



**ΑΛΕΞΑΝΔΡΕΙΟ ΤΕΧΝΟΛΟΓΙΚΟ ΕΚΠΑΙΔΕΥΤΙΚΟ ΙΔΡΥΜΑ
ΘΕΣΣΑΛΟΝΙΚΗΣ
ΣΧΟΛΗ ΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ ΤΡΟΦΙΜΩΝ &
ΔΙΑΤΡΟΦΗΣ
ΤΜΗΜΑ ΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ ΤΡΟΦΙΜΩΝ**



ΠΤΥΧΙΑΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ

**Η ΜΕΛΕΤΗ ΣΥΝΘΕΣΗΣ ΥΔΡΟΠΗΚΤΩΝ ΑΠΟ ΦΙΒΡΟΙΝΗ ΜΕ
ΠΡΟΣΘΗΚΗ ΔΙΑΦΟΡΕΤΙΚΩΝ ΣΑΚΧΑΡΩΝ**

Αναγνώστου Νικόλαος

Λαμπρίδης Δημήτριος

ΘΕΣΣΑΛΟΝΙΚΗ 2012

**Η ΜΕΛΕΤΗ ΣΥΝΘΕΣΗΣ ΥΔΡΟΠΗΚΤΩΝ ΑΠΟ ΦΙΒΡΟΙΝΗ ΜΕ
ΠΡΟΣΘΗΚΗ ΔΙΑΦΟΡΕΤΙΚΩΝ ΣΑΚΧΑΡΩΝ**

Αναγνώστου Νικόλαος

Λαμπρίδης Δημήτριος

Υποβολή Πτυχιακής διατριβής που αποτελεί μέρος των απαιτήσεων για την απονομή του Πτυχίου του Τμήματος Τεχνολογίας Τροφίμων του ΑΤΕΙ Θεσσαλονίκης.

ΣΕΠΤΕΜΒΡΙΟΣ 2012

ΚΑΡΑΓΕΩΡΓΙΟΥ ΒΑΣΙΛΗΣ

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Θα θέλαμε να εκφράσουμε τις ευχαριστίες μας στον καθηγητή της σχολής Τεχνολογίας Τροφίμων, Καραγεωργίου Βασίλη για τις πολύτιμες συμβουλές του και στην καθοδήγηση που μας προσέφερε σε όλη την διάρκεια της έρευνας και συγγραφής αυτής της πτυχιακής εργασίας, καθώς και στον καθηγητή, Ραφαηλίδη Στυλιανό για τη βοήθεια του στην διεκπεραίωση της εργασίας.

Επίσης, θα θέλαμε να ευχαριστήσουμε τους καθηγητές, Ριτζούλη Χρήστο και Παπαστεργιάδη Ευθύμη για τις συμβουλές τους και την υπομονή που επέδειξαν κατά την διάρκεια του πειραματικού μέρους της πτυχιακής εργασίας.

**Η ΜΕΛΕΤΗ ΣΥΝΘΕΣΗΣ ΥΔΡΟΠΗΚΤΩΝ ΑΠΟ ΦΙΒΡΟΪΝΗ ΜΕ
ΠΡΟΣΘΗΚΗ ΔΙΑΦΟΡΕΤΙΚΩΝ ΣΑΚΧΑΡΩΝ**

Αναγνώστου Νικόλαος

Λαμπρίδης Δημήτριος

**ΑΤΕΙ Θεσσαλονίκης, Σχολή Τεχνολογίας Τροφίμων & Διατροφής, Τμήμα
Τεχνολογίας Τροφίμων, 54101 Θεσσαλονίκη, Τ.Θ. 14561**

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Η φιβροΐνη χρησιμοποιείται ως βιούλικο για διάφορες ιατρικές, κυρίως, εφαρμογές, επειδή παρουσιάζει εξαιρετικές μηχανικές ιδιότητες αλλά και βιοσυμβατότητα. Σ' αυτήν την έρευνα μελετήθηκε η σύνθεση υδροπηκτών από φιβροΐνη με προσθήκη διαφορετικών σακχάρων. Τα σάκχαρα που χρησιμοποιήθηκαν ήταν η γλυκόζη, η φρουκτόζη και η ισογλυκόζη. Αφού απομονώθηκε η φιβροΐνη από τα κουκούλια του γένους *bombyx mori* σε υδατικό διάλυμα, παρασκευάστηκαν υδροπηκτές φιβροΐνες και υδροπηκτές φιβροΐνες με προσθήκη σακχάρου σε συγκέντρωση 20% w/w. Η μελέτη των ρεολογικών δεδομένων των υδροπηκτών έγινε με ρεόμετρο στους 20°C, όπου έγιναν δυναμικές δοκιμές (Oscillation) και δοκιμές ερπυσμού (Creep/creep recovery). Ακόμα έγινε μελέτη της συμπεριφοράς των δεσμών του συστήματος της φιβροΐνης με μέτρηση των ρεολογικών χαρακτηριστικών του συστήματος αυτού σε τρεις διαφορετικές θερμοκρασίες, 5, 20 και 37°C. Τέλος, μελετήθηκε η κρυσταλλική δομή των υδροπηκτών φιβροΐνης – σακχάρων με περίθλαση ακτινών X (XRD). Το συμπέρασμα που εξήχθη από αυτή τη μελέτη με τη βοήθεια του ρεόμετρου ήταν ότι οι υδροπηκτές φιβροΐνες χωρίς προσθήκη σακχάρου παρουσιάζουν μεγαλύτερη ελαστικότητα από της υδροπηκτές φιβροΐνες – σακχάρου ενώ στη μελέτη της συμπεριφοράς των δεσμών του συστήματος της φιβροΐνης, οι δευτερεύοντες δεσμοί του πλέγματος του συστήματος της φιβροΐνης είναι ενθαλπικής φύσης και τέλος στη μελέτη της κρυσταλλικής δομής των υδροπηκτών φιβροΐνης – σακχάρων έδειξε ότι οι υδροπηκτές δεν έχουν κρυσταλλική δομή.

Περιεχόμενα

1. Εισαγωγή	7
2. Βιβλιογραφική ανασκόπηση	9
2.1. Ιστορία των Υδροπηκτών	9
2.1.1 Τι είναι οι υδροπηκτές.....	9
2.1.2 Δομή του δικτύου της υδροπηκτής	10
2.1.3 Συμπεριφορά υδροπηκτών κατά τη διόγκωση τους.....	12
2.1.4 Το νερό στις υδροπηκτές.....	13
2.2 Υλικά που χρησιμοποιούνται για τη σύνθεση υδροπηκτών.	14
2.2.1 Αλγινικό	14
2.2.2 χιτοζάνη.....	15
2.3 Φιβροΐνη.....	16
2.3.1 Λόγοι επιλογής φιβροΐνης έναντι άλλων βιοϋλικών.....	20
2.3.2 Τρόπος πήξης φιβροΐνης	20
2.3.3 Εφαρμογές φιβροΐνης.....	23
2.3.4 Παρασκευή υδροπηκτών φιβροΐνης.....	25
2.4 Υδατάνθρακες	25
2.4.1 Μονοσακχαρίτες	26
2.4.1.1 Γλυκόζη.....	26
2.4.1.2 Φρουκτόζη.....	27
3. Σκοπός της εργασίας	29
4. Πειραματικό μέρος.....	30
4.1 Υλικά και μέθοδοι	30
4.1.1 Κουκούλια από μεταξοσκώληκα του γένους <i>Bombyx mori</i>	30
4.1.2 Αντιδραστήρια.....	30
4.1.3 Σκεύη.....	30

4.1.4 Όργανα	31
4.2. Μέθοδοι ανάλυσης	31
4.2.1 παραλαβή φιβροΐνης από κουκούλια	32
4.2.2 Παρασκευή υδροπηκτών φιβροΐνης.....	32
4.2.3 Παρασκευή υδροπηκτής φιβροΐνης με παρουσία διαφορετικών σακχάρω	32
4.2.4 Μακροσκοπική εκτίμηση	32
4.2.5 Ρεόμετρο.....	32
4.2.6 Περίθλαση Ακτινών-X (X-ray Diffraction)	33
5. Αποτελέσματα – Συζήτηση.....	34
5.1 Μακροσκοπικές παρατηρήσεις	34
5.2 Εκτίμηση ρεολογικών δεδομένων	34
5.2.1 Δυναμικές δοκιμές	34
5.2.2 Δοκιμές ερπυσμού	37
5.3 Κρυσταλλική δομής των υδροπηκτών φιβροΐνης – σακχάρων με Περίθλαση Ακτινών X (XRD)	38
6. Συμπεράσματα	41
7. Προτάσεις για μελλοντική έρευνα	43
8. Βιβλιογραφία.....	44

1. Εισαγωγή

Οι υδροπηκτές, έχουν χρησιμοποιηθεί σε πολλές βιοϊατρικές επιστήμες, όπως στην οφθαλμολογία ως φακοί επαφής και στη χειρουργική, όπως απορροφήσιμα ράμματα, καθώς και σε πολλούς άλλους τομείς στην ιατρική. Ακόμη είναι παρούσες σε πολύ προηγμένες εφαρμογές, π.χ. μηχανική των ιστών και αναγέννησης. Μπορούν ακόμα να χρησιμεύσουν στην πρόληψη της θρόμβωσης, ως συστήματα χορήγησης φαρμάκων, επιστρώσεις για βιοαισθητήρες και για μεταμόσχευση κυττάρων (Gibas & Janik, 2010).

Οι υδροπηκτές ή υδρογέλες είναι τρισδιάστατα, κολλοειδή, υδρόφιλα πλέγματα πολυμερών ικανά να συγκρατήσουν (απορροφήσουν) μεγάλες ποσότητες νερού ή βιολογικών υγρών. Οι υδροπηκτές παρουσιάζουν θερμοδυναμική συμβατότητα με το νερό που τους επιτρέπει να διογκώνονται σε ένα υδατικό μέσο και μπορούν να συγκρατούν νερό από 10-20% μέχρι πάνω από χιλιάδες φορές του ξηρού βάρους του (Sah & Pramanik, 2011).

Οι υδροπηκτές παρασκευάζονται από διάφορα πολυμερή όπως αλγινικά, χιτοζάνη, κολλαγόνο, αγαρόζη και φιβροΐνη, τα οποία έχουν μελετηθεί εκτεταμένα για τη χρήση τους στη μηχανική ιστών και άλλων εφαρμογών.

Τα τελευταία χρόνια ιδιαίτερο ενδιαφέρον παρουσιάζει η φιβροΐνη. Η φιβροΐνη είναι μια πρωτεΐνη που βρίσκεται στην ίνα του μεταξιού. Οι ίνες μεταξιού έχουν μηχανικές ιδιότητες ανώτερες του Nylon, Kevlar και υψηλής αντοχής χάλυβα. Οι μηχανικές ιδιότητες και βιοσυμβατότητα των ινών του μεταξιού επέτρεψαν στο ανθρώπινο γένος την χρήση τους για χιλιετίες σε διάφορες εφαρμογές, όπως το νόμισμα, το κυνήγι (χορδές τόξου, τρίχες, πετονιές ή δίχτυα) υφάσματα και επιδέσμους τραυμάτων. Το μετάξι παράγεται από τα αθρόποδα. Τα τελευταία χρόνια, η φιβροΐνη χρησιμοποιείται ως βιοϋλικό η οποία δεν είναι επιβλαβές στους ζωντανούς ιστούς. (Hardly & Scheibel, 2010).

Επίσης, λειτουργεί ως υποστηρικτικό υλικό για την κυτταρική και ιστική ανάπτυξη. Οι εξαιρετικές μηχανικές της ιδιότητες, ομοιάζουν με αρκετές ιστικές δομές στο σώμα, και έχει επιτυχώς ερευνηθεί στο επιστημονικό πεδίο της μηχανικής ιστών για οστά, χόνδρους και συνδέσμους. Είναι ένα καθιερωμένο βιοϋλικό ως βιομιμητική πλατφόρμα στήριξης ιστού, κυρίως λόγω της ευελιξίας της δομής της. Ακόμη δεν

υπάρχουν, όμως, ενδείξεις πως η φιβροΐνη μόνη της έχει την ικανότητα να αντιδράσει με κυτταρικούς υποδοχείς ή να πυροδοτήσει ενεργητικά αναγεννητικές διαδικασίες. Η φιβροΐνη βρίσκει εφαρμογή και ως περιέκτης φαρμάκου λόγω της βιοσυμβατότητας της και ακόμη χρησιμοποιείται στη δημιουργία ικριωμάτων φιβροΐνης - υαλουρονικού οξέος, με σκοπό την καλλιέργεια ανθρώπινων μεσεγχυματικών αρχέγονων κυττάρων (hMSCs) για την μηχανική ιστών και άλλων εφαρμογών (Karageorgiou et al, 2004)

Σκοπός της παρούσας εργασίας είναι μελέτη της σύνθεσης υδροπηκτών από φιβροΐνη ως προς την ρεολογική συμπεριφορά σε διαφορετικές θερμοκρασίες. Οι θερμοκρασίες που μελετήθηκαν οι υδροπηκτές φιβροΐνης ήταν 5, 20 και 37°C. Ακόμη έγινε μελέτη της σύνθεσης υδροπηκτών από φιβροΐνη με προσθήκη διαφορετικών σακχάρων ως προς την ρεολογική συμπεριφορά. Τα σάκχαρα που επιλέχθηκαν ήταν η γλυκόζη, η φρουκτόζη και η ισογλυκόζη. Η επιλογή των σακχάρων στηρίχτηκε σε έρευνα για τη χρήση διαφόρων ειδών σακχάρων και των επιπτώσεών τους στις μηχανικές ιδιότητες και τα χαρακτηριστικά υφής των πηκτών, κατά την παρασκευή μαρμελάδας ροδάκινου. Τα αποτελέσματα εκείνης της έρευνας έδειξαν ότι το είδος των σακχάρων παίζει σημαντικό ρόλο στο τελικό προϊόν και ότι οι μονοσακχαρίτες, και τα μίγματα αυτών, σχηματίζουν πηκτές με μικρότερη ελαστικότητα (Raphaelides et al, 1996). Τέλος έγινε μελέτη της κρυσταλλικής δομής των υδροπηκτών φιβροΐνης – σακχάρων με χρήση XRD.

2. Βιβλιογραφική ανασκόπηση

2.1. Ιστορία των Υδροπηκτών

Για πάνω από πενήντα χρόνια οι υδροπηκτές, έχουν χρησιμοποιηθεί σε πολλές βιοϊατρικές επιστήμες, όπως στην οφθαλμολογία ως φακοί επαφής και στη χειρουργική, όπως απορροφήσιμα ράμματα, καθώς και σε πολλούς άλλους τομείς στην ιατρική. Το 1955 οι Καθηγητές Lim και Wichterle στην Πράγα, συντέλεσαν στην παρασκευή της πρώτης υδροπηκτής με δυνατότητα αυτής να μπορεί να χρησιμοποιεί στην βιοϊατρική. Η πρώτη υδροπηκτική ήταν πολυ-2-υδροξυαιθυλο μεθακρυλικός εστέρας (poly-2-hydroxyethyl methacrylate) η οποία, αμέσως μετά την ανακάλυψη της, χρησιμοποιήθηκε στη παραγωγή φακών επαφών. Το κύριο πλεονέκτημα της υδροπηκτής, που ανακαλύφθηκε από τους Lim και Wichterle ήταν η σταθερότητα της σε διάφορες τιμές pH, σε θερμοκρασία και στις συνθήκες τονικότητας. Στη δεκαετία του 1980 οι υδροπηκτές τροποποιήθηκαν για άλλες εφαρμογές. Ο Lim και Sun συνέθεσαν μικροκάψουλες αλγινικού ασβεστίου για την μηχανική κυττάρων, και αντίστοιχα η ομάδα Yannas έκανε τροποποιημένες υδροπηκτές με ορισμένες φυσικές ουσίες, όπως το κολλαγόνο και ο χόνδρος καρχαρία για τη παρασκευή νέων επιδέσμων, παρέχοντας άριστες συνθήκες για την επούλωση εγκαυμάτων (Gibas & Janik, 2010).

Σήμερα, οι υδροπηκτές εξακολουθούν να απασχολούν τους επιστήμονες επειδή οι υδροπηκτές είναι παρούσες σε πολύ προηγμένες εφαρμογές, π.χ. μηχανική των ιστών και αναγέννησης, όπου μπορούν να εφαρμοστούν με μη επεμβατικό τρόπο. Μπορούν ακόμα να χρησιμεύσουν στην πρόληψη της θρόμβωσης, ως συστήματα χορήγησης φαρμάκων, επιστρώσεις για βιοαισθητήρες και για μεταμόσχευση κυττάρων (Gibas & Janik, 2010).

2.1.1 Τι είναι οι υδροπηκτές

Σύμφωνα με τις τελευταίες ιατρικές και φαρμακευτικές εγκυκλοπαίδειες, δεν υπάρχει ακόμη ακριβής ορισμός του όρου υδροπηκτική. Πιο συχνά, η υδροπηκτική θεωρείται ότι είναι ένα υλικό το οποίο απορροφά μεγάλη ποσότητα νερού. Οι πολυμερείς υδροπηκτές μπορεί να είναι είτε συνθετικής ή φυσικής προέλευσης, ομοπολυμερή ή συμπολυμερή. Σύμφωνα με τον ορισμό του Hoffman η υδροπηκτική είναι η χημική πηκτική που σταθεροποιείται με ομοιοπολικά διασυνδεδεμένα δίκτυα. Αυτές οι χημικές

υδροπηκτές μπορούν να παρασκευαστούν είτε με διασύνδεση απο υδατοδιαλυτά πολυμερή ή μετατρέποντας υδρόφοβα πολυμερή σε υδρόφιλα πολυμερή τα οποία έχουν σταυροειδείς δεσμούς για να σχηματίσουν ένα δίκτυο. Με μια τέτοια δομή, οι υδροπηκτές είναι σε θέση να διογκώνονται, απορροφώντας μία μεγάλη ποσότητα νερού χωρίς τη διάλυση του πολυμερούς, πράγμα που τους δίνει χαρακτηριστικά παρόμοια με εκείνα των μαλακών ιστών (Gibas & Janik, 2010).

Οι υδροπηκτές παρουσιάζουν θερμοδυναμική συμβατότητα με το νερό που τους επιτρέπει να διογκώνονται σε ένα υδατικό μέσο και να συγκρατούν νερό από 10-20% του βάρους τους (Sah & Pramanik, 2011).

Δεδομένου ότι οι υδροπηκτές έχουν υδρόφιλα πλέγματα πολυμερών, περιέχουν πόρους και κενούς χώρους μεταξύ των πολυμερών τους αλυσίδων και μπορούν να εμφυτευθούν για την αποκατάστασή ιστών. Οι υδροπηκτές παρέχουν πολλά πλεονεκτήματα έναντι από κοινά συμβατικά στερεά υλικά (ικρίωματα), συμπεριλαμβανομένης μιας ενισχυμένης παροχής θρεπτικών ουσιών και οξυγόνου για τα κύτταρα. Οι πόροι παρέχουν χώρο στα κύτταρα για τον πολλαπλασιασμό και την εξάπλωση τους. Λόγω της υψηλής περιεκτικότητας σε νερό, οι υδροπηκτές είναι παρόμοιες με ορισμένους ιστούς και εξωκυττάρειες μήτρες (Sah & Pramanik, 2011).

2.1.2 Δομή του δικτύου της υδροπηκτής

Η δομή μιας ιδανικής υδροπηκτής φαίνεται στο Σχήμα 1. Οι πιο σημαντικές παράμετροι που καθορίζουν την δομή και τις ιδιότητες των διογκωμένων υδροπηκτών είναι το κλάσμα όγκου του πολυμερούς στη διογκωμένη κατάσταση, $v_{2,ss}$, το αποτελεσματικό μοριακό βάρος της πολυμερούς αλυσίδας μεταξύ των σταυροειδών δεσμών σημείων, M_c , και η σχετική απόσταση μεταξύ δύο γειτονικών σταυροειδών δεσμών, ξ . Η θεωρία της ελαστικότητας και η θεωρία ισορροπίας-διόγκωσης είναι ευρέως εφαρμοσμένες για να περιγράψουν αυτές τις τρεις εξαρτημένες παραμέτρους (Ganji et al, 2010).



Σχήμα 1 : Σχηματική αναπαράσταση της δομής μιας ιδανικής υδροπηκτής

Το κλάσμα όγκου του πολυμερούς στη διογκωμένη κατάσταση ($v_{2,s}$) περιγράφει την ποσότητα του υγρού που μπορεί να εμποτιστεί σε μια υδροπηκτή και ορίζεται ως μία αναλογία όγκου του πολυμερούς (V_p) στο διογκωμένο όγκο του πήγματος (V_g). Είναι επίσης, αμοιβαία της αναλογίας ογκομετρικής διόγκωσης (Q) η οποία μπορεί να σχετίζεται με τις πυκνότητες του διαλύτη (ρ_1), πολυμερούς (ρ_2) και την αναλογία διογκωμένης μάζας (Q_m) :

$$v_{2,s} = \frac{V_p}{V_g} = Q^{-1} = \frac{1}{\frac{Q_m}{\rho_1} + \frac{1}{\rho_2}}$$

Το αποτελεσματικό μοριακό βάρος της πολυμερούς αλυσίδας μεταξύ των σημείων των σταυροειδών δεσμών συνήθως σχετίζεται με τον βαθμό της εγκάρσιας σύνδεσης στο πήκτωμα (X) όπως :

$$X = \frac{M_0}{2M_c}$$

όπου, M_0 είναι μια εκτίμηση του μοριακού βάρους των επαναλαμβανόμενων μονάδων (Ganji).

ξ είναι η απόσταση μεταξύ διαδοχικών διασταυρωμένων σημείων, η οποία αντιπροσωπεύει μια εκτίμηση του διαθέσιμου χώρου μεταξύ των μακρομοριακών

αλυσίδων προσβάσιμων για τη διάχυση του φαρμάκου και μπορεί να υπολογιστεί από τη ακόλουθη εξίσωση :

$$\zeta = v_{2,x}^{-1/3} l \left(\frac{C_n \cdot 2\overline{M}_c}{M_r} \right)^{1/2}$$

όπου C_n είναι η σταθερά Flory που είναι χαρακτηριστική αναλογία για ένα δεδομένο σύστημα πολυμερούς-διαλύτη, l είναι το μήκος του δεσμού άνθρακα-άνθρακα και M_r είναι το βάρος των επαναλαμβανόμενων μονάδων από τις οποίες αποτελείται η αλυσίδα του πολυμερούς (Ganji et al, 2010).

2.1.3 Συμπεριφορά υδροπηκτών κατά τη διόγκωση τους

Η ευνοϊκή ιδιότητα των υδροπηκτών είναι η ικανότητά τους να διογκώνονται, όταν έρθουν σε επαφή με ένα θερμοδυναμικά συμβατό διαλύτη. Όταν μία υδροπηκτή στην αρχική της κατάσταση είναι σε επαφή με τα μόρια του διαλύτη, ο τελευταίος προκαλεί φθορές στην επιφάνεια της υδροπηκτής και διεισδύει μέσα στο πολυμερικό δίκτυο. Σε αυτή την περίπτωση, η αδιάλυτη υαλώδης φάση διαχωρίζεται από την ελαστική περιοχή της υδροπηκτής με ένα κινούμενο όριο. Τακτικά τα πλέγματα του δικτύου στην ελαστική φάση θα αρχίσουν να επεκτείνονται, επιτρέποντας σε άλλα μόρια του διαλύτη να διεισδύσουν στο δίκτυο της υδροπηκτής (Ganji et al, 2010).

Με βάση την τεχνική των παγιδευμένων φωτοενεργοποιούμενων φθοριοφόρων (caged photo-activated fluorophores) και άλλες προσομοιώσεις, είναι προφανές ότι η διόγκωση δεν είναι μια συνεχής διαδικασία. Ενάντια στην οσμωτική δύναμη, υπάρχει μια αντίθετη δύναμη ελαστικότητας, η οποία εξισορροπεί την επέκταση του δικτύου και αποτρέπει την παραμόρφωση του. Κατά την ισορροπία, όπου η ελαστικότητα και οσμωτικές δυνάμεις είναι ίσες, δεν υπάρχει πρόσθετη διόγκωση (Ganji et al, 2010).

Ένα από τα πολύ σημαντικά χαρακτηριστικά της διόγκωσης της υδροπηκτής είναι ο ρυθμός διόγκωσης ο οποίος προσδιορίζεται από διάφορες φυσικοχημικές παραμέτρους ιδιαίτερα την έκταση του πορώδους, και το είδος της δομής του πορώδους. Με βάση αυτό, οι υδροπηκτές μπορούν να ταξινομηθούν σε τέσσερις κατηγορίες: Μη-πορώδη, μικρο-πορώδη, μακρο-πορώδη και υπερ-πορώδη υδροπηκτές (Ganji et al, 2010).

2.1.4 Το νερό στις υδροπηκτές

Το νερό στις υδροπηκτές όχι μόνο παρέχει ένα υγρό περιβάλλον (σημαντικό παράδειγμα, στην επούλωση των πληγών) αλλά επίσης ελέγχει την διείσδυση θρεπτικών ουσιών εντός των κυττάρων και των κυτταρικών προϊόντων. Αποξηραμένες υδροπηκτές μπορούν να διογκωθούν σε νερό έως και 1000 φορές του βάρους τους. Η ποσότητα του νερού που απορροφάται συνήθως εκφράζεται ως το περιεχόμενο νερού ισορροπίας (EWC) (Εξίσωση 1):

$$EWC = \frac{W_w}{W_t} \cdot 100\% \quad (1)$$

όπου W_w είναι το βάρος του νερού στη πηκτή και W_t είναι το ολικό βάρος της ένυδρης πηκτής (Gibas & Janik, 2010).

Το EWC είναι η πιο σημαντική ιδιότητα των υδροπηκτών. Δεδομένου ότι το νερό σε μια δομή υδροπηκτής προσδίδει μοναδικές ιδιότητες και τις πιθανές περαιτέρω εφαρμογές σε βιοϊατρικά πεδία (Gibas & Janik, 2010).

Η διόγκωση των υδροπηκτών είναι μια αρκετά περίπλοκη διεργασία και αποτελείται από έναν αριθμό σταδίων. Στο πρώτο βήμα, τα μόρια νερού που εισέρχεται στο ένυδρο πλέγμα της υδροπηκτής και ενυδατώνουν τις πιο πολικές, υδρόφιλες ομάδες. Το οποίο είναι αποτέλεσμα της πρωτογενής δέσμευσης νερού. Στο δεύτερο στάδιο, οι υδρόφοβες ομάδες εκτίθενται, και αλληλεπιδρούν με μόρια του νερού δίνοντας τη δευτεροταγή δέσμευση νερού. Η πρωτογενής και δευτερογενής δέσμευση νερού μαζί σχηματίζουν το συνολικό δεσμευμένο νερό. Στο τρίτο βήμα, λόγω της ωσμωτική δύναμης στο δικτύου υφίσταται αντίσταση από τους ομοιοπολικούς ή από τους φυσικούς σταυροειδείς δεσμούς, έχει αποτέλεσμα την απορρόφηση μίας πρόσθετης ποσότητα νερού. Το νερό που απορροφάται μέχρι την διόγκωση ισορροπίας καλείται ελεύθερο νερό το οποίο γεμίζει το χώρο μεταξύ των αλυσίδων του δικτύου και των μεγαλύτερων πόρων (Gibas & Janik, 2010).

Η συνολική ποσότητα του νερού που απορροφάται από μία υδροπηκτική εξαρτάται από τη θερμοκρασία και την ειδική αλληλεπίδραση μεταξύ των μορίων του νερού και των αλυσίδων του πολυμερούς και μπορεί να περιγραφεί από την θεωρία του Flory-

Huggins. Η ελεύθερη ενέργεια ανάμιξης (ΔG_m) των αλυσίδων του πολυμερούς και ύδατος μορίων εκφράζεται από την Εξίσωση 2:

$$\Delta G_m = kT [n_w \ln \phi_w + \ln(1 - \phi_w) + \chi n_w (1 - \phi_w)] \quad (2)$$

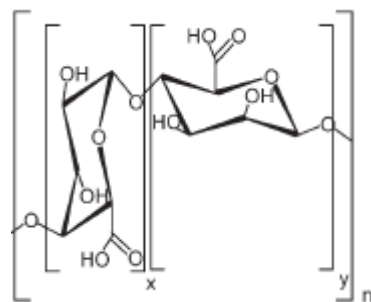
όπου: το χ είναι η παράμετρος της αλληλεπίδρασης των μορίων νερού με τα πολυμερή, η οποία μπορεί να υπολογιστεί από πειραματικά δεδομένα της ισορροπίας πρόσληψης νερού του δικτύου υπό την παρουσία μίας φάσης ατμού που περιέχει νερό, n_w είναι ο αριθμός μορίων και ϕ_w είναι ο όγκος του νερού (Gibas & Janik, 2010).

2.2 Υλικά που χρησιμοποιούνται για τη σύνθεση υδροπηκτών.

Οι υδροπηκτές παρασκευάζονται από διάφορα πολυμερή όπως αλγινικά, χιτοζάνη, κολλαγόνο, αγαρόζη και φιβροΐνη, τα οποία έχουν μελετηθεί εκτεταμένα για τη χρήση τους στη μηχανική ιστών και άλλων εφαρμογών. Παρακάτω γίνεται αναφορά κάποιων πολυμερών.

2.2.1 Αλγινικό

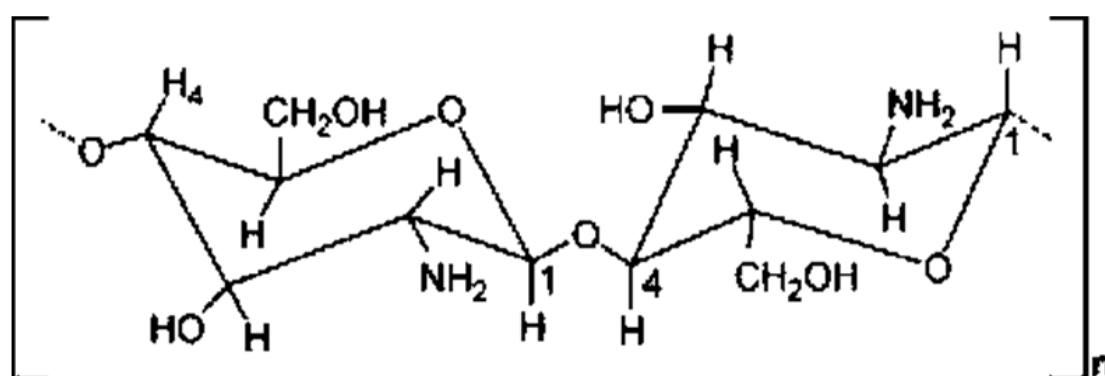
Το αλγινικό είναι ένα γραμμικό συμπολυμερές του D-μαννουρονικού (M) οξέως και L-γουλουρονικού οξέος (G) (Σχήμα 2) που ευρέως χρησιμοποιείται για την ενθυλάκωση κυττάρων. Η αλληλουχία της δομής του μπορεί είναι είτε όμοια ή εναλλασσόμενη (MMMM, GGGG, ή GMGM). Πηκτές αλγινικού έχουν επίσης χρησιμοποιηθεί σε εφαρμογές χορήγησης φαρμάκων επειδή μειώνουν τη διάχυση των υδρόφιλων φαρμάκων μέσα στο αλγινικό πηκτώματα, έτσι τα φάρμακα μπορούν να παγιδευτούν στο πολυμερές μέσω ιοντικής συμπλοκοποίησης. Ακόμα έχουν επίσης χρησιμοποιηθεί για εγκλεισμό κυττάρων (π.χ., οστεοβλάστες και χονδροκύτταρα) για την επισκευή χόνδρου και διαλύματα των χονδροκυττάρων και αλγινικού, καθώς και έχουν χυτευθεί διεγχύσεως σε ανατομικά εμφυτεύματα. Τέλος, το αλγινικό έχει χρησιμοποιηθεί σε χειρουργικούς επιδέσμους και για την καταστολή της απορρόφησης ραδιενεργού στροντίου στο σώμα (Slaughter et al, 2009).



Σχήμα 2 : Δομή αλγινικού

2.2.2 χιτοζάνη

Η χιτοζάνη είναι ένας πολυσακχαρίτης που λαμβάνεται με αλκαλική αποακετυλίωση ενός φυσικώς απαντώμενου πολυσακχαρίτη, της χιτίνης. Η χιτίνη απαντάται στη φύση και αποτελείται από κρυσταλλικά μικροϊνίδια που σχηματίζουν τα δομικά συστατικά στο εξωσκελετό των αρθροπόδων ή στα κυτταρικά τοιχώματα των μυκήτων και των ζυμών. Η χιτοζάνη είναι ένα γραμμικό συμπολυμερές που αποτελείται από β (1-4)-συνδεδεμένο 2-αμινο-2-δεοξυ-D-γλυκόζη (D-γλυκοζαμίνη) και 2-ακεταμιδο-2-δεοξυ-D-γλυκόζη (N-ακετυλ -D-γλυκοζαμίνη) μονάδες (Σχήμα 3). Η χιτοζάνη εμφανίζει πρόσθετες βιολογικές ιδιότητες όπως αναγεννητική επίδραση στο συνδετικό ιστό των ούλων και επιταχύνει το σχηματισμό των οστεοβλαστών. Είναι επίσης βιοσυμβατό, μη-ανοσογόνο, μη-καρκινογόνο, μη τοξικό και βλεννοπροσκολλητικό πολυμερές, το οποίο το καθιστά υποψήφιο για βιοϊατρικές εφαρμογές, όπως είναι η διαχείριση τραύματος, η μηχανική των ιστών και μεταφοράς φαρμάκου (Suresh et al, 2011).



Σχήμα 3 : Δομή της χιτοζάνης

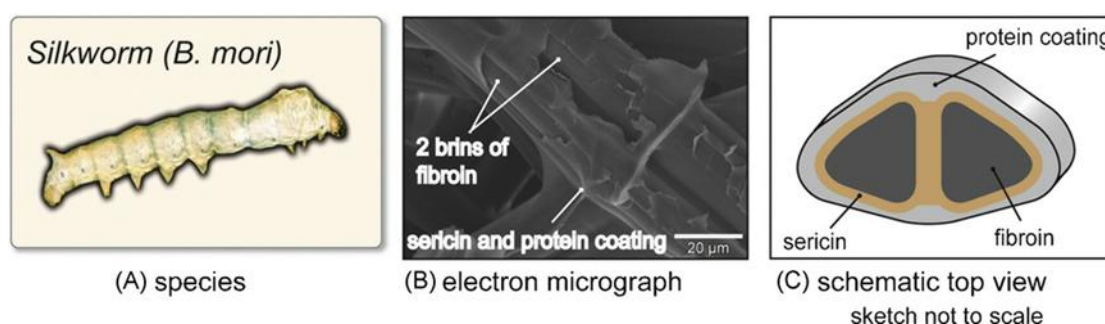
Η αγαρόζη είναι ένας θερμοαντιστρέψιμος πολυσακχαρίτης. Η υδροπηκτική αγαρόζης είναι διαυγής, η οποία έχει χρησιμοποιηθεί για τη διατήρηση καλλιεργειών

χονδροκυττάρου. Μετά από δοκιμές στην Ευρώπη η αγαρόζη μαζί με το αλγινικό δημιούργησαν ένα σύνθετο υλικό επισκευής χόνδρου. Ωστόσο, η αγαρόζη δεν είναι βιοαποικοδομήσιμη και μπορεί να προκαλέσει ανοσογόνες αποκρίσεις όταν εμφυτεί (Chao et al, 2010).

2.3 Φιβροΐνη

Ένας αριθμός ζώων γνωστά ως αρθρόποδα έχουν εξελιχθεί να παράγουν από συγκεκριμένες διεργασίες το μετάξι, το οποίο είναι ένα σύνθετο υλικό. Μεγάλη οικονομική σημασία έχει το είδος του μεταξοσκώληκα *Bombyx mori* (*B. mori*) που παράγουν κουκούλια από τις σύνθετες ίνες του μεταξιού για να προστατευτεί από τα αρπακτικά ζώα κατά τη διάρκεια της μεταμόρφωσης τους σε σκόρο. Οι ίνες μεταξιού έχουν μηχανικές ιδιότητες ανώτερες του Nylon, Kevlar και υψηλής αντοχής χάλυβα. Οι μηχανικές ιδιότητες και βιοσυμβατότητα των ινών του μεταξιού επέτρεψαν στο ανθρώπινο γένος την χρήση τους για χιλιετίες σε διάφορες εφαρμογές, όπως το νόμισμα, το κυνήγι (χορδές τόξου, τρίχες, πετονιές ή δίχτυα) υφάσματα και επιδέσμους τραυμάτων (Hardly & Scheibel, 2010).

Η ανθρωπότητα εκτρέφει *B. mori* μεταξοσκώληκες (Σχήμα 4A) για χιλιάδες χρόνια, γεγονός το οποίο διευκόλυνε στην κατανόηση της σύνθετης δομής του μεταξιού που αποτελείται από φιβροΐνη, σερικίνη, πεπτίδια και λιπίδια και πρόσφατα έδωσε τη δυνατότητα το μετάξι να χρησιμοποιηθεί για βιοϊατρικές εφαρμογές (Hardly & Scheibel, 2010).



Σχήμα 4: A) Φωτογραφία ενός *Bombyx mori* μεταξοσκώληκα. B) Μικρογράφημα ηλεκτρονίων ίνας κουκουλιού *B. mori* μεταξοσκώληκα, C) Σχηματική απεικόνιση της σύνθετης δομής μιας ίνας κουκουλιού.

Η ίνα του μεταξιού αποτελείται από δύο πρωτεΐνες μικρονηματίων, γνωστά ως Brins, οι οποίες είναι ενσωματωμένες σε μια γλυκοπρωτεΐνη που τις επικαλύπτει σαν κόλλα. Αυτό φαίνεται στην Σχήμα 4B και 4C. Τα Brins είναι νημάτια φιβροΐνης που αποτελείται από δέσμες (περίπου 100nm) από νανοινίδια (μεμονωμένα περίπου είναι 5nm) τα οποία κατά προτίμηση είναι ευθυγραμμισμένα με τον επιμήκη άξονα της ίνας (Hardly & Scheibel, 2010).

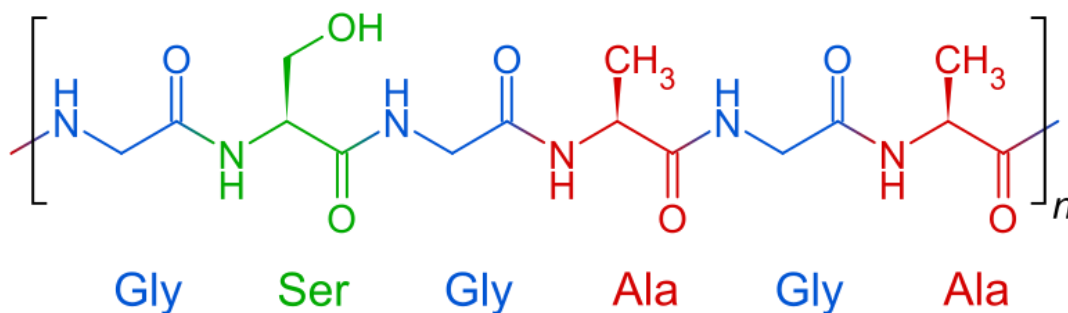
Το νανοινίδιο φιβροΐνης αποτελείται από μια σύνθεση τριών πρωτεϊνών. Η σύνθεση των τριών πρωτεϊνών αποτελείται από μια μεγάλη πρωτεΐνη, γνωστή ως βαριά αλυσίδα (H-chain) φιβροΐνη που είναι περίπου 350kDa και συνδέεται σε μία δεύτερη πιο μικρή πρωτεΐνη, γνωστή ως ελαφριά αλυσίδα (L-chain) φιβροΐνη περίπου 25kDa μέσω δισουλφιδικών δεσμών και η τρίτη είναι μια γλυκοπρωτεΐνη, γνωστή ως πρωτεΐνη P25 και είναι περίπου 30kDa και όλες είναι συνδεδεμένες μέσω μη-ομοιοπολικών υδρόφοβων αλληλεπιδράσεων. Οι μοριακές αναλογίες της H-αλυσίδα, L-αλυσίδα και P25 είναι 6:6:1. Η βαριά αλυσίδα είναι υδρόφοβη και περιέχει ένα μπλοκ αμινοξέων (Gly-Ala-Gly-Ala-Gly-Ser)_n που σχηματίζουν ανισότροπα φύλλα πλούσια σε νανοκρυστάλλους, ενώ η ελαφριά αλυσίδα είναι περισσότερο υδρόφιλη και σχετικά ελαστική, τέλος η πρωτεΐνη P25 πιστεύεται ότι παίζει ένα ρόλο στη διατήρηση της ακεραιότητας του συμπλόκου (Hardly & Scheibel, 2010).

Μια γλυκοπρωτεΐνη σαν κόλλα γνωστή ως σερικίνη σκεπάζει τη φιβροΐνη σαν παλτό και διασφαλίζει τη συνοχή του κουκουλιού (Σχήμα 4C) ώστε να κολλήσουν οι ίνες σε νημάτια. Τέλος οι ίνες περιέχουν και άλλες πρωτεΐνες που προστατεύουν το κουκούλι ενάντια μικροβίων και αρπακτικών (Hardly & Scheibel, 2010).

Στη χημική δομή των πρωτεϊνών μεταξιού από *Bombyx mori* μεταξοσκώληκες κυριαρχούν δύο απλά αμινοξέα, η γλυκίνη και η αλανίνη των οποίων το άθροισμα τους περιλαμβάνει περίπου το 75% της πρωτεΐνης (Hajime & Tsukada, 2000).

Οι κρυσταλλικές περιοχές των πρωτεϊνών του μεταξιού περιέχουν αρκετές επαναλήψεις της βασικής ακολουθίας $-(\text{γλυκίνη-αλανίνη-γλυκίνη-X})_n-$ και όπου X = σερίνη ή τυροσίνη ενώ οι κρυσταλλικές περιοχές των πρωτεϊνών του αγρίου μεταξιού είναι κυρίως του τύπου $-(\text{αλανίνη})_n-$ (Σχήμα 5). Οι άμορφες περιοχές περιέχουν τα περισσότερα μόρια αμινοξέων που είναι ογκώδη, με πολικές πλευρικές αλυσίδες και είναι πιο άφθονα στα άγρια. Οι επιστημονικές πληροφορίες σχετικά με τις

κρυσταλλικές και άμορφες περιοχές είναι σημαντικές επειδή οι ιδιότητες εφελκυσμού των ινών μεταξύ εξαρτώνται κυρίως από την κρυσταλλική δομή, ενώ οι φυσικές ιδιότητες, όπως ανάκτηση υγρασίας, χρωστική ικανότητα και χημική αντίσταση εξαρτώνται από την κατάσταση των άμορφων περιοχών (Hajime& Tsukada, 2000).



Σχήμα 5 : Βασική δομή φιβροΐνης, (Gly-Ser-Gly-Ala-Gly-Ala)_n

Με την τεχνική της απομάκρυνσης της σερικίνης, γίνεται εκτεταμένη υδρολυτική αποδόμηση της φιβροΐνης που μπορεί να έχει ως αποτέλεσμα μία ευρεία κατανομή του μοριακού της βάρους. Η φιβροΐνης μπορεί να τροποποιηθεί και με άλλους τρόπους (με προσθήκη NaOH, αλλαγή θερμοκρασίας, ενζυματική αποδόμηση) γεγονός που έχει ως συνέπεια την σημαντική ελάττωση του μοριακού βάρους. Έτσι, εμποδίζονται οι μηχανικές ιδιότητες, επηρεάζεται το ιξώδες, η κρυσταλλικότητα του μορίου, ο βαθμός αποδόμησης, αλλά και η κινητική απελευθέρωσης του φαρμάκου στο αντίστοιχο σύστημα διανομής του (Garcia-Fuentes et al, 2009).

Μία άλλη φυσική ιδιότητα της φιβροΐνης, είναι η κρυσταλλικότητα της και η αδιαλυτότητα στο νερό. Οι υδροφοβικές δομές στη δευτεροταγή δομή σχηματίζουν διαμοριακές β-πτυχωτές επιφάνειες και έτσι σχηματίζονται οι κρυσταλλικές περιοχές. Η πιο κοινή μέθοδος για την αύξηση των β-πτυχωτών επιφανειών είναι αυτή με την μεθανόλη. Με αυτόν τον τρόπο η πρωτεΐνη γίνεται πιο σταθερή και μειώνεται η υδατοδιαλυτότητα. Άλλωστε η κρυσταλλικότητα είναι η βάση για την σταθερότητα της φιβροΐνης (υπερβολική αύξηση της κρυσταλλικότητας όμως οδηγεί σε μειωμένη ευελιξία και συνεπώς σε πιο εύθραυστη πρώτη ύλη) (Dyakonov et al, 2012).

Η κρυσταλλοποιημένη φιβροΐνη είναι αδιάλυτη στους περισσότερους διαλύτες που χρησιμοποιούνται στα συστήματα διανομής φαρμάκου, οπότε χρειάζεται να περάσει από την διαδικασία της διαλυτοποίησης. Το τελικό υδατικό διάλυμα φιβροΐνης που

χρησιμοποιείται για την κατασκευή συσκευών διανομής φαρμάκου παρουσιάζει τα εξής πλεονεκτήματα: την επιλογή φόρτισης φαρμάκου, πορογενούς, η μικροσωματιδίων που είναι αδιάλυτα σε υδατικά διαλύματα, την ευκολία αποστείρωσης με φιλτράρισμα και την απουσία υπολειμμάτων από διαλύτες στην κατασκευασμένη μήτρα. Επιπλέον, η φιβροΐνη είναι εξαιρετικά θερμοάντοχη, παρουσιάζοντας μηχανική σταθερότητα έως και τους 140°C (βαθμούς Κελσίου) (Motta et al, 2004).

Η φιβροΐνη εξάγεται από το μετάξι του μεταξοσκώληκα και καθαρίζεται με ειδικές τεχνικές. Είναι μία ουσία μη-τοξική και μη-ανοσογονική, άρα και συμβατή με τον ανθρώπινο οργανισμό. Αυτό έχει ως αποτέλεσμα τοπική και όχι σημαντικού μεγέθους φλεγμονώδη απόκριση. Επιπροσθέτως, εμφανίζει καλή διαπερατότητα ύδατος και υδρατμών στους ιστούς. Επίσης, λειτουργεί ως υποστηρικτικό υλικό για την κυτταρική και ιστική ανάπτυξη. Οι εξαιρετικές μηχανικές της ιδιότητες, ομοιάζουν με αρκετές ιστικές δομές στο σώμα, και έχει επιτυχώς ερευνηθεί στο επιστημονικό πεδίο της μηχανικής ιστών για οστά, χόνδρους και συνδέσμους. Είναι ένα καθιερωμένο βιοϋλικό ως βιομιμητική πλατφόρμα στήριξης ιστού, κυρίως λόγω της ευελιξίας της δομής της. Ακόμη δεν υπάρχουν, όμως, ενδείξεις πως η φιβροΐνη μόνη της έχει την ικανότητα να αντιδράσει με κυτταρικούς υποδοχείς ή να πυροδοτήσει ενεργητικά αναγεννητικές διαδικασίες (Pal et al, 2009).

Η φιβροΐνη ως φυσικό πρωτεϊνικό πολυμερές με μοναδικές ιδιότητες, είναι προτιμώμενη μήτρα για ενσωμάτωση και διανομή μίας ποικιλίας θεραπευτικών παραγόντων. Είναι βιοσυμβατή, με αργό ρυθμό βιοδιάσπασης (το προϊόν της αποδόμησης ίσως να είναι χρήσιμο στην αναγέννηση οστού), με εξαιρετικές μηχανικές ιδιότητες και δυνατότητα επεξεργασίας του μορίου της. Μήτρες κατασκευασμένες από φιβροΐνη, είναι ικανές να διανεύουν πρωτεϊνικά φάρμακα και να διατηρούν τη δραστηριότητα τους. Με τη χρήση ενός βιοϋλικού αποφεύγεται η χρήση οργανικών διαλυτών, και επιτυγχάνεται τεχνολογία ήπιας επεξεργασίας. Επίσης, το σύστημα διανομής είναι ρυθμιζόμενο, άρα υπάρχει χωροχρονικός έλεγχος των θεραπευτικών συγκεντρώσεων των πρωτεϊνικών μορίων που έχουν φορτιστεί στην μήτρα (Zhang et al, 2011)

2.3.1 Λόγοι επιλογής φιβροΐνης έναντι άλλων βιοϋλικών

Τα εντυπωσιακά και γοητευτικά χαρακτηριστικά των πρωτεϊνών του μεταξιού από τη πλευρά των βιομηχανικών υλικών μπορούν να συνοψιστούν ως εξής, με σύγκριση άλλων φυσικών απαντώμενων βιοπολυμερών. 1) Οι ίνες μεταξιού μπορούν να διαλυθούν σε πυκνά ουδέτερα διαλύματα άλατος όπως χλωριούχο ασβέστιο σε υψηλές θερμοκρασίες χωρίς τη χρήση οποιουδήποτε επιβλαβούς και αναγωγικού μέσου. 2) Η φιβροΐνης, πρωτεΐνη του μεταξιού που παράγεται από την *Bombyx mori* όπως προαναφέρθηκε είναι ένα από τα πιο άφθονα σε φυσικές ίνες και μπορεί να αποκτηθεί εύκολα και ανέξοδα. 3) Η χρήση διαφόρων μορφών όπως σκόνες, πηκτές και φιλμ μεταξιού. 4) Οι πρωτεΐνες μεταξιού γίνονται αδιάλυτες, με εμβάπτιση τους σε διάλυμα αλκοόλης. Αυτή η τεχνική είναι ενδιαφέρουσα για την εφαρμογή των υλικών φιβροΐνης ως βιοϋλικά δεδομένου ότι αυτό δεν είναι επιβλαβής στους ζωντανούς ιστούς (Hajime & Tsukada, 2000).

2.3.2 Τρόπος πήξης φιβροΐνης

Οι πηκτές φιβροΐνης είναι ενδιαφέροντα βιοϋλικά εφόσον μπορούν να χρησιμοποιηθούν ως πορώδη ικριωμάτα για μηχανική ιστών. Το διάλυμα φιβροΐνης είναι εγγενώς μεταβλητό και μετατρέπεται σε κατάσταση πηκτής υπό ισόθερμες συνθήκες αποθήκευσης. Η πηκτωματοποίηση συνοδεύεται από σχηματισμό θερμοδυναμικών σταθερών φύλλων E. Οι Kim et al έχουν δείξει ότι πηκτές φιβροΐνης έχουν μακροπορώδη δομή και το μέτρο συμπιεστότητας τους μπορεί να ρυθμιστεί με την αλλαγή της συγκέντρωσης της πρωτεΐνης. Η πήξη της φιβροΐνης είναι μια αργή διαδικασία και ο ρυθμός της αυξάνει με μείωση του pH (Nagarkar, 2010).

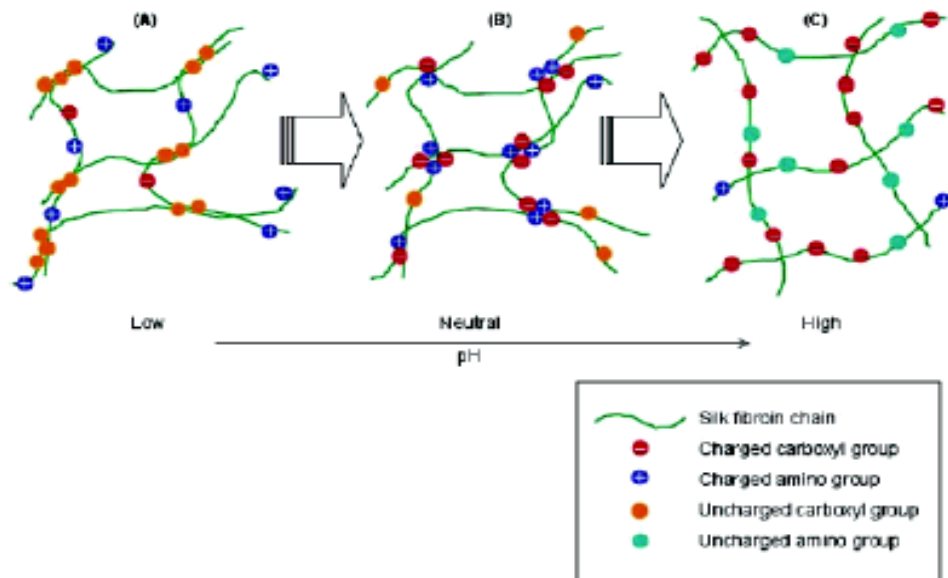
Οι Ayub et al, το 1993, μελέτησαν πηκτές φιβροΐνης με χρήση υπέρυθρης φασματοσκοπίας (IR), κυκλικού διχρωϊσμού (CD), μικροσκοπία σάρωσης ηλεκτρονίων (SEM) και ακτίνων-X. Η χρήση CD έδειξε ότι η πρωτεΐνη είχε τυχαία χωροδιάταξη σπείρας στο διάλυμα και διάπλασης φύλλου β στην πηκτική. Παρόμοια μεταβολή διάπλασης ανιχνεύθηκε χρησιμοποιώντας μετασχηματισμό Fourier υπέρυθρης φασματοσκοπίας (FTIR). Μελέτες με ακτίνες X σε αποξηραμένη πηκτική μεταξιού έδειξαν κρυσταλλικές δομές που σχηματίζονται από φύλλα β, ενώ μία ηλεκτρονική μικρογραφία της λυοφιλοποιημένης πηκτικής έδειξε μία πορώδη δομή. Με βάση αυτά τα αποτελέσματα, οι Ayub et al πρότειναν ότι πηκτωματοποίηση μεταξιού

οδηγείται από υδρόφοβες αλληλεπιδράσεις μεταξύ των αλυσίδων που οδηγούν στο σχηματισμό των δεσμών υδρογόνου στα φύλλα β που δίνουν σταθερότητα στη δομή του πηκτώματος (Nagarkar, 2010).

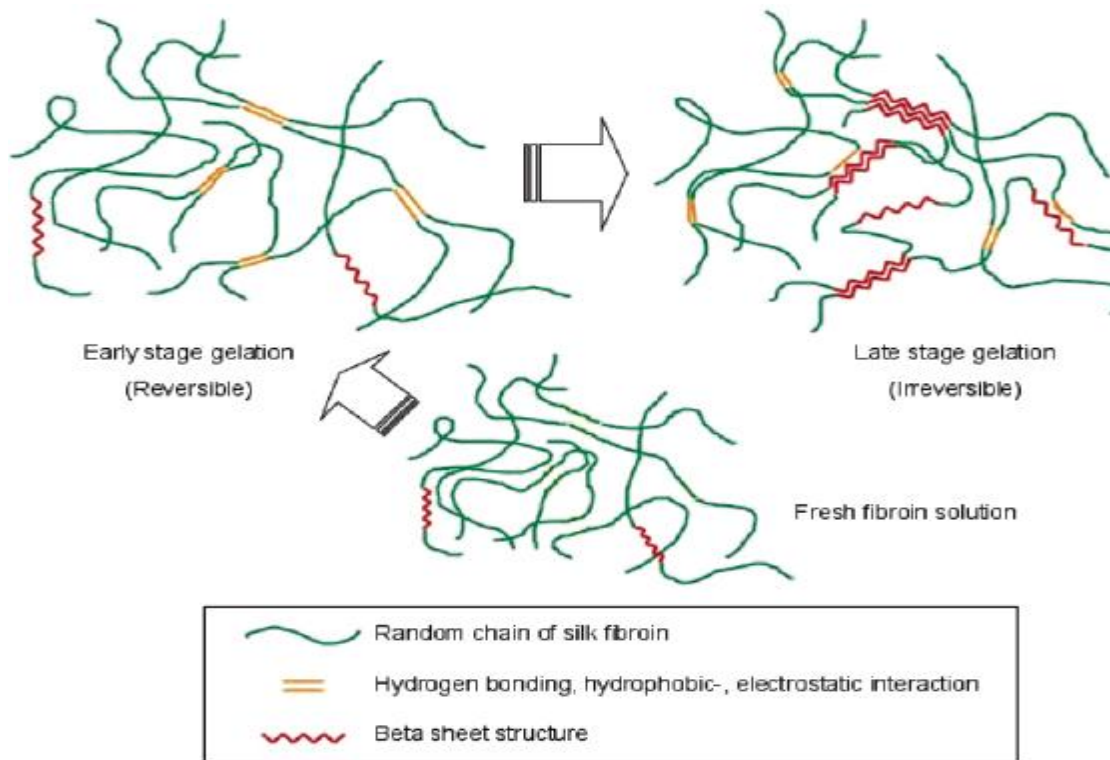
Οι Matusmoto et al, μελέτησαν την πήξη διαλύματος φιβροΐνης σε συνάρτηση διαφόρων παραμέτρων, όπως η συγκέντρωση, το pH και η θερμοκρασία. Η χρονική εξέλιξη της πήξης ερευνήθηκε με παρακολούθηση αλλαγών στην οπτική πυκνότητα, FTIR και CD φάσματα. Οι συγγραφείς παρατήρησαν μια ισχυρή εξάρτηση από το pH στο χρόνο πήξης του διαλύματος της φιβροΐνης. Ο χρόνος πήξης αυξάνεται με την αύξηση του pH. Με βάση τα δεδομένα τους, πρότειναν τον ακόλουθο μηχανισμό πήξης. Αλλαγή του pH από ουδέτερο σε όξινο προκαλεί πρωτονίωση της καρβοξυλομάδας στις παρούσες πλευρικές αλυσίδες. Αυτό μειώνει τις ηλεκτροστατικές απωθήσεις και ως εκ τούτου αυξάνει την υδροφοβικότητα της φιβροΐνης, με αποτέλεσμα, ισχυρές υδροφοβικές αλληλεπιδράσεις και φυσικοί διασταυρωμένοι δεσμοί επιταχύνουν τη διαδικασία πήξης. Αλλαγή του pH από ουδέτερο σε βασικό στην κλίμακα 6 – 9 pH, οι καρβοξυλομάδες και οι αμινομάδες φορτίζονται. Οι ελκτικές ηλεκτροστατικές αλληλεπιδράσεις μεταξύ των αντίθετων φορτισμένων ομάδων προκαλεί πήξη, αλλά σε βραδύτερο ρυθμό από ότι σε όξινο pH. Πάνω από pH 9, οι βασικές αμινομάδες και οι όξινες καρβοξυλομάδες αρχίζουν να αποπρωτονώνονται με αποτέλεσμα την αύξηση των απωστικών ηλεκτροστατικών αλληλεπιδράσεων μεταξύ των καρβοξυλομάδων που οδηγούν σε μεγαλύτερο χρόνο πήξης. Μια σχηματική αναπαράσταση αυτών των αλληλεπιδράσεων ως συνάρτηση του pH φαίνεται στο Σχήμα 6 (Nagarkar, 2010).

Οι δευτερεύουσες δομικές αλλαγές εντοπίστηκαν με τη χρήση FTIR και CD κατά τη διάρκεια της πήξης της φιβροΐνης. Αυτές οι τεχνικές πρότειναν ότι η τυχαία διαμόρφωση σπείρα της φιβροΐνης σε διάλυμα άλλαξε τη διαμόρφωση του β φύλλου στην πηκτή. Οι συγγραφείς υπολόγισαν το ποσοστό των β φύλλων που σχηματίζονται κατά τη διάρκεια της πήξης. Η μελέτη τους, πρότεινε ότι στα αρχικά στάδια της ζελατινοποίησης υπάρχουν λιγότερα β φύλλα και η πηκτή σχηματίζεται λόγω των σχετικά ασθενών αλληλεπιδράσεων έτσι η διαδικασία πήξης μπορεί να είναι αναστρέψιμη σε αυτά τα πρώτα στάδια. Ωστόσο, σε μεταγενέστερα στάδια η πηκτή γίνεται πιο ισχυρή με το σχηματισμό μεγάλου αριθμού β φύλλων και αντίστοιχα η

πήξη γίνεται μη αναστρέψιμη. Η σχηματική παράσταση του μηχανισμού ζελατινοποίησης που προτείνει ο Matsumoto φαίνεται στο Σχήμα 7 (Nagarkar, 2010).



Σχήμα 6 : Σχηματική αναπαράσταση της αλληλεπίδραση της αλυσίδας της φιβροΐνης με το pH



Σχήμα 7 : Σχηματική αναπαράσταση της πήξης της φιβροΐνης

Είναι προφανές από τις παραπάνω μελέτες ότι η δομή της πηκτής φιβροΐνης μέχρι σήμερα έχει χαρακτηριστεί μόνο σε μοριακή κλίμακα με την παρακολούθηση του σχηματισμού των δομών φύλλου β. Ο ρυθμός της ζελατινοποίησης και η εξάρτηση της από τη θερμοκρασία καθορίζει σε μεγάλο βαθμό αν υπάρχει μετουσίωση της πρωτεΐνης που εμπλέκεται κατά τη διάρκεια της ζελατινοποίησης. Αυτές οι λεπτομερείς πτυχές δεν έχουν μελετηθεί για μια ινώδη πρωτεΐνη, όπως τη φιβροΐνη (Nagarkar, 2010).

2.3.3 Εφαρμογές φιβροΐνης

Πρόσφατα, ενδιαφέρον μεγάλωσε για τη φιβροΐνη λόγω της ελκυστικότητας της για βιοεφαρμογές. Οι ίνες του μεταξιού έχουν χρησιμοποιηθεί ως ράμματα για μεγάλο χρονικό διάστημα στο χειρουργικό πεδίο, λόγω της βιοσυμβατότητας των ινών της φιβροΐνης με τους ανθρώπινους ιστούς. Επιπλέον, έχει αποδειχθεί ότι η φιβροΐνης μπορεί να χρησιμοποιηθεί ως υπόστρωμα για ακινητοποίηση ενζύμου σε βιοαισθητήρες στο αίμα που προς το παρόν είναι υπό δοκιμή με συμβατικά υλικά (Hajime et al).

Η φιβροΐνη δίνει ακόμα την δυνατότητα εκμετάλλευσής της για νέες χρήσεις, όπως βιοσυμβατικά υλικά για διάφορες ιατρικές εφαρμογές. Παρακάτω γίνεται μια αναφορά σε έρευνες για ιατρικές εφαρμογές που χρησιμοποιήθηκε η φιβροΐνη που είναι εν δυνάμει ένα βιοϋλικό, σε συνδυασμό με άλλα υλικά.

Μία από τις εφαρμογές της, έγκειται στη δημιουργία ικριωμάτων φιβροΐνη - υαλουρονικού οξέος, με σκοπό την καλλιέργεια ανθρώπινων μεσεγχυματικών αρχέγονων κυττάρων (hMSCs) για χρήση στην μηχανική των ιστών. Στην σχετική έρευνα δείχνεται ότι το μείγμα αυτών των δύο υλικών και συγκεκριμένα σε αναλογία 60:40 (φιβροΐνη- υαλουρονικό οξύ) παράγει μία πορώδη πολυμερή δομή, η οποία ενισχύει την εσωτερική αύξηση του ιστού (Garcia-Fuentes et al, 2009).

Πορώδη ικριώματα φιβροΐνη σε τρισδιάστατη μορφή έχουν ερευνηθεί και για την διανομή της μορφογενετικής πρωτεΐνης οστού 2 (BMP-2). Έγιναν πειράματα τόσο in vitro, όσο και in vivo, και τα αποτελέσματα έδειξαν την καταλληλότητα της φιβροΐνης ως βιοϋλικό, λόγω των ιδιαίτερων χαρακτηριστικών που συγκεντρώνει και τα οποία αναλύονται παρακάτω. Η έρευνα δείχνει ότι η χρήση των ικριωμάτων επάγει την ενεργητικότητα της αλκαλικής φωσφατάσης, την εναπόθεση ασβεστίου και

ανόργανων ουσιών με αποτέλεσμα την αναγέννηση του οστού. Επίσης, η φιβροΐνη μπορεί να χρησιμοποιηθεί και σε μορφή ταινίας με δεσμευμένη BMP-2 σε αυτή, με σκοπό την επαγωγή της οστεογενετικής διαφοροποίησης των hMSCs (Karageorgiou et al, 2006).

Η φιβροΐνη φαίνεται να βρίσκει εφαρμογή και ως περιέκτης φαρμάκου λόγω της βιοσυμβατότητας της, ενδείκνυται για ελεγχόμενη απελευθέρωση φαρμάκου στον ιστό. Παρασκευάσματα που κατασκευάζονται από φιβροΐνη, λόγω της εξαιρετικής μηχανικής σταθερότητας και της μακροπρόθεσμης βιοδιάσπασης χρησιμοποιούνται κυρίως και για *in vitro* και *in vivo* αναγέννηση οστού, με προσθήκη συνήθως αυξητικού παράγοντα (Wenk et al, 2010).

Μία ακόμη εφαρμογή της φιβροΐνης που ερευνάται είναι η χρήση της στην κατασκευή μεμβράνης για την τεχνική καθοδηγούμενης αναγέννησης οστού. Πειράματα σε κουνέλια έδειξαν τη δημιουργία οστίτη ιστού στο μέγεθος περίπου της βλάβης που υπήρχε στο κρανίο τους. Η φιβροΐνη ως υλικό προτιμήθηκε, λόγω χαμηλού κόστους, και επειδή διαχειρίζεται εύκολα και μπορεί να μετατραπεί σε ποικίλες μορφές (Song et al, 2011).

Οστεοκαθοδηγητικές μήτρες φιβροΐνης με BMP-2 που επάγουν την ανάπτυξη νέου οστού, μελετήθηκαν στην επούλωση βλαβών του μηριαίου οστού. Σε αντίθεση με το γκρουπ ελέγχου, οι υπόλοιπες μήτρες παρουσίασαν καλή γεφύρωση των αρχικών διαφυσιακών φλοιών του οστού και παρόμοια ποσότητα νεοσχηματισμένου ιστού. Η φιβροΐνη ως βιοϋλικό παρουσίασε πλεονεκτήματα έναντι του απορροφητικού σπόγγου από κολλαγόνο (ACS) (Kirker-Head et al, 2007).

Πολλές εφαρμογές δείχνουν την ικανότητα των υδροπηκτών για την καλλιέργεια κυττάρων και την αναγεννητική ιατρική. Ο Fini et al. (2005) διαπίστωσε ότι σε χαμηλά pH οι υδροπηκτές φιβροΐνης εμφανίζουν καλύτερη επούλωση των σπόγγων άπω μηριαίων σε κουνέλι (Pramanik et al, 2011).

Υδροπηκτές φιβροΐνης μελετήθηκαν όσον αφορά στη λειτουργία των οστεοβλαστών και στην επούλωση του σπογγώδους οστού σε κουνέλια. Σε πειράματα *in vivo*, οι υδροπηκτες φιβροΐνης επέτρεψαν την επούλωση των κρίσιμων τραυματισμών στο δοκιδωτό οστό των κουνελιών (Fini et al, 2005).

Η φιβροΐνης μπορεί να χρησιμοποιηθεί ως εργαλείο για μελέτες που εμπλέκονται στο σχηματισμό χόνδρου (Chao et al, 2010).

2.3.4 Παρασκευή υδροπηκτών φιβροΐνης

Οι υδροπηκτές φιβροΐνης σχηματίζονται υπό παρουσία οξέων, ιόντων, ή άλλων πρόσθετων. Εκτός από αυτά τα πρόσθετα, άλλοι παράγοντες όπως η θερμοκρασία, η συγκέντρωση φιβροΐνης, και pH επηρεάζουν σημαντικά τη διαδικασία της πήξης. Παρακάτω γίνονται αναφορές για τρόπους παρασκευής υδροπηκτών φιβροΐνης. (Wang et al, 2006).

Διαλύμα φιβροΐνης αφήνεται να πήξει μόνο του σε κάποια θερμοκρασία το διατήρησαν στους 37°C για 1-6 ώρες (Zhang et al, 2009), ενώ οι Fini et al το διατήρησαν τη νύχτα στους 50°C, οι Kim et al το διατήρησαν σε θερμοκρασία δωματίου, στους 37°C και στους 60°C, οι Pramanik et al, διατήρησαν το διάλυμα φιβροΐνης σε υγρό περιβάλλον στους 20°C για 3 ημέρες), αφού έχει ομογενοποιηθεί με χρήση υπερήχων (Chao et al (2010), Guziewicz et al (2010), Zhang et al (2009)), ή/και με ελάττωση του pH κάτω από το ισοηλεκτρικό σημείο (pI = 3,8) [Fini et al, 2005, Kim et al, 2004], ή/και με προσθήκη αιθανόλης (Moraes et al, 2009). Οι Liu et al, ανάδεδυσαν διάλυμα φιβροΐνης σε διάφορους ρυθμούς διάτμησης (150, 240 και 380 r/min) για διαφορετικούς χρόνους (15, 30, 45, 60 και 90 min) αντίστοιχα. Τέλος, οι Hanpanich et al, εφάρμοσαν χρήση ακτινοβολίας 40 και 60 kGy για να επιτευχθεί υδροπηκτική φιβροΐνης.

2.4 Υδατάνθρακες

Ο όρος «υδατάνθρακας» χρησιμοποιήθηκε αρχικά για να δείξει ότι αυτές οι ενώσεις στοιχειακά περιγράφονται από το γενικό τύπο $C_x(H_2O)_y$, πρόκειται δηλαδή για «ενυδατωμένο» άνθρακα, όπου το οξυγόνο και το υδρογόνο περιέχονται στην ίδια όπως και στο νερό αναλογία. Υπάρχουν όμως, γνωστοί υδατάνθρακες που δεν ανταποκρίνονται στον τύπο αυτό καθώς ενώσεις του τύπου $C_x(H_2O)_y$ που δεν έχουν τα χαρακτηριστικά υδατανθράκων όπως π.χ. το οξικό οξύ ($C_2H_4O_2$) και το γαλακτικό οξύ ($C_3H_6O_3$). Οι υδατάνθρακες (σάκχαρα) είναι πολυ-ύδροξυ-καρβονυλικές ενώσεις, από τα πλέον πολικά συστατικά των τροφίμων, γι' αυτό είναι σχεδόν στο σύνολό τους υδατοδιαλυτοί. Οι απλούστεροι υδατάνθρακες από άποψη δομής είναι οι μονοσακχαρίτες.

2.4.1 Μονοσακχαρίτες

Οι μονοσακχαρίτες ταξινομούνται σύμφωνα με τον αριθμό των ατόμων του άνθρακα στο μόριό τους. Έτσι έχουμε τριόζες, τετρόζες, πεντόζες, εξόζες, από τις οποίες οι περισσότερες ενδιαφέρουσες τη χημεία των τροφίμων είναι ορισμένες εξόζες (γλυκόζη, φρουκτόζη, γαλακτόζη, μαννόζη) και πεντόζες (αραβινόζη, ξυλόζη).

Η αρίθμηση των ατόμων του άνθρακα στο μόριό τους αρχίζει από το πλησιέστερο προς την ανάγουσα ομάδα ακραίο άτομο άνθρακα. Η ύπαρξη στα μόρια των σακχάρων ασύμμετρων ατόμων άνθρακα έχει ως συνέπεια την εμφάνιση στερεοϊσομερών μορφών και στροφική ικανότητα του επιπέδου του πολωμένου φωτός. Μία ένωση που είναι δεξιόστροφη αναφέρεται με το σύμβολο (+) ή (d) ενώ μία ένωση που είναι αριστερόστροφη αναφέρεται με το σύμβολο (-) ή (l). Τα κεφαλαία γράμματα D και L αποτελούν ένδειξη εναντιομέρειας που χρησιμοποιείται στα σάκχαρα και άλλα οργανικά μόρια με βιολογική σημασία όπως τα αμινοξέα και δεν χαρακτηρίζουν στροφική ικανότητα. Για παράδειγμα αναφέρεται η D-φρουκτόζη που είναι αριστερόστροφη (D (-) φρουκτόζη). Η διεύθυνση και το μέγεθος της στροφής έχουν σημαντική σημασία, τόσο για την αναγνώριση, όσο και για τον ποσοτικό προσδιορισμό των σακχάρων.

Οι εξόζες είναι η πιο ενδιαφέρουσα ομάδα μονοσακχαριτών, καθώς σε αυτήν την κατηγορία ανήκουν τα πιο διαδεδομένα στη φύση σάκχαρα, αλδόζες ή κετόζες. Βρίσκονται είτε ελεύθερες στη φύση, είτε ως συστατικά πολυσακχαριτών και γλυκοζιτών. Οι εξόζες έχουν γλυκεία γεύση, είναι ευδιάλυτες στο νερό και την αιθανόλη, αδιάλυτες στον αιθέρα. Ανάγουν το φελίγγειο υγρό και οι περισσότερες είναι ζυμώσιμες. Οι σπουδαιότερες εξόζες είναι από τις αλδοεξόζες: γλυκόζη, γαλακτόζη και μαννόζη και από τις κετοεξόζες: φρουκτόζη και σορβόζη.

2.4.1.1 Γλυκόζη

Η γλυκόζη (σταφυλοσάκχαρο, δεξτρόζη) είναι ένα απλό σάκχαρο (μονοσακχαρίτης) και ένα σημαντικός υδατάνθρακας. Τα κύτταρα τον χρησιμοποιούν ως κύρια πηγή ενέργειας. Η γλυκόζη είναι ένα από τα κύρια προϊόντα της φωτοσύνθεσης και λειτουργεί ως καύσιμο για την κυτταρική αναπνοή. Μαζί με τη φρουκτόζη απαντάται στο χυμό όλων των γλυκών καρπών και στο μέλι, ενώ αποτελεί και συστατικό του αίματος. Η γλυκόζη αποτελεί δομικό συστατικό διαφόρων ολιγοσακχαριτών, όπως

της σακχαρόζης, της λακτόζης και της μαλτόζης, καθώς επίσης και πολυσακχαριτών όπως του αμύλου, του γλυκογόνου και της κυτταρίνης και τέλος και συστατικό γλυκοζιτών. Η γλυκόζη παρασκευάζεται βιομηχανικά με όξινη ή ενζυμική υδρόλυση του αμύλου (πατάτας ή καλαμποκιού) και με όξινη υδρόλυση της κυτταρίνης. Η γλυκόζη είναι ζυμώσιμο σάκχαρο τόσο με αερόβιους μικροοργανισμούς όσο και με αναερόβιους (παραγωγή αιθανόλης). Στο Σχήμα 8 παρουσιάζεται η δομή της γλυκόζης (www.elmhurst.edu).

2.4.1.2 Φρουκτόζη

Η φρουκτόζη είναι ένας απλός μονοσακχαρίτης και έχει βρεθεί σε πολλά φυτά. Η φρουκτόζη ανακαλύφθηκε από τον Γάλλο χημικό Augustin-Pierre Dubrunfaut το 1847 (Vuilleumier).

Η φρουκτόζη είναι ένας μονοσακχαρίτης που βρίσκεται φυσικά στα φρούτα και τους χυμούς τους, στα λαχανικά και στο μέλι και τους προσδίδει γλυκιά γεύση (ελεύθερη φρουκτόζη). Στα τρόφιμα συναντάται ως συστατικό φυτικών ολιγοσακχαριτών (Bray et al, 2004).

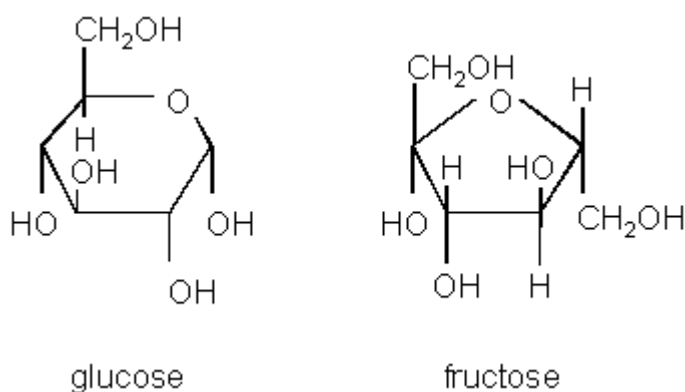
Η φρουκτόζη ως γλυκαντική ουσία (πρόσθετη ή γλυκαντική φρουκτόζη) είναι προϊόν της βιομηχανικής επεξεργασίας του αμύλου του καλαμποκιού και παρασκευάζεται είτε σε μορφή σιροπιού (high fructose corn syrup, HFCS), είτε σε κρυσταλλική μορφή (κρυσταλλική φρουκτόζη) (Bray et al, 2004).

Η κρυσταλλική φρουκτόζη αποτελείται 100% από φρουκτόζη, έχει στερεή μορφή είναι πολύ γλυκιά, λευκή, άοσμη, κρυσταλλική και είναι η πιο υδατοδιαλυτή σε σχέση με όλα τα άλλα σάκχαρα (Vuilleumier, 1993).

Η καθαρή κρυσταλλική φρουκτόζη είναι προϊόν της υγρής άλεσης καλαμποκιού και των βιομηχανιών σακχαρόζης (corn wet milling and sucrose industries). Αρχικά, το άμυλο εξάγεται από τους πυρήνες του καλαμποκιού (corn starch) και στη συνέχεια με μια σειρά επεξεργασιών η γλυκόζη μετασχηματίζεται ενζυματικά σε φρουκτόζη. Στην περίπτωση της παραγωγής της φρουκτόζης από της βιομηχανίες ζάχαρης, ο δισακχαρίτης σακχαρόζη υδρολύεται ενζυματικά και αποδίδει μόρια γλυκόζης και φρουκτόζης. Και στις δύο μεθόδους παραγωγής της, η φρουκτόζη στη συνέχεια κρυσταλλώνεται, στεγνώνεται (ξηραίνεται), αλέθεται στο επιθυμητό μέγεθος μορίων

και συσκευάζεται. Η κρυσταλλική φρουκτόζη είναι λευκή, γυαλιστερή με υψηλή καθαρότητα.

Η φρουκτόζη είναι ένας αριστερόστροφος μονοσακχαρίτης με τον ίδιο εμπειρικό τύπο της γλυκόζης ($C_6H_{12}O_6$) αλλά με διαφορετική δομή. Η δομή της φρουκτόζης παρουσιάζεται στο Σχήμα 8. Η φυσική φρουκτόζη έχει γλυκιά γεύση παρόμοια με της επιτραπέζιας ζάχαρης αλλά με φρουτένιο άρωμα Παρ' ότι η φρουκτόζη είναι μια εξόζη, γενικά υπάρχει ως ένα ημιακεταλικό δακτυλίδι (μία φουρανόζη) (<http://www.oci.uzh.ch/edu>)



Σχήμα 8 : Από αριστερά είναι η δομή της φρουκτόζης και δεξιά η δομή της γλυκόζης

3. Σκοπός της εργασίας

Σκοπός της παρούσας εργασίας ήταν:

- Η μελέτη της σύνθεσης υδροπηκτών από φιβροΐνη με προσθήκη διαφορετικών ζαχάρων ως προς την ρεολογική συμπεριφορά.
- Η μελέτη της κρυσταλλικής δομής των υδροπηκτών φιβροΐνης – σακχάρων με Περίθλαση Ακτινών-Χ (XRD).
- Η μελέτη της φύση των δεσμών του συστήματος της φιβροΐνης διερευνήθηκε με τη μέτρηση των ρεολογικών χαρακτηριστικών του συστήματος αυτού σε τρεις διαφορετικές θερμοκρασίες, 5, 20 και 37°C.

4. Πειραματικό μέρος

4.1 Υλικά και μέθοδοι

4.1.1 Κουκούλια από μεταξοσκώληκα του γένους *Bombyx mori*

Η προμήθεια της πρώτης ύλης, κουκούλια (*Bombyx mori*) έγινε από το Εργαστήριο Σηροτροφίας και Μελισσοκομίας του Καθηγητή Πασχάλη Χαριζάνη του Γεωπονικού Πανεπιστημίου Αθηνών. Τα δείγματα έφτασαν στο ΑΤΕΙ Θεσσαλονίκης σε κατάλληλη συσκευασία. Αμέσως μετά την άφιξη τους αποθηκεύτηκαν σε ξηραντήριο.

4.1.2 Αντιδραστήρια

Τα αντιδραστήρια που χρησιμοποιήθηκαν ήταν :

- Βρομιούχο Λίθιο (LiBr, Sigma-Aldrich).
- Ανθρακικό Νάτριο (Na_2CO_3 , Riedel-de Haën).
- Διάλυμα Καυστικού Νατρίου (NaOH).
- Διάλυμα Υδροχλωρίου (HCL).
- Αποσταγμένο νερό (H_2O).
- Απορρυπαντικό (Skip Active Clean).
- D(+)-Γλυκόζη (Merck).
- D(-)-Φρουκτόζη (Riedel-de Haën).

4.1.3 Σκεύη

- Ποτήρια ζέσεως.
- Σπάτουλες.
- Μαγνητάκια ανάδευσης.
- Κωνικές φιάλες των 250 ml.
- Φλάντζα.

- Διηθητικός ηθμός.
- Πλαστικά μπουκάλια των 100 ml.
- Ξηραντήριο κενού.
- Δειγματοληπτικοί υποδοχείς για ρεόμετρο.
- Δειγματοληπτικοί υποδοχείς για XRD.
- Πάραφιλμ.
- Τρυβλίο πετρί.
- μεμβράνη διαπίδωσης (MWCO 3500 g/mol; Orange Scientific).

4.1.4 Όργανα

- Μικροπιπέτες 200-1000 μ l (Pipetman neo, Gilson, United States).
- Αναλυτικός ζυγός (KERN & Sohn GmbH, Electronic Balance, ABJ 220-4M, max 180g, d=0.1mg).
- Ηλεκτρονικό pH-μετρο (Thermo Electron Corporation).
- Υπέρηχοι (Ultrasonic Processor, Hielscher).
- Θερμαινόμενος μαγνητικός αναδευτήρας (Fisher Stirring Hotplace, Fisher Scientific).
- Ρεόμετρο (Bohlin Viscometry C-VOR, Bohlin Instrument).
- Περίθλαση Ακτίνων-X (X-ray Diffraction Panalytical X'Pert Pro MPD powder diffractometer with Cu K α radiation).

4.2. Μέθοδοι ανάλυσης

Παρακάτω γίνεται μια γενική αναφορά για το τρόπο παραλαβής της φιβροΐνης και της παρασκευής υδροπηκτών.

4.2.1 παραλαβή φιβροΐνης από κουκούλια

Κουκούλια του γένους *Bombyx Mori* βράζονται σε διάλυμα Na_2CO_3 και απορρυπαντικού για 60 λεπτά, έπειτα ξεπλένονται με αποσταγμένο νερό για να απομακρυνθεί η σερικήνη και ακολουθεί ολονύκτια ξήρανση στο εναπομένον μετάξι. Το μετάξι διαλύεται σε διάλυμα LiBr (9 M) με συγκέντρωση 20% (w/v) στους 60°C για δύο μέρες. Με την ολοκλήρωση των δύο ημερών, το διάλυμα μεταξιού διηθείται υπό συνθήκες κενού. Το εκχυλισμένο μετάξι υποβλήθηκε έναντι αποσταγμένου νερού σε ταινία διαπίδυσης για 2 μέρες για την απομάκρυνση των αλάτων και για τη λήψη της φιβροΐνης. Τέλος η φιβροΐνη αποθηκεύτηκε σε πλαστικά μπουκάλια.

4.2.2 Παρασκευή υδροπηκτών φιβροΐνης

Σε διάλυμα φιβροΐνης προστέθηκε HCl για να μειώσει το pH κάτω από το ισοηλεκτρικό σημείο ($\text{pI} = 3,8$), με ταυτόχρονη χρήση υπέρηχων για 30 δευτερόλεπτα και έπειτα τοποθετήθηκε σε δειγματοληπτικούς υποδοχείς. Για το σχηματισμό υδροπηκτής διατηρήθηκε τη νύχτα σε συνθήκες περιβάλλοντος.

4.2.3 Παρασκευή υδροπηκτής φιβροΐνης με παρουσία διαφορετικών σακχάρων

Τα σάκχαρα (20% w/w) προστέθηκαν στο διάλυμα φιβροΐνης και ακολούθησε ο ίδιος τρόπος επεξεργασίας με τη παράγραφο 4.2.2. Τα ζάχαρα που χρησιμοποιήθηκαν ήταν η γλυκόζη, φρουκτόζη και ισογλυκόζη.

4.2.4 Μακροσκοπική εκτίμηση

Πραγματοποιήθηκε μακροσκοπική παρατήρηση των υδροπηκτών ως προς τη διαύγεια και υδαρότητα τους.

4.2.5 Ρεόμετρο

Μετά από την παρασκευή των υδροπηκτών πάρθηκαν 10ml από το επεξεργασμένο διάλυμα φιβροΐνης και τοποθετήθηκαν σε δειγματοληπτικούς υποδοχείς ειδικούς για ρεόμετρο με διάμετρο 4 cm και πάχος 5,5 mm. Σημειώνεται ότι πάνω από τους δειγματοληπτικούς υποδοχείς τοποθετήθηκε τριβλίο πετρί προκειμένου να διαφυλαχτούν οι υποδοχείς από εξωτερικούς παράγοντες. Για το σχηματισμό της υδροπηκτής, το σκεύασμα διατηρήθηκε τη νύχτα σε συνθήκες περιβάλλοντος. Με τον ίδιο τρόπο έγινε η παρασκευή υδροπηκτών φιβροΐνης με σάκχαρα. Οι υδροπηκτές

μελετήθηκαν με ρεόμετρο (Bohlin Viscometry C-VOR, Bohlin Instrument) και διερευνήθηκε η ρεολογική συμπεριφορά των υδροπηκτών.

Η μελέτη των ρεολογικών δεδομένων πραγματοποιήθηκε σε δυναμικές δοκιμές (Oscillation) και δοκιμές ερπυσμού (Creep/creep recovery). Οι συχνότητες που ρυθμιστήκαν στο ρεόμετρο ήταν από 0,01 – 10 Hz. Οι δυναμικές δοκιμές σάρωσης έγιναν υπό ελεγχόμενη τάση διάτμησης (Shear Stress) 0,02 Pa και υπό ελεγχόμενη διατμητική παραμόρφωση (Shear Strain) $1,667 \cdot 10^{-4}$. Οι δοκιμές ερπυσμού έγιναν υπό ελεγχόμενη τάση διάτμησης (Shear Stress) 0,02 Pa.

Η μελέτη για την συμπεριφορά των υδροπηκτών με προσθήκη σακχάρων και ο μάρτυρας τους (υδροπηκτές φιβροΐνης) έγινε στους 20°C και οι συχνότητες που μελετήθηκαν στη καταγραφή αποτελεσμάτων ήταν 0,1109 Hz και 1,019 Hz.

Η μελέτης της συμπεριφοράς των δεσμών του συστήματος της φιβροΐνης διερευνήθηκε με τη μέτρηση των ρεολογικών χαρακτηριστικών του συστήματος αυτού σε τρεις διαφορετικές θερμοκρασίες, 5, 20 και 37°C και η συχνότητα που μελετήθηκε για καταγραφή αποτελεσμάτων ήταν 0,1109 Hz.

4.2.6 Περίθλαση Ακτινών-X (X-ray Diffraction)

Με την ολοκλήρωση της παρασκευής των υδροπηκτών, αυτές τοποθετήθηκαν σε ξηραντήριο στους 60°C και παρέμειναν μέχρι να ξηραθούν. Με σπάτουλα τοποθετήθηκε σε δειγματοληπτικούς υποδοχείς για Περίθλαση Ακτινών-X.

Οι μετρήσεις XRD πραγματοποιήθηκαν σε εύρος $2\theta=6-55^\circ$, με βήμα 0.2° , χρόνο/βήμα 5 s και ταχύτητα $0.04^\circ/s$.

5. Αποτελέσματα – Συζήτηση

5.1 Μακροσκοπικές παρατηρήσεις

Οι υδροπηκτές φιβροΐνης με γλυκόζη έδωσαν τις πιο υδαρές υδροπηκτές σε σχέση με τις υδροπηκτές φιβροΐνης, τις υδροπηκτές φιβροΐνης με φρουκτόζη και τις υδροπηκτές φιβροΐνης με ισογλυκόζη. Οι υδροπηκτές φιβροΐνης και υδροπηκτές φιβροΐνης με ισογλυκόζη δεν φαινόταν να ήταν υδαρές. Τέλος οι υδροπηκτές φιβροΐνης με φρουκτόζη ήταν λίγο υδαρές.

Οι υδροπηκτές φιβροΐνης με φρουκτόζη ανέπτυξαν ένα ημιδιαφανές λευκό χρώμα ενώ οι υδροπηκτές φιβροΐνης και υδροπηκτές φιβροΐνης με ισογλυκόζη ανέπτυξαν ένα ημιδιαφανές χρώμα και οι υδροπηκτές φιβροΐνης με γλυκόζη ανέπτυξαν διαυγές χρώμα.

5.2 Εκτίμηση ρεολογικών δεδομένων

Η μελέτη των ρεολογικών δεδομένων πραγματοποιήθηκε σε δυναμικές δοκιμές και δοκιμές ερπυσμού. Τα ρεολογικά δεδομένα που προέκυψαν από τις μετρήσεις των συστημάτων φιβροΐνης – ζαχάρων έχουν ως εξής:

5.2.1 Δυναμικές δοκιμές

Στις δυναμικές δοκιμές σάρωσης υπό ελεγχόμενη διατμητική παραμόρφωση οι τιμές του συντελεστή ελαστικότητας G' , της εφαπτομένης της γωνίας δ και του μιγαδικού ιξώδους η^* στις συχνότητες 0,1 Hz και 1,0 Hz παρουσιάζονται στον ακόλουθο Πίνακα 1 για το μάρτυρα, τη φιβροΐνη με γλυκόζη, τη φιβροΐνη με φρουκτόζη και τη φιβροΐνη με ισογλυκόζη :

Πίνακας 1. Ρεολογικά δεδομένα δειγμάτων φιβροΐνης (μάρτυρας) και μιγμάτων φιβροΐνης με γλυκόζη ή φρουκτόζη ή ισογλυκόζη μετρηθέντων σε καθεστώς ελεγχόμενης παραμόρφωσης

Δείγμα	G' (Pa)	Συχνότητα (Hz)	Μιγαδικό ιξώδες (Pa*s)	$\tan\delta$	Παραμόρφωση
Μάρτυρας	383,7	0,1	4428	0,630	$3,28 \cdot 10^{-5}$

“	312,7	1,0	693,1	1,650	$2,03 \cdot 10^{-5}$
Φιβροΐνη + γλυκόζη	169,5	0,1	945,3	0,996	$1,86 \cdot 10^{-5}$
“	252,0	1,0	197,0	2,263	$2,22 \cdot 10^{-5}$
Φιβροΐνη + φρουκτόζη	219,1	0,1	2420	0,710	$1,90 \cdot 10^{-5}$
“	258,1	1,0	401,3	2,100	$2,03 \cdot 10^{-5}$
Φιβροΐνη + ισογλυκόζη	200,8	0,1	2528	0,510	$2,02 \cdot 10^{-5}$
“	144,1	1,0	387,8	7,760	$1,63 \cdot 10^{-5}$

Όπως φαίνεται στο Πίνακα 1, σε όλα τα δείγματα οι τιμές παραμόρφωσης που μετρήθηκαν ήταν εξαιρετικά μικρές γεγονός που διασφαλίζει ότι όλες οι δοκιμές έγιναν μέσα στο όρια της γραμμικής ελαστικότητας και οι τιμές των παραμέτρων που καταγράφηκαν οφείλονταν αποκλειστικά και μόνο στα δομικά χαρακτηριστικά των δειγμάτων χωρίς να έχει συμβεί θραύση δευτερευόντων δεσμών της δομής των συστημάτων αυτών. Παρατηρείται ότι τα δείγματα του μάρτυρα δείχνουν μεγαλύτερη ελαστικότητα από ότι τα μίγματα της φιβροΐνης με τα τρία ζάχαρα (γλυκόζη, φρουκτόζη και ισογλυκόζη) που εξετάστηκαν και στις δύο τιμές συχνότητας ταλάντωσης που επιλέχθηκαν. Οι τιμές συχνότητας επιλέχθηκαν με το σκεπτικό να παρέχουν στο δείγμα αρκετό χρόνο ώστε να χαλαρώνει κατά την ημιτονοειδή εφαρμογή της τάσης διάτμησης. Παρόλα αυτά οι τιμές του μιγαδικού ιξώδους σε όλα τα δείγματα μειώνονται καθώς η τιμή της συχνότητας αυξάνει γεγονός που δείχνει ότι οι δεσμοί διασύνδεσης (entanglements) στο πλέγμα (matrix) των δειγμάτων ολισθαίνουν ο ένας σε σχέση με τον άλλο χωρίς απαραίτητα να σπάσουν και αυτή η τοπολογική κίνηση αποδεικνύεται και από την αύξηση της τιμής του $\tan\delta$ που αποτελεί κριτήριο του ιξώδους χαρακτήρα των δειγμάτων δηλ. όσο πιο ψηλή είναι η τιμή αυτή τόσο και πιο έντονα το δείγμα συμπεριφέρεται ως υγρό δηλ. κινείται.

Τα ίδια δείγματα μετρήθηκαν και σε καθεστώς ελεγχόμενης τάσης διάτμησης για λόγους σύγκρισης και τα αποτελέσματα που προέκυψαν παρουσιάζονται στον ακόλουθο Πίνακα 2

Πίνακας 2. Ρεολογικά δεδομένα δειγμάτων φιβροΐνης (μάρτυρας) και μιγμάτων φιβροΐνης με γλυκόζη ή φρουκτόζη ή ισογλυκόζη μετρηθέντων σε καθεστώς ελεγχόμενης τάσης διάτμησης

Δείγμα	G' (Pa)	Συχνότητα (Hz)	Μιγαδικό ιξώδες (Pa*s)	tanδ	Παραμόρφωση
Μάρτυρας	312,1	0,1	1993	0,098	$6,37 \cdot 10^{-5}$
“	363,4	1,0	332,1	0,163	$5,77 \cdot 10^{-5}$
Φιβροΐνη + γλυκόζη	234,8	0,1	1339	0,163	$8,45 \cdot 10^{-5}$
“	290,1	1,0	237,1	0,173	$7,20 \cdot 10^{-5}$
Φιβροΐνη + φρουκτόζη	198,8	0,1	731,8	0,130	$1,18 \cdot 10^{-4}$
“	269,9	1,0	147,6	0,123	$8,05 \cdot 10^{-5}$
Φιβροΐνη + ισογλυκόζη	219,5	0,1	1080	0,236	$9,22 \cdot 10^{-5}$
“	284,3	1,0	199,1	0,167	$7,31 \cdot 10^{-5}$

Επίσης και στη περίπτωση αυτή παρατηρείται ότι το δείγμα του μάρτυρα εμφανίζει μεγαλύτερη ελαστικότητα από ότι τα δείγματα των μιγμάτων φιβροΐνης – ζαχάρων. Σε σχέση με τη προηγούμενη σειρά των μετρήσεων του Πίνακα 1 εδώ παρατηρείται ότι η τιμή του συντελεστή ελαστικότητας αυξάνει σε συνάρτηση με την αύξηση της συχνότητας ταλάντωσης. Αυτό πιθανώς να οφείλεται ότι τα δείγματα δεν προλαβαίνουν να χαλαρώσουν κατά την διάτμηση τόσο όσο στη προηγούμενη περίπτωση οπότε λόγω αδράνειας εμφανίζονται να συμπεριφέρονται περισσότερο ως

στερεά με την αύξηση της συχνότητας. Παρόλα αυτά η μείωση του μιγαδικού ιξώδους σε συνάρτηση με την αύξηση της συχνότητας δείχνει ότι τα μοριακά συστατικά της δομής των δειγμάτων εμφανίζουν κινητικότητα κατά την εφαρμογή της τάσης που στην περίπτωση αυτή ήταν μεγαλύτερη από εκείνες που εφαρμόστηκαν στη πρώτη περίπτωση με αποτέλεσμα και οι παραμορφώσεις των δειγμάτων να είναι μεγαλύτερες (Πίνακες 1 & 2).

5.2.2 Δοκιμές ερπυσμού

Πίνακας 3. Ρεολογικά δεδομένα δειγμάτων φιβροΐνης (μάρτυρας) και μιγμάτων φιβροΐνης με γλυκόζη ή φρουκτόζη ή ισογλυκόζη μετρηθέντων σε καθεστώς ερπυσμού

Δείγμα	Ολική έρπυση (1/Pa)	Ιξώδες σε μηδενική διάτμηση (Pa*s)	Ολικός Συντελεστής Ελαστικότητας(Pa)
Μάρτυρας	0,000476	$2,043 \cdot 10^5$	$2,101 \cdot 10^3$
Φιβροΐνη + γλυκόζη	0,009014	$8,61 \cdot 10^4$	110,9
Φιβροΐνη + φρουκτόζη	0,0004839	$1,742 \cdot 10^5$	$2,067 \cdot 10^3$
Φιβροΐνη + ισογλυκόζη	0,01808	$4,518 \cdot 10^4$	55,31

Όπως φαίνεται στον Πίνακα 3 το δείγμα του μάρτυρα εμφανίζεται να έχει περισσότερη συνεκτική δομή από τα άλλα δείγματα γεγονός που είναι σε συμφωνία με τα πειραματικά δεδομένα των δυναμικών δοκιμών. Όπως αναμενόταν οι τιμές του ιξώδους σε όλα τα δείγματα είναι κατά πολύ μεγαλύτερες από εκείνες που προέκυψαν από τις δυναμικές δοκιμές και αυτό είναι απολύτως συμβατό γιατί στη περίπτωση της δοκιμής ερπυσμού το ιξώδες υπολογίζεται σε κατάσταση του δείγματος υπό καθεστώς ακινησίας (μηδενικής διάτμησης).

Η φύση των δεσμών του συστήματος της φιβροΐνης διερευνήθηκε με τη μέτρηση των ρεολογικών χαρακτηριστικών του συστήματος αυτού σε τρεις διαφορετικές θερμοκρασίες, 5, 20 και 37°C. Τα αποτελέσματα που προέκυψαν παρουσιάζονται στον Πίνακα 4.

Πίνακας 4. Ρεολογικά δεδομένα δειγμάτων φιβροΐνης σε διάφορες θερμοκρασίες

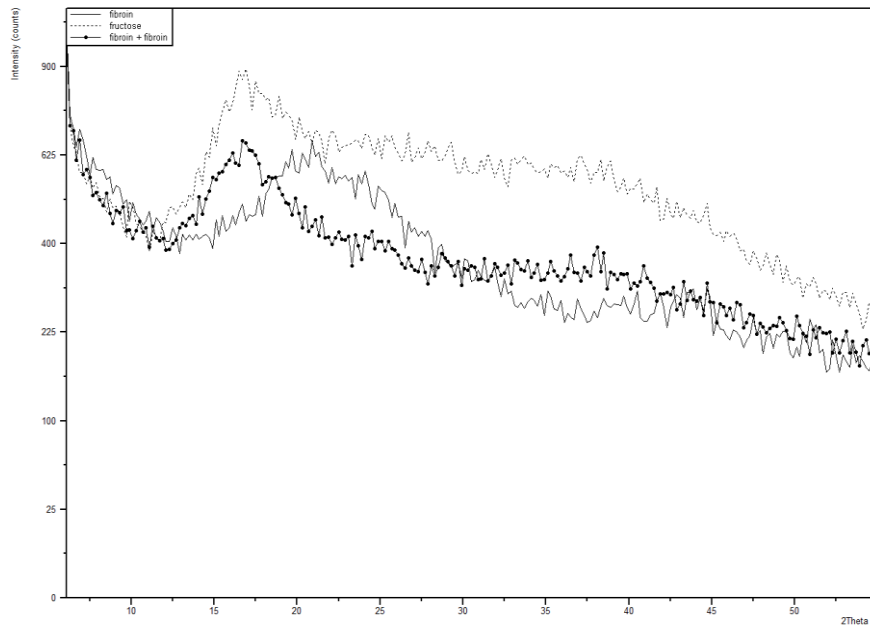
Θερμοκρασία (°C)	G' (Pa)	tanδ	Ιξώδες σε μηδενική διάτμηση (Pa*s)	Ολική έρπυση (1/Pa)	Ολικός Συντελεστής Ελαστικότητας (Pa)
5	1342	0,61	614700	0,00063	1585,8
20	1295	0,83	25180	0,00517	193,3
37	1020	0,95	111000	0,00536	186,6

Παρατηρείται βαθμιαία μείωση των τιμών των ρεολογικών παραμέτρων με την αύξηση της θερμοκρασίας γεγονός που αποτελεί ένδειξη ότι οι δευτερεύοντες δεσμοί του πλέγμα του συστήματος της φιβροΐνης είναι ενθαλπικής φύσης και πιθανώς είναι δεσμοί υδρογόνου στην πλειονότητα τους.

5.3 Κρυσταλλική δομής των υδροπηκτών φιβροΐνης – σακχάρων με Περίθλαση Ακτινών X (XRD)

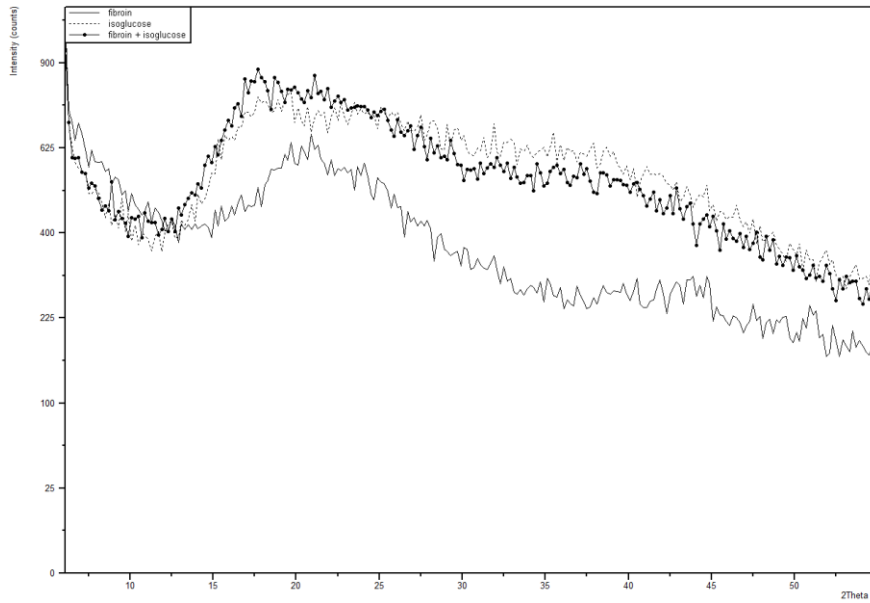
Στο Σχήμα 9 φαίνονται τα φάσματα περίθλασης της φιβροΐνης, της φρουκτόζης και της υδροπηκτής φιβροΐνης – φρουκτόζης. Για την υδροπηκτική φιβροΐνη-φρουκτόζη κυριαρχεί η δομή της φρουκτόζης και η απόσταση των κρυστάλλων της φρουκτόζης μειώνεται λίγο ενώ η δομή της φιβροΐνης χάνεται.

Στο Σχήμα 10 φαίνονται τα φάσματα περίθλασης φιβροΐνης, ισογλυκόζης και φιβροΐνης-ισογλυκόζης και στο Σχήμα 11 τα φάσματα περίθλασης φιβροΐνης, γλυκόζης και φιβροΐνης-γλυκόζης.

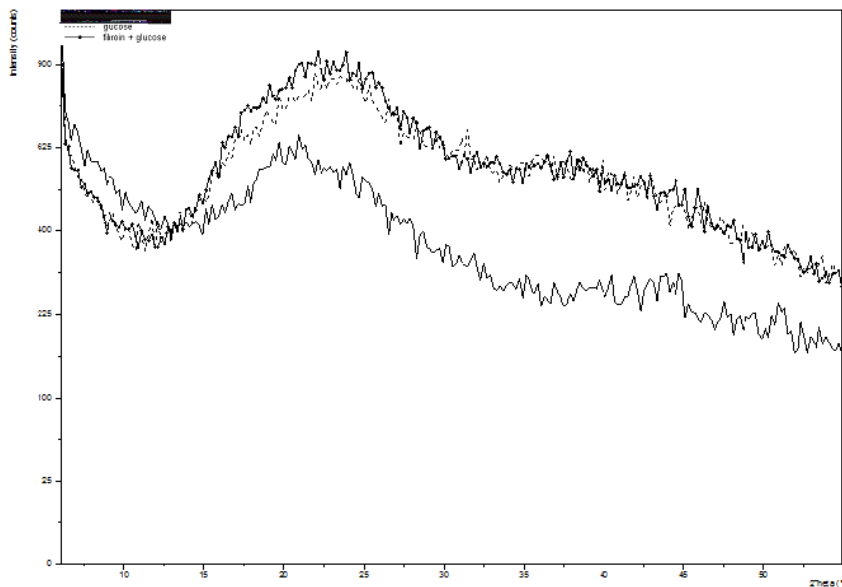


Σχήμα 9 : Φάσμα περίθλασης φιβροΐνης, φρουκτόζης και υδροπηκτής φιβροΐνης-φρουκτόζης. Σημειώνεται ότι το φάσμα με την πιο υψηλή κορυφή είναι της φρουκτόζης ενώ αυτό με την γραμμή με κύκλους είναι της υδροπηκτής φιβροΐνης-φρουκτόζης. Τέλος, το φάσμα περίθλασης φιβροΐνης απεικονίζεται στο παραπάνω σχήμα με συνεχόμενη γραμμή.

Παρόμοιο φαινόμενο δηλαδή, ότι η δομή της φιβροΐνης χάνεται και κυριαρχεί η δομή των σακχάρων συμβαίνει στην περίπτωση της υδροπηκτής φιβροΐνης-γλυκόζης και της υδροπηκτής φιβροΐνης-ισογλυκόζης αλλά δεν φαίνεται να αλλάζει η απόσταση των κρυστάλλων για αυτά τα δυο σάκχαρα.



Σχήμα 10 : Φάσμα περίθλασης φιβροΐνης, ισογλυκόζης και φιβροΐνης-ισογλυκόζης. Τα φάσμα με την διακεκομμένη γραμμή είναι της ισογλυκόζης ενώ αυτό με τη συνεχόμενη γραμμή της φιβροΐνης. Τέλος, το φάσμα περίθλασης της φιβροΐνης-ισογλυκόζης παρουσιάζεται με την γραμμή με κύκλους.



Σχήμα 11 : Φάσμα περίθλασης φιβροΐνης, γλυκόζης και φιβροΐνης-γλυκόζης. Ομοίως το φάσμα περίθλασης της φιβροΐνης παρουσιάζεται ως συνεχόμενη γραμμή, της γλυκόζης με διακεκομμένη γραμμή και τέλος, με γραμμή με κύκλους απεικονίζεται το φάσμα περίθλασης της φιβροΐνης-γλυκόζης.

6. Συμπεράσματα

Στις δυναμικές δοκιμές σάρωσης υπό ελεγχόμενη διατμητική παραμόρφωση :

- τα δείγματα των υδροπηκτών φιβροΐνης δείχνουν μεγαλύτερη ελαστικότητα από ότι τα δείγματα των υδροπηκτών με τα τρία ζάχαρα (γλυκόζη, φρουκτόζη και ισογλυκόζη)
- η αύξηση της τιμής του $\tan\delta$ αποτελεί κριτήριο του ιξώδους χαρακτήρα των δειγμάτων. Όσο πιο ψηλή είναι η τιμή αυτή τόσο πιο έντονα το δείγμα συμπεριφέρεται ως υγρό δηλ. κινείται. Συμπεραίνεται οι υδροπηκτές συμπεριφέρονται ως υγρά
- όσο μειώνονται οι τιμές του μιγαδικού ιξώδους η συχνότητα αυξάνει δείχνοντας ότι οι δεσμοί διασύνδεσης (entanglements) στο πλέγμα των δειγμάτων ολισθαίνουν ο ένας σε σχέση με τον άλλο

Στις δυναμικές δοκιμές σάρωσης υπό ελεγχόμενης τάσης διάτμησης :

- τα δείγματα των υδροπηκτών φιβροΐνης δείχνουν μεγαλύτερη ελαστικότητα από ότι τα δείγματα των υδροπηκτών με τα τρία ζάχαρα
- η τιμή του συντελεστή ελαστικότητας αυξάνει σε συνάρτηση με την αύξηση της συχνότητας ταλάντωσης. Έτσι τα δείγματα κατά την διάτμηση δεν προλαβαίνουν να χαλαρώσουν οπότε λόγω αδράνειας εμφανίζονται να συμπεριφέρονται περισσότερο ως στερεά με την αύξηση της συχνότητας
- Οι παραμορφώσεις των δειγμάτων είναι μεγαλύτερες λόγω της μείωσης του μιγαδικού ιξώδους σε συνάρτηση με την αύξηση της συχνότητας, δείχνοντας ότι τα μοριακά συστατικά της δομής των δειγμάτων εμφανίζουν κινητικότητα κατά την εφαρμογή της τάσης που στην περίπτωση αυτή ήταν μεγαλύτερη από εκείνες που εφαρμόστηκαν στις δυναμικές δοκιμές σάρωσης υπό ελεγχόμενη διατμητική παραμόρφωση.

Στις δοκιμές ερπυσμού :

- Οι υδροπηκτές φιβροΐνης εμφανίζουν να έχουν πιο συνεκτική δομή από τις υδροπηκτές με τα τρία ζάχαρα

- Οι τιμές του ιξώδους σε όλες τις υδροπηκτές που μελετήθηκαν είναι κατά πολύ μεγαλύτερες από εκείνες που προέκυψαν από τις δυναμικές δοκιμές και αυτό συνέβη διότι στην δοκιμή ερπυσμού το ιξώδες υπολογίζεται στην κατάσταση εκείνη του δείγματος υπό καθεστώς ακινησίας (μηδενικής διάτμησης).

Στην μελέτη της φύση των δεσμών του συστήματος της φιβροΐνης σε τρεις διαφορετικές θερμοκρασίες, 5, 20 και 37°C:

- οι δευτερεύοντες δεσμοί του πλέγματος του συστήματος της φιβροΐνης είναι ενθαλπικής φύσης και πιθανώς είναι δεσμοί υδρογόνου στην πλειονότητα τους.

Στη μελέτη της κρυσταλλική δομής των υδροπηκτών φιβροΐνης – σακχάρων με χρήση XRD:

- Δεν μπορεί να βγει συμπέρασμα γιατί δεν υπάρχει κρυσταλλική δομή.

7. Προτάσεις για μελλοντική έρευνα

- Χρήση ακτινοβολίας 40 και 60 kGy για την επίτευξη υδροπηκτής φιβροΐνης και υδροπηκτής φιβροΐνης με σάκχαρα και όχι με μείωση του pH με οξέα.
- Η θερμοκρασία επηρεάζει σημαντικά τη διαδικασία πήξης. Άρα για το σχηματισμό υδροπηκτής προτείνεται να γίνει διατήρηση στους 37°C και 60°C
- Διατήρηση διαλύματος φιβροΐνης για σχηματισμό υδροπηκτής περισσότερο από μια ημέρα
- Η συγκέντρωση φιβροΐνης επηρεάζει σημαντικά τη διαδικασία πήξης. Προτείνεται επανάληψη του πειράματος με μεγαλύτερη συγκέντρωση της φιβροΐνης.
- Να γίνει μελέτη της σύνθεσης υδροπηκτών από φιβροΐνη με προσθήκη διαφορετικών μονοσακχαριτών, δισακχαριτών και πολυσακχαριτών

8. Βιβλιογραφία

Επιστημονικά άρθρα

1. Garcia-Fuentes M., Meinel A., Hilbe M., Meinel L & Merkle H. (2009).Silk fibroin/hyaluronan scaffolds for human mesenchymal stem cell culture in tissue engineering. *Biomaterials*, 30, 5068–5076
2. Karageorgiou V., Tomkins M., Fajardo R., Meinel L., Snyder B., Wade K., Chen J., Vunjak-Novakovic G. & Kaplan D., (2006) Porous silk fibroin 3-D scaffolds for delivery of bone morphogenetic protein-2 in vitro and in vivo. *Journal of Biomedical Materials Research Part A*, 78(2),324-34.
3. Wenk E. , Murphy A., Kaplan D., Meinel L., Merkle H. & Uebersax L.(2010). The use of sulfonated silk fibroin derivatives to control binding, delivery and potency of FGF-2 in tissue regeneration. *Biomaterials*, 31, 1403–1413
4. Song J, Kim S., Lee J., Chae W., Kweon H., Jo Y., Lee K., Lee Y., Choi J. & Kim J.,(2011) Accelerated healing with the use of a silk fibroin membrane for the guided bone regeneration technique. *Oral Surgery Oral Medicine Oral Pathology Oral Radiology and Endodontology*, 112(6), 26-33
5. Kirker-Head C., Karageorgiou V., Hofmann S., Fajardo R., Betze O., Merkle H., Hilbe M., von Rechenberg B., McCool J., Abrahamsen L., Nazarian A., Cory E., Curtis M., Kaplan D. & Meinel L.. (2007) BMP-silk composite matrices heal critically sized femoral defects. *Bone*, 41, 247–255
6. Karageorgiou V., Meinel M., Hofmann S., Malhotra A., Volloch V. & Kaplan D.(2004) Bone morphogenetic protein-2 decorated silk fibroin films induce osteogenic differentiation of human bone marrow stromal cells. *Journal of Biomedical Material Research* ,71A, 528–537
7. Suresh P.,Suryawani S. & Divya D.. (2011) Chitosan-based interpenetrating polymer network (IPN) hydrogels: A potential multicomponent oral drug delivery vehicle. *International Journal of Comprehensive Pharmacy*, 8 (1), 1-8
8. Hanpanich B., Oonkhanond B., Vichai Srimuninnimit V., Visuthikosol V. &Prasert Sophon P.. (2011) De novo method of developing silk fibroin

- hydrogel aim for using as a dermal scaffold by gamma irradiation. *International Journal of applied biomedical engineering*, 1(4), 14-18
9. Dyakonov T., Yang C., Bush D., Gosangari S., Majuru S. & Fatmi A.. (2012) Design and characterization of a silk-fibroin-based drug delivery Platform using Naproxen as a model drug. *Journal of Drug Delivery*, In press
 10. Motta A., Migliares C., Faccioni F., Torricelli P., Fini M. & Giardino R. (2004) Fibroin hydrogels for biomedical applications: preparation, characterization and in vitro cell culture studies. *Journal of biomaterials science, Polymer edition*, 7, 851–864
 11. Chao P., Yodmuang S., Wang X., Sun L., Kaplan D., & Vunjak-Novakovic G.. (2010) Silk hydrogel for cartilage tissue engineering, *Journal of Biomedical Material Research*, 95(1), 84-90
 12. Finia M., Mottab A., Torricellia P., Giavaresia G., Aldinia N., Tschona M., Giardinoa R. & Migliaresib C.. (2005) The healing of confined critical size cancellous defects in the presence of silk fibroin hydrogel, *Biomaterials*, 26, 3527-3536
 13. Guziewicz N., Best A., Perez-Ramirez B. & Kaplan D.. (2011) Lyophilized silk fibroin hydrogels for the sustained local delivery of therapeutic monoclonal antibodies, *Biomaterials*, 32, 2642-2650
 14. Slaughter B., Khurshid S., Fisher O., Khademhosseini A. & Peppas N.. (2009), *Hydrogels in Regenerative Medicine*, *Advanced materials*, 21, 3307–3329
 15. Liu Y., Cheng Y., Xiong S., Li P., Wei Y. & Zhong Li M.. (2010) The Effect of Shearing Force that Influences Structural Transitions in Silk Fibroin, *Journal of Fiber Bioengineering and Informatics*, 3, 174-180
 16. Zhang Q., Yan S. & Mingzhong Li M.. (2009), *Silk Fibroin Based Porous Materials*, *Materials*, 2, 2276-2295

17. Wang Y., Kima H., Vunjak-Novakovic G. & Kaplan D.. (2006), Stem cell-based tissue engineering with silk biomaterials, *Biomaterials*, 27, 6064-6082
18. Sah M. & Pramanik K. (2011) Preparation, characterization and in vitro study of biocompatible fibroin hydrogel, *African Journal of Biotechnology*, 40, 7878-7892
19. Raphaelides S., Ambatzidou A. & Petrides D.. (1996) Sugar Composition Effects on Textural Parameters of Peach Jam, *Journal of food science*, 61, 942-946
20. Iwona Gibas & Helena Janik. (2010) Review : Synthetic Polymer Hydrogels for Biomedical Applications, *Chemistry & Chemical Technology*, 4, 297-304
21. Hardy J & Scheibel T. (2010) Composite materials based on silk proteins, *Progress in Polymer Science*, 35, 1093–1115
22. Hajime M & Tsukada M. (2010) New silk protein: modification of silk protein by gene engineering for production of biomaterials, *Molecular Biotechnology*, 74, 95-103
23. Pal K., Banthia A., Majumdar D.. (2009) Polymeric Hydrogels: Characterization and Biomedical Applications: a mini review, *Designed monomers and polymers*, 12, 197-220
24. Zhang W., Wang X., Wang S., Zhao J., Xu L., Zhu C., Zeng D., Chen J., Zhang Z., Kaplan D. & Jiang X.. (2011), The use of injectable sonication-induced silk hydrogel for VEGF165 and BMP-2 delivery for elevation of the maxillary sinus floor, *Biomaterials*, 32, 9415-9424
25. George A Bray, Samara Joy Nielsen, and Barry M Popkin. (2004) Consumption of high-fructose corn syrup in beverages may play a role in the epidemic of obesity^{1,2}. *Am J Clin Nutr*, 79, 37–43
26. Step/zen Vuilleumier, (1993) Worldwide production of high-fructose syrup and crystalline fructose^{1,2}. *Am J C/in Nutr*, 58,733-736.

27. Ganji F, Vasheghani-Farahani S, and Vasheghani-Farahani E, (2010).
Theoretical Description of Hydrogel Swelling: A Review Iranian Polymer
Journal 19 (5), 375-398

Διατριβή Διδακτορικού

1. Nagarkar S., Gelation of regenerated fibroin solution (2010)
2. Moraes M., Silva M., Nogueira G. & Beppu M.. Silk fibroin hydrogels formed
by addition of ethanol

Διαδικτυακές πηγές

www.elmhurst.edu

<http://www.oci.uzh.ch/edu>