



**ΕΛΛΗΝΙΚΗ ΔΗΜΟΚΡΑΤΙΑ
ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΙΩΑΝΝΙΝΩΝ
ΣΧΟΛΗ ΘΕΤΙΚΩΝ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ
ΤΜΗΜΑ ΜΗΧΑΝΙΚΩΝ ΕΠΙΣΤΗΜΗΣ ΥΛΙΚΩΝ**

**ΚΑΤΑΣΚΕΥΗ ΚΑΙ ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΜΟΣ
ΒΙΟΑΠΟΔΟΜΟΥΜΕΝΩΝ ΙΣΤΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΚΩΝ
ΙΚΡΙΩΜΑΤΩΝ ΓΙΑ ΤΗΝ ΠΡΟΛΗΨΗ ΤΗΣ
ΑΝΑΔΙΑΜΟΡΦΩΣΗΣ ΤΗΣ ΑΡΙΣΤΕΡΗΣ ΚΟΙΛΙΑΣ
ΜΕΤΑ ΤΟ ΟΞΥ ΕΜΦΡΑΓΜΑ ΤΟΥ ΜΥΟΚΑΡΔΙΟΥ**

ΕΛΕΟΝΩΡΑ Γ. ΜΠΑΡΚΑ
ΜΗΧΑΝΙΚΟΣ ΕΠΙΣΤΗΜΗΣ ΥΛΙΚΩΝ

ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ

ΙΩΑΝΝΙΝΑ 2016

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

Ημερομηνία αίτησης της κ. Ελεονώρας Μπάρκα: 20.09.2012

Ημερομηνία ορισμού Τριμελούς Συμβουλευτικής Επιτροπής: 28.09.2012 & 06.02.2013

Μέλη Τριμελούς Συμβουλευτικής Επιτροπής:

Επιβλέπων

Συμεών Αγαθόπουλος, Αναπληρωτής Καθηγητής του Τ.Μ.Ε.Υ της Σ.Θ.Ε του Π.Ι.

Μέλη

Μιχαήλ Καρακασίδης, Καθηγητής του Τ.Μ.Ε.Υ της Σ.Θ.Ε του Π.Ι.

Θεόφιλος Κωλέττης, Καθηγητής Καρδιολογίας του τμήματος Ιατρικής της Σχολής Επιστημών Υγείας του Π. Ι.

Ημερομηνία ορισμού θέματος: 28.09.2012

«Κατασκευή και χαρακτηρισμός βιοαποδομούμενων εμφυτευμάτων για τη χορήγηση φαρμάκων και την αποκατάσταση κατεστραμμένου ιστού του μυοκαρδίου μετά από οξύ έμφραγμα»

Ημερομηνία τροποποίησης θέματος: 27.06.2016

«Κατασκευή και χαρακτηρισμός βιοαποδομούμενων ιστοτεχνολογικών ικριωμάτων για την πρόληψη της αναδιαμόρφωσης της αριστερής κοιλίας μετά το οξύ έμφραγμα του μυοκαρδίου»

ΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΕΠΤΑΜΕΛΟΥΣ ΕΞΕΤΑΣΤΙΚΗΣ ΕΠΙΤΡΟΠΗΣ : 05.10.2016

- 1.Συμεών Αγαθόπουλος**, Αν. Καθηγητής του ΤΜΕΥ της Σ.Θ.Ε. του Π.Ι.,
- 2.Μιχαήλ Καρακασίδης**, Καθηγητής του ΤΜΕΥ της Σ.Θ.Ε. του Π.Ι.,
- 3.Θεόφιλος Κωλέττης**, Καθηγητής του Τμήματος Ιατρικής της Σχολής Επιστημών Υγείας,
- 4.Δημήτριος Φωτιάδης**, Καθηγητής του ΤΜΕΥ της Σ.Θ.Ε. του Π.Ι., μέλος της 3μελους Συμβουλευτικής Επιτροπής,
- 5.Θεόδωρος Φώτσης**, Καθηγητής του Τμήματος Ιατρικής της Σχολής Επιστημών Υγείας,
- 6.Τριαντάφυλλος Παπαδόπουλος**, Καθηγητής Οδοντιατρικής Σχολής του Εθνικού και Καποδιστριακού Παν/μίου Αθηνών,
- 7. Δημήτριος Παπαγιάννης**, Επίκουρος Καθηγητής του ΤΜΕΥ της Σ.Θ.Ε. του Π.Ι.

Έγκριση Διδακτορικής Διατριβής με βαθμό «ΑΡΙΣΤΑ» στις 13.12.2016

Ο Πρόεδρος του Τμήματος

Η Γραμματέας του Τμήματος

Καρακασίδης Μιχαήλ
Καθηγητής

Ξανθή Τουτουνζόγλου

ΠΡΑΚΤΙΚΟ

της Επταμελούς Εξεταστικής Επιτροπής για την αναγόρευση σε διδάκτορα του Τμήματος Μηχανικών Επιστήμης Υλικών (Τ.Μ.Ε.Υ.) του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων της κ. **Ελεονώρας Μπάρκα**. Η Γενική Συνέλευση Ειδικής Σύνοψης (Γ.Σ.Ε.Σ.) του Τμήματος Μηχανικών Επιστήμης Υλικών του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων στη συνεδρίασή της αριθμ. 288/05-10-2016 ύστερα από την κρίση της Τριμελούς Συμβουλευτικής Επιτροπής ότι η ερευνητική εργασία της υποψήφιας διδάκτορος κ. **Ελεονώρας Μπάρκα** έχει ολοκληρωθεί και έχει κατατεθεί στο Τμήμα, όρισε σύμφωνα με το άρθρο 12 παρ.5 εδ. Β του Ν.2083/92, και το άρθ. 9 παρ.4 εδ. α του Ν. 3685/2008 Επταμελή Εξεταστική Επιτροπή που αποτελείται από τους κ.κ. **Συμεών Αγαθόπουλο**, Αναπληρωτή Καθηγητή του Τμήματος Μηχανικών Επιστήμης Υλικών, της Σχολής Θετικών Επιστημών, του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων, **Μιχαήλ Καρακασίδη**, Καθηγητή του Τμήματος Μηχανικών Επιστήμης Υλικών, της Σχολής Θετικών Επιστημών, του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων, **Θεόφιλο Κωλέττη**, Καθηγητή του Τμήματος Ιατρικής, της Σχολής Επιστημών Υγείας, του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων, **Δημήτριο Φωτιάδη**, Καθηγητή του Τμήματος Μηχανικών Επιστήμης Υλικών, της Σχολής Θετικών Επιστημών, του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων, **Θεόδωρο Φώτση**, Καθηγητή του Τμήματος Ιατρικής, της Σχολής Επιστημών Υγείας, του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων, **Τριαντάφυλλο Παπαδόπουλο**, Καθηγητή της Οδοντιατρικής Σχολής, του Εθνικού και Καποδιστριακού Πανεπιστημίου Αθηνών, και **Δημήτριο Παπαγιάννη**, Επίκουρο Καθηγητή του Τμήματος Μηχανικών Επιστήμης Υλικών, της Σχολής Θετικών Επιστημών, του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων, για να αναπτύξει ενώπιον της, η υποψήφια διδάκτορας κ. **Ελεονώρα Μπάρκα** τη διατριβή της με θέμα: «**Κατασκευή και χαρακτηρισμός βιοαποδομοούμενων ιστοτεχνολογικών ικριωμάτων για την πρόληψη της αναδιαμόρφωσης της αριστερής κοιλίας μετά το οξύ έμφραγμα του μυοκαρδίου**».

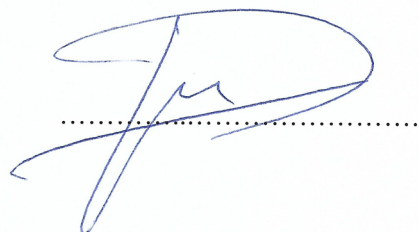
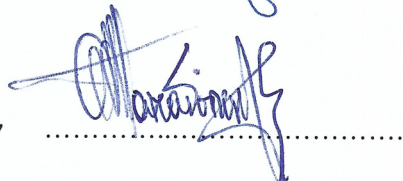
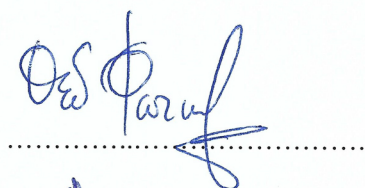
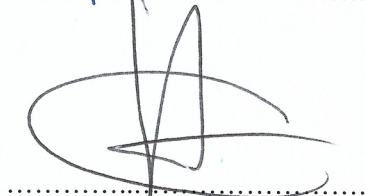
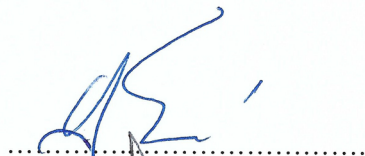
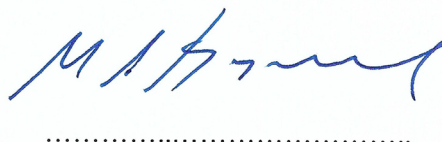
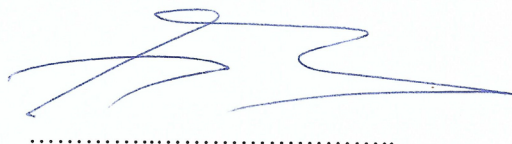
Η Επταμελής Εξεταστική Επιτροπή με την παραπάνω σύνθεσή της, συνήλθε σήμερα **13 Δεκεμβρίου 2016** ημέρα **Τρίτη** και ώρα **14:00** στην αίθουσα **KY2**, στο κτίριο **Μηχανικών Επιστήμης Υλικών** του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων για να εξετάσει τη διδακτορική διατριβή της υποψήφιας διδάκτορος κ. **Ελεονώρας Μπάρκα**. Χρέη προέδρου της Εξεταστικής Επιτροπής ανέθεσαν τα μέλη της στον κ. **Συμεών Αγαθόπουλο**, Αναπληρωτή Καθηγητή του Τ.Μ.Ε.Υ. του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων. Στο σημείο αυτό, τίθεται υπόψη της 7μελούς Εξεταστικής Επιτροπής το αρθ. 36 του Ν.1268/82, τα άρθ. 12 και 13 του Ν. 2083/92 και το άρθ. 9 παρ.4 εδ. α του Ν. 3685/2008 και τα αρθ. 40 και 41 του Εσωτερικού Κανονισμού Λειτουργίας του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων (ΦΕΚ 310/10.03.05 τ. 2^ο). Τα μέλη της Επιτροπής έλαβαν εγκαίρως γνώση του κειμένου της διατριβής της υποψηφίας και τη μελέτησαν. Η υποψήφια κ. **Ελεονώρα Μπάρκα** ανέπτυξε ενώπιον της Επιτροπής τη διατριβή της με θέμα: «**Κατασκευή και χαρακτηρισμός βιοαποδομοούμενων ιστοτεχνολογικών ικριωμάτων για την πρόληψη της αναδιαμόρφωσης της αριστερής κοιλίας μετά το οξύ έμφραγμα του μυοκαρδίου**» τονίζοντας τα σημεία, στα οποία κατά τη γνώμη της η διατριβή είναι πρωτότυπη και αποτελεί συμβολή στην επιστήμη. Τα μέλη της Εξεταστικής Επιτροπής απηύθυναν ερωτήσεις στην υποψήφια, μετά την προφορική ανάπτυξη απ' αυτήν του θέματος. Η ανάπτυξη και οι ερωτήσεις έγιναν σε δημόσια συνεδρίαση. Στη συνέχεια το ακροατήριο και η υποψήφια αποχώρησαν

και τα μέλη της Εξεταστικής Επιτροπής συσκέφθηκαν και ψήφισαν, υπέρ της παραδοχής της διατριβής, με ψήφους επτά (7) υπέρ, και κατά μηδέν (0). Πρότειναν, δε, με ψήφους επτά (7) έναντι μηδενός (0) το βαθμό **Άριστα** εφαρμόζοντας την παρ. 6 του αρθ. 40 του Εσωτερικού Κανονισμού Λειτουργίας του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων (ΦΕΚ 310/10.03.05 τ. 2°).

Ιωάννινα, 13 Δεκεμβρίου 2016

Η Εξεταστική Επιτροπή

1. **Συμεών Αγαθόπουλος**
Αναπληρωτής Καθηγητής
του Τμήματος Μηχανικών Επιστήμης Υλικών
της Σχολής Θετικών Επιστημών
του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων
2. **Μιχαήλ Καρακασίδης**
Καθηγητής
του Τμήματος Μηχανικών Επιστήμης Υλικών
της Σχολής Θετικών Επιστημών
του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων
3. **Θεόφιλος Κωλέττης**
Καθηγητής
του Τμήματος Ιατρικής
της Σχολής Επιστημών Υγείας
του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων
4. **Δημήτριος Φωτιάδης**
Καθηγητής
του Τμήματος Μηχανικών Επιστήμης Υλικών
της Σχολής Θετικών Επιστημών
του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων
5. **Θεόδωρος Φώτης**
Καθηγητής
του Τμήματος Ιατρικής
της Σχολής Επιστημών Υγείας
του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων
6. **Τριαντάφυλλος Παπαδόπουλος**
Καθηγητής
της Οδοντιατρικής Σχολής
του Εθνικού και Καποδιστριακού Πανεπιστημίου Αθηνών
7. **Δημήτριος Παπαγιάννης**
Επίκουρος Καθηγητής
του Τμήματος Μηχανικών Επιστήμης Υλικών
της Σχολής Θετικών Επιστημών
του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων



Στο σύζυγό μου, Γιάννη

ΠΡΟΛΟΓΟΣ

Η παρούσα διδακτορική διατριβή εκπονήθηκε στο Εργαστήριο Κεραμικών και Σύνθετων Υλικών του Τμήματος Μηχανικών Επιστήμης Υλικών του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων. Παρουσιάζει τα πειράματα που έγιναν με απώτερο σκοπό την κατασκευή ενός νέου αποτελεσματικού εμφυτεύματος με βάση το υδροπήκτωμα ενός φυσικού πολυσακχαρίτη, και συγκεκριμένα του αλγινικού οξέος, το οποίο αναπτύχθηκε για να χρησιμοποιηθεί ως εν δυνάμει ικρίωμα της ιστοτεχνολογίας για την ανάταξη του κατεστραμμένου ιστού του μυοκαρδίου μετά από οξύ έμφραγμα. Λόγω της διεπιστημονικότητας του θέματος, η διατριβή είναι, ουσιαστικά, προϊόν μίας γόνιμης πολυετούς επιστημονικής συνεργασίας του Τμήματος Μηχανικών Επιστήμης Υλικών, και συγκεκριμένα του Εργαστηρίου Κεραμικών και Σύνθετων Υλικών, και της Ιατρικής Σχολής, και συγκεκριμένα της Καρδιολογικής Κλινικής αμφοτέρων, του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων, καθώς και του Ερευνητικού Καρδιαγγειακού Ινστιτούτου, η οποία, συγκεκριμένα, ξεκίνησε, πριν από 10 χρόνια (το 2006) απλώς σε μία φιλόδοξη ιδέα και μία συζήτηση σε ένα γραφείο του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων.

Όταν συμβεί οξύ έμφραγμα στο μυοκάρδιο, λαμβάνουν αμέσως χώρα μία σειρά από γεγονότα τα οποία θέτουν σε κίνδυνο ακόμα και την ίδια τη ζωή του ασθενούς. Όμως, η αποφυγή του θανάτου του ασθενούς μετά το έμφραγμα δεν συνεπάγεται ούτε διασφαλίζει ότι ο σοβαρός κίνδυνος για τη ζωή του έχει εκλείψει. Αντίθετα, ο ιστός του μυοκαρδίου έχει υποστεί σοβαρότατες βλάβες σε τέτοια έκταση ώστε ο κίνδυνος για τη μετέπειτα ζωή του ασθενούς παραμένει εξαιρετικά υψηλός. Έτσι, το έμφραγμα του μυοκαρδίου κατατάσσεται στις πρώτες αιτίες θανάτου στις σύγχρονες κοινωνίες. Από καθαρά ιατρική άποψη, υπάρχουν πολλές σκέψεις, ιδέες και προτάσεις για το πώς να χορηγηθούν κατάλληλα φάρμακα, ουσίες, ή ακόμα και κύτταρα ή ολόκληροι ιστοί, ώστε να προληφθούν διάφορες επικίνδυνες, για τη ζωή του ασθενούς, δυσλειτουργίες μετά το έμφραγμα, όπως είναι οι αρρυθμίες, για παράδειγμα, αλλά και να γίνουν προσπάθειες να επιτευχθεί ανάταξη και αναγέννηση των κατεστραμμένων ή ημικατεστραμμένων κυττάρων μετά το έμφραγμα έτσι ώστε ο ιστός του μυοκαρδίου του ασθενούς, μετά τη θεραπεία, να μην έχει καθόλου ίχνη από το έμφραγμα που υπέστη. Πριν από χρόνια, τέτοιες ιδέες εντάσσονταν στα πλαίσια μόνο της τολμηρής φαντασίας. Στις μέρες μας, η ταχύτατη ανάπτυξη της ιστοτεχνολογίας, μεταφράζοντας τον Αγγλικό όρο *tissue engineering*, ανοίγει διάπλατα τις πόρτες, τόσο στην Ιατρική Επιστήμη, όσο και στην Επιστήμη των Υλικών για να αναλάβουν την πρόκληση αυτή.

Έτσι, η κατασκευή εμφυτεύματος, που όχι μόνο πρέπει να είναι βιοσυμβατό, βιοαποδεκτό και βιοενεργό στο σώμα, όλα αυτά νοούμενα υπό την ευρύτερη προσέγγιση τού να παρέχει το εμφύτευμα-ικρίωμα κατάλληλα γεωμετρικά, μοριακά, ή βιολογικά ερεθίσματα ώστε να πείσει τον οργανισμό να αυτοθεραπευτεί, αλλά να μπορεί να το χειριστεί ο ιατρός-χειρουργός κατά την εμφύτευση και να το τοποθετήσει σωστά στο μυοκάρδιο ήταν οι απαιτήσεις που είχε να αντιμετωπίσει η έρευνα που αναλήφθηκε στη διατριβή αυτή.

Έτσι, η παρούσα διατριβή έχει διαιρεθεί σε πέντε (5) μεγάλα κεφάλαια. Αρχικά, στο 1^ο κεφάλαιο παρουσιάζεται το ιατρικό πρόβλημα που κληθήκαμε να αντιμετωπίσουμε. Εν συνεχεία, το 2^ο κεφάλαιο παρουσιάζει τους συγκεκριμένα στόχους που τέθηκαν υπό το φως, μέσω της ανασκόπησης της διεθνούς βιβλιογραφίας, της καινοτομίας της έρευνας που αναλήφθηκε, ως προς την πειραματική προσέγγιση της συγκεκριμένης ασθένειας, δια μέσου της επιστήμης και της τεχνολογίας των βιοϋλικών και της ιστοτεχνολογίας. Στο 3^ο κεφάλαιο παρουσιάζεται η ανάπτυξη του βιοϋλικού, συμπεριλαμβανομένων και των τροποποιημένων υλικών με χαρακτηριστικά drug delivery systems, καθώς και για την υποστήριξη φιλοξενίας κυτταροκαλλιιεργειών, ώστε στο 4^ο κεφάλαιο να παρουσιαστούν τα *in vitro* πειράματα με κυτταροκαλλιέργειες και η ανάπτυξη ολοκληρωμένων ικριωμάτων της ιστοτεχνολογίας (tissue engineering constructs), καθώς και ο πλήρης *in vivo* έλεγχος των βιοϋλικών αυτών σε πειραματόζωα, σύμφωνα με τα ιατρικά πρωτόκολλα για τη συγκεκριμένη θεραπεία, τόσο στην οξεία όσο και στη χρόνια φάση του εμφράγματος. Το τελευταίο 5^ο κεφάλαιο της διατριβής συνοψίζει, εν είδει γενικής συζήτησης, τα αποτελέσματα που ελήφθησαν και παρουσιάζει τις προτάσεις για μελλοντική έρευνα.

Για να εκπονηθεί η διατριβή αυτή, ένας μεγάλος αριθμός ανθρώπων συνέβαλαν πραγματικά και θετικά με την παρουσία τους, και αυτούς θα ήθελα εδώ να αναφέρω και να ευχαριστήσω. Πρώτον απ' όλους, θα ήθελα να ευχαριστήσω θερμά τον επιβλέποντα της διατριβής μου, τον Αναπληρωτή Καθηγητή κ. Συμεών Αγαθόπουλο, ο οποίος με μύησε, από τα προπτυχιακά μου ακόμη χρόνια, στο ερευνητικό πεδίο της επιστήμης των βιοϋλικών και της ιστοτεχνολογίας. Χωρίς την πολύτιμη καθοδήγηση και υποστήριξή του καθ' όλη τη διάρκεια της εκπόνησης της διατριβής, η συγκεκριμένη έρευνα δεν θα ήταν εφικτό να υλοποιηθεί.

Θα ήθελα επίσης, να ευχαριστήσω τα δύο άλλα μέλη της τριμελούς συμβουλευτικής μου επιτροπής. Συγκεκριμένα, τον Καθηγητή κ. Μιχάλη Καρακασίδη, που με υποδέχτηκε με θερμή στο Εργαστήριό του, για το συνεχές ενδιαφέρον του για την εξέλιξη της έρευνάς μου, και για τις εύστοχες παρατηρήσεις του. Ιδιαίτερα, ένα τεράστιο ευχαριστώ οφείλω στον Καθηγητή Καρδιολογίας κ. Θεόφιλο Κωλέττη για την επιστημονική και ηθική υποστήριξή του και για την εμπιστοσύνη με την οποία με περιέβαλε

καθ' όλη τη διάρκεια της διατριβής μου, συμπεριλαμβανομένης και της επιμονής του να μυηθώ, αν και Μηχανικός Επιστήμης Υλικών, στον κόσμο των *in vivo* πειραμάτων, στα πλαίσια, όλα αυτά, μίας καθ' όλα υψηλής ποιότητας, άψογης και έντιμης συνεργασίας που είχαμε.

Επίσης, θα ήθελα να ευχαριστήσω θερμά και τα υπόλοιπα μέλη της εξεταστικής επιτροπής, τον Καθηγητή κ. Δημήτρη Φωτιάδη, τον Καθηγητή κ. Θεόδωρο Φώτση, τον Καθηγητή κ. Τριαντάφυλλο Παπαδόπουλο, και τον Επίκουρο Καθηγητή κ. Δημήτρη Παπαγιάννη, για την τιμή που μου έκαναν να συμμετέχουν σε αυτήν, καθώς και για τη φιλοξενία στα Εργαστήριά τους και τις χρήσιμες συμβουλές τους, που πραγματικά είχα από όλους ανεξαιρέτως. Θα ήθελα ιδιαίτερα να ευχαριστήσω τον κ. Δ. Παπαγιάννη για τη βοήθεια που μου παρείχε και για τις πολύτιμες συμβουλές του και παρατηρήσεις στους θεωρητικούς κβαντομηχανικούς υπολογισμούς, τα αποτελέσματα των οποίων έριξαν φως και επιβεβαίωσαν, τα πειραματικά μας ευρήματα, δίνοντας ταυτόχρονα στην έρευνα αυτή και τη διάσταση, αφενός της μοντελοποίησης και της τεκμηρίωσης, μέσω της μοντελοποίησης, των πειραματικών ευρημάτων, αφετέρου της ανάδειξης των μεγάλων δυνατοτήτων που αυτή (η θεωρητική μοντελοποίηση) παρέχει στο Μηχανικό των Υλικών για το σχεδιασμό νέων υλικών, το οποίο είναι, εν τέλει, η πεμπτουσία της Μηχανικής των Υλικών.

Για την εξαιρετική συνεργασία μας και για τις πολύτιμες γνώσεις που μου μετέφεραν, όσον αφορά στο συναρπαστικό κόσμο των κυττάρων (ενδοθηλιακών και μεσεγχυματικών), θα ήθελα να ευχαριστήσω τα μέλη της ερευνητικής ομάδας του Καθηγητή της Ιατρικής Σχολής κ. Θ. Φώτση, και συγκεκριμένα τη Δρ. κ. Ελένη Μπαγκκλή, το Δρ. κ. Δημήτρη Κουρούπη, και την Υποψήφια Διδάκτορα κ. Μαρία Μάρκου, καθώς και την ερευνητική ομάδα του Αναπληρωτή Καθηγητή της Ιατρικής Σχολής κ. Παναγιώτη Κούκλη, τον ίδιο και τη Δρ. κ. Βιολέττα Μαλταμπέ, με τους οποίους μελετήσαμε την καλλιέργεια των καρδιακών προγονικών κυττάρων στο βιοϋλικό.

Επίσης, θα ήθελα να ευχαριστήσω θερμά τις Ιατρούς Δρ. κ. Αγάπη Βιλαέτη και Δρ. κ. Μαριάννα Κοντονίκα για την άψογη συνεργασία μας και την αμέριστη βοήθεια που μου παρείχαν, καθ' όλη τη διάρκεια της διατριβής. Αφιέρωσαν πολλές ώρες για να με μυήσουν στον κόσμο της καρδιολογίας και της χειρουργικής πρακτικής. Ακόμη, θα ήθελα να ευχαριστήσω τον Δρ. Παναγιώτη Λέκκα για την πολύτιμη βοήθειά σου κατά την υλοποίηση των *in vivo* πειραμάτων. Από την ίδια ομάδα, επίσης, ένα τεράστιο ευχαριστώ οφείλω στην κ. Ελένη Γκόγκα, για τον εξαιρετικό συντονισμό κατά τη διάρκεια των πειραμάτων με τα πειραματόζωα καθώς και για την ψυχολογική και θερμή ηθική υποστήριξή της και ενδιαφέρον. Θα ήθελα, επίσης, να ευχαριστήσω τον Καθηγητή κ. Χαράλαμπο Σταμάτη του Τμήματος Βιολογικών Εφαρμογών και Τεχνολογιών και την Δρ. κ. Μαρία Κατσούρα για τη φιλοξενία στο Εργαστήριο Βιοτεχνολογίας και τη

βοήθειά τους στις μετρήσεις φθοροσιμετρίας. Ένα ακόμη ευχαριστώ οφείλω στον Καθηγητή κ. Γιάννη Δεληγιαννάκη του Τμήματος Φυσικής, για την ευγενική παραχώρηση των νανοσωματιδίων του οξειδίου του σιδήρου για τα πειράματα πρόσδεσης των αυξητικών παραγόντων σε αυτά καθώς, και τον υποψήφιο διδάκτορα στο Εργαστήριό του κ. Λευτέρη Μουζουράκη. Επίσης, ευχαριστώ θερμά τον Αναπληρωτή Καθηγητή κ. Δημοσθένη Φωκά για τη συνεχή επιστημονική υποστήριξή του και βοήθεια, καθώς και τον Καθηγητή κ. Δημήτρη Γουρνή για το συνεχές ενδιαφέρον του για την εξέλιξη της διατριβής μου μέσα στο Εργαστήριο Κεραμικών και Σύνθετων Υλικών. Από το εξωτερικό, θέλω να ευχαριστήσω το Δρ. κ. Ευάγγελο Δασκαλόπουλο (και τον Καθηγητή του κ. W. Matthijs Blankesteyn), που με δέχτηκε στο Εργαστήριό του στο Maastricht της Ολλανδίας στα πρώτα βήματα της διατριβής μου και στη συνέχεια (από τη νέα του θέση του στο Πανεπιστήμιο του Leuven του Βελγίου) για τις συνεχείς συνεργασίες μας στα πειράματα και στις δημοσιεύσεις που προέκυψαν από αυτά, τον Καθηγητή κ. Pedro Granja του INEB (Ινστιτούτο Βιοϊατρικής Μηχανικής) στο Πανεπιστήμιο του Πόρτο της Πορτογαλίας, και τον Καθηγητή κ. Yasuhiko Tabata του τμήματος Βιοϋλικών (τομέας Ιστοτεχνολογίας, στο Ινστιτούτο Ιατρικών Επιστημών Αιχμής) στο Πανεπιστήμιο του Κιότο της Ιαπωνίας για τις πραγματικά πολύτιμες συμβουλές τους που μου έδωσαν, μοιραζόμενοι μαζί μου τη μακρόχρονη και εις βάθος εμπειρία τους στο αλγινικό υδροπήκτωμα ως βιοϋλικό.

Από τους συναδέλφους, ένα μεγάλο ευχαριστώ οφείλω στις συναδέλφους και φίλες μου, από τα φοιτητικά ακόμη χρόνια, μέχρι τώρα, που όλες εκπονούμε τις διδακτορικές διατριβές μας, Ανθή Πούλια και Μαίρη Ρουμπή για την αμέριστη συμπαράσταση, υποστήριξη, και βοήθειά τους, επιστημονική και ηθική, καθώς και για τις όμορφες στιγμές, τις τόσο απαραίτητες για την έκβαση της διατριβής αυτής, καθ' όλη τη διάρκεια των ετών αυτών. Θα ήθελα, επίσης, να ευχαριστήσω θερμά όλα τα μέλη του Εργαστηρίου Κεραμικών και Σύνθετων Υλικών για την άψογη συνεργασία μας, ανεξαιρέτως, από την κ. Σουζάνα Παππά μέχρι τον πιο νέο συνάδελφο που ήρθε στο Εργαστήριο, αλλά, σίγουρα οφείλω να ευχαριστήσω ιδιαίτερα τον Δρ. κ. Κώστα Δήμο, ο οποίος ήταν αυτός που αρχικά με μύησε, με τις πολύτιμες συμβουλές του, στην ανάπτυξη των βιοϋλικών για τη συγκεκριμένη εφαρμογή που μελέτησα στη διατριβή μου. Ιδιαίτερα, επίσης, θα ήθελα να ευχαριστήσω τη Δρ. κ. Νεφέλη Λαγοπάτη για τη βοήθειά της στις μετρήσεις με δυναμική σκέδαση φωτός και το Εργαστήριο Γενικής Χημείας της Αναπληρώτριας Καθηγήτριας κ. Ευαγγελίας Παυλάτου στο Ε.Μ.Π., που δέχθηκε να τη φιλοξενήσει για την πραγματοποίηση των μετρήσεων αυτών.

Από τη θέση αυτή, οφείλω, επίσης, να τονίσω και να αναγνωρίσω την οικονομική υποστήριξή μου από το Ερευνητικό Καρδιαγγειακό Ινστιτούτο και το Πειραματικό-Ερευνητικό Κέντρο της Φαρμακοβιομηχανίας ΕΛΠΕΝ

(και του Διευθυντή του τελευταίου Δρ. κ. Απόστολο Παπαλόη, όπου διενεργήθηκαν τα περισσότερα πειράματα των εμφυτεύσεων), η οποία ήταν καθοριστική για την εξέλιξη της έρευνάς μου αλλά και της επιστημονικής κατάρτισής μου.

Θα ήθελα να ολοκληρώσω τον κύκλο αυτό, των ευχαριστιών, ευχαριστώντας το Θεό και, φυσικά, την οικογένειά μου, για τη βοήθεια που μου παρείχε όλα αυτά τα χρόνια. Δεν περιγράφεται με λόγια η βαθιά ευγνωμοσύνη που νιώθω απέναντι στους γονείς μου, Γιώργο και Λαμπρινή, για την υποστήριξη, την υπομονή, την αντοχή αλλά και την ανοχή που έδειξαν σε όλη μου την προσπάθεια, με αποκορύφωμα τα έτη αυτά της διδακτορικής διατριβής μου. Ένα μεγάλο ιδιαίτερο ευχαριστώ θέλω να απευθύνω στην αδερφή μου Πωλίνα, που μου έμαθε να βάζω υψηλούς στόχους και να αγωνίζομαι για αυτούς, με εντιμότητα, υπομονή και επιμονή. Και φυσικά, ένα πολύ μεγάλο ευχαριστώ το οφείλω, και το απευθύνω από τη θέση αυτή, στο σύζυγό μου, Γιάννη, για την εμπιστοσύνη που με περιέβαλε, την υπομονή που επέδειξε, και τη διαρκή, θερμή του και πραγματικά τεράστια υποστήριξη και ενθάρρυνση όλα αυτά τα χρόνια μέχρι σήμερα.

Δεκέμβριος 2016

Ελεονώρα Μπάρκα

ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΩΝ

Περιεχόμενα

ΠΡΟΛΟΓΟΣ	XIII
ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΩΝ	XIX
ΕΚΤΕΝΗΣ ΠΕΡΙΛΗΨΗ	XXV
SUMMARY	XXXI
ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΠΙΝΑΚΩΝ	XXXV
ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΕΙΚΟΝΩΝ	XXXVI
ΑΚΡΩΝΥΜΙΑ	XLIII
 1. Η ΚΑΡΔΙΑ, ΤΟ ΕΜΦΡΑΓΜΑ ΤΟΥ ΜΥΟΚΑΡΔΙΟΥ ΚΑΙ ΘΕΡΑΠΕΙΕΣ.....	 3
1.1 Το όργανο της καρδιάς	3
Η ΔΟΜΗ ΚΑΙ Η ΛΕΙΤΟΥΡΓΙΑ ΤΗΣ ΚΑΡΔΙΑΣ.....	3
Ο ΚΑΡΔΙΑΚΟΣ ΚΥΚΛΟΣ	4
ΗΛΕΚΤΡΟΦΥΣΙΟΛΟΓΙΑ ΤΗΣ ΚΑΡΔΙΑΣ	5
1.2 Το μυοκάρδιο	7
1.3 ΟΞΥ ΕΜΦΡΑΓΜΑ ΤΟΥ ΜΥΟΚΑΡΔΙΟΥ ΚΑΙ ΘΕΡΑΠΕΙΕΣ	9
1.3.1 ΟΞΥ ΕΜΦΡΑΓΜΑ ΤΟΥ ΜΥΟΚΑΡΔΙΟΥ.....	9
1.3.2 ΙΣΧΑΙΜΙΚΟ ΜΥΟΚΑΡΔΙΟ ΚΑΙ ΑΝΑΔΙΑΜΟΡΦΩΣΗ ΑΡΙΣΤΕΡΗΣ ΚΟΙΛΙΑΣ (LV REMODELLING)	10
1.3.3 ΘΕΡΑΠΕΙΕΣ ΕΜΦΡΑΓΜΑΤΟΣ ΜΥΟΚΑΡΔΙΟΥ.....	13
1.4 ΑΝΑΓΕΝΝΗΣΗ ΜΥΟΚΑΡΔΙΟΥ ΚΑΙ ΙΣΤΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑ.....	15
1.4.1 ΓΕΝΙΚΑ	15
1.4.2 ΣΤΡΑΤΗΓΙΚΗ ΑΝΑΠΤΥΞΗΣ ΙΚΡΙΩΜΑΤΩΝ ΤΗΣ ΙΣΤΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ ΓΙΑ ΤΗ ΘΕΡΑΠΕΙΑ ΑΝΑΔΙΑΜΟΡΦΩΣΗΣ ΤΗΣ ΑΡΙΣΤΕΡΗΣ ΚΟΙΛΙΑΣ ΜΕΤΑ ΑΠΟ ΟΞΥ ΕΜΦΡΑΓΜΑ.....	19
1.4.3 ΒΙΟΪΛΙΚΑ ΙΚΡΙΩΜΑΤΩΝ ΤΗΣ ΙΣΤΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ ΓΙΑ ΤΗ ΘΕΡΑΠΕΙΑ ΤΟΥ ΕΜΦΡΑΓΜΑΤΟΣ ΤΟΥ ΜΥΟΚΑΡΔΙΟΥ	20
ΚΟΛΛΑΓΟΝΟ	21
ΥΑΛΟΥΡΟΝΙΚΟ ΟΞΥ	22
ΝΑΝΟ-ΪΝΕΣ	22

ΧΙΤΟΖΑΝΗ (CHITOSAN).....	23
ΑΛΓΙΝΙΚΟ ΟΞΥ.....	23
ΠΟΛΥ (Ν-ΙΣΟΠΡΟΠΥΛΑΚΡΥΛΑΜΙΔΙΟ) (PNIPAM).....	24
ΠΟΛΥ (ΑΙΘΥΛΕΝΟΓΛΥΚΟΛΗ).....	25
2. ΣΚΟΠΟΣ ΔΙΑΤΡΙΒΗΣ	29
2.1 Η ΕΠΙΛΟΓΗ ΤΟΥ ΑΛΓΙΝΙΚΟΥ ΥΔΡΟΠΗΚΤΩΜΑΤΟΣ ΩΣ ΒΙΟΪΛΙΚΟ ΤΟΥ ΙΚΡΙΩΜΑΤΟΣ ΓΙΑ ΤΗΝ ΕΝΕΣΙΜΗ ΘΕΡΑΠΕΙΑ ΤΟΥ ΕΜΦΡΑΓΜΑΤΟΣ ΤΟΥ ΜΥΟΚΑΡΔΙΟΥ	29
2.2 ΣΧΗΜΑΤΙΣΜΟΣ (ΖΕΛΑΤΙΝΟΠΟΙΗΣΗ) ΑΛΓΙΝΙΚΟΥ ΥΔΡΟΠΗΚΤΩΜΑΤΟΣ.....	32
2.3 Το ΑΛΓΙΝΙΚΟ ΥΔΡΟΠΗΚΤΩΜΑ ΩΣ ΒΙΟΪΛΙΚΟ ΓΙΑ ΤΗ ΘΕΡΑΠΕΙΑ ΕΜΦΡΑΓΜΑΤΟΣ ΤΟΥ ΜΥΟΚΑΡΔΙΟΥ	37
2.4 ΔΙΑΡΘΡΩΣΗ ΤΗΣ ΠΑΡΟΥΣΙΑΣΗΣ ΤΩΝ ΠΕΙΡΑΜΑΤΩΝ ΚΑΙ ΤΩΝ ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΩΝ ΤΗΣ ΔΙΑΤΡΙΒΗΣ.....	47
3. ΑΝΑΠΤΥΞΗ ΙΚΡΙΩΜΑΤΟΣ ΑΛΓΙΝΙΚΟΥ ΥΔΡΟΠΗΚΤΩΜΑΤΟΣ.....	53
3.1 ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΗ ΔΙΑΔΙΚΑΣΙΑ	53
3.1.1 ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΧΗΜΙΚΑ ΑΝΤΙΔΡΑΣΤΗΡΙΑ	53
3.1.2 ΠΑΡΑΣΚΕΥΗ ΥΔΡΟΠΗΚΤΩΜΑΤΩΝ.....	55
ΠΑΡΑΣΚΕΥΗ ΥΔΡΟΠΗΚΤΩΜΑΤΟΣ ΜΕ ΒΑΣΗ ΤΟ ΜΗΧΑΝΙΣΜΟ ΔΙΑΛΥΣΗΣ/ΔΙΑΧΥΣΗΣ .	55
ΠΑΡΑΣΚΕΥΗ ΥΔΡΟΠΗΚΤΩΜΑΤΟΣ ΜΕ ΒΑΣΗ ΤΟ ΜΗΧΑΝΙΣΜΟ ΕΣΩΤΕΡΙΚΗΣ ΖΕΛΑΤΙΝΟΠΟΙΗΣΗΣ	56
ΠΑΡΑΣΚΕΥΗ ΥΔΡΟΠΗΚΤΩΜΑΤΟΣ ΜΕ ΑΛΛΑ ΔΙΣΘΕΝΗ ΙΟΝΤΑ ΑΛΚΑΛΙΚΩΝ ΓΑΙΩΝ	57
ΠΑΡΑΣΚΕΥΗ ΥΔΡΟΠΗΚΤΩΜΑΤΟΣ ΜΕ ΒΑΣΗ ΤΟ ΧΗΛΙΚΟ ΣΥΜΠΛΟΚΟ Ca-EDTA.....	58
ΚΑΤΕΡΓΑΣΙΑ ΥΔΡΟΠΗΚΤΩΜΑΤΩΝ	58
3.1.3 ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΕΣ ΜΕΘΟΔΟΙ ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΜΟΥ ΤΩΝ ΥΔΡΟΠΗΚΤΩΜΑΤΩΝ	59
ΙΞΟΔΟΜΕΤΡΙΑ	59
ΦΑΣΜΑΤΟΣΚΟΠΙΑ ΥΠΕΡΥΘΡΟΥ (FT-IR)	63
ΗΛΕΚΤΡΟΝΙΑΚΗ ΜΙΚΡΟΣΚΟΠΙΑ ΣΑΡΩΣΗΣ (SEM)	65
ΠΟΡΟΣΙΜΕΤΡΙΑ ΥΔΡΑΡΓΥΡΟΥ.....	66
Άλλες τεχνικές και μέθοδοι	67
3.2 ΜΕΛΕΤΗ ΖΕΛΑΤΙΝΟΠΟΙΗΣΗΣ	68
3.2.1 ΑΛΓΙΝΙΚΟ ΥΔΡΟΠΗΚΤΩΜΑ ΠΑΡΑΣΚΕΥΑΣΜΕΝΟ ΜΕ ΤΟ ΜΗΧΑΝΙΣΜΟ ΔΙΑΛΥΣΗΣ / ΔΙΑΧΥΣΗΣ.....	68
3.2.2 ΑΛΓΙΝΙΚΟ ΥΔΡΟΠΗΚΤΩΜΑ ΠΑΡΑΣΚΕΥΑΣΜΕΝΟ ΜΕ ΤΟ ΜΗΧΑΝΙΣΜΟ ΕΣΩΤΕΡΙΚΗΣ ΖΕΛΑΤΙΝΟΠΟΙΗΣΗΣ	73
3.2.3 ΑΛΓΙΝΙΚΟ ΥΔΡΟΠΗΚΤΩΜΑ ΠΑΡΑΣΚΕΥΑΣΜΕΝΟ ΜΕ ΠΑΡΟΧΗ Ca ²⁺ ΑΠΟ ΤΟ ΧΗΛΙΚΟ ΣΥΜΠΛΟΚΟ Ca - EDTA	77
3.2.4 ΕΠΙΔΡΑΣΗ ΤΗΣ ΣΥΓΚΕΝΤΡΩΣΗΣ ΤΩΝ ΙΟΝΤΩΝ ΑΣΒΕΣΤΙΟΥ ΣΤΗ ΣΤΑΘΕΡΟΤΗΤΑ ΤΟΥ ΑΛΓΙΝΙΚΟΥ ΥΔΡΟΠΗΚΤΩΜΑΤΟΣ	81

3.2.5	ΕΠΙΔΡΑΣΗ ΤΩΝ ΙΟΝΤΩΝ ΤΩΝ ΑΛΚΑΛΙΚΩΝ ΓΑΙΩΝ ΣΤΟ ΣΧΗΜΑΤΙΣΜΟ ΤΟΥ ΑΛΓΙΝΙΚΟΥ ΥΔΡΟΠΗΚΤΩΜΑΤΟΣ.....	83
3.2.6	ΘΕΩΡΗΤΙΚΟΙ ΥΠΟΛΟΓΙΣΜΟΙ ΓΙΑ ΤΗ ΜΕΛΕΤΗ ΤΗΣ ΕΠΙΔΡΑΣΗΣ ΔΙΣΘΕΝΩΝ ΚΑΤΙΟΝΤΩΝ ΚΑΙ ΤΗΣ ΣΥΓΚΕΝΤΡΩΣΗΣ ΙΟΝΤΩΝ ΑΣΒΕΣΤΙΟΥ ΣΤΗ ΣΤΑΘΕΡΟΤΗΤΑ ΤΟΥ ΥΔΡΟΠΗΚΤΩΜΑΤΟΣ	87
	ΘΕΩΡΗΤΙΚΗ ΧΗΜΕΙΑ	87
	ΘΕΩΡΙΑ ΣΥΝΑΡΤΗΣΙΑΚΩΝ ΤΗΣ ΗΛΕΚΤΡΟΝΙΑΚΗΣ ΠΥΚΝΟΤΗΤΑΣ (DFT).....	88
	Η ΜΕΘΟΔΟΣ B3LYP	89
	FT-IR ΦΑΣΜΑ ΔΟΜΙΚΩΝ ΜΟΝΑΔΩΝ ΑΛΓΙΝΙΚΟΥ ΟΞΕΟΣ G ΚΑΙ M.....	90
	ΠΑΡΟΥΣΙΑΣΗ ΚΑΙ ΣΥΖΗΤΗΣΗ ΤΩΝ ΘΕΩΡΗΤΙΚΩΝ ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΩΝ	91
	ΕΠΙΔΡΑΣΗ ΤΩΝ ΔΙΣΘΕΝΩΝ ΚΑΤΙΟΝΤΩΝ ΣΤΟ ΔΙΚΤΥΟ ΤΟΥ ΑΛΓΙΝΙΚΟΥ ΥΔΡΟΠΗΚΤΩΜΑΤΟΣ: ΘΕΩΡΗΤΙΚΑ ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ ΚΑΙ ΕΡΜΗΝΕΙΑ ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΩΝ ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΩΝ	94
3.3	ΥΦΗ ΛΥΟΦΙΛΟΠΟΙΗΜΕΝΩΝ ΥΔΡΟΠΗΚΤΩΜΑΤΩΝ	100
3.4	ΧΗΜΙΚΗ ΑΠΟΙΚΟΔΟΜΗΣΗ ΑΛΓΙΝΙΚΟΥ ΥΔΡΟΠΗΚΤΩΜΑΤΟΣ ΣΕ ΦΥΣΙΟΛΟΓΙΚΟ ΟΡΟ ΣΤΟΥΣ 37°C.....	102
	ΜΕΛΕΤΗ ΑΠΟΙΚΟΔΟΜΗΣΗΣ ΜΕ ΜΕΤΡΗΣΕΙΣ ΣΥΓΚΕΝΤΡΩΣΗΣ ΔΙΑΛΥΜΕΝΟΥ ΑΛΓΙΝΙΚΟΥ ΣΕ ΦΥΣΙΟΛΟΓΙΚΟ ΟΡΟ	102
	ΜΕΛΕΤΗ ΑΠΟΙΚΟΔΟΜΗΣΗΣ ΑΛΓΙΝΙΚΟΥ ΥΔΡΟΠΗΚΤΩΜΑΤΟΣ ΜΕ ΜΕΤΡΗΣΕΙΣ ΑΠΩΛΕΙΑΣ ΜΑΖΑΣ	105
3.5	ΧΗΜΙΚΗ ΤΡΟΠΟΠΟΙΗΣΗ ΑΛΓΙΝΙΚΟΥ ΥΔΡΟΠΗΚΤΩΜΑΤΟΣ	107
	ΥΔΑΤΙΚΗ ΧΗΜΕΙΑ ΚΑΡΒΟΔΙΙΜΙΔΙΩΝ	107
3.5.1	ΠΡΟΣΔΕΣΗ ΤΟΥ ΥΔΡΑΖΙΔΙΟΥ ΤΗΣ ΒΙΟΤΙΝΗΣ ΣΤΟ ΑΛΓΙΝΙΚΟ ΥΔΡΟΠΗΚΤΩΜΑ ΓΙΑ ΤΗΝ IN VIVO ΜΕΛΕΤΗ ΑΠΟΙΚΟΔΟΜΗΣΗΣ ΤΟΥ	110
	ΔΙΑΔΙΚΑΣΙΑ ΣΥΝΘΕΣΗΣ	110
	ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΜΟΣ ΠΡΟΣΔΕΣΗΣ ΒΙΟΤΙΝΗΣ	111
3.5.2	ΠΡΟΣΔΕΣΗ ΟΛΙΓΟΠΕΠΤΙΔΙΟΥ ΤΥΠΟΥ RGD ΣΤΟ ΑΛΓΙΝΙΚΟ ΥΔΡΟΠΗΚΤΩΜΑ ΓΙΑ ΤΗΝ ΕΝΙΣΧΥΣΗ ΤΗΣ ΚΥΤΤΑΡΙΚΗΣ ΠΡΟΣΚΟΛΛΗΣΗΣ.....	113
	ΠΑΡΑΣΚΕΥΗ ΤΟΥ LMW ΑΛΓΙΝΙΚΟΥ ΟΞΕΟΣ.....	114
	ΜΕΤΡΗΣΗ ΜΟΡΙΑΚΩΝ ΒΑΡΩΝ ΤΩΝ ΚΛΑΣΜΑΤΩΝ ΤΟΥ ΥΨΗΛΟΥ (HMW) ΚΑΙ ΤΟΥ ΧΑΜΗΛΟΥ (LMW) ΜΟΡΙΑΚΟΥ ΒΑΡΟΥΣ ΑΛΓΙΝΙΚΟΥ ΟΞΕΟΣ	116
	ΟΞΕΙΔΩΣΗ ΑΛΓΙΝΙΚΟΥ ΟΞΕΟΣ.....	118
	ΠΡΟΣΔΕΣΗ ΕΝΝΕΑΠΕΠΤΙΔΙΟΥ (GGGGRGDSP)	120
3.5.3	ΟΜΟΙΟΠΟΛΙΚΗ ΠΡΟΣΔΕΣΗ ΑΥΞΗΤΙΚΗΣ ΟΡΜΟΝΗΣ ΚΑΙ ΠΡΩΤΕΪΝΩΝ ΣΤΟ ΑΛΓΙΝΙΚΟ ΥΔΡΟΠΗΚΤΩΜΑ.....	122
3.6	Το ΑΛΓΙΝΙΚΟ ΥΔΡΟΠΗΚΤΩΜΑ ΩΣ ΣΥΣΤΗΜΑ ΜΕΤΑΦΟΡΑΣ ΚΑΙ ΑΠΕΛΕΥΘΕΡΩΣΗΣ ΑΥΞΗΤΙΚΩΝ ΠΑΡΑΓΟΝΤΩΝ ΚΑΙ ΠΡΩΤΕΪΝΩΝ ΣΕ ΕΜΦΡΑΓΜΑ-ΤΙΚΟ ΜΥΟΚΑΡΔΙΟ	123
3.6.1	«ΕΓΚΛΩΒΙΣΜΟΣ» ΑΥΞΗΤΙΚΗΣ ΟΡΜΟΝΗΣ ΚΑΙ ΠΡΩΤΕΪΝΩΝ ΣΤΟ ΑΛΓΙΝΙΚΟ ΥΔΡΟΠΗΚΤΩΜΑ.....	124
3.6.2	ΠΡΟΣΔΕΣΗ ΚΑΙ ΑΠΕΛΕΥΘΕΡΩΣΗ ΠΡΩΤΕΪΝΗΣ ΣΤΟ ΑΛΓΙΝΙΚΟ ΥΔΡΟΠΗΚΤΩΜΑ ΜΕ ΧΡΗΣΗ ΜΑΓΝΗΤΙΚΩΝ ΝΑΝΟ-ΣΩΜΑΤΙΔΙΩΝ Fe_2O_3	129

ΕΠΙΔΡΑΣΗ ΤΟΥ ΡΗ ΣΤΗ ΔΕΣΜΕΥΣΗ ΤΗΣ BSA ΣΤΑ ΝΑΝΟΣΩΜΑΤΙΔΙΑ.....	130
ΑΠΕΛΕΥΘΕΡΩΣΗ ΤΗΣ BSA	133
3.6.3 ΜΕΛΕΤΗ ΑΠΕΛΕΥΘΕΡΩΣΗΣ ΠΡΩΤΕΪΝΗΣ ΟΜΟΙΟΠΟ-ΛΙΚΑ ΠΡΟΣΔΕΔΕΜΕΝΗΣ ΣΤΗΝ ΑΛΥΣΙΔΑ ΤΟΥ ΑΛΓΙΝΙΚΟΥ ΜΟΡΙΟΥ.....	136
4. IN VITRO & IN VIVO ΕΛΕΓΧΟΣ ΙΚΡΙΩΜΑΤΟΣ ΑΛΓΙΝΙΚΟΥ ΥΔΡΟΠΗΚΤΩΜΑΤΟΣ.....	141
4.1 IN VITRO ΕΛΕΓΧΟΣ ΙΚΡΙΩΜΑΤΟΣ	141
4.1.1 IN VITRO ΕΛΕΓΧΟΣ ΑΛΓΙΝΙΚΟΥ ΒΙΟΪΛΙΚΟΥ ΜΕ ΚΑΡΔΙΑΚΟ / ΕΝΔΟΘΗΛΙΑΚΟ ΠΛΗΘΥΣΜΟ (CEDPs)	142
4.1.2 IN VITRO ΕΛΕΓΧΟΣ ΑΛΓΙΝΙΚΟΥ ΒΙΟΪΛΙΚΟΥ ΜΕ ΕΝΔΟΘΗΛΙΑΚΑ (HUVECS) ΚΑΙ ΜΕΣΕΓΧΥΜΑΤΙΚΑ ΚΥΤΤΑΡΑ (MSCs)	144
1,2 % ΑΛΓΙΝΙΚΟ ΥΔΡΟΠΗΚΤΩΜΑ.....	144
1,2 % ΑΛΓΙΝΙΚΟ ΥΔΡΟΠΗΚΤΩΜΑ – G ₄ RGDSP.....	147
4.2 IN VIVO ΕΛΕΓΧΟΣ ΒΙΟΪΛΙΚΩΝ.....	149
ΒΙΟΪΛΙΚΑ ΠΟΥ ΕΜΦΥΤΕΥΘΗΚΑΝ	150
ΠΕΙΡΑΜΑΤΟΖΩΑ	150
ΔΙΑΣΩΛΗΝΩΣΗ – ΈΜΦΡΑΓΜΑ – ΕΜΦΥΤΕΥΣΗ	150
4.2.1 IN VIVO ΕΛΕΓΧΟΣ ΒΙΟΑΠΟΙΚΟΔΟΜΗΣΗΣ ΑΛΓΙΝΙΚΟΥ ΥΔΡΟΠΗΚΤΩΜΑΤΟΣ ΣΕ ΕΜΦΡΑΓΜΑΤΙΚΟ ΜΥΟΚΑΡΔΙΟ.....	152
4.2.2 ΕΜΦΥΤΕΥΣΗ ΑΛΓΙΝΙΚΟΥ ΥΔΡΟΠΗΚΤΩΜΑΤΟΣ ΜΕ ΚΥΤΤΑΡΑ CEDPs.....	154
4.2.3 ΈΛΕΓΧΟΣ ΕΠΙΔΡΑΣΗΣ ΤΟΥ ΑΛΓΙΝΙΚΟΥ ΥΔΡΟΠΗΚΤΩ-ΜΑΤΟΣ ΜΕ GH ΣΤΗΝ ΑΝΑΔΙΑΜΟΡΦΩΣΗ ΤΗΣ ΑΡΙΣΤΕΡΗΣ ΚΟΙΛΙΑΣ.....	156
ΙΣΤΟΛΟΓΙΚΕΣ ΜΕΤΡΗΣΕΙΣ ΑΝΑΔΙΑΜΟΡΦΩΣΗΣ ΤΗΣ ΑΡΙΣΤΕΡΗΣ ΚΟΙΛΙΑΣ	156
ΥΠΕΡΗΧΟΚΑΡΔΙΟΓΡΑΦΙΚΑ ΕΥΡΗΜΑΤΑ	157
ΦΛΕΓΜΟΝΩΔΗΣ ΑΝΤΙΔΡΑΣΗ ΞΕΝΟΥ ΣΩΜΑΤΟΣ ΚΑΙ ΜΥΟΪΝΟΒΛΑΣΤΙΚΗ ΑΝΤΙΔΡΑΣΗ	157
ΑΓΓΕΙΟΓΕΝΕΣΗ	158
4.2.4 ΈΛΕΓΧΟΣ ΕΠΙΔΡΑΣΗΣ ΤΟΥ ΑΛΓΙΝΙΚΟΥ ΥΔΡΟΠΗΚΤΩΜΑΤΟΣ, ΧΩΡΙΣ ΚΑΙ ΜΕ GH, ΣΤΙΣ ΚΟΙΛΙΑΚΕΣ ΑΡΡΥΘΜΙΕΣ ΕΠΕΙΤΑ ΑΠΟ ΠΡΟΚΛΗΣΗ ΙΣΧΑΙΜΙΑΣ – ΕΠΑΝΑΙΜΑΤΩΣΗΣ ΣΤΗΝ ΟΞΕΙΑ ΦΑΣΗ.....	159
4.2.5 ΈΛΕΓΧΟΣ ΕΠΙΔΡΑΣΗΣ ΤΟΥ ΑΛΓΙΝΙΚΟΥ ΥΔΡΟΠΗΚΤΩΜΑΤΟΣ, ΧΩΡΙΣ ΚΑΙ ΜΕ GH, ΣΤΙΣ ΚΟΙΛΙΑΚΕΣ ΑΡΡΥΘΜΙΕΣ ΕΠΕΙΤΑ ΑΠΟ ΟΞΥ ΕΜΦΡΑΓΜΑ ΣΤΗ ΧΡΟΝΙΑ ΦΑΣΗ	161
4.2.6 ΈΛΕΓΧΟΣ ΕΠΙΔΡΑΣΗΣ ΤΟΥ TEC (ΑΛΓΙΝΙΚΟ- G ₄ RGDSP- HUVECS/MSCs) ΣΤΙΣ ΚΟΙΛΙΑΚΕΣ ΑΡΡΥΘΜΙΕΣ ΕΠΕΙΤΑ ΑΠΟ ΟΞΥ ΕΜΦΡΑΓΜΑ, ΣΤΗ ΧΡΟΝΙΑ ΦΑΣΗ.....	163
5. ΓΕΝΙΚΗ ΣΥΖΗΤΗΣΗ, ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ & ΠΡΟΤΑΣΕΙΣ ΓΙΑ ΜΕΛΛΟΝΤΙΚΗ ΕΡΕΥΝΑ	169
ΓΕΝΙΚΗ ΣΥΖΗΤΗΣΗ ΚΑΙ ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ	169
ΠΡΟΤΑΣΕΙΣ ΓΙΑ ΜΕΛΛΟΝΤΙΚΗ ΕΡΕΥΝΑ	181

ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ.....	185
Π1. ΠΑΡΑΓΩΓΗ ΝΑΝΟΣΩΜΑΤΙΔΙΩΝ Fe_2O_3 ΜΕ ΤΗ ΜΕΘΟΔΟ FLAME SPRAY PYROLYSIS (FSP)	185
ΠΑΡΑΓΩΓΗ ΝΑΝΟΣΩΜΑΤΙΔΙΩΝ	185
ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΜΟΣ ΤΩΝ ΝΑΝΟΣΩΜΑΤΙΔΙΩΝ $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$	187
Π2. INPUT FILE ΘΕΩΡΗΤΙΚΩΝ ΥΠΟΛΟΓΙΣΜΩΝ DFT	188
Π3. ΣΧΗΜΑΤΙΣΜΟΣ ΣΦΑΙΡΟΕΙΔΩΝ ΜΕΘΥ-ΣΕΛΛΟΥΛΟΖΗΣ ΓΙΑ ΤΗΝ ΕΝΣΩΜΑΤΩΣΗ ΤΩΝ ΚΥΤΤΑΡΩΝ HUVECS ΚΑΙ MSCs ΜΕ ΤΗ ΜΕΘΟΔΟ ΚΡΕΜΑΜΕΝΗΣ ΣΤΑΓΟΝΑΣ (HANGING DROP)	190
Π4. ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΑ ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ IN VIVO ΠΕΙΡΑΜΑΤΩΝ	191
Π4.1. IN VIVO ΥΠΕΡΗΧΟΓΡΑΦΙΚΑ ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ ΠΟΥ ΕΛΗΦΘΗΣΑΝ ΑΠΟ ΤΑ ΠΕΙΡΑΜΑΤΑ ΕΛΕΓΧΟΥ ΤΗΣ ΕΠΙΔΡΑΣΗΣ ΤΟΥ ΑΛΓΙΝΙΚΟΥ ΥΔΡΟΠΗΚΤΩΜΑΤΟΣ ΜΕ GH ΣΤΗΝ ΑΝΑΔΙΑΜΟΡΦΩΣΗ ΤΗΣ ΑΡΙΣΤΕΡΗΣ ΚΟΙΛΙΑΣ	191
Π4.2. ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΑ ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ ΜΕΛΕΤΗΣ VTs ΠΟΥ ΕΛΗΦΘΗΣΑΝ ΚΑΤΑ ΤΟΝ ΕΛΕΓΧΟ ΤΗΣ ΕΠΙΔΡΑΣΗΣ ΤΟΥ ΑΛΓΙΝΙΚΟΥ ΥΔΡΟΠΗΚΤΩΜΑΤΟΣ, ΧΩΡΙΣ ΚΑΙ ΜΕ GH, ΣΤΙΣ ΚΟΙΛΙΑΚΕΣ ΑΡΡΥΘΜΙΕΣ ΕΠΕΙΤΑ ΑΠΟ ΠΡΟΚΛΗΣΗ ΙΣΧΑΙΜΙΑΣ – ΕΠΑΝΑΙΜΑΤΩΣΗΣ ΣΤΗΝ ΟΞΕΙΑ ΦΑΣΗ	193
Π4.3. ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΑ ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ ΑΠΟ ΤΟΝ ΕΛΕΓΧΟ ΤΗΣ ΕΠΙΔΡΑΣΗΣ ΤΟΥ ΤΕC ΣΤΙΣ ΚΟΙΛΙΑΚΕΣ ΑΡΡΥΘΜΙΕΣ ΕΠΕΙΤΑ ΑΠΟ ΟΞΥ ΕΜΦΡΑΓΜΑ, ΣΤΗ ΧΡΟΝΙΑ ΦΑΣΗ....	194
ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΚΕΣ ΑΝΑΦΟΡΕΣ	197
ΣΥΝΤΟΜΟ ΒΙΟΓΡΑΦΙΚΟ ΣΗΜΕΙΩΜΑ	209

ΕΚΤΕΝΗΣ ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Το έμφραγμα του μυοκαρδίου αποτελεί ένα από τα σοβαρότερα προβλήματα υγείας καθώς αποτελεί τη συχνότερη αιτία νοσηρότητας και θνησιμότητας παγκοσμίως. Η περιορισμένη ικανότητα του καρδιακού μυός να αναγεννηθεί μετά από οξύ έμφραγμα οδηγεί στην ανάγκη ανάπτυξης νέων μεθόδων για αναγέννηση του μυοκαρδίου. Προηγούμενες πειραματικές μελέτες έδειξαν ότι, εμφύτευση βιοϋλικών στην εμφραγματική περιοχή, στην αριστερή κοιλία, μπορεί να μειώσει τη λέπτυνση και τη διάταση της εμφραγματικής περιοχής και να βελτιώσει την αναδιαμόρφωση της αριστερής κοιλίας. Επιπλέον, η αποτελεσματικότητα βιοϋλικών που σχεδιάζονται για την πρόληψη της αναδιαμόρφωσης της αριστερής κοιλίας αυξάνεται όταν αυτά μπορούν να ασκήσουν δυνάμεις που να περιορίζουν τις διαστάσεις της. Μια πολλά υποσχόμενη προσέγγιση είναι η ενσωμάτωση αυξητικών παραγόντων και κυττάρων σε τρισδιάστατα βιοδιασπώμενα ικρίωματα (scaffolds). Τα ικρίωματα αυτά μπορούν να παρέχουν προσωρινή φιλοξενία και υποστήριξη των κυττάρων και να καθοδηγήσουν την αναδιοργάνωσή τους και στις τρεις διαστάσεις μέσα στον ιστό.

Στη διατριβή αυτή παρουσιάζεται η ανάπτυξη ενός βιοδιασπώμενου ικρίωματος της ιστοτεχνολογίας για τη χρήση του στη θεραπεία του εμφράγματος του μυοκαρδίου. Το ικρίωμα είχε ως βάση το υδροηκτώμα του αλγινικού οξέος. Το αλγινικό οξύ είναι ένας φυσικός πολυσακχαρίτης που βρίσκεται στα καφέ άλγη και χρησιμοποιείται ευρέως σε βιοϊατρικές εφαρμογές. Χημικά, είναι ένα γραμμικό 1,4 διασταυρωμένο συμπολυμερές που αποτελείται από τα μονομερή του β-D μαννουρονικού οξέος (M) και του α-L-γουλουρονικού οξέος (G).

Η ανάπτυξη των αλγινικών υδροηκτωμάτων έγινε με ιοντική μέθοδο ζελατινοποίησης. Με μετρήσεις δυναμικού ιξώδους, ως δείκτη της έκτασης της ζελατινοποίησης και της συνεκτικότητας του υδροηκτώματος, και καταγραφή των φασμάτων μέσου υπερύθρου μελετήθηκε η επίδραση που είχε στο σχηματισμό του υδροηκτώματος ο τρόπος παροχής των δισθενών ιόντων μέσω των μηχανισμών διάλυσης/διάχυσης και εσωτερικής ζελατινοποίησης (σε ήπια όξινο περιβάλλον). Μελετήθηκαν τα ιόντα των αλκαλικών γαιών, Ca^{2+} , Mg^{2+} , Sr^{2+} και Ba^{2+} . Στα φάσματα υπερύθρου των λυοφιλοποιημένων υδροηκτωμάτων καταγράφηκαν οι χαρακτηριστικές δονήσεις του μορίου του αλγινικού οξέος, χωρίς, όμως, να εμφανίζεται κάποια άλλη αλλαγή στην οποία να αποδοθεί η παρουσία των δισθενών ιόντων στο σχηματισμό του συμπλόκου, με αυτά, του αλγινικού υδροηκτώματος. Οι τιμές του δυναμικού ιξώδους των υδροηκτωμάτων

του Ca, του Sr και του Ba ήταν σαφώς πιο υψηλές από τις αντίστοιχες τιμές των διαλυμάτων του αλγινικού οξέος. Αντίθετα, τα ιόντα του Mg^{2+} επέδειξαν πολύ φτωχή ικανότητα ζελατινοποίησης στις πειραματικές συνθήκες που μελετηθήκαν (δηλαδή, το ιξώδες παρέμενε πολύ χαμηλό, στην τάξη μεγέθους των διαλυμάτων του αλγινικού οξέος).

Με σκοπό τη βελτιστοποίηση των πειραματικών συνθηκών της σύνθεσης υδροπηκτώματος κατάλληλου για τη συγκεκριμένη εφαρμογή στο εμφαγματικό μυοκάρδιο, έγινε προσδιορισμός της συγκέντρωσης των ιόντων Ca^{2+} η οποία θα είχε ως αποτέλεσμα τη μεγιστοποίηση της έκτασης της ζελατινοποίησης, δηλαδή την επίτευξη της μέγιστης δικτύωσης του αλγινικού υδροπηκτώματος, η οποία προσδιορίστηκε πειραματικά (με μετρήσεις δυναμικού ιξώδους) στα 4,18 mM. Θεωρητικοί κβαντομηχανικοί υπολογισμοί DFT, με τους οποίους υπολογίστηκε θεωρητικά η δομή του αλγινικού υδροπηκτώματος, τεκμηριώνουν τα πειραματικά ευρήματα, δηλαδή, προβλέπουν ότι, πράγματι, σε μια τιμή της συγκέντρωσης των ιόντων Ca^{2+} επιτυγχάνεται η μέγιστη δικτύωση του αλγινικού υδροπηκτώματος, ενώ περεταίρω αύξηση της συγκέντρωσής τους οδηγεί σε χαλάρωση της συνεκτικής δομής του. Το εύρημα αυτό είναι πολύ σημαντικό για το σχεδιασμό του αλγινικού ικρίωματος, γιατί η περιοχή του ισχαιμικού και επαναιματωμένου μυοκαρδίου είναι πλούσια σε ιόντα Ca^{2+} . Έτσι, το αλγινικό υδροπήκτωμα θα πρέπει να εμφυτεύεται υποασβεστιωμένο, ώστε, όταν θα προσλάβει αναπόφευκτα και αυθόρμητα ιόντα Ca^{2+} από τον περιβάλλοντα χώρο του επαναιματωμένου μυοκαρδίου να σχηματίσει *in situ* και γρήγορα (αμέσως μόλις εμφυτευτεί) ένα καλά δικτυωμένο υδροπήκτωμα. Αντίθετα, εάν ένα πολύ καλά δικτυωμένο αλγινικό υδροπήκτωμα Ca (π.χ. με συγκέντρωση Ca^{2+} 4,18 mM) εμφυτευτεί, τότε, η περαιτέρω αύξηση σε ιόντα Ca^{2+} (προερχόμενα από τα βιολογικά υγρά της περιοχής του μυοκαρδίου) στο δίκτυο του υδροπηκτώματος θα το οδηγήσει αυτομάτως προς την κατάσταση της χαλαρής συνεκτικότητας, και έτσι το υδροπήκτωμα αυτό, ακόμα και αν δεν είναι επικίνδυνο για τον οργανισμό, σίγουρα δεν θα επιτελέσει το ρόλο του ως ικρίωμα της ιστοτεχνολογίας και απλώς θα χαθεί γρήγορα στη συστηματική κυκλοφορία. Επίσης, οι θεωρητικοί αυτοί υπολογισμοί έδειξαν ότι, η μικρή ικανότητα σχηματισμού αλγινικού υδροπηκτώματος με τα ιόντα Mg^{2+} οφείλεται στη μικρή ιοντική ακτίνα των ιόντων αυτών, με αποτέλεσμα να μην μπορεί να σχηματιστεί ένα συνεκτικό υδροπήκτωμα, όπως γίνεται με τα ιόντα του Ca^{2+} και με τα άλλα δισθενή ιόντα με μεγαλύτερη ιοντική ακτίνα, που μελετήθηκαν στην παρούσα εργασία.

Η μορφολογία των λυοφιλοποιημένων δειγμάτων των υδροπηκτωμάτων του Ca μελετήθηκε με ηλεκτρονική μικροσκοπία σάρωσης (SEM) και το πορώδες τους (κατανομή μεγέθους πόρων) εκτιμήθηκε με ποροσιμετρία Hg. Σύμφωνα με την οπτική παρατήρηση με το SEM, η μικροδομή του ικρίωματος ομοιάζει μορφολογικά με την αντίστοιχη

μικροδομή του λυοφιλοποιημένου υγιούς μυοκαρδιακού ιστού επίμυος. Το δε πορώδες ήταν κατάλληλο (δηλαδή είχε πολύ μεγάλο πορώδες, μέγεθος πόρων 60-200 μm , με μέγιστο στα $\sim 110 \mu\text{m}$, και υψηλή ενδοσύνδεσή τους) για την ανάπτυξη καλλιέργειας κυττάρων και ιστών εντός αυτού.

Τα παραπάνω αποτελέσματα, λαμβάνοντας, επίσης, υπόψη και την ευρεία παρουσία των ιόντων ασβεστίου στον οργανισμό, στα βιολογικά υγρά και στους ιστούς, προέκριναν για την ανάπτυξη του τελικού ικριώματος το αλγινικό υδροπήκτωμα του Ca. Έτσι, μετά τον πλήρη χαρακτηρισμό, ακολούθησε η σύνθεση τροποποιημένων αλγινικών υδροπηκτωμάτων τα οποία να μπορούν να χρησιμοποιηθούν για να φιλοξενήσουν στη δομή τους, να μεταφέρουν και να απελευθερώσουν σταδιακά με το χρόνο μετά την εμφύτευση στο εμφραγματικό μυοκάρδιο αυξητικούς πρωτεϊνικούς παράγοντες και κύτταρα. Η ομοιοπολική σύνδεση διαφόρων μορίων, όπως το υδραζίδιο της βιοτίνης, η αυξητική ορμόνη, η αλβουμίνη (BSA) και το ολιγοπεπίδιο (τύπου RGD) GGGGRGDSP, στην αλυσίδα του αλγινικού μορίου έγινε με εφαρμογή της μεθόδου της χημείας καρβοδιιμιδίων μέσω του μηχανισμού αντίδρασης με σουλφο-NHS και EDC.

Ο ρυθμός (δηλαδή η κινητική) της βιοαποικοδόμησης του αλγινικού υδροπηκτώματος του ασβεστίου μελετήθηκε *in vitro* (με μετρήσεις απώλειας μάζας και με μετρήσεις απελευθέρωσής του σε φυσιολογικό ορό στους 37°C) και *in vivo* (με εμφύτευση στο μυοκάρδιο αλγινικού υδροπηκτώματος το οποίο είχε σημανθεί με υδραζίδιο της βιοτίνης, όπου το τελευταίο, με κατάλληλη βαφή, παίρνει χαρακτηριστικό καφέ χρώμα ώστε να ανιχνεύεται στις τομές του μυοκαρδίου). Τα αποτελέσματα αυτών των πειραμάτων έδειξαν ότι, το αλγινικό υδροπήκτωμα του ασβεστίου αποικοδομείται σταδιακά (δηλαδή, στην αρχή πιο γρήγορα και μετά προοδευτικά πιο αργά) σε διάστημα περίπου 10 ημερών, χρονικό διάστημα το οποίο είναι στα πλαίσια του χρόνου που υπολογίζεται να γίνεται η θεραπεία στο εμφραγματικό μυοκάρδιο, σύμφωνα με τα σχετικά ιατρικά πρωτόκολλα.

Προηγούμενες μελέτες είχαν δείξει ότι, η αυξητική ορμόνη παίζει σημαντικό ρόλο στην αναδιαμόρφωση της αριστερής κοιλίας μετά το έμφραγμα. Στην εργασία αυτή, στα πειράματα πρόσδεσης και απελευθέρωσης (στους 37°C) αυξητικών παραγόντων χρησιμοποιήθηκε η σοματοτροπίνη, ενώ πειράματα έγιναν και με αλβουμίνη (BSA). Μελετήθηκαν τρεις τρόποι πρόσδεσης της αυξητικής ορμόνης στο αλγινικό υδροπήκτωμα. Ο πρώτος τρόπος ήταν με απλό εγκλωβισμό της αυξητικής ορμόνης στο υψηλού ιξώδους αλγινικό υδροπήκτωμα. Η κινητική της απελευθέρωσης έδειξε ότι, η αυξητική ορμόνη (και η BSA, επίσης) απελευθερώνεται ταχύτητα στις πρώτες 24 ώρες, και το φαινόμενο έχει ολοκληρωθεί μέσα σε 2 ημέρες. Συνεπώς, η κινητική της απελευθέρωσης σε αυτήν την περίπτωση εξαρτάται από τη διάχυση της ορμόνης μέσα στο δίκτυο του υδροπηκτώματος. Αυτό το υδροπήκτωμα ενδείκνυται για μελέτη

στην οξεία φάση του εμφράγματος (δηλαδή μελέτη εντός 24 ωρών από την εκδήλωση του εμφράγματος και την εφαρμογή της θεραπείας). Ο δεύτερος τρόπος είναι η ιοντική πρόσδεσή της στην επιφάνεια μαγνητικών νανοσωματιδίων $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$, τα οποία μετά «εγκλωβίστηκαν» στο υδροπήκτωμα. Τα σωματίδια αυτά έχουν $pI = 7,9$, σε αντίθεση με την ορμόνη που έχει $pI = 4,9$ και την αλβουμίνη που έχει $pI = 5,1$, προεξοφλώντας, έτσι, ισχυρή ιοντική πρόσδεση σε $pH = 7,4$. Η κινητική της απελευθέρωση ήταν ταχύτερη στις πρώτες 12 ώρες, ενώ το υπόλοιπο περίπου 20-30% της πρωτεΐνης που δεν απελευθερώθηκε αμέσως, μετά τις 2 ημέρες άρχισε να απελευθερώνεται με ρυθμούς συμβατούς με το ρυθμό αποικοδόμησης του αλγινικού υδροπηκτώματος, φτάνοντας μέχρι τις περίπου 8 ημέρες ώστε να ολοκληρωθεί πλήρως η απελευθέρωση όλης της δεσμευμένης στο υδροπήκτωμα πρωτεΐνης. Αυτό είναι πολύ ενδιαφέρον για τη συγκεκριμένη θεραπεία, γιατί στην αρχή της θεραπείας αμέσως μετά το έμφραγμα, απελευθερώνεται ένα μεγάλο ποσοστό (~70%) της αυξητικής ορμόνης, όμως, μετά την πρώτη αυτή φάση, δεν σταματάει εντελώς η παροχή της ορμόνης στην περιοχή του εμφραγματικού μυοκαρδίου αλλά συνεχίζεται με πιο αργούς ρυθμούς μέχρι τις 8 περίπου ημέρες, που ολοκληρώνεται. Ο ρυθμός αυτός αποδίδεται στη χρήση των νανοσωματιδίων του οξειδίου του σιδήρου και στο σχηματισμό των συμπλόκων που δημιουργήθηκαν με τα πρωτεϊνικά μόρια. Ο τρίτος τρόπος πρόσδεσης είναι με απευθείας ομοιοπολικό δεσμό στο αλγινικό μόριο. Στην περίπτωση αυτή, η κινητική της απελευθέρωσης ακολουθεί το ρυθμό της βιοαποικοδόμησης του αλγινικού υδροπηκτώματος.

Τα αλγινικά υδροπηκτώματα του ασβεστίου μελετήθηκαν τόσο *in vitro*, με κυτταροκαλλιέργειες, όσο και *in vivo*, με εμφυτεύσεις σε επίμυες τύπου Wistar, σύμφωνα με τα σχετικά ιατρικά πρωτόκολλα. Οι εμφυτεύσεις και οι *in vivo* μελέτες έγιναν ακολουθώντας όλες τις οδηγίες, εθνικές και διεθνείς, τους κανονισμούς και τη νομοθεσία, σχετικά με το χειρισμό και γενικά τα πειράματα στα οποία χρησιμοποιούνται πειραματόζωα. Για την ενίσχυση της κυτταρικής προσκόλλησης, το αλγινικό υδροπήκτωμα τροποποιήθηκε με ομοιοπολική πρόσδεση του ολιγοπετιδίου $G_4\text{RGDSP}$. Με απώτερο τελικό σκοπό την προαγωγή της αναγέννησης και της αγγειογένεσης της εμφραγματικής καρδιάς, στο τροποποιημένο αυτό προϊόν, έγινε, με επιτυχία, καλλιέργεια και διαφοροποίηση τόσο προγονικών καρδιακών κυττάρων, όσο και ενδοθηλιακών και μεσεγχυματικών κυττάρων (HUVEC και MSC, αντίστοιχα, σε αναλογία 9:1), και ελήφθησαν πολύ καλά και ενθαρρυντικά, για τη συγκεκριμένη εφαρμογή, αποτελέσματα σε όλες τις περιπτώσεις που μελετήθηκαν.

Η επίδραση των αλγινικών υδροπηκτωμάτων με τους διάφορους συνδυασμούς που προαναφέρθηκαν, δηλαδή με (και χωρίς) αυξητική ορμόνη, καθώς επίσης και με (και χωρίς) κύτταρα, στην αναδιαμόρφωση της αριστερής κοιλίας και στην ηλεκτροφυσιολογική κατάσταση της

καρδιάς των πειραματόζων μελετήθηκαν *in vivo* (δηλαδή με εμφύτευσή τους) σε πειραματόζωα, με ιστοπαθολογικό και ηλεκτροφυσιολογικό έλεγχο, τόσο στην οξεία όσο και στη χρόνια φάση του εμφράγματος. Τα αποτελέσματα ήταν πολύ καλά και προκρίνουν τα εμφυτεύματα που κατασκευάστηκαν στην εργασία αυτή για περαιτέρω θεώρηση σε πειράματα πρόληψης της αναδιαμόρφωσης της αριστερής κοιλίας μετά από οξύ έμφραγμα του μυοκαρδίου.

SUMMARY

Development of novel tissue-engineering scaffolds for preventing post-myocardial infarction ventricular remodelling

Eleonora Barka

Dipl. Materials Science Engineer

Department of Materials Science and Engineering, University of Ioannina, Greece

Myocardial infarction constitutes an important health related problem worldwide. During the past decades, experimental studies, using cell-based therapies and growth factors administration integrated in biomaterial scaffolds, have demonstrated the potential to reduce the infarcted area and thus to improve regional and global left ventricular function. Tissue engineering approaches are vastly applied on medical treatment after infarction and perhaps even to regenerate the damaged tissues of myocardium. Nevertheless, there is still no treatment that can restore, if not entirely, at least adequately, the damage that is occurred by myocardium infarction. The outstanding progress in tissue engineering, in conjunction with the breathtaking developments in drug delivery systems due to the nano-materials, emerges new ways and approaches in the treatment and reconstruction of damaged tissues, even in the case of myocardium. Numerous highly porous scaffolds of synthetic biodegradable polymers, such as alginate hydrogels, have been proposed.

This study focuses on developing and characterizing novel alginate hydrogels, which can be used as efficient scaffolds in myocardial tissue engineering. Alginate is a naturally occurring anionic polysaccharide, built of units of β -D mannuronic acid (M) and α -L-guluronic acid (G), linked one to the other with 1,4 bonds, which is typically obtained from brown seaweed. It has been extensively investigated and used in many biomedical applications, due to its good biocompatibility, low toxicity, relatively low cost, and mild chelating ability in the presence of divalent cations.

In the present thesis, alginate hydrogels were synthesized according to the mechanisms of dialysis, or internal gelation. Divalent ions of alkaline earths, specifically Ca^{2+} , Mg^{2+} , Sr^{2+} , and Ba^{2+} , were tested as gelling ions. The Ca-, Sr-, and Ba-alginate hydrogels were successfully synthesized; their dynamic viscosity was sufficiently high (compared to

the low viscosity of the alginate solution). These hydrogels were lyophilized and their structural features were studied by FT-IR spectroscopy, while their morphology and texture was studied by scanning electron microscopy (SEM) observations and mercury porosimetry measurements. The results showed that the lyophilized hydrogels (assuming that they reflect their texture when they are in the liquid state in the form of hydrogels) have an ideal structure and porosity, in terms of very high porosity, pore size distribution (which ranges between 60-200 μm , with a peak at $\sim 110 \mu\text{m}$), and high pores interconnectivity, in order to host cell cultures into their porous matrix, as well as to be implanted in the myocardial tissue, since they displayed high similarity (lamellar microstructure) to the microstructure of lyophilized myocardial tissue (which was also examined in a similar manner). It is worthy to note that no hydrogels were obtained with Mg^{2+} cations.

A main aim of this study was to optimize the hydrogel composition, which would be an ideal tissue engineering scaffold in myocardial ischemia – reperfusion application. Thus, the influence of Ca^{2+} ions (i.e. their concentration and the method for supplying them in the alginate acid solution) on the properties, the features, and the quality of the produced hydrogels (reflected in the stability and the molecular configuration of the produced hydrogels) were thoroughly investigated, both experimentally, with viscosity measurements and FT-IR spectroscopy, and theoretically, with DFT (density functional theory) calculations. There was a significant overall agreement between the experimental results and the theoretical calculations and modeling.

Moreover, the DFT calculations shed light on two important issues. The first one is related to a structural degradation of the hydrogel at very high Ca^{2+} concentrations. In other words, the theoretical models predict an optimum Ca^{2+} concentration for achieving the best chelation in the alginate hydrogel, which was also found experimentally. Further addition of Ca^{2+} ions in the gel (beyond this concentration) results in the relaxation and the degradation of the dense (so called “egg-box”) structure of the hydrogel. This is an important result because reperfusion supplies a high amount of Ca^{2+} ions to the damaged area. Thus, it was proposed that it is better to implant a Ca-deficient alginate hydrogel in the myocardium, because this Ca-deficient alginate can spontaneously uptake the Ca^{2+} ions from the biological liquids and form *in situ* in the heart the well-dense Ca-alginate hydrogel. If a fully structurally dense hydrogel (i.e. with all the Ca^{2+} ions present) would be implanted, then, the uptake of Ca^{2+} ions from the Ca-rich blood-environment (since, as said, the reperfusion supplies a high amount of Ca^{2+} ions to the damaged area), will result (*in situ*, in the myocardium) in a hydrogel that will immediately fall into a degradation, which would be eventually perhaps even dangerous. The second important

finding is related to the explanation of the poor ability of Mg^{2+} ions to form alginate hydrogel, under the experimental conditions tested in this work. This was attributed to the small ionic radius of the Mg^{2+} ions, which do not sufficiently favor the formation of the dense “egg-box” configuration (i.e. there is lack of the overall strong polymer-ion interactions, necessary to form the “egg-box” configuration), as the Ca^{2+} ions do. These results, in conjunction with the wide presence of Ca^{2+} ions in the body fluids and tissues, qualified the use of Ca^{2+} ions for the next parts of this investigation and the production of the final scaffolds.

Therefore, the Ca-alginate hydrogel was chemically modified to produce complete tissue engineering scaffolds, which can bear growth factors and host cells and transfer and deliver them to the damaged area of the infarcted myocardium. Covalent bonding of different compounds (namely biotine, growth hormone, and the peptide GGGGRGDSP) with the alginate chain was successfully achieved by using carbodiimide conjugate chemistry.

The experimental results of the *in vitro* and the *in vivo* studies of the degradation of the Ca-hydrogels showed that the hydrogels are slowly dissolved in *ca.* 10 days, which is considered as an ideal period of time for the specific therapy in the infarcted myocardium. The *in vitro* experiments were carried out in normal saline at 37°C, and mass-loss measurements of the hydrogel, as well as UV-visible spectroscopy (to measure the concentration of the dissolved hydrogel in the supernatant liquid over the hydrogel) were used. For the *in vivo* experiments, the alginate hydrogel implanted in the myocardium of experimental animals was labeled with biotin hydrazide (covalently bonded to the alginate chain), and thus, it was easily detected (after specific staining process) in the cross-sections of myocardium tissue.

Earlier studies have demonstrated that the treatment with growth hormone (GH) is beneficial in preventing left ventricular remodeling. Nevertheless, there is still poor documentation on sustained local administration in the literature. In this thesis, three delivery systems of GH from Ca-alginate hydrogel were developed (fluorescence spectroscopy as well as Bradford method were used for the measurements of the concentration of GH released from the hydrogels). In the first approach, the GH was incorporated into the alginate solution before the addition of the Ca^{2+} cations to form the gel. Hence, the GH was merely caged into the alginate hydrogel. The high viscosity of the hydrogel delays the diffusion of the GH hormone into the myocardium. In the second system, the GH hormone was absorbed onto the surface of magnetic iron oxide (γ - Fe_2O_3) nano-particles, which have a pI = 7.9 (in contrast to the pI of GH, which is 4.9). Thus, strong ionic bonding was developed between the GH and the Fe_2O_3 nano-particles at pH = 7.4. Then, the GH-nanoparticles complex

was incorporated into the alginate hydrogel. The release of GH from the alginate matrix was very fast in the first 12 hours. After 2 days, a slow degradation was recorded, which followed the degradation rate of the alginate hydrogel. The release of GH was completed in *ca.* 8 days. In the third approach, GH was covalently bonded to the alginate chain. The kinetics of the release of GH followed the degradation rate of the alginate hydrogel.

The produced Ca-alginate hydrogels were tested *in vitro*, with cell cultures, and *in vivo*, with implantations in Wistar rats, according to specific medical protocols. As far as the experiments with the experimental animals are concerned, all the necessary precautions were carefully taken, according to all national and international regulations and law. To favor cells' attachment, a modified alginate hydrogel was used, where the oligopeptide GGGGRGDSP was covalently bonded to it. The ultimate aim of these experiments was to enhance the angiogenesis and the cardiomyogenesis in the area of the infarcted myocardium. Two sets of cell cultures, cultivated in the hydrogel, were tested, cardiac and endothelial progenitor cells as well as endothelial (HUVEC) and mesenchymal cells (MSC), the latter in the ratio 9:1. The *in vitro* results were very good, in terms of cells' viability, proliferation and functionality. Therefore, the alginate hydrogel, with (or without) GH and with (or without) the above cell cultures were implanted into the infarcted myocardium of rats. Complete *in vivo* examination was taken place, according to the specific medical protocols. The experimental findings were very good and qualify the produced scaffolds for further consideration and experimentation in preventing left ventricular remodeling after myocardium infarction.

ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΠΙΝΑΚΩΝ

Πίνακας 1. Κατάλογος χημικών αντιδραστηρίων που χρησιμοποιήθηκαν για τη διεξαγωγή των πειραμάτων που αναφέρονται στο Κεφ. 3.	54
Πίνακας 2. Στοιχεία για τα αντιδραστήρια και τις ποσότητές τους που χρησιμοποιήθηκαν για την παρασκευή 20 ml αλγινικών υδροπηκτωμάτων.	56
Πίνακας 3. Ταχύτητες περιστροφής ιξωδόμετρου σε rpm και Hz.	60
Πίνακας 4. Στοιχεία για τα αντιδραστήρια και τις ποσότητές τους που χρησιμοποιήθηκαν για την παρασκευή 20 ml αλγινικών υδροπηκτωμάτων με παροχή Ca^{2+} από το χηλικό σύμπλοκο Ca - EDTA.	77
Πίνακας 5. Υλικά που μελετήθηκαν in vitro με κυτταροκαλλιέργειες.	141
Πίνακας 6. Υλικά που ελέγχθηκαν in vivo στα ιατρικά πρωτόκολλα που εφαρμόστηκαν.	150
Πίνακας 7. Ομάδες μελέτης στο ιατρικό πρωτόκολλο αναδιαμόρφωσης της αριστερής κοιλίας.	156
Πίνακας 8. Ομάδες μελέτης στο ιατρικό πρωτόκολλο επίδρασης του αλγινικού υδροπηκτώματος, χωρίς και με GH, στις κοιλιακές αρρυθμίες έπειτα από πρόκληση ισχαιμίας – επαναιμάτωσης στην οξεία φάση.	159
Πίνακας 9. Ομάδες μελέτης στο ιατρικό πρωτόκολλο επίδρασης του αλγινικού υδροπηκτώματος, χωρίς και με GH, στις κοιλιακές αρρυθμίες έπειτα από οξύ έμφραγμα στη χρόνια φάση.	161
Πίνακας 10. Ομάδες μελέτης στο ιατρικό πρωτόκολλο επίδρασης του TEC στις κοιλιακές αρρυθμίες έπειτα από οξύ έμφραγμα στη χρόνια φάση. ..	163

ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΕΙΚΟΝΩΝ

Εικόνα 1. Ηλεκτρομηχανική σύζευξη (4).....	6
Εικόνα 2. Κυτταρική ιοντική ισορροπία (4).....	6
Εικόνα 3. Δομή μυοκαρδιακού κυττάρου (4).....	8
Εικόνα 4. Το τοίχωμα της καρδιάς (4).....	8
Εικόνα 5. Θρόμβωση στεφανιαίας αρτηρίας και οξύ έμφραγμα του μυοκαρδίου (11).....	10
Εικόνα 6. Σχηματική αναπαράσταση των αλλαγών των καρδιακών κοιλοτήτων έπειτα από καρδιακή ανεπάρκεια. Σύγκριση μιας φυσιολογικής καρδιάς (αριστερά) με μία παθολογική (δεξιά) (12).....	12
Εικόνα 7. Αναδιαμόρφωση αριστερής κοιλίας μετά από οξύ έμφραγμα του μυοκαρδίου (13).....	12
Εικόνα 8. Αγγειοπλαστική με μεταλλική πρόθεση (stent) (16).....	13
Εικόνα 9. Στρατηγικές ιστοτεχνολογίας μυοκαρδίου (31).....	20
Εικόνα 10. Ισημερινές και αξονικές θέσεις (56).....	31
Εικόνα 11. Διαμορφώσεις C1 και 1C (56).....	31
Εικόνα 12. Χαρακτηριστικά της στερεοχημικής διαμόρφωσης των αλγινικών οξέων: (a) Μονομερή αλγινικού οξέος, (b) δομή αλυσίδας, (c) blocks αλυσίδας αλγινικού οξέος (56).....	32
Εικόνα 13. Η συμπεριφορά stress-relaxation αλγινικών υδροπηκτωμάτων με ιοντικούς και ομοιοπολικούς σταυροδεσμούς. Το μέτρο ελαστικότητας είναι ίδιο και στα δύο πηκτώματα (~ 26 KPa) (66).....	34
Εικόνα 14. Δημιουργία δικτύου αλγινικού υδροπηκτώματος (67).....	34
Εικόνα 15. Μοντέλο «Egg Box» (69).....	35
Εικόνα 16. Ζελατινοποίηση διαλύματος αλγινικού οξέος. (Α) Μηχανισμός διάλυσης/διάχυσης, και (Β) μηχανισμός εσωτερικής ζελατινοποίησης (70).....	35
Εικόνα 17. Σχηματική αναπαράσταση εμφύτευσης και αποικοδόμησης αλγινικού υδροπηκτώματος σε μυοκαρδιακό ιστό (67).....	39
Εικόνα 18. (α) Προϊόν της μερικής οξειδωσης της αλυσίδας αλγινικού οξέος, και (β) εξάρτηση της αποικοδόμησης από το pH (άδειοι κύκλοι pH=4.5, τετράγωνα pH = 7.4, και σκιασμένοι κύκλοι pH = 9.2) (58).....	40
Εικόνα 19. Διάγραμμα προσέγγισης θεραπείας του εμφράγματος δια μέσου παροχής κυττάρων (99).....	44
Εικόνα 20. Προσθήκη πεπτιδίου (τύπου RGD) στο αλγινικό οξύ με χημεία καρβοδιιμιδίων (58).....	45
Εικόνα 21. Μηχανισμός μεθόδου εσωτερικής ζελατινοποίησης (70).....	57

Εικόνα 22. Αφροί από λυοφιλοποιημένα υδροπηκτώματα αλγινικού οξέος (παρασκευασμένα με χρήση CaCl_2).	59
Εικόνα 23. Το ιξωδόμετρο (Bohlin Visco 88) με τοποθετημένο τον κύλινδρο περιστροφής (στα αριστερά του, σε κάθετη θέση, διακρίνεται ο μεταλλικός αισθητήρας καταγραφής της θερμοκρασίας) και το αντίστοιχο δοχείο τοποθέτησης του υγρού (α) πριν την εμφύσηση, και (β) μετά την τοποθέτηση στο όργανο και την εμφύσηση του κυλίνδρου στο, υπό μέτρηση, υγρό.	60
Εικόνα 24. Σύστημα κυλίνδρου-δοχείου C30, C25 και C14.	61
Εικόνα 25. Μετρήσεις ιξώδους σε σταθερή θερμοκρασία: (α) το θερμοστατούμενο δοχείο (μπλέ κύλινδρος) θερμοστατείται με παροχή νερού σταθερής θερμοκρασίας και στο κέντρο του τοποθετείται ο κύλινδρος C30, και (β) τοποθέτηση όλου του συστήματος στη συσκευή του ιξωδομέτρου.....	62
Εικόνα 26. (α) FT-IR φασματοφωτόμετρο FT-IR Jasco, και (β) σκεύη και αντιδραστήρια για παρασκευή των δισκίων με KBr.....	64
Εικόνα 27. Ηλεκτρονικό μικροσκόπιο σάρωσης (SEM, Oxford company, Jeol 6510LV) TMEY.	66
Εικόνα 28. (α) Αρχή ποροσιμετρίας υδραργύρου (111), και (β) ποροσίμετρο Hg Quantachrome, Model PM33GT.....	67
Εικόνα 29. Υδροπήκτωμα αλγινικού οξέος με πηγή ιόντων ζελατινοποίησης από CaCl_2 . Παρατηρείται η αργή καταβύθιση της μαγνητικής ράβδου λόγω του υψηλού ιξώδους του πηκτώματος.....	69
Εικόνα 30. Εξάρτηση του δυναμικού ιξώδους (η) των αλγινικών υδροπηκτωμάτων 1%, 2%, 3% από το χρόνο (t). Με διακεκομμένες γραμμές φαίνονται οι αντίστοιχες τιμές ιξώδους των διαλυμάτων του αλγινικού οξέος 1%, 2% και 3%. Οι μετρήσεις έγιναν στην ταχύτητα περιστροφής 4, στους 37°C. Το διαλύματα ήταν υπό συνεχή ήπια ανάδευση, μέσα στο ιξωδόμετρο, από τον κύλινδρο του ιξωδομέτρου.	70
Εικόνα 31. Φάσματα απορρόφησης δονητικής φασματοσκοπίας FT-IR (α) καθαρού αλγινικού οξέος και (β) των πορωδών αφρών που παρήχθησαν από τη λυοφιλοποίηση των υδροπηκτωμάτων αλγινικού οξέος παρασκευασμένων με CaCl_2 , 1%, 2% και 3%, καθώς και υδροπηκτώματος 1% που λυοφιλοποιήθηκε μετά από έκθεσή του σε συνεχή διατμητική τάση (στο ιξωδόμετρο στη ταχύτητα περιστροφής 3) για 300 min.	72
Εικόνα 32. Υδροπήκτωμα αλγινικού οξέος με πηγή ιόντων ζελατινοποίησης CaCO_3 , μετά από 24 ώρες.	73
Εικόνα 33. Αύξηση του δυναμικού ιξώδους (η) με το χρόνο (t) στα αλγινικά υδροπηκτώματα 1 και 2% με CaCO_3 στις ταχύτητες 3 (α) και 4 (β). (Οι μετρήσεις έγιναν σε θερμοκρασία περιβάλλοντος. Τα πηκτώματα ήταν υπό συνεχή ήπια ανάδευση. Η σταθερή απόκλιση των παρουσιαζόμενων πειραματικών τιμών είναι μικρότερη του 5%).	75
Εικόνα 34. Φάσματα απορρόφησης δονητικής φασματοσκοπίας IR των πορωδών αφρών που παρήχθησαν από τη λυοφιλοποίηση των υδροπηκτωμάτων αλγινικού οξέος 1%, 2% και 3% με CaCO_3	76
Εικόνα 35. Αύξηση του δυναμικού ιξώδους (η) με το χρόνο (t) στα αλγινικά υδροπηκτώματα παρασκευασμένα με Ca-EDTA στην ταχύτητα (α) 3 και (β) 4. (Οι μετρήσεις έγιναν σε θερμοκρασία περιβάλλοντος. Τα	

πηκτώματα ήταν υπό συνεχή ήπια ανάδευση. Η σταθερή απόκλιση των παρουσιαζόμενων πειραματικών τιμών είναι μικρότερη του 5%).	79
Εικόνα 36. Καταγραφή ταχείας ελάττωσης του ιξώδους αλγινικού υδροπηκτώματος 1% αμέσως μετά την προσθήκη διαλύματος EDTA. (Οι μετρήσεις έγιναν στην ταχύτητα 4 και σε θερμοκρασία περιβάλλοντος. Το διάλυμα ήταν υπό συνεχή ήπια ανάδευση).	80
Εικόνα 37. Επίδραση της ποσότητας του CaCl_2 που προστέθηκε στο διάλυμα του αλγινικού οξέος στο δυναμικό ιξώδες (η) του αλγινικού υδροπηκτώματος 1% που προέκυψε. (Οι μετρήσεις έγιναν στις ταχύτητες 3 και 4 στους 37°C).	82
Εικόνα 38. Αύξηση του δυναμικού ιξώδους (η) με το χρόνο (t) στο αλγινικό υδροπήκτωμα 1% που παρασκευάστηκε με SrCO_3 στις ταχύτητες 3 και 4. (Οι μετρήσεις έγιναν σε θερμοκρασία περιβάλλοντος. Τα πηκτώματα ήταν υπό συνεχή ήπια ανάδευση. Η σταθερή απόκλιση των παρουσιαζόμενων πειραματικών τιμών είναι μικρότερη του 5%).	85
Εικόνα 39. Αύξηση του δυναμικού ιξώδους (η) με το χρόνο (t) στο αλγινικό υδροπήκτωμα 1% που παρασκευάστηκε με BaCO_3 στις ταχύτητες 3 και 4. (Οι μετρήσεις έγιναν σε θερμοκρασία περιβάλλοντος. Τα πηκτώματα ήταν υπό συνεχή ήπια ανάδευση. Η σταθερή απόκλιση των παρουσιαζόμενων πειραματικών τιμών είναι μικρότερη του 5%).	85
Εικόνα 40. Σύγκριση τιμών δυναμικού ιξώδους υδροπηκτωμάτων 1% που παρασκευάστηκαν με διαφορετικές πηγές και τρόπους παροχής δισθενών κατιόντων και αντίστοιχη τιμή διαλύματος αλγινικού οξέος, μετρημένες στην ταχύτητα 4, σε θερμοκρασία περιβάλλοντος. (Η σταθερή απόκλιση των παρουσιαζόμενων πειραματικών τιμών είναι μικρότερη του 5%).	86
Εικόνα 41. Δομή του μανουρονικού οξέος (M) και του γουλουρονικού οξέος (G) θεωρητικά υπολογισμένων με τη μέθοδο DFT σε επίπεδο θεωρίας B3LYP/6-31+G(d,p).	92
Εικόνα 42. (α) Πειραματικό φάσμα IR του αλγινικού οξέος και (β) θεωρητικά υπολογισμένο (με DFT) φάσμα των μονάδων M και G. Στις δύο ένθετες εικόνες παρουσιάζονται οι διαφορές των (θεωρητικών) φασμάτων απορρόφησης των μονάδων M και G που οφείλονται στις δονήσεις τάσης των ατόμων του H στους δεσμούς C-H.	94
Εικόνα 43. Τρισδιάστατη απεικόνιση 2 ενωμένων μονομερών του αλγινικού οξέος, υπολογισμένων σε επίπεδο θεωρίας B3LYP/6-31+G(d,p), σύμφωνα με υπολογισμούς DFT. (α) Οι δύο πεντόζες με ιόντα Ca^{2+} στη βέλτιστη διαμόρφωση (με τη βέλτιστη συγκέντρωση σε ιόντα Ca^{2+}), και (β) οι δύο πεντόζες με περίσσεια σε ιόντα Ca^{2+} .	95
Εικόνα 44. Βέλτιστη διαμόρφωση με τις δύο ενωμένες πεντόζες του αλγινικού με ιόντα Mg^{2+} , όπως υπολογίστηκαν σε επίπεδο θεωρίας B3LYP/6-31+G(d,p), σύμφωνα με υπολογισμούς DFT.	98
Εικόνα 45. Εικόνα SEM από λυοφιλοποιημένο δείγμα αλγινικού υδροπηκτώματος Ca 1%. Στη μικρή εικόνα φαίνεται η μικροδομή λυοφιλοποιημένου υγιούς ιστού μυοκαρδίου επίμυος.	100
Εικόνα 46. Αποτελέσματα ποροσιμετρίας Hg σε λυοφιλοποιημένο δείγμα αλγινικού υδροπηκτώματος Ca 1%.	101
Εικόνα 47. In vitro μελέτη βιοαποικοδόμησης.	103
Εικόνα 48. Μελέτη χημικής αποικοδόμησης αλγινικού υδροπηκτώματος ασβεστίου 1%, σε φυσιολογικό ορό στους 37°C . (α) Φάσματα απορρόφησης UV-Vis	

υπερκείμενου διαλύματος σε διάφορους χρόνους (σε h) και (β) καμπύλη κινητικής της διάλυσης του αλγινικού υδροπηκτώματος (υπολογισμένη από τη συγκέντρωση αλγινικού στην υδατική φάση).....	104
Εικόνα 49. Τοποθέτηση (με απόχυση) υδροπηκτώματος στη φαρμακευτική γάζα.	106
Εικόνα 50. Αποτελέσματα από τη μελέτη χημικής αποικοδόμησης του αλγινικού υδροπηκτώματος Ca 1%, σε φυσιολογικό ορό στους 37 °C, με καταγραφή της απώλειας μάζας.	106
Εικόνα 51. Μηχανισμός καρβοδιμιδικής αντίδρασης με EDC (119).	108
Εικόνα 52. Μηχανισμός αντίδρασης με σουλφο-NHS και EDC (κάτω αντίδραση). Παρουσιάζονται και οι δύο οδοί, της Εικόνα 51 και της (μη επιθυμητής) υδρόλυσης του ενδιάμεσου εστέρα o-acylisourea (119).	109
Εικόνα 53. Μόριο υδραζιδίου της βιοτίνης (120).	110
Εικόνα 54. Σήμανση αλγινικής αλυσίδας με υδραζίδιο βιοτίνης μέσω χημείας καρβοδιμιδίων (121).	110
Εικόνα 55. Πειραματική πορεία σύνθεσης αλγινικού που έχει σημανθεί με υδραζίδιο βιοτίνης. (α) 1 % διάλυμα αλγινικού οξέος, (β) προσθήκη υδραζιδίου βιοτίνης στο διάλυμα του αλγινικού οξέος, (γ) μετά την προσθήκη NHS/EDAC και έπειτα από 3 h μαγνητικής ανάδευσης, και (δ) καθαρισμός με μεμβράνη διαπίδυσης MWCO 3.5 KDa.....	111
Εικόνα 56. Φάσματα απορρόφησης δονητικής φασματοσκοπίας IR του λυοφιλοποιημένου προϊόντος βιοτίνη-αλγινικό της αντίδρασης και της σκόνης αλγινικού οξέος.	112
Εικόνα 57. (α) Διάλυση σκόνης αλγινικού οξέος HMW σε Millipore αποσταγμένο νερό, και (β) πειραματική διάταξη θέρμανσης σε λουτρό, υπό κάθετο ψυκτήρα, (reflux) της όξινης υδρόλυσης του αλγινικού οξέος HMW σε διάλυμα HCl 3 M.	114
Εικόνα 58. Άσπρο στερεό ίζημα έπειτα από τη φυγοκέντρωση.	115
Εικόνα 59. Καταβύθιση ιζήματος με απόλυτη αιθανόλη.	116
Εικόνα 60. Αποτελέσματα μετρήσεων DLS στο HMW (επάνω διάγραμμα) και στο LMW αλγινικό οξύ (κάτω διάγραμμα). Οι μετρήσεις αυτές ελήφθησαν στο εργαστήριο Γενικής Χημείας στο τμήμα Χημικών Μηχανικών στο Ε.Μ.Π.	117
Εικόνα 61. Διάσπαση δεσμού -CH(OH)-CH(OH)- (A) και -CH(OH)-CH ₂ OH (B), με οξειδωση με υπεριοξικό νάτριο (120).....	118
Εικόνα 62. (α) Αντίδραση οξειδωσης του αλγινικού οξέος με NaIO ₄ σε σκοτεινό δωμάτιο (η αντίδραση δεν είναι ευαίσθητη στην ερυθρή ακτινοβολία), και (β) προϊόν της αντίδρασης πριν την έναρξη καθαρισμού με μεμβράνη MWCO.....	119
Εικόνα 63. Φάσματα δονητικής φασματοσκοπίας FT-IR για τα οξειδωμένα κλάσματα HMW και LMW αλγινικού οξέος και της καθαρής σκόνης του αλγινικού οξέος.	120
Εικόνα 64. Φάσματα δονητικής φασματοσκοπίας FT-IR για τα οξειδωμένα κλάσματα RGD - HMW και RGD - LMW αλγινικού οξέος και της καθαρής σκόνης του αλγινικού οξέος.	121
Εικόνα 65. «Εγκλωβισμός» αυξητικής ορμόνης στο αλγινικό υδροπήκτωμα Ca 1%.	124

Εικόνα 66. (α) Πρότυπη καμπύλη υδατικών διαλυμάτων GH (από μετρήσεις σε φθοροσίμετρο), και (β) καμπύλη απελευθέρωσης της GH από το αλγινικό υδροπήκτωμα με το χρόνο έπειτα από εγκλωβισμό της στο αλγινικό υδροπήκτωμα. (Τα πειράματα έγιναν στους 37°C).	126
Εικόνα 67. (α) Πρότυπη καμπύλη υδατικών διαλυμάτων BSA μετρημένων με τη μέθοδο Bradford, και (β) καμπύλη απελευθέρωσης της BSA από το αλγινικό υδροπήκτωμα με το χρόνο έπειτα από εγκλωβισμό της εντός του αλγινικού υδροπηκτώματος. (Τα πειράματα έγιναν στους 37°C)...127	127
Εικόνα 68. Επίτευξη ιοντικής δέσμευσης GH και BSA στα νανοσωματίδια, σε pH = 7,4.	130
Εικόνα 69. Τυπική εικόνα TEM των νανοσωματιδίων Fe ₂ O ₃ (128).	130
Εικόνα 70. Σχηματική αναπαράσταση πειραματικής διαδικασίας πρόσδεσης της BSA στα μαγνητικά νανοσωματίδια γ-Fe ₂ O ₃ σε pH 7,4, και μαγνητικός διαχωρισμός τους.	131
Εικόνα 71. Μαγνητικός διαχωρισμός των νανοσωματιδίων γ-Fe ₂ O ₃ , στα οποία είχε προσδεθεί ιοντικά η BSA.	131
Εικόνα 72. Πρόσδεση BSA στα μαγνητικά νανοσωματίδια γ-Fe ₂ O ₃ , σε διάφορες τιμές pH. Σε pH = 7 έγιναν μετρήσεις προσρόφησης και σε sonicated νανοσωματίδια γ-Fe ₂ O ₃ με μεγάλη ειδική επιφάνεια. (Τα πειράματα έγιναν στους 37°C).	133
Εικόνα 73. Εναπόθεση φυσιολογικού ορού στην επιφάνεια αλγινικού υδροπηκτώματος στο οποίο είναι διεσπαρμένα νανοσωματίδια Fe ₂ O ₃ με BSA προσδεδεμένη σε αυτά. Το υδροπήκτωμα έχει έντονο χαρακτηριστικό καφέ χρώμα λόγω των νανοσωματιδίων.	134
Εικόνα 74. Καμπύλη απελευθέρωσης της BSA από την επιφάνεια αλγινικού υδροπηκτώματος στο οποίο είναι διεσπαρμένα νανοσωματίδια Fe ₂ O ₃ με BSA προσδεδεμένη σε αυτά, στους 37°C.	134
Εικόνα 75. Εναπόθεση φυσιολογικού ορού περιμετρικά του αλγινικού υδροπηκτώματος στο οποίο ήταν ομοιοπολικά προσδεδεμένη η BSA. .137	137
Εικόνα 76. Καμπύλη απελευθέρωσης της BSA από το αλγινικό υδροπήκτωμα, η οποία ήταν ομοιοπολικά προσδεδεμένη σε αυτό, με χρήση χημείας καρβοδιμιδίων. (Τα πειράματα έγιναν στους 37°C).....	138
Εικόνα 77. Σχηματισμός σφαιριδίων αλγινικού ηκτώματος με εγκλωβισμένα κύτταρα.	142
Εικόνα 78. Διαφοροποίηση καρδιακών και ενδοθηλιακών προγονικών κυττάρων (CEDPs) σε αλγινικό υδροπήκτωμα ασβεστίου (129, 130).	143
Εικόνα 79. (Α) Τα CEDPs διαφοροποιούνται σε αλγινικό υδροπήκτωμα ασβεστίου, (Β) cTnT+ κύτταρα έπειτα από χρώση με CTnT και VE-cadherin, (C) VE cadherin+ κύτταρα στα CEDPs διαφοροποιημένα κύτταρα, και (D) έκφραση των MLC2ν και MLC2α τη 10 ^η ημέρα διαφοροποίησης των CEDPs, αποτελέσματα από RT-PCR (131).	144
Εικόνα 80. Τυπικές εικόνες από την 3 ^η και την 6 ^η ημέρα της κυτταροκαλλιέργειας (σφαιρίδιο μεθυσελλουλόζης με την αποικία κυττάρων) εντός του αλγινικού σφαιριδίου, όπως παρατηρήθηκαν από οπτικό μικροσκόπιο.146	146
Εικόνα 81. Τυπική εικόνα με μονήρη κύτταρα εγκλωβισμένα σε σφαιρίδιο αλγινικού οξέος την 4 ^η ημέρα καλλιέργειας, όπως παρατηρήθηκαν από οπτικό μικροσκόπιο. Διακρίνονται τα σαφή όρια της σφαίρας του	

αλγινικού πηκτώματος (κόκκινα βέλη) καθώς και τα μονήρη κύτταρα.	147
Εικόνα 82. Οι κυτταροκαλιέργειες όπως παρατηρήθηκαν από συνεστιακό μικροσκόπιο (LeicaSP5) την 1 ^η , την 4 ^η και την 6 ^η ημέρα.	148
Εικόνα 83. Πειραματόζωο διασωληνωμένο υπό αναισθησία.	151
Εικόνα 84. (α) Περίδεση, (β) απολίνωση αριστερής στεφανιαίας αρτηρίας, και (γ) απόδειξη πρόκλησης εμφράγματος δια μέσου ηλεκτροκαρδιογραφήματος (ανάσπαση ST).	151
Εικόνα 85. Ενέσιμη ενδομυοκαρδιακή εμφύτευση βιοϋλικού.	152
Εικόνα 86. Χαρακτηριστικές εικόνες τομών του μυοκαρδίου (μετά από βαφή με avidin) για τη μελέτη της <i>in vivo</i> αποικοδόμησης του αλγινικού υδροπηκτώματος που είχε σημανθεί με βιοτίνη, μετά από (Α) 3, (Β) 7 και (C) 15 μέρες από την εμφύτευση, και (D) σύγκριση τομής από ιστό έπειτα από εμφύτευση φυσιολογικού ορού (scale: 20 μ m).	154
Εικόνα 87. Διαφοροποίηση των CEDPs έπειτα από εμφύτευση αλγινικού υδροπηκτώματος με τα κύτταρα (131).	155
Εικόνα 88. Πάχος εμφραγματικής περιοχής, όπως φαίνεται στις τομές της καρδιάς, έπειτα από χρώση με Heidenhain's AZAN-trichrome, για τις 3 ομάδες μελέτης του Πίνακα 7.	157
Εικόνα 89. Χαρακτηριστικές εικόνες μυοϊνοβλαστικής αντίδρασης (myofibroblast activation), έπειτα από χρώση με α-ακτίνη, για τις 3 ομάδες μελέτης του Πίνακα 7. (Η γραμμή της κλίμακας είναι 50 μ m).	158
Εικόνα 90. Χαρακτηριστικές εικόνες της αγγειογένεσης στην περι-εμφραγματική περιοχή για τις 3 ομάδες μελέτης του Πίνακα 7. (Η γραμμή της κλίμακας είναι 50 μ m).	159
Εικόνα 91. Πειραματικά αποτελέσματα καταγραφής αρρυθμιών για τις ομάδες μελέτης του Πίνακα 9.	162
Εικόνα 92. Χαρακτηριστικές εικόνες, που ελήφθησαν από συνεστιακό μικροσκόπιο, σφαιροειδών διαμορφώσεων των κυττάρων HUVECs και MSCs, μετά από 1 ημέρα στο μυοκάρδιο. Τα κύτταρα βρίσκονταν στο TEC και χορηγήθηκαν ενέσιμα στο μυοκάρδιο.	164
Εικόνα 93. Πρωτόκολλο ηλεκτροφυσιολογικής αξιολόγησης και καμπύλες επιβίωσης Kaplan-Mieler.	165
Εικόνα 94. Ιοντική ζελατινοποίηση αλγινικού οξέος. Χρήση ιόντων Ca^{2+} , ως ιόντα ζελατινοποίησης, για την ανάπτυξη αλγινικού υδροπηκτώματος για ενέσιμη εμφύτευση σε εμφραγματικό μυοκάρδιο επίμυων (140).	171
Εικόνα 95. (Α) Η πρωτεΐνη έχει εγκλωβιστεί στο υδροπήκτωμα. Παρατηρείται η γρήγορη διάχυσή της από το πήκτωμα. (Β) Η πρωτεΐνη έχει προσδεθεί ιοντικά στην επιφάνεια των νανοσωματιδίων Fe_2O_3 και το σύμπλοκο BSA-νανοσωματίδια Fe_2O_3 έχει εγκλωβιστεί στο αλγινικό υδροπήκτωμα. Μετά τους πρώτους χρόνους, παρατηρείται πιο σταδιακή απελευθέρωσή της, λόγω μεγαλύτερης δυσκολίας διάχυσης του συμπλόκου BSA-νανοσωματίδια Fe_2O_3 από το υδροπήκτωμα. (Γ) Η πρωτεΐνη συνδέθηκε ομοιοπολικά στο αλγινικό μόριο. Επομένως, η απελευθέρωσή της ακολουθεί πιστά το ρυθμό αποικοδόμησης του υδροπηκτώματος.	177
Εικόνα 96. Συγκριτική απεικόνιση των καμπυλών της κινητικής (στους 37°C) της βιοδιάσπασης του αλγινικού υδροπηκτώματος <i>in vitro</i> και <i>in vivo</i> και της απελευθέρωσης της BSA από το υδροπήκτωμα στο οποίο είχε προσδεθεί	

με τους τρεις τρόπους πρόσδεσης (εγκλωβισμός, με νανοσωματίδια Fe_2O_3 και με ομοιοπολικό δεσμό).	178
Εικόνα 97. Τελική δομή του υλικού.	183
Εικόνα 98. Διάγραμμα διεργασίας FSP για τη σύνθεση Fe_xO_y υπό ελεγχόμενη ατμόσφαιρα, που οδηγεί στη παρασκευή νανοσωματιδίων έως 50 nm (128).	186
Εικόνα 99. Περιθλασιογράφημα νανοσωματιδίων $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$	187
Εικόνα 100. Καμπύλη μαγνήτισης νανοσωματιδίων $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$	187
Εικόνα 101. Μέθοδος hanging drop που χρησιμοποιήθηκε για τη δημιουργία των σφαιριδίων και οι διαφορετικοί συνδυασμοί ενδοθηλιακών και μεσεγχυματικών κυττάρων που έχουν παρασκευαστεί με τη μέθοδο αυτή.	190
Εικόνα 102. Τελοδιαστολική και συστολική διάμετρος αριστερής κοιλίας για τις 4 ομάδες μελέτης του Πίνακα 7.	191
Εικόνα 103. Σφαιρικότητα, κλάσμα εξώθησης και δείκτης τοιχωματικής τάσης για τις 4 ομάδες μελέτης του Πίνακα 7.	192
Εικόνα 104. Αποτελέσματα από την ανάλυση κοιλιακών ταχυκαρδιών για τις 3 ομάδες μελέτης του Πίνακα 8.	193
Εικόνα 105. Καταγραφή κοιλιακών ταχυκαρδιών στις 3 ομάδες μελέτης του Πίνακα 10.	194
Εικόνα 106. Καθυστέρηση της αγωγιμότητας (conduction delay) στις 3 ομάδες μελέτης του Πίνακα 10.	195
Εικόνα 107. Καρδιακός ρυθμός (heart rate).	196

ΑΚΡΩΝΥΜΙΑ

BSA	: Αλβουμίνη (Bovine serum albumin)
CEDP _s	: Καρδιακός/ενδοθηλιακός διπλός προγονικός πληθυσμός
DFT	: Density Functional Theory
ECM	: Εξωκυττάρια μήτρα
EDTA	: Αιθυλενοδιαμινοτετραοξικό οξύ
EF	: Κλάσμα εξώθησης (Ejection fraction)
IMDM	: Isgoves modified medium
G BLOCK	: Gyluronic ομάδες
GDL	: Γλουκονολακτόνη
GH ('H STH)	: Αυξητική ορμόνη (Growth hormone)
GF	: Αυξητικοί παράγοντες (Growth factors)
HR	: Καρδιακός ρυθμός (Heart rate)
HF	: Θεωρία Hartee – Fock
HMW	: Υψηλό μοριακό βάρος
HUVECs	: Ενδοθηλιακά ανθρώπινα κύτταρα
MAP (<i>IN VIVO</i>)	: Monophasic action potential καταγραφές
MAP (Θεωρ. Υπολ.)	: Mulliken atomic populations
M BLOCK	: Mannuronic ομάδες
MSCs	: Μεσενγχυματικά κύτταρα
MI	: Έμφραγμα μυοκαρδίου (myocardial infarction)
LMW	: Χαμηλό μοριακό βάρος
LV	: Αριστερή κοιλία (Left ventricle)
PBS	: Phosphate buffer saline
PDGF	: Platelet-derived growth factor
PEG	: Πολύ(αιθυλενογλυκόλη)
pI	: Ισοηλεκτρικό σημείο
PNIPAAm	: πολύ(N-ισοπροπυλακρυλαμίδιο)
RGD	: H-Arg-Gly-Asp-O
TEC	: Tissue Engineering Construct
VEGF	: Vascular endothelial growth factor
SEM	: Ηλεκτρονική μικροσκοπία σάρωσης
VT/VF	: Κοιλιακή ταχυκαρδία/ μαρμαρυγή
WTI	: Δείκτης τοιχωματικής τάσης
G ₄ RGDSP	: H-Gly-Gly-Gly-Gly-Arg-Gly-Asp-Ser-Pro-O

**ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1: Η ΚΑΡΔΙΑ,
ΤΟ ΕΜΦΡΑΓΜΑ ΤΟΥ
ΜΥΟΚΑΡΔΙΟΥ ΚΑΙ
ΘΕΡΑΠΕΙΕΣ**

1. Η ΚΑΡΔΙΑ, ΤΟ ΕΜΦΡΑΓΜΑ ΤΟΥ ΜΥΟΚΑΡΔΙΟΥ ΚΑΙ ΘΕΡΑΠΕΙΕΣ

1.1 Το όργανο της καρδιάς

Η δομή και η λειτουργία της καρδιάς

Η καρδιά είναι ένα κοίλο μυώδες όργανο, σχήματος ανεστραμμένης τριγωνικής πυραμίδας, με την κορυφή προς τα κάτω, πρόσω και αριστερά. Είναι το όργανο που δίνει την κινητήρια δύναμη της κυκλοφορίας του αίματος (1). Περιβαλλόμενη από ινοορογόνο θύλακο, το περικάρδιο, καταλαμβάνει το μέσο μεσοπνευμόνιο χώρο, κάτω από το νοητό επίπεδο διερχόμενο, εμπρός, από τη στερνική γωνία και όπισθεν από το κάτω χείλος του 4^{ου} θωρακικού σπονδύλου. Στη θέση αυτή, η καρδιά, επικαλυπτόμενη από τα πλάγια και κατά το μέγιστο μέρος από μπροστά από τα παρακείμενα μεσοπνευμόνια πέταλα των υπεζωκότων και από τους πνεύμονες, βρίσκεται πίσω από το σώμα του στέρνου και, αμφοτερόπλευρα, πίσω από τους χόνδρους από τη 3^η έως την 6^η πλευρά (1).

Η βάση της καρδιάς αντιστοιχεί σε επίπεδο μεταξύ των τρίτων στερνοchonδρικών διαρθρώσεων, η δε κορυφή της αντιστοιχεί στο αριστερό 5^ο μεσοπλεύριο διάστημα, λίγο επί τα εντός της μεσοκλειδικής γραμμής. Επικαθήμενη στο τεντόνιο κέντρο του διαφράγματος, φέρει τον επιμήκη άξονά της (από την έκφυση της αορτής μέχρι την κορυφή της καρδιάς) από τα δεξιά, άνω και πίσω προς τα αριστερά, κάτω και πρόσω υπό γωνία 30°, ως προς το οριζόντιο επίπεδο και 45°, ως προς το μέσο οβελιαίο επίπεδο (1). Εν συνόλω, βρίσκεται κατά τα δύο τριτημόρια αριστερά από τη μέση γραμμή του σώματος. Σε σχέση με την εμβρυϊκή της θέση, η οποία καθορίζει και την επικρατούσα τοπογραφική και ανατομική ορολογία της, η καρδιά έχει υποστεί συστροφή περί τον επιμήκη άξονα, από τα δεξιά προς τα αριστερά, έτσι ώστε στην ανατομική θέση του σώματος, οι δεξιές κοιλότητες φέρονται σε πιο πρόσθιες θέσεις σε σχέση προς τις αριστερές (1).

Η καρδιά, αν και είναι κατά το μέγιστο μέρος της (πλην της βάσης της) κινούμενο εφ'όρου ζωής όργανο, στηρίζεται σταθερά στη θέση της από το περικάρδιο. Τούτο, αφού την περιβάλλει, αντίστοιχα από τη θέση της καρδιάς, αναδιπλώνεται, ως επικάρδιο, επί του αρχικού τμήματος (ή τελικού για τις φλέβες) των μεγάλων αγγείων, που εκφύονται ή καταλήγουν στην καρδιά (άνω και κάτω κοίλη και πνευμονικές φλέβες), τα οποία και αυτά συμβάλλουν στη στήριξη της καρδιάς (1). Το βάρος, το μέγεθος και η φορά της φυσιολογικής καρδιάς ποικίλλουν, εξαρτώμενα από

την ηλικία, το φύλο, τη σωματική διάπλαση, το επικαρδιακό λίπος και τις αναπνευστικές κινήσεις. Παραδείγματος χάριν, κατά την εισπνοή καθώς και σε άτομα υψηλόσωμα και λεπτόσωμα, η καρδιά έχει πιο κάθετη φορά και αντιθέτως κατά την εκπνοή και σε πιο μεγαλόσωμα άτομα έχει πιο οριζόντια θέση. Η καρδιά ενός μέσης ανάπτυξης ενήλικου έχει διαστάσεις από τη βάση προς την κορυφή 12 cm, μέγιστη εγκάρσια διάμετρο 8-9 cm και προσθοπίσθια διάμετρο 6 cm. Το βάρος στους άνδρες ποικίλλει από 280-340 g και στις γυναίκες από 230-280 g (1).

Η καρδιά μπορεί να θεωρηθεί ως ένα διφυές όργανο, αποτελούμενο από δύο μυϊκές αντλίες. Τη «δεξιά» και την «αριστερή καρδιά», ταυτόσημης λειτουργίας, δηλαδή της διατήρησης της ροής και της πίεσης του αίματος μέσα στο διπλό αγγειακό σύστημα της μικρής (πνευμονικής) και της μεγάλης (συστηματικής) κυκλοφορίας. Κάθε «καρδιά» («αντλία») τροφοδοτείται από μια προσαγωγό αιματική ροή, την οποία μεταβάλλει σε απαγωγό αιματική ροή, αλλάζοντας τη φορά της (1, 2). Το προσαγόμενο αίμα κάθε ροής (δεξιά των κοίλων φλεβών, αριστερά των πνευμονικών φλεβών) εισέρχεται στο λεπτοτοιχωματικό κόλπο, ο οποίος έχει μικρή μόνο συσταλτική δύναμη. Από τον κόλπο, το αίμα ρέει στη σύστοιχη παχυτοιχωματική κοιλία, μέσω του κολποκοιλιακού τμήματος. Ο ισχυρός μονοδρομικός βαλβιδικός μηχανισμός παρεμποδίζει την παλινδρόμηση του αίματος στους κόλπους. Η συστολή των κοιλιών εξακοντίζει το αίμα της δεξιάς κοιλίας στην πνευμονική αρτηρία και της αριστερής στην αορτή (1, 2). Η προσαγωγός και η απαγωγός ροή της «δεξιάς» καρδιάς αποτελείται από αποξυγονωμένο (ή μη οξυγονωμένο) αίμα («φλεβικό» αίμα), το οποίο διοχετεύεται στο σχετικά χαμηλής αντίστασης αγγειακό δίκτυο της πνευμονικής κυκλοφορίας (1, 2). Αντίθετα, η προσαγωγός και η απαγωγός ροή της «αριστερής» καρδιάς αποτελείται από οξυγονωμένο αίμα, το οποίο διοχετεύεται στο τεράστιο, σχετικά υψηλής αντιστάσεως, αγγειακό δίκτυο της συστηματικής κυκλοφορίας. Για το λόγο αυτό, το τοίχωμα της αριστερής κοιλίας είναι πολύ παχύτερο (τρεις φορές περίπου) από το τοίχωμα της δεξιάς, η δε γωνία εισόδου-εξόδου της αιματικής ροής, εντός αυτής είναι οξύτερη (2).

Ο καρδιακός κύκλος

Η κυκλοφορία του αίματος στηρίζεται στη συνεχή και ρυθμική σύσπαση της καρδιάς. Κατά τη διάρκεια του καρδιακού κύκλου, η καρδιά συνεχώς διαστέλλεται και συστέλλεται. Κατά τη διαστολή, το αίμα από τους κόλπους μετακινείται στις κοιλίες. Κατά τη συστολή, αρχίζει η σύσπαση των κοιλιών η οποία αυξάνει την ενδοκοιλιακή πίεση. Όταν η ενδοκοιλιακή πίεση αυξηθεί αρκετά ανοίγουν οι μηννοειδείς βαλβίδες και το αίμα εξωθείται προς τις αρτηρίες. Οι βαλβίδες επιτρέπουν τη ροή του αίματος μόνο προς μία

κατεύθυνση. Κάθε λεπτό η καρδιά αντλεί κατά μέσο όρο περίπου 5 λίτρα αίματος (2).

Θεωρείται ότι ο κύκλος του αίματος ξεκινά με την είσοδο του αποξυγονωμένου αίματος ("βρώμικο αίμα") από το σώμα στην καρδιά. Το αίμα αυτό εισέρχεται στο δεξιό κόλπο και από εκεί, μέσω μίας βαλβίδας, εισάγεται στη δεξιά κοιλία. Εκείνη το προωθεί στους πνεύμονες όπου εμπλουτίζεται με οξυγόνο στη θέση του διοξειδίου του άνθρακα, το οποίο αποβάλλεται με την εκπνοή. Το αίμα, με το μεγάλης σημασίας, για τον οργανισμό, οξυγόνο, εισέρχεται, στη συνέχεια, μέσω των πνευμονικών φλεβών, στον αριστερό κόλπο και έπειτα στην αριστερή κοιλία πάλι με τη βοήθεια μιας βαλβίδας. Από την αριστερή κοιλία, το αίμα κατευθύνεται προς το σώμα μέσω των αρτηριών (2). Στο σώμα γίνεται σταδιακά η αποβολή του οξυγόνου προς τα κύτταρα και η πρόσληψη του διοξειδίου του άνθρακα από αυτά. Μέσω των τριχοειδών αγγείων, το αίμα περνάει από τις αρτηρίες στις φλέβες για να κατευθυνθεί πάλι προς την καρδιά και στη συνέχεια, στους πνεύμονες, για να ξεκινήσει και πάλι ο κύκλος, να καθαριστεί και να εμπλουτίσει και πάλι κάθε κύτταρο με οξυγόνο. Με αυτόν τον πολύ καλά οργανωμένο τρόπο επιτελείται η κυκλοφορία του αίματος και ο εμπλουτισμός των κυττάρων του σώματος με το απαραίτητο, για τη ζωή, οξυγόνο (2).

Ηλεκτροφυσιολογία της καρδιάς

Η ηλεκτρική δραστηριότητα της καρδιάς αποτελεί ένα από τα θεμελιώδη φαινόμενα της φυσιολογίας του ανθρώπου και είναι αυτή η οποία προκαλεί τη μηχανική συστολή των κόλπων και των κοιλιών και που διατηρεί τη λειτουργία της καρδιάς και την ίδια τη ζωή (3). Οι πρώτες έρευνες πάνω στην ηλεκτροφυσιολογία έγιναν από τον Luigi Galvani και τον Alessandro Volta στο τέλος του 18^{ου} αιώνα, στο νευρομυϊκό σύστημα πειραματοζώων. Ακολούθησαν τα πειράματα του Matteucci το 1838, ο οποίος απέδειξε ότι, μεταβολές του δυναμικού της κυτταρικής μεμβράνης σε σκελετικούς μύες προκαλούσε μηχανική συστολή. Η πρώτη καταγραφή του ηλεκτροκαρδιογραφήματος έγινε από τον Wilhelm Einthoven το 1903 (Βραβείο Nobel, 1924) (3). Η σύγχρονη ηλεκτροφυσιολογία στοχεύει τόσο στη διάγνωση και στη μελέτη των διαταραχών του καρδιακού ρυθμού όσο και στην αντιμετώπιση πολλών μορφών αρρυθμιών και του ξαφνικού θανάτου (3, 4). Η μηχανική συστολή και διαστολή, που ονομάζονται καρδιακός ρυθμός, συντονίζονται με μεγάλη ακρίβεια από μία αλληλουχία βιοχημικών φαινομένων που είναι αποτέλεσμα εισόδου ιόντων από και προς το κυτταρόπλασμα των καρδιακών κυττάρων.

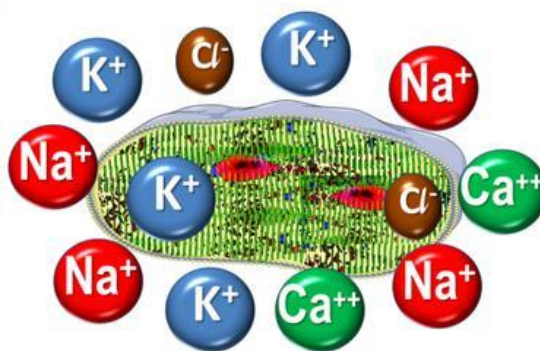
Επομένως, η καρδιακή ηλεκτροφυσιολογία είναι η μελέτη των ηλεκτρικών φαινομένων της καρδιάς που συμβάλλουν στη γένεση του καρδιακού ρυθμού. Η συστολή και η διαστολή της καρδιάς είναι άρρηκτα συνδεδεμένες μεταξύ τους. Κάθε ηλεκτρική εκπόλωση ακολουθείται, έπειτα

από 30-80 ms, από μηχανική συστολή (αρχή ηλεκτρομηχανικής σύζευξης). Καθοριστικό ρόλο στη λειτουργία της καρδιάς κατέχουν τα ιόντα ασβεστίου καθώς είναι ο συνδετικός κρίκος μεταξύ των δύο λειτουργιών (Εικόνα 1) (4).



Εικόνα 1. Ηλεκτρομηχανική σύζευξη (4).

Όλα τα κύτταρα του οργανισμού περιέχουν ιόντα σε διάφορες συγκεντρώσεις. Τα κυριότερα από αυτά είναι το ασβέστιο, το νάτριο και το κάλιο, ενώ άλλα, όπως το χλώριο ή το μαγνήσιο, υπάρχουν σε μικρότερες συγκεντρώσεις και διαδραματίζουν μικρότερο φυσιολογικό ρόλο (3-5). Τέλος, μία σειρά ιόντων βρίσκονται σε ελάχιστες συγκεντρώσεις στον οργανισμό και ονομάζονται ιχνοστοιχεία. Οι ηλεκτρικές ιδιότητες του κυττάρου καθορίζονται από την ένδο- και την έξω- κυττάρια ιοντική ισορροπία (Εικόνα 2, (4)).



Εικόνα 2. Κυτταρική ιοντική ισορροπία (4).

Η σημασία των ιόντων ασβεστίου στη φυσιολογία του μυοκαρδιακού κυττάρου καταδεικνύεται από τη συσχέτιση του χρησιμοποιούμενου ασβεστίου με την ισχύ της μηχανικής συστολής (3, 4). Κατά τη διάρκεια της διαστολής, τα ιόντα ασβεστίου είναι αποθηκευμένα στο σαρκοενδοπλασματικό δίκτυο και η συγκέντρωση του ασβεστίου στο κυτταρόπλασμα είναι ελάχιστη. Αυτό γίνεται για λόγους αυτοπροστασίας του κυττάρου, γιατί το ασβέστιο είναι ο «σπινθήρας που ανάβει τη φωτιά»,

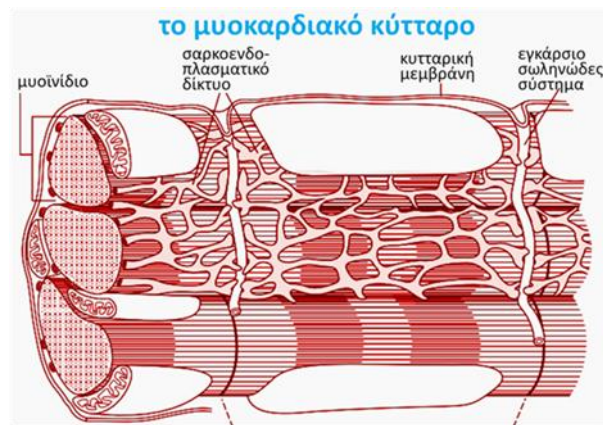
προκαλώντας τη μηχανική συστολή (3, 5). Ενώ κατά τη διάρκεια της διαστολής, το κύτταρο προστατεύεται από τη «φωτιά», περιχαρακώνοντας το ασβέστιο στο σαρκοενδοπλασματικό δίκτυο. Δηλαδή, κατά τη διάρκεια της συστολής, το ασβέστιο απελευθερώνεται στο κυτταρόπλασμα και ενώνεται με την τροπονίνη-C, όπου η διαδικασία αυτή είναι ο συνδετικός κρίκος των ηλεκτρικών και των μηχανικών φαινομένων στα κύτταρα (3, 4). Το έναυσμα για τη χάλαση του μυοκαρδίου είναι η επαναπρόσληψη του ασβεστίου στο σαρκοενδοπλασματικό δίκτυο κατά τη φάση επαναπόλωσης του μυοκαρδιακού κυττάρου (4). Σύμφωνα με την αρχή των Frank-Starling, τα ιόντα ασβεστίου, όχι μόνο συνδέουν τα ηλεκτρικά και τα μηχανικά φαινόμενα, αλλά καθορίζουν και την ένταση της μηχανικής συστολής (3, 4). Η διακίνηση των ιόντων ασβεστίου ελέγχεται από το δυναμικό της κυτταρικής μεμβράνης, που καθορίζεται από τη διακίνηση των ιόντων. Ένας πολύ περίπλοκος αλλά ακριβής συγχρονισμός στη λειτουργία των ιοντικών διαύλων προκαλεί την εκπόλωση (μεταβολή του δυναμικού της κυτταρικής μεμβράνης ώστε να επιτρέπει την είσοδο ιόντων ασβεστίου μέσα σε αυτό) και την επαναπόλωση (επαναφορά του δυναμικού της μεμβράνης) του κυττάρου (4).

Η ηλεκτροφυσιολογική μελέτη βασίζεται στην καταγραφή της εκπόλωσης από διάφορα σημεία του κοιλιακού και κοιλιακού μυοκαρδίου (3, 6). Εάν τοποθετηθεί ένα διπολικό ηλεκτρόδιο στο ενδοκάρδιο των κόλπων ή των κοιλιών, τότε καταγράφεται η διαφορά δυναμικού μεταξύ των δύο περιοχών που εφάπτονται με τους δύο πόλους. Η καταγραφή αυτή ονομάζεται ηλεκτρόγραμμα. Η ηλεκτροφυσιολογική μελέτη βασίζεται στην καταγραφή των ηλεκτρογραμμάτων καθώς και στην αξιολόγηση της ανταπόκρισης της εκπόλωσης των κόλπων και των κοιλιών σε προγραμματισμένη χορήγηση βηματοδοτικών ερεθισμάτων (3, 6). Μία βασική έννοια στην ηλεκτροφυσιολογία είναι το μονοφασικό δυναμικό ενέργειας, το οποίο ορίζεται από την καταγραφή της συνισταμένης του δυναμικού της κυτταρικής μεμβράνης από μία ομάδα κυττάρων του ενδοκαρδίου ή του επικαρδίου (3, 4).

1.2 Το μυοκάρδιο

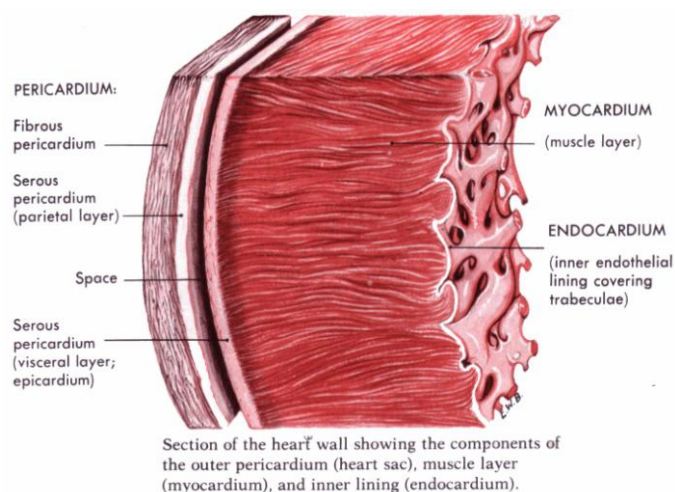
Τα τρία βασικά δομικά συστατικά της καρδιάς είναι τα μυοκαρδιακά κύτταρα, ο συνδετικός ιστός και τα αιμοφόρα αγγεία. Τα μυοκαρδιακά κύτταρα επιτελούν το κύριο έργο της καρδιάς, που είναι η μηχανική συστολή. Για αυτό, αποτελούν περίπου το 75% του συνολικού όγκου και περίπου το 50% του συνολικού βάρους του μυοκαρδίου. Τα μυοκαρδιακά κύτταρα ταξινομούνται σε κύτταρα του μυοκαρδίου των κόλπων και των κοιλιών. Εκείνα των κοιλιών ευθύνονται για το μηχανικό έργο της καρδιάς και είναι κυλινδρικά στη μορφή. Τα μυοκαρδιακά κύτταρα των κόλπων είναι πολύ μικρότερα και ελλειπτικά (Εικόνα 3, (4)). Τα βασικά δομικά

στοιχεία του μυοκαρδιακού κυττάρου είναι η κυτταρική μεμβράνη, το σαρκοενδοπλασματικό δίκτυο και οι συσταλτές πρωτεΐνες, ενώ εμφανίζουν ένα ή δύο πυρήνες στο κέντρο τους. Επίσης, τα μυοκαρδιακά κύτταρα διαθέτουν μεγάλο αριθμό μιτοχονδρίων, κατανεμημένα ανάμεσα στα μυοϊνίδια.



Εικόνα 3. Δομή μυοκαρδιακού κυττάρου (4).

Στον υπενδοκάρδιο ιστό, ανάμεσα στο ενδοκάρδιο και το μυοκάρδιο, περιέχονται ινοβλάστες, ίνες κολλαγόνου, αγγεία και νεύρα, καθώς και οι ίνες του Purkinje, που σχηματίζουν ένα πυκνό δίκτυο. Το τοίχωμα της καρδιάς αποτελείται κυρίως από τις στοιβάδες των μυοκαρδιακών κυττάρων, που απαρτίζουν το μυοκάρδιο. Το εξωτερικό του τοίχωμα, στο οποίο διέρχονται οι κύριοι κλάδοι των στεφανιαίων αγγείων και των νεύρων, καλύπτεται από το επικάρδιο, το οποίο αναδιπλώνεται στο περίτονο περικάρδιο. Το περικάρδιο περιβάλλει την καρδιά και την έκφυση των μεγάλων αγγείων και επιπλέον οι σύνδεσμοι του περικαρδίου με τους παρακείμενους ιστούς συμβάλλουν στην διατήρηση της καρδιάς στη φυσιολογική της θέση, αλλά και στην φυσιολογική της κίνηση κατά τη συστολή και διαστολή (Εικόνα 4, (4)).



Εικόνα 4. Το τοίχωμα της καρδιάς (4).

Η πολυπλοκότητα του μυοκαρδίου και ο πιθανός ρόλος της εξωκυττάριας μήτρας στη διατήρηση των μοναδικών προσανατολισμών των μυοκυττάρων σε όλο το τοίχωμα της αριστερής κοιλίας περιγράφηκαν αρχικά από τους Streeter και Basset (7). Χρησιμοποιώντας μια δομική εμβιομηχανική προσέγγιση, οι παραπάνω ερευνητές απέδειξαν ότι, ο προσανατολισμός των μυοκυττάρων, καθώς και οι γωνίες των μυοκαρδιακών ινών, χαρακτηρίζονται από εξαιρετική οργάνωση και κινούνται με ένα συνεχόμενο τρόπο από το ενδοκάρδιο προς το επικάρδιο (7). Ουσιαστικά, η εξωκυττάρια μήτρα είναι ένα δίκτυο πρωτεϊνών αποτελούμενο από πρωτεΐνες εξαιρετικής δομικής οργάνωσης και αρχιτεκτονικής (όπως κολλαγόνο τύπου I και III), παρέχοντας δομική ακεραιότητα στα γειτονικά μυοκύτταρα και συνεισφέροντας στη συνολική λειτουργία της «αντλίας» της αριστερής κοιλίας δια μέσου συντονισμού βράχυνσης αυτών των μυοκυττάρων. Έρευνες, που ακολούθησαν, έδειξαν ότι, η εξωκυττάρια μήτρα του μυοκαρδίου διατηρεί σε παράταξη τις μυϊκές ίνες ανάμεσα στα μυοκύτταρα μέσω της σχέσης collagen-cytoskeleton-myofibril. Η εξωκυττάρια μήτρα του μυοκαρδίου (ECM), εκτός από το ινώδες δίκτυο του κολλαγόνου, τη βασική (θεμέλια) μεμβράνη, τις πρωτεογλυκάνες και τις αμινογλυκάνες, περιέχει και τεράστιες ποσότητες βιοδραστικών μορίων (όπως, angiotensin II (ANG II), transforming growth factor- β (TGF- β) και endothelin (ET)-1) (8).

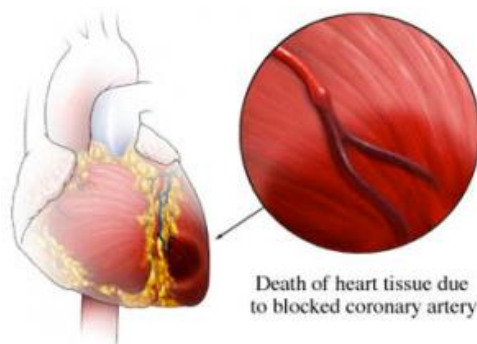
1.3 Οξύ έμφραγμα του μυοκαρδίου και θεραπείες

1.3.1 Οξύ έμφραγμα του μυοκαρδίου

Τα καρδιαγγειακά νοσήματα (cardiovascular diseases, CVD) είναι η κύρια αιτία θνησιμότητας παγκοσμίως. Σύμφωνα με τον Παγκόσμιο Οργανισμό Υγείας (World Health Organization, WHO), 17,3 εκατομμύρια θάνατοι ετησίως οφείλονται σε καρδιαγγειακά νοσήματα (5, 9, 10). Το ποσοστό αυτό αντιπροσωπεύει το 30% του συνόλου των θανάτων σε όλον τον κόσμο. Η στεφανιαία καρδιακή νόσος (coronary heart disease, ή ισχαιμική νόσος (ischemic disease)) προκαλεί το 42% όλων των καρδιαγγειακών θανάτων (9). Οι ασθενείς που επιβιώνουν από οξύ έμφραγμα του μυοκαρδίου μπορεί να αναπτύξουν καρδιακή ανεπάρκεια, η οποία μπορεί να οριστεί ως η κλινική κατάσταση που προκύπτει από την ανικανότητα της καρδιάς να αντλεί αρκετό αίμα όσο το σώμα απαιτεί (9).

Από τα παραπάνω γίνεται σαφές ότι, το έμφραγμα του μυοκαρδίου είναι από τις σημαντικότερες αιτίες θανάτου και αναπηρίας σε όλον τον κόσμο (5). Μπορεί να είναι ένα ασήμαντο γεγονός σε μια χρόνια ασθένεια, μπορεί ακόμη να παραμείνει αδιάγνωστο, αλλά μπορεί επίσης να είναι ένα καταστροφικό γεγονός που μπορεί να οδηγήσει σε σοβαρή αιμοδυναμική

διαταραχή ή ακόμη και στο θάνατο (10). Το οξύ έμφραγμα του μυοκαρδίου συγκαταλέγεται στα οξέα στεφανιαία σύνδρομα και οφείλεται σε αιφνίδια απόφραξη ενός κλάδου των στεφανιαίων αρτηριών λόγω ρήξης ή διάβρωσης της αθηρωματικής πλάκας και δημιουργίας θρόμβου, ο οποίος αποφράσσει πλήρως τη στεφανιαία αρτηρία, με αποτέλεσμα τη διακοπή της κυκλοφορίας του αίματος (Εικόνα 5, (11)) (10).



Εικόνα 5. Θρόμβωση στεφανιαίας αρτηρίας και οξύ έμφραγμα του μυοκαρδίου (11).

Αυτό έχει σαν αποτέλεσμα τη νέκρωση μιας περιοχής του μυοκαρδίου (5, 10), οδηγώντας στην εμφάνιση πόνου στο στήθος (στηθάγχη) καθώς και στην ηλεκτροκαρδιογραφική απόδειξη της ισχαιμίας (ST-segment elevation) (5). Το οξύ έμφραγμα του μυοκαρδίου χαρακτηρίζεται από την παρουσία των πολυμορφοπύρηνων λευκοκυττάρων (και γενικά κυττάρων φλεγμονής στην περιοχή) (5). Εάν το χρονικό διάστημα μεταξύ της έναρξης του εμφράγματος και του θανάτου είναι πολύ σύντομο, ελάχιστα ή καθόλου πολυμορφοπύρηνια λευκύτταρα μπορεί να υπάρχουν. Ο θάνατος των κυττάρων του μυοκαρδίου μπορεί να διαγνωστεί από την εμφάνιση στο αίμα διαφόρων πρωτεϊνών που απελευθερώνονται στην κυκλοφορία από τα κατεστραμμένα μυοκύτταρα (1, 2).

Η συχνότητα εμφάνισης του εμφράγματος στους άνδρες αυξάνεται με γρήγορο ρυθμό από την ηλικία των 40 ετών, κορυφώνεται στην ηλικία των 70 ετών και κατόπιν μειώνεται. Στις γυναίκες, αντίθετα, η αύξηση αρχίζει από την ηλικία των 55 ετών. Γενικά, είναι ευρέως αποδεκτό ότι, το οξύ έμφραγμα του μυοκαρδίου είναι μια δυνητικά θανατηφόρος πάθηση, η οποία απαιτεί όσο το δυνατόν πιο άμεση αντιμετώπιση (1, 2).

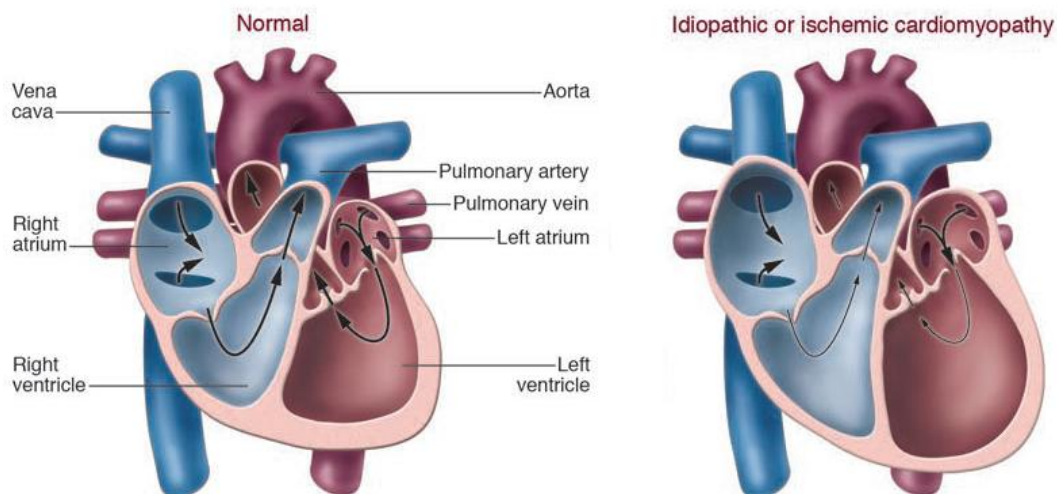
1.3.2 Ισχαιμικό μυοκάρδιο και αναδιαμόρφωση αριστερής κοιλίας (LV remodelling)

Σημαντικές αλλαγές λαμβάνουν χώρα στη δομή και στη σύνθεση της εξωκυττάριας μήτρας του μυοκαρδίου έπειτα από οξύ έμφραγμα. Η αποκατάσταση της ουλής μετά το έμφραγμα συμπεριλαμβάνει τη φλεγμονώδη φάση και τη φάση αναδιαμόρφωσης του ιστού (5, 7, 12, 13).

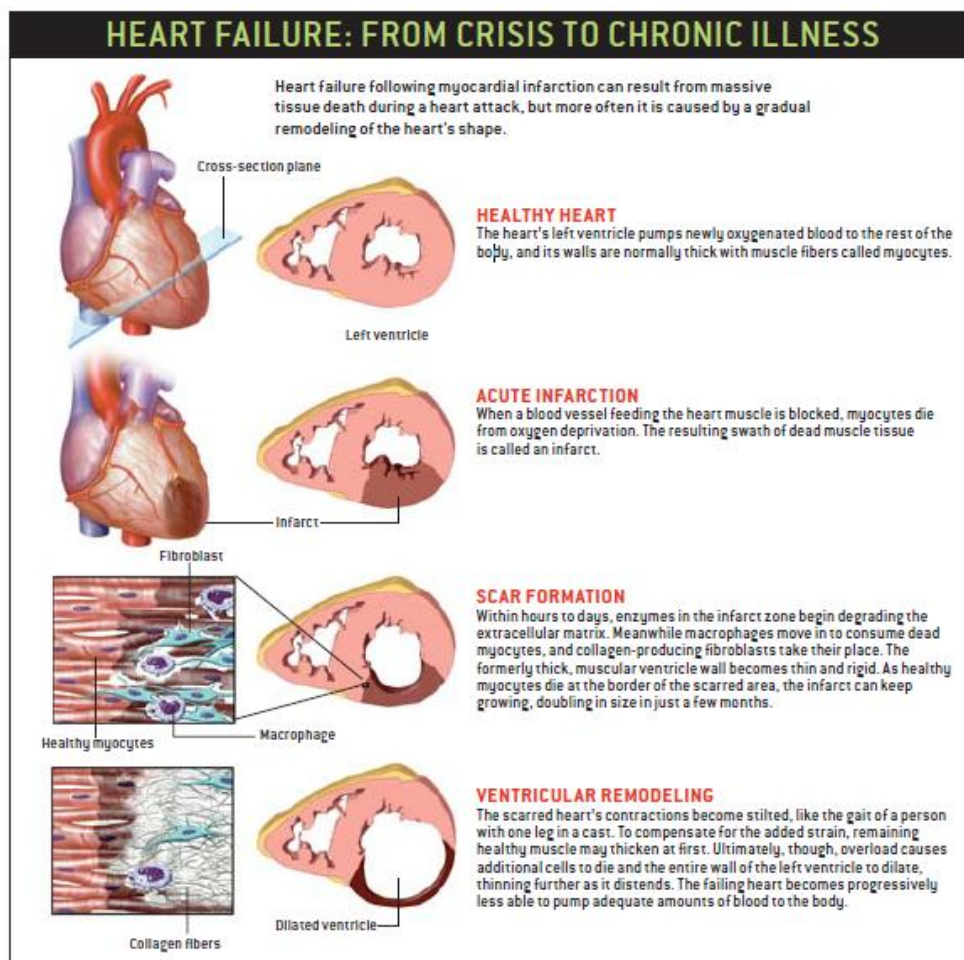
Η πρώτη φάση εκκινείται αμέσως μετά τη θρόμβωση της αριστερής στεφανιαίας αρτηρίας, με ή χωρίς επαναιμάτωση, και οδηγεί σε αποδόμηση της φυσιολογικής εξωκυττάριας μήτρας (ECM), σε εισβολή φλεγμονωδών κυττάρων στη θέση του αρχικού τραύματος και σε εμφάνιση βιοδραστικών πεπτιδίων και κυτοκινών (12). Η αποδόμηση της ECM κατά τη διάρκεια της οξείας φάσης επιτρέπει την είσοδο των φλεγμονωδών κυττάρων, που προαναφέρθηκαν, καθώς και τον πολλαπλασιασμό των μακροφάγων και ινοβλαστών, δημιουργώντας το βασικό θεμέλιο σχηματισμού της ουλής (5, 12). Σε αυτήν την πρώιμη χρονική περίοδο, η αναδιαμόρφωση και η αποδόμηση της εξωκυττάριας μήτρας της αριστερής κοιλίας σχετίζεται με την αυξημένη πιθανότητα ρήξης της. Έτσι, δυναμικές αλλαγές συμβαίνουν εντός της εξωκυττάριας μήτρας του μυοκαρδίου στα αρχικά στάδια μετά το έμφραγμα, επηρεάζοντας άμεσα τις μηχανικές ιδιότητες του μυοκαρδίου της αριστερής κοιλίας (12, 14).

Καθώς η περίοδος του εμφράγματος εξελίσσεται τις επόμενες ημέρες, παρατηρείται εισροή φλεγμονωδών κυττάρων στο τραυματισμένο μυοκάρδιο, έχοντας ως αποτέλεσμα την περαιτέρω πρωτεόλυση των πρωτεϊνών της ECM (5, 12, 13). Η τελευταία αυτή φάση αναδιαμόρφωσης μετά το έμφραγμα οδηγεί σε αλλαγές της ECM σε όλες τις περιοχές της αριστερής κοιλίας (στην περιοχή του εμφράγματος, στο ζωτικό μυοκάρδιο της διασυστολικής ζώνης και στην απομακρυσμένη περιοχή). Χάνοντας η εξωκυττάρια μήτρα την ικανότητα στήριξης, ακολουθεί η λήπτυνση του τοιχώματος της αριστερής κοιλίας (wall thinning) και η ολίσθηση των μυοκυττάρων (12). Αυτή η μη αναστρέψιμη διαδικασία αναδιαμόρφωσης αποτελεί ένα σημαντικό κλινικό πρόβλημα, το οποίο μπορεί να οδηγήσει σε διαστολή της αριστερής κοιλίας, σε διαστολική και συστολική δυσλειτουργία και σε περαιτέρω καρδιακή ανεπάρκεια. Ασθενής με καρδιακή ανεπάρκεια παρουσιάζει εμφανή διαστολή της κοιλότητας της αριστερής κοιλίας, όπως χαρακτηριστικά απεικονίζεται στην Εικόνα 6 (12). Η διαδικασία αυτή ονομάζεται αναδιαμόρφωση της αριστερής κοιλίας (LV Remodelling) (5, 12).

Η ευνοϊκή, για τον ασθενή, αναδιαμόρφωση οδηγεί σε μεταβολή του γεωμετρικού σχήματος και του πάχους των τοιχωμάτων της αριστερής κοιλίας, ώστε να διασφαλιστεί φυσιολογική καρδιακή παροχή χωρίς να εμφανιστεί διάταση της αριστερής κοιλίας και καρδιακή ανεπάρκεια. Η μη ευνοϊκή αναδιαμόρφωση αφορά στη λήπτυνση της εμφραγματικής περιοχής με δημιουργία δυσκινησίας και παράλληλη διάταση της μη εμφραγματικής περιοχής. Το αποτέλεσμα είναι η μεταβολή του γεωμετρικού σχήματος και η συνολική διάταση της αριστερής κοιλίας, που οδηγούν τελικά σε ανάπτυξη καρδιακής ανεπάρκειας (Εικόνα 7, (13)) (5, 13, 15).



Εικόνα 6. Σχηματική αναπαράσταση των αλλαγών των καρδιακών κοιλοτήτων έπειτα από καρδιακή ανεπάρκεια. Σύγκριση μιας φυσιολογικής καρδιάς (αριστερά) με μία παθολογική (δεξιά) (12).

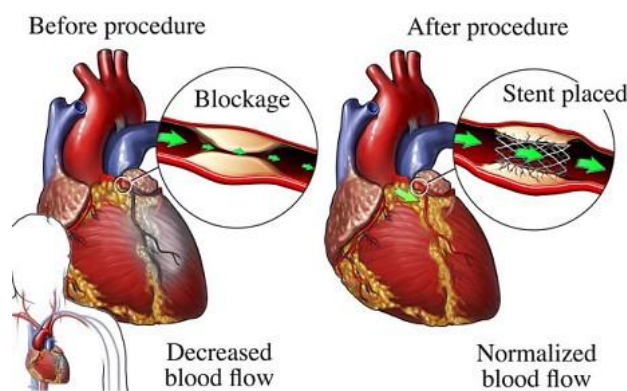


Εικόνα 7. Αναδιαμόρφωση αριστερής κοιλίας μετά από οξύ έμφραγμα του μυοκαρδίου (13).

1.3.3 Θεραπείες εμφράγματος μυοκαρδίου

Είναι απολύτως ξεκάθαρο ότι, η άμεση διάνοιξη της αποφραγμένης στεφανιαίας αρτηρίας, της υπεύθυνης για το Οξύ Έμφραγμα του Μυοκαρδίου (ΟΕΜ), είναι το κλειδί της κλινικής εξέλιξης του ασθενούς. Η θρομβολυτική θεραπεία υπήρξε η πρώτη δραστική θεραπεία η οποία μείωσε τη θνητότητα στο ΟΕΜ. Ο χρόνος από την εκδήλωση των συμπτωμάτων του ΟΕΜ μέχρι την έναρξη της θεραπείας είναι πολύτιμος για την έκβαση των ασθενών (1). Στο οξύ έμφραγμα του μυοκαρδίου, η θρομβολυτική θεραπεία χρησιμοποιείται πλέον μόνο στις περιπτώσεις που δεν υπάρχει αντένδειξη (όπως πρόσφατης αιμορραγίας) και όταν δεν υπάρχει η δυνατότητα πρωτογενούς αγγειοπλαστικής (primary Percutaneous Coronary Intervention) εντός 2 ωρών από τη στιγμή της διάγνωσης (1).

Η αγγειοπλαστική, που είναι μια μέθοδος επαναιμάτωσης του μυοκαρδίου, εφαρμόστηκε για πρώτη φορά σε άνθρωπο στην Ελβετία το 1977 από τον A. Gruentzing. Η αγγειοπλαστική των στεφανιαίων αρτηριών είναι μια μη χειρουργική επέμβαση που αποσκοπεί στην διάνοιξη των στενωμένων ή αποφραγμένων στεφανιαίων αρτηριών (1, 2). Η αγγειοπλαστική των στεφανιαίων αρτηριών μπορεί να γίνει με απλή διάνοιξη της στεφανιαίας αρτηρίας που εμφανίζει στένωση με μπαλόνι ή και να συνοδευθεί από τοποθέτηση στεφανιαίας πρόθεσης (stent) (Εικόνα 8). Στην επέμβαση αγγειοπλαστικής με μπαλόνι χρησιμοποιείται ένας κάθετηρας που έχει στο άκρο του ένα μπαλόνι ώστε να ανοίξει την αποφραγμένη στεφανιαία αρτηρία. Η μεταλλική πρόθεση (stent) είναι ένας μικρός μεταλλικός σωληνίσκος με διάκενα που τοποθετείται στο σημείο της στένωσης της στεφανιαίας αρτηρίας, μετά από προηγούμενη διάνοιξη με μπαλόνι (αγγειοπλαστική με τοποθέτηση μεταλλικής πρόθεσης) για να κρατήσει την αρτηρία ανοιχτή (1, 2). Η μεταλλική πρόθεση είναι τοποθετημένη σε ένα καθετήρα μπαλόνι και με τη βοήθεια ακτίνων Χ, τοποθετείται στο σημείο της στένωσης της στεφανιαίας αρτηρίας (1, 2).



Εικόνα 8. Αγγειοπλαστική με μεταλλική πρόθεση (stent) (16).

Το μπαλόνι διατείνεται και οδηγεί στη διάνοιξη της μεταλλικής πρόθεσης που έρχεται σε επαφή με το τοίχωμα της αρτηρίας. Γίνεται έλεγχος με τη χρήση ακτίνων Χ ώστε να εκτιμηθεί το αποτέλεσμα της διάνοιξης και της μεταλλικής πρόθεσης. Το μπαλόνι μπορεί να διαταθεί αρκετές φορές έως ότου να εξασφαλισθεί ότι η μεταλλική πρόθεση έχει σωστά τοποθετηθεί και διαταθεί στο σημείο της στένωσης. Η μεταλλική πρόθεση παραμένει στο σημείο της στένωσης κρατώντας ανοιχτή την αρτηρία. Μετά την επέμβαση γίνεται σύγκλειση του σημείου εισόδου του καθετήρα με τη βοήθεια διαφόρων ουσιών (όπως του κολλαγόνου) ή ραμμάτων.

Στο οξύ έμφραγμα του μυοκαρδίου, η θρομβολυτική θεραπεία, όπως αποδείχθηκε από πολλές κλινικές μελέτες, δεν είναι αποτελεσματική. Αντίθετα, μπορεί να είναι και επικίνδυνη, διότι ελλοχεύει ο κίνδυνος θανάτου ή νέου εμφράγματος. Η αορτοστεφανιαία παράκαμψη (bypass), είναι το πιο σύνηθες χειρουργείο καρδιάς που γίνεται σήμερα. Είναι δοκιμασμένο στο χρόνο και εξαιρετικά ασφαλές και αποτελεσματικό. Ο σκοπός του χειρουργείου είναι να παρακάμψει τα σημεία των στεφανιαίων που παρουσιάζουν στένωση για την καλύτερη επαναιμάτωση του καρδιακού μυός. Η παράκαμψη επιτυγχάνεται με τη συρραφή ενός μοσχεύματος μεταξύ της αορτής και των νοσούντων αρτηριών, λίγο πιο κάτω από το αποφραγμένο σημείο. Η αλματώδης εξέλιξη της τεχνολογίας, οι καινούργιες τεχνικές (πάλλουσα καρδιά, κλπ), τα σύγχρονα φάρμακα και η επιδεξιότητα του χειρουργού καθιστούν τα χειρουργεία αορτοστεφανιαίας παράκαμψης εξαιρετικά αξιόπιστα και ασφαλή. Η εγχείρηση της επαναιμάτωσης του μυοκαρδίου φέρει κίνδυνο 1-2% για την πλειονότητα των ασθενών, ενώ για τις βαρύτερες περιπτώσεις, όπως όταν το μυοκάρδιο έχει υποστεί σημαντική βλάβη από προηγούμενα εμφράγματα, είναι υψηλότερο [1, 7, 15].

1.4 Αναγέννηση μυοκαρδίου και ιστοτεχνολογία

1.4.1 Γενικά

Για πολλές δεκαετίες, ήταν παραδεκτό ότι, η καρδιά αποτελούνταν από κύτταρα σε τελικό στάδιο διαφοροποίησης και επομένως θεωρούνταν «ανίκανη» να αναγεννηθεί μόνη της (17, 18). Παρόλα αυτά, πρόσφατα νέα δεδομένα έχουν αλλάξει αυτήν την οπτική, παρέχοντας βάσιμες ενδείξεις ότι νέα καρδιομυοκύτταρα μπορούν να σχηματιστούν σε ενήλικη ανθρώπινη καρδιά. Δύο κύριοι μηχανισμοί μπορούν να συμβάλλουν στην ενδογενή αναγέννηση του μυοκαρδίου. Σύμφωνα με τον πρώτο μηχανισμό, ενήλικα καρδιομυοκύτταρα ξανά εισέρχονται στον κυτταρικό κύκλο και διαιρούνται. Αυτός ο τρόπος αναγέννησης των μυοκυττάρων αντιπροσωπεύει ένα «αρχαίο» πρόγραμμα αναγέννησης της καρδιάς αμφίβιων και ψαριών. Για παράδειγμα, αποδιαφοροποίηση και πολλαπλασιασμός των καρδιομυοκυττάρων είναι ο κύριος μηχανισμός αναγέννησης της καρδιάς των zebrafish σε σχέση με τη διαφοροποίηση από cardiac progenitors ή βλαστοκύτταρα (19, 20).

Κατά τη διάρκεια των περασμένων δεκαετιών, η ιδέα της έγχυσης βιώσιμων κυττάρων απευθείας στο μυοκάρδιο είχε αναδυθεί (19, 20). Αυτή η θεραπευτική στρατηγική έχει σκοπό να βελτιώσει την απόδοση της εμφραγματικής περιοχής του μυοκαρδίου αυξάνοντας τον αριθμό των λειτουργικών καρδιομυοκυττάρων. Μέχρι σήμερα, διάφορες επιτυχίες έχουν σημειωθεί κατά τη χρήση αυτής της θεραπείας. Η κυτταρική μεταμόσχευση (cellular transplantation) ως θεραπεία της καρδιομυοπάθειας, στην καλύτερη περίπτωση, έχει μέτρια αποτελέσματα (19, 20). Ο λόγος της περιορισμένης επιτυχίας της θεραπείας αυτής είναι τριπλός:

1. Η έλλειψη πηγής ανθρώπινων καρδιομυοκυττάρων.
2. Η περιορισμένη ενσωμάτωση των μεταμοσχευμένων κυττάρων στο μυοκαρδιακό ιστό. Στην πραγματικότητα, τα εμφυτευμένα κύτταρα είναι επιρρεπή στη δημιουργία συμπλεγμάτων με τον ουλώδη ιστό με τυχαίο προσανατολισμό, μετριάζοντας, έτσι, το αναμενόμενο συσταλτικό όφελος.
3. Το υψηλό ποσοστό κυτταρικού θανάτου μετά από τη μεταμόσχευση.

Από τα παραπάνω συνάγεται ότι, υπάρχει πολύ μεγάλο ενδιαφέρον για περαιτέρω μελέτη και έρευνα ώστε να αναπτυχθούν νέες και πιο βελτιωμένες θεραπείες στην κατεύθυνση αυτή. Μια πολλά υποσχόμενη, και συνεπώς ελπιδοφόρα, προσέγγιση της θεραπείας της καρδιομυοπάθειας είναι μέσω προσεγγίσεων της ιστοτεχνολογίας (tissue engineering). Με τον όρο ιστοτεχνολογία (ή μηχανική των ιστών, ή ιστική μηχανική, όπως

μπορεί να αποδοθεί διαφορετικά ο όρος της Αγγλικής) ορίζεται η τεχνική που θα πείσει τον οργανισμό να αυτοθεραπευτεί μέσω παροχής στην τραυματισμένη περιοχή κατάλληλων δομών υποστήριξης, κυττάρων και μοριακών ερεθισμάτων (21, 22). Με άλλα λόγια, η ιστοτεχνολογία προσπαθεί να εκμαιεύσει και την πιο ελάχιστη, αν υπάρχει, δυνατότητα του οργανισμού προκειμένου να αναγεννηθεί μόνος του και αυθόρμητα (αυτό, δηλαδή, που ορίζεται ως αναγεννητική ιατρική, *regenerative medicine*, όπως λέγεται στα Αγγλικά), και τελικά να θεραπευτεί. Στον όρο «παροχή» συμπεριλαμβάνονται και τα συστήματα ελεγχόμενης και στοχευμένης παροχής φαρμάκων (*drug delivery systems*).

Γενικά, ο όρος ιστοτεχνολογία είναι άμεσα συνυφασμένος με το σχεδιασμό και την κατασκευή ενός ικριώματος (*scaffold*), το οποίο μπορεί να αποτελείται από φυσικά ή συνθετικά υλικά. Αυτά τα υλικά πρέπει να υποκαταστήσουν την εξωκυττάρια μήτρα του κολλαγόνου (*extracellular collagen matrix*) και επίσης να έχουν την ικανότητα να ενισχύσουν τη φυσική ίαση (*natural healing response*) (20). Έτσι, τα βιοϋλικά των ικριωμάτων επιλέγονται και σχεδιάζονται με τέτοιο τρόπο ώστε να μπορούν να αποτελέσουν το μέσο το οποίο θα διατηρεί και θα ελέγχει την τοπική διαχείριση των μορίων και των κυττάρων που συμμετέχουν, άμεσα ή έμμεσα, στην ίαση. Υπό αυτήν την προσέγγιση, τόσο η πρόληψη, όσο και η θεραπεία της αναδιαμόρφωσης της αριστερής κοιλίας (*left ventricular remodelling*) μέσω της προσέγγισης της ιστοτεχνολογίας πρέπει να περιλαμβάνει τη χρήση ικριωμάτων. Αυτός ακριβώς είναι και ο στόχος της παρούσας διατριβής, δηλαδή ο σχεδιασμός και η ανάπτυξη τέτοιων ικριωμάτων. Από προηγούμενες έρευνες έχουν προκύψει ενθαρρυντικά αποτελέσματα με τη χρήση βιοϋλικών για τη θεραπεία μετά το έμφραγμα του μυοκαρδίου (19, 21-25).

Με τον όρο βιοϋλικά ορίζονται μη-ζωντανά υλικά που μπορούν να αντικαταστήσουν τμήματα ή λειτουργίες του οργανισμού με τρόπο ασφαλή, αξιόπιστο, οικονομικό και φυσιολογικά αποδεκτό. Έτσι, τα βιοϋλικά μπορούν να αντικαταστήσουν πλήρως ή να υποκαταστήσουν μερικά ή ολικά τον ιστό ενός οργανισμού και να είναι είτε ισοβίως, ή περιοδικά, ή μόνο για κάποιο χρονικό διάστημα εάν διαλυθούν (π.χ. τα απορροφήσιμα βιοϋλικά) σε επαφή με τα υγρά και τους ιστούς του σώματος. Συνεπώς, η κατασκευή ενός βιοϋλικού, ως βάση του ικριώματος, είναι εξέχουσας σημασίας στην ιστοτεχνολογία. Στο ικριώμα του βιοϋλικού, στη συνέχεια, μπορεί να προσδεθούν φάρμακα, αυξητικοί παράγοντες, κύτταρα ή και ολόκληροι ιστοί, και το συνολικό αυτό ολοκληρωμένο ικριώμα μπορεί, είτε να αναπτυχθεί μέσα σε έναν βιοαντιδραστήρα, στην πιο απλή προσέγγιση μέσα σε ένα τρυβλίο, είτε να αναπτυχθεί *in situ* μέσα στο σώμα, μετά την εμφύτευση (19, 21-25).

Ο κοινός παρονομαστής σε όλες τις παραπάνω προσεγγίσεις είναι ότι τα βιοϋλικά διαφέρουν από τις άλλες κατηγορίες των υλικών επειδή πρέπει να

πληρούν και τα εξειδικευμένα κριτήρια της βιοσυμβατότητας (9, 26). Με απλά λόγια, οι όροι βιοϋλικά και βιοσυμβατότητα είναι αλληλένδετοι και ο ένας συμπληρώνει τον άλλο. Με τον όρο βιοσυμβατότητα ορίζεται η ικανότητα ενός υλικού να προκαλεί την κατάλληλη απόκριση του ξενιστή σε συγκεκριμένη εφαρμογή (Williams, 1987). Είναι προφανές ότι, αν και έχουν περάσει πολλά χρόνια από τότε που διατυπώθηκε ο ορισμός αυτός, και ουσιαστικά διατυπώθηκε ώστε να δώσει, για την εποχή εκείνη, το καινοτόμο στίγμα ότι ένα βιοϋλικό δεν πρέπει απλώς να είναι μη τοξικό και βιοαποδεκτό, αλλά και βιοενεργό, δηλαδή να συμμετέχει ενεργά στη διαδικασία της ίασης και να προάγει ακόμα περισσότερο και να κατευθύνει προς τη σωστή κατεύθυνση την ίαση, ο ορισμός του Williams βρίσκει την πραγματική του απόδοση στην ιστοτεχνολογία.

Είναι προφανές ότι, σε σχέση με άλλα υλικά που χρησιμοποιούνται σε άλλες εφαρμογές, τα βιοϋλικά έχουν το φαινομενικό πλεονέκτημα ότι, επειδή η θερμοκρασία του ανθρώπινου σώματος (~37°C) είναι σχετικά χαμηλή, δεν υπάρχει μεγάλη κόπωση του υλικού ή αλλοίωσή του από θερμική καταπόνηση (ίσως εξαίρεση αποτελούν τα οδοντικά εμφυτεύματα, αλλά και στην περίπτωση αυτή, οι διαφορές θερμοκρασίας που υπάρχουν στο στόμα, π.χ. ανάμεσα στη θερμοκρασία ενός ζεστού ροφήματος και ενός παγωμένου αναψυκτικού, δεν είναι τόσο μεγάλες, όπως, για παράδειγμα, σε ένα κοπτικό εργαλείο, ή στο πιστόνι μίας μηχανής εσωτερικής καύσης, ή στο πτερύγιο μίας τουρμπίνας). Ωστόσο, ο συνδυασμός της θερμοκρασίας με το πολύ δραστικό χημικό περιβάλλον του ανθρώπινου οργανισμού μπορεί, υπό προϋποθέσεις, να καταστεί ιδιαίτερα ισχυρός για την αλλοίωση και αποικοδόμησή ενός βιοϋλικού μετά την εμφύτευσή του στο σώμα. Έτσι, γίνεται σαφές ότι, σε όλες τις περιπτώσεις των βιοϋλικών, ο πιο σημαντικός στόχος, η πιο σημαντική τεχνολογική πρόκληση στην τεχνολογία των υλικών, είναι η επίτευξη της μεγαλύτερης δυνατής διάρκειας ζωής του υλικού και συγχρόνως η καλή βιοσυμβατότητά του με τον οργανισμό του ασθενή, έτσι ώστε να αποφεύγονται τυχόν επιπλοκές (26).

Επειδή ακόμα δεν έχει λυθεί το πρόβλημα του χρόνου ζωής των βιοϋλικών, ώστε αυτά να μπορούν να διασφαλίζουν ισόβια λειτουργία τους στο σώμα, η ιδέα της ιστοτεχνολογίας, όπου το βιοϋλικό στο ικρίωμα κάποια στιγμή θα αποδομηθεί μόνο του στο σώμα και θα παραδώσει τη σκυτάλη της ίασης ολοκληρωτικά στον οργανισμό, λύνει το πρόβλημα της μακροβιότητας των βιοϋλικών και πιο πολύ το ανάγει στο να βρεθεί, για κάθε συγκεκριμένη εφαρμογή, το σωστό λειτουργικά και ουσιαστικά έξυπνο υλικό που θα ικανοποιεί τις συγκεκριμένες απαιτήσεις της εφαρμογής για την οποία προορίζεται. Έτσι, μερικά γενικά χαρακτηριστικά ενός βιοϋλικού το οποίο προορίζεται να χρησιμοποιηθεί για την κατασκευή ικριωμάτων της ιστοτεχνολογίας, τα οποία μπορούν να πιστοποιηθούν πριν την εφαρμογή του υλικού ως εμφύτευμα ή γενικότερα πριν την άμεση

επαφή του με το ανθρώπινο σώμα, μπορούν να σκιαγραφηθούν ως ακολούθως (26):

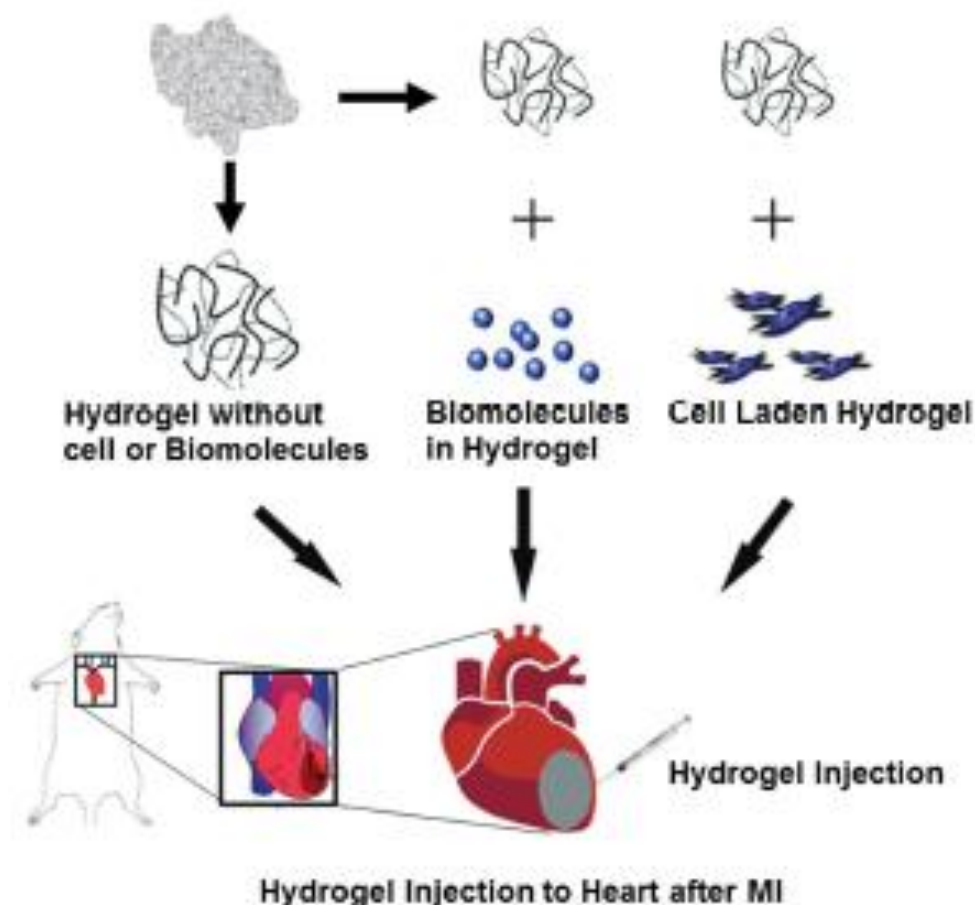
- Να μην είναι τοξικό, ή καρκινογόνο, ή να επηρεάζει το γενετικό υλικό και να προκαλεί τερατογενέσεις.
- Να έχει υψηλή μηχανική αντοχή, έτσι ώστε να μπορεί να υποστηρίξει τις μηχανικές απαιτήσεις ή/και τις επαναλαμβανόμενες κυκλικές φορτίσεις που δέχεται κατά τη χρήση του όταν εμφυτευτεί.
- Να είναι πολύ ανθεκτικό στη διάβρωση στο δραστικό περιβάλλον του ανθρώπινου σώματος.
- Να έχει ελεγχόμενη, ανάλογα με την εφαρμογή, ικανότητα βιοδιάσπασης και τα συστατικά του να μπορούν να αποβληθούν από το σώμα μέσω των μεταβολικών οδών.
- Να μπορεί να μορφοποιηθεί εύκολα και με ακρίβεια, ώστε να μπορεί εύκολα να διαμορφωθεί στο επιθυμητό σχήμα και μέγεθος για την εφαρμογή που προορίζεται, από το χειρουργό, ανάλογα με τις ανάγκες του κάθε ασθενούς.
- Να έχει κατάλληλη μικροδομή, η οποία να μπορεί να φιλοξενήσει δομές κυττάρων και ιστών, ή να διασφαλίζει ότι μπορεί έρθει σε αρμονική άμεση επαφή μαζί τους.
- Να είναι υπερυψηλής καθαρότητας, συμπεριλαμβανομένης και της αποστείρωσης, να μην περιέχει ακαθαρσίες, ή κάθε είδους ανεπιθύμητες προσμίξεις.
- Να είναι εύκολα διαθέσιμο και να μην έχει υψηλό κόστος παραγωγής και πώλησης. Αυτό είναι σημαντικό και σημειώνεται ιδιαίτερα εδώ, γιατί τα βιοϋλικά και τα εμφυτεύματα της ιστοτεχνολογίας, όπως κάθε βιοϊατρική συσκευή, φάρμακο και θεραπεία, έχουν αποκλειστικό και ξεκάθαρο ανθρωποκεντρικό χαρακτήρα, συνεπώς απευθύνονται (και πρέπει να εφαρμόζονται) σε όλον τον κόσμο, όλη την ανθρωπότητα, ανεξάρτητα από την οικονομική ευρωστία των ασθενών ή οποιονδήποτε άλλων κοινωνικών χαρακτηριστικών και γνωρισμάτων.

Τα παραπάνω μπορούν να υιοθετηθούν και για την κατασκευή ικριώματος της ιστοτεχνολογίας με σκοπό τη χρήση του στη θεραπεία του εμφράγματος του μυοκαρδίου, που αποτελεί το αντικείμενο μελέτης στην παρούσα διατριβή.

1.4.2 Στρατηγική ανάπτυξης ικριωμάτων της ιστοτεχνολογίας για τη θεραπεία αναδιαμόρφωσης της αριστερής κοιλίας μετά από οξύ έμφραγμα

Τα ικριώματα της ιστοτεχνολογίας παρέχουν ελπιδοφόρες υποσχέσεις για την αποτελεσματική αποκατάσταση της καρδιακής λειτουργίας μετά από οξύ έμφραγμα (27, 28). Όμως, μέχρι στιγμής, τα διαθέσιμα συνθετικά υλικά για το σκοπό αυτό είναι αδρανή, δύσκαμπτα και ασβεστοποιούνται. Έτσι, λόγω της κατάρρευσής τους ή της δημιουργίας θρόμβωσης, συχνά απαιτείται νέα επέμβαση για την απομάκρυνση του παλιού και την τοποθέτησή νέου υλικού (27). Αυτό ακριβώς τονίστηκε και στην προηγούμενη ενότητα σχετικά με το μεγάλο πρόβλημα του μικρού χρόνου ζωής και της ασφαλούς λειτουργίας των βιοϋλικών στο σώμα. Ένα άλλο πρόβλημα των κλασικών συνθετικών και μη αποικοδομήσιμων βιοϋλικών, όπως αυτά που εφαρμόζονται στη θεραπεία του μυοκαρδίου, είναι ότι δεν μπορούν να αυξομειώσουν τις διαστάσεις τους. Αυτό είναι προφανές τόσο στα βρέφη και στα παιδιά, τα οποία μεγαλώνουν, όμοια και η καρδιά τους, όσο και στους ηλικιωμένους, όπου, με την πρόοδο της ηλικίας τους, γίνεται συρρίκνωση και σμίκρυνση της καρδιάς.

Έτσι, σε συνδυασμό και με τις εξελίξεις στον τομέα της κυτταρικής βιολογίας, η ιστοτεχνολογία του μυοκαρδίου αναδεικνύεται ως μία στρατηγική συνδυασμού ενός βιοοικοδομήσιμου ικριώματος (υλικού) και κυττάρων, η οποία θα μπορεί να παρέχει μια αναγεννητική προσέγγιση, στοχεύοντας στην πλήρη αποκατάσταση του μυοκαρδιακού ιστού (8, 27). Η συνθετική αυτή μήτρα θα πρέπει να παρέχει μηχανική υποστήριξη στην αριστερή κοιλία, προκειμένου να περιορίσει τη διάτασή της και την περαιτέρω αναδιαμόρφωσή της μετά το έμφραγμα (8, 29). Επιπλέον, θα πρέπει να παρέχει ένα ευνοϊκό περιβάλλον για να μεταμοσχευθούν κύτταρα υποστηρίζοντας και ενισχύοντας, έτσι, την επιβίωση και την ανάπτυξη, τον πολλαπλασιασμό και τη διαφοροποίηση αυτών των κυττάρων (30). Η συνθετική μήτρα, για να υποστηρίξει όλες τις παραπάνω λειτουργίες *in vivo*, θα πρέπει να έχει κατάλληλα δομικά χαρακτηριστικά και κατάλληλες φυσικές και μηχανικές ιδιότητες που να ομοιάζουν με αυτές της καρδιάς. Επίσης, τα ικριώματα πρέπει να ενισχύουν την ενδοανάπτυξη και αγγείωση των κυττάρων ξενιστών καθώς και την ηλεκτρο-μηχανική σύζευξη με τον ιστό της κοιλίας. Η Εικόνα 9 απεικονίζει τις κύριες στρατηγικές της ιστοτεχνολογίας του μυοκαρδίου, όπου φαίνεται ξεκάθαρα ο σπουδαίος ρόλος ύπαρξης του βιοϋλικού (27).



Εικόνα 9. Στρατηγικές ιστοτεχνολογίας μυοκαρδίου (31).

1.4.3 Βιοϋλικά ικριωμάτων της ιστοτεχνολογίας για τη θεραπεία του εμφράγματος του μυοκαρδίου

Πολυμερικά υλικά χρησιμοποιούνται κυρίως για τη σύνθεση ικριώματος και μπορούν να κατηγοριοποιηθούν ανάλογα με την πηγή προέλευσής τους και τη χημική δομή τους (πεπτίδια/πρωτεΐνες, πολυσακχαρίτες, πολυεστέρες, κτλ.) (23).

Τα φυσικά πολυμερή είναι συνήθως βιοσυμβατά και εύκολα τροποποιήσιμα ως προς τη χημική τους δομή. Τα περισσότερα από αυτά (όπως το κολλαγόνο), παρέχουν δομές και διαμορφώσης αναγνώρισης των κυττάρων διεγείροντας έτσι την κυτταρική απόκριση και προσκόλληση. Παρόλα αυτά υπάρχουν ενδοιασμοί για χρήση τους στη θεραπεία ασθενών λόγω του κινδύνου μεταφοράς παθογόνων μικροοργανισμών αλλά και της «απόρριψης» τους λόγω του ότι προέρχονται από ζωικές ή πτωματικές πηγές (32). Τα συνθετικά πολυμερή μπορούν να σχεδιαστούν με πολλές επιθυμητές ιδιότητες, όπως μηχανική αντοχή και ιδανικό ρυθμό βιοαποικοδόμησης, αλλά και να τροποποιηθούν εύκολα με λειτουργικές ομάδες. Το βασικό αρνητικό χαρακτηριστικό τους είναι η έλλειψη

βιολογικών ερεθισμάτων για την ενίσχυση της κυτταρικής βιωσιμότητας και απόκρισης (23).

Τα πιο βασικά *φυσικά πολυμερή* είναι τα ακόλουθα.

Κολλαγόνο

Από τις φυσικές πρωτεΐνες, το πιο γνωστό πολυμερές είναι το κολλαγόνο (collagen) (5, 33). Το κολλαγόνο είναι μία από τις κύριες ενώσεις της εξωκυττάρια μήτρα (ECM) σε όλα τα ζωτικά όργανα. Η ECM του μυοκαρδίου αποτελείται κυρίως από κολλαγόνο (34) με μικρότερες ποσότητες λαμινίνης (lamine), ινονεκτίνης (fibronectin) και ελαστίνης (elastin). Η ECM παρέχει δομική και λειτουργική ακεραιότητα και συμβάλλει στη συντονισμένη μηχανική υποστήριξη της καρδιακής λειτουργίας. Δύο κύριοι τύποι κολλαγόνου απαντώνται στην καρδιά, το κολλαγόνο τύπου I και τύπου III (5, 27). Έπειτα από ισχαιμία, η ισορροπία αυτών των δύο τύπων κολλαγόνου μεταβάλλεται. Η σχετική ποσότητα του κολλαγόνου I μειώνεται, ενώ στο σύνολο υπάρχει αυξημένη εναπόθεση κολλαγόνου ή παθολογική ίνωση (34). Η ίνωση συνεισφέρει στη δυσμενή αναδιαμόρφωση, μετά το έμφραγμα. Αυτό τονίζει το σημαντικό ρόλο του κολλαγόνου στην κανονική λειτουργία και δραστηριότητα της καρδιάς (27).

Προσχηματισμένο πορώδες στεγνό κολλαγόνο (preperformed porous collagen) χρησιμοποιείται ήδη εδώ και 30 χρόνια σε κλινική εφαρμογή, ως υλικό αιμόστασης σε τραυματισμένους ιστούς βοηθώντας στην αποφυγή αιμοραγίας (35). Ο Κοφίδης και οι συνεργάτες του το 2002 πρώτη φορά καλλιέργησαν καρδιακά κύτταρα νεογέννητων επίμυων σε μήτρα κολλαγόνου, παρουσιάζοντας έναν τεχνητό ιστό *in vitro* (36). Όταν το ικρίωμα μεταμοσχεύθηκε στην επιφάνεια επικαρδίου εμφραγματικής καρδιάς επίμυων, προκλήθηκε νεοαγγείωση και μείωση της διάτασης της αριστερής κοιλίας. Επίσης, ενισχύοντας το ικρίωμα με granulocyte-colony stimulating factor (G-CSF), παρατηρήθηκε αυξημένη αγγείωση, πιθανώς λόγω της αυξημένης κινητοποίησης των βλαστοκυττάρων και παλιννόστησης του εμφραγματικού μυοκαρδίου (37). Η κλινική δοκιμή αυτού του ικριώματος έγινε σε μία μικρή ομάδα ασθενών με χρόνια ουλή, έχοντας EF<35% και με προηγούμενη αορτοστεφανιαία παράκαμψη. Δέκα ασθενείς έλαβαν άμεση έγχυση των μονοπύρηνων κυττάρων του μυελού των οστών και δέκα ασθενείς έλαβαν κύτταρα «εγκλωβισμένα» σε ικρίωμα διαστάσεων $7 \times 5 \times 0,6 \text{ cm}^3$ ράβοντάς το πάνω στη ζώνη του εμφράγματος. Μετά από ενός έτους παρακολούθηση ($10 \pm 3,5$ μήνες), δεν αναφέρθηκαν ανεπιθύμητες ενέργειες, υποδηλώνοντας την ασφάλεια της θεραπείας. Θα μπορούσε όμως, επιπλέον, να είχε παρατηρηθεί αυξημένο EF, μείωση τελοδιαστολικού όγκου αριστερής κοιλίας και μειωμένο πάχος στην περιοχή της ουλής (38). Αν και πολλά υποσχόμενη, η θεραπεία αυτή χρειάζεται περαιτέρω μελέτες με σκοπό την αξιολόγηση της βελτίωσης με

χρήση αποκλειστικά του ικριώματος και όχι λόγω ύπαρξης της αορτοστεφανιαίας παράκαμψης. Περαιτέρω τροποποιήσεις αυτού του προσχηματισμένου ικριώματος με βάση το κολλαγόνο μελετήθηκαν και από τον Schussler και την ομάδα του. Συγκεκριμένα, προχώρησαν σε πρόσδεση του πεπτιδίου RGD στο κολλαγόνο ώστε να αυξήσει τη βιωσιμότητα και τη διαφοροποίηση των καρδιομυοκυττάρων με αξιόλογα αποτελέσματα (39).

Το κολλαγόνο μπορεί, επίσης, να χρησιμοποιηθεί και σε υγρή μορφή, έχοντας το πλεονέκτημα ότι τα κύτταρα είναι πιο ομοιογενή κατανεμημένα σε σχέση με το προσχηματισμένο ικρίωμα (pre-performed scaffold). Η εύκολη ζελατινοποίηση σε φυσιολογική θερμοκρασία και η δυνατότητα συνδυασμού με άλλα υδροπηκτώματα είναι ελκυστικά χαρακτηριστικά του υλικού.

Υαλουρονικό οξύ

Ένα άλλο συστατικό της φυσικής ECM είναι το υαλουρονικό οξύ (HA), που είναι ένας υψηλού μοριακού βάρους γραμμικός πολυσακχαρίτης. Το HA ρυθμίζει διαφορετικές φυσιολογικές διεργασίες, αλληλεπιδρώντας με άλλα συστατικά της ECM, όπως τις πρωτεογλυκάνες (24). Με τον τρόπο αυτό διατηρεί την ενυδάτωση, υποστηρίζοντας τις εμβιομηχανικές ιδιότητες του ιστού. Από την άλλη μεριά, το HA μπορεί να δεσμεύει τις κυτταρικές επιφάνειες και μπορεί επίσης να ρυθμίσει την προσκόλληση των κυττάρων, τη μετανάστευση, τον πολλαπλασιασμό, τη φλεγμονή και την απόκριση επούλωσης των τραυμάτων. Οι Ventura κ.συν. ανέπτυξαν ένα μίγμα υαλουρονικού εστέρα (hyaluronan ester) με βουτυρικό (butyric) και ρετινοϊκό (retinoic) οξύ και τόνισαν την πιθανότητα ενίσχυσης της καρδιακής διαφοροποίησης ανθρώπινων μεσεγχυματικών βλαστοκυττάρων. Όταν αυτό το ικρίωμα εμφυτεύθηκε σε εμφραγματική καρδιά, η καρδιακή λειτουργία βελτιώθηκε σε σύγκριση με απλή έγχυση PBS (24).

Νανο-ίνες

Η χρήση νανοϊνών (nanofibers) αυτοοργανωμένων πεπτιδίων στην ιστοτεχνολογία του μυοκαρδίου είναι ευρέως γνωστή στην επιστημονική κοινότητα. Τα αυτοοργανωμένα πεπτίδια αποτελούνται από «μικρά» πεπτίδια, τα οποία αυτοοργανώνονται σε φυσιολογικό pH σε τριδιάστατη δομή. Η μετάβαση αυτή, υπό φυσιολογικό pH, κάνει αυτήν την προσέγγιση ιδιαίτερα ελκυστική διότι το βιοϋλικό έχει τη δυνατότητα ενέσιμης εμφύτευσης. Δηλαδή, παραμονή του σε υγρή μορφή έως την έγχυση στο μυοκάρδιο, όπου εκεί μπορεί να μετατραπεί σε τρισδιάστατο ικρίωμα για την περαιτέρω θεραπεία του εμφράγματος (5). Δύο πεπτιδικές σειρές έχουν δοκιμαστεί *in vivo*, RAD16-I, γνωστή ως Puramatrix (peptide sequence AcN-RADARADARADADA-CNH₂), και RAD16-II (peptide sequence AcN-RARADADARARADADA-CNH₂). Προηγούμενες έρευνες έδειξαν την επιτυχή βιωσιμότητα τόσο των καρδιομυοκυττάρων καθώς και των ενδοθηλιακών

κυττάρων εντός του μικροπεριβάλλοντος των πεπτιδίων. Πιο πρόσφατες μελέτες έδειξαν ότι, η ενσωμάτωση των αυξητικών παραγόντων insulin-like growth factor-1 (IGF-1) και platelet derived growth factor (PDGF) στο αυτοοργανωμένο δίκτυο των πεπτιδίων, οδήγησε σε ενθαρρυντικά αποτελέσματα (αύξηση βιωσιμότητας των κυττάρων καθώς και βελτίωση της καρδιακής λειτουργίας) (5).

Χιτοζάνη (chitosan)

Η χιτοζάνη είναι ένας γραμμικός πολυσακχαρίτης και παράγωγο της χιτίνης. Ο βαθμός απεκετυλίωσης ελέγχει το ρυθμό αποικοδόμησης του υλικού. Επίσης, μπορεί να διαλυτοποιήσει αδιάλυτες ενώσεις (όπως το κολλαγόνο) και χρησιμοποιείται ευρέως ως πορώδες ικρίωμα (24). Επιπλέον, η χιτοζάνη έχει τη δυνατότητα αλλαγής φάσης σε φυσιολογική θερμοκρασία, επιτρέποντας, έτσι, τη μετατροπή σε πήκτωμα κατά την έγχυση στο πάσχον μυοκάρδιο. Ενώ η χιτοζάνη χαρακτηρίζεται από πληθώρα πλεονεκτημάτων, η έλλειψη διαλυτότητάς της σε ουδέτερους διαλύτες καθιστά περιορισμένη την κυτταρική προσκόλληση και βιωσιμότητα των κυττάρων σε αυτήν (24, 40).

Σύμφωνα με τη μελέτη των Lu κ.συν. το 2009 (41) για τον έλεγχο της θερμικής «απόκρισης» της χιτοζάνης και τη μετατροπή της σε πήκτωμα κατά την έγχυση σε μυοκαρδιακό ιστό, εμφυτεύθηκε ενέσιμο βιοϋλικό χιτοζάνης σε μοντέλο ισχαιμίας – επαναιμάτωσης επίμυ, μια εβδομάδα μετά την πρόκληση του εμφράγματος. Οι ομάδες μελέτης ήταν, (α) έγχυση χιτοζάνης, (β) έγχυση χιτοζάνης με εμβρυϊκά βλαστοκύτταρα (mouse embryonic stem cells, mESCs), (γ) έγχυση PBS με εμβρυϊκά βλαστοκύτταρα (mouse embryonic stem cells, mESCs), και (δ) έγχυση PBS (41). Η διατήρηση των κυττάρων στην περιοχή εμφύτευσης στις 24 h και στις 4 εβδομάδες ήταν ενισχυμένη μετά την έγχυση με χιτοζάνη σε σύγκριση μετά την έγχυση με PBS. Τα αποτελέσματα των υπερηχοκαρδιογραφημάτων έδειξαν βελτιωμένες τιμές LVESD, LVEDD, EF, και FS στις 4 εβδομάδες, σε σύγκριση με την ομάδα ελέγχου (έγχυση PBS). Επίσης, οι επίμυες που έλαβαν χιτοζάνη / mESCs έδειξαν βελτιωμένη καρδιακή λειτουργία και στατιστικά αυξημένη μικροαγγειακή πυκνότητα (με διάμετρο του αυλού περίπου 10-100 μm). Επομένως, η έγχυση χιτοζάνης, με κύτταρα σε εμφραγματικό μυοκάρδιο είναι αποτελεσματική στη διατήρηση της γεωμετρίας της αριστερής κοιλίας καθώς και στην περαιτέρω ενίσχυση της καρδιακής λειτουργίας (41).

Αλγινικό οξύ

Το υλικό το οποίο έχει προσελκύσει το ενδιαφέρον των ερευνητών τα τελευταία χρόνια είναι το αλγινικό οξύ (alginate) λόγω και της πιθανής άμεσης εφαρμογής του σε κλινικές μελέτες (42). Το κολλαγόνο, η χιτοζάνη, το matrigel μελετήθηκαν με ενθουσιασμό από το 2004 έως το

2007, αλλά οι δημοσιεύσεις με τα πλεονεκτήματα αυτών από τότε έχουν περιοριστεί αρκετά (43, 44). Η χρήση του αλγινικού οξέος μελετάται τόσο σε μικρά όσο και σε μεγάλα μοντέλα πειραματοζώων. Το αλγινικό οξύ, είναι ένας φυσικός πολυσακχαρίτης προερχόμενος από τα καφέ άλγη, και έχει τη δυνατότητα σχηματισμού πηκτώματος υπό τη παρουσία δισθενών κατιόντων (όπως Ca^{2+}) (22).

Οι Landa κ.συν. μελέτησαν την εμφύτευση ενέσιμου (με και χωρίς κύτταρα) υδροπηκτώματος αλγινικού οξέος σε εμφραγματικό μυοκάρδιο επίμυων με εξαιρετικά αποτελέσματα στη βελτίωση της λειτουργίας της αριστερής κοιλίας (45). Πιο πρόσφατα, οι Rocca κ.συν. το 2016 εμφύτευσαν gelatinized capillary-alginate gel σε εμφραγματικό μυοκάρδιο με ενθαρρυντικά αποτελέσματα στη βελτίωση της λειτουργίας της αριστερής κοιλίας (46). Επίσης, το αλγινικό οξύ είναι ένα ιδανικό βιοϋλικό για τη μεταφορά αυξητικών παραγόντων (π.χ. VEGF, PDGF) και πεπτιδίων (45, 47-49). Η επίδραση απελευθέρωσης αυξητικών παραγόντων από τη μήτρα του αλγινικού οξέος έπειτα από μόνιμο έμφραγμα μελετήθηκε σε μοντέλο εμφράγματος μυοκαρδίου επίμυων. Συγκεκριμένα, 3 μg VEGF και PDGF ενσωματώθηκαν σε 100 ml διαλύματος αλγινικού οξέος. Στη συνέχεια, το βιοϋλικό εμφυτεύθηκε στο μυοκάρδιο μία (1) εβδομάδα μετά την πρόκληση του εμφράγματος (50), ενώ ενέσεις PBS πραγματοποιήθηκαν σε εμφραγματικούς επίμυες για την ομάδα ελέγχου. Ενισχυμένη αγγειογένεση παρατηρήθηκε στην ομάδα alginate+GFs σε σχέση τόσο με το alginate μόνο του όσο με την ομάδα ελέγχου. Άλλη ερευνητική ομάδα (Bidara κ.συν. 2009) έδειξε ότι, η πρόσδεση του πεπτιδίου RGD στο alginate βοήθησε στην ενίσχυση της αγγειογένεσης και στη βελτίωση της λειτουργίας της αριστερής κοιλίας (51).

Επίσης, ιδιαίτερο ενδιαφέρον έχουν και τα *συνθετικά πολυμερή* για εφαρμογές στην ιστοτεχνολογία του μυοκαρδίου. Τα πιο γνωστά από αυτά είναι τα ακόλουθα:

Πολυ (N-ισοπροπυλακρυλαμίδιο) (PNiPAm)

Το πολυ (N-ισοπροπυλακρυλαμίδιο) (PNiPAm) είναι ένα θερμοαποκρινόμενο υδροπήκτωμα το οποίο μπορεί να αλλάζει φάση κάτω από την κρίσιμη θερμοκρασία διαλύματος (critical solution temperature, LCST) του υλικού, δηλαδή λίγο χαμηλότερα από τη θερμοκρασία του σώματος. Επομένως, είναι ελκυστικό για χρήση ως ενέσιμου εμφυτεύματος στο εμφραγματικό μυοκάρδιο, διότι η ζελατινοποίησή του λαμβάνει χώρα *in situ* κατά την εμφύτευση (52). Σύμφωνα με τη μελέτη των Wang κ.συν., το σύμπλοκο dextran (Dex) grafted poly(E-caprolactone)-2-hydroxyethyl methacrylate (PCL-HEMA)/PNIPAAm (Dex-PCL-HEMA/PNIPAAm) εμφυτεύθηκε ενέσιμα σε μυοκάρδιο κονίκλων 4 ημέρες μετά τη πρόκληση του εμφράγματος. Το υλικό σε θερμοκρασία δωματίου έχει τη μορφή

διαλύματος (sol) ενώ στη θερμοκρασία του σώματος λαμβάνει τη μορφή πηκτώματος (sol-gel transition). Το μέγεθος του εμφράγματος μειώθηκε έπειτα από την εμφύτευση του υλικού.

Πολυ (αιθυλενογλυκόλη)

Η πολυ (αιθυλενογλυκόλη) (PEG), που επίσης ονομάζεται πολυ (αιθυλενοξείδιο) (PEO) στην υψηλού μοριακού βάρους μορφή της, μπορεί να χαρακτηριστεί ως υδροπήκτωμα, ειδικά όταν οι αλυσίδες διασταυρώνονται. Η χαμηλή αντιδραστικότητα της PEG με τους ζωντανούς οργανισμούς έγινε γνωστή το 1944 όταν εξετάσθηκε ως πιθανό μέσο ενδοφλέβιας χορήγησης λιποδιαλυτών ορμονών (Friedman, 1944) (53). Στα μέσα της δεκαετίας του 1970, ο Abuchowski ανακάλυψε ότι, εάν οι αλυσίδες της PEG προσκολληθούν σε ένζυμα και πρωτεΐνες, τα τελευταία μπορούν να έχουν μεγαλύτερο χρόνο παραμονής *in vivo*, από ότι τα βιομόρια που δεν θα έχουν προσκολληθεί σε PEG. Παρόλα αυτά, για μία πιο εκτενή χρήση των συμβατικών υδροπηκτωμάτων βασισμένων στην PEG πρέπει να ληφθεί υπόψη η έλειψη μηχανικής αντοχής και βιοδιάσπασης σε μια μεγάλη χρονική κλίμακα. Παραδείγματος χάριν, το PEGDA χρησιμοποιείται ευρέως αλλά εμφανίζει χαμηλή μηχανική αντοχή και θεωρείται ότι είναι μη βιοδιασπώμενο (54). Η μηχανική αντοχή των hydrogel είναι μια από τις βασικές ιδιότητες που πρέπει να βελτιωθεί διότι συχνά αποτυγχάνουν να διατηρούν την ακεραιότητα της δομής τους κατά τη διάρκεια διεργασίας της αναγέννησης του ιστού, όπως αγγειακών μοσχευμάτων και οστών, ενώ επίσης εμφανίζουν σημαντικές δυσκολίες στο χειρισμό. Επιπλέον, η βελτιωμένη μηχανική αντοχή είναι ιδιαίτερα επιθυμητή για την κατασκευή τρισδιάστατων ικριωμάτων (53, 54). Σύμφωνα με τη Vilaeti κ.συν. (2013), ικρίωμα με βάση την PEG εμφυτεύθηκε στο επικόρδιο της αριστερής κοιλίας επίμυων έπειτα από πρόκληση εμφράγματος. Τα αποτελέσματα ήταν εξαιρετικά, το υλικό παρείχε μηχανική υποστήριξη και βοήθησε στη διατήρηση της γεωμετρίας της αριστερής κοιλίας καθώς και στην ενίσχυση της καρδιακής λειτουργίας (55).

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2: ΣΚΟΠΟΣ ΔΙΑΤΡΙΒΗΣ

2. ΣΚΟΠΟΣ ΔΙΑΤΡΙΒΗΣ

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΚΗ ΑΝΑΣΚΟΠΙΣΗ ΚΑΙ ΚΑΙΝΟΤΟΜΙΑ ΤΗΣ ΔΙΑΤΡΙΒΗΣ

2.1 Η επιλογή του αλγινικού υδροπηκτώματος ως βιοϋλικό του ικριώματος για την ενέσιμη θεραπεία του εμφράγματος του μυοκαρδίου

Η παρούσα διατριβή εστιάζει το ενδιαφέρον της στη σύνθεση υδροπηκτωμάτων, τα οποία θα μπορούν να χρησιμοποιηθούν με ασφάλεια, επιτυχώς, στη θεραπεία του εμφράγματος του μυοκαρδίου. Συγκεκριμένα, η έρευνα επικεντρώθηκε στην ανάπτυξη ενός καινοτόμου ικριώματος της ιστοτεχνολογίας. Αυτό σημαίνει ότι, το αποτέλεσμα της προσπάθειας της βελτιστοποίησής του έπρεπε να ικανοποιεί ταυτόχρονα δύο βασικές προϋποθέσεις: (α) να επιτρέπει τη μετέπειτα (i) φιλοξενία στη δομή του αυξητικών παραγόντων, χωρίς να τους μετουσιώνει, καθώς και (ii) καλλιέργεια κυττάρων σε αυτό, και (β) να μπορεί να το χειριστεί ο ιατρός – χειρουργός, όταν το εμφυτεύσει, με ευκολία, ασφάλεια και αξιοπιστία. Έτσι, ο αρχικός στόχος ήταν η επιλογή του υλικού που θα ήταν η βάση για τη δημιουργία του τελικού ικριώματος της ιστοτεχνολογίας που να ικανοποιεί τις δύο παραπάνω προϋποθέσεις.

Υπό το πρίσμα μίας ιδανικής προσέγγισης, η προσοχή στράφηκε προς την αναζήτηση ενός υλικού φυσικής προέλευσης, βιοδιασπώμενο και το οποίο να χρησιμοποιείται ήδη εκτενώς σε βιοϊατρικές εφαρμογές ως συνθετική εξωκυττάρια μήτρα, ώστε να παρέχει εγγυήσεις για την ασφαλή χρήση του ως βιοϋλικό. Έτσι, επιλέχθηκε ένας φυσικός πολυσακχαρίτης, και συγκεκριμένα το αλγινικό οξύ (alginate). Το αλγινικό οξύ έχει προσελκύσει το ενδιαφέρον πολλών ερευνητικών ομάδων, ως εν δυνάμει ικρίωμα της ιστοτεχνολογίας, όπως ήδη αναφέρθηκε στο προηγούμενο κεφάλαιο.

Πριν την αναλυτική περιγραφή των στόχων της διατριβής, αμέσως στη συνέχεια εδώ, θα παρουσιαστεί μία αναλυτική περιγραφή της χημικής δομής του αλγινικού οξέος, μαζί με άλλες σχετικές γενικές πληροφορίες.

Το αλγινικό οξύ βρίσκεται σε αφθονία στη φύση. Εμφανίζεται είτε ως δομικό συστατικό στα θαλάσσια καφέ άλγη (*Phaeophyceae*), είτε ως πολυσακχαρίτης σε βακτήρια του εδάφους. Παρ' όλα αυτά, σύμφωνα με πρόσφατες έρευνες, είναι πιθανώς δυνατή η παραγωγή αλγινικού οξέος και

από μικροβιακή ζύμωση. Αυτήν τη στιγμή, όλα τα εμπορικά αλγινικά οξέα προέρχονται από πηγές φυκιών (56, 57).

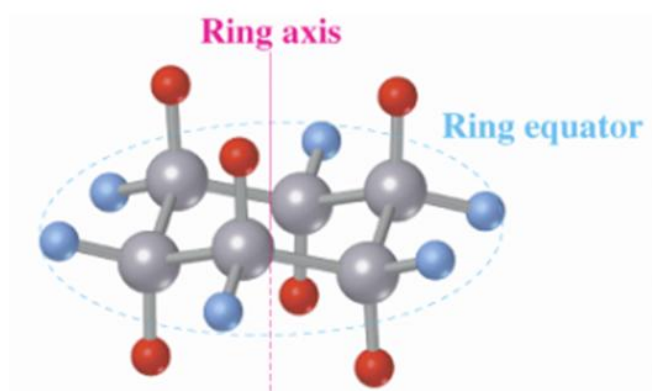
Οι βιομηχανικές εφαρμογές του αλγινικού οξέος συνδέονται με τις πηκτικές, ιξωδοελαστικές και σταθεροποιητικές ιδιότητές του. Στον τομέα της βιοτεχνολογίας, το αλγινικό οξύ, υπό την παρουσία πολυσθενών κατιόντων (π.χ. Ca^{2+}), είναι ιδιαίτερα διαδεδομένο ως μήτρα ακινητοποίησης ζωντανών κυττάρων (56, 57).

Οι ιδιότητές των αλγινικών οξέων εξαρτώνται από τη δομή τους, η οποία είναι άμεση απόρροια του τρόπου της σύνθεσής τους. Για τα φυσικής προέλευσης αλγινικά οξέα, αυτό εξαρτάται από την προέλευσή τους, δηλαδή από τα διαφορετικά είδη φυκιών από όπου προέρχονται. Για παράδειγμα, το *Laminaria hyperborean*, που αναπτύσσεται σε παραθαλάσσιες περιοχές, έχει υψηλή περιεκτικότητα σε γουλουρονικό οξύ, το οποίο του προσδίδει υψηλή μηχανική ακαμψία. Αντίθετα, τα φύλλα του ίδιου είδους, τα οποία επιπλέουν σε τρεχούμενο νερό, χαρακτηρίζονται από χαμηλή περιεκτικότητα σε γουλουρονικό οξύ, και έτσι έχουν πιο εύκαμπτη δομή (56).

Ιστορικά, ο Βρετανός χημικός E. C. C. Stanford περιέγραψε πρώτος το αλγινικό οξύ στις 9 Ιανουαρίου 1881. Μετά τη δημοσιοποίηση της σχετικής ευρεσιτεχνίας, η ανακάλυψή του συζητήθηκε περαιτέρω σε δημοσιευμένα επιστημονικά άρθρα από το 1883 και μετά. Ο Stanford, ο οποίος πίστευε ότι το αλγινικό οξύ περιείχε άζωτο, συνέβαλε σημαντικά στην αποσαφήνιση της χημικής δομής του (58). Το 1926, κάποιες ερευνητικές ομάδες ανακάλυψαν ότι το ουρονικό οξύ (uronic acid) ήταν συστατικό του αλγινικού οξέος. Η φύση του ουρονικού οξέος μελετήθηκε από τρεις διαφορετικές ερευνητικές ομάδες, οι οποίες ανίχνευσαν το D-μαννουρονικό οξύ κατά την υδρόλυση του αλγινικού οξέος (56). Αυτή η πολύ απλή και ικανοποιητική εικόνα της σύστασης του αλγινικού οξέος αμφισβητήθηκε από την ομάδα των Fischer και Dorfel το 1955, οι οποίοι, κατά τη χρωματογραφία ουρονικών οξέων, ανακάλυψαν την παρουσία ενός ουρονικού οξέος διαφορετικού από το μαννουρονικό οξύ. Αυτό το νέο ουρονικό οξύ προσδιορίστηκε ότι ήταν το L-γουλουρονικό οξύ. Το αλγινικό οξύ, τότε, θεωρήθηκε ως δυαδικό συμπολυμερές, αποτελούμενο από τα μονομερή του α-L-γουλουρονικού οξέος και του β-D μαννουρονικού οξέος. Η σύσταση των ουρονικών οξέων από διαφορετικές πηγές αλγινικού οξέος μελετήθηκε κυρίως από το Hang και την ομάδα του το 1964 (56).

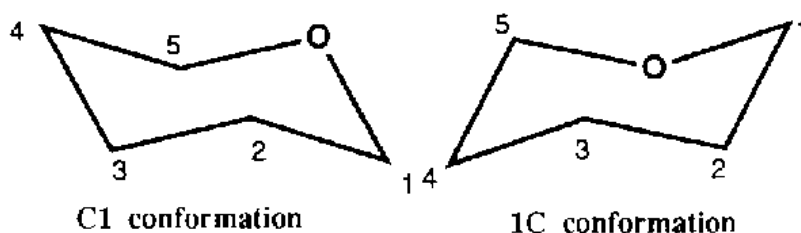
Έτσι, στις ημέρες μας, στη βιβλιογραφία αναγράφεται ότι, το αλγινικό οξύ, το οποίο είναι ένας φυσικός πολυσακχαρίτης που βρίσκεται στα άλγη, είναι ένα γραμμικό 1,4 διασταυρωμένο συμπολυμερές που αποτελείται από τα μονομερή του β-D- μαννουρονικού οξέος (β-D mannuronic acid) (M) και του α-L-γουλουρονικού οξέος (α-L-guluronic acid) (G). Η βασική δομή του κάθε μονομερούς είναι ένας δακτύλιος τετραϋδροπυρανίου, με δύο πιθανές διαμορφώσεις ανακλίντρου (chair conformation), που αφορούν

στις δύο διαφορετικές διατάξεις για τα άτομα του υδρογόνου (H) στο δακτύλιο, αξονικές (a, axial) και ισημερινές (e, equatorial), όπως φαίνονται στην Εικόνα 10, (56).



Εικόνα 10. Ισημερινές και αξονικές θέσεις (56)

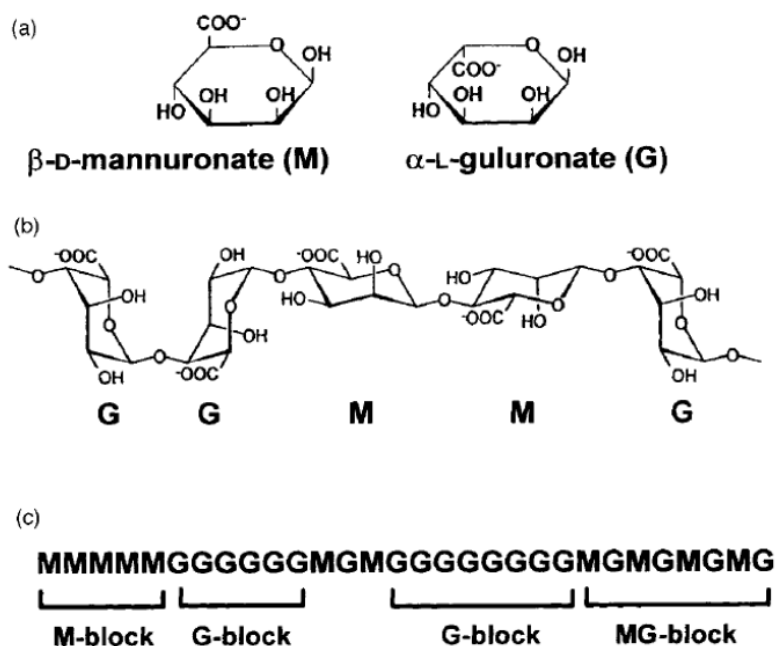
Οι δύο αυτές διαφορετικές διαμορφώσεις ανακλίντρου, C1 και 1C, παρουσιάζονται στην Εικόνα 11, (56). Αυτή είναι και η μοναδική διαφορά ανάμεσα στο β-D μαννουρονικό οξύ και α-L γουλουρονικό οξύ. Όμως, η διαφορά αυτή είναι πολύ σημαντική, γιατί αναπτύσσονται πολύ διαφορετικές στερεοχημικές αλληλεπιδράσεις-παρεμποδίσεις (steric interactions) μεταξύ του αξονικού -COOH στον C-5 και του αξονικού -OH στον C-3 ανάλογα εάν η διαμόρφωση είναι η C1 ή 1C. Αυτό επηρεάζει τόσο την ικανότητα ζελατινοποίησης με τα δισθενή κατιόντα (όπως παρουσιάζεται παρακάτω, το σταθερό αλγινικό υδροπήκτωμα παράγεται κυρίως με τις ομάδες G), όσο και τη θερμοδυναμική σταθερότητα των μονάδων αυτών (αυτό μπορεί να υπολογιστεί με θεωρητικούς υπολογισμούς, όπως αυτοί που περιγράφονται και στην παρούσα εργασία στο κεφάλαιο 3).



Εικόνα 11. Διαμορφώσεις C1 και 1C (56).

Τα μονομερή G και M ενώνονται μεταξύ τους με δεσμούς 1-4, και διευθετούνται σε ομάδες (block) στην αλυσίδα. Έτσι, η κάθε δομική μονάδα εναλλάσσεται της άλλης με τυχαίο τρόπο, π.χ. ...GGGGMMMMGMGGGGMMMMGMGMGMGMGMGMGGGGMGMG... (Εικόνα 12) (56). Επομένως, η πολυμερική αλυσίδα του αλγινικού οξέος αποτελείται από τυχαίες εναλλαγές τριών βασικών block, M, G και MG. Η εμφάνιση των τριών

αυτών block εξαρτάται από την πηγή των φυκιών που προέρχεται το αλγινικό οξύ (56).



Εικόνα 12. Χαρακτηριστικά της στερεοχημικής διαμόρφωσης των αλγινικών οξέων: (α) Μονομερή αλγινικού οξέος, (β) δομή αλυσίδας, (c) blocks αλυσίδας αλγινικού οξέος (56).

Τα εμπορικά διαθέσιμα αλγινικά οξέα προέρχονται κυρίως από τα άλγη *Laminaria hyperborean*, *Macrocystis pyrifera*, *Laminaria digitata*, *Ascophyllum nodosum*, *Laminaria japonica*, *Eclonia maxima*, *Lessonia nigrescens*, *Durvillea Antarctica* και *Sargassum spp.* Η σύνθεση και η δομή τους εξαρτώνται από τις συνθήκες ανάπτυξης. Υψηλό περιεχόμενο σε μονομερή G εμφανίζεται στα αλγινικά οξέα που προέρχονται από τα άλγη *Laminaria hyperborean*, ενώ χαμηλό περιεχόμενο σε G blocks (που, κατ' επέκταση, τα υδροπηκτώματά τους έχουν χαμηλή μηχανική αντοχή) εμφανίζεται στα αλγινικά οξέα που προέρχονται από τα άλγη *Nodosum*, *Japonica* και *Macrocystis Pylifera* (56).

2.2 Σχηματισμός (ζελατινοποίηση) αλγινικού υδροπηκτώματος

1^{ος} στόχος της παρούσας διατριβής ήταν η μελέτη της χημικής δομής του αλγινικού οξέος, έχοντας ως πολύτιμο εργαλείο την πειραματική φασματοσκοπική μέθοδο fourier transform infra red, FT-IR (φασματοσκοπία υπερύθρου με μετασχηματισμό Fourier). Η καινοτομία στο πρώτο αυτό στάδιο της διατριβής έγκειται στο γεγονός ότι η μελέτη αυτή ολοκληρώθηκε με θεωρητικούς υπολογισμούς DFT (μέθοδος συναρτησιακών της ηλεκτρονιακής πυκνότητας), οι οποίοι επέτρεψαν τη

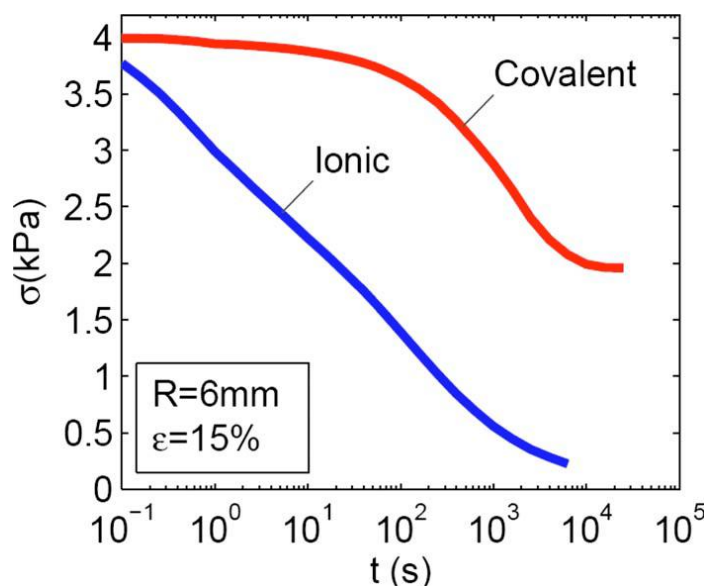
μοντελοποίηση των δομών των δύο μονομερών του πολυσακχαρίτη G και M, και, από αυτές τις δομές, τον υπολογισμό των θεωρητικών φασμάτων IR. Έτσι, έγινε συσχέτιση των πειραματικών και των θεωρητικών αποτελεσμάτων.

Αφού αποκτήθηκε πλήρης εικόνα της δομής γι' αυτόν τον, πολλά υποσχόμενο και στη βιοϊατρική, πολυσακχαρίτη, το επόμενο βήμα ήταν η σύνθεση υδροπηκτωμάτων με βάση το αλγινικό οξύ. Τα αλγινικά υδροπηκτώματα είναι ιδιαίτερα ελκυστικά σε ένα ευρύ φάσμα ιατρικών εφαρμογών, επειδή είναι φυσικής προέλευσης υλικά, συμβατά με τον οργανισμό και έχουν τη δυνατότητα να προσαρμόζουν το σχήμα τους καθώς και το ιξώδες τους στις απαιτήσεις και τις συνθήκες της εκάστοτε εφαρμογής τους (59, 60). Στην ιστοτεχνολογία, έχουν χρησιμοποιηθεί ως «όχημα» για τη μεταφορά κυττάρων, αυξητικών παραγόντων και φαρμάκων, καθώς και ως συνθετική εξωκυττάρια μήτρα για την υποστήριξη κυττάρων και ιστών (61). Ας σημειωθεί ότι, σε αντίθεση με τα πηκτώματα άλλων πολυσακχαριτών, τα πηκτώματα του αλγινικού οξέος μπορούν να αναπτυχθούν σε σταθερές θερμοκρασίες. Αυτή η μοναδική ιδιότητα είναι ιδιαίτερα χρήσιμη σε εφαρμογές στις οποίες εμπλέκονται κύτταρα ή ιστοί ευαίσθητοι σε υψηλές θερμοκρασίες (62).

Έχουν αναπτυχθεί πολλές τεχνικές για τον έλεγχο της ταχύτητας ζελατινοποίησης του αλγινικού οξέος, προς παρασκευή υδροπηκτωμάτων με τις κατάλληλες ιδιότητες για κάθε συγκεκριμένη εφαρμογή (59, 60, 63). Η ύπαρξη χημικών ή φυσικών σταυροδεσμών στα υδρόφιλα πολυμερή αποτελεί τυπική προσέγγιση σχηματισμού υδροπηκτωμάτων με εφαρμογές στην ιστοτεχνολογία (58). Οι φυσικοχημικές τους ιδιότητες εξαρτώνται ισχυρά από τον τύπο και την πυκνότητα των σταυροδεσμών, το μοριακό βάρος και τη χημική σύνθεση του πολυμερούς (64).

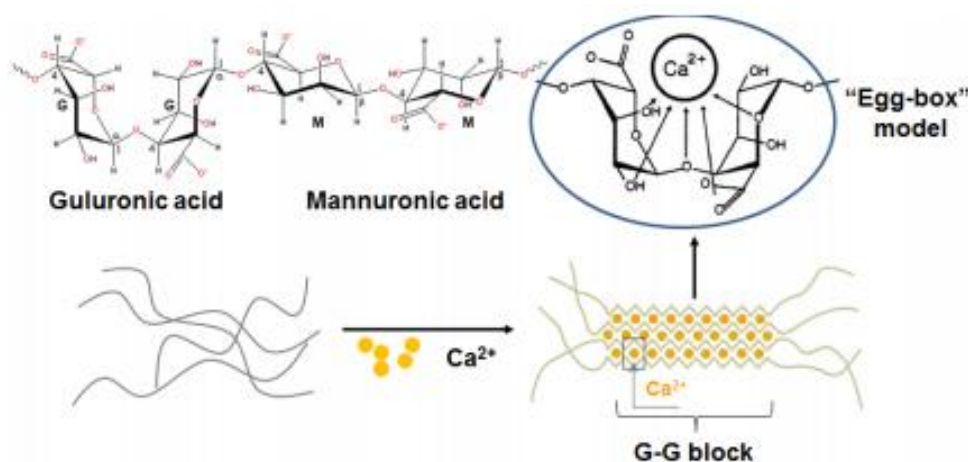
Η πιο κοινή μέθοδος παρασκευής υδροπηκτωμάτων από υδατικό διάλυμα αλγινικού οξέος είναι ο συνδυασμός του με παράγοντες που έχουν την ικανότητα δημιουργίας ιοντικών σταυροδεσμών, π.χ. Ca^{2+} (22, 65). Επίσης, μια ακόμη μέθοδος παρασκευής πηκτώματος αλγινικού οξέος είναι η δημιουργία ομοιοπολικών σταυροδεσμών (58). Έχουν ήδη μελετηθεί διάφοροι τρόποι σύνθεσης, όπως η δημιουργία ομοιοπολικών σταυροδεσμών μεταξύ αλγινικού οξέος και poly(ethylene glycol)-diamines, όπου το τελικό προϊόν έχει βελτιωμένες μηχανικές ιδιότητες (22, 57). Παρ' όλα αυτά, η χρήση των αντιδραστηρίων που απαιτούνται για την παρασκευή αυτών των ομοιοπολικών σταυροδεσμών ίσως εγείρουν σοβαρές ενστάσεις σχετικά με την πρόκληση πιθανής τοξικότητας, και έτσι τα μη αντιδρώντα χημικά αντιδραστήρια πρέπει να απομακρυνθούν παντελώς από τα τελικά πηκτώματα (22, 65). Επίσης, σύμφωνα με το διάγραμμα της Εικόνα 13 (66), η διατμητική τάση του πηκτώματος με ιοντικούς σταυροδεσμούς ελαττώνεται με την πάροδο του χρόνου έως ότου σχεδόν

μηδενιστεί, ενώ στο πήκτωμα με ομοιοπολικούς σταυροδεσμούς φθάνει σε πλατό στο ~46% της αρχικής τιμής, χωρίς περαιτέρω ελάττωση.

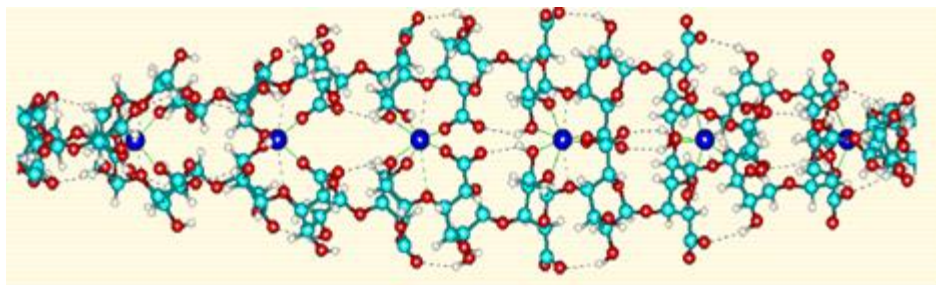


Εικόνα 13. Η συμπεριφορά stress-relaxation αλγινικών υδροπηκτωμάτων με ιοντικούς και ομοιοπολικούς σταυροδεσμούς. Το μέτρο ελαστικότητας είναι ίδιο και στα δύο πηκτώματα (~ 26 KPa) (66).

Η ιοντική ζελατινοποίηση (Εικόνα 14, (67)) λαμβάνει χώρα όταν δισθενή κατιόντα δεσμεύονται ιοντικά μεταξύ των blocks του γουλουρονικού οξέος (G blocks) στην πολυμερική αλυσίδα, δημιουργώντας ένα τρισδιάστατο δίκτυο (68). Τα ιόντα αυτά (σε φθίνουσα σειρά ικανότητας ζελατινοποίησης του αλγινικού οξέος) είναι κυρίως $Pb^{2+} > Cu^{2+} > Cd^{2+} > Ba^{2+} > Sr^{2+} > Ca^{2+} > Co^{2+} = Ni^{2+} = Zn^{2+} > Mn^{2+}$. Τα δισθενή κατιόντα συνδέονται μόνο στις μονάδες του γουλουρονικού οξέος, επειδή η δομή τους επιτρέπει υψηλού βαθμού ένταξη (coordination) των δισθενών ιόντων (65). Τέτοιες ζώνες δέσμευσης ανάμεσα στα G blocks συχνά αναφέρονται στη διεθνή βιβλιογραφία ως "egg boxes" (Εικόνα 15, (69)) (22, 43, 57).

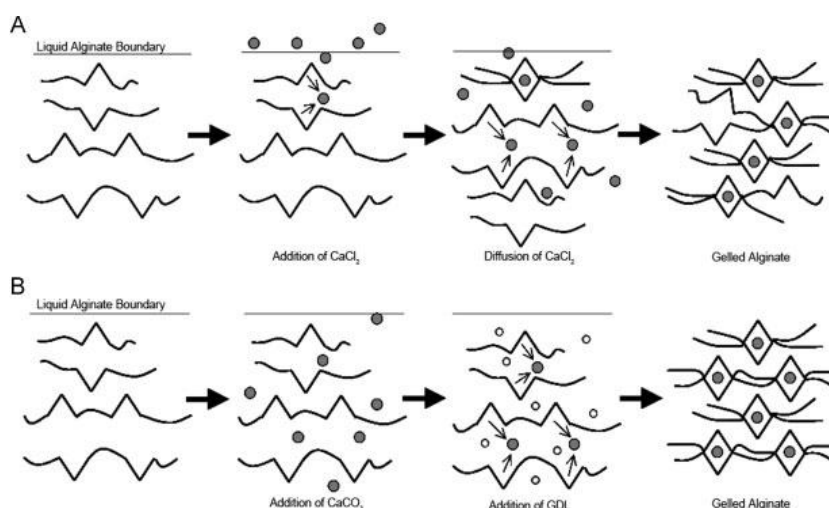


Εικόνα 14. Δημιουργία δικτύου αλγινικού υδροπηκτώματος (67).



Εικόνα 15. Μοντέλο «Egg Box» (69).

Ο μηχανισμός της ζελατινοποίησης (59, 60) εξαρτάται από τη διάχυση των ιόντων ζελατινοποίησης (gelling ions) στο πολυμερικό δίκτυο. Έτσι, υπάρχουν δύο μέθοδοι παρασκευής αλγινικού υδροπηκτωματος, (α) η μέθοδος διάλυσης/διάχυσης, και (β) η εσωτερική μέθοδος ζελατινοποίησης, οι οποίες απεικονίζονται σχηματικά στην Εικόνα 16, (70).



Εικόνα 16. Ζελατινοποίηση διαλύματος αλγινικού οξέος. (Α) Μηχανισμός διάλυσης/διάχυσης, και (Β) μηχανισμός εσωτερικής ζελατινοποίησης (70).

Στη μέθοδο διάλυσης/διάχυσης, τα ιόντα ζελατινοποίησης διαχέονται ταχύτατα στο διάλυμα του αλγινικού οξέος. Για παράδειγμα, τα δισθενή κατιόντα του ασβεστίου (Ca^{2+}) μπορούν να απελευθερωθούν γρήγορα σε ένα υδατικό διάλυμα αλγινικού οξέος μέσω διάλυσης χλωριούχου ασβεστίου (CaCl_2). Έτσι, τα ιόντα του Ca^{2+} στο διάλυμα μπορούν να δημιουργήσουν αμέσως σταυροδεσμούς με τις καρβοξυλομάδες του αλγινικού οξέος με τις οποίες έρχονται σε επαφή (Εικόνα 16 (Α), (70)). Αυτή η μέθοδος χρησιμοποιείται ευρέως στον τομέα της βιοτεχνολογίας για την ακινητοποίηση ζωντανών κυττάρων στο υδροπήκτωμα του αλγινικού οξέος (71). Συγκεκριμένα, κάθε σταγόνα διαλύματος αλγινικού οξέος που βυθίζεται σε ένα διάλυμα CaCl_2 , το οποίο περιέχει και τα κύτταρα που πρέπει να εγκλωβιστούν, σχηματίζει αμέσως, σε μορφή σφαιριδίων, ένα

πυκνό και συνεκτικό πήκτωμα που παγιδεύει το ενεργό βιολογικό υλικό. Ένα σημαντικό χαρακτηριστικό της μεθόδου αυτής είναι ότι το τελικό πήκτωμα μπορεί να εμφανίσει ανομοιογενή κατανομή της περιεκτικότητας των αλυσίδων του αλγινικού οξέος, επειδή η συγκέντρωση του αλγινικού οξέος μειώνεται σταδιακά από την επιφάνεια προς το κέντρο του πηκτώματος (59, 60). Η ανομοιογένεια αυτή, όμως, μπορεί, εν μέρει, να ελεγχθεί. Συγκεκριμένα, υψηλός βαθμός ανομοιογένειας επιτυγχάνεται με τη χρήση χαμηλής συγκέντρωσης σε ιόντα ζελατινοποίησης και με την απουσία ιόντων μη-ζελατινοποίησης (non-gelling ions). Αντίθετα, μεγαλύτερος βαθμός ομοιογένειας επιτυγχάνεται όταν το πήκτωμα παράγεται παρουσία υψηλών συγκεντρώσεων τόσο ιόντων ζελατινοποίησης όσο και ιόντων μη-ζελατινοποίησης (70).

Το CaCO_3 και το CaSO_4 χρησιμοποιούνται, επίσης, ως πηγές ιόντων Ca^{2+} . Σε αυτήν την περίπτωση, τα ιόντα του Ca^{2+} παρέχονται με αργό ρυθμό στο διάλυμα του αλγινικού οξέος από την αργή διάλυση του CaCO_3 σε συνθήκες ήπια όξινου pH (~4). Τα ιόντα Ca^{2+} προσδένονται στις κοντινότερες διαθέσιμες καρβοξυλομάδες, οδηγώντας στη σταδιακή ζελατινοποίηση του διαλύματος του αλγινικού οξέος (Εικόνα 16 (B), (70)). Η αργή παροχή των ιόντων ασβεστίου οδηγεί σε αργό ρυθμό σχηματισμού του υδροπηκτώματος (εσωτερικός μηχανισμός ζελατινοποίησης), το οποίο, όμως, σε αντίθεση με τα υδροπηκτώματα που παράγονται με τη μέθοδο διάλυσης/διάχυσης, διακρίνονται για την υψηλή ομοιογένειά τους.

Έτσι, ο **2^{ος} στόχος** της παρούσας διατριβής ήταν η πειραματική μελέτη της ικανότητας των δισθενών κατιόντων των αλκαλικών γαιών να σχηματίσουν υδροπηκτώματα με το αλγινικό οξύ. Εκτός από τα ιόντα του Ca^{2+} , τα οποία ασφαλώς προκρίνονται λόγω της παρουσίας τους στο αίμα, στα βιολογικά υγρά και στους ιστούς του σώματος, στα πειράματα αυτά μελετήθηκαν τα ιόντα του Mg^{2+} , τα οποία και αυτά παίζουν σημαντικό ρόλο στις βιολογικές λειτουργίες του οργανισμού, καθώς και τα ιόντα του Sr^{2+} και του Ba^{2+} , από την ομάδα 2 του περιοδικού πίνακα. Η μελέτη αυτή έγινε με καταγραφή του δυναμικού ιξώδους πηκτωμάτων και διαλυμάτων αλγινικού οξέος με και χωρίς την παρουσία των ιόντων αυτών.

Στη βιβλιογραφία αναφέρεται ότι, τα ιόντα Mg^{2+} δεν είναι ικανά να σχηματίσουν υδροπήκτωμα με το αλγινικό οξύ (72). Γενικά, τα φυσικοχημικά χαρακτηριστικά των διαλυμάτων του αλγινικού οξέος του Mg εξαρτώνται ισχυρά από το λόγο μαννουρονικό (M blocks) / γουλουρονικό οξύ (G blocks). Σύμφωνα με τον Donati και τους συνεργάτες του, το αλγινικό οξύ προτιμά να αλληλεπιδράσει με τα ιόντα του Mg^{2+} ακολουθώντας τη σειρά guluronan > polyalternating > mannuronan (72). Οι ερευνητές αυτοί περιέγραψαν το όλο φαινόμενο ως μία απλή διάχυση των ιόντων Mg^{2+} στο πολυμερικό δίκτυο του αλγινικού οξέος, παρά ως ένα ισχυρό δίκτυο, όπως για παράδειγμα αυτό που αναπτύσσεται υπό την παρουσία ιόντων Ca^{2+} (72). Στη βιβλιογραφία απλά αναφέρεται ότι, η

φτωχή (έως ανύπαρκτη) ικανότητα των ιόντων του Mg^{2+} να ζελατινοποιούν το αλγινικό οξύ οφείλεται στην έλλειψη ισχυρών αλληλεπιδράσεων μεταξύ του πολυμερούς και των ιόντων (72).

Έτσι, ο **3^{ος} στόχος** της διατριβής ήταν να γίνει, με θεωρητικούς υπολογισμούς DFT (73), η θεωρητική ερμηνεία της ικανότητας ζελατινοποίησης του αλγινικού οξέος με τα διάφορα κατιόντα των αλκαλικών γαιών. Αυτό έγινε με βάση τη δομή του αλγινικού οξέος που υπολογίστηκε στον 1ο στόχο, και τα πειραματικά ευρήματα που προέκυψαν από την έρευνα που αναπτύχθηκε στα πλαίσια του 2ου στόχου. Εκτός της επιβεβαίωσης των πειραματικών ευρημάτων, αναφορικά με το ερώτημα αυτό (δηλαδή την ικανότητα ζελατινοποίησης), η θεωρητική μοντελοποίηση επέτρεψε να προταθούν οι βέλτιστες συνθήκες παρασκευής του αλγινικού υδροπηκτώματος που πρέπει να εμφυτευτεί για τη θεραπεία του εμφράγματος του μυοκαρδίου. Αυτός είναι, άλλωστε, ο απώτερος σκοπός της μοντελοποίησης, δηλαδή, όχι απλώς να ερμηνεύσει τα πειραματικά ευρήματα, αλλά να καθοδηγήσει το σωστό σχεδιασμό διεργασιών και υλικών, ώστε να επιτευχθεί η βέλτιστη απόδοση σε μία συγκεκριμένη εφαρμογή. Έτσι, στην παρούσα έρευνα, ο απώτερος σκοπός ήταν να σχεδιαστούν βιοϋλικά με βάση το αλγινικό ικρίωμα με την καλύτερη *in vivo* συμπεριφορά στη θεραπεία του εμφράγματος του μυοκαρδίου. Η μοντελοποίηση που έγινε στα πλαίσια του 3^{ου} στόχου έδωσε πολύτιμα δεδομένα για το σχεδιασμό αυτού του ικριώματος.

Στο σημείο αυτό σημειώνεται ότι, ο επόμενος 4^{ος} στόχος εντάσσεται στο γενικό πλαίσιο της έρευνας που αναπτύχθηκε για την επίτευξη των στόχων 2 και 3. Όμως, επειδή κατέχει διακριτή θέση τόσο στην έρευνα που αναπτύχθηκε στη διατριβή αυτή, όσο και λόγω της μεγάλης σπουδαιότητάς του αναφορικά με το αλγινικό υδροπήκτωμα που αναπτύχθηκε στην παρούσα διατριβή για τη θεραπεία του εμφράγματος του μυοκαρδίου, παρουσιάζεται την επόμενη ενότητα, ως διακριτός και ξεχωριστά οριοθετημένος στόχος.

2.3 Το αλγινικό υδροπήκτωμα ως βιοϋλικό για τη θεραπεία εμφράγματος του μυοκαρδίου

Στη συγκεκριμένη έρευνα, το τελικό ικρίωμα που θα συντεθεί θα πρέπει να έχει χρόνο ζωής περίπου 15 ημέρες. Συγκεκριμένα, σύμφωνα με το ιατρικό πρωτόκολλο, το ικρίωμα σχεδιάζεται να εφαρμοστεί σε εμφραγματικό μυοκάρδιο πειραματόζωνων (επίμυων) αμέσως μετά την πρόκληση του εμφράγματος. Έτσι, έως τη 15η ημέρα από την εφαρμογή της θεραπείας, το υδροπήκτωμα θα πρέπει να έχει βιοαποικοδομηθεί πλήρως και να μην διατηρεί πλέον την τρισδιάστατη δομή του, ώστε να απελευθερώσει στο μυοκαρδιακό ιστό τους αυξητικούς παράγοντες και τις δομές των κυττάρων

που θα περιέχει. Τα υδροπηκτώματα που χρησιμοποιήθηκαν για τα *in vitro* και τα *in vivo* πειράματα στην παρούσα διατριβή παρασκευάστηκαν με δημιουργία ιοντικών σταυροδεσμών με ιόντα Ca^{2+} , και έτσι αφορούν αποκλειστικά στην ύπαρξη μοριακών δομών τύπου «egg box» (22).

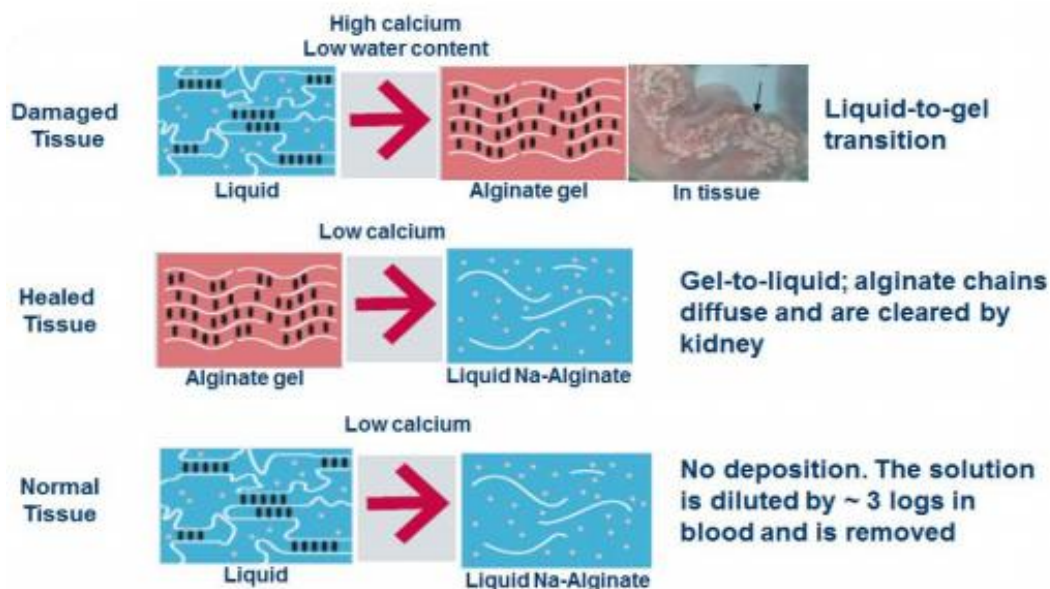
Η Landa και οι συνεργάτες της, το 2009, ανέπτυξαν ένα ενέσιμο βιοϋλικό με βάση το αλγινικό οξύ για ανάταξη κατεστραμμένων ιστών του μυοκαρδίου έπειτα από οξύ έμφραγμα (45). Η συγκεκριμένη ερευνητική ομάδα εμφύτευσε ενέσιμα σε εμφραγματικό μυοκάρδιο επίμυων υποασβεστιωμένο διάλυμα αλγινικού οξέος. Καλείται (εδώ, και όχι στην εργασία τους) υποσβαστιωμένο γιατί η μικρή ποσότητα των ιόντων Ca^{2+} που χρησιμοποιήθηκε στις εργασίες τους δεν καθιστά ικανό το διάλυμα του αλγινικού οξέος να χαρακτηριστεί ως πήκτωμα (45). Όμως, είναι γενικά αποδεκτό ότι, αμέσως μετά την πρόκληση της ισχαιμίας, η εμφραγματική περιοχή περιέχει υψηλή συγκέντρωση ιόντων Ca^{2+} . Έτσι, το διάλυμα του αλγινικού οξέος μετατρέπεται σε υδροπήκτωμα *in situ* κατά την εμφύτευσή του στο ισχαιμικό μυοκάρδιο (45). Ένα χρόνο μετά τη μελέτη της Landa, ο Leor και η ομάδα του (74) εμφύτευσαν επίσης υποασβεστιωμένο βιοϋλικό με βάση το αλγινικό οξύ σε ισχαιμικό μυοκάρδιο χοίρων, και τα αποτελέσματά τους ανέδειξαν τις ευεργετικές ιδιότητες του υλικού αυτού στην αναδιαμόρφωση της αριστερής κοιλίας.

Στο συγκεκριμένο σημείο, όμως, διαφαίνεται ένα σημαντικό κενό στη βιβλιογραφία, το οποίο σχετίζεται με το τι πραγματικά συμβαίνει στο αλγινικό υδροπήκτωμα όταν υπάρχει πολλή μεγάλη συγκέντρωση ιόντων Ca^{2+} στο δίκτυό του. Και ιδιαίτερα σε σχέση με τη συγκεκριμένη εφαρμογή, από αυτό το κενό αναδύεται το εύλογο ερώτημα: εάν εμφυτευόταν εξ αρχής αλγινικό υδροπήκτωμα Ca στο ήδη πλούσιο σε ιόντα Ca^{2+} ισχαιμικό μυοκάρδιο, τι επιπτώσεις θα υπήρχαν στη δομή του βιοϋλικού και εν συνεχεία στη συνολική υγεία των πειραματόζων;

Η απάντηση στο παραπάνω ερώτημα αποτέλεσε τον **4^ο στόχο** της παρούσας διατριβής, ο οποίος ήταν ο προσδιορισμός της μέγιστης συγκέντρωσης των ιόντων Ca^{2+} που μπορούν να δεσμευτούν στο δίκτυο του αλγινικού υδροπηκτώματος, έτσι ώστε αυτό να αποτελέσει το βέλτιστο ικρίωμα για εφαρμογή του στη θεραπεία του εμφράγματος του μυοκαρδίου. Η έρευνα στα πλαίσια του στόχου αυτού συμπεριελάμβανε μετρήσεις ιξώδους, ως δείκτη της συνεκτικότητας του υδροπηκτώματος και της έκτασης της ζελατινοποίησης του, και θεωρητικούς υπολογισμούς DFT για την ερμηνεία των πειραματικών αποτελεσμάτων, δηλαδή, την εύρεση των παραγόντων που επηρεάζουν την ποιότητα του αλγινικού υδροπηκτώματος του Ca, αλλά και τη διατύπωση συγκεκριμένων προτάσεων για το σχεδιασμό της σύστασης αυτού του βέλτιστου αλγινικού υδροπηκτώματος για τη συγκεκριμένη εφαρμογή. Το τελευταίο είναι πολύ σημαντικό γιατί σχετίζεται άμεσα με την πρόληψη της αποφυγής κινδύνων γένεσης κοιλιακών (επικίνδυνων) αρρυθμιών λόγω πιθανής υπερφόρτωσης της

πάσχουσας περιοχής με Ca^{2+} , διότι, όπως αναφέρθηκε και στο κεφάλαιο 1, τα ιόντα Ca^{2+} είναι ο «σπινθήρας» για την έναρξη παθολογικών αρρυθμιών (4).

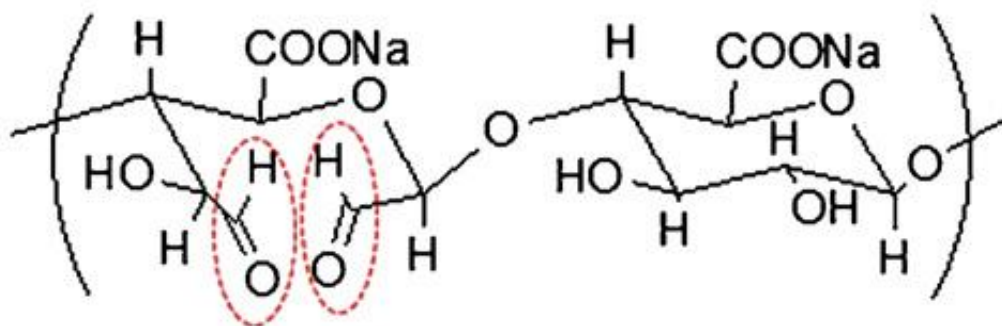
Ένα βασικό γνώρισμα όλων των βιοϋλικών είναι ότι, δεν πρέπει να συσσωρεύονται στο σώμα, αλλά να συμμετέχουν ενεργά στο μεταβολισμό. Έτσι, πριν παρουσιαστούν οι επόμενοι στόχοι της διατριβής, πρέπει πρώτα να τεθεί ένα σοβαρό ζήτημα, το οποίο αφορά στη βιοδιάσπαση του αλγινικού υδροπηκτώματος, αφού αυτό επιτελέσει το έργο του ως εμφύτευμα στο μυοκάρδιο (ανεξάρτητα εάν η ολική ποσότητα του αλγινικού υδροπηκτώματος που θα χορηγηθεί στην καρδιά εφάπαξ είναι συνολικά πολύ μικρή). Όπως είναι ήδη γνωστό, στα θηλαστικά, το αλγινικό οξύ είναι μη βιοδιασπώμενο λόγω απουσίας σχετικού ενζύμου αλγινάσης, το οποίο θα μπορούσε να διασπάσει την πολυμερική αλυσίδα και αυτή στη συνέχεια να μπορεί να αποβληθεί τελικά από το σώμα μέσω των νεφρών. Στην ιοντική ζελατινοποίηση, το υδροπήκτωμα αποικοδομείται, μεν, λόγω απελευθέρωσης των δισθενών κατιόντων στον περιβάλλοντα χώρο, λόγω ανταλλαγής των δισθενών με τα μονοσθενή ιόντα (π.χ. Na^+) (Εικόνα 17) (67). Όμως, ακόμη και μετά από αυτήν τη βιοαποικοδόμηση του υδροπηκτώματος, το μοριακό βάρος των προϊόντων της αποικοδόμησης είναι πολύ υψηλό για το όριο που μπορεί να γίνει η νεφρική κάθαρση, έχοντας ως αποτέλεσμα να μην απομακρύνονται ολοκληρωτικά τα προϊόντα της αποικοδόμησης του αλγινικού εμφυτεύματος από το σώμα.



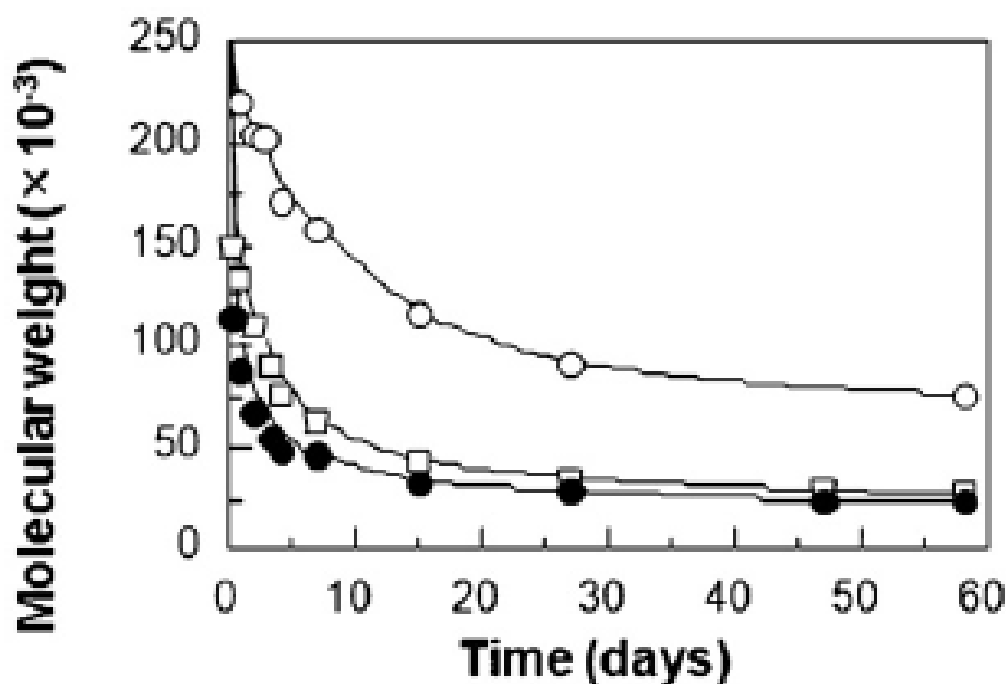
Εικόνα 17. Σχηματική αναπαράσταση εμφύτευσης και αποικοδόμησης αλγινικού υδροπηκτώματος σε μυοκαρδιακό ιστό (67).

Μια ελκυστική προσέγγιση για να μετατραπεί το αλγινικό οξύ σε ένα πλήρως βιοδιασπώμενο πολυμερές είναι η μερική οξειδωση της πολυμερικής αλυσίδας (67). Η οξειδωση με υπερϊωδικό νάτριο (NaIO_4) διασπά το δεσμό C–C της ομάδας της cis-διόλης και αλλάζει τη διάταξη της

προηγούμενως κλειστής αλυσίδας σε μία ανοιχτή μορφή δακτυλίου (Εικόνα 18 (α), (58)) (75). Η τελική αποικοδόμηση των υδροπηκτωμάτων εξαρτάται από το βαθμό της οξείδωσης καθώς και από το pH του μέσου αποικοδόμησης (Εικόνα 18 (β), (58)). Η οξείδωση της αλυσίδας του αλγινικού οξέος (η οποία στην παρούσα διατριβή ήταν της τάξης του 1 %) δεν επηρεάζει την ικανότητα ζελατινοποίησης με τα δισθενή κατιόντα (58, 67).



(α)



(β)

Εικόνα 18. (α) Προϊόν της μερικής οξείδωσης της αλυσίδας αλγινικού οξέος, και (β) εξάρτηση της αποικοδόμησης από το pH (άδειοι κύκλοι pH=4.5, τετράγωνα pH = 7.4, και σκιασμένοι κύκλοι pH = 9.2) (58).

Η εύρεση της βέλτιστης συγκέντρωσης ασβεστίου αποτελεί το διακριτό 4^ο στόχο, υπό το πρίσμα της καινοτομίας, όμως, από την οπτική της πρακτικής εφαρμογής του υδροπηκτώματος στη συγκεκριμένη εφαρμογή της θεραπείας του μυοκαρδίου, ουσιαστικά εισαγάγει την έρευνα της διατριβής αυτής στη βελτιστοποίηση και στον πλήρη χαρακτηρισμό του αλγινικού υδροπηκτώματος που θα ελεγχθεί και θα χρησιμοποιηθεί στα *in vitro* και *in vivo* πειράματα. Έτσι, κάτω από την ίδια ομπρέλα που εντάσσεται τόσο η εύρεση της βέλτιστης συγκέντρωσης Ca^{2+} όσο και να ληφθεί πρόνοια ώστε το τελικό εμφύτευμα να είναι βιοαποικοδομήσιμο, κάτι που γίνεται μέσω της οξείδωσης της αλυσίδας του αλγινικού οξέος που προαναφέρθηκε, πρέπει να ενταχθούν, επίσης, η μελέτη της *in vitro* και της *in vivo* κινητικής της βιοαποικοδόμησης του αλγινικού υδροπηκτώματος και η μελέτη της υφής του. Το πρώτο έγινε μελετώντας πειραματικά τη διάλυσή του σε φυσιολογικό ορό καθώς και στο μυοκάρδιο, το τελευταίο χρησιμοποιώντας μέθοδο σήμανσης του αλγινικού υδροπηκτώματος με βιοτίνη και μετά βαφή της, η οποία δίνει χαρακτηριστικό καφέ χρώμα στις τομές της καρδιάς. Το δεύτερο είναι σημαντικό γιατί πιστεύεται ότι, εκτός από τη χημική συγγένεια, έχει μεγάλη σημασία να υπάρχει και ομοιότητα της μικροδομής του τεχνητού ικρίωματος με τον ιστό που θα αντικατασταθεί ή θα έρθει το ικρίωμα σε επαφή. Επειδή αυτό είναι πολύ δύσκολο, τεχνικά, να γίνει στην υγρή φάση, στη συγκεκριμένη έρευνα έγινε σε στερεά φάση, δηλαδή παρατηρώντας τη μικροδομή και μετρώντας το πορώδες σε λυοφιλοποιημένα δείγματα, τόσο του αλγινικού υδροπηκτώματος, όσο και μυοκαρδίου από επίμυ.

Αφού δοθούν απαντήσεις στα ερωτήματα που τέθηκαν στους 4 πρώτους στόχους της διατριβής, οι οποίοι, όπως προαναφέρθηκε, αφορούσαν στην εύρεση των βέλτιστων συνθηκών για την παρασκευή του αλγινικού υδροπηκτώματος του Ca , οι επόμενοι στόχοι της έρευνας θα πρέπει να κατευθυνθούν προς τη μεταφορά αυξητικών παραγόντων και κυττάρων στο εμφραγματικό μυοκάρδιο δια μέσου ακυτταρικού αλγινικού υδροπηκτώματος, και η μελέτη με *in vitro* και *in vivo* πειράματα.

Ενώ έχουν αναπτυχθεί πολλά υδροπηκτώματα για εφαρμογές στην ιστοτεχνολογία, μόνο μερικά από αυτά έχουν δοκιμαστεί σε εφαρμογές στην καρδιά. Κάποια από αυτά έχει αποδειχθεί ότι έχουν θετικά αποτελέσματα στη θεραπεία του εμφράγματος του μυοκαρδίου. Ακυτταρικά ενέσιμα υδροπηκτώματα, χωρίς θεραπευτικά μόρια, ως bulking agents, έχει δειχθεί ότι μεταβάλλουν τα μηχανικά και βιολογικά σήματα μετά το έμφραγμα, μειώνοντας τις προκαλούμενες τάσεις και περιορίζοντας τη δυσμενή αναδιαμόρφωση της αριστερής κοιλίας (76). Επιπλέον, η μεταφορά βιομορίων από τα ενέσιμα υδροπηκτώματα μπορεί να επηρεάσει κυτταρικές διεργασίες, όπως την απόπτωση και την αγγειογένεση στον καρδιακό ιστό, ή μπορούν να χρησιμοποιηθούν για τη συγκέντρωση και ενεργοποίηση βλαστοκυττάρων (76, 77).

Έτσι, ο πρώτος επόμενος στόχος της διατριβής θα πρέπει να αφορά στην ανάπτυξη ενέσιμου ακυτταρικού βιοϋλικού με βάση το αλγινικό οξύ. Από πολλές μελέτες έχει προκύψει ότι, το αλγινικό οξύ είναι μη τοξικό και βιοσυμβατό (78-81). Όμως, στο σημείο αυτό της έρευνας, απαραίτητη είναι και η δέσμευση αυξητικών παραγόντων στο υδροπήκτωμα του αλγινικού οξέος και ο έλεγχος του συνολικού αυτού βιοϋλικού σε πειραματόζωα. Τα υδροκολλοειδή, όπως το αλγινικό οξύ, παίζουν σημαντικό ρόλο στο σχεδιασμό ελεγχόμενου συστήματος μεταφοράς φαρμάκων (62, 82-84). Το μόριο του αλγινικού, με άμεση ενυδάτωση, μπορεί να δημιουργήσει ένα πήκτωμα με υψηλό ιξώδες. Αυτό, αυτομάτως, δημιουργεί ένα «εμπόδιο», μειώνοντας, έτσι, το γρήγορο ρυθμό διάχυσης διαφόρων βιομορίων από το εσωτερικό του υλικού. Στην παρούσα έρευνα, επιλέχθηκε η ενσωμάτωση αυξητικής ορμόνης (ή σωματοτροπίνης) στη μήτρα του αλγινικού υδροπηκτώματος (19, 85). Η σωματοτροπίνη είναι μια πρωτεϊνική ορμόνη στον άνθρωπο και στα ζώα, που προάγει την ανάπτυξη, τον πολλαπλασιασμό και τη διαφοροποίηση των κυττάρων. Είναι ένα μόριο πρωτεΐνης, που η πρωτοταγής δομή της οποίας αποτελείται από 191 αμινοξέα και έχει μοριακό βάρος περίπου 22 kDa. Το μόριό της συγκροτείται από τέσσερεις έλικες, οι οποίες συνδέονται μεταξύ τους με δισουλφιδικούς δεσμούς σχηματίζοντας, έτσι, κατάλληλη δομή ώστε να είναι εφικτή η σύνδεση με τον υποδοχέα της (86).

Η αυξητική ορμόνη προκαλεί αύξηση όλων σχεδόν των ιστών του σώματος. Προάγει τη μεταβολή του μεγέθους των κυττάρων και τη μίτωση, με αποτέλεσμα την αύξηση του όγκου και του αριθμού των κυττάρων. Επίσης, προκαλεί ειδική διαφοροποίηση ορισμένων τύπων κυττάρων, όπως τους οστεοβλάστες και τους μυοϊνοβλάστες. Ο κύριος μηχανισμός δράσης της αυξητικής ορμόνης, εκτός από την απευθείας επίδρασή της στα όργανα στόχους, επιτυγχάνεται μέσω των σωματομεδινών. Η αυξητική ορμόνη διεγείρει την έκκριση των σωματομεδινών, που είναι μία ομάδα ορμονών που προάγουν την κυτταρική αύξηση και διαίρεση (86). Σύμφωνα με μελέτες, η χορήγηση αυξητικής ορμόνης σε επίμυες μετά από πρόκληση εμφράγματος του μυοκαρδίου είχε ως αποτέλεσμα τη βελτίωση της επιβίωσης, μέσω της μειωμένης κυτταρικής απόπτωσης και της παθολογικής αναδιαμόρφωσης του υγιούς μυοκαρδίου (87). Σε επίπεδο κλινικών μελετών, οι πρώτες αναφορές έδειξαν σημαντική βελτίωση της καρδιακής λειτουργίας έπειτα από τη χορήγηση αυξητικής ορμόνης σε ασθενείς με ισχαιμική καρδιακή ανεπάρκεια (88). Ενθαρρυντικά αποτελέσματα καταγράφηκαν, επίσης, σε ασθενείς με καρδιακή ανεπάρκεια. Παρατηρήθηκε βελτίωση των αιμοδυναμικών παραμέτρων με τη χορήγηση αυξητικής ορμόνης τόσο στην οξεία φάση, όσο και σε χρόνια θεραπεία (89).

Έτσι, ο **5^{ος} στόχος** της παρούσας διατριβής ήταν η ενσωμάτωση αυξητικής ορμόνης (GH: growth hormone) στο υδροπήκτωμα του

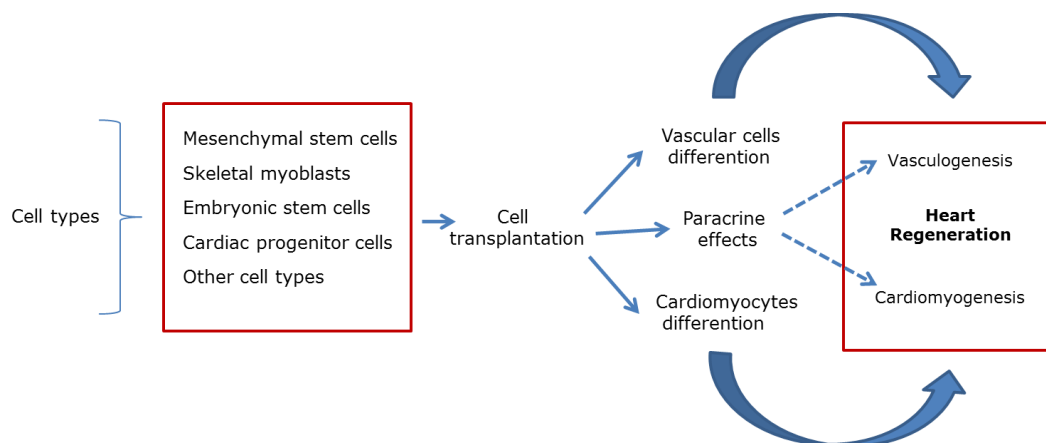
οξειδωμένου αλγινικού οξέος, η μελέτη του ρυθμού απελευθέρωσής της *in vitro*, και ο *in vivo* έλεγχος του βιοϋλικού αυτού σε ισχαιμικό μυοκάρδιο επίμυων, με μελέτη της αναδιαμόρφωσης της αριστερής κοιλίας, της αγγειογένεσης, καθώς και της συνολικής βελτίωσης της καρδιακής λειτουργίας (85, 87, 90). Η ευεργετική δράση της αυξητικής ορμόνης έπεται από οξύ έμφραγμα μυοκαρδίου είναι ευρέως γνωστή, αλλά η τοπική και σταδιακή χορήγησή της στο πάσχον μυοκάρδιο δεν έχει ακόμη μελετηθεί πλήρως (91). Η καινοτομία έγκειται στο συνδυασμό της συγκεκριμένης ορμόνης με το αλγινικό υδροπήκτωμα, με στόχο τον πλήρη *in vivo* έλεγχο (91). Για την υλοποίηση του στόχου αυτού αναπτύχθηκε ένας φορέας με βάση το αλγινικό υδροπήκτωμα, στον οποίο προσδέθηκε η GH, ώστε η GH να μεταφερθεί στοχευμένα στον ιστό και ταυτόχρονα να εξασφαλιστεί ελεγχόμενος ρυθμός απελευθέρωσής της, όταν ο φορέας αυτός εμφυτευθεί στον ιστό του μυοκαρδίου. Συγκεκριμένα, μελετήθηκαν τρεις τρόποι για τη μεταφορά και τη χορήγηση της GH στο μυοκάρδιο: (α) με «εγκλωβισμό» της στο υψηλού ιξώδους αλγινικό υδροπήκτωμα, (β) με ιοντική πρόσδεση της GH σε μαγνητικά νανοσωματίδια οξειδίου του σιδήρου (Fe_2O_3), και (γ) με ομοιοπολική πρόσδεση της GH στο αλγινικό υδροπήκτωμα.

Την τελευταία δεκαετία, η επιστήμη της νανοτεχνολογίας με εφαρμογές στη βιοϊατρική έχει εξελιχθεί σημαντικά. Η χρήση μικρών σωματιδίων οξειδίου του σιδήρου στην *in vitro* διαγνωστική εφαρμόζεται εδώ και 60 χρόνια (92). Την περασμένη δεκαετία, ολοένα και πιο αυξανόμενη ήταν η ανάπτυξη μαγνητικών νανοσωματιδίων οξειδίων του σιδήρου (κυρίως μαγκεμίτη, $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$), λόγω της εξαιρετικής βιοσυμβατότητάς τους, όπως έχει ήδη αποδειχθεί σε προηγούμενες μελέτες (93). Λόγω, των μοναδικών μηχανικών, φυσικών, χημικών και θερμικών ιδιοτήτων, τα μαγνητικά νανοσωματίδια μαγκεμίτη χρησιμοποιούνται για κυτταρικές θεραπείες, ως συστήματα μεταφοράς φαρμάκων, για αποκατάσταση ιστών, καθώς και στην υπερθερμία (94, 95). Για τους παραπάνω λόγους, στην παρούσα διατριβή, ένας από τους τρόπους πρόσδεσης της αυξητικής ορμόνης στο αλγινικό υδροπήκτωμα επιλέχθηκε να είναι η χρήση μαγνητικών νανοσωματιδίων οξειδίου του σιδήρου. Συγκεκριμένα, επιλέχθηκε η χρήση $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$ (μαγκεμίτη). Ο μαγκεμίτης είναι ένα οξείδιο του σιδήρου το οποίο ανήκει στην ομάδα των σπινελίων, με τη διαφορά ότι δεν υπάρχει ο δισθενής σίδηρος, και χαρακτηρίζεται από υψηλή σιδηρομαγνητικότητα (96, 97). Τα συγκεκριμένα μαγνητικά νανοσωματίδια μας παρασχέθηκαν ευγενικά, για τις ανάγκες της έρευνας της παρούσας διατριβής, από το εργαστήριο του Καθηγητή κ. Δεληγιαννάκη, του τμήματος Φυσικής του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων. Στην παρούσα έρευνα, η πρόσδεση της αυξητικής ορμόνης στα νανοσωματίδια μαγκεμίτη, σε ουδέτερο (φυσιολογικό) pH, οφείλεται στα διαφορετικά επιφανειακά φορτία τους

λόγω των διαφορετικών ισοηλεκτρικών σημείων (pI) της GH και των νανοσωματιδίων του Fe_2O_3 (βλ. κεφάλαιο 3).

Το τελευταίο κομμάτι της διατριβής αφορά στην ανάπτυξη αλγινικού υδροπηκτώματος ως φορέα μεταφοράς και παροχής κυττάρων στο εμφραγματικό μυοκάρδιο. Σύμφωνα με τη βιβλιογραφία, μία μεγάλη ποικιλία διαφορετικών τύπων κυττάρων (όπως embryonic stem cells, induced pluripotent stem cells, cardiac progenitor cells (CPCs), cardiomyocytes, mesenchymal stem cells, skeletal myoblasts κ.α) (78, 98, 99) μελετώνται ήδη για την αποκατάσταση της εμφραγματικής καρδιάς (100) και έχει βρεθεί ότι προάγουν την αγγειογένεση, την καρδιομυογένεση και τη δημιουργία παρακρινικών επιδράσεων (paracrine effects) (99, 101). Οι προσεγγίσεις για τη θεραπεία του εμφράγματος δια μέσου παροχής κυτταρικών δομών συνοψίζονται στην Εικόνα 19 (99).

Έτσι, ο **6^{ος} στόχος** της διατριβής ήταν να ελεγχθεί η ικανότητα διαφοροποίησης καρδιακού/ενδοθηλιακού προγονικού διπλού πληθυσμού κυττάρων σε ώριμα καρδιομυοκύτταρα ενώ αυτά ήταν εγκλωβισμένα ακόμη στην πολυμερική μήτρα του αλγινικού υδροπηκτώματος. Ο έλεγχος έγινε τόσο *in vitro*, όσο και *in vivo*, έπειτα από έγχυση του συγκεκριμένου προγονικού πληθυσμού σε υγιές μυοκάρδιο επίμυων, έχοντας ως φορέα μεταφοράς τους το αλγινικό υδροπύκτωμα. Οι αλληλεπιδράσεις μεταξύ των ενδοθηλιακών και των καρδιακών κυττάρων είναι απαραίτητες κατά την ανάπτυξη της καρδιάς.

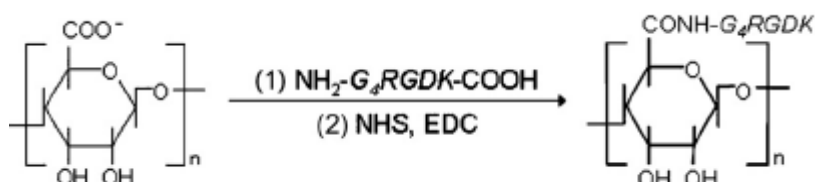


Εικόνα 19. Διάγραμμα προσέγγισης θεραπείας του εμφράγματος δια μέσου παροχής κυττάρων (99).

Έχοντας υλοποιήσει τους παραπάνω στόχους, ο (τελευταίος) **7^{ος} στόχος** της παρούσας διατριβής ήταν η επαγωγή νεοαγγειογένεσης στην εμφραγματική καρδιά μέσω παροχής ενδοθηλιακών (102) και μεσεγχυματικών κυττάρων (103), που μπορούν να μεταφερθούν με χρήση ενέσιμου αλγινικού υδροπηκτώματος. Ο *in vitro* συνδυασμός αυτών των δύο τύπων κυττάρων επιτρέπει την παρακρινή αλληλεπίδρασή τους και το

σχηματισμό ενός οργανωμένου αγγειακού δικτύου (104, 105). Ο στόχος αυτός μπορεί να διακριθεί σε τρία (3) πειραματικά μέρη.

Στο πρώτο μέρος έγινε η τροποποίηση του αλγινικού υδροπηκώματος με σκοπό να ενισχυθεί η «επικοινωνία» των κυττάρων με τη μήτρα του αλγινικού υδροπηκτώματος, η οποία, ως άμεσο (επιθυμητό) επακόλουθο, θα είχε την αύξηση της βιωσιμότητας και του πολλαπλασιασμού των κυττάρων (106). Για να γίνει αυτό, στο οξειδωμένο αλγινικό οξύ προσδέθηκε, με υδατική χημεία καρβοδιϊμιδίων, ολιγοπεπτίδιο, με σειρά αμινοξέων GGGGRGDSP (Εικόνα 20, (58)), το οποίο είναι πεπτίδιο τύπου RGD. Το πεπτίδιο RGD έχει αποδειχθεί ότι λειτουργεί ως αποτελεσματικός διαμεσολαβητής της κυτταρικής προσκόλλησης (σε πολλές επιφάνειες βιοϋλικών) και σηματοδότησης, μέσω μηχανισμών δέσμευσης ποικίλων πρωτεϊνών της εξωκυττάριας ουσίας με τους υποδοχείς ιντεγκρινών της κυτταρικής μεμβράνης (107).



Εικόνα 20. Προσθήκη πεπτιδίου (τύπου RGD) στο αλγινικό οξύ με χημεία καρβοδιϊμιδίων (58).

Στο σημείο αυτό πρέπει να σημειωθεί ότι, μία πολύ σημαντική παράμετρος που διασφαλίζει υψηλή βιωσιμότητα των κυττάρων είναι, όταν αυτά είναι προσκολλημένα στο υπόστρωμα, το υπόστρωμα αυτό να μην τα υποβάλει σε μηχανική τάση. Το αλγινικό υδροπήκτωμα που παράγεται από το αλγινικό οξύ, λόγω της μεγάλης μήκους αλυσίδας του τελευταίου (και άρα μεγάλου μοριακού βάρους, high molecular weight, HMW), παράγει σχετικά άκαμπτο υδροπήκτωμα, το οποίο, έχει βρεθεί ότι, θα υποβάλει σε υψηλή μηχανική τάση τα προσκολλημένα σε αυτό κύτταρα, με αποτέλεσμα αυτά τα κύτταρα να έχουν υψηλό κίνδυνο να εμφανίσουν πολύ υψηλή θνητότητα. Το πρόβλημα αυτό λύνεται αποτελεσματικά εάν για την προσκόλληση των κυττάρων χρησιμοποιηθεί μικρού μοριακού βάρους (low molecular weight, LMW) αλγινικό οξύ. LMW αλγινικό οξύ μπορεί να παραχθεί από όξινη διάσπαση της αλυσίδας του HMW με διάλυμα HCl, με μία πειραματική μέθοδο η οποία, μάλιστα, εμπλουτίζει το προϊόν της αντίδρασης με μονάδες G, ενώ ταυτόχρονα απομακρύνει τις ομάδες M. Όμως, η ζελατινοποίηση που προέρχεται αποκλειστικά από LMW αλγινικό οξύ αναμένεται να σχηματίσει ένα υδροπήκτωμα με πολύ χαλαρή δομή, πρακτικά εντελώς υδαρές, λόγω του μικρού μήκους των αλυσίδων του αλγινικού οξέος. Έτσι, ένα από τα καλύτερα αλγινικά υδροπηκτώματα που ευνοούν την κυτταρική προσκόλληση, τα οποία, σύμφωνα με τη διεθνή βιβλιογραφία, χρησιμοποιούνται με επιτυχία σε ανάπτυξη

κυτταροκαλλιιεργειών σε ικριώματα με πολύ υψηλή βιωσιμότητα κυττάρων, και παρασκευάστηκαν και στην παρούσα εργασία, συντίθεται με την ανάμιξη (σε αναλογία 1:1) RGD - HMW οξειδωμένου αλγινικού οξέος και RGD - LMW οξειδωμένου αλγινικού οξέος (και ακολουθεί η σύνθεση του υδροπηκτώματος με προσθήκη, στο μίγμα αυτό, ιόντων ασβεστίου).

Η δεύτερη πειραματική στόχευση του 7ου στόχου αφορούσε στην επίτευξη προσκόλλησης καλλιιεργειών ενδοθηλιακών (HUVECs) και μεσεγχυματικών κυττάρων (MSCs) στο καινοτόμο αυτό βιοϋλικό, και στην *in vitro* μελέτη της επιβίωσής τους και της ικανότητας επαγωγής νεοαγγειογένεσης που επιδεικνύουν εντός (μέσα στον κύριο όγκο, δηλαδή) του βιοϋλικού.

Το τρίτο μέρος περιελάμβανε την πλήρη *in vivo* μελέτη, σε εμφραγματικούς επίμυες, της επίδρασης του αλγινικού υδροπηκτώματος, σε όλες τις πιο ενδιαφέρουσες, (με βάση τα πειραματικά αποτελέσματα που είχαν ήδη προκύψει από το χαρακτηρισμό των διαφόρων εκδοχών και τροποποιήσεων των βιοϋλικών που είχαν παραχθεί, ιδωμένων από την οπτική των ιατρικών πρωτόκολλων που εφαρμόστηκαν), μορφές του, από το απλό αμιγές αλγινικό υδροπήκτωμα έως το συνδυασμό του με δομές κυττάρων MSCs/HUVECs σε μορφή σφαιροειδών μεθυσσελλουλόζης. Αναφορικά, όμως, με την καινοτομία, σημειώνεται ιδιαίτερα ο πλήρης ηλεκτροφυσιολογικός έλεγχος που έγινε σε εμφραγματικούς επίμυες για τον έλεγχο γένεσης πιθανών παθολογικών αρρυθμιών, κάτι που έως τώρα δεν έχει ερευνηθεί επαρκώς και έτσι υπάρχει σχετικά φτωχή τεκμηρίωση στη βιβλιογραφία. Οι αλλαγές στην αρχιτεκτονική της αριστερής κοιλίας αποτελούν το υπόστρωμα για τη δημιουργία κοιλιακής ταχυκαρδίας, που προέρχεται από την περιοχή του μυοκαρδίου ανάμεσα στο φυσιολογικό και στον εμφραγματικό ιστό. Σημαντικός παράγοντας για την αρρυθμιογένεση είναι η ταχύτητα αγωγής του δυναμικού που επηρεάζεται από τις κονεξίνες καθώς και από τον ινώδη ιστό που δημιουργείται μετά το έμφραγμα. Η καρδιακή ανεπάρκεια διαμέσου της αναδιαμόρφωσης της αριστερής κοιλίας επηρεάζει τους προαναφερθέντες μηχανισμούς, με αποτέλεσμα τη δημιουργία θανατηφόρων αρρυθμιών. Υπάρχουν ήδη μελέτες που δείχνουν τη δυνατότητα αγγειογένεσης κατά την καλλιέργεια αυτών των κυττάρων (του 7ου σκοπού) στο RGD-αλγινικό υδροπήκτωμα (57, 106), και την αλλαγή στην ηλεκτροφυσιολογική κατάσταση έπειτα από εμφύτευση παρόμοιων βιοϋλικών ή κυττάρων σε εμφραγματικό μυοκάρδιο (108-110).

2.4 Διάρθρωση της παρουσίασης των πειραμάτων και των αποτελεσμάτων της διατριβής

Η περιγραφή των πειραμάτων που διεξήχθησαν για την υλοποίηση των 7 στόχων που προαναφέρθηκαν και των αποτελεσμάτων τους περιγράφονται στο κεφάλαιο 3 και στο κεφάλαιο 4, τα οποία υποστηρίζονται, με την παράθεση πειραματικών ευρημάτων και άλλων σημαντικών στοιχείων, από τα παραρτήματα, ενώ στο κεφάλαιο 5 επιχειρείται μια γενική αποτίμησή τους, εν είδει γενικής συζήτησης, με σκοπό να καταγραφούν τα γενικά συμπεράσματα της εργασίας και να αναδειχτούν οι στόχοι για μελλοντική έρευνα.

Πιο συγκεκριμένα, το κεφάλαιο 3 περιγράφει τις ιδιότητες του αλγινικού βιοϋλικού, είτε ως απλό υδροπήκτωμα, είτε ως τροποποιημένο παράγωγο. Έμφαση δίνεται στην κατανόηση των παραγόντων που επηρεάζουν τη δικτύωση του αλγινικού υδροπηκτώματος, όπως είναι η επίδραση άλλων, εκτός του ασβεστίου, δισθενών ιόντων, της συγκέντρωσης τους, και του τρόπου που αυτά παρέχοντα στο διάλυμα (μηχανισμοί διάλυσης/διάχυσης και εσωτερικής ζελατινοποίησης). Η ερμηνεία των πειραματικών αποτελεσμάτων στο θέμα αυτό, τα οποία προέρχονται από μετρήσεις ιξώδους και από φάσματα υπερύθρου, γίνεται αξιοποιώντας τα αποτελέσματα από θεωρητικούς υπολογισμούς DFT, που ρίχνουν φως στη δομή του αλγινικού οξέος και στις διαμορφώσεις του αλγινικού υδροπηκτώματος στις περιπτώσεις που ερευνήθηκαν πειραματικά. Ο χαρακτηρισμός των υδροπηκτωμάτων ολοκληρώνεται με χαρακτηρισμό της υφής τους (σε λυοφιλοποιημένα δείγματα) και της κινητικής της χημικής βιοδιάσπασής τους σε προσομοιωμένο βιολογικό περιβάλλον φυσιολογικού ορού στους 37°C. Ακολουθεί η περιγραφή της σύνθεσης και του χαρακτηρισμού των χημικά τροποποιημένων παραγώγων που παρήχθησαν με τη χημεία των καρβοδιιμιδίων, τα οποία χρησιμοποιήθηκαν στα πειράματα που έγιναν με σκοπό την *in vivo* μελέτη της βιοαποικοδόμησης (με σήμανση με βιοτίνη), την ενίσχυση της κυτταρικής προσκόλλησης (με προσθήκη ολιγοπεπτιδίου τύπου RGD), και τη ρύθμιση της κινητικής της απελευθέρωσης αυξητικών παραγόντων *in vitro* και *in vivo*, οι οποίοι είναι ομοιοπολικά προσδεδεμένοι σε αλγινικό υδροπήκτωμα. Το κεφάλαιο ολοκληρώνεται με τη μελέτη της κινητικής της απελευθέρωσης πρωτεϊνικών παραγόντων από το αλγινικό υδροπήκτωμα, όπου οι παράγοντες αυτοί είτε είχαν απλώς εγκλωβιστεί στον όγκο του, είτε είχαν προσδεθεί με ιοντικές αλληλεπιδράσεις με τη βοήθεια νανοσωματιδίων Fe_2O_3 , είτε ήταν ομοιοπολικά συνδεδεμένοι στην αλυσίδα του αλγινικού οξέος. Τα αποτελέσματα αυτά συζητούνται υπό την προοπτική της εφαρμογής τους στα *in vitro* και στα *in vivo* πειράματα που ακολουθούν στο επόμενο κεφάλαιο.

Στο κεφάλαιο 4, η πρώτη ενότητα, 4.1, παρουσιάζει τα πειράματα και τα αποτελέσματα των *in vitro* μελετών με κυτταροκαλλιέργειες των διαφόρων τύπων κυττάρων που αναφέρθηκαν παραπάνω στην πολυμερική μήτρα του αλγινικού υδροπηκτώματος, και στη δεύτερη ενότητα, 4.2, παρατίθενται τα πειράματα και τα αποτελέσματα από την υλοποίηση των ιατρικών πρωτόκολλων εμφύτευσης (*in vivo*) του αλγινικού υδροπηκτώματος, με και χωρίς αυξητικούς παράγοντες, και με και χωρίς δομές κυττάρων, σε πειραματόζωα. Πρέπει εδώ να τονιστεί ότι, τα *in vitro* και *in vivo* πειράματα του κεφαλαίου 4 δεν είναι απλώς ένας ακόμα έλεγχος για να ολοκληρωθεί ο χαρακτηρισμός του υδροπηκτώματος που παρασκευάστηκε στο κεφάλαιο 3, αλλά είναι απολύτως απαραίτητα συστατικά της σύνθεσης του ικρίωματος της ιστοτεχνολογίας για τη θεραπεία του εμφραγματικού μυοκαρδίου, όπως περιγράφηκε στην αρχή αυτού του κεφαλαίου. Δηλαδή, υπενθυμίζεται ότι, ένα ικρίωμα της ιστοτεχνολογίας, όπως αυτό που κατασκευάστηκε στην παρούσα εργασία, είναι το αποτέλεσμα τριών βασικών συνιστωσών: της συνιστώσας της χημείας και της μηχανικής του υλικού, της βιολογικής συνιστώσας, που δεν είναι άλλη από τις καλλιέργειες των κυττάρων που επιλέγονται ως καταλληλότερα για τη συγκεκριμένη εφαρμογή, και της ιατρικής συνιστώσας, που σχετίζεται με τα ιατρικά πρωτόκολλα που θα εφαρμοστούν, ώστε τόσο η βιολογική συνιστώσα όσο και η συνιστώσα της μηχανικής των υλικών (Materials Engineering) να δώσουν μαζί της τη μέγιστη απόδοση στη θεραπεία στη συγκεκριμένη εφαρμογή. Συνεπώς, η αναφορά σε ικρίωματα της ιστοτεχνολογίας θεωρεί ισότιμες, τόσο σε συνεισφορά, όσο και σε βαρύτητα και σπουδαιότητα και τις τρεις αυτές συνιστώσες. Με αυτό το πνεύμα παρατίθενται και συζητούνται τα πειράματα που διεξήχθησαν στα κεφάλαια 3 και 4, καθώς και τα αποτελέσματα που εξήχθησαν από αυτά τα πειράματα.

Η γενική συζήτηση στο κεφάλαιο 5 συγκροτείται από τρία διακριτά μέρη. Αυτό έγινε για να αναδειχτεί στο κεφάλαιο αυτό ότι, τα πιο σημαντικά, από άποψη καινοτομίας, ευρήματα της όλης έρευνας που αναπτύχθηκε στην παρούσα διατριβή εστιάζονται ουσιαστικά προς τρεις βασικές κατευθύνσεις. Έτσι, το πρώτο μέρος στοχεύει στη συζήτηση της σπουδαιότητας, για την παρούσα εφαρμογή, του μέγιστου της δικτύωσης του αλγινικού υδροπηκτώματος που επιτυγχάνεται με παρουσία συγκεκριμένης ποσότητας ιόντων Ca^{2+} . Το δεύτερο μέρος εστιάζεται στην κινητική της απελευθέρωσης των πρωτεϊνικών και αυξητικών παραγόντων από το αλγινικό υδροπήκτωμα, υπό το φως της εφαρμογής του στη θεραπεία του εμφραγματικού μυοκαρδίου σύμφωνα με τα ιατρικά πρωτόκολλα που εφαρμόστηκαν στην παρούσα εργασία. Στο τελευταίο μέρος, η γενική συζήτηση στοχεύει να παρουσιάσει μία εμπεριστατωμένη αποτίμηση με βάση την αξιολόγηση των ευρημάτων στα *in vitro* και στα *in*

νίνο πειράματα, με σκοπό να αναδείξει την αξία και την προοπτική του υδροπηκτώματος που αναπτύχθηκε στην παρούσα εργασία στην κλινική πράξη για τη συγκεκριμένη ιατρική εφαρμογή.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3: ΑΝΑΠΤΥΞΗ
ΙΚΡΙΩΜΑΤΟΣ
ΑΛΓΙΝΙΚΟΥ
ΥΔΡΟΠΗΚΤΩΜΑΤΟΣ

3. ΑΝΑΠΤΥΞΗ ΙΚΡΙΩΜΑΤΟΣ ΑΛΓΙΝΙΚΟΥ ΥΔΡΟΠΗΚΤΩΜΑΤΟΣ

Στο κεφάλαιο αυτό παρουσιάζονται η σύνθεση του αλγινικού υδροπηκτώματος με διάφορες μεθόδους, ο χαρακτηρισμός του, καθώς και τα υλικά που προέκυψαν από τη χημική τροποποίησή του. Επίσης, παρουσιάζεται η ικανότητα πρόσδεσης και απελευθέρωσης από το αμιγές και το χημικά τροποποιημένο αλγινικό υδροπήκτωμα πρωτεϊνικών (BSA και ολιγοπεπτίδια τύπου RGD) και αυξητικών παραγόντων (σοματοτροπίνη). Πέραν από το χαρακτηρισμό, κάποια από τα υλικά αυτά παρασκευάστηκαν με σκοπό να χρησιμοποιηθούν στις καλλιέργειες κυττάρων και στις εμφυτεύσεις σε πειραματόζωα.

3.1 Υλικά και πειραματική διαδικασία

3.1.1 Υλικά και χημικά αντιδραστήρια

Για τη διεξαγωγή των πειραμάτων χρησιμοποιήθηκαν τα χημικά αντιδραστήρια που φαίνονται στον Πίνακας 1.

Στα πειράματα αυτά επιλέχθηκε το υψηλού μοριακού βάρους (HMW) αλγινικό οξύ από την εταιρεία Pronova, με έδρα το Oslo της Νορβηγίας, λόγω χαμηλής περιοκτικότητας σε ενδοτοξίνες ($[EU/g] \leq 100$), το οποίο είναι πιο ασφαλές στις μετέπειτα καλλιέργειες κυττάρων.

Επίσης, το νερό που χρησιμοποιήθηκε για την παρασκευή και το χαρακτηρισμό του ικριώματος του αλγινικού υδροπηκτώματος ήταν υπερκαθαρό και συγκεκριμένα λήφθηκε έπειτα από το πέρασμα δις-αποσταγμένου νερού (χαρακτηρισμένο με μετρήσεις ηλεκτρικής αγωγιμότητας στο εργαστήριο Φυσικοχημείας του ΤΜΕΥ) από συσκευή με ενεργό άνθρακα (Millipore). Το νερό αυτό στη συνέχεια περιγράφεται ως νερό Millipore.

Πίνακας 1. Κατάλογος χημικών αντιδραστηρίων που χρησιμοποιήθηκαν για τη διεξαγωγή των πειραμάτων που αναφέρονται στο Κεφ. 3.

Αντιδραστήριο	Χημικός τύπος	Εταιρεία (Κωδικός)	Πείραμα (Κεφάλαιο στη διατριβή)
Alginic acid sodium salt	$C_6H_9NaO_7$	Pronova LVG - Norway	Ανάπτυξη βιοϋλικού (Κεφ. 3)
Millipore distilled water	H_2O		Ανάπτυξη (Κεφ. 3)
Calcium chloride dehydrated	$CaCl_2$	Fluka (97%, 21075)	Ανάπτυξη βιοϋλικού (Ενότητες 3.2.1 & 3.2.4)
Calcium carbonate	$CaCO_3$	Fluka ($\geq 99\%$, 21075)	Ανάπτυξη βιοϋλικού (Ενότητα 3.2.2)
Gluconolactone (GDL)	$C_6H_{10}O_6$	Sigma Ald (G2164)	Ανάπτυξη βιοϋλικού (Ενότητα 3.2)
Magnesium chloride - 6 - hydrate	$MgCl_2 \cdot 6H_2O$	Sigma Ald (G2164)	Ανάπτυξη βιοϋλικού (Ενότητα 3.2.5)
Barium carbonate	$BaCO_3$	Sigma Ald (289833)	Ανάπτυξη βιοϋλικού (Ενότητα 3.2.5)
Strontium carbonate	$SrCO_3$	Sigma Ald (289833)	Ανάπτυξη βιοϋλικού (Ενότητα 3.2.5)
Anhydrous ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA)	$C_{10}H_{16}N_2O_8$	Sigma Ald (99% titration)	Ανάπτυξη βιοϋλικού (Ενότητα 3.2.3)
Sodium Hydroxide	$NaOH$	Merck (1.06498)	Απόκτηση LMW αλγινικού (Ενότητα 3.5.2)
Biotin Hydrazide	$C_{10}H_{18}N_4O_2S$	Sigma Ald (B7639)	Πρόσδεση βιοτίνης (Ενότητα 3.5.1)
Sodium Chloride	$NaCl$	Sigma Ald (S7653)	Απόκτηση LMW αλγινικού (Ενότητα 3.4)
Hydrochloric acid fuming 37%	HCl	Merck (100317)	Απόκτηση LMW αλγινικού (Ενότητα 3.5.2)
1-ethyl-[3-(dimethylamino)propyl]-3-ethylcarbodiimide HCl	$C_8H_{17}N_3 \cdot HCl$	Sigma Ald (E1769)	Πρόσδεση βιομορίων (Ενότητα 3.5)
N-Hydroxysulfosuccinimide sodium salt	$C_4H_4NNaO_6S$	ThermoFisher (PG82071)	Πρόσδεση βιομορίων (Ενότητα 3.5)
Somatotropin	Growth Hormone	Sigma Ald (S8648)	Πρόσδεση GH (Ενότητα 3.5.3)
Bovine Serum Albumin	BSA	Sigma Ald (A2058)	Πρόσδεση πρωτεϊνικών παραγόντων (Ενότητες 3.5 και 3.6)
Phosphate Buffer Saline	PBS	Sigma Ald (806544)	Καθαρισμός με MWCO μεμβράνη (Ενότητα 3.5)
Normal Saline	0.9 % $NaCl$	Εμπορικό ιατρικό σκεύασμα	Πρόσδεση βιομορίων (Ενότητα 3.5)
2-[N-morpholino] ethanesulfonic acid (MES) Buffer	"MES hydrate"	Sigma Ald (M8250)	
Activated Carbon	Activated charcoal	Sigma Ald (C9157)	Καθαρισμός LMW (Ενότητα 3.5)
GGGGRGDSP peptide	"RGD"	Eurogentec (758 g/mol)	Πρόσδεση πεπτιδίου (Ενότητα 3.5)
Coomassie Brilliant Blue	$C_{47}H_{48}N_3NaO_7S_2$	Sigma Ald (B0770)	Απελευθέρωση πρωτεϊνικών παραγόντων (Ενότητα 3.6)

3.1.2 Παρασκευή υδροπηκτωμάτων

Παρασκευάστηκαν τρία διαφορετικά υδροπηκτώματα (hydrogels) αλγινικού οξέος, 1%, 2% και 3% κ.β. Το άλας του νατρίου του αλγινικού οξέος, το οποίο ήταν το αρχικό αντιδραστήριο, ήταν σε μορφή λευκής σκόνης. Ο τελικός όγκος του κάθε υδροπηκτώματος ήταν 20 ml. Για την παρασκευή κάθε διαλύματος (για τα υδροπηκτώματα 1, 2 ή 3%), ζυγίστηκαν οι αντίστοιχες ποσότητες του αλγινικού οξέος, και διαλύθηκαν σε Millipore αποσταγμένο νερό. Το αλγινικό οξύ διαλύθηκε, υπό συνεχή ανάδευση του διαλύματος με τη χρήση μαγνητικού αναδευτήρα και λουτρού υπερήχων, εναλλάξ. Είναι απαραίτητο να σημειωθεί ότι, για τη διάλυση της σκόνης του αλγινικού οξέος απαιτούνταν αρκετός χρόνος έως ότου διαλυθεί ολόκληρη η ποσότητα του αλγινικού οξέος και ληφθεί διαυγές διάλυμα. Στα συνέχεια, στα αλγινικά διαλύματα γινόταν προσθήκη της πηγής των απαραίτητων ιόντων ζελατινοποίησης.

Στην εργασία αυτή, η παρασκευή αλγινικών υδροπηκτωμάτων βασίστηκε σε δύο κύριους μηχανισμούς, της διάλυσης/διάχυσης και της εσωτερικής ζελατινοποίησης. Υποπερίπτωση της τελευταίας είναι η μέθοδος σχηματισμού με τη χρήση του συμπλόκου Ca-EDTA.

Παρασκευή υδροπηκτώματος με βάση το μηχανισμό διάλυσης/διάχυσης

Τα πρώτα υδροπηκτώματα παρασκευάστηκαν με χρήση άνυδρου χλωριούχου ασβεστίου ως πηγή των απαραίτητων ιόντων ζελατινοποίησης (Πίνακας 2). Αρχικά, ζυγίστηκε η ποσότητα του αλγινικού οξέος, η ποσότητα του CaCl_2 , ως πηγή δισθενών κατιόντων, και η ποσότητα της GDL, σύμφωνα με τον Πίνακα 2. Ακολούθησε η διάλυση της σκόνης του αλγινικού οξέος σε 10 ml Millipore αποσταγμένο νερό (διάλυμα Α) και η διάλυση της σκόνης του CaCl_2 και της GDL σε 10 ml αποσταγμένο νερό (διάλυμα Β). Στη συνέχεια, στο διάλυμα Α προστέθηκε υπό ήπια μαγνητική ανάδευση, στάγδην, το διάλυμα Β. Το υδροπήκτωμα σχηματίστηκε εντός δύο (2) λεπτών. Η ίδια διαδικασία ακολουθήθηκε για την παρασκευή των υδροπηκτωμάτων με συγκέντρωση 1%, 2% και 3% (Πίνακας 2). Ο σχηματισμός του υδροπηκτώματος με την ταχεία παροχή ιόντων Ca^{2+} στο διάλυμα του αλγινικού, όπως περιγράφηκε παραπάνω, γίνεται, όπως ονομάζεται και στη βιβλιογραφία, με το μηχανισμό *διάλυσης/διάχυσης*.

Πίνακας 2. Στοιχεία για τα αντιδραστήρια και τις ποσότητές τους που χρησιμοποιήθηκαν για την παρασκευή 20 ml αλγινικών υδροπηκτωμάτων.

Κωδική ονομασία υδροπηκτώματος	Αλγινικό οξύ (g)	Πηγή αλκαλικών γαιών	Ποσότητα αλάτων αλκαλικών γαιών (mg)	GDL (mg)
1%	0,2	CaCl ₂	9,3	30
		CaCO ₃	8,3	30
		MgCl ₂ ·6H ₂ O	12,8	30
		SrCO ₃	12,25	100
		BaCO ₃	16,42	100
2%	0,4	CaCl ₂	18,6	60
		CaCO ₃	16,7	60
		MgCl ₂ ·6H ₂ O	25,6	60
		SrCO ₃	24,5	200
		BaCO ₃	32,8	200
3%	0,6	CaCl ₂	27,9	90
		CaCO ₃	25	90
		MgCl ₂ ·6H ₂ O	38,4	90
		SrCO ₃	36,8	400
		BaCO ₃	49	400

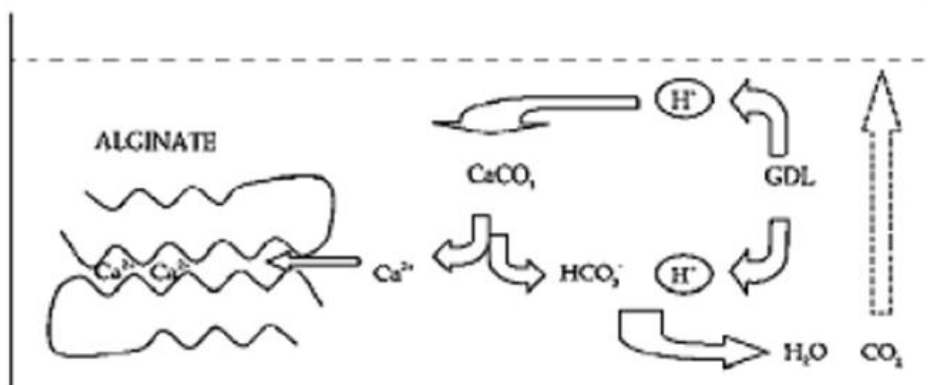
Παρασκευή υδροπηκτώματος με βάση το μηχανισμό εσωτερικής ζελατινοποίησης

Όπως αναφέρθηκε και στο κεφάλαιο 2, τα ιόντα Ca²⁺ οδηγούν σε υψηλού ιξώδους, και συνεπώς υψηλής δικτύωσης, υδροπηκτώματα αλγινικού οξέος (43). Μία πολύ σημαντική παράμετρος στη σύνθεση αυτών των υδροπηκτωμάτων είναι ο τρόπος που τα ιόντα ασβεστίου παρέχονται στο διάλυμα του αλγινικού οξέος και είναι διαθέσιμα προς συμπλοκοποίηση με τις ομάδες του γουλουρονικού οξέος (G Blocks) (70). Έτσι, στην παρούσα διατριβή μελετήθηκε η σταδιακή παροχή των ιόντων Ca²⁺ στο αλγινικό διάλυμα. Ο μηχανισμός αυτός ονομάζεται *εσωτερική ζελατινοποίηση*. Συγκεκριμένα, έλαβε χώρα η διάλυση του CaCO₃ σε περιβάλλον ήπια όξινο pH, σύμφωνα με την αντίδραση που περιγράφεται από τη χημική εξίσωση που ακολουθεί:



Το CaCO₃ είναι πρακτικά αδιάλυτο σε ουδέτερο pH ($K_{sp} = 4.8 \times 10^{-9}$, στους 25 °C). Όμως, διαλύεται εύκολα σε όξινο περιβάλλον. Η GDL, που είναι ένα ασθενές οργανικό οξύ, διαλυόμενη στο νερό δημιουργεί ένα ήπια όξινο διάλυμα με pH ~3-4. Επομένως, αυτό το ελαφρώς όξινο διάλυμα αναμένεται να ευνοήσει τη διαλυτοποίηση, με αργούς ρυθμούς, της σκόνης

του CaCO_3 . Με τον τρόπο αυτό, παρέχονται στο διάλυμα του αλγινικού οξέος, με αργό ρυθμό, ιόντα Ca^{2+} , τα οποία μπορούν να συμπλοκοποιηθούν με το αλγινικό οξύ προς σχηματισμό υδροπηκτώματος (Εικόνα 21, (70)).



Εικόνα 21. Μηχανισμός μεθόδου εσωτερικής ζελατινοποίησης (70).

Συνεπώς, ενώ με τη χρήση ευδιάλυτου CaCl_2 , όλο το ασβέστιο παρέχεται σε μορφή ιόντων στο διάλυμα ακαριαία, με το CaCO_3 παρέχεται όλο το ασβέστιο αλλά σταδιακά.

Για την παρασκευή των αλγινικών υδροπηκτωμάτων με χρήση, ως πηγής ασβεστίου, σκόνης ανθρακικού ασβεστίου (CaCO_3), οι υπολογισμοί έγιναν έτσι ώστε η ποσότητα άλατος που ζυγίζονταν, να ήταν τόση ώστε να διασφαλίζεται ότι μέσα στο διάλυμα θα υπήρχε η ίδια ακριβώς ποσότητα mol δισθενών κατιόντων (η) όση υπολογίστηκε παραπάνω, στην περρίπτωση του CaCl_2 (Πίνακας 2). Στον Πίνακα 2 παρατίθενται συνοπτικά οι ποσότητες όλων των αντιδραστηρίων για την παρασκευή αυτών των υδροπηκτωμάτων.

Για την παρασκευή του υδροπηκτώματος με τη μέθοδο αυτή, χρησιμοποιήθηκαν δύο φιαλίδια Α και Β. Το φιαλίδιο Α περιείχε το διάλυμα του αλγινικού με την ποσότητα του CaCO_3 , όγκου 10 ml. Το φιαλίδιο Β περιείχε το υδατικό διάλυμα της GDL, όγκου 10 ml. Το διάλυμα της GDL του φιαλιδίου Β προστέθηκε, στάγδην, υπό ανάδευση, στο φιαλίδιο Α. Για τη μελέτη της κινητικής της ζελατινοποίησης, η οποία έλαβε χώρα σε θερμοκρασία δωματίου, ως χρόνος $t=0$ ορίστηκε η στιγμή της ανάμιξης των περιεχομένων των δύο φιαλιδίων.

Παρασκευή υδροπηκτώματος με άλλα δισθενή ιόντα αλκαλικών γαιών

Επίσης, ελέγχθηκε η ικανότητα σχηματισμού πηκτώματος και με άλλες πηγές δισθενών κατιόντων αλκαλικών γαιών, και συγκεκριμένα με χρήση ιόντων μαγνησίου (Mg^{2+}), τα οποία προήλθαν από διάλυση σκόνης ένυδρου άλατος χλωριούχου μαγνησίου ($\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$), ιόντων στροντίου (Sr^{2+}), τα οποία προήλθαν από διάλυση σκόνης ανθρακικού στροντίου

(SrCO_3), και ιόντων βαρίου (Ba^{2+}), τα οποία προήλθαν από διάλυση σκόνης ανθρακικού βαρίου (BaCO_3). Για το σχηματισμό του αλγινικού ηηκτώματος του Mg, χρησιμοποιήθηκε ο μηχανισμός διάλυσης/διάχυσης. Τα άλλα δύο ηηκτώματα, του Sr και του Ba, παρασκευάστηκαν με το μηχανισμό της εσωτερικής μεθόδου ζελατινοποίησης, δηλαδή έγινε και προσθήκη GDL. Στον Πίνακα 2 παρέχονται όλες οι πληροφορίες για την παρασκευή τους.

Παρασκευή υδροηηκτώματος με βάση το χηλικό σύμπλοκο Ca-EDTA

Εκτός από τα παραπάνω, έγινε μελέτη παρασκευής αλγινικού υδροηηκτώματος Ca χρησιμοποιώντας το σύμπλοκο Ca - EDTA. Η πειραματική διαδικασία σύνθεσης αυτών των υδροηηκτωμάτων ήταν λίγο διαφορετική από αυτήν που προαναφέρθηκε. Αρχικά, παρασκευάστηκε υδατικό διάλυμα CaCl_2 . Στη συνέχεια, προστέθηκε στο διάλυμα η απαραίτητη ποσότητα EDTA, που υπολογίστηκε ώστε να συμπλοκοποιηθούν όλα τα ιόντα Ca^{2+} . (Επειδή το EDTA είναι δυσδιάλυτο στο νερό προστέθηκε μικρή ποσότητα διαλύματος NaOH). Μόλις αυτό γινόταν διαυγές, στο διάλυμα αυτό προσθέταμε, υπό συνεχή ανάδευση, τη σκόνη του αλγινικού οξέος, στις ποσότητες και όπως ακριβώς αναφέρθηκε παραπάνω για την περίπτωση του CaCl_2 . Μετά την πλήρη διάλυση και του αλγινικού οξέος, το διάλυμα αυτό αναμιγνυόταν με το αντίστοιχο διάλυμα της GDL που περιείχε την ποσότητα της GDL που είχε και στην περίπτωση του διαλύματος με το CaCO_3 .

Το EDTA δρα ανταγωνιστικά, ως προς τη δέσμευση των ιόντων Ca^{2+} , στο αλγινικό οξύ, λόγω της ικανότητάς του να δημιουργεί χηλικά σύμπλοκα με τα ιόντα Ca^{2+} . Επομένως, εδώ μελετήθηκε η σταδιακή απελευθέρωση των ιόντων Ca^{2+} από το σύμπλοκο Ca - EDTA και η ταυτόχρονη δέσμευσή τους από το μόριο του αλγινικού οξέος.

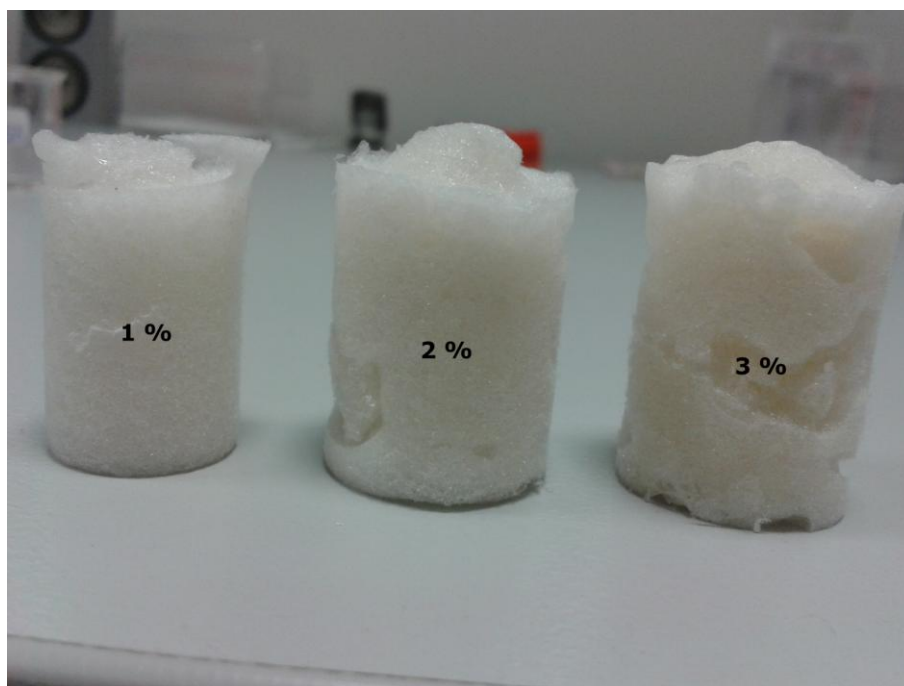
Για να διευκολυνθεί ο αναγνώστης, η πειραματική διαδικασία ανάπτυξης των υδροηηκτωμάτων αυτών (ποσότητες αντιδραστηρίων) παρουσιάζεται στην ενότητα 3.2.3, μαζί με τα πειραματικά ευρήματα.

Κατεργασία υδροηηκτωμάτων

Ιδιαίτερη προσοχή κατά την παρασκευή των αλγινικών υδροηηκτωμάτων δόθηκε και στην εφαρμογή αποστειρωτικών μεθόδων. Αρχικά, πριν την έναρξη των πειραμάτων, γινόταν ενδελεχής καθαρισμός των σκευών και των εργαλείων που χρησιμοποιούνταν με δισ-αποσταγμένο νερό καθώς και με απόλυτη αιθανόλη. Τα σκευή, στη συνέχεια, τοποθετούνταν σε πυριαντήριο στους $90\text{ }^\circ\text{C}$ για να στεγνώσουν και να απομακρυνθούν τυχόν κατάλοιπα της αιθανόλης. Επίσης, έγινε έκθεση σε υπεριώδη ακτινοβολία, με χρήση λάμπας UV στα 280 nm , για ορισμένα λεπτά, των γυάλινων σκευών και των εργαλείων καθώς και των κόνεων των πρώτων υλών. Η

χρήση αποστειρωτικών φίλτρων 0,2 μm (Whatman) ήταν ιδιαίτερη σημαντική για την αποστείρωση των διαλυμάτων.

Σε αρκετά από τα υδροπηκτώματα που παρασκευάστηκαν έγινε λυοφυλοποίηση. Συγκεκριμένα, ορισμένος όγκος από το κάθε υδροπήκτωμα, μετά από ψύξη στους -60°C , τοποθετήθηκε σε συσκευή λυοφιλοποίησης (Biobase Bioindustry, Shandong, Co. Ltd). Έπειτα από την παραμονή τους εκεί για 24 h, ελήφθησαν πορώδεις αφροί (Εικόνα 22). Λυοφιλοποίηση έγινε και σε διαλύματα αλγινικού οξέος.



Εικόνα 22. Αφροί από λυοφιλοποιημένα υδροπηκτώματα αλγινικού οξέος (παρασκευασμένα με χρήση CaCl_2).

3.1.3 Πειραματικές μέθοδοι χαρακτηρισμού των υδροπηκτωμάτων

Ο χαρακτηρισμός των ιδιοτήτων των υδροπηκτωμάτων έγινε με μετρήσεις δυναμικού ιξώδους, με φασματοσκοπία FT-IR, με μελέτη της μικροδομής τους με ηλεκτρονική μικροσκοπία (SEM) και με ποροσιμετρία υδραργύρου. Επίσης, για την αποσαφήνιση της δομής τους και την ερμηνεία των πειραματικών αποτελεσμάτων, έγιναν και θεωρητικοί κβαντομηχανικοί υπολογισμοί DFT (Density Functional Theory).

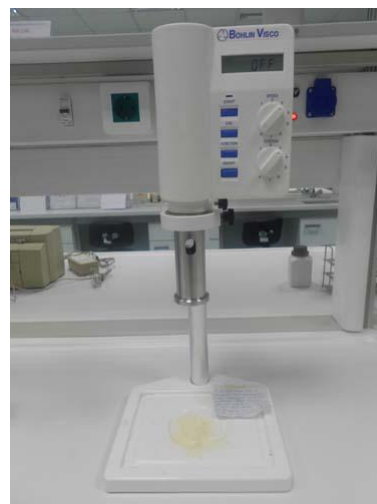
Ιξωδομετρία

Για τις μετρήσεις του ιξώδους των διαλυμάτων και των πηκτωμάτων, χρησιμοποιήθηκε το ιξωδόμετρο Bohlin Visco 88 (Εικόνα 23), της εταιρείας Malvern Instruments.

Η αρχή λειτουργίας αυτού του τύπου ιξωδομέτρου βασίζεται στο εξής: Το προς μέτρηση υγρό (καθαρό υγρό, διάλυμα, αιώρημα, πήκτωμα) τοποθετείται μέσα σε ένα μεταλλικό κυλινδρικό δοχείο. Μέσα στο δοχείο εμβαπτίζεται συμπαγής μεταλλικός κύλινδρος, ο οποίος βυθίζεται εξ ολοκλήρου μέσα στο υγρό. Η απόσταση μεταξύ των τοιχωμάτων του δοχείου και του κυλίνδρου είναι πάρα πολύ μικρή (1 mm).



(α)



(β)

Εικόνα 23. Το ιξωδόμετρο (Bohlin Visco 88) με τοποθετημένο τον κύλινδρο περιστροφής (στα αριστερά του, σε κάθετη θέση, διακρίνεται ο μεταλλικός αισθητήρας καταγραφής της θερμοκρασίας) και το αντίστοιχο δοχείο τοποθέτησης του υγρού (α) πριν την εμβάπτιση, και (β) μετά την τοποθέτηση στο όργανο και την εμβάπτιση του κυλίνδρου στο, υπό μέτρηση, υγρό.

Ο κύλινδρος αρχίζει να περιστρέφεται με συγκεκριμένη ταχύτητα μέσα στο υγρό (Πίνακας 3). Όσο πιο ιξώδες είναι το υγρό, τόσο πιο μεγάλη αντίσταση έχει ο κύλινδρος να περιστραφεί. Όσο πιο λεπτόρευστο είναι το υγρό, τόσο πιο εύκολα ο κύλινδρος περιστρέφεται μέσα στο υγρό.

Πίνακας 3. Ταχύτητες περιστροφής ιξωδομέτρου σε rpm και Hz.

Ταχύτητα	rpm	Hz
1	20	0.33
2	35	0.58
3	61	1.02
4	107	1.78
5	187	3.12
6	327	5.45
7	572	9.53
8	1000	16.67

Το ιξωδόμετρο μετράει αυτήν την αντίσταση στην περιστροφή του κυλίνδρου μέσα στο υγρό. Για να είναι αξιόπιστες οι μετρήσεις, ο κύλινδρος πρέπει να είναι ολόκληρος βυθισμένος στο υγρό (και να μην επιπλέει ή να

είναι μόνο μέρος του εμβαπτισμένο) καθώς και η ροή στο διάστημα κυλίνδρου-τοιχώματος του δοχείου να είναι στρωτή. Η μέθοδος αυτή δεν ενδείκνυται σε πολύ λεπτόρευστα υγρά, όπως νερό ή οργανικούς διαλύτες (για τις περιπτώσεις αυτές, χρησιμοποιούνται ιξωδόμετρα εκροής από στενό στόμιο και μετράται ο χρόνος εκροής σταθερού όγκου υγρού). Αντίθετα, είναι ιδανική για μετρήσεις αρκετά παχύρευστων υγρών, αιωρημάτων κλπ. Για το λόγο αυτό, θεωρείται ιδανική για τις μετρήσεις του ιξώδους των υδροπηκτωμάτων της παρούσας εργασίας.

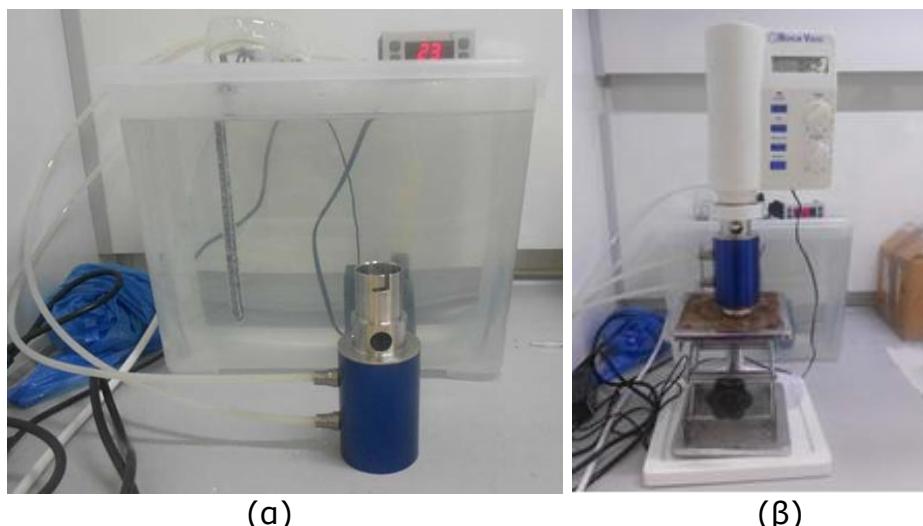
Το συγκεκριμένο ιξωδόμετρο, αφενός είναι εύκολο στη χρήση του, αφετέρου παρέχει ακριβείς μετρήσεις δυναμικού ιξώδους, ροπής και ρυθμού διάτμησης, με ταυτόχρονη καταγραφή και της θερμοκρασίας. Το ιξωδόμετρο μπορεί να κάνει μετρήσεις με τρεις διαφορετικούς ομόκεντρους κυλίνδρους με διαφορετική διάμετρο και δοχεία (ανάλογα με τον όγκο του δείγματος που θα μετρηθεί). Στην Εικόνα 24 φαίνονται οι διαφορετικοί κύλινδροι και τα αντίστοιχα δοχεία.



Εικόνα 24. Σύστημα κυλίνδρου-δοχείου C30, C25 και C14.

Στην παρούσα διατριβή, χρησιμοποιήθηκε το σύστημα C30 και θερμοστατούμενο C30 για μετρήσεις σε θερμοκρασία περιβάλλοντος και στους 37°C, αντίστοιχα (Εικόνα 25).

Σύμφωνα με τις οδηγίες χειρισμού, το ιξωδόμετρο έχει τη δυνατότητα, να κάνει μετρήσεις σε τιμές ροπής ανάμεσα σε 0,5 – 9,5 mN·m. Εάν η ροπή είναι μικρότερη από 0,5 mN·m, τότε πρέπει να χρησιμοποιηθεί περισσότερο ευαίσθητο σύστημα, δηλαδή κύλινδρος με μεγαλύτερη διάμετρο, ή μεγαλύτερη ταχύτητα. Εάν η ροπή είναι μεγαλύτερη από 9,5 mN·m, τότε πρέπει να χρησιμοποιηθεί λιγότερο ευαίσθητο σύστημα, δηλαδή κύλινδρος με μικρότερη διάμετρο, ή χαμηλότερη ταχύτητα περιστροφής.



Εικόνα 25. Μετρήσεις ιξώδους σε σταθερή θερμοκρασία: (α) το θερμοστατούμενο δοχείο (μπλέ κύλινδρος) θερμοστατείται με παροχή νερού σταθερής θερμοκρασίας και στο κέντρο του τοποθετείται ο κύλινδρος C30, και (β) τοποθέτηση όλου του συστήματος στη συσκευή του ιξωδομέτρου.

Η θερμοστάτιση γίνεται με διέλευση νερού στο μπλέ μανδύα που φαίνεται στην Εικόνα 25. Μέσα στο μανδύα τοποθετείται το θερμοστατούμενο μεταλλικό δοχείο C30 (το οποίο εφαρμόζει απολύτως). Η θερμοστάτιση γίνεται ταχύτητα (σε λιγότερο από 1 min) επειδή τα δοχεία και ο κύλινδρος είναι μεταλλικά ενώ το πάχος του υγρού ανάμεσα στο δοχείο και στον κύλινδρο είναι πολύ μικρό. Η πλαστική δεξαμενή του θερμοστάτη, η οποία περιέχει 25 l αποσταγμένου νερού, αποτελείται από ένα μικρό κυκλοφορητή νερού που τροφοδοτεί το μανδύα (από την κάτω οπή), μία αντίσταση και ένα θερμοστάτη, ο οποίος στη συγκεκριμένη εργασία ρυθμιζόταν στους 37°C ($\pm 1^{\circ}\text{C}$).

Στην παρούσα διατριβή, με τη χρήση του ιξωδομέτρου μετρήθηκαν η ροπή (M), το δυναμικό ιξώδες (η) και ο ρυθμός διάτμησης ($\dot{\gamma}$) όλων υδροηλεκτρικών σε διάφορες ταχύτητες περιστροφής (στα αποτελέσματα παρουσιάζονται οι τιμές του δυναμικού ιξώδους). Ταυτόχρονα, το όργανο κατέγραφε και τις τιμές της θερμοκρασίας (θ) στο υγρό.

Ακολουθήθηκαν διάφορες πειραματικές διαδικασίες μέτρησης του ιξώδους των υλικών που παρασκευάστηκαν (π.χ. πριν, κατά τη διάρκεια και μετά το σχηματισμό του πηκτώματος). Σε κάθε περίπτωση, το κάθε πήκτωμα ή διάλυμα τοποθετούνταν στο ειδικό κυλινδρικό δοχείο (C30) για μικρό χρονικό διάστημα μέχρι να θερμοστατηθεί. Μία μέθοδος μετρήσεων ήταν η πρώτη μέτρηση να γίνεται στην ταχύτητα 1. Μετά την καταγραφή των μετρήσεων των προαναφερθέντων μεγεθών στην ταχύτητα αυτή, η ταχύτητα περιστροφής αυξανόταν στην αμέσως επόμενη ταχύτητα, καταγράφονταν οι μετρήσεις, και το ίδιο επαναλαμβανόταν μέχρι την ταχύτητα 8. Επίσης, έγινε και μελέτη της επίδρασης του χρόνου περιστροφής στα μεγέθη της ροπής, του δυναμικού ιξώδους και του

ρυθμού διάτμησης. Για τις μετρήσεις αυτές ορίστηκε ως ταχύτητα περιστροφής η ταχύτητα 4 (107 rpm, 1,78 Hz) καθ'όλη τη διάρκεια του πειράματος, πάντα σε σταθερή θερμοκρασία. Οι τιμές των παραπάνω μεγεθών καταγράφονταν κάθε 5 ή 10 min για συνολικό χρόνο πειράματος 100 min (κάποια πειράματα είχαν μεγαλύτερη διάρκεια, 300 min με ταχύτητα περιστροφής 3) χωρίς να σταματάει καθόλου η περιστροφή του κυλίνδρου μέσα στο υδροπήκτωμα ή στο διάλυμα.

Στην παρούσα διατριβή, με τις μετρήσεις της ιξωδομετρίας μελετήθηκαν:

- η κινητική της ζελατινοποίησης, και
- ο πιθανός υποβιβασμός των ιδιοτήτων του υδροπηκτώματος (degradation) μετά το σχηματισμό του.

Σε ότι αφορά στην κινητική της ζελατινοποίησης, η οποία μελετήθηκε σε θερμοκρασία δωματίου, οι μετρήσεις γινόντουσαν σε διάφορους χρόνους από τη στιγμή της ανάμιξης των διαλυμάτων του αλγινικού οξέος και των δισθενών κατιόντων με το διάλυμα της GDL. Η πρόοδος της έκτασης της ζελατινοποίησης αποτυπωνόταν στη σταδιακή αύξηση του ιξώδους με το χρόνο.

Γενικά, ο μέγιστος βαθμός δικτύωσης στο υδροπήκτωμα θεωρείται ότι αντιστοιχεί στο μέγιστο της τιμής του ιξώδους. Επίσης, η αποδόμηση (degradation) του υδροπηκτώματος αποτυπωνόταν στη μείωση της τιμής του ιξώδους (η).

Φασματοσκοπία υπέρυθρου (FT-IR)

Η υπέρυθρη φασματοσκοπία θεωρείται μια από τις σημαντικότερες τεχνικές στη Χημεία και στην Επιστήμη Υλικών. Η συγκεκριμένη τεχνική χρησιμοποιείται για το χαρακτηρισμό των υλικών, την πιστοποίηση της καθαρότητας των χημικών ουσιών, καθώς επίσης και για την παροχή πληροφοριών όσον αφορά στη μοριακή δομή μιας ένωσης ή ενός υλικού. Γενικά ισχύει ότι, όταν η υπέρυθρη ακτινοβολία προσπίπτει σε ένα υλικό, μπορεί να το διαπεράσει, να σκεδαστεί ή να απορροφηθεί από αυτό. Η απορροφημένη υπέρυθρη ακτινοβολία συνήθως διεγείρει μόρια σε υψηλότερες στάθμες δόνησης που είναι κβαντισμένες. Αυτό παρατηρείται όταν η ενέργεια της ακτινοβολίας είναι ίση με τη διαφορά δύο ενεργειακών δονητικών σταθμών.

Στην περιοχή του υπέρυθρου της ηλεκτρομαγνητικής ακτινοβολίας ένα μόριο είναι δυνατόν να δονείται με περισσότερους από έναν τρόπους, γεγονός που καθιστά ιδιαίτερα πολύπλοκη τη συνολική κίνηση των ατόμων. Έτσι, παρατηρούνται απορροφήσεις που οφείλονται σε δονήσεις έκτασης και κάμψης των δεσμών των μορίων. Ζώνες απορρόφησης προκύπτουν και από άλλους τρόπους δόνησης, όπως είναι οι δονήσεις έκτασης ή τάσης (stretch), που είναι μεταβολές στο μήκος των δεσμών,

παραμόρφωσης (deformation), κάμψης (bending), δηλαδή μεταβολές στη γωνία που σχηματίζουν οι δεσμοί, αιώρησης (rocking) και συστροφής (twisting). Ένα μόριο που αποτελείται από N άτομα δονείται με 3N-6 διαφορετικές βασικές δονήσεις εάν είναι μη γραμμικό και με 3N-5 αν είναι γραμμικό.

Μετράται η απορρόφηση (A) ή η διαπερατότητα (T) του δείγματος και βάση αυτών πραγματοποιείται ποιοτική ανάλυση. Το φάσμα απορρόφησης υπερύθρου, δηλαδή η απεικόνιση της A ή της T% συναρτήσει του μήκους κύματος, λ, ή του κυματάριθμου ν, αποτελεί ουσιαστικά την ταυτότητα της δομής του μορίου, όπως χαρακτηριστικά λέγεται, το «δακτυλικό αποτύπωμα» μιας ουσίας, και έτσι χρησιμεύει στην ταυτοποίηση της δομής μιας ένωσης, που δεν είναι τίποτα άλλο παρά η φύση των δεσμών στο μόριο και της διάταξής τους στο χώρο. Το φάσμα υπερύθρου διακρίνεται σε δύο περιοχές, στην περιοχή ταυτοποίησης των χαρακτηριστικών ομάδων των μορίων ($4000-1400\text{ cm}^{-1}$) και στην περιοχή ταυτοποίησης ολόκληρου του μορίου ($< 1400\text{ cm}^{-1}$).

Για την καταγραφή των φασμάτων υπερύθρου (IR) χρησιμοποιήθηκε το φασματοφωτόμετρο FT/IR-6200 Jasco (Εικόνα 26 (α)). Τα δείγματα ήταν σε στερεή μορφή (λυοφιλοποιημένα δείγματα) και έτσι χρησιμοποιήθηκε η τεχνική των συμπιεσμένων διαφανών δισκίων KBr (Εικόνα 26 (β)). Κάθε δισκίο παρασκευάστηκε ως εξής: Αναμίχθηκε σκόνη δείγματος (περίπου 5% κ.β.) με απολύτως στεγνή σκόνη KBr (95% κ.β.) σε γουδί από αχάτι μέχρι να σχηματιστεί ομοιογενές μίγμα λεπτόκοκκης σκόνης. Στη συνέχεια, το μίγμα των κόνεων τοποθετήθηκε σε καλούπι και συμπίεστηκε μονοαξονικά (10 t) με υδραυλική πρέσα, ώστε να δημιουργηθεί συμπιεσμένο δισκίο διαμέτρου 1 cm και ύψους 1-1,5 mm.



(α)



(β)

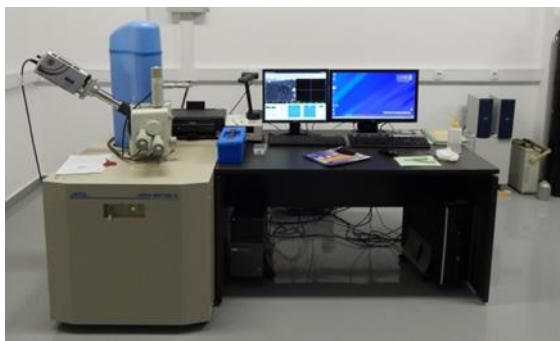
Εικόνα 26. (α) FT-IR φασματοφωτόμετρο FT-IR Jasco, και (β) σκεύη και αντιδραστήρια για παρασκευή των δισκίων με KBr.

Το κάθε δείγμα παρεμβλήθηκε στην πορεία της δέσμης υπερύθρου φωτός του φασματομέτρου και ελήφθη το φάσμα διαπερατότητας (T%) και απορρόφησης (A). Τα τελικά φάσματα είναι ο μέσος όρος 32 φασμάτων, που μετρήθηκαν στην περιοχή $400\text{-}4000\text{ cm}^{-1}$.

Ηλεκτρονική μικροσκοπία σάρωσης (SEM)

Η ηλεκτρονική μικροσκοπία σάρωσης (scanning electron microscopy, SEM) είναι μία από τις σύγχρονες και ευέλικτες μεθόδους ανάλυσης και παρατήρησης της μικροδομής ευρέους φάσματος υλικών. Τα ηλεκτρόνια, λόγω της κυματικής τους φύσης, μπορούν να εστιαστούν όπως και τα φωτεινά κύματα, αλλά σε πολύ μικρότερη επιφάνεια. Η δέσμη ηλεκτρονίων σαρώνει την επιφάνεια του δείγματος με το οποίο αλληλεπιδρά. Από την αλληλεπίδραση αυτή προκύπτουν πληροφορίες σε σχέση με τα άτομα των στοιχείων που απαρτίζουν το εξεταζόμενο δείγμα. Από τα άτομα των στοιχείων εκπέμπονται κυρίως δευτερογενή (secondary) και οπισθοσκεδαζόμενα (backscattered) ηλεκτρόνια καθώς και ακτίνες Χ. Η ένταση των εκπεμπομένων ηλεκτρονίων επηρεάζεται από τα χαρακτηριστικά της επιφάνειας. Δηλαδή, η βασική αρχή λειτουργίας βασίζεται στην ακτινοβολία του δείγματος που παράγεται από την επίδραση (πρόσπτωση) μιας καλά εστιασμένης δέσμης ηλεκτρονίων. Οι πληροφορίες που «επεξεργάζεται» είναι αποτέλεσμα των αλληλεπιδράσεων της δέσμης των ηλεκτρονίων με τα άτομα που βρίσκονται στην επιφάνεια (ή κοντά σε αυτήν) του δείγματος. Στις περισσότερες περιπτώσεις καταγραφής σημάτων, το SEM δίνει εικόνες υψηλής ανάλυσης της επιφάνειας των δοκιμίων, αποκαλύπτοντας λεπτομέρειες σε μέγεθος έως 10 nm ($\times 300.000$). Η μελέτη της επιφάνειας του δείγματος καθίσταται εφικτή διότι η καλά στοχευμένη δέσμη ηλεκτρονίων που «χτυπά» το στόχο, δίνει στο SEM ένα μεγάλο βάθος πεδίου που μετατρέπεται σε τρισδιάστατη εικόνα.

Το SEM χρησιμοποιήθηκε στην παρούσα διατριβή για την εξέταση της μικροδομής και για τη λήψη εικόνων υψηλού βαθμού διείσδυσης σε λυοφιλοποιημένα ικρίωματα καθώς και σε λυοφιλοποιημένο και υγιή μυοκαρδιακό ιστό επίμυ. Για τη λήψη των εικόνων, τα δείγματα τοποθετήθηκαν σε δειγματοφορέα Cu με χρήση αγωγίμης κόλλας άνθρακα και στη συνέχεια τοποθετήθηκαν σε συσκευή επιχρύσωσης για 5 λεπτά. Έπειτα, τοποθετήθηκαν στο ηλεκτρονικό μικροσκόπιο σάρωσης, όπου με την επιβολή χαμηλής τάσης (10 kV) ελήφθησαν οι εικόνες (Εικόνα 27).



Εικόνα 27. Ηλεκτρονικό μικροσκόπιο σάρωσης (SEM, Oxford company, Jeol 6510LV) TMEY.

Ποροσιμετρία υδραργύρου

Η ποροσιμετρία υδραργύρου αποτελεί μια από τις σημαντικότερες μεθόδους προσδιορισμού της κατανομής του μεγέθους των πόρων των υλικών για μεγέθη πόρων 0,04 - 100 μm . Η τεχνική βασίζεται στη βαθμιαία διείσδυση Hg σε πορώδες υλικό εκκενωμένο από αέρα, με αύξηση της εξωτερικής πίεσης. Με την επιβολή εξωτερικής πίεσης, ο Hg εισδύει πρώτα στους πόρους μεγαλύτερου μεγέθους και στη συνέχεια, με επιβολή μεγαλύτερης πίεσης, στους μικρότερους πόρους.

Η σχέση που συνδέει τη διάμετρο των πόρων (d) με την πίεση που πρέπει να ασκηθεί για να διεισδύσει ένα υγρό που δεν διαβρέχει το στερεό (γωνία επαφής $> 90^\circ$) σε έναν πόρο είναι

$$P_L - P_G = - (4\gamma \cos\theta)/d$$

ή η αντίστοιχη σχέση για την ακτίνα του πόρου (r)

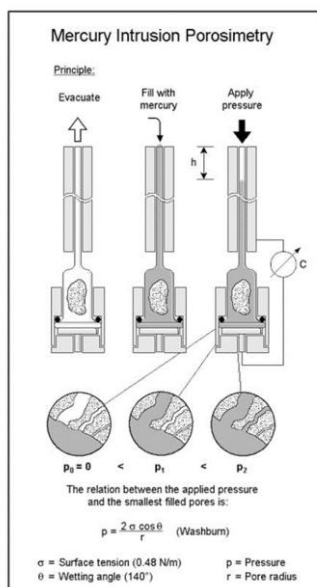
$$P_L - P_G = - (2\gamma \cos\theta)/r$$

όπου P_L είναι η πίεση που ασκείται στο υγρό για να διεισδύσει στον πόρο, P_G η πίεση των ατμών (αλλά επειδή το πείραμα γίνεται υπό κενό, $p_G = 0$), γ η επιφανειακή τάση του υγρού (για τον υδράργυρο είναι 0,48 N/m στους 20°C) και θ η γωνία επαφής, (η οποία για τον υδράργυρο σε επαφή με τα περισσότερα στερεά κυμαίνεται μεταξύ 135° και 142° και έτσι στις μετρήσεις αυτές λαμβάνεται ίση με 140° , ως μέσος όρος, χωρίς μεγάλο σφάλμα). Ουσιαστικά, δηλαδή, η ασκούμενη εξωτερική πίεση προσπαθεί να ξεπεράσει την αντίσταση της επιφανειακής τάσης του υγρού ώστε να διεισδύσει μέσα στον πόρο. Η παραπάνω σχέση δείχνει ότι, όσο μικρότερος είναι ο πόρος, τόσο μεγαλύτερη δύναμη πρέπει να ασκηθεί για να εισέλθει ο υδράργυρος σε αυτόν. Από τη σχέση αυτή συνάγεται ότι, ο Hg θα απομακρυνθεί από τους πόρους (πρώτα από τους πόρους μικρής διαμέτρου και μετά από μεγαλύτερους) εάν ελαττωθεί η εξωτερική πίεση. Το σχήμα της Εικόνα 28 (α) απεικονίζει τη διαδικασία και την αρχή της ποροσιμετρίας Hg (111).

Έτσι, με αυτήν την αναλυτική τεχνική προσδιορίζεται η κατανομή του πορώδους (όγκος πόρων) ενός υλικού με τη διάμετρο των πόρων, η ειδική

επιφάνεια των πόρων και η φαινόμενη και πραγματική πυκνότητα του υλικού (111).

Στην παρούσα διατριβή, για τη μέτρηση του πορώδους του λυοφιλοποιημένου ικριώματος, χρησιμοποιήθηκε το ποροσίμετρο υδραργύρου Quantachrome, Model PM33GT (Εικόνα 28 (β)). Συγκεκριμένα, δείγμα λυοφιλοποιημένου δείγματος αλγινικού υδροπηκτώματος ζυγίστηκε με ακρίβεια τέταρτου δεκαδικού ψηφίου του γραμμαρίου και το βάρος του εισήχθη στον υπολογιστή. Ακολούθησε, η τοποθέτηση του δείγματος στην κυψελίδα του ποροσίμετρου. Στη συνέχεια, έγινε εξαέρωση της κυψελίδας με χρήση της αντλίας κενού και ακολούθησε πλήρωση της κυψελίδας, υπό κενό, με Hg. Μετά την επιβολή της μέγιστης πίεσης, ακολούθησε η διαδικασία αποσυμπίεσης, όπου ο Hg εξήλθε αυθόρμητα από τους πόρους. Με τη μέθοδο αυτή καταγράφεται ο όγκος των πόρων (και το ποσοστό του όγκου των πόρων) που αντιστοιχεί σε κάθε διάμετρο πόρων.



(α)



(β)

Εικόνα 28. (α) Αρχή ποροσιμετρίας υδραργύρου (111), και (β) ποροσίμετρο Hg Quantachrome, Model PM33GT.

Άλλες τεχνικές και μέθοδοι

Για την ολοκλήρωση του χαρακτηρισμού των υδροπηκτωμάτων και την επιβεβαίωση της επιτυχούς περάτωσης κάθε πειραματικού σταδίου, χρησιμοποιήθηκαν και μια σειρά από άλλες τεχνικές και μεθόδους. Για παράδειγμα, η διαπίδυση με ημιπερατή μεμβράνη MWCO χρησιμοποιήθηκε σε πολλές διαδικασίες σύνθεσης και σε πολλά στάδια της πειραματικής διαδικασίας για τον καθαρισμό των υλικών. Η δυναμική σκέδαση φωτός (DLS) χρησιμοποιήθηκε για τη μέτρηση μοριακών βαρών των κλασμάτων χαμηλού και υψηλού μοριακού βάρους του αλγινικού οξέος. Η οπτική

παρατήρηση ήταν η πρώτη, απλή αλλά αξιόπιστη, μέθοδος για να επιβεβαιωθεί η δημιουργία των υψηλού ιξώδους υδροπηκτωμάτων. Με τη μέθοδο μέτρησης απώλειας μάζας μελετήθηκε η κινητική της αποικοδόμησης των υδροπηκτωμάτων σε υδατικό διάλυμα (π.χ. σε φυσιολογικό ορό). Επίσης, χρησιμοποιήθηκαν η φασματοφωτομετρία ορατού-υπεριώδους και η φθοροσιμετρία για τη μελέτη του ρυθμού αποικοδόμησης των υδροπηκτωμάτων καθώς και της απελευθέρωσης αυξητικών παραγόντων από το αλγινικό υδροπύκτωμα. Η ανίχνευση πρωτεϊνών έγινε και με τη μέθοδο Bradford, στα πειράματα πρόσδεσης και απελευθέρωσης πρωτεϊνών από το αλγινικό υδροπύκτωμα. Για να προσδιοριστεί η ποσότητα της προσροφημένης πρωτεΐνης στα νανοσωματίδια $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$, χρησιμοποιήθηκε η τεχνική του μαγνητικού διαχωρισμού. Επίσης, χρησιμοποιήθηκαν και άλλες γνωστές στη χημεία τεχνικές, όπως είναι η εξάτμιση υπό κενό (rotary evaporation), για την ελάττωση του όγκου των διαλυμάτων, και ο βρασμός σε κάθετο ψυκτήρα (reflux) για τη χημική κατεργασία σχηματισμού μικρού μοριακού βάρους αλγινικού οξέος από μεγάλου μοριακού βάρους αλγινικό οξύ. Τέλος, οι λυοφιλοποιημένοι αφροί παρατηρήθηκαν, επίσης, επικουρικά, και με οπτικό μικροσκόπιο και με στερεοσκόπιο.

Λεπτομέρειες για τις μεθόδους αυτές, δηλαδή όπως χρησιμοποιήθηκαν και εφαρμόστηκαν στην παρούσα εργασία, όπου αυτό απαιτείται, παρουσιάζονται στις σχετικές παραγράφους στη συνέχεια.

Επίσης, σημαντική ήταν και η θεωρητική μελέτη με την υπολογιστική μέθοδο DFT. Επειδή η μέθοδος και οι υπολογισμοί αυτοί είναι πολύ σημαντικοί για την έρευνα που αναπτύχθηκε στην παρούσα διατριβή, παρουσιάζονται, αναλυτικά, σε ιδιαίτερη ενότητα στη συνέχεια (3.2.6).

3.2 Μελέτη ζελατινοποίησης

3.2.1 Αλγινικό υδροπύκτωμα παρασκευασμένο με το μηχανισμό διάλυσης / διάχυσης

Όπως αναφέρθηκε και παραπάνω, η παρασκευή των υδροπηκτωμάτων με το μηχανισμό διάλυσης / διάχυσης γινόταν με απευθείας ανάμιξη διαλύματος αλγινικού οξέος με διάλυμα CaCl_2 . Η GDL προστέθηκε ώστε το διάλυμα να είναι σε συνθήκες ελαφρώς όξινου pH και έτσι να διασφαλίζεται ότι όλο το ασβέστιο από το CaCl_2 , είναι σε μορφή ιόντων Ca^{2+} , διαθέσιμων προς συμπλοκοποίηση από τις αλυσίδες του αλγινικού οξέος.

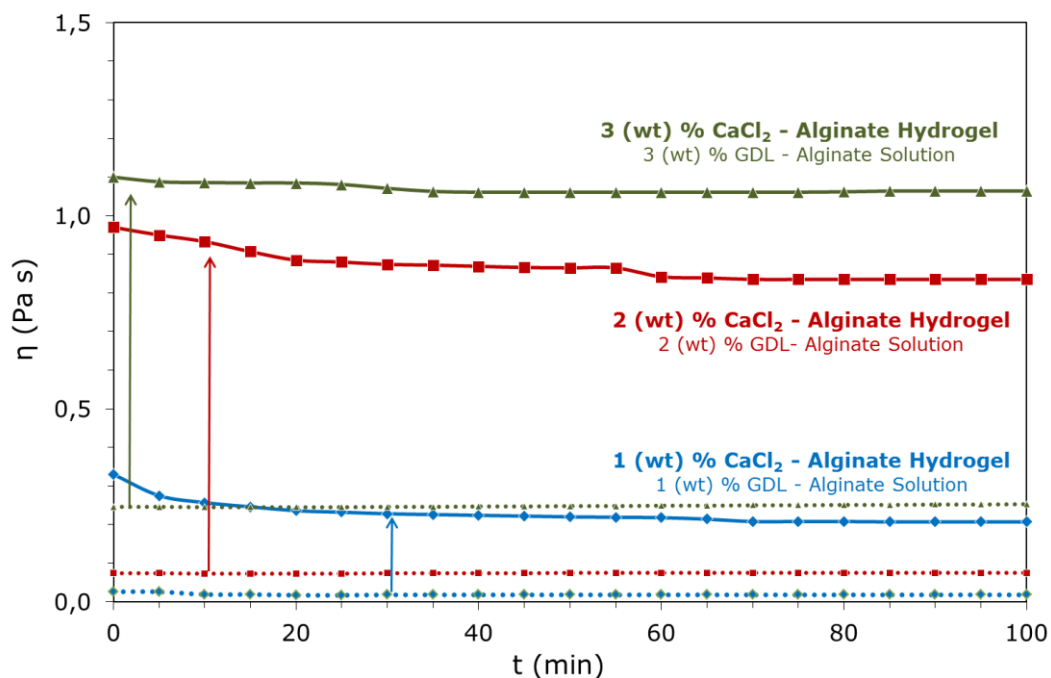
Στα πειράματα αυτά, η πήξη του διαλύματος ήταν εμφανέστατη και αμέσως αντιληπτή μετά την ανάμιξη των διαλυμάτων του αλγινικού οξέος και του διαλύματος CaCl_2 . Ο ταχύτετος σχηματισμός του υδροπηκτώματος αποδίδεται στην υψηλή διαλυτότητα του CaCl_2 . Όπως έχει ήδη αναφερθεί, με τη χρήση CaCl_2 , αποδίδονται ακαριαία (70), προς ζελατινοποίηση, όλα

τα ιόντα του Ca^{2+} στο διάλυμα. Όλα τα πηκτώματα, ήταν έντονα ιξώδη (Εικόνα 29).



Εικόνα 29. Υδροπήκτωμα αλγινικού οξέος με πηγή ιόντων ζελατινοποίησης από CaCl_2 . Παρατηρείται η αργή καταβύθιση της μαγνητικής ράβδου λόγω του υψηλού ιξώδους του πηκτώματος.

Στο διάγραμμα της Εικόνα 30 παρουσιάζονται τα πειραματικά αποτελέσματα των μετρήσεων του ιξώδους που ελήφθησαν στους 37°C . Φαίνεται πολύ καθαρά η έντονη αύξηση του ιξώδους των δειγμάτων, όταν γίνεται προσθήκη των Ca^{2+} στα διαλύματα του αλγινικού οξέος (δημιουργία δομής «egg box»). Η επίδραση του χρόνου περιστροφής στο ιξώδες είναι πιο αισθητή στα υδροπηκτώματα (που αποδίδονται στην ανάπτυξη ιοντικών σταυροδεσμών, εν είδει χηλικών συμπλόκων) από ότι στα αντίστοιχα διαλύματα, στα πρώτα 100 λεπτά που διήρκεσαν τα πειράματα (Εικόνα 30). Το πειραματικό αυτό εύρημα βρίσκεται σε συμφωνία με τη βιβλιογραφία. Συγκεκριμένα, αναφέρεται ότι τα αλγινικά υδροπηκτώματα παρουσιάζουν μη Νευτώνια συμπεριφορά και μείωση του ιξώδους με αύξηση της διατμητικής τάσης (112). Επίσης, στο Κεφάλαιο 2 αναφέρθηκε, ότι στα αλγινικά υδροπηκτώματα που ζελατινοποιούνται με δισθενή κατιόντα, το ιξώδες τους ελαττώνεται με το χρόνο επιβολής διατμητικής τάσης (Εικόνα 13).



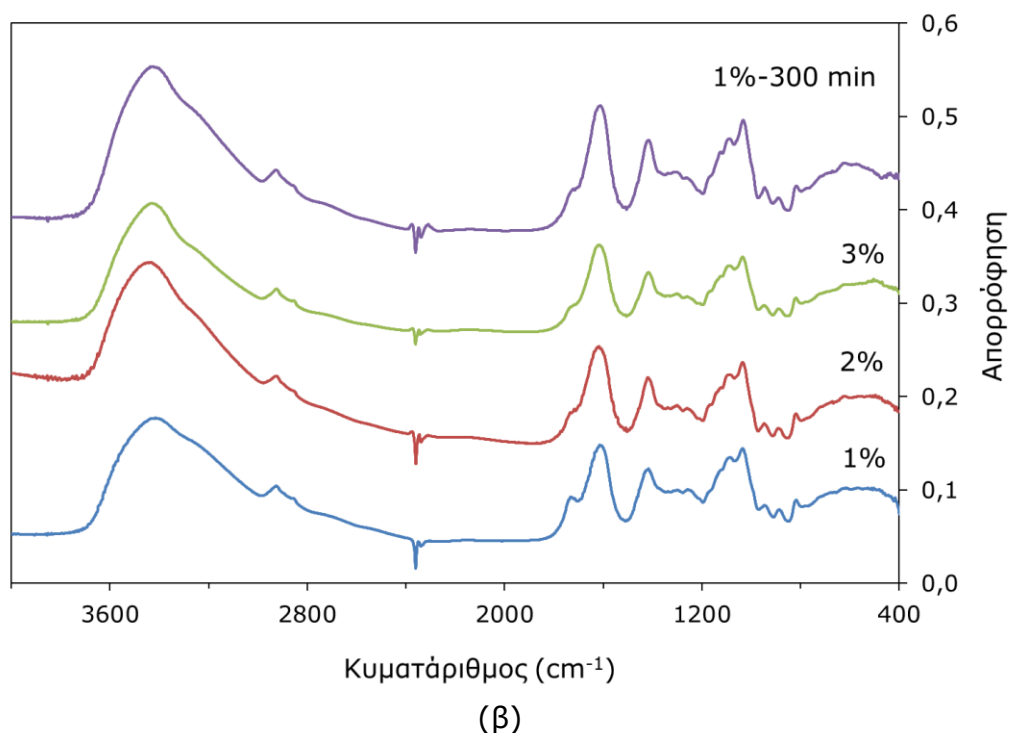
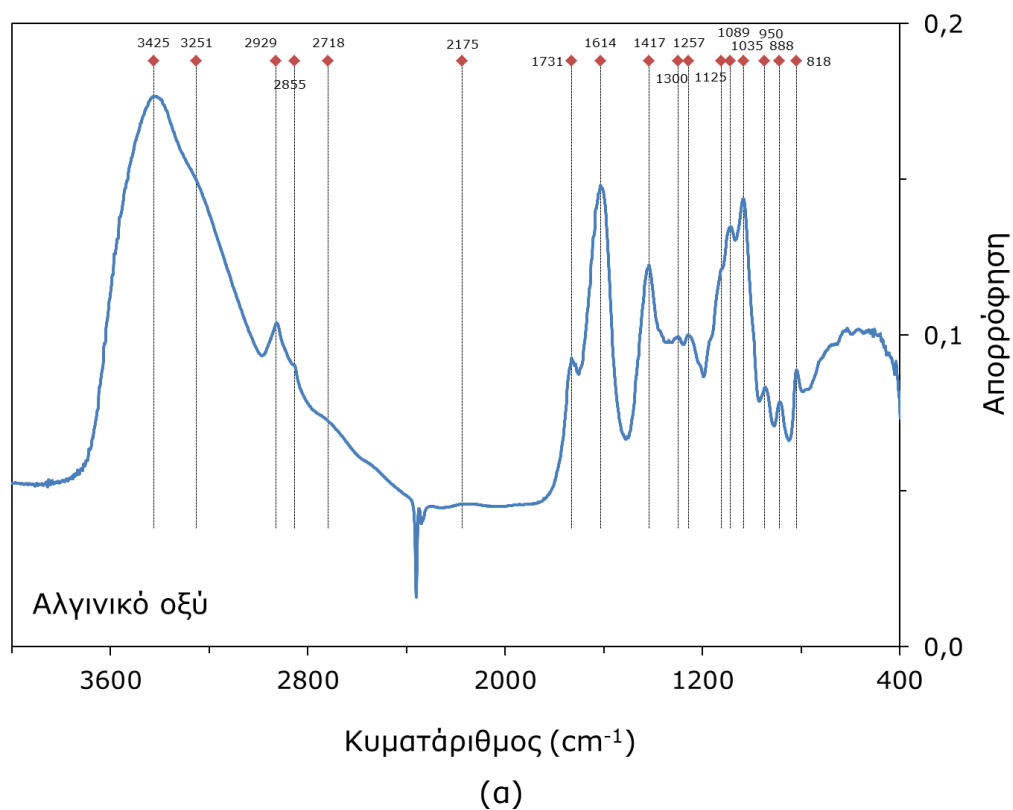
Εικόνα 30. Εξάρτηση του δυναμικού ιξώδους (η) των αλγινικών υδροπηκτωμάτων 1%, 2%, 3% από το χρόνο (t). Με διακεκομμένες γραμμές φαίνονται οι αντίστοιχες τιμές ιξώδους των διαλυμάτων του αλγινικού οξέος 1%, 2% και 3%. Οι μετρήσεις έγιναν στην ταχύτητα περιστροφής 4, στους 37°C . Τα διαλύματα ήταν υπό συνεχή ήπια ανάδευση, μέσα στο ιξωδομέτρο, από τον κύλινδρο του ιξωδομέτρου.

Για την καταγραφή των φασμάτων FT-IR χρησιμοποιήθηκαν σκόνες από τα λυοφιλοποιημένα δείγματα των υδροπηκτωμάτων 1%, 2% και 3%. Στην περίπτωση του υδροπηκτώματος 1%, καταγράφηκε και το φάσμα λυοφιλοποιημένου υδροπηκτώματος, το οποίο προηγουμένως είχε παραμείνει στο δοχείο του ιξωδομέτρου, με τον κύλινδρο να περιστρέφεται στην ταχύτητα 3, για 300 min. Η ταχύτητα 3 θεωρήθηκε η πλησιέστερη στην καρδιακή συχνότητα του επίμουσ. Επίσης, για λόγους σύγκρισης, καταγράφηκε και το φάσμα απορρόφησης σκόνης καθαρού αλγινικού οξέος. Τα φάσματα απορρόφησης φαίνονται στην Εικόνα 31. Στην Εικόνα 31 (α) παρουσιάζεται μόνο το φάσμα του αλγινικού οξέος όπου σημειώνονται όλες οι κορυφές απορρόφησης, και στην Εικόνα 31 (β) τα φάσματα των τριών υδροπηκτωμάτων.

Από τη σύγκριση των φασμάτων στην Εικόνα 31 (β) προκύπτει ότι δεν υπάρχουν διαφορές μεταξύ τους. Και τα τρία φάσματα είναι όμοια μεταξύ τους και ως προς τη θέση των κορυφών απορρόφησης, και ως προς τη σχετική ένταση των κορυφών αυτών. Επίσης, όλες οι κορυφές στο φάσμα της Εικόνα 31 (β) είναι ακριβώς ίδιες με τις κορυφές του φάσματος του αλγινικού οξέος στην Εικόνα 31 (α). Συνεπώς, μπορεί να εξαχθεί το συμπέρασμα ότι, όλα τα χαρακτηριστικά της δομής του αλγινικού οξέος παραμένουν αμετάβλητα και κυριαρχούν και στο υδροπήκτωμα μετά τη ζελατινοποίηση με τα ιόντα ασβεστίου (και φυσικά και μετά τη διαδικασία του παγώματος στους -60°C και της λυοφιλοποίησης). Επίσης, η επιβολή της διατμητικής τάσης για πέντε ώρες δεν είχε καμία επίδραση στη δομή του αλγινικού υδροπηκτώματος. Επομένως, φαίνεται ότι, η ζελατινοποίηση του αλγινικού οξέος με ιόντα Ca^{2+} δεν επιφέρει αλλαγές στη δομή των καρβοξυλικών πεντοζών που αποτελούν το βασικό σκελετό του υδροπηκτώματος.

Στα φάσματα της Εικόνα 31 διακρίνονται οι μεγάλης έντασης ευρείες κορυφές των υψηλών συχνοτήτων ($3425, 3251\text{ cm}^{-1}$), που οφείλονται σε δονήσεις τάσης των ατόμων του H στις μονάδες του OH. Στη συνέχεια, διακρίνεται ο ώμος στην περιοχή $2700\text{-}2900\text{ cm}^{-1}$ λόγω των δονήσεων τάσης των ατόμων του H στους δεσμούς C-H. Η ισχυρή έντασης και μικρού πλάτους κορυφή δόνησης του διπλού δεσμού C=O της καρβοξυλομάδας έχει μέγιστο στους 1614 cm^{-1} . Τέλος, στις μικρότερες συχνότητες παρατηρούνται πολλές μικρές κορυφές που οφείλονται στις δονήσεις κάμψης του σκελετού των μορίων M και G.

Από τα φάσματα της Εικόνα 31 συνάγεται ότι, με τη φασματοσκοπία υπερύθρου δεν παρέχονται πληροφορίες σχετικά για τη ζελατινοποίηση του αλγινικού οξέος με τα ιόντα Ca^{2+} . Έτσι, η μόνη πηγή πληροφορίας για την έκταση της ζελατινοποίησης του συγκεκριμένου αλγινικού υδροπηκτώματος είναι οι μετρήσεις ιξωδομετρίας.



Εικόνα 31. Φάσματα απορρόφησης δονητικής φασματοσκοπίας FT-IR (α) καθαρού αλγινικού οξέος και (β) των πορωδών αφρών που παρήχθησαν από τη λυοφιλοποίηση των υδροπηκτωμάτων αλγινικού οξέος παρασκευασμένων με CaCl_2 , 1%, 2% και 3%, καθώς και υδροπηκτώματος 1% που λυοφιλοποιήθηκε μετά από έκθεσή του σε συνεχή διατμητική τάση (στο ιξωδόμετρο στη ταχύτητα περιστροφής 3) για 300 min.

3.2.2 Αλγινικό υδροπήκτωμα παρασκευασμένο με το μηχανισμό εσωτερικής ζελατινοποίησης

Στην Εικόνα 32 φαίνεται υδροπήκτωμα αλγινικού οξέος που έχει συντεθεί με χρήση CaCO_3 ως πηγή Ca^{2+} , μετά από 24 h από την έναρξη της αντίδρασης.



Εικόνα 32. Υδροπήκτωμα αλγινικού οξέος με πηγή ιόντων ζελατινοποίησης CaCO_3 , μετά από 24 ώρες.

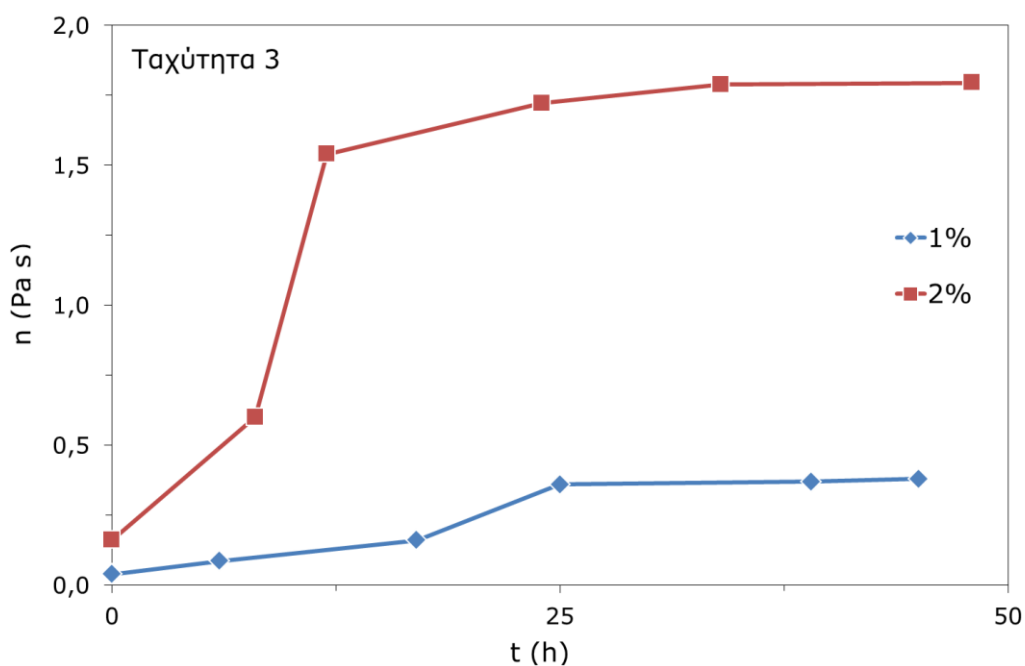
Με τη βοήθεια του ιξώδομετρου, ελήφθη η πρώτη μέτρηση του δυναμικού ιξώδους (η) και του ρυθμού διάτμησης (γ) στις ταχύτητες 3 και 4 αμέσως μετά την ανάμιξη του διαλύματος του αλγινικού οξέος και του CaCO_3 με το διάλυμα της GDL ($t=0$ h). (Επισημαίνεται ότι, οι τιμές του ιξώδους που παρουσιάζονται στην ενότητα αυτή έχουν ληφθεί από μετρήσεις σε θερμοκρασία περιβάλλοντος. Για το λόγο αυτό, οι τιμές αυτές είναι υψηλότερες από τις τιμές που παρουσιάζονται στην Εικόνα 30, οι οποίες ελήφθησαν στους 37°C , δηλαδή σε αρκετά υψηλότερη θερμοκρασία). Έπειτα, εντός των επόμενων 2 ημερών, ελήφθησαν οι υπόλοιπες μετρήσεις ανά τακτά χρονικά διαστήματα. Η ίδια διαδικασία ακολουθήθηκε για τα αλγινικά υδροπήκτωμα 2 και 3%.

Τα πειραματικά αποτελέσματα των μετρήσεων δυναμικού ιξώδους ως προς το χρόνο της αντίδρασης απεικονίζονται στα διαγράμματα της Εικόνα 33 για τα πηκτώματα 1 και 2%. Από τις καμπύλες αυτές προκύπτει ότι, η ζελατινοποίηση αρχίζει από την πρώτη στιγμή της αντίδρασης. Συγκεκριμένα, ενώ η τιμή του ιξώδους του διαλύματος του αλγινικού οξέος 1% σε θερμοκρασία περιβάλλοντος μετρήθηκε ίση με $0,017 \text{ Pa}\cdot\text{s}$, μετρημένη στην ταχύτητα 4, το αντίστοιχο υδροπήκτωμα σε $t=0$ h είχε ιξώδες $0,032 \text{ Pa}\cdot\text{s}$ (Εικόνα 33 (β)). Επίσης, παρατηρείται ότι, οι τιμές του ιξώδους αυξάνονται σταδιακά με το χρόνο και η ζελατινοποίηση ολοκληρώνεται περίπου σε 24 ώρες, όπου επιτυγχάνονται οι μέγιστες τιμές ιξώδους. Οι τιμές του ιξώδους, βρίσκονται στην ίδια τάξη μεγέθους με τις τιμές του ιξώδους, των πηκτωμάτων που παρασκευάστηκαν με τη μέθοδο διάλυσης/διάχυσης με πηγή ιόντων Ca^{2+} το CaCl_2 . Μάλιστα, είναι ελαφρά υψηλότερες. Συγκεκριμένα, το αλγινικό υδροπήκτωμα 1% με τη μέθοδο

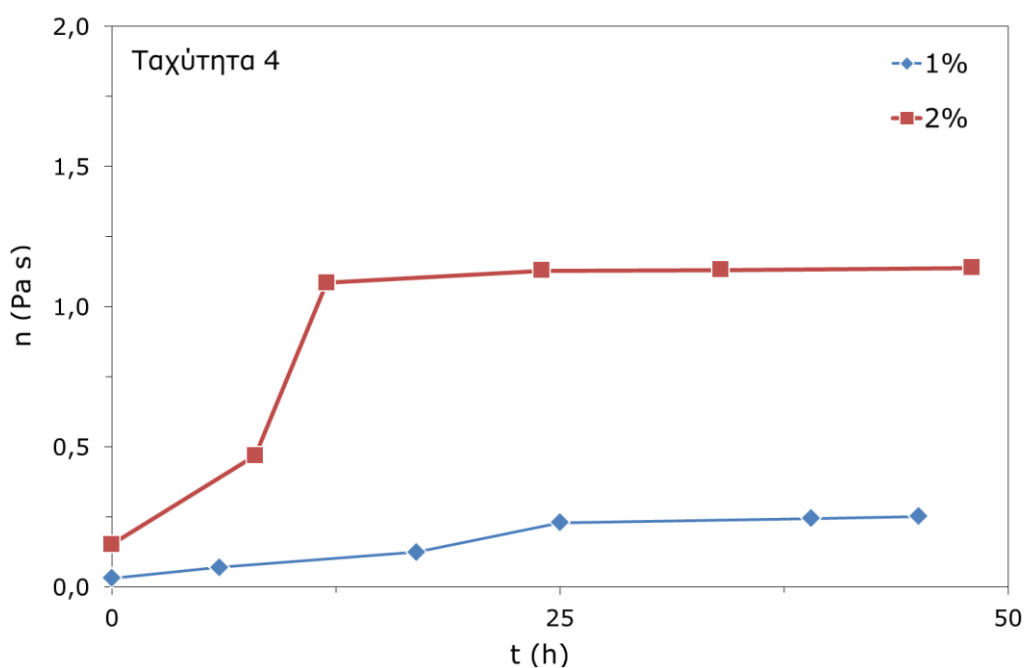
διάλυσης/διάχυσης (πηγή CaCl_2) είχε ιξώδες 0,21 Pa·s ενώ το αντίστοιχο υδροπήκτωμα με τη μέθοδο εσωτερικής ζελατινοποίησης (πηγή CaCO_3) είχε μέγιστη τιμή ιξώδους μετά από 48 ώρες 0,25 Pa·s (Εικόνα 33 (β)). Επίσης, παρατηρείται ότι, η συγκέντρωση του υδροπηκτώματος επηρεάζει το χρόνο επίτευξης του πλατό της μέγιστης τιμής του ιξώδους. Συγκεκριμένα, στο πυκνότερο υδροπήκτωμα (2%), η μέγιστη δικτύωσή του επιτυγχάνεται σε 12 ώρες ενώ στο υδροπήκτωμα 1% σε μια ημέρα. Το αλγινικό υδροπήκτωμα 3% συντέθηκε εντός 10 ωρών, σταδιακά. Όμως, επειδή οι τιμές της ροπής αυτών των υδροπηκτωμάτων βρίσκονταν εκτός των ορίων που μετρά το ιξωδόμετρο (0,5 - 9,5 mN m), δεν ελήφθησαν οι τιμές του ιξώδους από το ιξωδόμετρο γι'αυτά.

Για την καταγραφή των φασμάτων FT-IR χρησιμοποιήθηκαν σκόνες από τα λυοφιλοποιημένα δείγματα των υδροπηκτωμάτων 1%, 2% και 3% που παρασκευάστηκαν με CaCO_3 . Τα φάσματα απορρόφησης φαίνονται στην Εικόνα 34. Επίσης, είναι σημειωμένες και όλες οι κορυφές απορρόφησης.

Και τα τρία φάσματα είναι όμοια μεταξύ τους και ως προς τη θέση των κορυφών απορρόφησης, και ως προς τη σχετική ένταση των κορυφών αυτών. Επίσης, όλες οι κορυφές στο φάσμα της Εικόνα 34 είναι ακριβώς ίδιες με τις κορυφές του φάσματος του αλγινικού οξέος στην Εικόνα 31 (α). Συνεπώς, μπορεί να εξαχθεί το συμπέρασμα ότι, όλα τα χαρακτηριστικά της δομής του αλγινικού οξέος παραμένουν αμετάβλητα και κυριαρχούν και στο υδροπήκτωμα μετά τη ζελατινοποίηση με τα ιόντα ασβεστίου, ανεξαρτήτως από ποια ένωση αυτά προέρχονται, CaCl_2 ή CaCO_3 , (και φυσικά και μετά τη διαδικασία του παγώματος στους -60°C και της λυοφιλοποίησης).

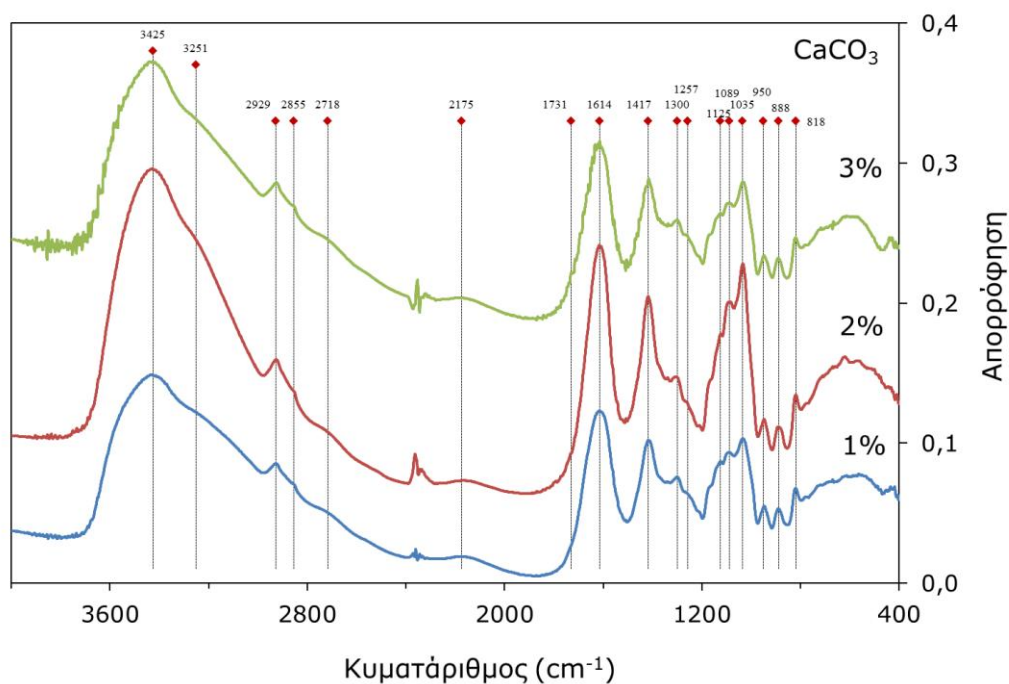


(α)



(β)

Εικόνα 33. Αύξηση του δυναμικού ιξώδους (η) με το χρόνο (t) στα αλγινικά υδροπηκτώματα 1 και 2% με CaCO_3 στις ταχύτητες 3 (α) και 4 (β). (Οι μετρήσεις έγιναν σε θερμοκρασία περιβάλλοντος. Τα πηκτώματα ήταν υπό συνεχή ήπια ανάδευση. Η σταθερή απόκλιση των παρουσιαζόμενων πειραματικών τιμών είναι μικρότερη του 5%).



Εικόνα 34. Φάσματα απορρόφησης δονητικής φασματοσκοπίας IR των πορωδών αφρών που παρήχθησαν από τη λυοφιλοποίηση των υδροπηκτωμάτων αλγινικού οξέος 1%, 2% και 3% με CaCO_3 .

Έτσι, με βάση και όσα αναφέρθηκαν για το αλγινικό οξύ, στα φάσματα της Εικόνα 34 διακρίνονται οι μεγάλης έντασης ευρείες κορυφές των υψηλών συχνοτήτων ($3425, 3251 \text{ cm}^{-1}$), που οφείλονται σε δονήσεις τάσης των ατόμων του H στις μονάδες του OH. Στη συνέχεια, διακρίνεται ο ώμος στην περιοχή $2700\text{-}2900 \text{ cm}^{-1}$, λόγω των δονήσεων τάσης των ατόμων του H στους δεσμούς C-H. Η ισχυρή και μικρού πλάτους κορυφή δόνησης του διπλού δεσμού C=O της καρβοξυλομάδας έχει μέγιστο στους 1614 cm^{-1} . Τέλος, στις μικρότερες συχνότητες παρατηρούνται πολλές μικρές κορυφές που οφείλονται στις δονήσεις κάμψης του σκελετού των μονάδων M και G.

Όμοια με όσα αναφέρθηκαν και για τα υδροπηκτώματα που παρασκευάστηκαν με τη μέθοδο διάλυσης/διάχυσης, και εδώ, από τα φάσματα της Εικόνα 34 συνάγεται ότι, με τη φασματοσκοπία υπερύθρου δεν παρέχονται πληροφορίες σχετικά για τη ζελατινοποίηση του αλγινικού οξέος με τα ιόντα Ca^{2+} . Όμως, η απουσία χαρακτηριστικών κορυφών που αποδίδονται στις ανθρακικές ομάδες, σε συνδυασμό με το γεγονός ότι οι τιμές του ιξώδους που επιτεύχθηκαν ήταν ελαφρά υψηλότερες από τις αντίστοιχες των υδροπηκτωμάτων που παρασκευάστηκαν με CaCl_2 , μπορούν να υποστηρίξουν ότι όλα τα διαθέσιμα ιόντα Ca^{2+} από το ανθρακικό ασβέστιο, συμπλοκοποιήθηκαν στο υδροπήκτωμα.

3.2.3 Αλγινικό υδροπηκτώμα παρασκευασμένο με παροχή Ca^{2+} από το χηλικό σύμπλοκο $\text{Ca} - \text{EDTA}$

Η σύνθεση των υδροπηκτωμάτων 1% που παρασκευάστηκαν με αυτόν τον τρόπο έγινε ως εξής. Αρχικά, ζυγίστηκαν 9,3 mg CaCl_2 και 18,41 mg αιθυλενοδιαμινοτετραοξικό οξύ (EDTA) και διαλύθηκαν σε 10 ml Millipore αποσταγμένο νερό. Επειδή το EDTA είναι αρκετά δισυάλυτο στο νερό, προστέθηκαν 5 ml διαλύματος υδροξειδίου του νατρίου (NaOH) συγκέντρωσης 0,5 M. Μόλις το EDTA διαλύθηκε πλήρως, προστέθηκαν 0,2 g αλγινικού οξέος (1%) στο διάλυμα. Στη συνέχεια, το διάλυμα αφέθηκε, υπό μαγνητική ανάδευση, έως την πλήρη διάλυση του αλγινικού οξέος. Τέλος, προστέθηκε σε αυτό, στάγδην, με τη βοήθεια πιπέτας, διάλυμα GDL (30 mg GDL διαλυμένα σε 5 ml αποσταγμένου νερού). Η ίδια διαδικασία ακολουθήθηκε και για την παρασκευή αντίστοιχων υδροπηκτωμάτων 2 και 3%. Στον Πίνακα 4 παρουσιάζονται συνοπτικά τα αντιδραστήρια και οι ποσότητές τους που χρησιμοποιήθηκαν για την παρασκευή αυτών των υδροπηκτωμάτων.

Πίνακας 4. Στοιχεία για τα αντιδραστήρια και τις ποσότητές τους που χρησιμοποιήθηκαν για την παρασκευή 20 ml αλγινικών υδροπηκτωμάτων με παροχή Ca^{2+} από το χηλικό σύμπλοκο $\text{Ca} - \text{EDTA}$.

Κωδική ονομασία υδροπηκτώματος	Αλγινικό οξύ (g)	EDTA (mg)	CaCl_2 (mg)	GDL (mg)
1%	0,2	18,14	9,3	30
2%	0,4	36,8	18,6	60
3%	0,6	55,46	27,9	90

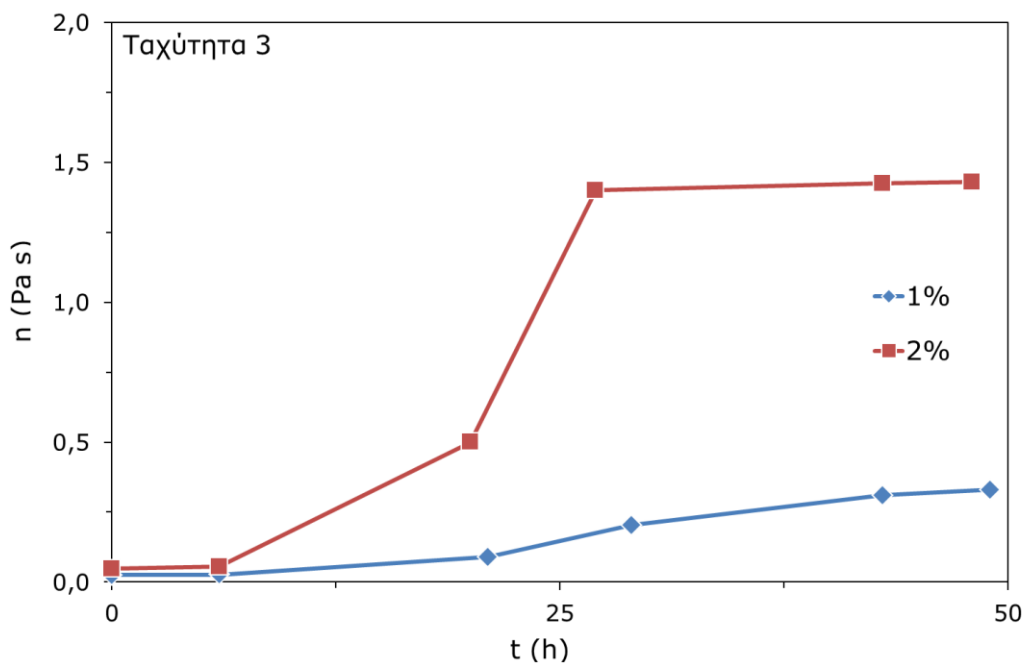
Η στιγμή που προστέθηκε το διάλυμα της GDL, ορίστηκε ο χρόνος $t=0$, και με τη βοήθεια του ιξωδομέτρου ελήφθη η πρώτη τιμή του δυναμικού ιξώδους (η). Η ίδια διαδικασία ακολουθήθηκε για 2 ημέρες, όπου λαμβάνονταν μετρήσεις ανά τακτά χρονικά διαστήματα.

Τα πειραματικά αποτελέσματα αυτών των μετρήσεων (τιμές δυναμικού ιξώδους, μετρημένες στις ταχύτητες 3 και 4) φαίνονται στα διαγράμματα της Εικόνας 35, (α) και (β), αντίστοιχα. Από τις καμπύλες αυτές προκύπτουν δύο βασικά συμπεράσματα. Το πρώτο είναι ότι η ζελατινοποίηση δεν αρχίζει αμέσως, αλλά απαιτείται ένας χρόνος «εκκόλαψης», μεγαλύτερος των 5 ωρών, ώστε το δυναμικό ιξώδες του διαλύματος να αρχίζει να αυξάνεται. Οι τιμές του ιξώδους για $t = 0$ και 5 ώρες είναι πρακτικά ίδιες με τις τιμές του ιξώδους του διαλύματος του αλγινικού οξέος, που αναφέρθηκαν στην προηγούμενη ενότητα 3.2.2. (Επισημαίνεται και εδώ ότι, οι τιμές του ιξώδους που παρουσιάζονται στην ενότητα αυτή έχουν ληφθεί από μετρήσεις σε θερμοκρασία περιβάλλοντος. Για το λόγο αυτό, οι τιμές αυτές

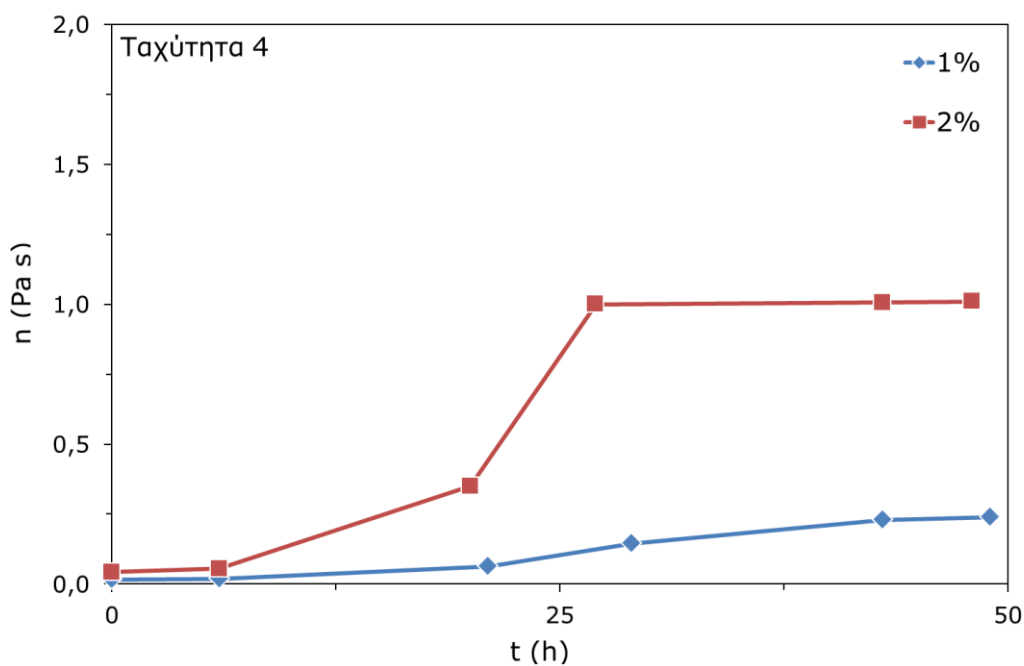
είναι υψηλότερες από τις τιμές που παρουσιάζονται στην Εικόνα 30, οι οποίες ελήφθησαν στους 37°C, δηλαδή σε αρκετά υψηλότερη θερμοκρασία).

Το δεύτερο συμπέρασμα είναι ότι η ζελατινοποίηση σαφώς λαμβάνει χώρα και με αυτόν τον τρόπο παρασκευής, όπου το EDTA ανταγωνίζεται το αλγινικό οξύ ως προς τη δέσμευση ιόντων Ca^{2+} . Αυτό είναι εμφανές από την απότομη αύξηση του ιξώδους, η οποία ακολουθείται από τη σταθεροποίηση της τιμής του (μετά την επίτευξη του πλατό, παρατηρείται μία πάρα πολύ μικρή περαιτέρω αύξησή του). Και με αυτήν τη μέθοδο παρασκευής, η ζελατινοποίηση ολοκληρώνεται σε περίπου 1 ημέρα. Σε σχέση με την παρασκευή του υδροηκτώματος με τη μέθοδο εσωτερικής ζελατινοποίησης μέσω της διάλυσης του CaCO_3 σε ήπια όξινο διάλυμα, η κινητική της ζελατινοποίησης με τη χρήση του Ca-EDTA φαίνεται ότι είναι ελαφρώς πιο αργή. Η δε τιμή του ιξώδους είναι ελαφρώς μικρότερη από το ιξώδες των υδροηκτωμάτων που παρασκευάστηκαν με τη μέθοδο εσωτερικής ζελατινοποίησης (CaCO_3) και ελαφρώς υψηλότερη από το ιξώδες των υδροηκτωμάτων που παρασκευάστηκαν με τη μέθοδο διάλυσης/διάχυσης (CaCl_2).

Τα υδροηκτώματα αυτά (οι λυοφιλοποιημένοι αφροί) χαρακτηρίστηκαν επίσης και με φασματοσκοπία FT-IR. Τα φάσματα απορρόφησης ήταν απολύτως όμοια με τα φάσματα που παρουσιάζονται στην Εικόνα 31 και στην Εικόνα 34 (και γι'αυτό δεν παρουσιάζονται ξεχωριστά εδώ).



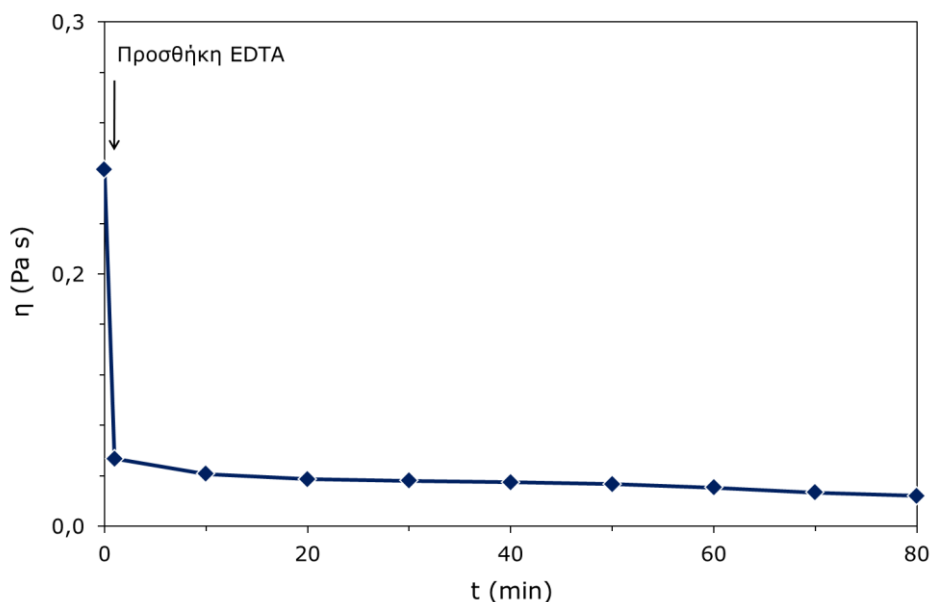
(α)



(β)

Εικόνα 35. Αύξηση του δυναμικού ιξώδους (η) με το χρόνο (t) στα αλγινικά υδροηλεκτρώματα παρασκευασμένα με Ca-EDTA στην ταχύτητα (α) 3 και (β) 4. (Οι μετρήσεις έγιναν σε θερμοκρασία περιβάλλοντος. Τα πηκτώματα ήταν υπό συνεχή ήπια ανάδευση. Η σταθερή απόκλιση των παρουσιαζόμενων πειραματικών τιμών είναι μικρότερη του 5%).

Τα αποτελέσματα της ενότητας αυτής, και συγκεκριμένα η καθυστέρηση της έναρξης της ζελατινοποίησης, έδειξαν ότι το EDTA συναγωνίζεται το μόριο του αλγινικού οξέος, ως προς τη δέσμευση των ιόντων Ca^{2+} , τα οποία μπορούν να σχηματίσουν χηλικά σύμπλοκα τόσο με το EDTA όσο και με την αλυσίδα του αλγινικού οξέος. Υπό το φως αυτού του συμπεράσματος, έγινε και το αντίστροφο πείραμα, δηλαδή, παρασκευάστηκε αλγινικό υδροηκτώμα με τη μέθοδο διάλυσης/διάχυσης (με CaCl_2) και στη συνέχεια προστέθηκε διάλυμα EDTA ώστε να μελετηθεί η επίδραση που θα έχει η προσθήκη του EDTA στη συνεκτικότητα (ιξώδες) του υδροηκτώματος. (Η ποσότητα του EDTA υπολογίστηκε έτσι ώστε να μπορεί να συμπλοκοποιήσει όλα τα ιόντα Ca^{2+} που προέρχονται από τη διάλυση του CaCl_2). Η κινητική αυτής της αντίδρασης απεικονίζεται στο διάγραμμα της Εικόνα 36. Παρατηρείται ότι, το ιξώδες του υδροηκτώματος καταρρέει ταχύτατα, μέσα στο πρώτο λεπτό, από την προσθήκη του διαλύματος του EDTA. Η πρώτη τιμή είναι ίση με τη μέγιστη τιμή του ηκτώματος που παρασκευάστηκε με τη χρήση του Ca-EDTA (Εικόνα 35 (β)), ενώ οι χαμηλές τιμές, μετά την κατάρρευση των τιμών του ιξώδους, αντιστοιχούν στην τιμή του ιξώδους του αλγινικού διαλύματος (που αναφέρθηκε στην ενότητα 3.2.2). Το αποτέλεσμα αυτό δείχνει ότι, τα ιόντα Ca^{2+} συμπλοκοποιούνται με τρόπο αντιστρεπτό στις αλυσίδες του μορίου του αλγινικού οξέος. Το τελευταίο δείχνει ότι, μπορεί να ρυθμιστεί η έκταση της συμπλοκοποίησης ανάλογα με την ποσότητα των διατιθέμενων ιόντων Ca^{2+} . Αυτό θα διερευνηθεί στις επόμενες ενότητες.



Εικόνα 36. Καταγραφή ταχείας ελάττωσης του ιξώδους αλγινικού υδροηκτώματος 1% αμέσως μετά την προσθήκη διαλύματος EDTA. (Οι μετρήσεις έγιναν στην ταχύτητα 4 και σε θερμοκρασία περιβάλλοντος. Το διάλυμα ήταν υπό συνεχή ήπια ανάδευση).

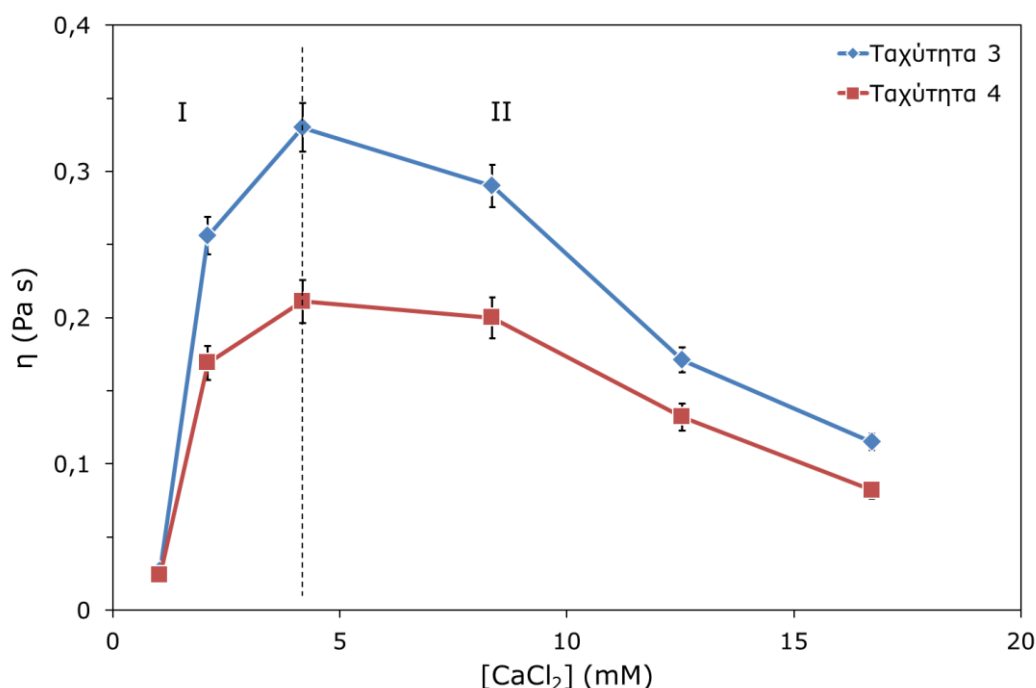
3.2.4 Επίδραση της συγκέντρωσης των ιόντων ασβεστίου στη σταθερότητα του αλγινικού υδροπηκτώματος

Ένα από τα σημαντικά θέματα που απασχόλησαν την έρευνα που αναπτύχθηκε στην παρούσα διατριβή ήταν η εύρεση της βέλτιστης ποσότητας των ιόντων Ca^{2+} που είναι απαραίτητη για να επιτευχθεί ο μέγιστος βαθμός ζελατινοποίησης. Τα αποτελέσματα της ιξωδομετρίας κατά τη μελέτη της κινητικής της ζελατινοποίησης τόσο με τη μέθοδο εσωτερικής ζελατινοποίησης (με CaCO_3) όσο και με την παρασκευή υδροπηκτώματος μέσω παροχής ιόντων Ca^{2+} από το σύμπλοκο Ca-EDTA, σε συνδυασμό και με την κατάρρευση των τιμών του ιξώδους όταν στο υδροπήκτωμα προστεθεί EDTA, έδειξαν ότι το παραπάνω ερώτημα ευσταθεί και πρέπει να ερευνηθεί διεξοδικά. Για τον υπολογισμό της ποσότητας του ασβεστίου που χρησιμοποιήθηκε στις προηγούμενες ενότητες, τα δεδομένα ελήφθησαν από προηγούμενες εργασίες δημοσιευμένες από έγκριτες ομάδες άλλων ερευνητών (βλ. Κεφάλαιο 2).

Το ερώτημα αυτό διερευνήθηκε παρασκευάζοντας υδροπηκτώματα 1% με το μηχανισμό διάλυσης/διάχυσης, ο οποίος εξασφαλίζει ταχεία ζελατινοποίηση λόγω της άμεσης παροχής ιόντων Ca^{2+} στο διάλυμα από τη διάλυση του CaCl_2 , χρησιμοποιώντας διαφορετικές ποσότητες ιόντων Ca^{2+} . Συγκεκριμένα, παρασκευάστηκαν έξι (6) διαλύματα (των 20 ml το καθένα), όπου η ποσότητα του αλγινικού οξέος ήταν σε όλα σταθερή (0,2 g, δηλαδή 1 %), ενώ οι ποσότητες του CaCl_2 και της GDL ήταν πολλαπλάσιες ή υποπολλαπλάσιες από αυτές που χρησιμοποιήθηκαν στην παραπάνω ενότητα 3.2.1 (Πίνακας 2). Δηλαδή, στα τελικά υδροπηκτώματα, οι συγκεντρώσεις του CaCl_2 ήταν 1,04, 2,09, 4,18, 8,36, 12,54 και 16,72 mM.

Τα πειραματικά αποτελέσματα παρουσιάζονται στο διάγραμμα της Εικόνα 37 και επιβεβαιώνουν την υπόθεση εργασίας. Δηλαδή, η καμπύλη του δυναμικού ιξώδους παρουσιάζει μέγιστο στο υδροπήκτωμα με συγκέντρωση 4,18 mM CaCl_2 . Αυτό σημαίνει ότι, στη συγκεκριμένη τιμή της συγκέντρωσης, όλα τα διατιθέμενα ιόντα Ca^{2+} (ή ο μέγιστος δυνατός αριθμός ιόντων Ca^{2+}) συμπλοκοποιούνται, οδηγώντας στη μεγιστοποίηση της δικτύωσης του υδροπηκτώματος. Με περεταίρω, πέραν του μεγίστου, αύξηση της συγκέντρωσης των ιόντων Ca^{2+} παρατηρείται σταδιακή ελάττωση του ιξώδους του υδροπηκτώματος. Πρέπει να σημειωθεί ότι δεν παρατηρήθηκαν φαινόμενα διαχωρισμού φάσεων, καταβύθισης κτλ., γεγονός που σημαίνει ότι τα επιπλέον αυτά ιόντα Ca^{2+} φιλοξενούνται ανάμεσα στις αλυσίδες του αλγινικού οξέος και στο δίκτυο του αλγινικού υδροπηκτώματος, όμως η παρουσία τους οδηγεί στη χαλάρωση της δικτύωσης του υδροπηκτώματος, το οποίο εξακολουθεί να είναι απολύτως ομοιογενές. Αντίθετα, εάν σε υποασβεστιωμένο αλγινικό υδροπήκτωμα (δηλαδή, με συγκέντρωση Ca^{2+} μικρότερη αυτής που αντιστοιχεί στη

μέγιστη τιμή του ιξώδους) προστεθούν ιόντα Ca^{2+} , αυτά, όχι μόνο θα φιλοξενηθούν στη δομή του, αλλά θα αυξήσουν και τη δικτύωσή του.



Εικόνα 37. Επίδραση της ποσότητας του CaCl_2 που προστέθηκε στο διάλυμα του αλγινικού οξέος στο δυναμικό ιξώδες (η) του αλγινικού υδροπηκτώματος 1% που προέκυψε. (Οι μετρήσεις έγιναν στις ταχύτητες 3 και 4 στους 37°C).

Λαμβάνοντας υπόψιν ότι η επίτευξη της μέγιστης δικτύωσης είναι ο απώτερος και ουσιαστικός στόχος για να παρασκευαστεί ένα υδροπήκτωμα, γίνεται αντιληπτό ότι, η περιοχή ενδιαφέροντος για να αναπτυχθεί ένα αλγινικό υδροπήκτωμα, για παράδειγμα για να χρησιμοποιηθεί στη βιοϊατρική, όπως στην παρούσα εργασία, είναι η περιοχή I, αριστερά του μέγιστου της τιμής του ιξώδους, ενώ αντίθετα η περιοχή II, δεξιά αυτής (δηλαδή η περιοχή των υψηλών συγκεντρώσεων ασβεστίου), πιο πολύ μπορεί να θεωρηθεί ως περιοχή αποδόμησης του υδροπηκτώματος. Ασφαλώς, η εγκυρότητα του συμπεράσματος αυτού θα πρέπει να αποδειχθεί και θεωρητικά. Αυτό γίνεται σε επόμενη ενότητα της εργασίας.

Θεωρώντας, πάντως, ότι τα πειραματικά ευρήματα είναι ασφαλή, υπό το φως της παραπάνω προσέγγισης, για την περιοχή I του διαγράμματος της Εικόνα 37 (αριστερή περιοχή, υποασβεστιωμένου υδροπηκτώματος), το ιξώδες του υδροπηκτώματος μπορεί να ρυθμιστεί ανάλογα με τις εκάστοτε απαιτήσεις, αρκεί να ρυθμιστεί η ποσότητα των παρεχομένων ιόντων Ca^{2+} . Αυτό, έχει μεγάλη σημασία στην ανάπτυξη ικριώματος για εφαρμογή σε εμφραγματικό μυοκάρδιο διότι, μετά από ένα ισχαιμικό επεισόδιο, όταν, κατά τη θεραπεία, γίνεται η επαναιμάτωση της εμφραγματικής περιοχής του μυοκαρδίου, παρέχεται αίμα με αυξημένη συγκέντρωση ιόντων Ca^{2+} . Έτσι, εάν εμφυτευθεί ένα υποασβεστιωμένο (περιοχή I, Εικόνα 37)

αλγινικό υδροπήκτωμα, αυτό θα έχει τη δυνατότητα να αυξήσει *in situ* το ιξώδες του μέσα στον ιστό του μυοκαρδίου και να σχηματίσει (*in situ*) ένα πλήρως δικτυωμένο υδροπήκτωμα. Αντίθετα, εάν εμφυτευθεί ένα πλήρως ζελατινοποιημένο αλγινικό υδροπήκτωμα (με συγκέντρωση ιόντων Ca^{2+} 4,18 mM), τότε, λόγω της επαναιμάτωσης του μυοκαρδίου, αυτό θα οδηγηθεί αυθόρμητα προς την υπερασβεστωμένη περιοχή II του διαγράμματος της Εικόνα 37, η οποία χαρακτηρίζεται ως περιοχή αποδicktύωσης και κατάρρευσης του υδροπηκτώματος.

Η ιατρική πρακτική υποστηρίζει την παραπάνω υπόθεση. Πράγματι, στη βιβλιογραφία, οι εμφυτεύσεις αλγινικού υδροπηκτώματος σε εμφραγματικό μυοκάρδιο αφορούν όλες σε υποασβεστωμένα υδροπηκτώματα (45, 46, 113). Παρ'όλα αυτά, σε κανένα άρθρο δεν υπάρχει ερμηνεία για το λόγο που επιλέχθηκε η εμφύτευση υποασβεστωμένου αλγινικού υδροπηκτώματος στο μυοκάρδιο. Η ύπαρξη μεγίστου και η χαλάρωση της συνεκτικότητας του δικτύου του αλγινικού υδροπηκτώματος που καταγράφηκε στην παρούσα εργασία (Εικόνα 37) αποτελεί ισχυρό επιχείρημα ώστε να προταθεί η εμφύτευση υποασβεστωμένου αλγινικού υδροπηκτώματος στο μυοκάρδιο.

3.2.5 Επίδραση των ιόντων των αλκαλικών γαιών στο σχηματισμό του αλγινικού υδροπηκτώματος

Με σκοπό να διερευνηθούν όλες οι πτυχές του μηχανισμού ζελατινοποίησης του αλγινικού μορίου με τα ιόντα Ca^{2+} , στην ενότητα αυτή εξετάζεται η ικανότητα ζελατινοποίησης του αλγινικού οξέος και με άλλα δισθενή κατιόντα (εκτός του Ca^{2+}), με στόχο τη συνολική αποτίμηση της επίδρασης των ιόντων των αλκαλικών γαιών στην ικανότητά τους να σχηματίσουν αλγινικό υδροπήκτωμα. Επειδή η έρευνα αυτή στοχεύει στην ανάπτυξη βιοϋλικών, εκτός του ασβεστίου, από τα υπόλοιπα δισθενή κατιόντα των αλκαλικών γαιών, προκρίνεται το μαγνήσιο, λόγω της ενεργού συμμετοχής του στο μεταβολισμό και της υψηλής βιολογικής του σημασίας. Ως πηγή των ιόντων Mg^{2+} επιλέχθηκε το ένυδρο άλας του MgCl_2 (Πίνακας 1), οι δε υπολογισμοί για την ποσότητα που απαιτείται για να σχηματιστεί το αντίστοιχο υδροπήκτωμα έγιναν όμοια με τους υπολογισμούς για το CaCl_2 (Πίνακας 2). Επίσης, μελετήθηκε η ικανότητα ζελατινοποίησης του αλγινικού οξέος και με τα δύο άλλα κατιόντα αλκαλικών γαιών, του Ba^{2+} και του Sr^{2+} . Και τα δύο αυτά ιόντα παρασχέθηκαν στο διάλυμα από τα ανθρακικά άλατά τους, SrCO_3 και BaCO_3 , αντίστοιχα (Πίνακας 1). Τα δύο αυτά υδροπηκτώματα συντέθηκαν με το μηχανισμό της εσωτερικής ζελατινοποίησης, όπως ακριβώς έγινε με

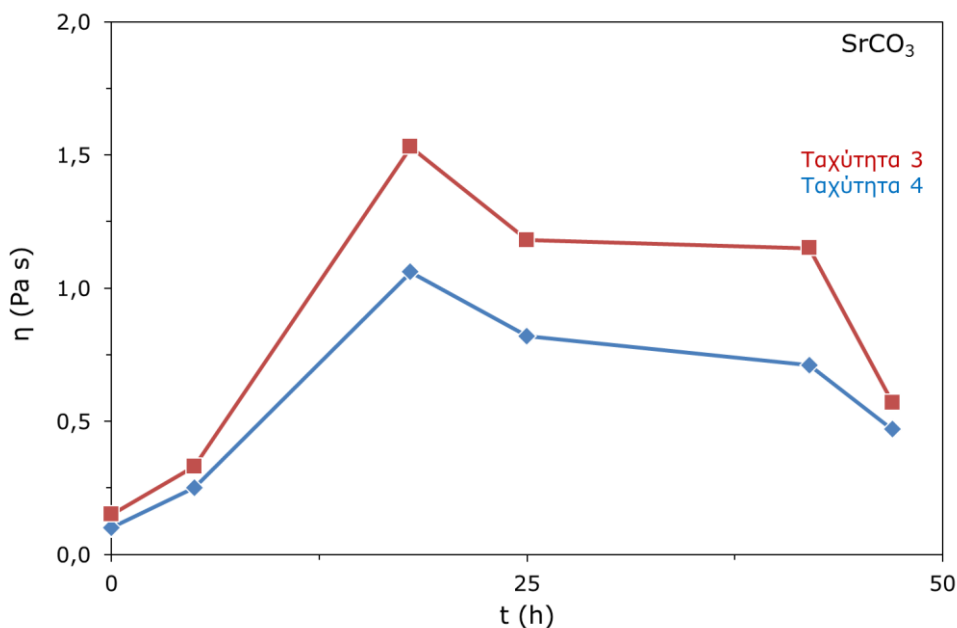
τη χρήση του CaCO_3 (Πίνακας 2). Όλα τα υδροπηκτώματα ήταν συγκέντρωσης 1%.

Το ένυδρο χλωριούχο άλας του μαγνησίου που χρησιμοποιήθηκε είναι ευδιάλυτο στο νερό. Συνεπώς, όλα τα ιόντα του Mg^{2+} ήταν αμέσως διαθέσιμα στο διάλυμα του αλγινικού οξέος. Παρ'όλα αυτά, δεν παρατηρήθηκε σχηματισμός υδροπηκτώματος. Αυτό επιβεβαιώθηκε και με μετρήσεις του ιξώδους, όπου η τιμή του ιξώδους του τελικού διαλύματος ($0,03 \text{ Pa}\cdot\text{s}$, σε θερμοκρασία περιβάλλοντος) ήταν στην τάξη μεγέθους του διαλύματος του αλγινικού οξέος. Αυτό δείχνει ότι, σε αντίθεση με τα ιόντα Ca^{2+} , τα ιόντα Mg^{2+} δεν μπορούν να σχηματίσουν υδροπήκτωμα με το αλγινικό οξύ, τουλάχιστον στις πειραματικές συνθήκες που μελετήθηκαν στην παρούσα εργασία.

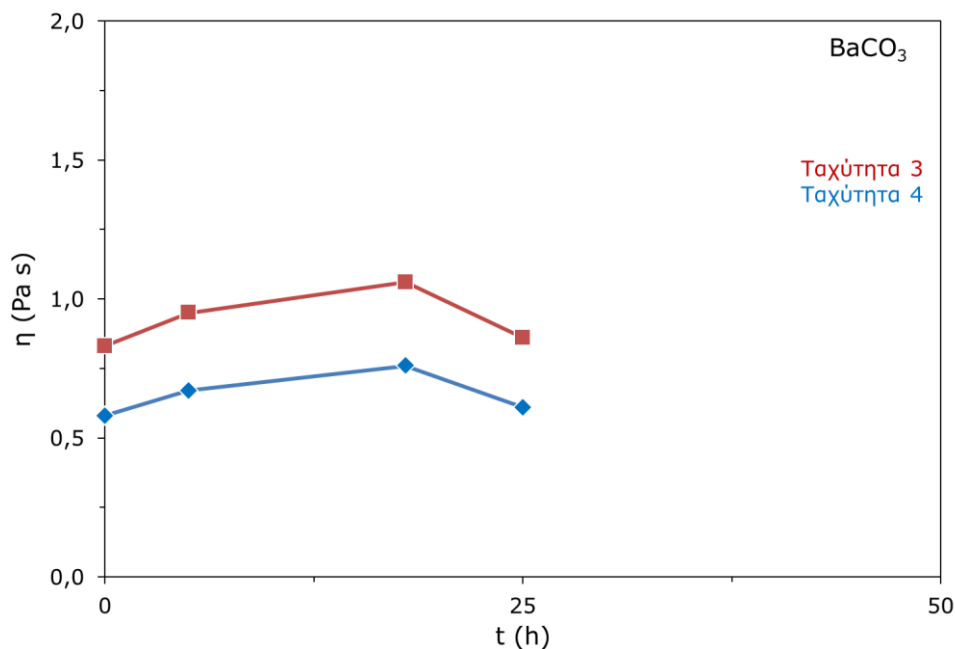
Αντίθετα, τα ιόντα του Sr (Sr^{2+}) και του Ba (Ba^{2+}) οδήγησαν στη ζελατινοποίηση και στο σχηματισμό υδροπηκτώματος πολύ καλής ποιότητας (από οπτική παρατήρηση). Σε σύγκριση με το ευδιάλυτο CaCl_2 ($74.5 \text{ g} / 100 \text{ ml H}_2\text{O}$, στους 20°C), τα ανθρακικά άλατα του ασβεστίου, του στροντίου και του βαρίου είναι αρκετά δυσδιάλυτα ($1,3$, $1,1$ και $2,4 \text{ mg} / 100 \text{ ml}$ στους $20\text{-}25^\circ\text{C}$, για το CaCO_3 , το SrCO_3 και το BaCO_3 , αντίστοιχα). Συνεπώς, η παροχή των ιόντων Sr^{2+} και Ba^{2+} έγινε με όξινη διάλυση των ανθρακικών τους αλάτων με την προσθήκη της GDL, ο δε σχηματισμός των υδροπηκτωμάτων τους έγινε με το μηχανισμό της εσωτερικής ζελατινοποίησης. Αυτό αποδεικνύεται κυρίως από την κινητική της ζελατινοποίησης του υδροπηκτώματος του Sr (Εικόνα 38), η οποία ομοιάζει με τις αντίστοιχες καμπύλες που ελήφθησαν κατά τη μελέτη του σχηματισμού του υδροπηκτώματος από CaCO_3 . Συγκεκριμένα, παρατηρείται ότι, η ζελατινοποίηση αρχίζει από την πρώτη στιγμή. Η πρώτη τιμή του ιξώδους στα διαγράμματα είναι περίπου 10 φορές υψηλότερη ($0,15$ και $0,1 \text{ Pa s}$ για τις ταχύτητες 3 και 4, αντίστοιχα) από την αντίστοιχη τιμή του διαλύματος του αλγινικού οξέος. Το ιξώδες αυξάνεται σταδιακά με το χρόνο και λαμβάνει μέγιστη τιμή σε 18 ώρες. Όμως, σε αντίθεση με το υδροπήκτωμα που παρασκευάστηκε με CaCO_3 , το υδροπήκτωμα του Sr παρουσιάζει σταδιακή ελάττωση του ιξώδους του με το χρόνο. Η ερμηνεία αυτού θα γίνει στην ενότητα της θεωρητικής μελέτης.

Το υδροπήκτωμα του Ba σχηματίστηκε ακαριαία (Εικόνα 39) και η ταχεία ζελατινοποίηση οδήγησε σε ένα καλής ποιότητας υδροπήκτωμα. Αυτό θα μπορούσε να αποδοθεί στη σχεδόν διπλάσια διαλυτότητα του BaCO_3 σε σχέση με τα CaCO_3 και SrCO_3 . Έτσι, στο ήπια όξινο διάλυμα, λόγω της GDL, ευνοήθηκε η διάλυση του BaCO_3 και η παροχή όλων (ή ενός πολύ μεγάλου μέρους) των ιόντων Ba^{2+} ώστε να γίνει αμέσως η ζελατινοποίηση του αλγινικού οξέος. Επίσης, σε σύγκριση με την κινητική του σχηματισμού υδροπηκτώματος του Sr (Εικόνα 38), στο υδροπήκτωμα

του Ba παρατηρείται μια πολύ μικρή ελάττωση του ιξώδους μετά τις 18 ώρες.

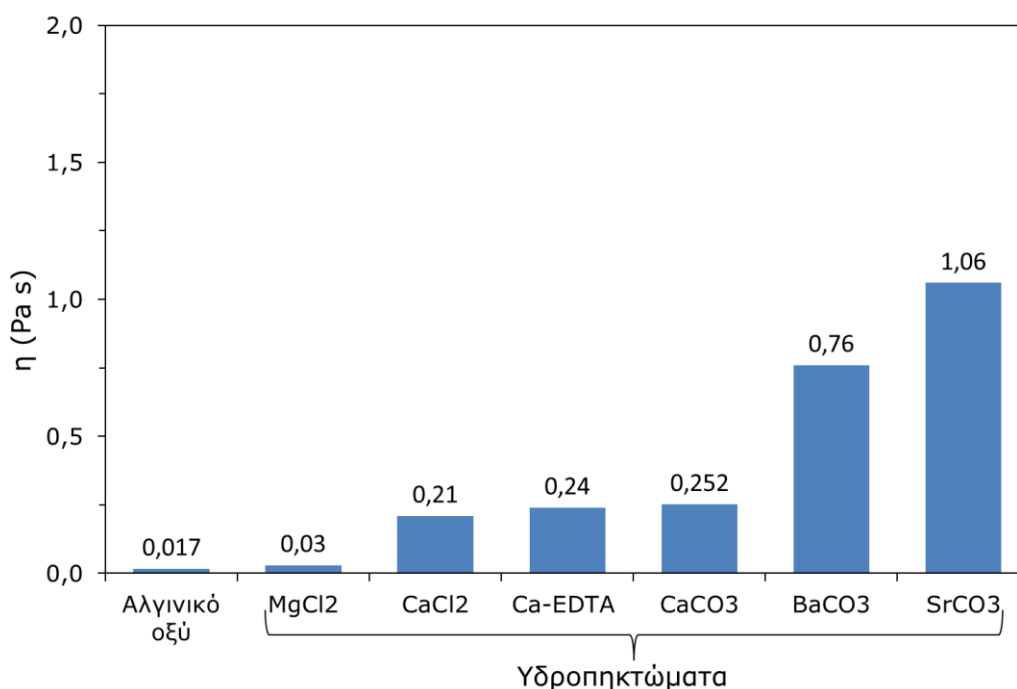


Εικόνα 38. Αύξηση του δυναμικού ιξώδους (η) με το χρόνο (t) στο αλγινικό υδροπρήκτωμα 1% που παρασκευάστηκε με SrCO_3 στις ταχύτητες 3 και 4. (Οι μετρήσεις έγιναν σε θερμοκρασία περιβάλλοντος. Τα πηκτώματα ήταν υπό συνεχή ήπια ανάδευση. Η σταθερή απόκλιση των παρουσιαζόμενων πειραματικών τιμών είναι μικρότερη του 5%).



Εικόνα 39. Αύξηση του δυναμικού ιξώδους (η) με το χρόνο (t) στο αλγινικό υδροπρήκτωμα 1% που παρασκευάστηκε με BaCO_3 στις ταχύτητες 3 και 4. (Οι μετρήσεις έγιναν σε θερμοκρασία περιβάλλοντος. Τα πηκτώματα ήταν υπό συνεχή ήπια ανάδευση. Η σταθερή απόκλιση των παρουσιαζόμενων πειραματικών τιμών είναι μικρότερη του 5%).

Η επίδραση των ιόντων των αλκαλικών γαιών στο σχηματισμό του αλγινικού υδροπηκτώματος 1% συνοψίζεται στην Εικόνα 40 (οι τιμές είναι από μετρήσεις που έγιναν σε θερμοκρασία περιβάλλοντος και στην ταχύτητα 4). Αμέσως συνάγεται το συμπέρασμα ότι τα ιόντα Mg^{2+} παρουσιάζουν φτωχή ικανότητα σχηματισμού υδροπηκτώματος. Δεν υπάρχουν σημαντικές διαφορές στις τιμές του ιξώδους ανάμεσα στα υδροπηκτώματα του Ca, στα οποία, όμως, το ιξώδες τους αυξάνεται με τη σειρά $CaCl_2$, Ca-EDTA, $CaCO_3$, αναφορικά με τον τρόπο παρασκευής τους. Τέλος, οι μέγιστες τιμές του ιξώδους των υδροπηκτωμάτων του Sr και του Ba είναι πολύ πιο υψηλές από τις αντίστοιχες τιμές του ιξώδους των υδροπηκτωμάτων 1% που παρήχθησαν με τα ιόντα Ca^{2+} , είτε με $CaCl_2$, είτε με $CaCO_3$. Η θεωρητική μελέτη που ακολουθεί στην επόμενη παράγραφο έγινε με σκοπό να ρίξει φως και να αποσαφηνίσει τις αιτίες στις οποίες οφείλονται οι διαφορές αυτές μεταξύ της ικανότητας σχηματισμού των υδροπηκτωμάτων, όπως αποτυπώνονται στην Εικόνα 40.



Εικόνα 40. Σύγκριση τιμών δυναμικού ιξώδους υδροπηκτωμάτων 1% που παρασκευάστηκαν με διαφορετικές πηγές και τρόπους παροχής δισθενών κατιόντων και αντίστοιχη τιμή διαλύματος αλγινικού οξέος, μετρημένες στην ταχύτητα 4, σε θερμοκρασία περιβάλλοντος. (Η σταθερή απόκλιση των παρουσιαζόμενων πειραματικών τιμών είναι μικρότερη του 5%).

3.2.6 Θεωρητικοί υπολογισμοί για τη μελέτη της επίδρασης δισθενών κατιόντων και της συγκέντρωσης ιόντων ασβεστίου στη σταθερότητα του υδροπηκτώματος

3.2.6.1 Γενικά - Εισαγωγή

Θεωρητική χημεία

Ο κλάδος της θεωρητικής χημείας αφορά στην εφαρμογή μαθηματικών μοντέλων και εργαλείων της φυσικής, στοχεύοντας στην ανάλυση χημικών διεργασιών. Τα θεωρητικά μοντέλα αποτελούν ιδανικές περιγραφές χημικών συστημάτων οι οποίες επιτρέπουν εξαιρετικές προβλέψεις για ιδιότητες ατόμων, μορίων, αλλά και της πορείας χημικών αντιδράσεων. Οι υπολογιστικές μέθοδοι χωρίζονται σε δύο κατηγορίες. Στις μεθόδους που στηρίζονται σε βασικές αρχές κβαντομηχανικής και σε αυτές οι οποίες χρησιμοποιούν κυρίως αρχές της κλασικής φυσικής για την περιγραφή χημικών διεργασιών. Οι κβαντομηχανικές μέθοδοι έχουν στόχο την επίλυση της εξίσωσης του Schrodinger, η οποία περιγράφει την κατάσταση ενός κβαντομηχανικού συστήματος. Η ηλεκτρονιακή κυματοσυνάρτηση ενός πολυατομικού μορίου εξαρτάται από τα μήκη δεσμών, τις γωνίες δεσμών και τις διέδρες γωνίες περιστροφής γύρω από απλούς δεσμούς (οι γωνίες αυτές καθορίζουν τη μοριακή διαμόρφωση). Επομένως, μια πλήρης κβαντομηχανική μελέτη ενός πολυατομικού μορίου συνεπάγεται τον υπολογισμό της ηλεκτρονιακής κυματοσυνάρτησης για όλες αυτές τις παραμέτρους. Τα μήκη και οι γωνίες δεσμών του μορίου μεταβάλλονται με σκοπό την ελαχιστοποίηση της ηλεκτρονιακής ενέργειας του μοριακού συστήματος.

Η επίλυση της εξίσωσης Schrodinger για πολυατομικά συστήματα υλοποιείται δια μέσου των μεθόδων (α) *ab initio*, (β) ημιεμπειρικών (semiempirical), (γ) εμπειρικών (empirical), και (δ) θεωρίας συναρτησοειδών ηλεκτρονικής πυκνότητας (Density Functional Theory, DFT). Οι *ab initio* υπολογισμοί υιοθετούν πλήρως τις θεμελιώδεις αρχές της κβαντομηχανικής και τις σταθερές ταχύτητας του φωτός, του Planck, καθώς και τις τιμές μάζας και φορτίου του πρωτονίου, του νετρονίου και του ηλεκτρονίου συμπεριλαμβάνοντας όλα τα ηλεκτρόνια στην έκφραση της χαμηλτονιανής του συστήματος. Οι ημιεμπειρικές κβαντομηχανικές μέθοδοι χρησιμοποιούν έναν απλουστευμένο χαμιλτονιανό τελεστή, αντί αυτού της πλήρους μορφής, αντικαθιστώντας μέρος των υπολογιζομένων αλληλεπιδράσεων από παραμετροποιημένες τιμές. Οι εμπειρικές μεθοδολογίες χαρακτηρίζονται από την υπολογιστική τους απλότητα και τη μειωμένη ακρίβεια των αποτελεσμάτων τους, καθώς αντικαθίσταται η επίλυση κάθε ολοκληρώματος από συνιστώμενες τιμές παραμέτρων. Η μεθοδολογία DFT χρησιμοποιεί την ηλεκτρονιακή πυκνότητα, ρ , αντί της

κυματοσυνάρτησης, Ψ , που περιγράφει το υπό μελέτη σύστημα, για τον υπολογισμό της ηλεκτρονιακής του ενέργειας. Για την υλοποίηση των θεωρητικών υπολογισμών της παρούσας διατριβής επιλέχθηκε να χρησιμοποιηθεί η θεωρία συναρτησιακών της ηλεκτρονιακής πυκνότητας (DFT) (114).

Θεωρία συναρτησιακών της ηλεκτρονιακής πυκνότητας (DFT)

Μια τεχνική που έχει κερδίσει σημαντικό έδαφος τα τελευταία χρόνια και έχει γίνει μια από τις πιο ευρέως χρησιμοποιούμενες τεχνικές για τον υπολογισμό της μοριακής δομής είναι η θεωρία συναρτησειδούς της πυκνότητας (density functional theory, DFT).

Η ηλεκτρονιακή κυματοσυνάρτηση ενός μορίου N -ηλεκτρονίων εξαρτάται από $3N$ χωρικές και N σπιν συντεταγμένες. Επειδή ο χαμιλτονιανός τελεστής περιέχει χωρικούς όρους ενός και δύο ηλεκτρονίων, η μοριακή ενέργεια μπορεί να εκφραστεί με ολοκληρώματα που να περιλαμβάνουν μόνο έξι χωρικές συντεταγμένες. Δηλαδή, η κυματοσυνάρτηση ενός πολυηλεκτρονιακού μορίου περιέχει περισσότερη πληροφορία από την απαιτούμενη και πάσχει από έλλειψη άμεσης φυσικής σπουδαιότητας. Γι' αυτόν το λόγο, αναζητήθηκαν συναρτήσεις οι οποίες συμπεριλαμβάνουν μικρότερο αριθμό μεταβλητών σε σχέση με την κυματοσυνάρτηση Ψ και μπορούν να χρησιμοποιηθούν για τον υπολογισμό της ενέργειας του συστήματος καθώς και άλλων ιδιοτήτων (114).

Σύμφωνα με τις σύγχρονες αντιλήψεις, οι ιδιότητες κάθε μορίου καθορίζονται πλήρως από την κατανομή των ηλεκτρονίων του. Αυτή η κατανομή του ηλεκτρονιακού νέφους γύρω από κάθε μόριο μας επιτρέπει να το αναγνωρίσουμε αφού είναι μοναδική για κάθε χημική δομή. Μάλιστα, κατά την προσέγγιση δυο μορίων είναι δυνατή η αναγνώριση του καθενός, αφού ολόκληρη η απαιτούμενη πληροφορία για τον τρόπο που ένα μόριο συμπεριφέρεται βρίσκεται αποθηκευμένη στο σχήμα και τη μορφή του ηλεκτρονιακού του νέφους. Η παραπάνω διαπίστωση αποτελεί σημαντικό παράγοντα στην ανάπτυξη της φαρμακευτικής χημείας καθώς και στη μελέτη της δράσης των φαρμάκων που είναι απόρροια του θεωρήματος Hohenberg-Kohn. Σύμφωνα με αυτό το θεώρημα, η κατανομή της ηλεκτρονικής πυκνότητας ενός μορίου καθορίζει πλήρως την ενέργειά του, καθώς και το σύνολο των ιδιοτήτων του στην κατάσταση ελάχιστης ενέργειας, δηλαδή στη διαμόρφωσή του που χαρακτηρίζεται ως η ενεργειακά ελάχιστη.

$$E_{(u,N)}[n] = F[n] + \int u(\vec{r})n(\vec{r})d^3r \quad (1)$$

(1): Η εξίσωση των Hohenberg-Kohn για τον υπολογισμό της ενέργειας $E(u,n)$ ενός συστήματος πολλών σωματιδίων, όπου, N ο αριθμός των ηλεκτρονίων, $U(r)$ το δυναμικό και $F[n]$ η συνάρτηση ηλεκτρονικής πυκνότητας.

Εφαλτήριο για την ανάπτυξη της θεωρίας τους υπήρξε η αντιμετώπιση του προβλήματος της ηλεκτρονικής δομής συστημάτων πολλών σωματιδίων, η οποία ήταν η βάση για την καθιέρωση της DFT θεωρίας (Density Function Theory). Η ριζοσπαστική ιδέα της DFT είναι η χρήση της ολικής πυκνότητας των ηλεκτρονίων αντί της κυματοσυνάρτησης πολλών σωματιδίων Ψ , στην εξίσωση του Schrödinger. Αυτή η ιδέα αποτελεί μια τεράστια απλοποίηση καθώς δεν χρειάζεται να ξεκινήσει κάποιος την αντιμετώπιση του προβλήματος με μια δραστική προσέγγιση, όπως η Hartree ή η Hartree-Fock, οι οποίες περιγράφουν το σύστημα σαν ένα σύνολο από μεμονωμένα σωματίδια πάνω στα οποία επιδρά το δυναμικό που προέρχεται από το θετικό φορτίο των πυρήνων και ένα δυναμικό που προέρχεται από όλα τα υπόλοιπα ηλεκτρόνια, όπου θα ήταν απαραίτητη η χρήση της κυματοσυνάρτησης πολλών σωματιδίων. Η θεωρία αυτή έφερε μια επανάσταση στους υπολογισμούς των ιδιοτήτων των μορίων και των υλικών γενικότερα, και η εφαρμογή της εξακολουθεί μέχρι σήμερα να επεκτείνεται σε νέα προβλήματα. Η καθοριστική επίδραση και ο σημαντικός ρόλος της στην επιστήμη επιβεβαιώθηκε, μεταξύ άλλων, και από το βραβείο Νόμπελ Χημείας που απονεμήθηκε στο βασικό δημιουργό της W. Kohn το 1998 (115).

Στα πλεονεκτήματά της περιλαμβάνονται η λιγότερη υπολογιστική δουλειά, ο λιγότερος υπολογιστικός χρόνος και σε μερικές περιπτώσεις η καλύτερη συμφωνία με τις εμπειρικές τιμές από αυτήν που επιτυγχάνεται με τις διαδικασίες Hartree-Fock. Η DFT επικεντρώνεται στην ηλεκτρονιακή πυκνότητα ρ , αντί της κυματοσυνάρτησης Ψ . Το επίθετο συναρτησοειδές προέρχεται από το γεγονός ότι η ενέργεια του μορίου είναι συνάρτηση της ηλεκτρονιακής πυκνότητας, που γράφεται ως $E(\rho)$, και η ηλεκτρονιακή πυκνότητα είναι με τη σειρά της συνάρτηση της θέσης $\rho(r)$ και στα μαθηματικά η συνάρτηση μιας συνάρτησης ονομάζεται συναρτησοειδές. Τα κατειλημμένα τροχιακά χρησιμοποιούνται για την κατασκευή της ηλεκτρονιακής πυκνότητας μέσω της σχέσης:

$$\rho(r) = \sum_m |\psi_m(r)|^2 \quad \text{ηλεκτρονιακή πυκνότητα πιθανότητας}$$

και υπολογίζονται από τις εξισώσεις Kohn-Sham, που μοιάζουν με τις εξισώσεις Hartree-Fock εκτός από τον όρο που ονομάζεται δυναμικό συσχέτισης-ανταλλαγής (115).

Η μέθοδος B3LYP

Οι υβριδικές συναρτησιακές είναι μια τάξη προσεγγίσεων της συναρτησιακής της ενέργειας ανταλλαγής – συσχέτισης στη θεωρία συναρτησιακής πυκνότητας (DFT), που ενσωματώνουν ένα τμήμα ανταλλαγής της θεωρίας Hartree-Fock με ανταλλαγή και συσχέτιση από άλλες πηγές (*ab initio* ή εμπειρικές). Η ακριβής συναρτησιακή της

ενέργειας ανταλλαγής εκφράζεται περισσότερο ως τροχιακά Kohn-Sham παρά σε σχέση με την πυκνότητα, γι' αυτό και ονομάζεται έμμεση συναρτησιακή πυκνότητα. Στην παρούσα διατριβή, όλοι οι κβαντοχημικοί υπολογισμοί έγιναν με τη χρήση B3LYP, όπως συχνά αναφέρεται στη διεθνή βιβλιογραφία, η οποία είναι μια υβριδική τριπαραμετρική συναρτησιακή βασισμένη στην B3P86 ή αλλιώς B3P που προτάθηκε από τον Becke το 1993. Ονομάστηκε έτσι καθώς συνδυάζει τη συναρτησιακή ανταλλαγή του Becke (B88) με τη συναρτησιακή της συσχέτισης των Lee, Yang και Parr (LYP) και περιέχει 3 παραμέτρους. Ουσιαστικά, η πρώτη περιγραφή της B3LYP είναι αυτή που δημοσιεύτηκε από την Gaussian Inc. το 1994 (116). Μεταξύ του συνεχώς αυξανόμενου αριθμού των DFT μεθόδων, η υβριδική συναρτησιακή B3LYP αρχικά αναπτύχθηκε για να μελετήσει δονητική απορρόφηση και κυκλικό διχρωισμό (circular dichroism) και είναι η πιο συχνά χρησιμοποιούμενη εκδοχή.

Η συναρτησιακή ανταλλαγής-συσχέτισης της B3LYP είναι:

$$E_{xc}^{B3LYP} = E_x^{LDA} + a_o(E_x^{HF} - E_x^{LDA}) + a_x(E_x^{GGA} - E_x^{LDA}) + E_c^{LDA} + a_c(E_c^{GGA} - E_c^{LDA}) \quad (2)$$

όπου $a_o=0.2$, $a_x=0.72$ και $a_c=0.81$. Τα E_x^{GGA} και E_c^{GGA} είναι οι γενικευμένες προσεγγίσεις βαθμίδωσης: η συναρτησιακή ανταλλαγή Becke 88 και η συναρτησιακή συσχέτισης των Lee, Yang και Parr για την B3LYP και το E_c^{LDA} είναι η προσέγγιση τοπικής πυκνότητας VWN για τη συναρτησιακή συσχέτισης.

3.2.6.2 Θεωρητικοί υπολογισμοί (DFT) για το αλγινικό υδροπήκτωμα και ερμηνεία πειραματικών αποτελεσμάτων

Τα πειραματικά αποτελέσματα, τα οποία παρουσιάστηκαν στις προηγούμενες ενότητες, έδειξαν ότι, η συνεκτικότητα, η οποία αντανakλάται στις τιμές του ιξώδους, των αλγινικών υδροπηκτωμάτων, επηρεάζεται ισχυρά από το είδος των δισθενών κατιόντων που χρησιμοποιούνται για τη ζελατινοποίηση καθώς και την ποσότητά τους. Η ερμηνεία αυτών των πειραματικών ευρημάτων αποτέλεσε το έναυσμα για τη συγκεκριμένη θεωρητική ανάλυση. Έτσι, στο πλαίσιο της παρούσας μελέτης, έγιναν κβαντομηχανικοί υπολογισμοί της ηλεκτρονιακής βελτιστοποίησης της μοριακής δομής (επιτρέποντας σε όλα τα άτομα των μονάδων του αλγινικού οξέος να αλλάζουν θέση ώστε να επιτευχθεί η ελαχιστοποίηση της ενέργειας) και των συχνотήτων δόνησης.

FT-IR φάσμα δομικών μονάδων αλγινικού οξέος G και M

Όπως αναφέρθηκε και στις ενότητες με την παρουσίαση των πειραματικών αποτελεσμάτων, τα φάσματα IR δεν παρείχαν πληροφορίες για το σχηματισμό των υδροπηκτωμάτων. Στα φάσματα IR καταγράφονταν μόνο οι δονήσεις που οφείλονται στις δομικές μονάδες του αλγινικού οξέος,

δηλαδή στις μονάδες του γουλουρονικού (G) και μαννουρονικού οξέος (M). Έτσι, σε πρώτη φάση, έγινε, με την υπολογιστική μέθοδο DFT, ο θεωρητικός υπολογισμός και σχεδιασμός της στερεοχημικής διαμόρφωσης των μονάδων G και M καθώς και ο υπολογισμός του θεωρητικού φάσματος IR που δίνουν οι δομικές αυτές μονάδες. Για τη βέλτιστη προσομοίωση του υπό μελέτη συστήματος στη βάση της προσεγγιστικής δυνατότητας της κβαντικής χημείας εφαρμόσαμε, για λόγους σύγκρισης, παράλληλα με τη DFT και της HF (Hartee-Fock) μεθοδολογία χρησιμοποιώντας το ίδιο set συναρτήσεων βάσης. Όλοι οι ενεργειακοί υπολογισμοί καθώς και αυτοί που αφορούν στον υπολογισμό και στην ανάλυση των συχνотήτων δόνησης πραγματοποιήθηκαν σε επίπεδο θεωρίας B3LYP/6-31+G(d,p). Η ανάλυση του φάσματος IR έγινε στο εύρος $200-4000\text{ cm}^{-1}$ χρησιμοποιώντας το λογισμικό πακέτο Gauss View. Τέλος, για τον τερματισμό των δεσμών στα όρια του μοντέλου χρησιμοποιήθηκαν άτομα υδρογόνου.

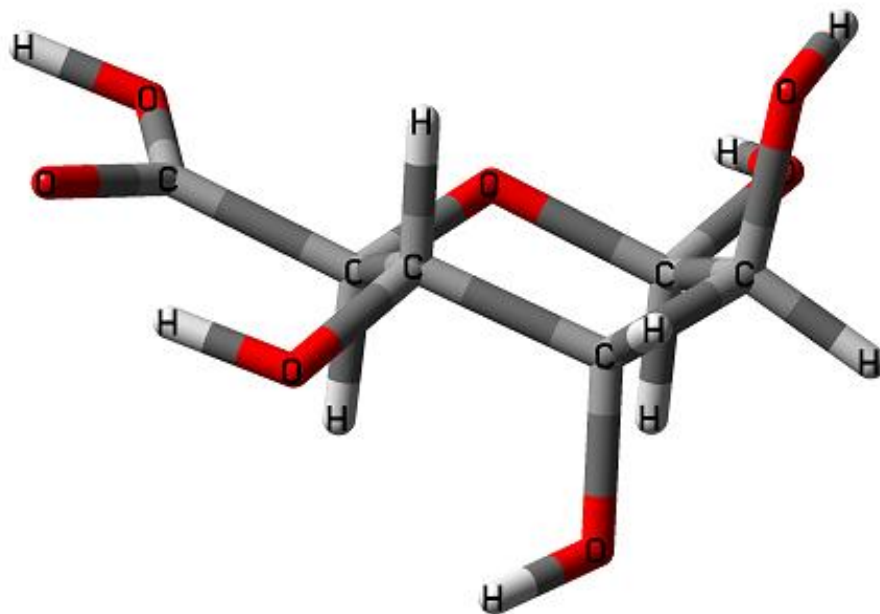
Σημαντικό στοιχείο, που σχετίζεται άμεσα με την αξιολόγηση της αποτελεσματικότητας της θεωρητικής μεθόδου, αποτελεί ο συντελεστής κλιμάκωσης εξορθολογισμού των συχνотήτων δόνησης (scale factor) ώστε οι θεωρητικές τιμές που υπολογίζονται από τους υπολογισμούς DFT να προσεγγίζουν με υψηλή ακρίβεια τις πειραματικές. Η ανάλυση των συχνотήτων του φάσματος IR που προσδιορίστηκαν με τους θεωρητικούς υπολογισμούς DFT έγινε στη βάση των βελτιστοποιημένων δομών, όπως αυτές έχουν προκύψει από προηγούμενες θεωρητικές προσεγγίσεις.

Γενικά, οι θεωρητικά υπολογισμένες αρμονικές συχνότητες δόνησης διαφέρουν από τις αντίστοιχες πειραματικές, λόγω των παραλειπόμενων μη αρμονικών επιδράσεων, της αδυναμίας ενσωμάτωσης της συσχέτισης ηλεκτρονίων, και της χρήσης ενός πεπερασμένου συνόλου βάσης. Στην παρούσα μελέτη, ως σημείο αναφοράς χρησιμοποιήθηκε η πειραματική τιμή της συχνотήτας δόνησης τάσης του δεσμού C=O της καρβοξυλομάδας (-COOH). Έτσι, η τιμή 0,95 υιοθετήθηκε ως η καλύτερη για το συντελεστή κλιμάκωσης, για τον εξορθολογισμό των θεωρητικά υπολογισμένων συχνотήτων δόνησης με σκοπό την καλύτερη δυνατή σχέση με το πειραματικό φάσμα (όπως θα δούμε στη συνέχεια). Η τιμή αυτή αντιστοιχεί στη B3LYP ανάλυση συχνотήτων με το 6-31+G(d,p) σύνολο βάσης, θεωρείται βέλτιστη για τους υπολογισμούς DFT και είναι πολύ καλύτερη συγκρινόμενη με την τιμή 0,87 της μεθόδου HF, χρησιμοποιώντας το ίδιο basis set.

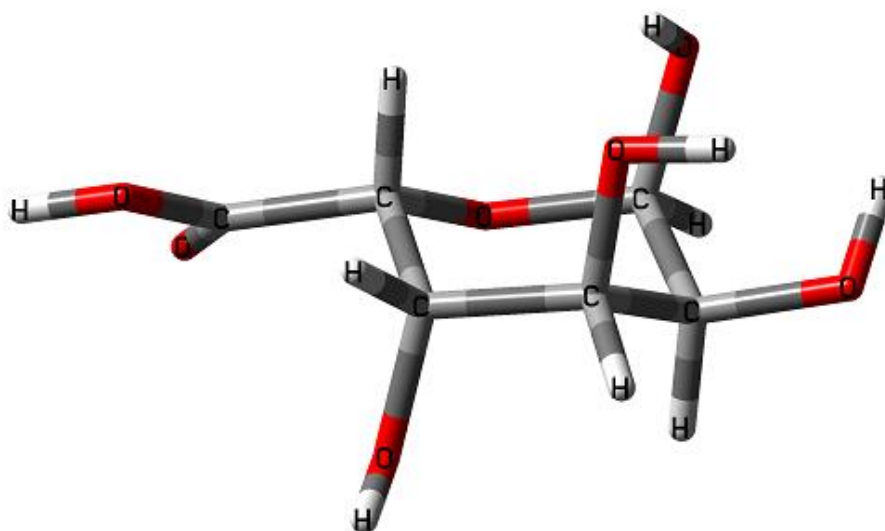
Παρουσίαση και συζήτηση των θεωρητικών αποτελεσμάτων

Στην Εικόνα 41 παρουσιάζονται οι τρισδιάστατες δομές των πεντοζών (με τις 4 υδροξυλομάδες και την καρβοξυλομάδα) του μαννουρονικού (M) και του γουλουρονικού οξέος (G), όπως υπολογίστηκαν με τη μέθοδο DFT. Επειδή και τα πέντε άτομα του C στο δακτύλιο της πεντόζης είναι ασύμμετρα, (δηλαδή είναι συνδεδεμένα με 4 διαφορετικά άτομα ή ομάδες),

η θέση των 4 υδροξυλίων στο δακτύλιο ορίζει τη διαφορά μεταξύ των δύο δομικών μονάδων του αλγινικού οξέος, του Μ και του G, οι οποίες κατά τ'άλλα έχουν τον ίδιο χημικό και συντακτικό τύπο.



Μαννουρονικό οξύ (M)

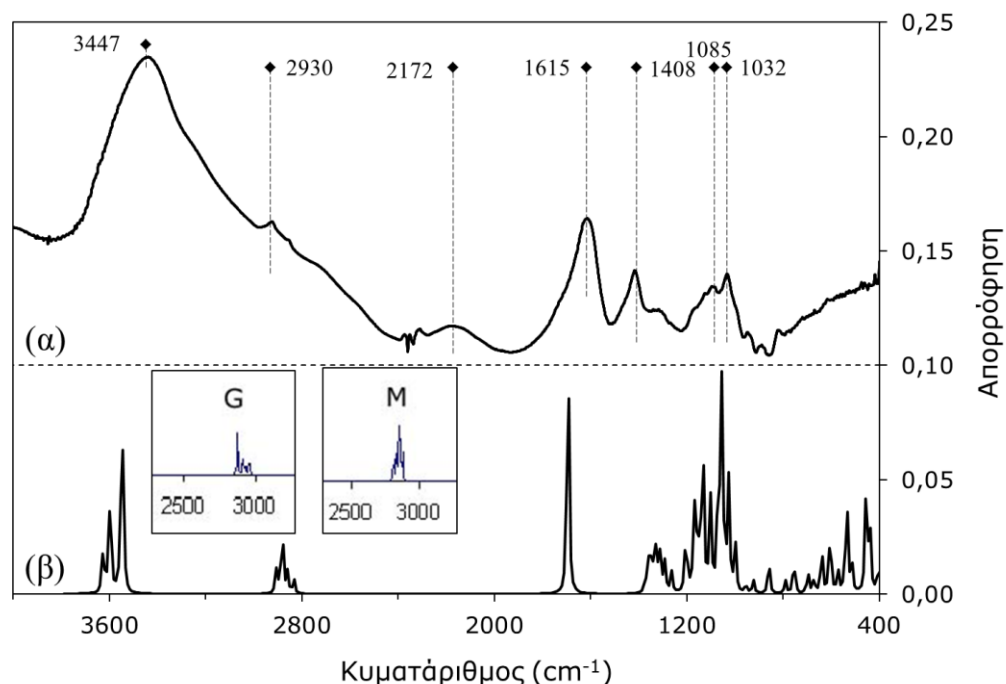


Γουλουρονικό οξύ (G)

Εικόνα 41. Δομή του μαννουρονικού οξέος (M) και του γουλουρονικού οξέος (G) θεωρητικά υπολογισμένων με τη μέθοδο DFT σε επίπεδο θεωρίας B3LYP/6-31+G(d,p).

Με βάση τις δομές αυτές, υπολογίστηκε (με υπολογισμούς DFT) το θεωρητικό φάσμα IR. Στην Εικόνα 42 συγκρίνεται το θεωρητικά υπολογισμένο φάσμα IR (ο συντελεστής 0,95 έχει ληφθεί υπόψιν) με το πειραματικό φάσμα του αλγινικού οξέος (Εικόνα 31 (α)). Παρατηρείται ότι το θεωρητικό φάσμα συμφωνεί με το πειραματικό. Διακρίνονται οι 4 περιοχές δονήσεων, όπως αυτές είχαν αποδοθεί για την ερμηνεία του πειραματικού φάσματος (Ενότητα 3.2.1). Συγκεκριμένα, στην περιοχή των υψηλών συχνοτήτων ($> 3500 \text{ cm}^{-1}$) καταγράφονται οι απορροφήσεις λόγω των δονήσεων τάσης των ατόμων του Η στις μονάδες του υδροξυλίου (OH). Οι δονήσεις τάσης των ατόμων του Η στους δεσμούς C-H δίνουν τη ζώνη απορρόφησης σε συχνότητες ελαφρώς μικρότερες των 3000 cm^{-1} . Εδώ, πρέπει να σημειωθεί ότι, στις δονήσεις αυτές παρατηρείται η μόνη σημαντική διαφορά μεταξύ των μονάδων Μ και G. Συγκεκριμένα, στη μονάδα Μ οι δονήσεις καταγράφονται σε συχνότητες ελαφρώς μικρότερες από ότι στη μονάδα G (βλ. τα δύο ένθετα στην Εικόνα 42). Αυτό οφείλεται στο ότι, όταν τα άτομα του Η είναι όλα στραμμένα προς το ίδιο επίπεδο, υπάρχει αλληλεπίδραση με τα άτομα του Ο στα OH και έτσι αλλάζει ελαφρώς η συχνότητα δόνησης των δεσμών C-H. Σε πιο χαμηλές συχνότητες καταγράφεται η έντονη και χαρακτηριστική δόνηση του διπλού δεσμού C=O της καρβοξυλομάδας ($\sim 1600\text{-}1700 \text{ cm}^{-1}$). Τέλος, οι κορυφές στις πιο μικρές συχνότητες οφείλονται σε δονήσεις κάμψης του σκελετού (συστροφές) του μορίου.

Οι θεωρητικοί υπολογισμοί, που έγιναν με τη χρήση του πακέτου Gaussian 09, έδειξαν ότι, η θέση των υδροξυλίων (λόγω της αλληλεπικάλυψης των μοριακών τροχιακών) είναι καθοριστική για την ενέργεια της κάθε διαμόρφωσης, Μ ή G. Πιο συγκεκριμένα, βρέθηκε ότι, το μαννουρονικό οξύ είναι πιο σταθερό ενεργειακά, κατά $\sim 5.6 \text{ kcal/mol}$, από το γουλουρονικό οξύ. Η ενεργειακή αυτή διαφορά, όμως, είναι μικρή, που σημαίνει ότι η αλλαγή της θέσης ενός υδροξυλίου, επάνω ή κάτω από το επίπεδο του δακτυλίου της πεντόζης, δεν αλλάζει πρακτικά παρά ελάχιστα το φάσμα δόνησης (IR) του μορίου.



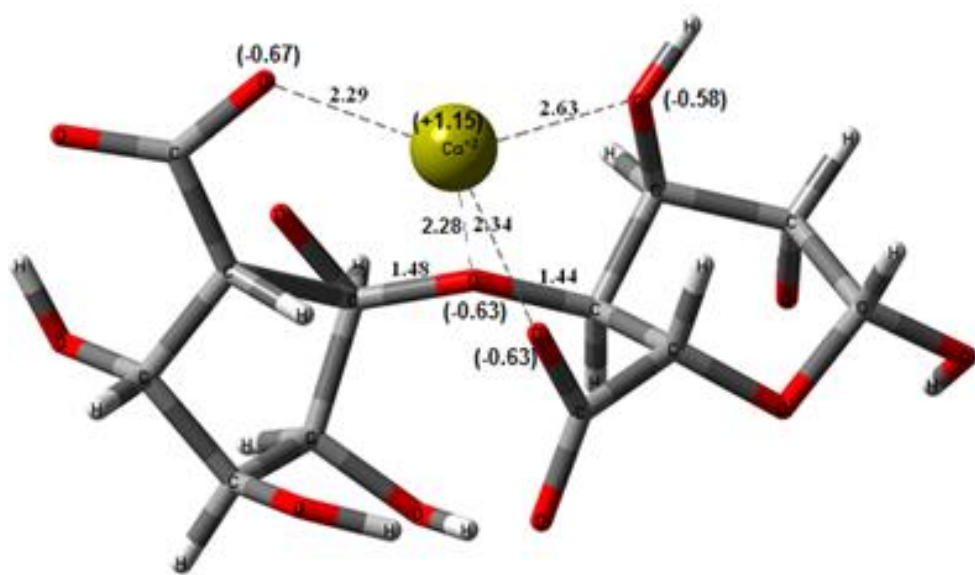
Εικόνα 42. (α) Πειραματικό φάσμα IR του αλγινικού οξέος και (β) θεωρητικά υπολογισμένο (με DFT) φάσμα των μονάδων M και G. Στις δύο ένθετες εικόνες παρουσιάζονται οι διαφορές των (θεωρητικών) φασμάτων απορρόφησης των μονάδων M και G που οφείλονται στις δονήσεις τάσης των ατόμων του H στους δεσμούς C-H.

Επίδραση των δισθενών κατιόντων στο δίκτυο του αλγινικού υδροπηκτώματος: Θεωρητικά αποτελέσματα και ερμηνεία πειραματικών αποτελεσμάτων

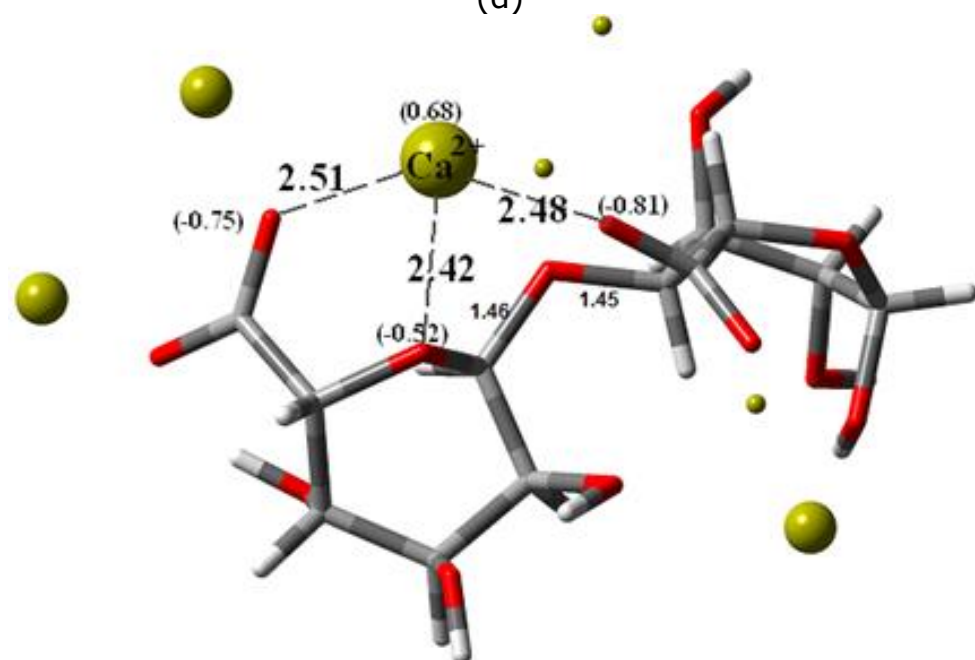
Η χημική αναπαράσταση κατανομής του ηλεκτρονιακού φορτίου σε ένα μόριο μπορεί να δοθεί από την κατά Mulliken ανάλυση (MAP, Mulliken atomic populations). Ο υπολογισμός τους θεωρείται ως ένα ποιοτικό εργαλείο για την ερμηνεία των τάσεων που αφορούν διαμοριακή μεταφορά φορτίου σε ένα μοριακό σύστημα καθώς επίσης και για την ερμηνεία του είδους και της ισχύος των αλληλεπιδράσεων (ηλεκτροστατικών και μη).

Στην παρούσα έρευνα, οι αριθμοί MAP των ατόμων που εμπλέκονται στην αλληλεπίδραση μεταξύ των ιόντων Ca^{2+} και του μορίου του αλγινικού οξέος (σε ιοντική μορφή) φαίνονται στις δομές των συμπλόκων της Εικόνα 43. Οι υπολογισμοί έγιναν με δύο ενωμένες μονάδες, θεωρώντας το διμερές των δύο δακτυλίων ως χαρακτηριστικό τμήμα της αλγινικής αλυσίδας και ικανό, σε αυτό, να αποτυπωθεί ο σχηματισμός του συμπλόκου με τα δισθενή αντισταθμικά κατιόντα. Στη συνέχεια, έγιναν οι εξής θεωρητικοί υπολογισμοί. Χρησιμοποιώντας ως δισθενές αντισταθμικό κατιόν το ιόν Ca^{2+} , στην αρχή υπολογίστηκε η βέλτιστη διαμόρφωση σχηματισμού συμπλόκου, η οποία αναμένεται να αντιστοιχεί στη μέγιστη τιμή ιξώδους (δηλαδή στη μέγιστη δικτύωση) του υδροπηκτώματος, που παρατηρήθηκε και πειραματικά. Η διαμόρφωση αυτή φαίνεται στην Εικόνα

43 (α). Με βάση αυτήν τη βέλτιστη διαμόρφωση, στο σύστημα προστέθηκε περίσσεια ιόντων Ca^{2+} και μελετήθηκε η νέα διαμόρφωση που αντιστοιχεί στην ελάχιστη ενέργεια του συστήματος (Εικόνα 43 (β)). Στις εικόνες αναγράφονται και οι αποστάσεις των ιοντικών δεσμών μεταξύ των κατιόντων του Ca^{2+} και του μορίου του αλγινικού.



(α)



(β)

Εικόνα 43. Τρισδιάστατη απεικόνιση 2 ενωμένων μονομερών του αλγινικού οξέος, υπολογισμένων σε επίπεδο θεωρίας B3LYP/6-31+G(d,p), σύμφωνα με υπολογισμούς DFT. (α) Οι δύο πεντόζες με ιόντα Ca^{2+} στη βέλτιστη διαμόρφωση (με τη βέλτιστη συγκέντρωση σε ιόντα Ca^{2+}), και (β) οι δύο πεντόζες με περίσσεια σε ιόντα Ca^{2+} .

Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι οι πιο σημαντικές διαφορές παρατηρήθηκαν στα άτομα του Ο των καρβοξυλομάδων (COO-) και στα άτομα του Ο των υδροξυλίων (OH) του αλγινικού. Είναι φάνερο ότι, η αύξηση του αριθμού των ιόντων Ca^{2+} στο σύστημα (περίπτωση περίσσειας ιόντων Ca^{2+} , Εικόνα 43 (β)), καθώς αυτό αναζητά, μέσω των υπολογισμών, να επιτύχει τη σταθερότερη ενεργειακή διαμόρφωση, έχει ως αποτέλεσμα την αύξηση των αποστάσεων ανάμεσα στα ιόντα Ca^{2+} και τις μονάδες της αλγινικής αλυσίδας που μπορούν να συζευχθούν με τα ιόντα του Ca^{2+} . Το θεωρητικό αυτό εύρημα εξηγεί το μέγιστο της τιμής του ιξώδους που καταγράφηκε στο διάγραμμα της Εικόνα 37 για συγκέντρωση Ca^{2+} 4,18 mM και την ελάττωση του ιξώδους για μεγαλύτερες συγκεντρώσεις Ca^{2+} . Αυτά τα αποτελέσματα δείχνουν ότι, όλο το ασβέστιο φιλοξενείται μέσα στο υδροπήκτωμα, όμως η περίσσεια ιόντων Ca^{2+} οδηγεί στη χαλάρωση της συνεκτικής και σφιχτής δομής του αλγινικού υδροπηκτώματος επειδή τα ιόντα που βρίσκονται έξω από τον κλωβό του χηλικού συμπλόκου μοιράζονται τις ίδιες δεσμικές θέσεις της αλγινικής αλυσίδας με τα ιόντα Ca^{2+} που βρίσκονται μέσα στον κλωβό αυτό. Έτσι, η αλυσίδα αρχίζει να στρέφεται και προς τα εξωτερικά (σε σχέση με το χηλικό σύμπλοκο) ιόντα του Ca^{2+} .

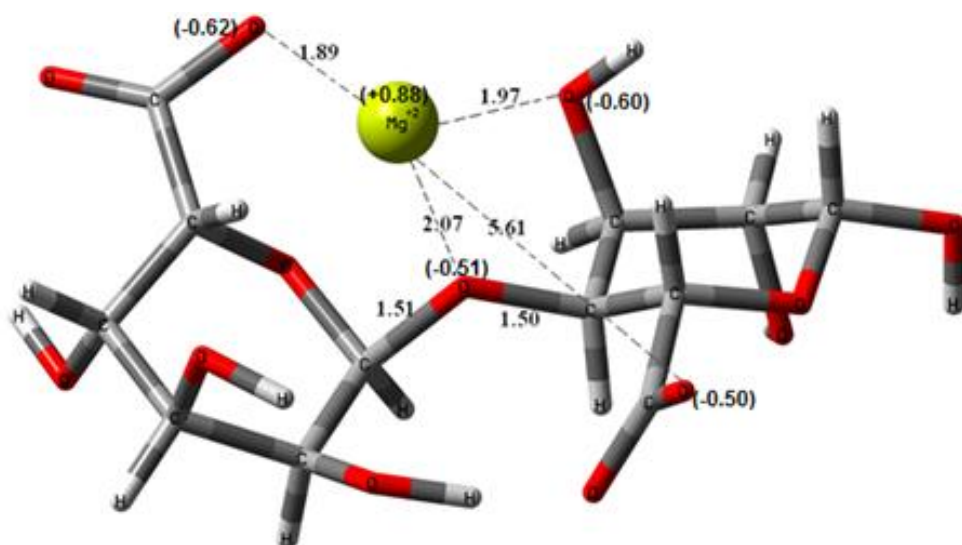
Οι διαφορές στις τιμές του ιξώδους ανάλογα με τον τρόπο παροχής των ιόντων Ca^{2+} (Εικόνα 40), σύμφωνα με τα αποτελέσματα των θεωρητικών αυτών υπολογισμών, δεν οφείλονται στη διαμόρφωση του συμπλόκου αλλά στο ρυθμό παροχής των ιόντων Ca^{2+} . Είναι σαφές ότι, το σύμπλοκο του αλγινικού οξέος με τα ιόντα Ca^{2+} , για να αποκτήσει το τελικό υδροπήκτωμα την πιο πυκνή και συνεκτική δομή, πρέπει να σχηματιστεί με αργό ρυθμό. Έτσι, η πιο υψηλή τιμή ιξώδους καταγράφηκε στο υδροπήκτωμα που παρήχθη με το μηχανισμό εσωτερικής ζελατινοποίησης με τη σταδιακή διάλυση του CaCO_3 σε ήπια όξινο pH. Στην περίπτωση της παρασκευής του υδροπηκτώματος με παροχή ιόντων Ca^{2+} από το σύμπλοκο Ca-EDTA, η ελαφρώς πιο χαμηλή τιμή ιξώδους οφείλεται στον ανταγωνισμό του EDTA και του αλγινικού μορίου να σχηματίσουν χηλικά σύμπλοκα με το ασβέστιο και λόγω του γεγονότος, όπως δείχνουν και οι θεωρητικοί υπολογισμοί, ότι το ασβέστιο είναι με αντιστρεπτό τρόπο δεσμευμένο στην αλυσίδα του αλγινικού οξέος. Τέλος, η μικρότερη τιμή που καταγράφηκε στα υδροπηκτώματα Ca που παρήχθησαν με το μηχανισμό διάλυσης/διάχυσης αποδίδεται στην άμεση απόδοση όλων των ιόντων Ca^{2+} , από τη διάλυση του CaCl_2 . Έτσι, παρά την έντονη ανάδευση, κάποιες περιοχές του υδροπηκτώματος ενδέχεται να είχαν ελαφρώς μικρότερη συγκέντρωση ασβεστίου από τη βέλτιστη και κάποιες υψηλότερη (και σύμφωνα με το διάγραμμα της Εικόνα 37, τόσο το υποασβεστιωμένο όσο και το υπερασβεστιωμένο υδροπήκτωμα έχει ελαττωμένη τιμή του ιξώδους). Επίσης, λόγω της ιξώδους φύσης του υδροπηκτώματος, η οποία περιγράφεται από τις διαμορφώσεις που υπολογίστηκαν θεωρητικά, η

ταχεία διάχυση των ιόντων Ca^{2+} από τις περιοχές υψηλής συγκέντρωσης σε περιοχές χαμηλής συγκέντρωσης ίσως είναι αργή.

Η περίπτωση της επίδρασης του μαγνησίου παρουσιάζει μεγάλο ενδιαφέρον σχετικά με την ικανότητα του αλγινικού μορίου να σχηματίζει υδροπηκτώματα. Γενικά, τα φυσικοχημικά χαρακτηριστικά των αλγινικών υδροπηκτωμάτων Mg εξαρτώνται ισχυρά από τη σύνθεση του αλγινικού οξέος και κυρίως από το λόγο των πεντοζών M/G. Πρόσφατα, ο Donati κ.συν. διαπίστωσαν ότι το αλγινικό προτιμά να αλληλεπιδρά με τα ιόντα Mg^{2+} σύμφωνα με τη σειρά $\text{GGGGG} > \text{GMGMGMGM} > \text{MMMMM}$. Η ίδια ερευνητική ομάδα περιγράφει τα ιόντα Mg^{2+} ως ιόντα διάχυσης παρά ως ιόντα που συνδέονται ισχυρά στο πλέγμα του αλγινικού πολυσακχαρίτη (72). Όμως, ελάχιστα πειράματα, έως τώρα, έχουν αποσαφηνίσει πλήρως αυτήν τη σχέση. Πιο πρόσφατα, ο Toruiz κ.συν. κατέληξαν σε τέσσερα βασικά συμπεράσματα: (i) η ζελατινοποίηση του αλγινικού με ιόντα Mg^{2+} είναι αργή και εξαρτάται από το ποσοστό ύπαρξης μονομερών G, (ii) ο χρόνος ζελατινοποίησης μειώνεται με την αύξηση της συγκέντρωσης του αλγινικού και των ιόντων Mg^{2+} , επομένως, (iii) η αυξημένη συγκέντρωση σε αλγινικό και σε ιόντα Mg^{2+} οδηγεί σε ισχυρότερα πηκτώματα, και (iv) υψηλό ποσοστό σε μονομερή G οδηγεί σε πιθανόν ισχυρότερα πηκτώματα (72). Τα παραπάνω συμφωνούν και με τα ευρήματα της παρούσας εργασίας, δηλαδή χρησιμοποιώντας ακριβώς τις ίδιες συγκεντρώσεις που χρησιμοποιήθηκαν και για τη σύνθεση του υδροπηκτώματος του ασβεστίου (και όχι υψηλής συγκέντρωσης διαλύματα αλγινικού και ιόντων Mg^{2+}) δεν κατέσκει δυνατόν να παρασκευαστούν υδροπηκτώματα μαγνησίου.

Παρόλα αυτά, οι θεωρητικοί υπολογισμοί του σχηματισμού του αλγινικού υδροπηκτώματος Mg, τα αποτελέσματα των οποίων συνοψίζονται στη διαμόρφωση της Εικόνα 44, δείχνουν ότι, οι αποστάσεις ανάμεσα στα ιόντα του Mg^{2+} και των δεσμικών θέσεων του μορίου του αλγινικού είναι σημαντικά μικρότερες από τις αντίστοιχες αποστάσεις που υπολογίστηκαν για το υδροπήκτωμα του ασβεστίου στην Εικόνα 43. Συνεπώς, η απόσταση ανάμεσα στα δισθενή κατιόντα και στο μόριο του αλγινικού δεν αποτελεί το μοναδικό παράγοντα που προεξοφλεί και διασφαλίζει το σχηματισμό υδροπηκτώματος (στην παρούσα εργασία δεν παρασκευάστηκαν καθόλου υδροπήκτωμα Mg και η τιμή του ιξώδους ήταν πρακτικά ίση με την τιμή του ιξώδους του διαλύματος του αλγινικού οξέος, Εικόνα 40). Έτσι, η αδυναμία των ιόντων Mg^{2+} να σχηματίσουν υδροπήκτωμα με το αλγινικό οξύ, σύμφωνα με τις πειραματικές συνθήκες της παρούσας εργασίας, αποδίδεται στη σημαντικά μικρότερη ιοντική ακτίνα του ιόντος Mg^{2+} σε σχέση με την αντίστοιχη ακτίνα του ιόντος Ca^{2+} . Δηλαδή, μπορεί το Mg^{2+} να είναι εγγύτερα στην αλυσίδα του αλγινικού, αλλά λόγω της μικρής ακτίνας του υπάρχει πολύ υψηλός (πυκνός) εντοπισμός των δεσμών που αναπτύσσει με το αλγινικό μόριο. Ο υψηλός αυτός εντοπισμός εμποδίζει την ευρεία συνεκτικότητα του συμπλόκου σε όλο τον όγκο του υδροπηκτώματος.

Αντίθετα, η μεγαλύτερη ακτίνα των ιόντων του Ca^{2+} επιτρέπει την ομοιόμορφη και ευρύτερη διασπορά αυτών των δεσμών σε όλες τις διαστάσεις και σε όλη την έκταση του αλγινικού υδροπηκτώματος.



Εικόνα 44. Βέλτιστη διαμόρφωση με τις δύο ενωμένες πεντόζες του αλγινικού με ιόντα Mg^{2+} , όπως υπολογίστηκαν σε επίπεδο θεωρίας $\text{B3LYP}/6\text{-}31\text{+G(d,p)}$, σύμφωνα με υπολογισμούς DFT .

Με βάση αυτήν την προσέγγιση, τα υδροπηκτώματα που σχηματίστηκαν με τα ιόντα Sr^{2+} και Ba^{2+} είχαν πολύ υψηλότερες τιμές ιξώδους από ότι τα αντίστοιχα υδροπηκτώματα με τα ιόντα Ca^{2+} (Εικόνα 40) επειδή αμφότερα έχουν μεγαλύτερη ιοντική ακτίνα από το Ca^{2+} . Το γεγονός ότι το υδροπηκτώμα του Ba είχε χαμηλότερο ιξώδες από το υδροπηκτώμα του Sr θα πρέπει να αποδοθεί στην ταχεία διάλυση του BaCO_3 με αποτέλεσμα την από την αρχή του πειράματος απόδοση μεγάλης ποσότητας ιόντων Ba^{2+} και τον ταχύτατο σχηματισμό του υδροπηκτώματος. Ο ταχύς αυτός σχηματισμός σύμφωνα με την ανάλυση που παρουσιάστηκε παραπάνω για το σχηματισμό του υδροπηκτώματος του ασβεστίου με το μηχανισμό διάλυσης/διάχυσης μέσω της ταχείας διάλυσης του CaCl_2 , οδηγεί σε μειωμένες τιμές του ιξώδους. Μάλιστα, φαίνεται ότι η επίδραση αυτή πρέπει να είναι πιο σημαντική όταν το κατιόν έχει μεγάλη ιοντική ακτίνα. Έτσι, η ελάττωση του ιξώδους ανάμεσα στα υδροπηκτώματα που παρασκευάστηκαν με CaCO_3 και CaCl_2 είναι πολύ μικρότερη από τη διαφορά του ιξώδους ανάμεσα στα υδροπηκτώματα του Sr και του Ba (Εικόνα 40).

Τέλος, η ελάττωση της τιμής του ιξώδους στην περίπτωση του υδροπηκτώματος του Sr σε μεγάλους χρόνους, μπορεί να ερμηνευτεί με βάση τη θεώρηση που έγινε και για το υδροπηκτώμα του Ca^{2+} . Δηλαδή, λόγω της μεγάλης ιοντικής ακτίνας του Sr^{2+} , αυτό αναμένεται να δεσμεύει πολλές δεσμικές θέσεις στο μόριο του αλγινικού. Η βέλτιστη συγκέντρωση

ιόντων Sr^{2+} αναμένεται να είναι μικρότερη από την αντίστοιχη των ιόντων του Ca^{2+} . Λόγω της αργής απελευθέρωσης των ιόντων Sr^{2+} στο υδατικό όξινο διάλυμα, αφού επιτευχθεί η μέγιστη δικτύωση, η περίσσεια των ιόντων Sr^{2+} οδήγησε στη χαλάρωση του πηκτώματος, ακριβώς με τον ίδιο τρόπο που ερμηνεύτηκε η ελάττωση του ιξώδους στην περίπτωση των υδροπηκτωμάτων με περίσσεια ιόντων Ca^{2+} . Θεωρητικοί υπολογισμοί για τα αλγινικά υδροπηκτώματα Sr^{2+} και Ba^{2+} δεν έγιναν, επειδή η μελέτη των συγκεκριμένων υδροπηκτωμάτων είναι έξω από τους ερευνητικούς σκοπούς της παρούσας διατριβής.

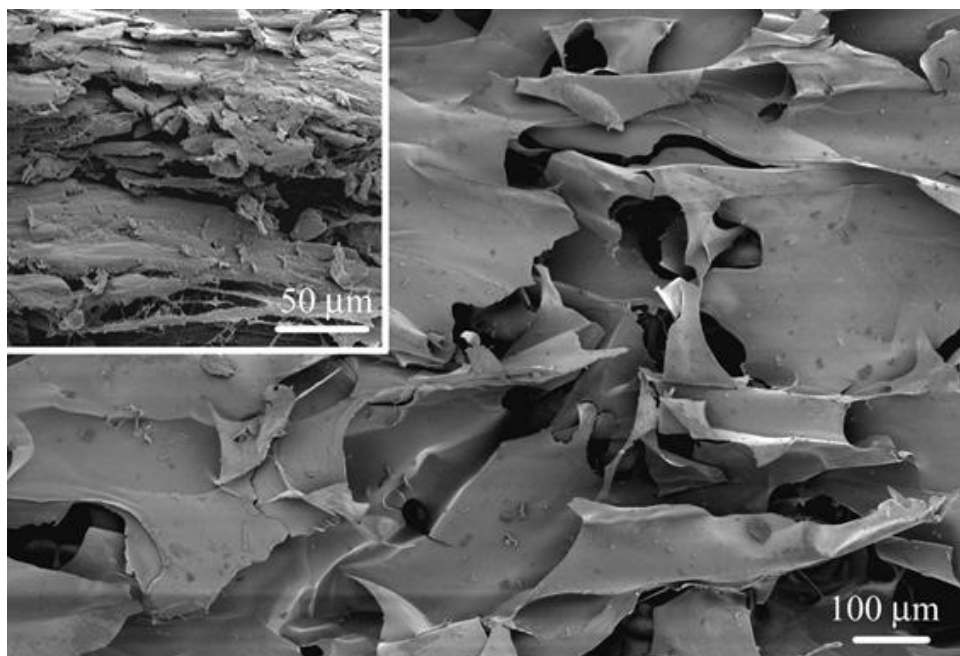
Συμπερασματικά, τα πειραματικά αποτελέσματα, η βιβλιογραφία και οι θεωρητικοί υπολογισμοί δείχνουν ότι, τα δισθενή κατιόντα των αλκαλικών γαιών σχηματίζουν υδροπηκτώματα με το αλγινικό οξύ. Η δέσμευσή τους με τις διατιθέμενες δεσμικές θέσεις της αλυσίδας του αλγινικού μορίου είναι αντιστρεπτή και εξαρτάται από την ιοντική ακτίνα του κατιόντος. Αυτό σημαίνει ότι, αναμένεται επίτευξη μέγιστου του ιξώδους σε όλες τις περιπτώσεις. Αυτό το μέγιστο, αναμένεται σε πιο υψηλές συγκεντρώσεις στα μικρής ιοντικής ακτίνας κατιόντα (π.χ. Mg^{2+}) και σε πιο χαμηλές συγκεντρώσεις στα κατιόντα μεγάλης ιοντικής ακτίνας (π.χ. Sr^{2+}). Επίσης, η ποιότητα του υδροπηκτώματος εξαρτάται από το ρυθμό παροχής των δισθενών κατιόντων. Τα καλύτερης ποιότητας υδροπηκτώματα ελήφθησαν όταν ο ρυθμός αυτός ήταν αργός (μηχανισμός εσωτερικής ζελατινοποίησης).

Τα παραπάνω έχουν υψηλό ενδιαφέρον να διερευνηθούν πειραματικά και θεωρητικά. Όμως, μια τέτοια μελέτη είναι έξω από τους ερευνητικούς σκοπούς της παρούσας διατριβής και γι'αυτό δεν παρουσιάζεται εδώ. Έτσι, μετά τη μελέτη και την ερμηνεία της ζελατινοποίησης με τα ιόντα Ca^{2+} , τα οποία ενδιαφέρουν την παρούσα διατριβή, η έρευνα εστιάζεται (στις επόμενες ενότητες) στην ολοκλήρωση του χαρακτηρισμού, όπως είναι η υφή και η μελέτη της αποικοδόμησης του υδροπηκτώματος του Ca (που παρασκευάστηκε στις προηγούμενες ενότητες), καθώς και στους τρόπους που αυτό μπορεί να τροποποιηθεί και γενικά να χρησιμοποιηθεί για την παροχή αυξητικών παραγόντων και κυττάρων, όταν εμφυτευθεί σε εμφραγματικό μυοκάρδιο.

3.3 Υφή λυοφιλοποιημένων υδροπηκτωμάτων

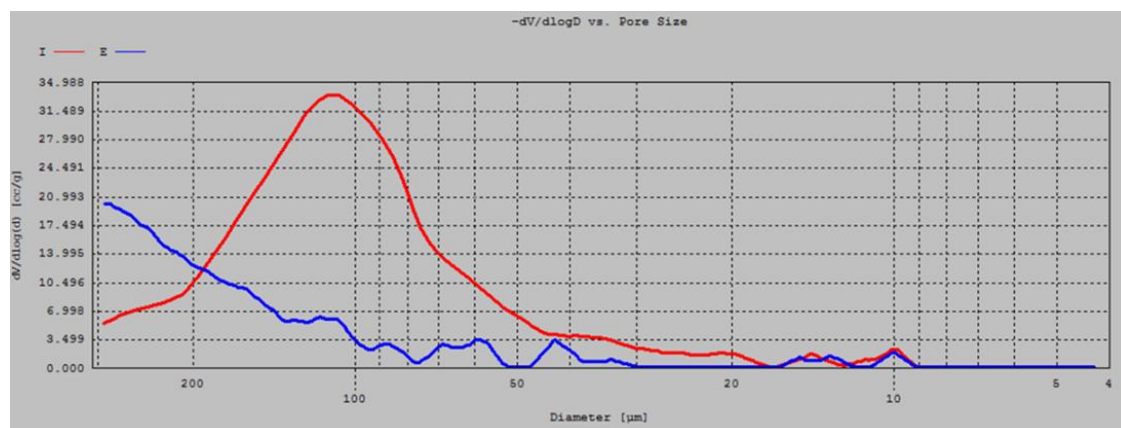
Η υφή των λυοφιλοποιημένων δειγμάτων μελετήθηκε με παρατήρηση της μικροδομής τους με ηλεκτρονική μικροσκοπία σάρωσης (SEM) και με μετρήσεις ποροσιμετρίας Hg.

Στην Εικόνα 45 παρουσιάζεται η μικροδομή λυοφιλοποιημένου αλγινικού υδροπηκτώματος 1%, όπου παρατηρείται μια φυλλοειδής μορφολογία. Πέραν από τη χημική συγγένεια, ένα εμφύτευμα θεωρείται ότι πρέπει να έχει και παρόμοια, γενικά, δομή με τον ιστό που θα αντικαταστήσει ή θα έρθει σε επαφή. Για το λόγο αυτό, στην παρούσα έρευνα, απομονώθηκε υγιής καρδιά επίμου και ακολούθησε καθαρισμός της από το εγκλωβισμένο αίμα με φυσιολογικό ορό (έπειτα από καθετηριασμό της αορτής). Στη συνέχεια, απομονώθηκε (με νυστέρι) το μυοκάρδιο της αριστερής κοιλίας και το δείγμα τοποθετήθηκε στους -60°C για 24 ώρες και λυοφιλοποιήθηκε. Η μικροδομή της εξωκυττάριας μήτρας του μυοκαρδίου παρουσιάζεται στην ένθετη μικρή εικόνα SEM της Εικόνα 45. Παρατηρείται ότι, η εξωκυττάρια μήτρα του μυοκαρδίου της καρδιάς έχει φυλλοειδή μορφολογία, η οποία ομοιάζει σημαντικά με τη μορφολογία του αλγινικού υδροπηκτώματος. Η δομική αυτή ομοιότητα θεωρείται ιδιαίτερα σημαντική για την εφαρμογή για την οποία προορίζεται το εμφύτευμα που έχει αναπτυχθεί στην παρούσα διατριβή και αποτελεί ένα ισχυρό επιχείρημα για την επιλογή του αλγινικού υδροπηκτώματος, ως βιοϋλικό που μπορεί να εμφυτευθεί στο μυοκάρδιο.



Εικόνα 45. Εικόνα SEM από λυοφιλοποιημένο δείγμα αλγινικού υδροπηκτώματος Ca 1%. Στη μικρή εικόνα φαίνεται η μικροδομή λυοφιλοποιημένου υγιούς ιστού μυοκαρδίου επίμους.

Οι λυοφιλοποιημένοι αφροί είχαν πολύ μεγάλο πορώδες, όπως εύκολα διαπιστωνόταν με απλή οπτική παρατήρηση. Τα αποτελέσματα των μετρήσεων της κατανομής του μεγέθους των πόρων με τη μέθοδο της ποροσιμετρίας Hg, που παρουσιάζονται στο διάγραμμα της Εικόνα 46, δείχνουν ότι, οι πόροι του λυοφιλοποιημένου αφρού ήταν μεταξύ 60 και 200 μm , με μέγιστο λίγο μεγαλύτερο από τα 100 μm . Θεωρώντας ότι η λυοφιλοποιημένη δομή αντικατοπτρίζει τη δομή του υδροπηκτώματος σε υγρή φάση, μπορεί να διατυπωθεί ότι, το υδροπήκτωμα 1% παρέχει μια δομή με ικανοποιητικό μέγεθος πόρων (εν είδη διαύλων μέσα στην υγρή φάση) και υψηλή διασύνδεσή τους, η οποία μπορεί να φιλοξενήσει κυτταροκαλλιέργειες καθώς και να επιτρέψει τη δημιουργία και επέκταση της αγγείωσης μετά την εμφύτευση. Για παράδειγμα, μια τέτοια πορώδης δομή θεωρείται ιδανική στα οστικά εμφυτεύματα, στα οποία η επίδραση του μεγέθους των πόρων στην οστεοενσωμάτωση και οστεοεπαγωγή έχει ευρέως μελετηθεί.



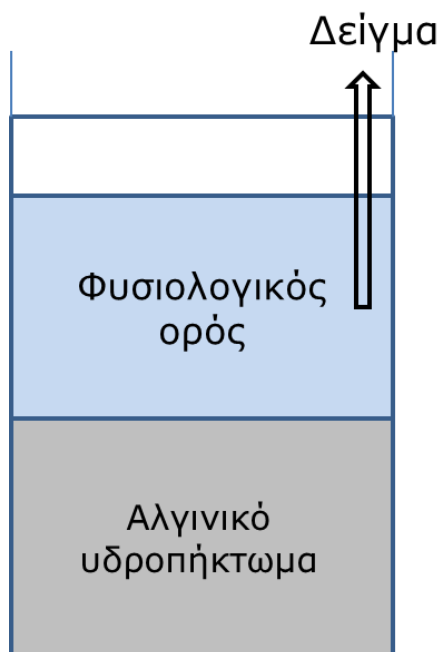
Εικόνα 46. Αποτελέσματα ποροσιμετρίας Hg σε λυοφιλοποιημένο δείγμα αλγινικού υδροπηκτώματος Ca 1%.

3.4 Χημική αποικοδόμηση αλγινικού υδροπηκτώματος σε φυσιολογικό ορό στους 37°C

Μία από τις βασικές ιδιότητες του τελικού ικριώματος (δηλαδή, αυτού που θα φέρει κύτταρα και αυξητικούς παράγοντες, με σκοπό τη χρησιμοποίησή του στην αναγέννηση του εμφραγματικού μυοκαρδίου), είναι η βιοαποικοδόμησή του, για τη συγκεκριμένη εφαρμογή, σε επιθυμητούς χρόνους. Αρχικά, ο ρυθμός αποικοδόμησης του υδροπηκτώματος που παρασκευάστηκε στις προηγούμενες ενότητες αυτού του κεφαλαίου μελετήθηκε *in vitro* με εμφύσησή του σε υδατικό περιβάλλον (φυσιολογικός ορός, 0,9% NaCl) στους 37°C. Αυτό, παρουσιάζεται στην ενότητα αυτή. Η μελέτη έγινε με δύο μεθόδους, με χρήση φασματοφωτομετρίας για τη μέτρηση της συγκέντρωσης του διαλυμένου, από το υδροπήκτωμα, αλγινικού σε φυσιολογικό ορό, και με μετρήσεις απώλειας μάζας. Τα πειράματα αυτά και τα αποτελέσματά τους περιγράφονται στη συνέχεια.

Μελέτη αποικοδόμησης με μετρήσεις συγκέντρωσης διαλυμένου αλγινικού σε φυσιολογικό ορό

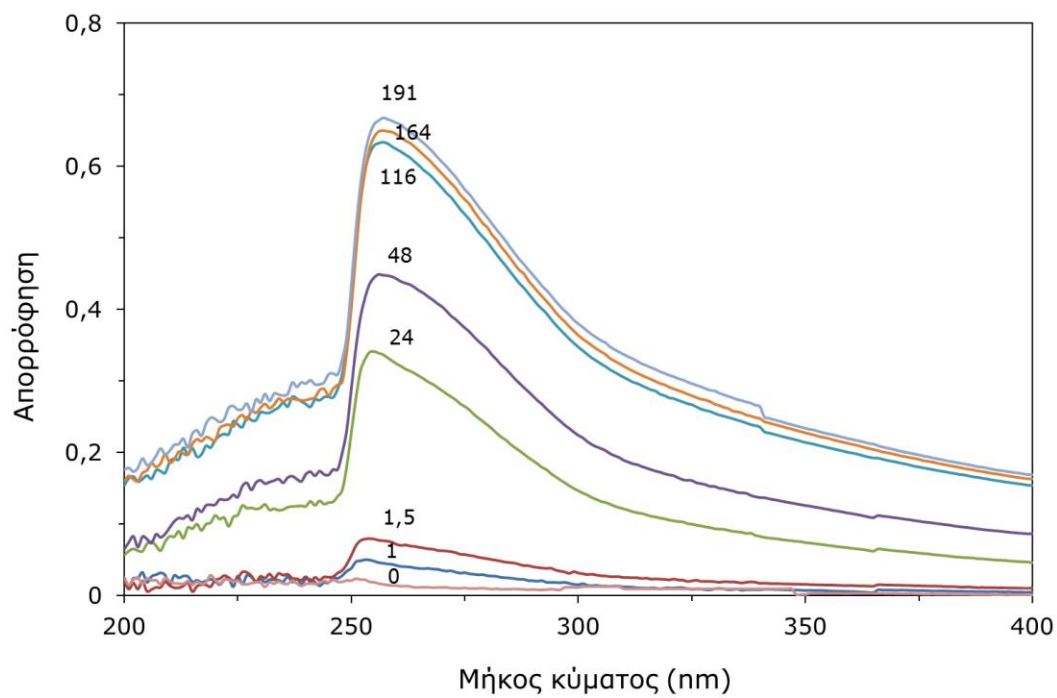
Για τον *in vitro* έλεγχο της βιοαποικοδόμησης, χρησιμοποιήθηκε αλγινικό υδροπήκτωμα 1%, που παρασκευάστηκε με CaCl₂. Αρχικά, σε γυάλινο φιαλίδιο, τοποθετήθηκαν στον πυθμένα του 5 ml του υδροπηκτώματος. Στη συνέχεια, 4 ml φυσιολογικού ορού εναποτέθηκαν, με πολύ προσοχή, στην επιφάνειά του (Εικόνα 47). Το φιαλίδιο σφραγίστηκε (για να μην εξατμιστεί το υγρό) και τοποθετήθηκε (με προσοχή, χωρίς αναταράξεις) σε εκκλαπτήριο στους 37°C, υπό στατικές συνθήκες (δηλαδή το φιαλίδιο ήταν σε ηρεμία, χωρίς ανάδευση). Σε συγκεκριμένους χρόνους γινόταν δειγματοληψία (1 ml) από το υπερκείμενο υγρό. Χρησιμοποιώντας κυψελίδα χαλαζία, γινόταν καταγραφή του φάσματος απορρόφησης στην περιοχή 200-400 nm με φασματοφωτόμετρο (UV-Vis mini 1240, Spectrophotometer, Shimadzu, Kyoto, Japan). Μετά τη μέτρηση, το δείγμα επέστρεφε στο δοχείο για τη διατήρηση σταθερού όγκου του υπερκείμενου υγρού.



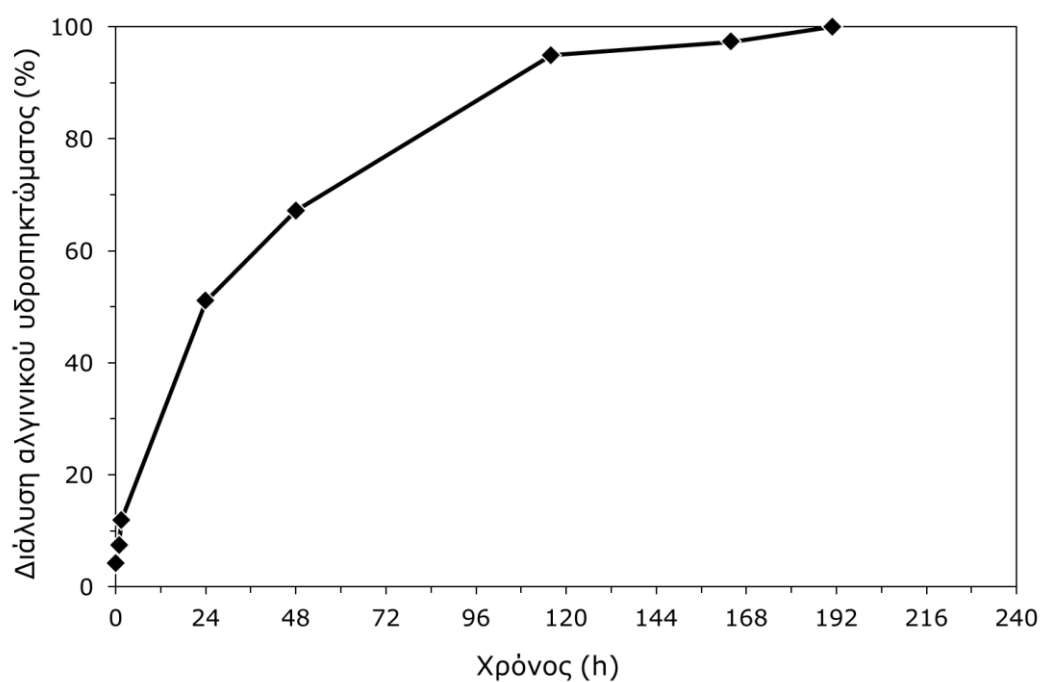
Εικόνα 47. *In vitro* μελέτη βιοαποικοδόμησης.

Τα φάσματα απορρόφησης παρουσιάζονται στην *Εικόνα 48* (α). Με τη πρόοδο του χρόνου παρατηρείται η καταγραφή μιας προοδευτικά αυξανόμενης έντασης κορυφής στο διάστημα 240-300 nm, με μέγιστο απορρόφησης στα ~250 nm, η οποία είναι χαρακτηριστική για το αλγινικό οξύ (117). Η αύξηση της έντασης δηλώνει ότι όλο και περισσότερα μόρια αλγινικού φεύγουν από τη φάση του υδροηεκτώματος και περνάνε στη φάση του υπερκείμενου υδατικού διαλύματος.

Είναι προφανές ότι, ο ρυθμός αποικοδόμησης είναι ταχύτερος στις πρώτες 24 ώρες. Έπειτα, η αποικοδόμηση συνεχίζεται, αλλά με πιο αργό ρυθμό, και τελικά ολοκληρώνεται σε διάστημα λίγο μεγαλύτερο της μιας εβδομάδας (περίπου 8 ημέρες). Με χρήση πρότυπης καμπύλης (μετρήσεις απορρόφησης διαλυμάτων αλγινικού οξέος πηκτωμάτων συγκεκριμένης συγκέντρωσης), χρησιμοποιώντας το μέγιστο της απορρόφησης των φασμάτων της *Εικόνα 48* (α) χαράχθηκε η καμπύλη της *Εικόνα 48* (β), η οποία απεικονίζει την κινητική της διάλυσης του αλγινικού υδροηεκτώματος του Ca 1% στους 37°C σε φυσιολογικό ορό (το 100% ισούται με τη συγκέντρωση που καταγράφηκε στο τελικό πλατό).



(α)



(β)

Εικόνα 48. Μελέτη χημικής αποικοδόμησης αλγινικού υδροπηκτώματος ασβεστίου 1%, σε φυσιολογικό ορό στους 37°C. (α) Φάσματα απορρόφησης UV-Vis υπερκείμενου διαλύματος σε διάφορους χρόνους (σε h) και (β) καμπύλη κινητικής της διάλυσης του αλγινικού υδροπηκτώματος (υπολογισμένη από τη συγκέντρωση αλγινικού στην υδατική φάση).

Μελέτη αποικοδόμησης αλγινικού υδροπηκτώματος με μετρήσεις απώλειας μάζας

Με το πείραμα αυτό, η μελέτη της κινητικής της αποικοδόμησης του υδροπηκτώματος (ίδιου όπως και προηγουμένως) έγινε ως εξής. Χρησιμοποιήθηκε μη-βιοδιασπώμενη εμπορική φαρμακευτική γάζα, η οποία εμβαπτίστηκε σε φυσιολογικό ορό, και στη συνέχεια στέγνωσε σε μουσκεμένο απορροφητικό ύφασμα. Αμέσως η γάζα ζυγίστηκε σε ζυγό ακριβείας 4 δεκαδικών ψηφίων. Στη συνέχεια, επάνω στη γάζα αυτή, τοποθετήθηκε προσεκτικά (με απόχυση) συγκεκριμένη ποσότητα (ήδη ζυγισμένη με τον ίδιο ζυγό ακριβείας) υδροπηκτώματος (Εικόνα 49).

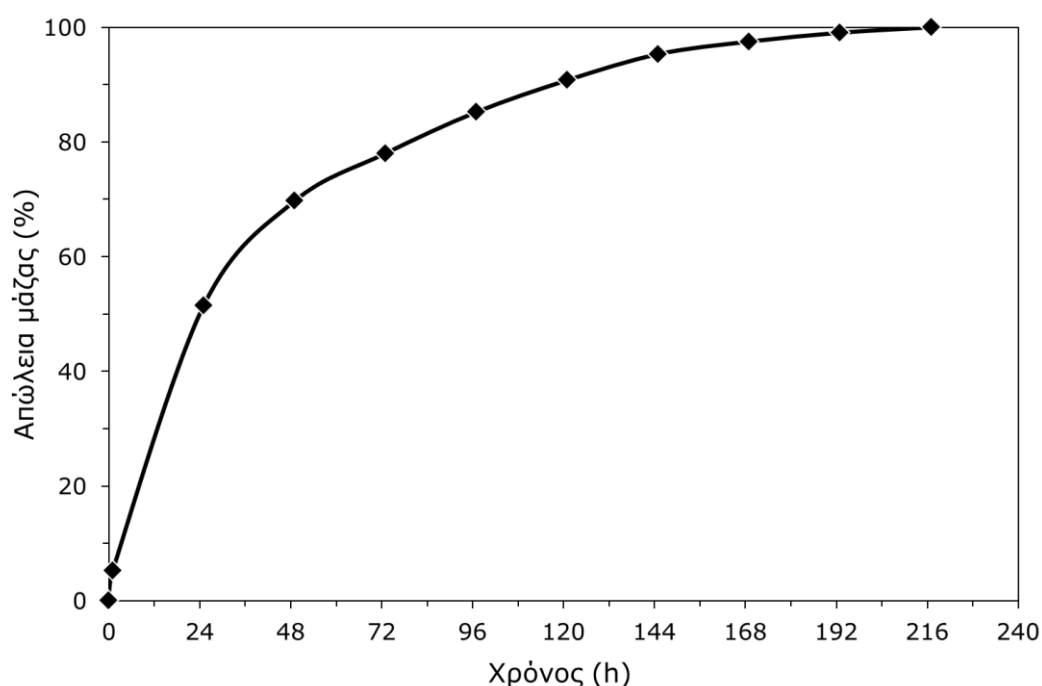
Η γάζα με το υδροπήκτωμα εμβαπτίστηκε αμέσως (για να μην στεγνώσει καθόλου) σε φυσιολογικό ορό εντός γυάλινου φιαλιδίου, το οποίο σφραγίστηκε και τοποθετήθηκε σε εκκολαπτήριο στους 37 °C. Η ανανέωση του φυσιολογικού ορού γινόταν κάθε 2 ημέρες. Κάθε ημέρα, με τη βοήθεια μεταλλικής λαβίδας, απομακρυνόταν η γάζα (με το υδροπήκτωμα) από το φιαλίδιο, και στέγνωνε επάνω σε μουσκεμένο (κορεσμένο σε νερό) απορροφητικό ύφασμα, ώστε να μην έχει σταγόνες αλλά και να μην απορροφά καθόλου νερό, και γινόταν καταγραφή του βάρους της με χρήση του ίδιου ζυγού ακριβείας. Από το μικτό βάρος αφαιρούνταν το βάρος της υγρής γάζας (το οποίο είχε μετρηθεί στην αρχή του πειράματος). Με τον τρόπο αυτό, υπολογιζόταν η απώλεια βάρους του υδροπηκτώματος με το χρόνο εμβάπτισης στο φυσιολογικό ορό. Η γάζα τοποθετούνταν ξανά στο φιαλίδιο για την επόμενη μέτρηση. Το πείραμα διήρκεσε συνολικά 15 ημέρες. Παράλληλα, για λόγους σύγκρισης, έγινε το ίδιο ακριβώς πείραμα με την ίδια γάζα χωρίς όμως αυτή να περιέχει καθόλου αλγινικό υδροπήκτωμα.

Τα αποτελέσματα των μετρήσεων παρουσιάζονται στο διάγραμμα της Εικόνα 50. Παρατηρείται ότι, το υδροπήκτωμα αποικοδομείται έντονα με ταχείς ρυθμούς στις πρώτες 24 ώρες. Ο ρυθμός αποικοδόμησης ελαττώνεται σταδιακά και ολοκληρώνεται σε περίπου 10 ημέρες.

Σε γενικές γραμμές, οι μετρήσεις τόσο με τη μία μέθοδο όσο και με την άλλη, συμφωνούν μεταξύ τους, τόσο ως προς το ρυθμό αποικοδόμησης με το χρόνο, όσο και στο συνολικό χρόνο που γίνεται η ολική αποικοδόμηση του υδροπηκτώματος. Η ελαφρώς πιο γρήγορη κινητική της πρώτης μεθόδου ίσως οφείλεται σε μικρή ανατάραξη του στρώματος του αλγινικού υδροπηκτώματος, στη διάχυσή του προς την υδατική φάση χωρίς όμως αυτό να αποικοδομηθεί, και αυτό σε συνδυασμό με τη διόγκωσή του (η διόγκωση του αλγινικού υδροπηκτώματος παρατηρήθηκε και στα πειράματα της διατριβής αυτής, δηλαδή στο συγκεκριμένο πείραμα της Εικόνα 47, και καταγράφεται και στη βιβλιογραφία (118)).



Εικόνα 49. Τοποθέτηση (με απόχυση) υδροπηκτώματος στη φαρμακευτική γάζα.



Εικόνα 50. Αποτελέσματα από τη μελέτη χημικής αποικοδόμησης του αλγινικού υδροπηκτώματος Ca 1%, σε φυσιολογικό ορό στους 37 °C, με καταγραφή της απώλειας μάζας.

Τα πειραματικά αποτελέσματα που παρουσιάστηκαν σε αυτήν την ενότητα είναι ιδιαίτερα ενθαρρυντικά καθώς η αποικοδόμηση του βιοϋλικού εντός 15 ημερών θεωρείται ιδανική για την υλοποίηση των ιατρικών πρωτοκόλλων στη συγκεκριμένη εφαρμογή της εμφύτευσης σε εμφραγματικό μυοκάρδιο. Τα αποτελέσματα αυτά συγκρίθηκαν και με αποτελέσματα μελέτης σε ρεαλιστικές συνθήκες, που είναι ο *in vivo* ρυθμός αποικοδόμησης του υδροπηκτώματος που έχει εμφυτευθεί στο εμφραγματικό μυοκάρδιο. Αυτά τα πειράματα παρουσιάζονται σε επόμενη ενότητα (4.2), η δε ανίχνευση του αλγινικού στον καρδιακό ιστό έγινε με

σήμανση (labelling) του αλγινικού υδροπηκτώματος με πρόσδεση σε αυτό υδραζιδίου της βιοτίνης (που παρουσιάζεται στην επόμενη ενότητα), το οποίο, μετά από συγκεκριμένη βαφή, παίρνει χαρακτηριστικό καφέ χρώμα (βλ. Κεφάλαιο 4).

3.5 Χημική τροποποίηση αλγινικού υδροπηκτώματος

Όπως έχει αναφερθεί, το τελικό βιοϋλικό θα βασίζεται στο αλγινικό υδροπήκτωμα με σκοπό, όμως, αυτό, ως ένα πλήρες σύστημα της ιστοτεχνολογίας, να μπορεί να μεταφέρει στην εμφραγματική περιοχή κύτταρα και αυξητικούς παράγοντες. Έτσι, μετά τον πλήρη χαρακτηρισμό του, που έγινε στις προηγούμενες ενότητες, στις επόμενες ενότητες του κεφαλαίου 3 θα παρουσιαστεί η χημική τροποποίηση και οι ιδιότητες των υλικών που θα προκύψουν, ως προς την επίτευξη του τελικού στόχου, δηλαδή, του ολοκληρωμένου βιοϋλικού/ικριώματος.

Η ενότητα αυτή παρουσιάζει τρεις διαφορετικές χημικές τροποποιήσεις. Αρχικά, θα παρουσιαστεί η πρόσδεση του μορίου του υδραζιδίου της βιοτίνης στην αλυσίδα του αλγινικού οξέος με χρήση υδατικής χημείας καρβοδιιμιδίων. Το υδροπήκτωμα βιοτίνης – αλγινικού παρασκευάστηκε για να εμφυτευθεί στο εμφραγματικό μυοκάρδιο πειραματόζων με σκοπό την *in vivo* παρακολούθηση της βιοαποικοδόμησής του. Στη συνέχεια, θα παρουσιαστεί η χημική τροποποίηση του αλγινικού υδροπηκτώματος με σκοπό την πρόσδεση αυξητικών παραγόντων και πρωτεϊνών, καθώς και ολιγοπεπτιδίων (τύπου RGD), με σκοπό την ενίσχυση της κυτταρικής προσκόλλησης.

Η τροποποίηση και στις 3 παραπάνω περιπτώσεις έγινε χρησιμοποιώντας τη χημεία καρβοδιιμιδίων, σύμφωνα με τη οποία σχηματίζεται πεπτιδικός δεσμός ανάμεσα στην καρβοξυλομάδα των πεντοζών (M και G) του αλγινικού μορίου και των αμινομάδων (NH₂) που υπάρχουν στα μόρια της βιοτίνης, των πρωτεϊνών (και του ολιγοπεπτιδίου) και των αυξητικών παραγόντων. Για τη διευκόλυνση του αναγνώστη, στα σχήματα που ακολουθούν και περιγράφουν το μηχανισμό της αντίδρασης, τα μόρια του αλγινικού οξέος σημειώνονται (αντιστοιχίζονται) με τον αριθμό (1) και τα μόρια της βιοτίνης, του ολιγοπεπτιδίου και της αυξητικής ορμόνης που περιέχουν την αμινομάδα με τον αριθμό (2).

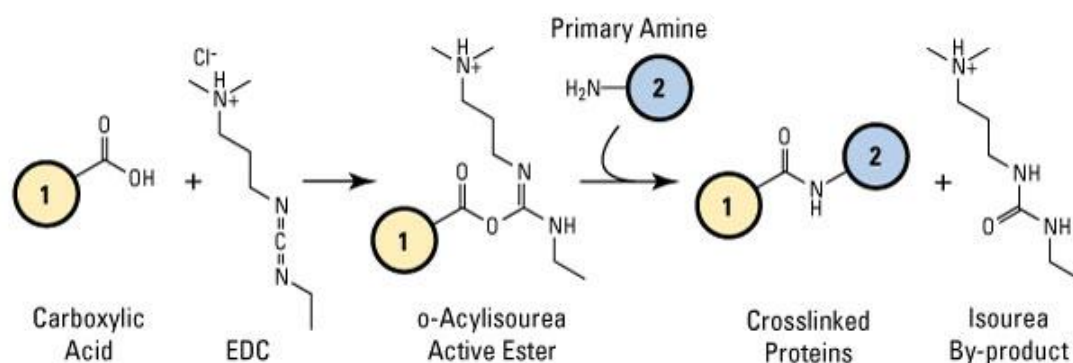
Υδατική χημεία καρβοδιιμιδίων

Οι ενώσεις καρβοδιιμιδίων είναι ιδιαίτερα δημοφιλείς για τη χρήση τους σε (σχετικά εύκολες) μεθόδους σήμανσης ή σύνδεσης με καρβοξυλικές ομάδες (-COOH), όπως εκείνες που βρίσκονται σε πρωτεΐνες και άλλα βιομόρια (στην παρούσα διατριβή, στις πεντόζες M και G του αλγινικού οξέος). Τα πλέον διαθέσιμα καρβοδιιμίδια είναι το υδατοδιαλυτό EDC, (-ethyl-3-(3-

dimethylaminopropyl) carbodiimide hydrochloride, μοριακού βάρους 191.70), για χρήση σε υδατικά μέσα, και το αδιάλυτο στο νερό DCC, (N',N'-dicyclohexyl carbodiimide, μοριακού βάρους 206.32) για χρήση σε μη υδατικές βιολογικές μεθόδους σύνθεσης.

Στην Εικόνα 51 (119) παρουσιάζεται ο μηχανισμός της αντίδρασης πρόσδεσης μιας καρβοξυλικής ένωσης με μια ένωση που περιέχει NH_2 χρησιμοποιώντας το αντιδραστήριο EDC. Οι καρβοξυλομάδες της ένωσης (1) αντιδρούν με το EDC (γνωστό και ως EDAC) και σχηματίζεται το ενδιάμεσο προϊόν, που είναι ο εστέρας o-acylisourea. Το ενδιάμεσο αυτό προϊόν μπορεί να αντιδράσει με μια πρωτοταγή αμίνη (2) μέσω πυρηνόφιλης προσβολής. Έτσι, η αμίνη (2) ενώνεται τελικά με την ένωση (1) μέσω σχηματισμού αμιδικού δεσμού, το δε EDC απελευθερώνεται, ως παραπροϊόν με τη μορφή διαλυτού παράγωγου ουρίας.

Η αντίδραση αυτή είναι πιο αποτελεσματική όταν λαμβάνει χώρα σε ήπια όξινες προς ουδέτερες συνθήκες ($\text{pH} = 4.5 - 6.8$). Αυτό μπορεί να γίνει με χρήση ρυθμιστικών διαλυμάτων, τα οποία, όμως, δεν πρέπει να περιέχουν άλλες επιπλέον αμίνες ή καρβοξύλια (τα οποία μπορούν να συμμετέχουν ενεργά στην αντίδραση και να την αναστείλουν ή να την ανταγωνιστούν). Έτσι, ένα ιδανικό ρυθμιστικό διάλυμα, για τη συγκεκριμένη αντίδραση, είναι το MES (4-μορφολινοαιθανοσουλφονικό οξύ).

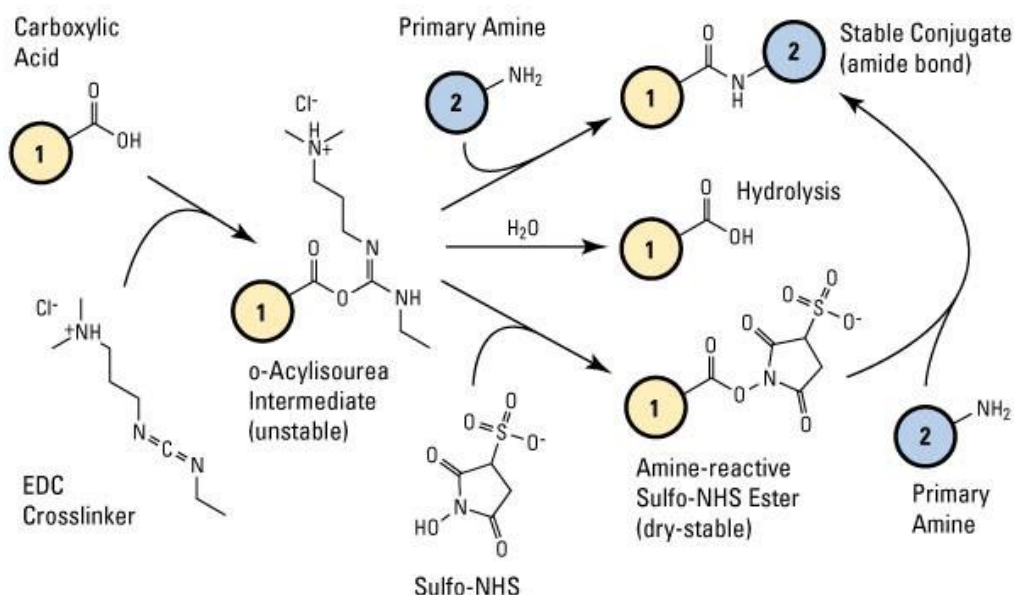


Εικόνα 51. Μηχανισμός καρβοδιμιδικής αντίδρασης με EDC (119).

Όμως, το ενδιάμεσο προϊόν του εστέρα o-acylisourea αργεί να αντιδράσει με τις αμίνες, και έτσι μπορεί, σε υδατικά διαλύματα, να ευνοηθεί η υδρόλυσή του. Γενικά, το ενδιάμεσο προϊόν του εστέρα o-acylisourea είναι μια ασταθής ένωση σε υδατικά διαλύματα, η οποία δεν αντιδρά εύκολα με αμίνες, με αποτέλεσμα να υδρολύεται εύκολα και κατά συνέπεια τελικά να γίνεται επαναδημιουργία των καρβοξυλικών ομάδων και απελευθέρωση προϊόντων ουρίας. Αυτό είναι σημαντικό πρόβλημα, ιδιαίτερα εάν το μόριο-στόχος είναι σε χαμηλή συγκέντρωση σε σύγκριση με το νερό (120). Όμως, σύμφωνα με τους Nakajima και Ikada (1995) (120), εάν από το ενδιάμεσο προϊόν (o-acylisourea) σχηματιστεί ανυδρίτης, τότε η απόδοση σχηματισμού του αμιδικού δεσμού είναι

αυξημένη (120). Επίσης, μια ενδιαφέρουσα και ελκυστική εναλλακτική προσέγγιση είναι να χρησιμοποιηθεί στην αντίδραση το NHS (σουλφο-NHS, N-hydroxysuccinimide).

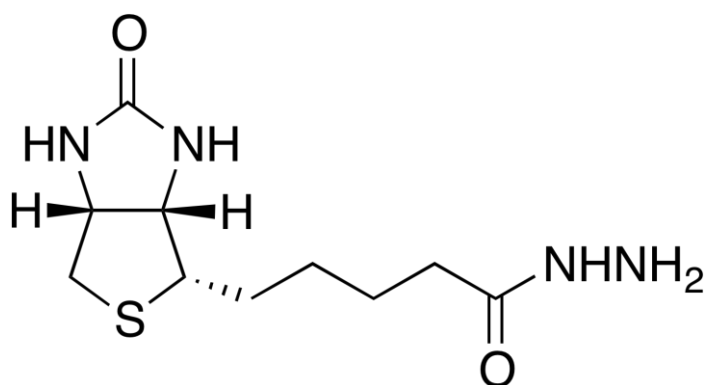
Συγκεκριμένα, το υδατοδιαλυτό καρβοδιιμίδιο EDC μπορεί να χρησιμοποιηθεί για το σχηματισμό δραστικών λειτουργικών εστέρων με καρβοξυλικές ομάδες χρησιμοποιώντας την υδατοδιαλυτή ένωση NHS. Οι σουλφο-NHS εστέρες είναι υδρόφιλες δραστικές ενώσεις που ενώνονται ταχέως με αμίνες. Σε αντίθεση με μη-σουλφονωμένους εστέρες NHS, οι οποίοι είναι σχετικά αδιάλυτοι στο νερό (και έτσι πρέπει να διαλυθούν πρώτα σε οργανικό διαλύτη πριν προστεθούν σε υδατικά διαλύματα), οι σουλφο-NHS εστέρες τυπικά είναι υδατοδιαλυτοί, μακροβιότεροι και δεν υδρολύονται τόσο γρήγορα στο νερό (120). Υπό την παρουσία αμινο-πυρηνόφιλων ενώσεων, οι οποίες μπορούν να προσβάλουν την ομάδα του καρβονυλίου του εστέρα, η ομάδα σουλφο-NHS φεύγει γρήγορα, δημιουργώντας σταθερό αμιδικό δεσμό στο τελικό προϊόν. Το πλεονέκτημα της προσθήκης σουλφο-NHS σε αυτές τις αντιδράσεις με EDC είναι ότι αυξάνεται η διαλυτότητα και η σταθερότητα του ενεργού ενδιάμεσου προϊόντος, το οποίο αντιδρά τελικά με την αμίνη. Έτσι, οι αντιδράσεις EDC/σουλφο-NHS είναι σημαντικά πιο αποτελεσματικές και αυξάνουν την απόδοση της σύζευξης, σε σύγκριση με την απλή αντίδραση με EDC. Στην Εικόνα 52 (119) συνοψίζονται οι τρεις δυνατοί μηχανισμοί που μπορεί να αντιδράσει ο ενδιάμεσος εστέρας. Είναι προφανές ότι, η τρίτη οδός μέσω του σουλφο-NHS προκρίνεται και είναι αυτή που χρησιμοποιήθηκε στην παρούσα διατριβή.



Εικόνα 52. Μηχανισμός αντίδρασης με σουλφο-NHS και EDC (κάτω αντίδραση). Παρουσιάζονται και οι δύο οδοί, της Εικόνα 51 και της (μη επιθυμητής) υδρόλυσης του ενδιάμεσου εστέρα o-acylisourea (119).

3.5.1 Πρόσδεση του υδραζιδίου της βιοτίνης στο αλγινικό υδροπρήκτωμα για την *in vitro* μελέτη αποικοδόμησής του

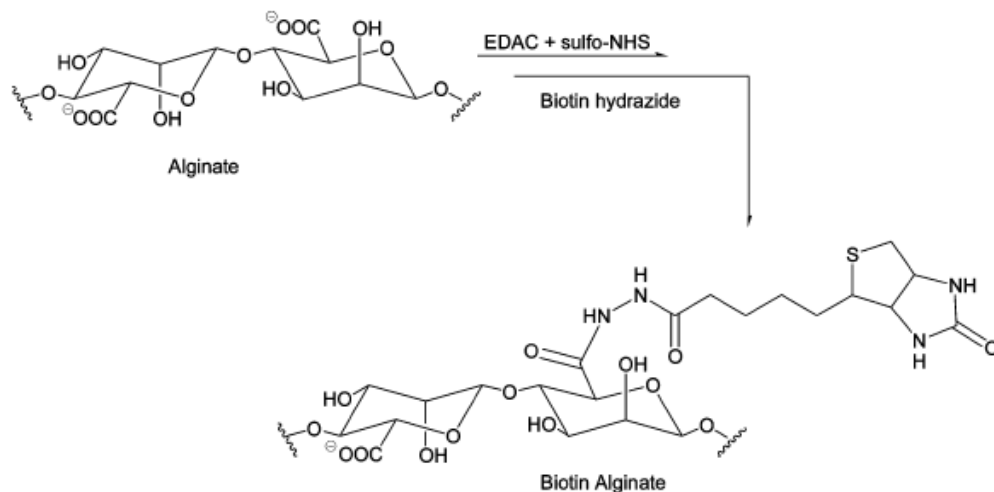
Το υδραζίδιο της βιοτίνης (Εικόνα 53, Πίνακας 1) προσδέθηκε στην αλυσίδα του μορίου του αλγινικού οξέος. Στη συνέχεια, σχηματίστηκε το υδροπρήκτωμα με τη μέθοδο διάλυσης/διάχυσης (CaCl_2), το οποίο εμφυτεύτηκε στα πειραματόζωα. Το μόριο της βιοτίνης, ακόμη και μέσα στο μυοκαρδιακό ιστό, μετά από βαφή με συγκεκριμένο αντιδραστήριο, χρωματίζεται με χαρακτηριστικό καφέ χρώμα και έτσι μπορεί να ανιχνευτεί (45, 121). Η πρόσδεση έγινε με βάση την αντίδραση των καρβοδιιμιδίων (σούλφο-NHS/EDC, Εικόνα 52).



Εικόνα 53. Μόριο υδραζιδίου της βιοτίνης (120).

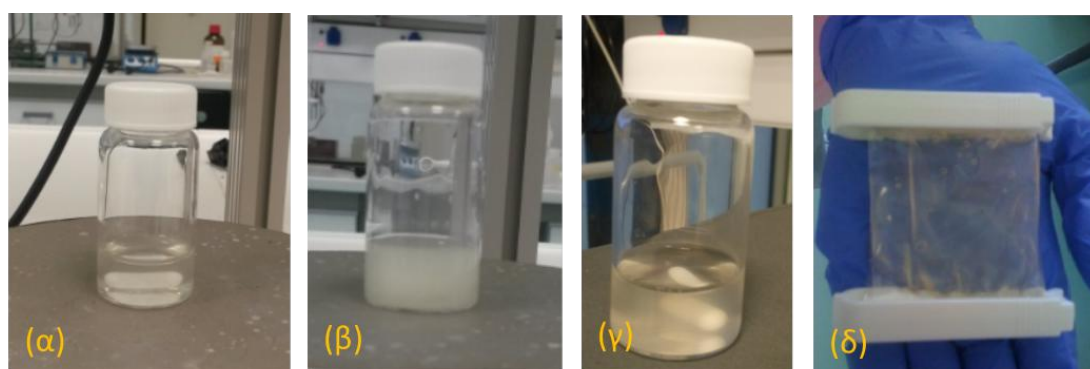
Διαδικασία σύνθεσης

Στην Εικόνα 54 (121) παρουσιάζεται η πρόσδεση του υδραζιδίου της βιοτίνης στην αλυσίδα του μορίου του αλγινικού οξέος μέσω υδατικής χημείας καρβοδιιμιδίων (120, 121).



Εικόνα 54. Σήμανση αλγινικής αλυσίδας με υδραζίδιο βιοτίνης μέσω χημείας καρβοδιιμιδίων (121).

Αρχικά, διαλύθηκε σκόνη αλγινικού οξέος σε ρυθμιστικό διάλυμα MES (Πίνακας 1) 0,1 M (Εικόνα 55 (α)). Σε αυτό το υδατικό διάλυμα ($\text{pH} = 6$) προστέθηκε υδραζίδιο βιοτίνης (Εικόνα 55 (β)), με αναλογία 1 mmol υδραζιδίου βιοτίνης ανά 1 g αλγινικού οξέος, και όλο το σύστημα αφέθηκε υπό ανάδευση (100 rpm) ώστε να επιτευχθεί πλήρης διασπορά της βιοτίνης στο διάλυμα. Η ομοιογενής διασπορά της βιοτίνης πραγματοποιήθηκε μετά από 1 ώρα δημιουργώντας ένα θολό αιώρημα. Μετά το πέρας των εξήντα λεπτών, προστέθηκε NHS και EDAC (Πίνακας 1) με αναλογία βαρών 1 / 2, αντίστοιχα, και ακολούθησε ήπια ανάδευση (80 rpm), για 3 ώρες σε θερμοκρασία δωματίου (Εικόνα 55 (γ)) (121). Με την προσθήκη αυτών των δύο αντιδραστηρίων, το αιώρημα, από θολό, με την πάροδο του χρόνου έγινε διαυγές. Σύμφωνα με τη βιβλιογραφία, η αναλογία NHS/EDAC είναι υπολογισμένη για 20 % μοριακή τροποποίηση των καρβοξυλομάδων του αλγινικού οξέος (121). Το τελικό πολυμερές τοποθετήθηκε σε μεμβράνη διαπίδυσης MWCO 3.500 Da (Εικόνα 55 (δ)) και εμβαπτίστηκε σε ποτήρι ζέσεως, το οποίο περιείχε Millipore αποσταγμένο νερό, για 3 ημέρες (η αλλαγή του νερού γινόταν τουλάχιστον 3 φορές την ημέρα). Ακολούθησε ψύξη του δείγματος στους -60°C και λυοφιλοποίησή του.

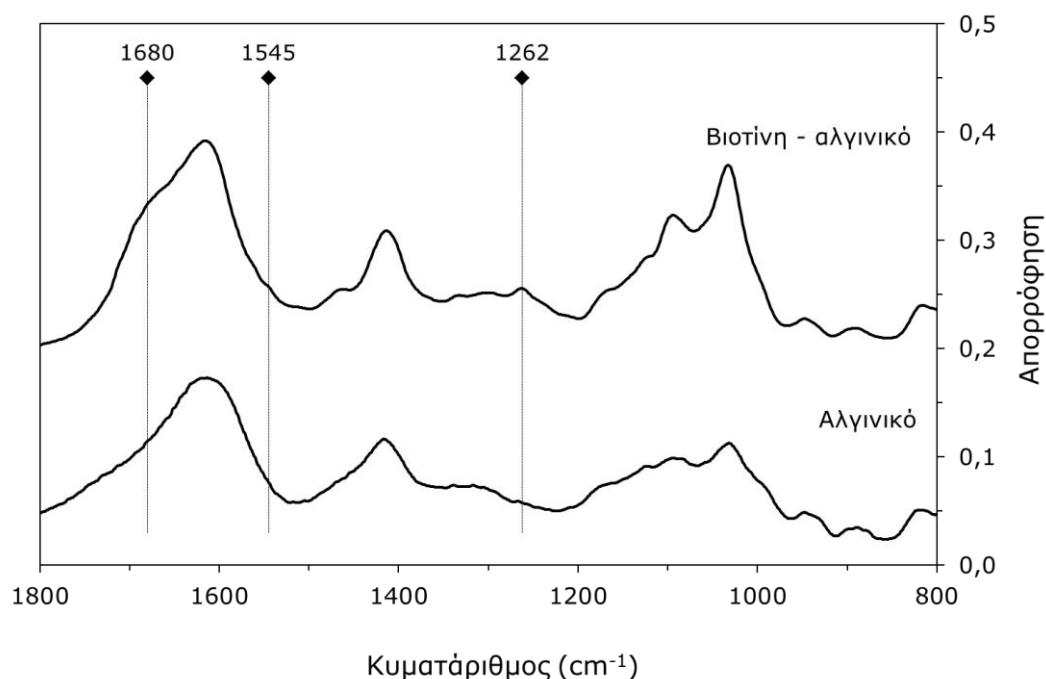


Εικόνα 55. Πειραματική πορεία σύνθεσης αλγινικού που έχει σημανθεί με υδραζίδιο βιοτίνης. (α) 1 % διάλυμα αλγινικού οξέος, (β) προσθήκη υδραζιδίου βιοτίνης στο διάλυμα του αλγινικού οξέος, (γ) μετά την προσθήκη NHS/EDAC και έπειτα από 3 h μαγνητικής ανάδευσης, και (δ) καθαρισμός με μεμβράνη διαπίδυσης MWCO 3.5 KDa.

Χαρακτηρισμός πρόσδεσης βιοτίνης

Η πρόσδεση της βιοτίνης στο μόριο του αλγινικού πιστοποιήθηκε με φασματοσκοπία FT-IR, με μετρήσεις σε λυοφιλοποιημένο δείγμα (με τη μέθοδο του δισκίου KBr). Στην Εικόνα 56, παρουσιάζεται το φάσμα FT-IR για το προϊόν της αντίδρασης. Για λόγους σύγκρισης, στο ίδιο διάγραμμα, απεικονίζεται και το φάσμα δόνησης FT-IR της καθαρής σκόνης αλγινικού οξέος. Οι χαρακτηριστικές κορυφές στα 1680 cm^{-1} (amide I band, C=O δονήσεων τάσης), 1545 cm^{-1} (amide II band, N-H δονήσεων κάμψης) και 1262 cm^{-1} (amide II band, αλληλεπιδράσεις μεταξύ των δονήσεων κάμψης του δεσμού N-H και τάσης του δεσμού C-N) υποδηλώνουν την επιτυχή

πρόσδεση του υδραζιδίου της βιοτίνης στην αλυσίδα του αλγινικού οξέος (121).



Εικόνα 56. Φάσματα απορρόφησης δονητικής φασματοσκοπίας IR του λυοφιλοποιημένου προϊόντος βιοτίνη-αλγινικό της αντίδρασης και της σκόνης αλγινικού οξέος.

Αφού αποδείχθηκε πειραματικά ότι η βιοτίνη προσδέθηκε στην αλυσίδα του μορίου του αλγινικού οξέος, η παρασκευή του υδροπηκτώματος το οποίο εμφυτεύτηκε έγινε ως εξής: μετά τον καθαρισμό του συμπλόκου βιοτίνη-αλγινικό με τη διαπίδυση, ελαττώθηκε ο όγκος του διαλύματος με τη μέθοδο της περιστροφικής εξάτμισης (rotary evaporation) έτσι ώστε το διάλυμα που προέκυψε να ικανοποιεί την τελική συγκέντρωση του υδροπηκτώματος σε αλγινικό οξύ 1%. Το υδροπήκτωμα παρασκευάστηκε από το διάλυμα αυτό με τη μέθοδο διάλυσης/διάχυσης (διάλυση CaCl_2) αλλά υποασβεστιωμένο (1,39 mM ιόντων Ca^{2+}). Το υδροπήκτωμα χρησιμοποιήθηκε φρέσκο στις εμφυτεύσεις (μέχρι την εμφύτευση φυλάχθηκε σε ψυγείο στους 4°C).

3.5.2 Πρόσδεση ολιγοπεπτιδίου τύπου RGD στο αλγινικό υδροπήκτωμα για την ενίσχυση της κυτταρικής προσκόλλησης

Τα αλγινικά υδροπηκτώματα χρησιμοποιούνται ευρέως στη βιοϊατρική, κυρίως για μεταφορά κυττάρων σε εφαρμογές της ιστοτεχνολογίας (59, 78, 122, 123). Όμως, η ομοιοπολική πρόσδεση πεπτιδίων τύπου RGD, δηλαδή που περιέχουν το τριπεπτίδιο Arg-Gly-Asp, σε αυτό το καθιστά κυτταροδραστικό, δηλαδή ενισχύεται η κυτταρική προσκόλληση και η βιωσιμότητα των κυττάρων στο αλγινικό υδροπήκτωμα (19, 45, 48, 51).

Ένας ακόμη σπουδαίος παράγοντας ενίσχυσης της βιωσιμότητας των κυττάρων κατά την ενσωμάτωσή τους στο υδροπήκτωμα είναι η μείωση της διατμητικής τάσης που ασκείται στα κύτταρα. Στην παρούσα διατριβή, αυτό επιχειρήθηκε να επιτευχθεί με μείωση του ιξώδους του τελικού υδροπηκτώματος. Για το λόγο αυτό, παρασκευάστηκε υδροπήκτωμα, το οποίο προήλθε από συνδυασμό κλασμάτων χαμηλού (LMW) και υψηλού (HMW) μοριακού βάρους αλγινικού οξέος. Προηγούμενες έρευνες έδειξαν ότι, ο συνδυασμός HMW και LMW αλγινικού οξέος καθώς και η πρόσδεση πεπτιδίου (τύπου RGD) σε αυτό, οδηγούν σε ενθαρρυντικά αποτελέσματα ως προς την ενίσχυση της κυτταρικής βιωσιμότητας (9, 24, 49, 51, 53, 67).

Επομένως, αρχικά στην παράγραφο αυτή, θα παρουσιαστεί η πειραματική διαδικασία παρασκευής αλγινικού οξέος χαμηλού μοριακού βάρους από το υψηλού μοριακού βάρους αλγινικό οξύ. Έπειτα, θα ακολουθήσει η πειραματική πορεία ομοιοπολικής πρόσδεσης πεπτιδίου τύπου RGD τόσο στο HMW όσο και στο LMW. Απώτερος σκοπός είναι το τελικό υδροπήκτωμα να αποτελείται από συνδυασμό των δύο παραπάνω δειγμάτων, RGD – HMW και RGD – LMW, το οποίο χρησιμοποιήθηκε στις *in vitro* και *in vivo* μελέτες που αναφέρονται στο κεφάλαιο 4.

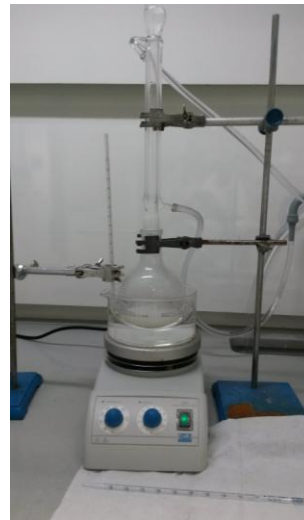
Ως υψηλού μοριακού βάρους (HMW) αλγινικό οξύ ορίζουμε το alginic acid sodium salt (Pronova, LVG, Oslo), όπως παραλήφθηκε από την εταιρεία χωρίς καμία περαιτέρω τροποποίηση. Σύμφωνα με τη βιβλιογραφία, το χαμηλού μοριακού βάρους αλγινικό οξύ (LMW) ουσιαστικά θα αποτελείται κυρίως από τις G μονάδες του γουλουρονικού οξέος. Το πολύ-(γουλουρονικό) νάτριο (LMW alginate) παρήχθη από το HMW με μία ήπια τροποποίησή του, σύμφωνα με την πειραματική πορεία που ανέπτυξε ο Bouhadir και οι συνεργάτες του το 1999 (124). Η διαδικασία αυτή οδηγεί, επίσης, στην απομάκρυνση των M μονάδων του μαννουρονικού οξέος.

Παρασκευή του LMW αλγινικού οξέος

Αρχικά, παρασκευάστηκε διάλυμα αλγινικού από τη διάλυση της σκόνης του αλγινικού οξέος HMW σε Millipore αποσταγμένο νερό, υπό ισχυρή μαγνητική ανάδευση (Εικόνα 57 (α)). Στη συνέχεια, προστέθηκε διάλυμα HCl 3 M. Το διάλυμα τοποθετήθηκε σε σφαιρική φυάλη και ακολούθησε θέρμανση σε λουτρό (με λάδι σιλικόνης), υπό κάθετο ψυκτήρα (reflux), και ήπια ανάδευση με μαγνητική ράβδο (Εικόνα 57 (β)). Η αντίδραση έγινε για 5 ώρες στους 100 °C.



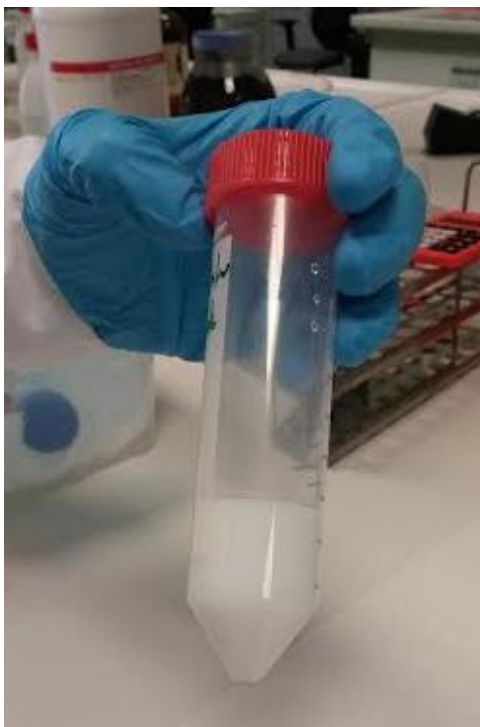
(α)



(β)

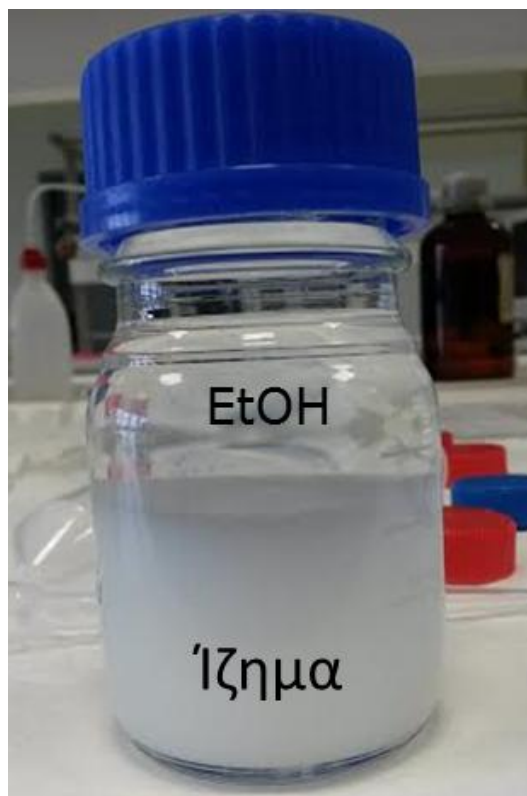
Εικόνα 57. (α) Διάλυση σκόνης αλγινικού οξέος HMW σε Millipore αποσταγμένο νερό, και (β) πειραματική διάταξη θέρμανσης σε λουτρό, υπό κάθετο ψυκτήρα, (reflux) της όξινης υδρόλυσης του αλγινικού οξέος HMW σε διάλυμα HCl 3 M.

Μετά το πέρας των 5 ωρών, το αιώρημα αφέθηκε να κρυώσει σε θερμοκρασία δωματίου, για 10 ώρες, και στη συνέχεια έγινε φυγοκέντρηση στις 6.000 rpm για 15 λεπτά σε θερμοκρασία περιβάλλοντος. Ακολούθησε συλλογή του ιζήματος, το οποίο διαλύθηκε σε Millipore αποσταγμένο νερό. Στη συνέχεια, στο παραπάνω υδατικό διάλυμα προστέθηκε NaCl και το pH ρυθμίστηκε να είναι βασικό (pH=9) με προσθήκη υδατικού διαλύματος NaOH. Το pH ρυθμίστηκε ξανά στο 2.3 με προσθήκη, στάγδην, διαλύματος HCl 3 M. Στο βασικό pH το διάλυμα ήταν διαυγές ενώ στο όξινο γινόταν θολό. Στη συνέχεια, το αιώρημα αφέθηκε σε ηρεμία σε θερμοκρασία δωματίου για 10 ώρες και μετά ακολούθησε απομάκρυνση (με απόχυση) του υπερκείμενου υγρού. Το ίζημα φυγοκεντρήθηκε (6.000 rpm, 15 min) και στο άσπρο στερεό που καταβυθίστηκε μετά τη φυγοκέντρηση (Εικόνα 58) έγινε έκπλυση με Millipore αποσταγμένο νερό. Το στερεό μετά την πλύση, επαναιωρήθηκε σε Millipore αποσταγμένο νερό, στο οποίο προστέθηκε και NaCl.



Εικόνα 58. Άσπρο στερεό ίζημα έπειτα από τη φυγοκέντρωση.

Το pH ρυθμίστηκε στο 7.5 με προσθήκη υδατικού διαλύματος NaOH 4 M. Στο διάλυμα προστέθηκε σκόνη ενεργού άνθρακα (Πίνακας 1) και το αιώρημα παρέμεινε υπό μαγνητική ανάδευση για 2 ώρες. Έπειτα, έγινε διήθηση υπό κενό για την απομάκρυνση της σκόνης του ενεργού άνθρακα. Το διίθημα καταβυθίστηκε με προσθήκη σε αυτό απόλυτης αιθανόλης, όπως παρατηρείται στην *Εικόνα 59*. Μετά την απομάκρυνση του υπερκείμενου υγρού, το ίζημα φυγοκεντρήθηκε (6.000 rpm, 15 min), συλλέχθηκε και λυοφιλοποιήθηκε. Μετά τη λυοφιλοποίηση, συλλέχθηκε άσπρη σκόνη, η οποία σύμφωνα με τη βιβλιογραφία, πρέπει να περιείχε το πλούσιο σε μονάδες G LMW αλγινικό οξύ.

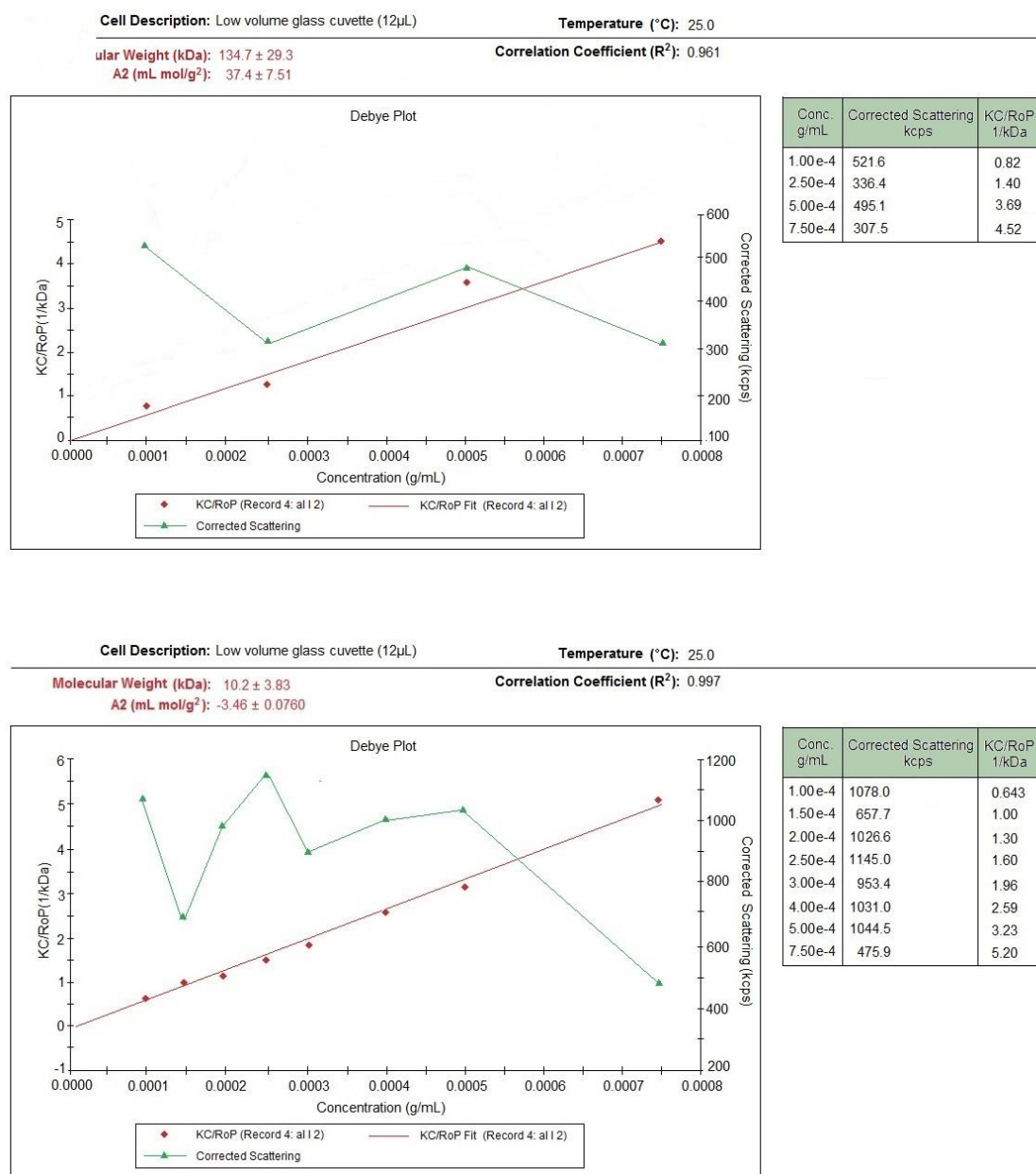


Εικόνα 59. Καταβύθιση ιζήματος με απόλυτη αιθανόλη.

Μέτρηση μοριακών βαρών των κλασμάτων του υψηλού (HMW) και του χαμηλού (LMW) μοριακού βάρους αλγινικού οξέος

Η μέτρηση των μοριακών βαρών έγινε με χρήση δυναμικής σκέδασης φωτός (DLS) (125). Τόσο για το HMW όσο και για το LMW αλγινικό οξύ, παρασκευάστηκαν υδατικά διαλύματα διαφόρων συγκεντρώσεων. Το κάθε δείγμα τοποθετήθηκε σε κυψελίδα και αυτή τοποθετήθηκε στο ειδικό φωτόμετρο (Malver Instruments) όπου, από τις μετρήσεις της σκέδασης του φωτός, υπολογίστηκαν, τα μοριακά βάρη των δύο κλασμάτων HMW και LMW. Τα πειραματικά αποτελέσματα καθώς και οι συγκεντρώσεις των δειγμάτων φαίνονται στην Εικόνα 60.

Σύμφωνα με τα αποτελέσματα, η παρασκευή χαμηλού μοριακού βάρους αλγινικού οξέος (LMW) από το αντίστοιχο υψηλού μοριακού βάρους (HMW) ήταν επιτυχής. Συγκεκριμένα, η τιμή του μοριακού βάρους για το κλάσμα LMW ήταν $10,2 \pm 3,83$ KDa ενώ για το κλάσμα HMW ήταν 134.7 ± 29.3 KDa. Οι τιμές αυτές είναι αντίστοιχες με αυτές που αναφέρονται στη βιβλιογραφία (126), για το LMW, και από τον κατασκευαστή για το HMW αλγινικό οξύ.

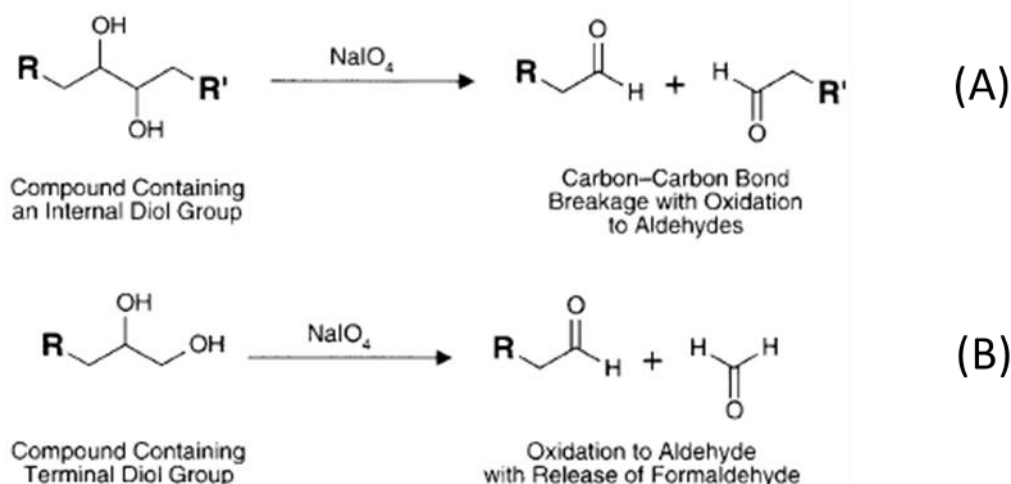


Εικόνα 60. Αποτελέσματα μετρήσεων DLS στο HMW (επάνω διάγραμμα) και στο LMW αλγινικό οξύ (κάτω διάγραμμα). Οι μετρήσεις αυτές ελήφθησαν στο εργαστήριο Γενικής Χημείας στο τμήμα Χημικών Μηχανικών στο Ε.Μ.Π.

Οξείδωση αλγινικού οξέος

Πριν την πρόσδεση του πεπτιδίου στο αλγινικό οξύ, σε αυτό το συγκεκριμένο σημείο της πειραματικής διαδικασίας, έγινε οξείδωση της αλυσίδας του αλγινικού μορίου, ώστε να αλλάξει η στερεοχημική διαμόρφωσή του. Όπως αναφέρθηκε αναλυτικά στο Κεφάλαιο 2 και στην περιγραφή των στόχων της διατριβής, η οξείδωση αυτή είναι απαραίτητο να γίνει για να μετατραπεί το τελικό αλγινικό υδροπρήκτωμα σε ένα πλήρως βιοαποικοδομήσιο αλγινικό ικρίωμα.

Το υπερϊωδικό νάτριο (sodium periodate, NaIO_4 , Πίνακας 1) μπορεί να χρησιμοποιηθεί για να οξειδώσει υδροξυλομάδες σε γειτονικά άτομα άνθρακα, σχηματίζοντας αλδεϋδομάδες. Η αντίδραση λαμβάνει χώρα μεταξύ δύο υδροξυλίων που είναι συνδεδεμένα σε γειτονικά δευτεροταγή άτομα άνθρακα, με αποτέλεσμα τη διάσπαση του δεσμού άνθρακα-άνθρακα και τη δημιουργία δύο τερματικών αλδεϋδικών ομάδων στα προϊόντα που θα προκύψουν (Εικόνα 61 (A), (120)). Όταν το άτομο του άνθρακα που είναι συνδεδεμένο σε ένα από τα γειτονικά υδροξύλια είναι πρωτοταγές, η αντίδραση με το υπερϊωδικό νάτριο παράγει ένα μόριο φορμαλδεΐδης και μια τελική ομάδα αλδεΐδης στο άλλο προϊόν (Εικόνα 61 (B), (120)).



Εικόνα 61. Διάσπαση δεσμού $-\text{CH}(\text{OH})-\text{CH}(\text{OH})-$ (A) και $-\text{CH}(\text{OH})-\text{CH}_2\text{OH}$ (B), με οξείδωση με υπερϊωδικό νάτριο (120).

Για να γίνει η αντίδραση αυτή, αρχικά τόσο η σκόνη από το HMW και όσο και η σκόνη από το LMW αλγινικό οξύ (ξεχωριστά το καθένα) διαλύθηκαν σε Millipore αποσταγμένο νερό προς σχηματισμό των αντίστοιχων διαλυμάτων. Στα διαλύματα αυτά προστέθηκε διάλυμα NaIO_4 0.5 M για να λάβει χώρα η αντίδραση της οξείδωσης της αλυσίδας του αλγινικού οξέος. Η αντίδραση ολοκληρώθηκε έπειτα από 19 ώρες, υπό μαγνητική ανάδευση, σε σκοτεινές συνθήκες (Εικόνα 62 (α)).



(α)



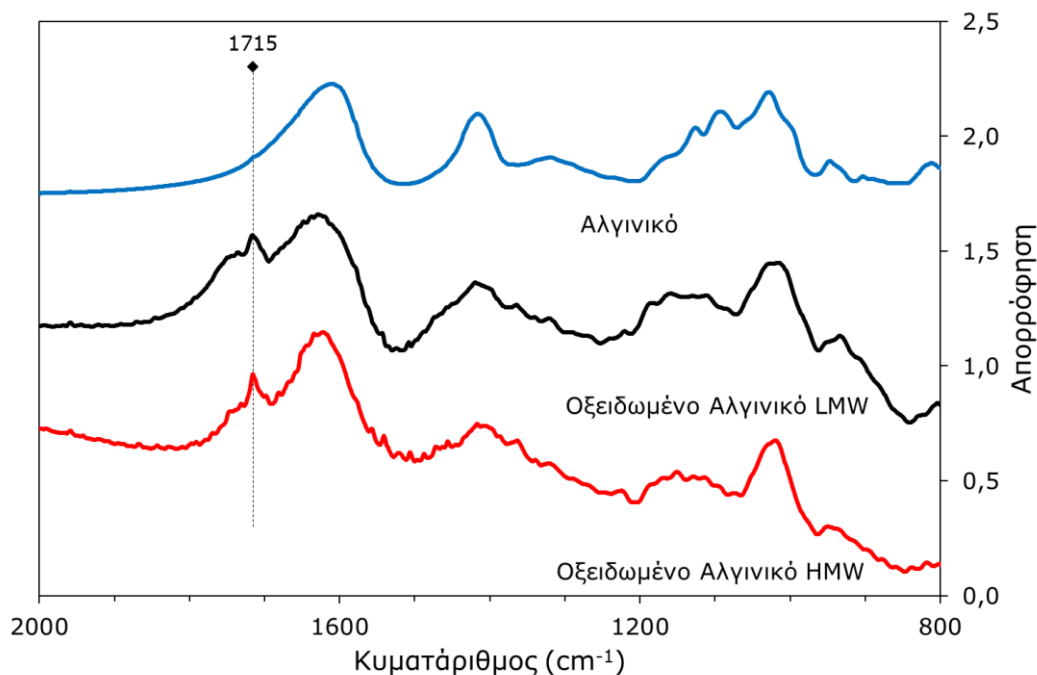
(β)

Εικόνα 62. (α) Αντίδραση οξείδωσης του αλγινικού οξέος με NaIO_4 σε σκοτεινό δωμάτιο (η αντίδραση δεν είναι ευαίσθητη στην ερυθρή ακτινοβολία), και (β) προϊόν της αντίδρασης πριν την έναρξη καθαρισμού με μεμβράνη MWCO.

Στη συνέχεια, προστέθηκε αιθυλενογλυκόλη για να ανάγει την ποσότητα του NaIO_4 που δεν αντέδρασε. Η αντίδραση αυτή, που επίσης έγινε σε σκοτεινό δωμάτιο, ολοκληρώθηκε έπειτα από 2 ώρες, υπό μαγνητική ανάδευση. Το προϊόν της αντίδρασης (για κάθε κλάσμα LMW και HMW, ξεχωριστά) τοποθετήθηκε σε μεμβράνη διαπίδυσης 3.500 Da (Εικόνα 62 (β)). Η μεμβράνη τοποθετήθηκε σε ποτήρι ζέσεως των 500 ml με αποσταγμένο νερό. Η διαπίδυση ολοκληρώθηκε έπειτα από 3 ημέρες (κάθε ημέρα γινόταν αλλαγή του νερού για 3 τουλάχιστον φορές). Τέλος, μετά τη διαπίδυση, το διάλυμα πάγωσε στους -60°C και λυοφιλοποιήθηκε.

Τα φάσματα FT-IR των λυοφιλοποιημένων δειγμάτων παρουσιάζονται στην Εικόνα 63 (τα δείγματα παρήχθησαν με τη μέθοδο των δισκίων KBr). Για σύγκριση, παρουσιάζεται και το φάσμα καθαρής σκόνης αλγινικού οξέος (HMW). Και στα δύο φάσματα του οξειδωμένου HMW και LMW αλγινικού οξέος καταγράφεται η συμμετρική κορυφή της δόνησης του καρβονυλίου της αλδεϋδης. Το αποτέλεσμα αυτό επιβεβαιώνει ότι η οξείδωση ήταν επιτυχής και στα δύο κλάσματα.

Σύμφωνα με τη βιβλιογραφία, για την ποσότητα των αντιδραστηρίων που χρησιμοποιήθηκαν (σχέση ποσοτήτων αλγινικού οξέος και NaIO_4) στην αντίδραση της οξείδωσης οδηγεί σε 1% τροποποίηση των πεντοζών του αλγινικού οξέος (127), σύμφωνα με την αντίδραση της Εικόνα 61.



Εικόνα 63. Φάσματα δονητικής φασματοσκοπίας FT-IR για τα οξειδωμένα κλάσματα HMW και LMW αλγινικού οξέος και της καθαρής σκόνης του αλγινικού οξέος.

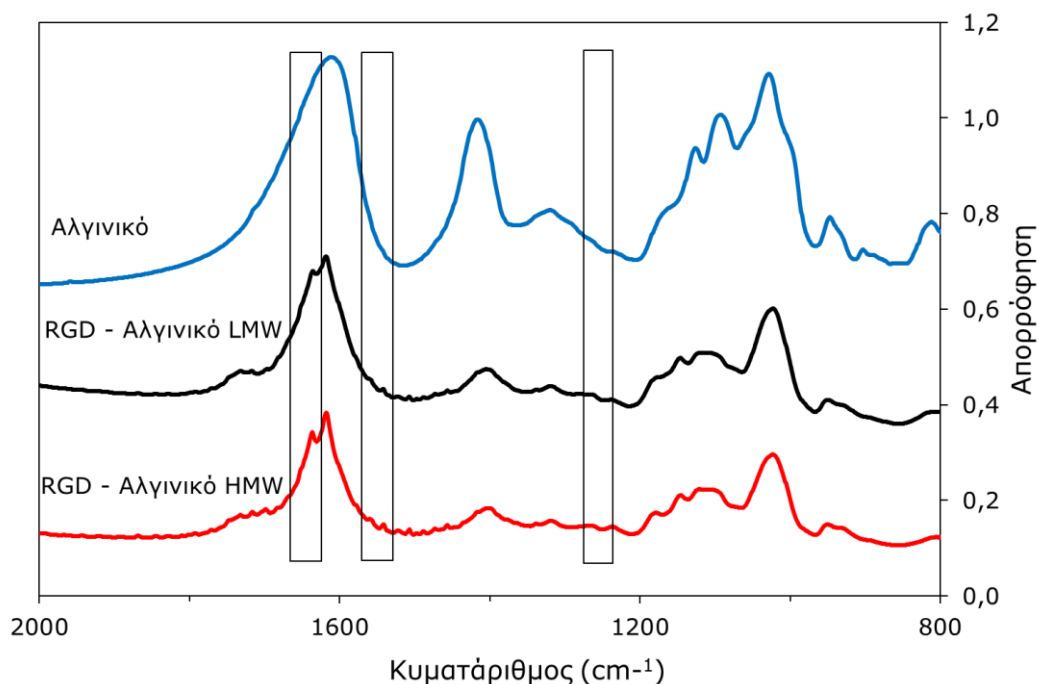
Πρόσδεση εννεαπεπτιδίου (GGGGRGDSP)

Το ολιγοπεπτίδιο που χρησιμοποιήθηκε είχε πρωτοταγή δομή GGGGRGDSP (εννεαπεπτίδιο) (Πίνακας 1). Η ομοιοπολική πρόσδεσή του στα οξειδωμένα αλγινικά οξέα των κλασμάτων LMW και HMW έγινε με χρήση υδατικής χημείας καρβοδιιμιδίων (126), όπως ακριβώς αναφέρθηκε στην προηγούμενη ενότητα με το μόριο του υδραζιδίου της βιοτίνης.

Στην αρχή παρασκευάστηκε υδατικό διάλυμα (3 κ.β. %) οξειδωμένου LMW σε ρυθμιστικό διάλυμα MES (60 ml, pH 6.5), το οποίο περιείχε επιπλέον και NaCl με τελική συγκέντρωσή του στο διάλυμα 0.5 M. Ακολούθησε η προσθήκη υδατικού διαλύματος του πεπτιδίου (40 μmol) και το διάλυμα αφαιήθηκε, υπό ήπια ανάδευση, για 60 λεπτά. Μετά το πέρας των εξήντα λεπτών, προστέθηκε NHS και EDAC (Πίνακας 1) με αναλογία βαρών 1 / 2, αντίστοιχα, και ακολούθησε ήπια ανάδευση (80 rpm) (127). Η αντίδραση ολοκληρώθηκε έπειτα από 12 ώρες σε θερμοκρασία περιβάλλοντος. Μετά, το διάλυμα τοποθετήθηκε σε μεμβράνη διαπίδυσης 3.500 Da, η οποία εμβαπτίστηκε σε φυσιολογικό ορό. Κάθε 3 ημέρες γινόταν αλλαγή του υδατικού μέσου, το οποίο περιείχε και αποστειρωμένο νερό (water for injection), με τρόπο ώστε σταδιακά το διάλυμα της διαπίδυσης να εμπλουτίζεται συνεχώς με το αποστειρωμένο νερό. Θεωρείται ότι ο τρόπος αυτός της σταδιακής (και όχι απότομης) ελάττωσης των ιόντων του Na⁺ ενδείκνυται για αλγινικά υδροπηκτώματα τα οποία θα χρησιμοποιηθούν σε ιστοκαλλιέργειες και *in vivo* πειράματα. Η πολύ μεγάλη σημασία του πολύ προσεκτικού τρόπου καθαρισμού στο στάδιο

αυτό, συμπεριλαμβανομένου και του σταδιακού αποεμπλουτισμού του διαλύματος για τη διαπίδυση από ιόντα Na^+ , παρατηρήθηκε και στα πειράματα της παρούσας εργασίας που παρουσιάζονται στο κεφάλαιο 4. Το τελικό διάλυμα, έπειτα από το πέρας των 3 ημερών, πάγωσε στους -60°C και λυοφιλοποιήθηκε. Η ίδια διαδικασία ακολουθήθηκε και για την πρόσδεση του πεπτιδίου και στο οξειδωμένο HMW αλγινικό οξύ.

Τα φάσματα FT-IR των λυοφιλοποιημένων δειγμάτων παρουσιάζονται στην Εικόνα 64 (τα δείγματα παρήχθησαν με τη μέθοδο των δισκίων KBr). Για σύγκριση παρουσιάζεται και το φάσμα καθαρής σκόνης αλγινικού (HMW). Στα φάσματα των RGD-HMW και RGD-LMW αλγινικών οξέων καταγράφονται οι χαρακτηριστικές κορυφές στα 1636 cm^{-1} (amide I band, $\text{C}=\text{O}$ δονήσεων τάσης), 1540 cm^{-1} (amide II band, $\text{N}-\text{H}$ δονήσεων κάμψης) και 1256 cm^{-1} (amide II band, αλληλεπιδράσεις μεταξύ των δονήσεων κάμψης του δεσμού $\text{N}-\text{H}$ και τάσης του δεσμού $\text{C}-\text{N}$). Αυτό υποδηλώνει την επιτυχή πρόσδεση του πεπτιδίου στην αλυσίδα των δύο αυτών κλασμάτων (121).



Εικόνα 64. Φάσματα δονητικής φασματοσκοπίας FT-IR για τα οξειδωμένα κλάσματα RGD - HMW και RGD - LMW αλγινικού οξέος και της καθαρής σκόνης του αλγινικού οξέος.

Αφού αποδείχθηκε πειραματικά ότι το πεπτίδιο προσδέθηκε στην αλυσίδα του μορίου του HMW και του LMW αλγινικού οξέος, η παρασκευή του υδροπηκτώματος έγινε ως εξής: Ζυγίστηκαν ίδιες ποσότητες των δύο κλασμάτων LMW και HMW των λυοφιλοποιημένων κόνεων και τοποθετήθηκαν σε δύο διαφορετικά φυαλίδια. Οι σκόνες διαλύθηκαν σε αποσταγμένο και αποστειρωμένο νερό ή σε διάλυμα ζελατίνης (0,1%), ανάλογα με την τελική τους χρήση (σε εμφύτευση ή σε

κυτταροκαλλιέργεια, βλ. κεφάλαιο 4). Τα διαλύματα αναμίχθηκαν για την παρασκευή ομοιογενούς μίγματος με αναλογία βάρους LMW:HMW 1:1. Λεπτομέρειες για την παρασκευή του υδροπηκτώματος (με τη προσθήκη ιόντων Ca^{2+}) δίνονται στο κεφάλαιο 4.

3.5.3 Ομοιοπολική πρόσδεση αυξητικής ορμόνης και πρωτεϊνών στο αλγινικό υδροπήκτωμα

Στην ενότητα αυτή παρουσιάζεται η ομοιοπολική πρόσδεση της αυξητικής ορμόνης στην αλυσίδα του αλγινικού οξέος μέσω της χημείας καρβοδιιμιδίων. Συγκεκριμένα, στόχος είναι η δημιουργία αμιδικού δεσμού μεταξύ των καρβοξυλομάδων του αλγινικού οξέος και των αμινομάδων της ορμόνης (και της πρωτεΐνης, BSA, που χρησιμοποιήθηκε στην παρούσα εργασία).

Αρχικά, διαλύθηκε αλγινικό οξύ (3 κ.β %, 10 ml) σε ρυθμιστικό διάλυμα MES 0,1 M, υπό ισχυρή μαγνητική ανάδευση. Ακολούθησε η προσθήκη διαλύματος σουλφο-NHS (0.005 mmol, διαλυμένα σε ρυθμιστικό διάλυμα MES). Το διάλυμα αφέθηκε σε θερμοκρασία περιβάλλοντος, υπό ήπια μαγνητική ανάδευση, για 20 λεπτά. Στη συνέχεια, προστέθηκε το υδατικό διάλυμα της αυξητικής ορμόνης (0,017 μmol, 125 μg, Πίνακας 1). Τέλος, προστέθηκε διάλυμα EDAC (0.012 mmol, διαλυμένα σε ρυθμιστικό διάλυμα MES), στάγδην, υπό ήπια ανάδευση. Η αντίδραση ολοκληρώθηκε έπειτα από παραμονή, σε ήπια ανάδευση, για 12 ώρες. Το διάλυμα τοποθετήθηκε σε μεμβράνη διαπίδυσης 25.000 Da και εμβαπτίστηκε σε Millipore αποσταγμένο νερό για 3 ημέρες, με καθημερινή αλλαγή του νερού. Έπειτα από το πέρας των 3 ημερών, το διάλυμα πάγωσε στους -60°C και λυοφιλοποιήθηκε.

Το τελικό προϊόν χαρακτηρίστηκε με φασματοσκοπία FT-IR. Το φάσμα ήταν ακριβώς ίδιο με τα φάσματα της Εικόνα 56 και της Εικόνα 64 (γι' αυτό και δεν παρουσιάζεται). Δηλαδή, καταγράφηκαν οι χαρακτηριστικές κορυφές του σχηματισμού του αμιδικού δεσμού όπως στο σύμπλοκο βιοτίνης – αλγινικού και G_4RGDSP – αλγινικού οξέος. Αυτό αποδεικνύει ότι έγινε η ομοιοπολική πρόσδεση της αυξητικής ορμόνης στο μόριο του αλγινικού οξέος. Η ίδια ακριβώς διαδικασία έγινε και για να προσδεθεί αλβουμίνη (BSA, Πίνακας 1) στο αλγινικό οξύ και τα αποτελέσματα ήταν ακριβώς ίδια. Η συγκέντρωση της BSA ήταν όση ακριβώς και στην περίπτωση με την GH. Αναφορικά με την απόδοση της αντίδρασης αυτής της πρόσδεσης, ο σχετικός σχολιασμός θα γίνει στην ενότητα 3.6, βασιζόμενος στα πειράματα που περιγράφονται εκεί.

Αφού αποδείχθηκε πειραματικά ότι η αυξητική ορμόνη προσδέθηκε στην αλυσίδα του αλγινικού μορίου, η παρασκευή του υδροπηκτώματος το οποίο εμφυτεύτηκε έγινε ως εξής: Ζυγίστηκε ποσότητα από τη λυοφιλοποιημένη σκόνη και στη συνέχεια παρασκευάστηκε αλγινικό

υδροπήκτωμα 1% με τη μέθοδο διάλυσης/διάχυσης (CaCl_2). Το υδροπήκτωμα χρησιμοποιήθηκε φρέσκο στις εμφυτεύσεις (μέχρι την εμφύτευση φυλάχθηκε σε ψυγείο στους 4°C). Το συγκεκριμένο υδροπήκτωμα χρησιμοποιήθηκε κυρίως για εμφυτεύσεις στα πειραματόζωα.

3.6 Το αλγινικό υδροπήκτωμα ως σύστημα μεταφοράς και απελευθέρωσης αυξητικών παραγόντων και πρωτεϊνών σε εμφραγματικό μυοκάρδιο

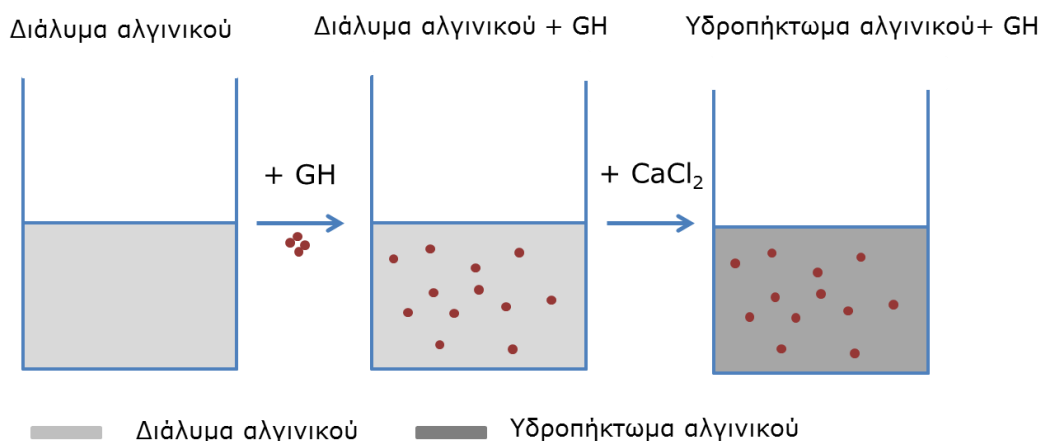
Πειραματικές μελέτες έχουν δείξει ότι, η χορήγηση αυξητικής ορμόνης (GH) μετά από έμφραγμα του μυοκαρδίου βελτιώνει τη λειτουργία της αριστερής κοιλίας. Η αναδιαμόρφωση της αριστερής κοιλίας, που συμβαίνει μετά το έμφραγμα του μυοκαρδίου, μπορεί να μειωθεί εάν η θεραπεία χορηγηθεί στα πρώτα στάδια του εμφράγματος του μυοκαρδίου (87). Ιδανικά, δηλαδή, για καλύτερη απόδοση, η θεραπεία πρέπει να χορηγηθεί αμέσως μετά το έμφραγμα, τοπικά αλλά και σταδιακά στο πάσχον μυοκάρδιο.

Στην εργασία αυτή μελετήθηκαν τρεις διαφορετικοί τρόποι «φόρτωσης» πρωτεϊνών στο αλγινικό υδροπήκτωμα. Ο πιο απλός τρόπος είναι ο εγκλωβισμός της αυξητικής ορμόνης στη μήτρα του υδροπηκτώματος. Ο δεύτερος τρόπος βασίζεται στην ιοντική προσκόλληση, σύμφωνα με την οποία σε συγκεκριμένη τιμή pH (φυσιολογικό pH = 7,4) η επιφάνεια του υποστρώματος του αλγινικού υδροπηκτώματος και της πρωτεΐνης πρέπει να είναι διαφορετικά φορτισμένες. Στην εργασία αυτή, αυτό επιτεύχθηκε με χρήση νανοσωματιδίων Fe_2O_3 , τα οποία σε pH = 7,4 είναι αντίθετα φορτισμένα από την αυξητική ορμόνη. Τα νανοσωματίδια αυτά εγκλωβίστηκαν στη μήτρα του αλγινικού υδροπηκτώματος. Ο τρίτος τρόπος είναι η ομοιοπολική σύνδεση της αυξητικής ορμόνης στην αλυσίδα του αλγινικού οξέος, όπως περιγράφηκε στην ενότητα 3.5.3.

Στη συνέχεια, περιγράφονται τα πειράματα που έγιναν για τη μελέτη της φόρτωσης της αυξητικής ορμόνης (somatotropin, Sigma, Πίνακας 1) στο αλγινικό υδροπήκτωμα του Ca με τους 3 παραπάνω τρόπους, καθώς και της απελευθέρωσή της. Επίσης, λόγω της δυσκολίας λήψης αξιόπιστων αποτελεσμάτων στην ανίχνευση της αυξητικής ορμόνης (επειδή το σήμα από το φθοροσίμετρο ήταν πολύ χαμηλής έντασης και έτσι ο προσδιορισμός της συγκέντρωσης της GH εμπεριείχε υψηλό σφάλμα), πειράματα έγιναν και με αλβουμίνη (BSA). Σε όλες τις περιπτώσεις που περιγράφονται στην παρούσα ενότητα, το αλγινικό υδροπήκτωμα ήταν 1% (και 1.2% στην τρίτη περίπτωση) και παρασκευάστηκε με τη μέθοδο διάλυσης/διάχυσης από CaCl_2 .

3.6.1 «Εγκλωβισμός» αυξητικής ορμόνης και πρωτεϊνών στο αλγινικό υδροηέκτωμα

Η σύνθεση του αλγινικού υδροηέκτωματος 1% με εγκλωβισμένη αυξητική ορμόνη περιγράφεται στην Εικόνα 65. Αρχικά, διαλύθηκε σκόνη αλγινικού οξέος σε Millipore αποσταγμένο νερό με τη βοήθεια λουτρού υπερήχων και μαγνητικής ανάδευσης. Στη συνέχεια, στο υδατικό διάλυμα του αλγινικού οξέος προστέθηκε, υπό ήπια ανάδευση, υδατικό διάλυμα αυξητικής ορμόνης (GH: growth hormone). Ακολούθησε ήπια ανάδευση για 20 λεπτά για την πλήρη διασπορά της ορμόνης στο διάλυμα του αλγινικού οξέος. Τέλος, στο διάλυμα προστέθηκε, στάγδην, διάλυμα άνυδρου CaCl_2 , υπό ήπια μαγνητική ανάδευση (όπως ακριβώς περιγράφηκε στην παράγραφο 3.2.1). Η κ.β αναλογία των αντιδραστηρίων στο τελικό υδροηέκτωμα ήταν: 1 % αλγινικό, 4,18 mM CaCl_2 (συγκέντρωση που αντιστοιχεί στη μέγιστη τιμή δυναμικού ιξώδους), 7,5 mg GDL και 0,045 μM GH.



Εικόνα 65. «Εγκλωβισμός» αυξητικής ορμόνης στο αλγινικό υδροηέκτωμα Ca 1%.

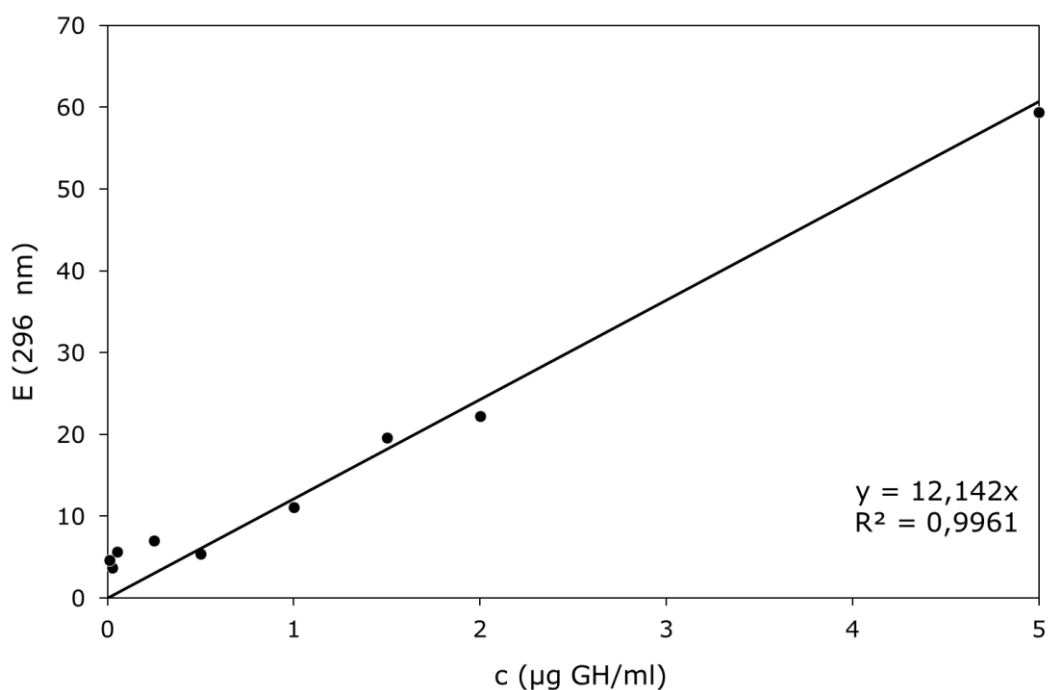
Ο *in vitro* έλεγχος της απελευθέρωσης της αυξητικής ορμόνης από το υδροηέκτωμα σε υδατικό διάλυμα έγινε με τον ίδιο ακριβώς τρόπο που περιγράφεται η πειραματική διαδικασία στη μελέτη αποικοδόμησης του αλγινικού υδροηέκτωματος στην ενότητα 3.4 και στην Εικόνα 47 (τα πειράματα αυτά, δηλαδή η διατήρηση του δείγματος καθ'όλο το χρονικό διάστημα των δειγματοληψιών, έγιναν στους 37°C). Από την υδατική φάση γινόνταν δειγματοληψία 500 μl σε τακτά χρονικά διαστήματα. Φάσματα των δειγμάτων καταγράφηκαν σε φθοροσίμετρο (RF-5301 PC, Spectrophotometer, Shimadzu) σε μήκος κύματος διέγερσης 280 nm και εκπομπής 329 nm. Μετά τη λήψη του φάσματος, το δείγμα επέστρεφε στο φυαλίδιο (για να μην μεταβάλλεται ο όγκος του δείγματος). Επίσης, όμοια πειράματα έγιναν και με αλγινικό υδροηέκτωμα χωρίς αυξητική ορμόνη.

Με τη βοήθεια της πρότυπης καμπύλης, που φαίνεται στην Εικόνα 66 (α), υπολογίστηκαν οι ποσότητες της αυξητικής ορμόνης που απελευθερώθηκαν στο διάλυμα σε κάθε χρονική στιγμή. Από τους υπολογισμούς προκύπτει ότι, η επίτευξη του πλατό αντιστοιχεί στην πλήρη (100%) απελευθέρωση όλης της αυξητικής ορμόνης που είχε εγκλωβιστεί στο υδροπήκτωμα. Με βάση αυτό, χαράχθηκε η καμπύλη της κινητικής της απελευθέρωσής της, η οποία απεικονίζεται στην Εικόνα 67 (β). Σύμφωνα με αυτά τα πειραματικά ευρήματα, διαπιστώνεται ότι, η αυξητική ορμόνη που εγκλωβίστηκε με αυτόν τον τρόπο στο υδροπήκτωμα διαχέεται με ταχείς ρυθμούς από το υδροπήκτωμα προς την υδατική φάση, και εντός των πρώτων 24 ωρών έχει απελευθερωθεί σχεδόν το 90% της ορμόνης. Η απελευθέρωση φαίνεται να ολοκληρώνεται σε χρόνο μικρότερο των 3 ημερών.

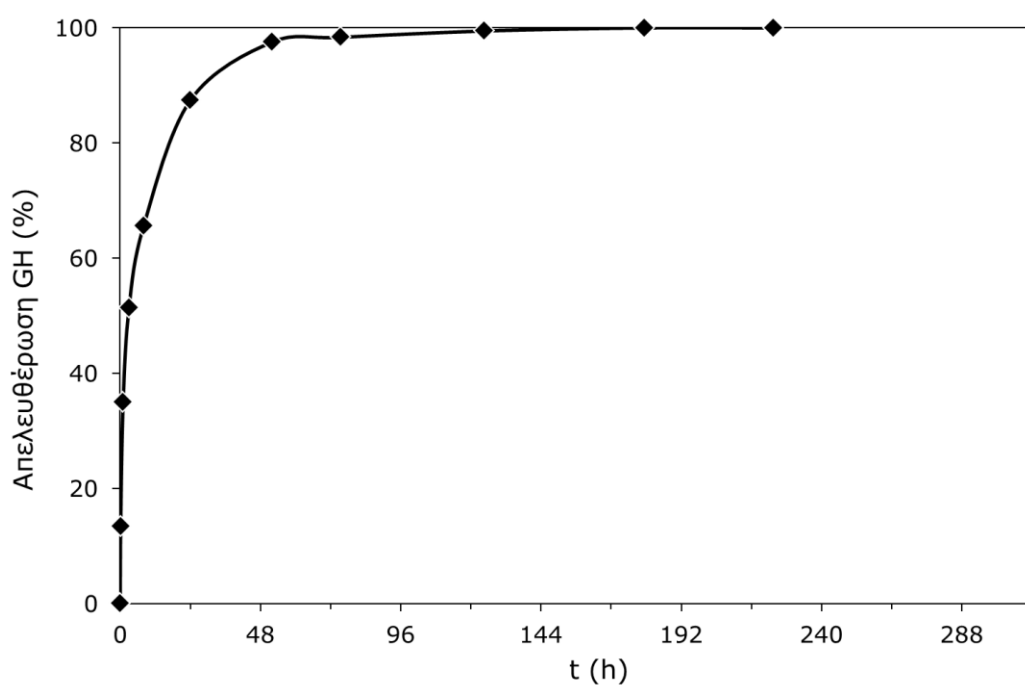
Το ίδιο πείραμα έγινε και με εγκλωβισμό αλβουμίνης (BSA: bovine serum albumin) στο υδροπήκτωμα του αλγινικού οξέος. Ο προσδιορισμός της BSA που απελευθερώθηκε από το υδροπήκτωμα στο υδατικό διάλυμα έγινε με τη μέθοδο Bradford και την καταγραφή της απορρόφησης στα 595 nm. Σε αυτό το μήκος κύματος δεν απορροφά καθόλου το αλγινικό μόριο (Εικόνα 48 (α)). Το αντιδραστήριο Bradford παρασκευάστηκε διαλύοντας σκόνη Coomassie Brilliant Blue (Πίνακας 1) σε μεθανόλη και φωσφορικό οξύ (H_3PO_4) (10 mg Coomassie/10 ml MeOH/20 ml 80 κ.β % H_3PO_4).¹

Με ακριβώς ίδιο τρόπο, όπως έγινε και για τη περίπτωση της αυξητικής ορμόνης, χαράχθηκε η πρότυπη καμπύλη της Εικόνα 67 (α) και με τη βοήθειά της η καμπύλη της Εικόνα 67 (β), η οποία απεικονίζει την κινητική απελευθέρωσης της BSA από το αλγινικό υδροπήκτωμα (τα πειράματα αυτά, δηλαδή η διατήρηση του δείγματος καθ' όλο το χρονικό διάστημα των δειγματοληψιών, έγιναν στους 37°C). Όπως και στην GH, έτσι και στην περίπτωση αυτή, παρατηρείται ότι, το μεγαλύτερο ποσοστό της BSA απελευθερώνεται από το υδροπήκτωμα εντός των πρώτων ωρών του πειράματος. Δηλαδή, σε 12 ώρες, το ποσοστό απελευθέρωσης είναι μεγαλύτερο από 80%, ενώ η απελευθέρωση ολοκληρώνεται σε περίπου 2 ημέρες.

¹ Η μέθοδος Bradford χρησιμοποιείται για τη μέτρηση της συγκέντρωσης της συνολικής πρωτεΐνης σε ένα δείγμα. Η αρχή αυτής της μεθόδου βασίζεται στη σύνδεση των μορίων της πρωτεΐνης στη χρωστική ουσία Coomassie, υπό όξινες συνθήκες, η οποία οδηγεί σε αλλαγή του χρώματος από καφέ σε μπλε. Αυτή η μέθοδος μετρά την παρουσία των αμινοξέων της αργινίνης, της λυσίνης και της ιστιδίνης, τα οποία συμμετέχουν στο σχηματισμό του συμπλόκου της πρωτεΐνης με τη χρωστική.

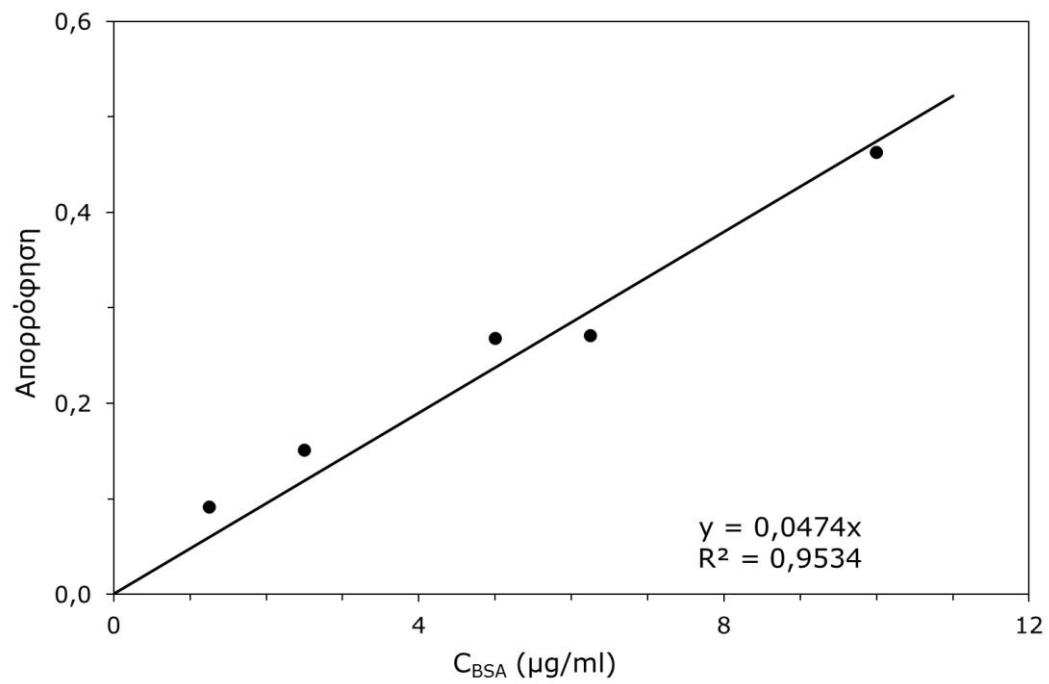


(α)

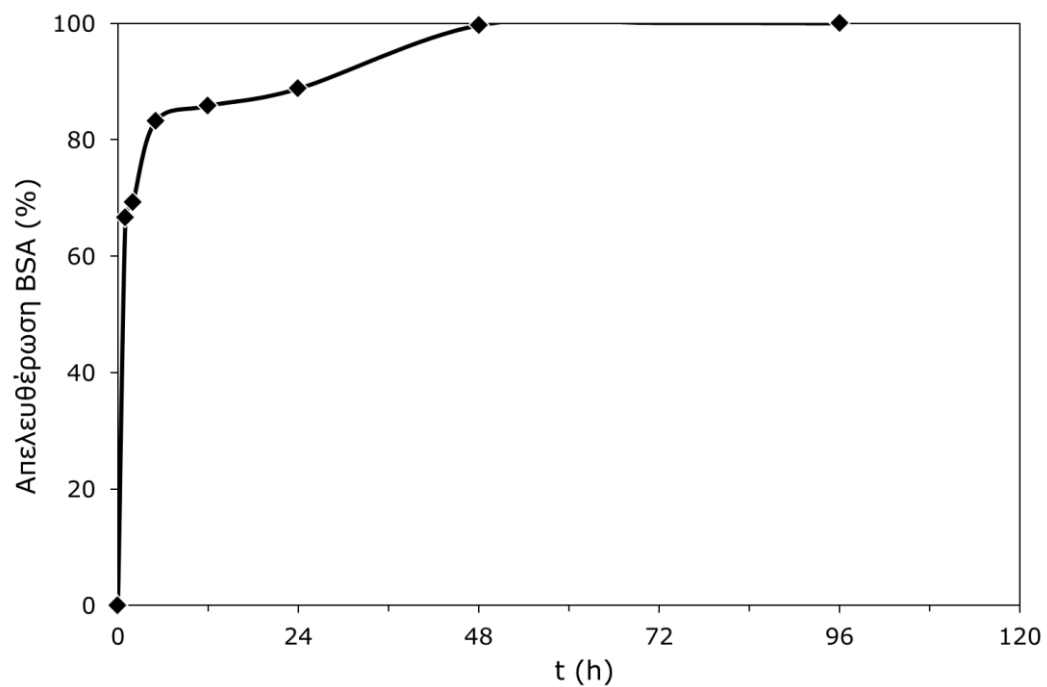


(β)

Εικόνα 66. (α) Πρότυπη καμπύλη υδατικών διαλυμάτων GH (από μετρήσεις σε φθοροσίμετρο), και (β) καμπύλη απελευθέρωσης της GH από το αλγινικό υδροπρήκτωμα με το χρόνο έπειτα από εγκλωβισμό της στο αλγινικό υδροπρήκτωμα. (Τα πειράματα έγιναν στους 37°C).



(α)



(β)

Εικόνα 67. (α) Πρότυπη καμπύλη υδατικών διαλυμάτων BSA μετρημένων με τη μέθοδο Bradford, και (β) καμπύλη απελευθέρωσης της BSA από το αλγινικό υδροπρήκτωμα με το χρόνο έπειτα από εγκλωβισμό της εντός του αλγινικού υδροπρηκτώματος. (Τα πειράματα έγιναν στους 37°C).

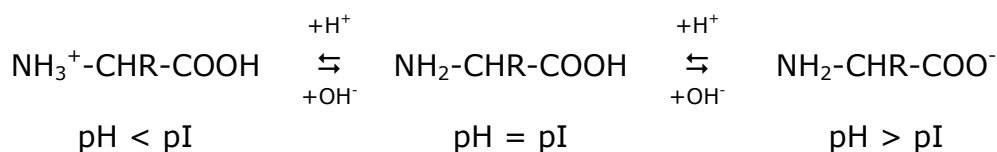
Από τα πειραματικά αποτελέσματα και από τις δύο περιπτώσεις συνάγεται το συμπέρασμα ότι, λόγω της μη ύπαρξης κάποιου τύπου ομοιοπολικού δεσμού μεταξύ της πρωτεΐνης και του αλγινικού υδροπηκτώματος, η πρωτεΐνη, τόσο η αλβουμίνη όσο και η αυξητική ορμόνη, διαχέονται πολύ γρήγορα από τη μήτρα του υδροπηκτώματος προς την υδατική φάση, με το μεγαλύτερο ποσοστό τους να απελευθερώνεται εντός των πρώτων 24 ωρών.

Το μοριακό βάρος της BSA (50 KDa) είναι υπέρ διπλάσιο από το μοριακό βάρος της αυξητικής ορμόνης (22 KDa). Αυτή η διαφορά πρέπει να αντανakλάται και στην υδροδυναμική ακτίνα των δύο αυτών ουσιών, η οποία, λόγω της απουσίας άλλων αλληλεπιδράσεων, επηρεάζει την ταχύτητα διέλευσης των μορίων αυτών από το δίκτυο του υδροπηκτώματος. Επομένως, η ομοιότητα της κινητικής της απελευθέρωσης της GH και της BSA από το υδροπήκτωμα δείχνει ότι, δεν παίζει σημαντικό ρόλο το μέγεθος της πρωτεΐνης στο ρυθμό απελευθέρωσής της από το αλγινικό υδροπήκτωμα όταν η δέσμευση έχει γίνει με απλό εγκλωβισμό της σε αυτό, όπως έγινε στη μελέτη της ενότητας αυτής. Με άλλα λόγια, τα πειραματικά αποτελέσματα δείχνουν ότι, η απελευθέρωση της πρωτεΐνης (GH ή BSA) είναι πρακτικά ανεξάρτητη από την αποδόμηση του υδροπηκτώματος, και η όποια μικρή καθυστέρηση της απελευθέρωσής της οφείλεται καθαρά σε φαινόμενα διάχυσής της πρωτεΐνης μέσα στη μάζα του υδροπηκτώματος. Συνεπώς, πρέπει να προταθούν άλλοι τρόποι δέσμευσης των πρωτεϊνικών αυτών παραγόντων ώστε ο ρυθμός απελευθέρωσής τους να ακολουθεί το ρυθμό βιοδιάσπασης του αλγινικού υδροπηκτώματος. Αυτό, μπορεί να γίνει εάν επιτευχθεί πιο ισχυρή και πιο εκτεταμένη σύνδεση των πρωτεϊνών με το αλγινικό υδροπήκτωμα. Αυτό επιχειρήθηκε με τις μεθόδους που παρουσιάζονται στις δύο επόμενες ενότητες.

Παρ' όλα αυτά, στην ιατρική πρακτική, όπως αναφέρεται στην ενότητα 4.2, έχει ενδιαφέρον να μελετηθεί η επίδραση της απελευθέρωσης της GH από το αλγινικό υδροπήκτωμα μέσα στις πρώτες 24 ώρες μετά την εμφύτευσή του στο εμφραγματικό μυοκάρδιο. Συνεπώς, σε ένα τέτοιο πείραμα, η ταχεία κινητική απελευθέρωσης της GH, όπως καταγράφηκε στην ενότητα αυτή, είναι απαραίτητη και η πλέον ενδεδειγμένη (η οποία σίγουρα δεν είναι όμοια όπως η απευθείας έγχυση GH στο μυοκάρδιο). Έτσι, τα υδροπηκτώματα με απλό εγκλωβισμό της GH χρησιμοποιήθηκαν σε αρκετά από τα πειράματα που περιγράφονται στην ενότητα 4.2.

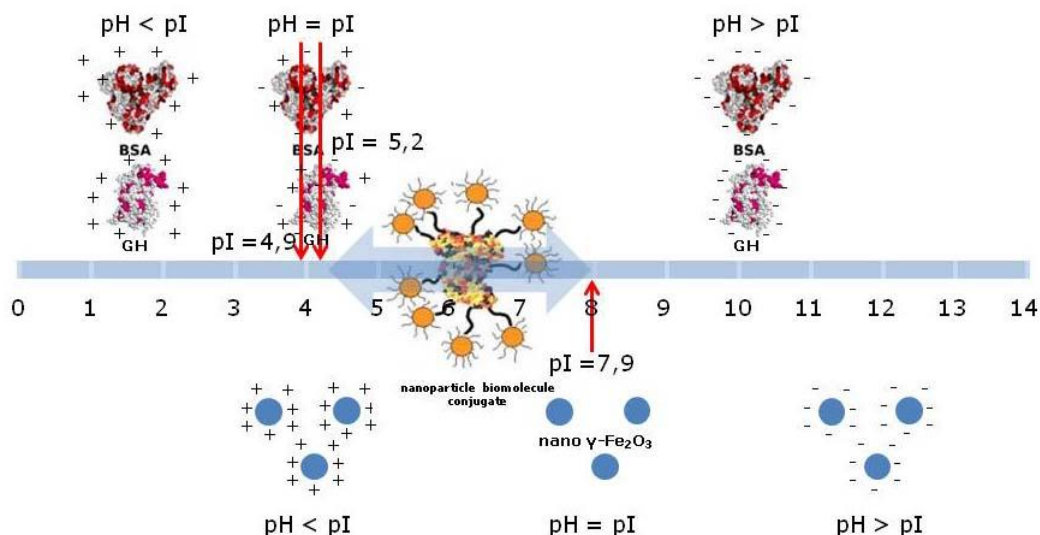
3.6.2 Πρόσδεση και απελευθέρωση πρωτεΐνης στο αλγινικό υδροπήκτωμα με χρήση μαγνητικών νανο-σωματιδίων Fe_2O_3

Ο δεύτερος τρόπος πρόσδεσης των πρωτεϊνικών μορίων στο αλγινικό υδροπήκτωμα που μελετήθηκε ήταν με ιοντική δέσμευση. Το ισοηλεκτρικό σημείο της αυξητικής ορμόνης είναι $pI = 4,9$ και της BSA $pI = 5,2$. Αυτό σημαίνει ότι, όταν το pH του διαλύματος είναι μικρότερο από το pI αυτών των πρωτεϊνών, τότε η επιφάνειά τους είναι θετικά φορτισμένη, ενώ όταν το pH του διαλύματος είναι μεγαλύτερο του pI , τότε είναι αρνητικά φορτισμένες, σύμφωνα με το σχήμα της παρακάτω αντίδρασης:



Έτσι, σε φυσιολογικό $pH = 7,4$ (δηλαδή $pH > pI$), αναμένεται, τόσο η GH όσο και η BSA να έχουν αρνητικό επιφανειακό συνολικό φορτίο. Το πείραμα που παρουσιάστηκε στην προηγούμενη ενότητα δείχνει ότι, μεταξύ των πρωτεϊνών αυτών (GH και BSA) και του αλγινικού μορίου υπάρχει χαλαρή σύνδεση, η οποία ασφαλώς δεν συνηγορεί στην ανάπτυξη ιοντικής σύνδεσης. Έτσι, πρέπει να αναζητηθεί κάποιο άλλο (ενδιάμεσο) υλικό του οποίου η επιφάνεια σε φυσιολογικό pH να είναι θετικά φορτισμένη. Με άλλα λόγια, το ισοηλεκτρικό σημείο (pI) της επιφάνειας αυτού του υλικού πρέπει να βρίσκεται στην αλκαλική περιοχή. Το υλικό αυτό θα πρέπει να ενσωματωθεί σε αλγινικό υδροπήκτωμα.

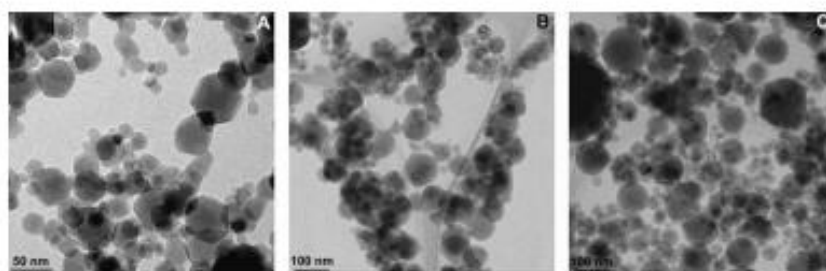
Στην εργασία αυτή επιλέχθηκαν τα νανοσωματίδια Fe_2O_3 , τα οποία έχουν $pI = 7,9$ (και τα οποία επίσης, όπως έχει αναφερθεί και στο κεφ. 2, χρησιμοποιούνται σε εφαρμογές της βιοϊατρικής, σε φάρμακα κλπ.). Αυτό σημαίνει ότι, μπορούν να αναπτύξουν ισχυρή ιοντικής φύσης σύνδεση με τη BSA και τη GH σε φυσιολογικό $pH = 7,4$, σύμφωνα με το σχήμα της Εικόνα 68. Εκτός της υψηλής τιμής του pI , τα συγκεκριμένα νανοσωματίδια επιλέχθηκαν και επειδή έχουν μεγάλη ειδική επιφάνεια και απλή σχετικά μορφολογία, έτσι ώστε να παρασχεθεί αμέσως η πληροφορία που αφορά στην πρόσδεση και απελευθέρωση των πρωτεϊνικών μορίων (ενώ αντίθετα, άλλες πιο περίπλοκες ενώσεις, όπως για παράδειγμα μεσοπορώδεις δομές Si με υψηλή τιμή pI , θα δυσκόλευαν την ερμηνεία των αποτελεσμάτων, γιατί η απελευθέρωση θα ήταν αποτέλεσμα τόσο της ιοντικής σύνδεσης, όσο και της μεσοπορώδους και πολύπλοκης δομής τους). Επίσης, λόγω της μαγνητικής φύσης τους, επέτρεπαν τον εύκολο (μαγνητικό) διαχωρισμό τους από το διάλυμα.



Εικόνα 68. Επίτευξη ιοντικής δέσμευσης GH και BSA στα νανοσωματίδια, σε $pH = 7,4$.

Για την *in vitro* μελέτη της ιοντικής πρόσδεσης και της απελευθέρωσης των πρωτεϊνικών παραγόντων στα νανοσωματίδια $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$, μεγέθους 40 nm, χρησιμοποιήθηκε η BSA. Τα πειράματα πρόσδεσης και απελευθέρωσης με GH δεν παρουσιάζονται επειδή τα πειράματα στην προηγούμενη ενότητα έδειξαν ότι η BSA έχει παρόμοια συμπεριφορά με την GH και επίσης, επειδή το σήμα στο φωτόμετρο με τη μέθοδο Bradford ήταν πολύ ισχυρό με τη BSA ενώ με την GH πολύ ασθενές.

Τα νανοσωματίδια (όπως αναφέρθηκε και στο κεφάλαιο 2), παρασκευάστηκαν και χαρακτηρίστηκαν πλήρως από την ερευνητική ομάδα του Καθηγητή κ. Δεληγιαννάκη στο τμήμα Φυσικής του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων και ευγενικά μας παρασχέθηκαν για την υλοποίηση των συγκεκριμένων πειραμάτων. Η τυπική νανοδομή των νανοσωματιδίων Fe_2O_3 , όπως αποτυπώνεται με TEM, φαίνεται στην Εικόνα 69 (128).

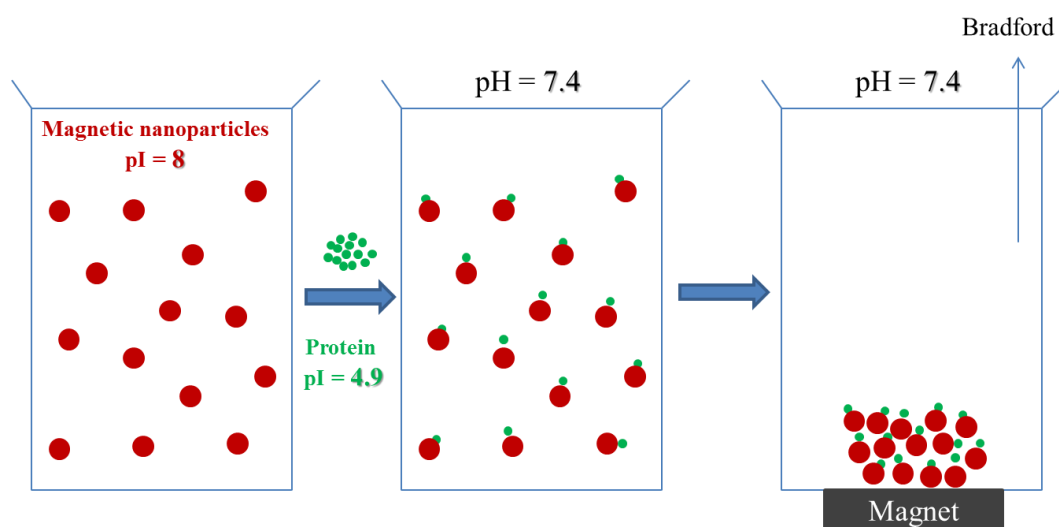


Εικόνα 69. Τυπική εικόνα TEM των νανοσωματιδίων Fe_2O_3 (128).

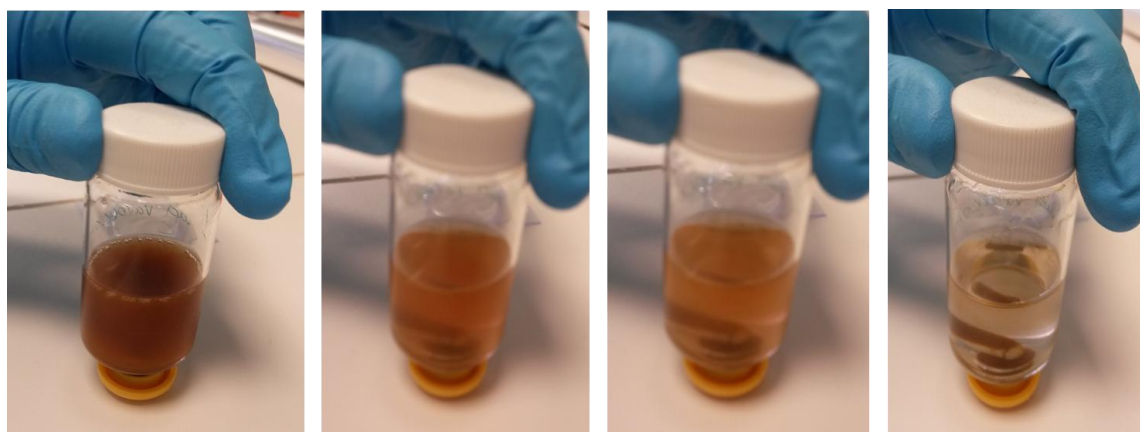
Επίδραση του pH στη δέσμευση της BSA στα νανοσωματίδια

Η πειραματική διαδικασία της δέσμευσης της BSA στα νανοσωματίδια Fe_2O_3 παρουσιάζεται συνοπτικά στην Εικόνα 71. Για τη μελέτη της δέσμευσης της BSA σε ουδέτερο pH (7.4) χρησιμοποιήθηκε ρυθμιστικό διάλυμα PBS.

Αρχικά, 10 mg από τα νανοσωματίδια εναποτέθηκαν σε PBS σε γυάλινο φιαλίδιο και ακολούθησε η τοποθέτηση του αιωρήματος σε λουτρό υπερήχων για 1 ώρα. Στη συνέχεια, στο παραπάνω αιώρημα προστέθηκε υδατικό διάλυμα BSA (το οποίο περιείχε 25 μ g πρωτεΐνης). Το τελικό αιώρημα αφέθηκε, υπό ήπια μαγνητική ανάδευση, σε θερμοκρασία δωματίου για 2 ώρες. Τέλος, τα νανοσωματίδια (γ -Fe₂O₃) με την προσροφημένη πρωτεΐνη διαχωρίστηκαν με μαγνητικό διαχωρισμό (με την τοποθέτηση μαγνήτη στον πυθμένα του γυάλινου φιαλιδίου), όπως φαίνεται στην Εικόνα 70. Από το υπερκείμενο υγρό συλλέχθηκε δείγμα για να μετρηθεί, με τη μέθοδο Bradford, η περιεκτικότητα σε BSA.



Εικόνα 70. Σχηματική αναπαράσταση πειραματικής διαδικασίας πρόσδεσης της BSA στα μαγνητικά νανοσωματίδια γ -Fe₂O₃ σε pH 7.4, και μαγνητικός διαχωρισμός τους.



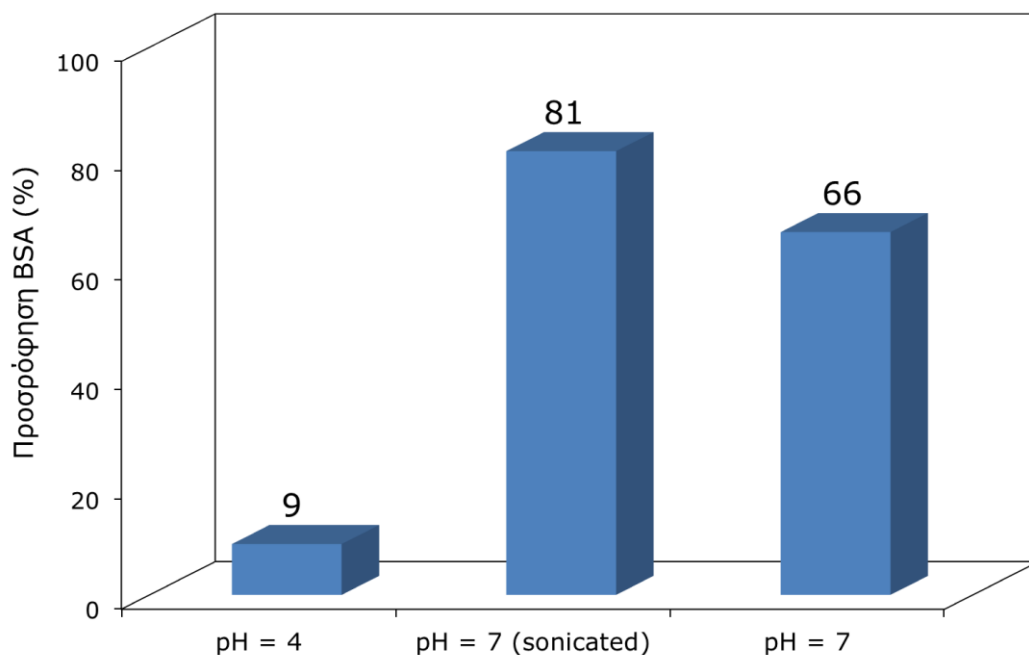
Εικόνα 71. Μαγνητικός διαχωρισμός των νανοσωματιδίων γ -Fe₂O₃, στα οποία είχε προσδεθεί ιοντικά η BSA.

Είναι γνωστό ότι, ένα από τα κύρια χαρακτηριστικά των νανο-κόνεων είναι ο αυθόρμητος και εκτεταμένος σχηματισμός συμπαγών και ισχυρά συνεκτικών συσσωματωμάτων, τα οποία δύσκολα διασπώνται και διασκορπίζονται, π.χ. με απλή αιώρηση σε διάλυμα και ανάδευση. Έτσι, για να αυξηθεί η ειδική επιφάνεια των νανοσωματιδίων που μελετήθηκαν, από το ίδιο εργαστήριο που μας τα προμήθευσε, παρελήφθησαν και σκόνες νανοσωματιδίων στις οποίες είχαν διασπαστεί τα συσσωματώματα με χρήση υπερήχων, τα οποία ονομάζονται στην παρούσα διατριβή ως sonicated νανοσωματίδια Fe_2O_3 (750 Watt ultrasonic processor model VC 750, company SONICS & MATERIALS, INC). Έτσι, μελετήθηκε, ακριβώς όπως περιγράφηκε και προηγουμένως, η πρόσδεση της BSA και με τη χρήση αυτών των sonicated νανοσωματιδίων Fe_2O_3 . Σημειώνεται ότι, δεν παρατηρήθηκε κάποια αλλοίωση της μαγνητικής τους ικανότητας σε σχέση με τα προηγούμενα, κατά την εφαρμογή του μαγνητικού διαχωρισμού.

Τέλος, μελετήθηκε η επίδραση του pH στην ικανότητα πρόσδεσης της BSA στα νανοσωματίδια Fe_2O_3 (όχι τα sonicated). Για το λόγο αυτό, το ίδιο πείραμα έλαβε χώρα και σε όξινο περιβάλλον, σε $\text{pH} = 4$, με χρήση διαλύματος GDL.

Τα πειραματικά αποτελέσματα συνοψίζονται στην Εικόνα 72. Ως 100% προσρόφηση ορίστηκε η ποσότητας της BSA που προστέθηκε στο αρχικό διάλυμα (και άρα που ήταν διαθέσιμη να προσδεθεί από τα νανοσωματίδια). Παρατηρείται ότι, σε $\text{pH} = 4 < \text{pI}$ τόσο των νανοσωματιδίων όσο και της BSA, η πρόσδεση είναι πρακτικά ανύπαρκτη (9%), επιβεβαιώνοντας το σχήμα της ιοντικής πρόσδεσης της Εικόνα 68. Η πρόσδεση της BSA είναι εμφανής και υψηλή (66%) στην περιοχή του pH μεταξύ των τιμών του pI της BSA και των νανοσωματιδίων. Η επιπλέον αύξηση του ποσοστού της προσρόφησης της διατιθέμενης στο διάλυμα BSA στα sonicated νανοσωματίδια (81%) αποδίδεται στη σημαντικά αυξημένη ειδική τους επιφάνεια. Με το αποτέλεσμα αυτό φαίνεται ότι η διατιθέμενη BSA στο αρχικό διάλυμα ήταν σε περίσσεια και αρκούσε ώστε να δεσμευτούν όλες οι διαθέσιμες επιφανειακές θέσεις στα νανοσωματίδια.

Είναι προφανές ότι, οι πρωτεΐνες σε $\text{pH} > \text{pI}$ μπορούν να δεσμευτούν και με περισσότερες θέσεις (πέραν των καρβοξυλομάδων), ανάλογα με τις πλευρικές ομάδες στην αλυσίδα του R. Για την εκτίμηση της ποσότητας της BSA που πρέπει να διαλυθεί στο αρχικό διάλυμα ώστε να επαρκεί για τις διαθέσιμες θέσεις στα συγκεκριμένα νανοσωματίδια έγιναν σχετικοί υπολογισμοί (δηλαδή έγινε ανάλυση της δομής της BSA για την εύρεση όλων των δεσμικών θέσεων που μπορούν να είναι διαθέσιμες σε $\text{pH} = 7$, το ίδιο έγινε και για τη σοματοτροπίνη), αλλά η παράθεσή τους εδώ δεν γίνεται γιατί είναι ένα ξεχωριστό και πολύ μεγάλο πεδίο έρευνας, το οποίο είναι έξω από το ενδιαφέρον της παρούσας μελέτης.

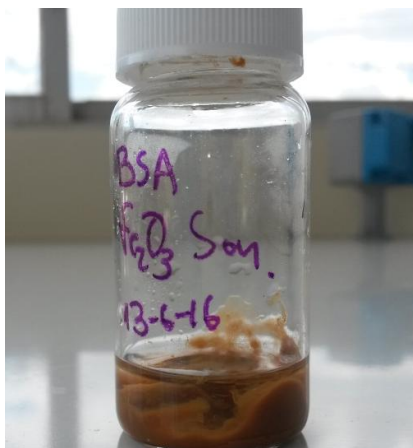


Εικόνα 72. Πρόσδεση BSA στα μαγνητικά νανοσωματίδια $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$, σε διάφορες τιμές pH. Σε pH = 7 έγιναν μετρήσεις προσρόφησης και σε sonicated νανοσωματίδια $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$ με μεγάλη ειδική επιφάνεια. (Τα πειράματα έγιναν στους 37°C).

Απελευθέρωση της BSA

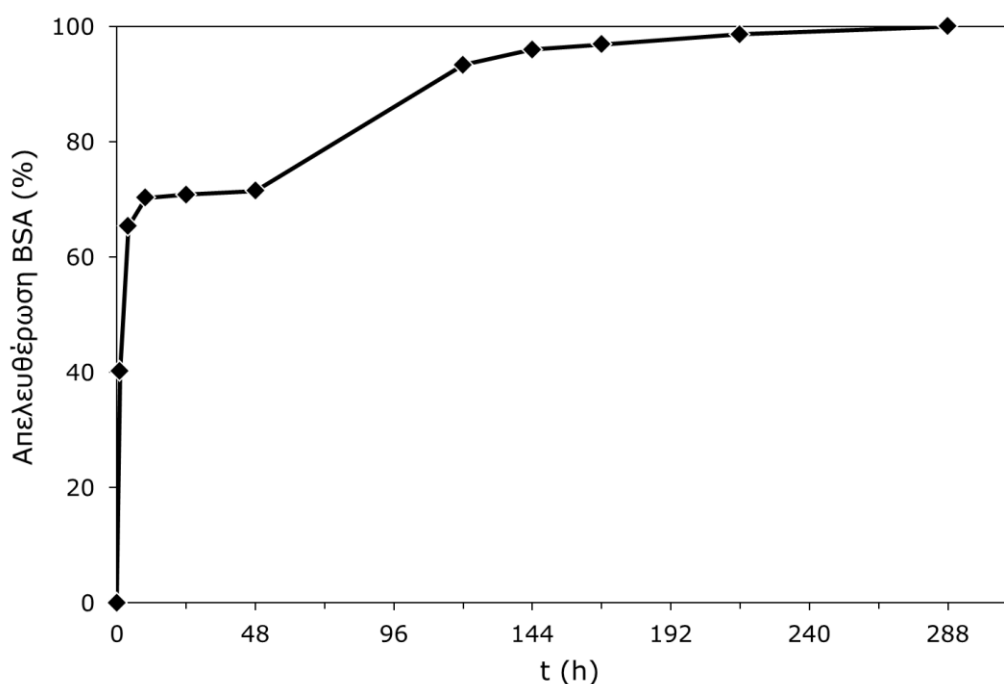
Στη συνέχεια, τα νανοσωματίδια του Fe_2O_3 με την προσδεμένη σε αυτά BSA εγκλωβίστηκαν σε αλγινικό υδροπηκτώμα Ca 1%. Συγκεκριμένα, τα νανοσωματίδια αιωρήθηκαν σε υδατικό διάλυμα αλγινικού οξέος, υπό ήπια μαγνητική ανάδευση, για την καλύτερη διασπορά τους στην πολυμερική μήτρα. Ακολούθησε, η προσθήκη υδατικού διαλύματος ιόντων Ca^{2+} (από CaCl_2) και παρατηρήθηκε ο άμεσος σχηματισμός του υδροπηκτώματος.

Για το πείραμα της μέτρησης της απελευθέρωσης της BSA, στην επιφάνεια του υδροπηκτώματος τοποθετήθηκε με πολύ προσοχή, ώστε να μην αναταραχθεί η επιφάνειά του, φυσιολογικός ορός. Το δοχείο σφραγίστηκε και τοποθετήθηκε στους 37 °C (Εικόνα 73). Ανά τακτά χρονικά διαστήματα γινόταν δειγματοληψία από την υδατική φάση και στο φιαλίδιο προσθέτονταν ίση ποσότητα φρέσκου φυσιολογικού ορού, για να διατηρείται σταθερός ο όγκος του δείγματος. Η δειγματοληψία διήρκεσε 12 ημέρες. Ο προσδιορισμός της συγκέντρωσης της BSA σε κάθε δείγμα έγινε με τη μέθοδο Bradford, χρησιμοποιώντας την πρότυπη καμπύλη της Εικόνα 67 (α).



Εικόνα 73. Εναπόθεση φυσιολογικού ορού στην επιφάνεια αλγινικού υδροπηκτώματος στο οποίο είναι διεσπαρμένα νανοσωματίδια Fe_2O_3 με BSA προσδεσμένη σε αυτά. Το υδροπήκτωμα έχει έντονο χαρακτηριστικό καφέ χρώμα λόγω των νανοσωματιδίων.

Οι μετρήσεις της συγκέντρωσης της BSA στο υπερκείμενο υγρό έφτασαν σε πλατό μετά από 10-12 περίπου ημέρες. Θεωρώντας τη μέγιστη αυτή ποσότητα της BSA ως το 100%, το οποίο υπολογίστηκε ότι συνέπιπτε και με την ποσότητα της BSA που ήταν προσδεσμένη στα νανοσωματίδια Fe_2O_3 , κατασκευάστηκε η καμπύλη της Εικόνα 74.



Εικόνα 74. Καμπύλη απελευθέρωσης της BSA από την επιφάνεια αλγινικού υδροπηκτώματος στο οποίο είναι διεσπαρμένα νανοσωματίδια Fe_2O_3 με BSA προσδεσμένη σε αυτά, στους 37°C .

Δεδομένου ότι δεν έγιναν αλλαγές στο pH, μπορεί με ασφάλεια να διατυπωθεί ότι η BSA που μετρήθηκε στο υπερκείμενο υγρό εξακολουθούσε να είναι προσδεσμένη στα νανοσωματίδια του Fe_2O_3 .

Όπως έχει ήδη αναφερθεί επανειλημμένως, η παρουσία των νανοσωματιδίων του Fe_2O_3 σε αυτήν την πολύ μικρή ποσότητα και για μία εφάπαξ έγχυση δεν αποτελεί πρόβλημα (σχετικά με την ασφάλεια) για τη χρήση τους στη συγκεκριμένη εφαρμογή στη θεραπεία του μυοκαρδίου.

Η καμπύλη της κινητικής της Εικόνα 74 έχει 3 διακριτές περιοχές. Στην πρώτη, η πρωτεΐνη απελευθερώνεται ταχύτατα και φτάνει σε ποσοστό ~70% μέσα στις πρώτες 12 ώρες. Στη συνέχεια, ακολουθεί ένα πλατό για 36 ώρες, όπου το ποσοστό απελευθέρωσης είναι πολύ μικρό (1,24 %). Μετά από 48 ώρες παραμονής του υδροπηκτώματος στο διάλυμα του φυσιολογικού ορού, η απελευθέρωση ακολουθεί πιο αργό ρυθμό, ο οποίος είναι ανάλογος του ρυθμού αποικοδόμησης του υδροπηκτώματος (σε αυτούς τους χρόνους από την έναρξη του πειράματος) που παρουσιάστηκε στην ενότητα 3.4 (Εικόνα 48 και Εικόνα 50).

Τα αποτελέσματα αυτά δείχνουν ότι, ενώ η ιοντική πρόσδεση της BSA ήταν επιτυχής στα νανοσωματίδια, ο απλός εγκλωβισμός των νανοσωματιδίων μέσα στο αλγινικό υδροπήκτωμα είχε παρόμοια αποτελέσματα στα αρχικά στάδια του πειράματος (δηλαδή στους μικρούς χρόνους) με τον άμεσο εγκλωβισμό της πρωτεΐνης στο υδροπήκτωμα, όπως αυτός μελετήθηκε στην προηγούμενη ενότητα. Άλλωστε, το μέγεθος των νανοσωματιδίων είναι πολύ μικρό και έτσι δεν υπήρχε πολύ σημαντική παρεμπόδιση από το δίκτυο του υδροπηκτώματος για να βγουν έξω από το αυτό. Όμως, δεν αποδόθηκε αμέσως όλη η ποσότητα της πρωτεΐνης στο διάλυμα. Ένα σημαντικό ποσοστό, της τάξης του 25-30% της συνολικής BSA, παρέμεινε στο υδροπήκτωμα, και, μετά από ένα διάστημα 2 ημερών, σταδιακά, άρχισε να απελευθερώνεται από αυτό. Αυτό αποτελεί την ειδοποιό διαφορά μεταξύ του απλού εγκλωβισμού της πρωτεΐνης στο υδροπήκτωμα, που μελετήθηκε στην προηγούμενη ενότητα, και στο υδροπήκτωμα με τη χρήση ενδιάμεσων νανοσωματιδίων Fe_2O_3 , που μελετήθηκε εδώ.

Υπό την έννοια αυτή, το πλατό που εμφανίζεται στις 12-48 ώρες, καθώς και το γεγονός ότι μετά τις 2 ημέρες η απελευθέρωση της BSA ακολουθεί το ρυθμό βιοαποικοδόμησης του αλγινικού υδροπηκτώματος υποδηλώνουν ότι, τα νανοσωματίδια πράγματι είχαν ενεργό ρόλο στη ρύθμιση της απελευθέρωσης της BSA, και συγκεκριμένα, επιτυγχάνοντας μικρούς ρυθμούς απελευθέρωσης στα στάδια των μεγαλύτερων χρόνων του πειράματος, κάτι που δεν καταγράφηκε καθόλου στα πειράματα απλού απευθείας εγκλωβισμού της BSA στο αλγινικό υδροπήκτωμα στην προηγούμενη ενότητα. Έτσι, στο ίδιο βιοϋλικό, καταγράφηκαν 2 διαφορετικοί ρυθμοί απελευθέρωσης της πρωτεΐνης, ο ένας ταχύς και σε μεγάλες ποσότητες στην αρχή, που στη θεραπεία του εμφράγματος του μυοκαρδίου είναι απαραίτητος, και ένας πιο αργός, που επίσης είναι επιθυμητός, ώστε να μην σταματήσει εντελώς, μετά την δεύτερη ημέρα, η χορήγηση των αυξητικών παραγόντων στην τραυματισμένη περιοχή, αλλά

να συνεχίσει, σε μικρότερες ποσότητες, μέχρι την ολοκλήρωση των πρώτων 10 ημερών μετά την εκδήλωση του εμφράγματος και την έναρξη της θεραπείας.

Οι ταχείς ρυθμοί απελευθέρωσης τις πρώτες 12 ώρες πρέπει να οφείλονται στην απελευθέρωση των συμπλόκων BSA-Fe₂O₃ που βρίσκονται εγκλωβισμένα σε περιοχές στο υδροπήκτωμα πιο κοντά στην εξωτερική επιφάνειά του. Όσο η αποικοδόμηση του υδροπηκτώματος προχωράει, ανοίγουν δίοδοι ώστε να αρχίσει η απελευθέρωση και των συμπλόκων που είναι εγκλωβισμένα πιο εσωτερικά στο υδροπήκτωμα.

Έτσι, με τα πειράματα στην ενότητα αυτή και στην προηγούμενη προκύπτει το συμπέρασμα ότι, οι πρωτεϊνικοί παράγοντες πρέπει να συνδεθούν άμεσα με το αλγινικό υδροπήκτωμα ώστε να μπορέσει ο ρυθμός απελευθέρωσής τους να ακολουθεί το ρυθμό βιοαποικοδόμησης του υδροπηκτώματος. Αυτό ακριβώς πραγματεύεται η επόμενη ενότητα.

3.6.3 Μελέτη απελευθέρωσης πρωτεΐνης ομοιοπολικά προσδεδεμένης στην αλυσίδα του αλγινικού μορίου

Στα πειράματα αυτά χρησιμοποιήθηκε η λυοφιλοποιημένη σκόνη του αλγινικού υποστρώματος, στο οποίο ήταν προσδεδεμένη ομοιοπολικά η BSA, η οποία παρασκευάστηκε σύμφωνα με τη διαδικασία που περιγράφεται στην ενότητα 3.5.3. Η σκόνη αυτή αιωρήθηκε σε Millipore αποσταγμένο νερό και, αφού διαλύθηκε πλήρως με μαγνητική ανάδευση, στο διάλυμα προστέθηκε διάλυμα CaCl₂ και GDL (μηχανισμός διάλυσης / διάχυσης). Το τελικό υδροπήκτωμα του Ca με τη BSA είχε όγκο 5 ml και συγκέντρωση 1,2 % σε αλγινικό (η συγκέντρωση αυτή επιλέχθηκε για να είναι ακριβώς ίδια με αυτήν που χρησιμοποιήθηκε στα *in vivo* πειράματα της ενότητας 4.2). Περιμετρικά του υδροπηκτώματος που σχηματίστηκε (λόγω της μεγάλης διαμέτρου του δοχείου, το υδροπήκτωμα βρέθηκε στη μία πλευρά των τοιχωμάτων του δοχείου) εναποτέθηκε πολύ προσεκτικά η υδατική φάση, που ήταν 7 ml φυσιολογικού ορού (Εικόνα 75). Η εικόνα αυτή παρατίθεται ώστε να παρατηρηθεί η πολύ υψηλή συνεκτικότητα του αλγινικού υδροπηκτώματος. Το δοχείο σφραγίστηκε (για να μην εξατμιστεί το υγρό) και τοποθετήθηκε στους 37 °C.



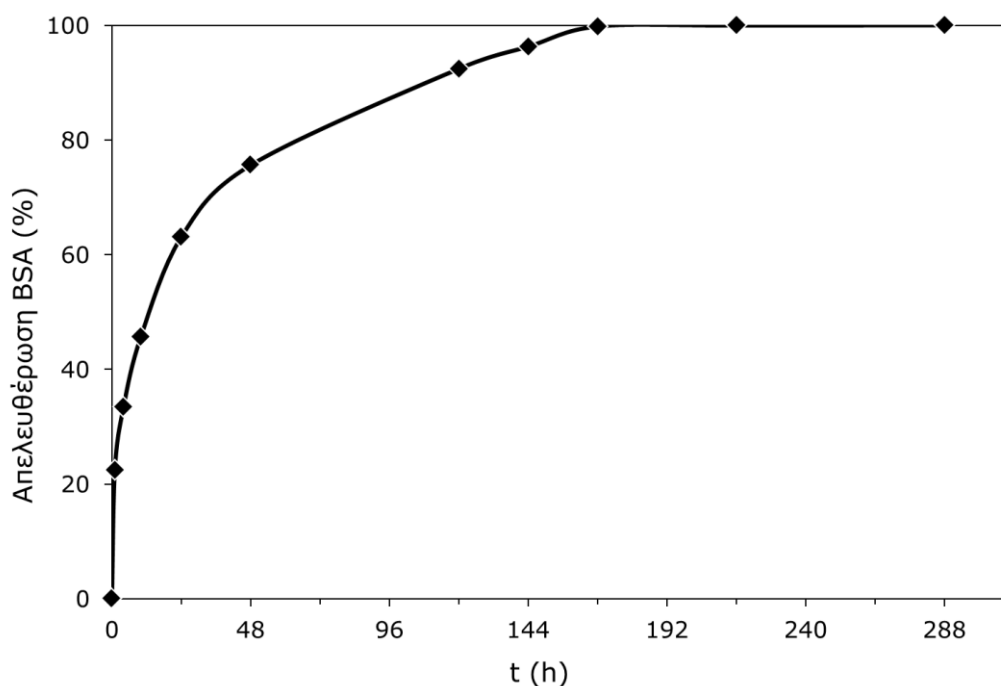
Εικόνα 75. Εναπόθεση φυσιολογικού ορού περιμετρικά του αλγινικού υδροπηκτώματος στο οποίο ήταν ομοιοπολικά προσδεδεμένη η BSA.

Η δειγματοληψία έγινε ως εξής. Σε τακτά χρονικά διαστήματα συλλέγονταν 800 μl από την υδατική (διαυγή) φάση. Όλα τα δείγματα, αμέσως μετά τη δειγματοληψία, διατηρούνταν στους 4°C. Κάθε φορά που αφαιρούνταν τα 800 μl, στο φιαλίδιο προσθέτονταν 800 μl φρέσκου φυσιολογικού ορού με σκοπό ο όγκος να παραμένει σταθερός και ταυτόχρονα να ανανεώνεται το υδατικό περιβάλλον του υδροπηκτώματος, προσομοιάζοντας, έτσι, ακόμη περισσότερο το περιβάλλον του μυοκαρδίου. Η δειγματοληψία διήρκεσε 12 ημέρες. Ο προσδιορισμός της συγκέντρωσης της BSA σε κάθε δείγμα έγινε με τη μέθοδο Bradford, χρησιμοποιώντας την πρότυπη καμπύλη της Εικόνα 67 (α).

Τα πειραματικά αποτελέσματα της *in vitro* απελευθέρωσης της BSA από το αλγινικό υδροπήκτωμα του Ca παρουσιάζονται στην Εικόνα 76. Σύμφωνα με αυτά, η BSA απελευθερώνεται σταδιακά με το χρόνο. Η ολοκλήρωση της απελευθέρωσής της ολοκληρώνεται σε περίπου 8 ημέρες. Το γεγονός ότι, αφενός η BSA ήταν ομοιοπολικά προσδεδεμένη στο υδροπήκτωμα, αφετέρου η καμπύλη της Εικόνα 76 είναι σε πολύ καλή συμφωνία και ως προς τον ρυθμό και ως προς το χρόνο της ολικής διάλυσης (100%) του αλγινικού υδροπηκτώματος, όπως καταγράφηκε στην ενότητα 3.4 (Εικόνα 48 και Εικόνα 50), δείχνει ότι, η απελευθέρωση της BSA ακολουθεί το ρυθμό της αποικοδόμησης του αλγινικού υδροπηκτώματος. Συνεπώς, σε ένα τέτοιο υδροπήκτωμα, όπου οι πρωτεϊνικοί αυξητικοί παράγοντες είναι ομοιοπολικά προσδεδεμένο σε αυτό, ο ρυθμός απελευθέρωσης των πρωτεϊνικών αυτών παραγόντων στο

όργανο-στόχο μπορεί να ρυθμιστεί με τη ρύθμιση του ρυθμού βιοαποικοδόμησής του.

- **Σημείωση:** Το πλατό της καμπύλης της κινητικής της απελευθέρωσης ορίστηκε ως το 100% της απελευθέρωσης της BSA. Από τις απόλυτες τιμές της συγκέντρωσης της BSA στο πλατό, υπολογισμοί έδειξαν ότι, η απόδοση της αντίδρασης της ομοιοπολικής δέσμευσης της BSA στο αλγινικό υδροπήκτωμα, που περιγράφηκε στην ενότητα 3.5.3, ήταν πολλή υψηλή.



Εικόνα 76. Καμπύλη απελευθέρωσης της BSA από το αλγινικό υδροπήκτωμα, η οποία ήταν ομοιοπολικά προσδεσμένη σε αυτό, με χρήση χημείας καρβοδιμιδίων. (Τα πειράματα έγιναν στους 37°C).

**ΚΕΦΑΛΑΙΟ 4: *IN VITRO*
ΚΑΙ *IN VIVO* ΕΛΕΓΧΟΣ
ΙΚΡΙΩΜΑΤΟΣ
ΑΛΓΙΝΙΚΟΥ
ΥΔΡΟΠΗΚΤΩΜΑΤΟΣ**

4. IN VITRO & IN VIVO ΕΛΕΓΧΟΣ ΙΚΡΙΩΜΑΤΟΣ ΑΛΓΙΝΙΚΟΥ ΥΔΡΟΠΗΚΤΩΜΑΤΟΣ

4.1 In vitro έλεγχος ικριώματος

Για τον *in vitro* έλεγχο του ικριώματος πραγματοποιήθηκαν κυτταροκαλλιέργειες με διπλό προγονικό πληθυσμό καρδιακών/ενδοθηλιακών κυττάρων (CEDPs) καθώς και με ενδοθηλιακά και βλαστικά μεσεγχυματικά κύτταρα (HUVECs/MSCs). Τα πειράματα αυτά έγιναν σε συνεργασία με το εργαστήριο Βιολογίας της Ιατρικής Σχολής του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων και με το εργαστήριο Βιοχημείας του Ιντιστούτου Βιοϊατρικών Ερευνών του ΙΤΕ στα Ιωάννινα, στους χώρους των εργαστηρίων αυτών. Συγκεκριμένα, η απομόνωση, η καλλιέργεια, η διαφοροποίηση των κυττάρων και η εφαρμογή των βιολογικών πρωτοκόλλων πραγματοποιήθηκαν από τα δύο προαναφερθέντα εργαστήρια.

Ο λόγος για τον οποίο έγιναν οι κυτταροκαλλιέργειες ήταν για να ελεγχθεί *in vitro* η απόκρισή τους υπό την παρουσία του αλγινικού βιοϋλικού. Έτσι, ο *in vitro* έλεγχος με καλλιέργειες κυττάρων έγινε σε απλό αλγινικό υδροπήκτωμα και σε τροποποιημένο με το ολιγοπεπτίδιο G₄RGDSP. Στον Πίνακα 5 παρουσιάζονται συνοπτικά τα υλικά που ελέχθηκαν *in vitro* και οι τύποι των κυττάρων που έγιναν οι έλεγχοι αυτοί.

Πίνακας 5. Υλικά που μελετήθηκαν *in vitro* με κυτταροκαλλιέργειες.

Ικρίωμα	CEDPs	HUVECs/MSCs
Alginate Hydrogel	✓	✓
G ₄ RGDSP-Alginate Hydrogel	-	✓

CEDPs: Καρδιακός/προγονικός πληθυσμός.
HUVECs: Ανθρώπινα ενδοθηλιακά κύτταρα.
MSCs: Ανθρώπινα μεσεγχυματικά κύτταρα.

4.1.1 *In vitro* έλεγχος αλγινικού βιοϋλικού με καρδιακό / ενδοθηλιακό πληθυσμό (CEDPs)

Για την υλοποίηση των συγκεκριμένων πειραμάτων, τα κύτταρα θρυψινοποιήθηκαν και επαναδιαλύθηκαν σε 1,1 % κ.β. διάλυμα αλγινικού οξέος με τελική συγκέντρωση 1×10^6 κύτταρα / ml διαλύματος. Σε σχέση με την παρασκευή του διαλύματος του αλγινικού οξέος που παρουσιάστηκε στο κεφάλαιο 3, στα συγκεκριμένα πειράματα, για την ενίσχυση της επιβίωσης των κυττάρων εντός της πολυμερικής μήτρας του αλγινικού υδροπηκτώματος, η σκόνη του αλγινικού οξέος διαλύθηκε σε 0,1 % υδατικό διάλυμα ζελατίνης. Επομένως, το τελικό βιοϋλικό στο οποίο τοποθετήθηκαν τα κύτταρα είχε περιεκτικότητα (κ.β.) 1,1 % αλγινικό και 0,1 % ζελατίνη. Εν συνεχεία, το συγκεκριμένο διάλυμα του αλγινικού οξέος, με τα κύτταρα, τοποθετήθηκε σε σύριγγα. Έπειτα, το μίγμα αλγινικό/κύτταρα εναποτέθηκε, στάγδην, σε υδατικό διάλυμα CaCl_2 1 M, με $\text{pH} = 7.4$, για το σχηματισμό σφαιριδίων αλγινικού οξέος (μέθοδος διάλυσης / διάχυσης), με εγκλωβισμένα τα εν λόγω κύτταρα. Ο σχηματισμός των σφαιριδίων του αλγινικού πηκτώματος ήταν ταχύτατος και απεικονίζεται στην Εικόνα 77.

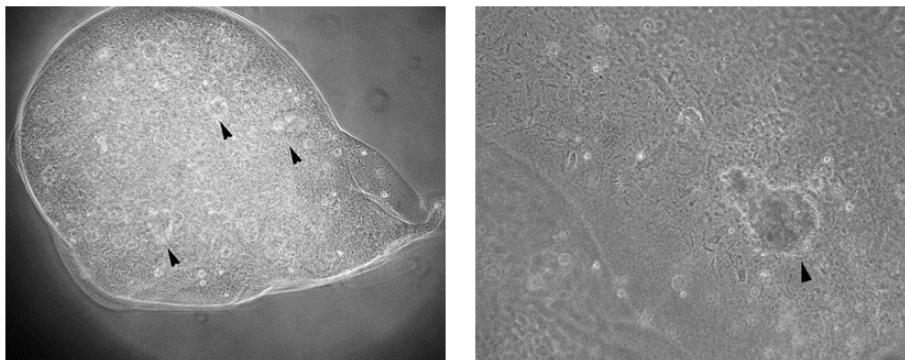


Εικόνα 77. Σχηματισμός σφαιριδίων αλγινικού πηκτώματος με εγκλωβισμένα κύτταρα.

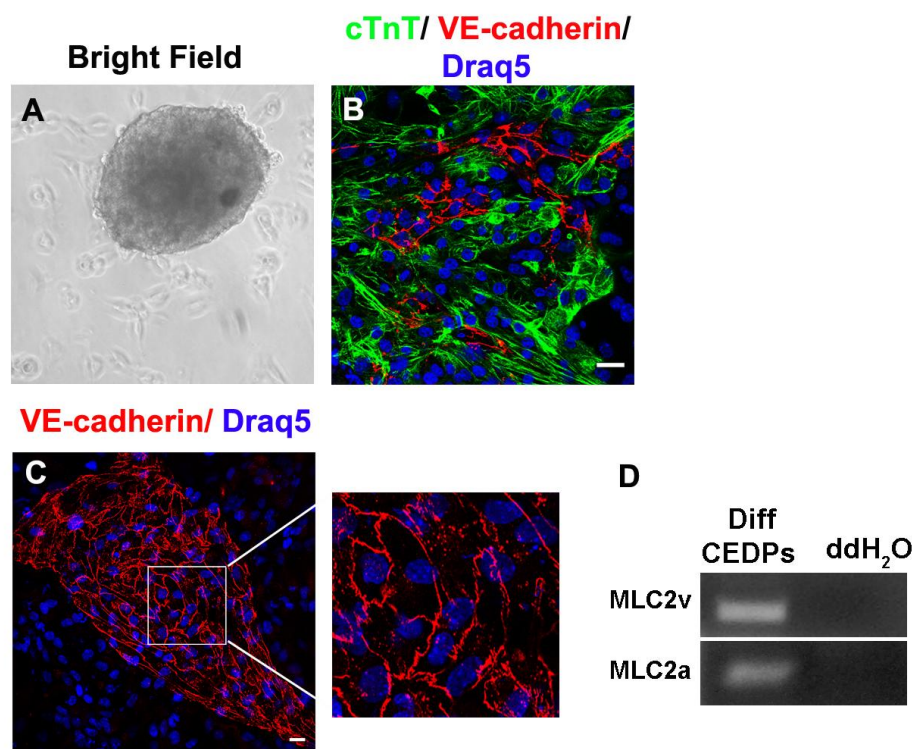
Ακολούθησαν πλύσεις των σφαιριδίων με αποστειρωμένο διάλυμα 0,9% NaCl και μεταφορά τους σε τρυβλία για περαιτέρω διαφοροποίηση σε θρεπτικό μέσο Iscove's modified Dublecco's medium (IMDM), εμπλουτισμένο με 15% FBS, 450 mmol/L μονοθιογλυκερόλη, 10 ng/ml VEGF, 30ng/ml bFGF, 5 μg/ml ασκορβικό οξύ, 2 mM L-γλουταμίνη, 100 u/ml πενικιλίνη και 0.1 mg/ml στρεπτομυκίνη. Το θρεπτικό μέσο διαφοροποίησης για λόγους συντομίας αναφέρεται ως DM2.

Τα σφαιρίδια του αλγινικού πηκτώματος διατηρήθηκαν για περίπου 10 ημέρες στο θρεπτικό μέσο. Μετά από αυτό το χρονικό διάστημα παρατηρήθηκε ότι άρχισαν να βιοαποικοδομούνται. Έπειτα από 12 ημέρες στην καλλιέργεια και αφού τα σφαιρίδια του αλγινικού πηκτώματος είχαν ήδη βιοαποικοδομηθεί παρατηρήθηκε ότι, η διαφοροποίηση των CEDPs στα σφαιρίδια του αλγινικού πηκτώματος ήταν παρόμοια με αυτή στο θρεπτικό μέσο DM2. Πιο συγκεκριμένα, παρατηρήθηκαν μεγάλες «παλλόμενες» περιοχές (Εικόνα 78 και Εικόνα 79 (A)) εντός του υδροπηκτώματος και έκφραση χαρακτηριστικών δεικτών και καρδιομυοκυττάρων (Εικόνα 79 (B, C, D)).

Τα αποτελέσματα αυτά θεωρούνται θετικά, υπό την έννοια ότι προκρίνουν το αλγινικό ικρίωμα για περαιτέρω θεώρηση ως υποσχόμενο εμφύτευμα στη θεραπεία του εμφράγματος του μυοκαρδίου. Για το λόγο αυτό, το ικρίωμα αλγινικού-CEDPs μελετήθηκε και *in vivo* σε πειραματόζωα (ενότητα 4.2) (129, 130).

A**Bright Field**

Εικόνα 78. Διαφοροποίηση καρδιακών και ενδοθηλιακών προγονικών κυττάρων (CEDPs) σε αλγινικό υδροπήκτωμα Ca (129, 130).



Εικόνα 79. (A) Τα CEDPs διαφοροποιούνται σε αλγινικό υδροπήκτωμα ασβεστίου, (B) cTnT+ κύτταρα έπειτα από χρώση με CTnT και VE-cadherin, (C) VE cadherin+ κύτταρα στα CEDPs διαφοροποιημένα κύτταρα, και (D) έκφραση των MLC2v και MLC2a τη 10^η ημέρα διαφοροποίησης των CEDPs, αποτελέσματα από RT-PCR (131).

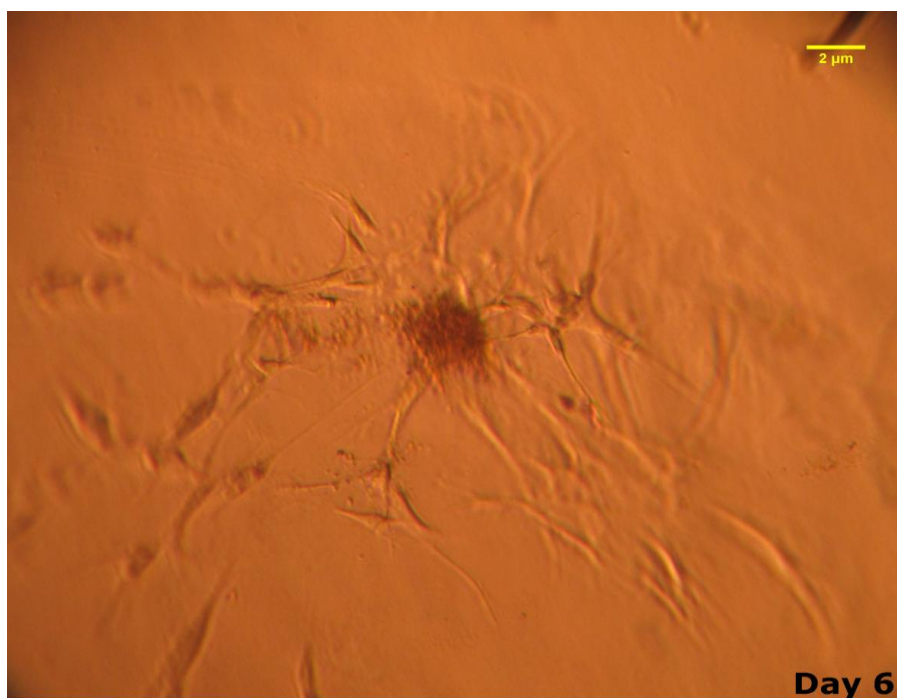
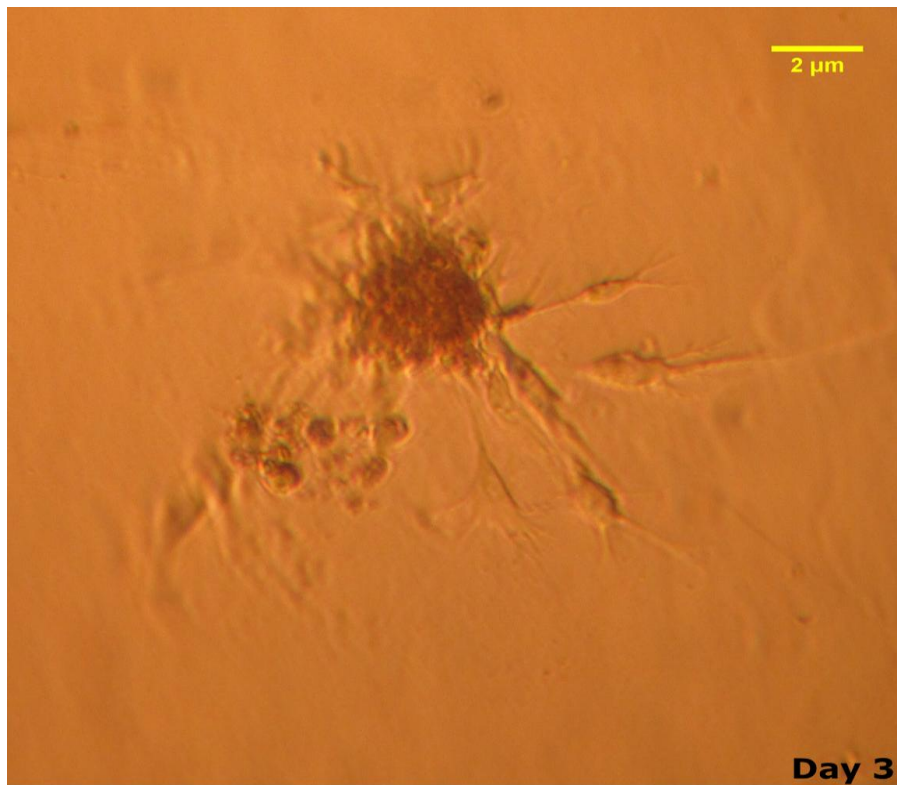
4.1.2 *In vitro* έλεγχος αλγινικού βιοϋλικού με ενδοθηλιακά (HUVESs) και μεσεγχυματικά βλαστικά κύτταρα (MSCs)

1,2 % αλγινικό υδροπήκτωμα

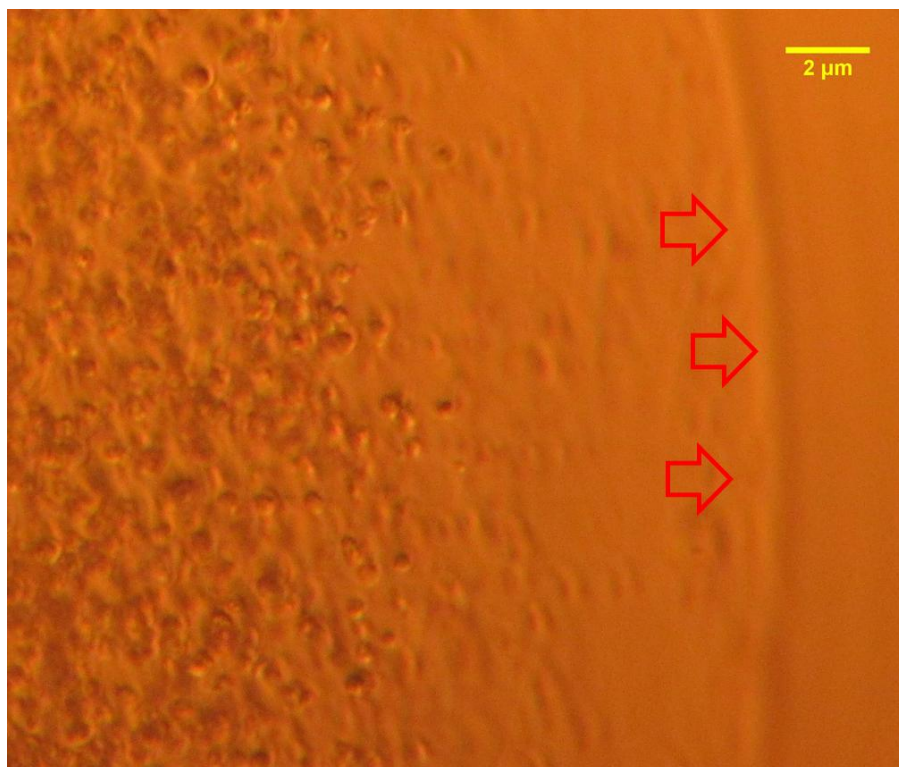
Για την υλοποίηση των συγκεκριμένων πειραμάτων χρησιμοποιήθηκαν μεσεγχυματικά βλαστικά κύτταρα (Mesenchymal Stem Cells-MSCs) προερχόμενα από λιπώδη ιστό ανθρώπου και ενδοθηλιακά κύτταρα (HUVESs) από ομφάλιο λώρο ανθρώπου, σε αναλογία 1:9. Συγκεκριμένα, τα κύτταρα αποκολλήθηκαν από την επιφάνεια των τρυβλίων καλλιέργειας με τη χρήση τρυψίνης και επαναδιαλύθηκαν σε 1,2 % διάλυμα αλγινικού οξέος. Ο σχηματισμός των σφαιριδίων του αλγινικού πηκτώματος πραγματοποιήθηκε, όπως περιγράφηκε και στην προηγούμενη παράγραφο 4.1.1, με τη μέθοδο διάλυσης / διάχυσης (με CaCl₂). Για την ενίσχυση της προσκόλλησης και επιβίωσης των κυττάρων, χρησιμοποιήθηκε και εδώ διάλυμα 0,1 % ζελατίνης στο οποίο διαλύθηκε η σκόνη του αλγινικού. Τα κύτταρα εγκλωβίστηκαν τόσο ως μονήρη στην πολυμερική μήτρα του αλγινικού πηκτώματος, όσο και μέσα σε σφαιροειδή μεθυλοσελλουλόζης που σχηματίστηκαν με τη μέθοδο κρεμάμενης σταγόνας (hanging drop, βλ. παράρτημα). Το κάθε σφαιροειδές μεθυλοσελλουλόζης περιείχε 900 HUVESs

και 100 MSCs. Τα συγκεκριμένα σφαιροειδή των κυττάρων εναποτέθηκαν στο διάλυμα του αλγινικού οξέος για τον περαιτέρω εγκλωβισμό τους σε σφαίρες πολυμερικής μήτρας αλγινικού πηκτώματος. Τα σφαιρίδια του αλγινικού οξέος με τα εγκλωβισμένα κύτταρα τοποθετήθηκαν σε τρυβλία με υπόστρωμα matrigel και θρεπτικό μέσο (EGM2 medium-Lonza) προκειμένου να ελεγχθεί η επιβίωση των κυττάρων και η δυνατότητα ανάπτυξης αγγειακών εκβλαστήσεων. Εναλλακτικά, μονήρη κύτταρα (100.000 κύτταρα ανά σφαίρα αλγινικού με αναλογία HUVECs / MSCs = 9/1) εγκλωβίστηκαν σε σφαιρίδια αλγινικού οξέος.

Η παρατήρηση έγινε με οπτικό μικροσκόπιο. Τυπικές και χαρακτηριστικές εικόνες παρουσιάζονται παρακάτω. Στην Εικόνα 80 διακρίνονται εκβλαστήσεις των κυττάρων από ένα σφαιροειδές μεθυσελλουλόζης εγκλωβισμένο σε σφαιρίδιο του αλγινικού οξέος στο οποίο προστέθηκε διάλυμα EDTA, με σκοπό να γίνει αποσυμπλοκοποίηση του αλγινικού υδροπηκτώματος (βλ. Εικόνα 36 στο κεφάλαιο 3). Στην Εικόνα 81 διακρίνονται τα μονήρη κύτταρα καθώς και τα σαφή όρια του σφαιριδίου του αλγινικού πηκτώματος. Επίσης, η οπτική παρατήρηση έδειξε ότι, στις καλλιέργειες (έως 6 ημέρες) τα κύτταρα ήταν ζωντανά και είχαν πολλαπλασιαστεί, με τάση δημιουργίας αγγειακών δομών.



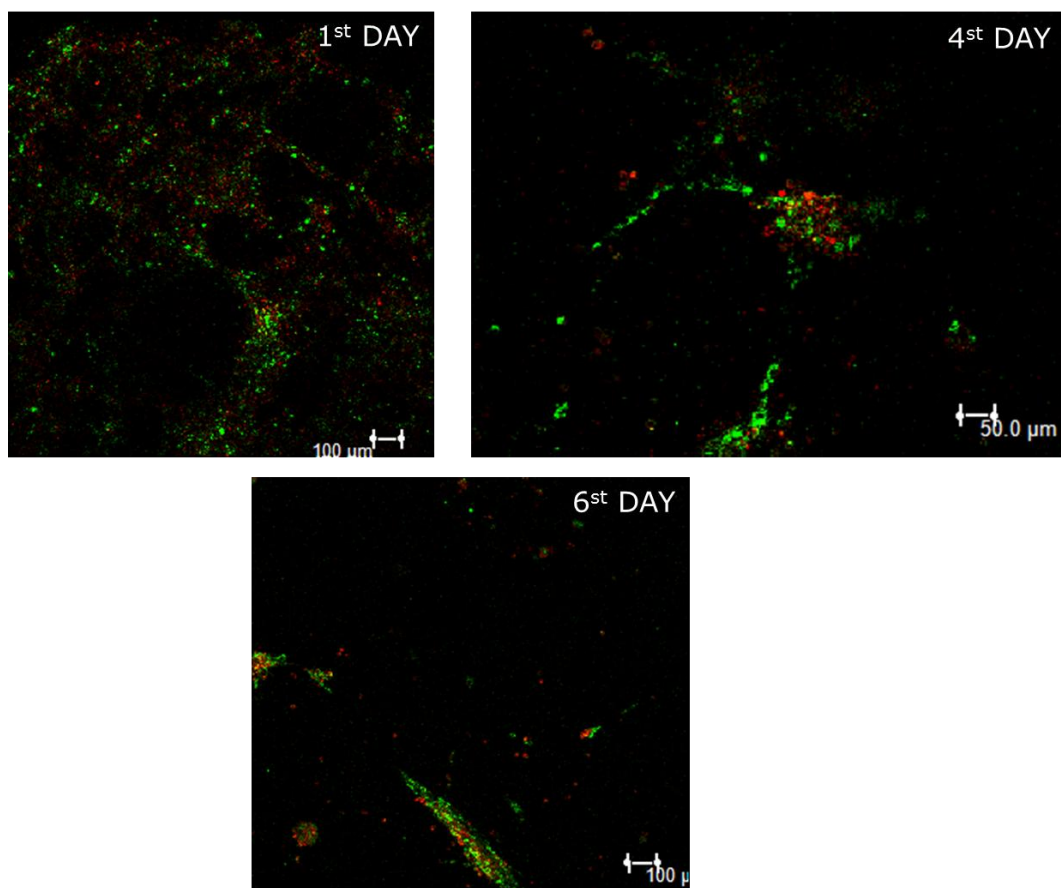
Εικόνα 80. Τυπικές εικόνες από την 3^η και την 6^η ημέρα της κυτταροκαλλιέργειας (σφαιροειδές μεθυσελλουλόζης με την αποικία κυττάρων) εντός του αλγινικού σφαιριδίου, όπως παρατηρήθηκαν από οπτικό μικροσκόπιο.



Εικόνα 81. Τυπική εικόνα με μονήρη κύτταρα εγκλωβισμένα σε σφαιρίδιο αλγινικού οξέος την 4^η ημέρα καλλιέργειας, όπως παρατηρήθηκαν από οπτικό μικροσκόπιο. Διακρίνονται τα σαφή όρια της σφαίρας του αλγινικού πηκτώματος (κόκκινα βέλη) καθώς και τα μονήρη κύτταρα.

1,2 % αλγινικό υδροπήκτωμα – G₄RGDSP

Η πρόσδεση του εννεαπεπτιδίου πεπτιδίου G₄RGDSP στο αλγινικό υδροπήκτωμα έγινε με σκοπό να ενισχυθεί η προσκόλληση των κυττάρων στο υδροπήκτωμα, θεωρώντας ότι αυτό θα έχει θετικό αντίκτυπο στη βιωσιμότητά τους επάνω στο υδροπήκτωμα. Όπως περιγράφηκε αναλυτικά στην ενότητα 3.5.2, το πεπτίδιο συνδέθηκε ομοιοπολικά με το αλγινικό οξύ μέσω υδατικής χημείας καρβοδιιμιδίων με αναλογία 22 μmol G₄RGDSP / 1 g αλγινικό οξύ (51). Με τη μέθοδο διάλυσης/διάχυσης σχηματίστηκε RGD – αλγινικό υδροπήκτωμα, χρησιμοποιώντας υδατικό διάλυμα CaCl₂. Το υδροπήκτωμα τοποθετήθηκε σε ένα φρεάτιο από τρυβλίο των 24 φρεατίων όγκου 10 μl (επιφάνειας 0,125 cm²). Στην επιφάνεια του RGD-αλγινικού πηκτώματος εναποτέθηκαν 25.000 μονήρη κύτταρα σε αναλογία 9 HUVECs : 1 MSCs. Για να είναι δυνατή η διάκριση των κυττάρων, αυτά βάφτηκαν με 2 διαφορετικές χρωστικές. Τα ενδοθηλιακά κύτταρα βάφτηκαν κόκκινα, με το PKH26 Fluorescent Cell Linker Kits (Sigma-Aldrich), και τα μεσεγχυματικά κύτταρα πράσινα, με το PKH67 Fluorescent Cell Linker Kits (Sigma-Aldrich).



Εικόνα 82. Οι κυτταροκαλιέργειες όπως παρατηρήθηκαν από συνεστιακό μικροσκόπιο (LeicaSP5) την 1^η, την 4^η και την 6^η ημέρα.

Τα αποτελέσματα παρουσιάζονται στις χαρακτηριστικές φωτογραφίες της Εικόνα 82, που ελήφθησαν με το συνεστιασκό μικροσκόπιο την 1^η, την 4^η και την 6^η ημέρα. Την 1^η ημέρα της καλλιέργειας των κυττάρων στην επιφάνεια του G₄RGDSP - αλγινικού υδροπηκτώματος, παρατηρήθηκε αυξημένη επιβίωση των κυττάρων καθώς και πιθανή αλληλεπίδραση μεταξύ των δύο τύπων κυττάρων (HUVECs και MSCs). Την 4^η και την 6^η ημέρα, η επιβίωση συνεχίζει να είναι υψηλή και υπάρχουν ενδείξεις ότι τα κύτταρα αρχίζουν να σχηματίζουν διαμορφώσεις που πιθανόν να ομοιάζουν με προοίμια δομών μεταξύ τους. Τα αποτελέσματα αυτά δείχνουν ότι, η βιωσιμότητα των συγκεκριμένων τύπων κυττάρων στο αλγινικό υδροπήκτωμα ενισχύθηκε από την παρουσία του πεπτιδίου. Έτσι, υπό την οπτική της ιστοτεχνολογίας, το νέο αυτό G₄RGDSP -αλγινικό υδροπήκτωμα με εγκλωβισμένα τα κύτταρα HUVECs και MSCs μπορεί να οριστεί ως TEC (Tissue Engineering Construct) ώστε να ελεγχθεί σε *in vivo* πειράματα (ενότητα 4.2).

4.2 *In vivo* έλεγχος βιοϋλικών

Στην ενότητα αυτή παρουσιάζεται η *in vivo* μελέτη που έγινε με την εμφύτευση του βιοϋλικού σε πειραματόζωα. Η πρόληψη της αναδιαμόρφωσης της αριστερής κοιλίας μετά το έμφραγμα του μυοκαρδίου παραμένει ένας σημαντικός θεραπευτικός στόχος και πεδίο έρευνας υψηλής σπουδαιότητας. Στην παρούσα διατριβή, όπως έχει ήδη αναφερθεί εκτενώς σε προηγούμενα κεφάλαια, η πρόληψη αυτή προσεγγίζεται με χρήση βιολογικών ικριωμάτων στην εμφραγματική περιοχή. Ο έλεγχος των βιοϋλικών σε πειραματόζωα είναι ιδιαίτερα σημαντικός για τη βελτίωσή τους, ώστε να προκριθούν μελλοντικά για έλεγχο με κλινικές μελέτες.

Στην παρούσα ενότητα περιγράφεται μια ολοκληρωμένη *in vivo* μελέτη των βιοϋλικών που κατασκευάστηκαν στη διατριβή αυτή, η οποία εκτείνεται από τον έλεγχο απόκρισης των πειραματόζωων στην παρουσία του εμφυτεύματος έως την μελέτη επίδρασης που είχε αυτό στην αναδιαμόρφωση της αριστερής κοιλίας, συμπεριλαμβανομένης και της πιθανής πρόκλησης αρρυθμιών. Ως ικριώματα, μελετήθηκαν το απλό αλγινικό υδροπήκτωμα Ca, το αλγινικό υδροπήκτωμα με προσδεσμένη την αυξητική ορμόνη και τα υδροπηκτώματα που παρασκευάστηκαν με τα κύτταρα CEDPs και HUVECs/MSCs. Πρέπει να σημειωθεί ότι, οι εμφυτεύσεις σε πειραματόζωα θεωρούνται για τη συγκεκριμένη διατριβή ένα από τα πιο βασικά στοιχεία της, διότι τα αποτελέσματα αυτά έδιναν βασικές πληροφορίες για τη βελτιστοποίηση των πειραμάτων σύνθεσης αλλά και της τελικής σύστασης του βιοϋλικού.

Στις επόμενες παραγράφους, γίνεται η περιγραφή του χειρουργείου καθώς και των ιατρικών πρωτοκόλλων που ακολουθήθηκαν. Τα πειράματα αυτά πραγματοποιήθηκαν σε συνεργασία με την Καρδιολογική Κλινική της Ιατρικής Σχολής του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων, υπό την επίβλεψη του Καθηγητή κ. Θεόφιλου Κωλέττη. Όλες οι χειρουργικές επεμβάσεις πραγματοποιήθηκαν στις αίθουσες του Πειραματικού Εργαστηρίου του Ερευνητικού Καρδιαγγειακού Ινστιτούτου, υπό άσηπτες συνθήκες. Ιδιαίτερη έμφαση δόθηκε στη χορήγηση αναισθητικών, στοχεύοντας στην ελάττωση του πόνου και της κακουχίας των πειραματόζωων (πλήρης εφαρμογή της συνθήκης των 3Rs).

Βιοϋλικά που εμφυτεύθηκαν

Τα υλικά που εμφυτεύθηκαν παρουσιάζονται στον Πίνακα 6.

Πίνακας 6. Υλικά που ελέγχθηκαν *in vivo* στα ιατρικά πρωτόκολλα που εφαρμόστηκαν.

Ικρίωμα	GH	CEDPs	HUVECs/ MSCs	<i>In vivo</i>
Biotin – Alginate Hydrogel	-	-	-	A
Alginate Hydrogel	-	-	-	B & Γ
GH-Alginate Hydrogel	√ ^(α)	-	-	B & Γ
GH-Alginate Hydrogel (NHS/EDAC)	√ ^(β)	-	-	Γ
Alginate Hydrogel - Cells	-	√ ^(γ)	-	A
RGD - Alginate Hydrogel - Cells	-	-	√ ^(δ)	Γ

A: Ιστολογική μελέτη, B: LV remodelling (μελέτη αναδιαμόρφωσης αριστερής κοιλίας), Γ: Ηλεκτροφυσιολογική μελέτη (ΗΦΜ), GH: Growth Hormone, CEDPs: Καρδιακά / ενδοθηλιακά προγονικά κύτταρα, HUVECs/MSCs: Ενδοθηλιακά/Μεσεγχυματικά κύτταρα, (α): 5 µg GH / 0,2 ml alginate/επίµυ, (β): 2,5 µg GH / 0,2 ml alginate/επίµυ, (γ): 10⁶ κύτταρα/0,2 ml alginate/επίµυ, (δ): 10⁵ κύτταρα/0,2 ml alginate/επίµυ.

Πειραματόζωα

Χρησιμοποιήθηκαν επίµυες, ως πειραματόζωα, τύπου Wistar, βάρους 250-300 g, και ηλικίας 18-20 εβδομάδων. Όλα τα ζώα έλαβαν κατάλληλη φροντίδα, σύμφωνα με την ευρωπαϊκή νομοθεσία (European Union directive for the protection of animals used for scientific purposes, 2010/63/EU). Τοποθετούνταν 1-2 επίµυες σε κάθε κλωβό σε συνθήκες ελεγχόμενης θερμοκρασίας, υγρασίας και φυσιολογικού κύκλου ημέρας / νύχτας, με ελεύθερη πρόσβαση σε τροφή και νερό.

Στην παρούσα μελέτη χρησιμοποιήθηκε το πειραματικό πρότυπο πρόκλησης εμφράγματος του μυοκαρδίου σε επίµυες (MI Rat Model) (20, 55). Μετά τον αποκλεισμό της στεφανιαίας αρτηρίας, οι επίµυες εμφανίζουν αναδιαμόρφωση της αριστερής κοιλίας και καρδιακή ανεπάρκεια, που ομοιάζουν σημαντικά με αντίστοιχη περίπτωση καρδιακής ανεπάρκειας στον άνθρωπο (132).

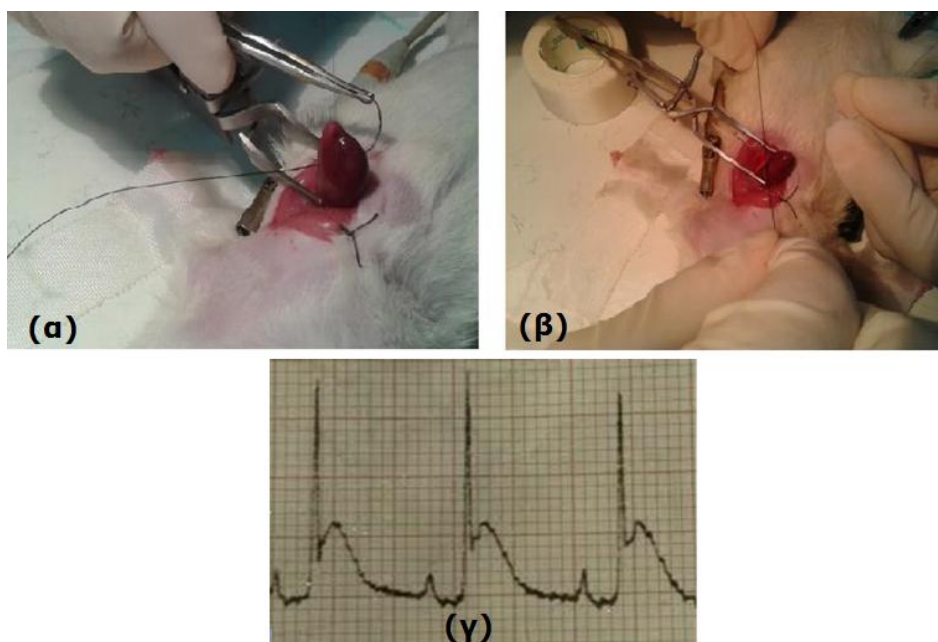
Διασωλήνωση – Έμφραγμα – Εμφύτευση

Οι αρουραίοι διασωληνώθηκαν χρησιμοποιώντας συσκευή για τρωκτικά (model 7025, Ugo Basile, Comerio, VA, Italy), (Εικόνα 83). Υπό άσηπτες συνθήκες, έλαβε χώρα αριστερή θωρακατομή και η καρδιά εξωτερικεύτηκε. Το έμφραγμα του μυοκαρδίου προκλήθηκε με μόνιμη απολίνωση της αριστερής στεφανιαίας αρτηρίας (Εικόνα 84 (α , β)) και η εμφύτευση του

βιοϋλικού πραγματοποιήθηκε 15 λεπτά μετά την πρόκληση του εμφράγματος (Εικόνα 85).



Εικόνα 83. Πειραματόζωο διασωληνωμένο υπό αναισθησία.



Εικόνα 84. (α) Περίδεση, (β) απολίνωση αριστερής στεφανιαίας αρτηρίας, και (γ) απόδειξη πρόκλησης εμφράγματος δια μέσου ηλεκτροκαρδιογραφήματος (ανάσπαση ST).

Η αριστερή στεφανιαία αρτηρία περικυκλώθηκε και απολινώθηκε με 6-0 ράμμα, που επεκτάθηκε από τον πνευμονικό κώνο έως το ωτίο του αριστερού κόλπου (left atrial appendage). Η πρόκληση εμφράγματος γινόταν πάντα κάτω υπό ηλεκτροκαρδιογραφική παρακολούθηση (το πειραματόζωο ήταν συνδεδεμένο σε ειδικό ηλεκτροκαρδιογράφο), (Εικόνα 84 (γ)).

Για το ιατρικό πρωτόκολλο εκτίμησης της επίδρασης του αλγινικού βιοϋλικού σε ισχαιμικό και επαναιματωμένο μυοκάρδιο, αρχικά έλαβε χώρα πρόκληση εμφράγματος με τον τρόπο που προαναφέρθηκε και έπειτα από χρόνο 30 λεπτών πραγματοποιήθηκε επαναιμάτωση της αρτηρίας, με χαλάρωση του ράμματος της περιδέσης.



Εικόνα 85. Ενέσιμη ενδομυοκαρδιακή εμφύτευση βιοϋλικού.

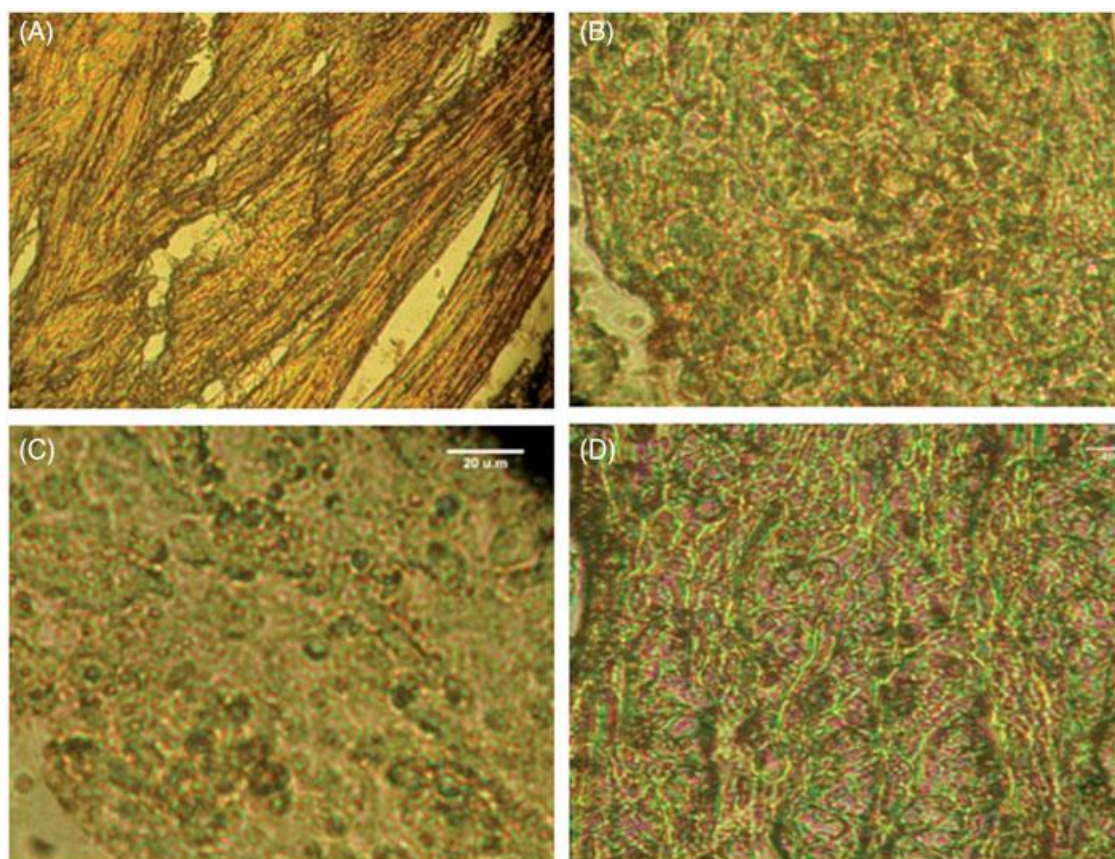
4.2.1 *In vivo* έλεγχος βιοαποικοδόμησης αλγινικού υδροπηκτώματος σε εμφραγματικό μυοκάρδιο

Στο κεφάλαιο 3 μελετήθηκε η χημική αποικοδόμηση του αλγινικού υδροπηκτώματος σε υδατικό διάλυμα φυσιολογικού ορού. Για να επιβεβαιωθεί ότι ο ρυθμός αποικοδόμησης που υπολογίστηκε στα πειράματα εκείνα ανταποκρίνονταν στην πραγματικότητα παρασκευάστηκε αλγινικό υδροπήκτωμα που είχε σημανθεί με βιοτίνη (ενότητα 3.5.1). Το υλικό αυτό εμφυτεύθηκε ενδομυοκαρδιακά (0,2 ml σε κάθε επίμυ) σε συνολικά 8 εμφραγματικούς επίμυες. Επίσης, εμφυτεύθηκε και φυσιολογικός ορός σε ορισμένα (4) πειραματόζωα, ως ομάδα ελέγχου. Την 3^η, 7^η και 15^η ημέρα μετά την εμφύτευση, έγινε ευθανασία των πειραματοζώων και συλλογή της καρδιάς τους, οι οποίες διατηρήθηκαν σε διάλυμα φορμόλης 10%.

Το πρωτόκολλο λήψης τομών της καρδιάς ήταν ως ακολούθως. Το μυοκάρδιο εγκιβωτίστηκε με ειδική ένωση (O.C.T Compound Mounting Medium for Cryotomy) και ακολούθησε κοπή των ιστών σε λεπτές τομές. Στη συνέχεια, οι ιστοί τοποθετήθηκαν σε υγρό άζωτο για 10 με 15 δευτερόλεπτα και μετά τοποθετήθηκαν στους -80°C για 24 ώρες. Η τομή των ιστών έγινε με κρυοτόμο και ελήφθησαν τομές πάχους 5 μm . Οι τομές διατηρήθηκαν στους -80°C.

Τα βήματα που ακολουθήθηκαν για την βαφή των ιστών είναι τα εξής. Αρχικά οι ιστοί αφέθηκαν σε θερμοκρασία περιβάλλοντος για 30 λεπτά και ακολούθησε η σταθεροποίησή τους με ακετόνη στους -20°C για 10 λεπτά. Κάθε ιστός πλύθηκε με TBS (2 ml Tris-HCl, 6 ml NaCl, 92 ml H_2O) για 5 λεπτά. Στη συνέχεια, προστέθηκε streptavidin, και παρέμεινε στις τομές για 30 λεπτά. Ακολουθήθηκε η απομάκρυνσή της με πλύση με TBS. Στη συνέχεια, προστέθηκε στους ιστούς το διάλυμα DAB (1ml DAB buffer + 1 σταγόνα chromogen) και μετά οι ιστοί πλύθηκαν για 5 λεπτά με TBS. Η βαφή των ιστών ολοκληρώθηκε και οι ιστοί παρατηρήθηκαν με οπτικό μικροσκόπιο.

Χαρακτηριστικές εικόνες από τις τομές μετά τη βαφή από μυοκάρδιο μετά από διαφορετικές ημέρες εμφύτευσης παρουσιάζονται στην Εικόνα 86. Οι περιοχές με καφέ χρώμα οφείλονται στην παρουσία ύπαρξης της συζευγμένης ένωσης βιοτίνης – avidin. Παρατηρείται ότι, 3 ημέρες μετά την εμφύτευση, το σύμπλοκο αλγινικό υδροπήκτωμα / βιοτίνη εντοπίζεται σε μεγάλη αφθονία στο μυοκάρδιο (Εικόνα 86 (Α)). Με χρήση ειδικού λογισμικού (Image Analysis) υπολογίστηκε σε $77.8 \pm 4.1\%$. Την 7^η ημέρα το έντονο καφέ χρώμα που υποδηλώνει την ύπαρξη του υδροπηκτώματος, είναι εμφανώς πιο αραιό ($2.0 \pm 0.2\%$) (Εικόνα 86 (Β)). Τη 15^η ημέρα, το υδροπήκτωμα έχει αποικοδομηθεί πλήρως ($0.7 \pm 0.1\%$) (Εικόνα 86 (Γ)). Τα αποτελέσματα αυτά συμφωνούν με τα *in vitro* αποτελέσματα, δηλαδή ότι το αλγινικό υδροπήκτωμα διαλύεται πλήρως σε διάστημα λίγο μεγαλύτερο της μίας εβδομάδας.



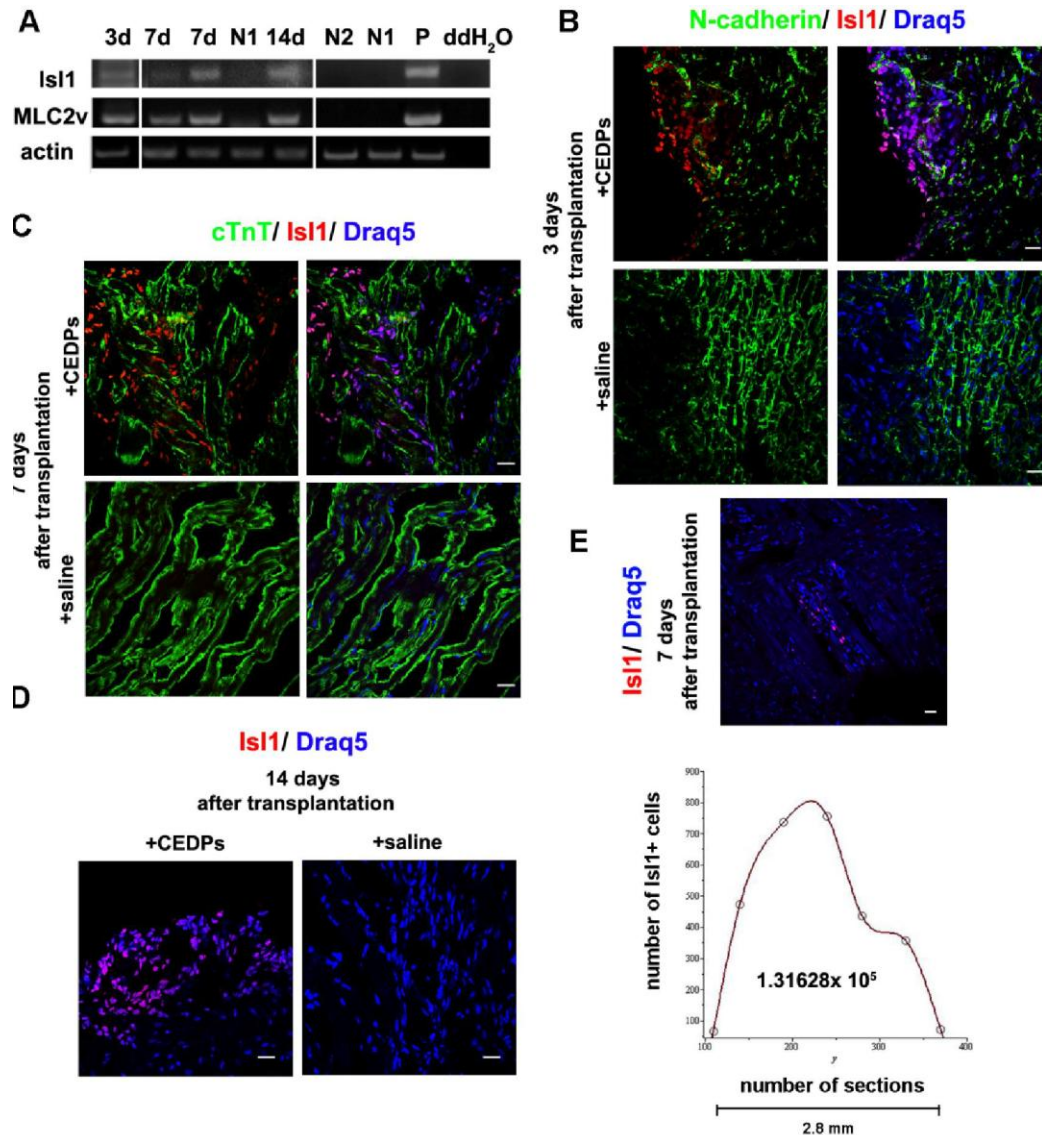
Εικόνα 86. Χαρακτηριστικές εικόνες τομών του μυοκαρδίου (μετά από βαφή με anidrin) για τη μελέτη της *in vivo* αποικοδόμησης του αλγινικού υδροπηκτώματος που είχε σημανθεί με βιοτίνη, μετά από (A) 3, (B) 7 και (C) 15 μέρες από την εμφύτευση, και (D) σύγκριση τομής από ιστό έπειτα από εμφύτευση φυσιολογικού ορού (scale: 20 μ m).

4.2.2 Εμφύτευση αλγινικού υδροπηκτώματος με κύτταρα CEDPs

Ο έλεγχος του αλγινικού υδροπηκτώματος με κύτταρα CEDPs έγινε σε ανοσοκατεσταλμένους υγιείς επίμυες. Συγκεκριμένα, έγινε έγχυση 0,2 ml υποασβεστιωμένου αλγινικού υδροπηκτώματος 1,1% στο οποίο (0,2 ml) υπήρχαν εγκλωβισμένα 10^6 κύτταρα, δηλαδή εμφυτεύθηκαν στο μυοκάρδιο κάθε πειραματοζώων 0,2 ml με 10^6 κύτταρα. Στην ομάδα ελέγχου, στους ανοσοκατεσταλμένους επίμυες απλώς έγινε έγχυση PBS. Οι επίμυες θυσιάστηκαν την 3^η, 7^η και 14^η ημέρα έπειτα από την εμφύτευση και οι καρδιές τους αφαιρέθηκαν για περαιτέρω ανάλυση.

Για τον έλεγχο της *in vivo* διαφοροποίησης, μελετήθηκε η έκφραση του παράγοντα Isl1, ο οποίος γενικά ανιχνεύεται στα CEDPs και όχι στην ενήλικη καρδιά. Σύμφωνα με τα αποτελέσματα, ο μεταγραφικός αυτός παράγοντας ανιχνεύεται έως και τη 14^η ημέρα της *in vivo* μελέτης, επομένως, τα CEDPs επιβιώνουν *in vivo* μετά την εμφύτευση, καθ'όλο αυτό το διάστημα δια μέσου του αλγινικού υδροπηκτώματος και αφού αυτό έχει αποικοδομηθεί. Επίσης, παρατηρήθηκε έκφραση του παράγοντα MLC2V καθ'όλη τη διάρκεια της μελέτης, ο οποίος ανιχνεύεται μόνο κατά τη

διαφοροποίηση των CEDPs και εκφράζεται επίσης στα ενήλικα ζώα. Στην Εικόνα 87 παρουσιάζονται τα πειραματικά αποτελέσματα της διαφοροποίησης των CEDPs έπειτα από την εμφύτευση αλγινικού υδροπηκτώματος με τα κύτταρα (129).



Εικόνα 87. Διαφοροποίηση των CEDPs έπειτα από εμφύτευση αλγινικού υδροπηκτώματος με τα κύτταρα (131).

4.2.3 Έλεγχος επίδρασης του αλγινικού υδροπηκτώματος με GH στην αναδιαμόρφωση της αριστερής κοιλίας

Για τον *in vivo* έλεγχο της επίδρασης του αλγινικού υδροπηκτώματος με αυξητική ορμόνη (GH) στην αναδιαμόρφωση της αριστερής κοιλίας χρησιμοποιήθηκαν συνολικά 42 επίμυες. Από αυτούς, στους 36 προκλήθηκε έμφραγμα του μυοκαρδίου, ενώ οι υπόλοιποι 6 χρησιμοποιήθηκαν ως ομάδα εικονικής επέμβασης. Στον Πίνακα 7 παρουσιάζονται οι ομάδες μελέτης.

Πίνακας 7. Ομάδες μελέτης στο ιατρικό πρωτόκολλο αναδιαμόρφωσης της αριστερής κοιλίας.

Ομάδα	Έμφραγμα	Αλγινικό υδροπήκτωμα Ca 1%	Αλγινικό υδροπήκτωμα Ca 1%+GH	η
Ελέγχου*	✓	-	-	6
Εικονικής επέμβασης	-	-	-	12
Alginate	✓	✓		12
Alginate +GH	✓		✓	12

*: Έγχυση φυσιολογικού ορού.

Εμφυτεύθηκε το αλγινικό υδροπήκτωμα Ca 1%, το οποίο συντέθηκε με τη μέθοδο διάλυσης / διάχυσης (βλ. Κεφ. 3 και Πίνακας 2). Για την ομάδα μελέτης Alginate+GH, η GH ήταν «εγκλωβισμένη» στο αλγινικό υδροπήκτωμα (βλ. ενότητα 3.6.1) με αναλογία 5 μ g GH / 0.2 ml αλγινικό υδροπήκτωμα (Πίνακας 6). Στις 3 εβδομάδες μελέτης έπειτα από τη θεραπεία, στα πειραματόζωα πραγματοποιήθηκε ηχοκαρδιογραφική αξιολόγηση της αναδιαμόρφωσης και της λειτουργίας της αριστερής κοιλίας. Στη συνέχεια, στους επίμυες έγινε, υπό αναισθησία, ευθανασία με ενέσιμη χορήγηση KCl. Στη συνέχεια, γινόνταν συλλογή των ιστών της καρδιάς για περαιτέρω ιστολογική μελέτη. Η ιστολογική μελέτη περιελάμβανε έλεγχο της αγγειακής πυκνότητας στην εμφραγματική περιοχή, της φλεγμονώδους αντίδρασης ξένου σώματος και της μυοϊνοβλαστικής αντίδρασης. Επίσης, έγινε και μελέτη της αναδιαμόρφωσης της αριστερής κοιλίας (91, 132).

Ιστολογικές μετρήσεις αναδιαμόρφωσης της αριστερής κοιλίας

Η ιστολογική μελέτη έδειξε ότι, στην εμφραγματική και περι-εμφραγματική περιοχή το κολλαγόνο ήταν παρόμοιο σε όλες τις ομάδες μελέτης. Όμως, το πάχος της εμφραγματικής περιοχής ήταν μεγαλύτερο στα πειραματόζωα στην ομάδα Alginate+GH, συγκρίνοντάς το με τα πειραματόζωα της ομάδας

ελέγχου και της ομάδας Alginate, όπως φαίνεται στις χαρακτηριστικές τομές της καρδιάς που παρουσιάζονται στην Εικόνα 88.



Εικόνα 88. Πάχος εμφραγματικής περιοχής, όπως φαίνεται στις τομές της καρδιάς, έπειτα από χρώση με Heidenhain's AZAN-trichrome, για τις 3 ομάδες μελέτης του Πίνακα 7.

Υπερηχοκαρδιογραφικά ευρήματα

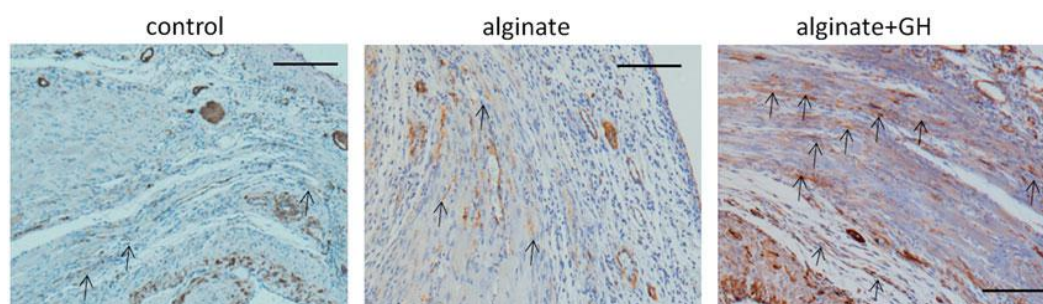
Η παρουσίαση των υπερηχογραφημάτων και η ανάλυσή τους παρατίθενται στο Παράρτημα. Σύμφωνα με τα πειραματικά αυτά αποτελέσματα, συνάγεται ότι, το πάχος της εμφραγματικής ουλής ήταν μεγαλύτερο στην ομάδα Alginate+GH, συγκριτικά με την ομάδα Alginate. Αυτό αποτελεί ένδειξη της θετικής επίδρασης του συνδυασμού του αλγινικού υδροπηκτώματος μαζί με τη GH στη συγκεκριμένη θεραπεία. Τα αποτελέσματα αυτά συμφωνούν με αποτελέσματα προηγούμενων μελετών από άλλες ερευνητικές ομάδες, τα οποία έδειξαν ότι, η εμφύτευση αλγινικού υδροπηκτώματος με εγκλωβισμένο τον αυξητικό παράγοντα IGF-1 είχε ευεργετικά αποτελέσματα ως προς την έκταση του εμφράγματος, κάτι που αποδόθηκε στη μείωση της απόπτωσης και στην αυξημένη συγκέντρωση των βλαστικών κυττάρων στην περι-εμφραγματική ζώνη (133).

Οι θετικές μορφολογικές αλλαγές στην εμφραγματική περιοχή, που παρατηρήθηκαν και στην παρούσα εργασία, βελτιώνουν την αρχιτεκτονική της αριστερής κοιλίας, λόγω της μειωμένης τοιχωματικής τάσης. Η τοιχωματική τάση σχετίζεται άμεσα με την αναδιαμόρφωση της αριστερής κοιλίας. Συνεπώς, ο βελτιωμένος δείκτης τοιχωματικής τάσης που βρέθηκε στην παρούσα μελέτη 3 εβδομάδες μετά το έμφραγμα και αφού χορηγήθηκε αλγινικό υδροπήκτωμα ασβεστίου με GH, δεικνύει τη θετική επίδραση που είχε το ικρίωμα αυτό στη διαμόρφωση του σχήματος και της λειτουργίας της αριστερής κοιλίας.

Φλεγμονώδης αντίδραση ξένου σώματος και μνοϊνοβλαστική αντίδραση

Σύμφωνα με τα πειραματικά αποτελέσματα, σε όλες τις ομάδες μελέτης παρατηρήθηκε χαμηλού βαθμού φλεγμονώδης αντίδραση. Στην Εικόνα 89

φαίνονται χαρακτηριστικές εικόνες της μυοϊνοβλαστικής αντίδρασης μετά από χρώση με α-ακτίνη για τις 3 ομάδες μελέτης. Η παρουσία των μυοϊνοβλαστών στην εμφραγματική περιοχή βρέθηκε αυξημένη στην ομάδα Alginate+GH. Αυτό το εύρημα βρίσκεται σε συμφωνία με προηγούμενες *in vitro* μελέτες από άλλες ερευνητικές ομάδες, οι οποίες επίσης παρατήρησαν αύξηση και εξαπλωση των μυοϊνοβλαστών, έπειτα από χορήγηση της GH (134). Στην παρούσα εργασία, η αύξηση των μυοϊνοβλαστών μετά την εμφύτευση Alginate+GH δεν συνοδεύτηκε από αυξημένο ποσοστό κολλαγόνου. Αυτό το εύρημα είναι ιδιαίτερα σημαντικό και ενθαρρυντικό, διότι η αυξημένη ίνωση επηρεάζει τη χαλάρωση της αριστερής κοιλίας και ενισχύει την αρρυθμιογένεση (135).



Εικόνα 89. Χαρακτηριστικές εικόνες μυοϊνοβλαστικής αντίδρασης (*myofibroblast activation*), έπειτα από χρώση με α-ακτίνη, για τις 3 ομάδες μελέτης του Πίνακα 7. (Η γραμμή της κλίμακας είναι 50 μ m).

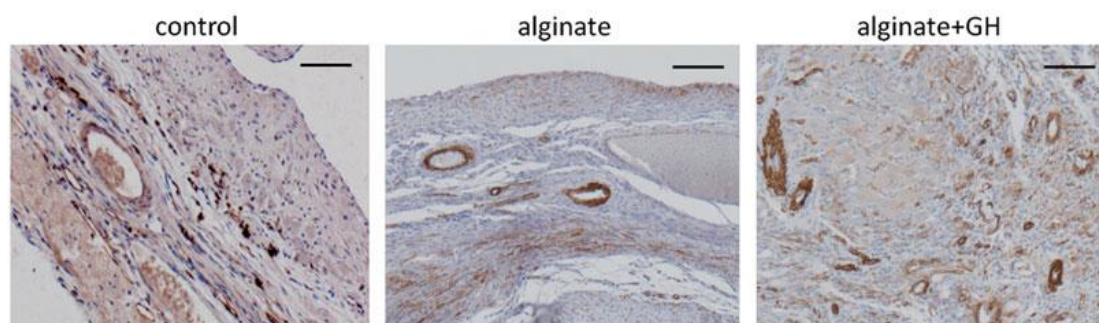
Αξίζει, επίσης, να σημειωθεί ότι, προηγούμενες *in vivo* και *in vitro* μελέτες με αλγινικό υδροπρήκτωμα έχουν δείξει ότι λαμβάνει χώρα πρώιμη ενεργοποίηση των μακροφάγων, η οποία ακολουθείται από άμεση και γρήγορη μείωσή τους. Αυτό το πρότυπο φλεγμονώδους αντίδρασης θεωρείται ευεργετικό μετά την εμφύτευση ενός βιοϋλικού, διότι προάγει την επούλωση και την αναγέννηση του ιστού (132).

Αγγειογένεση

Η αγγειογενετική δράση της GH έχει μελετηθεί και επιβεβαιωθεί σε πειράματα χορήγησής της σε εμφραγματικό μυοκάρδιο πειραματόζωνων. Στην εμφραγματική περιοχή, η γένεση νέων αγγείων αίματος είναι σημαντική, διότι διευκολύνει την αιμάτωση στην πάσχουσα περιοχή και ενισχύει τη διαδικασία επούλωσης.

Στην Εικόνα 90 φαίνονται χαρακτηριστικές εικόνες της αγγειογένεσης στην περι-εμφραγματική περιοχή για τις 3 ομάδες μελέτης. Παρατηρήθηκε ότι, η μικροαγγειακή πυκνότητα στην εμφραγματική περιοχή ήταν μεγαλύτερη στα πειραματόζωα της ομάδας Alginate+GH ($6,93 \pm 0,55\%$), σε σύγκριση με τα πειραματόζωα της ομάδας ελέγχου ($3,61 \pm 0,44\%$) και της ομάδας Alginate ($3,76 \pm 0,44\%$). Τα αποτελέσματα αυτά δείχνουν ότι, η εμφύτευση αλγινικού υδροπρήκτματος Ca με «εγκλωβισμένη» την αυξητική ορμόνη προκαλεί ενίσχυση της αγγειογένεσης, παρέχοντας, έτσι,

μια ακόμη απόδειξη ώστε να υποστηριχθεί η χρήση του συγκεκριμένου ικριώματος στη θεραπεία για τη βελτίωση της μορφολογίας της εμφραγματικής αριστερής κοιλίας.



Εικόνα 90. Χαρακτηριστικές εικόνες της αγγειογένεσης στην περι-εμφραγματική περιοχή για τις 3 ομάδες μελέτης του Πίνακα 7. (Η γραμμή της κλίμακας είναι 50 μm).

4.2.4 Έλεγχος επίδρασης του αλγινικού υδροπηκτώματος, χωρίς και με GH, στις κοιλιακές αρρυθμίες έπειτα από πρόκληση ισχαιμίας – επαναιμάτωσης στην οξεία φάση

Για τον έλεγχο της επίδρασης του αλγινικού υδροπηκτώματος, με και χωρίς αυξητική ορμόνη (GH), στις κοιλιακές αρρυθμίες έπειτα από πρόκληση ισχαιμίας και επαναιμάτωσης στην οξεία φάση χρησιμοποιήθηκαν 36 επίμυες. Οι ομάδες μελέτης παρουσιάζονται στον Πίνακα 8.

Πίνακας 8. Ομάδες μελέτης στο ιατρικό πρωτόκολλο επίδρασης του αλγινικού υδροπηκτώματος, χωρίς και με GH, στις κοιλιακές αρρυθμίες έπειτα από πρόκληση ισχαιμίας – επαναιμάτωσης στην οξεία φάση.

Ομάδα	Έμφραγμα	Επαναιμάτωση	Αλγινικό υδροπήκτωμα Ca 1%	Αλγινικό υδροπήκτωμα Ca 1%+GH	η
Ελέγχου*	✓	✓	-	-	12
Alginate	✓	✓	✓		12
Alginate +GH	✓	✓		✓	12

*: Έγχυση φυσιολογικού ορού.

Στα πειράματα αυτά, εμφυτεύθηκε υποασβεστωμένο αλγινικό υδροπήκτωμα Ca 1%, (1,39 mM CaCl_2 , δηλαδή περιείχε το 1/3 της συγκέντρωσης των ιόντων Ca^{2+} η οποία απαιτείται για να αποκτήσει το υδροπήκτωμα μέγιστο ιξώδες, Εικόνα 37, ενότητα 3.2.4). Για την ομάδα μελέτης Alginate+GH, η GH ήταν «εγκλωβισμένη» στο αλγινικό υδροπήκτωμα (βλ. ενότητα 3.6.1) με αναλογία 2,5 μg GH / 0.2 ml αλγινικό υδροπήκτωμα (Πίνακας 6).

Το βιοϋλικό εμφυτεύθηκε έπειτα από πρόκληση ισχαιμίας και επαναιμάτωσης στα πειραματόζωα. Για τον έλεγχο και την ανάλυση των κοιλιακών αρρυθμιών (VTs) κατά την οξεία φάση πραγματοποιήθηκε εμφύτευση στην κοιλιακή χώρα πομπού τηλεμετρίας για την καταγραφή του ηλεκτροκαρδιογραφήματος καθ'όλο το εικοσιτετράωρο. Επίσης, η μελέτη στην οξεία φάση περιελάμβανε ανάλυση της δραστηριότητας του συμπαθητικού νευρικού συστήματος και καταγραφή του δυναμικού δράσης (MAP) με χρήση καθετήρα.

Η ενδο-μυοκαρδιακή έγχυση μη αγωγίμων βιοϋλικών, όπως στη συγκεκριμένη εργασία είναι το αλγινικό υδροπήκτωμα, σε εμφραγματικό μυοκάρδιο αναμένεται να μεταβάλλει τις τοπικές ιδιότητες της αγωγιμότητας, και αυτό είναι πιθανόν να συμβάλει αρνητικά στην αρρυθμιογένεση. Όμως, τα πειραματικά αποτελέσματα στην παρούσα εργασία, τα οποία παρουσιάζονται στο Παράρτημα, έδειξαν, αντίθετα με την παραπάνω πρόβλεψη ότι, η συχνότητα εμφάνισης VTs (κοιλιακών ταχυκαρδιών) είναι συγκρίσιμη μεταξύ της ομάδας Alginate και της ομάδας ελέγχου.

Η μελέτη αυτή είχε ουσιαστικά ως στόχο τη διερεύνηση της επίδρασης της τοπικής χορήγησης GH, μέσω του αλγινικού υδροπηκτώματος Ca, στην αρρυθμιογένεση κατά τη διάρκεια των πρώτων 24 ωρών. Σύμφωνα με τα πειραματικά αποτελέσματα, που παρουσιάζονται στο Παράρτημα, στα πειραματόζωα της ομάδας Alginate+GH καταγράφηκε μειωμένη συχνότητα εμφάνισης VTs κατά τη διάρκεια της περιόδου των πρώτων 24 ωρών έπειτα από την ισχαιμία και την επαναιμάτωση. Επίσης, η μέση διάρκεια κάθε επεισοδίου ήταν αμετάβλητη. Συμπερασματικά, τα αποτελέσματα και από αυτά τα πειράματα αποδεικνύουν την ευεργετική επίδραση του συνδυασμού του αλγινικού υδροπηκτώματος Ca με την GH στη θεραπεία του εμφραγματικού μυοκαρδίου (136, 137).

4.2.5 Έλεγχος επίδρασης του αλγινικού υδροπηκτώματος, χωρίς και με GH, στις κοιλιακές αρρυθμίες έπειτα από οξύ έμφραγμα στη χρόνια φάση

Σε σχέση με τα προηγούμενα πειράματα, στα πειράματα του ελέγχου της επίδρασης του αλγινικού υδροπηκτώματος, χωρίς και με GH, στις κοιλιακές αρρυθμίες έπειτα από οξύ έμφραγμα στη χρόνια φάση, που περιγράφονται στην ενότητα αυτή, στο αλγινικό υπόστρωμα (το οποίο δεν περιείχε καθόλου ιόντα Ca^{2+}) η αυξητική ορμόνη (GH) ήταν προσδεσμένη ομοιοπολικά, όπως περιγράφηκε στην ενότητα 3.5.3. Το βιοϋλικό αυτό αναμενόταν, αφενός να σχηματίσει *in situ*, αμέσως μετά την εμφύτευσή του, αλγινικό υδροπήκτωμα Ca, προσλαμβάνοντας για τη ζελατινοποίησή του ιόντα Ca^{2+} από το αίμα, αφετέρου η αυξητική ορμόνη να απελευθερωθεί σταδιακά ακολουθώντας την αργή κινητική της αποικοδόμησης του αλγινικού υδροπηκτώματος, όπως μετρήθηκε *in vitro* στην ενότητα 3.6.3 (Εικόνα 76) και *in vivo* στην ενότητα 4.2.1 (Εικόνα 86). Στα πειράματα αυτά χρησιμοποιήθηκαν 33 επίμυες. Οι ομάδες μελέτης παρουσιάζονται στον Πίνακα 9.

Πίνακας 9. Ομάδες μελέτης στο ιατρικό πρωτόκολλο επίδρασης του αλγινικού υδροπηκτώματος, χωρίς και με GH, στις κοιλιακές αρρυθμίες έπειτα από οξύ έμφραγμα στη χρόνια φάση.

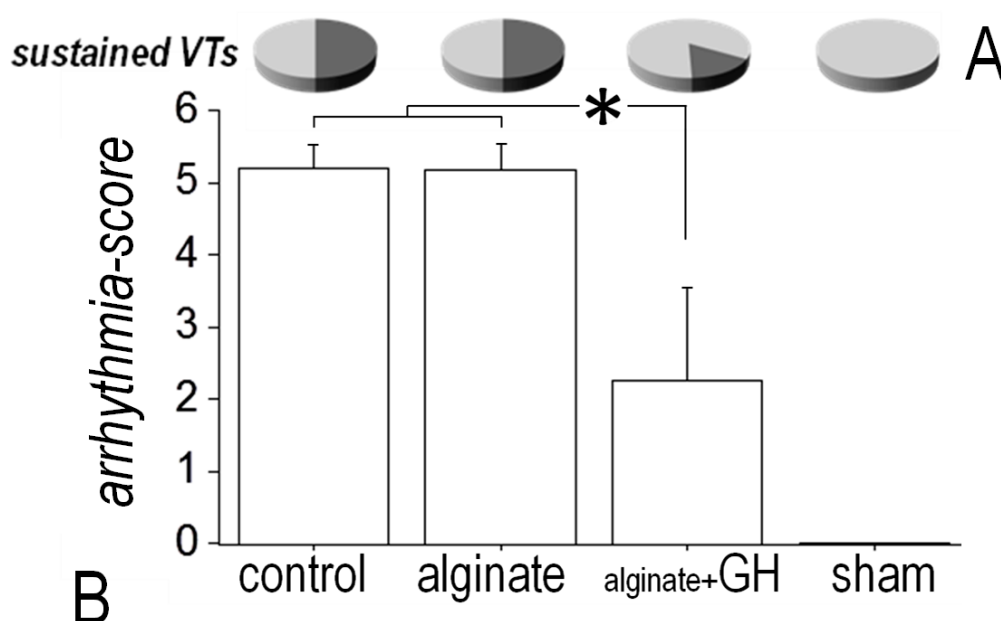
Ομάδα	Έμφραγμα	Αλγινικό υδροπήκτωμα Ca 1,2%	Αλγινικό υδροπήκτωμα Ca 1,2%+GH	η
Ελέγχου*	✓	-	-	9
Εικονικής επέμβασης	-	-	-	6
Alginate	✓	✓		9
Alginate +GH	✓		✓	9

*: Έγχυση φυσιολογικού ορού.

Μετά την πρόκληση του εμφράγματος και την εμφύτευση του βιοϋλικού, η εκτίμηση της ηλεκτροφυσιολογικής αναδιαμόρφωσης πραγματοποιήθηκε μετά από 14 ημέρες. Συγκεκριμένα, εξετάστηκε η πρόκληση κοιλιακών ταχυκαρδιών (VTs) μετά από προγραμματισμένη ηλεκτρική διέγερση (PES), η καταγραφή των μονοφασικών δυναμικών (MAPs) και η τοπική αγωγιμότητα και επαναπόλωση (137, 138).

Σύμφωνα με τα αποτελέσματα από την προγραμματισμένη ηλεκτρική διέγερση (PES), τα οποία παρουσιάζονται στην Εικόνα 91, η πρόκληση VTs καθώς και ο συνολικός αριθμός των αρρυθμιών ήταν χαμηλότεροι στα

πειραματόζωα της ομάδας Alginate+GH, σε σύγκριση με τα πειραματόζωα των ομάδων Alginate και της ομάδας ελέγχου. Γενικά, από τη συνολική αποτίμηση και αξιολόγηση όλων των πειραματικών ευρημάτων που προέκυψαν από τα πειράματα που έγιναν στα πλαίσια της έρευνας που παρουσιάζεται στην ενότητα αυτή (παρούσα εργασία και (137, 138)), συνάγεται ότι, καταγράφηκε χαμηλή αρρυθμιογένεση κατά τη σταδιακή χορήγηση της GH. Αυτό θεωρείται ότι είναι άμεση απόρροια της ταυτόχρονης βελτίωσης των δομικών και των ηλεκτρικών δεικτών έπειτα από την εμφύτευση του υποασβεστιωμένου αλγινικού υδροπηκτώματος Ca στο οποίο ήταν ομοιοπολικά συνδεδεμένη η GH στο εμφραγματικό μυοκάρδιο.



Εικόνα 91. Πειραματικά αποτελέσματα καταγραφής αρρυθμιών για τις ομάδες μελέτης του Πίνακας 9.

4.2.6 Έλεγχος επίδρασης του TEC (αλγινικό- G_4 RGDSP-HUVECs/MSCs) στις κοιλιακές αρρυθμίες έπειτα από οξύ έμφραγμα, στη χρόνια φάση

Τα πειραματικά αποτελέσματα που παρουσιάστηκαν στις προηγούμενες ενότητες απέδειξαν τον ευεργετικό ρόλο της χορήγησης της αυξητικής ορμόνης, μέσω του αλγινικού υδροπηκτώματος του Ca, στην αναδιαμόρφωση της αριστερής κοιλίας. Έτσι, στην ενότητα αυτή μελετήθηκε η επίδραση του TEC (αλγινικό- G_4 RGDSP -HUVECs/MSCs) στις κοιλιακές αρρυθμίες έπειτα από οξύ έμφραγμα, στη χρόνια φάση. Η παρασκευή του TEC (tissue engineering construct) παρουσιάστηκε στην ενότητα 3.5.2 (για το G_4 RGDSP - αλγινικό υδροπήκτωμα) και στην ενότητα 4.1.2 (για την καλλιέργεια των κυττάρων στο G_4 RGDSP - αλγινικό υδροπήκτωμα). Για τα πειράματα αυτά χρησιμοποιήθηκαν 27 επίμυες. Οι ομάδες μελέτης παρουσιάζονται στον Πίνακα 10.

Πίνακας 10. Ομάδες μελέτης στο ιατρικό πρωτόκολλο επίδρασης του TEC στις κοιλιακές αρρυθμίες έπειτα από οξύ έμφραγμα στη χρόνια φάση.

Ομάδα	Έμφραγμα	TEC	η
Ελέγχου*	✓	-	15
Εικονικής επέμβασης	-	-	6
TEC	✓	✓	15

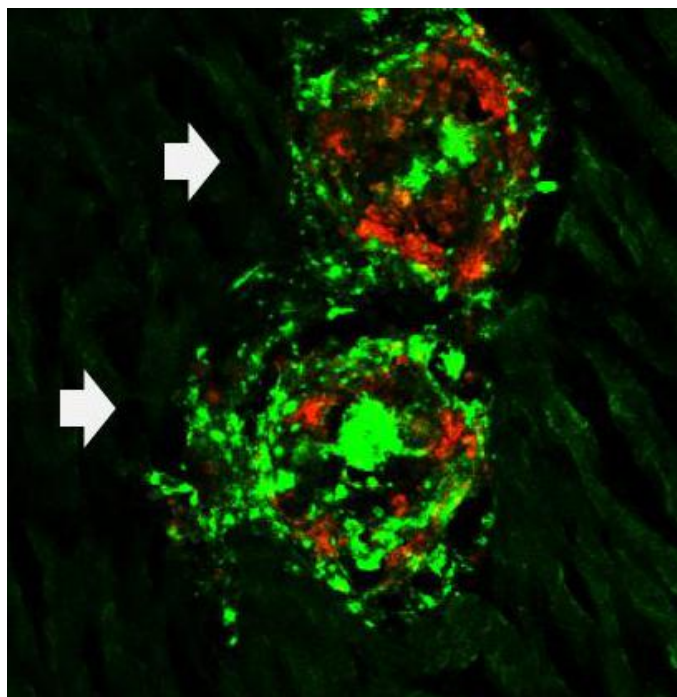
*: Έγχυση φυσιολογικού ορού.

Το αλγινικό υπόστρωμα του TEC δεν περιείχε καθόλου ιόντα Ca^{2+} , με σκοπό αυτά να τα πάρει αμέσως, κατά την εμφύτευσή του, από το αίμα και να σχηματιστεί *in situ* το υδροπήκτωμα. Επίσης, με αυτόν τον τρόπο προλαμβάνεται η περίπτωση υπερφόρτωσης της περιοχής της εμφύτευσης με ιόντα Ca^{2+} , η οποία μπορεί να έχει ως συνέπεια την πιθανή απόπτωση των κυττάρων, καθώς και την αλλαγή της ηλεκτρικής δραστηριότητας της καρδιάς. Όπως αναφέρθηκε και στην ενότητα 4.1.2, σε κάθε πειραματόζωο εμφυτεύτηκαν 0.2 ml G_4 RGDSP-αλγινικό ικρίωμα με εγκλωβισμένα 100 σφαιροειδή μεθυσελλουλόζης των 1000 κυττάρων το καθένα, με αναλογία HUVECs/MSCs : 9/1. Σε κάθε πειραματόζωο χορηγούνταν καθημερινώς χαμηλή δόση κυκλοσπορίνης (2.5 mg/Kg/ημέρα).

Σε όλες τις ομάδες μελέτης έγινε αξιολόγηση του μονοφασικού δυναμικού ενέργειας με χρήση ειδικού καθετήρα MAP (model 200, EP Technologies, EPT, Boston Scientific Corporation, Marlborough, MA, USA), ο οποίος εφαρμόστηκε στο επικάρδιο της ισχαιμικής περιοχής της αριστερής κοιλίας. Επίσης, έλαβε χώρα χαρτογράφηση με συστοιχία πολλαπλών ηλεκτροδίων. Η συστοιχία των ηλεκτροδίων τοποθετήθηκε στο πρόσθιο τοίχωμα του επικαρδίου της αριστερής κοιλίας. Για την ολοκλήρωση της

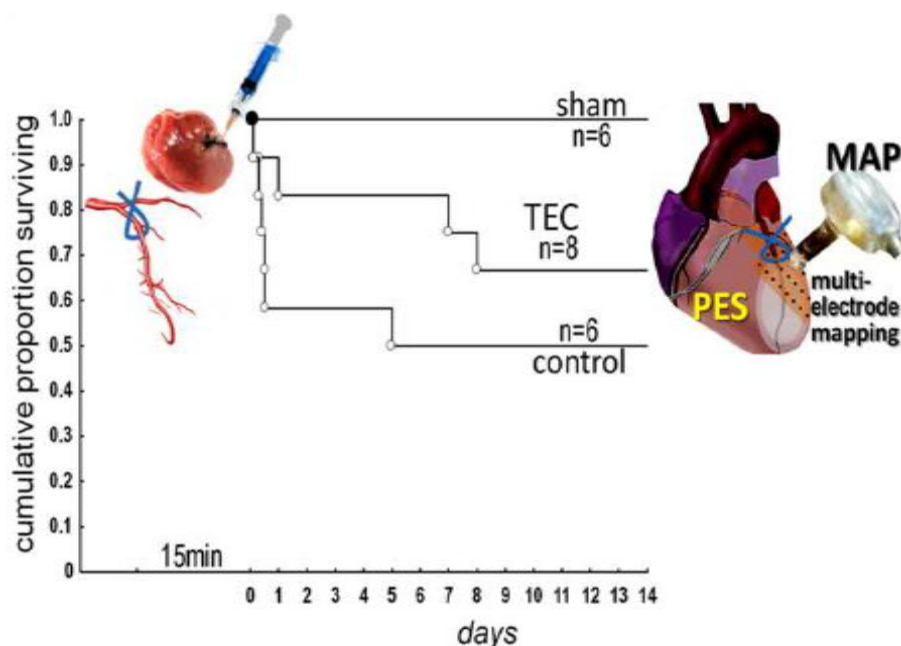
μελέτης πραγματοποιήθηκε προγραμματισμένη ηλεκτρική διέγερση (PES) της καρδιάς με τη χρήση ειδικής συσκευής και ενός διπολικού ηλεκτροδίου, το οποίο τοποθετήθηκε στην κοιλία.

Πρώτα απ'όλα, έγινε έλεγχος της δομικής ακεραιότητας των σφαιριδίων του TEC που χορηγήθηκε, ενέσιμα, στο μυοκάρδιο. Για το λόγο αυτό, συλλέχθηκαν καρδιές μετά από 1 ημέρα εμφύτευση και παρατηρήθηκαν σε συνεστιακό μικροσκόπιο. Στην Εικόνα 92 παρουσιάζεται μια χαρακτηριστική εικόνα από την εμφύτευση του TEC εντός του μυοκαρδιακού ιστού (η βαφή των κυττάρων είχε γίνει πριν την εμφύτευσή τους). Παρατηρείται ότι, η εμφύτευση του TEC στο μυοκαρδιακό ιστό ήταν επιτυχής, δηλαδή τα σφαιρίδια των κυττάρων φαίνονται ακέραια, χωρίς να έχουν επηρεαστεί από τις διατμητικές δυνάμεις κατά το πέρασμά τους από τη βελόνα μεγέθους 27 G.



Εικόνα 92. Χαρακτηριστικές εικόνες, που ελήφθησαν από συνεστιακό μικροσκόπιο, σφαιροειδών διαμορφώσεων των κυττάρων HUVECs και MSCs, μετά από 1 ημέρα στο μυοκάρδιο. Τα κύτταρα βρίσκονταν στο TEC και χορηγήθηκαν ενέσιμα στο μυοκάρδιο.

Μετά από την ολοκλήρωση δύο εβδομάδων, παρέμειναν ζωντανά 20 πειραματόζωα, και από τις τρεις ομάδες μελέτης. Στην Εικόνα 93 παρουσιάζεται το πρωτόκολλο ηλεκτροφυσιολογικής αξιολόγησης της μελέτης και οι καμπύλες επιβίωσης Kaplan-Mieler. Παρατηρείται ότι, η εμφύτευση του TEC αύξησε το ποσοστό επιβίωσης (χωρίς στατιστικά σημαντική διαφορά).



Εικόνα 93. Πρωτόκολλο ηλεκτροφυσιολογικής αξιολόγησης και καμπύλες επιβίωσης Kaplan-Mieler.

Παρόμοια αποτελέσματα ελήφθησαν και από τα πειράματα με την προγραμματισμένη ηλεκτρική διέγερση (PES) και την πρόκληση κοιλιακών αρρυθμιών (VTs), την καταγραφή της καθυστέρησης της αγωγιμότητας (conduction delay), και τις καταγραφές MAP, π.χ. την αύξηση του δυναμικού και του καρδιακού ρυθμού (τα αποτελέσματα αυτά παρουσιάζονται στο Παράρτημα). Δηλαδή, οι τιμές από τις μετρήσεις στα πειραματόζωα της ομάδας TEC βρίσκονταν ανάμεσα στις τιμές από τις αντίστοιχες ομάδες των πειραματοζώων εικονικής επέμβασης και ελέγχου (η στατιστική ανάλυση, δηλαδή εάν οι διαφορές των τιμών μεταξύ των διαφορετικών ομάδων μελέτης είναι στατιστικά σημαντικές, παρουσιάζεται επίσης στο Παράρτημα).

Συμπερασματικά, τα αποτελέσματα των πειραμάτων που διεξήχθησαν στην παρούσα ενότητα έδειξαν ότι, μετά το πέρας των δύο εβδομάδων από την εμφύτευση του TEC, η πιθανότητα πρόκλησης αρρυθμιών στη χρόνια φάση είναι χαμηλή. Συνεπώς, τόσο το G₄RGDSP - αλγινικό υδροπλέκτωμα Ca όσο και οι συγκεκριμένοι τύποι κυττάρων HUVECs και MSCs είναι ασφαλή και προκρίνονται για τη θεραπεία της αναδιαμόρφωσης της αριστερής κοιλίας μετά το οξύ έμφραγμα και έτσι μπορούν να χρησιμοποιηθούν για τη περαιτέρω συνέχιση της έρευνας αυτής.

**ΚΕΦΑΛΑΙΟ 5: ΓΕΝΙΚΗ
ΣΥΖΗΤΗΣΗ,
ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ &
ΠΡΟΤΑΣΕΙΣ ΓΙΑ
ΜΕΛΛΟΝΤΙΚΗ ΕΡΕΥΝΑ**

5. ΓΕΝΙΚΗ ΣΥΖΗΤΗΣΗ, ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ & ΠΡΟΤΑΣΕΙΣ ΓΙΑ ΜΕΛΛΟΝΤΙΚΗ ΕΡΕΥΝΑ

Γενική συζήτηση και συμπεράσματα

Το οξύ έμφραγμα του μυοκαρδίου αποτελεί στις δυτικές κοινωνίες μείζονα αιτία θνησιμότητας (κάθε χρόνο, στην Ελλάδα καταγράφονται 20.000 νέα περιστατικά οξέος εμφράγματος του μυοκαρδίου), και για το λόγο αυτό απαιτεί άμεση και αποτελεσματική θεραπεία. Πρέπει να σημειωθεί ότι, πέραν από το ποσοστό θνησιμότητας (που αγγίζει περίπου το 10%) κατά τη διάρκεια του πρώτου εξαμήνου, περισσότερο από το ένα τρίτο των ασθενών που επιβιώνουν μετά την οξεία φάση θα εμφανίσουν κάποια επιπλοκή του εμφράγματος, παρά την ύπαρξη των ήδη εφαρμοζόμενων θεραπειών.

Από ιατρική σκοπιά, έπειτα από την εκδήλωση του εμφράγματος, ξεκινά μια πολυσύνθετη παθοφυσιολογική αλληλουχία γεγονότων, η οποία έχει ως αποτέλεσμα την εξασθένηση της αριστερής κοιλίας. Η εκκίνηση γίνεται στη διάρκεια της πρώιμης φάσης του εμφράγματος του μυοκαρδίου. Το όλο αυτό φαινόμενο στη βιβλιογραφία περιγράφεται με τον όρο «αναδιαμόρφωση της αριστερής κοιλίας» (LV remodelling).

Η ανάπτυξη της βιοϊατρικής και της ιστοτεχνολογίας, μαζί με την ταχύτατη και εντυπωσιακή εξέλιξη της επιστήμης των υλικών τα τελευταία χρόνια (συμπεριλαμβανομένης και της νανο-τεχνολογίας και της ανάπτυξης νέων νανο-υλικών), έχει ανοίξει νέες λεωφόρους για τη θεραπεία του εμφράγματος. Όμως, οι νέες ερευνητικές προσεγγίσεις απαιτούν την ύπαρξη διεπιστημονικότητας. Δηλαδή, η εξέλιξη του κάθε διακριτού επιστημονικού κλάδου πρέπει να ακολουθεί διαδρομές που να διασταυρώνονται με τις αντίστοιχες διαδρομές της εξέλιξης των άλλων επιστημονικών κλάδων που συνεισφέρουν στον ίδιο σκοπό. Αυτό τονίζεται γιατί, είναι κοινή διαπίστωση ότι, μέχρι τώρα, κάθε επιστημονικός κλάδος, η ιατρική, η επιστήμη των υλικών, η βιολογία, προχωρούσε γρήγορα μεν και με εντυπωσιακά αποτελέσματα, αλλά μάλλον ακολουθώντας δρόμους παράλληλους. Στη διατριβή αυτή, ένα από τα κύρια μελήματα της ήταν και η επίτευξη αυτής της διεπιστημονικότητας. Για το λόγο αυτό, όλα τα πειράματα που αναφέρθηκαν στα προηγούμενα δύο κεφάλαια δεν αποτελούν ξεχωριστές οντότητες αλλά όλα είναι αναπόσπαστα και αδιαίρετα μέρη ενός ενιαίου συνόλου με τελικό σκοπό την κατασκευή ενός χρήσιμου ικριώματος για τη θεραπεία και την αναγέννηση του ιστού στο εμφραγματικό μυοκάρδιο.

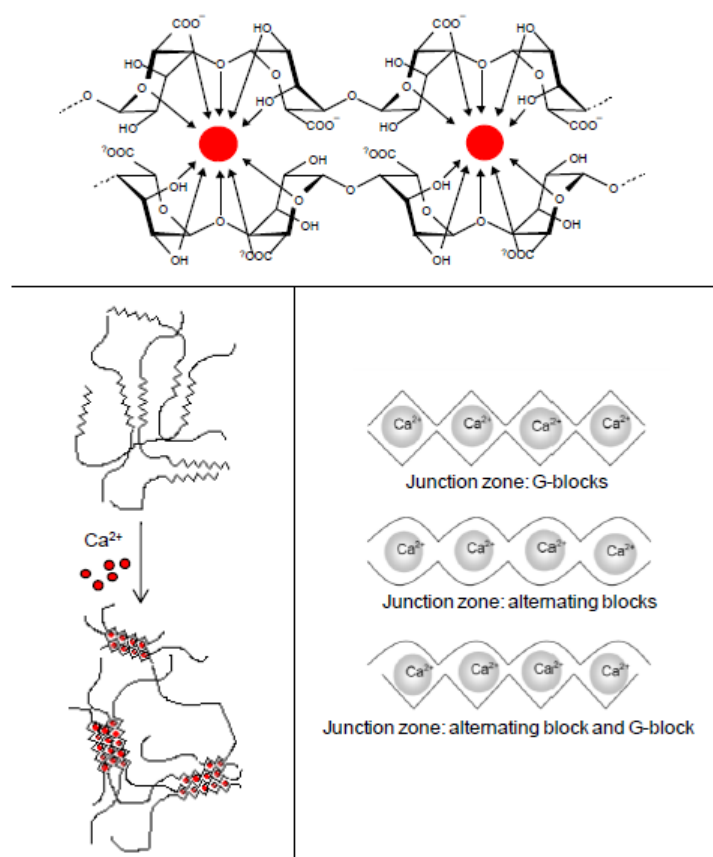
Η προσέγγιση της θεραπείας του εμφράγματος δια μέσου χρήσης ικριωμάτων της ιστοτεχνολογίας, όπως για παράδειγμα μελετήθηκε στην παρούσα διατριβή, απαιτεί αλληλεπίδραση μεταξύ των κλάδων αυτών, διασταύρωση των προσπαθειών, των ιδεών, των τεχνολογιών, των θεωριών και των πρακτικών. Η ιστοτεχνολογία μπορεί να αποτελέσει την εναλλακτική λύση για τη μεταμόσχευση οργάνων και ιστών. Η μεταμόσχευση κυττάρων, με τη χρήση βιοδιασπώμενων συνθετικών εξωκυτταρικών μητρών, προσφέρει τη δυνατότητα δημιουργίας πλήρους και απολύτως φυσικού νέου ιστού, στοχεύοντας με αυτόν τον τρόπο στην αντικατάσταση κατεστραμμένων οργάνων ή ιστών. Συνθετικές εξωκυτταρικές μήτρες που κατασκευάζονται από βιοσυμβατά και βιοαποικοδομήσιμα πολυμερή παίζουν σημαντικό ρόλο στο σχηματισμό νέου λειτουργικού ιστού δια μέσου των κυττάρων που μεταμοσχεύονται. Συγκεκριμένα, τα βιοϋλικά αυτά παρέχουν ένα προσωρινό ικρίωμα, το οποίο θα καθοδηγήσει την ανάπτυξη και την οργάνωση του νέου ιστού.

Έτσι, πριν η συζήτηση υπεισέρθει στα συμπεράσματα της παρούσας μελέτης, συνοψίζοντας όλα τα παραπάνω, πρέπει να τονιστεί ότι, διεθνώς (139), όλη η προσέγγιση στη θεραπεία δύσκολων ιδιαίτερα περιπτώσεων, όπως είναι η περίπτωση του εμφραγματικού μυοκαρδίου, που μελετήθηκε στην παρούσα εργασία, τίθεται κάτω από την ομπρέλα που φέρει το γενικό τίτλο αναγεννητική ιατρική (*regenerative medicine*). Ο σκοπός της είναι να εκμαιεύσει και την τελευταία, την πιο μικρή, δυνατότητα του οργανισμού, αν αυτή υπάρχει (και είναι κωδικοποιημένη και φυλαγμένη στο γενετικό υλικό του, ίσως όχι όμως εκπεφρασμένη ακόμα στη συγκεκριμένη στιγμή που οργανισμός κινδυνεύει και έτσι την έχει ανάγκη ώστε αυτή αμέσως να εκφραστεί), για να αναλάβει μόνος του την αυτοθεραπεία του. Είναι προφανές ότι, η αναγεννητική ιατρική δεν προβλέπει γενικευμένες προσεγγίσεις για όλους τους ασθενείς κάθε κατηγορίας ασθένειας, αλλά στοχεύει στον κάθε συγκεκριμένο ασθενή, με τα συγκεκριμένα χαρακτηριστικά της γενικής υγείας του, του οργανισμού του και, φυσικά, της δικής του συγκεκριμένης ασθένειας. Τα εργαλεία για να γίνει αυτό (δηλαδή, τα εργαλεία της αναγεννητικής ιατρικής) είναι δύο, η ιστοτεχνολογία (*tissue engineering*) και η στοχευμένη χρονικά και τοπικά παροχή φαρμάκων και κάθε είδους άλλων ουσιών (*drug delivery systems*), όπως είναι οι αυξητικοί παράγοντες. Αν η χρησιμότητα του δεύτερου εργαλείου είναι πιο προφανής (καθόλου εύκολη, όμως, να επιτευχθεί), σε ότι αφορά στο πρώτο, η ιστοτεχνολογία στοχεύει στην κατασκευή του περιβάλλοντος, γεωμετρικού, χημικού, μοριακού, βιολογικού, που θα μπορέσει να φιλοξενήσει δομή/δομές κυττάρων ή ακόμα και ολόκληρων ιστών, όπου θα διασφαλίζεται (και προεξοφλείται) ότι τα κύτταρα θα είναι απολύτως λειτουργικά και ενεργά, έτοιμα να αποδώσουν μόλις όλο αυτό το σύστημα εμφυτευτεί στο σώμα. Ο σκοπός αμφοτέρων είναι να προάγουν

αφενός την *παραγωγή εξωκυττάριας μήτρας*, αφετέρου την *αγγειογένεση* στην περιοχή που θα εμφυτευτούν.

Έτσι, υπό το πρίσμα αυτής της γενικής και πλέον σύγχρονης, διεθνώς, προσέγγισης, στην παρούσα διατριβή μελετήθηκε η ανάπτυξη ικριώματος της ιστοτεχνολογίας με βάση το αλγινικό υδροπήκτωμα, που παράγεται από τη ζελατινοποίηση του αντίστοιχου αλγινικού οξέος, το οποίο αναγνωρίζεται, τουλάχιστον από την εποχή της δεκαετίας του 1950, ως ένας πολλά υποσχόμενος φυσικός πολυσακχαρίτης με πολλές εφαρμογές, όπως στη βιοϊατρική. Η φυσική του προέλευση, από τα καφέ άλγη, αποτελεί ένα επιπλέον πλεονέκτημα και ισχυρό επιχείρημα για τη χρήση του, ιδιαίτερα στις μέρες μας, όπου το δόγμα «ας αφήσουμε τη Φύση να μας δείξει το δρόμο» είναι πλέον κοινός τόπος στο χώρο της αναγεννητικής ιατρικής για το σχεδιασμό βιοϋλικών και ικριωμάτων της ιστοτεχνολογίας.

Για τα πειράματα, λαμβανομένου υπόψη και του συγκεκριμένου ιατρικού στόχου και του τρόπου εμφύτευσης του νέου ικριώματος, επιλέχθηκε ο ιοντικός μηχανισμός ζελατινοποίησης του διαλύματος του αλγινικού οξέος, όπως ακριβώς απεικονίζεται στην πρόσφατη μελέτη της ομάδας του T. Andersen το 2015, στην Εικόνα 94 (140).



Εικόνα 94. Ιοντική ζελατινοποίηση αλγινικού οξέος. Χρήση ιόντων Ca^{2+} , ως ιόντα ζελατινοποίησης, για την ανάπτυξη αλγινικού υδροπηκτώματος για ενέσιμη εμφύτευση σε εμφραγματικό μυοκάρδιο επίμυων (140).

Από τις δύο μεθόδους ζελατινοποίησης που μελετήθηκαν, υδροπήκτωμα ασβεστίου καλής ποιότητας σχηματίστηκε και με τις δύο, το δε ιξώδες του τελικού υδροπηκτώματος που παρασκευάστηκε είτε με τη μία, είτε με την άλλη μέθοδο ζελατινοποίησης ήταν παρόμοιο. Ασφαλώς, το υδροπήκτωμα με τη μέθοδο διάλυσης/διάχυσης σχηματιζόταν αμέσως (σε μερικά δευτερόλεπτα), ενώ με τη μέθοδο εσωτερικής ζελατινοποίησης χρειαζόνταν περίπου 24 ώρες για να σχηματιστεί, τα δε τελικά υδροπηκτώματα ήταν, με τη δεύτερη μέθοδο παρασκευής, πιο ομοιόμορφα και με ομαλότερη επιφάνεια. Γενικά, επειδή τα ιόντα ασβεστίου συμπλοκοποιούνται πολύ γρήγορα και αυθόρμητα με την αλυσίδα του μορίου του αλγινικού οξέος, σχηματίζοντας, όπως έδειξαν και οι θεωρητικοί υπολογισμοί DFT, ισχυρά, σταθερά και καλά δομημένα σύμπλοκα, εν είδει χηλικών συμπλόκων, ο σχηματισμός του αλγινικού υδροπηκτώματος πρέπει να γίνει σχετικά αργά, ώστε να δίνεται χρόνος στο κάθε ιόν του ασβεστίου να συμπλοκοποιείται στη δεσμική του θέση με τα G-blocks της αλγινικής αλυσίδας. Πάντως, πρέπει να σημειωθεί ότι, και οι δύο τρόποι ζελατινοποίησης χρησιμοποιήθηκαν για την παρασκευή των ικριωμάτων που ελέγχθηκαν και χρησιμοποιήθηκαν στα *in vitro* και στα *in vivo* πειράματα. Έτσι, δεν υπάρχει κάποια συγκεκριμένη (από τις δύο αυτές) μέθοδος η οποία να προκρίνεται (ή κάποια να αποκλείεται) αλλά και οι δύο είναι πολύ χρήσιμες, η κάθε μια για τα χαρακτηριστικά της και την ποιότητα και τις ιδιότητες του τελικού υδροπηκτώματος που παράγει.

Στα πλαίσια της διερεύνησης της επίδρασης του μηχανισμού ζελατινοποίησης στην ποιότητα του τελικού υδροπηκτώματος (μελέτη στην οποία συνέβαλαν ουσιωδώς και τα πειραματικά αποτελέσματα από τη μελέτη της ζελατινοποίησης με τα άλλα ιόντα των αλκαλικών γαιών), στην εργασία αυτή βρέθηκε ότι, το αλγινικό υδροπήκτωμα του ασβεστίου αποκτά μία μέγιστη τιμή ιξώδους σε μία συγκεκριμένη συγκέντρωση ιόντων ασβεστίου. Η μέγιστη τιμή του ιξώδους θεωρήθηκε ότι είναι αποτέλεσμα της επίτευξης της μέγιστης δικτύωσης του υδροπηκτώματος σύμφωνα με τη δομή «egg-box». Προσθήκη μεγαλύτερης, από αυτήν, ποσότητας ιόντων Ca^{2+} οδήγησε στην ελάττωση της τιμής του ιξώδους, που σύμφωνα με την παραπάνω θεώρηση πρέπει να αντανakλά μία πιο χαλαρή δομή του υδροπηκτώματος. Τα πειραματικά αυτά ευρήματα επιβεβαιώθηκαν και με τους θεωρητικούς υπολογισμούς DFT.

Η μοντελοποίηση της δομής του αλγινικού υδροπηκτώματος με τους υπολογισμούς DFT προέβλεψε ότι, πράγματι, η πυκνή διαμόρφωση των αλυσίδων του αλγινικού μορίου χαλαρώνει όταν αυξάνεται η παρουσία των ιόντων ασβεστίου στον περιβάλλοντα χώρο των διαμορφώσεων «egg-box». Λαμβανομένου υπόψη του γεγονότος ότι, η επαναιμάτωση του μυοκαρδίου μετά από ένα ισχαιμικό επεισόδιο (έμφραγμα) δημιουργεί στην περιοχή του εμφράγματος ένα περιβάλλον πλούσιο σε ιόντα ασβεστίου, οι θεωρητικοί αυτοί υπολογισμοί υπέδειξαν το σωστό σχεδιασμό ενός

αλγινικού ικριώματος που θα πρέπει εμφυτευτεί στο εμφραγματικό μυοκάρδιο. Και αυτό, με απλά λόγια, ήταν ότι, στο εμφραγματικό μυοκάρδιο πρέπει να εμφυτεύεται υποασβεστιωμένο αλγινικό υδροπήκτωμα.

Το υποασβεστιωμένο υδροπήκτωμα, λόγω της δυνατότητάς του να προσλαμβάνει και να φιλοξενεί συνεχώς ιόντα Ca^{2+} στη δομή του, όπως απέδειξαν τα πειράματα με τις μετρήσεις του δυναμικού ιξώδους, θα προσλάβει (είτε με τον ένα μηχανισμό ζελατινοποίησης, είτε με τον άλλο, είτε με συνδυασμό τους) από την περιοχή όπου θα εμφυτευτεί τα απαραίτητα ιόντα ασβεστίου και θα σχηματίσει *in situ* ένα καλά δικτυωμένο υδροπήκτωμα. Το τελευταίο θα μπορεί να συγκρατήσει τους αυξητικούς παράγοντες και τα κύτταρα που θα φέρει και θα αποσυντεθεί με τους ρυθμούς και στο χρόνο όπως έχει προβλεφθεί στα *in vitro* πειράματα. Επίσης, μπορεί να ρυθμιστεί, ανάλογα με την ποσότητα του ασβεστίου που θα περιέχει, το ιξώδες του υποασβεστιωμένου υδροπηκτώματος που θα εμφυτευτεί, έτσι ώστε να μην αναπτυχθούν υψηλές μηχανικές τάσεις μόλις αυτό εμφυτευτεί στον καρδιακό ιστό, κάτι που εάν δεν ληφθεί αυτή η μέριμνα, μπορεί να είναι επικίνδυνο τόσο για τον ιστό του μυοκαρδίου όσο και για τη βιωσιμότητα των κυττάρων που θα φέρει το αλγινικό υδροπήκτωμα. Στα πειράματα παρασκευής των υδροπηκτωμάτων που θα φιλοξενούσαν κυτταρικές καλλιέργειες έγινε ειδική μνεία για την πολλή μεγάλη σημασία που έχει να διασφαλιστεί η αποφυγή εφαρμογής μηχανικών τάσεων στα κύτταρα, οι οποίες μπορεί να οδηγήσουν σε θάνατο όλων των κυττάρων σε μία καλλιέργεια (όμοια σαν τις περιπτώσεις που υπάρχουν μολύνσεις ή άλλες τοξικές ουσίες). Στην εργασία αυτή, η μέριμνα για το θέμα της ελαχιστοποίησης αυτών των μηχανικών τάσεων εφαρμόστηκε ιδιαίτερα στις περιπτώσεις της σύνθεσης αλγινικού υδροπηκτώματος από μίγμα κλασμάτων LMW και HMW αλγινικού οξέος, καθώς και στη σταδιακή ελάττωση της περιεκτικότητας σε NaCl των διαλυμάτων που χρησιμοποιήθηκαν στον καθαρισμό με τη μέθοδο της διαπίδωσης (141). Τα *in vivo* πειράματα της παρούσας εργασίας επιβεβαίωσαν την πρόβλεψη αυτή. Δηλαδή, τα αποτελέσματα από τα *in vivo* πειράματα με το υποασβεστιωμένο αλγινικό εμφύτευμα ήταν πολύ καλά. Αυτό αποδόθηκε στο γεγονός ότι, αυτό το εμφύτευμα είχε καλή *in vivo* συμπεριφορά στο να δεσμεύει την περίσσεια του ασβεστίου από την περιοχή του εμφράγματος. Επίσης, με τον τρόπο αυτό, ίσως να μπορεί το εμφύτευμα να βοηθήσει και σε μία πιο ισορροπημένη κατάσταση σε ότι αφορά στη συγκέντρωση του ασβεστίου στην περιοχή αυτή. Τέλος, πολύ καλός (για το συγκεκριμένο ιατρικό πρωτόκολλο) ήταν και ο ρυθμός της *in vivo* βιοαποικοδόμησης των υποασβεστιωμένων αλγινικών εμφυτευμάτων στα πειράματα αυτά με τα πειραματόζωα.

Αντίθετα, εάν εμφυτευτεί ένα πλήρως δικτυωμένο αλγινικό υδροπήκτωμα, η παρουσία των ιόντων ασβεστίου από τα βιολογικά υγρά

στον περιβάλλοντα χώρο αναμένεται να οδηγήσει το εμφυτευμένο υδροπήκτωμα σε χαλάρωση και κατάρρευση. Έτσι, δεν θα υπηρετήσει το σκοπό για τον οποίο εμφυτεύτηκε, δηλαδή να αποικοδομηθεί στις επόμενες ~10 ημέρες και με το ρυθμό αυτό να απελευθερώσει τους αυξητικούς παράγοντες και τα κύτταρα, όπως αυτά έχουν προβλεφθεί από τις *in vitro* μελέτες, αλλά αμέσως όλα αυτά θα διαφύγουν στην κυκλοφορία και θα χαθούν. Επίσης, δεν είναι γνωστό τι επιπτώσεις θα έχει η παρουσία ενός τέτοιου εμφυτεύματος, δηλαδή, αν υπάρχουν κίνδυνοι για την επιβίωση του οργανισμού. Αναφορικά με το τελευταίο ερώτημα, όπως τονίστηκε και στο κεφάλαιο 1 της Εισαγωγής, τα ιόντα ασβεστίου παίζουν σημαντικό ρόλο στη μετέπειτα υγεία μετά την εκδήλωση του εμφράγματος, επειδή είναι υπεύθυνα για τη διατήρηση της ηλεκτρικής δραστηριότητας της καρδιάς. Έτσι, εάν το υδροπήκτωμα που θα εμφυτευτεί έχει ήδη υψηλή περιεκτικότητα σε ιόντα Ca^{2+} , τότε θα συντελέσει στην περεταίρω αύξηση της συγκέντρωσης του Ca^{2+} κατά τις πρώτες ώρες που θα αρχίσει η διάλυσή του στην περιοχή, με αποτέλεσμα να θέσει σε έναν επιπλέον πιθανό αλλά σοβαρό κίνδυνο ακόμα και την ίδια τη ζωή του ασθενούς.

Τα αποτελέσματα των θεωρητικών υπολογισμών έδειξαν, επίσης, ότι, τα ιόντα του ασβεστίου, λόγω της κατάλληλης (για το αλγινικό μόριο) τιμής της ιοντικής του ακτίνας, δημιουργούν καλής ποιότητας υδροπηκώματα. Αντίθετα, οι υπολογισμοί αυτοί έδειξαν ότι, η πολλή μικρή ιοντική ακτίνα των ιόντων του Mg^{2+} δεν επιτρέπει τη συνολική πύκνωση των αλυσίδων του αλγινικού μορίου γύρω του, παρά το γεγονός ότι αυτό μπορεί να βρεθεί, λόγω ακριβώς του μικρού του μεγέθους, πολύ πιο κοντά σε μερικές ομάδες του αλγινικού μορίου, αποτέλεσμα που συμφωνεί και με τα ευρήματα τόσο της παρούσας εργασίας όσο και από άλλες εργασίες που αναφέρονται στη βιβλιογραφία (72).

Ο προσδιορισμός των χαρακτηριστικών της δομής του εμφυτεύματος είναι πολύ σημαντικός γιατί αυτά τα χαρακτηριστικά το προκρίνουν για περεταίρω θεώρηση και πειραματισμό ως εμφύτευμα στη συγκεκριμένη εφαρμογή. Από τα φάσματα υπερύθρου προέκυψε ότι, η ζελατινοποίηση δεν αλλοιώνει τα βασική δομή του φυσικού πολυσακχαρίτη του αλγινικού οξέος. Επίσης, η μικροδομή των αλγινικών υδροπηκτωμάτων του ασβεστίου που παρασκευάστηκαν είναι γενικά παρόμοια με τη δομή του ιστού του μυοκαρδίου. Και στις δύο περιπτώσεις, τα λυοφιλοποιημένα δείγματα είχαν φυλλοειδή δομή. Το δε πορώδες του λυοφιλοποιημένου υδροπηκτώματος δείχνει ότι, εφόσον η υφή του παραμένει ίδια και σε υγρή φάση, υπάρχουν πολλές δίοδοι για κυτταρική μεταφορά και αγγείωση, όπως επιβεβαιώθηκε και στα *in vitro* πειράματα με τους διάφορους τύπους κυττάρων που μελετήθηκαν.

Η βιοαποικοδόμηση του υδροπηκτώματος είναι μία επίσης πολύ σημαντική ιδιότητα. Για το αλγινικό υδροπήκτωμα, συγκεκριμένα, η βιοαποικοδόμησή του περιλαμβάνει δύο στάδια. Το πρώτο αφορά στην

αποσυμπλοκοποίηση του υδροπηκτώματος σε αλυσίδες αλγινικού οξέος, όπως μελετήθηκε στην περίπτωση της προσθήκης του EDTA σε καλά σχηματισμένο αλγινικό υδροπήκτωμα (Εικόνα 35). Το στάδιο αυτό σχετίζεται άμεσα με το χρόνο που πρέπει να διαρκέσει η θεραπεία. Το δεύτερο στάδιο αφορά στην ολική απομάκρυνση των αλγινικών ομάδων που θα προκύψουν από το πρώτο στάδιο της βιοαποικοδόμησης από τον οργανισμό. Όπως τονίστηκε, η απουσία σχετικών ενζύμων τύπου αλγινάσης καθιστά αδύνατη την απομάκρυνση, από τους νεφρούς, του αλγινικού οξέος (142). Έτσι, στην εργασία αυτή, πριν το σχηματισμό του υδροπηκτώματος, έγινε οξείδωση της αλυσίδας και άνοιγμα του 1% των αλυσίδων του αλγινικού οξέος, έτσι ώστε το προϊόν αυτό να είναι, μέσα στον οργανισμό, διασπάσιμο και έτσι να μπορεί τελικά να αποβληθεί από το σώμα (127).

Η αποικοδόμηση του αλγινικού υδροπηκτώματος κατά το πρώτο στάδιο, στην περίπτωση του μυοκαρδίου, σύμφωνα με τα ιατρικά πρωτόκολλα, πρέπει να γίνεται σε χρόνο περίπου 2 εβδομάδων. Έτσι, τόσο τα *in vitro* πειράματα όσο και τα *in vivo* έδειξαν ότι, οι χρόνοι βιοαποικοδόμησης του αλγινικού υδροπηκτώματος του ασβεστίου εμπίπτουν σε αυτό το χρονικό παράθυρο. Συνεπώς, το αλγινικό υδροπήκτωμα του ασβεστίου που παρασκευάστηκε στην παρούσα εργασία πληροί και την προϋπόθεση αυτή, ώστε να μπορεί να χρησιμοποιηθεί στη συγκεκριμένη θεραπεία ως υπόστρωμα για την κατασκευή ενός ολοκληρωμένου ικριώματος της ιστοτεχνολογίας που θα φιλοξενήσει, μεταφέρει και αποδώσει στο εμφραγματικό μυοκάρδιο αυξητικούς παράγοντες και κύτταρα.

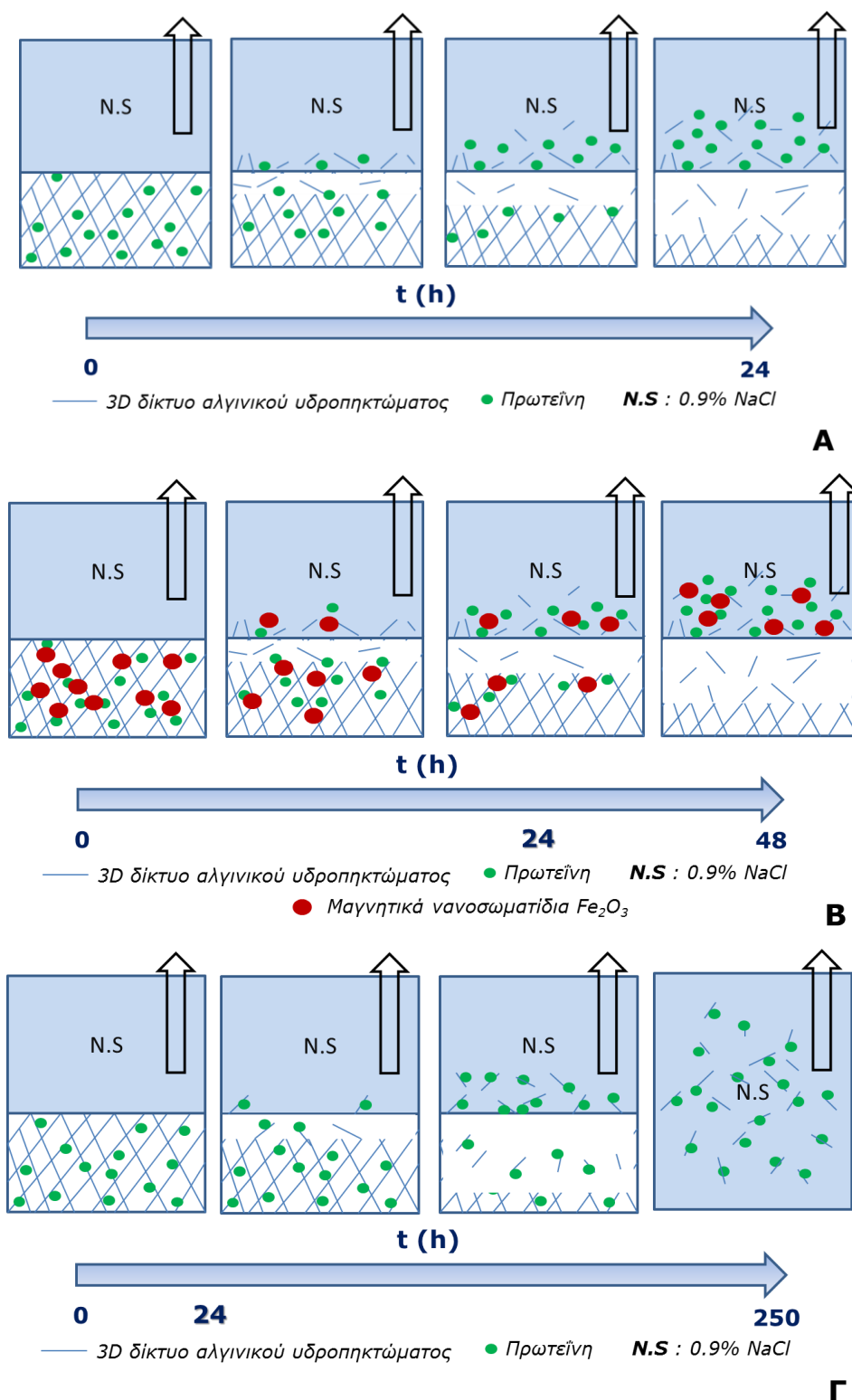
Σε ότι αφορά στο πρώτο, μελετήθηκαν τρεις διαφορετικοί τρόποι πρόσδεσης των αυξητικών πρωτεϊνικών παραγόντων στο υδροπήκτωμα και καταγράφηκαν τρεις διαφορετικές κινητικές απελευθέρωσης της πρωτεΐνης από αυτό. Ο τρόπος πρόσδεσης και απελευθέρωσης της πρωτεΐνης για κάθε έναν από αυτούς τους τρεις τρόπους πρόσδεσης συνοψίζεται στην Εικόνα 95. Η σχηματική αυτή αναπαράσταση σχεδιάστηκε με βάση τις καμπύλες απελευθέρωσης της πρωτεΐνης για κάθε περίπτωση, καθώς και, βάσει της σχεδίασης του ικριώματος, του μηχανισμού που σχεδιάστηκε και προβλέφθηκε για να γίνει η πρόσδεση της πρωτεΐνης στο αλγινικό υδροπήκτωμα.

Στην Εικόνα 96 παρουσιάζονται σε ένα συγκεντρωτικό διάγραμμα, όλες οι καμπύλες από τις κινητικές, τόσο της *in vitro* και *in vivo* βιοαποικοδόμησης του αλγινικού υδροπηκτώματος, όσο και της απελευθέρωσης της πρωτεΐνης (BSA) που ήταν προσδεσμένη με τους τρεις τρόπους πρόσδεσης στο αλγινικό υδροπήκτωμα. Τα αποτελέσματα αυτά δείχνουν ότι, μόνο στην περίπτωση που το μόριο της πρωτεΐνης είναι ομοιοπολικά συνδεδεμένο με την αλγινική αλυσίδα ο ρυθμός απελευθέρωσης της πρωτεΐνης ακολουθεί το ρυθμό αποικοδόμησης του

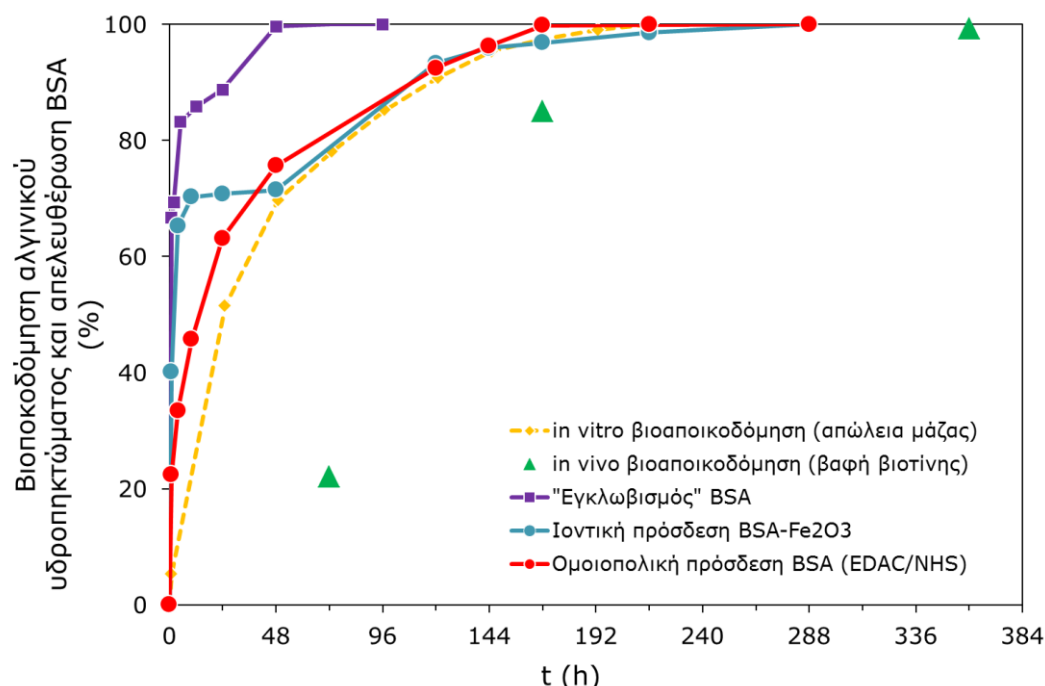
αλγινικού υδροπηκτώματος. Αυτό δείχνει ότι, με αυτόν τον τρόπο πρόσδεσης, η κινητική της απελευθέρωση της πρωτεΐνης μπορεί να ρυθμιστεί από το ρυθμό της αποικοδόμησης του αλγινικού υδροπηκτώματος. Στις άλλες δύο περιπτώσεις δεν υπάρχει καθόλου τέτοια άμεση δυνατότητα. Φυσικά, η πυκνότητα του δικτύου του υδροπηκτώματος, π.χ. εάν αυτό είναι 1, 2, ή 3%, αναμένεται να παίζει ρόλο στην ταχύτητα της διάχυσης της πρωτεΐνης από το εσωτερικό του υδροπηκτώματος προς τα έξω. Αυτό δεν μελετήθηκε γιατί ο στόχος ήταν να βρεθεί τρόπος ώστε να μπορεί να ελεγχθεί απευθείας από το αλγινικό υδροπήκτωμα ο ρυθμός απελευθέρωσης των πρωτεϊνικών αυξητικών παραγόντων.

Όμως, είναι σημαντικό να τονιστεί ότι, και οι τρεις αυτές μέθοδοι πρόσδεσης έχουν πολύ μεγάλο ενδιαφέρον στην ιατρική πρακτική και στα ιατρικά πρωτόκολλα που μελετήθηκαν. Έτσι, όταν το ενδιαφέρον της μελέτης επικεντρωνόταν στην οξεία φάση του εμφράγματος, η άμεση απελευθέρωση της αυξητικής ορμόνης ήταν απαραίτητη, ενώ μια αργή απελευθέρωση αντενδείκνυται εντελώς. Αντίθετα συμβαίνει όταν η μελέτη αφορούσε στη χρόνια φάση του εμφράγματος, όπου η αργή απελευθέρωση της αυξητικής ορμόνης είχε ιδιαίτερο ενδιαφέρον. Τέλος, η αλλαγή του ρυθμού απελευθέρωσης στην περίπτωση της πρόσδεσης της πρωτεΐνης στην επιφάνεια των νανοσωματιδίων έχει πολύ μεγάλο ενδιαφέρον γιατί, στην περίπτωση αυτή, γίνεται μια πολύ γρήγορη απελευθέρωση στην αρχή, η οποία είναι σημαντική για τη θεραπεία του εμφράγματος, αλλά μετά από 2 ημέρες, αυτή η παροχή της αυξητικής ορμόνης δεν παύει εντελώς, όπως συμβαίνει στην περίπτωση της απλής ανάμιξης (εγκλωβισμού), αλλά συνεχίζει με πιο αργούς ρυθμούς και ολοκληρώνεται μετά την πάροδο χρόνου λίγο μεγαλύτερου της μιας εβδομάδας.

Οι μηχανικές ιδιότητες του υδροπηκτώματος, οι οποίες είναι άμεση απόρροια της δικτύωσής του, προεξοφλούν την ασφαλή μεταφορά και απόδοση, στο πάσχον μυοκάρδιο, ουσιών, όπως είναι αυξητικοί παράγοντες (π.χ. αυξητική ορμόνη), φαρμάκων (π.χ. ανοσοκατασταλτικά, καταστολείς απόπτωσης, αντιαρρυθμιακά κ.α.), ή ακόμα και ολόκληρων κυτταροκαλλιεργειών. Μία ιδιαίτερη τεχνική δυσκολία κατά την εμφύτευση (που απασχόλησε ιδιαίτερα τη συγκεκριμένη διατριβή) είναι το εμφύτευμα να έχει το κατάλληλο ιξώδες ώστε να μην καταστρέφονται όλα τα παραπάνω που έχουν ετοιμαστεί *in vitro* όταν περνάει το υδροπήκτωμα-ικρίωμα μέσα από τη σύριγγα ή τη βελόνα, π.χ. να μην τραυματιστούν τα κύτταρα που θα εμφυτευτούν ή τα κύτταρα του μυοκαρδίου που θα έρθουν σε επαφή μαζί με το εμφύτευμα.



Εικόνα 95. (Α) Η πρωτεΐνη έχει εγκλωβιστεί στο υδροπύκνωμα. Παρατηρείται η γρήγορη διάχυσή της από το πύκνωμα. (Β) Η πρωτεΐνη έχει προσδεθεί ιοντικά στην επιφάνεια των νανοσωματιδίων Fe_2O_3 και το σύμπλοκο BSA-νανοσωματίδια Fe_2O_3 έχει εγκλωβιστεί στο αλγινικό υδροπύκνωμα. Μετά τους πρώτους χρόνους, παρατηρείται πιο σταδιακή απελευθέρωσή της, λόγω μεγαλύτερης δυσκολίας διάχυσης του συμπλόκου BSA-νανοσωματίδια Fe_2O_3 από το υδροπύκνωμα. (Γ) Η πρωτεΐνη συνδέθηκε ομοιοπολικά στο αλγινικό μόριο. Επομένως, η απελευθέρωσή της ακολουθεί πιστά το ρυθμό αποικοδόμησης του υδροπηκτώματος.



Εικόνα 96. Συγκριτική απεικόνιση των καμπυλών της κινητικής (στους 37°C) της βιοδιάσπασης του αλγινικού υδροπηκτώματος *in vitro* και *in vivo* και της απελευθέρωσης της BSA από το υδροπήκτωμα στο οποίο είχε προσδεθεί με τους τρεις τρόπους πρόσδεσης (εγκλωβισμός, με νανοσωματίδια Fe₂O₃ και με ομοιοπολικό δεσμό).

Επίσης, οι μηχανικές ιδιότητες του υδροπηκτώματος πρέπει να ελαττώνονται προοδευτικά με το χρόνο μετά την εμφύτευση, δηλαδή, η δικτύωση του υδροπηκτώματος πρέπει να χαλαρώνει σταδιακά ώστε τα παραπάνω (αυξητικοί παράγοντες, φάρμακα και κύτταρα) να μπορούν να αποδίδονται από την πρώτη στιγμή της εμφύτευσης στον ιστό του μυοκαρδίου. Αυτό μελετήθηκε στα πειράματα της επίδρασης του χρόνου επιβολής διατμητικής τάσης στο ιξώδες των υδροπηκτωμάτων. Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι, το αλγινικό υδροπήκτωμα του ασβεστίου πληροί και αυτήν την προϋπόθεση, δηλαδή, τα συγκεκριμένα υδροπηκτώματα δείχνουν ότι επηρεάζονται έντονα από την επιβολή διατμητικής τάσης και το δυναμικό ιξώδες τους ελαττώνεται με την πάροδο του χρόνου (Εικόνα 30). Επομένως, κατά την εμφύτευση του αλγινικού υδροπηκτώματος του ασβεστίου στο συνεχώς παλλόμενο μυοκάρδιο, εκτός από τη φυσικοχημική αποικοδόμησή του, λόγω της ανταλλαγής των δισθενών ιόντων ασβεστίου με τα μονοσθενή ιόντα του μικροπεριβάλλοντος του μυοκαρδίου (Εικόνα 17), λαμβάνει χώρα και μηχανικός υποβιβασμός των ιδιοτήτων του αλγινικού υδροπηκτώματος.

Ο προσεκτικός σχεδιασμός, στον οποίο συνέβαλε και η αναλυτική αξιολόγηση των πειραματικών αποτελεσμάτων (τόσο των επιτυχημένων, όσο και η συστηματική συζήτηση και η ενδελεχής ερμηνεία της αποτυχίας ή

της μη επίτευξης των επιθυμητών στόχων στα καλούμενα αποτυχημένα πειράματα), οδήγησε στην κατασκευή ενός καλής ποιότητας αλγινικού υδροπηκτώματος, υπό την έννοια ότι μπορεί να χρησιμοποιηθεί για περαιτέρω *in vitro* και *in vivo* ανάπτυξη προς ένα πλήρες ικρίωμα της ιστοτεχνολογίας. Έτσι, μαζί με τη, σημαντική για αυτά τα στάδια ανάπτυξης του ικριώματος, πρόσδεση αυξητικών παραγόντων, έγινε και η τροποποίησή του με χημική πρόσδεση σε αυτό του ολιγοπεπτιδίου GGGGRGDSP, το οποίο, ως πεπτίδιο τύπου RDG, αυξάνει την κυτταρική προσκόλληση. Τα *in vitro* πειράματα των κυτταροκαλλιιεργειών με όλους τους τύπους κυττάρων που χρησιμοποιήθηκαν έδειξαν ενθαρρυντικά αποτελέσματα, ως προς την επιβίωση, τον πολλαπλασιασμό, τη λειτουργικότητα και τη διαφοροποίηση των κυττάρων, καθώς και την ικανότητα αγγειογένεσης, εντός του υδροπηκτώματος του πολυσακχαρίτη.

Η τελική αξιολόγηση του ικριώματος έγινε με τα *in vivo* πειράματα, δηλαδή, με τις εμφυτεύσεις του νέου αλγινικού υδροπηκτώματος σε εμφραγματικό μυοκάρδιο επίμυων σύμφωνα με τα διάφορα ιατρικά πρωτόκολλα που εφαρμόστηκαν, και τη μελέτη της επίδρασής του στα πειραματόζωα, δηλαδή στη γενική τους υγεία κατά την περίοδο της εμφύτευσης, στην καρδιά τους και γενικά σε όλους τους ιστούς του σώματός τους. Άλλωστε, η εμφύτευση στο εμφραγματικό μυοκάρδιο είναι και ο απώτερος και τελικός σκοπός της κατασκευής του συγκεκριμένου ικριώματος. Στην εργασία αυτή, τα *in vivo* πειράματα περιελάμβαναν τρεις διακριτούς *in vivo* ελέγχους, την επίδραση του αμιγούς αλγινικού υδροπηκτώματος, καθώς της απελευθέρωσης, από αυτό, τόσο αυξητικής ορμόνης, όσο και κυττάρων HUVEC και MSC.

Η έγχυση αλγινικού υδροπηκτώματος σε εμφραγματικό μυοκάρδιο επίμυων έχει αποδειχθεί ότι περιορίζει τις αλλαγές στο σχήμα και στις διαστάσεις της αριστερής κοιλίας (45). Σύμφωνα με τα ευρήματα από τα *in vivo* πειράματα της παρούσας εργασίας, η χορήγηση αυξητικής ορμόνης μέσω ενός αλγινικού υδροπηκτώματος έχει επιπλέον ευεργετικά αποτελέσματα στην αναδιαμόρφωση της αριστερής κοιλίας (91). Το πάχος της εμφραγματικής ουλής μετρήθηκε και βρέθηκε ότι ήταν μεγαλύτερο στην ομάδα των πειραματόζωων στην οποία έγινε έγχυση αλγινικού υδροπηκτώματος με αυξητική ορμόνη (Alginate-GH), σε σύγκριση με την ομάδα που εγχύθηκε μόνο αλγινικό υδροπήκτωμα. Η τοιχωματική τάση έχει δείχτει ότι σχετίζεται άμεσα με την αναδιαμόρφωση της αριστερής κοιλίας. Έτσι, θεωρείται ιδιαίτερα σημαντικό ότι ο δείκτης τοιχωματικής τάσης, που σχετίζεται ισχυρά με τη λειτουργικότητα της αριστερής κοιλίας, βρέθηκε βελτιωμένος στην ομάδα Alginate-GH. Επίσης, η αντίδραση ξένου σώματος ήταν ήπια και παρόμοια σε όλες τις ομάδες μελέτης, προκρίνοντας το αλγινικό υδροπήκτωμα ως ένα εν δυνάμει ικρίωμα για εφαρμογή στην ιστοτεχνολογία του μυοκαρδίου (91). Η ενισχυμένη αγγειογένεση που παρατηρήθηκε στην εμφραγματική περιοχή έπειτα από εμφύτευση στην

ομάδα Alginate-GH ενισχύει ισχυρά την παραπάνω πρόταση και επίσης ανοίγει προοπτικές για τη χρήση και άλλων, πιο εξειδικευμένων, αυξητικών παραγόντων που μπορούν να προάγουν την αγγειογένεση. Συνοψίζοντας τα πειραματικά αποτελέσματα φαίνεται ότι, η εμφύτευση αλγινικού υδροπηκτώματος με αυξητική ορμόνη περιορίζει τη λέπτυνση της περιοχής του εμφράγματος στην αριστερή κοιλία και παρεμποδίζει την περαιτέρω παραμόρφωση του σχήματός της, όμως δεν παρατηρήθηκε ουσιαστική και αποτελεσματική βελτίωση των διαστάσεων και της λειτουργίας της κοιλίας. Το εύρημα αυτό μπορεί να αποδοθεί στον πιο γρήγορο ρυθμό αποικοδόμησης, σε σχέση με αντίστοιχο βιοϋλικό που έχει περιγραφεί σε προηγούμενη εργασία από άλλη ερευνητική ομάδα (45).

Έτσι, μετά την ολοκλήρωση της μελέτης της αναδιαμόρφωσης της αριστερής κοιλίας έπειτα από έγχυση αλγινικού υδροπηκτώματος (με και χωρίς GH) στην εμφραγματική περιοχή, το επίκεντρο του ενδιαφέροντος της έρευνας μεταφέρθηκε στον *in vivo* έλεγχο της γένεσης κοιλιακών αρρυθμιών έπειτα από εμφύτευση του αλγινικού υδροπηκτώματος (ως μη αγωγίμο βιοπολυμερές) σε μοντέλο ισχαιμίας-επαναιμάτωσης επίμυων κατά τη διάρκεια των πρώτων 24 ωρών. Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι, οι εγχύσεις του αλγινικού υδροπηκτώματος στην εμφραγματική περιοχή δεν προκαλούν αρρυθμιογένεση. Συγκεκριμένα, οι εγχύσεις αλγινικού οξέος σε επαναιματωμένο εμφραγματικό μυοκάρδιο δεν επηρέασαν τον αριθμό των επεισοδίων VT/VF ή τη θνητότητα. Όμως, στην ομάδα μελέτης Alginate-GH παρατηρήθηκαν λιγότερα επεισόδια κοιλιακής ταχυκαρδίας (VT). Με βάση αυτά τα σημαντικά αποτελέσματα, μελετήθηκε η επίδραση του αλγινικού εμφυτεύματος στην αρρυθμιογένεση σε εμφραγματικούς επίμυες σε χρόνια φάση. Η σταδιακή και έγκαιρη χορήγηση της GH δια μέσου του αλγινικού υδροπηκτώματος διατήρησε την αγωγιμότητα και εξασθένησε τη διασπορά της επαναπόλωσης (repolarization-despersion), έχοντας ως αποτέλεσμα τη μείωση της εμφάνισης VTs έπειτα από PES. Τα αποτελέσματα αυτά δεικνύουν μία πιθανή αντιαρρυθμική δράση της GH. Η σταδιακή απελευθέρωση της αυξητικής ορμόνης εντός των πρώτων ημερών της μελέτης ήταν καθοριστική λόγω της πρώιμης έναρξης της διεργασίας επέκτασης του εμφράγματος και της περαιτέρω διαστολής της αριστερής κοιλίας (143).

Η κυτταρική μεταμόσχευση μέσω ικριωμάτων, ενώ είναι ο απώτερος σκοπός και η ουσία της ιστοτεχνολογίας, συχνά συνοδεύεται από σημαντικά αρρυθμιολογικά προβλήματα. Έτσι, στην παρούσα διατριβή, ελέγχθηκε η αρρυθμιογένεση έπειτα από εμφύτευση του νέου κυτταροδραστικού αλγινικού ικριώματος σε εμφραγματικούς επίμυες. Συγκεκριμένα, κάθε πειραματόζωο έλαβε 100.000 κύτταρα συνολικά, τα οποία ήταν συνδυασμός μεσεγχυματικών και ενδοθηλιακών κυττάρων (σε αναλογία MSCs:HUVES = 1:9). Τα προηγούμενα *in vivo* πειράματα αυτής της εργασίας έδειξαν ότι, είναι ασφαλής η έγχυση του υποασβεστωμένου

αλγινικού υδροπηκτώματος (που ομοιάζει έντονα με το διάλυμα του αλγινικού οξέος, λόγω της πολύ χαμηλής συγκέντρωσης ιόντων ασβεστίου, ασφαλώς με σκοπό να τα πάρει αυτά τα ιόντα *in situ* μόλις εμφυτευτεί) για χρήση ως ικρίωμα για την εφαρμογή στην ιστοτεχνολογία του μυοκαρδίου. Με αυτό ως δεδομένο, μελετήθηκε η ηλεκτροφυσιολογική απόκριση των εμφραγματικών επίμυων έπειτα από εμφύτευση αλγινικού υδροπηκτώματος με εγκλωβισμένα MSCs και HUVECs σε σφαιροειδείς αποικίες. Οι τιμές της αύξησης της τάσης (voltage rise) στις καταγραφές MAP ήταν παρόμοιες στα πειραματόζωα που έλαβαν θεραπεία με τα πειραματόζωα της ομάδας ελέγχου. Έπειτα από δύο εβδομάδες παρατήρησης, καμία διαφορά στην επαγωγιμότητα VTs μέσω PES δεν παρατηρήθηκε μεταξύ των πειραματόζωων που έλαβαν το ικρίωμα και των πειραματόζωων της ομάδας ελέγχου. Επίσης, ο χρόνος αγωγής και η κλίση της φάσης 0 στις καταγραφές MAP ήταν συγκρίσιμες μεταξύ των δύο ομάδων μελέτης. Το ευρήματα από αυτήν τη μελέτη υποστηρίζουν την απουσία προ-αρρυθμικής επίδρασης του ικριώματος που εμφυτεύθηκε και γενικά δείχνουν χαμηλή πιθανότητα αρρυθμογένεσης στη χρόνια φάση έπειτα από εμφύτευση του ικριώματος.

Προτάσεις για μελλοντική έρευνα

Το αντικείμενο που μελετήθηκε στην παρούσα διατριβή αποτελεί θέμα αιχμής (hot topic) στη σύγχρονη έρευνα, ταυτόχρονα, όμως, διακρίνεται και για τον απολύτως ξεκάθαρο ανθρωποκεντρικό του χαρακτήρα. Η επίτευξη των επτά (7) στόχων που τέθηκαν (στο κεφάλαιο 2), σε συνδυασμό με τα παραπάνω δύο γνωρίσματα, οδηγούν στις προτάσεις που παρατίθενται παρακάτω για ανάπτυξη μελλοντικής έρευνας. Οι προτάσεις αυτές στοχεύουν στη διεύρυνση και εμβάθυνση της έρευνας που αναλήφθηκε στην παρούσα διατριβή, με απώτερο σκοπό να κατασκευαστεί ένα πλήρες και ολοκληρωμένο, από όλες τις απόψεις, προ-αγγειωμένο ικρίωμα της ιστοτεχνολογίας (TEC: tissue engineered construct), το οποίο να είναι αποτελεσματικό και αξιόπιστο για την αντιμετώπιση της αναδιαμόρφωσης της αριστερής κοιλίας έπειτα από οξύ έμφραγμα του μυοκαρδίου.

Καταρχήν, τα πειραματικά αποτελέσματα της μελέτης έδειξαν ότι είναι απαραίτητο να γίνει πλήρης ιστολογική μελέτη στους ιστούς της καρδιάς έπειτα από την εμφύτευση του αλγινικού υδροπηκτώματος με τα μεσεγχυματικά (MSCs) και τα ενδοθηλιακά (HUVEC) κύτταρα. Έτσι, θα αποκτηθεί πλήρης εικόνα για την επίδραση που έχουν τα κύτταρα αυτά στην ενίσχυση της αγγειογένεσης και γενικά στην αντιμετώπιση της αναδιαμόρφωσης της αριστερής κοιλίας έπειτα από οξύ έμφραγμα του μυοκαρδίου. Τα αποτελέσματα αυτής της μελέτης θα επιτρέψουν τη σύγκριση με τα αντίστοιχα αποτελέσματα από την παρούσα έρευνα, θα

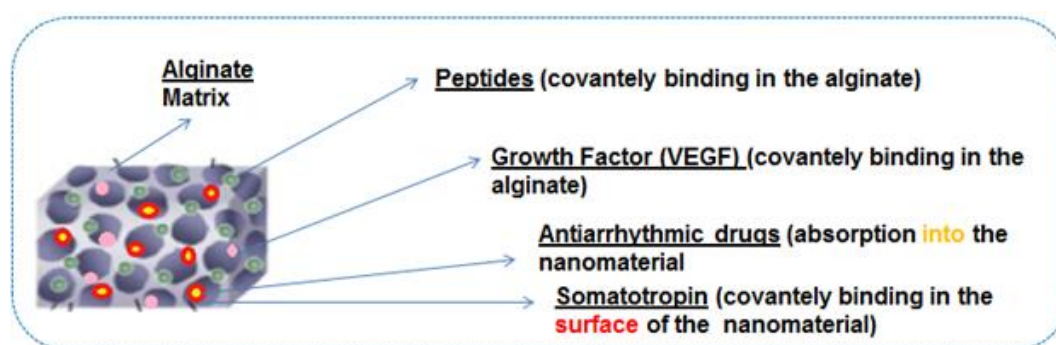
αναδείξουν τυχόν προβλήματα, αλλά το πιο σημαντικό είναι ότι αναμένεται να ανοίξουν δρόμους για περαιτέρω έρευνα, όπως αυτή που προτείνεται στη συνέχεια.

Και η έρευνα αυτή δεν μπορεί να στοχεύει πουθενά αλλού παρά στην κατασκευή ενός πλήρους και ολοκληρωμένου ικριώματος για τη συγκεκριμένη εφαρμογή, δηλαδή τη θεραπεία που θα παρασχεθεί στο εμφραγματικό μυοκάρδιο. Αξιοποιώντας όλα τα αποτελέσματα της παρούσας εργασίας, το εμφύτευμα προτείνεται να είναι δομημένο σε μία τριπλή ιεραρχική δομή με σκοπό να μπορεί να φιλοξενήσει και να μεταφέρει στο εμφραγματικό μυοκάρδιο μικρά μόρια, όπως είναι φάρμακα, μεγάλα μόρια, όπως είναι οι αυξητικοί παράγοντες, και κύτταρα. Στο πρώτο επίπεδο της δομής θα είναι μεσοπορώδη ροφητικά υλικά, στο δεύτερο το δίκτυο του αλγινικού υδροηλεκτρώματος και το τρίτο είναι η ενσωμάτωση κυτταροκαλλιιεργειών σε αυτό.

Η χημεία καρβοδιιμιδίων (carbodiimide chemistry) θα χρησιμοποιηθεί για την ομοιοπολική πρόσδεση στο αλγινικό υδροηλεκτρώμα τόσο πεπτιδίων (της οικογένειας RGD), για την ενίσχυση της κυτταρικής πρόσδεσης, όσο και εξειδικευμένων αγγειογενετικών αυξητικών παραγόντων, όπως είναι οι VEGF και PDGF (144).

Τα νανοσωματίδια του οξειδίου του σιδήρου, που χρησιμοποιήθηκαν στην παρούσα εργασία, μπορούν να αντικατασταθούν με νανοκεραμικά υλικά, και συγκεκριμένα με μεσοπορώδη υλικά του οξειδίου του πυριτίου, με βάση το γνωστό SBA-15. Τα μεσοπορώδη αυτά υλικά παρέχουν ακόμα πιο μεγάλη ειδική επιφάνεια και μπορούν να εγκλωβίσουν αποτελεσματικά μικρά μόρια μέσα στους μικρούς (νανο-διαστάσεων) πόρους τους. Τα υλικά αυτά, επίσης, μπορούν να τροποποιηθούν χημικά, με αποτέλεσμα να μπορεί ρυθμιστεί η τιμή του pI τους στην περιοχή που είναι επιθυμητή, ώστε να επιτευχθεί η καλύτερη ιοντική πρόσδεση με διάφορα μόρια. Για παράδειγμα, το SBA-15 έχει pI στην όξινη περιοχή ενώ το τροποποιημένο NH_2 -SBA (aminopropyl functionalized SBA-15) στην αλκαλική. Τα μεσοπορώδη αυτά υλικά μπορούν να παρασκευαστούν με τη μέθοδο *sol-gel* (145). Επίσης, με τα υλικά αυτά παρέχεται η δυνατότητα σε άλλο pH να γίνει η πρόσδεση ενώ σε φυσιολογικό pH να λαμβάνει χώρα η απελευθέρωση (με τα νανοσωματίδια του οξειδίου του σιδήρου αυτό δεν ήταν δυνατόν γιατί η μέγιστη πρόσδεση της BSA καταγράφηκε σε $pH = 7$). Προηγούμενα πειράματα της ερευνητικής μας ομάδας έχουν δείξει ότι, η σοματοτροπίνη (somatotropin) και η αμιοδαρόνη (amiodarone), που είναι ένα αντιαρρυθμικό φάρμακο, παίζουν σπουδαίο ρόλο στη βελτίωση της λειτουργίας της αριστερής κοιλίας μετά το εμφραγμα και στην αντιμετώπιση της παθολογικής αρρυθμιογένεσης. Έτσι, κατά την ανάπτυξη μεσοπορώδους NH_2 -SBA, "*in situ*" θα «εγκλωβιστούν» στο πορώδες του υλικού αντιαρρυθμικά φάρμακα (π.χ. αμιοδαρόνη) (146-148). Στη συνέχεια, στις αμινομάδες της επιφάνειας του μεσοπορώδους αυτού

συμπλόκου, θα λάβει χώρα η ακινητοποίηση της σωματοτροπίνης (somatotropin) με χρήση χημείας καρβοδιϊμιδίων (Sulfo-NHS/EDAC) (120). Το καινοτόμο αυτό νανο-σύμπλοκο (somatotropin-SBA-amiodarone) θα εγκλωβιστεί στο τεράστιο πορώδες της τροποποιημένης κυτταροδραστικής πολυμερικής μήτρας του αλγινικού οξέος (στο οποίο θα είναι προσδεσμένα το πεπτίδιο GGGGRGDSP και οι αγγειογενετικοί αυξητικοί παράγοντες). Στην Εικόνα 97 απεικονίζεται αυτή η δομή του βιοϋλικού. Σε ένα τέτοιο ικρίωμα, εκτός από τον έλεγχο των σταδίων παρασκευής και τον προσδιορισμό των χαρακτηριστικών της δομής του, πρέπει να γίνουν πολλοί *in vitro* έλεγχοι της κινητικής της ρόφησης (πρόσδεσης) και εκρόφησης (απελευθέρωσης) των φαρμάκων και των αυξητικών παραγόντων σε φυσιολογικό περιβάλλον.



Εικόνα 97. Τελική δομή του υλικού.

Στο τρίτο επίπεδο της δομικής ιεραρχίας, είναι η δημιουργία αγγειωμένης ιστικής κατασκευής (vascularized tissue engineered constructs - VEC), που προτείνεται να γίνει ως εξής. Ανθρώπινα πολυδύναμα βλαστικά κύτταρα (human induced pluripotent stem cells/human embryonic stem cells) θα διαφοροποιηθούν αρχικά σε προγονικά αγγειακά κύτταρα σε συνθήκες δύο διαστάσεων. Στη συνέχεια, τα κύτταρα αυτά θα απομονωθούν και θα ενσωματωθούν στο βιοϋλικό ώστε να το εποικήσουν και να διαφοροποιηθούν περαιτέρω σε ώριμα αγγειακά κύτταρα (ενδοθηλιακά και τοιχωματικά κύτταρα). Η επιτυχής ανάπτυξη και οργάνωση των κυττάρων αυτών σε ένα ώριμο αγγειακό δίκτυο μέσα στο ικρίωμα θα ελεγχθεί με μικροσκοπία και τη χρήση λειτουργικών δοκιμασιών. Εφόσον η αγγείωση είναι επιτυχής, θα προστεθούν και καρδιομυοκύτταρα, ώστε να ολοκληρωθεί η δημιουργία μιας αγγειωμένης ιστικής κατασκευής εξειδικευμένης για την αναγέννηση του μυοκαρδίου.

Το ικρίωμα αυτό, εφόσον θα μπορεί να ικανοποιεί επαρκώς όλα τα παραπάνω χαρακτηριστικά του σχεδιασμού του, δηλαδή όλα τα μόρια και κύτταρα να μπορούν να επιτελέσουν το έργο για το οποίο συμμετέχουν σε αυτήν την πολύπλοκη ιστική κατασκευή, θα πρέπει να εμφυτευτεί σε

εμφραγματικούς επίμυες και να γίνουν όλοι οι *in vivo* έλεγχοι, σύμφωνα με τα ιατρικά πρωτόκολλα, όπως έγιναν και στην παρούσα εργασία.

Το παραπάνω ικρίωμα μπορεί να εξελίχθη περεταίρω ανοίγοντας και μία άλλη, διαφορετική διάσταση στο σχεδιασμό του, πέρα από τα πλαίσια της χημείας, της μηχανικής και της βιολογίας, όπως έγινε μέχρι τώρα. Συγκεκριμένα, λαμβάνοντας υπόψη και τη διάσταση της ηλεκτρικής δραστηριότητας της εμφραγματικής καρδιάς, μια μελλοντική ερευνητική πρόταση θα μπορούσε να είναι η αντικατάσταση του αλγινικού ικριώματος (ολική ή μερική) από ένα άλλο υδροπήκτωμα το οποίο να έχει αγωγιμες (ηλεκτρικές) ιδιότητες, με σκοπό και την ενίσχυση της μεταφοράς του ηλεκτρικού σήματος στα καρδιομυοκύτταρα. Η αποτελεσματική καρδιακή λειτουργία απαιτεί συγχρονισμό της κοιλιακής συστολής. Μετά το έμφραγμα του μυοκαρδίου, η μη αγωγήμη φύση του ιστού της ουλής που δημιουργείται οδηγεί στην κοιλιακή δυσλειτουργία λόγω μη σωστής μετάδοσης του ηλεκτρικού σήματος στα ζωντανά καρδιομυοκύτταρα στην περιοχή του εμφράγματος (149). Η έγχυση ενός αγωγίμου βιοϋλικού αναμένεται να αποκαταστήσει εν πολλοίς τη διάδοση του ηλεκτρικού σήματος στα ζωντανά καρδιομυοκύτταρα στην περιοχή του εμφράγματος, να συγχρονίσει τη συστολή και να ενισχύσει την ηλεκτρική σύνδεση μεταξύ των απομονωμένων καρδιομυοκυττάρων και του υπόλοιπου ιστού, έχοντας ως αποτέλεσμα τη βελτίωση της συνολικής καρδιακής λειτουργίας. Αγωγή οργανικά πολυμερή περιγράφηκαν πρώτη φορά το 1977 και η ανακάλυψη αυτή οδήγησε στο βραβείο Nobel το 2000 (150, 151). Τα αγωγιμα πολυμερή είναι ιδιαίτερα ελκυστικά λόγω συνδυασμού τόσο των ηλεκτρικών ιδιοτήτων (που ομοιάζουν με αυτές των μετάλλων και των ημιαγωγών), όσο και των μηχανικών (όπως ελαστικότητα). Οι ηλεκτρικές ιδιότητες των υλικών αυτών μπορούν να προσαρμοστούν κατάλληλα, αλλάζοντας τις συνθήκες σύνθεσης και περιλαμβάνοντας και την προσθήκη συγκεκριμένων χημικών ενώσεων (152, 153). Έτσι, θα μπορούσε συγκεκριμένα να προταθεί στο αλγινικό οξύ να προσδεθεί polyglyrole (PPy) για να συντεθεί ένα ηλεκτρικά αγωγιμο alginate - PPy βιοϋλικό για την ενίσχυση της ηλεκτρικής διάδοσης κατά μήκος της ζώνης του εμφράγματος (108, 154). Το νέο αγωγιμο βιοϋλικό, σε συνδυασμό με τα φάρμακα, τους αυξητικούς παράγοντες και τα κύτταρα που προαναφέρθηκαν, προτείνεται να ελεγχθεί *in vivo* σε πειραματόζωα, με πλήρη ηλεκτροφυσιολογική μελέτη.

ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ

Π1. Παραγωγή νανοσωματιδίων Fe_2O_3 με τη μέθοδο flame spray pyrolysis (FSP)

Παραγωγή νανοσωματιδίων

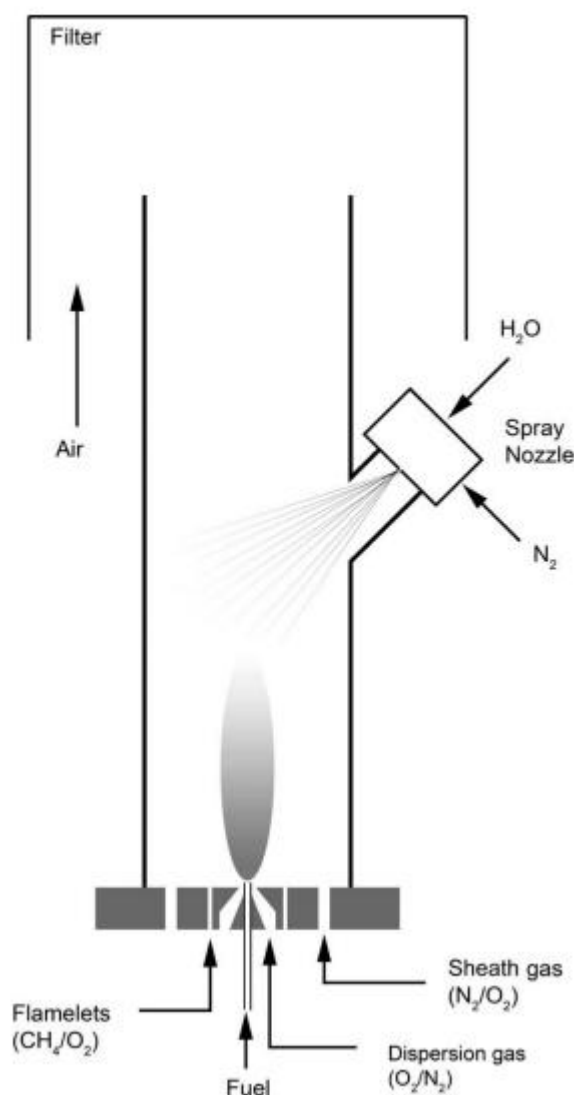
Υπάρχουν τέσσερα τμήματα σε μία τυπική διάταξη πυρόλυσης ψεκασμού φλόγας (Εικόνα 98): (1) εισαγωγή υγρού διαλύματος πρόδρομης ένωσης, (2) παραγωγή αερολύματος, (3) σχηματισμός σωματιδίων, και (4) συλλογή παραγόμενων νανοσωματιδίων.

Τα υγρά διαλύματα για FSP περιέχουν υλικά (π.χ. μέταλλα) τα οποία αναμιγνύονται με οργανικούς διαλύτες για να σχηματίσουν ένα καύσιμο μίγμα με υψηλή ενθαλπία. Οι πρόδρομες ενώσεις μετάλλου προέρχονται είτε από μεταλλικά άλατα, είτε από οργανικές ενώσεις μετάλλων. Για μικτές συνθέσεις, οι μεταλλικές πρόδρομες ενώσεις αναμιγνύονται έτσι ώστε να περιέχουν τα στοιχεία στην ακριβή στοιχειομετρία που επιθυμείται στο προϊόν. Οι διαλύτες παρέχουν μία οργανική πηγή για την εκκίνηση και τη διάδοση των θερμικών οξειδωτικών μετατροπών των μεταλλικών πρόδρομων ενώσεων σε μεταλλικές συστοιχίες ατόμων (*metal clusters*).

Το οργανικό διάλυμα διασπείρεται με μορφή αερολύματος μέσω ενός ακροφυσίου για να σχηματίσει ενεργά (*droplets*) σταγονίδια με υψηλό λόγο εμβαδού επιφάνειας προς όγκο. Η ταχύτητα των σταγονιδίων, καθώς εξέρχονται από τον ψεκαστήρα, είναι σημαντική καθώς καθορίζει το ρυθμό θέρμανσης και το χρόνο παραμονής του σταγονιδίου στη φλόγα. Για τη διασπορά του οργανικού διαλύματος μπορεί να χρησιμοποιηθεί αέριο οξυγόνο είτε αέρας, το οποίο έχει επίδραση στα χαρακτηριστικά της φλόγας. Η φλόγα με καθαρό οξυγόνο είναι πιο φωτεινή και πιο έντονη, με μέγιστη αδιαβατική θερμοκρασία περίπου 1000 K υψηλότερη από του αέρα, επειδή η φλόγες προερχόμενη από οξυγόνο έχει 13,5 φορές υψηλότερη ένταση καύσης. Στην άκρη του ακροφυσίου, η δέσμη ψεκασμού έχει υψηλή πυκνότητα σε αριθμό σταγόνων και περιβάλλεται και αναφλέγεται από ένα πίδακα φλόγας.

Κατά τη διάρκεια της σύνθεσης FSP, τα ενεργά σταγονίδια εξατμίζονται με αποτέλεσμα το σχηματισμό ατμού μετάλλου (αέριο), ο οποίος αρχίζει να πυρηνοποιείται. Η διαδικασία πυρήνωσης ακολουθείται από αύξηση της επιφάνειας του πρωτογενούς σωματιδίου. Επιπλέον, η θερμοκρασία της φλόγας μειώνεται εξαιτίας της απώλειας θερμότητας λόγω ακτινοβολίας και το υψηλό ποσοστό των αερίων που συμπαρασύρει. Σε αυτή την κατάσταση, τα πρωτογενή σωματίδια σχηματίζουν μεγαλύτερα και πυκνότερα σωματίδια (*clusters*). Αυτό το είδος του σχηματισμού σωματιδίων είναι γνωστό ως «αέριο-προς-σωματίδιο μετατροπή». Τα σωματίδια αφήνοντας

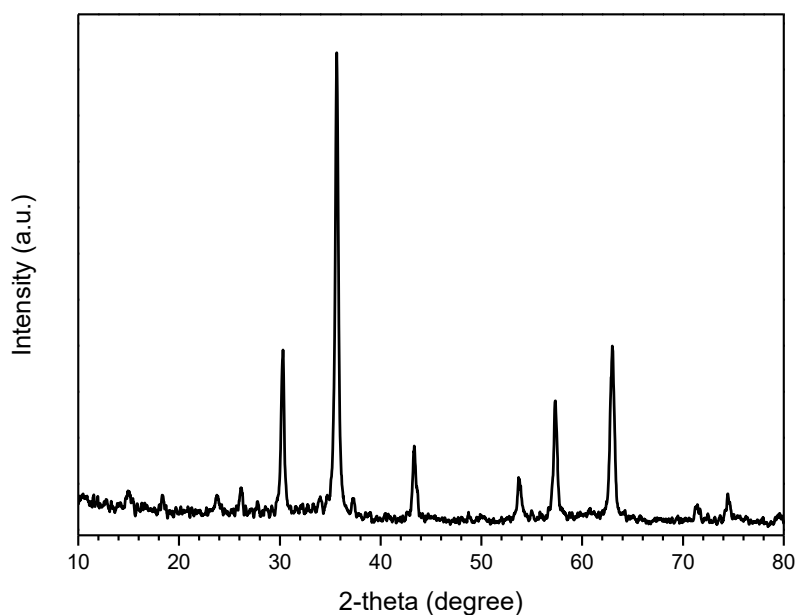
τη φλόγα, συλλέγονται με διαχωρισμό στερεών-αερίων, ο οποίος μπορεί και επιτυγχάνεται με διήθηση, με ηλεκτροστατική κατακρήμνιση, ή με μία δίνη αέρα. Άμεση εναπόθεση σε υποστρώματα με διάφορες γεωμετρίες μπορεί επίσης να πραγματοποιηθεί. Παρόλο που η γενική FSP διαδικασία περιλαμβάνει σύντομο χρόνο παραμονής για το σχηματισμό των νανοσωματιδίων (λίγα χιλιοστά του δευτερολέπτου), νανοσωματίδια υψηλής κρυσταλλικότητας και ομοιογένειας μπορούν να αποκτηθούν μέσω του σχολαστικού ελέγχου των παραμέτρων της φλόγας. Επιπλέον, υλικά φτιαγμένα από πυρόλυση ψεκασμού φλόγας είναι υψηλής καθαρότητας, χωρίς να περιέχουν καθόλου υποπροϊόντα υγρών αποβλήτων, υψηλής θερμικής σταθερότητας και μοναδικών κρυσταλλικών δομών.



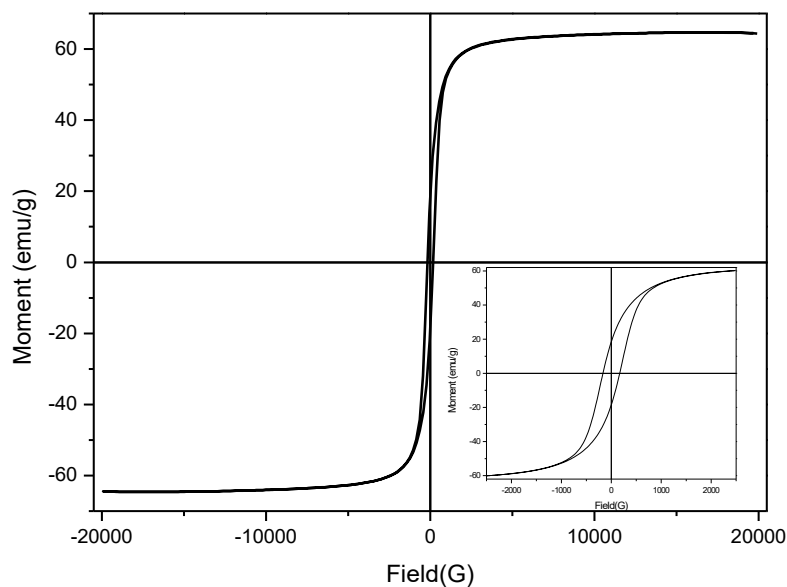
Εικόνα 98. Διάγραμμα διεργασίας FSP για τη σύνθεση Fe_xO_y υπό ελεγχόμενη ατμόσφαιρα, που οδηγεί στη παρασκευή νανοσωματιδίων έως 50 nm (128).

Χαρακτηρισμός των νανοσωματιδίων $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$

Στην Εικόνα 99 παρουσιάζονται τα περιθλασιογράφημα των νανοσωματιδίων του $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$ που παρασκευάστηκαν με τη μέθοδο FSP και χρησιμοποιήθηκαν στη παρούσα διατριβή. Στην Εικόνα 100 παρουσιάζονται οι καμπύλες μαγνήτισής τους.



Εικόνα 99. Περιθλασιογράφημα νανοσωματιδίων $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$.



Εικόνα 100. Καμπύλη μαγνήτισης νανοσωματιδίων $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$.

Π2. Input file θεωρητικών υπολογισμών DFT

```
% nproc=2
% mem=4gb
% chk=aga14gu1
# b3lyp/6-31+g(d,p) geom=connectivity
# scf=(maxcycle=1024,nosave)
# fopt=(tight,maxcycle=100)
# pop=full test
```

ONIOM optimization

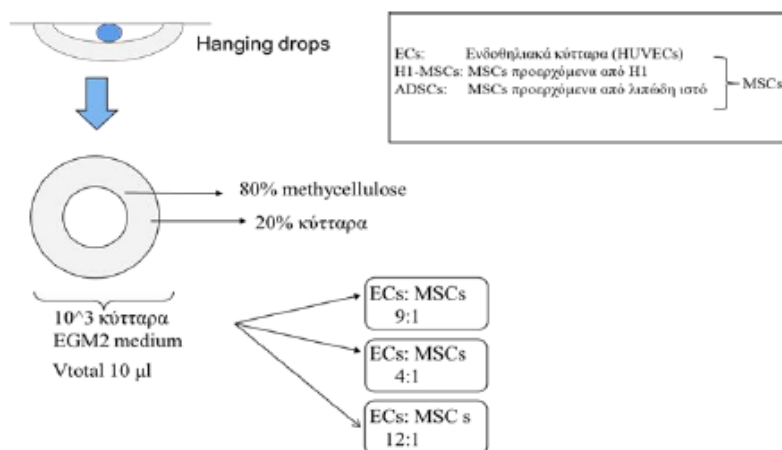
0 1

C	0	-3.31880200	-1.94641200	-0.71484100 M
C	0	-2.92614700	-0.51262400	-0.32187700 M
C	0	-3.89175900	0.43679000	0.32878000 M
C	0	-3.15200100	1.78252600	0.32507400 M
O	0	-4.22016400	0.06924200	1.68403900 M
C	0	-1.70722900	1.77231400	0.97189600 M
C	0	-0.97487100	0.38293600	0.96735700 M
O	0	-1.81467300	-0.78145000	0.70003300 M
O	0	0.05293700	0.17127600	-0.11397600 M
H	0	-2.51341400	0.04882400	-1.17579700 M
O	0	-4.45200800	-2.38826900	-0.54460400 M
H	0	-0.48487200	0.19620500	1.92451000 M
H	0	-4.76744800	0.53909700	-0.32503500 M
H	0	-4.70093200	-0.80297100	1.63041100 M
H	0	-3.74183500	2.53666400	0.85865500 M
O	0	-2.96448100	2.10318200	-1.07479200 M
H	0	-2.08587300	2.63447500	-1.01400300 M
O	0	-1.02092200	2.76744100	0.22285700 M
H	0	0.06351100	2.81619100	0.37482800 M
H	0	-1.81875500	2.01268800	2.03743500 M
O	0	-2.24170300	-2.58313400	-1.22321500 M
C	0	1.48304300	0.08687500	0.32647300 M
H	0	1.62578100	0.68580800	1.22523200 M
C	0	2.31408900	0.76212100	-0.74416700 M
C	0	1.81026800	-1.38585700	0.53798500 M
H	0	2.10725100	0.37502700	-1.75253600 M
O	0	3.72450800	0.57100500	-0.38120500 M
C	0	1.98627900	2.31073000	-0.69529200 M
O	0	1.42645300	2.64378900	0.44516900 M
O	0	2.26916200	2.99781500	-1.68045300 M
C	0	4.12964500	-0.82037000	-0.39250600 M
H	0	1.27997500	-1.80865300	1.39810400 M
C	0	3.31597400	-1.60558400	0.66807300 M
O	0	1.24970300	-2.17636700	-0.63657600 M
H	0	4.01043500	-1.26608100	-1.39100800 M
O	0	5.49364800	-0.91055500	-0.04878000 M
H	0	5.53217700	-0.58507200	0.89690500 M
H	0	1.89763000	-2.20267500	-1.38610200 M
H	0	3.56350000	-2.67068200	0.59779000 M
O	0	3.72828000	-1.00559800	1.93710600 M
H	0	3.70240300	-1.69941600	2.64835900 M
Mg	0	-0.66053300	-1.68476100	-0.69785900 H

1 2 1.0 11 2.0 21 1.0
2 3 1.0 10 1.0 8 1.0
3 4 1.0 5 1.0 13 1.0
4 6 1.0 15 1.0 16 1.0
5 14 1.0
6 7 1.0 18 1.0 20 1.0
7 8 1.0 9 1.0 12 1.0
8
9 22 1.0
10
11
12
13
14
15
16 17 1.0
17
18 19 1.0
19
20
21
22 23 1.0 24 1.0 25 1.0
23
24 26 1.0 27 1.0 28 1.0
25 32 1.0 33 1.0 34 1.0
26
27 31 1.0
28 29 1.5 30 2.0
29
30
31 33 1.0 35 1.0 36 1.0
32
33 39 1.0 40 1.0
34 38 1.0
35
36 37 1.0
37
38
39
40 41 1.0
41
42

Π3. Σχηματισμός σφαιροειδών μεθυσελλουλόζης για την ενσωμάτωση των κυττάρων HUVECs και MSCs με τη μέθοδο κρεμάμενης σταγόνας (hanging drop)

Για το σχηματισμό των σφαιροειδών μεθυσελλουλόζης εφαρμόστηκε η τεχνική των κρεμάμενων σταγόνων (hanging drops). Συγκεκριμένα, μεταφέρονται 10 μ l από το μίγμα κυττάρων/μεθυλοσελλουλόζης με μορφή σταγόνας στην εσωτερική επιφάνεια από το καπάκι ενός πιάτου διαμέτρου 10 εκατοστών (Corning #430167). Επαναλαμβάνεται η διαδικασία μέχρι να καλυφθεί όλη η επιφάνεια από το καπάκι με σταγόνες κρατώντας ασφαλή απόσταση ανάμεσά τους. Στη συνέχεια, το καπάκι αναστρέφεται με προσοχή και τοποθετείται στην κανονική του θέση πάνω από τη βάση του τρυβλίου. Μέσα στο τρυβλίο έχουν ήδη τοποθετηθεί 10 ml PBS, ώστε να διασφαλίζεται η απαραίτητη υγρασία. Τέλος, το τρυβλίο μεταφέρεται με προσοχή στον επωαστήρα των 37°C. Μετά από επώαση 2-5 ημερών ελέγχεται η δημιουργία των σφαιροειδών στο συνεστιακό μικροσκόπιο Leica SP5 (155). Με τη μέθοδο αυτή, έχουν παρασκευαστεί διαφορετικοί συνδυασμοί HUVECs και MSCs. Στη παρούσα εργασία μελετήθηκε η αναλογία HUVECs/MSCs = 9/1.

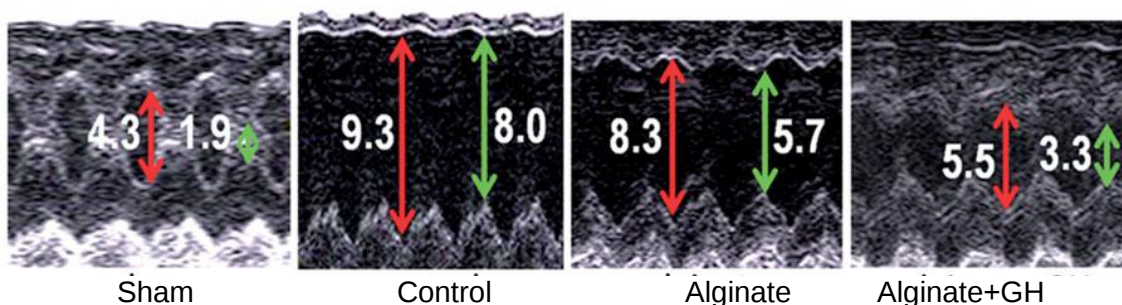


Εικόνα 101. Μέθοδος *hanging drop* που χρησιμοποιήθηκε για τη δημιουργία των σφαιριδίων και οι διαφορετικοί συνδυασμοί ενδοθηλιακών και μεσεγχυματικών κυττάρων που έχουν παρασκευαστεί με τη μέθοδο αυτή.

Π4. Πειραματικά αποτελέσματα *in vivo* πειραμάτων

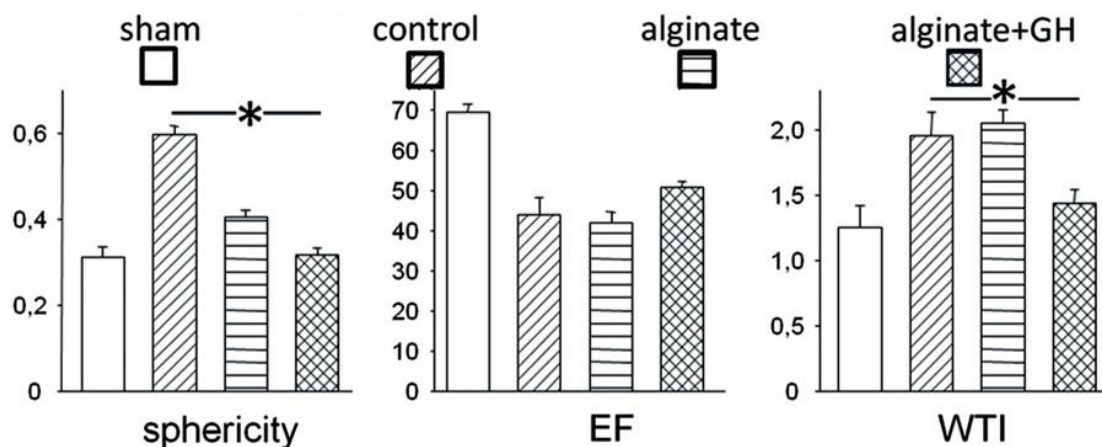
Π4.1. *In vivo* υπερηχογραφικά αποτελέσματα που ελήφθησαν από τα πειράματα ελέγχου της επίδρασης του αλγινικού υδροπηκτώματος με GH στην αναδιαμόρφωση της αριστερής κοιλίας

Στην Εικόνα 102 παρουσιάζονται η τελοδιαστολική και η συστολική διάμετρος της αριστερής κοιλίας για τις 4 ομάδες μελέτης του Πίνακα 7. Η τελοδιαστολική διάμετρος της αριστερής κοιλίας ήταν μικρότερη στην ομάδα Alginate+GH ($5,61 \pm 0,35\text{mm}$) σε σύγκριση με την ομάδα ελέγχου ($7,92 \pm 0,34\text{mm}$, $p < 0,001$) ή την ομάδα του Alginate ($7,21 \pm 0,33\text{mm}$, $p = 0,002$). Οι τιμές ήταν παρόμοιες με εκείνες της ομάδας εικονικής επέμβασης ($5,05 \pm 0,32\text{mm}$). Η τελοσυστολική διάμετρος στην ομάδα του Alginate+GH ($3,12 \pm 0,21\text{mm}$) ήταν παρόμοια με αυτήν της ομάδας εικονικής επέμβασης ($2,55 \pm 0,37\text{mm}$) και μικρότερη από αυτήν της ομάδας ελέγχου ($6,28 \pm 0,48\text{mm}$, $p < 0,001$) και της ομάδας του Alginate ($4,58 \pm 0,38\text{mm}$, $p = 0,032$).



Εικόνα 102. Τελοδιαστολική και συστολική διάμετρος αριστερής κοιλίας για τις 4 ομάδες μελέτης του Πίνακα 7.

Οι τιμές του κλάσματος εξώθησης ήταν χαμηλότερες στις εμφραγματικές ομάδες, σε σύγκριση με την ομάδα εικονικής επέμβασης ($69,4 \pm 1,9\%$), όπως ήταν αναμενόμενο. Μεταξύ των εμφραγματικών ομάδων, το κλάσμα εξώθησης ήταν μεγαλύτερο στην ομάδα Alginate+GH ($50,7 \pm 1,5\%$) (Εικόνα 103).

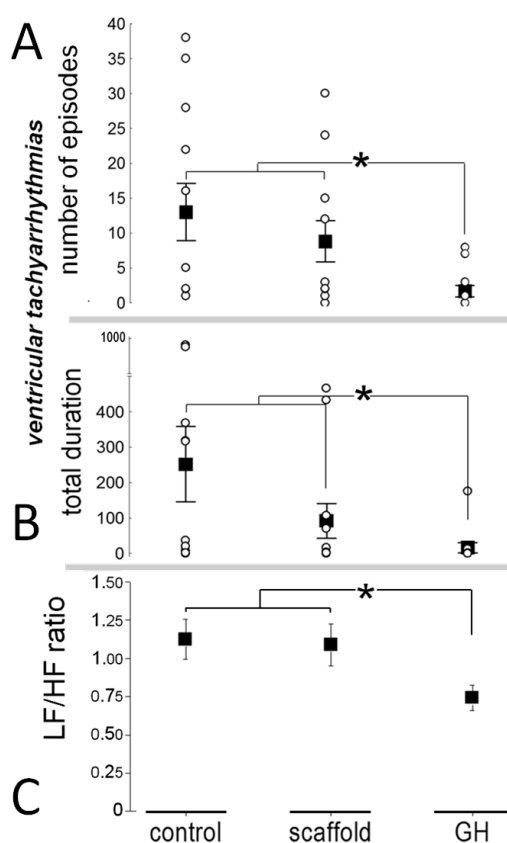


Εικόνα 103. Σφαιρικότητα, κλάσμα εξώθησης και δείκτης τοιχωματικής τάσης για τις 4 ομάδες μελέτης του Πίνακα 7.

Στην Εικόνα 103 παρουσιάζονται επίσης, τα αποτελέσματα της σφαιρικότητας, του κλάσματος εξώθησης και του δείκτη τοιχωματικής τάσης για τις 4 ομάδες μελέτης του Πίνακα 7. Ο δείκτης σφαιρικότητας στην ομάδα Alginate+GH ($0,317 \pm 0,017$) ήταν σχεδόν ίδιος με αυτόν της ομάδας εικονικής επέμβασης ($0,312 \pm 0,025$), και βελτιωμένος σε σχέση με την ομάδα ελέγχου ($0,598 \pm 0,019$, $p < 0,001$) και την ομάδα του Alginate ($0,406 \pm 0,015$, $p = 0,0023$).

Π4.2. Πειραματικά αποτελέσματα μελέτης VTs που ελήφθησαν κατά τον έλεγχο της επίδρασης του αλγινικού υδροπηκτώματος, χωρίς και με GH, στις κοιλιακές αρρυθμίες έπειτα από πρόκληση ισχαιμίας – επαναιμάτωσης στην οξεία φάση

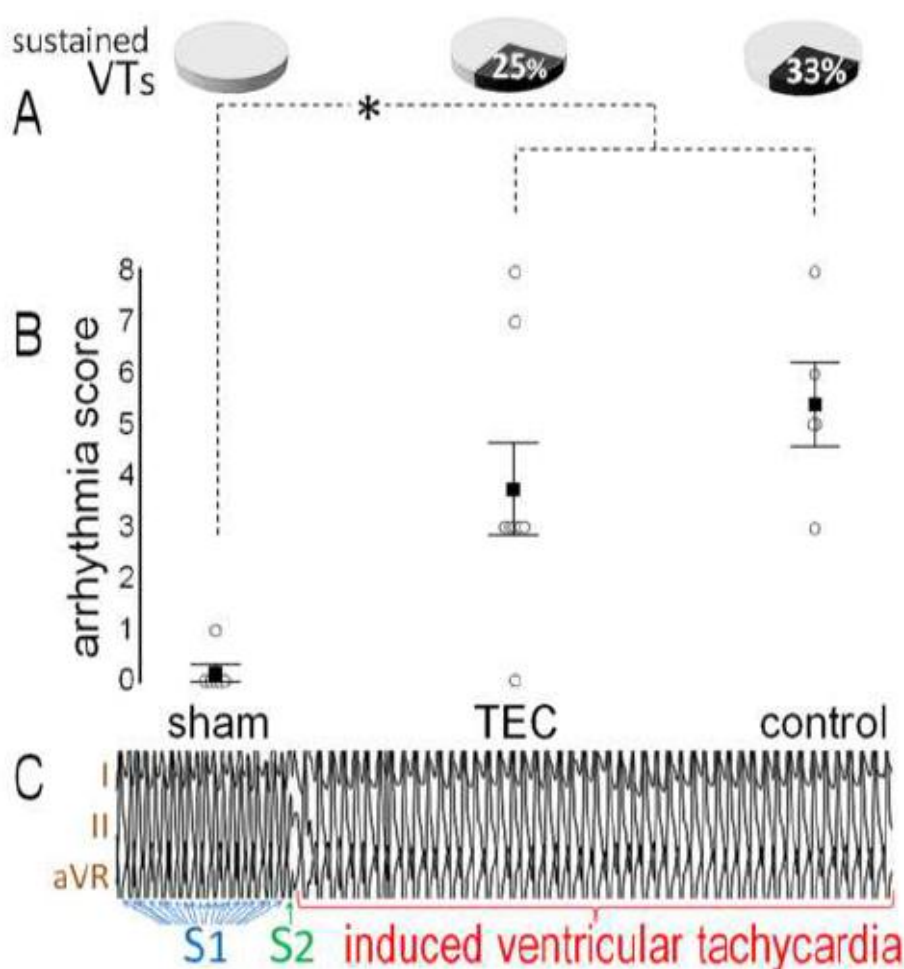
Στην Εικόνα 104 παρουσιάζονται τα αποτελέσματα από την ανάλυση κοιλιακών ταχυκαρδιών για τις 3 ομάδες μελέτης του Πίνακα 8. Η μέση διάρκεια κάθε επεισοδίου δεν διέφερε ανάμεσα στις τρεις ομάδες μελέτης ($F=0.8$, $p=0.4$). Καμία διαφορά δεν παρατηρήθηκε στον αριθμό και στη συνολική διάρκεια των VT/VF επεισοδίων, μεταξύ της ομάδας εμφύτευσης του βιοϋλικού (χωρίς GH) και της ομάδας ελέγχου. Σε αντίθεση, παρατηρήθηκαν λιγότερα επεισόδια VT/VF έπειτα από χορήγηση βιοϋλικού με αυξητική ορμόνη (ομάδα Alginate+GH), σε σύγκριση με την ομάδα ελέγχου ($p<0,01$). Επομένως, η συνολική VT-διάρκεια ήταν χαμηλότερη στην ομάδα μελέτης Alginate+GH, σε σύγκριση με την ομάδα ελέγχου ($p<0.01$) και την ομάδα Alginate ($p=0.014$).



Εικόνα 104. Αποτελέσματα από την ανάλυση κοιλιακών ταχυκαρδιών για τις 3 ομάδες μελέτης του Πίνακα 8.

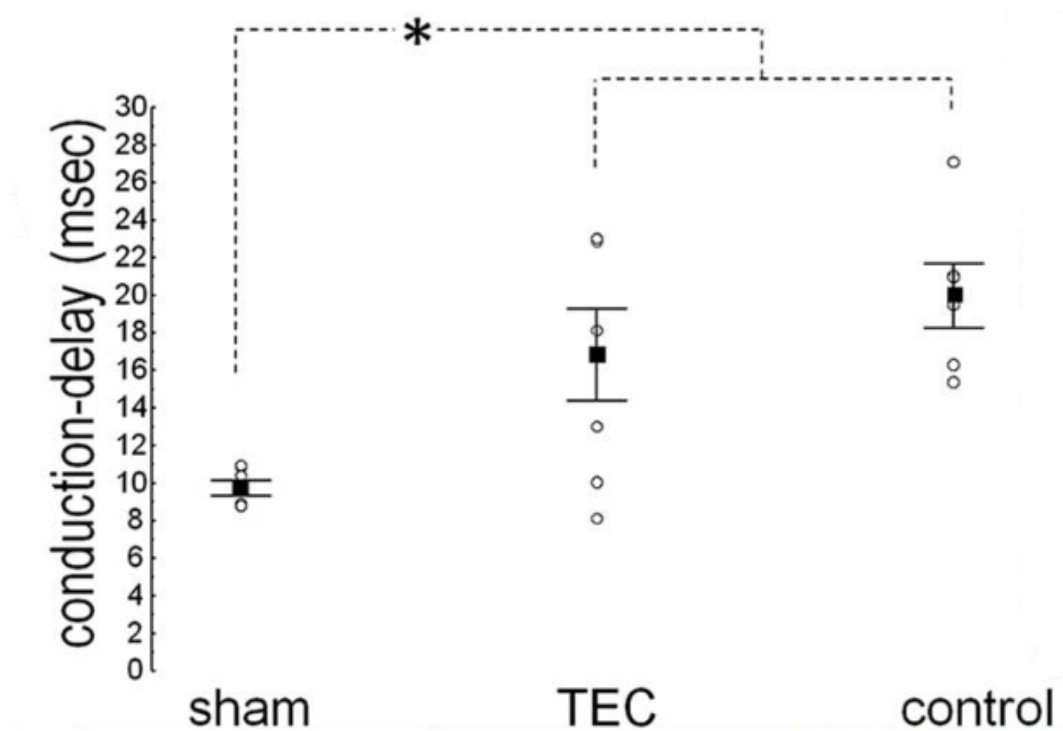
Π4.3. Πειραματικά αποτελέσματα από τον έλεγχο της επίδρασης του TEC στις κοιλιακές αρρυθμίες έπειτα από οξύ έμφραγμα, στη χρόνια φάση

Στην Εικόνα 105 παρουσιάζονται τα αποτελέσματα της καταγραφής των κοιλιακών ταχυκαρδιών στις 3 ομάδες μελέτης του Πίνακα 10. Σύμφωνα με τα αποτελέσματα αυτά, από την προγραμματισμένη ηλεκτρική διέγερση (PES) δεν προκλήθηκαν VTs στα πειραματόζωα της ομάδας εικονικής επέμβασης. Σε αντίθεση, υψηλές τιμές VTs καταγράφηκαν σε 2 πειραματόζωα της ομάδας TEC (25%) και σε 2 πειραματόζωα της ομάδας ελέγχου (33%).



Εικόνα 105. Καταγραφή κοιλιακών ταχυκαρδιών στις 3 ομάδες μελέτης του Πίνακα 10.

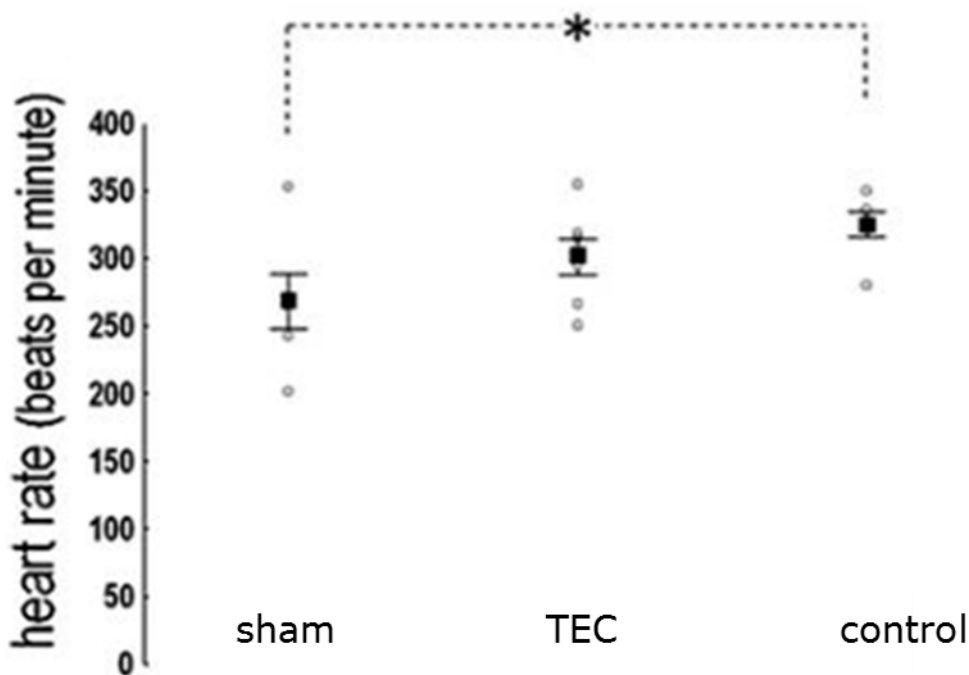
Στην Εικόνα 106 παρουσιάζονται τα αποτελέσματα της καθυστέρησης της αγωγιμότητας στις 3 ομάδες μελέτης του Πίνακα 10. Σύμφωνα με αυτά, η καθυστέρηση της αγωγιμότητας δεν διέφερε ($p=0.24$) ανάμεσα στην ομάδα ελέγχου και στην ομάδα TEC. Χαμηλότερες τιμές καταγράφηκαν στην ομάδα εικονικής επέμβασης, σε σύγκριση με την ομάδα ελέγχου ($p=0.0017$) και την ομάδα TEC ($p=0.015$).



Εικόνα 106. Καθυστέρηση της αγωγιμότητας (*conduction delay*) στις 3 ομάδες μελέτης του Πίνακα 10.

Σύμφωνα με τις καταγραφές MAP στην αριστερή κοιλία, η αύξηση της κλίσης της φάσης 0 (dV/dt_{max}) ήταν χαμηλότερη στις ομάδες όπου προκλήθηκε έμφραγμα από ότι στην ομάδα εικονικής επέμβασης ($p < 0.01$). Παρόλα αυτά, οι τιμές ήταν συγκρίσιμες ($p = 0.22$) μεταξύ της ομάδας ελέγχου και της ομάδας TEC.

Δύο εβδομάδες μετά το έμφραγμα, οι καρδιακοί παλμοί ήταν λιγότεροι ($p = 0.019$) στην ομάδα εικονικής επέμβασης, σε σύγκριση με την ομάδα ελέγχου. Η διαφορά που παρατηρείται ανάμεσα στην ομάδα TEC και στην ομάδα ελέγχου δεν είναι στατιστικά σημαντική (Εικόνα 107).



Εικόνα 107. Καρδιακός ρυθμός (heart rate).

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΚΕΣ ΑΝΑΦΟΡΕΣ

1. Π. Τουτούζας ΧΜ. Καρδιακές Παθήσεις. Αθήνα: Εκδόσεις Παρισιάνος; 1992.
2. Μουτσόπουλος ΧΜ. Βασικές Αρχές Παθοφυσιολογίας. Αθήνα: Ιατρικές Εκδόσεις; 2010.
3. Κωλέττης ΘΜ. Ηλεκτροφυσιολογία της καρδιάς. Αθήνα: Εκδόσεις Π.Χ. Πασχαλίδης; 2008.
4. Κωλέττης ΘΜ. Παθοφυσιολογία της καρδιάς. Αθήνα: Ελληνικά Ηλεκτρονικά Ακαδημαϊκά Συγγράμματα; 2015.
5. Ruvinov E, Sapir Y, Cohen S. Cardiac Tissue Engineering. In: Principles, Materials, and Applications. Morgan & Claypool; 2012.
6. Γουδέβενος ΙΑ, Κωλέττης ΘΜ. Συστηματική Ερμηνεία Ηλεκτροκαρδιογραφήματος. Ιωάννινα: Εκδόσεις Εφύρα.
7. Streeter DD, Jr., Spotnitz HM, Patel DP, Ross J, Jr., Sonnenblick EH. Fiber orientation in the canine left ventricle during diastole and systole. *Circ Res*. 1969;24(3):339-47.
8. Jawad H, Ali NN, Lyon AR, Chen QZ, Harding SE, Boccaccini AR. Myocardial tissue engineering: a review. *J Tissue Eng Regen Med*. 2007;1(5):327-42.
9. Silvestri A, Boffito M, Sartori S, Ciardelli G. Biomimetic materials and scaffolds for myocardial tissue regeneration. *Macromol Biosci*. 2013;13(8):984-1019.
10. Priori SG, Blomstrom-Lundqvist C, Mazzanti A, Blom N, Borggrefe M, Camm J, et al. 2015 ESC Guidelines for the management of patients with ventricular arrhythmias and the prevention of sudden cardiac death: The Task Force for the Management of Patients with Ventricular Arrhythmias and the Prevention of Sudden Cardiac Death of the European Society of Cardiology (ESC) Endorsed by: Association for European Paediatric and Congenital Cardiology (AEPC). *Eur Heart J*. 2015;36(41):2793-867.
11. Τζίκας Α. Οξύ Έμφραγμα Μυοκαρδίου. 2015 [cited 2016 21-5-2016]; Available from: <http://www.apostolostzikas.gr/heart-attack/>.
12. Berk BC, Fujiwara K, Lehoux S. ECM remodeling in hypertensive heart disease. *J Clin Invest*. 2007;117(3):568-75.
13. Cohen S, Leor J. Rebuilding broken hearts. Biologists and engineers working together in the fledgling field of tissue engineering are within reach of one of their greatest goals: constructing a living human heart patch. *Sci Am*. 2004;291(5):44-51.
14. Eaton LW, Weiss JL, Bulkley BH, Garrison JB, Weisfeldt ML. Regional cardiac dilatation after acute myocardial infarction: recognition by two-dimensional echocardiography. *N Engl J Med*. 1979;300(2):57-62.
15. Kolettis TM, Vilaeti A, Dimos K, Tsitou N, Agathopoulos S. Tissue engineering for post-myocardial infarction ventricular remodeling. *Mini Rev Med Chem*. 2011;11(3):263-70.

16. Collins N. Coronary stenting: how does it work? 2011 [cited 2016 21-5-2016]; Available from: <http://www.telegraph.co.uk/news/uknews/theroyalfamily/8977422/Coronary-stenting-how-does-it-work.html>.
17. Lima JA, Becker LC, Melin JA, Lima S, Kallman CA, Weisfeldt ML, et al. Impaired thickening of nonischemic myocardium during acute regional ischemia in the dog. *Circulation*. 1985;71(5):1048-59.
18. Ye Z, Zhou Y, Cai H, Tan W. Myocardial regeneration: Roles of stem cells and hydrogels. *Adv Drug Deliv Rev*. 2011;63(8):688-97.
19. Agathopoulos S, Kolettis TM. Editorial: Novel strategies for cardiac repair post-myocardial infarction. *Curr Pharm Des*. 2014;20(12):1925-9.
20. Kolettis TM, Vilaeti A, Dimos K, Tsitou N, Agathopoulos S. Tissue engineering for post-myocardial infarction ventricular remodeling. *Mini-Reviews in Medicinal Chemistry*. 2011;11(3):263-70. doi: 10.2174/138955711795049853.
21. Buddy D. Ratner, Allan S. Hoffman, Frederick J. Schoen, Lemons JE. *Biomaterials Science*. Third ed 2013.
22. Peter X. Ma JE. *Scaffolding In Tissue Engineering*: CRC press; 2006.
23. Kopeček J. Hydrogel Biomaterials: A Smart Future? *Biomaterials*. 2007;28(34):5185-92. doi: 10.1016/j.biomaterials.2007.07.044.
24. Leor J, Amsalem Y, Cohen S. Cells, scaffolds, and molecules for myocardial tissue engineering. *Pharmacol Ther*. 2005;105(2):151-63.
25. Leor J, Cohen S. Myocardial tissue engineering: creating a muscle patch for a wounded heart. *Ann N Y Acad Sci*. 2004:312-9.
26. BD Ratner AH, FJ Schoen and JE Lemons *Biomaterials Science: Introduction to Materials in Medicine*, 2nd Edition: Elsevier Academic Press 2004.
27. Tallawi M, Rosellini E, Barbani N, Cascone MG, Rai R, Saint-Pierre G, et al. Strategies for the chemical and biological functionalization of scaffolds for cardiac tissue engineering: a review. *J R Soc Interface*. 2015;12(108):20150254.
28. Vunjak-Novakovic G, Tandon N, Godier A, Maidhof R, Marsano A, Martens TP, et al. Challenges in cardiac tissue engineering. *Tissue Eng Part B Rev*. 2010;16(2):169-87.
29. Guyette JP, Charest JM, Mills RW, Jank BJ, Moser PT, Gilpin SE, et al. Bioengineering Human Myocardium on Native Extracellular Matrix. *Circulation Research*. 2016;118(1):56-72. doi: 10.1161/circresaha.115.306874.
30. Barabadi Z, Azami M, Sharifi E, Karimi R, Lotfibakhshaiesh N, Roozafzoon R, et al. Fabrication of hydrogel based nanocomposite scaffold containing bioactive glass nanoparticles for myocardial tissue engineering. *Materials Science and Engineering C*. 2016;69:1137-46. doi: 10.1016/j.msec.2016.08.012.
31. Hasan A, Khatlab A, Islam MA, Hweij KA, Zeitouny J, Waters R, et al. Injectable Hydrogels for Cardiac Tissue Repair after Myocardial Infarction. *Adv Sci*. 2015;2(11).

32. Laurienzo P, Fernandes JC, Collic-Jouault S, Fitton JH. The Use of Natural Polysaccharides as Biomaterials. *BioMed Research International*. 2015;2015:242378. doi: 10.1155/2015/242378.
33. Hall MS, Long R, Feng X, Huang Y, Hui CY, Wu M. Toward single cell traction microscopy within 3D collagen matrices. *Exp Cell Res*. 2013;319(16):2396-408.
34. Sirry MS, Butler JR, Patnaik SS, Brazile B, Bertucci R, Claude A, et al. Infarcted rat myocardium: Data from biaxial tensile and uniaxial compressive testing and analysis of collagen fibre orientation. *Data Brief*. 2016;8:1338-43.
35. Silverstein ME, Keown K, Owen JA, Chvapil M. Collagen fibers as a fleece hemostatic agent. *J Trauma*. 1980;20(8):688-94.
36. Kofidis T, Akhyari P, Wachsmann B, Boublik J, Mueller-Stahl K, Leyh R, et al. A novel bioartificial myocardial tissue and its prospective use in cardiac surgery. *Eur J Cardiothorac Surg*. 2002;22(2):238-43.
37. Gaballa MA, Sunkomat JN, Thai H, Morkin E, Ewy G, Goldman S. Grafting an acellular 3-dimensional collagen scaffold onto a non-transmural infarcted myocardium induces neo-angiogenesis and reduces cardiac remodeling. *J Heart Lung Transplant*. 2006;25(8):946-54.
38. Chachques JC, Trainini JC, Lago N, Masoli OH, Barisani JL, Cortes-Morichetti M, et al. Myocardial assistance by grafting a new bioartificial upgraded myocardium (MAGNUM clinical trial): one year follow-up. *Cell Transplant*. 2007;16(9):927-34.
39. Schussler O, Coirault C, Louis-Tisserand M, Al-Chare W, Oliviero P, Menard C, et al. Use of arginine-glycine-aspartic acid adhesion peptides coupled with a new collagen scaffold to engineer a myocardium-like tissue graft. *Nat Clin Pract Cardiovasc Med*. 2009;6(3):240-9.
40. Wang H, Zhou J, Liu Z, Wang C. Injectable cardiac tissue engineering for the treatment of myocardial infarction. *J Cell Mol Med*. 2010;14(5):1044-55.
41. Lu WN, Lu SH, Wang HB, Li DX, Duan CM, Liu ZQ, et al. Functional improvement of infarcted heart by co-injection of embryonic stem cells with temperature-responsive chitosan hydrogel. *Tissue Eng Part A*. 2009;15(6):1437-47.
42. Anker SD, Coats AJ, Cristian G, Dragomir D, Pusineri E, Piredda M, et al. A prospective comparison of alginate-hydrogel with standard medical therapy to determine impact on functional capacity and clinical outcomes in patients with advanced heart failure (AUGMENT-HF trial). *Eur Heart J*. 2015;36(34):2297-309.
43. Rowley JA, Madlambayan G, Mooney DJ. Alginate hydrogels as synthetic extracellular matrix materials. *Biomaterials*. 1999;20(1):45-53.
44. Stilhano RS, Madrigal JL, Wong K, Williams PA, Martin PK, Yamaguchi FS, et al. Injectable alginate hydrogel for enhanced spatiotemporal control of lentivector delivery in murine skeletal muscle. *J Control Release*. 2016;237:42-9.

45. Landa N, Miller L, Feinberg MS, Holbova R, Shachar M, Freeman I, et al. Effect of injectable alginate implant on cardiac remodeling and function after recent and old infarcts in rat. *Circulation*. 2008;117(11):1388-96.
46. Rocca DG, Willenberg BJ, Qi Y, Simmons CS, Rubiano A, Ferreira LF, et al. An injectable capillary-like microstructured alginate hydrogel improves left ventricular function after myocardial infarction in rats. *Int J Cardiol*. 2016;220:149-54.
47. Orr S, Strominger I, Eremenko E, Vinogradov E, Ruvinov E, Monsonego A, et al. TGF-beta affinity-bound to a macroporous alginate scaffold generates local and peripheral immunotolerant responses and improves allocell transplantation. *Acta Biomater*. 2016;11(16):30402-0.
48. Lim GB. Heart failure: Alginate-hydrogel in chronic HF. *Nat Rev Cardiol*. 2015;12(8):7.
49. Sandvig I, Karstensen K, Rokstad AM, Aachmann FL, Formo K, Sandvig A, et al. RGD-peptide modified alginate by a chemoenzymatic strategy for tissue engineering applications. *J Biomed Mater Res A*. 2015;103(3):896-906.
50. Hao X, Silva EA, Mansson-Broberg A, Grinnemo KH, Siddiqui AJ, Dellgren G, et al. Angiogenic effects of sequential release of VEGF-A165 and PDGF-BB with alginate hydrogels after myocardial infarction. *Cardiovasc Res*. 2007;75(1):178-85.
51. Bidarra SJ, Barrias CC, Fonseca KB, Barbosa MA, Soares RA, Granja PL. Injectable in situ crosslinkable RGD-modified alginate matrix for endothelial cells delivery. *Biomaterials*. 2011;32(31):7897-904.
52. Klouda L, Mikos AG. Thermoresponsive hydrogels in biomedical applications. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*. 2008;68(1):34-45. doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ejpb.2007.02.025>.
53. VandeVondele S, Voros J, Hubbell JA. RGD-grafted poly-L-lysine-graft-(polyethylene glycol) copolymers block non-specific protein adsorption while promoting cell adhesion. *Biotechnol Bioeng*. 2003;82(7):784-90.
54. Kim J, Lee KW, Hefferan TE, Currier BL, Yaszemski MJ, Lu L. Synthesis and evaluation of novel biodegradable hydrogels based on poly(ethylene glycol) and sebacic acid as tissue engineering scaffolds. *Biomacromolecules*. 2008;9(1):149-57.
55. Vilaeti AD, Dimos K, Lampri ES, Mantzouratou P, Tsitou N, Mourouzis I, et al. Short-term ventricular restraint attenuates post-infarction remodeling in rats. *International Journal of Cardiology*. 2013;165(2):278-84. doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ijcard.2011.08.036>.
56. Draget KI, Smidsrød O, Skjåk-Bræk G. Alginates from Algae. *Biopolymers Online: Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA*; 2005.
57. Sun J, Tan H. Alginate-Based Biomaterials for Regenerative Medicine Applications. *Materials*. 2013;6(4):1285-309.
58. Lee KY, Mooney DJ. Alginate: Properties and biomedical applications. *Progress in Polymer Science*. 2012;37(1):106-26. doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.progpolymsci.2011.06.003>.

59. Augst AD, Kong HJ, Mooney DJ. Alginate hydrogels as biomaterials. *Macromol Biosci.* 2006;6(8):623-33.
60. Kuo CK, Ma PX. Ionically crosslinked alginate hydrogels as scaffolds for tissue engineering: Part 1. Structure, gelation rate and mechanical properties. *Biomaterials.* 2001;22(6):511-21. doi: [http://dx.doi.org/10.1016/S0142-9612\(00\)00201-5](http://dx.doi.org/10.1016/S0142-9612(00)00201-5).
61. Somo SI, Khanna O, Brey EM. Alginate Microbeads for Cell and Protein Delivery. *Methods Mol Biol.* 2017:217-24.
62. Tonnesen HH, Karlsen J. Alginate in drug delivery systems. *Drug Dev Ind Pharm.* 2002;28(6):621-30.
63. Lee S, Kim YC, Park JH. Zein-alginate based oral drug delivery systems: Protection and release of therapeutic proteins. *Int J Pharm.* 2016;515(1-2):300-6.
64. Hecht H, Srebnik S. Structural Characterization of Sodium Alginate and Calcium Alginate. *Biomacromolecules.* 2016;17(6):2160-7. doi: 10.1021/acs.biomac.6b00378.
65. Lee KY, Rowley JA, Eiselt P, Moy EM, Bouhadir KH, Mooney DJ. Controlling Mechanical and Swelling Properties of Alginate Hydrogels Independently by Cross-Linker Type and Cross-Linking Density. *Macromolecules.* 2000;33(11):4291-4. doi: 10.1021/ma9921347.
66. Zhao X, Huebsch N, Mooney DJ, Suo Z. Stress-relaxation behavior in gels with ionic and covalent crosslinks: *J Appl Phys.* 2010 Mar 15;107(6):063509. Epub 2010 Mar 23 doi:10.1063/1.3343265.
67. Ruvinov E, Cohen S. Alginate biomaterial for the treatment of myocardial infarction: Progress, translational strategies, and clinical outlook: From ocean algae to patient bedside. *Advanced Drug Delivery Reviews.* 2016;96:54-76. doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.addr.2015.04.021>.
68. Andersen T, Melvik JE, G  ser  d O, Alsberg E, Christensen BE. Ionically gelled alginate foams: Physical properties controlled by type, amount and source of gelling ions. *Carbohydrate Polymers.* 2014;99(0):249-56. doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.carbpol.2013.08.036>.
69. Μπάρκα ΕΓ. Ανάπτυξη βιοϋλικών για ανάταξη κατεστραμμένων ιστών του μυοκαρδίου μετά από οξύ έμφραγμα. Ιωάννινα: Πανεπιστήμιο Ιωαννίνων; 2012.
70. Quong D, Neufeld RJ, Skjak-Braek G, Poncelet D. External versus internal source of calcium during the gelation of alginate beads for DNA encapsulation. *Biotechnol Bioeng.* 1998;57(4):438-46.
71. Detsch R, Sarker B, Zehnder T, Frank G, Boccaccini AR. Advanced alginate-based hydrogels. *Materials Today.* 2015;18(10):590-1. doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.mattod.2015.10.013>.
72. Topuz F, Henke A, Richtering W, Groll J. Magnesium ions and alginate do form hydrogels: a rheological study. *Soft Matter.* 2012;8(18):4877-81. doi: 10.1039/c2sm07465f.
73. Agulhon P, Markova V, Robitzer M, Quignard F, Mineva T. Structure of alginate gels: interaction of diuronate units with divalent cations from density functional calculations. *Biomacromolecules.* 2012;13(6):1899-907.

74. Leor J, Tuvia S, Guetta V, Manczur F, Castel D, Willenz U, et al. Intracoronary injection of in situ forming alginate hydrogel reverses left ventricular remodeling after myocardial infarction in Swine. *J Am Coll Cardiol*. 2009;54(11):1014-23.
75. Kristiansen KA, Tomren HB, Christensen BE. Periodate oxidized alginates: Depolymerization kinetics. *Carbohydrate Polymers*. 2011;86(4):1595-601. doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.carbpol.2011.06.069>.
76. Tous E, Purcell B, Ifkovits JL, Burdick JA. Injectable acellular hydrogels for cardiac repair. *J Cardiovasc Transl Res*. 2011;4(5):528-42.
77. Lee J, Lee KY. Injectable microsphere/hydrogel combination systems for localized protein delivery. *Macromol Biosci*. 2009;9(7):671-6.
78. Rinaudo M. Biomaterials based on a natural polysaccharide: alginate. *TIP*. 2014;17(1):92-6. doi: [http://dx.doi.org/10.1016/S1405-888X\(14\)70322-5](http://dx.doi.org/10.1016/S1405-888X(14)70322-5).
79. Swioklo S, Constantinescu A, Cannon CJ. Alginate-Encapsulation for the Improved Hypothermic Preservation of Human Adipose-Derived Stem Cells. *Stem Cells Transl Med*. 2016;5(3):339-49.
80. Darnell M, Sun JY, Mehta M, Johnson C, Arany P, Suo Z, et al. Performance and Biocompatibility of Extremely Tough Alginate/Polyacrylamide Hydrogels: Biomaterials. 2013 Nov;34(33):8042-8. Epub 2013 Jul 26 doi:10.1016/j.biomaterials.2013.06.061.
81. Tam SK, Dusseault J, Bilodeau S, Langlois G, Halle JP, Yahia L. Factors influencing alginate gel biocompatibility. *J Biomed Mater Res A*. 2011;98(1):40-52.
82. Giunchedi P, Gavini E, Moretti MDL, Pirisino G. Evaluation of alginate compressed matrices as prolonged drug delivery systems: AAPS PharmSciTech. 2000 Sep;1(3):31-6. Epub 2000 Jun 30 doi:10.1208/pt010319.
83. Zhao Y, Li F, Carvajal MT, Harris MT. Interactions between bovine serum albumin and alginate: An evaluation of alginate as protein carrier. *Journal of Colloid and Interface Science*. 2009;332(2):345-53. doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jcis.2008.12.048>.
84. Leonard M, De Boisseson MR, Hubert P, Dalençon F, Dellacherie E. Hydrophobically modified alginate hydrogels as protein carriers with specific controlled release properties. *Journal of Controlled Release*. 2004;98(3):395-405. doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jconrel.2004.05.009>.
85. Hatzistergos KE, Mitsi AC, Zachariou C, Skyrilas A, Kapatou E, Agelaki MG, et al. Randomised comparison of growth hormone versus IGF-1 on early post-myocardial infarction ventricular remodelling in rats. *Growth hormone & IGF research : official journal of the Growth Hormone Research Society and the International IGF Research Society*. 2008;18(2):157-65.
86. Baumann GP. Growth hormone isoforms. *Growth Horm IGF Res*. 2009;19(4):333-40.
87. Elaiopoulos DA, Tsalikakis DG, Agelaki MG, Baltogiannis GG, Mitsi AC, Fotiadis DI, et al. Growth hormone decreases phase II ventricular

- tachyarrhythmias during acute myocardial infarction in rats. Clin Sci. 2007;112(7):385-91.
88. Fazio S, Sabatini D, Capaldo B, Vigorito C, Giordano A, Guida R, et al. A preliminary study of growth hormone in the treatment of dilated cardiomyopathy. N Engl J Med. 1996;334(13):809-14.
89. Genth-Zotz S, Zotz R, Geil S, Voigtlander T, Meyer J, Darius H. Recombinant growth hormone therapy in patients with ischemic cardiomyopathy : effects on hemodynamics, left ventricular function, and cardiopulmonary exercise capacity. Circulation. 1999;99(1):18-21.
90. Rodness J, Mihic A, Miyagi Y, Wu J, Weisel RD, Li RK. VEGF-loaded microsphere patch for local protein delivery to the ischemic heart. Acta Biomater. 2016;12(16):009.
91. Daskalopoulos EP, Vilaeti AD, Barka E, Mantzouratou P, Kouroupis D, Kontonika M, et al. Attenuation of post-infarction remodeling in rats by sustained myocardial growth hormone administration. Growth Factors. 2015;12:1-9.
92. Gilchrist RK, Medal R, Shorey WD, Hanselman RC, Parrott JC, Taylor CB. Selective Inductive Heating of Lymph Nodes. Annals of Surgery. 1957;146(4):596-606.
93. Schwertmann U, Cornell RM. The Iron Oxides. Iron Oxides in the Laboratory: Wiley-VCH Verlag GmbH; 2007. p. 5-18.
94. Hafeli U, Schutt W, Teller J, Zborowski M. Scientific and clinical applications of magnetic carriers. New York: Plenum Press; 1997.
95. Zhang H, Wu P, Zhu Z, Wang Y. Interaction of gamma-Fe(2)O(3) nanoparticles with fibrinogen. Spectrochim Acta A Mol Biomol Spectrosc. 2015;151:40-7.
96. Serna CJ, Morales MP. Maghemite (γ -Fe₂O₃): A Versatile Magnetic Colloidal Material. In: Matijević E, Borkovec M, editors. Surface and Colloid Science. Boston, MA: Springer US; 2004. p. 27-81.
97. Cui H, Liu Y, Ren W. Structure switch between α -Fe₂O₃, γ -Fe₂O₃ and Fe₃O₄ during the large scale and low temperature sol-gel synthesis of nearly monodispersed iron oxide nanoparticles. Advanced Powder Technology. 2013;24(1):93-7. doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.apt.2012.03.001>.
98. Lee BH, Li B, Guelcher SA. Gel Microstructure Regulates Proliferation and Differentiation of MC3T3-E1 Cells Encapsulated in Alginate Beads: Acta Biomater. 2012 May;8(5):1693-702. Epub 2012 Jan 18 doi:10.1016/j.actbio.2012.01.012.
99. Tian S, Liu Q, Gnatovskiy L, Ma PX, Wang Z. Heart Regeneration with Embryonic Cardiac Progenitor Cells and Cardiac Tissue Engineering. Journal of stem cell and transplantation biology. 2015;1(1):104. doi: 10.19104/jstb.2015.104.
100. Sapir Y, Kryukov O, Cohen S. Integration of multiple cell-matrix interactions into alginate scaffolds for promoting cardiac tissue regeneration. Biomaterials. 2011;32(7):1838-47.

101. Lee J, Cuddihy MJ, Kotov NA. Three-dimensional cell culture matrices: state of the art. *Tissue Eng Part B Rev.* 2008;14(1):61-86.
102. Sapir Y, Cohen S, Friedman G, Polyak B. The promotion of in vitro vessel-like organization of endothelial cells in magnetically responsive alginate scaffolds. *Biomaterials.* 2012;33(16):4100-9. doi: 10.1016/j.biomaterials.2012.02.037.
103. Westhrin M, Xie M, Olderoy MO, Sikorski P, Strand BL, Standal T. Osteogenic differentiation of human mesenchymal stem cells in mineralized alginate matrices. *PLoS ONE.* 2015;10(3).
104. Korff T, Kimmina S, Martiny-Baron G, Augustin HG. Blood vessel maturation in a 3-dimensional spheroidal coculture model: direct contact with smooth muscle cells regulates endothelial cell quiescence and abrogates VEGF responsiveness. *Faseb J.* 2001;15(2):447-57.
105. Prestwich GD. Simplifying the extracellular matrix for 3-D cell culture and tissue engineering: a pragmatic approach. *J Cell Biochem.* 2007;101(6):1370-83.
106. Yu J, Gu Y, Du KT, Mihardja S, Sievers RE, Lee RJ. The effect of injected RGD modified alginate on angiogenesis and left ventricular function in a chronic rat infarct model. *Biomaterials.* 2009;30(5):751-6.
107. Rosso F, Giordano A, Barbarisi M, Barbarisi A. From cell-ECM interactions to tissue engineering. *J Cell Physiol.* 2004;199(2):174-80.
108. Mihic A, Cui Z, Wu J, Vlacic G, Miyagi Y, Li SH, et al. A Conductive Polymer Hydrogel Supports Cell Electrical Signaling and Improves Cardiac Function After Implantation into Myocardial Infarct. *Circulation.* 2015;132(8):772-84.
109. Kontonika M, Barka E, Daskalopoulos EP, Vilaeti AD, Papalois A, Agathopoulos S, et al. Effects of Myocardial Alginate Injections on Ventricular Arrhythmias after Experimental Ischemiareperfusion. *Trends Biomater Artif Organs.* 2014;28(2):79-82.
110. Suarez SL, Rane AA, Munoz A, Wright AT, Zhang SX, Braden RL, et al. Intramyocardial injection of hydrogel with high interstitial spread does not impact action potential propagation. *Acta Biomater.* 2015;26:13-22.
111. Moscou L, Lub S. Practical use of mercury porosimetry in the study of porous solids. *Powder Technology.* 1981;29(1):45-52. doi: [http://dx.doi.org/10.1016/0032-5910\(81\)85003-6](http://dx.doi.org/10.1016/0032-5910(81)85003-6).
112. Becker TA, Kipke DR, Brandon T. Calcium alginate gel: a biocompatible and mechanically stable polymer for endovascular embolization. *J Biomed Mater Res.* 2001;54(1):76-86.
113. Rocca DGD, Willenberg BJ, Qi Y, Simmons CS, Rubiano A, Ferreira LF, et al. An injectable capillary-like microstructured alginate hydrogel improves left ventricular function after myocardial infarction in rats. *International Journal of Cardiology.* 2016;220:149-54. doi: 10.1016/j.ijcard.2016.06.158.
114. Bockstedte M, Kley A, Neugebauer J, Scheffler M. Density-functional theory calculations for poly-atomic systems: electronic structure, static and elastic properties and ab initio molecular dynamics. *Computer Physics*

- Communications. 1997;107(1):187-222. doi: [http://dx.doi.org/10.1016/S0010-4655\(97\)00117-3](http://dx.doi.org/10.1016/S0010-4655(97)00117-3).
115. Görling A. Density-functional theory beyond the Hohenberg-Kohn theorem. *Physical Review A*. 1999;59(5):3359-74.
 116. Wong MW. Vibrational frequency prediction using density functional theory. *Chemical Physics Letters*. 1996;256(4):391-9. doi: [http://dx.doi.org/10.1016/0009-2614\(96\)00483-6](http://dx.doi.org/10.1016/0009-2614(96)00483-6).
 117. Nagasawa N, Mitomo H, Yoshii F, Kume T. Radiation-induced degradation of sodium alginate. *Polymer Degradation and Stability*. 2000;69(3):279-85. doi: [http://dx.doi.org/10.1016/S0141-3910\(00\)00070-7](http://dx.doi.org/10.1016/S0141-3910(00)00070-7).
 118. Davidovich-Pinhas M, Bianco-Peled H. A quantitative analysis of alginate swelling. *Carbohydrate Polymers*. 2010;79(4):1020-7. doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.carbpol.2009.10.036>.
 119. Carbodiimide Crosslinker Chemistry. 2016 [cited 2016 28.11.2016]; Available from: www.thermofisher.com.
 120. Hermanson GT. *Bioconjugate Techniques*. Third ed. London; 2013.
 121. Polyak B, Geresh S, Marks RS. Synthesis and characterization of a biotin-alginate conjugate and its application in a biosensor construction. *Biomacromolecules*. 2004;5(2):389-96.
 122. Schmitt A, Rödel P, Anamur C, Seeliger C, Imhoff AB, Herbst E, et al. Calcium Alginate Gels as Stem Cell Matrix – Making Paracrine Stem Cell Activity Available for Enhanced Healing after Surgery. *PLoS ONE*. 2015;10(3):e0118937. doi: 10.1371/journal.pone.0118937.
 123. Pitts KL, Fenech M. An Analytic Study on the Effect of Alginate on the Velocity Profiles of Blood in Rectangular Microchannels Using Microparticle Image Velocimetry. *PLoS ONE*. 2013;8(8):e72909. doi: 10.1371/journal.pone.0072909.
 124. Bouhadir KH, Hausman DS, Mooney DJ. Synthesis of cross-linked poly(aldehyde guluronate) hydrogels. *Polymer*. 1999;40(12):3575-84. doi: [http://dx.doi.org/10.1016/S0032-3861\(98\)00550-3](http://dx.doi.org/10.1016/S0032-3861(98)00550-3).
 125. Καραναστάσης Α. Ανάπτυξη και χαρακτηρισμός σύνθετων νανοϋβριδικών υλικών [Διδακτορική Διατριβή]: Πανεπιστήμιο Ιωαννίνων; 2016.
 126. Bouhadir KH, Lee KY, Alsberg E, Damm KL, Anderson KW, Mooney DJ. Degradation of partially oxidized alginate and its potential application for tissue engineering. *Biotechnol Prog*. 2001;17(5):945-50.
 127. Evangelista MB, Hsiong SX, Fernandes R, Sampaio P, Kong HJ, Barrias CC, et al. Upregulation of bone cell differentiation through immobilization within a synthetic extracellular matrix. *Biomaterials*. 2007;28(25):3644-55.
 128. Strobel R, Pratsinis SE. Direct synthesis of maghemite, magnetite and wustite nanoparticles by flame spray pyrolysis. *Advanced Powder Technology*. 2009;20(2):190-4. doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.appt.2008.08.002>.
 129. Maltabe V, Barka E, Kontonika M, Florou D, Kouvara- Pritsouli M, Roumpi M, et al. Isolation of an ES-derived cardiovascular multipotent cell

- population based on VE-cadherin promoter activity. Stem Cells International. 2016;in press.
130. Μαλταμπέ Β. Μηχανισμοί διαφοροποίησης εμβρυονικών βλαστικών κυττάρων προς κυτταρικούς τύπους μεσοδερμικής προέλευσης [Διδακτορική διατριβή]: Πανεπιστήμιο Ιωαννίνων; 2015.
131. Violetta Maltabe, Eleonora Barka, Marianthi Kontonika, Dimitra Florou, Maria Kouvara- Pritsouli, Maria Roumpi, et al. Isolation of an ES-derived cardiovascular multipotent cell population based on VE-cadherin promoter activity. Stem Cells International. 2016;in press.
132. Βιλαέτη Α. Επίδραση των αυξητικών παραγόντων και βιολογικών ικριωμάτων στο μυοκάρδιο της αριστερής κοιλίας μετά το οξύ έμφραγμα. Πειραματική μελέτη. [Διδακτορική Διατριβή]. Ιωάννινα: Πανεπιστήμιο Ιωαννίνων; 2015.
133. Ruvinov E, Leor J, Cohen S. The promotion of myocardial repair by the sequential delivery of IGF-1 and HGF from an injectable alginate biomaterial in a model of acute myocardial infarction. Biomaterials. 2011;32(2):565-78. doi: 10.1016/j.biomaterials.2010.08.097.
134. Lee SW, Kim SH, Kim JY, Lee Y. The effect of growth hormone on fibroblast proliferation and keratinocyte migration. J Plast Reconstr Aesthet Surg. 2010;63(4):22.
135. Kolettis TM. Arrhythmogenesis after cell transplantation post-myocardial infarction. Four burning questions–And some answers. Cardiovascular Research. 2006;69(2):299-301. doi: 10.1016/j.cardiores.2005.12.007.
136. Κοντονίκα Μ. Επίδραση αυξητικών παραγόντων προσδεσμένων σε βιολογικό ικρίωμα στη μετεμφραγματική αρρυθμιογένεση - Πειραματική μελέτη. [Διδακτορική Διατριβή]. Υπό συγγραφή: Πανεπιστήμιο Ιωαννίνων; 2016.
137. Kontonika M, Barka E, Roumpi M, Vilaeti AD, Baltogiannis GG, Vlahos AP, et al. Intra-myocardial growth hormone administration ameliorates arrhythmogenesis during ischemia-reperfusion in rats. J Electrocardiol. 2016;18(16):30274-6.
138. Kontonika M, Barka E, Roumpi M, La Rocca V, P. Daskalopoulos EP, Vilaeti AD, et al. Prolonged intra-myocardial growth hormone administration ameliorates post-infarction electrophysiologic remodeling in rats. Growth Factors. 2016;Submitted.
139. Tabata Y. Biomaterials technology indispensable for regenerative medicine. 6th international conference on materials science and technologies, ROMAT. Bucharest, Romania 2016.
140. Andersen T, Auk-Emblem P, Dornish M. 3D Cell Culture in Alginate Hydrogels. Microarrays. 2015;4(2):133.
141. Granja P. Personal communication. 2014.
142. Tabata Y. Personal communication. 2016.
143. O'Sullivan JF, Leblond AL, Kelly G, Kumar AH, Metharom P, Buneker CK, et al. Potent long-term cardioprotective effects of single low-dose insulin-like growth factor-1 treatment postmyocardial infarction. Circ Cardiovasc Interv. 2011;4(4):327-35.

144. Silva EA, Mooney DJ. Effects of VEGF temporal and spatial presentation on angiogenesis. *Biomaterials*. 2010;31(6):1235-41.
145. Qu F, Zhu G, Lin H, Zhang W, Sun J, Li S, et al. A controlled release of ibuprofen by systematically tailoring the morphology of mesoporous silica materials. *Journal of Solid State Chemistry*. 2006;179(7):2027-35. doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jssc.2006.04.002>.
146. Wang X, Lin KSK, Chan JCC, Cheng S. Direct Synthesis and Catalytic Applications of Ordered Large Pore Aminopropyl-Functionalized SBA-15 Mesoporous Materials. *The Journal of Physical Chemistry B*. 2005;109(5):1763-9. doi: 10.1021/jp045798d.
147. Tao Q, Xu Z, Wang J, Liu F, Wan H, Zheng S. Adsorption of humic acid to aminopropyl functionalized SBA-15. *Microporous and Mesoporous Materials*. 2010;131(1-3):177-85. doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.micromeso.2009.12.018>.
148. Ozdil E, Carlson TA, Massumi A. Use of amiodarone in the postmyocardial infarction patient. *Texas Heart Institute Journal*. 1995;22(1):40-3.
149. Ruschitzka F, Abraham WT, Singh JP, Bax JJ, Borer JS, Brugada J, et al. Cardiac-resynchronization therapy in heart failure with a narrow QRS complex. *N Engl J Med*. 2013;369(15):1395-405.
150. Miller JS. The 2000 Nobel Prize in Chemistry—A Personal Accolade. *ChemPhysChem*. 2000;1(4):229-30. doi: 10.1002/1439-7641(20001215)1:4<229::aid-cphc229>3.0.co;2-j.
151. Tanaka K, Murashima M, Yamabe T. Synthesis of electrically conductive organic thin film by plasma polymerization of 3,4,9,10-perylenetetracarboxylic dianhydride. *Solid State Communications*. 1988;67(2):159-61. doi: [http://dx.doi.org/10.1016/0038-1098\(88\)90955-6](http://dx.doi.org/10.1016/0038-1098(88)90955-6).
152. Zhang QS, Yan YH, Li SP, Feng T. Synthesis of a novel biodegradable and electroactive polyphosphazene for biomedical application. *Biomed Mater*. 2009;4(3):1748-6041.
153. Schmidt CE, Shastri VR, Vacanti JP, Langer R. Stimulation of neurite outgrowth using an electrically conducting polymer. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1997;94(17):8948-53.
154. Kai D, Prabhakaran MP, Jin G, Ramakrishna S. Polypyrrole-contained electrospun conductive nanofibrous membranes for cardiac tissue engineering. *J Biomed Mater Res A*. 2011;99(3):376-85.
155. Μάρκου Μ. Διαφοροποίηση προγονικών αγγειακών κυττάρων σε ικρίωματα για τη δημιουργία in vitro αγγειωμένων τεχνητών ιστών [Διπλωματική εργασία]. Ιωάννινα: Πανεπιστήμιο Ιωαννίνων 2015.

ΣΥΝΤΟΜΟ ΒΙΟΓΡΑΦΙΚΟ ΣΗΜΕΙΩΜΑ

Ι. ΣΤΟΙΧΕΙΑ ΒΙΟΓΡΑΦΙΚΟΥ

Α. ΑΤΟΜΙΚΑ ΣΤΟΙΧΕΙΑ

Όνομα : Ελεονώρα
Επώνυμο : Μπάρκα
Όν. Πατρός : Γεώργιος
Όν. Μητρός : Λαμπρινή
Χρον. Γεννήσεως : 18 Οκτωβρίου 1989
Τόπος Γεννήσεως : Ιωάννινα
Οικ. Κατάσταση : Έγγαμη

Β. ΑΚΑΔΗΜΑΪΚΟΙ ΤΙΤΛΟΙ

1. Διπλωματούχος Τμήματος Μηχανικών Επιστήμης Υλικών Πανεπιστημίου Ιωαννίνων, 2012 (7.74, "Λίαν Καλώς").
2. Υποψήφια Διδάκτωρ Τμήματος Μηχανικών Επιστήμης Υλικών Πανεπιστημίου Ιωαννίνων (2012-2016).

Τίτλος Διδακτορικής Διατριβής: «Κατασκευή και χαρακτηρισμός βιοαποδομούμενων ιστοτεχνολογικών ικρωμάτων για την πρόληψη της αναδιαμόρφωσης της αριστερής κοιλίας μετά το οξύ έμφραγμα του μυοκαρδίου»

Συμβουλευτική Επιτροπή: Σ. Αγαθόπουλος (Επιβλέπων, Αναπληρωτής Καθηγητής Τ.Μ.Ε.Υ), Θ. Κωλέττης (Καθηγητής Καρδιολογίας, Ιατρική σχολή), Μ. Καρακασίδης (Καθηγητής Τ.Μ.Ε.Υ)

Γ. ΣΠΟΥΔΕΣ – ΕΡΕΥΝΗΤΙΚΗ ΔΡΑΣΤΗΡΙΟΤΗΤΑ

1995-2000 :Δημοτικό Σχολείο, Ελεούσα Ιωαννίνων.

2001-2003 :Γυμνάσιο, Ελεούσα Ιωαννίνων.

2004-2006 :Λύκειο, Ελεούσα Ιωαννίνων.

2007-2012 :Πανεπιστημιακές Σπουδές, Τμήμα Μηχανικών Επιστήμης Υλικών, Πανεπιστήμιο Ιωάννινα, Ιωάννινα.

2012-2016 : Μεταπτυχιακές Σπουδές (Υποψήφια Διδάκτωρ).

Τμήμα Μηχανικών Επιστήμης Υλικών

Εργαστήριο Κεραμικών και Σύνθετων Υλικών, Πανεπιστήμιο Ιωαννίνων, Ιωάννινα.

Δ. ΜΕΛΟΣ ΕΠΙΣΤΗΜΟΝΙΚΩΝ ΕΤΑΙΡΕΙΩΝ

1. Ερευνητικό Μέλος, Ερευνητικό Καρδιαγγειακό Ινστιτούτο (Care Institute), Ιωάννινα & Αθήνα. (www.careinstitute.gr).
2. Ελληνική Εταιρία Εμβιομηχανικής (ΕΛΕΜΒΙΟ) (associated member of the International Society of Biomechanics).
3. Ελληνική Εταιρεία Βιοϋλικών (ΕΕΒ) (associated member of the European Society of Biomaterials).
4. Ελληνική Κεραμική Εταιρεία (ΕΚΕ).

Ε. ΕΠΙΜΟΡΦΩΣΗ

- ✓ Παρακολούθηση του σεμιναρίου «Εισαγωγή στην ELISA», Ελληνική Εταιρία Βιοϊατρικών Ερευνών (Bioprobe), 24-25/02/2013, Θεσσαλονίκη.
- ✓ Certification on **Laboratory Animal Science European Union Functions Course** (Felasa Category A,B,C) (*LAS Course as stated in article 23 of the Directive 2010/63/EU, according to European Felasa Directions, on experimental animals (Mice & Rats), KAT Hospital, Athens, November 2015*).
- ✓ Επιτυχής παρακολούθηση μαθημάτων Διδακτορικών Σπουδών:
 - Τεχνικές χαρακτηρισμού υλικών - αναλυτικές τεχνικές (Φασματοσκοπικές / τεχνικές μικροσκοπίας, θεωρία - εργαστηριακές ασκήσεις)
 - Μηχανική Βιολογικών Ιστών
 - Προχωρημένα Θέματα Βιοϊατρικής Τεχνολογίας

ΣΤ. ΣΥΜΜΕΤΟΧΗ ΣΕ ΕΡΓΑ

- ✓ «Επίδραση βιολογικού ικριώματος και αυξητικής ορμόνης στην αναδιαμόρφωση της αριστεράς κοιλίας μετά από έμφραγμα του μυοκαρδίου σε επίμυες». Το έργο αυτό διεξήχθη στο πειραματικό εργαστήριο του Ερευνητικού Καρδιαγγειακού Ινστιτούτου, στα πλαίσια του προγράμματος υποτροφιών του Ερευνητικού Κέντρου της Φαρμακοβιομηχανίας ΕΛΠΕΝ (2012-2016).

Ζ. ΒΡΑΒΕΥΣΕΙΣ

1. Βραβείο 2^{ης} καλύτερης εργασίας νέων ερευνητών στο 5^ο Πανελλήνιο Συνέδριο της Ελληνικής Εταιρείας Εμβιομηχανικής (ΕΛΕΜΒΙΟ), Θεσσαλονίκη, 28-29/09/2012.
2. "Young Researcher Travel Award for 2013" from the Hellenic Society of Biomechanics for participating at the ESB 2013, 25-28 August 2013, Patras, Greece.
3. 1^ο βραβείο καλύτερης παρουσίασης εργασίας νέου ερευνητή στο 2^ο Διεθνές Συνέδριο Αθλητικών Επιστημών, Κέντρο Διάδοσης Ερευνητικών

Αποτελεσμάτων Α.Π.Θ. (ΚΕ.Δ.Ε.Α.), 25-27 Νοεμβρίου 2016, στη συνεδρία της ΕΛΕΜΒΙΟ, με την εργασία "Κατασκευή καινοτόμων ικριωμάτων της ιστικής μηχανικής με χρήση νανο-υλικών για τη στοχευμένη απελευθέρωση αυξητικής ορμόνης για την αναγέννηση του ιστού του εμφραγματικού μυοκαρδίου" με συγγραφείς τους Χ.Παππά, Ε. Μπάρκα, Δ. Παπαγιάννη, Κ. Τριανταφυλλίδη και Σ. Αγαθόπουλο.

ΙΙ. ΕΠΙΚΟΥΡΙΚΟ ΔΙΔΑΚΤΙΚΟ ΕΡΓΟ ΣΤΟ ΤΜΗΜΑ ΜΗΧΑΝΙΚΩΝ ΕΠΙΣΤΗΜΗΣ ΥΛΙΚΩΝ ΤΟΥ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟΥ ΙΩΑΝΝΙΝΩΝ

Ακαδημαϊκό έτος 2012-2013:

- Εργαστήρια μαθήματος «Φυσικοχημείας»
- Εργαστήρια μαθήματος «Γενικής και Ανόργανης Χημείας»
- Εργαστήρια μαθήματος «Υλικά ΙΙ»
- Διπλωματικές Εργασίες:
 - Γιακαλή Κατερίνα
 - Σαγάνη Θεοδώρα
 - Τζόκα Μαρία
 - Ευθυμιάδη Ιωάννα
 - Κάρκαλου Μαριλένα

Ακαδημαϊκό Έτος 2013-2014:

- Εργαστήρια μαθήματος «Φυσικοχημείας»
- Εργαστήρια μαθήματος «Υλικά ΙΙ»
- Εργαστήρια μαθήματος «Ανόργανης Χημείας»
- Διπλωματική Εργασία:
 - Περπερή Αθηνά

Ακαδημαϊκό Έτος 2014-2015:

- Εργαστήρια μαθήματος «Φυσικοχημείας»
- Εργαστήρια μαθήματος «Υλικά ΙΙ»

Ακαδημαϊκό Έτος 2015-2016:

- Εργαστήρια μαθήματος «Φυσικοχημείας»
- Εργαστήρια μαθήματος «Υλικά ΙΙ»
- Διπλωματικές Εργασίες:
 - Παππά Χριστίνα
 - Μούγιος Νίκος (Τελειόφοιτος τμήματος Βιολογικών Εφαρμογών και Τεχνολογιών)

III. ΕΡΕΥΝΗΤΙΚΟ ΕΡΓΟ

A. ΔΗΜΟΣΙΕΥΣΕΙΣ ΣΕ ΕΠΙΣΤΗΜΟΝΙΚΑ ΠΕΡΙΟΔΙΚΑ ΜΕ ΚΡΙΤΕΣ

1. Theofilos M. Kolettis, Dimitrios L. Oikonomidis, Maria-Eleni E. Baibaki, Eleonora Barka, Marianthi Kontonika, Dimitrios G. Tsalikakis, Apostolos Papalois, Zenon S. Kyriakides, *Endothelin B-receptors and sympathetic activation: Impact on ventricular arrhythmogenesis during acute myocardial infarction*, *Life Sciences*, (2014), 118(2):281-7.
2. Marianthi Kontonika, Eleonora Barka, Evangelos P. Daskalopoulos, Agapi D. Vilaeti, Apostolos Papalois, Simeon Agathopoulos, Theofilos M. Kolettis, *Effects of Myocardial Alginate Injections on Ventricular Arrhythmias after Experimental Ischemia Reperfusion*, *Trends Biomater Artif Organs*, (2014); 28:79-82.
3. Theofilos M. Kolettis, Marianthi Kontonika, Eleonora Barka, Evangelos P. Daskalopoulos, Giannis G. Baltogiannis, Christos Tourmousoglou, Apostolos Papalois, Zinon Kyriakides, *Central Sympathetic Activation and Arrhythmogenesis during Acute Myocardial Infarction: Modulating Effects of Endothelin-B Receptors*, *Front Cardiovasc Med*. (2015); 2:6
4. Evangelos P. Daskalopoulos,* Agapi D. Vilaeti,* Eleonora Barka,* Polyxeni Mantzouratou, Dimitrios Kouroupis, Marianthi Kontonika, Christos Tourmousoglou, Apostolos Papalois, WM. Blankesteyn, Simeon Agathopoulos, Theofilos M. Kolettis, *Attenuation of post-infarction remodeling in rats by sustained myocardial growth hormone administration*. *Growth Factors*, (2015);12:1-9. *: *Equal Contribution of the first three authors*
5. Marianthi Kontonika, Eleonora Barka, Maria Roumpi, Agapi D. Vilaeti, Giannis G. Baltogiannis, Antonis P. Vlahos, S. Agathopoulos, Theofilos M. Kolettis, *Intra-myocardial growth hormone administration ameliorates arrhythmogenesis during ischemia-reperfusion in rats*. *Journal of Electrocardiology*, 2016;18(16):30274-30276.
6. Violetta Baltabe, Eleonora Barka, Marianthi Kontonika, Dimitra Florou, Maria Kouvara- Pritsouli, Maria Roympi, Simeon Agathopoulos, Theofilos M. Kolettis, Panos Kouklis, *Isolation of an ES-derived cardiovascular multipotent cell population based on VE-cadherin promoter activity*, *Stem Cells International*, (2016). In press.
7. Eleonora Barka et al, *Medium-term electrophysiologic effects of cardiac repair by tissue engineering construct implantation after myocardial infarction in rats*. Under Preparation.
8. Marianthi Kontonika, Eleonora Barka, et al, *Prolonged intra-myocardial growth hormone administration ameliorates post-infarction*

electrophysiologic remodeling in rats. Growth Factors, (2016). Submitted.

9. Eleonora Barka, Dimitris Papayiannis, Simeon Agathopoulos, *Influence of Ca-ion concentration in the chelating behavior of alginate hydrogels*. Under Preparation.

B. ΠΑΡΟΥΣΙΑΣΕΙΣ ΣΕ ΕΠΙΣΤΗΜΟΝΙΚΑ ΣΥΝΕΔΡΙΑ

1. Κ. Δήμος, Ε. Μπάρκα, Α. Βιλαέτη, Α. Παπαλόης, Θ. Κωλέττης και Σ. Αγαθόπουλος, *Βιοδιασπώμενα ικριώματα από αλγινικό οξύ για εμφύτευση στο μυοκάρδιο, 5^ο Πανελλήνιο Συνέδριο Ελληνικής Εταιρείας Εμβιομηχανικής ΕΛΕΜΒΙΟ, 28-29/9/2012, Θεσσαλονίκη.*
2. Ε. Barka, Κ. Dimos, A.D. Vilaeti, Th. M. Kolettis, S. Agathopoulos, *Rheological properties of biodegradable hydrogels of alginate and PEG for myocardial tissue engineering applications, European Society Congress of Biomechanics 2013, 25-28/8/2013, Patra*
3. Ε. Μπάρκα, Α. Γιακαλή, Θ. Σαγάνη, Κ. Δήμος, Α. Βιλαέτη, Μ. Κοντονίκα, Α. Παπαλόης, Θ. Κωλέττης, Σ. Αγαθόπουλος, *Ανάπτυξη νέων βιοδιασπώμενων ικριωμάτων με βάση την πολυαιθυλενογλυκόλη (PEG) και το αλγινικό οξύ για εμφύτευση στο μυοκάρδιο μετά από οξύ έμφραγμα, 8^η Διημερία Ελληνικής Εταιρείας Βιοϋλικών, 15-16/11/2013, Αθήνα.*
4. Γ. Τόρη, Μ. Πέτσιος, Μ. Καβαλιωτη, Α. Σκαμνέλου, Ε. Καναβού, Ε. Μπάρκα, P. Valerio, F.N. Oktar, Σ. Αγαθόπουλος, *Παρασκευή τρισδιάστατων βιοκεραμικών ικριωμάτων HA και β-TCP με υδροθερμικό μετασχηματισμό κελυφών σουπιάς και κοραλλιού, 8^η Διημερία Ελληνικής Εταιρείας Βιοϋλικών, 15-16/11/2013, Αθήνα.*
5. Ε. Μπάρκα, Μ. Τζόκα, Ι. Ευθυριάδη, Μ. Κάρκαλου, Ε. Καναβού, Σ. Αγαθόπουλος, *Ανάπτυξη νέων σύνθετων βιοδιασπώμενων πορωδών ικριωμάτων από σωματίδια ενώσεων φωσφορικού ασβεστίου (HA και TCP) διεσπαρμένων σε πολυμερική μήτρα από αλγινικό οξύ, 6^ο Πανελλήνιο Συνέδριο Κεραμικών, 2-4/4/2014, Εθνικό Μετσόβειο Πολυτεχνείο, Αθήνα.*
6. Μ. Καβαλιωτη, Γ. Τόρη, Μ. Πέτσιο, Α. Σκαμνέλου, Ε. Καναβού, Ε. Μπάρκα, F.N. Oktar, P. Valerio, Σ. Αγαθόπουλο, *Υδροθερμικός μετασχηματισμός CaCO₃ (αραγωνίτη, ασβεστίτη) κελυφών σε βιοκεραμικά HA και TCP, 6^ο Πανελλήνιο Συνέδριο Κεραμικών, 2-4/4/2014, Εθνικό Μετσόβειο Πολυτεχνείο, Αθήνα.*
7. Κ. Giaka, Ε. Barka, C. Tourmousoglou, M. Roumpi, D. Chatzistefanidis, T.M. Kolettis TM, S. Markoula, *Chronic prolongation of QT and RR intervals in an animal epilepsy model, 11th European Congress on Epileptology, 29/6/2014-3/7/2014, Stocholm, Sweden.*

8. E. P. Daskalopoulos, A. D. Vilaeti, E. Barka, P. Mantzouratou, M. Kontonika, A. Papalois, C. Pantos, WM. Blankesteyn, S. Agathopoulos, TM. Kolettis, *Post infarction adverse remodeling in rats is attenuated by local growth hormone administration via an alginate scaffold*, *European Society of Cardiology (ESC) Congress 2015*, London, United Kingdom.
9. M. Tzoka, E. Barka, I. Gkiatas, M. G. Lykissas, I. P. Kostas-Agnantis, A. E. Beris, S. Agathopoulos, *Synthesis, characterization and in vivo performance of novel porous bioresorbable composite scaffolds with an alginate-chitosan polymeric matrix and dispersed particles of Ca-phosphates (HA and β -TCP) for bone tissue engineering applications*, *Bioceramics 27 International Congress 2015*, Bali, Indonesia.
10. E. Barka, A. Vilaeti, E. Daskalopoulos, P. Mantzouratou, D. Kouroupis, M. Kontonika, Ch. Tourmousoglou, A. Papalois, C. Pantos, W. M. Blankesteyn, Th. Kolettis, S. Agathopoulos, *Post-infarction remodeling in rats by sustained myocardial growth hormone administration*, Ομιλία στη Κοινή Ελληνοϊταλική Συνεδρία Νέων Ερευνητών, 10^η Επετειακή Εκδήλωση της Ελληνικής Εταιρείας Βιοϋλικών, 26-28/11/2015, Εθνικό Ίδρυμα Ερευνών, Αθήνα.
11. Ε. Μπάρκα, Δ. Κουρούπης, Ε. Μπαγκλή, Α. Βιλαέτη, Μ. Κοντονίκα, Α. Παπαλόης, Θ. Φώτσης, Θ. Κωλέπτης, Σ. Αγαθόπουλος, *Σχεδιασμός και ανάπτυξη νέου εμφυτεύματος της ιστοτεχνολογίας για αναγέννηση μυός σε εμφραγματικό μυοκάρδιο*, Αναρτημένη Ανακοίνωση, 10^η Επετειακή Εκδήλωση της Ελληνικής Εταιρείας Βιοϋλικών, 26-28/11/2015, Εθνικό Ίδρυμα Ερευνών, Αθήνα.
12. Μ. Τζόκα, Ε. Μπάρκα, Γ. Τόρη, Ι. Γκιάτας, Μ. Λυκίσσας, Ι. Κώστας-Αγνάντης, Α. Μπερής, Σ. Αγαθόπουλος, *Κατασκευή και χαρακτηρισμός σύνθετων πορωδών ικριωμάτων υδροπηκτωμάτων αλγινικού οξέος και χιτοζάνης και βιοκεραμικών HA*, Αναρτημένη Ανακοίνωση, 10^η Επετειακή Εκδήλωση της Ελληνικής Εταιρείας Βιοϋλικών, 26-28/11/2015, Εθνικό Ίδρυμα Ερευνών, Αθήνα.
13. Μ. Ρουμπή, Ε. Μπάρκα, Α. Βλάχος, Θ. Κωλέπτης, Α. Παπαλόης, Σ. Αγαθόπουλος, *Πνευμονική Υπέρταση: Στρατηγική Αντιμετώπισής της με βιοϋλικά*, Αναρτημένη Ανακοίνωση, 10^η Επετειακή Εκδήλωση της Ελληνικής Εταιρείας Βιοϋλικών, 26-28/11/2015, Εθνικό Ίδρυμα Ερευνών, Αθήνα.
14. M. Tzoka, G. Drougas, G. Tori, E. Barka, M. Roumpi, I. Gkiatas, M. G. Lykissas, I. P. Kostas-Agnantis, A. E. Beris, S. Agathopoulos, *Bio-mimetic porous bio-resorbable composite scaffolds of alginate-chitosan hydrogels with HA: characterization & in vivo performance*, *Bioceramics 28 International Congress 2015*, New Carolina, USA. Accepted.

15. Ε. Μπάρκα, Α. Βιλαέτη, Μ. Κοντονίκα, Ε. Μπαγκλή, Δ. Κουρούπης, Β. Μαλταμπέ, Μ. Ρουμπή, Α. Παπαλόης, Π. Κούκλης, Θ. Φώτσης, Θ. Κωλέττης και Σ. Αγαθόπουλος, *Νέο καινοτόμο βιοϋλικό της ιστοτεχνολογίας με βάση το υδροπήκτωμα αλγινικού για εφαρμογή στο μυοκάρδιο μετά από οξύ έμφραγμα*, 7^ο Πανελλήνιο Συνέδριο Εμβιομηχανικής, 24-26/06/2016, Νοσοκομείο Υγεία, Αθήνα. Υποβλήθηκε.
16. Μ. Τζόκα, Ε. Μπάρκα, Μ. Ρουμπή, Γ. Τόρη, Ι. Γκιάτας, Μ. Λυκίσσας, Ι. Κώστας-Αγνάντης, Α. Μπερής και Σ. Αγαθόπουλος, *Σύνθετα πορώδη ικριώματα της ιστοτεχνολογίας οστού από υδροπήκτωμα αλγινικού – χιτοζάνης και βιοκεραμικά ΗΑ*, 7^ο Πανελλήνιο Συνέδριο Εμβιομηχανικής, 24-26/06/2016, Νοσοκομείο Υγεία, Αθήνα. Υποβλήθηκε.
17. Γ. Παπατόλιος, Κ. Ψαρράς, Δ. Γιαννής, Β. Ντούρος, Γ. Γερόπουλος, Θ. Ε. Παυλίδης, Μ. Τζόκα, Ε. Μπάρκα, Μ. Ρουμπή και Σ. Αγαθόπουλος, *Διαφυγή αναστομώσεων παχέος εντέρου: μείζων πρόκληση της χειρουργικής και στρατηγικές σχεδιασμού ενισχυτικών βιομεμβρανών*, 7^ο Πανελλήνιο Συνέδριο Εμβιομηχανικής, 24-26/06/2016, Νοσοκομείο Υγεία, Αθήνα.
18. Β. Ντούρος, Κ. Ψαρράς, Γ. Παπατόλιος, Δ. Γιαννής, Γ. Γερόπουλος, Θ. Ε. Παυλίδης, Μ. Τζόκα, Ε. Μπάρκα, Μ. Ρουμπή και Σ. Αγαθόπουλος, *Ενδοπεριτοναϊκές συμφύσεις: Συχνότατο πρόβλημα της χειρουργικής και επιτακτική ανάγκη επινόησης δραστικών αντισυμφυτικών υλικών*, 7^ο Πανελλήνιο Συνέδριο Εμβιομηχανικής, 24-26/06/2016, Νοσοκομείο Υγεία, Αθήνα.
19. Ε. Barka, Th. M. Kolettis, S. Agathopoulos, *Synthesis and characterization of novel and biodegradable tissue engineering scaffolds based on alginate for myocardial tissue engineering applications (in vitro & in vivo study)*, 7th International Conference Biomaterials, Tissue Engineering & Medical Devices (BIOMMEDD'2016), 15-17/09/2016, Constanza, Romania.
20. M. Tzoka, G. Drougas, G. Tori, Ε. Barka, M. Roumpi, I. Gkiatas, M. G. Lykissas, I. P. Kostas-Agnantis, A. E. Beris, S. Agathopoulos, *Bio-mimetic porous bio-resorbable composite scaffolds of alginate-chitosan hydrogels with HA: characterization & in vivo performance*, 28th Annual Meeting of the International Society for Ceramics in Medicine (Bioceramics 28), 18-21/10/2016, North Carolina, USA.
21. Χ. Παππά, Ε. Μπάρκα, Δ. Παπαγιάννης, Κ. Τριανταφυλλίδης, Σ. Αγαθόπουλος, *Κατασκευή καινοτόμων ικριωμάτων της ιστικής μηχανικής με χρήση νανο-υλικών για τη στοχευμένη απελευθέρωση αυξητικής ορμόνης για την αναγέννηση του ιστού του εμφραγματικού μυοκαρδίου*, 2^ο Διεθνές Συνέδριο Αθλητικών Επιστημών, Κέντρο Διάδοσης Ερευνητικών Αποτελεσμάτων Α.Π.Θ. (ΚΕ.Δ.Ε.Α.), 25-27 Νοεμβρίου 2016.

22. V. A. Maltabe, E. Barka, M. Kontonika, D. Florou, M. Kouvara-Pritsouli, M. Roumpi, S. Agathopoulos, Th. M. Kolettis, P. Kouklis, *Isolation of a novel cardiovascular multipotent cell population during ESC differentiation*, 67^ο Πανελλήνιο Συνέδριο της Ελληνικής Εταιρείας Βιοχημείας και Μοριακής Βιολογίας, Ιωάννινα, 25-27 Νοεμβρίου 2016.

Γ. ΑΛΛΕΣ ΕΡΓΑΣΙΕΣ

1. Παρουσίαση διπλωματικής εργασίας με θέμα: «*Ανάπτυξη βιοϋλικών για την ανάταξη κατεστραμμένων ιστών του μυοκαρδίου μετά από οξύ έμφραγμα*» και βαθμό: Δέκα (10), το έτος 2012 .
Εξεταστική επιτροπή: Σ. Αγαθόπουλος (Επιβλέπων), Δ. Φωκάς, Δ. Φωτιάδης.
2. Παρουσίαση εργασίας με θέμα «*Electrophysiological study of the heart*» στα πλαίσια των διαλέξεων «Βιοϊατρική Τεχνολογία» του διδακτορικού προγράμματος σπουδών, το έτος 2015.
Εξεταστική Επιτροπή: Δ. Φωτιάδης (υπεύθυνος διαλέξεων), Σ. Αγαθόπουλος, Δ. Φωκάς, Γ. Ζώνιος.
3. Παρουσίαση εργασίας με θέμα «*Scaffolds for Cardiac Tissue Engineering*» στα πλαίσια των διαλέξεων «Μηχανική Βιολογικών Ιστών» του διδακτορικού προγράμματος σπουδών, το έτος 2015.
Εξεταστική Επιτροπή: Δ. Φωτιάδης (υπεύθυνος διαλέξεων), Σ. Αγαθόπουλος, Δ. Φωκάς, Γ. Ζώνιος.
4. Ετήσιες εκθέσεις προόδου διδακτορικής διατριβής (3) προς το Τμήμα Μηχανικών Επιστήμης Υλικών (Ακαδ. Έτη: 2012-13, 2013-14, 2014-15).
5. Τελική έκθεση διδακτορικής διατριβής για άδεια συγγραφής, προς το Τμήμα Μηχανικών Επιστήμης Υλικών (Μάϊος 2016).

Δ. ΠΑΡΑΚΟΛΟΥΘΗΣΗ ΣΥΝΕΔΡΙΩΝ & ΣΕΜΙΝΑΡΙΩΝ

1. 4^ο Πανελλήνιο Συνέδριο Ελληνικής Εταιρείας Εμβιομηχανικής ΕΛΕΜΒΙΟ, 4/6/2010-6/6/2010, Ιωάννινα.
2. 4^ο Πανελλήνιο Συνέδριο Μεταλλικών Υλικών, 4/11/2010-5/11/2010, Κέντρο διάδοσης επιστημών-μουσείο τεχνολογίας ΝΟΗΣΙΣ, Θεσσαλονίκη.
3. Ημερίδα «Συνδυασμός μεταλλικών και κεραμικών υλικών σε τεχνολογικές εφαρμογές», 3/4/2009, Επιστημονικό και Τεχνολογικό Πάρκο Ηπείρου, Ιωάννινα.
4. Ημερίδα «Μη καταστροφικοί μέθοδοι, εργαλείο για τον έλεγχο ποιότητας των έργων», Συνδιοργάνωση του τμήματος Μηχανικών Επιστήμης Υλικών του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων και του Τεχνικού Επιμελητηρίου Ελλάδος, 12/12/2008, Ιωάννινα.

5. 5^ο Πανελλήνιο Συνέδριο Ελληνικής Εταιρείας Εμβιομηχανικής ΕΛΕΜΒΙΟ, 28-29/9/2012, Θεσσαλονίκη.
6. 7^η Διημερίδα Ελληνικής Εταιρείας Βιοϋλικών, 23-24/11/2012, Αθήνα.
7. Ημερίδα Ελληνικής Εταιρείας Κεραμικών «Βιοκεραμικά», 08/02/2013, Εθνικό Μετσόβειο Πολυτεχνείο, Αθήνα.
8. Παρακολούθηση του σεμιναρίου «Εισαγωγή στην ELISA», Ελληνική Εταιρεία Βιοϊατρικών Ερευνών (Bioprobe), 24-25/02/2013, Θεσσαλονίκη.
9. 19th European Society of Biomechanics, ESB Congress 2013, 25-28/8/2013, Patras, Greece.
10. 8η διημερίδα Ελληνικής Εταιρείας Βιοϋλικών, 15-16/11/2013, Αθήνα.
11. 6^ο συνέδριο Ελληνικής Εταιρείας Εμβιομηχανικής, 10-12/10/2014, Πάτρα
12. 9^η διημερίδα Ελληνικής Εταιρείας Βιοϋλικών, 26-28/11/2015, Αθήνα.
13. 7^ο Πανελλήνιο Συνέδριο Ελληνικής Εταιρείας Εμβιομηχανικής, 24-26/6/2016, Νοσοκομείο Υγεία, Αθήνα.

Ε. ΕΠΙΣΚΕΨΕΙΣ ΣΕ ΕΡΕΥΝΗΤΙΚΑ ΚΕΝΤΡΑ ΚΑΙ ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΑ

- ✓ Ερευνητικό-Πειραματικό Κέντρο της Φαρμακευτικής Βιομηχανίας ΕΛΠΕΝ για τη διεξαγωγή των εμφυτεύσεων (συχνές επισκέψεις).
- ✓ Εργαστήριο Βιοχημείας, Ινστιτούτο Βιοϊατρικών Ερευνών, Πανεπιστήμιο Ιωαννίνων (συχνές επισκέψεις)
- ✓ Εργαστήριο Βιολογίας, Ιατρική σχολή, Πανεπιστήμιο Ιωαννίνων (συχνές επισκέψεις)
- ✓ University of Maastricht, The Netherlands, Faculty of Health, Medicine and Life Sciences, για τη διεξαγωγή πειράματος με ELISA, (Δεκέμβριος 2012)
- ✓ Ερευνητικό Εργαστήριο της Ελληνική Εταιρεία Βιοϊατρικών Ερευνών Bioprobe (Θεσσαλονίκη) κατά τη διεξαγωγή σεμιναρίου εκμάθησης τεχνικής ELISA , (23 & 24 Φεβρουαρίου 2013).
- ✓ Εργαστήριο Βιοϋλικών, Επιστήμης και Τεχνολογίας Υλικών, Πανεπιστήμιο Ηρακλείου (Κρήτη), (Μάιος 2013).
- ✓ Εργαστήριο Εμβιομηχανικής, Τμήμα Μηχανολόγων και Αεροναυπηγών Μηχανικών, Πανεπιστήμιο Πατρών, (Ιανουάριος 2013).

