερις φορές πιο γρήγορα από ότι στην χρόνια νόσο, συνδέεται στενά με το παθογόνο βακτήριο *Actinobacillus actinomycetemcomitans* και τείνει να προσβάλλει τους γομφίους και τους τομείς ενώ φαίνεται να υπάρχει κληρονομική προδιάθεση για την εμφάνιση της νόσου (Guthmiller & Novak, 2002).

Οι βλαβερές συνέπειες τις περιοδοντίτιδας δεν περιορίζονται μόνο στην στοματική κοιλότητα καθώς μέσω του επιθηλίου του θύλακα έχει πρόσβαση στη συστηματική κυκλοφορία διεγείροντας έτσι ανοσο-φλεγμονώδη απόκριση και άλλες επιπλοκές. Έχει αναφερθεί η συσχέτιση της περιοδοντίτιδας με - συστηματικές ασθένειες όπως ο σακχαρώδης διαβήτης, τα καρδιαγγειακά νοσήματα και η εγκυμοσύνη (Rajeshwari et al., 2019).

1.6.4. Θεραπείες για την αντιμετώπιση της περιοδοντίτιδας

Ο απώτερος στόχος της περιοδοντικής θεραπείας είναι η καταπολέμηση της φλεγμονής και η λειτουργική αποκατάσταση των κατεστραμμένων περιοδοντικών ιστών (Staples et al., 2020). Το περιοδόντιο παρουσιάζει εξαιρετικά μειωμένη ενδογενή αναγεννητική ικανότητα (Chen et al., 2010). Οι υπάρχουσες συντηρητικές και χειρουργικές προσεγγίσεις επιτυγχάνουν μείωση της φλεγμονής αλλά δεν είναι αποτελεσματικές όσον αφορά την αναγέννηση του περιοδοντικού συνδέσμου (Staples et al., 2020).

Η συντηρητική θεραπεία εστιάζει στην εξάλειψη της μόλυνσης και την καταπολέμηση της φλεγμονής χωρίς όμως να επιφέρει ικανοποιητικά αποτελέσματα (Daghrery & Bottino, 2022; Deepak et al., 2018). Περιλαμβάνει την αφαίρεση της οδοντικής βιομεμβράνης, την μηχανική απόξεση των μαλακών και σκληρών τοιχωμάτων των περιοδοντικών θυλάκων και την χορήγηση αντιβιοτικών (Uskoković et al., 2022; Zhu et al., 2023). Αν και η συντηρητική θεραπεία μπορεί να είναι επαρκής για την αντιμετώπιση της αρχόμενης περιοδοντίτιδας, απαιτείται χειρουργική επέμβαση όταν υπάρχει επίμονη φλεγμονή και βαθιοί περιοδοντικοί θύλακες (Zhu et al., 2023).

Ωστόσο, η αναγέννηση του περιοδοντικού συνδέσμου παραμένει μια μεγάλη πρόκληση. Για το λόγο αυτό, βρίσκεται σε συνεχή εξέλιξη η δημιουργία νέων βιοδραστικών υλικών με αντιβακτηριακές και αναγεννητικές ιδιότητες (Huang et al., 2021; Xu et al., 2021). Στα υλικά αυτά συγκαταλέγονται συστήματα τοπικής μεταφοράς φαρμάκων, οστικά μοσχεύματα, αυξητικοί παράγοντες, θεραπεία με βλαστοκύτταρα και μεμβράνες κατευθυνόμενης ιστικής/οστικής αναγέννησης (Rajeshwari et al., 2019; Zhu et al., 2023).

1.6.4.1. Μεμβράνες ιστικής/οστικής αναγέννησης

Τα τελευταία χρόνια το ερευνητικό ενδιαφέρον για την θεραπεία της περιοδοντίτιδας έχει στραφεί στην ανάπτυξη μεμβρανών κατευθυνόμενης ιστικής/οστικής αναγέννησης (Guided Tissue/Bone Regeneration, GTR/GBR) από βιοϋλικά οι οποίες λειτουργούν ως ένας φυσικός φραγμός αποτρέποντας την διείσδυση και υπέρμετρη ανάπτυξη των ταχέως αναπτυσσόμενων επιθηλιακών κυττάρων, ενώ παράλληλα διευκολύνουν την αναγέννηση του περιοδοντικού συνδέσμου και του φατνιακού οστού, παρέχοντας χώρο και χρόνο στα κύτταρα του περιοδοντικού συνδέσμου και στους οστεοβλάστες για να πολλαπλασιαστούν και να αντισταθμίσουν την απώλεια της πρόσφυσης (Babo et al., 2014; Huang et al., 2021; Xu et al., 2021). Οι μεμβράνες GTR/GBR για να είναι αποτελεσματικές θα πρέπει να είναι βιοσυμβατές και να επιτρέπουν την διάχυση οξυγόνου, και των θρεπτικών και βιοδραστικών ουσιών που είναι αναγκαίες για την αναγέννηση του οστού και των μαλακών ιστών (Hassan et al., 2021; Qasim et al., 2017; Woo et al., 2021). Επιπλέον, θα πρέπει να διαθέτουν τις κατάλληλες μηχανικές ιδιότητες ώστε να επιτρέπουν την ανάπτυξη των κυττάρων, παραμένοντας σταθερές κατά την διάρκεια της αναγέννησης των ιστών, να μπορούν να λειτουργήσουν ως φραγμός και να είναι εύκολα διαχειρίσιμες κατά την εφαρμογή. Ακόμη, απαιτείται επαρκής ελαστικότητα ώστε να μπορούν τα κύτταρα να αναπτυχθούν προς μία συγκεκριμένη κατεύθυνση (dos Santos et al., 2020; Ye et al., 2019; Zhou et al., 2017).

Οι GTR/GBR μεμβράνες ανάλογα με τα υλικά κατασκευής τους μπορεί να είναι μη-απορροφήσιμες ή βιο-απορροφήσιμες. Οι κυριότερες μη-απορροφήσιμες μεμβράνες που χρησιμοποιούνται αποτελούνται από πολυτετραφλουροαιθυλένιο όπως η CytoplastR TXT-200 ή από πολυτετραφλουροαιθυλένιο ενισχυμένο με τιτάνιο όπως η Cytoplast R Ti-250. Οι μη-απορροφήσιμες μεμβράνες παρουσιάζουν το μειονέκτημα ότι απαιτείται δεύτερο χειρουργείο για την αφαίρεση τους και συνεπώς αυξάνεται ο κίνδυνος μόλυνσης. Ως εκ τούτου, έχουν γίνει εντατικές προσπάθειες να

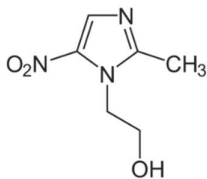
δημιουργηθούν βιο-απορροφήσιμες μεμβράνες οι οποίες θα μπορούν να αποικοδομούνται, χωρίς να αποδεδειγμένουν επιβλαβή παραπροϊόντα, μέσα σε ένα εύλογο χρονικό διάστημα το οποίο θα επιτρέπει την αναγέννηση του περιοδοντικού ιστού (Hassan et al., 2021; Qasim et al., 2017; Woo et al., 2021; Zhu et al., 2023). Η πλειονότητα των μεμβρανών που βρίσκονται ήδη στην αγορά αποτελούνται από συνθετικά πολυμερή, όπως η PCL το PLA, και το πολυγλυκολικό οξύ (PGA) και από φυσικά πολυμερή όπως το κολλαγόνο. Οι μεμβράνες αυτές παρασκευάζονται συνήθως μέσω τήξης των πολυμερών ή χύτευσης διαλύτη (Zhuang et al., 2019). Οι GTR/GBR μεμβράνες έχουν ήδη βρει κλινική εφαρμογή, χωρίς όμως να προσφέρουν ικανοποιητική βιοσυμβατότητα, αντιβακτηριακή προστασία και αναγεννητική ικανότητα (Huang et al., 2021).

Μία αιτία της μη ικανοποιητικής απόδοσης των GTR/GBR μεμβρανών είναι ο αποικισμός παθογόνων βακτηρίων στο σημείο της βλάβης (Huang et al., 2021). Η παρουσία περιοπαθογόνων αναερόβιων βακτηρίων, όπως τα *P. gingivalis* και *P. intermedia*, μπορούν να επηρεάσουν αρνητικά την αναγέννηση του περιοδοντίου. Ως εκ τούτου είναι πολύ σημαντικό να περιοριστεί η βακτηριακή μόλυνση του περιοδοντίου (Shi et al., 2014). Η επιλογή του κατάλληλου αντιμικροβιακού παράγοντα και οδού χορήγησης, διαδραματίζουν καθοριστικό ρόλο στην επιτυχή θεραπεία (Rajeshwari et al., 2019). Η συστηματική χορήγηση αντιβιοτικών παρουσιάζει το μειονέκτημα ότι απαιτείται χορήγηση μεγάλη δόσης per os ώστε να φτάσει στην θεραπευτική συγκέντρωση στον επιθυμητό στόχο (Shi et al., 2014).

Η ελεγχόμενη μεταφορά αντιμικροβιακών παραγόντων στο σημείο της βλάβης παρουσιάζει πολλά πλεονεκτήματα σε σχέση με την per os χορήγηση, ανάμεσα στα οποία συμπεριλαμβάνονται η στοχευμένη μεταφορά, η μικρότερη δόση και οι λιγότερες παρενέργειες (Rajeshwari et al., 2019). Για το λόγο αυτό, έχει μελετηθεί η ενσωμάτωση αντιβακτηριακών παραγόντων στις GTR/GBR μεμβράνες ώστε να λειτουργούν ως μέσο τοπικής απελευθέρωσης στο περιβάλλον του περιοδοντικού θύλακα. Οι αντιβακτηριακοί παράγοντες συμπεριλαμβάνουν αντιβιοτικά, νανοσωματίδια μετάλλων και αντιμικροβιακά πεπτίδια (Huang et al., 2021). Η μετρονιδαζόλη και η σιπροφλοξασίνη (ή υδροχλωρική σιπροφλοξασίνη) είναι ορισμένα από τα αντιβιοτικά που χρησιμοποιούνται ευρέως για την θεραπεία της περιοδοντίτιδας. Τόσο η μετρονιδαζόλη όσο και η σιπροφλοξασίνη (ή υδροχλωρική σιπροφλοξασίνη) είναι αποτελεσματικές έναντι των παθογόνων βακτηρίων που συνδέονται με την περιοδοντίτιδα. Στην διεθνή βιβλιογραφία έχουν αναφερθεί συστήματα τοπικής

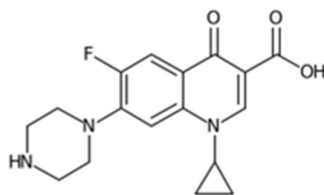
απελευθέρωσης μετρονιδαζόλης, σιπροφλοξασίνης ή υδροχλωρικής σιπροφλοξασίνης στο περιβάλλον του περιοδοντικού θύλακα τα οποία ήταν ικανά να αναστείλουν τα περιοπαθογόνα βακτήρια (Ashish et al., 2017; Bottino et al., 2014; Budai-Szűcs et al., 2020; Rajeshwari et al., 2019).

Η **μετρονιδαζόλη** (Εικ. 20) είναι ένας αντιμικροβιακός παράγοντας που ανήκει στις νιτροιμιδαζόλες και χρησιμοποιείται για την θεραπεία αναερόβιων βακτηρίων και κάποιων παθογόνων πρωτόζωων για περισσότερα από 45 χρόνια (Freeman et al., 1997; Löfmark et al., 2010). Η μετρονιδαζόλη εισέρχεται στο κύτταρο τους με παθητική διάχυση σαν προφάρμακο και ενεργοποιείται στο κυτταρόπλασμα των βακτηρίων ή σε συγκεκριμένα οργανίδια στα πρωτόζωα. Στην συνέχεια μετατρέπεται σε ελεύθερες ρίζες νιτρικών οι οποίες είναι κυτταροτοξικές και αναστέλλουν την σύνθεση νουκλεϊκού οξέος με αποτέλεσμα των θάνατο των κυττάρων (Deepak et al., 2018; Löfmark et al., 2010). Παρουσιάζει το μειονέκτημα ότι χρειάζεται μεγάλο διάστημα χορήγησης για να είναι αποτελεσματική και παρουσιάζει συχνά ανεπιθύμητες ενέργειες όπως ναυτία, μεταλλική γεύση και απώλεια όρεξης (Deepak et al., 2018).



Εικόνα 20. Χημική δομή της μετρονιδαζόλης.

Η **σιπροφλοξασίνη** (Εικ. 21) είναι ένα αντιβιοτικό ευρείας χρήσης που ανήκει στην οικογένεια των φθοριοκινολόνων. Χρησιμοποιείται κυρίως για την αντιμετώπιση GRAM-θετικών και αρνητικών βακτηρίων. Λειτουργεί αναστέλλοντας την DNA γυράση με τρόπο που σταματάει την αναπαραγωγή του βακτηρίου (Fisher et al., 1989). Χρειάζεται μεγάλο διάστημα χορήγησης για να είναι αποτελεσματική και παρουσιάζει συχνά ανεπιθύμητες ενέργειες όπως ναυτία, εμετό, κοιλιακό πόνο, άγχος νευρική και αϋπνία (Kashyap et al., 2021).



Εικόνα 21. Χημική δομή της σιπροφλοξασίνης.

1.6.4.2. Μεμβράνες κατευθυνόμενης ιστικής/οστικής αναγέννησης από νανοϋλικά

Η νανοτεχνολογία έχει εισέλθει δυναμικά στον τομέα της αναγεννητικής ιατρικής και δίνει νέα προοπτική στην κατευθυνόμενη αναγέννηση ιστών για την θεραπεία της περιοδοντίτιδας. Τα τελευταία χρόνια, υπάρχει αυξημένο ερευνητικό ενδιαφέρον αναφορικά με την χρήση νανοσωματιδίων, νανοϊνών και άλλων νανοδομών για την θεραπεία της περιοδοντίτιδας.

Δεδομένου της εγγενούς ινώδους δομής της εξωκυττάριας μήτρας, νανοϊνώδη ικρίωματα που μιμούνται την δομή της, μπορούν να σχεδιαστούν ώστε να προωθούν την μετανάστευση, την προσκόλληση και τον πολλαπλασιασμό των κυττάρων στους κατεστραμμένους ιστούς. Οι πολυμερικές νανοϊνες επιτελούν αυτό το σκοπό αφού προσομοιάζουν το πορώδες και την αρχιτεκτονική της φυσικής εξωκυττάριας μήτρας παρέχοντας ένα μικρο-περιβάλλον που προάγει τη κυτταρική προσκόλληση, τον πολλαπλασιασμό και την διαφοροποίηση (Chen & Huang, 2022).

Μία μεγάλη δυσκολία που υπάρχει στην αναγέννηση του περιοδοντίου είναι η πολύπλοκη ανατομία του, καθώς αποτελείται από σκληρούς και μαλακούς ιστούς που περιβάλλουν και στηρίζουν το δόντι. Οι υπάρχουσες μεμβράνες GTR/GBR είναι αποτελεσματικές στο να βελτιώσουν το θεραπευτικό αποτέλεσμα αλλά δεν καταφέρνουν να οδηγήσουν στην πλήρη αποκατάσταση του περιοδοντίου. Για το λόγο αυτό τα τελευταία χρόνια η ερευνητική δραστηριότητα έχει εστιάσει στην ανάπτυξη πολυ-στρωματικών ικριωμάτων από βιοαποικοδομήσιμα υλικά τα οποία μιμούνται την αρχιτεκτονική του περιοδοντίου και μπορούν να επάγουν την αναγέννηση των σκληρών και μαλακών ιστών του. Με την εφαρμογή διαφόρων τεχνικών όπως η εκτύπωση τριών διαστάσεων και η ηλεκτροϊνινοποίηση, έχει επιτευχθεί η ανάπτυξη πολυ-στρωματικών GTR μεμβρανών από διάφορα φυσικά και συνθετικά βιοαποικοδομήσιμα πολυμερή, οι οποίες έχουν επιδείξει πολύ ελπιδοφόρα αποτελέσματα τόσο *in vitro* όσο και *in vivo* χωρίς ωστόσο, να έχουν γίνει ακόμη κλινικές μελέτες σε ανθρώπους (Abedi et al., 2022; Chen & Huang, 2022; Zhu et al., 2023).

1.7. Σκοπός της μελέτης

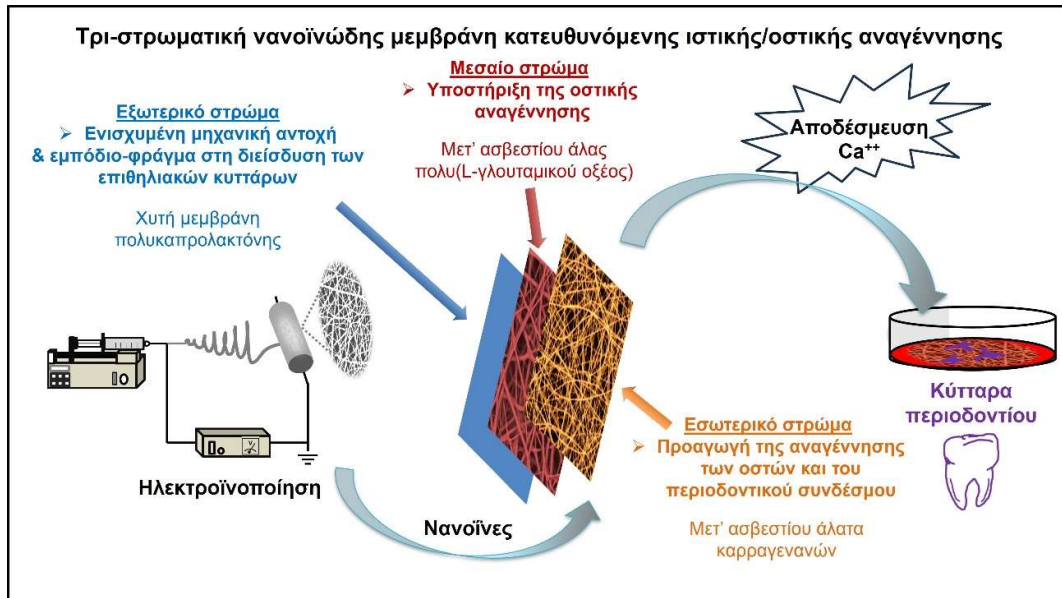
Τα τελευταία χρόνια το ερευνητικό ενδιαφέρον στις βιοϊατρικές εφαρμογές έχει στραφεί στα θαλάσσια βιοπολυμερή λόγω της εξαιρετικής βιοσυμβατότητας και βιοαποικοδομησιμότητας τους. Το ευρύ φάσμα βιολογικών δράσεων που παρουσιάζουν οι θεικοί πολυσακχαρίτες τους καθιστά ιδανικά βιοϋλικά για την ανάπτυξη καινοτόμων υλικών και συστημάτων για εφαρμογές μηχανικής ιστών, επούλωσης πληγών και χορήγησης φαρμάκων.

Ο σκοπός της παρούσας διδακτορικής διατριβής ήταν αφενός η απομόνωση, ο χαρακτηρισμός και η τροποποίηση θεικών πολυσακχαριτών από μακροφύκη, και αφετέρου, ο σχεδιασμός, η ανάπτυξη και ο χαρακτηρισμός καινοτόμων πολυλειτουργικών μεμβρανών κατευθυνόμενης ιστικής/οστικής αναγέννησης από νανοϊνες θαλάσσιων θεικών πολυσακχαριτών για την θεραπεία της περιοδοντίτιδας.

Η κατευθυνόμενη ιστική/οστική αναγέννηση (GTR/GBR) είναι μία μέθοδος που χρησιμοποιείται για την θεραπεία της περιοδοντίτιδας και συμβάλλει στην αναγέννηση του περιοδοντικού συνδέσμου. Ωστόσο, λόγω της πολυπλοκότητας του περιοδοντικού συνδέσμου η επιτυχής αναγέννηση του περιοδοντίου παραμένει μία μεγάλη πρόκληση. Οι ηλεκτροϊνοποιημένες νανοϊνες έχουν την ιδιότητα να μιμούνται την αρχιτεκτονική δομή της εξωκυττάριας μήτρας ευνοώντας την προσκόλληση, τον πολλαπλασιασμό και την διαφοροποίηση των κυττάρων. Οι μικρο-/νανοϊνώδεις δομές, λόγω των μοναδικών χαρακτηριστικών τους αλλά και της πληθώρας των φυσικών και συνθετικών πολυμερών που μπορούν να ηλεκτροϊνοποιηθούν, διερευνώνται ως προς την χρήση τους σε ένα ευρύ φάσμα εφαρμογών.

Ο σχεδιασμός περιελάμβανε την παρασκευή μεμβρανών δύο ή τριών στρωμάτων (Εικ. 22), οι οποίες θα είναι βιοσυμβατές, βιοδιασπώμενες, και θα επάγουν την αναγέννηση του περιοδοντίου. Πιο συγκεκριμένα, με στόχο την επίτευξη της επιθυμητής πολυλειτουργικότητας, όλες οι μεμβράνες σχεδιάστηκαν ώστε να αποτελούνται από μία εξωτερική χυτή μεμβράνη πολυκαπρολακτόνης, η οποία θα παρέχει βέλτιστη μηχανική αντοχή και θα λειτουργεί ως φυσικός φραγμός ενάντια στην υπέρμετρη ανάπτυξη και διείσδυση επιθηλιακών κυττάρων. Οι μεμβράνες τριών στρωμάτων αποτελούνταν από μία μεσαία μεμβράνη νανοϊνών από το μετ' ασβεστίου άλας πολυ(L-γλουταμικού οξέος) σε συνδυασμό με πολυ(ε-καπρολακτόνη) καθώς και από μία εσωτερική μεμβράνη νανοϊνών μετ' ασβεστίου ή μετά νατρίου αλάτων καρραγενανών. Οι μεμβράνες δύο στρωμάτων αποτελούνταν από μία εσωτερική

μεμβράνη νανοϊνών από μετ' ασβεστίου άλατος καρραγενανών ή/και μετ' ασβεστίου άλατος πολυ(L-γλουταμικού οξέος) σε συνδυασμό με πολυ(ε-καπρολακτόνη). Σε όλες τις περιπτώσεις, οι νανοϊνώδεις μεμβράνες σχεδιάστηκαν ώστε να λειτουργούν ως πηγή ιόντων ασβεστίου με στόχο να επάγουν την αναγέννηση του περιοδοντίου.

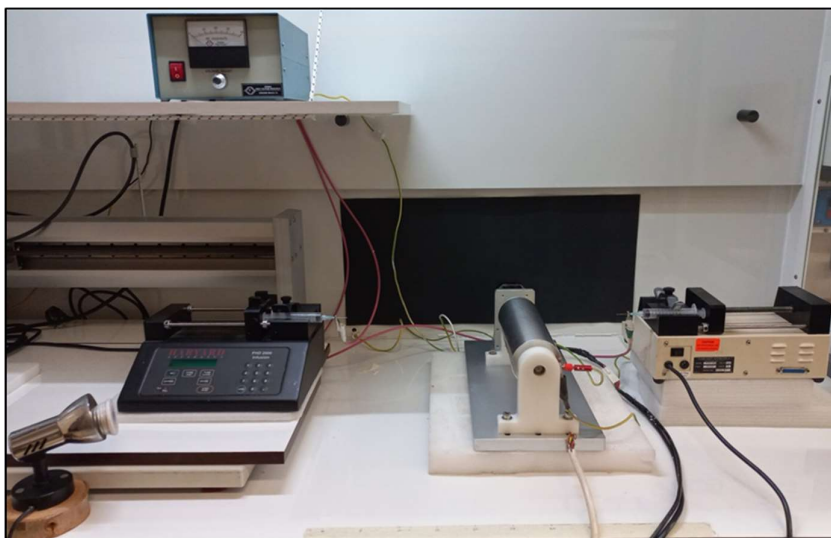


Εικόνα 22. Βασικός σχεδιασμός για την ανάπτυξη των πολυ-στρωματικών νανοϊνωδών μεμβρανών για τη θεραπεία της περιοδοντίτιδας.

2. ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

2.1. Οργανολογία

Η πειραματική διάταξη που χρησιμοποιήθηκε για την ηλεκτροϊονοποίηση αποτελείται από τρία βασικά μέρη: μία γεννήτρια παροχής υψηλής τάσης (Gamma High Voltage Research, Ormond Beach, FL, USA), η οποία παρέχει τάση έως 50kV, μία προγραμματιζόμενη αντλία (Harvard Apparatus, Holliston, MA, USA) και έναν περιστρεφόμενο συλλέκτη (RC-6000, NaBond Technologies, Hong Kong). Για την αντιπαράλληλη ηλεκτροϊονοποίηση των πολυμερικών διαλυμάτων χρησιμοποιήθηκαν δύο προγραμματιζόμενες αντλίες (Harvard PHD 2000, Harvard Apparatus, Holliston, MA, USA), οι οποίες ήταν οριζόντια και αντίθετα τοποθετημένες ώστε να διασφαλιστεί η ομοιογένεια των παραγόμενων πολυμερικών ινών. Η διάταξη ήταν τοποθετημένη σε οριζόντια θέση εντός ενός ηλεκτρικά μονωμένου θαλάμου (Εικ. 23).



Εικόνα 23. Εργαστηριακή διάταξη ηλεκτροϊονοποίησης.

Για την ηλεκτροϊονοποίηση των προς μελέτη πολυμερικών διαλυμάτων χρησιμοποιήθηκαν σύριγγες μιας χρήσεως των 10 mL με μεταλλική βελόνα διαμέτρου 23 gauge (0.60 mm). Στην άκρη της βελόνας εφαρμόστηκε το θετικό ηλεκτρόδιο προκειμένου να υπάρχει σταθερή διαφορά δυναμικού ανάμεσα στη βελόνα και στον συλλέκτη. Η ροή του πολυμερικού διαλύματος ρυθμιζόταν από την αντλία. Οι παραγόμενες νανοϊνες συλλέχθηκαν σε μία χυτή μεμβράνη PCL, η οποία ήταν

τοποθετημένη στον γειωμένο περιστρεφόμενο συλλέκτη. Η θερμοκρασία και η σχετική υγρασία ήταν 20 ± 2 °C και $60 \pm 5\%$, αντίστοιχα.

Ο χαρακτηρισμός και η παρατήρηση των παραγόμενων ινών έγινε με την χρήση ηλεκτρονικού μικροσκοπίου σάρωσης (SEM PhenomWorld, Eindhoven, The Netherlands) με νήμα βολφραμίου (10 kV). Όποτε κρίθηκε απαραίτητο για τον μορφολογικό χαρακτηρισμό των ινών προηγήθηκε επικάλυψη των δειγμάτων με αγωγίμο στρώμα χρυσού σε συσκευή επιχρύσωσης (SC7620 Mini Sputter Coater/Glow Discharge System, Quorum) για 15 sec. Για την εξέταση των δειγμάτων χρησιμοποιήθηκε δειγματολήπτης μείωσης φορτίου (charge reduction sample holder, PhenomWorld). Η διάμετρος των ινών υπολογίστηκε με το ενσωματωμένο λογισμικό ανάλυσης εικόνας Phenom Pro Suite/ FiberMetric.

Τα φάσματα υπερύθρου με μετασχηματισμό Fourier (FT-IR) καταγράφηκαν σε φασματογράφο Bruker Alpha II με την τεχνική της εξασθενημένης ολικής ανάκλισης (ATR).

Τα φάσματα υπεριώδους-ορατού (UV-Vis) καταγράφηκαν είτε σε φασματοφωτόμετρο UV-1900i χρησιμοποιώντας κυψελίδα πάχους 1 cm είτε σε φασματοφωτόμετρο Infinite M200 PRO TECAN plate reader (Männedorf, Zürich, Switzerland) χρησιμοποιώντας επίπεδες διαφανείς πλάκες 96 φρεατίων κατάλληλες για φάσματα υπεριώδους ή ορατού, αντίστοιχα, της εταιρείας Greiner.

Η θερμογραφική ανάλυση των δειγμάτων πραγματοποιήθηκε με την χρήση Θερμογραφικού Αναλυτή (TGA 55, TA instruments, New Castle, DE, USA) υπό ροή αζώτου 25 mL/min και ρυθμό θέρμανσης 10 °C/min από τους 27 έως τους 600 °C. Επιπλέον, για την ανάλυση της θερμικής συμπεριφοράς των δειγμάτων χρησιμοποιήθηκε Διαφορικός Θερμιδομετρητής Σάρωσης (DSC 25, TA instruments, New Castle, DE, USA). Για τις μετρήσεις χρησιμοποιήθηκαν δείγματα (6-7 mg) εγκλεισμένα σε καψίδια αλουμινίου. Η ανάλυση πραγματοποιήθηκε υπό ροή αζώτου 50 mL/min, με θέρμανση των δειγμάτων από τους 40 έως τους 350 °C υπό σταθερό ρυθμό θέρμανσης 10 °C/min.

Η χρωματογραφία μοριακού αποκλεισμού πραγματοποιήθηκε σε χρωματογράφο Agilent 1100 Series Liquid Chromatography Pump με τετραπλή αντλία εισαγωγής του συστήματος διαλυτών και ανιχνευτή Agilent 1100 Series RI. Για την χρωματογραφία μοριακού αποκλεισμού χρησιμοποιήθηκαν δύο στήλες αποκλεισμού μεγεθών συνδεδεμένες σε σειρά: (i) Agilent ZORBAX GF-450 διαστάσεων 25 cm x 9.4 mm και (ii) Agilent ZORBAX GF-250 διαστάσεων 25 cm x 9.4 mm.

Για την εφαρμογή υπερήχων υψηλής ισχύος χρησιμοποιήθηκε συσκευή υπερήχων Omni Sonic Ruptor 4000 (OMNI International) εξοπλισμένη με ένα micro-καθετήρα τιτανίου διαμέτρου 5/32''.

Οι φυγοκεντρήσεις των διαλυμάτων έγιναν είτε σε φυγόκεντρο 2236R της εταιρείας Labogene ή σε φυγόκεντρο CF-10 της εταιρείας Witeg.

Η συμπύκνωση των διαλυμάτων υπό κενό έγινε σε συσκευή ταχείας εξάτμισης διαλύτη με μηχανικά περιστρεφόμενη φιάλη απόσταξης και εφαρμογή ελαττωμένης πίεσης τύπου BÜCHI Rotavapor R-200 σε θερμοκρασία έως 38 °C.

Η λυοφιλοποίηση των δειγμάτων πραγματοποιήθηκε σε συσκευή Freeze Dry System της εταιρείας Scanvac CoolSafe.

Για την αποστείρωση των υλικών και την υδατική εκχύλιση των φυκών σε υψηλή θερμοκρασία χρησιμοποιήθηκε κλίβανος υγρής αποστείρωσης της εταιρείας Raypa Trade.

2.2. Διαλύτες και χημικά αντιδραστήρια

Για την απομόνωση των καρραγενανών χρησιμοποιήθηκαν NaOH και Ca(OH)₂ της εταιρείας Lachner, KOH της εταιρείας Merck και HCl 37% της εταιρείας Sigma-Aldrich. Για τον χαρακτηρισμό των απομονωμένων καρραγενανών χρησιμοποιήθηκαν πρότυπα δείγματα κ-, ι- και λ- καρραγενανών της εταιρείας Sigma-Aldrich.

Για την απομόνωση των φουκοϊδανών χρησιμοποιήθηκε CaCl₂ της εταιρείας Panreac, EDTA-2Na-2H₂O της εταιρείας Serva, βρωμιούχο εξαδεκυλοτριμεθυλαμμώνιο (cetavlon) της εταιρείας Sigma-Aldrich, NaI της εταιρείας Boehringer Ingelheim. Η φορμαλδεΰδη που χρησιμοποιήθηκε για τον αποχρωματισμό των φυκών ήταν συγκέντρωσης 35-40% w/v (σταθεροποιημένη με μεθανόλη) της εταιρείας Panreac.

Οι ουλβάνες που χρησιμοποιήθηκαν για την μελέτη της επίδρασης των υπερήχων υψηλής ισχύος είχαν απομονωθεί στο παρελθόν από την ερευνητική μας ομάδα από το χλωροφύκος *Ulva rigida*.

Οι μεμβράνες διαπίδυσης που χρησιμοποιήθηκαν για τον καθαρισμό των πολυσακχαριτών ήταν βενζοϋλιωμένες πάχους 32 mm της εταιρείας Sigma-Aldrich.

Για τον προσδιορισμό του μοριακού βάρους των πολυσακχαριτών χρησιμοποιήθηκαν πρότυπα δείγματα πουλουλανών (standard P-82) της εταιρείας Shodex. Το Na₂HPO₄ που χρησιμοποιήθηκε για την παρασκευή της κινητής φάσης ήταν της εταιρείας Fisher Scientific.

Για τον προσδιορισμό των θειικών εστέρων των πολυσακχαριτών χρησιμοποιήθηκε K_2SO_4 της εταιρείας Carlo Erba Reagents, ζελατίνη της εταιρείας Difco Laboratories, $BaCl_2 \cdot 2H_2O$ και διάλυμα τριχλωροξικού οξέος της εταιρείας Merck.

Για την παραγωγή ηλεκτροϊονοποιημένων ινών χρησιμοποιήθηκαν PEO (average Mn 900,000) και PCL (average Mn 80,000) της εταιρείας Sigma-Aldrich και PEO (average Mn 7,000,000) της εταιρείας Dow Inc. Το μετ' ασβεστίου άλας πολυ(L-γλουταμικού οξέος) (PG-Ca) που χρησιμοποιήθηκε για την παραγωγή των ηλεκτροϊονοποιημένων ινών παρασκευάστηκε στο Εργαστήριο Βιομηχανικής Χημείας του Τμήματος Χημείας του ΕΚΠΑ. Οι αντιβιοτικοί παράγοντες μετρονιδαζόλη και υδροχλωρική σιπροφλοξασίνη που ενσωματώθηκαν στις ηλεκτροϊονοποιημένες ίνες παρελήφθησαν από την εταιρεία INTERMED ΙΟΥΛΙΑ & ΕΙΡΗΝΗ ΤΣΕΤΗ ΑΒΕΕ.

Οι διαλύτες DCM και MeOH ήταν καθαρότητας A.R. της εταιρείας LAB-SCAN Analytical Sciences, οι οποίοι πριν από τη χρήση τους αποστάχθηκαν. Οι διαλύτες βενζόλιο και EtOH ήταν καθαρότητας A.R. της εταιρείας LAB-SCAN Analytical Sciences. Ο διαλύτης DMF ήταν καθαρότητας HPLC της εταιρείας LAB-SCAN Analytical Sciences. Όλοι οι διαλύτες χρησιμοποιήθηκαν χωρίς περαιτέρω καθαρισμό. Το νερό που χρησιμοποιήθηκε ήταν είτε απεσταγμένο (dH_2O) είτε υπερκάθαρο (ddH_2O).

Για τον χαρακτηρισμό των νανοϊνών μεμβρανών χρησιμοποιήθηκε διάλυμα προσομοίωσης σιέλου (Marques et al., 2011), η σύσταση του οποίου αναφέρεται στον Πίν. 1. Μετά την παρασκευή του, το διάλυμα αποστειρώθηκε σε κλίβανο υγρής αποστείρωσης (20 min στους $121^\circ C$) και προστέθηκε σε αυτό 1.5 g $NaHCO_3$ ακριβώς πριν την χρήση του διαλύματος.

Πίνακας 1. Σύσταση διαλύματος προσομοίωσης σιέλου που χρησιμοποιήθηκε για τον χαρακτηρισμό των μεμβρανών.

Σύσταση (g ανά 1L ddH_2O)	
KCl	0.720
$CaCl_2 \cdot 2H_2O$	0.220
NaCl	0.600
KH_2PO_4	0.680
$Na_2HPO_4 \cdot 2H_2O$	0.430
KSCN	0.060
Citric acid	0.030

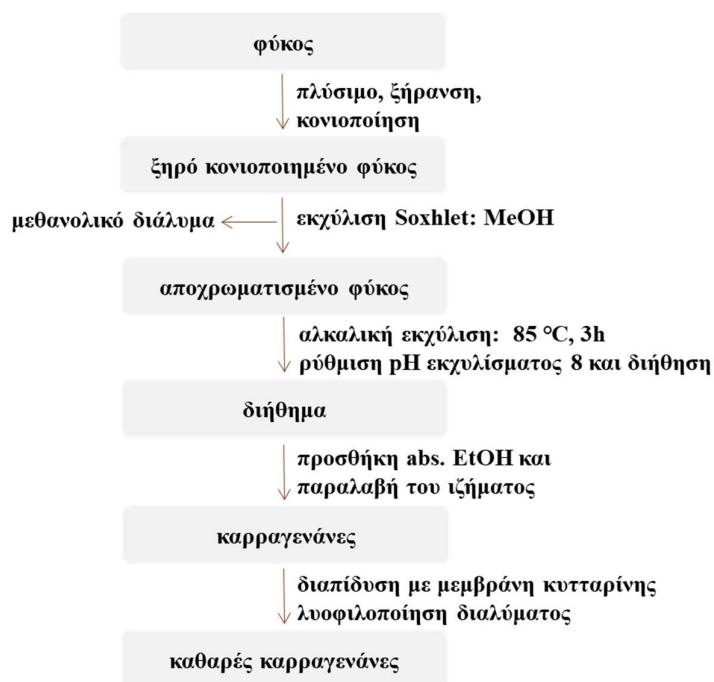
Τα $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, NaCl και $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ που χρησιμοποιήθηκαν για την παρασκευή του διαλύματος προσομοίωσης σιέλου ήταν της εταιρείας Merck, το KCl της εταιρείας Lach-Ner, το KH_2PO_4 της εταιρείας Carlo Erba, τα KSCN και NaHCO_3 της εταιρείας BDH Reagents and Chemicals και το κιτρικό οξύ της εταιρείας EltonGroup.

Για τον προσδιορισμό των ιόντων ασβεστίου στις μεμβράνες νανοϊνών χρησιμοποιήθηκε κιτ μέτρησης ασβεστίου (ab272527) της εταιρείας Abcam.

2.3. Απομόνωση καρραγενανών από το ροδοφύκος *Chondracanthus teedei*

Πραγματοποιήθηκε απομόνωση καρραγενανών από φυσικούς και καλλιεργημένους πληθυσμούς του ροδοφύκου *C. teedei*. Ποσότητα του ροδοφύκου συλλέχθηκε από φυσικούς πληθυσμούς στη Κεφαλονιά, σε βάθος 2-5 m, τον Ιούλιο και τον Οκτώβριο του 2018 (MP0789 και MP0791, αντίστοιχα). Η βιομάζα μεταφέρθηκε υπό ψύξη στο Εργαστήριο Αξιοποίησης Βιοδραστικών Φυσικών Προϊόντων του ΕΚΠΑ, όπου και διατηρήθηκε στους -20°C μέχρι την περαιτέρω επεξεργασία της. Παράλληλα, ποσότητα από καλλιεργημένα στελέχη του ροδοφύκου συλλέχθηκαν από δεξαμενές καλλιέργειας σε χερσαίες εγκαταστάσεις των Ιχθυοτροφείων Κεφαλονιάς τον Νοέμβριο του 2018 και τον Ιανουάριο του 2020 (MP0790 και MP0898, αντίστοιχα).

Τα δείγματα πριν την επεξεργασία τους καθαρίστηκαν επιμελώς από επίφυτα και πλύθηκαν με νερό ώστε να απομακρυνθούν άλατα και ξένα σώματα. Στη συνέχεια ξηράθηκαν στον αέρα, κονιοποιήθηκαν και εκχυλίστηκαν με μεθανόλη σε συσκευή Soxhlet προς την απομάκρυνση χρωστικών (όπως οι χλωροφύλλες). Ακολούθησαν διάφορες εκχυλίσεις, οι οποίες περιγράφονται ακολούθως προκειμένου να παραληφθούν μετά νατρίου, μετά καλίου και μετ' ασβεστίου άλατα καρραγενανών (Εικ. 24).



Εικόνα 24. Γενική πορεία απομόνωσης των καρραγενανών.

2.3.1. Απομόνωση μετά νατρίου αλάτων καρραγενανών

Προκειμένου να απομονωθούν μετά νατρίου άλατα καρραγενανών πραγματοποιήθηκε αλκαλική εκχύλιση του αποχρωματισμένου ξηρού φύκους σε NaOH (1M) σε αναλογία 1 g/ 150 mL στους 85-90 °C για 3 h υπό συνεχή ανάδευση. Μετά τη ρύθμιση του εκχυλίσματος σε pH 8 με προσθήκη HCl, το θερμό εκχύλισμα διηθήθηκε από πάνινη σακούλα και εν συνεχεία υπό κενό προς απομάκρυνση της βιομάζας και το διήθημα συμπυκνώθηκε περίπου έως το μισό του όγκου του. Για να καταβυθιστεί ο πολυσακχαρίτης ακολούθησε προσθήκη EtOH σε όγκο διπλάσιο του διηθήματος και το προκύπτον εναιώρημα παρέμεινε για 24 h στους 4 °C ώστε να ολοκληρωθεί η καταβύθιση (Pereira & Mesquita, 2004). Το ίζημα που καταβυθίστηκε διαχωρίστηκε με φυγοκέντρηση (6000 rpm, 25 °C, 15 min) και στη συνέχεια αφού εκπλύθηκε με EtOH σε λουτρό υπερήχων, διηθήθηκε υπό κενό και λαιοφιλοποιήθηκε. Ο πολυσακχαρίτης που απομονώθηκε, διαλύθηκε σε dH₂O και υποβλήθηκε σε διαπίδυση με μεμβράνη κυτταρίνης σε ddH₂O για 24 h ώστε να απομακρυνθούν άλατα και μικρά μόρια και αφού λαιοφιλοποιήθηκε, παραλήφθηκε το μετά νατρίου άλας των καρραγενανών σε καθαρή μορφή ως υποκίτρινο στερεό (Εικ. 25).



Εικόνα 25. (α) Εκχύλιση σε συσκευή Soxhlet, (β) αποχρωματισμένο ξηρό φύκος, (γ) καταβύθιση καρραγενανών με αιθανόλη, (δ) καρραγενάνες που απομονώθηκαν, και (ε) καρραγενάνες μετά από καθαρισμό με μεμβράνη διαπίδυσης.

2.3.2. Απομόνωση μετά καλίου αλάτων καρραγενανών

Προκειμένου να απομονωθούν μετά καλίου άλατα καρραγενανών πραγματοποιήθηκε αλκαλική εκχύλιση του αποχρωματισμένου ξηρού φύκους σε KOH (1M) σε αναλογία 1 g / 150 mL στους 85-90 °C για 3 h υπό συνεχή ανάδευση. Στην συνέχεια, ακολούθησε η ίδια διαδικασία που περιγράφηκε ανωτέρω για την παραλαβή μετά καλίου άλατος των καρραγενανών σε καθαρή μορφή.

2.3.3. Απομόνωση μετ' ασβεστίου αλάτων καρραγενανών

Για την απομόνωση μετ' ασβεστίου αλάτων καρραγενανών, στο αποχρωματισμένο ξηρό φύκος προστέθηκε dH₂O σε αναλογία 1 g / 80 mL και υπέρκορο διάλυμα Ca(OH)₂ έως ότου το διάλυμα γίνει αλκαλικό (pH 12-13). Ακολούθησε θέρμανση στους 85-90 °C για 2 h υπό συνεχή ανάδευση (Manuhara et al., 2016). Στην συνέχεια, ακολούθησε η ίδια διαδικασία με παραπάνω για την παραλαβή μετ' ασβεστίου άλατος των καρραγενανών σε καθαρή μορφή.

2.4. Απομόνωση φουκοϊδανών από το φαιοφύκος *Cystoseira barbata*

Πραγματοποιήθηκε απομόνωση φουκοϊδανών από φυσικούς πληθυσμούς του φαιοφύκους *C. barbata*. Ποσότητα του φαιοφύκους συλλέχθηκε από φυσικούς πληθυσμούς στον Κυπάρισσο της Μάνης, σε βάθος 1-3 m, τον Ιούλιο του 2011

(MP0249) και στον Γερολιμένα, σε βάθος 1-3 m, τον Απρίλιο του 2018 (MP0711). Η βιομάζα μεταφέρθηκε υπό ψύξη στο Εργαστήριο Αξιοποίησης Βιοδραστικών Φυσικών Προϊόντων του ΕΚΠΑ, όπου και διατηρήθηκε στους -20°C μέχρι την περαιτέρω επεξεργασία της.

Τα δείγματα πριν την επεξεργασία τους καθαρίστηκαν επιμελώς από επίφυτα, πλύθηκαν με νερό ώστε να απομακρυνθούν άλατα και ξένα σώματα και αφού ξηράνθηκαν στον αέρα, κονιοποιήθηκαν. Προκειμένου να παραληφθούν καθαρές φουκοϊδάνες χωρίς χρωστικές και με υψηλή απόδοση δοκιμάστηκαν διάφοροι μέθοδοι αποχρωματισμού και εκχύλισης. Η πορεία των μεθόδων που εφαρμόστηκαν περιγράφεται ακολούθως.

2.4.1. Αποχρωματισμός με αιθανόλη

Ο ξηρός οργανισμός εκχυλίστηκε με EtOH σε αναλογία 100 g / 300 mL με ήπια θέρμανση έως τους 40°C για 2 h και κάθετο ψυκτήρα επαναρροής. Πραγματοποιήθηκαν συνολικά 6 κύκλοι αποχρωματισμού όπου κάθε φορά απομακρυνόταν το αιθανολικό εκχύλισμα και χρησιμοποιούταν επιπλέον όγκος EtOH.

2.4.1.1. Υδατική εκχύλιση

Πραγματοποιήθηκε υδατική εκχύλιση του αποχρωματισμένου ξηρού φύκους σε dH_2O σε αναλογία 10 g / 300 mL στους 121°C για 20 min σε κλίβανο υγρής αποστείρωσης. Το εκχύλισμα φυγοκεντρήθηκε (6000 rpm, 25°C , 10 min) και διηθήθηκε υπό κενό ώστε να απομακρυνθεί η βιομάζα. Ακολούθησε συμπύκνωση του διηθήματος (περίπου στο ένα τρίτο του όγκου του) και προσθήκη CaCl_2 σε συγκέντρωση 0.2 mol/L ώστε να καταβυθιστεί το αλγινικό ασβέστιο και το προκύπτον εναιώρημα παρέμεινε για 24 h στους 4°C για να ολοκληρωθεί η καταβύθιση. Το ίζημα που καταβυθίστηκε διαχωρίστηκε με φυγοκέντρωση (6000 rpm, 25°C , 15 min) και στην συνέχεια αφού εκπλύθηκε με EtOH σε λουτρό υπερήχων, διηθήθηκε υπό κενό και λυοφιλοποιήθηκε ώστε να παραληφθεί το αλγινικό ασβέστιο. Ακολούθως, το διήθημα συμπυκνώθηκε (περίπου στο ένα τρίτο του όγκου του) και προστέθηκε κατάλληλος όγκος EtOH ώστε να προκύψει συγκέντρωση αιθανόλης 75% v/v και το προκύπτον εναιώρημα παρέμεινε για 24 h στους 4°C ώστε να ολοκληρωθεί η καταβύθιση. Το ίζημα που καταβυθίστηκε διαχωρίστηκε με φυγοκέντρωση (6000 rpm, 25°C , 15 min) και στην συνέχεια αφού εκπλύθηκε με EtOH σε λουτρό υπερήχων, διηθήθηκε υπό κενό και λυοφιλοποιήθηκε ώστε να παραληφθούν οι φουκοϊδάνες (Geng et al., 2018).

2.4.1.2. Όξινη εκχύλιση

Πραγματοποιήθηκε όξινη εκχύλιση του αποχρωματισμένου ξηρού φύκους σε διάλυμα 0.1 N HCl / 1% w/v CaCl₂ σε αναλογία 10 g / 200 mL στους 70-80 °C για 60 min υπό συνεχή ανάδευση. Το εκχύλισμα διηθήθηκε από πάνινη σακούλα προς απομάκρυνση της βιομάζας και το διήθημα παρέμεινε για 24 h στους 4 °C για να καταβυθιστεί το αλγινικό ασβέστιο. Το ίζημα που καταβυθίστηκε διαχωρίστηκε με φυγοκέντρηση (6000 rpm, 25 °C, 15 min) και διήθηση υπό κενό. Στην συνέχεια, στο διήθημα προστέθηκε διάλυμα 1 M NaOH (1/2 του όγκου του διηθήματος) για να καταβυθιστούν οι φουκοϊδάνες και το προκύπτον εναιώρημα παρέμεινε για 24 h στους 4 °C ώστε να ολοκληρωθεί η καταβύθιση. Το ίζημα που καταβυθίστηκε διαχωρίστηκε με φυγοκέντρηση (6000 rpm, 25 °C, 15 min) και στην συνέχεια αφού εκπλύθηκε με EtOH σε λουτρό υπερήχων, διηθήθηκε υπό κενό και λυοφιλοποιήθηκε ώστε να παραληφθούν οι φουκοϊδάνες.

2.4.2. Αποχρωματισμός με αιθανόλη/νερό/φορμαλδεΰδη

Πραγματοποιήθηκε κατεργασία του ξηρού οργανισμού με μίγμα EtOH (~87%v/v) / φορμαλδεΰδη σε αναλογία 8:2 με ήπια θέρμανση έως τους 40 °C και κάθετο ψυκτήρα επαναροής για 4.5 h και στην συνέχεια το διάλυμα παρέμεινε σε θερμοκρασία δωματίου για 24 h προς απομάκρυνση των χρωστικών (de Reviers, 1989).

2.4.2.1. Υδατική εκχύλιση

Το αποχρωματισμένο ξηρό φύκος υποβλήθηκε σε υδατική εκχύλιση ακολουθώντας την ίδια διαδικασία που αναφέρθηκε ανωτέρω (βλ. 2.4.1.1).

2.4.2.2. Υδατική εκχύλιση και καταβύθιση με βρωμιούχο δεκαεξυλοτριμεθυλαμμώνιο

Πραγματοποιήθηκε υδατική εκχύλιση του αποχρωματισμένου ξηρού φύκους σε dH₂O σε αναλογία 10 g / 300 mL στους 121 °C για 20 min σε κλίβανο υγρής αποστείρωσης. Το εκχύλισμα φυγοκεντρήθηκε (6000 rpm, 25 °C, 10 min) και διηθήθηκε υπό κενό ώστε να απομακρυνθεί η βιομάζα. Ακολούθησε συμπύκνωση του διηθήματος (περίπου στο ένα τρίτο του όγκου του) και προσθήκη CaCl₂ σε συγκέντρωση 0.2 mol/L ώστε να καταβυθιστεί το αλγινικό ασβέστιο. Το εναιώρημα παρέμεινε για 24 h στους 4 °C για να ολοκληρωθεί η καταβύθιση. Το ίζημα που καταβυθίστηκε διαχωρίστηκε με φυγοκέντρηση (6000 rpm, 25 °C, 15 min) και στην συνέχεια αφού εκπλύθηκε με EtOH σε λουτρό υπερήχων, διηθήθηκε υπό κενό και λυοφιλοποιήθηκε ώστε να παραληφθεί το αλγινικό ασβέστιο. Στην συνέχεια, το

διήθημα συμπυκνώθηκε (περίπου στο ένα τρίτο του όγκου του) και προστέθηκε διάλυμα 10% w/v βρωμιούχου δεκαεξυλο-τριμεθυλαμμωνίου (cetavlon) (1/2 του όγκου του διηθήματος) προκειμένου να καταβυθιστεί μετά δεκαεξυλο-τριμεθυλαμμωνίου άλας φουκοϊδανών. Το εναιώρημα παρέμεινε για 24 h στους 4 °C ώστε να ολοκληρωθεί η καταβύθιση. Ακολούθησε φυγοκέντρηση (6000 rpm, 25 °C, 15 min) και διήθηση υπό κενό για να διαχωριστεί το ίζημα. Το ίζημα εκπλύθηκε με dH₂O και αναδεύτηκε με αιθανολικό διάλυμα 20% w/v NaI για 72 h. Έπειτα, το εναιώρημα φυγοκεντρήθηκε (6000 rpm, 25 °C, 15 min) και διηθήθηκε υπό κενό για να παραληφθεί το ίζημα, το οποίο εκπλύθηκε με EtOH και λυοφιλοποιήθηκε. Ο πολυσακχαρίτης που απομονώθηκε διαλύθηκε σε ddH₂O και υποβλήθηκε σε διαπίδυση με μεμβράνη κυτταρίνης σε ddH₂O για 24 h ώστε να απομακρυνθούν άλατα και μικρά μόρια και αφού λυοφιλοποιήθηκε, παραλήφθηκαν οι φουκοϊδάνες σε καθαρή μορφή (Geng et al., 2018; Mak et al., 2014).

2.4.3. Εκχύλιση με EDTA χωρίς αποχρωματισμό

Το ξηρό φύκος εκχυλίστηκε σε διάλυμα 0.5% w/v EDTA-2Na-2H₂O σε dH₂O σε αναλογία 1 g / 30 mL στους 70 °C για 3 h. Το εκχύλισμα φυγοκεντρήθηκε (6000 rpm, 25 °C, 15 min) ώστε να απομακρυνθεί η βιομάζα και στην συνέχεια διηθήθηκε υπό κενό. Στο διήθημα (~pH 7) προστέθηκε κατάλληλος όγκος EtOH ώστε να προκύψει συγκέντρωση EtOH 20% v/v ώστε να καταβυθιστεί το αλγινικό νάτριο. Το προκύπτον εναιώρημα παρέμεινε για 24 h στους 4 °C ώστε να ολοκληρωθεί η καταβύθιση. Το ίζημα που καταβυθίστηκε διαχωρίστηκε με φυγοκέντρηση (6000 rpm, 25 °C, 15 min) και στο υπερκείμενο διάλυμα προστέθηκε κατάλληλος όγκος EtOH ώστε να προκύψει συγκέντρωση EtOH 64% v/v προκειμένου να καταβυθιστούν οι φουκοϊδάνες. Το προκύπτον εναιώρημα παρέμεινε για 24 h στους 4 °C ώστε να ολοκληρωθεί η καταβύθιση. Το ίζημα που καταβυθίστηκε, διαχωρίστηκε με φυγοκέντρηση (6000 rpm, 25 °C, 15 min) και στην συνέχεια αφού εκπλύθηκε με EtOH σε λουτρό υπερήχων, διηθήθηκε υπό κενό και λυοφιλοποιήθηκε ώστε να παραληφθούν οι φουκοϊδάνες (Zhao et al., 2018).

2.5. Τροποποιήσεις πολυσακχαριτών με υπέρηχους υψηλής ισχύος

Πραγματοποιήθηκε κατεργασία υδατικών διαλυμάτων θεικών πολυσακχαριτών από φύκη (καρραγενάνες, ουλβάνες και φουκοϊδάνες) με την χρήση υπερήχων υψηλής ισχύος προκειμένου να μελετηθεί η επίδραση των υπερήχων στο μοριακό βάρος των πολυσακχαριτών, καθώς και στο ποσοστό των θεικών τους εστέρων, αλλά και να

διερευνηθούν οι παράμετροι (pH διαλύματος και χρονική διάρκεια έκθεσης σε υπέρηχους) που πιθανόν συμβάλλουν σε αυτές τις μεταβολές.

Για το σκοπό αυτό, παρασκευάστηκαν για τον κάθε πολυσακχαρίτη υδατικά διαλύματα συγκέντρωσης 0.5 mg/mL σε όξινο και ουδέτερο pH (pH 5 και 7, αντίστοιχα). Για την διεξαγωγή των πειραμάτων, μεταφέρθηκαν 10 mL από κάθε διάλυμα σε φιαλίδια (με διάμετρο βάσης 2.5 cm και ύψος 5.6 cm), τα οποία κατά τη διάρκεια της κατεργασίας παρέμειναν τοποθετημένα μέσα σε παγόλουτρο ώστε να διατηρείται σταθερή η θερμοκρασία των διαλυμάτων. Η κατεργασία των διαλυμάτων πραγματοποιήθηκε με το άκρο του καθετήρα υπερήχων βυθισμένο κατά 6 mm εντός του διαλύματος και τοποθετημένο στο κέντρο αυτού, εφαρμόζοντας ισχύ 60 W για χρονικά διαστήματα 10, 20 και 30 min (Πίν. 2). Μετά το τέλος των πειραμάτων τα διαλύματα λυοφιλοποιήθηκαν προς ανάκτηση και περαιτέρω ανάλυση των πολυσακχαριτών.

Πίνακας 2. Συνθήκες επεξεργασίας των πολυσακχαριτών με υπέρηχους υψηλής ισχύος.

Πολυσακχαρίτης προς τροποποίηση	Τροποποιημένος πολυσακχαρίτης	pH	Χρόνος εφαρμογής (min)
καρραγενάνες (CG-Na-3)	carrultra5-1	5	10
	carrultra5-2		20
	carrultra5-3		30
	carrultra7-1	7	10
	carrultra7-2		20
	carrultra7-3		30
ουλβάνες (ul1120a)	ulultra5-1	5	10
	ulultra5-2		20
	ulultra5-3		30
	ulultra7-1	7	10
	ulultra7-2		20
	ulultra7-3		30
φουκοϊδάνες (FC-4)	fucultra5-1	5	10
	fucultra5-2		20
	fucultra5-3		30
	fucultra7-1	7	10
	fucultra7-2		20
	fucultra7-3		30

2.6. Προσδιορισμός κατανομής μοριακού βάρους

Η κατανομή του μοριακού βάρους και το μέσο μοριακό βάρος των απομονωμένων και των τροποποιημένων πολυσακχαριτών προσδιορίστηκε με χρωματογραφία αποκλεισμού μεγεθών (Size Exclusion Chromatography).

2.6.1. Απομονωμένοι πολυσακχαρίτες

Οι συνθήκες των χρωματογραφικών αναλύσεων για τις καρραγενάνες και τις φουκοϊδάνες που απομονώθηκαν παρουσιάζονται στους Πίν. 3-6.

Για τις χρωματογραφικές αναλύσεις παρασκευάστηκαν διαλύματα των πολυσακχαριτών συγκέντρωσης 0.5 mg/mL σε 0.2M Na₂HPO₄ pH 7.5. Πριν την ανάλυση όλα τα δείγματα διηθηθήκαν από φίλτρο μεμβράνης νάιλον μεγέθους πόρων 0.45 μm ώστε να απομακρυνθούν τυχόν αιωρούμενα σωματίδια.

Επιπλέον, παρασκευάστηκαν πρότυπα διαλύματα πουλουλανών διαφορετικού μοριακού βάρους συγκέντρωσης 0.5 mg/mL σε 0.2M Na₂HPO₄ pH 7.5, τα οποία υποβλήθηκαν σε χρωματογραφία αποκλεισμού μεγεθών υπό τις ίδιες συνθήκες διεξαγωγής με την ανάλυση των πολυσακχαριτών.

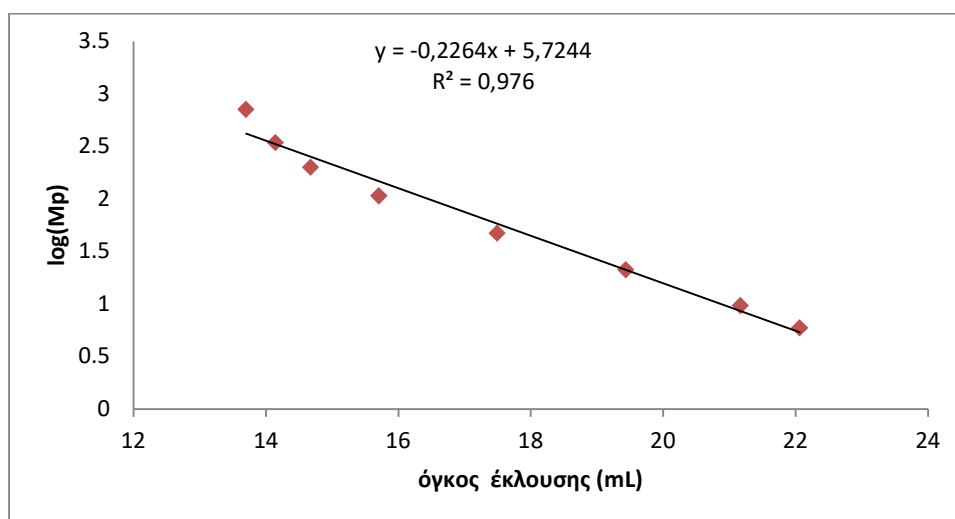
Πίνακας 3. Συνθήκες χρωματογραφικής ανάλυσης για τις απομονωμένες καρραγενάνες.

Συνθήκες χρωματογραφικής ανάλυσης	
Στήλη	GF-450 και GF-250
Διαλύτης έκλουσης	0.2M Na ₂ HPO ₄ pH 7.5
Θερμοκρασία	30 °C
Ροή διαλύτη	1.0 mL/min
Ένεση	100 μL
Ανιχνευτής	RI

Πίνακας 4. Πρότυπα διαλύματα πουλουλανών και χρόνοι έκλουσης τους.

Κωδικός	Μοριακό βάρος (Mp) ($\times 10^3$ Da)	Log(Mp)	Χρόνος έκλουσης (min)	Όγκος έκλουσης (mL)
P-5	5.9	0.771	22.063	22.063
P-10	9.6	0.982	21.166	21.166
P-20	21.1	1.324	19.435	19.435
P-50	47.1	1.673	17.491	17.491
P-100	107	2.029	15.705	15.705
P-200	200	2.301	14.673	14.673
P-400	344	2.537	14.141	14.141
P-800	708	2.850	13.7	13.7

Το μοριακό βάρος των απομονωμένων καρραγενανών προσδιορίστηκε μέσω της καμπύλης αναφοράς (Εικ. 26).



Εικόνα 26. Καμπύλη αναφοράς για τον προσδιορισμό του μοριακού βάρους των καρραγενανών.

Στην τεταγμένη τίθενται οι τιμές του λογαρίθμου του μοριακού βάρους των πρότυπων διαλυμάτων πουλουλανών και στην τετμημένη οι τιμές των όγκων έκλουσης των διαλυμάτων πουλουλανών (mL).

Μέσω της εξίσωσης $y = -0.2264x + 5.7244$ και δεδομένου ότι $1 \text{ min} = 1 \text{ mL}$ υπολογίστηκε ο λογάριθμος του μοριακού βάρους των απομονωμένων καρραγενανών και κατ' επέκταση το μοριακό τους βάρος.

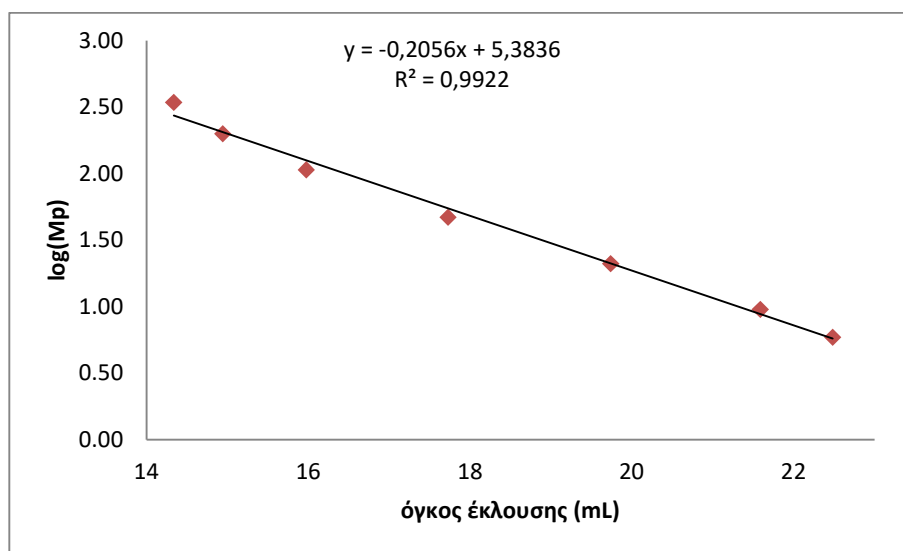
Πίνακας 5. Συνθήκες χρωματογραφικής ανάλυσης για τις απομονωμένες φουκοϊδάνες.

Συνθήκες χρωματογραφικής ανάλυσης	
Στήλη	GF-450 και GF-250
Διαλύτης έκλουσης	0.2M Na ₂ HPO ₄ pH 7.5
Θερμοκρασία	35 °C
Ροή διαλύτη	1.5 mL/min
Ένεση	200 µL
Ανιχνευτής	RI

Πίνακας 6. Πρότυπα διαλύματα πουλουλανών και χρόνοι έκλουσης τους.

Κωδικός	Μοριακό βάρος (Mp) (×10 ³ Da)	Log(Mp)	Χρόνος έκλουσης (min)	Όγκος έκλουσης (mL)
P-5	5.9	0.771	14.988	22.482
P-10	9.6	0.982	14.391	21.5865
P-20	21.1	1.324	13.159	19.7385
P-50	47.1	1.673	11.817	17.7255
P-100	107	2.029	10.65	15.975
P-200	200	2.301	9.96	14.94
P-400	344	2.537	9.556	14.334

Αντίστοιχα, το μοριακό βάρος των απομονωμένων φουκοϊδανών προσδιορίστηκε μέσω της καμπύλης αναφοράς (Εικ. 27).



Εικόνα 27. Καμπύλη αναφοράς για τον προσδιορισμό του μοριακού βάρους των φουκοϊδανών. Στην τεταγμένη τίθενται οι τιμές του λογαρίθμου του μοριακού βάρους των πρότυπων διαλυμάτων πουλουλανών και στην τετμημένη οι τιμές των όγκων έκλουσης των διαλυμάτων πουλουλανών (mL).

Μέσω της εξίσωσης $y = -0.2056x + 5.3836$ και δεδομένου ότι $1 \text{ min} = 1.5 \text{ mL}$ υπολογίστηκε ο λογάριθμος του μοριακού βάρους των απομονωμένων φουκοϊδανών και κατ' επέκταση το μοριακό τους βάρος.

2.6.2. Τροποποιημένοι πολυσακχαρίτες

Οι συνθήκες της χρωματογραφικής ανάλυσης των πολυσακχαριτών μετά την κατεργασία με υπέρηχους παρουσιάζονται στους Πίν. 7-10. Για το σκοπό αυτό, παρασκευάστηκαν υδατικά διαλύματα των πολυσακχαριτών συγκέντρωσης 0.5 mg/mL . Πριν την ανάλυση όλα τα δείγματα διηθηθήκαν από φίλτρο μεμβράνης νάilon μεγέθους πόρων $0.45 \mu\text{m}$.

Επιπλέον, παρασκευάστηκαν πρότυπα υδατικά διαλύματα πουλουλανών διαφορετικού μοριακού βάρους σε συγκέντρωση 0.5 mg/mL , τα οποία υποβλήθηκαν σε χρωματογραφία αποκλεισμού μεγεθών υπό τις ίδιες συνθήκες διεξαγωγής με την ανάλυση των πολυσακχαριτών.

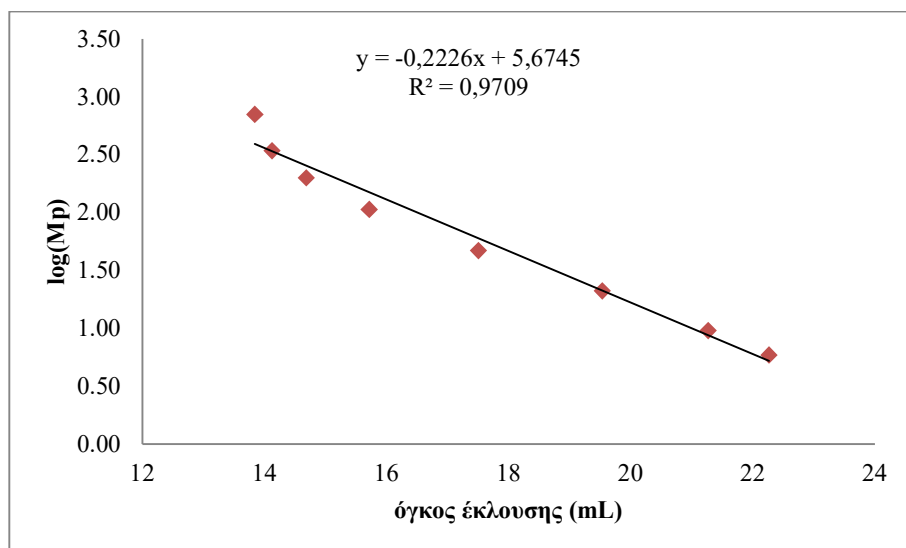
Πίνακας 7. Συνθήκες χρωματογραφικής ανάλυσης για τις τροποποιημένες καρραγενάνες.

Συνθήκες χρωματογραφικής ανάλυσης	
Στήλη	GF-450 και GF-250
Διαλύτης έκλουσης	$0.2\text{M Na}_2\text{HPO}_4$ pH 7.5
Θερμοκρασία	30°C
Ροή διαλύτη	1.0 mL/min
Ένεση	$100 \mu\text{L}$
Ανιχνευτής	RI

Πίνακας 8. Πρότυπα διαλύματα πουλουλανών και χρόνοι έκλουσης τους.

Κωδικός	Μοριακό βάρος (Mr) ($\times 10^3 \text{ Da}$)	Log(Mr)	Χρόνος έκλουσης (min)	Όγκος έκλουσης (mL)
P-5	5.9	0.771	22.239	22.239
P-10	9.6	0.982	21.267	21.267
P-20	21.1	1.324	19.519	19.519
P-50	47.1	1.673	17.511	17.511
P-100	107	2.029	15.72	15.72
P-200	200	2.301	14.696	14.696
P-400	344	2.537	14.121	14.121
P-800	708	2.850	13.834	13.834

Το μοριακό βάρος των τροποποιημένων καρραγενανών προσδιορίστηκε μέσω της καμπύλης αναφοράς (Εικ. 28).



Εικόνα 28. Καμπύλη αναφοράς για τον προσδιορισμό του μοριακού βάρους των καρραγενανών. Στην τεταγμένη τίθενται οι τιμές του λογαρίθμου του μοριακού βάρους (Mp) των πρότυπων διαλυμάτων πουλουλανών και στην τετμημένη οι τιμές των όγκων έκλουσης των πρότυπων διαλυμάτων πουλουλανών (mL).

Μέσω της εξίσωσης $y = -0.2226x + 5.6745$ και δεδομένου ότι $1 \text{ min} = 1 \text{ mL}$ υπολογίστηκε ο λογάριθμος του μοριακού βάρους των τροποποιημένων καρραγενανών και κατ' επέκταση το μοριακό τους βάρος.

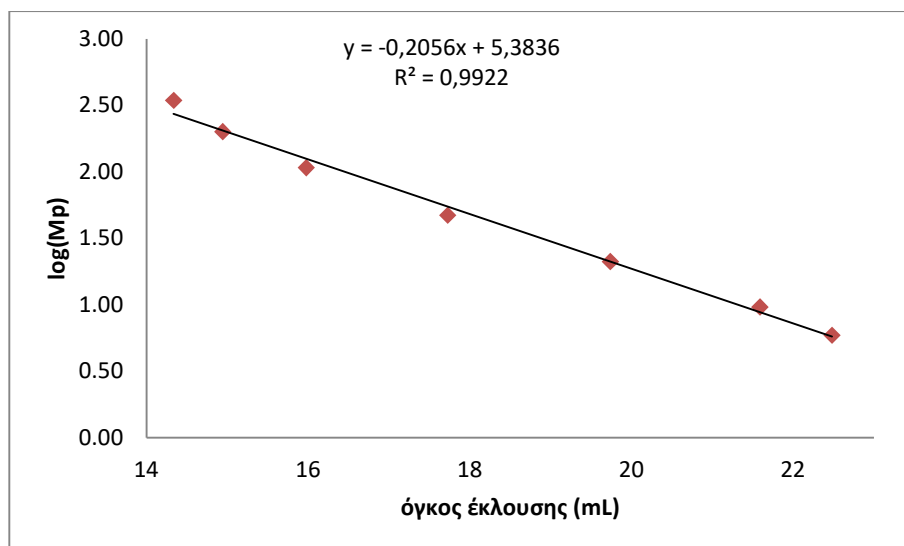
Πίνακας 9. Συνθήκες χρωματογραφικής ανάλυσης για τις τροποποιημένες ουλβάνες και φουκοϊδάνες.

Συνθήκες χρωματογραφικής ανάλυσης	
Στήλη	GF-450 και GF-250
Διαλύτης έκλουσης	0.2M Na ₂ HPO ₄ pH 7.5
Θερμοκρασία	35 °C
Ροή διαλύτη	1.5 mL/min
Ένεση	200 µL
Ανιχνευτής	RI

Πίνακας 10. Πρότυπα διαλύματα πουλουλανών και χρόνοι έκλουσης τους.

Κωδικός	Μοριακό βάρος (Mr) ($\times 10^3$ Da)	Log(Mr)	Χρόνος έκλουσης (min)	Όγκος έκλουσης (mL)
P-5	5.9	0.771	14.988	22.482
P-10	9.6	0.982	14.391	21.5865
P-20	21.1	1.324	13.159	19.7385
P-50	47.1	1.673	11.817	17.7255
P-100	107	2.029	10.65	15.975
P-200	200	2.301	9.96	14.94
P-400	344	2.537	9.556	14.334

Αντίστοιχα, το μοριακό βάρος των τροποποιημένων ουλβανών και φουκοϊδανών προσδιορίστηκε μέσω της καμπύλης αναφοράς (Εικ. 29).



Εικόνα 29. Καμπύλη αναφοράς για τον προσδιορισμό του μοριακού βάρους των ουλβανών και φουκοϊδανών. Στην τεταγμένη τίθενται οι τιμές του λογαρίθμου του μοριακού βάρους των πρότυπων διαλυμάτων πουλουλανών και στην τετμημένη οι τιμές των όγκων έκλουσης των πρότυπων διαλυμάτων πουλουλανών (mL).

Μέσω της εξίσωσης $y = -0.2056x + 5.3836$ και δεδομένου ότι $1 \text{ min} = 1.5 \text{ mL}$ υπολογίστηκε ο λογάριθμος του μοριακού βάρους των τροποποιημένων ουλβανών και φουκοϊδανών και κατ' επέκταση το μοριακό τους βάρος.

2.7. Προσδιορισμός θεικών ομάδων

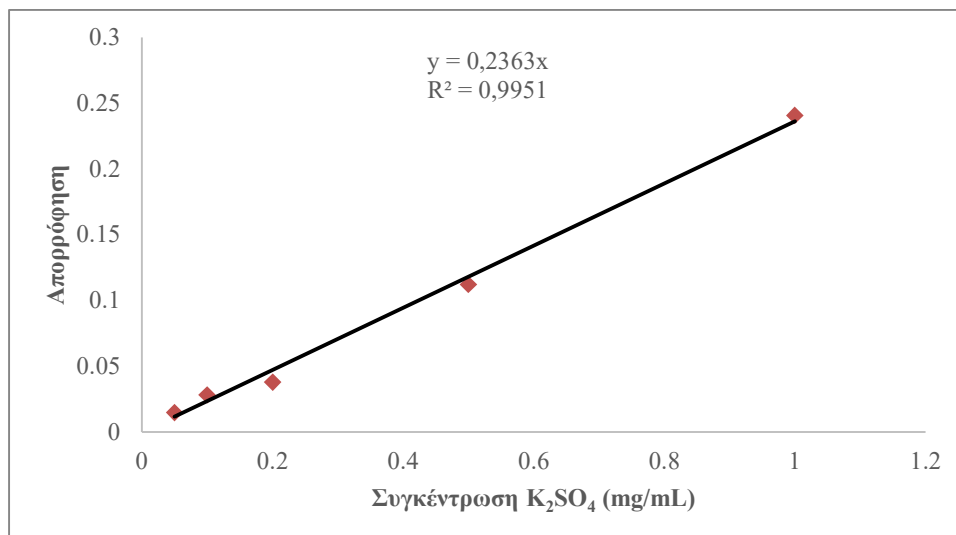
Το ποσοστό των θεικών ομάδων των απομονωμένων πολυσακχαριτών προσδιορίστηκε με την θολοσιμετρική μέθοδο υπό την μορφή BaSO_4 σε δείγματα πολυσακχαριτών τα οποία είχαν προηγουμένως υδρολυθεί (Dogson & Price, 1962).

Συγκεκριμένα, ποσότητα των πολυσακχαριτών προστέθηκε σε διάλυμα HCl 0.5N σε αναλογία 2.5 mg / 6 mL και ακολούθησε θέρμανση στους 100 °C υπό ανάδευση για 3.5 h. Έπειτα, τα δείγματα διηθήθηκαν από φίλτρο μεμβράνης πολυαιθερικής σουλφόνης (PES) μεγέθους πόρων 0.2 μm προκειμένου να απομακρυνθούν τυχόν αιωρούμενα σωματίδια.

Στην συνέχεια, 0.2 mL από το υδρολυμένο δείγμα μεταφέρθηκαν σε δοκιμαστικό σωλήνα και προστέθηκαν 3.8 mL CCl_3COOH (3% v/v) και 1 mL από το αντιδραστήριο BaCl_2 -ζελατίνη. Έπειτα από ανάμιξη και παραμονή για 15-20 min μετρήθηκε η απορρόφηση των διαλυμάτων στα 360 nm. Επιπλέον, ακολουθώντας την ίδια διαδικασία με παραπάνω, μετρήθηκε η απορρόφηση του τυφλού διαλύματος χρησιμοποιώντας 0.2 mL ddH_2O αντί για διάλυμα υδρολυμένου πολυσακχαρίτη. Προκειμένου να διαπιστωθεί εάν σχηματίστηκε κάποιο παραπροϊόν κατά την διαδικασία της υδρόλυσης, το οποίο εμφανίζει απορρόφηση στο ίδιο μήκος κύματος, πραγματοποιήθηκε μία ακόμη μέτρηση ακολουθώντας την ίδια διαδικασία με αυτή των δειγμάτων με την διαφορά ότι προστέθηκε διάλυμα ζελατίνης αντί για διάλυμα BaCl_2 -ζελατίνη. Οι τιμές αυτές αφαιρέθηκαν από τις απορροφήσεις των δειγμάτων.

Για την παρασκευή του αντιδραστηρίου BaCl_2 -ζελατίνη, προστέθηκε ζελατίνη (0.3 g) σε θερμό (60-70 °C) ddH_2O (60 mL) και, έπειτα από ανάδευση, το διάλυμα παρέμεινε για 16 h στους 4 °C. Στην συνέχεια, προστέθηκε BaCl_2 (0.353g $\text{BaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$) στο διάλυμα της ζελατίνης και το προκύπτον διάλυμα αφέθηκε υπό ανάδευση για τουλάχιστον 2-3 h. Το αντιδραστήριο ζελατίνης παρασκευάστηκε ακολουθώντας την ίδια διαδικασία χωρίς όμως την προσθήκη BaCl_2 .

Για την κατασκευή καμπύλης αναφοράς, με τη βοήθεια της οποίας προσδιορίστηκε το ποσοστό των θεικών ομάδων επί των πολυσακχαριτών (%), παρασκευάστηκαν πρότυπα υδατικά διαλύματα K_2SO_4 διαφορετικών συγκεντρώσεων (0.05, 0.1, 0.2, 0.5 και 1 mg/mL) και μετρήθηκε η απορρόφηση τους στα 360 nm ακολουθώντας την ίδια διαδικασία με αυτή των δειγμάτων (Εικ. 30).



Εικόνα 30. Καμπύλη αναφοράς για τον προσδιορισμό των θεικών ομάδων επί των πολυσακχαριτών. Στην τεταγμένη τίθενται οι τιμές των απορροφήσεων των πρότυπων διαλυμάτων K₂SO₄ στα 360 nm και στην τετμημένη οι τιμές των συγκεντρώσεων του K₂SO₄ (mg/mL).

Μέσω της εξίσωσης $y=0.2363x$ υπολογίστηκαν τα mg BaSO₄ ανά mL διαλύματος. Δεδομένου ότι 1 mL διαλύματος περιέχει 0.42 mg πολυσακχαρίτη υπολογίστηκαν τα mg θεικών ομάδων που αντιστοιχούν σε 100 mg πολυσακχαρίτη. Όλες οι αναλύσεις πραγματοποιήθηκαν εις τριπλούν για το κάθε υλικό και το ποσοστό των θεικών ομάδων εκφράζεται ως ο μέσος όρος των τριών μετρήσεων για κάθε δείγμα.

2.8. Προσδιορισμός ιξώδους

Μελετήθηκε το ιξώδες υδατικών διαλυμάτων διαφόρων δειγμάτων καρραγενανών που απομονώθηκαν, καθώς και πρότυπων δειγμάτων καρραγενανών, μετρώντας το κινηματικό ιξώδες διαλύματος σε θερμοκρασία δωματίου με ένα τριχοειδές ιξωδόμετρο Ubbelohde (Εικ. 31). Για τη μελέτη χρησιμοποιήθηκαν υδατικά διαλύματα καρραγενανών συγκέντρωσης 0.5% w/v και pH 9.



Εικόνα 31. Ιξωδόμετρο Ubbelohde για τον προσδιορισμό του κινηματικού ιξώδους.

Πιο συγκεκριμένα, αρχικά τοποθετήθηκαν 20 mL διαλύματος στο ιξωδόμετρο μέσω του σωλήνα εισόδου. Ακολούθως τοποθετήθηκε ένα πουάρ στο σωλήνα με το τριχοειδές, έκλεισε ο σωλήνας εξισορρόπησης πίεσης, και ακολούθησε αναρρόφηση του διαλύματος μέχρι ο μηνίσκος να φτάσει στον υποδοχέα υπερχειλίσης. Έπειτα, ελευθερώθηκαν οι σωλήνες εξισορρόπησης πίεσης και τριχοειδούς και μετρήθηκε ο χρόνος (sec) που χρειάζεται το διάλυμα για να διανύσει την απόσταση ανάμεσα στις δύο ενδείξεις που βρίσκονται πάνω και κάτω από τον υποδοχέα του προς μέτρηση υγρού. Το κινηματικό ιξώδες των καρραγενανών υπολογίστηκε πολλαπλασιάζοντας τον χρόνο εκροής (sec) του διαλύματος επί την σταθερά του ιξωδόμετρου $\kappa=0.05028$ cSt/sec.

2.9. Παρασκευή των πολυ-στρωματικών νανοϊνωδών μεμβρανών

Για την σύνθεση των μεμβρανών κατευθυνόμενης ιστικής αναγέννησης αναπτύχθηκαν πέντε διαφορετικές μεμβράνες, δύο εκ των οποίων ήταν τριών στρωμάτων (GTR1, GTR2) και τρεις ήταν δύο στρωμάτων (GTR3, GTR4, GTR5).

Σε όλες τις περιπτώσεις το εξωτερικό στρώμα των μεμβρανών αποτελούταν από

ένα χυτό φιλμ πολυκαπρολακτόνης (PCL). Στην περίπτωση των τρι-στρωματικών μεμβρανών GTR1 και GTR2, το μεσαίο στρώμα αποτελούταν από ηλεκτροϊονοποιημένες νανοΐνες μετ' ασβεστίου άλατος πολυ(L-γλουταμικού οξέος) (PG-Ca), ενώ το εσωτερικό στρώμα αποτελούταν από ηλεκτροϊονοποιημένες νανοΐνες μετ' ασβεστίου ή μετά νατρίου αλάτων καρραγενανών (CG-Ca ή CG-Na). Για την ηλεκτροϊονοποίηση του PG-Ca και των CG-Ca ή CG-Na χρησιμοποιήθηκε το πολυαιθυλενοξείδιο (PEO) ως υδρόφιλος πολυμερικός φορέας προκειμένου να ενισχυθεί η δυνατότητα ηλεκτροϊονοποίησης τους σε μη υφασμένες μεμβράνες. Για την παρασκευή του μεσαίου στρώματος πραγματοποιήθηκε συν-ηλεκτροϊονοποίηση του PG-Ca με την PCL προκειμένου εξασφαλισθεί η σταθερή συνοχή με το χυτό εξωτερικό στρώμα και να ενισχυθεί η σταθερότητα των νανοϊνών σε υδατικό περιβάλλον.

Στην περίπτωση των δι-στρωματικών μεμβρανών GTR3, GTR4, και GTR5, το εσωτερικό στρώμα αποτελούταν από ηλεκτροϊονοποιημένες νανοΐνες CG-Ca / PG-Ca ή μόνο CG-Ca ή μόνο PG-Ca, αντίστοιχα. Για την ηλεκτροϊονοποίηση του PG-Ca και του CG-Ca, όπως και του συνδυασμού αυτών, χρησιμοποιήθηκε το PEO ως υδρόφιλος πολυμερικός φορέας προκειμένου να ενισχυθεί η δυνατότητα ηλεκτροϊονοποίησής τους σε μη υφασμένες μεμβράνες, ενώ πραγματοποιήθηκε συν-ηλεκτροϊονοποίηση τους με την PCL προκειμένου εξασφαλισθεί η σταθερή συνοχή με το χυτό εξωτερικό στρώμα και να ενισχυθεί η σταθερότητα των νανοϊνών σε υδατικό περιβάλλον (Πίν. 11).

Πίνακας 11. Σύσταση των μεμβρανών που παρασκευάστηκαν.

Κωδικός	Σύσταση νανοϊνωδών μεμβρανών		
GTR0	PCL		
GTR1	PCL (εξωτερικό στρώμα)	PG-Ca/PEO, PCL (μεσαίο στρώμα)	CG-Ca/PEO (εσωτερικό στρώμα)
GTR2	PCL (εξωτερικό στρώμα)	PG-Ca/PEO, PCL (μεσαίο στρώμα)	CG-Na/PEO (εσωτερικό στρώμα)
GTR3	PCL (εξωτερικό στρώμα)	-	CG-Ca/ PG-Ca/PEO, PCL (εσωτερικό στρώμα)
GTR4	PCL (εξωτερικό στρώμα)	-	CG-Ca/ PEO, PCL (εσωτερικό στρώμα)
GTR5	PCL (εξωτερικό στρώμα)	-	PG-Ca/PEO, PCL (εσωτερικό στρώμα)

PCL: πολυκαπρολακτόνη, PG-Ca: μετ' ασβεστίου άλας πολυ(L-γλουταμικού οξέος), PEO: πολυαιθυλενοξείδιο, CG-Ca: μετ' ασβεστίου άλας καρραγενανών, CG-Na: μετά νατρίου άλας καρραγενανών.

2.9.1. Παρασκευή εξωτερικού στρώματος

Για την παρασκευή του εξωτερικού στρώματος ακολουθήθηκε η διαδικασία χύτευσης με διαλύτη έτσι ώστε να δημιουργηθεί μία χυτή μεμβράνη στην επιφάνεια ενός περιστρεφόμενου κυλίνδρου. Για το σκοπό αυτό, παρασκευάστηκε διάλυμα PCL (MW 80,000) έπειτα από προσθήκη του πολυμερούς σε συγκέντρωση 8% w/v σε βενζόλιο (300 mL) και ανάδευση για 48 h σε θερμοκρασία δωματίου με σκοπό την πλήρη διαλυτοποίηση του πολυμερούς και την εξασφάλιση της ομοιογένειας του διαλύματος. Στην συνέχεια, και κατόπιν μεταφοράς κατάλληλου όγκου του διαλύματος PCL σε έναν ειδικά διαμορφωμένο για τις ανάγκες του πειράματος περιέκτη, ο περιστρεφόμενος κυλινδρικός συλλέκτης (τύμπανο) RC-6000 (NaBondTechnologies) εμβάπτιστηκε στο πολυμερικό διάλυμα και αφέθηκε να περιστραφεί έως ότου ολόκληρη η επιφάνεια του κυλίνδρου καλυφθεί από το διάλυμα πολυμερούς (Εικ. 32α). Ακολούθησε απομάκρυνση του περιέκτη που περιείχε το διάλυμα PCL και ο κύλινδρος αφέθηκε να περιστραφεί στον αέρα μέχρι την πλήρη εξάτμιση του διαλύτη και το σχηματισμό μιας λεπτής μεμβράνης στην επιφάνειά του (Εικ. 32β). Η μεμβράνη αυτή (Εικ. 32γ), εκτός από εξωτερικό στρώμα των μεμβρανών, λειτούργησε και ως δείγμα αναφοράς (GTR0) για τις διάφορες αναλύσεις που ακολούθησαν.



Εικόνα 32. (α) Εμβάπτιση περιστρεφόμενου κυλίνδρου στο διάλυμα της PCL, (β) χυτή μεμβράνη PCL στην επιφάνεια του περιστρεφόμενου κυλίνδρου, (γ) χυτή μεμβράνη PCL (GTR0).

2.9.2. Προετοιμασία διαλυμάτων ηλεκτροϋνοποίησης

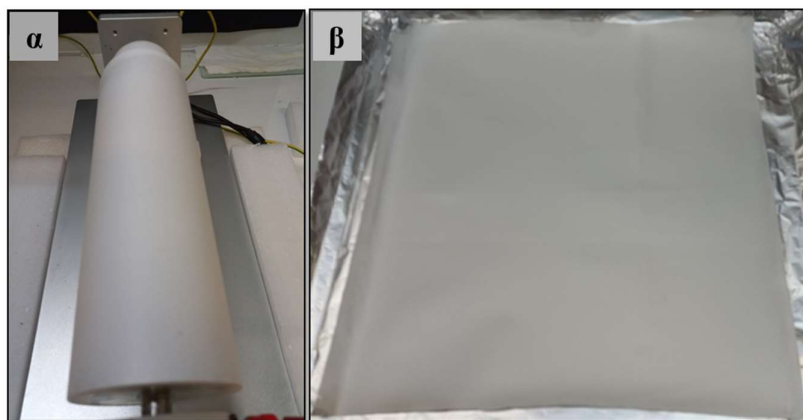
Όλα τα διαλύματα ηλεκτροϋνοποίησης παρασκευάστηκαν υπό συνεχή ανάδευση για 24 h ώστε να διασφαλιστεί η ομοιογένειά τους. Το διάλυμα της PCL παρασκευάστηκε σε θερμοκρασία δωματίου, ενώ όλα τα υδατικά διαλύματα

παρασκευάστηκαν υπό θέρμανση στους 60 °C μέχρι πλήρους διαλυτοποίησης των πολυμερικών υλικών.

Συγκεκριμένα, το διάλυμα CG-Ca/PEO παρασκευάστηκε έπειτα από προσθήκη του CG-Ca σε συγκέντρωση 1% w/v και του PEO (MW 900,000) σε συγκέντρωση 4% w/v σε 5 mL dH₂O. Αντίστοιχα, το διάλυμα CG-Na/PEO παρασκευάστηκε έπειτα από προσθήκη CG-Na σε συγκέντρωση 1% w/v και του PEO (MW 900,000) σε συγκέντρωση 4% w/v σε 5 mL dH₂O. Το διάλυμα PG-Ca/PEO παρασκευάστηκε έπειτα από προσθήκη του PG-Ca σε συγκέντρωση 4% w/v και του PEO (MW 7,000,000) σε συγκέντρωση 4% w/v σε 5 mL dH₂O. Το διάλυμα CG-Ca/PG-Ca/PEO παρασκευάστηκε έπειτα από προσθήκη του CG-Ca σε συγκέντρωση 1% w/v, του PG-Ca σε συγκέντρωση 4% w/v και του PEO (MW 7,000,000) σε συγκέντρωση 4% w/v σε 5 mL dH₂O. Το διάλυμα της PCL παρασκευάστηκε έπειτα από προσθήκη του πολυμερούς σε συγκέντρωση 10% w/v σε 2.7 mL DCM/DMF 8:2 v/v.

2.9.3. Συνθήκες ηλεκτροϊνοποίησης

Για την παρασκευή του μεσαίου στρώματος των μεμβρανών τριών στρωμάτων GTR1 και GTR2, η ηλεκτροϊνοποίηση πραγματοποιήθηκε στην επιφάνεια του εξωτερικού στρώματος (χυτή μεμβράνη PCL) (Εικ. 33). Για να παρασκευασθεί το μεσαίο στρώμα, πραγματοποιήθηκε συν-ηλεκτροϊνοποίηση των διαλυμάτων ηλεκτροϊνοποίησης PG-Ca/PEO και PCL σε μια αντιπαράλληλη διάταξη με τις σύριγγες τοποθετημένες σε δύο οριζόντια και αντίθετα τοποθετημένες προγραμματιζόμενες αντλίες έγχυσης ώστε να διασφαλιστεί η ομοιογένεια των αναμειγμένων πολυμερικών ινών. Για να εξασφαλιστεί η συνοχή μεταξύ των εναποτιθέμενων ινών και της χυτής μεμβράνης, αρχικά πραγματοποιήθηκε ξεχωριστά η ηλεκτροϊνοποίηση ενός μικρού όγκου (0.2 mL) του διαλύματος ηλεκτροϊνοποίησης PCL και ακολούθως πραγματοποιήθηκε η συν-ηλεκτροϊνοποίηση των διαλυμάτων ηλεκτροϊνοποίησης. Για την παρασκευή του εσωτερικού στρώματος των μεμβρανών τριών στρωμάτων GTR1 και GTR2, η ηλεκτροϊνοποίηση των διαλυμάτων ηλεκτροϊνοποίησης CG-Ca/PEO και CG-Na/PEO αντίστοιχα, πραγματοποιήθηκε στην επιφάνεια του μεσαίου στρώματος.



Εικόνα 33. (α) Ηλεκτροϋνοποιημένες νανοΐνες στην επιφάνεια του περιστρεφόμενου συλλέκτη (β) Πολυστρωματική μεμβράνη GTR.

Για την παρασκευή των μεμβρανών δύο στρωμάτων GTR3, GTR4 και GTR5, η ηλεκτροϋνοποίηση των επιθυμητών πολυμερικών διαλυμάτων πραγματοποιήθηκε στην επιφάνεια του εξωτερικού στρώματος (χυτή μεμβράνη PCL). Για να παρασκευασθεί το εσωτερικό στρώμα, η ηλεκτροϋνοποίηση των διαλυμάτων CG-Ca/PG-Ca/PEO (GTR3), CG-Ca/PEO (GTR4) ή PG-Ca/PEO (GTR5) πραγματοποιήθηκε ταυτόχρονα με την ηλεκτροϋνοποίηση του διαλύματος PCL σε μια αντιπαράλληλη διάταξη με τις σύριγγες τοποθετημένες σε δύο οριζόντια και αντίθετα τοποθετημένες προγραμματιζόμενες αντλίες έγχυσης ώστε να διασφαλιστεί η ομοιογένεια των αναμεμιγμένων πολυμερικών ινών. Για να εξασφαλιστεί η συνοχή μεταξύ των εναποτιθέμενων ινών και της χυτής μεμβράνης, αρχικά πραγματοποιήθηκε ξεχωριστά η ηλεκτροϋνοποίηση ενός μικρού όγκου (0.2 mL) του διαλύματος ηλεκτροϋνοποίησης PCL και ακολούθως πραγματοποιήθηκε η συν-ηλεκτροϋνοποίηση των διαλυμάτων ηλεκτροϋνοποίησης.

Οι συνθήκες ηλεκτροϋνοποίησης για το κάθε πολυμερικό διάλυμα αναφέρονται στους Πίν. 12-16.

Πίνακας 12. Συνθήκες ηλεκτροϋינוποίησης του μεσαίου και του εσωτερικού στρώματος της τρι-στρωματικής μεμβράνης GTR1.

Συνθήκες ηλεκτροϋינוποίησης μεσαίου στρώματος	
Εφαρμοζόμενη τάση (kV)	27
Ταχύτητα ροής PG-Ca/PEO (mL/h)	5
Απόσταση από τον συλλέκτη PG-Ca/PEO (cm)	27
Ταχύτητα ροής PCL (mL/h)	2.5
Απόσταση από τον συλλέκτη PCL (cm)	16
Ταχύτητα περιστροφής (rpm)	400
Συνθήκες ηλεκτροϋינוποίησης εσωτερικού στρώματος	
Εφαρμοζόμενη τάση (kV)	27
Ταχύτητα ροής CG-Ca/PEO (mL/h)	3
Απόσταση από τον συλλέκτη CG-Ca/PEO (cm)	30
Ταχύτητα περιστροφής (rpm)	400

Πίνακας 13. Συνθήκες ηλεκτροϋינוποίησης του μεσαίου και του εσωτερικού στρώματος της τρι-στρωματικής μεμβράνης GTR2.

Συνθήκες ηλεκτροϋינוποίησης μεσαίου στρώματος	
Εφαρμοζόμενη τάση (kV)	27
Ταχύτητα ροής PG-Ca/PEO (mL/h)	5
Απόσταση από τον συλλέκτη PG-Ca/PEO (cm)	27
Ταχύτητα ροής PCL (mL/h)	2.5
Απόσταση από τον συλλέκτη PCL (cm)	16
Ταχύτητα περιστροφής (rpm)	400
Συνθήκες ηλεκτροϋינוποίησης εσωτερικού στρώματος	
Εφαρμοζόμενη τάση (kV)	27
Ταχύτητα ροής CG-Na/PEO (mL/h)	3
Απόσταση από τον συλλέκτη CG-Na/PEO (cm)	30
Ταχύτητα περιστροφής (rpm)	400

Πίνακας 14. Συνθήκες ηλεκτροϋינוποίησης του εσωτερικού στρώματος της δι-στρωματικής μεμβράνης GTR3.

Εφαρμοζόμενη τάση (kV)	27
Ταχύτητα ροής CG-Ca/ PG-Ca/ PEO (mL/h)	5
Απόσταση από τον συλλέκτη CG-Ca/ PG-Ca/ PEO (cm)	27
Ταχύτητα ροής PCL (mL/h)	2.5
Απόσταση από τον συλλέκτη PCL (cm)	16
Ταχύτητα περιστροφής (rpm)	400

Πίνακας 15. Συνθήκες ηλεκτροϋינוποίησης του εσωτερικού στρώματος της δι-στρωματικής μεμβράνης GTR4.

Εφαρμοζόμενη τάση (kV)	27
Ταχύτητα ροής CG-Ca/PEO (mL/h)	3
Απόσταση από τον συλλέκτη CG-Ca/PEO (cm)	26
Ταχύτητα ροής PCL (mL/h)	1.5
Απόσταση από τον συλλέκτη PCL (cm)	16
Ταχύτητα περιστροφής (rpm)	400

Πίνακας 16. Συνθήκες ηλεκτροϋינוποίησης του εσωτερικού στρώματος της δι-στρωματικής μεμβράνης GTR5.

Εφαρμοζόμενη τάση (kV)	27
Ταχύτητα ροής PG-Ca/PEO (mL/h)	5
Απόσταση από τον συλλέκτη PG-Ca/PEO (cm)	27
Ταχύτητα ροής PCL (mL/h)	2.5
Απόσταση από τον συλλέκτη PCL (cm)	16
Ταχύτητα περιστροφής (rpm)	400

2.10. Χαρακτηρισμός των πολυ-στρωματικών νανοϊνωδών μεμβρανών

Ο μορφολογικός χαρακτηρισμός των παρασκευασθεισών μεμβρανών πραγματοποιήθηκε με ηλεκτρονική μικροσκοπία σάρωσης (SEM) μετά από επικάλυψη των δειγμάτων με ένα αγώγιμο στρώμα χρυσού. Χρησιμοποιώντας το ενσωματωμένο λογισμικό ανάλυσης εικόνας μετρήθηκαν οι διάμετροι 100 ινών από κάθε εικόνα SEM και προσδιορίστηκαν οι μέσοι διάμετροι των ινών. Επιπλέον, ελέγχθηκε η χημική σύσταση των μεμβρανών με φασματοσκοπία υπερύθρου (FT-IR) και η θερμική σταθερότητα τους με θερμοσταθμική ανάλυση (TGA).

2.11. Προσδιορισμός του ρυθμού αποικοδόμησης των πολυ-στρωματικών νανοϊνωδών μεμβρανών

Προκειμένου να προσδιοριστεί ο ρυθμός αποικοδόμησης των μεμβρανών, οι μεμβράνες κόπηκαν σε τεμάχια (βάρους περίπου 40 mg), ζυγίστηκαν προς την καταγραφή του αρχικού τους βάρους ($W_{m, αρχ.}$), και αποστειρώθηκαν υπό την επίδραση ακτινοβολίας UV για χρονικό διάστημα 10 min για κάθε πλευρά. Κατόπιν, μεταφέρθηκαν σε φιαλίδια, εμβαπτίστηκαν σε διάλυμα προσομοίωσης σιέλου (pH 7.2) σε συγκέντρωση 10 mg/mL (Εικ. 34) και μεταφέρθηκαν σε κλίβανο όπου και

διατηρήθηκαν σε σταθερή θερμοκρασία 37 °C για το απαραίτητο κάθε φορά χρονικό διάστημα της μελέτης. Σε προκαθορισμένα χρονικά διαστήματα της μελέτης (1^η, 7^η, 14^η, 21^η και 28^η ημέρα) οι μεμβράνες αφαιρέθηκαν από τα φιαλίδια, μεταφέρθηκαν σε κλίβανο και αφέθηκαν προς ξήρανση υπό κενό για 24 h σε θερμοκρασία δωματίου. Στη συνέχεια ζυγίστηκαν ώστε να καταγραφεί το τελικό τους βάρος ($W_{m_{τελ.}}$), ενώ παράλληλα μετρήθηκε το pH των διαλυμάτων στα οποία είχαν εμβαπτιστεί. Οι μετρήσεις πραγματοποιήθηκαν σε τέσσερις επαναλήψεις για το κάθε υλικό.



Εικόνα 34. Δείγματα προς ανάλυση.

Η εκατοστιαία απώλεια βάρους των μεμβρανών σε κάθε χρονική στιγμή υπολογίστηκε από την εξίσωση:

$$\% \text{ απώλεια βάρους μεμβράνης} = \frac{W_{m_{αρχ.}} - W_{m_{τελ.}}}{W_{m_{αρχ.}}} \times 100$$

Προκειμένου να προσδιοριστεί η απώλεια βάρους του ναοϊνώδους πλέγματος κάθε μεμβράνης σε κάθε χρονική στιγμή, στο τέλος του πειράματος αποικοδόμησης οι μεμβράνες ξεπλύθηκαν με νερό ώστε να αφαιρεθούν οι παραμένουσες ίνες από το εξωτερικό στρώμα και αφού ξηράνθηκαν καταγράφηκε το βάρος τους (W_{cf}). Το αρχικό βάρος των ναοϊνών ($W_{f_{αρχ.}}$) κάθε δείγματος προσδιορίστηκε από την εξίσωση:

$$W_{f_{αρχ.}} = W_{m_{αρχ.}} - W_{cf}$$

Αντίστοιχα, το τελικό βάρος των ναοϊνών ($W_{f_{τελ.}}$) κάθε δείγματος προσδιορίστηκε από την εξίσωση:

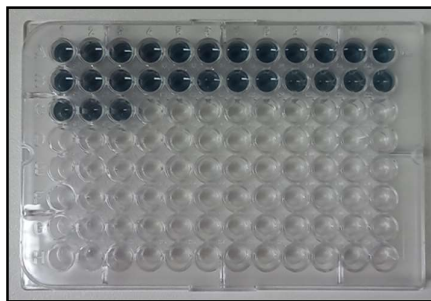
$$W_{f_{τελ.}} = W_{m_{τελ.}} - W_{cf}$$

Η εκατοστιαία απώλεια βάρους των νανοϊνών κάθε δείγματος σε κάθε χρονική στιγμή προσδιορίστηκε από την εξίσωση:

$$\% \text{ απώλεια βάρους νανοϊνών} = \frac{W_{f_{\text{αρχ.}}} - W_{f_{\text{τελ.}}}}{W_{f_{\text{αρχ.}}}} \times 100$$

2.12. Προσδιορισμός του ρυθμού αποδέσμευσης των ιόντων ασβεστίου

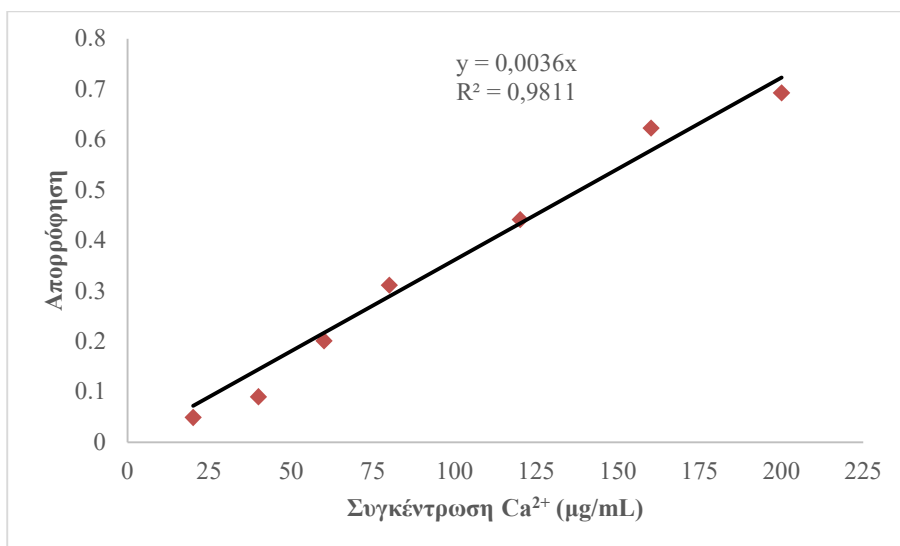
Προκειμένου να προσδιοριστεί ο ρυθμός αποδέσμευσης των ιόντων ασβεστίου από τις παρασκευασθείσες μεμβράνες, οι μεμβράνες κόπηκαν σε τεμάχια (βάρους περίπου 40 mg) και αποστειρώθηκαν υπό την επίδραση ακτινοβολίας UV για χρονικό διάστημα 10 min (για κάθε πλευρά). Κατόπιν, μεταφέρθηκαν σε φιαλίδια, εμβαπτίστηκαν σε διάλυμα προσομοίωσης σιέλου (pH 7.2) σε συγκέντρωση 10 mg/mL και μεταφέρθηκαν σε κλίβανο όπου και διατηρήθηκαν σε σταθερή θερμοκρασία 37 °C για το απαραίτητο κάθε φορά χρονικό διάστημα της μελέτης. Στα προκαθορισμένα χρονικά διαστήματα της μελέτης (1^η, 2^η, 7^η και 21^η ημέρα) οι μεμβράνες αφαιρέθηκαν από τα φιαλίδια ώστε να μετρηθεί η συγκέντρωση των ελεύθερων ιόντων ασβεστίου στο διάλυμα όπου είχαν εμβαπτιστεί μέσω κατάλληλου κιτ μέτρησης ασβεστίου. Για τον προσδιορισμό των ιόντων ασβεστίου μεταφέρθηκαν 5 μL από κάθε δείγμα σε πλάκα 96 φρεατίων, προστέθηκαν 200 μL αντιδραστηρίου (μείγμα αντιδραστηρίου A και B, 1:1) και ύστερα από 3 min μετρήθηκε η απορρόφηση στα 612 nm (Εικ. 35). Επιπλέον, σε κάθε χρονική στιγμή μετρήθηκε η απορρόφηση του διαλύματος προσομοίωσης σιέλου (τυφλό διάλυμα), η οποία αφαιρέθηκε από την απορρόφηση των δειγμάτων.



Εικόνα 35. Δείγματα προς ανάλυση σε πλάκα 96 φρεατίων μετά την προσθήκη του αντιδραστηρίου για την μέτρηση των ιόντων ασβεστίου.

Για τον προσδιορισμό της συγκέντρωσης των ιόντων ασβεστίου σε κάθε δείγμα, παρασκευάστηκαν πρότυπα διαλύματα ασβεστίου σε ddH₂O διαφορετικών

συγκεντρώσεων (20, 40, 60, 80, 120, 160 και 200 $\mu\text{g Ca}^{2+} / \text{mL}$), χρησιμοποιώντας το πρότυπο διάλυμα ασβεστίου που περιλαμβάνεται στο κιτ μέτρησης ασβεστίου, τα οποία υποβλήθηκαν στην ίδια διαδικασία με παραπάνω. Ο ρυθμός αποδέσμευσης των ιόντων ασβεστίου από τις παρασκευασθείσες μεμβράνες προσδιορίστηκε μέσω της καμπύλης αναφοράς (Εικ. 36).



Εικόνα 36. Καμπύλη αναφοράς για τον προσδιορισμό των ιόντων Ca^{2+} στα δείγματα. Στην τεταγμένη τίθενται οι τιμές των απορροφήσεων των πρότυπων διαλυμάτων ιόντων Ca^{2+} στα 612 nm και στην τετμημένη οι τιμές των συγκεντρώσεων των ιόντων Ca^{2+} ($\mu\text{g/mL}$).

Μέσω της εξίσωσης $y=0.0036x$ υπολογίστηκε η ποσότητα των ιόντων ασβεστίου ($\mu\text{g/mL}$) που απελευθερώνεται στο διάλυμα προσομοίωσης σιέλου σε κάθε χρονική στιγμή. Όλες οι αναλύσεις πραγματοποιήθηκαν τέσσερις φορές για το κάθε υλικό και η ποσότητα των ιόντων ασβεστίου εκφράζεται ως ο μέσος όρος των τεσσάρων μετρήσεων για κάθε δείγμα.

2.13. Ενσωμάτωση μετρονιδαζόλης στο μεσαίο και/ή στο εσωτερικό στρώμα των πολυ-στρωματικών μεμβρανών

Για την ενσωμάτωση της μετρονιδαζόλης (MET) στα νανοϊνώδη στρώματα των μεμβρανών κατευθυνόμενης ιστικής αναγέννησης αναπτύχθηκαν οι ίδιοι συνδυασμοί νανοϊνώδων μεμβρανών όπως ανωτέρω, στις νανοϊνες των οποίων ενσωματώθηκε η μετρονιδαζόλη σε συγκέντρωση 10% (w/w) ως προς τα βάρη των ηλεκτροϊνοποιημένων πολυμερών, με τα 2/3 της συνολικής ποσότητας της

κατανεμημένα στις υδρόφοβες πολυμερικές ίνες και το 1/3 στις υδρόφιλες πολυμερικές ίνες.

Όλα τα διαλύματα ηλεκτροϊονοποίησης παρασκευάστηκαν όπως ανωτέρω (βλ. 2.9.2), με μόνη διαφορά ότι το διάλυμα της PCL παρασκευάστηκε σε DCM/DMF 6:4 v/v. Σε όλα τα διαλύματα ηλεκτροϊονοποίησης προστέθηκε η μετρονιδαζόλη στις συγκεντρώσεις (% w/v) που αναγράφονται στους Πίν. 17-21 ώστε να προκύψει τελική συγκέντρωση μετρονιδαζόλης 10% w/w ως προς τα βάρη των πολυμερών των νανοϊνών σε κάθε μεμβράνη.

Πίνακας 17. Συγκέντρωση μετρονιδαζόλης (% w/v) στα πολυμερικά διαλύματα ηλεκτροϊονοποίησης για την σύνθεση της μεμβράνης GTR1-MET.

Πολυμερικό διάλυμα	Συγκέντρωση MET (% w/v)
CG-Ca/PEO	0.24
PG-Ca/PEO	0.38
PCL	2.27

Πίνακας 18. Συγκέντρωση μετρονιδαζόλης (% w/v) στα πολυμερικά διαλύματα ηλεκτροϊονοποίησης για την σύνθεση της μεμβράνης GTR2-MET.

Πολυμερικό διάλυμα	Συγκέντρωση MET (% w/v)
CG-Na/PEO	0.24
PG-Ca/PEO	0.38
PCL	2.27

Πίνακας 19. Συγκέντρωση μετρονιδαζόλης (% w/v) στα πολυμερικά διαλύματα ηλεκτροϊονοποίησης για την σύνθεση της μεμβράνης GTR3-MET.

Πολυμερικό διάλυμα	Συγκέντρωση MET (% w/v)
CG-Ca/PG-Ca/PEO	0.48
PCL	1.78

Πίνακας 20. Συγκέντρωση μετρονιδαζόλης (% w/v) στα πολυμερικά διαλύματα ηλεκτροϊονοποίησης για την σύνθεση της μεμβράνης GTR4-MET.

Πολυμερικό διάλυμα	Συγκέντρωση MET (% w/v)
CG-Ca/ PEO	0.35
PCL	1.28

Πίνακας 21. Συγκέντρωση μετρονιδαζόλης (% w/v) στα πολυμερικά διαλύματα ηλεκτροϊονοποίησης για την σύνθεση της μεμβράνης GTR5-MET.

Πολυμερικό διάλυμα	Συγκέντρωση MET (% w/v)
PG-Ca/ PEO	0.45
PCL	1.65

Οι συνθήκες ηλεκτροϊονοποίησης για το κάθε πολυμερικό διάλυμα αναφέρονται στους Πίν. 22-26. Για την παρασκευή των μεμβρανών τριών ή δύο στρωμάτων ακολουθήθηκε αντίστοιχη διαδικασία με την διαδικασία παρασκευής των μεμβρανών GTR1, GTR2, GTR3, GTR4, και GTR5 (βλ. 2.9.3).

Πίνακας 22. Συνθήκες ηλεκτροϊονοποίησης της τρι-στρωματικής μεμβράνης GTR1-MET.

Συνθήκες ηλεκτροϊονοποίησης μεσαίου στρώματος	
Εφαρμοζόμενη τάση (kV)	27
Ταχύτητα ροής PG-Ca/PEO/MET (mL/h)	5
Απόσταση από τον συλλέκτη PG-Ca/PEO/MET (cm)	28
Ταχύτητα ροής PCL/MET (mL/h)	2.5
Απόσταση από τον συλλέκτη PCL/MET (cm)	18
Ταχύτητα περιστροφής (rpm)	400
Συνθήκες ηλεκτροϊονοποίησης εσωτερικού στρώματος	
Εφαρμοζόμενη τάση (kV)	27
Ταχύτητα ροής CG-Ca/PEO/MET (mL/h)	2
Απόσταση από τον συλλέκτη CG-Ca/PEO/MET (cm)	33
Ταχύτητα περιστροφής (rpm)	400

Πίνακας 23. Συνθήκες ηλεκτροϊονοποίησης τρι-στρωματικής μεμβράνης GTR2-MET.

Συνθήκες ηλεκτροϊονοποίησης μεσαίου στρώματος	
Εφαρμοζόμενη τάση (kV)	27
Ταχύτητα ροής PG-Ca/PEO/MET (mL/h)	5
Απόσταση από τον συλλέκτη PG-Ca/PEO/MET (cm)	26
Ταχύτητα ροής PCL/MET (mL/h)	2.5
Απόσταση από τον συλλέκτη PCL/MET (cm)	18
Ταχύτητα περιστροφής (rpm)	400
Συνθήκες ηλεκτροϊονοποίησης εσωτερικού στρώματος	
Εφαρμοζόμενη τάση (kV)	27
Ταχύτητα ροής CG-Na/PEO/MET (mL/h)	2
Απόσταση από τον συλλέκτη CG-Na/PEO/MET (cm)	33
Ταχύτητα περιστροφής (rpm)	400

Πίνακας 24. Συνθήκες ηλεκτροϊνοποίησης της δι-στρωματικής μεμβράνης GTR3-MET.

Εφαρμοζόμενη τάση (kV)	27
Ταχύτητα ροής CG-Ca/PG-Ca/PEO/MET (mL/h)	3
Απόσταση από τον συλλέκτη CG-Ca/PG-Ca/PEO/MET (cm)	27
Ταχύτητα ροής PCL/MET (mL/h)	1.5
Απόσταση από τον συλλέκτη PCL/MET (cm)	18
Ταχύτητα περιστροφής (rpm)	400

Πίνακας 25. Συνθήκες ηλεκτροϊνοποίησης δι-στρωματικής μεμβράνης GTR4-MET.

Εφαρμοζόμενη τάση (kV)	27
Ταχύτητα ροής CG-Ca/PEO/MET (mL/h)	2.0
Απόσταση από τον συλλέκτη CG-Ca/PEO/MET (cm)	33
Ταχύτητα ροής PCL/MET (mL/h)	1.0
Απόσταση από τον συλλέκτη PCL/MET (cm)	18
Ταχύτητα περιστροφής (rpm)	400

Πίνακας 26. Συνθήκες ηλεκτροϊνοποίησης της δι-στρωματικής μεμβράνης GTR5-MET.

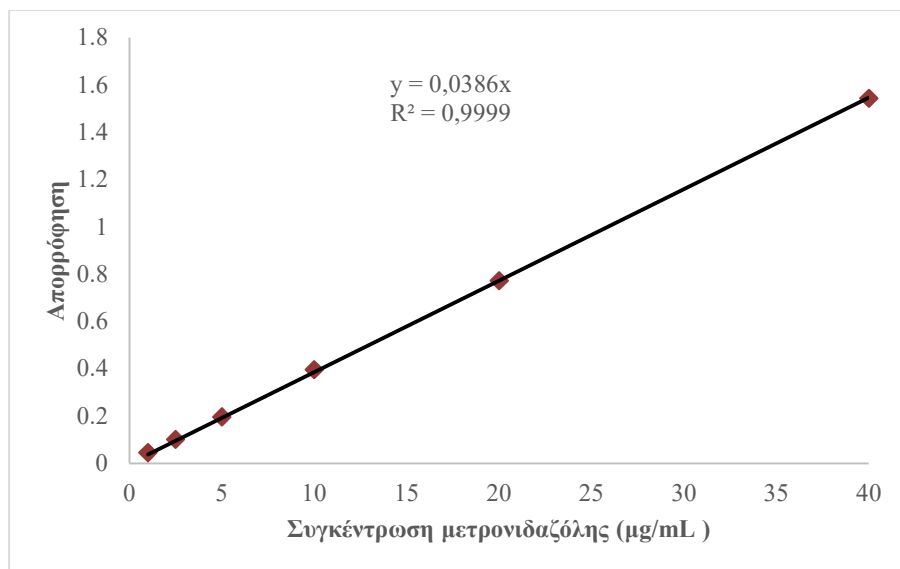
Εφαρμοζόμενη τάση (kV)	27
Ταχύτητα ροής PG-Ca/PEO/MET (mL/h)	5.0
Απόσταση από τον συλλέκτη PG-Ca/PEO/MET (cm)	30
Ταχύτητα ροής PCL/MET (mL/h)	2.5
Απόσταση από τον συλλέκτη PCL/MET (cm)	18
Ταχύτητα περιστροφής (rpm)	400

2.14. Προσδιορισμός του ρυθμού αποδέσμευσης της ενσωματωμένης μετρονιδαζόλης

Προκειμένου να προσδιοριστεί η ποσότητα της μετρονιδαζόλης που απελευθερώνεται από τις παρασκευασθείσες νανοϊνώδεις μεμβράνες, οι μεμβράνες κόπηκαν σε τεμάχια συγκεκριμένων διαστάσεων ώστε να αντιστοιχούν σε 5 mg νανοϊνών και άρα σε 454.55 µg μετρονιδαζόλης, και μεταφέρθηκαν σε φιαλίδια όπου εμβαπτίστηκαν σε 5 mL διαλύματος προσομοίωσης σιέλου (pH 7.2). Τα δείγματα διατηρήθηκαν σε κλίβανο στους 37 °C για το απαραίτητο κάθε φορά χρονικό διάστημα της μελέτης. Σε προκαθορισμένα χρονικά διαστήματα της μελέτης, αφαιρέθηκαν 0.5 mL από κάθε φιαλίδιο και μεταφέρθηκαν σε σωλίνες φυγοκέντρησης ενώ αντίστοιχα

προστέθηκαν 0.5 mL φρέσκου διαλύματος προσομοίωσης σιέλου σε κάθε φιαλίδιο ώστε να διατηρείται ο ίδιος όγκος διαλύματος. Ακολούθησε φυγοκέντρηση των σωλήνων (10,000 rpm, 10 min) ώστε να απομακρυνθούν τυχόν αιωρούμενα σωματίδια. Για τον προσδιορισμό της μετρονιδαζόλης μεταφέρθηκαν 0.3 mL από κάθε δείγμα σε πλάκα 96 φρεατίων και μετρήθηκε η απορρόφηση στα 320 nm. Στις περιπτώσεις που η απορρόφηση των δειγμάτων ήταν μεγαλύτερη από 2, τα δείγματα αραιώθηκαν κατάλληλα με ddH₂O. Επιπλέον, σε κάθε χρονική στιγμή μετρήθηκε η απορρόφηση του διαλύματος προσομοίωσης σιέλου (τυφλό διάλυμα), η οποία αφαιρέθηκε από την απορρόφηση των δειγμάτων.

Για τον προσδιορισμό του ρυθμού αποδέσμευσης της ενσωματωμένης μετρονιδαζόλης παρασκευάστηκαν πρότυπα διαλύματα μετρονιδαζόλης σε διάλυμα προσομοίωσης σιέλου διαφορετικών συγκεντρώσεων (1, 2.5, 5, 10, 20, 40 µg/mL) και μετρήθηκε η απορρόφηση τους στα 320 nm ακολουθώντας την ίδια διαδικασία με παραπάνω. Ο ρυθμός αποδέσμευσης της μετρονιδαζόλης από τις νανοϊνώδεις μεμβράνες προσδιορίστηκε μέσω της καμπύλης αναφοράς (Εικ. 37).



Εικόνα 37. Καμπύλη αναφοράς για τον προσδιορισμό της μετρονιδαζόλης στα δείγματα. Στην τεταγμένη τίθενται οι τιμές των απορροφήσεων των πρότυπων διαλυμάτων μετρονιδαζόλης στα 320 nm και στην τετμημένη οι τιμές των συγκεντρώσεων της μετρονιδαζόλης (µg/mL).

Μέσω της εξίσωσης $y=0.0386x$ υπολογίστηκε η ποσότητα της μετρονιδαζόλης (µg) που απελευθερώνεται σε 1 mL διαλύματος προσομοίωσης σιέλου σε κάθε χρονική στιγμή. Όλες οι αναλύσεις πραγματοποιήθηκαν πέντε φορές για το κάθε υλικό και η

ποσότητα της μετρονιδαζόλης εκφράζεται ως ο μέσος όρος των πέντε μετρήσεων για κάθε δείγμα. Λαμβάνοντας υπόψη την ποσότητα που αφαιρούνταν (0.5 mL) από τα φιαλίδια σε κάθε χρονική στιγμή, καθώς και τις αραιώσεις που έγιναν σε ορισμένα διαλύματα, υπολογίστηκαν τα μg της μετρονιδαζόλης που απελευθερώθηκαν σε 5 mL διαλύματος προσομοίωσης σιέλου.

2.15. Ενσωμάτωση υδροχλωρικής σιπροφλοξασίνης στο εξωτερικό στρώμα των πολυ-στρωματικών μεμβρανών

Για την παρασκευή της χυτής μεμβράνης PCL με ενσωματωμένη υδροχλωρική σιπροφλοξασίνη (CIP) παρασκευάστηκε διάλυμα PCL 8% w/v σε βενζόλιο, στο οποίο προστέθηκε η υδροχλωρική σιπροφλοξασίνη σε συγκέντρωση 5% w/w ως προς το βάρος του πολυμερούς και το διάλυμα αφέθηκε υπό ανάδευση για 24 h σε θερμοκρασία δωματίου ώστε να διασφαλιστεί η ομοιογένεια του διαλύματος. Η υδροχλωρική σιπροφλοξασίνη βρισκόταν σε διασπορά στο πολυμερικό διάλυμα. Έπειτα, ακολουθήθηκε η ίδια διαδικασία όπως ανωτέρω για την παρασκευή της χυτής μεμβράνης PCL (εξωτερικό στρώμα).

2.16. Προσδιορισμός του ποσοστού ενσωμάτωσης και του ρυθμού αποδέσμευσης της υδροχλωρικής σιπροφλοξασίνης

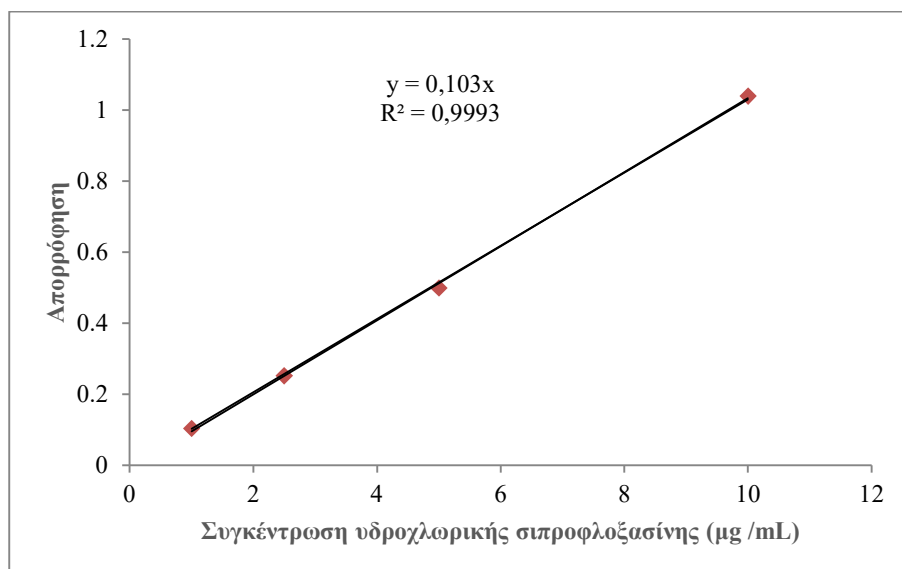
Για να προσδιοριστεί το ποσοστό ενσωμάτωσης της υδροχλωρικής σιπροφλοξασίνης στην χυτή μεμβράνη PCL πραγματοποιήθηκε υγρή-υγρή εκχύλιση της μεμβράνης (50 mg), η οποία είχε προηγουμένως διαλυθεί σε DCM (9 mL), χρησιμοποιώντας dH₂O ως τον μη μιγνύμενο διαλύτη. Η οργανική φάση εκχυλίστηκε δύο φορές ώστε να εκχυλιστεί πλήρως η υδροχλωρική σιπροφλοξασίνη. Έπειτα, μετρήθηκε η απορρόφηση της υδατικής φάσης στα 270 nm. Η διαδικασία πραγματοποιήθηκε σε τρεις επαναλήψεις. Το ποσοστό ενσωμάτωσης (%) υπολογίστηκε από την εξίσωση:

$$\frac{\text{πραγματικό } W_{\text{CIP}}}{\text{θεωρητικό } W_{\text{CIP}}} \times 100$$

Προκειμένου να προσδιοριστεί η ποσότητα της υδροχλωρικής σιπροφλοξασίνης που απελευθερώνεται από την χυτή μεμβράνη PCL, οι μεμβράνες κόπηκαν σε τεμάχια των 50 mg και μεταφέρθηκαν σε φιαλίδια όπου εμβαπτίστηκαν σε 5 mL διαλύματος προσομοίωσης σιέλου (pH 7.2). Τα δείγματα διατηρήθηκαν σε κλίβανο στους 37 °C για

το απαραίτητο κάθε φορά χρονικό διάστημα της μελέτης. Σε προκαθορισμένα χρονικά διαστήματα της μελέτης (1^η, 7^η, 14^η και 21^η ημέρα) αφαιρέθηκαν 0.5 mL από κάθε φιαλίδιο και μεταφέρθηκαν σε σωλήνες φυγοκέντρωσης, ενώ αντίστοιχα προστέθηκαν 0.5 mL φρέσκου διαλύματος προσομοίωσης σιέλου σε κάθε φιαλίδιο ώστε να διατηρείται σταθερός ο όγκος του διαλύματος. Ακολούθησε φυγοκέντρωση των σωλήνων (10,000 rpm, 10 min) ώστε να απομακρυνθούν τυχόν αιωρούμενα σωματίδια. Για τον προσδιορισμό της υδροχλωρικής σιπροφλοξασίνης μεταφέρθηκαν 0.3 mL από κάθε δείγμα σε πλάκα 96 φρεατίων και μετρήθηκε η απορρόφηση στα 270 nm. Στις περιπτώσεις που η απορρόφηση των δειγμάτων ήταν μεγαλύτερη από 2, τα δείγματα αραιώθηκαν κατάλληλα με ddH₂O. Επιπλέον, σε κάθε χρονική στιγμή μετρήθηκε η απορρόφηση του διαλύματος προσομοίωσης σιέλου (τυφλό διάλυμα), η οποία αφαιρέθηκε από την απορρόφηση των δειγμάτων.

Για τον προσδιορισμό της υδροχλωρικής σιπροφλοξασίνης στα δείγματα παρασκευάστηκαν πρότυπα διαλύματα υδροχλωρικής σιπροφλοξασίνης σε διάλυμα προσομοίωσης σιέλου διαφορετικών συγκεντρώσεων (1, 2.5, 5 και 10 µg/mL) και μετρήθηκε η απορρόφηση τους στα 270 nm ακολουθώντας την ίδια διαδικασία με παραπάνω. Ο ρυθμός αποδέσμευσης της υδροχλωρικής σιπροφλοξασίνης από την χυτή μεμβράνη PCL προσδιορίστηκε μέσω της καμπύλης αναφοράς (Εικ. 38).



Εικόνα 38. Καμπύλη αναφοράς για τον προσδιορισμό της υδροχλωρικής σιπροφλοξασίνης στα δείγματα.

Στην τεταγμένη τίθενται οι τιμές των απορροφήσεων των πρότυπων διαλυμάτων υδροχλωρικής σιπροφλοξασίνης στα 270 nm και στην τετμημένη οι τιμές των συγκεντρώσεων της υδροχλωρικής σιπροφλοξασίνης (µg/mL).

Μέσω της εξίσωσης $y=0.103x$ υπολογίστηκε η ποσότητα της υδροχλωρικής σιπροφλοξασίνης (μg) που απελευθερώνεται σε 1 mL διαλύματος προσομοίωσης σιέλου σε κάθε χρονική στιγμή. Όλες οι αναλύσεις πραγματοποιήθηκαν εις τριπλούν για το κάθε υλικό και η ποσότητα της υδροχλωρικής σιπροφλοξασίνης εκφράζεται ως ο μέσος όρος των τριών μετρήσεων για κάθε δείγμα. Λαμβάνοντας υπόψη την ποσότητα που αφαιρούνταν (0.5 mL) από τα φιαλίδια σε κάθε χρονική στιγμή, καθώς και τις αραιώσεις που έγιναν σε ορισμένα διαλύματα, υπολογίστηκαν τα μg της υδροχλωρικής σιπροφλοξασίνης που απελευθερώθηκαν σε 5 mL διαλύματος προσομοίωσης σιέλου.

3. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ ΚΑΙ ΣΥΖΗΤΗΣΗ

3.1. Απομόνωση και χαρακτηρισμός θεικών πολυσακχαριτών από μακροφύκη

Στα πλαίσια της παρούσας διδακτορικής διατριβής μελετήθηκε η απομόνωση καρραγενανών και φουκοϊδανών από το ροδοφύκος *C. teedei* και το φαιοφύκος *C. barbata*, αντίστοιχα.

3.1.1. Απομόνωση και ταυτοποίηση καρραγενανών από το ροδοφύκος *Chondracanthus teedei*

Η απομόνωση καρραγενανών από φυσικούς και καλλιεργημένους πληθυσμούς του ροδοφύκου *C. teedei* έγινε εφαρμόζοντας τρεις διαφορετικές μεθόδους αλκαλικής εκχύλισης (Πίν. 27).

Πίνακας 27. Δείγματα του ροδοφύκου *Chondracanthus teedei* που εκχυλίστηκαν προς παραλαβή καρραγενανών με τις αντίστοιχες αποδόσεις των εκχυλίσεων.

Κωδικός δείγματος	Πληθυσμός	Εκχύλιση	Κωδικός	Απόδοση % (w/w)
MP0789	Φυσικός	NaOH	CG-Na-1	30.46
MP0791	Φυσικός	NaOH	CG-Na-2	32.99
			CG-Na-3	33.44
MP0790	Καλλιεργημένος	NaOH	CG-Na-4	36.36
MP0898	Καλλιεργημένος	NaOH	CG-Na-5	23.6
MP0791	Φυσικός	KOH	CG-K-1	5.71
			CG-K-2	19.61
MP0791	Φυσικός	Ca(OH) ₂	CG-Ca-1	34.76

Πιο συγκεκριμένα, πραγματοποιήθηκε αλκαλική εκχύλιση με NaOH δύο φυσικών και δύο καλλιεργημένων πληθυσμών του *C. teedei*. Οι καρραγενάνες απομονώθηκαν σε αποδόσεις που κυμάνθηκαν από 23.6 έως 36.36% w/w, με το καλλιεργημένο φύκος MP0790 να παρουσιάζει την υψηλότερη απόδοση, ενώ το καλλιεργημένο φύκος MP0898 την χαμηλότερη.

Επιπλέον, πραγματοποιήθηκε αλκαλική εκχύλιση με KOH του φυσικού πληθυσμού MP0791. Ωστόσο, το εκχύλισμα είχε πολύ μεγάλο ιξώδες και παρατηρήθηκε δυσκολία στον διαχωρισμό του εκχυλίσματος από την βιομάζα μετά το τέλος της εκχύλισης. Πιο συγκεκριμένα, κατά το στάδιο της διήθησης του εκχυλίσματος για την απομάκρυνση της βιομάζας δεν διαχωρίστηκε αποτελεσματικά η

βιομάζα από την γέλη που είχε σχηματιστεί. Έτσι, η καταβύθιση πραγματοποιήθηκε σε δύο στάδια. Αρχικά, προστέθηκε EtOH στο διήθημα, οπότε και καταβυθίστηκε σε μικρή ποσότητα ο πολυσακχαρίτης CG-K-1 με απόδοση 5.71% w/w. Έπειτα, στη γέλη με την βιομάζα προστέθηκε dH₂O σε περίσσεια υπό θέρμανση έως τους 70 °C ώστε να διαλυθεί πλήρως η γέλη και αφού διηθήθηκε το θερμό εκχύλισμα προς απομάκρυνση της βιομάζας, προστέθηκε EtOH στο διήθημα, οπότε και καταβυθίστηκε ο πολυσακχαρίτης CG-K-2 με απόδοση 19.61% w/w.

Τέλος, πραγματοποιήθηκε αλκαλική εκχύλιση με Ca(OH)₂ του φυσικού πληθυσμού MP0791 με απόδοση 34.36% w/w. Σε όλες τις περιπτώσεις οι καρραγενάνες που απομονώθηκαν ήταν υποκίτρινου χρώματος.

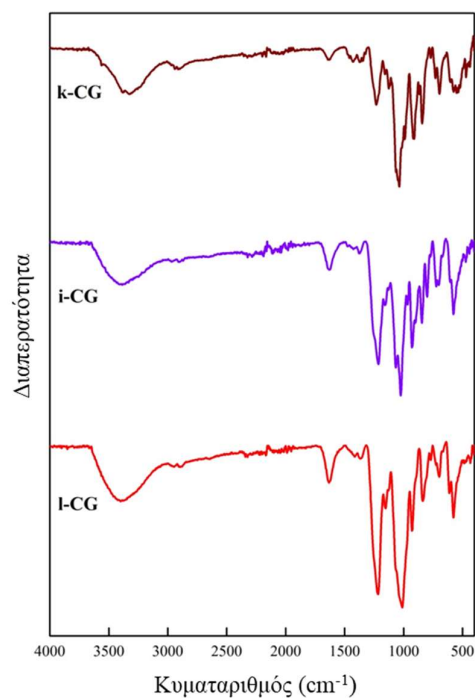
Η ταυτοποίηση των καρραγενανών βασίστηκε στην ανάλυση των φασματοσκοπικών τους δεδομένων (FT-IR) και τη σύγκριση τους με αυτά πρότυπων δειγμάτων, καθώς και με φασματοσκοπικά δεδομένα της βιβλιογραφίας.

Τα φάσματα FT-IR των πρότυπων κ-, ι- και λ-καρραγενανών (Εικ. 39, Πίν. 28) εμφανίζουν μία ευρεία ταινία απορρόφησης στα 3328-3400 cm⁻¹ που οφείλεται σε δονήσεις τάσης των -OH, μία ισχυρή ταινία απορρόφησης στα 1217-1231 cm⁻¹ που οφείλεται σε δονήσεις τάσης του δεσμού -S=O των θεικών εστέρων και μία πολύ ισχυρή ταινία απορρόφησης στα 1014-1038 cm⁻¹ που οφείλεται σε δονήσεις τάσης του γλυκοζιτικού δεσμού (C-O-C), οι οποίες εμφανίζονται σε όλα τα είδη καρραγενανών. Η παρουσία της 3,6-ανυδρο-D-γαλακτόζης στις κ- και ι-καρραγενάνες επιβεβαιώνεται από την χαρακτηριστική ταινία απορρόφησης στα 919-929 cm⁻¹ και στα 1064-1067 cm⁻¹. Η ταινία απορρόφησης στα 844 cm⁻¹ αποδίδεται στον θεικό εστέρα (C-O-SO₃) που βρίσκεται στον C-4 της D-γαλακτόζης και είναι χαρακτηριστική των κ και ι-καρραγενανών. Το φάσμα FT-IR των ι-καρραγενανών εμφανίζει μία επιπλέον ταινία απορρόφησης στα 803 cm⁻¹ η οποία αποδίδεται στον θεικό εστέρα (C-O-SO₃) που βρίσκεται στον C-2 της 3,6-ανυδρο-D-γαλακτόζης και είναι διαγνωστική των ι-καρραγενανών. Τέλος, το φάσμα FT-IR των λ-καρραγενανών εμφανίζει μία χαρακτηριστική ευρεία ταινία απορρόφησης στα 837 cm⁻¹ που οφείλεται στον θεικό εστέρα (C-O-SO₃) που βρίσκεται στον C-2 και έναν ώμο στα 815 cm⁻¹ που οφείλεται στον θεικό εστέρα (C-O-SO₃) που βρίσκεται στον C-6 της D-γαλακτόζης και είναι διαγνωστικές των λ-καρραγενανών (Pereira et al., 2003; Pereira et al., 2009).

Πίνακας 28. Χαρακτηριστικές απορροφήσεις φασμάτων FT-IR των κ-, ι- και λ-καρραγενανών.

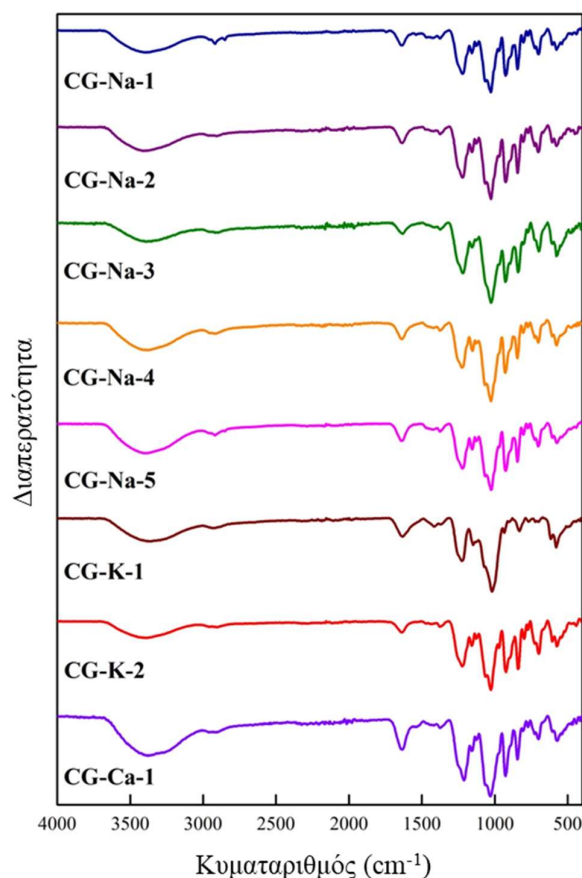
λειτουργική ομάδα	κ-CG	ι-CG	λ-CG
-OH	3328 +	3388 +	3400 +
S=O	1231 +	1217 ++	1219 +++
C-O της 3,6-ανυδρο-D-γαλακτόζης	1064 +	1067 ++	-
γλυκοζιτικός δεσμός C-O-C	1038 +++	1026 +++	1014 +++
C-O της 3,6-ανυδρο-D-γαλακτόζης	919 ++	929 ++	-
C-O-SO ₃ στον C-4 της D-γαλακτόζης	844 ++	844 ++	-
C-O-SO ₃ στον C-2 της D-γαλακτόζης	-	-	837 ++
C-O-SO ₃ στον C-6 της D-γαλακτόζης	-	-	815 s
C-O-SO ₃ στον C-2 της 3,6-ανυδρο-D-γαλακτόζης	-	803 +	-

Ένταση απορροφήσεων: -:Απουσιάζει, +: Μέτρια, ++: Ισχυρή, +++: Πολύ ισχυρή, Ωμος: s.



Εικόνα 39. Φάσματα FT-IR των κ-, ι- και λ-καρραγενανών.

Στην Εικ. 40 παρουσιάζονται τα φάσματα FT-IR των πολυσακχαριτών που απομονώθηκαν από το ροδοφύκος *C. teedei*.



Εικόνα 40. Φάσματα FT-IR των καρραγενανών που απομονώθηκαν από το ροδοφύκος *Chondracanthus teedei*.

Όλοι οι πολυσακχαρίτες, με εξαίρεση τον CG-K-1, εμφανίζουν παρόμοια φασματοσκοπικά δεδομένα (Πίν. 29) και δεν παρατηρείται κάποια διαφορά ανάμεσα στους φυσικούς και στους καλλιεργημένους πληθυσμούς. Πιο συγκεκριμένα, σε όλα τα φάσματα FT-IR των καρραγενανών που απομονώθηκαν παρατηρείται μία ευρεία ταινία απορρόφησης στα $3374\text{--}3410\text{ cm}^{-1}$ που οφείλεται σε δονήσεις τάσης των --OH , μια ισχυρή ταινία απορρόφησης στα $1213\text{--}1226\text{ cm}^{-1}$ που οφείλεται σε δονήσεις τάσης του δεσμού --S=O των θεικών εστέρων και μία πολύ ισχυρή ταινία απορρόφησης στα $1019\text{--}1030\text{ cm}^{-1}$ που οφείλεται σε δονήσεις τάσης του γλυκοζιτικού δεσμού (C-O-C), οι οποίες εμφανίζονται σε όλα τα είδη καρραγενανών. Επιπλέον, η παρουσία της 3,6-ανυδρο-D-γαλακτόζης στους πολυσακχαρίτες επιβεβαιώνεται από την παρουσία μίας

ισχυρής ταινίας απορρόφησης στα 926-934 cm^{-1} και από την ταινία απορρόφησης στα 1067-1072 cm^{-1} . Όλα τα φάσματα FT-IR των απομονωμένων πολυσακχαριτών, με εξαίρεση αυτό του CG-K-1, εμφανίζουν μία ταινία απορρόφησης στα 842-847 cm^{-1} , η οποία είναι χαρακτηριστική των κ- και ι-καρραγενανών και αποδίδεται στον θειικό εστέρα (C-O-SO₃) που βρίσκεται στον C-4 της D-γαλακτόζης (Pereira et al., 2003; Pereira et al., 2009).

Πίνακας 29. Χαρακτηριστικές απορροφήσεις φασμάτων FT-IR των καρραγενανών που απομονώθηκαν από το ροδοφύκος *Chondracanthus teedei*.

λειτουργική ομάδα	CG-Na-1	CG-Na-2	CG-Na-3	CG-Na-4	CG-Na-5	CG-K-1	CG-K-2	CG-Ca-1
-OH	3395 +	3410 +	3398 +	3388 +	3398 +	3374 +	3398 +	3376 +
S=O	1222 ++	1222 ++	1219 ++	1224 ++	1222 ++	1226 ++	1224 ++	1213 ++
C-O της 3,6-ανδρο-D-γαλακτόζης	1067 +	1067 +	1067 s	1067 +	1067 +	1072 s	1067 +	1067 s
γλυκοζιτικός δεσμός	1028 +++	1026 +++	1026 +++	1026 +++	1026 +++	1019 +++	1028 +++	1030 +++
C-O της 3,6-ανδρο-D-γαλακτόζης	927 ++	927 ++	927 ++	929 ++	927 ++	934 +	924 ++	926 ++
C-O-SO ₃ στον C-4 της D-γαλακτόζης	845 ++	845 ++	842 ++	847 ++	844 ++	-	842 ++	845 ++
C-O-SO ₃ στον C-2 της D-γαλακτόζης	-	-	-	-	-	832 +	-	-
C-O-SO ₃ στον C-2 της 3,6-ανδρο-D-γαλακτόζης	806 +	806 +	806 +	806 +	806 +	-	801 +	806 +

Ένταση απορροφήσεων: -: Απουσιάζει, +: Μέτρια, ++: Ισχυρή, +++: Πολύ ισχυρή, Ωμος: s.

Επιπρόσθετα, όλα τα φάσματα FT-IR των απομονωμένων πολυσακχαριτών, με εξαίρεση αυτό του CG-K-1, εμφανίζουν μία χαμηλής έντασης ταινία απορρόφησης στα 801-806 cm^{-1} , η οποία αποδίδεται στον θειικό εστέρα (C-O-SO₃) που βρίσκεται στον C-2 της 3,6-ανυδρο-D-γαλακτόζης και είναι διαγνωστική των ι-καρραγενανών. Σύμφωνα με δεδομένα από την βιβλιογραφία η αναλογία των απορροφήσεων στα 805 cm^{-1} και στα 845 cm^{-1} μπορεί να χρησιμοποιηθεί ως παράμετρος για να καθοριστεί ο βαθμός ι/κ υβριδισμού. Στους πολυσακχαρίτες που απομονώθηκαν, με εξαίρεση τον CG-K-1, παρατηρούνται και οι δύο χαρακτηριστικές απορροφήσεις με αυτή στα 845 cm^{-1} να είναι πολύ πιο έντονη και η αναλογία των απορροφήσεων 805/845 να κυμαίνεται μεταξύ 0.25 και 0.43 (Πίν. 30). Συνεπώς, όλοι οι πολυσακχαρίτες που απομονώθηκαν, με εξαίρεση τον CG-K-1, ταυτοποιήθηκαν ως υβρίδια κ/ι-καρραγενανών (Correa-Díaz et al., 1990; Pereira et al., 2004; Pereira et al., 2009).

Πίνακας 30. Αναλογία απορροφήσεων στα 805 cm^{-1} και 845 cm^{-1} στα φάσματα FT-IR των καρραγενανών.

Πολυσακχαρίτης	805/845
ι-CG	0.68
CG-Na-1	0.30
CG-Na-2	0.32
CG-Na-3	0.43
CG-Na-4	0.27
CG-Na-5	0.27
CG-K-2	0.35
CG-Ca-1	0.25

Όσον αφορά το φάσμα FT-IR του πολυσακχαρίτη CG-K-1, εμφανίζει μία ταινία απορρόφησης στα 832 cm^{-1} , η οποία αποδίδεται στον θειικό εστέρα (C-O-SO₃) που βρίσκεται στον C-2 της D-γαλακτόζης και είναι χαρακτηριστική των λ-καρραγενανών. Ωστόσο, η παρουσία δύο ταινιών απορρόφησης στα 934 cm^{-1} και 1070 cm^{-1} υποδηλώνει την παρουσία 3,6-ανυδρο-D-γαλακτόζης. Επομένως, φαίνεται να υπάρχει κάποιος βαθμός υβριδισμού με θ-καρραγενάνες, στις οποίες μετατρέπονται οι λ-καρραγενάνες υπό αλκαλικές συνθήκες (Pereira & Mesquita, 2004; Pereira et al., 2009). Τα δεδομένα υποδεικνύουν ότι κατά την εκχύλιση με KOH στο στάδιο της πρώτης καταβύθισης απομονώθηκαν σε πολύ μικρή ποσότητα λ-καρραγενάνες, οι οποίες δεν σχηματίζουν γέλη και για αυτό διαχωρίστηκαν από την γέλη που είχε σχηματιστεί, ενώ

στο δεύτερο στάδιο της καταβύθισης απομονώθηκε υβρίδιο κ/ι-καρραγενανών.

Το ιξώδες αποτελεί χαρακτηριστική ιδιότητα της ρεολογικής συμπεριφοράς των καρραγενανών. Επηρεάζεται από το είδος των καρραγενανών, το μοριακό τους βάρος, την θερμοκρασία, καθώς και την παρουσία αλάτων, κυρίως καλίου ή ασβεστίου. Επιπλέον, αυξάνεται εκθετικά με την αύξηση της συγκέντρωσης, ενώ όσο μεγαλύτερο είναι το ποσοστό των θεικών ομάδων τόσο μειώνεται το ιξώδες (Campo et al., 2009; Necas & Bartosikova, 2013; Venugopal, 2019).

Το κινηματικό ιξώδες των καρραγενανών που απομονώθηκαν, το οποίο ορίζεται ως το μέτρο αντίστασης που προβάλλει ένα υγρό όταν ρέει μέσα από έναν τριχοειδή σωλήνα, παρατίθεται στον Πίν. 31.

Πίνακας 31. Χρόνος εκροής και κινηματικό ιξώδες των απομονωμένων καρραγενανών.

Δείγμα	Χρόνος εκροής (sec)	Κινηματικό ιξώδες (cSt)
CG-Na-1	703	35.35
CG-Na-2	340	17.10
CG-Na-4	80	4.02
CG-Na-5	440	22.12
CG-K-1	130	6.54
CG-K-2	312	15.69
CG-Ca-1	646	32.48

Όπως φαίνεται, το κινηματικό ιξώδες των καρραγενανών που απομονώθηκαν διαφέρει αρκετά από δείγμα σε δείγμα. Οι διαφορές αυτές είναι πιθανόν να οφείλονται στο διαφορετικό μοριακό βάρος και στο διαφορετικό ποσοστό θεικών εστέρων των πολυσακχαριτών. Είναι αξιοσημείωτο ότι η CG-Na-4 που έχει το χαμηλότερο μοριακό βάρος και η CG-K-1 που έχει το υψηλότερο ποσοστό θεικών εστέρων εμφάνισαν το χαμηλότερο κινηματικό ιξώδες.

3.1.2. Απομόνωση και ταυτοποίηση φουκοϊδανών από το φαιοφύκος *Cystoseira barbata*

Οι φουκοϊδάνες εντοπίζονται στα φαιοφύκη σε περίπλοκες μήτρες στα κυτταρικά τοιχώματα και στην μεσοκυττάρια ουσία, η οποία αποτελείται κυρίως από φουκοϊδάνες και αλγινικά άλατα, ενώ στα χυμοτόπια εντοπίζεται λαμιναρίνη, μαννιτόλη και πολυφαινόλες (Zayed & Ulber, 2020). Ένα βασικό πρόβλημα που προκύπτει κατά την απομόνωση των φουκοϊδανών είναι η δυσκολία παραλαβής των

συγκεκριμένων πολυσακχαριτών σε καθαρή μορφή χωρίς την ταυτόχρονη παραλαβή αλγινικών, λαμιναρίνης και πολυφαινόλων.

Προκειμένου να βελτιστοποιηθούν οι συνθήκες που απαιτούνται ώστε απομονωθούν οι φουκοϊδάνες σε καθαρή μορφή χωρίς προσμείξεις και σε υψηλή απόδοση μελετήθηκαν διάφοροι μέθοδοι αποχρωματισμού και εκχύλισης (Πίν. 32).

Πίνακας 32. Δείγματα του φαιοφύκου *Cystoseira barbata* που εκχυλίστηκαν προς παραλαβή φουκοϊδανών με τις αντίστοιχες αποδόσεις των εκχυλίσεων.

Δείγμα	Αποχρωματισμός	Εκχύλιση	Κωδικός	Απόδοση % (w/w)
MP0249	EtOH	Υδατική	FC-1	5.93
MP0249		0.1 N HCl 1% CaCl ₂	FC-2	14.46
MP0249	-	EDTA	FC-3	1.96
MP0249	EtOH:HCHO 8:2	Υδατική	FC-4	3.34
MP0249		Υδατική Cetavlon	FC-5	1.00
MP0711	MeOH, DCM/MeOH 1:1, DCM EtOH:HCHO 8:2	Υδατική	FC-6	18.16

Ο πιο κλασικός τρόπος απομόνωσης φουκοϊδανών είναι η εκχύλιση σε θερμό νερό και η καταβύθιση με αιθανόλη αφού πρώτα απομακρυνθούν τα αλγινικά άλατα (Hahn et al., 2012). Για το λόγο αυτό, πραγματοποιήθηκε κατεργασία του ξηρού φαιοφύκου MP0249 με αιθανόλη και στην συνέχεια υδατική εκχύλιση με θέρμανση στους 121°C, όπου απομονώθηκε πολυσακχαρίτης (FC-1, Εικ. 41α) σκούρου καφέ χρώματος σε απόδοση 5.93% w/w. Το σκούρο χρώμα του πολυσακχαρίτη υποδηλώνει ότι απομονώθηκε μαζί με χρωστικές, όπως πολυφαινόλες, φουκοξανθίνη, χλωροφύλλη, β-καροτένιο και βιολαξανθίνη (Saepudin et al., 2018; Zayed & Ulber, 2020). Μία άλλη μέθοδος απομόνωσης που αναφέρεται συχνά στην βιβλιογραφία είναι η όξινη εκχύλιση, η οποία εμφανίζει το πλεονέκτημα ότι παρουσιάζει υψηλή απόδοση αλλά οι όξινες συνθήκες μπορεί να μειώσουν το ποσοστό θεικών ομάδων (Zhao et al., 2018). Κατά την όξινη εκχύλιση (0.1N HCl, 1% w/v CaCl₂) του αποχρωματισμένου ξηρού φύκου απομονώθηκε πολυσακχαρίτης (FC-2, Εικ. 41β) καφέ χρώματος σε απόδοση 14.46% w/w. Ένας εναλλακτικός τρόπος εκχύλισης που δοκιμάστηκε ήταν η εκχύλιση του ξηρού οργανισμού MP0249 με διάλυμα EDTA ώστε να εκχυλιστούν οι φουκοϊδάνες και ταυτόχρονα να απομακρυνθούν οι χρωστικές. Ωστόσο, η εκχύλιση είχε πολύ

χαμηλή απόδοση (1.96% w/w), ενώ ο πολυσακχαρίτης (FC-3, Εικ. 41γ) είχε σκούρο καφέ χρώμα, οπότε και απορρίφθηκε ως μέθοδος απομόνωσης.

Ένας άλλος τρόπος να αποφευχθεί η ταυτόχρονη παραλαβή χρωστικών κατά την απομόνωση των φουκοϊδανών είναι η προκατεργασία του ξηρού φύκους με φορμαλδεΰδη. Η φορμαλδεΰδη λειτουργεί ως παράγοντας πολυμερισμού που συνδέει και σταθεροποιεί τις φαινόλες καθιστώντας τις αδιάλυτες. Συνήθως χρησιμοποιείται διάλυμα αιθανόλη/νερό/φορμαλδεΰδη με υψηλή αναλογία αιθανόλης, καθώς το υδατικό διάλυμα αιθανόλης εξασφαλίζει την απομάκρυνση της μαννιτόλης και της χλωροφύλλης, ενώ παράλληλα αποτρέπει την ταυτόχρονη εκχύλιση των φουκοϊδανών (Hahn et al., 2012; Zayed & Ulber, 2020). Ωστόσο, η φορμαλδεΰδη μπορεί να δημιουργήσει σύμπλοκα υψηλού μοριακού βάρους με τις πολυφαινόλες και τις πρωτεΐνες, τα οποία μπορεί να αλληλεπιδράσουν με τις φουκοϊδάνες και να καταβυθιστούν, οδηγώντας σε μειωμένη απόδοση (Hahn et al., 2012). Κατά την κατεργασία του ξηρού οργανισμού MP0249 με διάλυμα αιθανόλη/νερό/φορμαλδεΰδη και στην συνέχεια υδατική εκχύλιση απομονώθηκε πολυσακχαρίτης (FC-4, Εικ. 41ε) μπεζ χρώματος σε απόδοση 3.34% w/w. Έπειτα, προκειμένου να καταβυθιστούν φουκοϊδάνες σε ακόμη πιο καθαρή μορφή δοκιμάστηκε η εκλεκτική καταβύθιση του πολυσακχαρίτη με βρωμιούχο δεκαεξυλο-τριμεθυλαμμώνιο, καθώς έχει την ιδιότητα να σχηματίζει άλας με τις φουκοϊδάνες αδιάλυτο στο νερό. Ωστόσο, η μέθοδος αυτή δεν ήταν αποδοτική (1% w/w), ενώ ο πολυσακχαρίτης που απομονώθηκε (FC-5, Εικ. 41δ) είχε καφέ χρώμα πιθανόν λόγω υπολειμμάτων NaI. Τέλος, δοκιμάστηκε εξαντλητική εκχύλιση του ξηρού οργανισμού MP0711 με DCM, DCM/MeOH 1:1, MeOH και έπειτα κατεργασία με αιθανόλη/νερό/φορμαλδεΰδη και υδατική εκχύλιση, από την οποία απομονώθηκε πολυσακχαρίτης (FC-6, Εικ. 41ζ) λευκού χρώματος σε απόδοση 18.16% w/w. Η μεγάλη διαφορά στην απόδοση είναι πιθανόν να οφείλεται στην διαφορετική εποχή συλλογής, καθώς και στην διαφορετική γεωγραφική τοποθεσία συλλογής των δειγμάτων (Rioux et al., 2007).

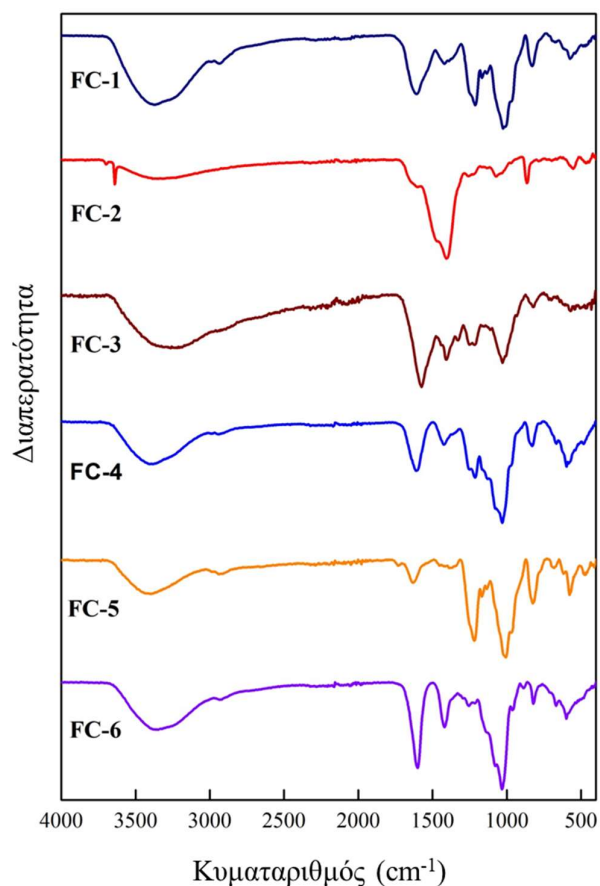


Εικόνα 41. Φουκοϊδάνες που απομονώθηκαν από τις διάφορες μεθόδους εκχύλισης: (α) FC-1, (β) FC-2, (γ) FC-3, (δ) FC-5, (ε) FC-4 και (ζ) FC-6.

Η ταυτοποίηση των φουκοϊδανών που απομονώθηκαν βασίστηκε στην ανάλυση των φασματοσκοπικών τους δεδομένων (FT-IR) και τη σύγκριση με δεδομένα της βιβλιογραφίας. Στην Εικ. 42 παρουσιάζονται τα φάσματα FT-IR των πολυσακχαριτών που απομονώθηκαν από το φαιοφύκος *C. barbata*, οι οποίοι ταυτοποιήθηκαν ως φουκοϊδάνες. Ωστόσο, παρατηρήθηκαν διαφορές στην ένταση των χαρακτηριστικών απορροφήσεων των φουκοϊδανών που υποδεικνύει ότι υπάρχουν διαφορές στην χημική δομή, στην καθαρότητα των πολυσακχαριτών και στο ποσοστό των θεικών ομάδων. Οι διαφορές που εντοπίστηκαν φαίνεται να οφείλονται στις διαφορετικές συνθήκες αποχρωματισμού και εκχύλισης.

Αναλυτικότερα, παρατηρείται μία ευρεία ταινία απορρόφησης στα 3270-3380 cm^{-1} που οφείλεται σε δονήσεις τάσης -OH . Ακόμη, εμφανίζεται μία ταινία απορρόφησης στα 1577-1631 cm^{-1} και άλλη μία στα 1405-1425 cm^{-1} οι οποίες οφείλονται σε ασύμμετρες και συμμετρικές δονήσεις τάσης των καρβοξυλίων του ουρονικού οξέος, η ένταση των οποίων διαφέρει ανάλογα με τον τρόπο παραλαβής. Οι απορροφήσεις στα 1251-1260 cm^{-1} και στα 1214-1227 cm^{-1} είναι χαρακτηριστικές των θεικών εστέρων των φουκοϊδανών και αποδίδονται σε δονήσεις τάσης S=O , η ένταση των οποίων επίσης διαφέρει ανάλογα με τον τρόπο παραλαβής. Οι ταινίες απορρόφησης στα 1072-1079 cm^{-1} και στα 1023-1033 cm^{-1} είναι χαρακτηριστικές του γλυκουρονικού και του μαννουρονικού οξέος και είναι πιθανόν να οφείλονται σε υπολείμματα αλγινικού οξέος. Ακόμη, η ταινία απορρόφησης στα 823-825 cm^{-1} (C-O -

S) που εμφανίζεται στις φουκοϊδάνες FC-3, FC-5 και FC-6 δείχνει ότι η πλειονότητα των θεικών ομάδων βρίσκεται σε ισημερινή θέση στον C-2 ή/και στον C-3, ενώ η ταινία απορρόφησης στα $830\text{-}864\text{ cm}^{-1}$ που εμφανίζεται στις φουκοϊδάνες FC-1, FC-2 και FC-4 δείχνει ότι η πλειονότητα των θεικών ομάδων βρίσκεται σε αξονική θέση στον C-4. Από την ανάλυση των φασματοσκοπικών δεδομένων (Εικ. 42, Πίν. 33) φαίνεται ότι οι φουκοϊδάνες που απομονώθηκαν από την όξινη εκχύλιση έχουν αρκετά μικρό ποσοστό θεικών ομάδων, καθώς η ταινία απορρόφησης στα 1258 cm^{-1} , η οποία είναι χαρακτηριστική των θεικών εστέρων, είναι πολύ ασθενής, ενώ φαίνεται να έχουν το μεγαλύτερο ποσοστό ουρονικού οξέος. Επιπλέον, οι φουκοϊδάνες που απομονώθηκαν από την καταβύθιση με βρωμιούχο δεκαεξυλο-τριμεθυλαμμώνιο (FC-5) φαίνεται να έχουν το μικρότερο ποσοστό ουρονικού οξέος, ενώ η απορρόφηση στα 1219 cm^{-1} που είναι χαρακτηριστική των θεικών εστέρων είναι αρκετά πιο ισχυρή από ότι στις υπόλοιπες φουκοϊδάνες που απομονώθηκαν (Chale-Dzul et al., 2015; Palanisamy et al., 2017; Wang & Chen, 2016; Zayed et al., 2016; Zayed et al., 2020).



Εικόνα 42. Φάσματα FT-IR των φουκοϊδανών που απομονώθηκαν από το φαιοφύκος *Cystoseira barbata*.

Πίνακας 33. Χαρακτηριστικές απορροφήσεις φασμάτων FT-IR των φουκοϊδανών που απομονώθηκαν από το φαιοφύκος *Cystoseira barbata*.

λειτουργική ομάδα	FC-1	FC-2	FC-3	FC-4	FC-5	FC-6
-OH	3369 ++	3369 ++	3270 ++	3381 ++	3398 ++	3361 ++
καρβοξύλιο ουρονικού οξέος	1604 ++	1604 s	1577 +++	1609 ++	1628 ++	1604 +++
καρβοξύλιο ουρονικού οξέος	1415 +	1405 +++	1408 ++	1425 +	1420 +	1420 ++
S=O	1251 s	1260 +	1251 ++	1251 s	-	1258 +
S=O	1214 ++	1227 s	1217 ++	1214 ++	1219 +++	1217 +
υπολείμματα γλυκουρονικού οξέος	-	1072 +	-	1077 s	1077 s	1079 s
υπολείμματα μαννουρονικού οξέος	1028 +++	1031 s	1028 ++	1031 +++	1009 +++	1033 +++
C-O-S, θεικές ομάδες στον C-4 σε αξονική θέση	830 +	864 ++	839 s	830 +	-	-
C-O-S, θεικές ομάδες στον C-2/ ή και στον C-3 σε ισημερινή θέση	-	-	824 +	-	825 ++	823 ++

Ένταση απορροφήσεων: -:Απουσιάζει, +: Μέτρια, ++: Ισχυρή, +++: Πολύ ισχυρή, Ωμος: s.

3.1.3. Προσδιορισμός κατανομής του μοριακού βάρους των απομονωμένων πολυσακχαριτών

Η κατανομή του μοριακού βάρους και το μέσο μοριακό βάρος των πολυσακχαριτών που απομονώθηκαν, καθώς επίσης και οι χρόνοι έκλουσης στην χρωματογραφία αποκλεισμού μεγεθών αναφέρονται στους Πίν. 34-35.

Πίνακας 34. Χρόνοι έκλουσης και μέση τιμή χρόνου έκλουσης των καρραγενανών και φουκοϊδανών που απομονώθηκαν.

Δείγμα	Χρόνος έκλουσης (min)	Μέση τιμή χρόνου έκλουσης (min)
κ-CG	12.6 – 15.9	13.658
ι-CG	12.4 – 16.9	14.702
λ-CG	12.7 – 15	13.712
CG-Na-1	12.4 – 15	13.373
CG-Na-2	13.0 – 17.0	13.928
CG-Na-3	12.6 – 15.9	13.696
CG-Na-4	13.0 – 17.8	14.898
CG-Na-5	13.3 – 18.0	14.510
CG-Ca-1	12.6 – 16.1	13.933
FC-4	8.8 – 9.8	9.590
	10.3 – 12.8	11.410

Πίνακας 35. Κατανομή μοριακού βάρους και μέσο μοριακό βάρος των καρραγενανών και φουκοϊδανών που απομονώθηκαν.

Δείγμα	Κατανομή Μοριακού Βάρους	Μέσο Μοριακό Βάρος (Mr)
κ-CG	133,242 – > 708,000	> 708,000
ι-CG	79,112 – > 708,000	248,810
λ- CG	213,010 – > 708,000	416,873
CG-Na-1	213,010 – > 708,000	> 708,000
CG-Na-2	75,093 – > 708,000	372,478
CG-Na-3	134,909 – > 708,000	> 708,000
CG-Na-4	49,486 – > 708,000	224,643
CG-Na-5	47,151 – > 708,000	278,339
CG-Ca-1	126,731 – > 708,000	374,123
FC-4	223,646 – >344,000	266,713
	26,776 – 167,035	73,241

Όσον αφορά στην κατανομή του μοριακού βάρους των πολυσακχαριτών που απομονώθηκαν και ταυτοποιήθηκαν ως καρραγενάνες, τα δεδομένα υποδεικνύουν ότι το μοριακό βάρος των πολυσακχαριτών επηρεάζεται τόσο από την πηγή απομόνωσης όσο και από τις συνθήκες εκχύλισης. Όπως φαίνεται, οι πολυσακχαρίτες που απομονώθηκαν από καλλιεργημένους πληθυσμούς (CG-Na-4, CG-Na-5) εμφάνισαν αρκετά μικρότερο μέσο μοριακό βάρος (224,643 Da, 278,339 Da) σε σχέση με τους πολυσακχαρίτες που απομονώθηκαν από φυσικούς πληθυσμούς (> 708,000 Da) στις ίδιες συνθήκες εκχύλισης.

Ακόμη, παρατηρείται ότι οι συνθήκες παραλαβής επηρεάζουν το μοριακό βάρος των πολυσακχαριτών. Ο πολυσακχαρίτης CG-Na-2 εμφάνισε πολύ μικρότερο μέσο μοριακό βάρος (372,478 Da) από τον CG-Na-3 (> 708,000 Da) παρόλο που απομονώθηκαν από τον ίδιο οργανισμό ακολουθώντας την ίδια διαδικασία. Η διαφορά στο μέσο μοριακό βάρος οφείλεται στο ότι κατά την απομόνωση του CG-Na-2 στο στάδιο της ρύθμισης του pH του εκχυλίσματος, το pH μειώθηκε στο 2 και ρυθμίστηκε γρήγορα στο 8. Είναι γνωστό ότι οι καρραγενάνες αποπολυμερίζονται εύκολα σε όξινες συνθήκες. Παράλληλα, η CG-Ca-1 που εκχυλίστηκε με Ca(OH)_2 εμφάνισε αρκετά μικρότερο μέσο μοριακό βάρος (374,123 Da) από την CG-Na-3 (> 708,000 Da) παρόλο που απομονώθηκαν από τον ίδιο οργανισμό.

Όσον αφορά στις φουκοϊδάνες προσδιορίστηκε η κατανομή του μοριακού βάρους μόνο για τον πολυσακχαρίτη που απομονώθηκε ύστερα από κατεργασία με φορμαλδεΰδη και υδατική εκχύλιση καθώς εμφάνισε τα καλύτερα χαρακτηριστικά. Καθώς ο πολυσακχαρίτης FC-6 ήταν πλήρως αδιάλυτος σε υδατικά διαλύματα, προσδιορίστηκε το μοριακό βάρος μόνο για τον FC-4, ο οποίος εμφάνισε δύο κορυφές με μέσο μοριακό βάρος 266,713 και 73,241 Da.

3.1.4. Προσδιορισμός θεικών ομάδων των απομονωμένων πολυσακχαριτών

Τα αποτελέσματα από τον προσδιορισμό των θεικών ομάδων στους πολυσακχαρίτες που απομονώθηκαν παρατίθενται στον Πίν. 36.

Πίνακας 36. Ποσοστό θεικών ομάδων για τις καρραγενάνες και τις φουκοϊδάνες που απομονώθηκαν.

Δείγμα	Ποσοστό θεικών εστέρων (%w/w)
κ-CG	21.90 ± 2.29
ι-CG	55.81 ± 2.23
λ-CG	64.34 ± 1.72
CG-Na-1	33.23 ± 1.80
CG-Na-2	33.41 ± 3.11
CG-Na-3	28.36 ± 2.29
CG-Na-4	32.33 ± 2.64
CG-Na-5	28.37 ± 2.80
CG-K-1	49.36 ± 1.41
CG-Ca-1	31.01 ± 1.87
FC-4	36.28 ± 2.29
FC-6	31.45 ± 1.52

Όλοι οι πολυσακχαρίτες που απομονώθηκαν και ταυτοποιήθηκαν ως υβρίδια κ/ι- καρραγενανών εμφάνισαν παρόμοιο ποσοστό θεικών ομάδων και δεν παρατηρήθηκαν διαφορές ανάμεσα στους φυσικούς και στους καλλιεργημένους πληθυσμούς. Από την σύγκριση των αποτελεσμάτων με τα πρότυπα δείγματα καρραγενανών φαίνεται ότι το ποσοστό των θεικών εστέρων των πολυσακχαριτών που ταυτοποιήθηκαν ως υβρίδια κ/ι-καρραγενανών είναι ανάμεσα στα ποσοστά των κ- και ι-καρραγενανών, γεγονός το οποίο συνάδει με τα φασματοσκοπικά δεδομένα. Επιπρόσθετα, η CG-K-1 εμφάνισε αρκετά υψηλότερο ποσοστό θεικών εστέρων, το οποίο επίσης συνάδει με τα φασματοσκοπικά δεδομένα που έδειξαν ότι πρόκειται για υβρίδιο λ/θ-καρραγενανών.

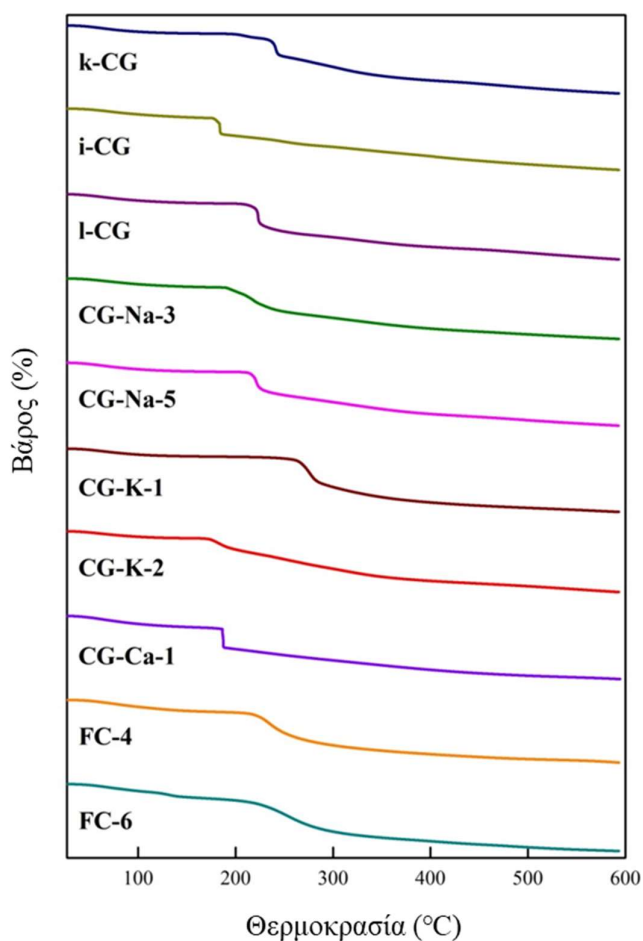
Τέλος, το ποσοστό θεικών εστέρων των φουκοϊδανών FC-4 (36.28% w/w) και FC-6 (31.45% w/w) ήταν αρκετά υψηλότερο από αυτό που έχει αναφερθεί στην βιβλιογραφία για αντίστοιχα δείγματα (Sellimi et al., 2014).

3.1.5. Θερμική ανάλυση των απομονωμένων πολυσακχαριτών

Οι πολυσακχαρίτες που απομονώθηκαν και τα πρότυπα δείγματα καρραγενανών χαρακτηρίστηκαν ως προς την θερμική σταθερότητα τους. Ειδικότερα, μελετήθηκε η θερμική σταθερότητα των πρότυπων καρραγενανών, των μετά νατρίου αλάτων καρραγενανών από φυσικό (CG-Na-3) και καλλιεργημένο (CG-Na-5) πληθυσμό, των μετά καλίου αλάτων καρραγενανών (CG-K-1, CG-K-2), των μετ' ασβεστίου αλάτων καρραγενανών (CG-Ca-1) και των φουκοϊδανών που απομονώθηκαν ύστερα από

κατεργασία με αιθανόλη/νερό/φορμαλδεΐδη και υδατική εκχύλιση (FC-4 και FC-6).

Όπως φαίνεται στα θερμογραφήματα TGA (Εικ. 43), όλοι οι πολυσακχαρίτες εμφάνισαν παρόμοια θερμικά προφίλ που χαρακτηρίζονται από μία μικρή μεταβολή βάρους λόγω φαινομένων αφυδάτωσης (απώλειας δομικά δεσμευμένων μορίων νερού ή και προσροφημένης υγρασίας) και ένα κύριο στάδιο απώλειας βάρους που οφείλεται στην αποσύνθεση τους, προκαλούμενη πιθανόν από την απελευθέρωση οξειδίων άνθρακα που επιφέρει ο αποπολυμερισμός τους λόγω της ρήξης δεσμών C-O και C-C. Στις περισσότερες των περιπτώσεων το κύριο στάδιο αποσύνθεσης δεν είχε σαφή διαχωρισμό με το τελικό στάδιο αποσύνθεσης των πολυσακχαριτών, το οποίο φαίνεται να εκτείνεται πέραν των 600 °C λόγω της αποσύνθεσης ανόργανων συστατικών των δειγμάτων.



Εικόνα 43. Θερμογραφήματα TGA των πρότυπων δειγμάτων καρραγενανών και των απομονωμένων πολυσακχαριτών.

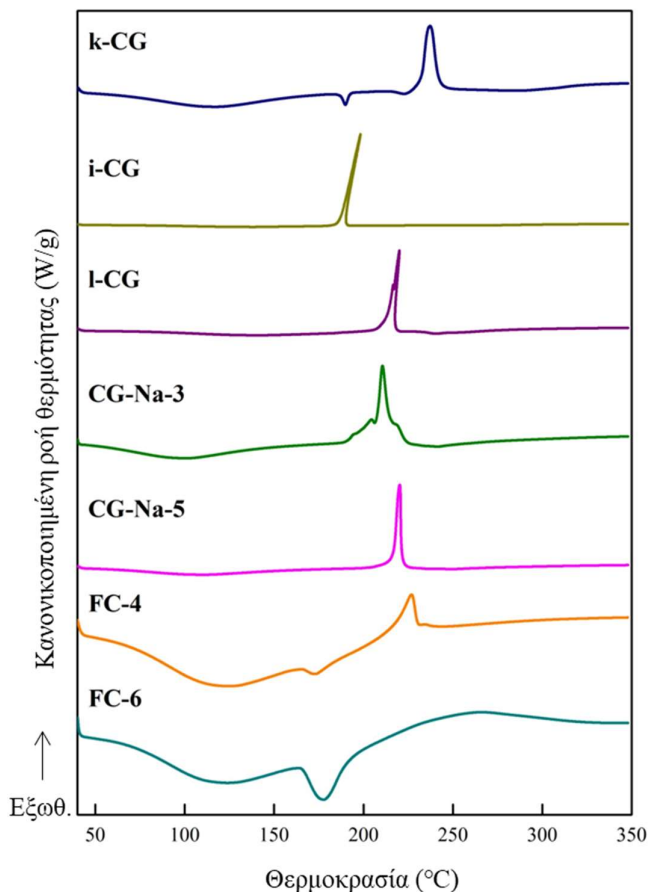
Αναλυτικότερα, η κ-CG εμφάνισε μία μικρή απώλεια βάρους έως τους 97 °C που οφείλεται σε απώλεια υγρασίας και στην συνέχεια παρουσίασε ένα κύριο στάδιο αποσύνθεσης που ξεκίνησε στους 199 °C και ολοκληρώθηκε στους 243 °C. Η ι-CG παρουσίασε μία μικρή απώλεια βάρους έως τους 92 °C λόγω απώλειας υγρασίας, ενώ το κύριο στάδιο αποσύνθεσης της ξεκίνησε στους 179 °C και ολοκληρώθηκε στους 184 °C. Παρομοίως, η λ-CG εμφάνισε μία μικρή απώλεια βάρους έως τους 120 °C που οφείλεται στην απώλεια υγρασίας και το κύριο στάδιο αποσύνθεσης του πολυσακχαρίτη ξεκίνησε στους 220 °C και ολοκληρώθηκε στους 224 °C.

Όσον αφορά τους απομονωμένους πολυσακχαρίτες, ο CG-Na-3 παρουσίασε μία μικρή απώλεια βάρους έως τους 104 °C λόγω απώλειας υγρασίας και ένα κύριο στάδιο αποσύνθεσης που άρχισε στους 190 °C και ολοκληρώθηκε στους 243 °C. Παρομοίως, ο CG-Na-5 εμφάνισε μία μικρή απώλεια υγρασίας έως τους 105 °C, ενώ το κύριο στάδιο της αποσύνθεσής του άρχισε στους 215 °C και ολοκληρώθηκε στους 225°C. Ο CG-K-1 παρουσίασε μία μικρή απώλεια βάρους έως τους 111 °C που οφείλεται στην απώλεια υγρασίας και στην συνέχεια ένα κύριο στάδιο αποσύνθεσης που ξεκίνησε στους 264 °C και ολοκληρώθηκε στους 283 °C. Ο CG-K-2, μετά από μία μικρή απώλεια βάρους έως τους 96 °C λόγω απώλειας υγρασίας, παρουσίασε μία μεγάλη απώλεια βάρους λόγω της αποσύνθεσης του πολυσακχαρίτη που ξεκίνησε στους 173 °C και ολοκληρώθηκε στους 344 °C. Ο CG-Ca-1 εμφάνισε μία μικρή απώλεια υγρασίας έως τους 95°C και η κύρια αποσύνθεση του ξεκίνησε στους 186 °C και ολοκληρώθηκε στους 188 °C.

Ο FC-4 εμφάνισε μία μικρή απώλεια βάρους έως τους 141 °C που οφείλεται σε απώλεια υγρασίας, ενώ το κύριο στάδιο αποσύνθεσης ξεκίνησε στους 220 °C και ολοκληρώθηκε στους 269 °C. Τέλος, ο FC-6, μετά από μία μικρή απώλεια βάρους έως τους 140 °C λόγω απώλειας υγρασίας, εμφάνισε μεγάλη απώλεια βάρους λόγω της αποσύνθεσης του πολυσακχαρίτη που ξεκίνησε στους 222 °C και ολοκληρώθηκε στους 288 °C.

Επιπλέον, μελετήθηκε η θερμική συμπεριφορά των πρότυπων δειγμάτων καρραγενανών, των μετά νατρίου αλάτων καρραγενανών από φυσικό (CG-Na-3) και καλλιεργημένο (CG-Na-5) πληθυσμό, και των φουκοϊδανών που απομονώθηκαν ύστερα από κατεργασία με αιθανόλη/νερό/φορμαλδεΰδη και υδατική εκχύλιση (FC-4 και FC-6) με διαφορετική θερμιδομετρία σάρωσης. Σε όλες τις περιπτώσεις, στα θερμογραφήματα DSC των πολυσακχαριτών (Εικ. 44) παρατηρήθηκε μία, διαφορετικής έντασης κατά περίπτωση, ευρεία ενδόθερμη περιοχή στους 100-125 °C λόγω της αφυδάτωσης των πολυσακχαριτών, συνοδευόμενη από μία οξεία εξώθερμη κορυφή

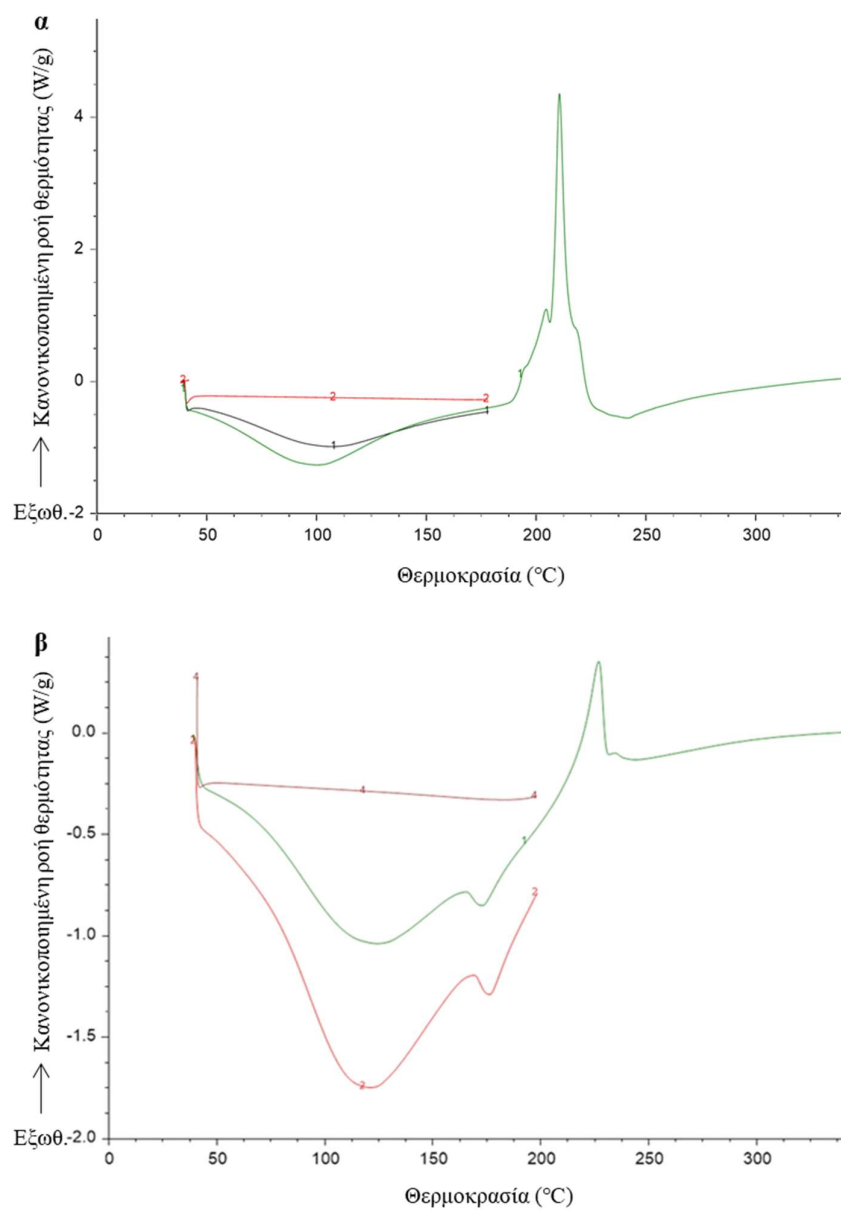
λόγω φαινομένων θερμικής διάσπασης. Επιπλέον, η ενδόθερμη απορρόφηση που εμφανίστηκε στις κ-καρραγενάνες στους 190 °C πιθανόν να οφείλεται σε πρώιμα φαινόμενα αποσύνθεσης.



Εικόνα 44. Θερμογραφήματα DSC των πρότυπων δειγμάτων καρραγενανών και των απομονωμένων πολυσακχαριτών.

Προκειμένου να επιβεβαιωθεί ότι οι ενδόθερμες απορροφήσεις που εμφανίστηκαν οφείλονται στην αφυδάτωση των πολυσακχαριτών, πραγματοποιήθηκε μία ακόμη μέτρηση, κατά την οποία οι πολυσακχαρίτες υποβλήθηκαν σε θερμική ανόπτηση. Μέσω μίας θερμικής αλληλουχίας θέρμανσης-ψύξης-θέρμανσης, αρχικά πραγματοποιήθηκε θέρμανση έως 10 °C πριν από την θερμοκρασία αποικοδόμησης για τη θερμική ανόπτηση των πολυσακχαριτών. Έπειτα τα δείγματα επανήλθαν σε θερμοκρασία δωματίου και ακολούθησε και δεύτερη θέρμανση έως 10 °C πριν από την θερμοκρασία αποικοδόμησής τους. Στο δεύτερο στάδιο θέρμανσης απουσίαζαν οι ενδόθερμες κορυφές που είχαν εμφανιστεί στο πρώτο στάδιο, επιβεβαιώνοντας ότι

οφείλονται στην αφυδάτωση των πολυσακχαριτών και όχι σε άλλου τύπου θερμικές μεταπτώσεις. Ενδεικτικά παρουσιάζονται τα θερμογραφήματα DSC πριν και μετά την ανόπτηση για τους πολυσακχαρίτες CG-Na-3 (μετά νατρίου άλατα καρραγενανών, Εικ. 45α) και FC-4 (φουκοϊδάνες, Εικ. 45β).



Εικόνα 45. Θερμογραφήματα DSC των πολυσακχαριτών (α) CG-Na-3 και (β) FC-4 πριν και μετά την ανόπτηση.

3.2. Τροποποιήσεις θεικών πολυσακχαριτών με υπέρηχους υψηλής ισχύος

Τα τελευταία χρόνια το ερευνητικό ενδιαφέρον έχει στραφεί στην διάσπαση των πολυμερών με την χρήση υπερήχων υψηλής ισχύος. Η μέθοδος αυτή εφαρμόζεται συνήθως σε διάλυμα ή εναιώρημα (Ratnawati et al., 2016). Ένα βασικό πλεονέκτημά της είναι ότι με τον τρόπο αυτό δεν αλλάζει η χημική δομή του πολυμερούς και η μείωση του μοριακού βάρους οφείλεται απλώς στην διάσπαση του πιο ευαίσθητου χημικού δεσμού (Mohod & Gogate, 2011). Επιπλέον, πρόκειται για μία απλή, οικονομική και οικολογική μέθοδο, καθώς τα δείγματα δεν χρειάζονται περαιτέρω επεξεργασία και δεν προκύπτουν χημικά απόβλητα (Guo et al., 2014).

Έχουν διατυπωθεί διάφορες θεωρίες αναφορικά με την χρήση υπερήχων υψηλής ισχύος που προσπαθούν να εξηγήσουν τους παράγοντες που οδηγούν στην μείωση του μοριακού βάρους των πολυμερών, καθώς και τον μηχανισμό μέσω του οποίου λαμβάνει χώρα η διάσπαση. Σε γενικές γραμμές θεωρείται ότι η διάσπαση των πολυμερών μέσω υπερήχων, σε αντίθεση με την χημική ή θερμική διάσπαση, δεν είναι τυχαία διαδικασία, με την διάσπαση να λαμβάνει χώρα κυρίως στο κέντρο του μορίου και τα μεγαλύτερα μέρη να διασπώνται πιο γρήγορα (Mohod & Gogate, 2011).

Όταν εφαρμόζονται υπέρηχοι σε ένα υγρό δημιουργείται κύμα πίεσης στο υγρό, το οποίο έχει ως αποτέλεσμα τον σχηματισμό και την ταχεία κατάρρευση φυσαλίδων. Το φαινόμενο αυτό ονομάζεται σπηλαιώση. Η ταχεία κατάρρευση των φυσαλίδων μπορεί να προκαλέσει δύναμη διάτμησης ικανή να διασπάσει τον ομοιοπολικό δεσμό των πολυμερών, υπό την προϋπόθεση ότι οι αλυσίδες είναι μεγαλύτερες από μία ορισμένη τιμή (Ratnawati et al., 2016; Tecson et al., 2021). Οι μεγαλύτερες πολυμερικές αλυσίδες εμφανίζουν μεγαλύτερη αντίσταση στην ροή και για αυτό αντιμετωπίζουν μεγαλύτερες δυνάμεις διάτμησης, οι οποίες οδηγούν σε πιο συχνή διάσπαση δεσμών κατά την κατάρρευση των φυσαλίδων σε αντίθεση με τις μικρότερες πολυμερικές αλυσίδες (Tecson et al., 2021). Επιπλέον, η κατάρρευση των φυσαλίδων προκαλεί τοπικά πολύ υψηλή θέρμανση και πίεση της τάξης των 5000 °C και 1000 atm, αντίστοιχα, με διάρκεια ζωής 10^{-10} s, γεγονός που μπορεί να οδηγήσει σε θερμική διάσπαση του νερού προς δημιουργία ελεύθερων ριζών:



Τόσο οι ελεύθερες ρίζες $\text{OH}\cdot$ όσο και το υπεροξείδιο του υδρογόνου (H_2O_2)

είναι ισχυροί οξειδωτικοί παράγοντες και μπορούν να οξειδώσουν ένα πολυμερές προκαλώντας την διάσπαση του (Guo et al., 2014; Ratnawati et al., 2016; Tecson et al., 2021).

Στα πλαίσια της παρούσας διδακτορικής διατριβής μελετήθηκαν οι συνθήκες που απαιτούνται ώστε να μειωθεί το μοριακό βάρος των μετά νατρίου αλάτων καρραγενανών με μέσο μοριακό βάρος μεγαλύτερο από 708,000 Da, ουλβανών με μέσο μοριακό βάρος μεγαλύτερο από 344,000 Da και φουκοϊδανών με μέσο μοριακό βάρος 266,713 Da μέσω εφαρμογής υπερήχων υψηλής ισχύος, καθώς και οι δομικές αλλαγές που προκύπτουν από την επίδραση των υπερήχων.

3.2.1. Προσδιορισμός κατανομής του μοριακού βάρους των τροποποιημένων πολυσακχαριτών

Η κατανομή του μοριακού βάρους και το μέσο μοριακό βάρος των πολυσακχαριτών ύστερα από κατεργασία με υπέρηχους, καθώς επίσης και οι χρόνοι έκλουσης στην χρωματογραφία αποκλεισμού μεγεθών και τα αντίστοιχα χρωματογραφήματά τους, παρουσιάζονται στους Πίν. 37-42 και στις Εικ. 46-51. Ακολουθεί σύγκριση των αποτελεσμάτων ανά πολυσακχαρίτη.

3.2.1.1. Μετά νατρίου άλατα καρραγενανών

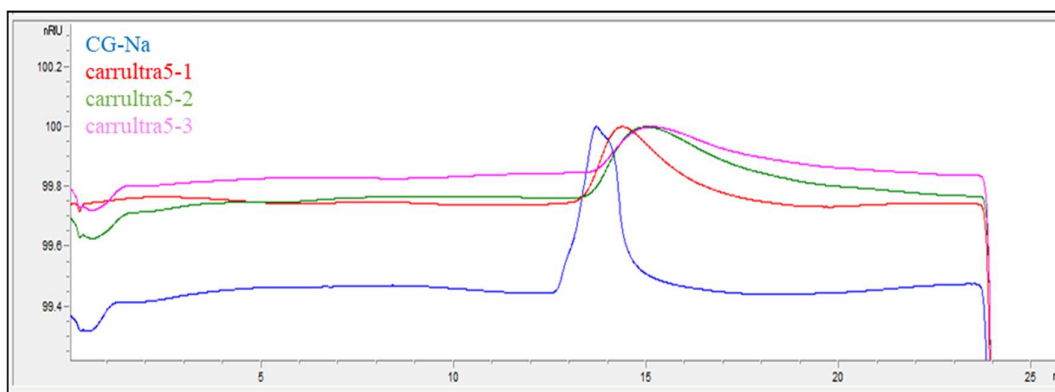
Το μέσο μοριακό βάρος των μετά νατρίου αλάτων των καρραγενανών παρουσίασε σημαντική μείωση ύστερα από κατεργασία με υπέρηχους για 10 min, καθώς από >708,000 Da μειώθηκε στα 298,893 Da σε όξινες συνθήκες και στα 314,612 Da σε ουδέτερες συνθήκες. Ύστερα από εφαρμογή υπερήχων για 20 min το μέσο μοριακό βάρος μειώθηκε ακόμη περισσότερο στα 223,398 Da σε όξινες συνθήκες και στα 257,477 Da σε ουδέτερες συνθήκες, ενώ μετά από 30 min μειώθηκε στα 200,293 Da και στα 167,915 Da, αντίστοιχα. Από την σύγκριση των αποτελεσμάτων σε όξινες και ουδέτερες συνθήκες διαλύματος, φαίνεται ότι σε όξινες συνθήκες το μέσο μοριακό βάρος μειώθηκε περισσότερο έπειτα από 10 και 20 min εφαρμογής υπερήχων, ενώ σε ουδέτερες συνθήκες μειώθηκε περισσότερο έπειτα από 30 min. Επιπρόσθετα, η κατεργασία των μετά νατρίου αλάτων των καρραγενανών με υπέρηχους οδήγησε στην αύξηση του εύρους κατανομής του μοριακού βάρους, η οποία ήταν ανάλογη του χρόνου εφαρμογής υπερήχων.

Πίνακας 37. Χρόνοι έκλουσης και μέση τιμή χρόνου έκλουσης των μετά νατρίου αλάτων των καρραγενανών.

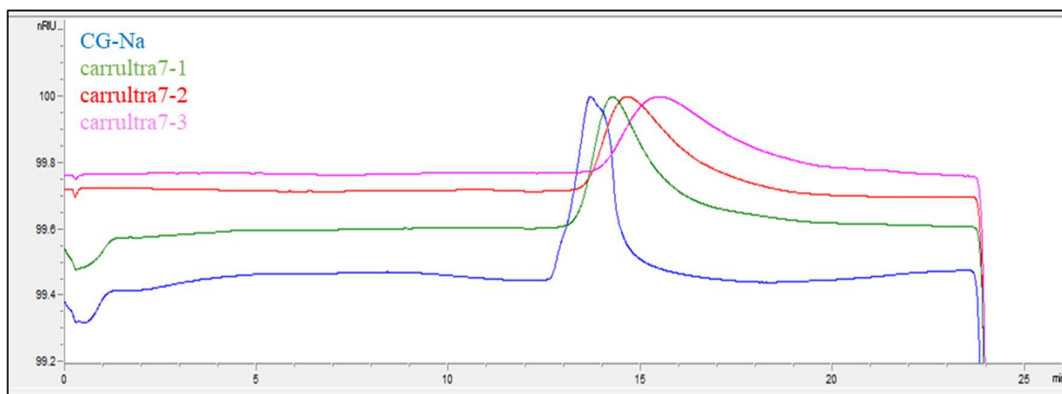
Δείγμα	Χρόνος έκλουσης (min)	Μέση τιμή χρόνου έκλουσης (min)
CG-Na	12.643 – 15.923	13.696
carrultra5-1	13.159 – 18.37	14.371
carrultra5-2	13.357 – 19.469	14.939
carrultra5-3	13.519 – 19.473	15.152
carrultra7-1	13.098 – 17.383	14.271
carrultra7-2	13.277 – 18.840	14.662
carrultra7-3	13.730 – 19.670	15.496

Πίνακας 38. Κατανομή μοριακού βάρους και μέσο μοριακό βάρος των μετά νατρίου αλάτων των καρραγενανών.

Δείγμα	Κατανομή Μοριακού Βάρους	Μέσο Μοριακό Βάρος (Mr)
CG-Na	134,909 – >708,000	>708,000
carrultra5-1	38,489 – >708,000	298,893
carrultra5-2	21,913 – >708,000	223,398
carrultra5-3	21,868 – >708,000	200,293
carrultra7-1	63,833 – >708,000	314,612
carrultra7-2	30,249 – >708,000	257,477
carrultra7-3	19,768 – >708,000	167,915



Εικόνα 46. Χρωματογραφήματα των μετά νατρίου αλάτων των καρραγενανών πριν και μετά από κατεργασία με υπέρηχους σε όξινες συνθήκες για 10, 20 και 30 min.



Εικόνα 47. Χρωματογραφήματα των μετά νατρίου αλάτων των καρραγενανών πριν και μετά από κατεργασία με υπέρηχους σε ουδέτερες συνθήκες για 10, 20 και 30 min.

3.2.1.2. Ουλβάνες

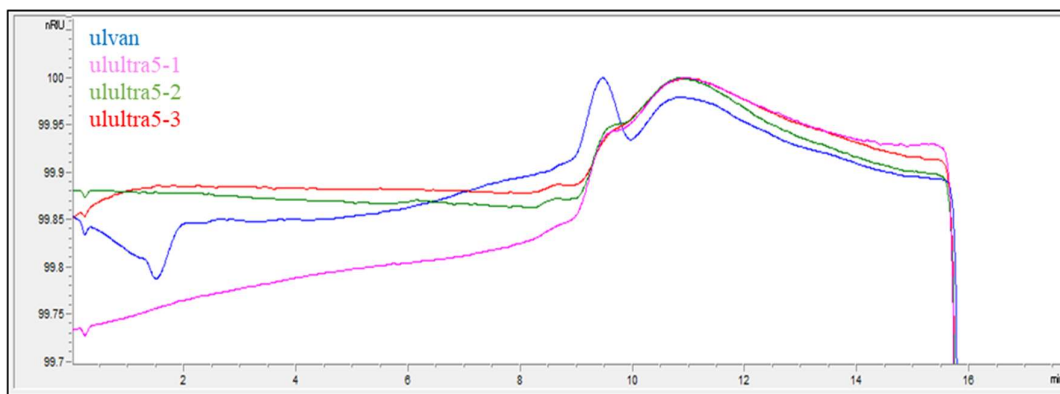
Το μέσο μοριακό βάρος των ουλβανών παρέμεινε σχεδόν ίδιο ύστερα από κατεργασία με υπέρηχους για 10 min τόσο σε όξινες όσο και σε ουδέτερες συνθήκες, ενώ έπειτα από 20 min μειώθηκε από $>344,000 / 108,931$ Da στα $268,995 / 106,711$ Da σε όξινες συνθήκες και στα $272,456 / 102,988$ Da σε ουδέτερες συνθήκες. Επιπλέον, μετά από 30 min το μέσο μοριακό βάρος των ουλβανών μειώθηκε στα $267,662 / 101,248$ Da σε όξινες συνθήκες και στα $263,325 / 101,825$ Da σε ουδέτερες συνθήκες. Από την σύγκριση των αποτελεσμάτων σε όξινες και ουδέτερες συνθήκες διαλύματος προκύπτει και πάλι ότι σε όξινες συνθήκες το μέσο μοριακό βάρος μειώθηκε περισσότερο ύστερα από 10 και 20 min εφαρμογής υπερήχων, ενώ σε ουδέτερες συνθήκες μειώθηκε περισσότερο έπειτα από 30 min.

Πίνακας 39. Χρόνοι έκλυσης και μέση τιμή χρόνου έκλυσης των ουλβανών.

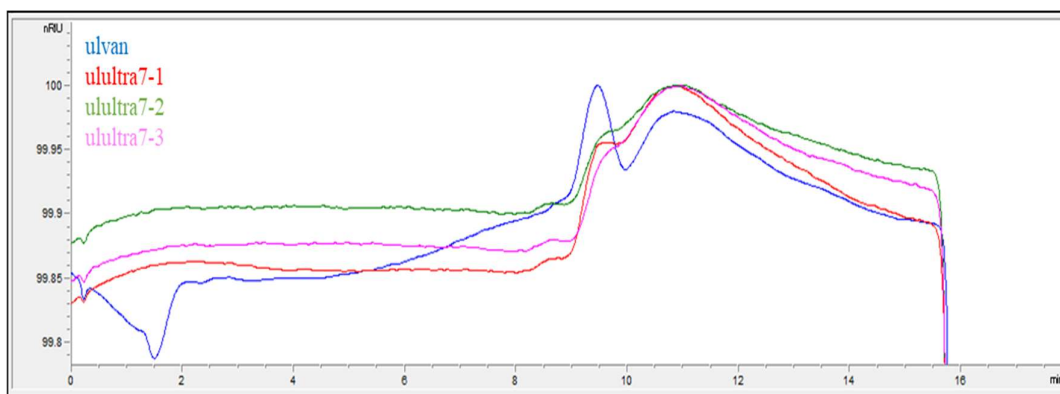
Δείγμα	Χρόνος έκλυσης (min)	Μέση τιμή χρόνου έκλυσης (min)
Ulvan	8.961 – 9.698	9.475
	9.838 – 12.796	10.851
ulultra5-1	8.962 – 9.846	9.52
	9.846 – 12.811	10.879
ulultra5-2	8.984 – 9.874	9.578
	9.874 – 12.811	10.88
ulultra5-3	9.014 – 9.927	9.585
	9.927 – 12.975	10.954
ulultra7-1	8.891 – 9.846	9.48
	9.846 – 12.796	10.885
ulultra7-2	8.963 – 9.866	9.56
	9.866 – 12.800	10.93
ulultra7-3	9.028 – 9.882	9.608
	9.882 – 12.928	10.946

Πίνακας 40. Κατανομή μοριακού βάρους και μέσο μοριακό βάρος των ουλβανών.

Δείγμα	Κατανομή Μοριακού Βάρους	Μέσο Μοριακό Βάρος (Mr)
Ulvan	247,023 – >344,000	>344,000
	27,372 – 223,646	108,931
ulultra5-1	222,379 – >344,000	>344,000
	27,082 – 222,379	106,787
ulultra5-2	218,001 – >344,000	268,995
	27,082 – 218,001	106,711
ulultra5-3	209,949 – >344,000	267,662
	24,105 – 209,949	101,248
ulultra7-1	222,379 – >344,000	>344,000
	27,372 – 222,379	106,332
ulultra7-2	219,243 – >344,000	272,456
	27,295 – 219,243	102,988
ulultra7-3	216,766 – >344,000	263,325
	24,923 – 216,766	101,825



Εικόνα 48. Χρωματογραφήματα των ουλβανών πριν και μετά από κατεργασία με υπέρηχους σε όξινες συνθήκες για 10, 20 και 30 min.



Εικόνα 49. Χρωματογραφήματα των ουλβανών πριν και μετά από κατεργασία με υπέρηχους σε ουδέτερες συνθήκες για 10, 20 και 30 min.

3.2.1.3. Φουκοϊδάνες

Το μέσο μοριακό βάρος των φουκοϊδανών μειώθηκε ελαφρώς ύστερα από κατεργασία με υπέρηχους για 10 min, όπου από 266,713 / 73,241 Da μειώθηκε στα 256,133 / 79,192 Da σε όξινες συνθήκες και στα 259,244 / 84,899 Da σε ουδέτερες συνθήκες. Έπειτα από 20 min το μέσο μοριακό βάρος μειώθηκε στα 247,549 / 71,494 Da σε όξινες συνθήκες και στα 252,162 / 64,179 Da σε ουδέτερες συνθήκες. Τέλος, μετά από εφαρμογή υπερήχων για 30 min το μέσο μοριακό βάρος μειώθηκε στα 235,880 / 83,464 Da σε όξινες συνθήκες και στα 237,730 / 59,737 Da σε ουδέτερες συνθήκες. Από την σύγκριση των αποτελεσμάτων φαίνεται ότι σε όξινες συνθήκες το μέσο μοριακό βάρος των φουκοϊδανών μειώθηκε ελαφρώς περισσότερο, χωρίς ωστόσο να προκύπτουν σημαντικές μεταβολές του μοριακού βάρους, με την αύξηση του χρόνου εφαρμογής υπερήχων τόσο σε όξινες όσο και σε ουδέτερες συνθήκες διαλύματος. Επιπρόσθετα, η κατεργασία των φουκοϊδανών με υπέρηχους είχε ως αποτέλεσμα την

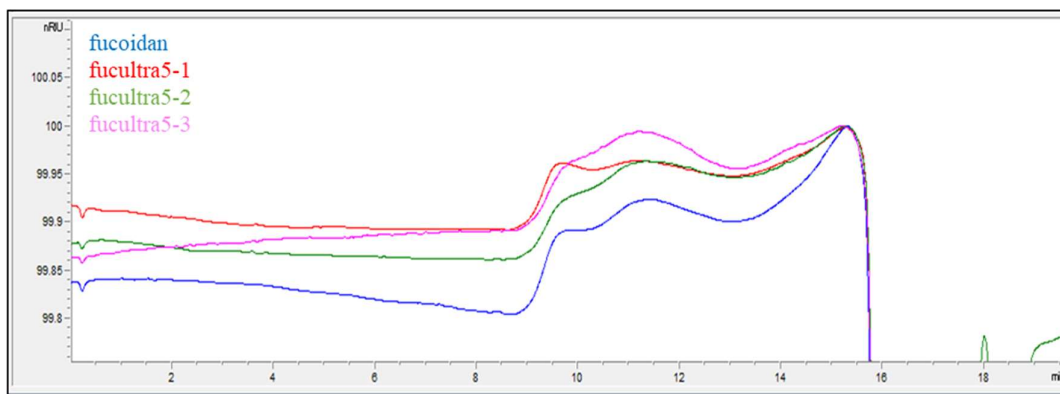
αύξηση του εύρους κατανομής του μοριακού βάρους και την μετατόπιση της στην περιοχή χαμηλότερων μοριακών βαρών, χωρίς όμως να προκύπτει ξεκάθαρη συσχέτιση με τις συνθήκες που δοκιμάστηκαν.

Πίνακας 41. Χρόνοι έκλυσης και μέση τιμή χρόνου έκλυσης των φουκοϊδανών.

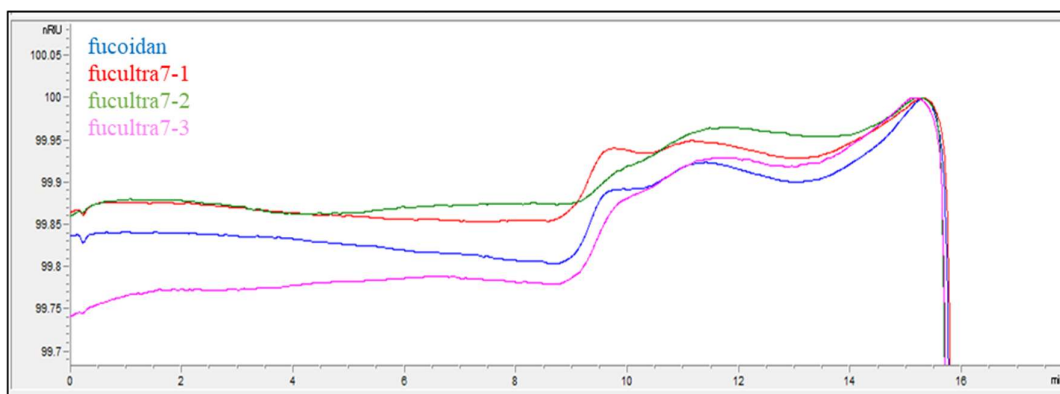
Δείγμα	Χρόνος έκλυσης (min)	Μέση τιμή χρόνου έκλυσης (min)
fucoidan	8.765 – 9.838	9.59
	10.249 – 12.827	11.41
fucultra5-1	8.765 – 10.248	9.647
	10.41 – 12.927	11.3
fucultra5-2	8.845 – 10.191	9.695
	10.191 – 12.984	11.444
fucultra5-3	8.847 – 10.233	9.763
	10.233 – 13.04	11.226
fucultra7-1	8.765 – 10.231	9.63
	10.424 – 12.873	11.202
fucultra7-2	8.966 – 10.208	9.669
	10.208 – 12.941	11.596
fucultra7-3	8.853 – 10.235	9.752
	10.235 – 12.977	11.697

Πίνακας 42. Κατανομή μοριακού βάρους και μέσο μοριακό βάρος των φουκοϊδανών.

Δείγμα	Κατανομή Μοριακού Βάρους	Μέσο Μοριακό Βάρος (Mr)
fucoidan	223,646 – >344,000	266,713
	26,776 – 167,035	73,241
fucultra5-1	167,154 – >344,000	256,133
	24,941 – 148,990	79,192
fucultra5-2	174,059 – >344,000	247,549
	23,952 – 174,059	71,494
fucultra5-3	168,944 – >344,000	235,880
	23,018 – 168,944	83,464
fucultra7-1	169,184 – >344,000	259,244
	25,916 – 147,516	84,899
fucultra7-2	171,970 – >344,000	252,162
	24,694 – 171,970	64,179
fucultra7-3	168,704 – >344,000	237,730
	24,071 – 168,704	59,737



Εικόνα 50. Χρωματογραφήματα των φουκοϊδανών πριν και μετά από κατεργασία με υπέρηχους σε όξινες συνθήκες για 10, 20 και 30 min.



Εικόνα 51. Χρωματογραφήματα των φουκοϊδανών πριν και μετά από κατεργασία με υπέρηχους σε ουδέτερες συνθήκες για 10, 20 και 30 min.

Συνοψίζοντας, όλοι οι πολυσακχαρίτες παρουσίασαν μείωση του μέσου μοριακού βάρους τους μέσω της εφαρμογής υπερήχων υψηλής ισχύος, η οποία αυξήθηκε με την αύξηση της διάρκειας εφαρμογής. Αξιοσημείωτο είναι ότι όσο μεγαλύτερο ήταν το αρχικό μέσο μοριακό βάρος των πολυσακχαριτών, τόσο μεγαλύτερη ήταν η μείωση του μέσου μοριακού βάρους που παρατηρήθηκε.

3.2.2. Προσδιορισμός θεικών ομάδων των τροποποιημένων πολυσακχαριτών

Τα δομικά χαρακτηριστικά ενός πολυσακχαρίτη συνδέονται άρρηκτα με τις βιολογικές τους ιδιότητες. Τόσο το μοριακό βάρος όσο και η παρουσία θεικών ομάδων επηρεάζουν σημαντικά την βιοδραστικότητα τους (Cunha & Grenha, 2016). Για το λόγο αυτό, προσδιορίστηκε το ποσοστό των θεικών εστέρων επί των πολυσακχαριτών στα δείγματα των καρραγενανών τα οποία είχαν υποστεί κατεργασία με υπέρηχους, καθώς αυτά παρουσίασαν τις μεγαλύτερες μεταβολές στο μοριακό τους βάρος (Πίν.

43).

Πίνακας 43. Ποσοστό θεικών εστέρων στις καρραγενάνες πριν και μετά την κατεργασία με υπέρηχους.

Δείγμα	Ποσοστό θεικών εστέρων (% w/w)
CG-Na	28.37 ± 2.29
carrultra5-1	23.97 ± 2.75
carrultra5-2	23.53 ± 4.03
carrultra5-3	16.93 ± 2.02
carrultra7-1	27.71 ± 0.93
carrultra7-2	27.49 ± 0.76
carrultra7-3	24.41 ± 1.87

Το ποσοστό θεικών εστέρων των μετά νατρίου αλάτων των καρραγενανών μειώθηκε από 28.37% w/w σε 23.97% w/w ύστερα από κατεργασία με υπέρηχους για 10 min σε όξινες συνθήκες, ενώ παρέμεινε σχεδόν σταθερό (27.71 % w/w) σε ουδέτερες συνθήκες. Παρομοίως, έπειτα από 20 min μειώθηκε στα 23.53% w/w σε όξινες συνθήκες και στα 27.49% w/w σε ουδέτερες συνθήκες. Τέλος, ύστερα από 30 min εφαρμογής υπέρηχων παρατηρήθηκε σημαντική μείωση των θεικών εστέρων σε όξινες συνθήκες με το ποσοστό τους να βρίσκεται στα 16.93% w/w, ενώ σε ουδέτερες συνθήκες μειώθηκε ελαφρώς στα 24.41% w/w. Τα δεδομένα υποδεικνύουν ότι η κατεργασία των καρραγενανών με υπέρηχους σε όξινες συνθήκες διαλύματος οδηγεί σε μείωση του ποσοστού των θεικών εστέρων, με τη μείωση να αυξάνεται με την αύξηση του χρόνου εφαρμογής, ενώ σε ουδέτερες συνθήκες το ποσοστό τους παρουσιάζει πολύ μικρότερη μείωση.

3.3. Σχεδιασμός και ανάπτυξη πολυ-στρωματικών νανοϊνωδών μεμβρανών για την θεραπεία της περιοδοντίτιδας

Στα πλαίσια της παρούσας διδακτορικής διατριβής προκειμένου να διερευνηθεί η ικανότητα των θεικών πολυσακχαριτών θαλάσσιας προέλευσης να προάγουν την αναγέννηση των οστών και του περιοδοντικού συνδέσμου, μελετήθηκε η ηλεκτροϊνοποίηση των θεικών πολυσακχαριτών που απομονώθηκαν με στόχο την παραγωγή ηλεκτροϊνοποιημένων μικρο-/νανοϊνών για την κατασκευή πολυ-στρωματικών μεμβρανών κατευθυνόμενης ιστικής αναγέννησης. Οι μεμβράνες αυτές σχεδιάστηκαν ώστε να λειτουργούν ως φυσικός φραγμός αποτρέποντας την υπέρμετρη ανάπτυξη και διείσδυση επιθηλιακών κυττάρων, ενώ παράλληλα να παρέχουν χώρο και

χρόνο στα κύτταρα του περιοδοντικού συνδέσμου και στους οστεοβλάστες να πολλαπλασιαστούν και να λειτουργούν ως πηγή ιόντων ασβεστίου για να προάγουν την αναγέννηση του περιοδοντίου.

Προκειμένου να επιτευχθεί η επιθυμητή πολυλειτουργικότητα, οι μεμβράνες σχεδιάστηκαν ώστε να αποτελούνται από δύο ή τρία στρώματα. Και στις δύο περιπτώσεις, οι μεμβράνες αποτελούνταν από ένα χυτό εξωτερικό στρώμα υδρόφοβου χαρακτήρα ικανό να παρέχει την επιθυμητή μηχανική αντοχή στη μεμβράνη, εμποδίζοντας παράλληλα τα επιθηλιακά κύτταρα να διεισδύσουν στην περιοχή του περιοδοντίου. Οι μεμβράνες τριών στρωμάτων περιελάμβαναν ένα μεσαίο στρώμα από ηλεκτροϊονοποιημένες ίνες για την υποστήριξη της οστικής αναγέννησης και ένα εσωτερικό στρώμα ηλεκτροϊονοποιημένων ινών για την προαγωγή της αναγέννησης των οστών και του περιοδοντικού συνδέσμου, ενώ οι μεμβράνες δύο στρωμάτων αποτελούνταν από ένα εσωτερικό στρώμα ηλεκτροϊονοποιημένων ινών για την υποστήριξη της οστικής αναγέννησης και την προαγωγή της αναγέννησης του περιοδοντικού συνδέσμου.

3.3.1. Παραγωγή και χαρακτηρισμός των GTR μεμβρανών

Για την παρασκευή του εξωτερικού στρώματος των μεμβρανών επιλέχθηκε η PCL, η οποία είναι ένα υδρόφοβο πολυμερές με σκοπό τη δημιουργία μιας χυτής μεμβράνης που να λειτουργεί αφενός ως υπόστρωμα για την εναπόθεση των ηλεκτροϊονοποιημένων νανοϊνών και αφετέρου να δρα ως εμπόδιο-φραγμός στη διείσδυση των επιθηλιακών κυττάρων. Η επιλογή του συγκεκριμένου πολυμερούς βασίστηκε στο γεγονός ότι είναι ένα βιοαποικοδομήσιμο και βιοσυμβατό πολυμερές, με ευρεία χρήση σε βιοϊατρικές εφαρμογές. Επιδεικνύοντας καλή μηχανική αντοχή, υψηλή ελαστικότητα και χαμηλό ρυθμό αποικοδόμησης, μπορεί να παρέχει στη χυτή μεμβράνη την επιθυμητή μηχανική σταθερότητα, καθώς και τον κατάλληλο χρόνο βιοαποικοδόμησης, ώστε να μπορεί να λειτουργήσει αποτελεσματικά ως φυσικός φραγμός έναντι της επιθηλιακής διείσδυσης στην περιοχή του περιοδοντίου, παρέχοντας τον απαραίτητο χρόνο στα περιοδοντικά κύτταρα να αναπτυχθούν (Basile et al., 2015). Η παρασκευή του εξωτερικού στρώματος επιτεύχθηκε με την τεχνική της χύτευσης με διαλύτη, μέσω της οποίας παρασκευάστηκε μία ομοιόμορφη μη πορώδης μεμβράνη με ικανοποιητικό πάχος, έπειτα από τη βελτιστοποίηση των πειραματικών συνθηκών αναφορικά με τη διαδικασία χύτευσης και τη σύσταση του πολυμερικού διαλύματος (συγκέντρωση πολυμερούς, είδος διαλύτη).

Για την παραγωγή των μεσαίων/εσωτερικών στρωμάτων των μεμβρανών, οι προσπάθειες εστιάστηκαν στην παραγωγή ηλεκτροϊονοποιημένων μικρο-/νανοϊνών από CG-Ca ή CG-Na, που όπως έχει αποδειχθεί μπορούν να ενισχύσουν την αναγέννηση των οστών (Dinoro et al., 2019; Goonoo et al., 2017). Επιπρόσθετα, για την σύνθεση των μεσαίων/εσωτερικών στρωμάτων των μεμβρανών μελετήθηκε η ηλεκτροϊονοποίηση του PG-Ca ώστε να λειτουργήσει ως πηγή ιόντων ασβεστίου. Το πολυ(L-γλουταμικό οξύ) συνιστά μία πολλά υποσχόμενη επιλογή για την δημιουργία καινοτόμων βιοϋλικών για οδοντιατρικές εφαρμογές καθώς η ικανότητα της πρωτεΐνης του σάλιου σταθερίνη να αποτρέπει την απομετάλλωση του σμάλτου των δοντιών και να λειτουργεί ως πηγή ιόντων ασβεστίου στην στοματική κοιλότητα αποδίδεται στην παρουσία μονάδων L-γλουταμικού οξέος (Parati et al., 2022).

Στα πλαίσια αυτά, διερευνήθηκε η δυνατότητα ηλεκτροϊονοποίησης των CG-Ca και CG-Na, καθώς και του PG-Ca σε διάφορες συγκεντρώσεις και πειραματικές συνθήκες χωρίς όμως την επιτυχή παραγωγή ινών. Για το σκοπό αυτό η ηλεκτροϊονοποίηση τους μελετήθηκε σε συνδυασμό με το υδρόφιλο συνθετικό πολυμερές PEO, ένα βιοαποικοδομήσιμο και μη τοξικό πολυμερές, το οποίο διαθέτει εξαιρετική ικανότητα ηλεκτροϊονοποίησης. Η βελτιστοποίηση των συνθηκών ηλεκτροϊονοποίησης οδήγησε στην επιτυχή παραλαβή νανοϊνών. Στη συνέχεια, αξιολογήθηκε η σταθερότητα των νανοϊνών σε διάλυμα προσομοίωσης σιέλου και επιβεβαιώθηκε ότι διατηρούν τη συνοχή τους για επαρκές χρονικό διάστημα. Από τους διάφορους συνδυασμούς που παρασκευάστηκαν, επιλέχθηκαν οι καλύτεροι με κριτήριο κυρίως την μορφολογία, την συνοχή και την σταθερότητα των παραγόμενων νανοϊνών.

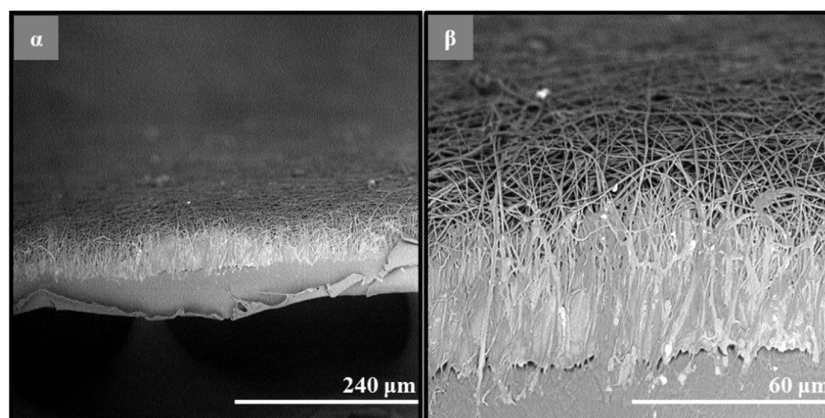
Ακολούθως, προκειμένου να μελετηθεί η ικανότητα των καρραγενανών να προάγουν την αναγέννηση του περιοδοντίου, αλλά και να διερευνηθεί κατά πόσο η παρουσία ιόντων ασβεστίου στις καρραγενάνες συμβάλει θετικά στις οστεοεπαγωγικές ιδιότητες της μεμβράνης, παρασκευάστηκε η τρι-στρωματική μεμβράνη GTR1, η οποία αποτελείται από ένα μεσαίο στρώμα νανοϊνών PG-Ca και ένα εσωτερικό στρώμα νανοϊνών CG-Ca, καθώς και η τρι-στρωματική μεμβράνη GTR2, η οποία αποτελείται από ένα μεσαίο στρώμα νανοϊνών PG-Ca και ένα εσωτερικό στρώμα νανοϊνών CG-Na.

Η μεμβράνη GTR1 που περιείχε CG-Ca εμφάνισε καλύτερες οστεοεπαγωγικές ιδιότητες και για αυτό επιχειρήθηκε η σύνθεση μίας πιο απλοποιημένης εκδοχής της τρι-στρωματικής μεμβράνης GTR1. Έτσι, παρασκευάστηκε η δι-στρωματική μεμβράνη GTR3, της οποίας το εσωτερικό στρώμα αποτελείται από νανοϊνες CG-Ca σε συνδυασμό με το PG-Ca.

Επόμενο βήμα ήταν να συγκριθεί η αποτελεσματικότητα της CG-Ca έναντι του PG-Ca ως προς την αναγέννηση του περιοδοντίου. Έτσι, παρασκευάστηκαν οι δι-στρωματικές μεμβράνες GTR4 και GTR5, των οποίων το εσωτερικό στρώμα αποτελείται από νανοϊνες CG-Ca ή από νανοϊνες PG-Ca, αντίστοιχα.

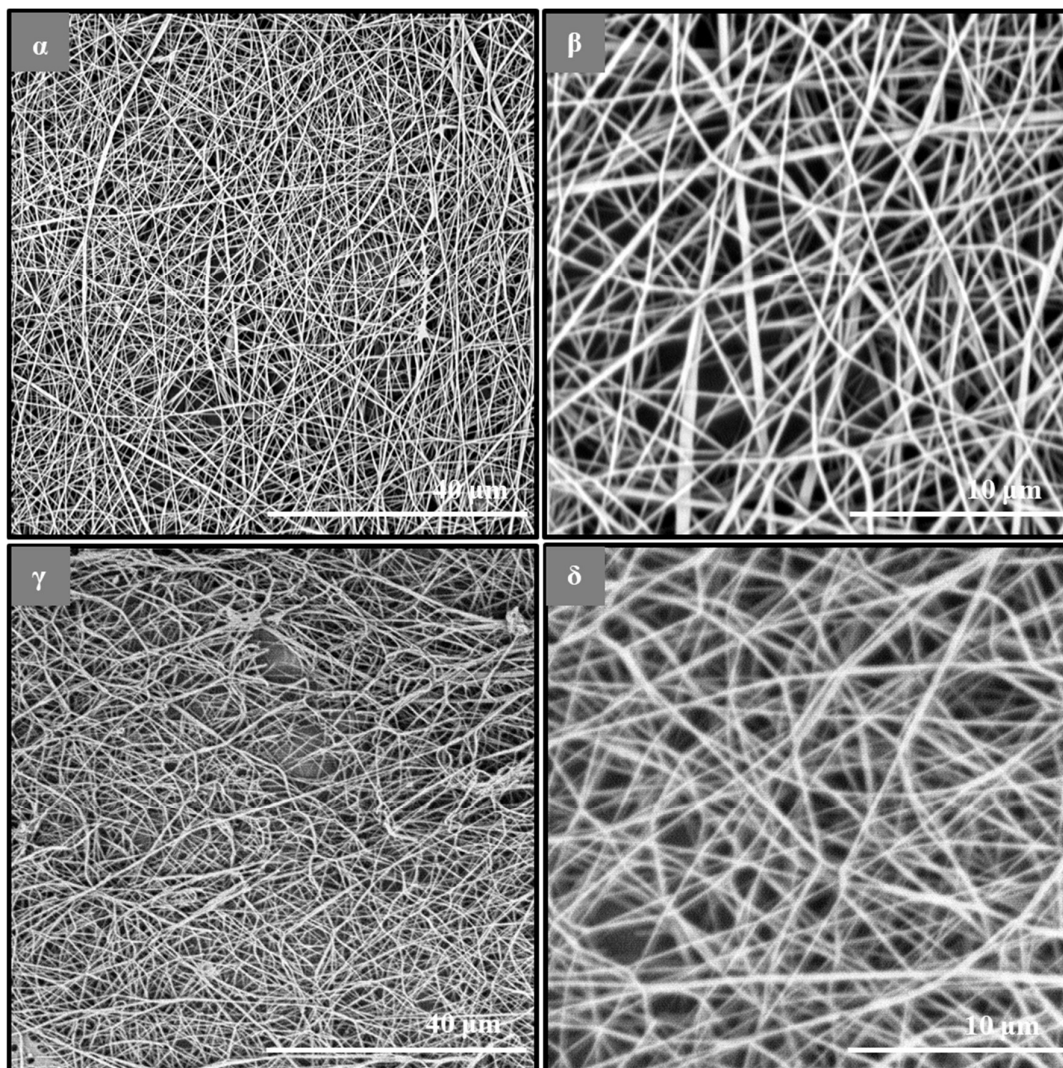
Για την παρασκευή του μεσαίου στρώματος των τρι-στρωματικών μεμβρανών και του εσωτερικού στρώματος των δι-στρωματικών μεμβρανών πραγματοποιήθηκε συν-ηλεκτροϊνοποίηση τα αντίστοιχων πολυμερών με την PCL προκειμένου να σχηματιστεί ένα σύνθετο δίκτυο ινών που θα μπορούσε να εξασφαλίσει την απαραίτητη συνοχή με το χυτό εξωτερικό στρώμα, ενισχύοντας παράλληλα τη σταθερότητα του νανοϊνώδους δικτύου σε ένα υδατικό περιβάλλον.

Η εξέταση των νανοϊνώδων μεμβρανών με ηλεκτρονική μικροσκοπία σάρωσης (SEM) έδειξε ότι δημιουργήθηκαν επιτυχώς νανοϊνες σε όλες τις περιπτώσεις των εξεταζόμενων συνδυασμών. Στην περίπτωση της χυτής μεμβράνης PCL (GTR0), επάνω στην οποία εναποτέθηκαν οι ηλεκτροϊνοποιημένες ίνες για την παραγωγή των τρι-στρωματικών και δι-στρωματικών μεμβρανών, απεδείχθη ότι δημιουργήθηκε με επιτυχία μία μη πορώδης ομοιόμορφη μεμβράνη. Το στρώμα των νανοϊνών είχε προσκολληθεί επιτυχώς στην επιφάνεια της χυτής μεμβράνης, όπως ενδεικτικά φαίνεται και από την εικόνα SEM της διατομής της δι-στρωματικής μεμβράνης GTR3 όπου ήταν εμφανές ότι σχηματίστηκε μία ομοιόμορφη δι-στρωματική δομή (Εικ. 52), με την επιφάνεια του χυτού εξωτερικού στρώματος να καλύπτεται από ένα πυκνό ινώδες δίκτυο.

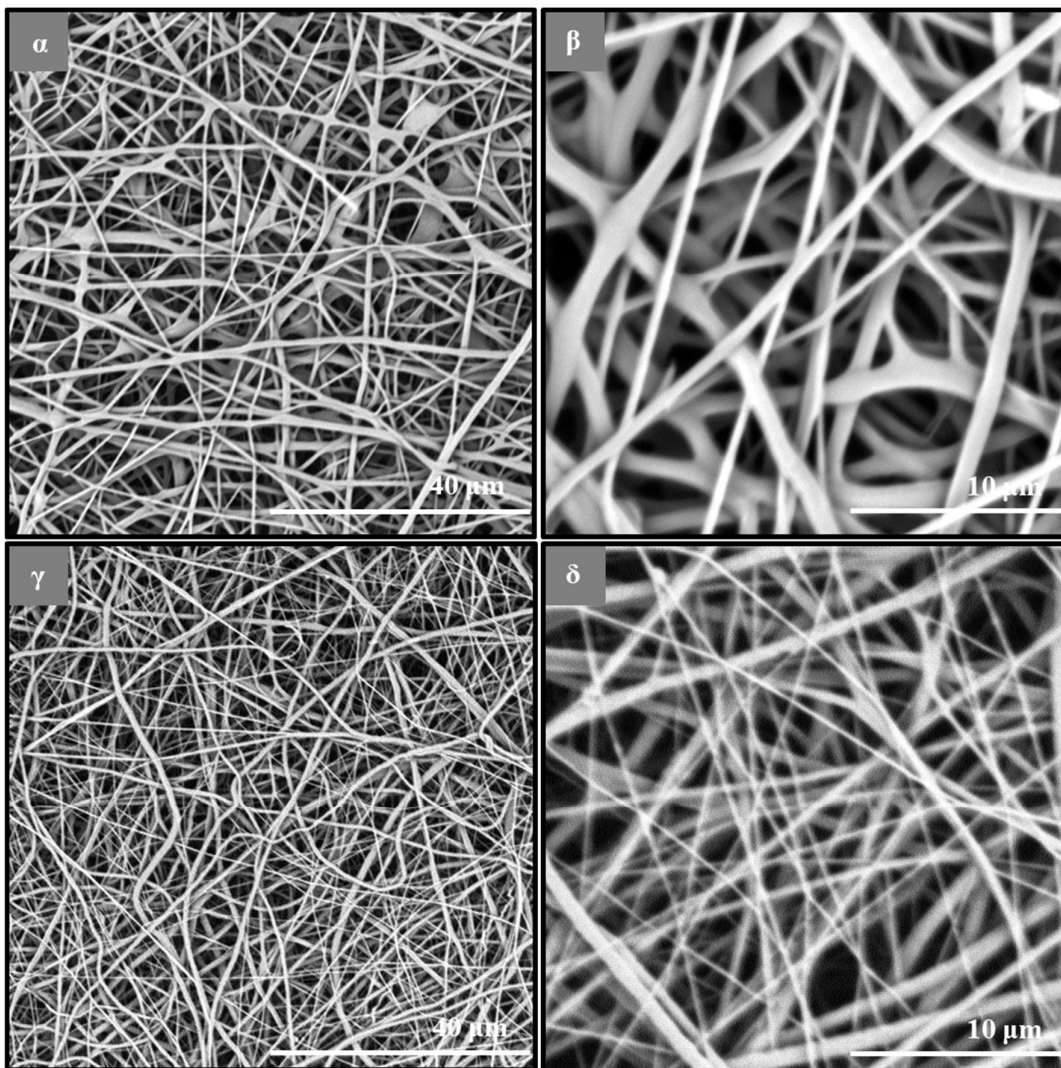


Εικόνα 52. Εικόνες SEM της διατομής της δι-στρωματικής μεμβράνης GTR3 (α) 500x μεγέθυνση (β) 2000x μεγέθυνση.

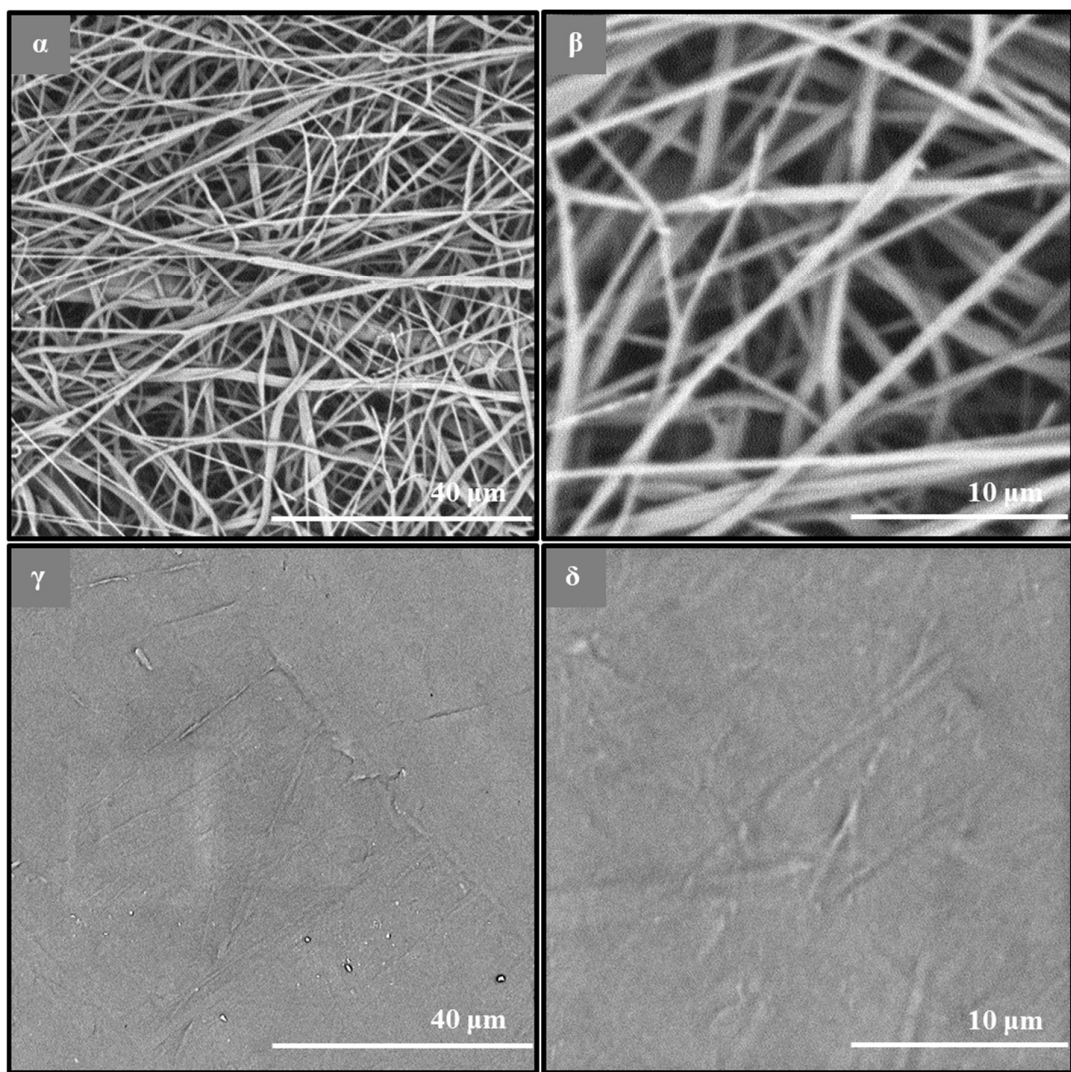
Σε όλες τις περιπτώσεις παρατηρήθηκε ότι σχηματίστηκε ένα ομοιόμορφο δίκτυο νανοϊνών κυλινδρικής μορφολογίας, με διαφορετικό μέγεθος ινών μεταξύ των διάφορων εξεταζόμενων συστημάτων, τόσο λόγω της διαφορετικής σύστασης των μεμβρανών όσο και λόγω των διαφορετικών συνθηκών ηλεκτροϋνοποίησης (Εικ. 53-55).



Εικόνα 53. Εικόνες SEM των εσωτερικών στρωμάτων των μεμβρανών GTR1 (α) 3000x μεγέθυνση (β) 10000x μεγέθυνση και GTR2 (γ) 3000x μεγέθυνση (δ) 10000x μεγέθυνση .



Εικόνα 54. Εικόνες SEM των εσωτερικών στρωμάτων των μεμβρανών GTR3 (α) 3000x μεγέθυνση (β) 10000x μεγέθυνση και GTR4 (γ) 3000x μεγέθυνση (δ) 10000x μεγέθυνση.



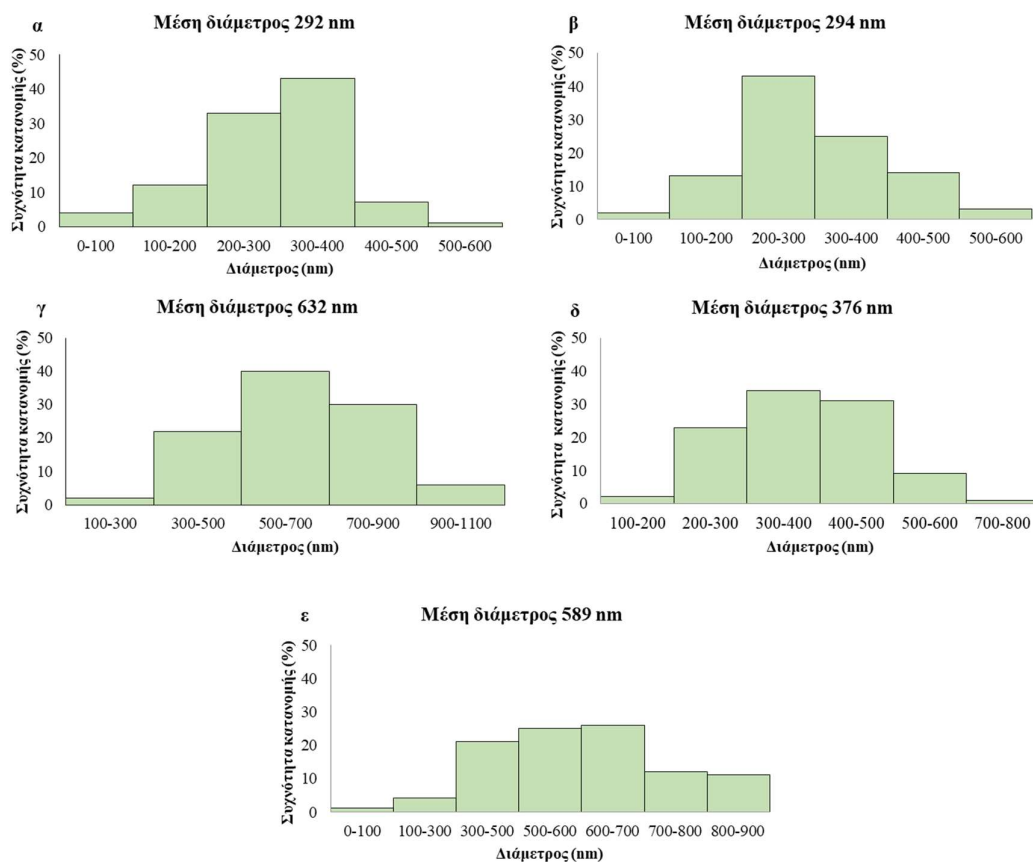
Εικόνα 55. Εικόνες SEM του εσωτερικού στρώματος της μεμβράνης GTR5 (α) 3000x μεγέθυνση (β) 10000x μεγέθυνση και της μεμβράνης GTR0 (γ) 3000x μεγέθυνση (δ) 10000x μεγέθυνση.

Η κατανομή των διαμέτρων και η μέση διάμετρος των ινών για κάθε σύστημα φαίνονται στον Πίν. 44 και στην Εικ. 56. Οι μεμβράνες GTR1 και GTR2, το εσωτερικό στρώμα των οποίων αποτελείται από ίνες CG-Ca/PEO και ίνες CG-Na/PEO, αντίστοιχα, εμφάνισαν το μικρότερο μέγεθος ινών από όλες τις μεμβράνες λόγω της απουσίας ινών PCL στο εσωτερικό στρώμα. Οι διαμέτροι των ινών της μεμβράνης GTR1 κυμαίνονταν από 43 έως 586 nm με μέση διάμετρο 292 ± 93 nm και της GTR2 από 54 έως 545 nm με μέση διάμετρο 294 ± 74 nm. Η μεμβράνη GTR3 εμφάνισε ίνες μεγαλύτερου μεγέθους, τόσο λόγω της παρουσίας των ινών PCL στο εσωτερικό της στρώμα όσο και λόγω των διαφορετικών συνθηκών ηλεκτροϊνοποίησης του διαλύματος CG-Ca/PG-Ca/PEO. Συγκεκριμένα, οι διαμέτροι των ινών της μεμβράνης GTR3

κυμαίνονταν από 154 έως 1180 nm με μέση διάμετρο 632 ± 176 nm. Η μεμβράνη GTR4 εμφάνισε ίνες μεγαλύτερου μεγέθους από την GTR1 λόγω της πλέξης των ινών CG-Ca/PEO με τις ίνες PCL, οι οποίες κυμαίνονταν από 131 έως 705 nm με μέση διάμετρο 376 ± 112 nm. Τέλος, οι διαμέτροι των ινών της μεμβράνης GTR5 κυμαίνονταν από 94 έως 899 nm με μέση διάμετρο 589 ± 137 nm.

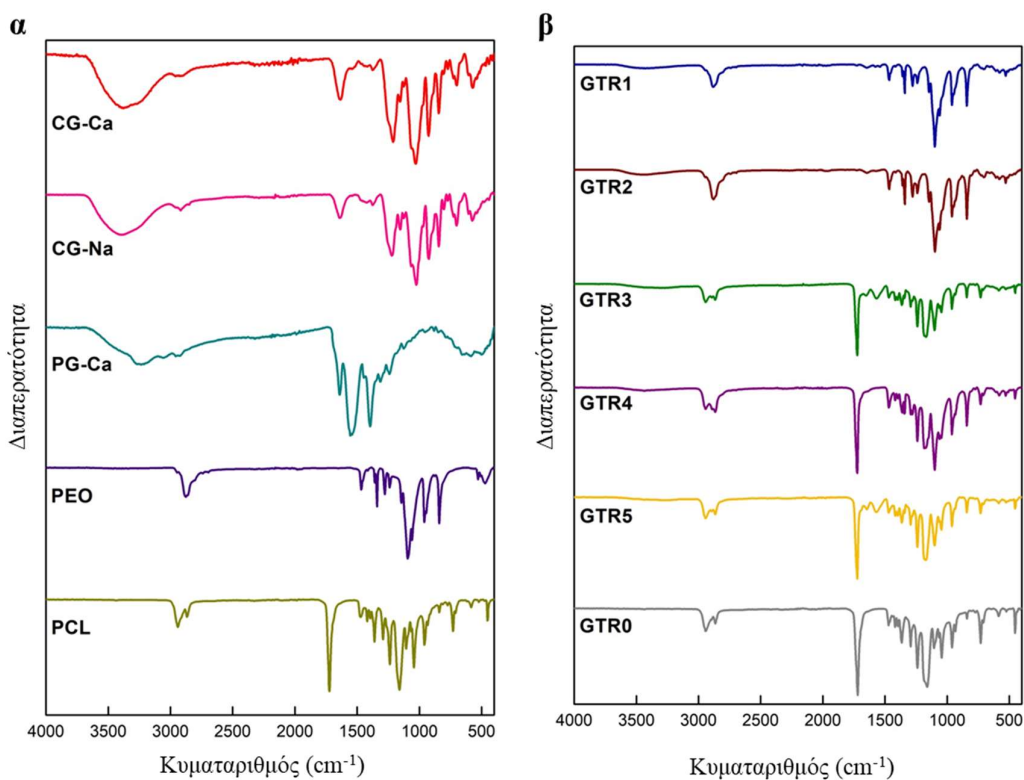
Πίνακας 44. Κατανομή του εύρους της διαμέτρου των ινών και μέση διάμετρος των ινών ($\pm$ SD) των ναοϊνώδων μεμβρανών.

Μεμβράνη	Εύρος διαμέτρου ινών (nm)	Μέση διάμετρος ινών $\pm$ SD (nm)
GTR1	43 - 586	292 ± 93
GTR2	54 - 545	294 ± 74
GTR3	154 - 1180	632 ± 176
GTR4	131 - 705	376 ± 112
GTR5	94 - 899	589 ± 137



Εικόνα 56. Ιστογράμματα κατανομής της διαμέτρου των ινών (α) GTR1, (β) GTR2, (γ) GTR3, (δ) GTR4 και (ε) GTR5.

Τα φάσματα FT-IR των πολυμερών CG-Ca, CG-Na, PG-Ca, PEO και PCL, καθώς και των παρασκευασθεισών μεμβρανών παρουσιάζονται στην Εικ. 57. Τα φάσματα FT-IR των πολυσακχαριτών CG-Ca και CG-Na έχουν αναλυθεί κατά την απομόνωση τους (βλ. 3.1.1). Το φάσμα FT-IR του PG-Ca εμφανίζει χαρακτηριστικές ταινίες απορρόφησης στα 3237 cm^{-1} που αποδίδεται σε αλληλεπικαλυπτόμενα σήματα των ομάδων OH και N-H , καθώς επίσης και στα 1642 cm^{-1} και 1553 cm^{-1} που αντιστοιχούν στα αμίδια I (C=O δόνηση τάσης) και II (N-H δόνηση κάμψης), αντίστοιχα, υποδεικνύοντας μία α-ελικοειδή διαμόρφωση (Nguyedn et al., 2021; Qamar et al., 2019). Το φάσμα FT-IR του PEO εμφανίζει μία χαρακτηριστική ταινία απορρόφησης στα 2878 cm^{-1} που οφείλεται σε δονήσεις τάσης των CH_2 , ενώ οι ταινίες απορρόφησης στα 1094 cm^{-1} και 961 cm^{-1} αποδίδονται σε δονήσεις τάσης της ομάδας C-O-C (Ionescu et al., 2021). Το φάσμα FT-IR της PCL εμφανίζει ασύμμετρες και συμμετρικές δονήσεις τάσης των CH_2 στα 2943 cm^{-1} και 2869 cm^{-1} , ενώ η παρουσία μίας πολύ ισχυρής ταινίας απορρόφησης στα 1726 cm^{-1} αποδίδεται σε δονήσεις τάσης της ομάδας C=O . Επιπλέον, οι ταινίες απορρόφησης στα 1292 cm^{-1} και 1160 cm^{-1} αποδίδονται σε δονήσεις τάσης των ομάδων C-O και C-C σε κρυσταλλική και άμορφη φάση, αντίστοιχα (Abdelrazek el at., 2016).

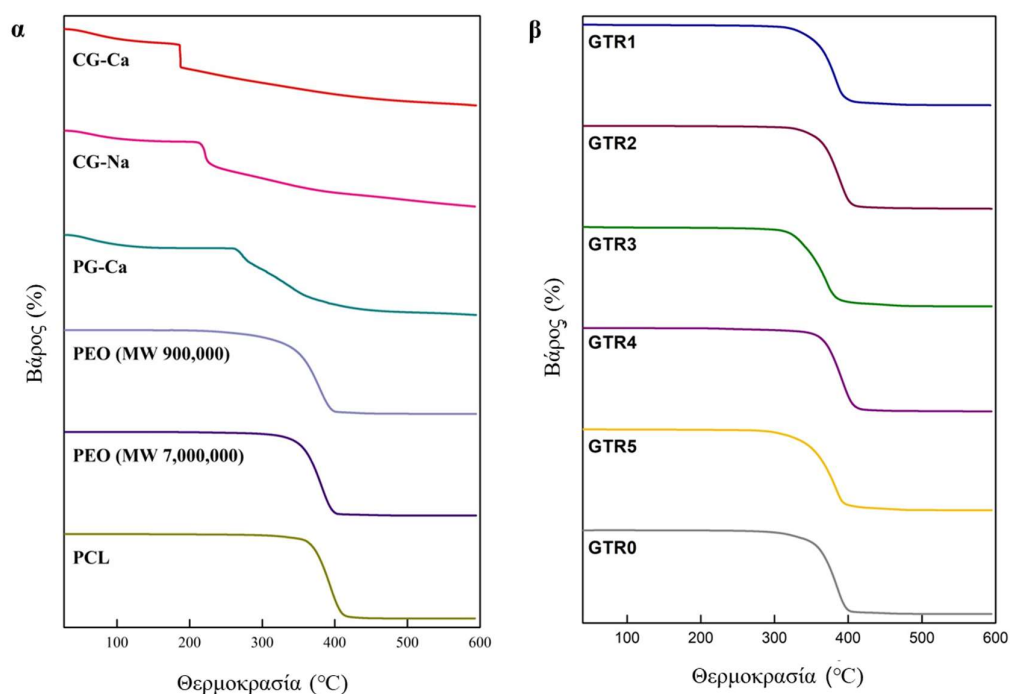


Εικόνα 57. Φάσματα FT-IR των CG-Ca, CG-Na, PG-Ca, PEO, PCL και των GTR μεμβρανών.

Τα φάσματα FT-IR των μεμβρανών που παράχθηκαν παρουσιάζουν κατά κύριο λόγο τις χαρακτηριστικές απορροφήσεις των συστατικών των εσωτερικών στρωμάτων. Αναλυτικότερα, στο φάσμα FT-IR της τρι-στρωματικής μεμβράνης GTR1 εμφανίζεται μία ευρεία ταινία απορρόφησης στα 3439 cm^{-1} , η οποία αποδίδεται σε δονήσεις τάσης των --OH της CG-Ca, ενώ η ταινία απορρόφησης στα 2883 cm^{-1} αποδίδεται σε δονήσεις τάσης των --CH_2 του PEO. Στο φάσμα FT-IR της τρι-στρωματικής μεμβράνης GTR2 εμφανίζεται μία ευρεία ταινία απορρόφησης στα 3439 cm^{-1} , η οποία αποδίδεται σε δονήσεις τάσης των --OH της CG-Na, ενώ η ταινία απορρόφησης στα 2880 cm^{-1} αποδίδεται σε δονήσεις τάσης των --CH_2 του PEO. Στο φάσμα FT-IR της GTR3 εμφανίζεται μία ευρεία ταινία απορρόφησης στα 3335 cm^{-1} που αποδίδεται σε δονήσεις τάσης των --OH της CG-Ca, η οποία πιθανόν αλληλεπικαλύπτεται με δονήσεις τάσης των ομάδων --OH και N--H του PG-Ca, ενώ η ταινία απορρόφησης στα 1568 cm^{-1} αποδίδεται αποκλειστικά σε δονήσεις κάμψης N--H του PG-Ca. Ακόμη, η ταινία απορρόφησης στα 2895 cm^{-1} αποδίδεται σε δονήσεις τάσης των --CH_2 του PEO, ενώ η παρουσία της PCL αποδεικνύεται από τις χαρακτηριστικές απορροφήσεις στα 2943 cm^{-1} και 2866 cm^{-1} που οφείλονται σε ασύμμετρες και συμμετρικές δονήσεις τάσης των --CH_2 , καθώς και στα 1725 cm^{-1} που αποδίδεται σε δόνηση τάσης της ομάδας --C=O . Στο φάσμα FT-IR της δι-στρωματικής μεμβράνης GTR4 εμφανίζεται μία ευρεία ταινία απορρόφησης στα 3439 cm^{-1} , η οποία αποδίδεται σε δονήσεις τάσης των --OH της CG-Ca, μία ταινία απορρόφησης στα 2892 cm^{-1} που οφείλεται σε δονήσεις τάσης των --CH_2 του PEO, ενώ στο υπόλοιπο φάσμα κυριαρχούν οι απορροφήσεις της PCL με πιο χαρακτηριστικές τις ισχυρές απορροφήσεις στα 2946 cm^{-1} και 2868 cm^{-1} που οφείλονται σε ασύμμετρες και συμμετρικές δονήσεις τάσης των --CH_2 και στα 1725 cm^{-1} που οφείλεται σε δονήσεις τάσης της ομάδας --C=O . Τέλος, στο φάσμα FT-IR της δι-στρωματικής μεμβράνης GTR5 η παρουσία του PG-Ca εντοπίζεται από τα αλληλεπικαλυπτόμενα σήματα των ομάδων N--H και O--H στα 3272 cm^{-1} και τις ταινίες απορρόφησης των αμιδίων I και II στα 1647 cm^{-1} (--C=O δόνηση τάσης) και στα 1570 cm^{-1} (N--H δόνηση κάμψης). Η ταινία απορρόφησης στα 2895 cm^{-1} αποδίδεται σε δονήσεις τάσης των --CH_2 του PEO, ενώ οι χαρακτηριστικές απορροφήσεις της PCL εμφανίζονται στα 2946 cm^{-1} , 2866 cm^{-1} (--CH_2 δονήσεις τάσης) και 1725 cm^{-1} (--C=O δόνηση τάσης). Τέλος, το φάσμα FT-IR της χυτής μεμβράνης (GTR0) εμφανίζει τα χαρακτηριστικά σήματα της PCL.

Τα θερμογραφήματα TGA των πολυμερών CG-Ca, CG-Na, PG-Ca, PEO και PCL, καθώς και των μεμβρανών που αναπτύχθηκαν παρουσιάζονται στην Εικ. 58.

Αναλυτικότερα, η CG-Ca εμφάνισε μία μικρή απώλεια βάρους έως τους 95°C που οφείλεται σε απώλεια υγρασίας και στη συνέχεια ένα κύριο στάδιο αποσύνθεσης που ξεκίνησε στους 186 °C και ολοκληρώθηκε στους 188 °C. Παρομοίως, η CG-Na εμφάνισε μία μικρή απώλεια βάρους έως τους 105 °C λόγω απώλεια υγρασίας και στη συνέχεια ένα κύριο στάδιο αποσύνθεσης, το οποίο άρχισε στους 215 °C και ολοκληρώθηκε στους 225°C. Όσον αφορά το PG-Ca, παρατηρήθηκε μία μικρή απώλεια υγρασίας έως τους 107 °C και στη συνέχεια ξεκίνησε η αποσύνθεση του στους 264 °C και ολοκληρώθηκε στους 414 °C. Επιπλέον, το PEO (MW 900,000) και το PEO (MW 7,000,000) εμφάνισαν παρόμοια θερμικά προφίλ με το στάδιο αποσύνθεσης τους να αρχίζει στους 341 °C και στους 347 °C, αντίστοιχα, και να ολοκληρώνεται στους 398 °C και στους 400 °C, αντίστοιχα. Τέλος, η αποσύνθεση της PCL άρχισε στους 365 °C και ολοκληρώθηκε στους 411 °C.



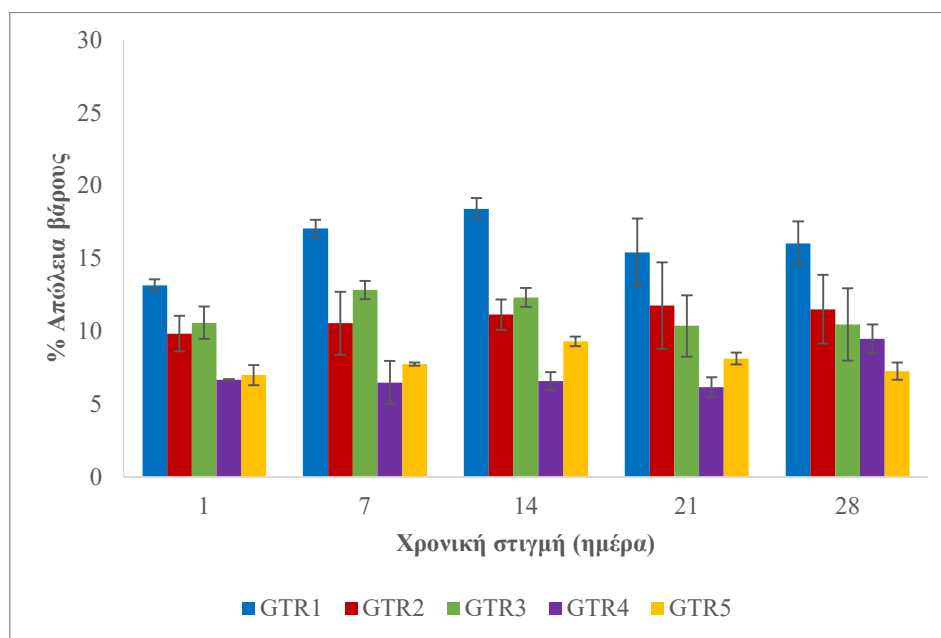
Εικόνα 58. Θερμογραφήματα TGA (α) των πολυμερών CG-Ca, CG-Na, PG-Ca, PEO, PCL και (β) των GTR μεμβρανών.

Όσον αφορά τις μεμβράνες, αυτές εμφάνισαν παρόμοια θερμικά προφίλ που χαρακτηρίζονται από ένα κύριο στάδιο αποσύνθεσης. Ειδικότερα, η αποσύνθεση της μεμβράνης GTR1 άρχισε στους 324 °C και ολοκληρώθηκε στους 400 °C, ενώ η μεμβράνη GTR2 άρχισε να αποσυντίθεται στους 348 °C και ολοκληρώθηκε στους 406

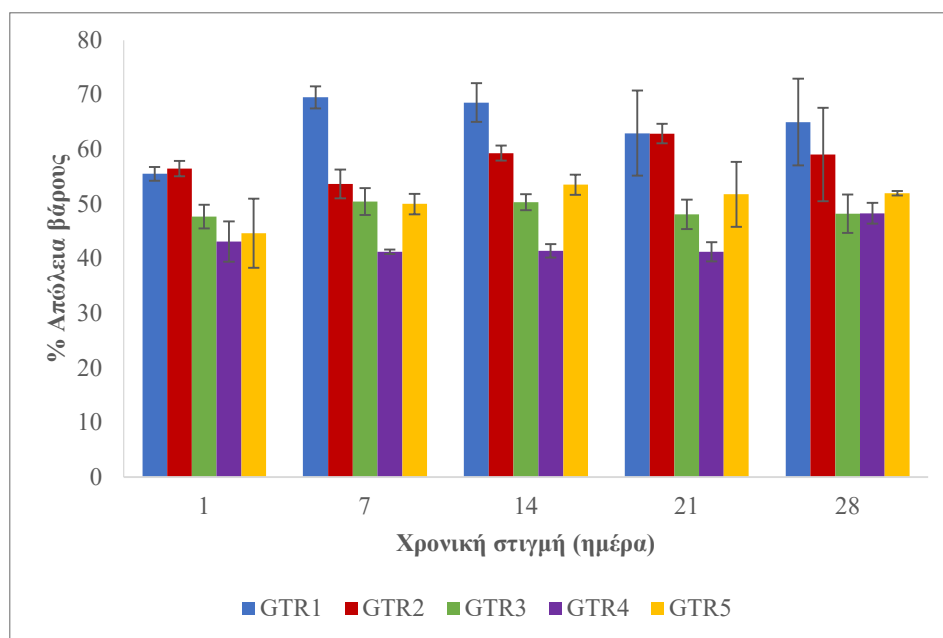
°C. Παρομοίως, το στάδιο αποσύνθεσης της GTR3 άρχισε στους 315 °C και ολοκληρώθηκε στους 390 °C, ενώ της μεμβράνης GTR4 ξεκίνησε στους 355 °C και ολοκληρώθηκε στους 412 °C. Τέλος, η αποσύνθεση της μεμβράνης GTR5 ξεκίνησε στους 310 °C και ολοκληρώθηκε στους 394 °C, ενώ η μεμβράνη GTR0 άρχισε να αποσυντίθεται στους 341 °C και ολοκληρώθηκε στους 400 °C. Η μετατοπισμένη σε υψηλότερες θερμοκρασίες αποσύνθεση των μεμβρανών σε σχέση με τις θερμοκρασίες αποσύνθεσης των CG-Ca, CG-Na και PG-Ca πιθανότατα οφείλεται στην κυρίαρχη παρουσία της PCL στο εξωτερικό τους στρώμα, ενώ οι διαφορές στις θερμοκρασίες αποσύνθεσης των μεμβρανών μπορούν να αποδοθούν σε συνεργιστικές αλληλεπιδράσεις των διαφορετικών συνδυασμών πολυμερών στη σύστασή τους.

3.3.2. Προσδιορισμός του ρυθμού αποικοδόμησης των GTR μεμβρανών

Ο ρυθμός με τον οποίο αποικοδομείται μία μεμβράνη κατευθυνόμενης ιστικής/οστικής αναγέννησης διαδραμάτιζει καίριο ρόλο στην αναγέννηση του περιοδοντίου, καθώς ο ρυθμός αποικοδόμησης της θα πρέπει να συμπίπτει με τον ρυθμό με τον οποίο σχηματίζεται νέος ιστός (Qasim et al., 2017). Για το λόγο αυτό, μελετήθηκε ο ρυθμός αποικοδόμησης των μεμβρανών σε διάλυμα προσομοίωσης σιέλου. Η εκατοστίαια απώλεια βάρους των παρασκευασθεισών μεμβρανών και του ινώδους πλέγματός τους συναρτήσει του χρόνου αποικοδόμησης παρουσιάζονται στις Εικ. 59-60.



Εικόνα 59. Μέση απώλεια βάρους ($\pm$ SD) των GTR μεμβρανών.

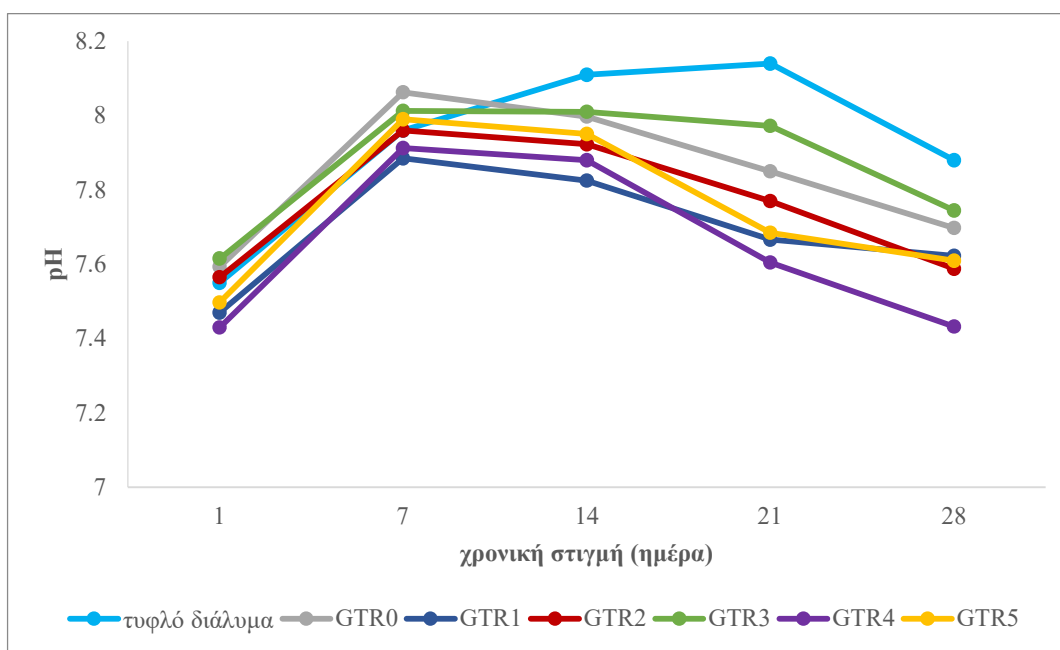


Εικόνα 60. Μέση απώλεια βάρους ($\pm$ SD) του νανοϊνώδους πλέγματος.

Όλες οι μεμβράνες παρουσίασαν μία μικρή απώλεια βάρους μέσα σε διάστημα 28 ημερών. Η μεμβράνη GTR0 δεν παρουσίασε καμία μεταβολή του βάρους της κατά την διάρκεια του πειράματος, αποδεικνύοντας ότι η απώλεια βάρους των μεμβρανών οφείλεται αποκλειστικά στην απώλεια βάρους του ινώδους πλέγματος τους. Αναλυτικότερα, η μεμβράνη GTR1 έχασε 13.14% του βάρους της την 1^η ημέρα και 16.74% έως και την 28^η ημέρα, ποσοστά που αναλογούν σε 55.54% και 66.65% απώλεια βάρους του ινώδους πλέγματος, αντίστοιχα. Η μεμβράνη GTR2 δεν εμφάνισε σημαντικές μεταβολές του βάρους της καθ' όλη την διάρκεια του πειράματος και έχασε μόλις 10.97% του βάρους της, ποσοστό που αναλογεί σε 58.31% απώλεια βάρους του ινώδους πλέγματος. Παρόμοια εικόνα παρουσίασε και η μεμβράνη GTR3, η οποία έχασε 11.32% του βάρους της καθ' όλη την διάρκεια του πειράματος, ποσοστό που αναλογεί σε 48.98% απώλεια βάρους του ινώδους πλέγματος. Η απώλεια βάρους της μεμβράνης GTR4 κυμάνθηκε σε 6.47% τις πρώτες 21 ημέρες και αυξήθηκε σε 9.50% την 28 ημέρα, ποσοστό που αναλογεί σε 41.78% και 48.34% απώλεια βάρους του ινώδους πλέγματος, αντίστοιχα. Τέλος, η μεμβράνη GTR5 δεν παρουσίασε σημαντικές μεταβολές του βάρους της κατά την διάρκεια του διαστήματος που μελετήθηκε και έχασε 7.89% του βάρους της, ποσοστό που αναλογεί σε 50.41% απώλεια βάρους του ινώδους πλέγματος. Σε όλες τις περιπτώσεις, οι μεμβράνες διατήρησαν την συνοχή τους

σε όλο το χρονικό διάστημα της μελέτης χωρίς να παρατηρηθούν φαινόμενα αποκόλλησης των ινωδών στρωμάτων από το εξωτερικό στρώμα.

Επιπρόσθετα, από την μέτρηση του pH των διαλυμάτων στα οποία είχαν εμβαπτιστεί οι μεμβράνες, καθώς και του διαλύματος προσομοίωσης σιέλου (τυφλό διάλυμα) προέκυψε ότι δεν μεταβλήθηκε ιδιαίτερα το pH τους κατά την διάρκεια του πειράματος αποικοδόμησης (Εικ. 61). Συγκεκριμένα, το pH των διαλυμάτων κυμάνθηκε από 7.4 έως 8.1 χωρίς να παρατηρούνται ιδιαίτερες διαφορές μεταξύ των διαφορετικών μεμβρανών. Συνέπως, κατά την διάρκεια της αποικοδόμησης των μεμβρανών δεν απελευθερώνεται κάποια ουσία που να μεταβάλλει σημαντικά το pH.



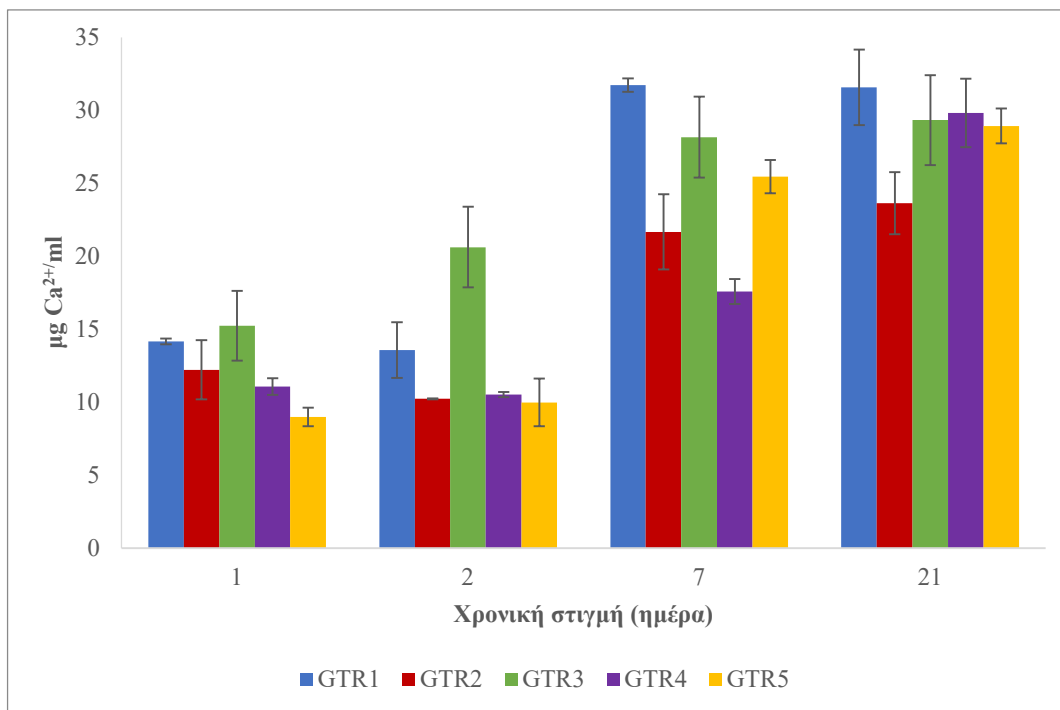
Εικόνα 61. Διακύμανση του pH των διαλυμάτων στα οποία είχαν εμβαπτιστεί οι μεμβράνες και του διαλύματος προσομοίωσης σιέλου (τυφλό διάλυμα).

3.3.3. Προσδιορισμός του ρυθμού αποδέσμευσης των ιόντων ασβεστίου από τις GTR μεμβράνες

Τα αποτελέσματα της μελέτης προσδιορισμού του ρυθμού αποδέσμευσης των ιόντων ασβεστίου από τις παρασκευασθείσες μεμβράνες παρουσιάζονται στον Πίν. 45 και στην Εικ. 62.

Πίνακας 45. Μέση ποσότητα ($\pm$ SD) ιόντων ασβεστίου που απελευθερώνεται από τις ναοϊνώδεις μεμβράνες.

Δείγμα	Χρονική στιγμή (ημέρα)	Μέση ποσότητα $\text{Ca}^{2+} \pm \text{SD}$ ($\mu\text{g/mL}$)
GTR1	1	14.18 ± 0.20
	2	13.57 ± 1.90
	7	31.73 ± 0.45
	21	31.57 ± 2.59
GTR2	1	12.22 ± 2.03
	2	10.23 ± 0.04
	7	21.68 ± 2.57
	21	23.64 ± 2.13
GTR3	1	15.24 ± 2.39
	2	20.63 ± 2.77
	7	28.17 ± 2.77
	21	29.34 ± 3.08
GTR4	1	11.08 ± 0.57
	2	10.52 ± 0.18
	7	17.59 ± 0.85
	21	29.82 ± 2.35
GTR5	1	8.99 ± 0.64
	2	9.99 ± 1.63
	7	25.47 ± 1.14
	21	28.93 ± 1.19



Εικόνα 62. Μέση ποσότητα ($\pm$ SD) ιόντων ασβεστίου που απελευθερώνεται από τις νανοϊνώδεις μεμβράνες.

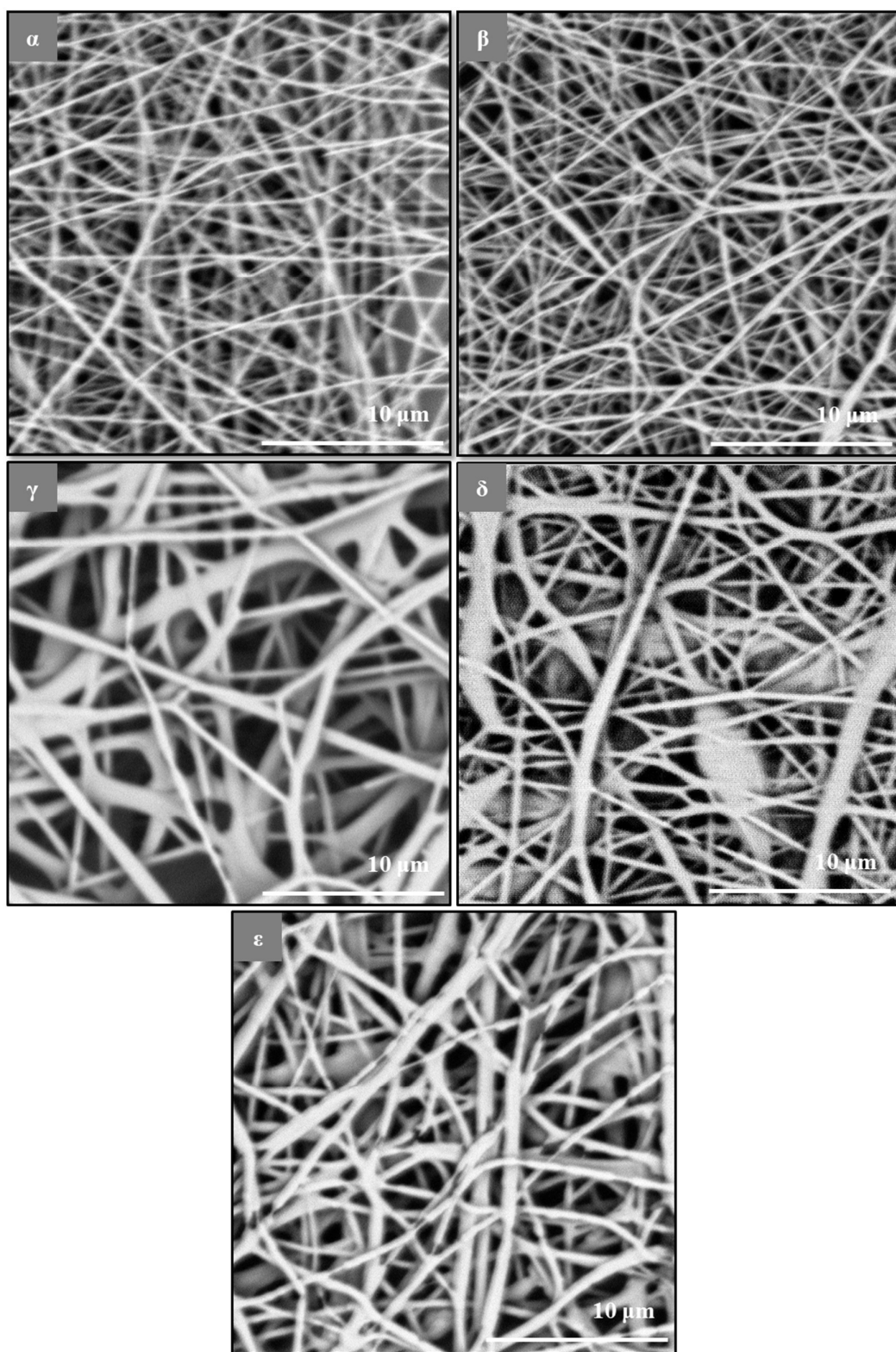
Όλες οι μεμβράνες εμφάνισαν σταδιακή αποδέσμευση ιόντων ασβεστίου για τουλάχιστον τρεις εβδομάδες και συνεπώς μπορούν δυνητικά να λειτουργήσουν ως συνεχής πηγή ιόντων ασβεστίου ώστε να συμβάλλουν στην αναγέννηση και την ανάπτυξη του περιοδοντίου. Αναλυτικότερα, η ποσότητα των ιόντων ασβεστίου που απελευθερώθηκε από τις παρασκευασθείσες μεμβράνες στο διάλυμα σιέλου την 1^η ημέρα κυμάνθηκε από 8.99 έως 15.24 $\mu\text{g}/\text{mL}$, με την δι-στρωματική μεμβράνη GTR3 να απελευθερώνει την μεγαλύτερη ποσότητα και την δι-στρωματική μεμβράνη GTR5 τη μικρότερη. Την 2^η ημέρα η ποσότητα των ιόντων ασβεστίου που απελευθερώθηκε από τις μεμβράνες ήταν σε παρόμοια επίπεδα με αυτά της 1^{ης} ημέρας και κυμάνθηκε από 9.99 έως 20.63 $\mu\text{g}/\text{mL}$, ενώ μόνο η δι-στρωματική μεμβράνη GTR3 παρουσίασε αύξηση απελευθερώνοντας και πάλι την μεγαλύτερη ποσότητα. Την 7^η ημέρα, όλες οι μεμβράνες παρουσίασαν αξιοσημείωτη αύξηση, με την ποσότητα του ασβεστίου που απελευθερώθηκε να κυμαίνεται από 17.59 έως 31.73 $\mu\text{g}/\text{mL}$, και την τρι-στρωματική μεμβράνη GTR1 να απελευθερώνει την μεγαλύτερη ποσότητα. Τέλος, την 21^η ημέρα η ποσότητα των ιόντων ασβεστίου που απελευθερώθηκε κυμάνθηκε από 23.64 έως 31.57 $\mu\text{g}/\text{mL}$, με την δι-στρωματική μεμβράνη GTR4 να εμφανίζει σημαντική αύξηση και την τρι-στρωματική μεμβράνη GTR1 να απελευθερώνει ξανά την μεγαλύτερη ποσότητα.

3.3.4. Ενσωμάτωση αντιβιοτικών στις GTR μεμβράνες

Ένας βασικός στόχος της περιοδοντικής θεραπείας είναι η καταστολή των παθογόνων αναερόβιων μικροοργανισμών που θεωρούνται υπεύθυνα για την έναρξη και την εξέλιξη της νόσου (Rajeshwari et al., 2019). Για το λόγο αυτό, διερευνήθηκε η δυνατότητα ενσωμάτωσης κάποιου αντιβιοτικού παράγοντα στις νανοϊνες των πολυστρωματικών μεμβρανών ώστε να λειτουργήσουν ως πηγή συνεχούς απελευθέρωσης του αντιβιοτικού στο περιβάλλον του περιοδοντικού θύλακα. Ο αντιβιοτικός παράγοντας που επιλέχθηκε αρχικά ήταν η μετρονιδαζόλη, καθώς θεωρείται ιδιαίτερα αποτελεσματική έναντι των παθογόνων αναερόβιων βακτηρίων της υποουλικής μικροβιακής χλωρίδας (Löfmark et al., 2010; Shi et al., 2014; Xue et al., 2014).

Στα πλαίσια αυτά, μελετήθηκε η δυνατότητα παραγωγής ηλεκτροϊνοποιημένων νανοϊνών με βάση τους πολυσακχαρίτες (CG-Ca και CG-Na) και τα πολυμερή (PG-Ca και PCL) που χρησιμοποιήθηκαν για την ανάπτυξη των GTR μεμβρανών, αλλά με ενσωματωμένη τη μετρονιδαζόλη. Η βελτιστοποίηση των συνθηκών ηλεκτροϊνοποίησης οδήγησε στην επιτυχή παραλαβή νανοϊνών και ακολούθησε η παρασκευή των πολυστρωματικών μεμβρανών με ενσωματωμένη τη μετρονιδαζόλη τόσο στις υδρόφοβες όσο και στις υδρόφιλες πολυμερικές ίνες.

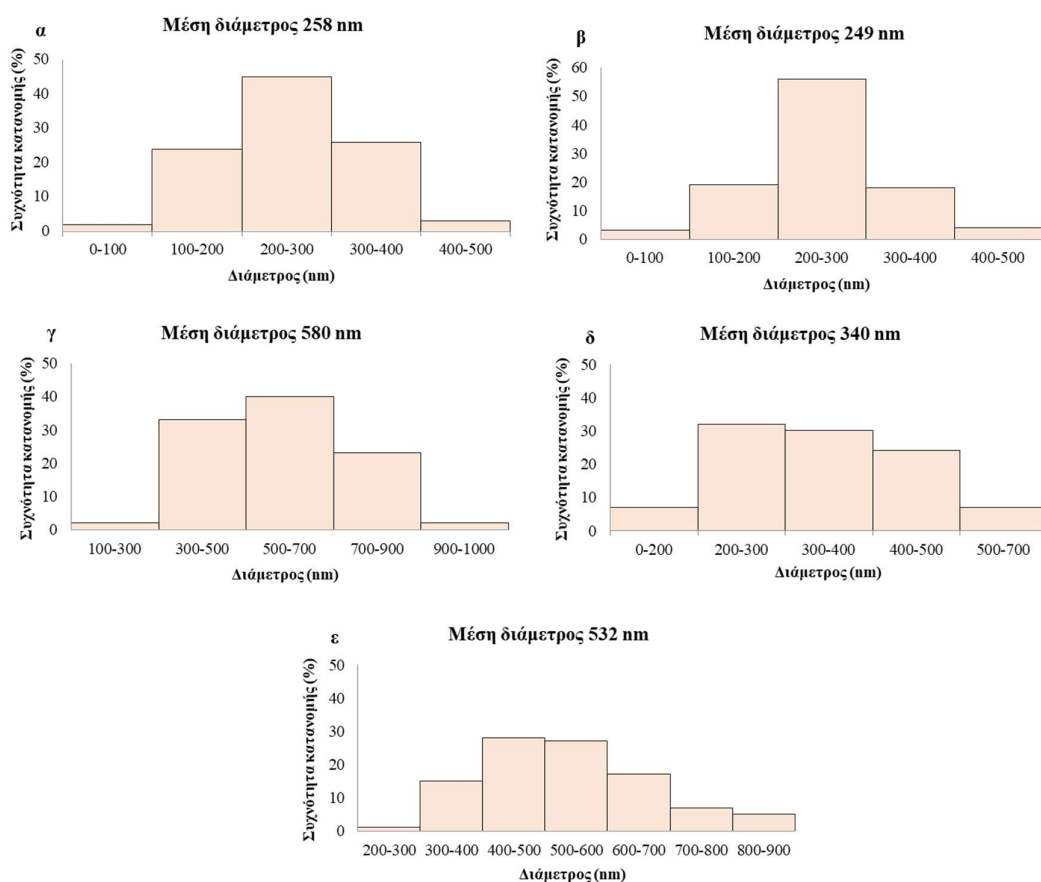
Η ανάλυση των παραχθέντων μεμβρανών με ηλεκτρονική μικροσκοπία σάρωσης (SEM) έδειξε ότι η ενσωμάτωση της μετρονιδαζόλης δεν επηρέασε αρνητικά την παραγωγή ινών, καθώς ένα ομοιόμορφο νανοϊνώδες πλέγμα ινών ελήφθη με επιτυχία σε όλες τις περιπτώσεις των ηλεκτροϊνοποιημένων μεμβρανών (Εικ. 63). Ωστόσο, οι προκύπτουσες δομές εμφάνισαν ίνες με ελαφρώς διαφορετική μορφολογία και μικρότερο μέγεθος ινών σε σύγκριση με τα αντίστοιχα συστήματα χωρίς την παρουσία μετρονιδαζόλης, τόσο λόγω της ενσωμάτωσης της μετρονιδαζόλης όσο και λόγω των διαφορετικών συνθηκών ηλεκτροϊνοποίησης. Η κατανομή των διαμέτρων και η μέση διάμετρος των ινών για κάθε σύστημα φαίνονται στον Πίν. 46 και στην Εικ. 64. Οι διαμέτροι των ινών της μεμβράνης GTR1-MET κυμαίνονταν από 75 έως 445 nm με μέση διάμετρο 258 ± 83 nm. Οι διαμέτροι των ινών της μεμβράνης GTR2-MET κυμαίνονταν από 51 έως 477 nm με μέση διάμετρο 249 ± 81 nm. Οι διαμέτροι των ινών της μεμβράνης GTR3-MET κυμαίνονταν από 135 έως 929 nm με μέση διάμετρο 580 ± 158 nm. Οι διαμέτροι των ινών της μεμβράνης GTR4-MET κυμαίνονταν από 47 έως 626 nm με μέση διάμετρο 340 ± 80 nm. Οι διαμέτροι των ινών της μεμβράνης GTR5-MET κυμαίνονταν από 234 έως 849 nm με μέση διάμετρο 532 ± 130 nm.



Εικόνα 63. Εικόνες SEM (x10000 μεγέθυνση) των εσωτερικών στρωμάτων των μεμβρανών (α) GTR1-MET, (β) GTR2-MET, (γ) GTR3-MET, (δ) GTR4-MET και (ε) GTR5-MET.

Πίνακας 46. Κατανομή του εύρους της διαμέτρου των ινών και μέση διάμετρος των ινών ($\pm$ SD) των νανοϊνών μεμβρανών.

Μεμβράνη	Εύρος διαμέτρου ινών (nm)	Μέση διάμετρος ινών $\pm$ SD (nm)
GTR1-MET	75 - 445	258 $\pm$ 83
GTR2-MET	51 - 477	249 $\pm$ 81
GTR3-MET	135 - 929	580 $\pm$ 158
GTR4-MET	47 - 626	340 $\pm$ 80
GTR5-MET	234 - 849	532 $\pm$ 130



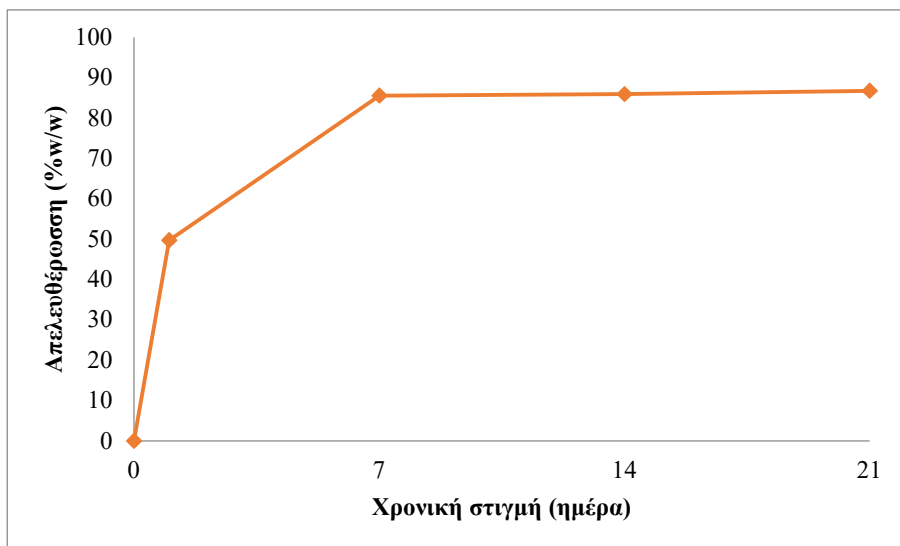
Εικόνα 64. Ιστογράμματα κατανομής της διαμέτρου των νανοϊνών μεμβρανών (α) GTR1-MET, (β) GTR2-MET, (γ) GTR3-MET, (δ) GTR4-MET και (ε) GTR5-MET.

Όλες οι νανοϊνώδεις μεμβράνες παρουσίασαν ταχεία αποδέσμευση της μετρονιδαζόλης με αποδέσμευση όλης της ποσότητας εντός 24 h. Ο γρήγορος ρυθμός με τον οποίο απελευθερώθηκε η μετρονιδαζόλη από τις παραγόμενες πολυστρωματικές μεμβράνες πιθανόν να επηρεάζεται από διάφορους παράγοντες, όπως από την υδροφιλικότητα τόσο της μετρονιδαζόλης όσο και των νανοϊνών, το μικρό μοριακό

βάρος της μετρονιδαζόλης, τις φυσικοχημικές αλληλεπιδράσεις που δημιουργούνται ανάμεσα στην μετρονιδαζόλη και τις μεμβράνες, αλλά και την μορφολογία των νανοϊνών (Bottino et al., 2014; Srithep et al., 2021).

Προκειμένου να παραχθεί ένα σύστημα με πιο αργή αποδέσμευση, μελετήθηκε η ενσωμάτωση του αντιβιοτικού παράγοντα στο εξωτερικό στρώμα των πολυστρωματικών μεμβρανών, καθώς τόσο ο υδρόφοβος χαρακτήρας της PCL όσο και η μη πορώδης επιφάνεια της χυτής μεμβράνης, θα μπορούσαν ενδεχομένως να παρατείνουν την απελευθέρωση του. Στα διερευνητικά πειράματα που ακολούθησαν προς αυτή την κατεύθυνση, εκτός από την ενσωμάτωση της μετρονιδαζόλης μελετήθηκε σαν εναλλακτική λύση και η ενσωμάτωση της υδροχλωρικής σιπροφλοξασίνης, η οποία είναι εξίσου αποτελεσματική στην καταπολέμηση των περιοπαθογόνων βακτηρίων (Bottino et al., 2014). Δεδομένου ότι η μετρονιδαζόλη εμφάνισε και σε αυτή τη περίπτωση ταχύ ρυθμό αποδέσμευσης, κρίθηκε σκόπιμο η συνέχεια της μελέτης να διεξαχθεί με την υδροχλωρική σιπροφλοξασίνη, η οποία εμφάνισε ενθαρρυντικά αποτελέσματα.

Το ποσοστό ενσωμάτωσης της υδροχλωρικής σιπροφλοξασίνης στην χυτή μεμβράνη PCL που παρασκευάστηκε με 5% w/w υδροχλωρική σιπροφλοξασίνη στο πολυμερικό διάλυμα (ως προς το βάρος του πολυμερούς) ήταν 51.75% w/w. Ο ρυθμός αποδέσμευσης της υδροχλωρικής σιπροφλοξασίνης από την χυτή μεμβράνη PCL συναρτήσει του χρόνου παρουσιάζεται στην Εικ. 65. Την 1^η ημέρα η χυτή μεμβράνη PCL εμφάνισε ταχεία απελευθέρωση της υδροχλωρικής σιπροφλοξασίνης, οπότε και απελευθερώθηκε το 49.73% w/w της ενσωματωμένης ποσότητας, και ακολούθησε σταδιακή απελευθέρωση έως την 7^η ημέρα, οπότε και απελευθερώθηκε το 85.57% w/w, ποσοστό το οποίο παρέμεινε σχεδόν σταθερό έως την 21^η ημέρα. Η γρήγορη αποδέσμευση της υδροχλωρικής σιπροφλοξασίνης την 1^η ημέρα είναι πιθανόν να οφείλεται στην αρχική αποδέσμευση μέρους της ποσότητας της που είχε εναποτεθεί στην επιφάνεια της μεμβράνης, ενώ η βραδύτερη αποδέσμευση που ακολούθησε μπορεί να οφείλετε στη ποσότητα της που έχει ενσωματωθεί στο εσωτερικό της.



Εικόνα 65. Ρυθμός απελευθέρωσης της υδροχλωρικής σιπροφλοξασίνης από την χυτή μεμβράνη PCL.

Οι διαφορές που παρατηρήθηκαν στον ρυθμό απελευθέρωσης ανάμεσα στην μετρονιδαζόλη και στην υδροχλωρική σιπροφλοξασίνη είναι πιθανό να οφείλονται και στο διαφορετικό μοριακό βάρος των αντιβιοτικών, καθώς το μοριακό βάρος της υδροχλωρικής σιπροφλοξασίνης (367.8 g/mol) είναι σχεδόν διπλάσιο από αυτό της μετρονιδαζόλης (171.16 g/mol) (Bottino et al., 2013).

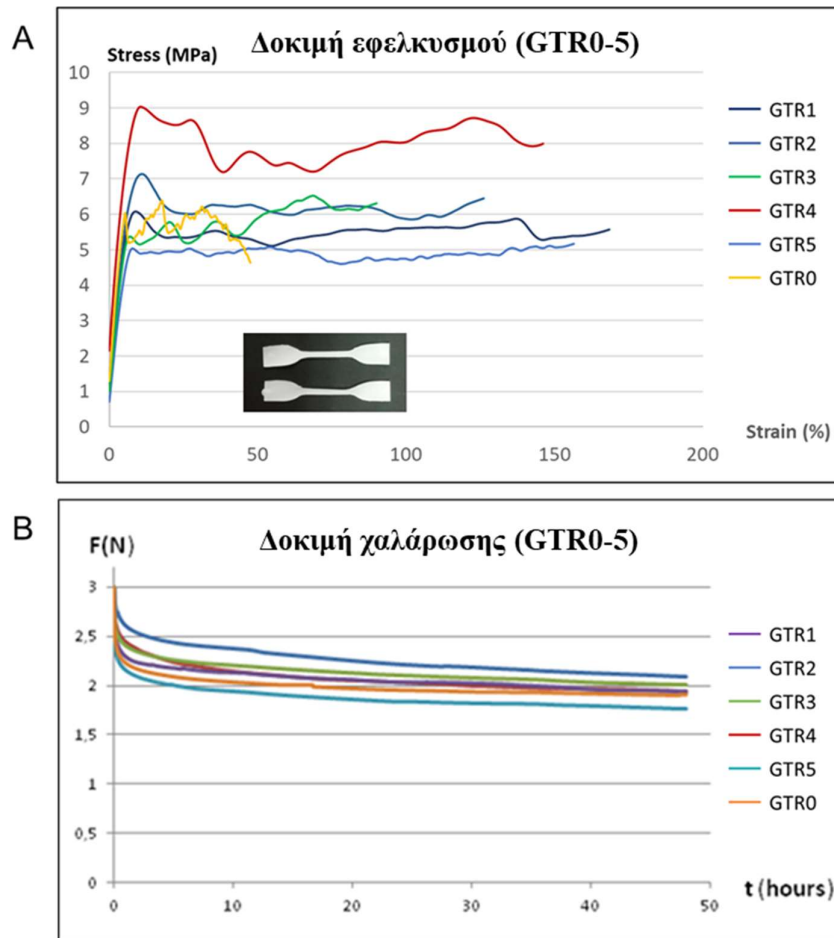
3.3.5. Αξιολόγηση των μηχανικών ιδιοτήτων των GTR μεμβρανών

Μελετήθηκαν οι χρονικά ανεξάρτητες και οι χρονικά εξαρτώμενες μηχανικές ιδιότητες των παρασκευασθεισών μεμβρανών μέσω δοκιμών εφελκυσμού και χαλάρωσης (Πίν. 47).

Πίνακας 47. Μηχανικές ιδιότητες των παρασκευασθεισών μεμβρανών (μέση τιμή και τυπική), όπου E είναι το μέτρο ελαστικότητας, UTS η αντοχή στον εφελκυσμό, Strain είναι η πλαστική παραμόρφωση και RAS η εκατοστιαία μείωση της αρχικής δύναμης υπό συνεχή τάση. Η παρουσία διαφορετικών συντομογραφικών γραμμάτων υποδεικνύει στατιστικά σημαντικές διαφορές μεταξύ των μέσων τιμών των ομάδων ($p < 0.05$).

Μεμβράνη	E (MPa)	UTS (MPa)	Strain (%)	RAS (%)
GTR1	117.6 (13.6) ^{ABC}	7.6 (0.4) ^C	78 [72, 120] ^{ABC}	32.2 (2.2) ^A
GTR2	118.4 (15.7) ^{AB}	9.6 (1.6) ^A	138 [136, 320] ^A	34.1 (5.7) ^A
GTR3	90.5 (8.2) ^{AB}	5.6 (0.4) ^B	100 [89, 118] ^{ABC}	37.0 (3.6) ^A
GTR4	88.0 (20.9) ^C	5.9 (1.2) ^{BC}	150 [96, 159] ^{AB}	33.4 (4.8) ^A
GTR5	128.3 (26.8) ^B	6.5 (1.1) ^{BC}	70 [59, 86] ^{BC}	37.7 (2.3) ^A
GTR0	97.3 (12.3) ^{AC}	5.7 (1.1) ^B	45 [36, 53] ^C	33.3 (6.3) ^A

Στην Εικ. 66Α παρουσιάζονται οι καμπύλες τάσης-παραμόρφωσης των δειγμάτων υπό εφελκυστική φόρτιση μέχρι την θραύση και στην Εικ. 66Β παρουσιάζονται οι καμπύλες μείωσης της δύναμης με την πάροδο του χρόνου (χαλάρωση).



Εικόνα 66. (Α) Καμπύλες τάσης παραμόρφωσης υπό εφελκυστική φόρτιση και ένθετη εικόνα δειγμάτων μεμβρανών σε σχήμα λαιμού φιάλης που χρησιμοποιήθηκαν για τη δοκιμή εφελκυσμού. (Β) Καμπύλες χαλάρωσης (μείωση της δύναμης με την πάροδο του χρόνου) για όλες τις παρασκευασθείσες μεμβράνες.

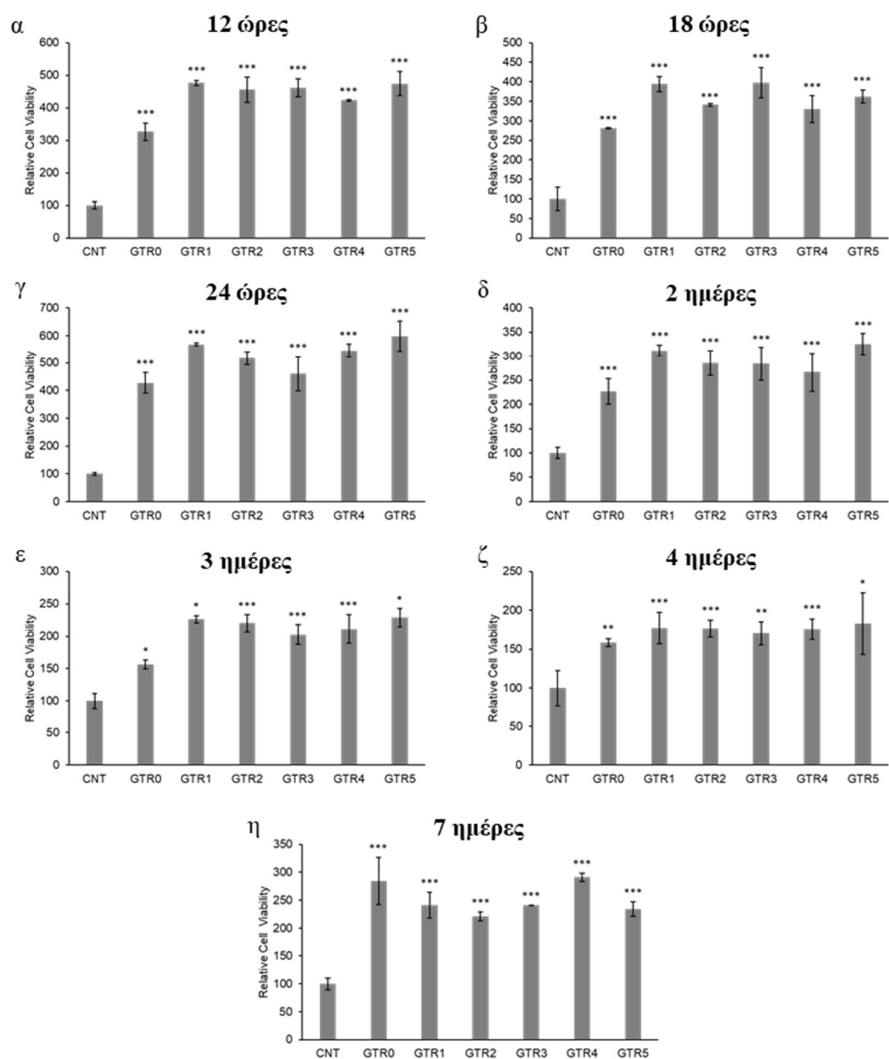
Μόνο η μεμβράνη GTR5 παρουσίασε σημαντικά υψηλότερη τιμή μέτρου ελαστικότητας σε σχέση με την GTR0, ενώ οι GTR1 και GTR2 μεμβράνες εμφάνισαν την υψηλότερη αντοχή στον εφελκυσμό σε σχέση με την GTR0. Όλες οι μεμβράνες (GTR1-5) παρουσίασαν αυξημένη πλαστική παραμόρφωση σε σχέση με την GTR0, με τις μεμβράνες GTR2 και GTR4 να εμφανίζουν σημαντικές διαφορές σε σχέση με την GTR0. Τα αποτελέσματα από τις δοκιμές εφελκυσμού έδειξαν ότι η εναπόθεση

επιπλέον στρωμάτων ινών στην χυτή μεμβράνη PCL βελτιώνει τις μηχανικές ιδιότητες που μελετήθηκαν με πιο εμφανή την αύξηση της πλαστικής παραμόρφωσης. Επιπλέον, η αρχική αντοχή των παρασκευασθεισών GTR μεμβρανών είναι συγκρίσιμη με εμπορικά διαθέσιμες απορροφήσιμες μεμβράνες από συνθετικά πολυμερή ή κολλαγόνο που χρησιμοποιούνται στην κλινική πρακτική εδώ και χρόνια. Πιο συγκεκριμένα, η μέση τιμή αντοχής στον εφελκυσμό (UTS) των μεμβρανών κυμαινόταν από 5.6 έως 9.6 MPa, τιμές παρόμοιες με την μεμβράνη πολυ-(DL-γαλακτικού-γλυκολικού οξέος) Resolut XT (11.7 MPa).

Τέλος, όσον αφορά την μελέτη χαλάρωσης δεν παρατηρήθηκαν σημαντικές διαφορές ανάμεσα στις παρασκευασθείσες GTR μεμβράνες. Η εκατοστιαία μείωση της αρχικής δύναμης υπό συνεχή καταπόνηση σε 48 h έφτασε το 35%, το οποίο υποδηλώνει ότι παραμένουν επαρκείς δυνάμεις και μετά από 48 h. Η απουσία στατιστικά σημαντικών διαφορών ανάμεσα στις μεμβράνες δείχνει ότι η προσθήκη επιπλέον στρωμάτων στις μεμβράνες δεν επηρεάζει την χρονικά εξαρτώμενη χαλάρωση.

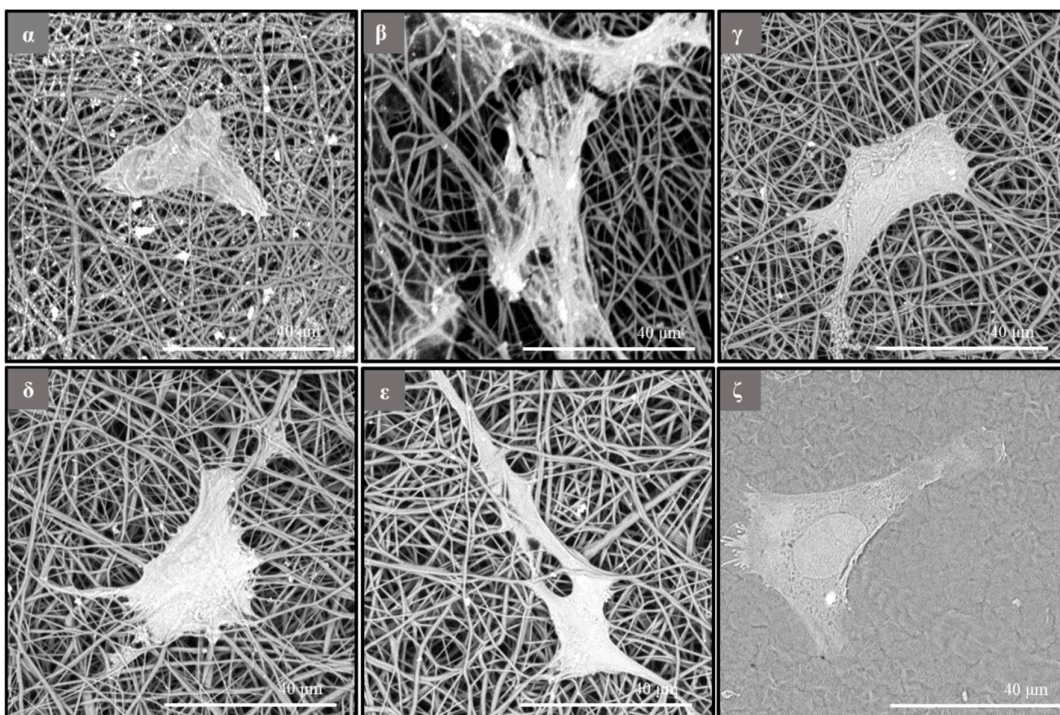
3.3.6. Αξιολόγηση της ανάπτυξης και της προσκόλλησης κυττάρων περιοδοντίου στις GTR μεμβράνες

Η βιοσυμβατότητα των παρασκευασθεισών μεμβρανών αξιολογήθηκε *in vitro* χρησιμοποιώντας ανθρώπινα κύτταρα περιοδοντίου (PDL) που απομονώθηκαν από τον περιοδοντικό σύνδεσμο υγιών δοντιών. Τα αποτελέσματα που προέκυψαν από την αξιολόγηση με τη χρωματομετρική μέθοδο MTT κατά τη 1^η έως την 7^η ημέρα έδειξαν ότι όλες οι μεμβράνες ήταν ικανές να προάγουν την ανάπτυξη και τον πολλαπλασιασμό των κυττάρων PDL. Πιο συγκεκριμένα, τις πρώτες 12, 18 και 24 h ο πολλαπλασιασμός των κυττάρων σε όλες τις μεμβράνες ήταν σημαντικά αυξημένος σε σχέση με το δείγμα ελέγχου (κύτταρα PDL που αναπτύχθηκαν σε απλή πλάκα καλλιέργειας). Επιπλέον, παρατηρήθηκε αυξημένος κυτταρικός πολλαπλασιασμός σε όλες τις μεμβράνες GTR κατά την 2^η, 3^η, 4^η και 7^η ημέρα (Εικ. 67).



Εικόνα 67. Πολλαπλασιασμός κυττάρων PDL στις GTR μεμβράνες. Οι ράβδοι αντιπροσωπεύουν την μέση τιμή $\pm$ τυπική απόκλιση της σχετικής κυτταρικής βιωσιμότητας κατά τις πρώτες 7 ημέρες καλλιέργειας σε σύγκριση με το δείγμα ελέγχου (CNT). Τα πειράματα πραγματοποιήθηκαν σε 3 επαναλήψεις. Students' t-test, * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$.

Επιπλέον, εξετάστηκε η προσκόλληση των κυττάρων PDL στις παρασκευασθείσες μεμβράνες με SEM. Τρεις ημέρες μετά την απόθεση τους, τα κύτταρα εμφάνισαν πεπλατυσμένο σχήμα και προσκολλήθηκαν σε όλες τις GTR μεμβράνες, συμπεριλαμβανομένης και της χυτής μεμβράνης (GTR0) (Εικ. 68).

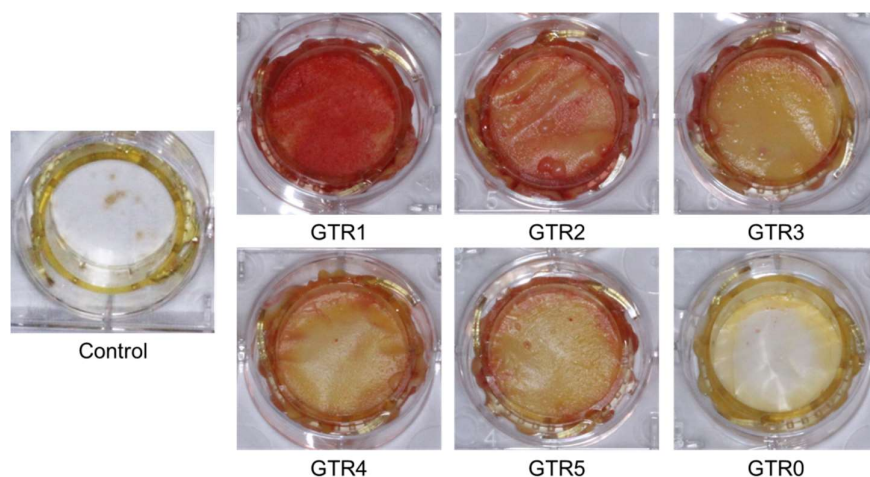


Εικόνα 68. Εικόνες SEM κυττάρων στις μεμβράνες (α) GTR1, (β) GTR2, (γ) GTR3, (δ) GTR4, (ε) GTR5 και (ζ) GTR0 τρεις ημέρες μετά την έναρξη της καλλιέργειας.

3.3.7. Αξιολόγηση των GTR μεμβρανών ως προς την οστεοεπαγωγή των περιοδοντικών κυττάρων

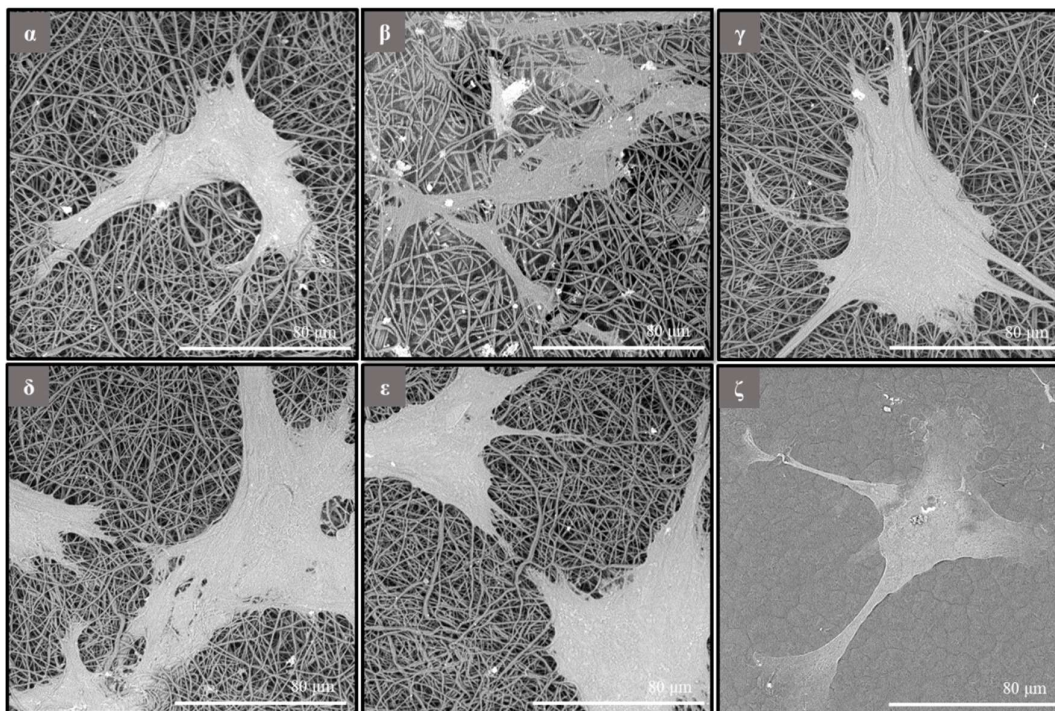
Τα αποτελέσματα από τον προσδιορισμό του ρυθμού απελευθέρωσης των ιόντων ασβεστίου από τις παρασκευασθείσες μεμβράνες έδειξαν ότι οι μεμβράνες μπορούν να λειτουργήσουν ως πηγή ιόντων ασβεστίου για τουλάχιστον 3 εβδομάδες, ευνοώντας τον πολλαπλασιασμό των οστεοβλαστών και την αναγέννηση του οστού. Ακολούθως, μελετήθηκε η ικανότητα των μεμβρανών να προάγουν την οστεοεπαγωγή των κυττάρων PDL σε οστεοεπαγωγικό μέσο.

Η χρώση των κυττάρων PDL με ερυθρό της αλιζαρίνης μετά από 1 εβδομάδα παραμονής σε οστεοεπαγωγικό μέσο έδειξε ότι οι μεμβράνες GTR1-5 ήταν ικανές να προάγουν την οστεοεπαγωγή των κυττάρων PDL νωρίτερα, σε σύγκριση με την GTR0 και την πλάκα ελέγχου (Εικ. 69). Η σχετική ικανότητα με την οποία οι GTR μεμβράνες προάγουν την διαδικασία της οστεοεπαγωγής είναι $GTR1 > GTR2 > GTR3 = GTR4 = GTR5$. Ωστόσο, η παρατεταμένη απελευθέρωση των ιόντων ασβεστίου από τις μεμβράνες δεν επέτρεψε τον ποσοτικό προσδιορισμό της οστεοεπαγωγής με βάση τη χρώση με το ερυθρό της αλιζαρίνης.



Εικόνα 69. Εικόνες χρώσης των μεμβρανών και του δείγματος ελέγχου με ερυθρό της αλιζαρίνης μετά την καλλιέργεια των κυττάρων PDL για 7 ημέρες σε οστεοεπαγωγικό μέσο.

Η προσκόλληση των κυττάρων PDL στις GTR μεμβράνες κατά την διάρκεια της οστεοεπαγωγής ήταν εμφανής και μέσω ηλεκτρονικής μικροσκοπίας σάρωσης (Εικ. 70).



Εικόνα 70. Εικόνες SEM των κυττάρων PDL στις μεμβράνες (α) GTR1, (β) GTR2, (γ) GTR3 (δ) GTR4 (ε) GTR5 και (ζ) GTR0 μετά από καλλιέργεια 4 ημερών σε οστεογονικό μέσο.

Προκειμένου να διερευνηθούν οι μοριακές αλλαγές που συμβαίνουν κατά την διάρκεια της 1^{ης} εβδομάδας οστεοεπαγωγής σε κύτταρα PDL, τα οποία είχαν τοποθετηθεί στις μεμβράνες GTR, προσδιορίστηκαν τα επίπεδα έκφρασης των γονιδίων που εμπλέκονται στην διαδικασία της οστεοεπαγωγής την 3^η και 7^η ημέρα μετά την επαγωγή.

Αναλυτικότερα, μετρήθηκε η έκφραση της αλκαλικής φωσφατάσης (ALP) η οποία εκφράζεται από οστεοπρογονικούς σε ανώριμους οστεοβλάστες, της οστεοκαλσίνης (OCN) που είναι δείκτης ώριμων οστεοβλαστών, του μεταγραφικού ρυθμιστή RUNX2 (runt-related transcription factor 2), η έκφραση του οποίου αυξάνεται κατά την οστεοβλαστική διαφοροποίηση και μειώνεται σε ώριμους οστεοβλάστες, και του κολλαγόνου τύπου I α1 αλυσίδες (COL1A) που εκφράζεται σε ανώριμους οστεοβλάστες.

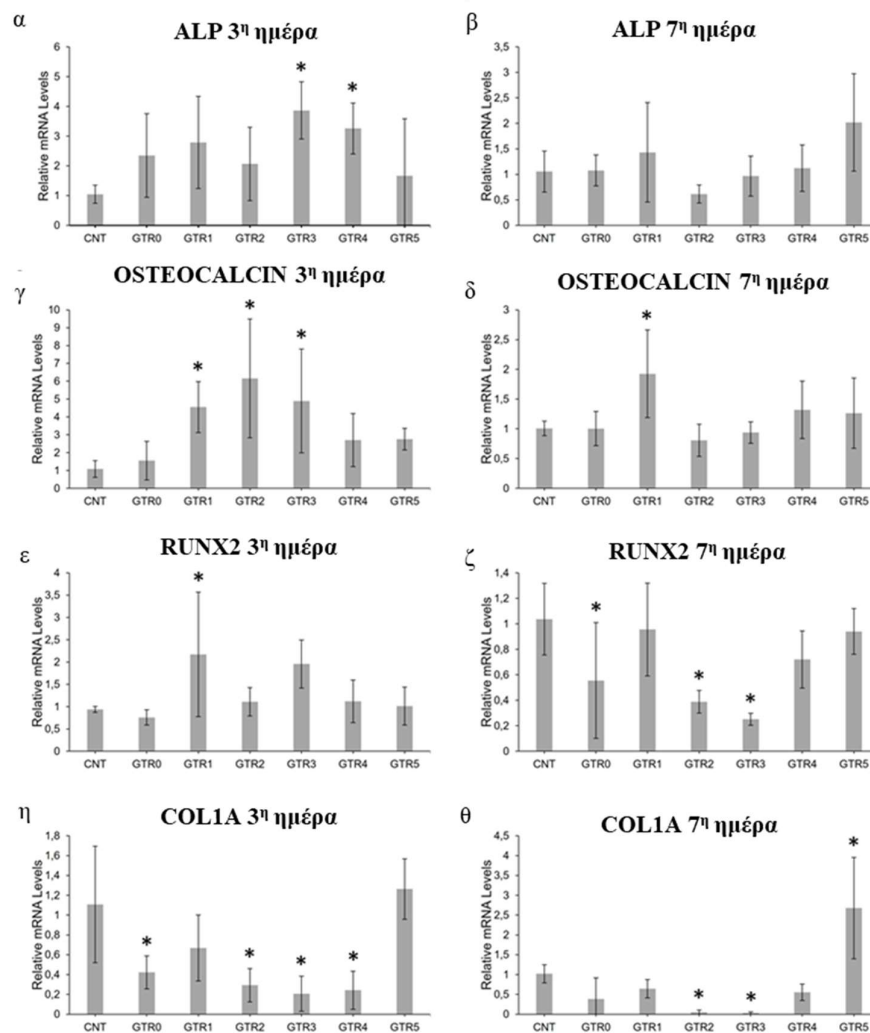
Η στατιστική ανάλυση των αποτελεσμάτων qRT-PCR έδειξε ότι οι παρασκευασθείσες GTR μεμβράνες είχαν σημαντική επίδραση στην έκφραση των οστεογονικών δεικτών, με εξαίρεση τον δείκτη ALP που δεν μεταβλήθηκε σημαντικά στα κύτταρα PDL που είχαν τοποθετηθεί στις διάφορες μεμβράνες GTR σε σχέση με το δείγμα ελέγχου (Εικ. 71α,β).

Η έκφραση του δείκτη OCN στα κύτταρα που είχαν τοποθετηθεί στις μεμβράνες αυξήθηκε σημαντικά την 3^η ημέρα μετά την επαγωγή των κυττάρων στις μεμβράνες GTR1, GTR2 και GTR3 σε σχέση με τα κύτταρα στην πλάκα ελέγχου. Στην μεμβράνη GTR1 η αύξηση αυτή διατηρήθηκε και την 7^η ημέρα μετά την επαγωγή (Εικ. 71γ,δ). Τα αποτελέσματα από την έκφραση του δείκτη OCN βρίσκονται σε συμφωνία με τα αποτελέσματα της οστεο-διαφοροποίησης μέσω της χρώσης με ερυθρό της αλιζαρίνης (GTR1>GTR2>GTR3).

Η έκφραση του δείκτη RUNX2 στα κύτταρα που είχαν τοποθετηθεί στις μεμβράνες την 3^η ημέρα οστεοεπαγωγής ήταν σημαντικά υψηλότερη στην μεμβράνη GTR1 σε σχέση με το δείγμα ελέγχου, ενώ την 7^η ημέρα οστεοεπαγωγής η έκφραση του ήταν παρόμοια με το δείγμα ελέγχου στην περίπτωση της μεμβράνης GTR1 και αρκετά μειωμένη στις μεμβράνες GTR2, GTR3 και GTR0 (Εικ. 71ε,ζ). Ο δείκτης RUNX2 είναι δείκτης πρώιμης οστεογένεσης και η μειωμένη έκφραση του την 7^η ημέρα οστεοεπαγωγής υποδηλώνει ότι η οστεο-διαφοροποίηση αρχίζει νωρίτερα σε αυτά τα κύτταρα.

Ο δείκτης COL1A, ο οποίος είναι πρώιμος δείκτης εναπόθεσης κολλαγόνου στην μήτρα πριν την επιμετάλλωση, ήταν ήδη μειωμένος από την 3^η ημέρα

οστεοεπαγωγής στα κύτταρα που είχαν τοποθετηθεί στις μεμβράνες GTR2, GTR3, GTR4 και GTR0. Είναι αξιοσημείωτο ότι η έκφραση του την 7^η ημέρα οστεοεπαγωγής ήταν αυξημένη μόνο στην μεμβράνη GTR5, γεγονός το οποίο υποδηλώνει μία πιο αργή οστεο-διαφοροποίηση (Εικ. 71η,θ).



Εικόνα 71. Έκφραση γονιδίων που σχετίζονται με την οστεο-διαφοροποίηση σε κύτταρα PDL που είχαν τοποθετηθεί στις μεμβράνες GTR μετά από 3 και 7 ημέρες οστεο-επαγωγής. Τα αποτελέσματα qRT-PCR αναλύθηκαν με μονόδρομη ANOVA και ακολούθησε Dunnett t διπλής όψης, όπου κρίθηκε απαραίτητο.

*p<0.05.

Συμπερασματικά, με βάση τα αποτελέσματα από την χρώση με το ερυθρό της αλιζαρίνης και την ανάλυση qRT-PCR, η μεμβράνη GTR5 φαίνεται να είναι η λιγότερο αποτελεσματική από τις παρασκευασθείσες μεμβράνες στο να επάγει την οστεο-διαφοροποίηση των κυττάρων PDL σε καλλιέργεια.

ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

Στόχος της παρούσας διδακτορικής διατριβής ήταν η απομόνωση και ο χαρακτηρισμός βιοπολυμερών θαλάσσιας προέλευσης, καθώς και η ανάπτυξη καινοτόμων, πολυστρωματικών μεμβρανών μικρο-/νανοϊνών για την αντιμετώπιση της περιοδοντικής νόσου.

Στα πλαίσια της διδακτορικής διατριβής απομονώθηκαν καρραγενάνες από φυσικούς και καλλιεργημένους πληθυσμούς του ροδοφύκου *C. teedei* μέσω αλκαλικής εκχύλισης με NaOH, KOH, Ca(OH)₂ ώστε να παραληφθούν τα μετά νατρίου, μετά καλίου και τα μετ' ασβεστίου άλατα των καρραγενανών, αντίστοιχα. Από την χημική ανάλυση των πολυσακχαριτών που απομονώθηκαν προέκυψε ότι τα μετά νατρίου και τα μετ' ασβεστίου άλατα των καρραγενανών είναι υβρίδια κ/ι-καρραγενανών, ενώ τα μετά καλίου άλατα των καρραγενανών ταυτοποιήθηκαν ως υβρίδιο κ/ι-καρραγενανών και υβρίδιο θ/λ-καρραγενανών.

Από τον χαρακτηρισμό των πολυσακχαριτών προέκυψε ότι το ποσοστό των θεικών εστέρων των καρραγενανών που ταυτοποιήθηκαν ως υβρίδια κ/ι-καρραγενανών ήταν ενδιάμεσο αυτού των κ- και ι-καρραγενανών και δεν παρατηρήθηκαν σημαντικές διαφορές μεταξύ τους, ενώ το μετά καλίου άλας των καρραγενανών που ταυτοποιήθηκε ως υβρίδιο θ/λ-καρραγενανών παρουσίασε το υψηλότερο ποσοστό θεικών εστέρων.

Επίσης, οι καρραγενάνες που απομονώθηκαν με ίδιες συνθήκες εκχύλισης από καλλιεργημένους πληθυσμούς ροδοφυκών εμφάνισαν πολύ μικρότερο μέσο μοριακό βάρος σε σχέση με αυτές που απομονώθηκαν από φυσικούς πληθυσμούς ροδοφυκών του ίδιου είδους. Από τις αναλύσεις των δειγμάτων που προήλθαν από διαφορετικές συνθήκες εκχύλισης φαίνεται ότι το μέσο μοριακό βάρος των πολυσακχαριτών επηρεάζεται σημαντικά και από τις συνθήκες εκχύλισης.

Για την απομόνωση φουκοϊδανών από το φαιοφύκος *C. barbata* δοκιμάστηκαν διαφορετικές μέθοδοι αποχρωματισμού και εκχύλισης, με τον αποχρωματισμό του φύκου με αιθανόλη/νερό/φορμαλδεΰδη και στην συνέχεια την υδατική εκχύλιση του ξηρού οργανισμού να δίνει με ικανοποιητική απόδοση τις πιο καθαρές και υψηλού ποσοστού θεικών εστέρων φουκοϊδάνες.

Καθώς είναι γνωστό ότι το μοριακό μέγεθος των πολυσακχαριτών επηρεάζει τις φυσικοχημικές τους ιδιότητες αλλά και την βιοδραστικότητά τους, στοχεύοντας στην ανάπτυξη πράσινων συνθηκών για την ελάττωση του μοριακού μεγέθους των

πολυσακχαριτών μελετήθηκε η επίδραση υπερήχων υψηλής ισχύος στο μέσο μοριακό βάρος καρραγενανών, φουκοϊδανών και ουλβανών υπό όξινες και ουδέτερες συνθήκες αλλά και για διαφορετικούς χρόνους έκθεσης. Σε όλες τις περιπτώσεις διαπιστώθηκε ότι οι υπερήχοι υψηλής ισχύος είναι ικανοί να μειώσουν το μέσο μοριακό βάρος των πολυσακχαριτών. Ωστόσο, όσο μεγαλύτερο είναι το αρχικό μέσο μοριακό βάρος τόσο μεγαλύτερη είναι η μείωση του μέσου μοριακού βάρους που παρατηρήθηκε. Αξίζει να αναφερθεί ότι με την αύξηση του χρόνου εφαρμογής υπερήχων το ποσοστό των θεικών εστέρων των καρραγενανών που κατεργάστηκαν σε όξινες συνθήκες μειώθηκε σημαντικά ενώ υπό ουδέτερες συνθήκες παρέμεινε σχεδόν σταθερό.

Στην συνέχεια, σχεδιάστηκαν και παρασκευάστηκαν με επιτυχία δι-στρωματικές και τρι-στρωματικές μεμβράνες αποτελούμενες από ένα εξωτερικό χυτό στρώμα PCL που εκτός από την δομική σταθερότητα λειτουργεί και σαν φραγμός στην διείσδυση των επιθηλιακών κυττάρων στην περιοχή τους περιοδοντίου. Επί της χυτής PCL μεμβράνης με την μέθοδο της ηλεκτροινοποίησης αποτέθηκαν ένα ή δύο επιπλέον στρώματα νανοϊνών αποτελούμενα από μετά νατρίου και μετ' ασβεστίου άλατα καρραγενανών ή/και μετ' ασβεστίου άλας πολυ(L-γλουταμικού οξέος) για να λειτουργήσουν ως πηγές Ca^{+2} αλλά και να προσφέρουν ιστική/οστική αναγέννηση στην περιοχή του περιοδοντίου. Από τους πολυσακχαρίτες που μελετήθηκαν για την παραγωγή των μεμβρανών επιλέχθηκαν οι καρραγενάνες λόγω της ικανότητάς τους να προάγουν την προσκόλληση και τον πολλαπλασιασμό των οστεοβλαστών αλλά και το χαμηλό τους κόστος που θα μπορούσε να επιτρέψει την βιομηχανική παραγωγή των GTR/GBR μεμβρανών για την αντιμετώπιση της περιοδοντικής νόσου. Όλες οι δι- και τρι-στρωματικές μεμβράνες χαρακτηρίστηκαν ως προς τα μορφολογικά τους χαρακτηριστικά με ηλεκτρονική μικροσκοπία σάρωσης και ως προς τις θερμικές τους ιδιότητες με TGA και DSC.

Τα πειράματα αποικοδόμησης έδειξαν ότι όλες οι μεμβράνες που παρασκευάστηκαν ήταν ικανές να παραμένουν σταθερές για τουλάχιστον 28 ημέρες παραμονής σε διάλυμα προσομοίωσης σιέλου στους 37 °C και παρουσίασαν παρατεταμένη αποδέσμευση ιόντων ασβεστίου για τουλάχιστον 3 εβδομάδες και θα μπορούσαν δυνητικά να λειτουργήσουν ως πηγή ιόντων ασβεστίου για να προάγουν τον πολλαπλασιασμό των οστεοβλαστών και την αναγέννηση του οδοντικού οστού. Τα αποτελέσματα της μελέτης των μηχανικών τους ιδιοτήτων των πολυ-στρωματικών μεμβρανών έδειξαν ότι έχουν ικανοποιητικές μηχανικές ιδιότητες και η αρχική αντοχή τους είναι συγκρίσιμη με απορροφήσιμες εμπορικές μεμβράνες που χρησιμοποιούνται

στην κλινική πράξη.

Τα αποτελέσματα από την γονιδιακή έκφραση των δεικτών που σχετίζονται με την οστεογονική διαφοροποίηση κατά την διάρκεια της οστεογονικής επαγωγής των κυττάρων PDL υποδεικνύουν ότι όλες οι σχεδιασμένες μεμβράνες και ιδιαίτερα η τρι-στρωματική μεμβράνη που αποτελείται από μετ' ασβεστίου άλας καρραγενανών και μετ' ασβεστίου άλας πολυ(L-γλουταμικού όξeos) είναι ικανές να προάγουν την οστεοεπαγωγή των κυττάρων PDL νωρίτερα σε σύγκριση με την πλάκα ελέγχου.

Παράλληλα μελετήθηκε ο ρυθμός αποδέσμευσης αντιμικροβιακών παραγόντων από τις μεμβράνες κατά την παραμονή τους σε διάλυμα προσομοίωσης σιέλου στους 37 °C. Η μετρονιδαζόλη που ενσωματώθηκε στα πολυμερικά υλικά των διαφορετικών στρωμάτων παρουσίασε πολύ γρήγορο ρυθμό απελευθέρωσης που πιθανά δεν θα πρόσφερε ικανοποιητικό διάστημα αντιμικροβιακής προστασίας. Η ενσωμάτωση όμως της υδροχλωρικής σιπροφλοξασίνης στο εξωτερικό στρώμα των πολυ-στρωματικών μεμβρανών έδειξε ελπιδοφόρα αποτελέσματα για την καταπολέμηση των περιοπαθογόνων βακτηρίων καθώς η μεγάλη απελευθέρωση που παρουσίασε κατά την 1^η ημέρα θα μπορούσε να προσφέρει γρήγορα την επιθυμητή θεραπευτική απόκριση ενώ η σταδιακή απελευθέρωση που εμφάνισε τις υπόλοιπες μέρες θα μπορούσε να παρατείνει την δράση της για μεγαλύτερο διάστημα.

Τα ενθαρρυντικά αποτελέσματα που προέκυψαν από την παρούσα μελέτη καταδεικνύουν την ικανότητα των μετά ασβεστίου αλάτων των καρραγενανών να αποτελέσουν λειτουργικό συστατικό ιστικής/οστικής αναγέννησης στην παραγωγή πολυστρωματικών GTR νανοϊνωδών μεμβρανών για την θεραπεία της περιοδοντίτιδας και την αναγέννηση του περιοδοντίου.

Καθώς ηλεκτροϋνοποιημένες μεμβράνες είναι πλέον δυνατόν να παραχθούν σε βιομηχανικό επίπεδο, η μελλοντική αξιολόγηση της αποτελεσματικότητας των μεμβρανών in vivo θα μπορούσε να οδηγήσει και στην εμπορική τους αξιοποίηση.

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

- Abdelrazek E.M., Hezma A.M., El-khodary A. Elzayat A.M. Spectroscopic studies and thermal properties of PCL/PMMA biopolymer blend. *Egypt. J. Basic Appl. Sci.*, **2016**, 3, 10-15.
- Abedi N., Rajabi N., Kharaziha M., Nejatidanesh F., Tayebi L. Layered scaffolds in periodontal regeneration. *J. Oral Biol. Craniofac. Res.*, **2022**, 12, 782-797.
- Alves A., Sousa R.A., Reis R.L. A practical perspective on ulvan extracted from green algae. *J. Appl. Phycol.*, **2013**, 25, 407-424.
- Ashish G., Rahul Y., Mukesh R., Prakash M. Formulation and evaluation on in-situ gel containing ciprofloxacin hydrochloride in the treatment of periodontitis. *Asian J. Pharm. Clin. Res.*, **2017**, 10, 154-9.
- Babo P.S., Pires R.L., Reis R.L., Gomes M.E. Membranes for periodontal tissues regeneration. *Cienc. Technol.*, **2014**, 26108-117.
- Bajaj, I., Singhal, R. Poly (glutamic acid)--an emerging biopolymer of commercial interest. *Bioresour. Technol.*, **2011**, 102, 5551-5561.
- Baji A., Mai Y.-W., Wong S.-C., Abtahi M., Chen P. Electrospinning of polymer nanofibers: Effects on oriented morphology, structures and tensile properties. *Compos. Sci. Technol.*, **2010**, 70, 703-718.
- Basile M.A., d'Ayala G.G., Malinconico M., Laurienzo P., Coudane J., Nottelet B., Ragione F. D., Oliva A. Functionalized PCL/HA nanocomposites as microporous membranes for bone regeneration. *Mater. Sci. Eng. C*, **2015**, 48, 457-468.
- Bhardwaj N., Kundu S.C. Electrospinning: A fascinating fiber fabrication technique. *Biotechnol. Adv.*, **2010**, 28, 325-347.
- Botelho J., Machado V., Leira Y., Proença L., Chambrone L., Mendes J. J. Economic burden of periodontitis in the United States and Europe: An updated estimation. *J. Periodontol.*, **2022**, 93, 373-379.
- Bottino M.C., Arthur R.A., Waeiss R.A., Kamocki K., Gregson K.S., Gregory, R.L. Biodegradable nanofibrous drug delivery systems: effects of metronidazole and ciprofloxacin on periodontopathogens and commensal oral bacteria. *Clin. Oral Investig.*, **2014**, 18, 2151-2158.
- Bottino M.C., Kamocki K., Yassen G.H., Platt J.A., Vail M.M., Ehrlich Y., Spolnik K.J., Gregory R.L. Bioactive nanofibrous scaffolds for regenerative endodontics. *J.*

- Dent. Res.*, **2013**, 92, 963-969.
- Budai-Szűcs M., Léber A., Cui L., Józó M., Vályi P., Burián K., Kirschweng B., Csányi E., Pukánszky, B. Electrospun PLA Fibers Containing Metronidazole for Periodontal Disease. *Drug Des. Devel. Ther.*, **2020**, 14, 233-242.
- Campo V.L., Kawano D.F., da Silva Jr. D.B., Carvalho I. Carrageenans: Biological properties, chemical modifications and structural analysis—A review. *Carbohydr. Polym.*, **2009**, 77, 167-180.
- Cardoso M.J., Costa R.R., Mano J.F. Marine origin polysaccharides in drug delivery systems. *Mar. Drugs*, **2016**, 14, 34.
- Castro P., Huber M. E. *Θαλάσσια βιολογία*. 1^η εκδ., Κουκούρας Θ., Βουλτσιάδου Ε., Εκδ., University Studio Press: Θεσσαλονίκη, Ελλάδα, **1999**.
- Chale-Dzul J., Moo-Pu R., Robledo, D. Freile-Pelegrín Y. Hepatoprotective effect of the fucoidan from the brown seaweed *Turbinaria tricostata*. *J. Appl. Phyco.*, **2015**, 27, 2123-2135.
- Chapple I.L.C. Time to take periodontitis seriously. *B.M.J.*, **2014**, 348, 2645.
- Chen F.M., Zhang J., Zhang M., An Y., Chen F., Wu, Z.F. A review on endogenous regenerative technology in periodontal regenerative medicine. *Biomaterials*, **2010**, 31, 7892-7927.
- Chen H., Zhang Y., Yu T., Song G., Xu T., Xin T., Lin Y., Han B. Nano-Based Drug Delivery Systems for Periodontal Tissue Regeneration. *Pharmaceutics*, **2022**, 21, 2250.
- Chen S., Huang X. Nanomaterials in Scaffolds for Periodontal Tissue Engineering: Frontiers and Prospects. *Bioengineering*, **2022**, 9, 431.
- Chiellini F., Morelli A. Ulvan: A versatile platform of biomaterials from renewable resources. In *Biomaterials-Physics and Chemistry*, Pignatello R., Ed. IntechOpen: London, UK, **2011**.
- Chu C., Zhao X., Rung S., Xiao W., Liu L., Qu Y., Man, Y. Application of biomaterials in periodontal tissue repair and reconstruction in the presence of inflammation under periodontitis through the foreign body response: Recent progress and perspectives. *J. Biomed. Mater. Res. Part B Appl. Biomater.* **2022**, 110, 7-17.
- Cimini A., Imperi E., Picano A., Rossi, M. Electrospun nanofibers for medical face mask with protection capabilities against viruses: State of the art and perspective for industrial scale-up. *Appl. Mater. Today*, **2023**, 32, 101833.
- Claverie M., McReynolds C., Petitpas A., Thomas M., Fernandes S.C.M. Marine-

- derived polymeric materials and biomimetics: An overview. *Polymers*, **2020**, 12, 1002.
- Coppola D., Oliviero M., Vitale G.A., Lauritano C., D'Ambra I., Iannace S., de Pascale D. Marine collagen from alternative and sustainable sources: Extraction, processing and applications. *Mar. Drugs*, **2020**, 18, 214.
- Correa-Diaz F., Aguilar-Rosas R., Aguilar-Rosas L.E. Infrared analysis of eleven carrageenophytes from Baja California, Mexico. *Hydrobiologia*, **1990**, 204, 609-614.
- Cunha L., Grenha A. Sulfated seaweed polysaccharides as multifunctional materials in drug delivery applications. *Mar. Drugs*, **2016**, 14, 42.
- Daghreery A., Bottin M. C. Advanced biomaterials for periodontal tissue regeneration. *Genesis*, **2022**, 60, e23501.
- Deepak A., Goyal A. K., Rath, G. Development and Characterization of Novel Medicated Nanofiber for the Treatment of Periodontitis. *AAPS PharmSciTech.*, **2018**, 19, 3687-3697.
- De Reviers B. Fucans and alginates without phenolic compounds. *J. Appl. Phycol.*, **1989**, 1, 75-76.
- Dinoro J., Maher M., Talebian S., Jafarkhani M., Mehrali M., Orive G., Foroughi J., Lord M.S., Dolatshahi-Pirouz A. Sulfated polysaccharide-based scaffolds for orthopaedic tissue engineering. *Biomaterials*, **2019**, 214, 119214.
- Dobrinčić A., Dobroslavić E., Pedisić S., Balbino S., Garofulić I.E., Čož-Rakovac R., Dragović-Uzelac V. The effectiveness of the *Fucus virsoides* and *Cystoseira barbata* fucoidan isolation as a function of applied pre-treatment and extraction conditions. *Algal Res.*, **2021**, 56, 102286.
- Dogson K.S., Price R.G. A note on the determination of the ester sulphate content of sulphated polysaccharides. *Biochem. J.*, **1962**, 84, 106.
- Dos Santos D.M., Chagas P.A.M., Leite I.S., Inada N.M., de Annunzio S.R., Fontana C.R., Campana-Filho, S.P., Correa D.S. Core-sheath nanostructured chitosan-based nonwovens as a potential drug delivery system for periodontitis treatment. *Int. J. Biol. Macromol.*, **2020**, 142, 521-534.
- Elsabee M.Z., Naguib H.F., Morsi R.E. Chitosan based nanofibers, review. *Mater. Sci. Eng. C*, **2012**, 32, 1711-1726.
- Essa W.K., Yasin S.A., Saeed I.A., Ali G.A.M. Nanofiber-Based Face Masks and Respirators as COVID-19 Protection: A Review. *Membranes*, **2021**, 11, 250.

- Fang J., Niu H., Lin T., Wang X. Applications of electrospun nanofibers. *Chinese Sci. Bull.*, **2008**, 53, 2265-2286.
- Fisher L. M., Lawrence J. M., Josty I. C., Hopewell R., Margerrison E. E., Cullen, M. E. Ciprofloxacin and the fluoroquinolones. New concepts on the mechanism of action and resistance. *Am. J. Med.*, **1989**, 87, 2S-8S.
- Freeman C. D., Klutman N. E., Lamp K. C. Metronidazole. A therapeutic review and update. *Drugs*, **1997**, 54, 679-708.
- Fröba M., Große M., Setz C., Rauch P., Auth J., Spanaus L., Münch J., Ruetalo N., Schindler M., Morokutti-Kurz M., Graf P., Prieschl-Grassauer E., Grassauer A., Schubert U. Iota-Carrageenan Inhibits Replication of SARS-CoV-2 and the Respective Variants of Concern Alpha, Beta, Gamma and Delta. *Int. J. Mol. Sci.*, **2021**, 22, 13202.
- Gamal A. A. E. Biological importance of marine algae. *Saudi Pharm. J.*, **2010**, 18, 1-25.
- Garg K., Bowlin G. L. Electrospinning jets and nanofibrous structures. *Biomicrofluidics*, **2011**, 5, 013403.
- Geng L., Hou N., Zhang M., Xu Y., Zhang Q., Wang J., Zhang L., Zhang Q. Comparative study of the effect of different fucoidans from *Sargassum maclurei* and *Saccharina japonica* on FGFs/FGFR signaling activation in BaF3 cells. *Int. J. Biol. Macromol.*, **2018**, 107, 2429-2435.
- Goonoo N., Khanbabaee B., Steuber M., Bhaw-Luximon A., Jonas U., Pietsch U., Jhurry D., Schönherr H. k-Carrageenan enhances the biomineralization and osteogenic differentiation of electrospun PHB and PHBV fibers. *Biomacromolecules*, **2017**, 18, 1563-1573.
- Greiner A., Wendorff J. H. Electrospinning: A Fascinating Method for the Preparation of Ultrathin Fibers. *Angew. Chem. Int. Edit.*, **2007**, 46, 5670-5703.
- Guiry M.D. *The Seaweed Site: information on marine algae*. **2000-2023**, Available online: https://www.seaweed.ie/descriptions/Ulva_rigida.php (accessed on 15 October 2023).
- Guiry M.D. In: Guiry, M.D. & Guiry, G.M. **2020**. *AlgaeBase*. World-wide electronic publication, National University of Ireland, Galway. Available online: <https://www.algaebase.org> (accessed on 15 October 2023).
- Guo H., Bai X., Wang X., Qiang J., Sha T., Shi Y., Zheng K., Yang Z., Ce S. Development and regeneration of periodontal supporting tissues. *Genesis*, **2022**, 60, e23491.

- Guo X., Wang Y., Qin Y., Shen P., Peng Q. Structures, properties and application of alginic acid: A review. *Int. J. Biol. Macromol.*, **2020**, 162, 618-628.
- Guo X., Ye X., Sun Y., Wu D., Wu N., Hu Y., Chen S. Ultrasound Effects on the Degradation Kinetics, Structure, and Antioxidant Activity of Sea Cucumber Fucoidan. *J. Agric. Food Chem.*, **2014**, 62, 1088-1095.
- Guo Z., Wei Y., Zhang Y., Xu Y., Zheng L., Benwei Zhu B., Yao Z. Carrageenan oligosaccharides: A comprehensive review of preparation, isolation, purification, structure, biological activities and applications. *Algal Res.*, **2022**, 61, 102593.
- Guthmiller J.M., Novak K.F. Periodontal Diseases. In *Polymicrobial Diseases*. Brodgen K.A.M., Guthmiller J.M. Eds., ASM Press: Washington (DC), 2002.
- Hahn T., Lang S., Ulbera R., Mufflera K. Novel procedures for the extraction of fucoidan from brown algae. *Process Biochem.*, **2012**, 47, 1691-1698.
- Hamed I., Özogul F., Özogul Y., Joe M. Regenstein J.M. Marine Bioactive Compounds and Their Health Benefits: A Review. *Compr. Rev. Food Sci. Food Saf.*, **2015**, 14, 446.
- Hassan S.U., Bilal B., Nazir M.S., Naqvi S.A.R., Ali Z., Nadeem S., Muhammad N., Palvasha B. A., Mohyuddin A. Recent progress in materials development and biological properties of GTR membranes for periodontal regeneration. *Chem. Biol. Drug Des.*, **2021**, 98, 1007-1024.
- Huang C., Soenen S. J., Rejman J., Lucas B., Braeckmans K., Demeester J., De Smedt S. C. Stimuli-responsive electrospun fibers and their applications. *Chem. Soc. Rev.*, **2011**, 40, 2417-2434.
- Huang Q., Huang X., Gu L. Periodontal Bifunctional Biomaterials: Progress and Perspectives. *Materials*, **2021**, 14, 7588.
- Huang Z.-M., Zhang Y.-Z., Kotaki M., Ramakrishna S. A review on polymer nanofibers by electrospinning and their applications in nanocomposites. *Compos. Sci. Technol.*, **2003**, 63, 2223-2253.
- Ibrahim H.M., Klingner A. A review on electrospun polymeric nanofibers: Production parameters and potential applications. *Polym. Test.*, **2020**, 90, 106647.
- Iliou K., Kikionis S., Ioannou E., Roussis V. Marine Biopolymers as Bioactive Functional Ingredients of Electrospun Nanofibrous Scaffolds for Biomedical Applications. *Mar. Drugs*, **2022**, 20, 314.
- Ionescu O.M., Mignon A., Iacob A.T., Simionescu N., Confederat L.G., Tuchilus C.; Profire, L. New Hyaluronic acid/polyethylene oxide-based electrospun nanofibers:

- Design, characterization and in vitro biological evaluation. *Polymers*, **2021**, 13, 1291.
- Jain R., Shetty S., Yadav K.S. Unfolding the electrospinning potential of biopolymers for preparation of nanofibers. *J. Drug Deliv. Sci. Technol.*, **2020**, 57, 101604.
- Kashyap A, Sreenivasan S, Rajan AK, Rashid M, Chhabra M. Ciprofloxacin-induced cutaneous adverse drug events: a systematic review of descriptive studies. *J. Basic Clin. Physiol. Pharmacol.*, **2021**, 33, 327-346.
- Kchaou M., Alquraish M., Abuhasel K., Abdullah A., Ali A.A. Electrospun Nanofibrous Scaffolds: Review of Current Progress in the Properties and Manufacturing Process, and Possible Applications for COVID-19. *Polymers*, **2021**, 13, 916.
- Kidgell, J.T.; Magnusson, M.; de Nys, R.; Glasson, C.R.K. Ulvan: A systematic review of extraction, composition and function. *Algal Res.*, **2019**, 39, 101422.
- Kraan, S. Algal polysaccharides, novel applications and outlook. In *Carbohydrates-Comprehensive Studies on Glycobiology and Glycotechnology*; Chang, C.F., Ed.; IntechOpen: London, UK, **2012**.
- Kumar K.P.A., Zare E.N., Torres-Mendieta R., Waclawek S., Makvandi P., Černík M., Padil V.V.T., Varma R.S. Electrospun fibers based on botanical, seaweed, microbial, and animal sourced biomacromolecules and their multidimensional applications. *Int. J. Biol. Macromol.*, **2021**, 171, 130-149.
- Laurienzo P., La Barre S., Bates S.S. Marine polysaccharides and their importance for human health. In *Blue Biotechnology: Production and Use of Marine Molecules*, La Barre, S., Bates, S.S., Eds., Wiley Online Library: Hoboken, NJ, USA, **2018**.
- Lee K. Y., Mooney D. J. Alginate: properties and biomedical applications. *Progr. Polym. Sci.*, **2012**, 37, 106-126.
- Li B., Lu F., Wei X., Zhao R. Fucoidan: Structure and Bioactivity. *Molecules*, **2008**, 13, 1671-1695.
- Li D., Xia Y. Electrospinning of nanofibers: Reinventing the wheel?. *Adv. Mater.*, **2004**, 16, 1151-1170.
- Li Z., Wang C. Effects of Working Parameters on Electrospinning. In *One-Dimensional nanostructures: Electrospinning Technique and Unique Nanofibers*, Springer: Heidelberg, Berlin, **2013**, 15-28.
- Lindequist U. Marine-Derived Pharmaceuticals - Challenges and Opportunities. *Biomol. Ther.*, **2016**, 24, 561-571.

- Löfmark S., Edlund C., Nord C. E. Metronidazole is still the drug of choice for treatment of anaerobic infections. *Clin. Inf. Dis.*, **2010**, 50, 16-23.
- Luthuli S., Wu S., Cheng Y., Zheng X., Wu M., Tong H. Therapeutic effects of fucoidan: A review on recent studies. *Mar. Drugs*, **2019**, 17, 487.
- Mak W., Wang S. K., Liu T., Hamid N., Li Y., Lu J., White W.L. Anti-proliferation potential and content of fucoidan extracted from sporophyll of New Zealand *Undaria pinnatifida*. *Front. Nutr.*, **2014**, 1, 9.
- Malea, P., Haritonidis S. Use of the green alga *Ulva rigida* C. Agardh as an indicator species to reassess metal pollution in the Thermaikos Gulf, Greece, after 13 years. *J. Appl. Phycol.*, **2000**, 12, 169-176.
- Manivasagan P., Bharathiraja S., Moorthy M.S., Oh Y.-O., Seo H., Oh J. Marine biopolymer-based nanomaterials as a novel platform for theranostic applications. *Polym. Rev.*, **2017**, 57, 631-667.
- Manuhara G.J., Praseptianga D., Riyanto R.A. Extraction and Characterization of Refined K-carrageenan of Red Algae [*Kappaphycus alvarezii* (Doty ex P.C. Silva, 1996)] Originated from Karimun Jawa Islands. *Aquat. Procedia*, **2016**, 7, 106-111.
- Marques M.R.C., Loebenberg R., Almukainzi M. Simulated biological fluids with possible application in dissolution testing. *Dissolution Technol.*, **2011**, 18, 15-28.
- Martins A., Vieira H., Gaspar H., Santos S. Marketed marine natural products in the pharmaceutical and cosmeceutical industries: Tips for success. *Mar. Drugs*, **2014**, 12, 1066-1101.
- Medeiros E. S., Glenn G. M., Klamczynski A. P., Orts W. J., Mattoso L. H. C. Solution blow spinning: A new method to produce micro- and nanofibers from polymer solutions. *J. Appl. Polym. Sci.*, **2009**, 113, 2322-2330.
- Memic A., Abudula T., Mohammed H.S., Navare K.J., Colombani T., Bencherif S.A. Latest progress in electrospun nanofibers for wound healing applications. *ACS Appl. Bio Mater.*, **2019**, 2, 952-969.
- Mohod A. V., Gogate P. R. Ultrasonic degradation of polymers: effect of operating parameters and intensification using additives for carboxymethyl cellulose (CMC) and polyvinyl alcohol (PVA). *Ultrason. Sonochem.*, **2011**, 18, 727-734.
- Nair L. S., Laurencin C. T. Biodegradable polymers as biomaterials. *Prog. Polym. Sci.*, **2007**, 32, 762-798.
- Necas J., Bartosikova L. Carrageenan: a review *Vet. Med.*, **2013**, 58, 187-205.
- Nguyen L.T., Tran H.L., Mai P.T., Duong V.B., Nguyen L.-T.T., Nguyen H.T. Poly(L-

- glutamic acid) via catalytical hydrogenation for the fabrication of carbon nanotube nanocomposites. *Mater. Res.*, **2021**, 24, e20200321.
- Pacheco D., Cotas J., Domingues A., Ressurreição S., Bahcevandziev K., Pereira L. *Chondracanthus teedei* var. *lusitanicus*: The Nutraceutical Potential of an Unexploited Marine Resource. *Mar. Drugs*, **2021**, 19, 570.
- Palanisamy S., Vinosha M., Marudhupandi T., Rajasekar P., Prabhu N. M. Isolation of fucoidan from *Sargassum polycystum* brown algae: Structural characterization, in vitro antioxidant and anticancer activity. *Int. J. Biol. Macromol.*, **2017**, 102, 405-412.
- Parati M., Clarke L., Anderson P., Hill R., Khalil I., Tchuenbou-Magaia F., Stanley M.S., McGee D., Mendrek B., Kowalczyk M., Radecka I. Microbial poly- γ -glutamic acid (γ -PGA) as an effective tooth enamel protectant. *Polymers*, **2022**, 14, 2937.
- Park S.-B., Sung M.-H., Uyama H., Han D.K. Poly(glutamic acid): Production, composites, and medical applications of the next-generation biopolymer. *Prog. Pol. Sci.*, **2021**, 113, 101314.
- Pereira L., Amado A.M., Critchley A.T., van de Velde F. Ribeiro-Claro P.J.A. Identification of selected seaweed polysaccharides (phycocolloids) by vibrational spectroscopy (FTIR-ATR and FT-Raman). *Food Hydrocoll.*, **2009**, 23, 1903-1909.
- Pereira L., Meireles F., Abreu H.T., Ribeiro-Claro P.J.A. A comparative analysis of carrageenans produced by underutilized versus industrially utilized macroalgae (Gigartinales, Rhodophyta). In *Marine Algae Extracts: Processes, Products, and Applications*, 1st ed., Kim S.-K., Chojnacka K., Eds., Wiley-VCH Verlag GmbH & Co.: Boschstr. 12, 69469 Weinheim, German, **2015**, Volume 1, pp. 277 - 294.
- Pereira L., Mesquita J.F. Population studies and carrageenan properties of *Chondracanthus teedei* var. *lusitanicus* (Gigartinaceae, Rhodophyta). *J. Appl. Phycol.*, **2004**, 16, 369-383.
- Pereira L., Silva P. A concise review of the red macroalgae *Chondracanthus teedei* (Mertens ex Roth) Kützinger and *Chondracanthus teedei* var. *lusitanicus* (J.E. De Mesquita Rodrigues) Bárbara & Cremades. *J. Appl. Phycol.*, **2021**, 33, 111-131.
- Pereira L., Sousa A., Coelho H., Amado A. M., Ribeiro-Claro P.J.A Use of FTIR, FT-Raman and ¹³C-NMR spectroscopy for identification of some seaweed phycocolloids. *Biomol. Eng.*, **2003**, 20, 223-228.
- Pihlstrom B.L., Michalowicz B.S., Johnson N.W. Periodontal diseases. *Lancet*, **2005**, 366, 1809-20.

- Pillay V., Dott C., Choonara Y.E., Tyagi C., Tomar L., Kumar P., du Toit L.C., Ndesendo V.M.K. A Review of the Effect of Processing Variables on the Fabrication of Electrospun Nanofibers for Drug Delivery Applications. *J. Nanomater.*, **2013**, 2013, 1-22.
- Qamar Z., Haji Abdul Rahim Z.B., Neon G.S., Chew H.P., Zeeshan T. Effectiveness of poly- γ -glutamic acid in maintaining enamel integrity. *Arch. Oral Biol.*, **2019**, 106, 104482.
- Qasim S.B., Najeeb S., Delaine-Smith R.B., Rawlinson A., Rehman I.U. Potential of electrospun chitosan fibers as a surface layer in functionally graded GTR membrane for periodontal regeneration. *Dent. Mater. J.*, **2017**, 33, 71-83.
- Rajeshwari H.R., Dhamecha D., Jagwani S., Rao M., Jadhav K., Shaikh S., Puzhankara L., Jalalpure S. Local drug delivery systems in the management of periodontitis: A scientific review. *J. Control. Release*, **2019**, 307, 393-409.
- Ramakrishna S., Fujihara K., Teo W.-E., Yong T., Ma Z., Ramaseshan R. Electrospun nanofibers: Solving global issues. *Mater. Today*, **2006**, 9, 40-50.
- Ratnawati R., Prasetyaningrum A., Wardhani D. H. Kinetics and Thermodynamics of Ultrasound-Assisted Depolymerization of κ -Carrageenan. *Bull. Chem. React. Eng. Catal.*, **2016**, 11, 48-58.
- Rioux L.-E., Turgeon S.L., Beaulieu M. Characterization of polysaccharides extracted from brown seaweeds. *Carbohydr. Polym.*, **2007**, 69, 530-537.
- Roato I., Masante B., Putame G., Massai D., Mussano F. Challenges of Periodontal Tissue Engineering: Increasing Biomimicry through 3D Printing and Controlled Dynamic Environment. *Nanomaterials*, **2022**, 12, 3878.
- Ruggieri G.D. Drugs from the Sea Marine organisms with novel chemical constituents are excellent sources of new drugs. *Science*, **1976**, 194, 491-497.
- Saepudin E., Sinurat E., Suryabrata I. A. Depigmentation and Characterization of Fucoidan from Brown Seaweed *Sargassum binderi* Sonder. *IOP Conf. Ser.: Mater. Sci. Eng.*, **2018**, 299, 012027.
- Sahana T. G., Rekha P. D. Biopolymers: Applications in wound healing and skin tissue engineering. *Mol. Biol. Rep.*, **2018**, 45, 2857-2867.
- Sarker S., Latif Z., Gray A. *Natural Products Isolation*. 2nd ed., Humana press: Totowa, New Jersey, USA, **2006**.
- Schiffman J. D., Schauer C. L. A Review: Electrospinning of Biopolymer Nanofibers and their Applications. *Polym. Rev.*, **2008**, 48, 317-352.

- Sellimi S., Kadri N., Barragan-Montero V., Laouer H., Hajji M., Nasri M. Fucans from a Tunisian brown seaweed *Cystoseira barbata*: Structural characteristics and antioxidant activity. *Int. J. Biol. Macromol.*, **2014**, 66, 281-288.
- Shi R., Xue J., He M., Chen D., Zhang L., Tian W. Structure, physical properties, biocompatibility and in vitro/vivo degradation behavior of anti-infective polycaprolactone-based electrospun membranes for guided tissue/bone regeneration. *Pol. Degrad. Stab.*, **2014**, 109, 293-306.
- Simon C., McHale M., Sulpice R. Applications of Ulva Biomass and Strategies to Improve Its Yield and Composition: A Perspective for Ulva Aquaculture. *Biology*, **2022**, 11, 1593.
- Srithep Y., Akkaprasa T., Pholharn D., Morris J., Liu S.-J., Patrojanasophon P., Ngawhirunpat T. Metronidazole-loaded polylactide stereocomplex electrospun nanofiber mats for treatment of periodontal disease. *J. Drug Deliv. Sci. Technol.*, **2021**, 64, 102582.
- Staples R.J., Ivanovski S., Vaquette C. Fibre guiding scaffolds for periodontal tissue engineering. *J. Periodont. Res.*, **2020**, 55, 331-341.
- Subbiah T., Bhat G. S., Tock R. W., Parameswaran S., Ramkumar S. S. Electrospinning of Nanofibers. *J. Appl. Polym. Sci.*, **2005**, 96, 557-569.
- Taemeh M.A., Shiravandi A., Korayem M.A., Daemi H. Fabrication challenges and trends in biomedical applications of alginate electrospun nanofibers. *Carbohydr. Polym.*, **2020**, 228, 115419.
- Tanioka A., Takashi M. High-performance and speciality fibers. *Springer*, **2016**, 273-283.
- Tecson M. G., Abad L. V., Ebajo V. D. Jr, Camacho D. H. Ultrasound-assisted depolymerization of kappa-carrageenan and characterization of degradation product. *Ultrason. Sonochem.*, **2021**, 73, 105540.
- Teo W. E., Ramakrishna S. A review on electrospinning design and nanofibre assemblies. *Nanotechnology*, **2006**, 17, R89-R106.
- Trica B, Delattre C, Gros F, Ursu AV, Dobre T, Djelveh G, Michaud P, Oancea F. Extraction and Characterization of Alginate from an Edible Brown Seaweed (*Cystoseira barbata*) Harvested in the Romanian Black Sea. *Mar Drugs*, **2019**, 17, 405.
- Tziveleka L.-A., Ioannou E., Roussis V. Ulvan, a bioactive marine sulphated polysaccharide as a key constituent of hybrid biomaterials: A review. *Carbohydr.*

- Polym.*, **2019**, 218, 355-370.
- Uskoković, V., Pejčić, A., Koliqi, R., & Anđelković, Z. Polymeric nanotechnologies for the treatment of periodontitis: A chronological review. *Int. J. Pharmaceutics*, **2022**, 625, 122065.
- Vasita R., Katti D. S. Nanofibers and their applications in tissue engineering. *Int. J. Nanomed.*, **2006**, 1, 15-30.
- Véliz K., Chandía N., Rivadeneira M. Thiel M. Seasonal variation of carrageenans from *Chondracanthus chamissoi* with a review of variation in the carrageenan contents produced by Gigartinales. *J. Appl. Phycol.*, **2017**, 29, 3139-3150.
- Venugopal, V. Sulfated and non-sulfated polysaccharides from seaweeds and their uses: An Overview. *EC Nutr.*, **2019**, 14, 126-141.
- Wan M. C., Qin W., Lei C., Li Q. H., Meng M., Fang M., Song W., Chen J. H., Tay F., Niu L. N. Biomaterials from the sea: Future building blocks for biomedical applications. *Bioact. Mater.*, **2021**, 6, 4255-4285.
- Wang C.-Y., Chen Y.-C. Extraction and characterization of fucoidan from six brown macroalgae. *J. Mar. Sci. Technol.*, **2016**, 24, 319-328.
- Wang J., Chen Y., Li J., Chen Z., Fan M., Lin F., Xie Y. Electrospun polysaccharides for periodontal tissue engineering: A review of recent advances and future perspectives. *Ann. Biomed. Eng.*, **2022**, 50, 769-793.
- Wang L., Wang X., Wu H., Liu, R. Overview on Biological Activities and Molecular Characteristics of Sulfated Polysaccharides from Marine Green Algae in Recent Years. *Mar. Drugs*, **2014**, 12, 4984-5020.
- Wang X., Ding B., Sun G., Wang M., Yu J. Electro-spinning/netting: A strategy for the fabrication of three-dimensional polymer nano-fiber/nets. *Prog. Mater. Sci.*, **2013**, 58, 1173-1243.
- Woo H.N., Cho Y.J., Tarafder S., Lee C.H. The recent advances in scaffolds for integrated periodontal regeneration. *Bioact. Mater.*, **2021**, 6, 3328-3342.
- Xue J., He M., Niu Y., Liu H., Crawford A., Coates P., Chen D., Shi R., Zhang L. Preparation and in vivo efficient anti-infection property of GTR/GBR implant made by metronidazole loaded electrospun polycaprolactone nanofiber membrane. *Int. J. Pharm.*, **2014**, 475, 566-577.
- Xu X., Ren S., Li L., Zhou Y., Peng W., Xu Y. Biodegradable engineered fiber scaffolds fabricated by electrospinning for periodontal tissue regeneration. *J. Biomater. Appl.*, **2021**, 36, 55-75.

- Yang Y.-S., Xie Y.-J., He W. Research progress on chemical modification of alginate: A review. *Carbohydr. Polym.*, **2011**, 84, 33-39.
- Ye Z., Xu W., Shen R., Yan Y. Emulsion electrospun PLA/calcium alginate nanofibers for periodontal tissue engineering. *J. Biomater. Appl.*, **2020**, 34, 763-777.
- Zayed A., El-Aasr M., Ibrahim A. S., Ulber, R. Fucoidan Characterization: Determination of Purity and Physicochemical and Chemical Properties. *Mar. Drugs*, **2020**, 18, 571.
- Zayed A., Muffler K., Hahn T., Rupp S., Finkelmeier D., Burger-Kentischer A., Ulber R. Physicochemical and Biological Characterization of Fucoidan from *Fucus vesiculosus* Purified by Dye Affinity Chromatography. *Mar. Drugs*, **2016**, 14, 79.
- Zayed A, Ulber R. Fucoidans: Downstream Processes and Recent Applications. *Mar. Drugs*, **2020**, 18, 170.
- Zhao D., Xu J., Xu X. Bioactivity of fucoidan extracted from *Laminaria japonica* using a novel procedure with high yield. *Food Chem.*, **2018**, 245, 911-918.
- Zhao W., Liu W., Li J., Lin X., Wang Y. Preparation of animal polysaccharides nanofibers by electrospinning and their potential biomedical applications. *J. Biomed. Mater. Res. A*, **2015**, 103, 807-818.
- Zhou T., Liu X., Sui B., Liu C., Mo X., Sun J. Development of fish collagen/bioactive glass/chitosan composite nanofibers as a GTR/GBR membrane for inducing periodontal tissue regeneration. *Biomed. Mater.*, **2017**, 12, 055004.
- Zhu Y., Zhao L., Ngai L. Multiphasic Membranes/Scaffolds for Periodontal Guided Tissue Regeneration. *Macromol. Mater. Eng.*, **2023**, 308, 2300081.
- Zhuang Y., Lin K., Yu, H. Advance of Nano-Composite Electrospun Fibers in Periodontal Regeneration. *Front. Chem.*, **2019**, 7, 495.
- Zia K.M., Tabasum S., Nasif M., Sultan N., Aslam N., Noreen A., Zuber M. A review on synthesis, properties and applications of natural polymer based carrageenan blends and composites. *Int. J. Biol. Macromol.*, **2017**, 96, 282-301.
- Zięba M., Chaber P., Duale K., Maksymiak M., Basczok M., Kowalczyk M., Adamus D. Polymeric Carriers for Delivery Systems in the Treatment of Chronic Periodontal Disease. *Polymers*, **2020**, 12, 1574.
- Ιωάννου Ε. Σημειώσεις για το μάθημα: *Θαλάσσια Φαρμακογνωσία*, ΜΔΕ Τομέα Φαρμακογνωσίας και Χημείας Φυσικών Προϊόντων. ΕΚΠΑ, Αθήνα, **2016**.
- Ορφανίδης Σ. Προοπτικές υδατοκαλλιέργειας μακροφυκών στην Ελλάδα. Καβάλα, **2009**.

Χατζηχρηστίδης Ν., Πιτσικάλης Μ., Ιατρού Ε. Σημειώσεις για το μάθημα: *Βιομηχανική Χημεία*, Τομέα Βιομηχανικής Χημείας, ΕΚΠΑ, Αθήνα, **2011**.