



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

**ΑΝΑΠΤΥΞΗ ΕΜΦΥΤΕΥΜΑΤΩΝ ΓΙΑ ΧΡΗΣΗ ΣΤΟ ΜΥΟΚΑΡΔΙΟ  
ΤΗΣ ΔΕΞΙΑΣ ΚΟΙΛΙΑΣ ΜΕΤΑ ΑΠΟ ΠΝΕΥΜΟΝΙΚΗ ΥΠΕΡΤΑΣΗ**

**ΜΑΡΙΑ ΡΟΥΜΠΗ**

**ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ**

**ΙΩΑΝΝΙΝΑ 2019**











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

**ΑΝΑΠΤΥΞΗ ΕΜΦΥΤΕΥΜΑΤΩΝ ΓΙΑ ΧΡΗΣΗ ΣΤΟ ΜΥΟΚΑΡΔΙΟ  
ΤΗΣ ΔΕΞΙΑΣ ΚΟΙΛΙΑΣ ΜΕΤΑ ΑΠΟ ΠΝΕΥΜΟΝΙΚΗ ΥΠΕΡΤΑΣΗ**

**ΜΑΡΙΑ ΡΟΥΜΠΗ**

**ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ**

**ΙΩΑΝΝΙΝΑ 2019**



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



**Ημερομηνία αίτησης της κ. Ρουμπή Μαρίας:** 10-09-2014

**Ημερομηνία Ορισμού Τριμελούς Συμβουλευτικής Επιτροπής:** 29-10-2014

**Μέλη Τριμελούς Συμβουλευτικής Επιτροπής:**

Επιβλέπων

**Συμεών Αγαθόπουλος**, Καθηγητής του Τμήματος Μηχανικών Επιστήμης Υλικών της Πολυτεχνικής Σχολής του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων

Μέλη

**Θεόφιλος Κωλέττης**, Καθηγητής Καρδιολογίας του Τμήματος Ιατρικής της Σχολής Επιστημών Υγείας του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων

**Δημοσθένης Φωκάς**, Αναπληρωτής Καθηγητής του Τμήματος Μηχανικών Επιστήμης Υλικών της Πολυτεχνικής Σχολής του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων

**Ημερομηνία ορισμού θέματος:** 29-10-2014

*Ανάπτυξη εμφυτευμάτων για χρήση σε πειραματικό πρότυπο υπερφόρτισης πίεσης της δεξιάς κοιλίας*

**Ημερομηνία τροποποίησης θέματος:** 27-02-2019

*Ανάπτυξη εμφυτευμάτων για χρήση στο μυοκάρδιο της δεξιάς κοιλίας μετά από πνευμονική υπέρταση*

**ΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΕΠΤΑΜΕΛΟΥΣ ΕΞΕΤΑΣΤΙΚΗΣ ΕΠΙΤΡΟΠΗΣ:** 05-06-2019

- 1. Συμεών Αγαθόπουλος**, Καθηγητής του Τμήματος Μηχανικών Επιστήμης Υλικών της Πολυτεχνικής Σχολής του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων
- 2. Θεόφιλος Κωλέττης**, Καθηγητής Καρδιολογίας του Τμήματος Ιατρικής της Σχολής Επιστημών Υγείας του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων
- 3. Δημοσθένης Φωκάς**, Αναπληρωτής Καθηγητής του Τμήματος Μηχανικών Επιστήμης Υλικών της Πολυτεχνικής Σχολής του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων
- 4. Δημήτριος Φωτιάδης**, Καθηγητής του Τμήματος Μηχανικών Επιστήμης Υλικών της Πολυτεχνικής Σχολής του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων
- 5. Απόστολος Αυγερόπουλος**, Καθηγητής του Τμήματος Μηχανικών Επιστήμης Υλικών της Πολυτεχνικής Σχολής του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων
- 6. Δημήτριος Παπαγιάννης**, Αναπληρωτής Καθηγητής του Τμήματος Μηχανικών Επιστήμης Υλικών της Πολυτεχνικής Σχολής του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων
- 7. Διονύσιος Μουζάκης**, Αναπληρωτής Καθηγητής της Στρατιωτικής Σχολής Ευελπίδων



## ΠΡΑΚΤΙΚΟ

της Επταμελούς Εξεταστικής Επιτροπής για την αναγόρευση σε διδάκτορα του Τμήματος Μηχανικών Επιστήμης Υλικών (Τ.Μ.Ε.Υ.) του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων της κ. **Μαρίας Ρουμπή**. Η Συνέλευση του Τμήματος Μηχανικών Επιστήμης Υλικών του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων στη συνεδρίασή της αριθ. 340/05-06-2019 ύστερα από την κρίση της Τριμελούς Συμβουλευτικής Επιτροπής ότι η ερευνητική εργασία της υποψήφιας διδάκτορας κ. **Μαρίας Ρουμπή** έχει ολοκληρωθεί και έχει κατατεθεί στο Τμήμα, όρισε σύμφωνα με τις διατάξεις του άρθρου 41, παρ. 2, του ν.4485/2017 όπως τροποποιήθηκε από το άρθρο 60 του ν.4559/2018, Επταμελή Εξεταστική Επιτροπή που αποτελείται από τους κ.κ. **Συμεών Αγαθόπουλο**, Καθηγητή του Τμήματος Μηχανικών Επιστήμης Υλικών, της Πολυτεχνικής Σχολής, του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων, **Θεόφιλο Κωλέττη**, Καθηγητή του Τμήματος Ιατρικής, της Σχολής Επιστημών Υγείας, του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων, **Δημοσθένη Φωκά**, Αναπληρωτή Καθηγητή του Τμήματος Μηχανικών Επιστήμης Υλικών, της Πολυτεχνικής Σχολής, του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων, **Δημήτριο Φωτιάδη**, Καθηγητή του Τμήματος Μηχανικών Επιστήμης Υλικών, της Πολυτεχνικής Σχολής, του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων, **Απόστολο Αυγερόπουλο**, Καθηγητή του Τμήματος Μηχανικών Επιστήμης Υλικών, της Πολυτεχνικής Σχολής, του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων, **Δημήτριο Παπαγιάννη**, Αναπληρωτή Καθηγητή του Τμήματος Μηχανικών Επιστήμης Υλικών της Πολυτεχνικής Σχολής, του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων, και **Διονύσιο Μουζάκη**, Αναπληρωτή Καθηγητή της Στρατιωτικής Σχολής Ευελπίδων, για να αναπτύξει ενώπιόν της, η υποψήφια διδάκτορας κ. **Μαρίας Ρουμπή** τη διατριβή της με θέμα «**Ανάπτυξη εμφυτευμάτων για χρήση στο μυοκάρδιο της δεξιάς κοιλίας μετά από πνευμονική υπέρταση**».

Η Επταμελής Εξεταστική Επιτροπή με την παραπάνω σύνθεσή της, συνήλθε σήμερα **15 Ιουλίου 2019 ημέρα Δευτέρα και ώρα 11:00 στην αίθουσα ΚΥ1, στο κτίριο Μηχανικών Επιστήμης Υλικών του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων** για να εξετάσει τη διδακτορική διατριβή της υποψήφιας διδάκτορας κ. **Μαρίας Ρουμπή**. Χρέη προέδρου της Εξεταστικής Επιτροπής ανέθεσαν τα μέλη της στον κ. **Συμεών Αγαθόπουλο**, Καθηγητή του Τ.Μ.Ε.Υ. του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων. Στο σημείο αυτό, τίθεται υπόψη της επταμελούς Εξεταστικής Επιτροπής το αρθ. 41 παρ. 3 του ν.4485/2017 και η παρ. 9<sup>ε</sup> του Κανονισμού Διδακτορικών Σπουδών του Τμήματος (ΦΕΚ. 832/9-3-2018, τ. Β). Τα μέλη της Επιτροπής έλαβαν εγκαίρως γνώση του κειμένου της διατριβής της υποψήφιας και τη μελέτησαν. Η υποψήφια κ. **Μαρία Ρουμπή** ανέπτυξε ενώπιον της Επιτροπής τη διατριβή της με θέμα: «**Ανάπτυξη εμφυτευμάτων για χρήση στο μυοκάρδιο της δεξιάς κοιλίας μετά από πνευμονική υπέρταση**» 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**.

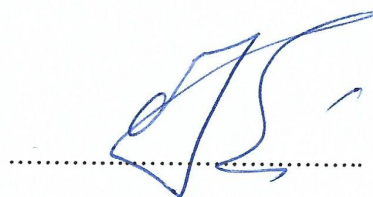
Ιωάννινα, 15 Ιουλίου 2019

### Η Εξεταστική Επιτροπή

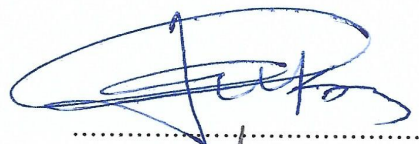
1. **Συμεών Αγαθόπουλος**  
Καθηγητής  
του Τμήματος Μηχανικών Επιστήμης Υλικών  
της Πολυτεχνικής Σχολής  
του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων



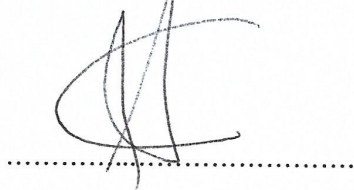
2. **Θεόφιλος Κωλέττης**  
Καθηγητής  
του Τμήματος Ιατρικής  
της Σχολής Επιστημών Υγείας  
του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων



3. **Δημοσθένης Φωκάς**  
Αναπληρωτής Καθηγητής  
του Τμήματος Μηχανικών Επιστήμης Υλικών  
της Πολυτεχνικής Σχολής  
του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων



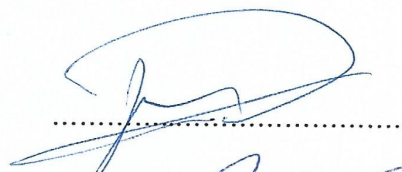
4. **Δημήτριος Φωτιάδης**  
Καθηγητής  
του Τμήματος Μηχανικών Επιστήμης Υλικών  
της Πολυτεχνικής Σχολής  
του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων



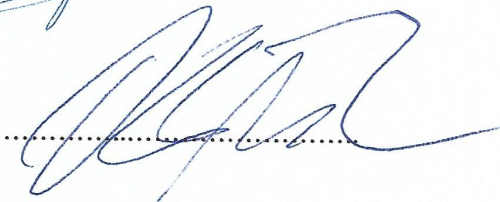
5. **Απόστολος Αυγερόπουλος**  
Καθηγητής  
του Τμήματος Μηχανικών Επιστήμης Υλικών  
της Πολυτεχνικής Σχολής  
του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων



6. **Δημήτριος Παπαγιάννης**  
Αναπληρωτής Καθηγητής  
του Τμήματος Μηχανικών Επιστήμης Υλικών  
της Πολυτεχνικής Σχολής  
του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων



7. **Διονύσιος Μουζάκης**  
Αναπληρωτής Καθηγητής  
της Στρατιωτικής Σχολής Ευελπίδων





*Στους γονείς μου, Θανάση και Αθανασία*



## ΠΡΟΛΟΓΟΣ

Η παρούσα Διδακτορική Διατριβή είχε στόχο την ανάπτυξη βιοϋλικών τα οποία να μπορούν να χρησιμοποιηθούν για να αντιμετωπιστεί η νόσος της πνευμονικής υπέρτασης. Εκπονήθηκε στο Εργαστήριο Κεραμικών και Σύνθετων Υλικών του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων, η δε υλοποίησή της συγχρηματοδοτήθηκε μέσω της Πράξης «Πρόγραμμα Χορήγησης Υποτροφιών για Μεταπτυχιακές Σπουδές Δεύτερου Κύκλου Σπουδών» του Επιχειρησιακού Προγράμματος «Ανάπτυξη Ανθρώπινου Δυναμικού, Εκπαίδευση και Δια Βίου Μάθηση», του ΕΣΠΑ 2014-2020 με τη συγχρηματοδότηση του Ευρωπαϊκού Κοινωνικού Ταμείου.

Η πνευμονική υπέρταση αποτελεί μία πολύ επικίνδυνη νόσο γιατί, από τη στιγμή που θα διαγνωστεί, μπορεί να καταλήξει σε σύντομο χρονικό διάστημα (1-2 ετών) σε θάνατο του ασθενούς. Αυτό οφείλεται στο γεγονός ότι ενώ η γενεσιουργός αιτία της εντοπίζεται στους πνεύμονες, η αύξηση της πίεσης εκεί έχει καταστροφικά αποτελέσματα στην καρδιά, αρχικά με την αλλαγή της γεωμετρίας της και τελικά στην όλη λειτουργία της, ως αποτέλεσμα του γεγονότος ότι η καρδιά, και συγκεκριμένα η δεξιά κοιλία της, προσπαθεί να αντιμετωπίσει την αυξημένη πίεση του αίματος στις πνευμονικές αρτηρίες. Τα παραπάνω γνωρίσματα, υπό το πρίσμα της επιστημονικής πρόκλησης λόγω της σοβαρότητας της ασθένειας αυτής, καθώς και ο ανθρωποκεντρικός χαρακτήρας του όλου ιατρικού και επιστημονικού πλαισίου, σε συνδυασμό με το γεγονός ότι στο Εργαστήριό μας υπήρχε μία δεκαετής εμπειρία στην ανάπτυξη ικριωμάτων της ιστικής μηχανικής που εφαρμόζονταν στην καρδιά, αποτέλεσαν τα πιο ισχυρά κίνητρα για να αναλάβω μία έρευνα, ως αντικείμενο της διατριβής μου, που σχετίζεται με την ανάπτυξη και εφαρμογή νέων βιοϋλικών που να μπορούν να εφαρμοστούν στην αντιμετώπιση, δηλαδή στην πρόληψη και στη θεραπεία, της πνευμονικής υπέρτασης.

Όμως, παρά το γεγονός ότι πρόκειται για πολύ σοβαρή ασθένεια, βιβλιογραφική ανασκόπηση έδειξε ότι, ανάμεσα στα άλλα νοσήματα που σχετίζονται με την καρδιά, τα οποία είναι επαρκώς καταγεγραμμένα στη βιβλιογραφία, ουσιαστικά δεν υπάρχει κανένα άρθρο ή μελέτη συστηματική και εμπεριστατωμένη για εμφυτεύματα που έχουν αναπτυχθεί αποκλειστικά για την αντιμετώπιση της πνευμονικής υπέρτασης. Αυτό οφείλεται προφανώς στο γεγονός ότι η πνευμονική

υπέρταση, αν και τόσο σοβαρό και επικίνδυνο νόσημα, σίγουρα δεν είναι τόσο συχνό, όπως για παράδειγμα είναι το έμφραγμα του μυοκαρδίου. Η παραπάνω διαπίστωση έδειξε ότι η ανάπτυξη της έρευνας που έπρεπε να αναληφθεί στη διατριβή αυτή πρέπει να στοχεύει στη χάραξη ενός *Οδικού Χάρτη*, δηλαδή ενός στρατηγικού σχεδίου που θα καθορίζει τον τρόπο, τα σημαντικά βήματα και τα ορόσημα που απαιτούνται για την επίτευξη του στόχου και του επιθυμητού αποτελέσματος, που είναι η κατασκευή ενός εμφυτεύματος που να συγκεντρώνει όλα τα απαραίτητα χαρακτηριστικά ώστε να μπορεί να δοθεί στο χειρουργό για την αντιμετώπιση της πνευμονικής υπέρτασης.

Κατά την πορεία της εξέλιξης της έρευνας, φάνηκε ότι αυτός ο Οδικός Χάρτης έπρεπε να περιλαμβάνει δύο διακριτά πεδία. Το πρώτο αφορούσε στη *θέσπιση κριτηρίων* τα οποία πρέπει να ικανοποιεί ένα βιοϋλικό ώστε να μπορεί να προταθεί ως υποψήφιο για χρήση στην αντιμετώπιση της πνευμονικής υπέρτασης. Τα κριτήρια αυτά ορίστηκαν ως απόρροια της ανασκόπησης της βιβλιογραφίας, αλλά, επειδή, όπως αναφέρθηκε παραπάνω, η ερευνητική αυτή περιοχή ήταν πρακτικά αχαρτογράφητη επιστημονικά, κυρίως από την προσωπική εμπειρία που αποκτήθηκε από την εφαρμογή των μεμβρανών σε εργαστηριακά ζώα. Με τη συνεχή πρόοδο της έρευνας, παρασκευάστηκαν μία σειρά από μεμβράνες από διαφορετικά βιοϋλικά, κυρίως από πολυαιθυλενογλυκόλη (PEG) και τα παράγωγά της (PEGSDA και OPF), και υδροπηκτώματα με βάση το αλγινικό οξύ και τη χιτοζάνη. Με γνώμονα τα κριτήρια επιλογής, ελέγχθηκαν τα υλικά, και ως προς τη χημική τους φύση αλλά και τις μεθόδους παρασκευής, οι οποίες σε όλες τις περιπτώσεις αποδείχτηκε ότι παίζουν καθοριστικό ρόλο στην ποιότητα του τελικού υλικού. Το δεύτερο πεδίο του Οδικού Χάρτη ήταν η ανάδειξη της *διεπιφάνειας* της μεμβράνης με το ζωντανό μέρος ως μία πολύ σημαντική παράμετρος που καθορίζει την απόδοση της μεμβράνης στη συγκεκριμένη εφαρμογή στην αντιμετώπιση της πνευμονικής υπέρτασης. Η μελέτη της διεπιφάνειας αυτής απαρτίζεται από πέντε συνιστώσες, τη βιολογική, την ιατρική, τη μορφολογική, τη χημική και τη μηχανική. Η αξιολόγηση της διεπιφάνειας μεμβράνης/ζωντανού μέρους από αυτές τις πέντε συνιστώσες μπορεί να βοηθήσει αφενός να σχεδιαστεί (και, βάσει του πρώτου πεδίου του Οδικού Χάρτη, να παρασκευαστεί) η βέλτιστη μεμβράνη για να προταθεί για εφαρμογή στο ιατρικό πρωτόκολλο της πνευμονικής υπέρτασης και να μετρηθεί

ποιοτικά και ποσοτικά η απόδοσή της στην περίπτωση αυτή, π.χ. με αιμοδυναμικές μελέτες, αφετέρου να συνδεθεί με τα ευρήματα αυτά (δηλαδή των αιμοδυναμικών μελετών) και να παρέχει επιστημονική τεκμηρίωση για τους παθοφυσιολογικούς μηχανισμούς των μορφολογικών και λειτουργικών μεταβολών της δεξιάς κοιλίας κατά την απόκρισή της στην υπερφόρτιση πίεσης. Θεωρώντας τα τελευταία ως τον απώτερο σκοπό της έρευνας που αναλήφθηκε στη διατριβή αυτή, γίνεται προφανής η σπουδαιότητα της χάραξης του παραπάνω Οδικού Χάρτη, που αποτελεί ουσιαστικά το κύριο έργο και την καινοτομία που φέρει η Διατριβή αυτή.

Από τα παραπάνω, γίνεται σαφές ότι, η διατριβή, ενώ εστιάστηκε σε ένα αμιγώς ιατρικό πρόβλημα, η όλη προσέγγιση έγινε αμιγώς από την πλευρά του Μηχανικού Υλικών και πώς μπορεί να προσφέρει την επιστημονική και τεχνική του γνώση στην επίλυση του ιατρικού αυτού προβλήματος. Υπό αυτό το πρίσμα, όπως άλλωστε συμβαίνει στο πεδίο της Βιοϊατρικής, υπάρχει στην έρευνα αυτή πολύ έντονο το στοιχείο της διεπιστημονικότητας. Έτσι, γίνεται αντιληπτό ότι στην επίτευξη αυτής της διεπιστημονικής συνέργειας έχουν συμβάλει πολλοί καθηγητές, ερευνητές και συνάδελφοι, από πολλά διαφορετικά εργαστήρια, τις υποδομές των οποίων χρησιμοποίησα, και τους οποίους οφείλω να ευχαριστήσω σε αυτό το εισαγωγικό σημείωμα, τόσο για την πρόσβαση που μου παρείχαν σε αυτές, όσο και για τις εποικοδομητικές συζητήσεις που είχα μαζί τους, για το σχεδιασμό και τη διεξαγωγή των πειραμάτων και των υπολογισμών, αλλά και την ανάλυση των αποτελεσμάτων.

Κατ' αρχήν θα ήθελα να ευχαριστήσω θερμά τον Επιβλέποντα Καθηγητή της Διδακτορικής Διατριβής μου Καθηγητή κ. Συμεών Αγαθόπουλο, για την ανάθεση του θέματος, την εμπιστοσύνη που με περιέβαλε και την υποστήριξη του όλα αυτά τα χρόνια, την ενθάρρυνση και την πίστη του στις ικανότητές μου, και την άριστη συνεργασία που είχαμε. Επίσης, τα άλλα δύο μέλη της τριμελούς συμβουλευτικής επιτροπής, τον Καθηγητή Καρδιολογίας κ. Θεόφιλο Κωλέττη για την εν γένει εποικοδομητική συνεργασία αλλά και πιο ειδικά για τη μύησή μου στις *in vivo* εμφυτεύσεις, και τον Αναπληρωτή Καθηγητή κ. Δημοσθένη Φωκά για την πολύτιμη καθοδήγηση, τη βοήθεια και τις πολύτιμες επιστημονικές συμβουλές του, από το ξεκίνημα της διατριβής μέχρι και σήμερα.

Επίσης, θα ήθελα να ευχαριστήσω θερμά και τα υπόλοιπα μέλη της εξεταστικής επιτροπής, όχι μόνο γιατί απεδέχθησαν να συμμετάσχουν σε αυτήν, αλλά και για την ουσιαστική βοήθεια που μου παρείχαν για την εκπόνησή της. Συγκεκριμένα, τον

Καθηγητή κ. Δημήτρη Φωτιάδη για τη συνεχή βοήθεια, υποστήριξη και φιλοξενία στους χώρους του Εργαστηρίου του, της Βιοϊατρικής Τεχνολογίας, στο οποίο πραγματοποίησα το κομμάτι της διατριβής που αφορά στην υπολογιστική μοντελοποίηση, με την πολύτιμη αρωγή και εξαιρετική συνεργασία του συνεργάτη του Δρ. Αντώνη Σακελλάριου. Τον Καθηγητή κ. Απόστολο Αυγερόπουλο για την απεριόριστη πρόσβασή μου στο Εργαστήριό του, των Πολυμερικών Υλικών, με το συνεργάτη του Δρ. Δημήτρη Μοσχόβα για τις μετρήσεις SEC και τη λήψη εικόνων στο SEM. Τον Αναπληρωτή Καθηγητή κ. Δημήτρη Παπαγιάννη για την πολύ σημαντική βοήθειά του και την πολύτιμη καθοδήγησή του και μύησή μου στους θεωρητικούς κβαντομηχανικούς υπολογισμούς, αλλά και για το συνεχές θερμό ενδιαφέρον του για την εξέλιξη της διατριβής μου όλα αυτά τα χρόνια. Τέλος, τον Αναπληρωτή Καθηγητή κ. Διονύση Μουζάκη από τη Σχολή Ευελπίδων, που κατά καιρούς, τόσο στο Ευρωπαϊκό Συνέδριο των Βιοϋλικών στην Αθήνα, όσο και στα Συνέδρια της Ελληνικής Εταιρείας Βιοϋλικών (ΕΕΒ), πάντα έδειχνε το ενδιαφέρον για την δουλειά μου και με ενθάρρυνε να ενταχθώ ως μέλος στην ΕΕΒ για να έχω ενεργό ρόλο στα επιστημονικά δρώμενα των Βιοϋλικών στην Ελλάδα.

Συνεχίζοντας, οφείλω να ευχαριστήσω και τον Επίκουρο Καθηγητή του Τμήματος Ιατρικής κ. Παναγιώτη Κούκλη και τη συνεργάτιδά του και φίλη μου Δρ. Βιολέττα Μαλταμπέ για την πολύτιμη βοήθειά τους στον έλεγχο της κυτταροτοξικότητας του υλικού με *in vitro* καλλιέργειες κυττάρων. Επίσης, οφείλω ένα μεγάλο ευχαριστώ στην Επίκουρη Καθηγήτρια του Τμήματος Ιατρικής κ. Αντωνία Χαρχαντή για τη βοήθεια και την επιστημονική της υποστήριξη στα πειράματα αντίδρασης ξένου σώματος, καθώς και για την πάντα καλή της διάθεση και επιμονή να με μυήσει στο πεδίο της παθολογοανατομίας. Επίσης, ευχαριστώ θερμά για την επιστημονική του καθοδήγηση στην ερμηνεία των φασμάτων XPS, τον Καθηγητή του Τμήματος Φυσικής κ. Γιώργο Ευαγγελάκη, καθώς και τους συνεργάτες του Υπ. Δρ. Κώστα Μουλρά και Υπ. Δρ. Γιάννη Γεωργίου για τις μετρήσεις των φασμάτων XPS. Επίσης, ευχαριστώ πολύ την Αναπληρώτρια Καθηγήτρια κ. Νεκταρία Μπάρκουλα για τις μετρήσεις δυναμικής μηχανικής ανάλυσης (DMA).

Σε αυτό το σημείο θα ήθελα να απευθύνω από καρδιάς ένα πολύ μεγάλο ευχαριστώ στη συνεργάτιδα και καλή φίλη μου Δρ. Μαρία Καράμπελα, μέλος ΕΔΙΠ του ΤΜΕΥ, για την αμέριστη βοήθεια και καθοριστική της συνεισφορά στο

επιστημονικό κομμάτι της διατριβής και πάνω από όλα για την ηθική και ψυχολογική υποστήριξη που μου παρείχε σε όλες τις δυσκολίες που έπρεπε να ανταπεξέλθω. Επίσης, θα ήθελα να ευχαριστήσω τον Δρ. Παναγιώτη Λέκκα για την υποστήριξη και βοήθειά του στις εμφυτεύσεις στα εργαστηριακά ζώα. Τον καρδιολόγο Δρ. Γιάννη Μπαλτογιάννη για την αμέριστη βοήθεια που μου προσέφερε σε ότι και αν χρειάστηκα και για την επιστημονική του καθοδήγηση στο ιατρικό κομμάτι της νόσου, καθώς και την Δρ. Περσεφόνη Μαργαρίτη για τη βοήθειά της στην εύρεση της κατάλληλης αξονικής θώρακα μέσω του Π.Γ.Ν.Ι. Θα ήθελα επίσης να ευχαριστήσω τη Διπλ. Μηχανικό κ. Δάφνη Κατσαρού για τη βοήθειά της και την ενεργό συμμετοχή της στη μοντελοποίηση, και τέλος, το τμήμα Αιμοδοσίας του Π.Γ.Ν.Ι. για την παροχή πλάσματος αίματος στα πλαίσια των πειραμάτων της παρούσας διατριβής.

Από τους συναδέλφους μου, ένα μεγάλο ευχαριστώ οφείλω στις συναδέλφους και πολύ καλές μου φίλες, Δρ. Ανθή Πούλια και Δρ. Ελεονώρα Μπάρκα, για την αμέριστη συμπαράσταση και υποστήριξή τους, επιστημονική και ηθική, καθώς και για τις πολύ όμορφες στιγμές που περάσαμε μαζί όλα αυτά τα χρόνια που εκπονούσαμε και οι τρεις τη διδακτορική μας διατριβή. Επίσης, άλλο ένα μεγάλο ευχαριστώ οφείλω στο συνάδελφο και φίλο μου Κώστα Δημητριάδη, Υποψήφιο Διδάκτορα στο ίδιο Εργαστήριο, για την υποστήριξή του σε ό,τι και αν χρειάστηκα, από την πρώτη κιόλας στιγμή που ήρθε στο Εργαστήριο πριν 3 χρόνια, μέχρι σήμερα.

Θα ήθελα να ολοκληρώσω το μεγάλο αυτό κύκλο ευχαριστώντας την οικογένειά μου, για την πολύτιμη υποστήριξή της όλα αυτά τα χρόνια, και ιδιαίτερα τους γονείς μου Θανάση και Αθανασία, σε όλη την μακρόχρονη προσπάθειά μου, από τις προπτυχιακές σπουδές μου, με αποκορύφωση τη διδακτορική διατριβή μου.

Ιωάννινα, Ιούλιος 2019

Μαρία Ρουμπή





---

---

# ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

---

---

<b>ΠΡΟΛΟΓΟΣ</b>	<b>13</b>
<b>ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ</b>	<b>19</b>
<b>ΕΚΤΕΝΗΣ ΠΕΡΙΛΗΨΗ</b>	<b>23</b>
<b>SUMMARY</b>	<b>27</b>
<b>ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΠΙΝΑΚΩΝ</b>	<b>31</b>
<b>ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΕΙΚΟΝΩΝ</b>	<b>33</b>
<b>I. ΕΙΣΑΓΩΓΗ: Η ΝΟΣΟΣ ΤΗΣ ΠΝΕΥΜΟΝΙΚΗΣ ΥΠΕΡΤΑΣΗΣ ΚΑΙ Η ΑΝΤΙΜΕΤΩΠΙΣΗ ΤΗΣ ΜΕΣΩ ΒΙΟΪΛΙΚΩΝ</b>	<b>41</b>
1. Η ΝΟΣΟΣ ΤΗΣ ΠΝΕΥΜΟΝΙΚΗΣ ΥΠΕΡΤΑΣΗΣ	42
2. ΤΡΟΠΟΙ ΑΝΤΙΜΕΤΩΠΙΣΗΣ ΤΗΣ ΝΟΣΟΥ	49
3. ΒΙΟΪΛΙΚΑ ΓΙΑ ΧΡΗΣΗ ΣΤΟ ΜΥΟΚΑΡΔΙΟ	51
<b>II. ΣΚΟΠΟΣ ΔΙΑΤΡΙΒΗΣ - ΚΑΙΝΟΤΟΜΙΑ ΚΑΙ ΔΙΑΡΦΩΣΗ</b>	<b>63</b>
<b>III. ΑΝΑΠΤΥΞΗ ΚΑΙ ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΜΟΣ ΒΙΟΪΛΙΚΟΥ</b>	<b>71</b>
<i>III-I: ΠΡΟΚΡΙΣΗ ΒΙΟΪΛΙΚΟΥ</i>	<i>71</i>
1. ΧΑΡΤΗΣ ΠΑΡΑΣΚΕΥΗΣ ΚΑΙ ΠΡΟΚΡΙΣΗΣ ΥΛΙΚΩΝ ΣΥΜΦΩΝΑ ΜΕ ΤΑ ΚΡΙΤΗΡΙΑ ΕΠΙΛΟΓΗΣ ΓΙΑ ΕΦΑΡΜΟΓΗ ΣΤΗΝ ΑΝΤΙΜΕΤΩΠΙΣΗ ΤΗΣ ΠΝΕΥΜΟΝΙΚΗΣ ΥΠΕΡΤΑΣΗΣ ΜΕ ΧΡΗΣΗ ΒΙΟΪΛΙΚΩΝ	71
2. ΥΔΡΟΠΗΚΤΩΜΑΤΑ ΜΕ ΒΑΣΗ ΤΗΝ ΠΟΛΥ(ΑΙΘΥΛΕΝΟΓΛΥΚΟΛΗ) (PEG)	76
2.1. Υδροπήκτωμα πολυ(αιθυλενογλυκόλης) και διακρυλικού	76
2.2. Χημική τροποποίηση υδροπηκτωμάτων με βάση την πολυ(αιθυλενογλυκόλη) (PEG) με μονομερή διοξέων (sebacoyl chloride) (PEGSDA)	80
2.3. Χημική τροποποίηση υδροπηκτωμάτων με βάση την πολυ(αιθυλενογλυκόλη) (PEG) με μονομερή διοξέων (fumaryl chloride) (OPF)	85
3. ΥΔΡΟΠΗΚΤΩΜΑΤΑ ΜΕ ΒΑΣΗ ΤΟ ΑΛΓΙΝΙΚΟ ΟΞΥ	87
4. ΥΔΡΟΠΗΚΤΩΜΑΤΑ ΜΕ ΒΑΣΗ ΤΗ ΧΙΤΟΖΑΝΗ	89
4.1. Επισκόπηση και σύγκριση ιδιοτήτων μεμβρανών χιτοζάνης	89
4.2. Παρασκευή μεμβρανών χιτοζάνης μεσαίου μοριακού βάρους (MMW) μέσω εμβάπτισης σε διάλυμα εξουδετέρωσης NaOH	92
4.3. Παρασκευή μεμβρανών χιτοζάνης χαμηλού μοριακού βάρους (LMW)	94
4.3.1 Διαδικασία εξουδετέρωσης I: Με τη χρήση διαλύματος NaOH	94

4.3.2 Διαδικασία εξουδετέρωσης II: Με τη χρήση διαλύματος ΚΟΗ	96
4.3.3 Διαδικασία εξουδετέρωσης III: Με τη χρήση διαλύματος φωσφορικού άλατος (β-GP)	97
4.4 Παρασκευή μεμβρανών χιτοζάνης MMW και LMW μέσω της διαδικασίας ζελατινοποίησης	99
<b>III-2. ΠΑΡΑΣΚΕΥΗ ΚΑΙ ΙΔΙΟΤΗΤΕΣ ΜΕΜΒΡΑΝΗΣ ΑΠΟ ΥΔΡΟΠΗΚΤΩΜΑ ΧΙΤΟΖΑΝΗΣ</b>	<b>100</b>
1. ΠΑΡΑΣΚΕΥΗ ΜΕΜΒΡΑΝΩΝ ΧΙΤΟΖΑΝΗΣ (MMW) ΜΕΣΩ ΤΗΣ ΜΕΘΟΔΟΥ ΖΕΛΑΤΙΝΟΠΟΙΗΣΗΣ	100
2. ΙΔΙΟΤΗΤΕΣ ΜΕΜΒΡΑΝΗΣ ΧΙΤΟΖΑΝΗΣ	102
2.1 Προσδιορισμός βαθμού αποακετυλίωσης	102
2.2 Δομικός χαρακτηρισμός	103
2.2.1 Ανάλυση με περίθλαση ακτίνων Χ (XRD)	103
2.2.2 Ανάλυση μέσου υπερύθρου (FT-IR)	105
2.3 Μορφολογικός χαρακτηρισμός και πορώδες	108
2.4 Θερμική ανάλυση	110
2.5 Μελέτη χαρακτηριστικών ρόφησης στους 37°C	111
2.6 Μελέτη Μηχανικών Ιδιοτήτων	115
2.6.1 Μελέτη της συμπεριφοράς στον εφελκυσμό	116
2.6.2 Μελέτη υποβάθμισης μηχανικών ιδιοτήτων σε υγρό περιβάλλον	119
2.6.3 Δυναμική Μηχανική Ανάλυση	127
<b>III-3: ΑΛΛΗΛΕΠΙΔΡΑΣΗ ΜΕΜΒΡΑΝΗΣ ΑΠΟ ΥΔΡΟΠΗΚΤΩΜΑ ΧΙΤΟΖΑΝΗΣ ΜΕ ΚΥΤΤΑΡΑ ΚΑΙ ΚΑΡΔΙΑΚΟ ΙΣΤΟ</b>	<b>130</b>
1. <i>IN VITRO</i> ΒΙΟΛΟΓΙΚΟΣ ΕΛΕΓΧΟΣ ΑΝΑΠΤΥΞΗΣ ΚΥΤΤΑΡΩΝ ΣΕ ΜΕΜΒΡΑΝΗ ΧΙΤΟΖΑΝΗΣ	130
2. <i>IN VIVO</i> ΜΕΛΕΤΗ ΔΙΕΠΙΦΑΝΕΙΑΣ ΜΕΜΒΡΑΝΗΣ ΧΙΤΟΖΑΝΗΣ/ΚΑΡΔΙΑΚΟΥ ΙΣΤΟΥ	136
2.1 Μακροσκοπική εξέταση εμφυτεύματος-ιστού	141
2.2 Φλεγμονώδης αντίδραση ξένου σώματος	145
3. ΜΟΡΦΟΛΟΓΙΚΟΣ ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΜΟΣ ΔΙΕΠΙΦΑΝΕΙΑΣ ΜΕΜΒΡΑΝΗΣ–ΜΥΟΚΑΡΔΙΟΥ	152
4. ΦΥΣΙΚΟΧΗΜΙΚΗ ΜΕΛΕΤΗ ΔΙΕΠΙΦΑΝΕΙΑΣ ΜΕΜΒΡΑΝΗΣ – ΜΥΟΚΑΡΔΙΟΥ	155
4.1 Φασματοσκοπία υπερύθρου	155
4.2 Φασματοσκοπία ΧΡS	161
4.3 Θεωρητικοί υπολογισμοί μέσω της θεωρίας συναρτησιακών της ηλεκτρονιακής πυκνότητας (DFT)	176
5. ΜΗΧΑΝΙΚΗ ΜΕΛΕΤΗ ΔΙΕΠΙΦΑΝΕΙΑΣ ΧΙΤΟΖΑΝΗΣ – ΜΥΟΚΑΡΔΙΟΥ ΜΕΣΩ ΤΗΣ ΜΕΘΟΔΟΥ ΤΩΝ ΠΕΠΕΡΑΣΜΕΝΩΝ ΣΤΟΙΧΕΙΩΝ	185
5.1 Συνοπτική περιγραφή στοιχείων μηχανικής των ρευστών	186
5.2 Βιβλιογραφική ανασκόπηση	188
5.3 Κατασκευή γεωμετρίας	190
5.4 Διακριτοποίηση	193
5.5 Περιγραφή εξισώσεων	195
5.6 Συνοριακές συνθήκες	196
5.7 Ιδιότητες	199
5.8 Εκτίμηση συμπεριφοράς δεξιάς κοιλίας με πνευμονική υπέρταση μετά από εφαρμογή μεμβράνης	200
<b>IV. ΓΕΝΙΚΗ ΣΥΖΗΤΗΣΗ, ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ ΚΑΙ ΠΡΟΤΑΣΕΙΣ ΓΙΑ ΜΕΛΛΟΝΤΙΚΗ ΕΡΕΥΝΑ</b>	<b>213</b>

---

<b>ΠΑΡΑΡΤΗΜΑΤΑ</b>	<b>219</b>
<i>ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ 1: ΧΗΜΙΚΑ ΑΝΤΙΔΡΑΣΤΗΡΙΑ</i>	<i>219</i>
<i>ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ 2: ΦΥΣΙΚΟΧΗΜΙΚΕΣ ΜΕΘΟΔΟΙ ΜΕΛΕΤΗΣ ΙΔΙΟΤΗΤΩΝ ΥΛΙΚΩΝ</i>	<i>221</i>
<i>ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ 3: IN VIVO ΕΜΦΥΤΕΥΣΕΙΣ</i>	<i>238</i>
<b>ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΚΕΣ ΑΝΑΦΟΡΕΣ</b>	<b>241</b>
<b>ΒΙΟΓΡΑΦΙΚΟ ΣΗΜΕΙΩΜΑ</b>	<b>259</b>



---

---

## ΕΚΤΕΝΗΣ ΠΕΡΙΛΗΨΗ

---

---

Με τον όρο πνευμονική υπέρταση ορίζεται η αύξηση της πνευμονικής αρτηριακής πίεσης σε τιμές μεγαλύτερες από τις φυσιολογικές. Αυτή η αύξηση έχει ως άμεση συνέπεια την πρόκληση υπερφόρτισης πίεσης της δεξιάς κοιλίας της καρδιάς, η οποία οδηγεί αρχικά σε υπερτροφία και τελικά σε δεξιά καρδιακή ανεπάρκεια και ακόμη και στο θάνατο. Πράγματι, η πνευμονική αρτηριακή υπέρταση (pulmonary arterial hypertension, PAH) αποτελεί μια θανατηφόρο νόσο με μεγάλα ποσοστά θνησιμότητας και νοσηρότητας. Επίσης, αν δεν διαγνωσθεί και αντιμετωπιστεί έγκαιρα, μετά η μέση επιβίωση είναι μόλις 2,8 έτη. Όμως, παρόλα αυτά, ακόμα και στις μέρες μας, η πρόγνωση και η διάγνωσή της ουσιαστικά εξακολουθεί να καθορίζεται από την ανάπτυξη υπερτροφίας και τελικά από τη διάταση και δυσλειτουργία της δεξιάς κοιλίας.

Γενικά, για την αντιμετώπιση της πνευμονικής υπέρτασης υπάρχουν τρεις κύριες θεραπευτικές επιλογές, οι οποίες είναι οι φαρμακολογικές θεραπείες, η μηχανική υποστήριξη της δεξιάς κοιλίας (με τη χρήση συσκευών υποβοήθησης), και η χρήση βιοϋλικών και εμφυτευμάτων. Αναφορικά με την τελευταία, η βιβλιογραφική ανασκόπηση δείχνει ότι δεν υπάρχει συστηματική καταγεγραμμένη εμπειρία για εμφυτεύματα για χρήση στο μυοκάρδιο της δεξιάς κοιλίας μετά από πνευμονική υπέρταση. Η παρούσα εργασία επικεντρώνεται στην κάλυψη του κενού αυτού, προτείνοντας, εν είδει *Οδικού Χάρτη (Road Map)*, μία στρατηγική ανάπτυξης βιοϋλικών για κατασκευή εμφυτευμάτων που μπορούν να χρησιμοποιηθούν για την αντιμετώπιση (πρόληψη, θεραπεία) της πνευμονικής υπέρτασης. Έτσι η έρευνα που αναλήφθηκε στην παρούσα διατριβή έχει δύο διακριτά στάδια. Το πρώτο αφορά στην επιλογή, στην πρόκριση και στην αριστοποίηση του βιοϋλικού που μπορεί να χρησιμοποιηθεί για το σκοπό αυτό. Το δεύτερο αναδεικνύει τη μελέτη (υπό το πρίσμα της βιολογίας, της ιατρικής, της μικροδομής, της χημείας, και της μηχανικής) της διεπιφάνειας και των αλληλεπιδράσεων μεταξύ του εμφυτεύματος και της εξωτερικής επιφάνειας του μυοκαρδίου όπου τοποθετείται η μεμβράνη, ως μείζονος

σπουδαιότητας ζήτημα για την πρόβλεψη και την κατανόηση της απόδοσης του βιοϋλικού στην αντιμετώπιση της νόσου, ακολουθώντας το ενδεδειγμένο ιατρικό πρωτόκολλο που θα προτείνει ο χειρουργός για τη συγκεκριμένη εφαρμογή.

Αφού προκρίθηκε το σχήμα του εμφυτεύματος, ως η καταλληλότερη επιλογή για το βιοϋλικό που θα εφαρμοστεί στη συγκεκριμένη περίπτωση (και για τη φάση της έρευνας που αναλήφθηκε στην παρούσα εργασία), ορίστηκαν οχτώ κριτήρια πρόκρισης, τα οποία πρέπει να ικανοποιεί ένα βιοϋλικό για να μπορεί να επιλεγεί ως υποψήφιο να χρησιμοποιηθεί στην αντιμετώπιση της νόσου. Αυτά ήταν (1) η δυνατότητα δημιουργίας μεμβράνης, (2) τα καλά ποιοτικά χαρακτηριστικά της μεμβράνης, (3) η ευκαμψία για να μπορεί να περιβάλλει επικαρδιακά τον ιστό, (4) οι ελεγχόμενες-ρυθμιζόμενες μηχανικές ιδιότητες ώστε να είναι παρόμοιες με αυτές του καρδιακού ιστού, (5) το ελεγχόμενο-ρυθμιζόμενο πάχος, (6) το ουδέτερο pH, (7) η βιοσυμβατότητα *in vitro* και *in vivo*, και (8) η ικανότητα βιοαποικοδόμησης σε συγκεκριμένο χρονικό διάστημα. Αναπτύχθηκαν μια σειρά υδροπηκτωμάτων, ξεκινώντας από το PEG (πολυ(αιθυλενογλυκόλη)) και τα παράγωγά του PEGSDA (PEG sebacate diacrylate) και OPF (oligo poly(ethylene glycol) fumarate), και στη συνέχεια υδροπηκτώματα των φυσικών πολυσακχαριτών με βάση το αλγινικό οξύ και τη χιτοζάνη. Τα πρώτα υδροπηκτώματα με βάση το PEG καθώς και αυτό του αλγινικού οξέος δεν ικανοποιούσαν τα κριτήρια πρόκρισης και για το λόγο αυτό αποκλείστηκαν από περαιτέρω θεώρηση και μελέτη. Αντίθετα, τα υδροπηκτώματα της χιτοζάνης έδειξαν καλύτερη συμπεριφορά και για το λόγο αυτό, έγινε εις βάθος μελέτη διαφόρων τρόπων παρασκευής του υδροπηκτώματος αυτού με σκοπό να ικανοποιηθούν τα κριτήρια πρόκρισης. Οι παράμετροι που ελέγχθηκαν ήταν το μοριακό βάρος της χιτοζάνης (χρησιμοποιήθηκε μεσαίου και χαμηλού μοριακού βάρους χιτοζάνη), το διάλυμα εξουδετέρωσης (NaOH, KOH, β-GP), και ο τρόπος εξουδετέρωσης (εμβάπτιση ή αργή ενστάλαξη). Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι κάθε συνδυασμός των τριών αυτών παραγόντων επηρεάζει το μηχανισμό σχηματισμού του υδροπηκτώματος και κατά συνέπεια την ποιότητα του τελικού προϊόντος. Τελικά, η μεμβράνη με τις βέλτιστες ιδιότητες παρασκευάστηκε με τη μέθοδο της ζελατινοποίησης, χρησιμοποιώντας ως παράγοντα εξουδετέρωσης διάλυμα NaOH, χωρίς να πραγματοποιηθεί εξάτμιση διαλύτη.

Οι ιδιότητες της μεμβράνης αυτής, που ικανοποιούσε τα κριτήρια επιλογής, προσδιορίστηκαν πειραματικά. Αυτές ήταν ο προσδιορισμός του βαθμού αποακετυλίωσης, τα δομικά χαρακτηριστικά της μεμβράνης που προσδιορίστηκαν με τη χρήση περίθλασης ακτίνων X και φασματοσκοπίας μέσου υπερύθρου (FT-IR), η μικροδομή και η υφή (πορώδες) της πορώδους μεμβράνης, οι θερμικές ιδιότητες, η ρόφηση σε υγρό περιβάλλον (PBS και νερό) στους 37°C, και οι μηχανικές ιδιότητες, οι οποίες μετρήθηκαν με πειράματα αντοχής σε εφελκυσμό σε ξηρό και υγρό περιβάλλον, καθώς και μετά από παραμονή της μεμβράνης σε πλάσμα αίματος και PBS στους 37°C για την εκτίμηση της υποβάθμισης των μηχανικών ιδιοτήτων σε φυσιολογικό περιβάλλον με το χρόνο, και με μετρήσεις δυναμικής μηχανικής ανάλυσης (DMA) σε ξηρό και υγρό περιβάλλον για τον προσδιορισμό του μέτρου αποθήκευσης ( $E'$ ) και του συντελεστή απόσβεσης ( $\tan\delta$ ). Οι ιδιότητες αυτές μετρήθηκαν με σκοπό να αξιολογηθεί κατά πόσο η μεμβράνη προσεγγίζει τις ιδιότητες του καρδιακού ιστού. Πράγματι, τα αποτελέσματα έδειξαν ότι οι φυσικοχημικές ιδιότητες και η μικροδομή επιτρέπουν τη θεώρηση της μεμβράνης ως υποψήφιας για χρήση στη συγκεκριμένη εφαρμογή, οι δε τιμές των μηχανικών ιδιοτήτων προσεγγίζουν αρκετά ικανοποιητικά τις τιμές του ιστού του μυοκαρδίου.

Στη συνέχεια, με βάση τις ιδιότητες που προσδιορίστηκαν, έγινε μελέτη της διεπιφάνειας μεταξύ της μεμβράνης και κυττάρων ή καρδιακού ιστού. Στην αρχή διεξήχθη βιολογικός *in vitro* έλεγχος με κυτταροκαλλιέργειες ινοβλαστών (NIH3T3), ο οποίος έδειξε την επιβίωση και την ανάπτυξη των κυττάρων αυτών στη μεμβράνη χιτοζάνης, υποδεικνύοντας τη βιοσυμβατότητα της μεμβράνης που κατασκευάστηκε. Ακολούθησε ο *in vivo* έλεγχος με εμφύτευση της μεμβράνης επικαρδιακά σε φυσιολογικούς επίμυες τύπου Wistar, ο οποίος έδειξε ότι ο χειρουργός μπορεί εύκολα και αξιόπιστα να χειριστεί τη μεμβράνη στο χειρουργείο, η οποία τοποθετείται με ακρίβεια γύρω από την καρδιά και παραμένει σταθερή στη θέση της καθ' όλη την περίοδο της εμφύτευσης (30 ημέρες), δεν προκαλεί προβλήματα ή θάνατο στα ζώα και δίνει ενδείξεις αποικοδόμησης. Μετά την ευθανασία των ζώων, η μελέτη αντίδρασης ξένου σώματος κατέγραψε την καλύτερη δυνατή εξέλιξη ως απόκριση του εμφυτευόμενου υλικού, όπου καταγράφηκαν σημαντική μείωση των φλεγμονωδών στοιχείων και εμφανής αύξηση νέων αγγείων σε ένα χαλαρό υπόστρωμα που προσομοιάζει αυτό της φυσιολογικής υποεπικαρδιακής στοιβάδας.

Το επόμενο βήμα ήταν η μελέτη της χημείας της διεπιφάνειας μεταξύ της μεμβράνης και του ιστού του μυοκαρδίου μετά από αλληλεπίδραση (δηλαδή εμφύτευση) 2 και 7 ημερών. Ελήφθη ο ιστός της καρδιάς «τυλιγμένος» με τη μεμβράνη, από τα ζώα και ακολούθησε ο διαχωρισμός της διεπιφάνειας τους. Η μελέτη των επιφανειών μετά το διαχωρισμό, έγινε πειραματικά με χρήση φασματοσκοπίας υπερύθρου (FT-IR) και φασματοσκοπίας φωτοηλεκτρονίων ακτίνων X (XPS), καθώς και υπολογιστικά, χρησιμοποιώντας τη θεωρία συναρτησιακών της ηλεκτρονιακής πυκνότητας (DFT), σύμφωνα με τη μέθοδο B3LYP/6-31G. Αμφότερα τα πειραματικά και τα θεωρητικά αποτελέσματα έδειξαν την ισχυρή αλληλεπίδραση μεταξύ μεμβράνης και ιστού, η οποία οφείλεται στην ανάπτυξη ιοντικών δεσμών και δεσμών υδρογόνου.

Τέλος, με τη χρήση υπολογιστικής μοντελοποίησης αναπτύχθηκε ένα ρεαλιστικό μοντέλο προσομοίωσης της ανθρώπινης καρδιάς και έγινε εκτίμηση της επίδρασης της μεμβράνης που παρασκευάστηκε, στα μεγέθη της τοιχωματικής τάσης, της παραμόρφωσης και της μετατόπισης, στην περίπτωση της πνευμονικής υπέρτασης. Για την επίλυση του προβλήματος, πρώτα κατασκευάστηκε η τρισδιάστατη γεωμετρία της δεξιάς κοιλίας, ακολούθησε η διακριτοποίηση για το τοίχωμα και το ρευστό (αίμα), και τέλος ορίστηκαν οι συνοριακές συνθήκες και οι ιδιότητες του ρευστού και του τοιχώματος. Δοκιμάστηκαν διαφορετικά πάχη μεμβρανών (1, 2, 3 mm) και διαφορετικά μέτρα ελαστικότητας (0,3 - 0,7 MPa).

Η εργασία ολοκληρώνεται με τη συζήτηση, την παράθεση των συμπερασμάτων και με προτάσεις για μελλοντική έρευνα.



---

---

## SUMMARY

---

---

### Development of right ventricular implants in pulmonary hypertension

Maria Roumpi

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

**Ph.D. Thesis**

Extended Abstract

Pulmonary hypertension is defined as an increase in pulmonary arterial pressure at values higher than the normal ones. This increase has as a direct consequence of causing right ventricular pressure overload, which initially leads to hypertrophy and ultimately to right heart failure or even death. Indeed, pulmonary arterial hypertension (PAH) is a lethal disease with high rates of mortality and morbidity. Also, if not diagnosed and treated promptly, then average survival is only 2.8 years. Nonetheless, prognosis and diagnosis is still determined by the hypertrophy and by the right ventricular dilation and dysfunction.

There are three main therapeutic options for the treatment of pulmonary hypertension, pharmacological treatments, mechanical support of the right ventricle (using special devices), and the use of biomaterials and implants. Regarding the latter option, a thorough literature review shows that there is no scientific documentation reporting on implants developed for use in right ventricular myocardium after pulmonary hypertension. The present study aims at covering this gap by proposing a *Road Map* for the development of biomaterials for implants that can be used to treat (prevent, treat) pulmonary hypertension. Thus, this investigation comprises two distinct stages. The first one concerns the selection, qualification and optimization of

a biomaterial that can be a candidate for being used for this purpose. The second one highlights the development (in terms of biology, surgery practice and performance, microstructure, chemistry, and mechanics) of the interface and the interactions between the implant and the outer surface of the myocardium, where the membrane is placed, as a major issue for predicting and understanding the performance of a biomaterial in the treatment of the disease, following the appropriate medical protocol proposed by the surgeon as far as its application in the heart is concerned.

In the light of the specific application in the present case and the level of the research undertaken in this study, the most suitable geometry of the biomaterial was selected to be that of a membrane. Then, eight qualification criteria were defined, which must satisfy a biomaterial in order to be selected as candidate for use in the treatment of the disease. These are (1) the ability to create a membrane, (2) the good quality of the membrane, (3) the flexibility in order to be able to wrap around the epicardial tissue, (4) the tuning ability to regulate the mechanical properties in order to approach those of the cardiac tissue, (5) the tuning ability to regulate the thickness, (6) neutral pH, (7) *in vitro* and *in vivo* biocompatibility, and (8) biodegradability within a specific period of time. A series of hydrogels were produced, starting with PEG (poly (ethylene glycol)) and its derivatives of PEGSDA (PEG sebacate diacrylate) and OPF (oligo poly (ethylene glycol) fumarate), followed by hydrogels of natural polysaccharides based on alginic acid and chitosan. The hydrogels based on PEG and alginic acid did not meet the qualification criteria and were, therefore, rejected from further consideration and experimentation. However, chitosan hydrogels showed better behavior. Therefore, various preparation methods were tested in order to produce a membrane that meets the qualification criteria. The parameters tested were the molecular weight (medium and low molecular weight chitosan was used), the neutralization solution (NaOH, KOH,  $\beta$ -GP), and the neutralization procedure (immersion or drop wise). Any combination of these three factors affects the mechanism of hydrogel formation and therefore the quality of the final product. The membrane with the optimal properties was prepared by the gelation process, using NaOH solution as a neutralizing agent without solvent evaporation.

The properties of this membrane, which met the selection criteria, were determined experimentally. The determination of the degree of deacetylation, of the

structural features of the membrane, by using X-ray diffraction and infrared (FT-IR) spectroscopy, of the microstructure and the texture (porosity) of the membrane, of the thermal properties, the sorption ability in PBS and water at 37 ° C, and the mechanical properties, was experimentally carried out. The mechanical properties were measured by tensile strength experiments in dry and wet environment as well as after the membrane immersion in blood plasma and PBS at 37° C for estimating the degradation of mechanical properties in a physiological environment over time, and by dynamic mechanical analysis (DMA) measurements in a dry and wet environment, to determine the storage modulus ( $E'$ ) and of the damping factor ( $\tan\delta$ ). The above properties were measured in order to evaluate whether this membrane mimics the properties of the heart tissue. The results showed that the physicochemical properties and the microstructure allow the membrane to be regarded as a candidate for use in the particular application, while its mechanical properties are in good agreement with the values of the myocardial tissue.

Then, the interface developed between the selected membrane and cells or cardiac tissue was studied. *In vitro* biological tests were performed in fibroblast cell culture (NIH3T3). The results showed evidence of viability and growth of fibroblasts in the chitosan membrane, suggesting the biocompatibility of the membrane. Then, *in vivo* tests, by implanting the membrane in Wistar rats, were conducted. The results showed that a surgeon can easily and reliably handle the membrane, the membrane was positioned accurately around the heart and remained firmly in place within the period of implantation (30 days), without causing any problems or death in animals. There was also evidence of degradation. After the animals euthanasia, the foreign body response recorded the best possible biological response to the implanted material, where a significant reduction in inflammatory and a prominent increase of newly formed vessels were recorded.

Then, the chemistry of the interface between the membrane and the myocardial tissue after implantation of 2 and 7 days was studied. The heart tissue wrapped around with membrane was obtained from the animals and the interface was separated. The detached surfaces were examined by infrared spectroscopy (FT-IR) and X-ray photoelectron spectroscopy (XPS). The experimental findings were interpreted with the aid of results calculated theoretically by using the density

functional theory (DFT) according to the B3LYP / 6-31G method. Both experimental and theoretical results suggested a strong interaction between membrane and tissue, attributed to ionic and hydrogen bonds.

Finally, computational modeling was performed by developing a realistic simulation model of the human heart, in order to evaluate the effect of the membrane prepared on wall stress, deformation, and displacement in the case of pulmonary hypertension. Before solving the problem, the three-dimensional geometry of the right ventricle was first constructed, followed by creating fluid and solid mesh and finally by defining the boundary conditions and the properties of the fluid and solid ventricular wall. Various thicknesses of membranes (1, 2, 3 mm) and Young modulus (0.3 - 0.7 MPa) were tested.

The work ends with a discussion, the conclusions, and proposals for future research.

---

## ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΠΙΝΑΚΩΝ

---

<b>Πίνακας 1.</b> Κριτήρια για την επιλογή του κατάλληλου υδροπηκτώματος για εφαρμογή στη θεραπεία πνευμονικής υπέρτασης με χρήση βιοϋλικών.....	66
<b>Πίνακας 2.</b> Μέσα μοριακά βάρη κατά αριθμό ( $M_n$ ), κατά βάρος ( $M_w$ ) και συντελεστής κατανομής μοριακών βαρών (PDI) των μακρομορίων PEG και PEGDA.....	78
<b>Πίνακας 3.</b> Μέσα μοριακά βάρη κατά αριθμό ( $M_n$ ), κατά βάρος ( $M_w$ ) και συντελεστής κατανομής μοριακών βαρών (PDI) των μακρομορίων PEG και PEGDA.....	84
<b>Πίνακας 4.</b> Ιδιότητες μεμβρανών χιτοζάνης με βάση τη συγκέντρωση των διαλυμάτων της, τον τύπο της βάσης που χρησιμοποιείται για εξουδετέρωση και τις διαφορετικές διαδικασίες εξουδετέρωσης.....	91
<b>Πίνακας 5.</b> Χαρακτηριστικές κορυφές και τύποι δονήσεων των φασμάτων σκόνης χιτοζάνης και μεμβράνης, μετά από εξουδετέρωση. ....	108
<b>Πίνακας 6.</b> Μέσες τιμές και τυπική απόκλιση μηχανικών ιδιοτήτων μεμβρανών χιτοζάνης σε ξηρό και υγρό περιβάλλον (διάλυμα PBS, 37°C). ....	118
<b>Πίνακας 7.</b> Πιθανά ή υπό εξέταση βιοϋλικά που έχουν χρησιμοποιηθεί στην μηχανική ιστών μυοκαρδίου.....	119
<b>Πίνακας 8.</b> Χαρακτηριστικές ζώνες απορρόφησης και τύποι δονήσεων του φάσματος της ECM της δεξιάς κοιλίας. ....	157
<b>Πίνακας 9.</b> Χαρακτηριστικές ζώνες απορρόφησης και τύποι δονήσεων των φασμάτων των μεμβρανών χιτοζάνης, δύο και επτά ημέρες μετά την εμφύτευση τους. ....	159
<b>Πίνακας 10.</b> Ποιοτικός και ποσοτικός προσδιορισμός της χημικής σύστασης των δειγμάτων CS_powder, CS_NaOH, CS_NaOH (2d), CS_NaOH (7d), ECM και ECM (2d). ....	162
<b>Πίνακας 11.</b> Εκτίμηση διαστάσεων δεξιάς κοιλότητας, τριγλώχινας και πνευμονικής βαλβίδας, καθώς και πνευμονικής αρτηρίας για την κατασκευή της γεωμετρίας της δεξιάς κοιλίας. ....	192
<b>Πίνακας 12.</b> Συνοριακές συνθήκες ρευστού [198]. ....	196
<b>Πίνακας 13.</b> Ιδιότητες ρευστού [198]. ....	199
<b>Πίνακας 14.</b> Ιδιότητες τοιχώματος μυοκαρδίου [144, 145]. ....	199
<b>Πίνακας 15.</b> Ιδιότητες μεμβράνης χιτοζάνης.....	199
<b>Πίνακας 16.</b> Κατάλογος χημικών αντιδραστηρίων για τη σύνθεση των υδροπηκτωμάτων. ....	219



---

## ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΕΙΚΟΝΩΝ

---

<b>Εικόνα 1.</b> Ανατομία της καρδιάς [5].....	43
<b>Εικόνα 2.</b> Ανεπάρκεια δεξιάς κοιλίας στην Πνευμονική Αρτηριακή Υπέρταση (ΠΑΥ) [11].....	46
<b>Εικόνα 3.</b> Η διαμόρφωση της RV σε υγιή καρδιά (αριστερά, A) και σε καρδιά με πνευμονική υπέρταση (δεξιά, B). Σύμφωνα με την σχέση Laplace, η πνευμονική υπέρταση χαρακτηρίζεται από αυξημένη τοιχωματική τάση ( $\sigma$ ), εξαιτίας της αυξημένης ενδοαυλικής πίεσης (P) και της ακτίνας του θαλάμου (r), εκτός και εάν το πάχος του τοιχώματος της RV (h) είναι αυξημένο από υπερτροφία [12]. .....	47
<b>Εικόνα 4.</b> Τριασδιάστατη δομή της φυσικής εξωκυττάριας μήτρας και οι αλληλεπιδράσεις μεταξύ των κυττάρων και των συστατικών της εξωκυττάριας μήτρας [42]. .....	51
<b>Εικόνα 5.</b> Επαναλαμβανόμενες δομικές μονάδες χιτοζάνης. ....	56
<b>Εικόνα 6.</b> (α) Δομή χιτοζάνης, και (β) στερεοχημική απεικόνιση της αλυσίδας, με αριθμημένα τα άτομα των στοιχείων, τους δεσμούς υδρογόνου (διακεκομμένες γραμμές) και τις διέδρες γωνίες ( $\varphi$ , $\psi$ και $\chi$ ) [71]. .....	57
<b>Εικόνα 7.</b> Σε χαμηλές τιμές pH (<6), οι αμινομάδες της χιτοζάνης πρωτονιώνονται και η χιτοζάνη αποκτά συμπεριφορά πολυκατιόντος. Σε υψηλές τιμές pH (>6,5), οι αμινομάδες είναι αποπρωτονιωμένες και ενεργές. [71] .....	58
<b>Εικόνα 8.</b> Μηχανισμός αντίδρασης σχηματισμού υδροπηκτώματος χιτοζάνης, με την ανάπτυξη δεσμών υδρογόνου, υδροφοβικών αλληλεπιδράσεων και του σχηματισμού κρυσταλλιτών (κάτω σχήμα) [75, 76]. .....	59
<b>Εικόνα 9.</b> Διάγραμμα ροής των διαφορετικών υλικών που συντέθηκαν, PEGDA, PEGSDA, OPF, υδροπήκτωμα αλγινικού και υδροπήκτωμα χιτοζάνης και η απόδοσή τους (+: Πλεονεκτήματα, -: Μειονεκτήματα).....	73
<b>Εικόνα 10.</b> Χημική δομή PEGDA .....	77
<b>Εικόνα 11.</b> Υδροπήκτωμα PEGDA, μετά τον φωτοπολυμερισμό. ....	77
<b>Εικόνα 12.</b> Φάσματα FT-IR του PEG και PEGDA.....	79
<b>Εικόνα 13.</b> Αντίδραση σχηματισμού PEGSDA. ....	83
<b>Εικόνα 14.</b> PEGSDA σε μορφή σκόνης, μετά από ξήρανση. ....	83
<b>Εικόνα 15.</b> Αντίδραση φωτοπολυμερισμού PEGSDA. ....	84
<b>Εικόνα 16.</b> Φάσματα FT-IR των μακρομορίων PEG, PEGS και PEGSDA. ....	85
<b>Εικόνα 17.</b> Αντίδραση σύνθεσης OPF. ....	86
<b>Εικόνα 18.</b> Σχηματισμός μεμβράνης αλγινικού, μετά από 48 ώρες παραμονής σε θερμοκρασία δωματίου. ....	88
<b>Εικόνα 19.</b> Σχηματισμός μεμβρανών χιτοζάνης σε καλούπι σιλικόνης στους $37\pm 1^\circ\text{C}$ . ....	93
<b>Εικόνα 20.</b> Διαδικασία αργής ενστάλαξης διαλύματος NaOH σε διάλυμα χιτοζάνης.....	95
<b>Εικόνα 21.</b> Φυσιοχημική διαδικασία παρασκευής υδροπηκτωμάτων χιτοζάνης μέσω της μεθόδου ζελατινοποίησης.....	101
<b>Εικόνα 22.</b> Προσδιορισμός του βαθμού αποακετυλίωσης (DD) μέσω τιτλοδότησης του διαλύματος χιτοζάνης.....	102
<b>Εικόνα 23.</b> Σχηματική αναπαράσταση κρυσταλλικών και άμορφων περιοχών του πολυμερούς, υποδεικνύοντας ένα «ελικοειδές» μονοπάτι για τα ένζυμα ή μόρια νερού, συντελώντας στη μείωση του ρυθμού αποικοδόμησης για τη χιτοζάνη με υψηλή κρυσταλλικότητα. ....	104

<b>Εικόνα 24.</b> Περιθλασιογράφημα σκόνης χιτοζάνης, όξινης μεμβράνης και μεμβράνης μετά από εξουδετέρωση με διάλυμα NaOH.....	105
<b>Εικόνα 25.</b> Φάσματα FT-IR σκόνης χιτοζάνης, όξινης μεμβράνης και μεμβράνης μετά από εξουδετέρωση.....	107
<b>Εικόνα 26.</b> Μικροδομές δειγμάτων (α) σκόνης χιτοζάνης, (β) όξινης μεμβράνης και (γ) μεμβράνης μετά από εξουδετέρωση.....	109
<b>Εικόνα 27.</b> Διάγραμμα κατανομής μεγέθους πόρων λυοφιλοποιημένης μεμβράνης χιτοζάνης.....	110
<b>Εικόνα 28.</b> Θερμογράφημα της σκόνης χιτοζάνης, όξινης μεμβράνης και μεμβράνης μετά από εξουδετέρωση με διάλυμα NaOH, στο θερμοκρασιακό εύρος 0-400°C.....	111
<b>Εικόνα 29.</b> Διάγραμμα ρόφησης της μεμβράνης μετά την εμβάπτιση της σε διάλυμα PBS (pH=7,4) και αποσταγμένο νερό, στους 37±1 °C για 144 h.....	113
<b>Εικόνα 30.</b> Διάγραμμα εκρόφησης της μεμβράνης, μετά την απομάκρυνση της από διάλυμα PBS (pH=7,4) και αποσταγμένο νερό, στους 37±1 °C για το χρονικό διάστημα των 144 h.....	114
<b>Εικόνα 31.</b> Συγκριτικά διαγράμματα μεταβολής βάρους της μεμβράνης σε διάλυμα PBS (pH=7,4) και σε αποσταγμένο νερό, κατά τη διάρκεια ρόφησης και εκρόφησης (37±1 °C, 10 h).....	115
<b>Εικόνα 32.</b> Διάγραμμα τάσης- παραμόρφωσης μεμβράνης χιτοζάνης σε ξηρό (dry) και υγρό (wet) περιβάλλον (διάλυμα PBS, 37°C) (n=5).....	117
<b>Εικόνα 33.</b> Διαγράμματα τάσης-παραμόρφωσης (σ-ε) μεμβρανών χιτοζάνης, πριν και μετά την εμβάπτιση τους σε διάλυμα PBS και πλάσμα αίματος για 1 ημέρα (1d), 2 ημέρες (2d), 5 ημέρες (5d) και 7 ημέρες (7d).....	121
<b>Εικόνα 34.</b> Υποβάθμιση του μέτρου δυσκαμψίας των μεμβρανών σε υδατικό περιβάλλον (διάλυμα PBS και πλάσμα αίματος) στο χρονικό διάστημα των 7 ημερών (n=5).....	122
<b>Εικόνα 35.</b> Υποβάθμιση της μέγιστης αντοχής των μεμβρανών σε υδατικό περιβάλλον (διάλυμα PBS και πλάσμα αίματος) στο χρονικό διάστημα των 7 ημερών (n=5).....	123
<b>Εικόνα 36.</b> Μεταβολή της μέγιστης παραμόρφωσης των μεμβρανών σε διάλυμα PBS και πλάσμα αίματος, στο χρονικό διάστημα των 7 ημερών (n=5).....	124
<b>Εικόνα 37.</b> Ποσοστό μείωσης δυσκαμψίας των μεμβρανών χιτοζάνης κατά τη διάρκεια εμβάπτισής τους σε διάλυμα PBS και πλάσμα αίματος (37°C).....	125
<b>Εικόνα 38.</b> Φάσματα FT-IR των θραυσμάτων των μεμβρανών μετά τον εφελκυσμό αφού πρώτα είχαν εμβάπτιστεί σε διάλυμα PBS και πλάσμα αίματος στο διάστημα των 7 ημερών.....	126
<b>Εικόνα 39.</b> Καμπύλες μεταβολής του μέτρου αποθήκευσης, E' και της tanδ συναρτήσει της συχνότητας των μεμβρανών χιτοζάνης σε ξηρό και υγρό περιβάλλον (n=5).....	128
<b>Εικόνα 40.</b> Επίδραση της αποθήκευσης σε υγρό περιβάλλον (37 °C) των μεμβρανών χιτοζάνης, στις δυναμικές μηχανικές ιδιότητες στο εύρος συχνοτήτων 0,1 - 50Hz (n=5).....	129
<b>Εικόνα 41.</b> Μορφολογικός έλεγχος των κυττάρων στη μεμβράνη χιτοζάνης με ανοσοφθορισμό των κυττάρων που έχουν αναπτυχθεί δύο μέρες στη μεμβράνη έναντι της πρωτεΐνης βιμεντίνης (γραμμή κλίμακας 20μm).....	133
<b>Εικόνα 42.</b> Μελέτη της ανάπτυξης των κυττάρων σε μεμβράνη χιτοζάνης. Α) Στατιστική ανάλυση του αριθμού των NIH3T3 κυττάρων που αναπτύχθηκαν σε καλυπτρίδες ή σε μεμβράνη χιτοζάνης για τέσσερις ημέρες. Β) Χαρακτηριστική εικόνα από την ανάπτυξη των κυττάρων σε καλυπτρίδα και στη μεμβράνη χιτοζάνης έπειτα από μια ημέρα καλλιέργειας των κυττάρων. (α) Κύτταρα σε καλυπτρίδα, (β) κύτταρα σε μεμβράνη χιτοζάνης.....	135
<b>Εικόνα 43.</b> Μεμβράνη χιτοζάνης πριν την εμφύτευση της επικαρδιακά.....	137
<b>Εικόνα 44.</b> Διασωλήνωση επίμυ υπό εισπνευστική αναισθησία.....	138
<b>Εικόνα 45.</b> Αριστερή πλάγια θωρακοτομή με α) αποκάλυψη του θωρακικού κλωβού και β) εξωτερίκευση της καρδιάς με τη χρήση ράμματος 6-0 και αποκάλυψη της δεξιάς κοιλίας.....	139



<b>Εικόνα 46.</b> Πρόσδεση και σταθεροποίηση του εμφυτεύματος επικαρδιακά του μυοκαρδίου α) με τη χρήση ράμματος και β) χωρίς ράμμα .....	140
<b>Εικόνα 47.</b> Συρραφή πλευρών θώρακα με τη χρήση ράμματος 3-0 (αριστερά) και δέρματος με τη χρήση ράμματος 2-0 (δεξιά). .....	140
<b>Εικόνα 48.</b> Εντοπισμός μεμβράνης χιτοζάνης 7 ημέρες μετά την εμφύτευση της (επάνω), χωρίς την ύπαρξη συμφύσεων στους θωρακικούς μύες (αριστερά), ενώ παρατηρείται η έναρξη της διαδικασίας επούλωσης του δέρματος (δεξιά).....	142
<b>Εικόνα 49.</b> Εντοπισμός εμφυτεύματος 21 ημέρες μετά την τοποθέτησή του επικαρδιακά, με σημαντικές ενδείξεις αποικοδόμησής του. ....	143
<b>Εικόνα 50.</b> Εντοπισμός μεμβράνης 30 ημέρες μετά την τοποθέτησή της επικαρδιακά με μεγάλο ποσοστό συρρίκνωσης και αποικοδόμησης (επάνω), χωρίς την ύπαρξη συμφύσεων στους θωρακικούς μύες (αριστερά) και πλήρης επούλωση του δέρματος, χωρίς την ύπαρξη πληγής (δεξιά). ....	144
<b>Εικόνα 51.</b> Χαρακτηριστικές εικόνες επικάλυψης από μεσοθηλιακά κύτταρα σε φυσιολογικό επικάρδιο. ....	148
<b>Εικόνα 52.</b> Χαρακτηριστικές εικόνες φλεγμονώδους αντίδρασης στην επιφάνεια του επικαρδίου, 7 ημέρες μετά την εικονική επέμβαση. ....	148
<b>Εικόνα 53.</b> Χαρακτηριστικές εικόνες μικρού βαθμού έντασης φλεγμονώδους αντίδρασης στην επιφάνεια του επικαρδίου αποτελούμενη κυρίως από μακροφάγα, 7 ημέρες μετά την αλληλεπίδρασή του με το εμφύτευμα. ....	149
<b>Εικόνα 54.</b> Χαρακτηριστικές εικόνες μείωσης των φλεγμονωδών στοιχείων στο επικάρδιο, με υπεροχή της ινοβλαστικής αντίδρασης και παρουσία νεόπλαστων αγγείων, 21 ημέρες μετά την επαφή του με το εμφύτευμα. ....	150
<b>Εικόνα 55.</b> Χαρακτηριστικές εικόνες υπεροχής των νεόπλαστων αγγείων σε ένα υπόστρωμα χαλαρού συνδετικού ιστού, 30 ημέρες μετά την επικαρδιακή εμφύτευση του υλικού. ....	150
<b>Εικόνα 56.</b> Μικροδομή λυοφιλοποιημένων δειγμάτων μεμβρανών χιτοζάνης, δύο (αριστερά) και επτά ημέρες (δεξιά) μετά την εμφύτευση τους επικαρδιακά.....	152
<b>Εικόνα 57.</b> Μικροδομή λυοφιλοποιημένων δειγμάτων της εξωκυττάριας μήτρας (ECM) του ιστού επίμυων, πριν (αριστερά) και μετά την αλληλεπίδραση με τη μεμβράνη χιτοζάνης (δεξιά).....	153
<b>Εικόνα 58.</b> Μορφολογία δείγματος ECM, μετά την αλληλεπίδρασή της με τη μεμβράνη. Στη μικρή εικόνα φαίνεται συγκριτικά, η μικροδομή λυοφιλοποιημένης μεμβράνης χιτοζάνης, 7 ημέρες μετά την εμφύτευσή της. ....	154
<b>Εικόνα 59.</b> Φάσματα FT-IR της ECM της δεξιάς κοιλίας, πριν και μετά την επαφή της με τη μεμβράνη. ....	157
<b>Εικόνα 60.</b> Φάσματα FT-IR των μεμβρανών χιτοζάνης δύο και επτά ημέρες μετά την εμφύτευση τους σε σύγκριση με το φάσμα χιτοζάνης πριν εμφυτευτεί. ....	158
<b>Εικόνα 61.</b> Φάσματα FT-IR της ECM και της χιτοζάνης, δύο και επτά ημέρες μετά την εμφύτευσή της. ....	160
<b>Εικόνα 62.</b> Φάσματα XPS στην περιοχή του C1s για τη σκόνη χιτοζάνης και τις μεμβράνες CS_NaOH, CS_NaOH (2d) και CS_NaOH (7d).....	165
<b>Εικόνα 63.</b> Φάσματα XPS στην περιοχή του O1s για τη σκόνη και τις μεμβράνες CS_NaOH, CS_NaOH (2d) και CS_NaOH (7d).....	167
<b>Εικόνα 64.</b> Φάσματα XPS στην περιοχή του N1s για τη σκόνη και τις μεμβράνες CS_NaOH, CS_NaOH (2d) και CS_NaOH (7d.).....	169
<b>Εικόνα 65.</b> Φάσματα XPS στην περιοχή του C1s για την εξωκυττάρια μήτρα πριν και μετά την αλληλεπίδρασή της με τη μεμβράνη (ECM, ECM 2d).....	171
<b>Εικόνα 66.</b> Φάσματα XPS στην περιοχή του O1s για την εξωκυττάρια μήτρα πριν την αλληλεπίδραση και μετά την αλληλεπίδραση με τη μεμβράνη (ECM, ECM 2d).....	172

<b>Εικόνα 67.</b> Φάσματα XPS στην περιοχή του N1s της ECM και ECM 2d. ....	173
<b>Εικόνα 68.</b> Φάσματα XPS στην περιοχή του P2p για την εξωκυττάρια μήτρα πριν και μετά την επαφή της με τη μεμβράνη (ECM, ECM 2d).....	174
<b>Εικόνα 69.</b> Τυχαία διαμόρφωση συστήματος χιτοζάνης και κολλαγόνου με ενέργεια αλληλεπίδρασης $\Delta E=14,9$ kcal/mol, σύμφωνα με τη μέθοδο B3LYP/6-31G.....	181
<b>Εικόνα 70.</b> Ευνοϊκότερη διαμόρφωση συστήματος χιτοζάνης-κολλαγόνου με ενέργεια συμπλοκοποίησης $\Delta E=23,2$ kcal/mol, σύμφωνα με τη μέθοδο B3LYP/6-31G.....	182
<b>Εικόνα 71.</b> Φάσματα FT-IR της χιτοζάνης, (α) πειραματικό φάσμα και (β) θεωρητικό φάσμα υπολογισμένο με τη μέθοδο DFT. ....	183
<b>Εικόνα 72.</b> Φάσματα FT-IR της χιτοζάνης μετά την αλληλεπίδραση με το κολλαγόνο τύπου I, (α) πειραματικό φάσμα και (β) θεωρητικό φάσμα υπολογισμένο με τη μέθοδο DFT.....	184
<b>Εικόνα 73.</b> Στρωτή και τυρβώδης ροή. ....	187
<b>Εικόνα 74.</b> Ανατομικό μοντέλο καρδιάς από μαγνητική τομογραφία (αριστερά) και διακριτοποιημένο μοντέλο πεπερασμένων στοιχείων με 208561 τετράεδρα στοιχεία και 47323 κόμβους (δεξιά) [187]...	189
<b>Εικόνα 75.</b> Απεικόνιση της καρδιάς από αξονική τομογραφία, στην πλατφόρμα λογισμικού 3D slicer.	190
<b>Εικόνα 77.</b> Χαρακτηρισμός του ρευστού της δεξιάς κοιλίας στο 3D slicer. ....	190
<b>Εικόνα 76.</b> Χαρακτηρισμός του τοιχώματος της δεξιάς κοιλίας στο 3D slicer.....	190
<b>Εικόνα 78.</b> Τρισδιάστατη γεωμετρία της δεξιάς κοιλίας. ....	191
<b>Εικόνα 79.</b> Απεικόνιση μοντέλου ρευστού και τοιχώματος της φυσιολογικής δεξιάς κοιλίας.....	192
<b>Εικόνα 80.</b> Απεικόνιση μοντέλου ρευστού και τοιχώματος της ασθενούς δεξιάς κοιλίας (στένωση πνευμονικής αρτηρίας). ....	193
<b>Εικόνα 81.</b> Απεικόνιση μοντέλου της ασθενούς δεξιάς κοιλίας με την τοποθέτηση μεμβράνης επικαρδιακά. ....	193
<b>Εικόνα 82.</b> Δημιουργία πλέγματος ρευστού της κοιλίας με 595573 τετράεδρα στοιχεία. ....	194
<b>Εικόνα 83.</b> Δημιουργία πλέγματος τοιχώματος της κοιλίας με 792345 τετράεδρα στοιχεία. ....	194
<b>Εικόνα 84.</b> Συνοριακές συνθήκες για το ρευστό υγιούς δεξιάς κοιλίας. ....	197
<b>Εικόνα 85.</b> Συνοριακές συνθήκες για το ρευστό ασθενούς δεξιάς κοιλίας. ....	197
<b>Εικόνα 86.</b> Απεικόνιση των σημείων στήριξης της κοιλίας. ....	198
<b>Εικόνα 87.</b> Απεικόνιση των σημείων στήριξης της μεμβράνης σε επαφή με την κοιλία. ....	198
<b>Εικόνα 88.</b> Απεικόνιση της κατανομής της ισοδύναμης τάσης στο τοίχωμα της φυσιολογικής δεξιάς κοιλίας.....	200
<b>Εικόνα 89.</b> Απεικόνιση της κατανομής της ισοδύναμης τάσης στο τοίχωμα της ασθενούς δεξιάς κοιλίας. ....	201
<b>Εικόνα 90.</b> Απεικόνιση της κατανομής της ισοδύναμης παραμόρφωσης στο τοίχωμα της φυσιολογικής δεξιάς κοιλίας.....	201
<b>Εικόνα 91.</b> Απεικόνιση της κατανομής της ισοδύναμης παραμόρφωσης στο τοίχωμα της ασθενούς δεξιάς κοιλίας.....	202
<b>Εικόνα 92.</b> Απεικόνιση της κατανομής της συνολικής μετατόπισης στο τοίχωμα της φυσιολογικής δεξιάς κοιλίας.....	202
<b>Εικόνα 93.</b> Απεικόνιση της κατανομής της συνολικής μετατόπισης στο τοίχωμα της ασθενούς δεξιάς κοιλίας. ....	203
<b>Εικόνα 94.</b> Μεταβολή (α) της ισοδύναμης τάσης, (β) της ισοδύναμης παραμόρφωσης και (γ) της συνολικής μετατόπισης στο εσωτερικό και το εξωτερικό τοίχωμα του μυοκαρδίου, ως συνάρτηση του μέτρου ελαστικότητας της μεμβράνης πάχους 1 mm.....	205

<b>Εικόνα 95.</b> Μεταβολή (α) της ισοδύναμης τάσης, (β) της ισοδύναμης παραμόρφωσης και (γ) της συνολικής μετατόπισης για το εσωτερικό και εξωτερικό τοίχωμα του μυοκαρδίου, ως συνάρτηση του μέτρου ελαστικότητας της μεμβράνης πάχους 2 mm. ....	206
<b>Εικόνα 96.</b> Μεταβολή (α) της ισοδύναμης τάσης, (β) της ισοδύναμης παραμόρφωσης και (γ) της συνολικής μετατόπισης στο εσωτερικό και εξωτερικό τοίχωμα του μυοκαρδίου, ως συνάρτηση του μέτρου ελαστικότητας της μεμβράνης πάχους 3mm. ....	207
<b>Εικόνα 97.</b> Συγκριτικά διαγράμματα μεταβολής της ισοδύναμης τάσης στο εσωτερικό και εξωτερικό τοίχωμα του μυοκαρδίου, μετά την τοποθέτηση μεμβρανών πάχους 1, 2 και 3mm. ....	208
<b>Εικόνα 98.</b> Συγκριτικά διαγράμματα μεταβολής της ισοδύναμης παραμόρφωσης στο εσωτερικό και εξωτερικό τοίχωμα του μυοκαρδίου, μετά την τοποθέτηση μεμβρανών πάχους 1, 2 και 3mm. ....	208
<b>Εικόνα 99.</b> Συγκριτικά διαγράμματα μεταβολής της συνολικής μετατόπισης στο εσωτερικό και εξωτερικό τοίχωμα του μυοκαρδίου, μετά την τοποθέτηση μεμβρανών πάχους 1, 2 και 3mm. ....	209
<b>Εικόνα 100.</b> Φασματοφωτόμετρο FT/IR-6200 της εταιρείας Jasco (αριστερά) και σκεύη για την παρασκευή των δισκίων με KBr (δεξιά).....	224
<b>Εικόνα 101.</b> Περιθλασίμετρο Ακτίνων-Χ Bruker, D8 Advance.....	226
<b>Εικόνα 102.</b> Ηλεκτρονικό μικροσκόπιο σάρωσης (Oxford company, Jeol 6510LV).....	227
<b>Εικόνα 103.</b> Δείγματα μεμβρανών χιτοζάνης (επάνω μέρος) και ιστοί μυοκαρδίου επίμυων (κάτω μέρος) μετά από λυοφιλοποίηση και τοποθέτησή τους στη συσκευή επιμετάλλωσης.....	227
<b>Εικόνα 104.</b> Θερμιδόμετρο DSC Q20, της TA. ....	228
<b>Εικόνα 105.</b> Τοποθέτηση δισκίων σε ξηραντήρες με silica gel ως ξηραντικό μέσο. ....	230
<b>Εικόνα 106.</b> Σχηματική αναπαράσταση δυνάμεων εφελκυσμού (F), καθώς και των αντίστοιχων τάσεων (S) που αναπτύσσονται στο υλικό. ....	231
<b>Εικόνα 107.</b> Μηχανική καταπόνηση μεμβρανών χιτοζάνης σε ιδιοκατασκευή για (α) ξηρό και (β) υγρό περιβάλλον (διάλυμα PBS, 37±1°C).....	232
<b>Εικόνα 108.</b> Εμβάπτιση μεμβρανών σε υδατικά διαλύματα (PBS και πλάσμα), για το χρονικό διάστημα των 1, 2, 5 και 7 ημερών (37±1°C).....	232
<b>Εικόνα 109.</b> Αναπήδηση μπάλας από δάπεδο. Το ύψος αναπήδησης της μπάλας είναι μικρότερο από το ύψος από όπου αφέθηκε, διότι κατά την κρούση της μπάλας στο δάπεδο απωλέσθηκε μέρος της αρχικής ενέργειας, E'', λόγω τριβής και εσωτερικών μοριακών κινήσεων.....	234
<b>Εικόνα 110.</b> Δυναμικός μηχανικός αναλυτής DMA 242C, NETZSCH. ....	235
<b>Εικόνα 111.</b> Ενεργειακό διάγραμμα εκπομπής φωτοηλεκτρονίων. Ακτίνα X με ενέργεια ην προσπίπτει στην επιφάνεια και το εκπέμπεται ηλεκτρόνιο. ....	236



# **I. ΕΙΣΑΓΩΓΗ**



## **I. ΕΙΣΑΓΩΓΗ: Η ΝΟΣΟΣ ΤΗΣ ΠΝΕΥΜΟΝΙΚΗΣ ΥΠΕΡΤΑΣΗΣ ΚΑΙ Η ΑΝΤΙΜΕΤΩΠΙΣΗ ΤΗΣ ΜΕΣΩ ΒΙΟΪΛΙΚΩΝ**

Η ενότητα αυτή παρουσιάζει εν συντομία σημαντικά, για τη διατριβή αυτή, αλλά ταυτόχρονα υποστηριζόμενα με βιβλιογραφικές αναφορές, ως αναπόσπαστο μέρος της διατριβής, στις οποίες μπορεί να προστρέξει ο αναγνώστης, εισαγωγικά στοιχεία που αφορούν στο αντικείμενο της έρευνας που αναπτύχθηκε και αναλύεται στις επόμενες ενότητες II, III και IV.<sup>1</sup> Πιο αναλυτικά, στο πρώτο μέρος της Εισαγωγής, μετά από μία συνοπτική περιγραφή των γενικών χαρακτηριστικών του οργάνου της καρδιάς, περιγράφεται λεπτομερώς η νόσος της πνευμονικής υπέρτασης. Στο δεύτερο μέρος, με βάση τα αποτελέσματα της βιβλιογραφικής ανασκόπησης, αναπτύσσονται οι τρόποι αντιμετώπισης της νόσου με διάφορες θεραπευτικές επιλογές (όπως φαρμακολογικές θεραπείες, μηχανική υποστήριξη με συσκευές κοιλιακής υποβοήθησης, βιοϊλικά). Το τρίτο μέρος εστιάζει το ενδιαφέρον του στα βιοϊλικά που χρησιμοποιούνται στο μυοκάρδιο και γίνεται εκτενής αναφορά σε αυτά που μελετώνται στην παρούσα εργασία.

---

<sup>1</sup> Για την καλύτερη εξυπηρέτηση του κειμένου, σε κάποια κεφάλαια, ειδικά στην ενότητα III-3 όπως και σε κάποια παραρτήματα των τεχνικών χαρακτηρισμού, παρατίθενται εκεί εισαγωγικές παράγραφοι με παράθεση βασικών θεωρητικών εννοιών που αφορούν στις συγκεκριμένες τεχνικές και μεθόδους των παραγράφων εκείνων (ενώ η παράθεσή τους σε αυτό το κεφάλαιο της Εισαγωγής της διατριβής θα αλλοίωνε τη στόχευσή της).

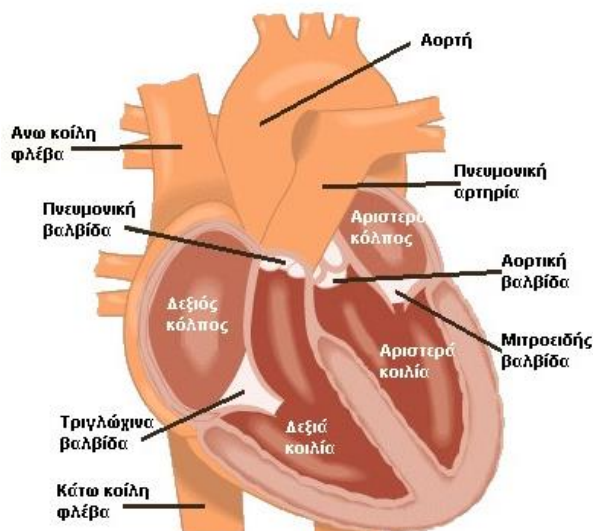
## 1. Η ΝΟΣΟΣ ΤΗΣ ΠΝΕΥΜΟΝΙΚΗΣ ΥΠΕΡΤΑΣΗΣ

Οι καρδιαγγειακές ασθένειες (cardiovascular diseases, CVDs) αποτελούν την πιο συχνή αιτία θανάτου παγκοσμίως. Σύμφωνα με τον Παγκόσμιο Οργανισμό Υγείας (World Health Organization, WHO), περισσότεροι από 17 εκατομμύρια άνθρωποι αποβιώνουν ετησίως από καρδιαγγειακές νόσους, ενώ πάνω από 3 εκατομμύρια αυτών των θανάτων εμφανίζονται κοντά στην ηλικία των 60 ετών. Το ποσοστό των πρόωρων θανάτων από καρδιαγγειακές παθήσεις κυμαίνεται από 4% στις χώρες υψηλού βιοτικού επιπέδου, μέχρι 42% στις χώρες χαμηλού βιοτικού επιπέδου, αυξάνοντας τις ανισότητες στη συχνότητα εμφάνισης των CVDs μεταξύ των χωρών και των πληθυσμών.

Η πνευμονική αρτηριακή υπέρταση (pulmonary arterial hypertension, PAH) αποτελεί μια θανατηφόρο νόσο με ποσοστό θνησιμότητας από 20 έως 40% μέσα στα επόμενα τρία χρόνια μετά τη διάγνωση [1, 2], ενώ συνολικά η αυξημένη πίεση αίματος υπολογίζεται ότι προκαλεί 7,5 εκατομμύρια θανάτους, αποτελώντας, έτσι, το 12,8% των συνολικών ετήσιων θανάτων [3, 4].

Στο σημείο αυτό, και πριν προχωρήσουμε στην αναλυτική περιγραφή της νόσου της πνευμονικής υπέρτασης σε ό,τι ενδιαφέρει την παρούσα εργασία, θα γίνει μία πολύ συνοπτική περιγραφή ορισμένων γενικών χαρακτηριστικών της καρδιάς, με σκοπό να γίνουν αντιληπτά τα συγκεκριμένα σημεία (όπως η ανατομική θέση, η γεωμετρία και η γειτνίασή της με άλλα σημεία του σώματος) (Εικόνα 1) και οι λειτουργίες της που αναφέρονται στην εργασία αυτή και αφορούν κυρίως (αλλά όχι αποκλειστικά) στο ιατρικό κομμάτι της συγκεκριμένης νόσου [5].





**Εικόνα 1.** Ανατομία της καρδιάς [5].

Η καρδιά, που έχει σχήμα ανεστραμμένης τριγωνικής πυραμίδας, με την κορυφή προς τα κάτω, εμπρός και αριστερά, είναι ένας κοίλος μυς που βρίσκεται στο θωρακικό τοίχωμα ανάμεσα στους πνεύμονες, ελαφρά προς τα αριστερά της μέσης γραμμής. Η φυσιολογική καρδιά βρίσκεται μέσα στον περικαρδιακό σάκο, στο μέσο του θώρακα. Η κορυφή της καρδιάς αγγίζει την άνω επιφάνεια του διαφράγματος, το οποίο βρίσκεται κοντά στην οπίσθια και κατώτερη καρδιακή επιφάνεια.

Η καρδιακός μυς αποτελείται από τέσσερεις κοιλότητες: το δεξιό κόλπο και τη δεξιά κοιλία, που καταλαμβάνουν το πρόσθιο τμήμα της καρδιάς, και τον αριστερό κόλπο και την αριστερή κοιλία, που καταλαμβάνουν το οπίσθιο τμήμα. Οι κόλποι χωρίζονται μεταξύ τους με το μεσοκοιλιακό διάφραγμα και οι κοιλίες με το μεσοκοιλιακό διάφραγμα. Ο δεξιός κόλπος χωρίζεται από τη δεξιά κοιλία με την τριγλώχινα βαλβίδα, και η δεξιά κοιλία χωρίζεται από την πνευμονική αρτηρία με την τρίπτυχη πνευμονική βαλβίδα, ενώ ο αριστερός κόλπος χωρίζεται από την αριστερή κοιλία με τη δίπτυχη μιτροειδή βαλβίδα και η αριστερή κοιλία χωρίζεται από την αορτή με την τρίπτυχη αορτική βαλβίδα.

Το τοίχωμα της καρδιάς αποτελείται κυρίως από το μυοκάρδιο, το οποίο εξωτερικά επενδύεται από το περισπλάγχνιο πέταλο του ορογόνου περικαρδίου, το καλούμενο επικάρδιο και εσωτερικά από το ενδοκάρδιο, το οποίο αποτελεί συνέχεια του ενδοθηλίου των αγγείων. Το επικάρδιο αποτελείται από ινώδη και ελαστικό ιστό,

ο οποίος στην ελεύθερη επιφάνειά του καλύπτεται από αποπλατυσμένα πολύγωνα μεσοθηλιακά κύτταρα. Το ενδοκάρδιο είναι πολύ λεπτότερο από το επικάρδιο. Το περικάρδιο είναι μία λεπτή μεμβράνη, η οποία καλύπτει εξωτερικά το μυοκάρδιο, ενώ σχηματίζει δύο πέταλα (το έξω ή περίτονο και το έσω ή περισπλάχνιο). Ανάμεσα στα δύο πέταλα υπάρχει η περικαρδιακή κοιλότητα που περιέχει λίγο ορώδες υγρό (το περικαρδιακό), το οποίο διευκολύνει τις κινήσεις της καρδιάς.

Η καρδιά, που είναι κατά το μεγαλύτερο μέρος της (πλην της βάσης της) κινούμενο εφ'όρου ζωής όργανο, στηρίζεται σταθερά στη θέση της από το περικάρδιο. Αυτό αναδιπλώνεται, ως επικάρδιο, επί του αρχικού τμήματος 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. Το περικάρδιο, ενώνεται με το θωρακικό τοίχωμα με τους στερνο-, φρενο-, σπόνδυλο-, περικαρδιακούς συνδέσμους [6].

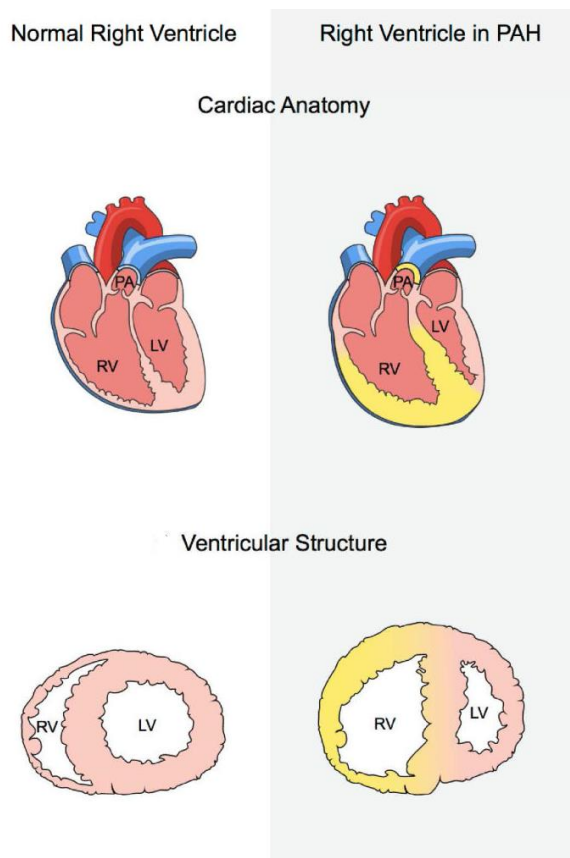
Κάθε καρδιακός κύκλος του αίματος θεωρείται ότι ξεκινά με την είσοδο του αποξυγονωμένου αίματος από το σώμα στην καρδιά. Το αίμα αυτό εισέρχεται στο δεξιό κόλπο και από εκεί, μέσω της τριγλώχινας βαλβίδας, εισάγεται στη δεξιά κοιλία. Εκείνη το προωθεί στους πνεύμονες όπου εμπλουτίζεται με οξυγόνο. Το αίμα που εισχωρεί στο δεξιό κόλπο και τη δεξιά κοιλία της καρδιάς φέρει, μεταξύ άλλων, μια σειρά από προϊόντα μεταβολισμού, όπως το διοξείδιο του άνθρακα, το οποίο ανταλλάσσεται με οξυγόνο στη διάρκεια της αναπνοής. Στη συνέχεια, το οξυγονωμένο αίμα, εισέρχεται, μέσω των πνευμονικών φλεβών, στον αριστερό κόλπο και έπειτα στην αριστερή κοιλία, μέσω της μιτροειδούς βαλβίδας. Από την αριστερή κοιλία, το αίμα κατευθύνεται προς το σώμα μέσω των αρτηριών. 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 [7].

Μετά από την παραπάνω συνοπτική γενική περιγραφή των χαρακτηριστικών της καρδιάς, επιστρέφοντας στην πνευμονική αρτηριακή υπέρταση (ΠΑΥ), αυτό που είναι σημαντικό να τονιστεί είναι ότι η ΠΑΥ αποτελεί μία σπάνια, αλλά σοβαρή πάθηση με υψηλή νοσηρότητα και θνησιμότητα, καθώς, αν δεν διαγνωσθεί και

αντιμετωπιστεί έγκαιρα, η μέση επιβίωση είναι μόλις 2,8 έτη για την ιδιοπαθή ΠΑΥ [8]. Οι σημαντικότεροι παράγοντες που συντελούν στη γρήγορη και μη αναστρέψιμη πορεία της νόσου είναι η ταχεία εξέλιξη και κυρίως, η καθυστερημένη διάγνωση της νόσου, η οποία γίνεται συνήθως 2-5 έτη μετά την έναρξη των συμπτωμάτων της. Η καθυστέρηση αυτή οφείλεται, κατά κύριο λόγο, στη μη ειδική φύση των συμπτωμάτων της νόσου, όπως η δύσπνοια και η κόπωση, τα οποία είναι κοινά σε πολλές παθήσεις του καρδιοαναπνευστικού συστήματος.

Η πνευμονική υπέρταση, με την πιο απλή έννοια, αναφέρεται σε οποιαδήποτε αύξηση της πνευμονικής αρτηριακής πίεσης πάνω από το φυσιολογικό επίπεδο. Εξ ορισμού, αναφέρεται ως η αύξηση της μέσης πίεσης της πνευμονικής αρτηρίας mPAP  $\geq 25$ mmHg σε ηρεμία, όπως προκύπτει από μέτρηση δεξιού καρδιακού καθετηριασμού (RHC). Η φυσιολογική μέση πίεση της πνευμονικής αρτηρίας σε ηρεμία είναι  $14 \pm 3$ mmHg, με ανώτερο φυσιολογικό όριο τα 20mmHg [9].

Η πνευμονική κυκλοφορία αποτελεί ένα σύστημα χαμηλών αγγειακών αντιστάσεων, στο οποίο αναπτύσσονται πολύ χαμηλότερες πιέσεις συγκριτικά με τη συστηματική κυκλοφορία. Η πνευμονική υπέρταση περιλαμβάνει ένα σύνολο παθήσεων, οι οποίες χαρακτηρίζονται από προοδευτική αύξηση των πνευμονικών αγγειακών αντιστάσεων, ενώ προσβάλλει κυρίως νεώτερες ηλικιακές ομάδες και συνδυάζεται με μεγάλη νοσηρότητα και θνησιμότητα [10]. Η αύξηση αυτή οδηγεί σε μεγάλη αύξηση της πίεσης της πνευμονικής αρτηρίας, προκαλώντας υπερφόρτιση πίεσης της δεξιάς κοιλίας της καρδιάς, που οδηγεί αρχικά σε υπερτροφία και τελικά σε δεξιά καρδιακή ανεπάρκεια και θάνατο (Εικόνα 2) [11]. Παρά τη σημαντική πρόοδο των τελευταίων ετών, λόγω της ανάπτυξης ειδικών θεραπειών που στοχεύουν στο ενδοθήλιο των μικρών και ενδιάμεσων πνευμονικών αρτηριών, η πρόγνωση καθορίζεται από την ανάπτυξη υπερτροφίας και τελικά από τη διάταση και δυσλειτουργία της δεξιάς κοιλίας.

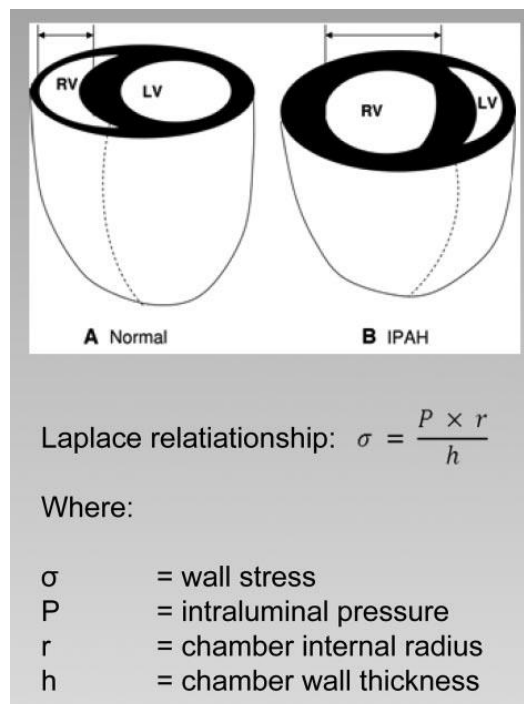


**Εικόνα 2.** Ανεπάρκεια δεξιάς κοιλίας στην Πνευμονική Αρτηριακή Υπέρταση (ΠΑΥ) [11].

Οι παθοφυσιολογικοί μηχανισμοί που διέπουν τις μορφολογικές και λειτουργικές μεταβολές της δεξιάς κοιλίας σαν απόκριση στην υπερφόρτιση πίεσης, δεν είναι επακριβώς τεκμηριωμένοι, καθιστώντας εμφανή και απαραίτητη την ανάγκη για μία πλήρη επιστημονική τεκμηρίωση αυτών των μηχανισμών. Η υπάρχουσα γνώση προέρχεται, κυρίως, από πειραματικές και κλινικές μελέτες στην αριστερή κοιλία. Όμως, λαμβάνοντας υπόψη τις σημαντικές διαφορές μεταξύ δεξιάς και αριστερής κοιλίας ως προς τις διαστάσεις, την αρχιτεκτονική, την αιμοδυναμική και τη λειτουργία, η γενίκευση συμπερασμάτων δεν είναι ασφαλής.

Η ανταπόκριση των κοιλιών σε συνθήκες χρόνιας υπερφόρτισης πίεσης συνίσταται αρχικά σε αύξηση της μυοκαρδιακής μάζας και διαστολική δυσλειτουργία, και σε επόμενα στάδια, η παρατεινόμενη αύξηση της τοιχωματικής τάσης οδηγεί σε προοδευτική διάταση της δεξιάς κοιλίας της καρδιάς και έκπτωση της συστολικής λειτουργίας. Πιο συγκεκριμένα, σε φυσιολογικές συνθήκες, τα τοιχώματα της δεξιάς κοιλίας (right ventricle, RV) είναι λεπτότερα και, κατά

συνέπεια, η μυοκαρδιακή μάζα είναι περίπου 6 φορές μικρότερη, συγκριτικά με την αριστερή κοιλία (left ventricle, LV). Επίσης, η RV έχει διαφορετικό σχήμα από την LV (Εικόνα 3), το οποίο αντανακλά τη χαμηλή πίεση στην πνευμονική κυκλοφορία και επιτρέπει τη γρήγορη προσαρμογή στις αλλαγές στην προφόρτιση. Όπως προκύπτει από το νόμο Laplace, σε μια λεπτού τοιχώματος σφαίρα, η αύξηση της ενδοαυλικής πίεσης έχει σαν αποτέλεσμα την αύξηση της τοιχωματικής τάσης, εκτός και αν το πάχος του τοιχώματος του θαλάμου είναι αυξημένο ή η εσωτερική ακτίνα του θαλάμου είναι μειωμένη. Εφόσον η αύξηση της τοιχωματικής τάσης, όχι μόνο αυξάνει την απαίτηση του μυοκαρδίου σε οξυγόνο, αλλά και παρακωλύει την αιμάτωση του μυοκαρδίου, μία σημαντική προσαρμογή της RV στην υψηλή πίεση σε ΠΑΥ είναι να αυξήσει το πάχος του τοιχώματος με τη συσσώρευση μυϊκής μάζας (υπερτροφία) και να λάβει ένα πιο στρογγυλεμένο σχήμα.



**Εικόνα 3.** Η διαμόρφωση της RV σε υγιή καρδιά (αριστερά, A) και σε καρδιά με πνευμονική υπέρταση (δεξιά, B). Σύμφωνα με την σχέση Laplace, η πνευμονική υπέρταση χαρακτηρίζεται από αυξημένη τοιχωματική τάση ( $\sigma$ ), εξαιτίας της αυξημένης ενδοαυλικής πίεσης (P) και της ακτίνας του θαλάμου (r), εκτός και εάν το πάχος του τοιχώματος της RV (h) είναι αυξημένο από υπερτροφία [12].

Όμως, η RV δεν είναι σε θέση να διατηρήσει μακροπρόθεσμα την πίεση της υπερφόρτισης. Έτσι, η καρδιακή συσταλτική δύναμη μειώνεται (λόγω λειτουργικών

ή δομικών αλλαγών στα καρδιομυοκύτταρα) και η RV διαστέλλεται. Επειδή η αυξημένη τοιχωματική τάση που προκύπτει από τη διάταση της RV αυξάνει τη ζήτηση του μυοκαρδίου σε οξυγόνο και ταυτόχρονα μειώνει την αιμάτωσή της, ακολουθεί ένας φαύλος κύκλος περαιτέρω κινδύνων για συσταλτικότητα και διάταση [12].

Οι μηχανισμοί που διέπουν τη μετάβαση από την υπερτροφία σε διαστολή και τελικά στην αστοχία της δεξιάς κοιλίας της καρδιάς δεν είναι πλήρως καθορισμένοι. Μολονότι είναι γνωστό ότι συγκεκριμένες ασθένειες που προσβάλλουν το μυοκάρδιο, όπως η σαρκοείδωση και η συστηματική σκλήρυνση [13, 14], συμβάλλουν στην καρδιακή δυσλειτουργία, δεν έχει διερευνηθεί εάν οι μοριακοί μηχανισμοί που καθορίζουν την πνευμονική αγγειακή αναδιαμόρφωση στην ιδιοπαθή ή συγγενή ΠΑΥ μπορούν, επίσης, να προκαλέσουν δυσλειτουργία του μυοκαρδίου.

## 2. ΤΡΟΠΟΙ ΑΝΤΙΜΕΤΩΠΙΣΗΣ ΤΗΣ ΝΟΣΟΥ

Οι αρχικές μελέτες για την αντιμετώπιση της καρδιακής αναδιαμόρφωσης εστιάστηκαν στην έγχυση βιώσιμων κυττάρων στο μυοκάρδιο, μια τεχνική γνωστή ως κυτταρική μεταμόσχευση. Τα μάλλον φτωχά αποτελέσματα, όπως έχουν δημοσιευτεί μέχρι σήμερα, υποδεικνύουν ότι η μέθοδος αυτή πρέπει να συμπληρωθεί από πρόσθετα θεραπευτικά μέτρα. Τις τελευταίες δεκαετίες, η βιβλιογραφία επικεντρώνεται σε θεραπευτικές επιλογές από φαρμακολογικές θεραπείες μέχρι μηχανική υποστήριξη της δεξιάς κοιλίας (με τη χρήση συσκευών υποβοήθησης) και μεταμόσχευση καρδιάς.

### Φαρμακολογικές θεραπείες

Η συμβατική θεραπεία των ασθενών με ΠΑΥ περιλαμβάνει τη χορήγηση διουρητικών, δακτυλίτιδας, αντιπηκτικών και οξυγονοθεραπείας, όπου αυτά χρειάζονται. Επίσης, η μακροχρόνια θεραπεία με ανταγωνιστές ασβεστίου φαίνεται ότι βελτιώνει τις αιμοδυναμικές παραμέτρους και την επιβίωση ενός ποσοστού ασθενών [15-18]. Νεότερες στοχευμένες θεραπείες ή συνδυασμοί αυτών, οι οποίες βασίζονται στα προστανοειδή (ανάλογα προστακυκλίνης) [19, 20], σε αναστολείς υποδοχέων ενδοθηλίνης-1 (ET-1) [21, 22] και αναστολείς φωσφοδιεστεράσης τύπου 5 (PDE-5) [23, 24], έδωσαν ικανοποιητικά αποτελέσματα, όσον αφορά στη θεραπεία της ΠΑΥ. Οι παραπάνω θεραπείες που χρησιμοποιούνται τα τελευταία χρόνια για τη θεραπεία της ΠΑΥ, είτε ως μονοθεραπείες, είτε ως συνδυασμός αυτών, συνέβαλα στη βελτίωση της λειτουργικής κατάστασης και της επιβίωσης των ασθενών, όμως εξακολουθεί να καταγράφεται ένα σημαντικό ποσοστό ασθενών στους οποίους τα αποτελέσματα δεν ήταν τα αναμενόμενα. Σε αυτήν την κατηγορία θεραπειών εντάσσεται και η έρευνα που αναλήφθηκε από την ερευνητική ομάδα του Καθ. Κωλέττη, που αφορούσε (μέσω καταγραφής των πιέσεων) στη χρήση πειραματικών ζωικών προτύπων, και συγκεκριμένα επίμυων με έλλειψη υποδοχέα ενδοθηλίνης-B, η οποία είναι πολύ σημαντική για την κατανόηση της περίπλοκης φυσιολογίας της πνευμονικής υπέρτασης [25]. Επίσης, σε επόμενη μελέτη, η ίδια ομάδα ανέδειξε, ως μια πολλά υποσχόμενη θεραπεία, το ρόλο του μεταμορφωτικού αυξητικού

παράγοντα-β στη βελτίωση της αγγειακής αναδιαμόρφωσης σε πειραματικό πρότυπο επίμυων και του περιορισμού της πνευμονικής υπέρτασης [26, 27].

### Μηχανική υποστήριξη

Όταν η φαρμακολογική θεραπεία δεν είναι επαρκής, υπάρχουν πολλές άλλες διαθέσιμες επιλογές για μηχανική υποστήριξη με συσκευές υποβοήθησης. Η κολπική διαφραγματοστομία με μπαλόνη θεωρείται, ίσως, η πρώτη προσέγγιση της δεξιάς ανεπάρκειας με μηχανική υποστήριξη, σύμφωνα με την οποία, εξισορροπείται η πίεση μεταξύ δεξιού και αριστερού κόλπου, ωστόσο δεν βοηθά ιδιαίτερα στην υποστήριξη της δεξιάς κοιλίας, καθώς δεν είναι αποτελεσματική για τη μείωση των πνευμονικών αγγειακών αντιστάσεων [28]. Οι συσκευές κοιλιακής υποβοήθησης δεξιάς κοιλίας (right ventricular assist devices, RVADs) μπορούν να εμφυτευθούν σε ασθενείς με ανεπάρκεια δεξιάς κοιλίας, μετά από καρδιοτομή και καρδιακή μεταμόσχευση [29-31]. Μόνο δύο συσκευές (paracorporeal ventricular assist device, Thoratec PVAD & CentriMag) είναι εγκεκριμένες για υποστήριξη δεξιάς κοιλίας από τον Αμερικανικό Οργανισμό Τροφίμων και Φαρμάκων (Food and Drug Administration, FDA) [32, 33]. Όμως, οι προτεινόμενες συσκευές είναι σχεδιασμένες για βραχύβια ή μακρόχρονη υποστήριξη της αριστερής κοιλίας και απλά προσαρμόζονται στην υποστήριξη της δεξιάς κοιλίας [34].

### Βιοϋλικά-εμφυτεύματα

Όπως αναφέρθηκε και προηγουμένως, με βάση τον νόμο του Laplace, η αρχιτεκτονική της δεξιάς κοιλίας είναι πιθανόν να ευνοεί την ανάπτυξη αναλογικά μεγαλύτερης τοιχωματικής τάσης και αντισταθμιστικής υπερτροφίας από την αριστερή κοιλία σε παρόμοιες συνθήκες φόρτισης. Διάφορες εναλλακτικές προσεγγίσεις [35] για την πρόληψη και τη θεραπεία της κοιλιακής αναδιαμόρφωσης προτείνουν την εφαρμογή μηχανικών μεθόδων για τον περιορισμό της διάτασης της δεξιάς κοιλίας, μέσω εξωτερικής εξισορρόπησης της τοιχωματικής τάσης, με βάση την ανάπτυξη εμφυτευμάτων από φυσικά ή συνθετικά βιοϋλικά για την αποκατάσταση του μυοκαρδίου στις περιπτώσεις αυτές. Κάποιες πρόσφατες προσπάθειες για την πρόληψη και τη θεραπεία της κοιλιακής αναδιαμόρφωσης, συμπεριλαμβανομένης και της χρήσης αυξητικών παραγόντων, καθώς και

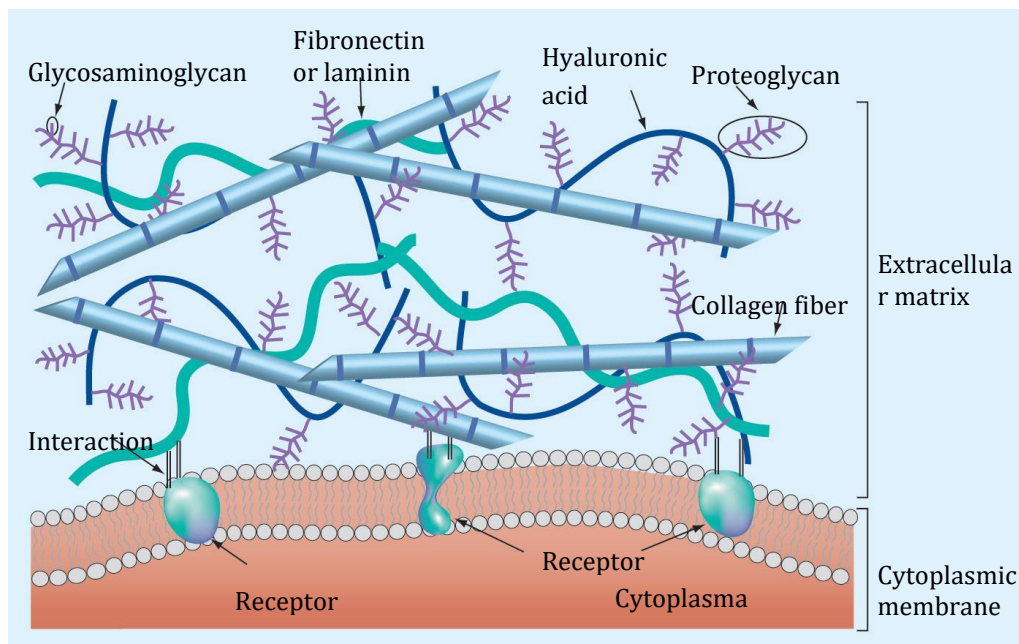


μηχανικών μεθόδων περιορισμού της διάτασης μέσω εξωτερικής αντιρρόπησης της τοιχωματικής τάσης, αφορούν στην αριστερή κοιλία, σε περιοχές ισχαιμίας και νέκρωσης του μυοκαρδίου [36-38].

Από βιβλιογραφική ανασκόπηση προκύπτει ότι δεν υπάρχει καταγεγραμμένη εμπειρία για εμφυτεύματα για χρήση στο μυοκάρδιο της δεξιάς κοιλίας μετά από πνευμονική υπέρταση.

### 3. ΒΙΟΪΛΙΚΑ ΓΙΑ ΧΡΗΣΗ ΣΤΟ ΜΥΟΚΑΡΔΙΟ

Τα τελευταία χρόνια, το ταχέως αναπτυσσόμενο πεδίο της Επιστήμης και της Μηχανικής των Υλικών προσφέρει εναλλακτικές στρατηγικές για τη θεραπεία των καρδιακών παθήσεων. Τα υδροπηκτώματα (hydrogels) έχουν αποκτήσει μεγάλο ενδιαφέρον ως βιοϋλικά, κυρίως λόγω της εξαιρετικής βιοσυμβατότητας που παρουσιάζουν και επειδή μιμούνται πολλές ιδιότητες της εξωκυττάριας μήτρας των ιστών (Εικόνα 4), όπως είναι η υψηλή περιεκτικότητα σε νερό και η ελαστικότητα [39-41].



**Εικόνα 4.** Τριασδιάστατη δομή της φυσικής εξωκυττάριας μήτρας και οι αλληλεπιδράσεις μεταξύ των κυττάρων και των συστατικών της εξωκυττάριας μήτρας [42].

Όσον αφορά στην εξωκυττάρια μήτρα (extracellular matrix, ECM) αξίζει να σημειωθεί η σημασία του δομικού και λειτουργικού της ρόλου. Η εξωκυττάρια μήτρα αποτελεί ένα περίπλοκο δίκτυο που περιβάλλει και υποστηρίζει τα κύτταρα. Η ECM αποτελείται από συστατικά όπως πρωτεΐνες και πρωτεογλυκάνες, τα οποία εκκρίνονται από τα κύτταρα. Οι επαφές μεταξύ ενός κυττάρου και του περιβάλλοντος της ECM είναι δυναμικές και ζωτικής σημασίας για την κυτταρική επιβίωση [42]. Αυτό σημαίνει ότι δεν δρα μόνο σαν «ικρίωμα» για τα κύτταρα αλλά αποτελεί και ένα δυναμικό περιβάλλον που προάγει τις κυτταρικές λειτουργίες [43, 44]. Μεταβολές στην ECM που μπορούν να συμβούν κατά τη διάρκεια της εμφύτευσης ενός βιοϋλικού, μπορούν να οδηγήσουν σε αλλαγές στο σχήμα ή και στη λειτουργία των γειτονικών κυττάρων. Γι'αυτό το λόγο θα πρέπει τα βιοϋλικά που συντίθενται να μιμούνται τη δομή και τις βιολειτουργίες της φυσικής εξωκυττάριας ουσίας, με σκοπό να κατευθυνθεί καλύτερα η απόκριση του ιστού στο εμφύτευμα [45-47].

Τα υδροπηκτώματα σχηματίζονται από φυσικά ή συνθετικά πολυμερή. Τα φυσικά πολυμερή χρησιμοποιούνται για να σχηματίσουν φυσικά υδροπηκτώματα ως ικρίωματα για την ιστική μηχανική, εξαιτίας της βιοσυμβατότητας τους, της αποικοδόμησης και της βιολογικής τους απόκρισης.

Στις περισσότερες περιπτώσεις τα φυσικά πολυμερή έχουν παρόμοια χημική σύσταση με τους ιστούς, επομένως μπορούν να ενσωματωθούν πληρέστερα στον περιβάλλοντα ιστό με την πάροδο του χρόνου ή να αναδιαμορφωθούν ευκολότερα ως απόκριση στις αλλαγές των αναγκών των ιστών. Ωστόσο, η χρήση των φυσικών υδροπηκτωμάτων είναι συχνά περιορισμένη, εξαιτίας της ύπαρξης των παθογόνων, την ύπαρξη τμημάτων που μπορεί να αναγνωριστούν ως «ξένα» από το ανοσοποιητικό σύστημα του σώματος, οδηγώντας στην «απόρριψη» του υλικού, καθώς και λόγω των σχετικά φτωχών μηχανικών τους ιδιοτήτων [48]. Συγκριτικά με τα φυσικά πολυμερή, τα συνθετικά πολυμερή παράγονται μαζικά, ενώ οι φυσικές και χημικές τους ιδιότητες καθώς και ικανότητα αποικοδόμησης μπορούν να προσαρμοστούν στις εκάστοτε συγκεκριμένες εφαρμογές [49, 50]. Το βασικό αρνητικό χαρακτηριστικό τους είναι η έλλειψη βιολογικών ερεθισμάτων για την ενίσχυση της κυτταρικής βιωσιμότητας και απόκρισης [51].

Όπως αναφέρθηκε παραπάνω, δεν υπάρχει εργασία στη βιβλιογραφία για βιοϋλικό που να έχει αποκλειστικά κατασκευαστεί για χρήση ως εμφύτευμα στο μυοκάρδιο της δεξιάς κοιλίας μετά από πνευμονική υπέρταση. Όμως, έχουν αναφερθεί πολλοί φυσικοί πολυσακχαρίτες που έχουν πρωταγωνιστικό ρόλο στην ιστική μηχανική μυοκαρδίου, διότι, λόγω της φυσικής τους προέλευσης, παρουσιάζουν το πλεονέκτημα της βιοσυμβατότητας και μιμούνται την εξωκυττάρια θεμέλια ουσία, επιτρέποντας την ανάπτυξη και τον πολλαπλασιασμό των κυττάρων, όπως είναι το κολλαγόνο [52], το υαλουρονικό οξύ [53], η φουκοειδίνη (fucoidan), η δεξτρίνη (dextran) και η πουλουλάνη (pullulan) [54, 55]. Επίσης, τα συνηθέστερα συνθετικά πολυμερή που χρησιμοποιούνται, στο μυοκάρδιο και εμφανίζουν ελεγχόμενες μηχανικές ιδιότητες και ρυθμό αποικοδόμησης είναι το poly(glycerol sebacate) PGS [56], το πολυ(N-ισοπροπυλακρυλαμίδιο) (PNiPAm) [57], η πολυκαπρολακτόνη και το πολυ(γαλακτικό οξύ) [58].

Από όλα αυτά τα υλικά, στην παράγραφο αυτή γίνεται εκτενέστερη αναφορά στα υδροπηκτώματα που μελετήθηκαν στην παρούσα διατριβή (αλγινικό, πολυ(αιθυλενογλυκόλη), χιτοζάνη), και κυρίως στη χιτοζάνη, που αποτελεί το υλικό στο οποίο επικεντρώθηκε το κυρίως ενδιαφέρον της συγκεκριμένης έρευνας.

#### *Αλγινικό οξύ*

Το αλγινικό οξύ, είναι ένας φυσικός πολυσακχαρίτης, ο οποίος προέρχεται από τα καφέ άλγη και χρησιμοποιείται σε πολλές εφαρμογές της ιστικής μηχανικής, εξαιτίας της απλής διαδικασίας εξαγωγής του και λόγω της μεγάλης αφθονίας του στη φύση [59]. Χημικά, πρόκειται για ένα γραμμικό 1,4 διασταυρωμένο συμπολυμερές που αποτελείται από τα μονομερή του β-D μαννουρονικού οξέος (M) και του α-L-γουλουρονικού οξέος (G). Παρόλο που οι φτωχές μηχανικές του ιδιότητες περιορίζουν τη χρήση του, συχνά ενσωματώνεται σε ικρίωματα συμπολυμερών για να ελέγξει την εφαρμογή τους με παρόμοιο τρόπο, όπως το κολλαγόνο και η ζελατίνη [60].

Τα τελευταία χρόνια, στα πλαίσια της ερευνητικής μας δραστηριότητας, μελετήθηκε η ανάπτυξη βιοδιασπώμενου ικρίωματος της ιστικής μηχανικής για τη χρήση του στη θεραπεία του εμφράγματος του μυοκαρδίου. Συγκεκριμένα, συντέθηκαν τροποποιημένα αλγινικά υδροπηκτώματα, τα οποία χρησιμοποιήθηκαν

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 επίδραση των τροποποιημένων αλγινικών υδροπηκτωμάτων στην αναδιαμόρφωση της αριστερής κοιλίας μελετήθηκε *in vivo* σε εργαστηριακά ζώα, τόσο στην οξεία όσο και στη χρόνια φάση του εμφράγματος. Τα αποτελέσματα ήταν πολύ ενθαρρυντικά [36-38, 61, 62]

Επίσης, η ομάδα των Landa και συνεργατών (εφεξής κ.συν.) χρησιμοποίησαν υδροπηκτώματα αλγινικού για την υποστήριξη της καρδιακής λειτουργίας, βασιζόμενοι στις υψηλές συγκεντρώσεις ασβεστίου στην ECM για το σχηματισμό υδροπηκτώματος, με πολύ καλά αποτελέσματα στη βελτίωση της λειτουργίας της αριστερής κοιλίας σε εμφραγματικό μυοκάρδιο επίμυων [63]. Τέλος, το 2016 η ερευνητική ομάδα των Rocca κ.συν. εμφύτευσαν υδροπήκτωμα αλγινικού οξέος (gelatinized capillary-alginate gel) σε εμφραγματικό μυοκάρδιο με ενθαρρυντικά αποτελέσματα στη βελτίωση της λειτουργίας της αριστερής κοιλίας [64].

#### *Πολυ(αιθυλενογλυκόλη)*

Η πολυ(αιθυλενογλυκόλη) (PEG) είναι ένα γνωστό πολυμερές που χρησιμοποιείται για το σχηματισμό υδροπηκτώματος, εξαιτίας των ιδιοτήτων του, όπως η διαλυτότητα σε νερό και οργανικούς διαλύτες, η μη τοξικότητα και η χαμηλή προσκόλληση πρωτεϊνών [65]. Μπορεί να χαρακτηριστεί ως υδροπήκτωμα, ειδικά όταν οι αλυσίδες διασταυρώνονται. Η χαμηλή αντιδραστικότητα της πολυ(αιθυλενογλυκόλης) με τους ζωντανούς οργανισμούς έγινε γνωστή το 1944 όταν εξετάστηκε ως πιθανό μέσο ενδοφλέβιας χορήγησης λιποδιαλυτών ορμονών (Friedman, 1944). Στα μέσα της δεκαετίας του 1970, ο Abuchowski ανακάλυψε ότι, εάν οι αλυσίδες του PEG προσκολληθούν σε ένζυμα και πρωτεΐνες, τα τελευταία θα έχουν μεγαλύτερο χρόνο παραμονής *in vivo*, από ότι τα βιομόρια που δεν έχουν προσκολληθεί σε PEG [39]. Παρόλα αυτά, τα υδροπηκτώματα με βάση την πολυ(αιθυλενογλυκόλη) έχουν πολύ μικρή μηχανική αντοχή και φτωχή βιοδιάσπαση σε ένα μεγάλο εύρος χρόνου. Για παράδειγμα, το παράγωγο του PEG, το PEGDA (PEG Diacrylate), χρησιμοποιείται ευρέως αλλά εμφανίζει χαμηλή μηχανική αντοχή. Η μηχανική αντοχή των υδροπηκτωμάτων είναι μια από τις σημαντικές ιδιότητες που πρέπει να βελτιωθεί διότι συχνά αποτυγχάνουν να διατηρούν την ακεραιότητα της

δομής τους ενώ επίσης εμφανίζουν σημαντικές δυσκολίες στο χειρισμό. Επιπλέον, η βελτιωμένη μηχανική αντοχή είναι ιδιαίτερα επιθυμητή για την κατασκευή τρισδιάστατων (3D) ικριωμάτων. Γι' αυτό το λόγο, η εισαγωγή δικαυροξυλικών οξέων στη κύρια αλυσίδα του PEG μπορεί να ενισχύσει τη μηχανική αντοχή. Το σεβακικό οξύ, αλλά και το φουμαρικό οξύ, είναι μονομερή διοξέων που εμφανίζουν εξαιρετική βιοσυμβατότητα, είναι εύκολα διαθέσιμα και, ως υδροφοβικά στοιχεία, εμποδίζουν την υπερβολική απορρόφηση νερού στο δίκτυο του πολυμερούς, το οποίο συμβαίνει στα περισσότερα hydrogel, με αποτέλεσμα τη μείωση της διόγκωσης και τη βελτίωση των μηχανικών του ιδιοτήτων. Επίσης, η ενσωμάτωση των μονομερών κάνει τα υδροπηκτώματα βιοδιασπώμενα σε μία λογική χρονική κλίμακα μέσω της υδρόλυσης της εστερικής σύνδεσης μεταξύ του σεβακικού και του φουμαρικού οξέος, αντίστοιχα, και της πολυ(αιθυλενογλυκόλης) [66, 67].

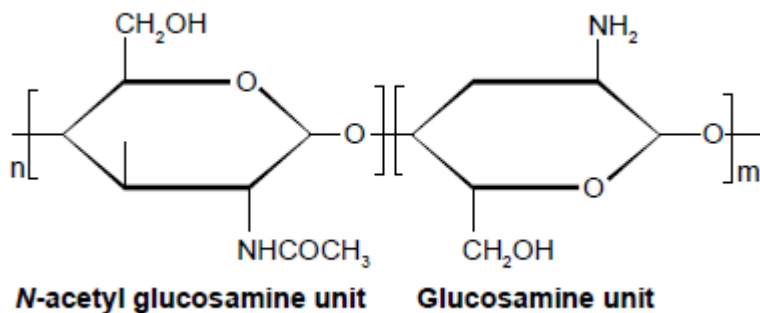
Η ερευνητική ομάδα του Kim κ.συν. εμφύτευσαν υδροπήκτωμα με βάση το PEG, στο οποίο είχαν ενσωματώσει καρδιακά κύτταρα, σε επίμυες μετά από έμφραγμα. Παρατήρησαν σημαντική αποκατάσταση του ιστού 21 ημέρες μετά την εμφύτευση, καθώς και αυξημένη εναπόθεση κολλαγόνου και επιβίωση των καρδιακών κυττάρων [42]. Τέλος, σύμφωνα με τους Vilaeti κ.συν., υδροπήκτωμα με βάση το PEG και το διακρυλικό εμφυτεύθηκε επικαρδιακά στην αριστερή κοιλία επίμυων, έπειτα από πρόκληση εμφράγματος. Τα αποτελέσματα ήταν εξαιρετικά, δηλαδή, το υλικό παρείχε μηχανική υποστήριξη και βοήθησε στη διατήρηση της γεωμετρίας της αριστερής κοιλίας καθώς και στην ενίσχυση της καρδιακής λειτουργίας [68].

### *Χιτοζάνη*

Ιστορικά, η πρώτη αναφορά στη χιτοζάνη χρονολογείται ήδη από τον 19<sup>ο</sup> αιώνα, όταν ο Rouget [69] αναφέρθηκε στις αποακετυλιωμένες μορφές του φυσικού πολυσακχαρίτη χιτίνης, το 1859. Η χιτοζάνη (chitosan) είναι ένας φυσικός πολυσακχαρίτης που προέρχεται από πλήρη ή μερική αποακετυλίωση της χιτίνης. Η χιτίνη είναι ο δεύτερος πιο άφθονος πολυσακχαρίτης μετά την κυτταρίνη και αποτελεί ένα σημαντικό συστατικό του κυτταρικού τοιχώματος των μυκήτων, του εξωσκελετού των καρκινοειδών και των εντόμων. Έτσι, και η χιτοζάνη θεωρείται ως το δεύτερο πιο άφθονο φυσικό βιοπολυμερές μετά την κυτταρίνη, όσον αφορά στη

διαθεσιμότητά του, σε ποσότητα μεγαλύτερη των 10 γιγατόνων ετησίως, γι' αυτό γενικά θεωρείται ως φθηνό και εύκολα διαθέσιμο προϊόν.

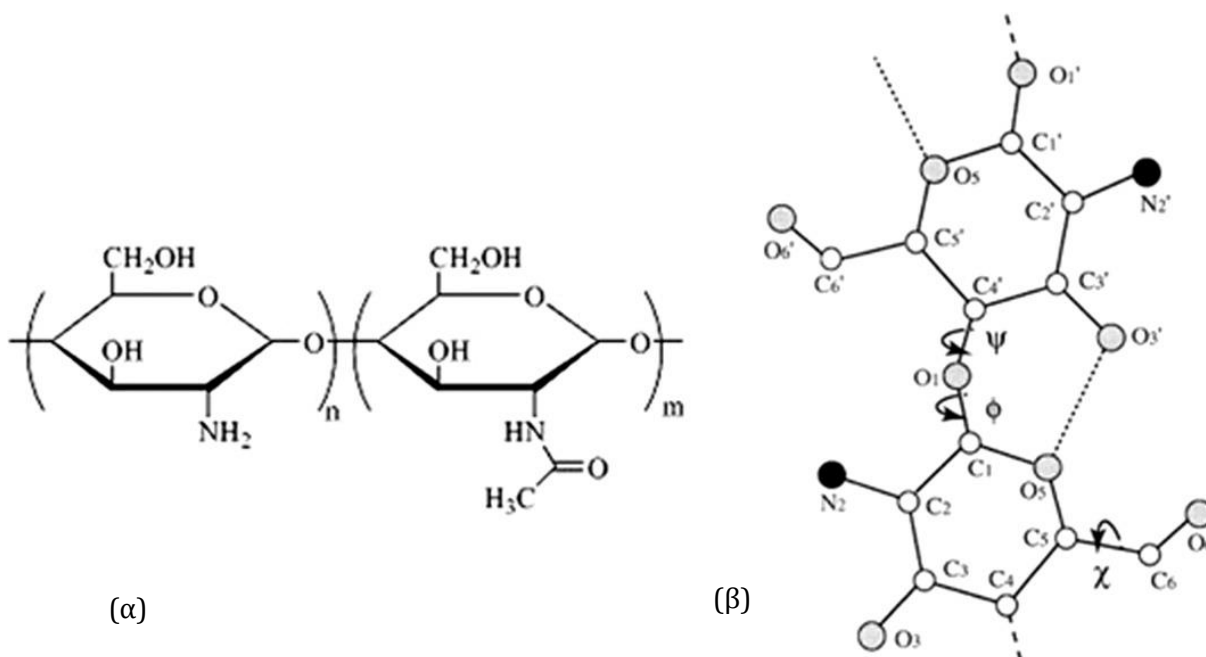
Η χιτοζάνη είναι ένας γραμμικός και ημικρυσταλλικός άμινοπολυσακχαρίτης που αποτελείται από δομικές μονάδες γλυκοζαμίνης και N-ακετυλογλυκοζαμίνης, συνδεδεμένες με  $\beta$ -(1-4) γλυκοζιδικούς δεσμούς (Εικόνα 5).



Εικόνα 5. Επαναλαμβανόμενες δομικές μονάδες χιτοζάνης.

Όταν το κλάσμα των μονάδων γλυκοζαμίνης είναι μεγαλύτερο του 50%, το πολυμερές ονομάζεται χιτοζάνη και ο αριθμός των μονάδων γλυκοζαμίνης βαθμός αποακετυλίωσης (degree of deacetylation, DD ή DDA). Στη χιτίνη, αντίθετα, όταν το κλάσμα των μονάδων της N-ακετυλογλυκοζαμίνης είναι μεγαλύτερο του 50%, τότε ο αριθμός των ακεταμιδίων αντιπροσωπεύει το βαθμό ακετυλίωσης (degree of acetylation, DA), και έτσι ισχύει η σχέση  $DA = 1 - DDA$ .

Η χιτοζάνη είναι αδιάλυτη σε υδατικά διαλύματα με pH μεγαλύτερο από 7, ενώ διαλύεται σε ελαφρώς όξινα διαλύματα ( $pH < 6$ ), λόγω της πρωτονίωσης των ελεύθερων αμινομάδων στη θέση C-2 της δομικής μονάδας D-γλυκοζαμίνης [70]. Σε όξινο περιβάλλον, ο πολυσακχαρίτης μετατρέπεται σε πολυηλεκτρολύτη, δηλαδή, σε ένα πολυκατιοντικό πολυμερές, το οποίο έχει μια αμινομάδα και δύο υδροξυλομάδες στην επαναλαμβανόμενη δομική του μονάδα. Πρόκειται για ένα γραμμικό συμπολυμερές που αποτελείται από 2-ακεταμίδιο-2-δέοξυ- $\beta$ -d-γλυκοπυρανόζη και 2-άμινο-2-δέοξυ- $\beta$ -d-γλυκοπυρανόζη δομικές μονάδες συνδεδεμένες με  $\beta$ -(1-4) γλυκοζιδικούς δεσμούς (Εικόνα 6) [71].



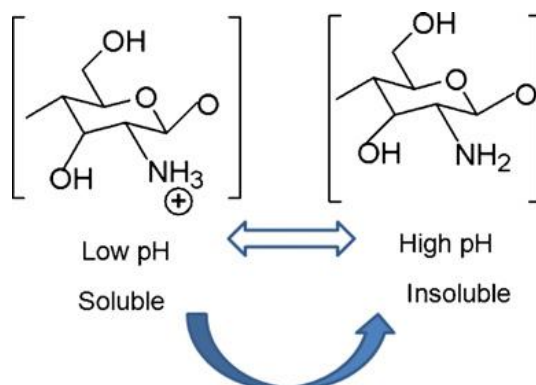
**Εικόνα 6.** (α) Δομή χιτοζάνης, και (β) στερεοχημική απεικόνιση της αλυσίδας, με αριθμημένα τα άτομα των στοιχείων, τους δεσμούς υδρογόνου (διακεκομμένες γραμμές) και τις διέδρες γωνίες ( $\phi$ ,  $\psi$  και  $\chi$ ) [71].

Η χιτοζάνη επιδεικνύει μοναδικά φυσικοχημικά χαρακτηριστικά για την ανάπτυξη ενός ικρίωματος, όπως το μοριακό βάρος, η κρυσταλλικότητα, η αποακετυλίωση και το θετικό φορτίο. Επίσης, είναι ο μοναδικός θετικά φορτισμένος πολυσακχαρίτης [72], ενώ χρησιμοποιείται σε ένα μεγάλο εύρος εφαρμογών, βιοϊατρικών αλλά και βιομηχανικών [73].

Η χιτοζάνη λαμβάνεται μετά τη θερμοχημική αποακετυλίωση της χιτίνης παρουσία αλκαλικών συνθηκών. Πιο συγκεκριμένα, η χιτίνη διασπείρεται σε υδατικό διάλυμα 40–45% (w/v) NaOH στους 90–120 °C για 4–5 ώρες, με αποτέλεσμα τη Ν-αποακετυλίωση της χιτίνης. Οι συνθήκες της αποακετυλίωσης προσδιορίζουν το μοριακό βάρος και το βαθμό αποακετυλίωσης του πολυμερούς.

Σε χαμηλές τιμές pH, οι αμινομάδες πρωτονιώνονται και γίνονται θετικά φορτισμένες, μετατρέποντας τη χιτοζάνη σε υδατοδιαλυτό πολυηλεκτρολύτη. Όταν η τιμή του pH αυξηθεί σε τιμές μεγαλύτερες από 6, οι αμινομάδες της χιτοζάνης αποπρωτονιώνονται και το πολυμερές χάνει το φορτίο του και γίνεται αδιάλυτο (Εικόνα 7). Η μετάβαση από τη διαλυτή στην αδιάλυτη φάση συμβαίνει όταν το pH κυμαίνεται μεταξύ του 6 και 6,5 ( $pK_a \sim 6,3$ ). Αφού η τιμή της  $pK_a$  εξαρτάται από το DDA, προφανώς και η διαλυτότητα της χιτοζάνης εξαρτάται, επίσης από το DDA.

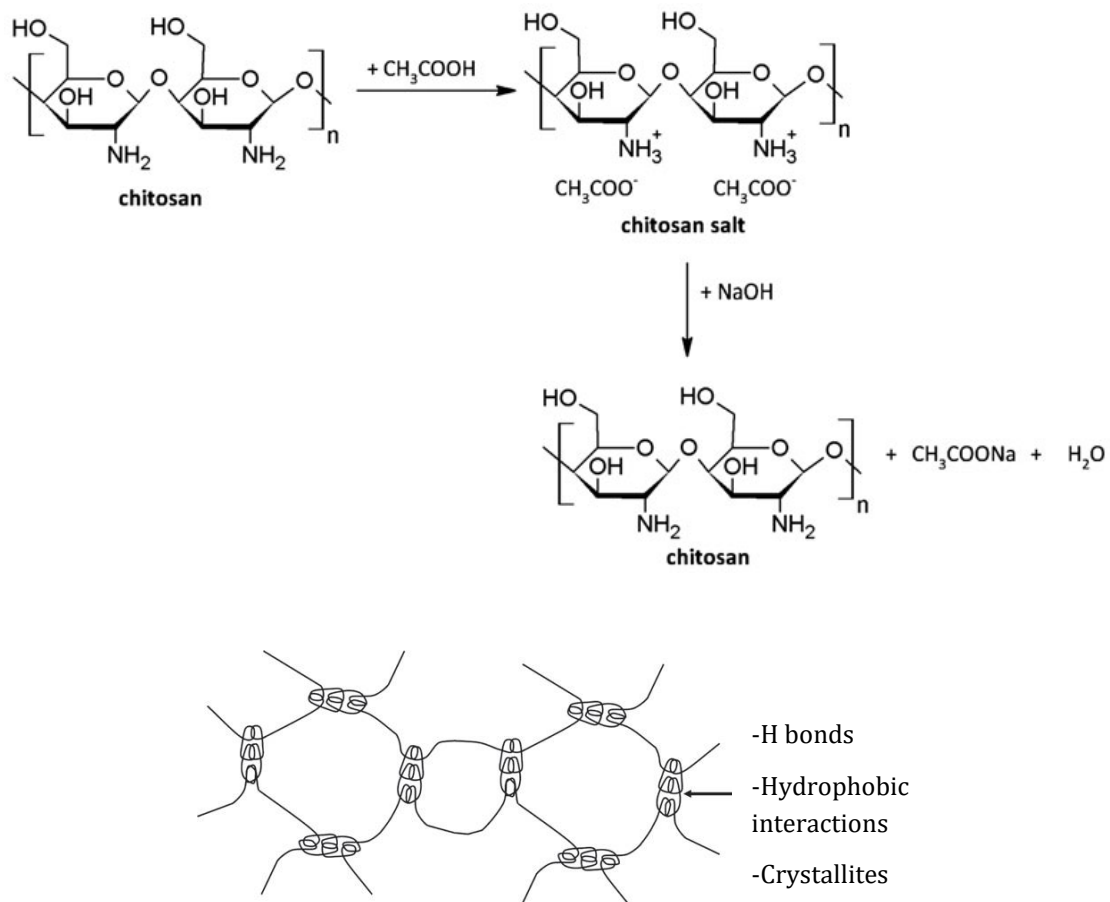
Εκτός από το βαθμό αποακετυλίωσης, το μοριακό βάρος επηρεάζει επίσης σημαντικά τη διαλυτότητα της χιτοζάνης και άλλες ιδιότητες, όπως την κρυσταλλικότητα και τη βιοαποικοδόμηση [71, 74]



**Εικόνα 7.** Σε χαμηλές τιμές pH (<6), οι αμινομάδες της χιτοζάνης πρωτονιώνονται και η χιτοζάνη αποκτά συμπεριφορά πολυκατιόντος. Σε υψηλές τιμές pH (>6,5), οι αμινομάδες είναι αποπρωτονιωμένες και ενεργές. [71]

Ο σχηματισμός των «φυσικών» υδροπηκτωμάτων χιτοζάνης βασίζεται στις αντιστρεπτές αλληλεπιδράσεις μεταξύ των πολυμερικών αλυσίδων. Αυτές οι αλληλεπιδράσεις είναι μη ομοιοπολικής φύσης, και συγκεκριμένα είναι ηλεκτροστατικές ή υδροφοβικές αλληλεπιδράσεις, ή δεσμοί υδρογόνου. Αξίζει να σημειωθεί ότι, η χιτοζάνη μπορεί να σχηματίσει υδροπήκτωμα από μόνη της, δηλαδή, χωρίς την ανάγκη κάποιου προσθέτου. Η διαδικασία βασίζεται στην εξουδετέρωση των αμινομάδων και στην καταστολή της απώθησης μεταξύ των αλυσίδων της χιτοζάνης. Ο σχηματισμός υδροπηκτώματος λαμβάνει χώρα μέσω της ανάπτυξης δεσμών υδρογόνου, υδροφοβικών αλληλεπιδράσεων και του σχηματισμού κρυσταλλιτών (Εικόνα 8) [75, 76].





**Εικόνα 8.** Μηχανισμός αντίδρασης σχηματισμού υδροπηκτώματος χιτοζάνης, με την ανάπτυξη δεσμών υδρογόνου, υδροφοβικών αλληλεπιδράσεων και του σχηματισμού κρυσταλλιτών (κάτω σχήμα) [75, 76].

Ο πολυσακχαρίτης χιτοζάνης έχει κερδίσει το ενδιαφέρον στο πεδίο της ιστικής μηχανικής μυοκαρδίου εξαιτίας των υδρόφιλων χαρακτηριστικών του και της δομικής του ομοιότητας με τις γλυκοζαμινογλυκάνες της καρδιάς. Τα υδροπηκτώματα χιτοζάνης, πέρα από το φυσικό τρόπο σχηματισμού τους, μπορούν να σχηματιστούν και με χημικό τρόπο με τη χρήση μέσων δικτύωσης (crosslinkers), αλλά και με αλλαγές του pH ή της θερμοκρασίας.

Τα υδροπηκτώματα των οποίων η συμπεριφορά επηρεάζεται από τη θερμοκρασία (thermoresponsive) σχηματίζονται από διάλυμα χιτοζάνης με την προσθήκη ασθενούς βάσης γλυκεροφωσφορικού άλατος ( $\beta$ -GP) [77]. Η ζελατινοποίηση λαμβάνει χώρα σε θερμοκρασία σώματος ( $37^\circ\text{C}$ ) και ο ρόλος του  $\beta$ -GP είναι να μειώσει το ηλεκτροστατικό φορτίο της χιτοζάνης και να αυξηθεί το pH του διαλύματος στο φυσιολογικό ( $\text{pH} = 7,4$ ).

Υδροπηκτώματα χιτοζάνης έχουν εφαρμοστεί στην καρδιά. Για παράδειγμα, η μελέτη των Lu κ.συν. έδειξε ότι, το υδροπήκτωμα χιτοζάνης από μόνο του βελτιώνει την καρδιακή λειτουργία, αλλά παρόλα αυτά δεν υπήρξαν καλές ενδείξεις για τα βλαστοκύτταρα που εμφυτεύτηκαν (καταγράφηκε ο θάνατός τους στην πρώτη μόλις εβδομάδα) [78]. Επίσης, η ερευνητική ομάδα των Fiamingo κ.συν. παρασκεύασε υδροπηκτώματα χιτοζάνης για καρδιακά εμφυτεύματα, μέσω της μεθόδου ζελατινοποίησης με τη χρήση διαλύματος NaOH και αέριας αμμωνίας. Τα αποτελέσματα έδειξαν πολύ καλή βιολογική απόκριση του υλικού στην επικαρδιακή επιφάνεια της καρδιάς, προκρίνοντας το υλικό αυτό για περαιτέρω μελέτη [79]. Τέλος, μετά από επιτυχείς προκλινικές μελέτες για το ρόλο της χιτοζάνης ως διατροφικό συμπλήρωμα στην αυξημένη πίεση, πραγματοποιήθηκαν κλινικές δοκιμές για τον έλεγχο επίδρασης της κατανάλωσης χιτοζάνης στη μείωση της πίεσης, ωστόσο, εξαιτίας του μικρού δείγματος στο οποίο έγινε η μελέτη, δεν εξάγονται ασφαλή συμπεράσματα [80-83]. Η ομάδα των Huang κ.συν. συνέχισαν την παραπάνω μελέτη και, βασιζόμενοι σε στατιστικά σημαντικά αποτελέσματα, πρότειναν την ευεργετική δράση της χιτοζάνης στην πνευμονική υπέρταση, όταν καταναλώνεται από ασθενείς με υψηλή διαστολική πίεση, χωρίς όμως να επηρεάζει τη συστολική πίεση [84].

## **II. ΣΚΟΠΟΣ ΔΙΑΤΡΙΒΗΣ**



## II. ΣΚΟΠΟΣ ΔΙΑΤΡΙΒΗΣ - ΚΑΙΝΟΤΟΜΙΑ ΚΑΙ ΔΙΑΡΘΡΩΣΗ

Όλα όσα αναφέρθηκαν στην Εισαγωγή συνοψίζονται στο ότι η πνευμονική υπέρταση αποτελεί μια πολύ σοβαρή νόσο παγκοσμίως η οποία συνδυάζεται με υψηλή νοσηρότητα και θνησιμότητα, και σχετίζεται τόσο με τους πνεύμονες όσο και με την καρδιά, όπου αυξημένη πίεση του αίματος στις αρτηρίες των πνευμόνων οδηγεί στη στένωση των αρτηριών και υπερφόρτιση πίεσης της δεξιάς κοιλίας. Η αύξηση της τοιχωματικής τάσης προκαλεί κοιλιακή υπερτροφία, η οποία ακολουθείται από προοδευτική διάταση της κοιλίας και μείωση της συστολικής λειτουργίας. Αυτή η περίπλοκη διαδικασία αναδιαμόρφωσης οδηγεί τελικά σε ανεπάρκεια της δεξιάς κοιλίας.

Παρά τη μεγάλη πρόοδο που καταγράφεται, αυτή τη στιγμή, η πρόγνωση εστιάζεται στην ανάπτυξη της υπερτροφίας και τελικά στη διάταση και δυσλειτουργία της δεξιάς κοιλίας, και έτσι, εξακολουθεί να υπάρχει ανάγκη για μία πλήρη επιστημονική τεκμηρίωση των παθοφυσιολογικών μηχανισμών των μορφολογικών και λειτουργικών μεταβολών της δεξιάς κοιλίας ως απόκριση της υπερφόρτιση πίεσης. Επίσης, η υπάρχουσα γνώση προέρχεται κυρίως από πειραματικές μελέτες στην αριστερή κοιλία. Όμως, λαμβάνοντας υπόψη τις σημαντικές διαφορές μεταξύ δεξιάς και αριστερής κοιλίας ως προς τις διαστάσεις, την αρχιτεκτονική, την αιμοδυναμική και τη λειτουργία, η γενίκευση συμπερασμάτων στη δεξιά κοιλία και για την περίπτωση της πνευμονικής υπέρτασης δεν είναι ασφαλής. Η καινοτομία της διατριβής αυτής έγκειται σε αυτό το σημείο. Δηλαδή, η κάλυψη του κενού που υπάρχει λόγω της έλλειψης συστηματικής χαρτογράφησης και επιστημονικής και πειραματικής τεκμηρίωσης για την αντιμετώπιση της πνευμονικής υπέρτασης μέσω βιοϋλικών, αποτελεί το σκοπό και την καινοτομία της διατριβής αυτής.

Τα τελευταία χρόνια, η ταχύτατη ανάπτυξη της επιστήμης των βιοϋλικών προσφέρει διάφορες στρατηγικές για τη θεραπεία των καρδιακών παθήσεων. Έτσι, η έρευνα που αναπτύχθηκε στην παρούσα διδακτορική διατριβή εντάσσεται στο πεδίο της *Επιστήμης και της Μηχανικής των Υλικών* που αφορά στο *σχεδιασμό και*

την ανάπτυξη νέων βιοϋλικών. Στην περίπτωση της συγκεκριμένης διατριβής, αυτό σημαίνει ότι, υπό το πρίσμα της τεχνολογικής ανάγκης για ανάπτυξη ενός νέου βιοϋλικού, το οποίο θα μπορεί να εξυπηρετεί τις απαιτήσεις μίας συγκεκριμένης ιατρικής εφαρμογής (της νόσου της πνευμονικής υπέρτασης, εν προκειμένω), αναπτύσσονται (δηλαδή σχεδιάζονται και παρασκευάζονται) νέα βιοϋλικά τα οποία να μπορούν να χρησιμοποιηθούν σε μία συγκεκριμένη ιατρική θεραπεία. Υπό αυτό το πρίσμα, η έρευνα που αναπτύχθηκε στη συγκεκριμένη διατριβή εστιάστηκε στη διερεύνηση, την ανάπτυξη και τη χάραξη στρατηγικής, εν είδει *Οδικού Χάρτη* (road map),<sup>2</sup> με την οποία ο Μηχανικός Υλικών μπορεί να συνθέσει ένα βιοϋλικό που να μπορεί να ανταποκριθεί στις ανάγκες της θεραπείας της νόσου. Έτσι, στα πλαίσια της διατριβής, διαμορφώθηκαν *κριτήρια* τα οποία πρέπει να πληρούνται από το βιοϋλικό που θα αναπτυχθεί, ώστε να μπορεί να ανταπεξέλθει στις τεχνολογικές προκλήσεις που απαιτεί η συγκεκριμένη θεραπεία.

Αυτά τα κριτήρια έπρεπε να ευθυγραμμίζονται με την ικανοποίηση μίας σειράς απαιτήσεων, όπως το υλικό να έχει ελεγχόμενο πάχος, να είναι ανθεκτικό μηχανικά για να μπορεί να το χειριστεί κατά την εμφύτευσή του ο χειρουργός στη συγκεκριμένη εφαρμογή, αλλά και να έχει παρόμοιες μηχανικές ιδιότητες με αυτές του καρδιακού μυ, να είναι βιοαποικοδομήσιμο σε συγκεκριμένο χρονικό διάστημα μετά την εμφύτευσή του, βιοανεκτό και βιοαποδεκτό από το μυοκάρδιο και τα κύτταρα, καθώς και μη τοξικό για τον οργανισμό. Τα πειραματικά αποτελέσματα ανατροφοδοτούσαν συνεχώς τις αρχικές επιλογές του υλικού και των πειραματικών συνθηκών και μεθόδων παρασκευής του, ώστε να επιτυγχάνεται η βελτίωση των ιδιοτήτων του και η ικανοποίηση των παραπάνω κριτηρίων.

---

<sup>2</sup> Οδικός Χάρτης (Road map): (α) σχέδιο/οδηγός που δείχνει πώς μπορεί κάτι να διευθετηθεί ή να επιτευχθεί (any plan or guide to show how something is arranged or can be accomplished, <https://www.wordreference.com/definition/road%20map>), (β) στρατηγικό έγγραφο καθοδήγησης καθώς και σχέδιο για την εκτέλεση της στρατηγικής (it's a guiding strategic document as well as a plan for executing the strategy, <https://www.productplan.com/what-is-a-product-roadmap>), (γ) στρατηγικό σχέδιο που καθορίζει ένα στόχο ή επιθυμητό αποτέλεσμα και περιλαμβάνει τα σημαντικά βήματα ή τα ορόσημα που απαιτούνται για την επίτευξη αυτού (it is a strategic plan that defines a goal or desired outcome, and includes the major steps or milestones needed to reach it, <https://www.productplan.com/roadmap-basics/>), (δ) ευέλικτη τεχνική σχεδιασμού που υποστηρίζει το στρατηγικό σχεδιασμό και τον προγραμματισμό μεγάλης εμβέλειας και βοηθάει στη διαχείριση του ασαφούς της πρωτοπορίας της καινοτομίας (it is a flexible planning technique to support strategic and long-range planning; it is a known technique to help manage the fuzzy front-end of innovation, [https://en.wikipedia.org/wiki/Technology\\_roadmap](https://en.wikipedia.org/wiki/Technology_roadmap)).

Οι προσεγγίσεις για την πρόληψη και τη θεραπεία της κοιλιακής αναδιαμόρφωσης που προτείνουν την εφαρμογή μηχανικών μεθόδων για τον περιορισμό της διάτασης, ουσιαστικά στοχεύουν στην εξωτερική εξισορρόπηση της τοιχωματικής τάσης της δεξιάς κοιλίας, με την ανάπτυξη κατάλληλων εμφυτευμάτων από φυσικά ή συνθετικά βιοϋλικά για την αποκατάσταση του μυοκαρδίου στις περιπτώσεις αυτές. Σε ό,τι αφορά στα υλικά αυτά καθαυτά για τη συγκεκριμένη θεραπεία της πνευμονικής υπέρτασης, τα υδροπηκτώματα (hydrogels) έχουν αποκτήσει μεγάλο ενδιαφέρον ως βιοϋλικά, κυρίως λόγω της εξαιρετικής βιοσυμβατότητας και επειδή μιμούνται πολλές ιδιότητες της εξωκυττάριας μήτρας των ιστών, όπως είναι η υψηλή περιεκτικότητα σε νερό και η ελαστικότητα.

Συνοψίζοντας τα παραπάνω, με σκοπό τη χάραξη του παραπάνω αναφερθέντος Οδικού Χάρτη για την αντιμετώπιση (θεραπεία, πρόληψη) της πνευμονικής υπέρτασης με βιοϋλικά, αναπτύχθηκε συστηματική έρευνα με χαρακτηριστικά επιστημονικής καινοτομίας σε διεθνές επίπεδο που αφορά σε ένα πεδίο αιχμής, σύμφωνα με τη διεθνή βιβλιογραφική ανασκόπηση που παρουσιάστηκε στην Εισαγωγή. Η δε παρουσίασή της στη διατριβή αυτή, εστιάζεται στις πρωτοβουλίες που ανελήφθησαν, αναφορικά με τις μεθόδους, τις πειραματικές τεχνικές και κυρίως την επίτευξη του τελικού στόχου της διατριβής. Όλα αυτά περιγράφονται αναλυτικά στην Ενότητα III που ακολουθεί, και η οποία αποτελείται από τρία διακριτά μέρη.

Στο πρώτο μέρος (Ενότητα III-1) παρουσιάζεται η πειραματική πορεία που ακολουθήθηκε για την πρόκριση του κατάλληλου βιοϋλικού, η οποία βασίστηκε στα κριτήρια που αναφέρθηκαν προηγουμένως και ομαδοποιούνται με τρόπο συστηματικό στον

Πίνακα 1, και είναι ουσιαστικά τα προαπαιτούμενα για τη χρήση αυτού του υλικού στη συγκεκριμένη εφαρμογή. Συγκεκριμένα, παρουσιάζεται η ανάπτυξη, παρασκευή και αξιολόγηση μίας σειράς από υλικά με σκοπό να προκριθεί το τελικό βιοϋλικό που να πληροί τα κριτήρια του

Πίνακα 1, και αυτά τα υλικά είναι (α) υδροπηκτώματα με βάση την πολυ(αιθυλενογλυκόλη), (β) χημικά τροποποιημένα υδροπηκτώματα με βάση την πολυ(αιθυλενογλυκόλη), με ενσωμάτωση χλωριδίου του σεβακικού οξέος και χλωριδίου του φουμαρικού οξέος, (γ) υδροπηκτώματα με βάση το αλγινικό οξύ, και (δ) υδροπηκτώματα με βάση τη χιτοζάνη.

Επειδή τρία πρώτα υδροπηκτώματα δεν ικανοποιούσαν τα κριτήρια, το ενδιαφέρον εστιάστηκε στη χιτοζάνη, και έτσι αναλήφθηκε συστηματική έρευνα για τη βελτίωση των ιδιοτήτων των υδροπηκτωμάτων σε μορφή μεμβράνης, όπως με τη χρήση χιτοζάνης με διαφορετικά μοριακά βάρη (LMW & MMW), με χρήση διαλυμάτων εξουδετέρωσης NaOH, KOH, ή φωσφορικού άλατος (β-GP), και με διάφορες μεθόδους παρασκευής, όπως η ζελατινοποίηση. Η τελευταία μέθοδος (η οποία, για λόγους δόμησης της εργασίας παρουσιάζεται λεπτομερώς στην επόμενη ενότητα) κατέληξε σε παραγωγή μεμβρανών που ικανοποιούσαν όλα τα κριτήρια και τις παραμέτρους που τέθηκαν για την επιλογή της κατάλληλης μεμβράνης και είχαν τις βέλτιστες ιδιότητες για τη συγκεκριμένη εφαρμογή.

**Πίνακας 1.** Κριτήρια για την επιλογή του κατάλληλου υδροπηκτώματος για εφαρμογή στη θεραπεία πνευμονικής υπέρτασης με χρήση βιοϋλικών.

Κριτήριο	Τίτλος	Περιγραφή
1	Δυνατότητα δημιουργίας μεμβράνης	Σχηματισμός μεμβράνης από υδροπήκτωμα
2	Καλά ποιοτικά χαρακτηριστικά μεμβράνης	Εύκολα διαχειρίσιμη και σταθεροποιήσιμη στο μυοκάρδιο με ράμμα ή χωρίς
3	Ευκαμψία	Εύκαμπτη μεμβράνη για να μπορεί να περιβάλλει επικαρδιακά τον ιστό
4	Ελεγχόμενες μηχανικές ιδιότητες	Μηχανικές ιδιότητες παρόμοιες με αυτές του καρδιακού ιστού για τη φυσιολογική του λειτουργία
5	Ελεγχόμενο πάχος	Ρυθμιζόμενο πάχος μεμβράνης με βάση τη διαδικασία παρασκευής
6	Ουδέτερο pH	pH=7-7,4 (φυσιολογικές συνθήκες οργανισμού)
7	Βιοσυμβατότητα	Βιοανεκτή μεμβράνη ( <i>in vitro</i> και <i>in vivo</i> έλεγχος)
8	Βιοαποικοδόμηση	Αποικοδόμηση μεμβράνης σε συγκεκριμένο χρονικό διάστημα για την ομαλή επαναλειτουργία του ιστού



Στο δεύτερο μέρος (Ενότητα III-2), αφού περιγράφεται στην αρχή λεπτομερώς η παρασκευή της μεμβράνης που προκρίθηκε στο πρώτο μέρος, δηλαδή της μεμβράνης από το φυσικό πολυσακχαρίτη χιτοζάνης, παρουσιάζεται ο πλήρης χαρακτηρισμός της βέλτιστης σύνθεσης του τελικού βιοϋλικού, που ήταν (α) ο προσδιορισμός του βαθμού αποακετυλίωσης, (β) ο δομικός χαρακτηρισμός των υδροπηκτωμάτων, (γ) ο μορφολογικός χαρακτηρισμός της μικροδομής της μεμβράνης, (δ) ο προσδιορισμός των θερμικών ιδιοτήτων, (ε) η μελέτη των χαρακτηριστικών ρόφησης σε αποσταγμένο νερό και σε διάλυμα PBS, και (στ) η μελέτη των μηχανικών ιδιοτήτων, στατικών και δυναμικών, σε ξηρό και υγρό περιβάλλον, καθώς και της υποβάθμισης των μηχανικών ιδιοτήτων των μεμβρανών μετά την εμβάπτισή τους σε διάλυμα PBS και πλάσμα αίματος.

Το τρίτο μέρος (Ενότητα III-3) εστιάζει το ενδιαφέρον του στη διεπιφάνεια μεταξύ της μεμβράνης και φυσικού, ζωντανού ιστού. Συγκριμένα, η μελέτη αφορά (α) στον *in vitro* έλεγχο της ανάπτυξης των NIH3T3 ινοβλαστών σε μεμβράνη χιτοζάνης, (β) στην *in vivo* πειραματική μελέτη της διεπιφάνειας μεμβράνης – καρδιακού ιστού βάση συγκεκριμένου ιατρικού πρωτοκόλλου εμφύτευσης σε ζωικό πρότυπο, η οποία περιλαμβάνει τον έλεγχο της απόκρισης των εργαστηριακών ζώων στην εμφύτευση και την αξιολόγηση της βιοσυμβατότητας, σε μικροσκοπικό επίπεδο, μέσω της αντίδρασης ξένου σώματος, (γ) στο μορφολογικό έλεγχο της μεμβράνης σε σύγκριση με την εξωκυττάρια μήτρα της δεξιάς κοιλίας, μετά την εμφύτευση της μεμβράνης επικαρδιακά, (δ) στη φυσικοχημική μελέτη της διεπιφάνειας μεμβράνης – καρδιακού ιστού μέσω πειραματικών μεθόδων και θεωρητικών υπολογισμών, με τις μεθόδους IR, XPS και την υπολογιστική μέθοδο DFT, αντίστοιχα, και (ε) στη μελέτη της διεπιφάνειας μεμβράνης - μυοκαρδίου της δεξιάς κοιλίας μετά από υπερφόρτιση πίεσης, χρησιμοποιώντας τη μέθοδο της υπολογιστικής μοντελοποίησης με πεπερασμένα στοιχεία και προσομοιάζοντας ένα ρεαλιστικό μοντέλο δεξιάς κοιλίας ασθενή.

Για τη διευκόλυνση του αναγνώστη, την Ενότητα III την υποστηρίζουν τα τρία Παραρτήματα, όπου παρουσιάζονται τα αντιδραστήρια που χρησιμοποιήθηκαν (Παράρτημα 1), οι τεχνικές για τον προσδιορισμό των φυσικοχημικών, θερμικών και μηχανικών ιδιοτήτων των υλικών και η προετοιμασία των δειγμάτων (Παράρτημα 2), και το ιατρικό πρωτόκολλο που αφορά στα *in vivo* πειράματα (Παράρτημα 3).

Η Διατριβή ολοκληρώνεται με τη γενική συζήτηση, τα συμπεράσματα και τις προτάσεις για μελλοντική έρευνα, τα οποία παρουσιάζονται στην Ενότητα IV.

### **III. ΑΝΑΠΤΥΞΗ ΚΑΙ ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΜΟΣ ΒΙΟΪΛΙΚΟΥ**



### **III. ΑΝΑΠΤΥΞΗ ΚΑΙ ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΜΟΣ ΒΙΟΪΛΙΚΟΥ**

Στην ενότητα αυτή παρουσιάζονται και αναλύονται τα αποτελέσματα των πειραμάτων και των υπολογισμών. Διακρίνεται σε 3 υποενότητες. Στην πρώτη παρουσιάζεται η πρόκριση του βιοϋλικού ανάμεσα από μια σειρά υποψήφιων βιοϋλικών που ελέχθηκαν. Στη δεύτερη παρουσιάζονται αναλυτικά η παρασκευή της μεμβράνης που προκρίθηκε από την προηγούμενη ενότητα (που ήταν από πολυσακχαρίτη χιτοζάνης) και οι ιδιότητες της. Στην τρίτη υποενότητα παρουσιάζονται τα αποτελέσματα της μελέτης της διεπιφάνειας της μεμβράνης αυτής με κύτταρα και καρδιακό ιστό.

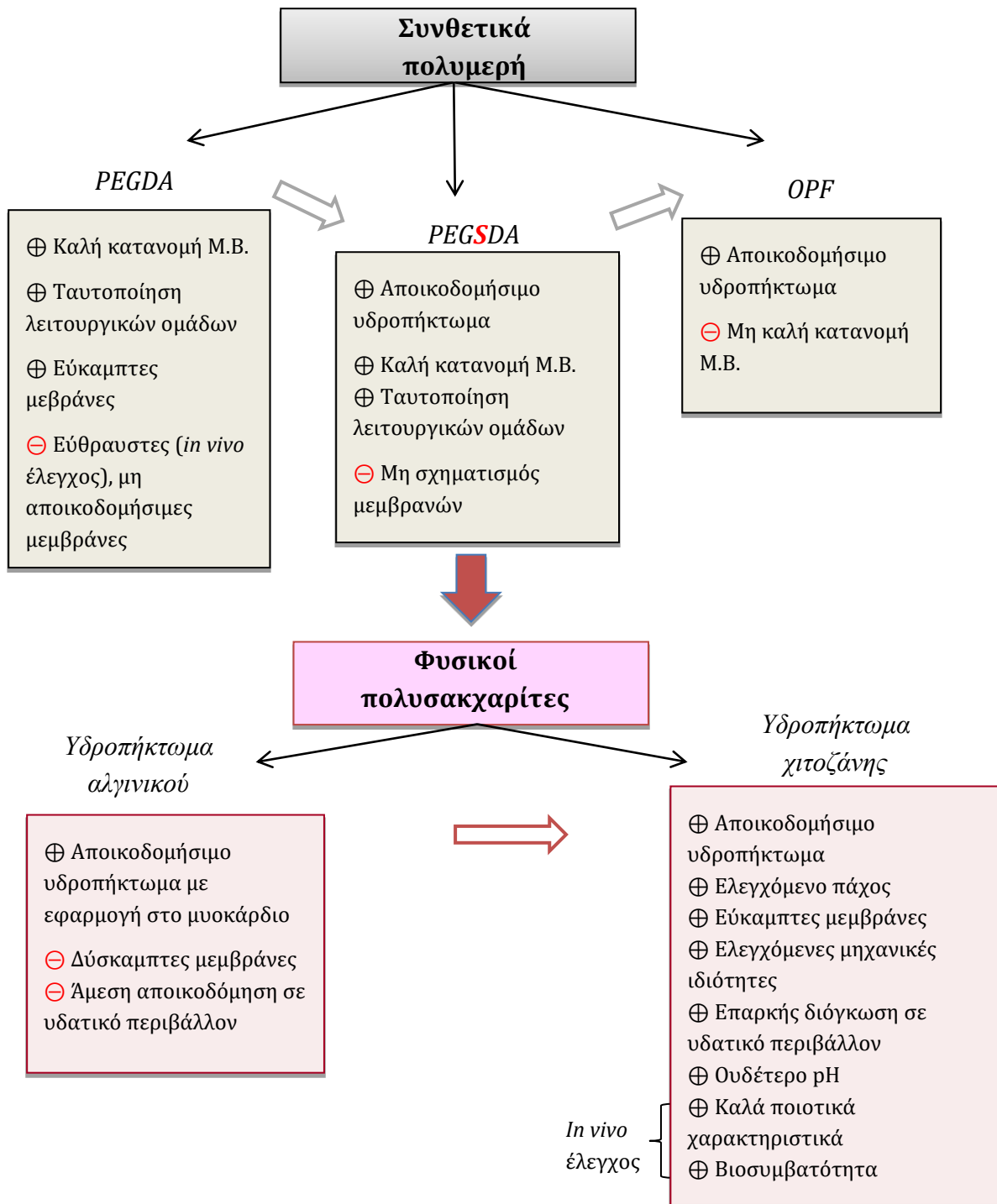
#### *III-I: ΠΡΟΚΡΙΣΗ ΒΙΟΪΛΙΚΟΥ*

Στην ενότητα αυτή, στην παράγραφο 1 παρουσιάζεται συνοπτικά το πως έγινε η πρόκριση του τελικού βιοϋλικού, ενώ η πειραματική διαδικασία σύνθεσης και παρασκευής των υδροπηκτωμάτων των υλικών που συντέθηκαν, καθώς και οι μέθοδοι χαρακτηρισμού τους αναλύονται στις επόμενες παραγράφους. Τα αντιδραστήρια που χρησιμοποιήθηκαν για τις επιμέρους συνθέσεις και παρασκευές αναφέρονται στην αρχή της περιγραφής της παρασκευής κάθε υλικού που συντέθηκε. Επίσης, στο Παράρτημα υπάρχουν λεπτομέρειες για τα αντιδραστήρια και για τις τεχνικές χαρακτηρισμού.

#### **1. ΧΑΡΤΗΣ ΠΑΡΑΣΚΕΥΗΣ ΚΑΙ ΠΡΟΚΡΙΣΗΣ ΥΛΙΚΩΝ ΣΥΜΦΩΝΑ ΜΕ ΤΑ ΚΡΙΤΗΡΙΑ ΕΠΙΛΟΓΗΣ ΓΙΑ ΕΦΑΡΜΟΓΗ ΣΤΗΝ ΑΝΤΙΜΕΤΩΠΙΣΗ ΤΗΣ ΠΝΕΥΜΟΝΙΚΗΣ ΥΠΕΡΤΑΣΗΣ ΜΕ ΧΡΗΣΗ ΒΙΟΪΛΙΚΩΝ**

Η πειραματική πορεία που ακολουθήθηκε για την πρόκριση του κατάλληλου βιοϋλικού, βασίστηκε στα κριτήρια που αναφέρθηκαν προηγουμένως και είναι προαπαιτούμενα για τη χρήση αυτού του υλικού στη συγκεκριμένη εφαρμογή,

δηλαδή στη θεραπεία της πνευμονικής υπέρτασης με χρήση βιοϋλικών. Στην Εικόνα 9 παρουσιάζονται, με μορφή διαγράμματος ροής, τα υλικά που παρασκευάστηκαν με σκοπό να πρικριθεί το τελικό υλικό, του οποίου η απόδοση αναλύεται στις επόμενες Ενότητες III-2 και III-3. Στην παράγραφο αυτή γίνεται μια συνοπτική παρουσίαση του διαγράμματος επιλογής της Εικόνα 9, ενώ οι πειραματικές πορείες παρασκευής των παραπάνω υλικών, καθώς και ο χαρακτηρισμός τους αναπτύσσονται διεξοδικά στις επόμενες παραγράφους.



**Εικόνα 9.** Διάγραμμα ροής των διαφορετικών υλικών που συντέθηκαν, PEGDA, PEGSDA, OPF, υδροπήκτωμα αλγινικού και υδροπήκτωμα χιτοζάνης και η απόδοσή τους (+: Πλεονεκτήματα, -: Μειονεκτήματα)

Σύμφωνα με το σχεδιάγραμμα αυτό της παρασκευής διαφορετικών υλικών και την απόκρισή τους με βάση τη συγκεκριμένη εφαρμογή, η αρχική επιλογή για τη χρήση των συνθετικών πολυμερών, έγινε λόγω των ελεγχόμενων μηχανικών και χημικών τους ιδιοτήτων, καθώς και λόγω της βιοσυμβατότητας και βιοαδράνειας που εμφανίζουν [85]. Η διαδικασία σύνθεσης του PEGDA είναι σχετικά εύκολη, όπως επιβεβαιώνεται με τα αποτελέσματα της καλής κατανομής μοριακών βαρών και την ταυτοποίηση των λειτουργικών της ομάδων στο φάσμα FT-IR. Παρόλα αυτά, το υδροπήκτωμα σε μορφή μεμβράνης είναι μη αποικοδομήσιμο (>12 εβδομάδες), ενώ σύμφωνα με τις *in vivo* εμφυτεύσεις δεν εμφανίζουν καλά ποιοτικά χαρακτηριστικά. Με βάση τα παραπάνω, δεν πληρούνται τα κριτήρια 2 και 8, άρα οι μεμβράνες PEGDA δεν προκρίνονται για επικαρδιακή εμφύτευση.

Η εισαγωγή των δικαρθοξυλικών οξέων στην κύρια αλυσίδα των υδροπηκτωμάτων μπορεί να ελέγξει τις μηχανικές ιδιότητες, τη συμπεριφορά στη διόγκωση και την αποικοδόμησή του υδροπηκτώματος PEGDA [86]. Η ενσωμάτωση του σεβακικού οξέος κάνει το υδροπήκτωμα βιοδιασπώμενο μέσω της υδρόλυσης της εστερικής σύνδεσης μεταξύ του σεβακικού οξέος και της πολυ(αιθυλενογλυκόλης), προσδίδοντας έναν πολύ σημαντικό λόγο για τη σύνθεση του PEGSDA. Η σύνθεση του PEGSDA επιβεβαιώνεται με την καλή κατανομή μοριακών βαρών και τις χαρακτηριστικές ομάδες στο φάσμα FT-IR. Το υδροπήκτωμα που προκύπτει έχει μεγάλο ιξώδες χωρίς να σχηματίζει μεμβράνες, μη ικανοποιώντας δηλαδή το κριτήριο 1 και γιαυτό το λόγο απορρίφθηκε.

Άλλο ένα συνθετικό πολυμερές που συντέθηκε είναι το OPF, το οποίο επιλέχθηκε, διότι, σύμφωνα με τη βιβλιογραφία έχει χρησιμοποιηθεί στην ιστική μηχανική του μυοκαρδίου σε μορφή υδροπηκτώματος με πολύ καλές ιδιότητες, ενώ θεωρείται αποικοδομήσιμο, λόγω των φουμαρικών εστερικών ομάδων που περιέχει [87]. Παρόλα αυτά, το τελικό προϊόν, πριν το σχηματισμό του υδροπηκτώματος, δεν έδειξε καλή κατανομή μοριακών βαρών, οπότε δεν προκρίθηκε για περαιτέρω χαρακτηρισμό.

Στη συνέχεια, το ενδιαφέρον στράφηκε στους φυσικούς πολυσακχαρίτες, οι οποίοι προσφέρουν σημαντικά πλεονεκτήματα, όπως η ικανότητα αποικοδόμησης των παραπροϊόντων τους, τα οποία μεταβολίζονται [88] και η μειωμένη αντίδραση ξένου σώματος [89]. Επίσης, οι φυσικοί πολυσακχαρίτες μιμούνται τις ιδιότητες της



φυσικής εξωκυττάριας μήτρας πολλών ιστών και έτσι μπορούν να υποστηρίξουν διάφορους τύπους κυττάρων [90]. Σύμφωνα, λοιπόν, με το παραπάνω διάγραμμα ροής, δοκιμάστηκαν δύο φυσικοί πολυσαχαρίτες, το αλγινικό οξύ και η χιτοζάνη, τα υδροπηκτώματα των οποίων έχουν χρησιμοποιηθεί σε εφαρμογές ιστομηχανικής μυοκαρδίου [61], [91]. Το αλγινικό οξύ δίνει αποικοδομήσιμα υδροπηκτώματα με πολύ καλές ιδιότητες στην αναδιαμόρφωση της αριστερής κοιλίας μετά από έμφραγμα του μυοκαρδίου [63, 92]. Εντούτοις, οι μεμβράνες που προκύπτουν από το υδροπήκτωμα αλγινικού είναι εξαιρετικά δύσκαμπτες και εύθραυστες, κάτι το οποίο είναι ορατό και με απλή οπτική εξέταση, ενώ συν τοις άλλοις, αποικοδομούνται ταχέως μέσα σε διάστημα 24 ωρών. Για αυτό το λόγο, οι μεμβράνες αλγινικού απορρίπτονται ως επιλογή για επικαρδιακή εμφύτευση.

Ένας άλλος φυσικός πολυσακχαρίτης που είναι ευρέως γνωστός για τις μοναδικές του ιδιότητες, οι οποίες σχετίζονται με την πολυκατιονική του φύση και χρησιμοποιείται σε βιοϊατρικές εφαρμογές, είναι η χιτοζάνη. Η πολύ καλή βιοσυμβατότητα και βιοαποικοδόμησή της, συντελούν στην ανάπτυξη αποδοτικών βιοϋλικών που χρησιμοποιούνται σε πολλές εφαρμογές [71]. Τα υδροπηκτώματα χιτοζάνης σε μορφή μεμβράνης παρουσιάζουν εξαιρετικές φυσικοχημικές, μηχανικές και βιολογικές ιδιότητες για εφαρμογές σε καρδιαγγειακές νόσους [79]. Το πολυκατιόν της χιτοζάνης μπορεί να σχηματίσει υδροπήκτωμα με πολλούς διαφορετικούς τρόπους, κάποιιοι εκ των οποίων μελετώνται στην παρούσα εργασία και παρουσιάζονται αναλυτικά στην Ενότητα III-1. Έτσι, με γνώμονα ότι το υδροπήκτωμα της χιτοζάνης έδειξε ότι προκρινόταν για περαιτέρω θεώρηση, δοκιμάστηκαν διαφορετικές μέθοδοι παρασκευής, ώστε να συντεθεί μια μεμβράνη χιτοζάνης που να ικανοποιεί στον καλύτερο βαθμό τις απαιτήσεις για χρήση στη συγκεκριμένη εφαρμογή. Οι ιδιότητες και τα χαρακτηριστικά των μεμβρανών χιτοζάνης που συντέθηκαν, αναφέρονται αναλυτικά στην παράγραφο 4, όπου εξηγούνται τα κριτήρια απόρριψης της εκάστοτε μεμβράνης, με βάση τη διαδικασία παρασκευής της και της επιλογής της τελικής μεμβράνης με τις επιθυμητές ιδιότητες για εφαρμογή στο μυοκάρδιο. Τόσο ο τρόπος παρασκευής της τελικής μεμβράνης, όσο και η μελέτη των ιδιοτήτων της και της διεπιφάνειας της με τα κύτταρα και τον καρδιακό ιστό παρουσιάζονται λεπτομερώς στις Ενότητες III-2 και III-3, αντίστοιχα.

## 2. ΥΔΡΟΠΗΚΤΩΜΑΤΑ ΜΕ ΒΑΣΗ ΤΗΝ ΠΟΛΥ(ΑΙΘΥΛΕΝΟΓΛΥΚΟΛΗ) (PEG)

### 2.1. Υδροπήκτωμα πολυ(αιθυλενογλυκόλης) και διακρυλικού

#### A. Σύνθεση

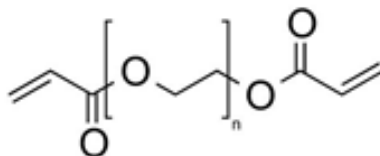
##### (α) Αντιδραστήρια

- Poly (ethylene glycol), Merck, CAS No 25322-68-3, MW= 950-1050,  $d_{25^{\circ}\text{C}}= 1.2 \text{ g/cm}^3$ , fp= 260 °C, mp= 33-40 °C
- Triethylamine, Merck (8.08352.1000), CAS No 121-44-8, MW=101,19,  $d_{25^{\circ}\text{C}}=0,73 \text{ g/cm}^3$ , fp= -11°C, mp= -115°C, bp= 90 °C
- Dichloromethane, Merck (1.06051.0500), CAS No 75-09-2, MW= 84,93,  $d_{25^{\circ}\text{C}}= 1,330 \text{ kg/cm}^3$ , mp= -96,7 °C bp= 39,6 °C
- Acryloyl chloride, Sigma Aldrich, CAS No 814-68-6, MW= 90,51,  $d_{25^{\circ}\text{C}}= 1.114 \text{ g/mL}$ , fp= 14°C, bp= 72-76 °C (lit.)
- Diethyl ether, Sigma Aldrich, CAS No 60-29-7, MW= 74,12,  $d_{25^{\circ}\text{C}}= 713 \text{ kg/m}^3$ , fp=-40°C, mp= -116,3 °C, bp= 34,6 °C
- 2-Hydroxy-4'-(2-hydroxyethoxy)-2-methylpropiophenone (Irgacure D-2959), Sigma Aldrich, CAS No 106797-53-9, MW=224,25, mp= 88-90 °C (lit.)

##### (β) Πειραματική διαδικασία

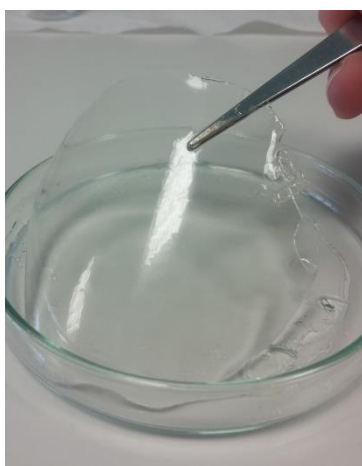
Για την σύνθεση του προπολυμερούς PEGDA με βάση την πολυ(αιθυλενογλυκόλη) (PEG) και το διακρυλικό (diacrylate), αρχικά, διασπείρουμε 10 g άνυδρη PEG σε οργανικό διαλύτη δίχλωρομεθανίου, υπό μαγνητική ανάδευση σε θερμοκρασία δωματίου. Ακολουθεί ανάμειξη του χλωριδίου του ακρυλικού οξέος (1 mol PEG/1.5 mol χλωρίδιο ακρυλικού οξέος) με 6 ml άνυδρου διχλωρομεθάνιου και ανάμειξη της τριαιθυλαμίνης (1 mol χλωρίδιο ακρυλικού οξέος/2 mol τριαιθυλαμίνης) με 6 ml άνυδρου διχλωρομεθάνιου. Μεταφέρουμε το διάλυμα PEG σε μία δίλιμη σφαιρική φιάλη συνδεδεμένη με δύο χοάνες, στις οποίες έχουμε τοποθετήσει τα διαλύματα του ακρυλικού και της τριαιθυλαμίνης, και ακολουθεί ταυτόχρονη προσθήκη αυτών των διαλυμάτων στάγδην στο διάλυμα PEG, υπό συνεχή ανάδευση, σε παγόλουτρο. Στη συνέχεια, αφού ολοκληρωθεί η διαδικασία, προσθέτουμε 50 ml διαιθυλεθέρα, προκαλώντας καθίζηση του μίγματος και κάνουμε διήθηση υπό κενό για την απομάκρυνση του υδροχλωρικού άλατος της

τριαιθυλαμίνης. Επαναδιασπείρουμε το διήθημα σε διαιθυλεθέρα, επαναλαμβάνουμε τη διήθηση και τέλος ξηραίνουμε το διήθημα υπό κενό και το αποθηκεύουμε σε μορφή σκόνης [66]. Η χημική δομή του προϊόντος φαίνεται στην Εικόνα 10:



**Εικόνα 10.** Χημική δομή PEGDA

Μία σημαντική μέθοδος για τη δικτύωση των αλυσίδων PEG είναι μέσω φωτοπολυμερισμού, χρησιμοποιώντας ακρυλικές τερματικές ομάδες σε μακρομόρια πολυ(αιθυλενογλυκόλης). Η παρασκευή του υδροπηκτώματος έγινε μέσω φωτοπολυμερισμού του διαλύματος προπολυμερούς σε αναλογία 1:1, 25% και 50% w/v, παρουσία 0,05% φωτοεκκινητή (Irgacure 2959) για 20 λεπτά (Εικόνα 11). Η συσκευή που χρησιμοποιήθηκε για τον φωτοπολυμερισμό ήταν λάμπα UV ( $\lambda=365$  nm, P=12 W), της εταιρείας Uvitec.



**Εικόνα 11.** Υδροπήκτωμα PEGDA, μετά τον φωτοπολυμερισμό.

## B. Χαρακτηρισμός

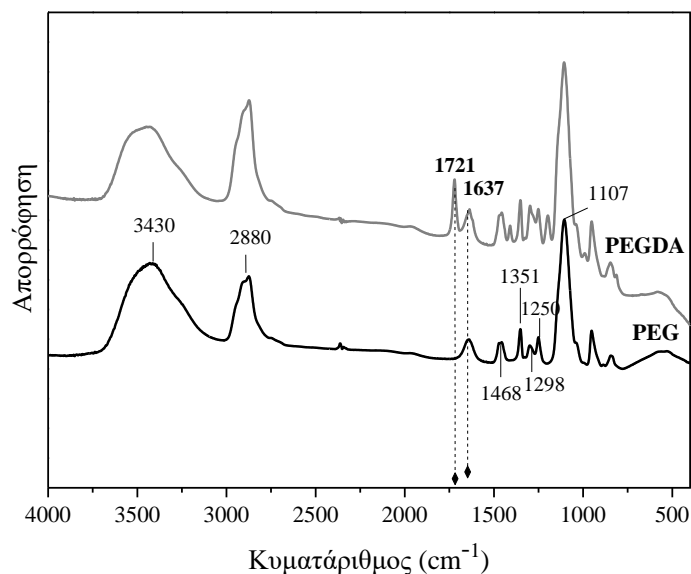
Μετά την ολοκλήρωση της σύνθεσης του PEGDA και την απόκτηση του προϊόντος σε μορφή σκόνης, πραγματοποιήθηκε ο χαρακτηρισμός του, αρχικά μέσω της χρωματογραφίας αποκλεισμού μεγεθών (SEC) (Παράρτημα 2.2) (Πίνακας 2) και στη συνέχεια, με φασματοσκοπία υπερύθρου FT-IR (Παράρτημα 2.3) (Εικόνα 12).

Η χρωματογραφία έδειξε ότι το μέσο μοριακό βάρος κατά αριθμό του PEGDA είναι ίσο με  $M_n = 1350$ , το μέσο μοριακό βάρος κατά βάρος ισούται με  $M_w = 1420$  και ο συντελεστής κατανομής μορακών βαρών  $PDI = 1,05$ .

**Πίνακας 2.** Μέσα μοριακά βάρη κατά αριθμό ( $M_n$ ), κατά βάρος ( $M_w$ ) και συντελεστής κατανομής μοριακών βαρών ( $PDI$ ) των μακρομορίων PEG και PEGDA.

Δείγμα	$M_n$	$M_w$	PDI
PEGDA	1350	1420	1,05
PEG	1000	1100	1,05

Μέσω της φασματοσκοπίας FT-IR ταυτοποιήθηκαν οι λειτουργικές ομάδες των μακρομορίων PEG και PEGDA. Συγκεκριμένα, στο φάσμα της PEG παρατηρούνται δύο κορυφές στα  $3430\text{ cm}^{-1}$  και στα  $2880\text{ cm}^{-1}$ , οι οποίες σχετίζονται με τις δονήσεις τάσης O-H και τις δονήσεις τάσης C-H, αντίστοιχα. Η κορυφή στα  $1650\text{ cm}^{-1}$  οφείλεται στην ύπαρξη μορίων  $\text{H}_2\text{O}$  λόγω υγρασίας. Στα  $1468\text{ cm}^{-1}$  και  $1351\text{ cm}^{-1}$  εντοπίζονται δονήσεις κάμψης C-H, ενώ οι χαρακτηριστικές κορυφές στα  $1298\text{ cm}^{-1}$ ,  $1250\text{ cm}^{-1}$  και  $1107\text{ cm}^{-1}$  αντιστοιχούν σε δονήσεις τάσης O-H και C-O-H στην αλυσίδα του PEG. Αντίστοιχα, στο φάσμα του PEGDA εμφανίζονται επιπλέον οι κορυφές στα  $1721\text{ cm}^{-1}$  και  $1637\text{ cm}^{-1}$  που αντιστοιχούν σε δεσμούς C=O και C=C, αντίστοιχα, επιβεβαιώνοντας την παρουσία των ακρυλικών ομάδων στην αλυσίδα της πολυ(αιθυλενογλυκόλης) [93].



**Εικόνα 12.** Φάσματα FT-IR του PEG και PEGDA.

Στη συνέχεια, στο υδροπήκτωμα PEGDA πραγματοποιήθηκαν *in vitro* και *in vivo* δοκιμές (Παράρτημα 3). Οι *in vitro* δοκιμές αφορούσαν την εμβάπτιση των υδροπηκτωμάτων σε φυσιολογικό ορό (0,9% NaCl) και πλάσμα αίματος, με αλλαγές των υγρών ανά τακτά χρονικά διαστήματα κάθε δύο ημέρες. Οι μεμβράνες τόσο στο πλάσμα αίματος όσο και στον ορό έδειξαν σταθερή, μη αποικοδομήσιμη συμπεριφορά για χρόνο περισσότερο από 12 εβδομάδες. Επίσης, προκαταρκτικές δοκιμές εμφυτεύσεων που πραγματοποιήθηκαν σε δύο επίμυες έδειξαν δυσκολία στο χειρισμό των μεμβρανών εξαιτίας της χαμηλής μηχανικής τους αντοχής, καθώς και μεγάλη αστάθεια της μεμβράνης γύρω από τη καρδιά.

### Γ. Συμπέρασμα

Οι μετρήσεις GPC έδειξαν καλή κατανομή μοριακών βαρών, επιβεβαιώνοντας την επιτυχή σύνθεση του PEGDA. Τα φάσματα FT-IR ταυτοποίησαν την ύπαρξη των ακρυλικών ομάδων μέσω των χαρακτηριστικών κορυφών τους. Λαμβάνοντας όμως υπόψιν, τόσο τα *in vitro* όσο και τα *in vivo* αποτελέσματα και εφόσον δεν πληρούνται τα κριτήρια 2 και 8, οδηγούμαστε στο συμπέρασμα ότι οι μεμβράνες PEGDA δεν είναι κατάλληλες για την συγκεκριμένη εφαρμογή στο μυοκάρδιο.

## 2.2 Χημική τροποποίηση υδροπηκτωμάτων με βάση την πολυ(αιθυλενογλυκόλη) (PEG) με μονομερή διοξέων (sebacoyl chloride) (PEGSDA)

### A. Σύνθεση

#### (α) Αντιδραστήρια

- Poly (ethylene glycol), Merck, CAS No 25322-68-3, MW= 950-1050,  $d_{25^{\circ}\text{C}}= 1.2 \text{ g/cm}^3$ , fp= 260 °C, mp= 33-40 °C
- Triethylamine, Merck, CAS No 121-44-8, MW=101,19,  $d_{25^{\circ}\text{C}}=0,73 \text{ g/cm}^3$ , fp= -11°C, mp= -115°C, bp= 90 °C
- Dichloromethane, Merck, CAS No 75-09-2, MW= 84,93,  $d_{25^{\circ}\text{C}}= 1,330 \text{ kg/cm}^3$ , mp= -96,7 °C bp= 39,6 °C
- Sebacoyl chloride (97%), Alpha Aesar, CAS No 111-19-3, MW=239,14,  $d_{25^{\circ}\text{C}}= 1.121 \text{ g/cm}^3$ , m.p.= -5°C, b.p.= 161°C, fp= 165°C
- Acryloyl chloride, Sigma Aldrich, CAS No 814-68-6, MW= 90,51,  $d_{25^{\circ}\text{C}}= 1.114 \text{ g/mL}$ , fp= 14°C, bp= 72-76 °C (lit.)
- Ethyl acetate, Merck, CAS No 141-78-6, MW= 88,105,  $d_{25^{\circ}\text{C}}= 897 \text{ kg/cm}^3$ , mp= -83,6 °C, bp= 77,1 °C
- Diethyl ether, Sigma Aldrich, CAS No 60-29-7, MW= 74,12,  $d_{25^{\circ}\text{C}}= 713 \text{ kg/m}^3$ , fp=-40°C, mp= -116,3 °C, bp= 34,6 °C
- 2-Hydroxy-4'-(2-hydroxyethoxy)-2-methylpropiophenone (Irgacure D-2959), Sigma Aldrich, CAS No 106797-53-9, MW=224,25, mp= 88-90 °C (lit.)

#### (β) Πειραματική διαδικασία

Η χημική τροποποίηση υλοποιήθηκε με την ενσωμάτωση του χλωριδίου του σεβακικού οξέος στο βασικό κορμό του πολυμερούς PEGDA, προς σχηματισμό του PEGSDA. Έτσι, για τη σύνθεση του υδροπηκτώματος ακολουθήθηκαν τα εξής στάδια:

##### *i) Κατεργασία αντιδραστηρίων*

Κατά την προετοιμασία για τα στάδια αντίδρασης όλων των παρακάτω συνθέσεων, είναι απαραίτητη αρχικά η απομάκρυνση της υγρασίας όλων των σκευών που θα χρησιμοποιηθούν με τη χρήση φλόγας και η τοποθέτησή τους σε ξηραντήρα, καθώς και η επεξεργασία των αντιδραστηρίων όπως του διχλωρομεθανίου (DCM) και της πολυ(αιθυλενογλυκόλης) (PEG), για την απομάκρυνση των μορίων νερού,

έτσι ώστε να επιτευχθεί η βέλτιστη απόδοση της αντίδρασης και η αύξηση του μοριακού βάρους του τελικού προϊόντος.

Συγκεκριμένα, το διχλωρομεθάνιο, πριν τη χρήση του ως διαλύτης στην αντίδραση, υπόκειται αρχικά σε ξήρανση και έπειτα σε απόσταξη. Για την ξήρανση, προστίθεται μια μικρή ποσότητα υδριδίου του ασβεστίου ( $\text{CaH}_2$ ) σε 250 ml DCM σε μία σφαιρική φιάλη. Ακολουθεί θέρμανση στους  $50^\circ\text{C}$  σε συνθήκες επαναροής, έτσι ώστε να σχηματιστεί το υδροξείδιο του ασβεστίου ( $\text{Ca}(\text{OH})_2$ ) σε μίγμα με το DCM, ενώ τέλος το μίγμα τοποθετείται σε συνθήκες αδρανούς ατμόσφαιρας αργού για την προστασία του από την υγρασία. Για τη διαδικασία απόσταξης, το μίγμα θερμαίνεται σε θερμοκρασία μεγαλύτερη από τη θερμοκρασία βρασμού του DCM και οι ατμοί που παράγονται, μέσω του συμπυκνωτή, ψύχονται και μετατρέπονται στην καθαρότερη μορφή του DCM.

Για την ξήρανση της PEG χρησιμοποιείται η αζεοτροπική μέθοδος, η οποία βασίζεται στο σχηματισμό αζεοτροπικού μίγματος κατά τη συναπόσταξη του νερού που περιέχεται στο μίγμα και ενός υγρού που δεν αναμιγνύεται με το νερό και έχει υψηλότερο σημείο ζέσεως και μικρότερο ειδικό βάρος από αυτό, όπως είναι το τολουόλιο. Η συσκευή (Dean & Stark ) που χρησιμοποιείται, αποτελείται από μία σφαιρική φιάλη, στην οποία διασπείρουμε 10g PEG σε 50 ml τολουόλιο, ένα ειδικά βαθμολογημένο υποδοχέα (παγίδα) και ένα ψυκτήρα, όπου κατά τη διάρκεια της απόσταξης οι ατμοί του αζεοτροπικού μίγματος υγροποιούνται στον ψυκτήρα και κατέρχονται στην παγίδα. Το νερό ως βαρύτερο, συλλέγεται στο κάτω μέρος της παγίδας ενώ ο διαλύτης επανέρχεται με υπερχειλίση στη σφαιρική φιάλη. Η απόσταξη συνεχίζεται μέχρις ότου, να αποστάξει ολόκληρη η ποσότητα του νερού και να συλλεχθεί στην παγίδα. Η συσκευή τοποθετείται σε ελαιόλουτρο σταθερής θερμοκρασίας  $140^\circ\text{C}$  για 30 λεπτά [94].

## ii) Σύνθεση PEG-Sebacate (PEGS)

Προστίθενται 10 g άνυδρη PEG σε διαλύτη διχλωρομεθανίου και το διάλυμα αναδεύεται με τη χρήση μαγνητικού αναδευτήρα μέχρι να διαλυθεί το PEG. Έπειτα, το διάλυμα μεταφέρεται σε δίκαιμη σφαιρική φιάλη, συνδεδεμένη με δύο χοάνες, στις οποίες τοποθετούνται το μίγμα του άνυδρου χλωριδίου του σεβακικού οξέος (1 mol PEG/0.9 mol χλωρίδιο σεβακικού οξέος) με 6 ml άνυδρο διχλωρομεθάνιο και το

μίγμα της τριαιθυλαμίνης (1 mol χλωρίδιο σεβακικού οξέος/2 mol τριαιθυλαμίνης) με 6 ml άνυδρο διχλωρομεθάνιο, αντίστοιχα. Η αντίδραση λαμβάνει χώρα σε αδρανή ατμόσφαιρα, και με ταυτόχρονη προσθήκη των μιγμάτων του χλωριδίου του σεβακικού οξέος και της τριαιθυλαμίνης, στο διάλυμα PEG, που βρίσκεται υπό ανάδευση στους 0° C. Αφού ολοκληρωθεί η προσθήκη, το μίγμα αναδεύεται για 48 ώρες σε θερμοκρασία δωματίου, καθώς η αντίδραση εξελίσσεται.

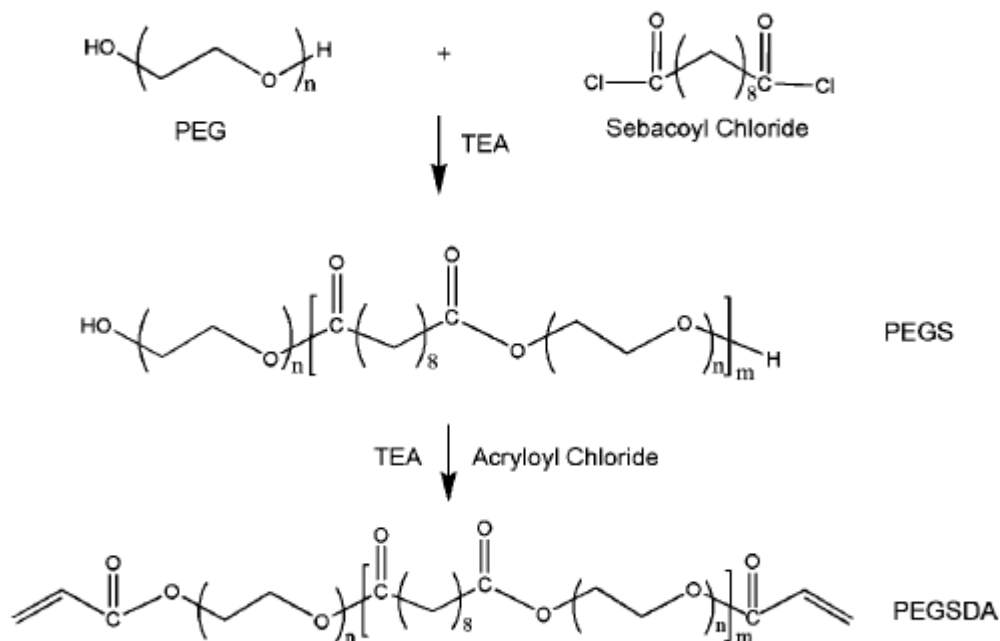
### *iii) Καθαρισμός PEGS*

Το μίγμα μεταφέρεται σε μία μονόλαιμη σφαιρική φιάλη, ενώ η απομάκρυνση του διχλωρομεθανίου γίνεται μέσω περιστροφικής εξάτμισης (rotary evaporation) υπό μειωμένη πίεση, σε υδατόλουτρο υπό θέρμανση στους 30°C. Στη συνέχεια, ακολουθεί η απομάκρυνση του υδροχλωρικού άλατος της τριαιθυλαμίνης μέσω διήθησης υπό κενό, αφού πρώτα πραγματοποιηθεί η καθίζηση του άλατος σε οξικό αιθυλεστέρα στους 40°C. Το υδροχλωρικό άλας της τριαιθυλαμίνης παράγεται από την αντίδραση μεταξύ των ιόντων χλωριδίου από το χλωρίδιο του σεβακικού οξέος και της τριαιθυλαμίνης. Έπειτα, ακολουθεί η διαδικασία της κρυστάλλωσης του PEGS σε οξικό αιθυλεστέρα, μειώνοντας τη θερμοκρασία του διαλύματος στους 0°C. Η διαδικασία συνεχίζεται με διήθηση και μεταφορά του στερεού (ίζημα) σε ένα ποτήρι ζέσεως, στο οποίο εκτελούνται εκπλύσεις με διαιθυλεθέρα. Τέλος, πραγματοποιείται ξήρανση υπό κενό, λαμβάνοντας το προϊόν σε μορφή άσπρης σκόνης.

### *iv) Σύνθεση πολυμερούς PEGSDA*

Ζυγίζουμε κατάλληλη ποσότητα PEGS, την οποία διασπείρουμε σε άνυδρο διχλωρομεθάνιο, υπό ανάδευση με μαγνητικό αναδευτήρα. Ακολουθεί ανάμειξη του χλωριδίου του ακρυλικού οξέος (1 mol PEGS/ 2 mol χλωρίδιο ακρυλικού οξέος) με άνυδρο διχλωρομεθάνιο και ανάμειξη της τριαιθυλαμίνης (1 mol χλωρίδιο ακρυλικού οξέος/ 2 mol τριαιθυλαμίνης) με άνυδρο διχλωρομεθάνιο. Αρχικά, προστίθεται στάγδην το διάλυμα της τριαιθυλαμίνης στο διάλυμα του PEGS και έπειτα ακολουθεί η προσθήκη του ακρυλικού διαλύματος με τον ίδιο ακριβώς τρόπο, στους 0°C (Εικόνα 13). Αφού ολοκληρωθεί η προσθήκη, το μίγμα αναδεύεται για 24 ώρες σε θερμοκρασία δωματίου, καθώς η αντίδραση εξελίσσεται.

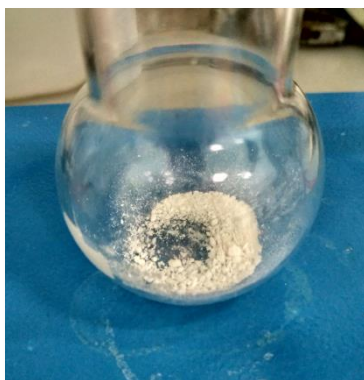




Εικόνα 13. Αντίδραση σχηματισμού PEGSDA.

#### ν) Καθαρισμός PEGSDA

Ακολουθείται η ίδια διαδικασία καθαρισμού του PEGSDA, όπως αυτή για τον καθαρισμό του PEGS και στο τέλος, μετά την ξήρανση υπό κενό, λαμβάνουμε το τελικό προϊόν σε μορφή λευκής σκόνης (Εικόνα 14) [66].

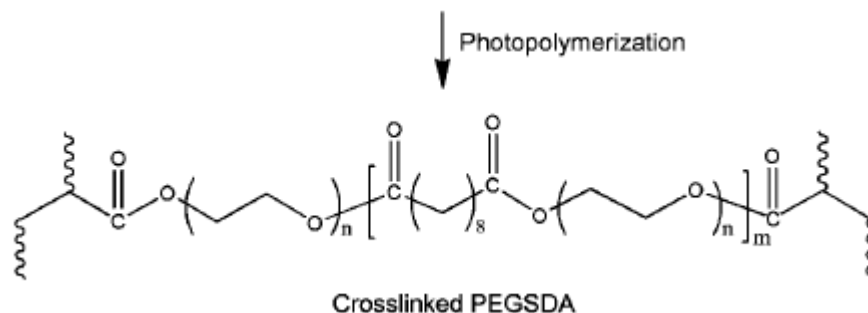


Εικόνα 14. PEGSDA σε μορφή σκόνης, μετά από ξήρανση.

#### vi) Φωτοπολυμερισμός

Ακολουθεί ο φωτοπολυμερισμός με ανόρθωση του διπλού δεσμού των τελικών ομάδων του ακρυλικού οξέος και την παραγωγή του υδροπηκτώματος με

συγκέντρωση προπολυμερούς PEGSDA 25% και 50% w/v, παρουσία 0,05% φωτοεκκινητή (Irgacure 2959), για 20 λεπτά μέσω έκθεσης σε υπεριώδη ακτινοβολία με χρήση λάμπας UV ( $\lambda=365$  nm, P=12 W). Η χημική δομή του υδροπηκτώματος φαίνεται παρακάτω (Εικόνα 15).



Εικόνα 15. Αντίδραση φωτοπολυμερισμού PEGSDA.

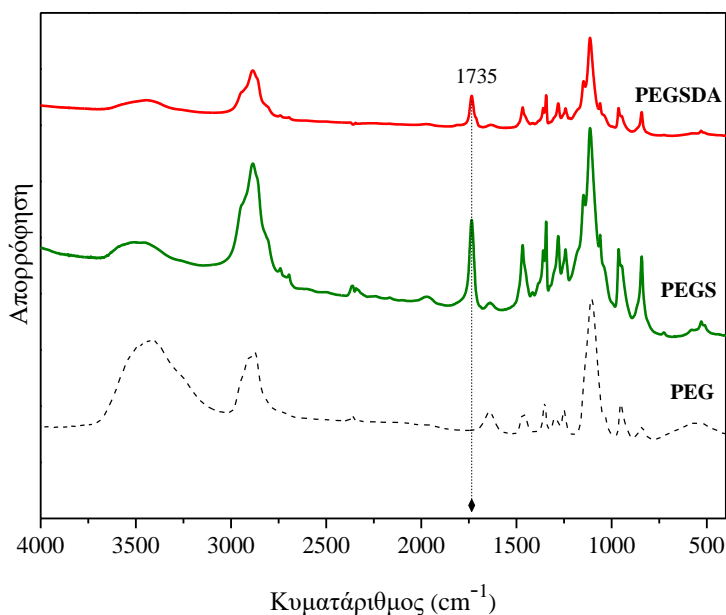
## B. Χαρακτηρισμός

Μετά το πέρας της πειραματικής πορείας σύνθεσης του PEGSDA και την απόκτηση του προϊόντος σε μορφή σκόνης, πραγματοποιήθηκε ποιοτικός έλεγχος του πολυμερούς μέσω της χρωματογραφίας αποκλεισμού μεγεθών (GPC) και τον προσδιορισμό των μοριακών βαρών (Πίνακας 3), καθώς και ταυτοποίηση των χαρακτηριστικών λειτουργικών ομάδων του μακρομορίου, μέσω της φασματοσκοπίας υπερύθρου FT-IR (Εικόνα 16). Η χρωματογραφία έδειξε καλή κατανομή μοριακών βαρών, ενώ οι τιμές για τα μέσα μοριακά βάρη ( $M_n$  και  $M_w$ ) συμφωνούν με αυτές της βιβλιογραφίας [66].

Πίνακας 3. Μέσα μοριακά βάρη κατά αριθμό ( $M_n$ ), κατά βάρος ( $M_w$ ) και συντελεστής κατανομής μοριακών βαρών (PDI) των μακρομορίων PEG και PEGDA.

Δείγμα	$M_n$	$M_w$	PDI
PEGS	10250	10660	1,52
PEGSDA	15400	20600	1,34

Όπως παρατηρείται στα φάσματα των PEGS και PEGSDA (Εικόνα 16), η ύπαρξη μίας νέας ισχυρής κορυφής στα  $1735\text{ cm}^{-1}$ , επιβεβαιώνει το σχηματισμό των εστερικών δεσμών στην κύρια αλυσίδα του πολυμερούς [95].



**Εικόνα 16.** Φάσματα FT-IR των μακρομορίων PEG, PEGS και PEGSDA.

### Γ. Συμπέρασμα

Τόσο το χρωματογράφημα όσο και τα φάσματα υπερύθρου επιβεβαίωσαν τη σύνθεση του προπολυμερούς PEGSDA, αλλά το τελικό υδροπήκτωμα που προέκυψε μέσω φωτοπολυμερισμού, είχε πολύ μεγάλο ιξώδες, χωρίς όμως να ικανοποιεί το κριτήριο του σχηματισμού μεμβράνης (κριτήριο 1), γιατί και δεν δύναται να χρησιμοποιηθεί επικαρδιακά του μυοκαρδίου.

## 2.3. Χημική τροποποίηση υδροπηκτωμάτων με βάση την πολυ(αιθυλενογλυκόλη) (PEG) με μονομερή διοξέων (fumaryl chloride) (OPF)

### A. Σύνθεση

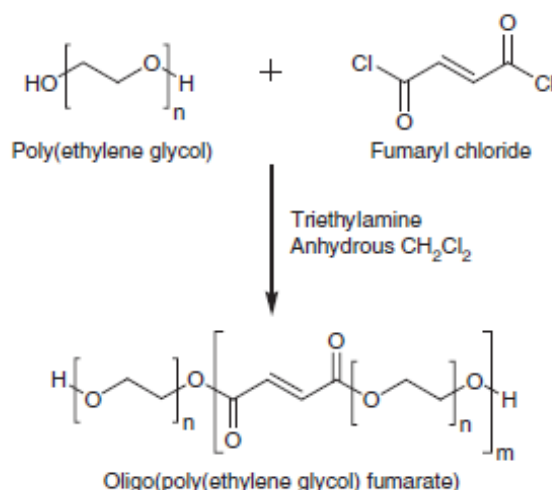
#### (α) Αντιδραστήρια

- Poly (ethylene glycol), Merck, CAS No 25322-68-3, MW= 950-1050,  $d_{25^{\circ}\text{C}}= 1.2 \text{ g/cm}^3$ , fp= 260 °C, mp= 33-40 °C
- Triethylamine, Merck, CAS No 121-44-8, MW=101,19,  $d_{25^{\circ}\text{C}}=0,73 \text{ g/cm}^3$ , fp= -11°C, mp= -115°C, bp= 90 °C
- Dichloromethane, Merck, CAS No 75-09-2, MW= 84,93,  $d_{25^{\circ}\text{C}}= 1,330 \text{ kg/cm}^3$ , mp= -96,7 °C bp= 39,6 °C

- Fumaryl chloride, Sigma Aldrich, CAS No 627-63-4, MW= 152,96,  $d_{25^{\circ}\text{C}}= 1.415 \text{ g/cm}^3$ ,  $fp=77^{\circ}\text{C}$ ,  $bp= 161-164^{\circ}\text{C}$  (lit.)
- Ethyl acetate, Merck, CAS No 141-78-6, MW= 88,105,  $d_{25^{\circ}\text{C}}= 897 \text{ kg/cm}^3$ ,  $mp= -83,6^{\circ}\text{C}$ ,  $bp= 77,1^{\circ}\text{C}$
- Diethyl ether, Sigma Aldrich, CAS No 60-29-7, MW= 74,12,  $d_{25^{\circ}\text{C}}= 713 \text{ kg/m}^3$ ,  $fp=-40^{\circ}\text{C}$ ,  $mp= -116,3^{\circ}\text{C}$ ,  $bp= 34,6^{\circ}\text{C}$

### (β) Πειραματική διαδικασία

Μετά την κατεργασία των αντιδραστηρίων που έγινε, όπως ακριβώς στην περίπτωση του PEGSDA, για τη σύνθεση του γραμμικού πολυεστέρα OPF (oligo poly(ethylene glycol) fumarate) πραγματοποιήθηκε πολυμερισμός συμπύκνωσης με βάση το PEG και το χλωρίδιο του φουμαρικού οξέος, όπως φαίνεται στην παρακάτω (Εικόνα 17):



**Εικόνα 17.** Αντίδραση σύνθεσης OPF.

Για τη σύνθεση του OPF χρησιμοποιήθηκε παρόμοια πειραματική πορεία με αυτή του PEGS και του PEGSDA (όπως αναφέρθηκε εκτενώς παραπάνω). Το χλωρίδιο του φουμαρικού οξέος και η τριαιθυλαμίνη αντιδρούν με το PEG (1 mol PEG/0,9 mol χλωρίδιο φουμαρικού οξέος και 1 mol χλωρίδιο φουμαρικού οξέος/2 mol τριαιθυλαμίνης). Αυτές οι αναλογίες παρέχουν 10% περίσσεια PEG στην αντίδραση συμπύκνωσης με το χλωρίδιο του φουμαρικού οξέος και αρκετή ποσότητα

τριαιθυλαμίνης για την απομάκρυνση των ιόντων χλωριδίου από το καθένα μόριο χλωριδίου του φουμαρικού οξέος [94].

## B. Χαρακτηρισμός

Το τελικό προϊόν που προέκυψε από τη σύνθεση του OPF σε μορφή σκόνης, χαρακτηρίστηκε με SEC και παρατηρήθηκε μη καλή κατανομή μοριακών βαρών.

## Γ. Συμπέρασμα

Η μη καλή κατανομή των MB στο τελικό προϊόν αποδίδεται στην περίπλοκη και ιδιαίτερα ευαίσθητη πειραματική διαδικασία σύνθεσης, η οποία αφενός αυξάνει το κόστος παρασκευής, αφετέρου ελαττώνει την επαναληψιμότητα της υψηλής τελικής ποιότητας του τελικού προϊόντος. Ένα βιοϋλικό όμως, πρέπει να έχει μικρό κόστος παρασκευής και απλή πορεία σύνθεσης [96]. Για τους λόγους αυτούς το OPF απορρίφθηκε για περαιτέρω θεώρηση.

## 3. ΥΔΡΟΠΗΚΤΩΜΑΤΑ ΜΕ ΒΑΣΗ ΤΟ ΑΛΓΙΝΙΚΟ ΟΞΥ

### A. Παρασκευή μεμβρανών

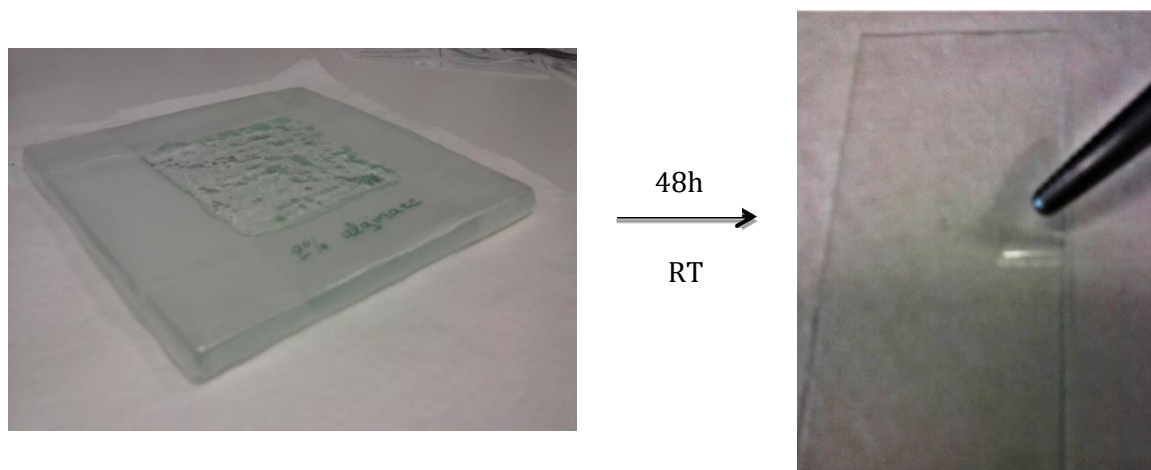
#### (α) Αντιδραστήρια

- Alginic acid sodium salt, Sigma Aldrich, CAS No 90005-38-3,  $d_{25^{\circ}\text{C}} = 1.601 \text{ g/cm}^3$
- Calcium chloride dehydrated, Fluka, CAS No 10043-52-4, MW= 110,98,  $d_{25^{\circ}\text{C}} = 1.85 \text{ g/cm}^3$ , mp=  $772^{\circ}\text{C}$  (lit.), bp=  $1,935^{\circ}\text{C}$
- Gluconolactone, Sigma Aldrich, CAS No 90-80-2, MW=178,14, mp=  $156^{\circ}\text{C}$  (lit.)

#### (β) Πειραματική διαδικασία

Τα υδροπηκτώματα αλγινικού παρασκευάζονται με χρήση άνυδρου χλωριούχου ασβεστίου ( $\text{CaCl}_2$ ) ως πηγή δισθενών κατιόντων. Η ζελατινοποίηση πραγματοποιείται μέσω του μηχανισμού διάλυσης/διάχυσης, κατά τον οποίο τα ιόντα ζελατινοποίησης διαχέονται με μεγάλη ταχύτητα στο διάλυμα του αλγινικού οξέος και έτσι χαρακτηριστικό της μεθόδου είναι ο ταχύτατος σχηματισμός του

υδροπηκτώματος. Παρασκευάστηκαν υδροπηκτώματα συγκέντρωσης 2% w/v. Αρχικά, ζυγίστηκαν 0,2g αλγινικού οξέος, τα οποία διαλύθηκαν σε 5 ml αποσταγμένου νερού (διάλυμα Α), καθώς και 9,5mg CaCl<sub>2</sub> και 30mg GDL, τα οποία διαλύθηκαν σε 5 ml αποσταγμένου νερού (διάλυμα Β). Το διάλυμα Β προστέθηκε σταγόδη στο διάλυμα Α, υπό ήπια ανάδευση. Η ίδια διαδικασία ακολουθήθηκε για την παρασκευή υδροπηκτωμάτων συγκέντρωσης 3% w/v. Τέλος, τα υδροπηκτώματα τοποθετήθηκαν σε γυάλινα πλακίδια σε θερμοκρασία δωματίου για 48 ώρες για να επιτευχθεί η εξάτμιση του διαλύτη (νερό) και ο σχηματισμός της μεμβράνης, όπως φαίνεται στην Εικόνα 18 [97].



**Εικόνα 18.** Σχηματισμός μεμβράνης αλγινικού, μετά από 48 ώρες παραμονής σε θερμοκρασία δωματίου.

## Β. Χαρακτηρισμός

Οι τελικές μεμβράνες που παρήχθησαν, μακροσκοπικά δεν είχαν καλά ποιοτικά χαρακτηριστικά, δεν ήταν καθόλου εύκαμπτες, ενώ οι *in vitro* δοκιμές που πραγματοποιήθηκαν σε φυσιολογικό ορό και πλάσμα αίματος έδειξαν την άμεση αποικοδόμησή τους σε 24 ώρες.

## Γ. Συμπέρασμα

Οι μεμβράνες από υδροπηκτώμα αλγινικού απορρίφθηκαν για χρήση στο μυοκάρδιο, διότι δεν ικανοποιούσαν το κριτήριο της ευκαμψίας (κριτήριο 3), ενώ εξαιτίας της άμεσης αποικοδόμησής τους σε υδατικό περιβάλλον, δεν πληρούσαν και το κριτήριο της βιοαποικοδόμησης σε συγκεκριμένο χρονικό διάστημα (κριτήριο 8).

#### 4. ΥΔΡΟΠΗΚΤΩΜΑΤΑ ΜΕ ΒΑΣΗ ΤΗ ΧΙΤΟΖΑΝΗ

##### 4.1 Επισκόπηση και σύγκριση ιδιοτήτων μεμβρανών χιτοζάνης

Για την παρασκευή υδροπηκτωμάτων χιτοζάνης σε μορφή μεμβράνης, χρησιμοποιήθηκε ίδιας πηγής προέλευσης χιτοζάνη με διαφορετικά μοριακά βάρη (LMW, MMW). Με βάση τη χιτοζάνη χαμηλού μοριακού βάρους (συμβολίζεται ως CS\_LMW), παρασκευάστηκαν μεμβράνες με τη χρήση τριών διαφορετικών διαλυμάτων εξουδετέρωσης (NaOH, KOH και β-GP) ενώ με βάση τη χιτοζάνη μεσαίου μοριακού βάρους (συμβολίζεται ως CS\_MMW) παρασκευάστηκαν μεμβράνες με τη χρήση διαλύματος εξουδετέρωσης NaOH. Τα διαλύματα εξουδετέρωσης του καυστικού νατρίου και καλίου παρήχθησαν από τη διάλυση των βάσεων σε αποσταγμένο νερό σε δύο διαφορετικές μοριακές συγκεντρώσεις (0,5M και 2M), ενώ το διάλυμα του γλυκεροφωσφορικού δινατρίουχου άλατος (β-GP disodium salt) παρήχθη από τη διάλυσή του σε αποσταγμένο νερό σε τέσσερις διαφορετικές συγκεντρώσεις (10%, 15%, 18% και 20% w/v). Πραγματοποιήθηκαν διαφορετικές διαδικασίες εξουδετέρωσης, τόσο με την CS\_LMW όσο και την CS\_MMW, μεταβάλλοντας, εκτός από το διάλυμα εξουδετέρωσης που χρησιμοποιείται και τις συγκεντρώσεις των διαλυμάτων χιτοζάνης. Στον Πίνακα 4 αναφέρονται οι ιδιότητες και τα χαρακτηριστικά των μεμβρανών που προκύπτουν από τις διαφορετικές πορείες παρασκευής τους.

Αρχικά κατασκευάστηκαν μεμβράνες χιτοζάνης (MMW, LMW) μέσω της εμβάπτισης τους σε διάλυμα εξουδετέρωσης NaOH. Τα χαρακτηριστικά των μεμβρανών αυτών ήταν το πολύ μικρό πάχος (0,1 mm), η μεγάλη δυσκαμψία και το χαμηλό pH, το οποίο προσδίδει μια ελαφρά οξύτητα στη μεμβράνη. Σύμφωνα με αυτά τα χαρακτηριστικά, οι μεμβράνες δεν πληρούσαν τα κριτήρια 3,4,5 και 6 οπότε δεν προκρίθηκαν για την τελική εφαρμογή.

Στη συνέχεια, τροποποιώντας τη διαδικασία εξουδετέρωσης, αναπτύχθηκαν μεμβράνες χιτοζάνης LMW μέσω της μεθόδου αργής ενστάλαξης διαλύματος NaOH και KOH. Στην πρώτη περίπτωση, οι μεμβράνες ήταν αρκετά δύσκαμπτες, με μικρή διόγκωση σε υδάτινο περιβάλλον, ενώ στη δεύτερη περίπτωση το μέτρο δυσκαμψίας τους ήταν αρκετά μικρότερο, εμφανίζοντας καλύτερες μηχανικές ιδιότητες, αλλά καθόλου καλή συμπεριφορά στον *in vivo* έλεγχο (κριτήριο 2). Και στις δύο

περιπτώσεις, δεν ικανοποιούνταν πλήρως τα κριτήρια 3,4,5 και 6 οπότε οι συγκεκριμένες μεμβράνες απορρίφθηκαν ως επιλογή για τη συγκεκριμένη εφαρμογή.

Σε συνέχεια των δοκιμών για την εύρεση της μεμβράνης με τα επιθυμητά χαρακτηριστικά, στοχεύοντας κυρίως στην επίτευξη του ουδέτερου pH, όπως αυτό του οργανισμού, παρασκευάστηκαν μεμβράνες χιτοζάνης με τη χρήση διαφορετικών συγκεντρώσεων διαλύματος φωσφορικού άλατος (β-GP). Το β-GP είναι μία ασθενής βάση, η οποία προσδίδει ουδέτερο pH όταν προστίθεται στο διάλυμα της χιτοζάνης, χωρίς να προκαλέσει καθίζηση ή διαχωρισμό φάσεων σε θερμοκρασία περιβάλλοντος είναι σε υγρή μορφή, με αύξηση της θερμοκρασίας στους 37 °C ζελατινοποιείται [98]. Τα χαρακτηριστικά των μεμβρανών που προέκυψαν ήταν το πολύ μικρό πάχος (0,05 mm), η μεγάλη δυσκαμψία και η πολύ μεγάλη διόγκωση σε υδατικό περιβάλλον που οδηγούσε στην ταχεία αποικοδόμηση τους. Επίσης, ο *in vivo* έλεγχος (βλέπε Ενότητα III-2, 2.1 και Παράρτημα 3) έδειξε μη καλή προσκόλληση και σταθερότητα στο μυοκάρδιο. Βάση των παραπάνω χαρακτηριστικών, δεν πληρούνται τα κριτήρια 2 (καλά ποιοτικά χαρακτηριστικά), 3 (ευκαμψία), 4 (ελεγχόμενες μηχανικές ιδιότητες), 5 (ελεγχόμενο πάχος) και 8 (βιοαπικοδόμηση), οπότε οι μεμβράνες δεν προκρίνονται για τη χρήση τους στο μυοκάρδιο. Οι πειραματικές πορείες παρασκευής των παραπάνω μεμβρανών, καθώς και ο χαρακτηρισμός τους αναπτύσσονται εκτενώς στις επόμενες παραγράφους.

Η τελευταία μέθοδος παρασκευής μεμβρανών χιτοζάνης (MMW και LMW) που χρησιμοποιήθηκε ήταν μέσω της διαδικασίας ζελατινοποίησης, η οποία επιτεύχθηκε με χρήση διαλύματος NaOH που προάγει το σχηματισμό υδροπηκτώματος σε μορφή μεμβρανών ελεγχόμενου πάχους. Η διαφορά αυτής της μεθόδου σε σύγκριση με τις προηγούμενες έγκειται στη χρήση του διαλύματος NaOH ως παράγοντα εξουδετέρωσης, οδηγώντας στο σχηματισμό μεμβράνης, χωρίς να πραγματοποιηθεί εξάτμιση του διαλύτη. Η συγκεκριμένη μέθοδος επιλέχθηκε να εφαρμοστεί για την παρασκευή μεμβρανών χιτοζάνης μεσαίου M.W. και όχι χαμηλού M.W. (που οδηγεί σε εξαιρετικά εύθραυστες μεμβράνες), ικανοποιώντας όλα τα κριτήρια που τέθηκαν για την επιλογή της κατάλληλης μεμβράνης με τις βέλτιστες ιδιότητες, οι οποίες αναλύονται λεπτομερώς στην επόμενη ενότητα.



**Πίνακας 4.** Ιδιότητες μεμβρανών χιτοζάνης με βάση τη συγκέντρωση των διαλυμάτων της, τον τύπο της βάσης που χρησιμοποιείται για εξουδετέρωση και τις διαφορετικές διαδικασίες εξουδετέρωσης.

Συγκέντρωση δ/των χιτοζάνης	MMW		LMW			Διάλυμα εξουδετέρωσης KOH	Διάλυμα β-GP			
	Διάλυμα εξουδετέρωσης NaOH		Διάλυμα εξουδετέρωσης NaOH				100% w/v	15% w/v	18% w/v	20% w/v
	Μέσω εμφάντισης (0,5M NaOH)	Μέσω ζελατινοποίησης (2M NaOH)	Μέσω εμφάντισης (0,5M NaOH)	Μέσω εντολάξης (0,5M NaOH)	Μέσω ζελατινοποίησης (2M NaOH)					
<b>1% w/v CS</b>	Πάχος 0,1 mm ↑Δυσκαμψία (E >3 GPa) ↓Διόγκωση (ορός) Ελαφρώς όξινες (pH~6)	-	Πάχος 0,1 mm ↑Δυσκαμψία ↓Διόγκωση (ορός) Ελαφρώς όξινες (pH~6)	Πάχος 0,1-0,2 mm ↑Δυσκαμψία ↓Διόγκωση (ορός) Ελαφρώς όξινες (pH~6)	-	Πάχος 0,1-0,2 mm Ευκαμψία ↓Διόγκωση (ορός) Ελαφρώς όξινες (pH~6) <i>In vivo</i> έλεγχος	Πάχος 0,05 mm ↑↑Δυσκαμψία ↑↑Διόγκωση (ορός) Ουδέτερο pH <i>In vivo</i> έλεγχος			
<b>2% w/v CS</b>	Πάχος 0,1 mm ↑Δυσκαμψία ↓Διόγκωση (ορός) Ελαφρώς όξινες (pH~6)	Πάχος 0,5-0,7 mm ↑Ευκαμψία Επαρκής διόγκωση Ουδέτερο pH <i>In vivo</i> έλεγχος	Πάχος 0,1 mm ↑Δυσκαμψία ↓Διόγκωση (ορός) Ελαφρώς όξινες (pH~6)	-	↓Μηχανική Αντοχή (Διάλυση κατά τη διαδικασία παρασκευής τους)	-	Πάχος 0,05 mm ↑↑Δυσκαμψία ↑↑Διόγκωση (ορός) Ουδέτερο pH <i>In vivo</i> έλεγχος			

Πίνακας 4. (συνέχεια)

4% w/v CS	-	Πάχος 1 mm	-	-	-	-	-
		↑Ευκαμψία					
		Επαρκής διόγκωση					
		Ουδέτερο pH					
		<i>In vivo</i> έλεγχος					

4.2 Παρασκευή μεμβρανών χιτοζάνης μεσαίου μοριακού βάρους (MMW) μέσω εμβάπτισης σε διάλυμα εξουδετέρωσης NaOH

A. Παρασκευή μεμβρανών

(α) Αντιδραστήρια

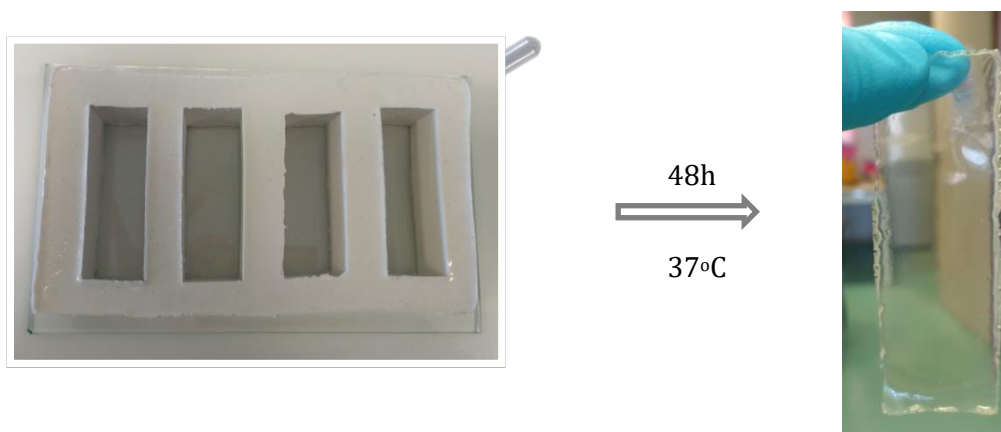
- Chitosan (MMW), Sigma Aldrich, CAS No 9012-76-4, DD=75-85%, visc. 200-800 cP, MW= 190-310 kDa
- Acetic acid (glacial), Merck, CAS No 64-19-7, MW= 60,05,  $d_{25^{\circ}\text{C}}= 1,05 \text{ g/cm}^3$ ,  $f_p= 39^{\circ}\text{C}$ ,  $m_p= 17^{\circ}\text{C}$ ,  $b_p= 116-118^{\circ}\text{C}$
- Sodium hydroxide, Merck, Cas No 1310-73-2, MW= 40,  $d_{25^{\circ}\text{C}}= 2,13 \text{ g/cm}^3$ ,  $m_p= 319-322^{\circ}\text{C}$

(β) Πειραματική διαδικασία

Η παρασκευή μεμβρανών CS\_MMW πραγματοποιήθηκε σύμφωνα με την παρακάτω πειραματική πορεία: Παρασκευάστηκαν μεμβράνες χιτοζάνης συγκέντρωσης 1% και 2% w/v σε διάλυμα οξικού οξέος συγκέντρωσης 0,5% v/v. Αρχικά, ζυγίστηκαν 0,2 και 0,4 g χιτοζάνης, αντίστοιχα, τα οποία διαλύθηκαν σε 20 ml διαλύματος οξικού οξέος, υπό μαγνητική ανάδευση, μέχρι την πλήρη διάλυση της χιτοζάνης. Ακολούθησε φυγοκέντρωση στα 5000 rpm για 1 ώρα στους 4 °C, για να απομακρυνθούν οι φυσσαλίδες και τα αδιάλυτα σωματίδια. Έπειτα, τα διαλύματα τοποθετήθηκαν σε ειδικό καλούπι σιλικόνης (ιδιοκατασκευή) σε ίσους όγκους στους

37±1°C για 48 ώρες, έτσι ώστε να γίνει η εξάτμιση του διαλύτη και να σχηματιστούν οι μεμβράνες (

Εικόνα 19). Στη συνέχεια, για τη διαδικασία εξουδετέρωσης οι μεμβράνες εμβάπτιστηκαν σε διάλυμα NaOH 0,5M για 30 λεπτά, ακολούθησαν εκπλύσεις με αποσταγμένο νερό και, τέλος, ξήρανση στους 37±1°C [99].



**Εικόνα 19.** Σχηματισμός μεμβρανών χιτοζάνης σε καλούπι σιλικόνης στους 37±1°C.

## B. Χαρακτηρισμός

Οι μεμβράνες που παρασκευάστηκαν με τη συγκεκριμένη πειραματική πορεία υποβλήθηκαν σε μετρήσεις εφελκυσμού (παράρτημα 2.9) για τον προσδιορισμό της δυσκαμψίας τους, δηλαδή του μέτρου Young (E). Τα αποτελέσματα επιβεβαίωσαν τη μακροσκοπική παρατήρηση που είχε ήδη προηγηθεί, ότι δηλαδή εμφανίζουν μεγάλη δυσκαμψία, αφού το E ξεπερνά τα 3 GPa. Επίσης, έγιναν δοκιμές εμβάπτισης σε ορό και αφού μετρήθηκε το πάχος των μεμβρανών, πριν και μετά την εμβάπτιση παρατηρήθηκε μετά τις τρεις πρώτες ημέρες εμβάπτισης, ελάχιστη διόγκωση. Τέλος, οι μεμβράνες εμφάνιζαν μια ελαφριά οξύτητα, εφόσον το pH ήταν κοντά στο 6, κάτι το οποίο συμφωνεί και με τη θεωρία [71].

## Γ. Συμπέρασμα

Οι μεμβράνες που παρήχθησαν είχαν πολύ μικρό και μη ελεγχόμενο πάχος, δηλαδή δεν ικανοποιούσαν το κριτήριο 5, καθώς επίσης δεν πληρούσαν και το κριτήριο της ευκαμψίας, των ελεγχόμενων μηχανικών ιδιοτήτων (παρόμοιων του καρδιακού ιστού) και του ουδέτερου pH (κριτήρια 3, 4 και 6, αντίστοιχα). Μετά την ξήρανση

τους, παρατηρήθηκε μεγάλη δυσκαμψία, η οποία πιθανόν να οφείλεται στην απομάκρυνση του οξικού οξέος (λόγω εξουδετέρωσης), το οποίο δρά ως πλαστικοποιητής [100]. Οπότε, για όλους τους παραπάνω λόγους, δεν προκρίνονται για τη συγκεκριμένη εφαρμογή.

#### 4.3 Παρασκευή μεμβρανών χιτοζάνης χαμηλού μοριακού βάρους (LMW)

Στην παράγραφο αυτή περιγράφεται η παρασκευή τεσσάρων μεμβρανών χιτοζάνης χαμηλού μοριακού βάρους (LMW), οι οποίες παρασκευάστηκαν με διαφορετικούς τρόπους και αντιδραστήρια. Για ευκολία, οι διαδικασίες παρασκευής τους έχουν ονομαστεί ως I, με υποπεριπτώσεις I-A και I-B, II και III.

##### 4.3.1 Διαδικασία εξουδετέρωσης I: Με τη χρήση διαλύματος NaOH

###### A. Παρασκευή μεμβρανών

###### (α) Αντιδραστήρια

- Chitosan (LMW), Sigma Aldrich, CAS No 9012-76-4, DD=75-85%, viscosity 20-300 cP, MW= 50-190 kDa, DD= 75-85%,
- Acetic acid (glacial), Merck, CAS No 64-19-7, MW= 60,05,  $d_{25^{\circ}\text{C}}= 1,05 \text{ g/cm}^3$ ,  $f_p= 39^{\circ}\text{C}$ ,  $m_p= 17^{\circ}\text{C}$ ,  $b_p= 116-118^{\circ}\text{C}$ ,
- Sodium hydroxide, Merck, Cas No 1310-73-2, MW= 40,  $d_{25^{\circ}\text{C}}= 2,13 \text{ g/cm}^3$ ,  $m_p= 319-322^{\circ}\text{C}$ ,

###### (β) Πειραματική διαδικασία

- Διαδικασία I-A: Εξουδετέρωση Μέσω Εμβάπτισης Των Μεμβρανών Στο Διάλυμα

Ακολουθήθηκε ακριβώς η ίδια πειραματική πορεία παρασκευής και εμβάπτισης των μεμβρανών χιτοζάνης, συγκέντρωσης 1% και 2% w/v σε διάλυμα εξουδετέρωσης NaOH 0,5M όπως αναφέρεται και παραπάνω για την αντίστοιχη παρασκευή μεμβρανών χιτοζάνης MMW.

- Διαδικασία I-B : Εξουδετέρωση μέσω της μεθόδου αργής ενστάλαξης (Slow Drip Method)

Για την παραγωγή του πολυκατιόντος χιτοζάνης, σκόνη χιτοζάνης (1% w/v) διαλύθηκε σε αποσταγμένο νερό με διαφορετικές συγκεντρώσεις οξικού οξέος (0,5%

και 1% v/v), υπό συνεχή ανάδευση, μέχρι την πλήρη διάλυσή της. Το ιξώδες διάλυμα του πολυκατιόντος φυγοκεντρήθηκε στα 5000 rpm για να απομακρυνθούν τα αδιάλυτα σωματίδια και οι ακαθαρσίες. Ακολούθησε η εξουδετέρωση του πολυκατιόντος με τη μέθοδο της αργής ενστάλαξης του διαλύματος εξουδετέρωσης NaOH 0,5M, με σταθερό ρυθμό μίας σταγόνας διαλύματος ανά λεπτό, υπό ήπια ανάδευση. Η διαδικασία της ενστάλαξης έγινε με τη χρήση προχοϊδας, τόσο για τον έλεγχο του συνολικού όγκου του διαλύματος NaOH που χρησιμοποιείται για την εξουδετέρωση, όσο και για το συνεχή έλεγχο του pH, μέχρι να φτάσει στη τιμή 6.0 (η pK του πολυκατιόντος χιτοζάνης είναι περίπου 6.3, εξαιτίας της παρουσίας των αμινομάδων [101]). Η διαδικασία εξουδετέρωσης και ενστάλαξης φαίνεται στην Εικόνα 20 [102]. Η παρασκευή των μεμβρανών μετά από την εξουδετέρωση έγινε μέσω της μεθόδου χύτευσης. Τα διαλύματα χυτεύτηκαν σε ειδικό καλούπι (ιδιοκατασκευή) σε ίσους όγκους στους  $37\pm 1^\circ\text{C}$  για 48 ώρες, έτσι ώστε να γίνει η εξάτμιση του διαλύτη και να σχηματιστούν μεμβράνες σταθερού πάχους.



**Εικόνα 20.** Διαδικασία αργής ενστάλαξης διαλύματος NaOH σε διάλυμα χιτοζάνης.

## B. Χαρακτηρισμός

Οι μεμβράνες που εμβαπτίστηκαν σε διάλυμα NaOH χαρακτηρίστηκαν με τις ίδιες τεχνικές, όπως ακριβώς αναφέρθηκε προηγουμένως. Δεν υπήρξε κάποια διαφορά στα αποτελέσματα. Η συμπεριφορά των μεμβρανών ήταν ακριβώς η ίδια, παρά το μικρότερο μοριακό βάρος της χιτοζάνης (LMW). Στις μεμβράνες που παρήχθησαν με

τη μέθοδο ενστάλαξης προσδιορίστηκε το μέτρο Young (E), μέσω των καμπυλών τάσης-παραμόρφωσης που προέκυψαν από τις δοκιμές εφελκυσμού. Διαπιστώθηκε ότι το E είναι της τάξης των μερικών εκατοντάδων MPa, ενώ σε μετρήσεις που πραγματοποιήθηκαν 7 και 15 ημέρες μετά την παρασκευή των μεμβρανών, παρατηρήθηκε αύξηση του E, άρα και της δυσκαμψίας τους λόγω της απομάκρυνσης των μορίων του οξέος. Οι διαφορετικές συγκεντρώσεις οξέος που χρησιμοποιήθηκαν (0,5 και 1% v/v) δεν έδειξαν σημαντικές διαφορές στην δυσκαμψία των μεμβρανών, αφού η τάξη μεγέθους του E παρέμεινε ίδια. Τέλος, έγιναν δοκιμές εμβάπτισης σε ορό και αφού μετρήθηκε το πάχος των μεμβρανών, πριν και μετά την εμβάπτιση, παρατηρήθηκε ότι η διόγκωσή τους ήταν ελάχιστη, ενώ παρέμειναν αναλοίωτες για πολύ μεγάλο χρονικό διάστημα (>6 μήνες).

### Γ. Συμπέρασμα

Και στις δύο διαδικασίες παρασκευής των μεμβρανών, οι μεμβράνες είχαν πολύ μικρό και μη ελεγχόμενο πάχος (0,1-0,2 mm) (κριτήριο 5), ενώ δεν ικανοποιούσαν τα κριτήρια της ευκαμψίας των ελεγχόμενων μηχανικών ιδιοτήτων και του ουδέτερου pH (κριτήρια 3, 4 και 6).

### 4.3.2 Διαδικασία εξουδετέρωσης II: Με τη χρήση διαλύματος KOH

#### A. Παρασκευή μεμβρανών

##### (α) Αντιδραστήρια

- Chitosan (LMW), Sigma Aldrich, CAS No 9012-76-4, DD=75-85%, viscosity 20-300 cP, MW= 50-190 kDa, DD= 75-85%,
- Acetic acid (glacial), Merck, CAS No 64-19-7, MW= 60,05,  $d_{25^{\circ}\text{C}} = 1,05 \text{ g/cm}^3$ ,  $f_p = 39^{\circ}\text{C}$ ,  $m_p = 17^{\circ}\text{C}$ ,  $b_p = 116 - 118^{\circ}\text{C}$ ,
- Potassium hydroxide, Riedel-de Haen, CAS No 1310-58-3, MW= 56,1,  $d_{25^{\circ}\text{C}} = 2,12 \text{ g/cm}^3$ ,  $m_p = 360^{\circ}\text{C}$ ,

##### (β) Πειραματική διαδικασία

Ακολουθήθηκε η ίδια πειραματική πορεία παρασκευής μεμβρανών χιτοζάνης συγκέντρωσης 1% w/v σε διαφορετικές συγκεντρώσεις οξικού οξέος (0,5% και 1% v/v), όπως αναφέρεται στη Διαδικασία I-B και ακολούθησε η διαδικασία

εξουδετέρωσης με τη μέθοδο αργής ενστάλαξης του διαλύματος εξουδετέρωσης ΚΟΗ 0,5Μ, με σταθερό ρυθμό μίας σταγόνας διαλύματος ανά λεπτό και με συνεχή έλεγχο του pH, μέχρι να φτάσει στην τιμή 6.0, υπό συνθήκες ήπιας ανάδευση.

## Β. Χαρακτηρισμός

Η χρήση διαλύματος εξουδετέρωσης ΚΟΗ είχε ως αποτέλεσμα το σχηματισμό μακροσκοπικά εύκαμπτων μεμβρανών, ενώ το μέτρο Young κυμάνθηκε σε πολύ μικρότερες τιμές, της τάξης των 10 ΜΡα, επιδεικνύοντας μια πιο όλκιμη συμπεριφορά σε σχέση με τις μεμβράνες που προέκυψαν από το διάλυμα εξουδετέρωσης ΝαΟΗ. Όπως και στις προηγούμενες μεμβράνες, οι *in vitro* δοκιμές σε ορό έδειξαν τη σταθερότητα των μεμβρανών και πολύ μικρή διόγκωση για μεγάλο χρονικό διάστημα (>6 μήνες). Επίσης, προκαταρκτικές δοκιμές εμφυτεύσεων που πραγματοποιήθηκαν σε τρεις επίμυες έδειξαν καλή προσκόλληση της μεμβράνης στο μυοκαρδίο, όμως μεγάλη αστάθεια, καθώς ήταν αδύνατον να ακινητοποιηθεί με τη χρήση ράμματος, διότι ήταν αρκετά εύθραυστη κατά τη διάρκεια της εμφύτευσης (βλέπε Ενότητα ΙΙΙ-2, 2.1 και Παράρτημα 3).

## Γ. Συμπέρασμα

Οι μεμβράνες που εξουδετερώθηκαν με τη μέθοδο αργής ενστάλαξης διαλύματος ΚΟΗ, πληρούσαν σε ικανοποιητικό βαθμό το κριτήριο της ευκαμψίας αλλά όχι το κριτήριο 2 που αφορά στα ποιοτικά χαρακτηριστικά της μεμβράνης, το κριτήριο 4 (ελεγχόμενες μηχανικές ιδιότητες), το κριτήριο 5 (ελεγχόμενο πάχος) και το κριτήριο του ουδέτερου pH.

### 4.3.3 Διαδικασία εξουδετέρωσης ΙΙΙ: Με τη χρήση διαλύματος φωσφορικού άλατος (β-GP)

#### Α. Παρασκευή μεμβρανών

##### (α) Αντιδραστήρια

- Chitosan (LMW), Sigma Aldrich, CAS No 9012-76-4, DD=75-85%, viscosity 20-300 cP, MW= 50-190 kDa, DD= 75-85%,
- Acetic acid (glacial), Merck, CAS No 64-19-7, MW= 60,05,  $d_{25^{\circ}\text{C}} = 1,05 \text{ g/cm}^3$ ,  $f_p = 39^{\circ}\text{C}$ ,  $m_p = 17^{\circ}\text{C}$ ,  $b_p = 116 - 118^{\circ}\text{C}$ ,

- $\beta$ -Glycerol phosphate disodium salt pentahydrate ( $\beta$ -GP), Sigma Aldrich, CAS No 13408-09-8, MW= 306,11.

### (β) Πειραματική διαδικασία

Για την προετοιμασία υδροπηκτωμάτων χιτοζάνης με την προσθήκη ασθενούς βάσης γλυκεροφωσφορικού άλατος ( $\beta$ -GP disodium salt), αρχικά ζυγίστηκαν 0,2 και 0,4g σκόνης χιτοζάνης (για τη συγκέντρωση 1% και 2% w/v, αντίστοιχα) και διαλύθηκαν σε 20ml διαλύματος οξικού οξέος (0,75% v/v). Ακολούθησε ανάδευση σε μαγνητικό αναδευτήρα για 24 ώρες και φυγοκέντρηση για την απομάκρυνση των αδιάλυτων σωματιδίων, στα 5000 rpm για 30 λεπτά. Στη συνέχεια, τα όξινα διαλύματα χιτοζάνης τοποθετήθηκαν σε μεμβράνη διαπίδυσης (3500 Da) σε 1L αποσταγμένου νερού για 3 ημέρες (με συχνές αλλαγές μέχρι να σταθεροποιηθεί το pH) στους 4°C. Το pH μετρήθηκε πριν και μετά τη διαπίδυση, επιδεικνύοντας σημαντική αύξηση από pH~5 σε pH~6.2, εξαιτίας της διαπίδυσης. Διαφορετικές συγκεντρώσεις  $\beta$ -GP προετοιμάστηκαν σε αποσταγμένο νερό (10%, 15%, 18%, 20% w/v), αποστειρώθηκαν με τη χρήση φίλτρων σύριγγας (μέγεθος πόρων 0,22  $\mu$ m) και αποθηκεύτηκαν στους 4°C. Το αποστειρωμένο διάλυμα του γλυκεροφωσφορικού άλατος προστίθεται στάγδην στο διάλυμα της χιτοζάνης, υπό μαγνητική ανάδευση, σε λουτρό πάγου. Το pH ελέγχεται συνεχώς με τη χρήση πεχάμετρου, ενώ η διαδικασία προσθήκης του  $\beta$ -GP σταματάει όταν το pH γίνει ουδέτερο (pH= 7-7,4). Η ανάμειξη συνεχίστηκε για 15 λεπτά και έπειτα τα διαλύματα τοποθετήθηκαν σε τριβλία για να σταθεροποιηθούν σε θερμοκρασία περιβάλλοντος για 48 ώρες. Τέλος, πραγματοποιήθηκε η διαδικασία ζελατινοποίησης, μετά την τοποθέτηση των διαλυμάτων στους 37°C (sol-gel transition) και ο σχηματισμός των μεμβρανών μετά από 48 ώρες, μέσω της εξάτμισης του διαλύτη [103].

### B. Χαρακτηρισμός

Η μεμβράνη CS-GP είχε ουδέτερο pH, όμως ήταν αρκετά λεπτή με συγκεκριμένο πάχος λόγω της συγκεκριμένης πειραματικής πορείας παρασκευής της. Ο έλεγχος σε φυσιολογικό ορό έδειξε μεγάλη διόγκωση και ταχεία αποικοδόμησή της στο χρονικό διάστημα των 3 ημερών. Τα αποτελέσματα που προκύπτουν από τις *in vivo* εμφυτεύσεις έδειξαν ότι δεν είχε καλή προσκόλληση και σταθερότητα στο



μυοκάρδιο. Υπήρχε δυσκολία στο χειρισμό της διότι ήταν αρκετά δύσκαμπτη και μόνο μετά την εμβάπτιση της σε φυσιολογικό ορό ήταν διαχειρίσιμη κατά την εμφύτευση. Επίσης, δεν σταθεροποιούνταν εύκολα με τη χρήση ράμματος (βλέπε Ενότητα III-2, 2.1 και Παράρτημα 3).

#### Γ. Συμπέρασμα

Οι μεμβράνες που παρασκευάστηκαν με το φωσφορικό άλας είχαν ουδέτερο pH, όποτε θεωρούνται κατάλληλες για εμφύτευση στον οργανισμό, αλλά ταυτόχρονα είχαν πολύ μικρό πάχος και μεγάλη δυσκαμψία. Συμπερασματικά, εφόσον δεν πληρούνται τα κριτήρια 2, 3, 4, 5 και 8 δεν προκρίνονται για χρήση τους στη συγκεκριμένη εφαρμογή.

#### 4.4 Παρασκευή μεμβρανών χιτοζάνης MMW και LMW μέσω της διαδικασίας ζελατινοποίησης

Ο σχηματισμός φυσικών υδροπηκτωμάτων χιτοζάνης πραγματοποιείται μέσω της διαδικασίας ζελατινοποίησης με τη χρήση υδατικού διαλύματος NaOH, το οποίο προάγει τη ζελατινοποίηση. Με αυτή τη μέθοδο σχηματίζονται υδροπηκτώματα σε μορφή μεμβρανών ελεγχόμενου πάχους και ουδέτερου pH, χωρίς να γίνεται εξάτμιση του διαλύτη [104]. Συγκεκριμένα, οι μεμβράνες χιτοζάνης MMW εμφανίζουν καλύτερα χαρακτηριστικά σε σύγκριση με τις μεμβράνες LMW, διότι οι τελευταίες εμφανίζουν χαμηλή μηχανική αντοχή και διαλύονται κατά τη διαδικασία παρασκευής τους. Η συγκεκριμένη μέθοδος παρασκευής ικανοποιεί όλα τα κριτήρια και τις παραμέτρους που τέθηκαν για την επιλογή της κατάλληλης μεμβράνης με τις βέλτιστες ιδιότητες και προκρίνεται η χρήση της για την παρασκευή των μεμβρανών με τα επιθυμητά χαρακτηριστικά για τη συγκεκριμένη εφαρμογή. Για το λόγο αυτό η πορεία παρασκευής των μεμβρανών χιτοζάνης MMW καθώς και η μελέτη των ιδιοτήτων τους παρουσιάζονται αναλυτικά στην Ενότητα III-2.

### III-2. ΠΑΡΑΣΚΕΥΗ ΚΑΙ ΙΔΙΟΤΗΤΕΣ ΜΕΜΒΡΑΝΗΣ ΑΠΟ ΥΔΡΟΠΗΚΤΩΜΑ ΧΙΤΟΖΑΝΗΣ

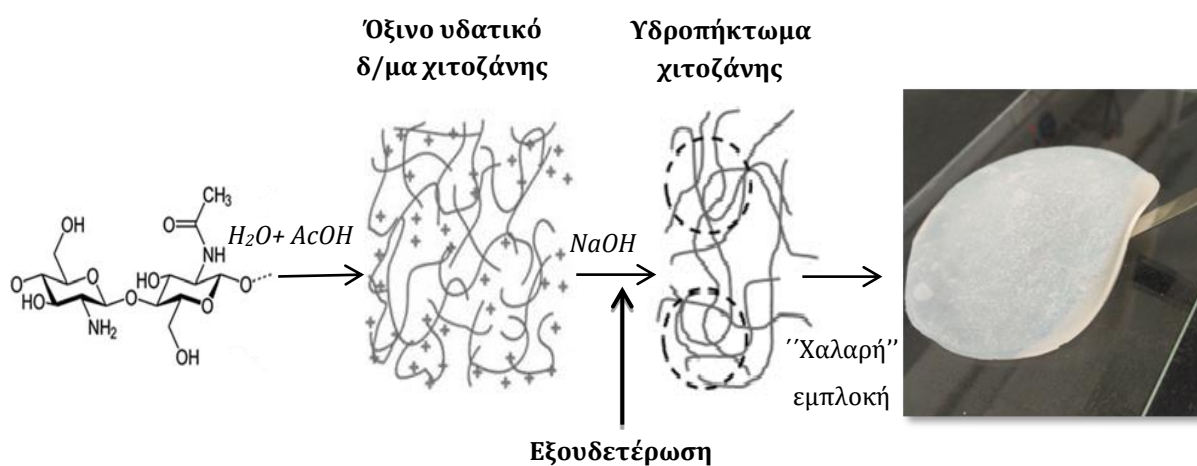
Σε αυτήν την ενότητα περιγράφεται η παρασκευή και η ανάπτυξη της τελικής μεμβράνης (με τα επιθυμητά χαρακτηριστικά), ενώ, με βάση το συγκεκριμένο τρόπο παρασκευής, μελετώνται και προσδιορίζονται οι ιδιότητες της μεμβράνης από υδροπήκτωμα χιτοζάνης.

#### 1. ΠΑΡΑΣΚΕΥΗ ΜΕΜΒΡΑΝΩΝ ΧΙΤΟΖΑΝΗΣ (MMW) ΜΕΣΩ ΤΗΣ ΜΕΘΟΔΟΥ ΖΕΛΑΤΙΝΟΠΟΙΗΣΗΣ

Για το σχηματισμό φυσικών υδροπηκτωμάτων χιτοζάνης μέσω της διαδικασίας ζελατινοποίησης και με τη χρήση παράγοντα εξουδετέρωσης διάλυμα NaOH (χωρίς εξάτμιση του διαλύτη), ακολουθήθηκε η παρακάτω διαδικασία: Ζυγίστηκαν 0,5 και 1g σκόνης χιτοζάνης (για συγκέντρωση 2% και 4% w/v, αντίστοιχα) και διαλύθηκαν σε 25 ml διαλύματος οξικού οξέος (συγκέντρωσης 1% και 2% v/v, αντίστοιχα). Η χιτοζάνη απαιτεί ένα ελαφρώς όξινο περιβάλλον για να μπορέσει να διαλυθεί. Έπειτα, ακολούθησε θέρμανση υπό ανάδευση στους 60°C σε συνθήκες επαναρροής για 5 ώρες για καλύτερη διασπορά της χιτοζάνης στο όξινο μέσο και συνεχίστηκε η ανάδευση σε θερμοκρασία δωματίου για 24 ώρες. Μετά την απομάκρυνση των αδιάλυτων σωματιδίων και ακαθαρσιών, τα διαλύματα τοποθετούνται σε τριβλία (Petri dishes) διαμέτρου 120mm, και αφήνονται να σταθεροποιηθούν σε θερμοκρασία δωματίου για περίπου 5 ημέρες. Για το σχηματισμό των υδροπηκτωμάτων σε μορφή μεμβράνης, τα όξινα διαλύματα χιτοζάνης έρχονται σε επαφή με διάλυμα NaOH 2M για 24 ώρες. Ακολουθούν εκπλύσεις με αποσταγμένο νερό μέχρι να ολοκληρωθεί η απομάκρυνση των όξινων αλάτων, και οι μεμβράνες να αποκτήσουν ουδέτερο pH (pH~7). Τέλος, οι μεμβράνες, αφού τοποθετούνται ανάμεσα σε γυάλινες πλάκες, ξηραίνονται στους 80°C για 4 ώρες και αποθηκεύονται σε αποσταγμένο νερό. Επίσης, παρασκευάστηκαν και όξινες μεμβράνες με την ίδια διαδικασία παρασκευής, αλλά χωρίς το στάδιο της εξουδετέρωσης, για σύγκριση με τις ουδέτερες μεμβράνες.

Η μέθοδος ζελατινοποίησης λαμβάνει χώρα εξαιτίας της εξουδετέρωσης του όξινου διαλύματος χιτοζάνης που οδηγεί στην αποπρωτονίωση των αμινομάδων των

αλυσιδών της. Αυτή η μείωση της πυκνότητας του φορτίου του κατιονικού πολυηλεκτρολύτη χιτοζάνης, η οποία προκαλεί αλλαγή στην απεμπλοκή των αλυσιδών του πολυμερούς, οδηγεί στην ανάπτυξη διαμοριακών αλληλεπιδράσεων (δεσμοί υδρογόνου, υδρόφοβες αλληλεπιδράσεις και κρυσταλλίτες). Επομένως, η κινητική της εξουδετέρωσης, η οποία εξαρτάται από τη φύση του παράγοντα εξουδετέρωσης, είναι πολύ σημαντική για την τελική εμπλοκή των αλυσιδών του υδροπηκτώματος και συνεπώς, επηρεάζει τις μηχανικές, φυσικές και βιολογικές ιδιότητες του (Εικόνα 21) [105].



**Εικόνα 21.** Φυσικοχημική διαδικασία παρασκευής υδροπηκτωμάτων χιτοζάνης μέσω της μεθόδου ζελατινοποίησης.

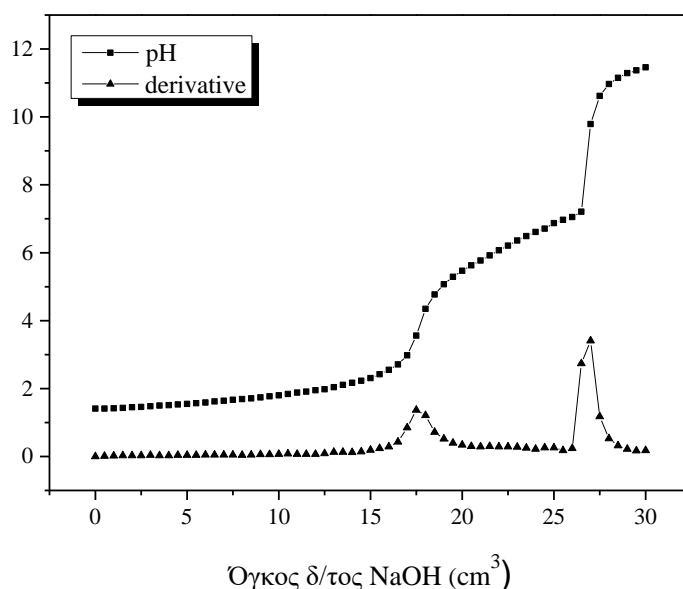
## 2. ΙΔΙΟΤΗΤΕΣ ΜΕΜΒΡΑΝΗΣ ΧΙΤΟΖΑΝΗΣ

### 2.1 Προσδιορισμός βαθμού αποακετυλίωσης

Ο βαθμός αποακετυλίωσης της χιτοζάνης προσδιορίστηκε μέσω της μεθόδου τιτλοδότησης (παράρτημα 2.4). Πρόκειται για μια απλή και με αρκετά μεγάλη ακρίβεια μέθοδο, μέσω της οποίας το διάλυμα της χιτοζάνης τιτλοδοτείται με διάλυμα NaOH 0,1M και προκύπτει μία καμπύλη με δύο σημεία καμπής, όπως φαίνεται στο διάγραμμα της Εικόνα 22. Η διαφορά των όγκων σε αυτά τα δύο σημεία (V1 και V2) αντιστοιχεί στο οξύ που καταναλώθηκε από τις αμινομάδες και επιτρέπει τον υπολογισμό του βαθμού αποακετυλίωσης, σύμφωνα με τη σχέση:

$$DD[\%] = 2.03 \cdot \frac{V_2 - V_1}{m + 0.0042 \cdot (V_2 - V_1)}$$

Ο υπολογισμός της πρώτης παραγώγου βοηθά στον ακριβή προσδιορισμό των V1 και V2. Πραγματοποιήθηκαν μετρήσεις τιτλοδότησης για 4 δείγματα (n=4), από τα οποία προκύπτει ο μέσος όρος του βαθμού αποακετυλίωσης που είναι ίσος με  $DDA = 79,27 \pm 1,96$ .



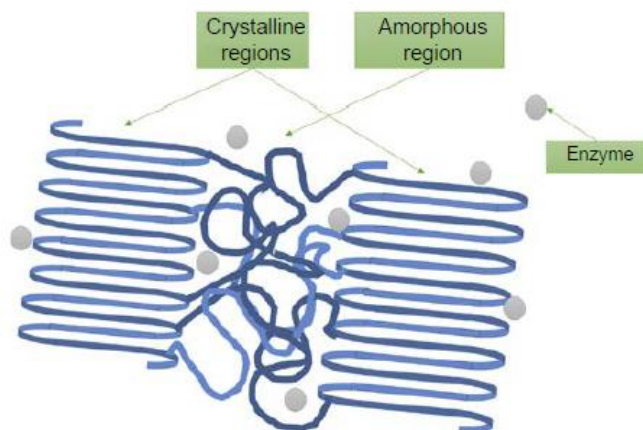
**Εικόνα 22.** Προσδιορισμός του βαθμού αποακετυλίωσης (DD) μέσω τιτλοδότησης του διαλύματος χιτοζάνης.

## 2.2 Δομικός χαρακτηρισμός

Ο δομικός χαρακτηρισμός των μεμβρανών χιτοζάνης πραγματοποιήθηκε μέσω δύο τεχνικών χαρακτηρισμού, τη φασματοσκοπία υπερύθρου (FT-IR) και την περίθλαση ακτίνων X (XRD), με σκοπό την άντληση πληροφοριών για τη μοριακή δομή του υλικού και τον προσδιορισμό της κρυσταλλικής ή άμορφης φύσης του, αντίστοιχα.

### 2.2.1 Ανάλυση με περίθλαση ακτίνων X (XRD)

Η χιτοζάνη είναι ένα ημικρυσταλλικό πολυμερές και η κρυσταλλικότητά του θεωρείται μέγιστη για βαθμό αποακετυλίωσης 100%, ενώ μειώνεται για ενδιάμεσους βαθμούς αποακετυλίωσης. Ο βαθμός αποακετυλίωσης, όπως και το μοριακό βάρος αποτελούν δομικές παραμέτρους που επηρεάζουν άμεσα τις χημικές και βιολογικές ιδιότητες του φυσικού πολυσακχαρίτη της χιτοζάνης, όπως την κρυσταλλικότητα του. Για ενδιάμεσου βαθμού αποακετυλιωμένης χιτοζάνης, η στερεοχημική παρεμπόδιση των ακετυλομάδων στις αλυσίδες της χιτοζάνης παρεμβαίνει στο «πακετάρισμα» των αλυσιδών της. Όταν ο βαθμός αποακετυλίωσης αυξάνεται, τότε η κρυσταλλικότητα της χιτοζάνης αυξάνεται, με αποτέλεσμα το μειωμένο ρυθμό αποικοδόμησής της [106]. Γενικά, ένα κρυσταλλικό πολυμερές έχει καλύτερα «πακεταρισμένες» τις αλυσίδες του σε σχέση με ένα άμορφο (Εικόνα 23), ενώ οι άμορφες περιοχές προσλαμβάνουν μεγαλύτερη ποσότητα νερού, διογκώνονται και θεωρούνται περισσότερο επιρρεπείς στη διείσδυση των ενζύμων άρα και στη συνολική αποικοδόμηση.

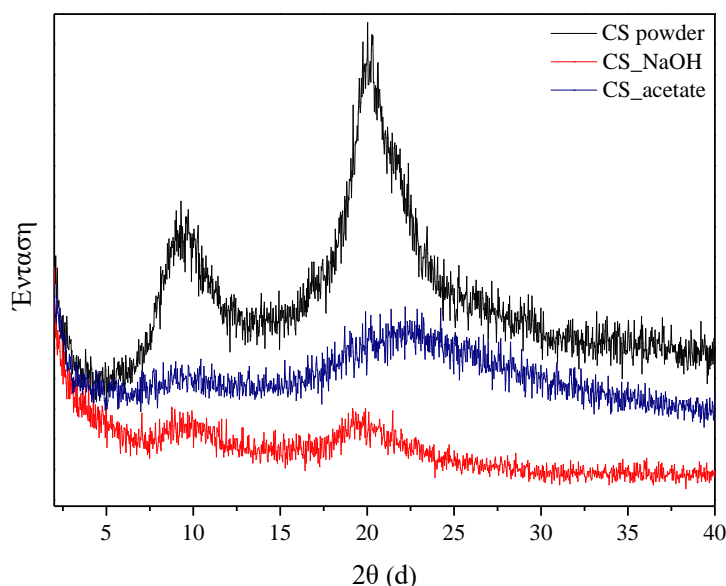


**Εικόνα 23.** Σχηματική αναπαράσταση κρυσταλλικών και άμορφων περιοχών του πολυμερούς, υποδεικνύοντας ένα «ελικοειδές» μονοπάτι για τα ένζυμα ή μόρια νερού, συντελώντας στη μείωση του ρυθμού αποικοδόμησης για τη χιτοζάνη με υψηλή κρυσταλλικότητα.

Ο βαθμός αποακετυλίωσης της χιτοζάνης που χρησιμοποιήθηκε, όπως αναφέρθηκε και στην παράγραφο 2.1, υπολογίστηκε ότι είναι ~80% γι'αυτό και κρίνεται απαραίτητη η διερεύνηση της κρυσταλλικότητάς της που είναι άμεσα συνδεδεμένη με το DDA. Η κρυσταλλική δομή της χιτοζάνης αποτελείται κυρίως από ενδομοριακούς και διαμοριακούς δεσμούς υδρογόνου που αναπτύσσονται μεταξύ των αμινομάδων στη θέση C-2 και των υδροξυλομάδων στη θέση C-3, καθώς και μεταξύ των υδροξυλομάδων στις θέσεις C-6 και C-3 του άνθρακα [107].

Για τον προσδιορισμό της κρυσταλλικής φύσης των δειγμάτων χιτοζάνης που προετοιμάστηκαν (Παράρτημα 2.5) χρησιμοποιήθηκε η τεχνική χαρακτηρισμού περίθλασης ακτίνων Χ. Όπως φαίνεται και στο διάγραμμα περίθλασης (Εικόνα 24), η χιτοζάνη παρουσιάζει δύο κορυφές, οι οποίες σχετίζονται με δύο διαφορετικούς τύπους κρυστάλλων που υπάρχουν στην πολυμερική μήτρα. Η πρώτη κορυφή σε  $2\theta = 9^\circ$  αντιστοιχεί στον κρύσταλλο τύπου I, ο οποίος βρίσκεται σε ρομβική διαμόρφωση (ρομβικό κρυσταλλικό σύστημα), με ακμές της μοναδιαίας κυψελίδας  $a = 7.76 \text{ \AA}$ ,  $b = 10.91 \text{ \AA}$ ,  $c = 10.30 \text{ \AA}$  και γωνία  $\beta = 90^\circ$ . Η δεύτερη κορυφή σε  $2\theta = 20^\circ$  σχετίζεται με τον κρύσταλλο τύπου II, σε ρομβική διαμόρφωση με ακμές της μοναδιαίας κυψελίδας  $a = 4.4 \text{ \AA}$ ,  $b = 10.0 \text{ \AA}$ ,  $c = 10.30 \text{ \AA}$  και γωνία  $\beta = 90^\circ$ . Το μέγεθος της μοναδιαίας κυψελίδας του κρυστάλλου τύπου I είναι μεγαλύτερο από αυτό του κρυστάλλου τύπου II, διότι ο κρύσταλλος τύπου I αποτελείται από δύο δομικές μονάδες κατά μήκος του κύριου άξονα της πολυμερικής αλυσίδας, ενώ ο κρύσταλλος τύπου II έχει μόνο μία δομική μονάδα κατά μήκος του κύριου άξονα [108].

Η διαδικασία εξουδετέρωσης του πολυκατιόντος χιτοζάνης με διάλυμα NaOH επέφερε αλλαγή στη διαμόρφωση της δομής του κρυστάλλου τύπου I της χιτοζάνης. Συγκεκριμένα, όπως φαίνεται στο περιθλασιογράφημα, η μεταβολή της κορυφής  $2\theta=9^\circ$ , η οποία είναι χαρακτηριστική του κρυσταλλικού πολύμορφου («tendon polymorph») της πολυμερικής δομής των μεμβρανών χιτοζάνης [109] και σχετίζεται με τη μορφολογία του κρυστάλλου τύπου I στο πολυμερικό δίκτυο, συνδέεται με την απώλεια των δεσμών υδρογόνου και της αποπρωτονίωσης των αμινομάδων στη δομή της χιτοζάνης μετά τη διαδικασία της εξουδετέρωσης [110]. Αντίθετα, η όξινη μεμβράνη χιτοζάνης δείχνει να έχει μια πιο άμορφη δομή.



**Εικόνα 24.** Περιθλασιογράφημα σκόνης χιτοζάνης, όξινης μεμβράνης και μεμβράνης μετά από εξουδετέρωση με διάλυμα NaOH.

### 2.2.2 Ανάλυση μέσου υπερύθρου (FT-IR)

Ο δομικός χαρακτηρισμός των δειγμάτων ολοκληρώνεται με τη φασματοσκοπία υπερύθρου με μετασχηματισμό Fourier (FTIR), βάσει της οποίας ταυτοποιήθηκαν οι χαρακτηριστικές κορυφές των φασμάτων. Αρχικά, πραγματοποιήθηκε η προετοιμασία των δειγμάτων (Παράρτημα 2.3) και έπειτα οι μετρήσεις και η ανάλυση των φασμάτων απορρόφησης, με τις χαρακτηριστικές κορυφές που

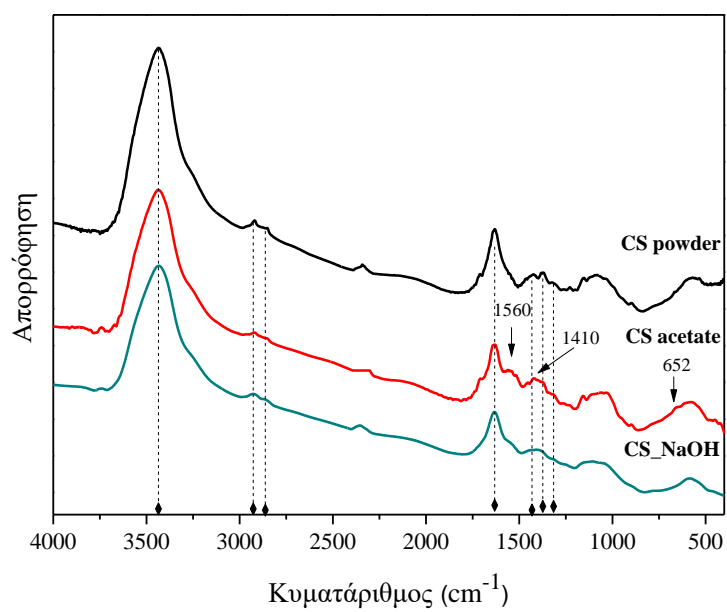
βρίσκονται στις ζώνες απορρόφησης των amide A, amide B, amide I, amide II και amide III.

Το φάσμα για τη σκόνη χιτοζάνης που χρησιμοποιήθηκε για το σχηματισμό της μεμβράνης, δείχνει τις χαρακτηριστικές κορυφές της χιτοζάνης (Εικόνα 25), όπως αναφέρονται και από άλλους συγγραφείς [111, 112]. Οι κύριες χαρακτηριστικές κορυφές (Πίνακας 5) αντιστοιχούν στα  $3437\text{ cm}^{-1}$  σε δονήσεις τάσης  $\text{-NH}$  και  $\text{O-H}$ , και στα  $2920\text{ cm}^{-1}$  και  $2875\text{ cm}^{-1}$  σε ασύμμετρες και συμμετρικές δονήσεις τάσης  $\text{-CH}_2$ , αντίστοιχα, που οφείλονται στο δακτύλιο της πυρανόζης. Επίσης, η κορυφή της ζώνης amide I στα  $1631\text{ cm}^{-1}$  αντιστοιχεί σε δόνηση τάσης  $\text{-C=O}$ . Στη ζώνη amide II παρατηρείται μια κορυφή στα  $1425\text{ cm}^{-1}$  που αντιστοιχεί σε δόνηση κάμψης  $\text{-CH}_2$  και μια δεύτερη κορυφή που αντιστοιχεί στη συμμετρική δόνηση κάμψης  $\text{-CH}_3$  στα  $1375\text{ cm}^{-1}$ , ενώ στα  $1317\text{ cm}^{-1}$  αντιστοιχούν δονήσεις κάμψης  $\text{-NH}$  (Amide III) και δονήσεις κάμψης  $\text{-CH}_2$ . Τέλος, από τα  $1260\text{-}800\text{ cm}^{-1}$  περιλαμβάνονται κορυφές που οφείλονται σε δονήσεις τάσης  $\text{C-O-C}$  του γλυκοζιδικού δεσμού στην κύρια αλυσίδα της χιτοζάνης.

Στο φάσμα απορρόφησης για την όξινη μεμβράνη χιτοζάνης διακρίνονται δύο χαρακτηριστικές κορυφές στα  $1560$  και  $1410\text{ cm}^{-1}$ , εξαιτίας των δονήσεων κάμψης  $\text{N-H}$  και των δονήσεων των ιόντων της καρβοξυλομάδας  $\text{COO}^-$  του οξέος [112, 113]. Επίσης, εντοπίζεται και μία μικρή κορυφή στα  $652\text{ cm}^{-1}$ , η οποία αντιστοιχεί στις δονήσεις κάμψης  $\text{O-C-O}$  του οξικού οξέος [112, 114].

Το φάσμα απορρόφησης της μεμβράνης χιτοζάνης μετά την εξουδετέρωση ( $\text{CS\_NaOH}$ ) παρουσιάζει τις ίδιες κορυφές με το φάσμα απορρόφησης της σκόνης, αποδεικνύοντας την απομάκρυνση των όξινων ομάδων. Επίσης, παρατηρείται μία μικρή μετατόπιση των κορυφών, λόγω της αποπρωτονίωσης των αμινομάδων όταν έρχονται σε επαφή με το διάλυμα  $\text{NaOH}$ . Αυτή η αποπρωτονίωση μειώνει το «κέλυφος ενυδάτωσης» (hydration shell) των αμινομάδων και επιτρέπει το σχηματισμό δεσμών υδρογόνου μεταξύ των αλυσιδών χιτοζάνης [115].





**Εικόνα 25.** Φάσματα FT-IR σκόνης χιτοζάνης, όξινης μεμβράνης και μεμβράνης μετά από εξουδετέρωση.

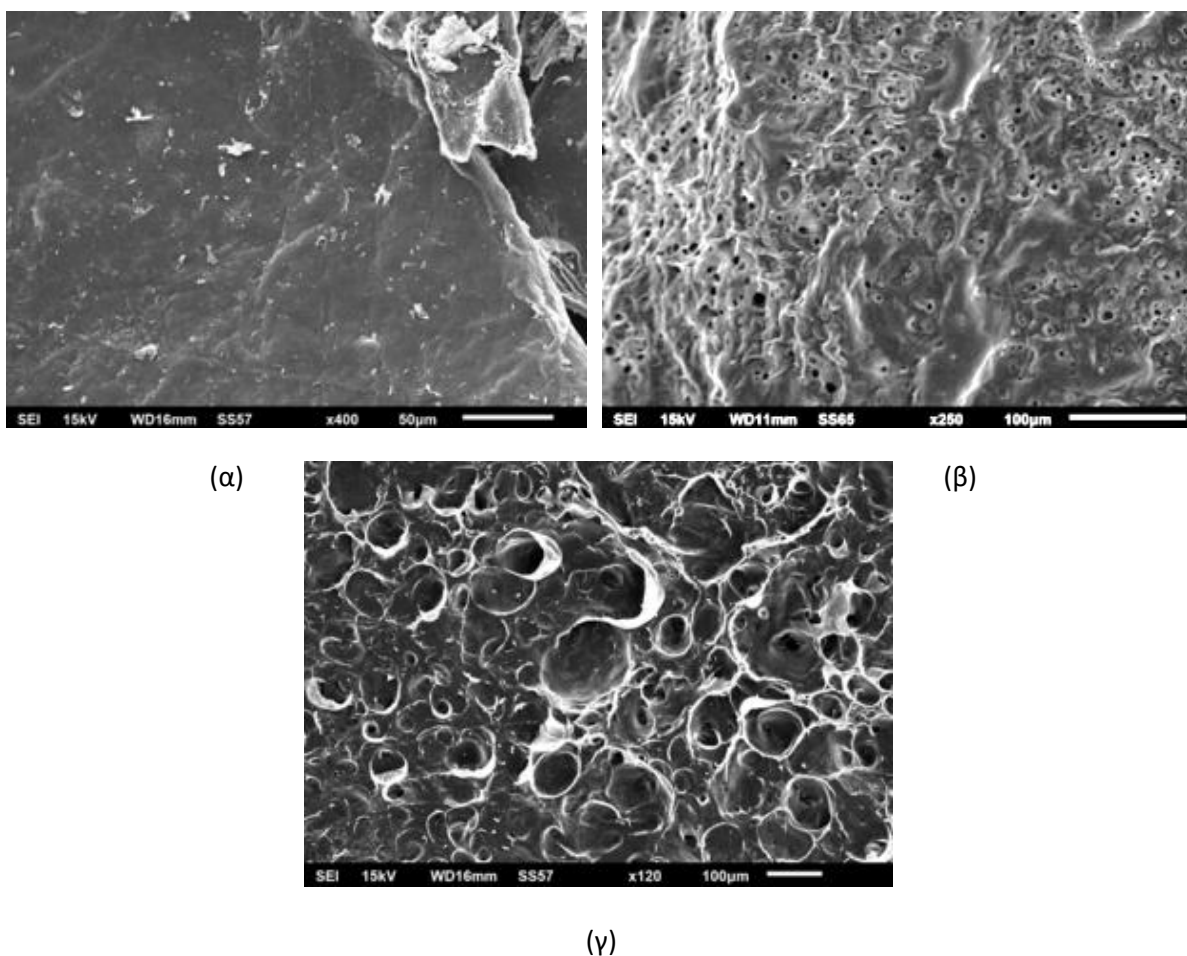
**Πίνακας 5.** Χαρακτηριστικές κορυφές και τύποι δονήσεων των φασμάτων σκόνης χιτοζάνης και μεμβράνης, μετά από εξουδετέρωση.

<b>CS powder</b>	<b>CS_NaOH</b>	<b>Τύποι δονήσεων</b>
<b>Κυματάριθμος (cm<sup>-1</sup>)</b>	<b>Κυματάριθμος (cm<sup>-1</sup>)</b>	
3437	3437	δόνηση τάσης -NH δόνηση τάσης O-H
2920	2928	δόνηση τάσης -CH <sub>2</sub>
2875	2877	(ασύμμετρη) δόνηση τάσης -CH <sub>2</sub> (συμμετρική)
1631	1633	δόνηση τάσης -C=O (Amide I)
1425	1438	δόνηση κάμψης -CH <sub>2</sub> (Amide II)
1375	1390	δόνηση κάμψης -CH <sub>3</sub> (Amide II)
1317	1324	δόνηση τάσης -C-N (Amide III) δόνηση κάμψης -CH <sub>2</sub>
1260-800	1260-800	δόνηση τάσης C-O-C του γλυκοζιδικού δεσμού

### 2.3 Μορφολογικός χαρακτηρισμός και πορώδες

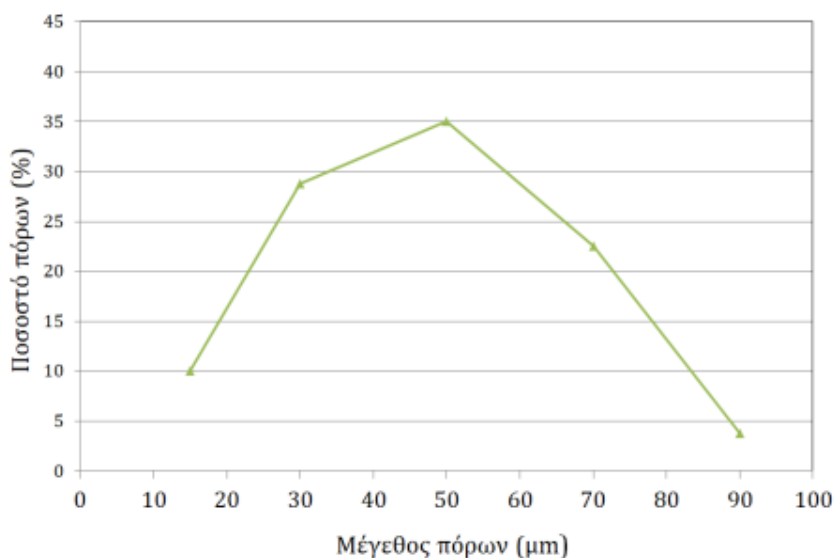
Για τον προσδιορισμό της μορφολογίας και της μικροδομής των μεμβρανών της χιτοζάνης πραγματοποιήθηκε ηλεκτρονική μικροσκοπία σάρωσης (SEM). Η προετοιμασία των δειγμάτων και οι συνθήκες που εφαρμόστηκαν αναφέρονται αναλυτικά στο Παράρτημα 2.6.

Παρατηρήθηκαν οι μικροδομές των διαφορετικών σταδίων προετοιμασίας των μεμβρανών χιτοζάνης (Εικόνα 26). Παρατηρείται η εμφάνιση πορώδους δομής μετά την επεξεργασία της σκόνης χιτοζάνης προς σχηματισμό των μεμβρανών, δηλαδή στην όξινη και στην τελική μεμβράνη μετά την εξουδετέρωση. Το μέγεθος των πόρων αυξάνεται ακόμη περισσότερο στην τελική μεμβράνη, κάτι το οποίο είναι αναμενόμενο, εξαιτίας του τρόπου παρασκευής της και του σχηματισμού 3D δικτύου μακροπορώδους δομής, κατά τη διάρκεια της ζελατινοποίησης [116].



**Εικόνα 26.** Μικροδομές δειγμάτων (α) σκόνης χιτοζάνης, (β) όξινης μεμβράνης και (γ) μεμβράνης μετά από εξουδετέρωση.

Εξίσου ενδιαφέρον παρουσιάζει και η κατανομή μεγέθους των πόρων της μεμβράνης, η οποία εξετάστηκε προσεγγιστικά στο ηλεκτρονικό μικροσκόπιο, μέσω του υπολογισμού της διαμέτρου των πόρων. Το διάγραμμα της Εικόνα 27 δείχνει ότι η κατανομή των πόρων κυμαίνεται από 15-90 μm, ενώ το μεγαλύτερο ποσοστό των πόρων, δηλαδή το 35% αντιστοιχεί σε πόρους μεγέθους 50 μm. Το 10% των πόρων είναι μεγέθους 15 μm, το 30% αντιστοιχεί σε μέγεθος πόρων 30 μm, το 23% αφορά μέγεθος πόρων 70 μm και το μικρότερο ποσοστό των πόρων (<5%) έχει μέγεθος 90 μm.



**Εικόνα 27.** Διάγραμμα κατανομής μεγέθους πόρων λυοφιλοποιημένης μεμβράνης χιτοζάνης.

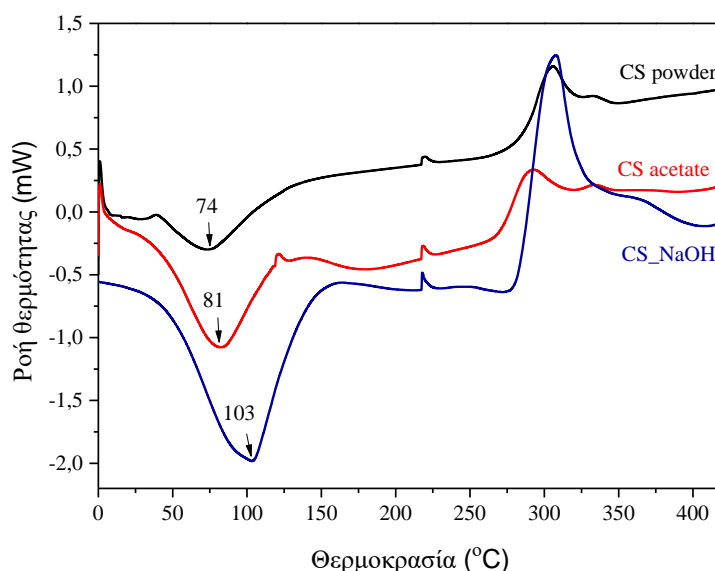
#### 2.4 Θερμική ανάλυση

Για τον προσδιορισμό των θερμικών φαινομένων που λαμβάνουν χώρα σε ένα ορισμένο εύρος θερμοκρασιών, μελετήθηκε η συμπεριφορά των δειγμάτων χιτοζάνης ως συνάρτηση της θερμοκρασίας μέσω της διαφορικής θερμιδομετρίας σάρωσης (DSC). Η προετοιμασία των δειγμάτων και οι συνθήκες μέτρησης που εφαμόστηκαν αναφέρονται αναλυτικά στο Παράρτημα 2.7.

Στο θερμογράφημα της Εικόνα 28 παρατηρούνται ενδόθερμες και εξώθερμες μεταπτώσεις για τη σκόνη χιτοζάνης, την όξινη μεμβράνη και τη μεμβράνη μετά την εξουδετέρωση, κυρίως στο θερμοκρασιακό εύρος των 50-320°C. Το πρώτο θερμικό φαινόμενο που λαμβάνει χώρα αντιστοιχεί σε ενδόθερμες μεταβολές των δειγμάτων. Η σκόνη χιτοζάνης εμφανίζει μία ευρεία ενδόθερμη κορυφή στους 50-150°C, λόγω της απώλειας νερού [117]. Η ενδόθερμη κορυφή που εμφανίζει η μεμβράνη CS\_NaOH στους 103 °C οφείλεται στη θερμική διάσπαση του πολυμερικού δικτύου της χιτοζάνης [118, 119]. Παρατηρείται ότι η μεμβράνη μετά την εξουδετέρωση έχει μεγαλύτερη ενέργεια διάσπασης σε σχέση με την όξινη μεμβράνη. Αυτό δείχνει το σχηματισμό πιο σταθερών μεμβρανών, εξαιτίας της αποπρωτονίωσης των αμινομάδων στην πολυμερική δομή της χιτοζάνης, μετά τη διαδικασία εξουδετέρωσης [108]. Το δεύτερο θερμικό φαινόμενο, το οποίο αντιστοιχεί σε εξώθερμη κορυφή στους ~300°C, αφορά στην αποσύνθεση της μεμβράνης και

οφείλεται σε μια πολύπλοκη διαδικασία που περιλαμβάνει την αφυδάτωση των δακτυλίων του πολυσακχαρίτη και την αποσύνθεση των ακετυλιωμένων και αποακετυλιωμένων δομικών μονάδων της χιτοζάνης [120, 121].

Τα αποτελέσματα της θερμικής ανάλυσης υποδηλώνουν ότι η θερμοκρασία θέρμανσης επηρεάζει σε σημαντικό βαθμό τη δομή των μεμβρανών, εξαιτίας των μη ομοιοπολικών δεσμών που αναπτύσσονται στο πολυμερικό της δίκτυο και καταρρέουν με τη θέρμανση, ενώ δεν παρατηρείται κάποιο θερμικό φαινόμενο στους 37°C, δηλαδή σε φυσιολογικές συνθήκες του οργανισμού.



**Εικόνα 28.** Θερμογράφημα της σκόνης χιτοζάνης, όξινης μεμβράνης και μεμβράνης μετά από εξουδετέρωση με διάλυμα NaOH, στο θερμοκρασιακό εύρος 0-400°C.

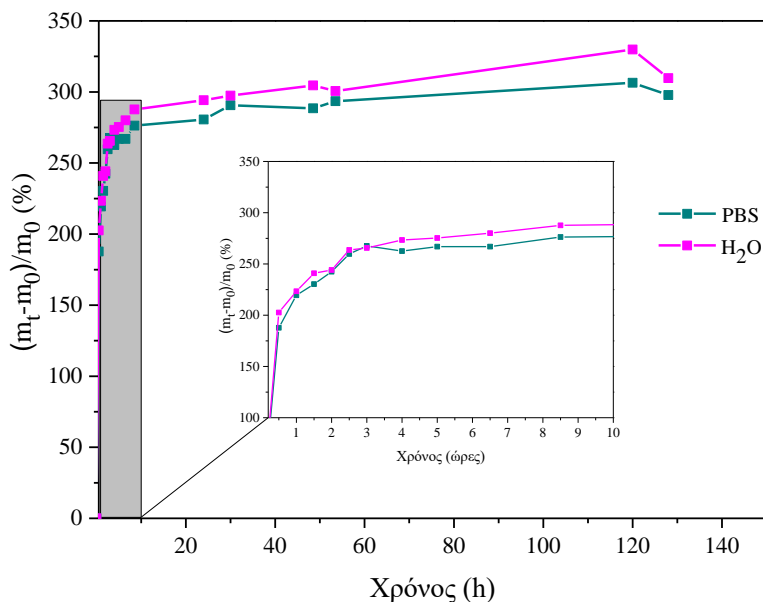
## 2.5 Μελέτη χαρακτηριστικών ρόφησης στους 37°C

Πολύ σημαντική θεωρείται η μελέτη της συμπεριφοράς των μεμβρανών κατά τη διαδικασία ρόφησης/ εκρόφησης για τον έλεγχο της σταθερότητάς τους σε υγρό περιβάλλον. Τα βιοϋλικά που χρησιμοποιούνται για εφαρμογές στο μυοκάρδιο υπόκεινται σε σταδιακή φθορά λόγω των συνθηκών στη θωρακική κοιλότητα, όπως η ρόφηση νερού (water sorption) από το περικαρδιακά υγρά, με αποτέλεσμα την υποβάθμιση των μηχανικών και φυσικών τους ιδιοτήτων. Η προετοιμασία των δειγμάτων για τη μελέτη της ρόφησης αναφέρεται λεπτομερώς στο Παράρτημα 2.8.

Η αύξηση του βάρους των δειγμάτων κατά τη ρόφηση του νερού ή του υδατικού διαλύματος PBS παριστάνεται γραφικά στην Εικόνα 29. Τα αποτελέσματα της ρόφησης έδειξαν παρόμοια συμπεριφορά των μεμβρανών χιτοζάνης σε αποσταγμένο νερό και διάλυμα PBS (pH=7,4). Επίσης, φαίνεται η άμεση σχέση μεταξύ διόγκωσης και αποικοδόμησης. Συγκεκριμένα, και στις δύο περιπτώσεις παρατηρείται αυξημένη πρόσληψη υγρού κατά τη διάρκεια των πρώτων 3 ωρών μετά την εμβάπτιση των μεμβρανών, έπειτα το σύστημα τείνει να σταθεροποιηθεί, φτάνοντας στην ισορροπία στο χρονικό διάστημα των 2 ημερών (αύξηση βάρους 300%) και όταν η διόγκωση γίνει μέγιστη (>120 ώρες), παρατηρείται απώλεια μάζας, η οποία αποδίδεται στην αποικοδόμηση της μεμβράνης.

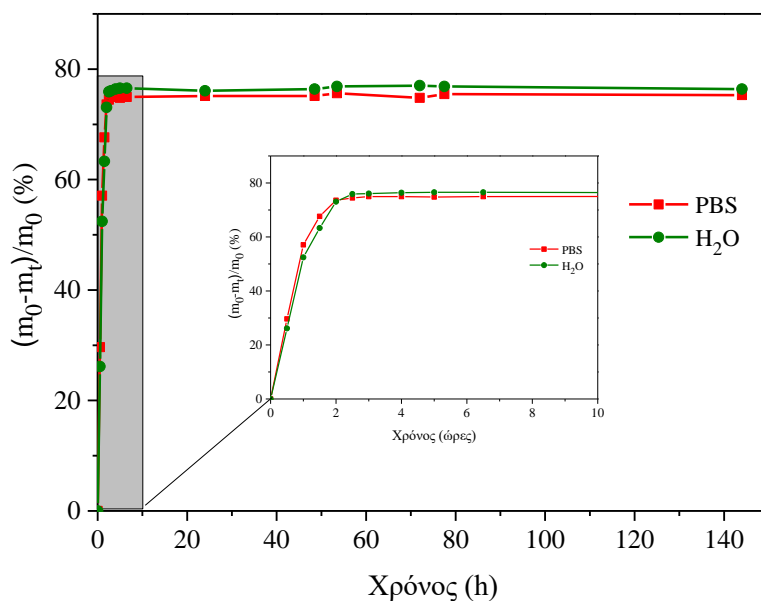
Αυτά τα αποτελέσματα συμφωνούν με τη βιβλιογραφία. Σύμφωνα με τους Silva κ.συν. [122], η αυξημένη πρόσληψη υγρού οφείλεται στη μεγάλη πυκνότητα φορτίου, η οποία αυξάνει τη διαφορά στην ωσμωτική πίεση μεταξύ του δικτύου της μεμβράνης και του υδατικού μέσου, οδηγώντας στη διόγκωση του δείγματος. Η ικανότητα διόγκωσης της χιτοζάνης είναι άμεσα συνδεδεμένη με τις υδρόφιλες ομάδες (υδροξυλομάδες, αμινομάδες) και την παρουσία των πολικών ομάδων στη δομή της, οι οποίες επιτρέπουν μεγαλύτερη αλληλεπίδραση με το μέσον που έρχονται σε επαφή, οδηγώντας στο σχηματισμό δεσμών υδρογόνου με τα μόρια του νερού [123, 124]. Σύμφωνα με τους Llanos κ.συν. [102], η διόγκωση των μεμβρανών μετά από εξουδετέρωση μελετάται σε δύο στάδια. Αρχικά παρατηρείται διόγκωση των μεμβρανών εξαιτίας της πρόσληψης υγρού κατά τη διάρκεια των 3 πρώτων ωρών, έπειτα το σύστημα τείνει να σταθεροποιηθεί και ακολουθεί η μείωση της διόγκωσης, εξαιτίας της απώλειας βάρους, κατά τη διάρκεια σταθεροποίησης των μεμβρανών στο διάλυμα. Αυτό το φαινόμενο αποδίδεται τόσο στο pH του διαλύματος που μελετάται η ρόφηση, όσο και στη συγκέντρωση και τον τύπο του διαλύματος εξουδετέρωσης, που χρησιμοποιείται. Οι μεμβράνες χιτοζάνης μετά την εξουδετέρωσή τους με διάλυμα NaOH (συγκέντρωσης >5M) επιδεικνύουν μεγαλύτερη σταθερότητα κατά τη διαδικασία ρόφησης. Επίσης, η ερευνητική ομάδα των Ren κ.συν. [106], έδειξε πως όταν η διόγκωση γίνει μέγιστη, παρατηρείται απώλεια μάζας που οφείλεται στην αποικοδόμηση της μεμβράνης και μείωση του πάχους της και του βαθμού ρόφησης στο χρονικό διάστημα των 7 ημερών. Η σχέση ρόφησης-αποικοδόμησης εξαρτάται από τις διαστάσεις των δειγμάτων της

μεμβράνης που μελετώνται, όπως και οι διαφορετικοί βαθμοί αποακετυλίωσης της χιτοζάνης οδηγούν σε διαφορετική συμπεριφορά των μεμβρανών κατά τη ρόφηση και την αποικοδόμηση.



**Εικόνα 29.** Διάγραμμα ρόφησης της μεμβράνης μετά την εμβάπτιση της σε διάλυμα PBS (pH=7,4) και αποσταγμένο νερό, στους 37±1 °C για 144 h.

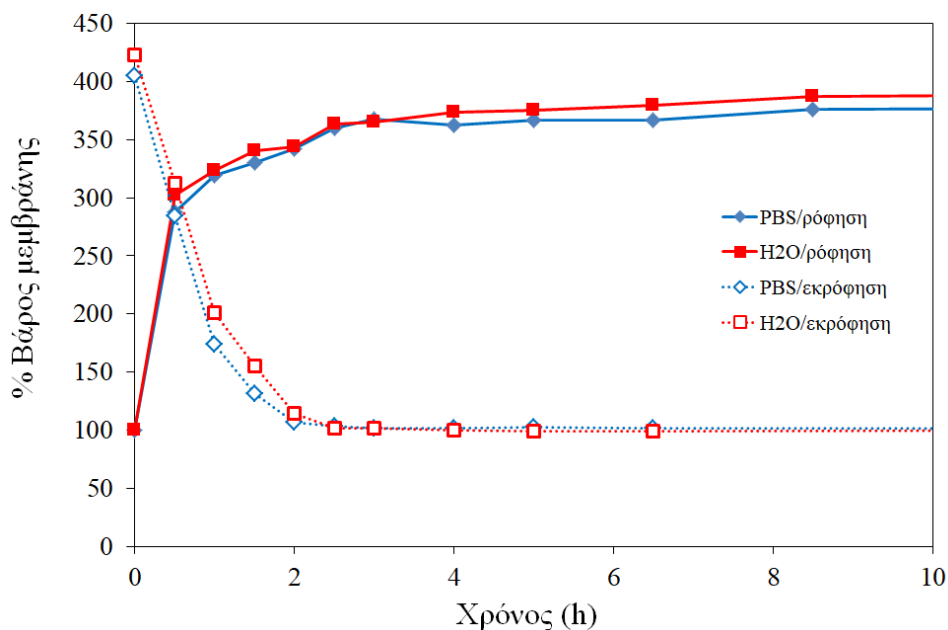
Τα αποτελέσματα της εκρόφησης, όπως φαίνονται στο διάγραμμα στην Εικόνα 30, έδειξαν ότι η μεγαλύτερη ποσότητα υγρού εκροφάται από τη μεμβράνη τις πρώτες 2 ώρες μετά την απομάκρυνση της από το υγρό περιβάλλον και στη συνέχεια το σύστημα ισορροπεί και σταθεροποιείται μέχρι το πέρας των 6 ημερών (144 h). Η μελέτη της εκρόφησης έδειξε παρόμοια συμπεριφορά των μεμβρανών χιτοζάνης σε αποσταγμένο νερό και διάλυμα PBS (pH=7,4), χωρίς σημαντικές διαφορές.



**Εικόνα 30.** Διάγραμμα εκρόφησης της μεμβράνης, μετά την απομάκρυνση της από διάλυμα PBS ( $\text{pH}=7,4$ ) και αποσταγμένο νερό, στους  $37\pm 1$  °C για το χρονικό διάστημα των 144 h.

Στην Εικόνα 31 παρουσιάζεται η μεταβολή του ποσοστού του βάρους της μεμβράνης στο χρονικό διάστημα των 10 ωρών, σε συνθήκες ρόφησης και εκρόφησης, παρουσία διαλύματος φωσφορικών και νερού. Και στις δύο περιπτώσεις των υδατικών μέσων που εμβαπτίζεται η μεμβράνη, δεν παρουσιάζονται ιδιαίτερες διαφορές που σημαίνει ότι το μέσον εμβάπτισης έχει την ίδια αλληλεπίδραση στη χιτοζάνη. Επίσης, αξίζει να σημειωθεί ότι το ποσοστό του διαλύματος που ροφάται δεν διαφέρει από το ποσοστό του διαλύματος που εκροφάται, επιβεβαιώνοντας την καλή και αντιστρεπτή συμπεριφορά διόγκωσης της χιτοζάνης σε υγρό περιβάλλον. Τέλος, ένας δεύτερος κύκλος ρόφησης-εκρόφησης καταγράφηκε για 24 ώρες, όπου η ποσότητα ροφημένου-εκροφημένου υγρού στο δεύτερο κύκλο ήταν λιγότερη από τον πρώτο, αναδεικνύοντας τη μεγάλη υδροφιλικότητα των μεμβρανών, αλλά και τη σταθερότητά τους για ορισμένη χρονική περίοδο σε υγρό περιβάλλον.





**Εικόνα 31.** Συγκριτικά διαγράμματα μεταβολής βάρους της μεμβράνης σε διάλυμα PBS ( $pH=7,4$ ) και σε αποσταγμένο νερό, κατά τη διάρκεια ρόφησης και εκρόφησης ( $37\pm 1$  °C, 10 h).

Συμπερασματικά, η πρόσληψη νερού είναι ιδιαίτερα σημαντική στην ιστική μηχανική και στα συστήματα χορήγησης φαρμάκων, δεδομένου ότι επηρεάζει παραμέτρους, όπως ο ρυθμός βιοαποικοδόμησης και επιτρέπει τη διάχυση και ανταλλαγή των θρεπτικών ουσιών μέσω του εμφυτεύματος. Οι μεμβράνες χιτοζάνης, απορροφώντας επαρκή ποσότητα υγρού, αποκτούν ιδιότητες παρόμοιες με του ζωντανού ιστού, όσον αφορά στη σταθερότητα σε φυσιολογικές συνθήκες, τη χαμηλή επιφανειακή τάση και τη διαπερατότητα, επηρεάζεται, όμως, η μηχανική τους απόδοση λόγω του υγρού περιβάλλοντος, οδηγώντας στην υποβάθμιση των μηχανικών ιδιοτήτων [125]. Αυτό μελετήθηκε αναλυτικά στην επόμενη παράγραφο.

## 2.6 Μελέτη Μηχανικών Ιδιοτήτων

Τα βιοϋλικά που αναπτύσσονται για χρήση σε εφαρμογές ιστομηχανικής μυοκαρδίου θα πρέπει να πληρούν συγκεκριμένες προϋποθέσεις όσον αφορά στην φυσική τους απόκριση, όταν έρχονται σε επαφή με τον καρδιακό μυ. Οι προϋποθέσεις αυτές σχετίζονται, κατά κύριο λόγο, (α) με την επιβολή των τάσεων που δέχονται από τη συνεχόμενη και παλλόμενη κίνηση του μυοκαρδίου και (β) όπως αναφέρθηκε και προηγουμένως, με τη διόγκωσή τους παρουσία υγρού περιβάλλοντος, το οποίο υποβιβάζει τις μηχανικές τους ιδιότητες. Επομένως, οι

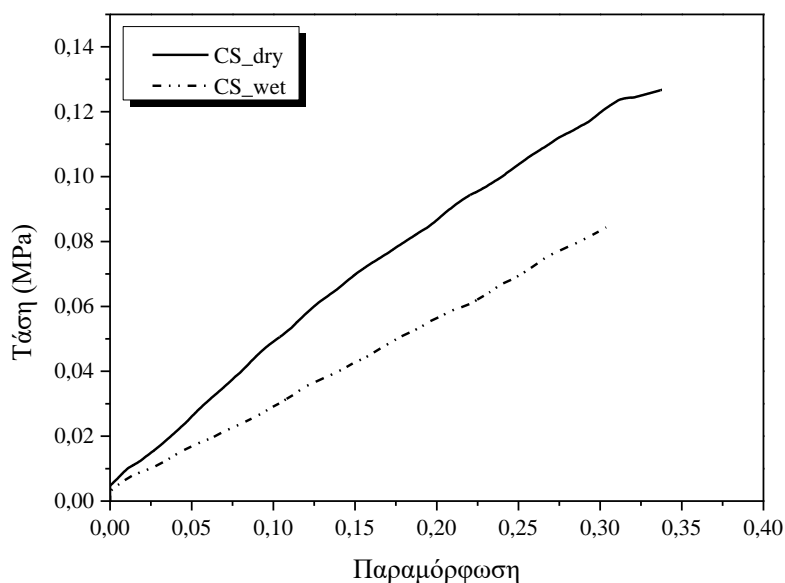
μηχανικές ιδιότητες, οι οποίες θα πρέπει να μιμούνται αυτές του φυσικού ιστού [126], είναι σημαντικές για την κατανόηση και την πρόβλεψη της συμπεριφοράς ενός υλικού κάτω από την επίδραση μιας εξωτερικής δύναμης, τόσο σε ξηρό όσο και σε υδατικό περιβάλλον, βοηθώντας στην επιλογή του καταλληλότερου βιοϋλικού. Από τις πιο βασικές ιδιότητες είναι η αντοχή (strength) του υλικού, δηλαδή η ικανότητά του να αντιστέκεται στα εξωτερικά φορτία χωρίς να οδηγείται σε θραύση, και το μέτρο ελαστικότητας (elastic modulus), δηλαδή το μέτρο αντίστασης του υλικού υπό την επίδραση μιας δύναμης. Στην ιστομηχανική μυοκαρδίου, ο τύπος φορτίου που παρουσιάζει ιδιαίτερο ενδιαφέρον τόσο για τον προσδιορισμό των χαρακτηριστικών των βιοϋλικών όσο και για τις ιδιότητες του ιστού είναι η αντοχή στον εφελκυσμό. Πέρα όμως από τις στατικές δοκιμές, δεδομένου ότι αναφερόμαστε σε πολυμερή υλικά, η Δυναμική Μηχανική Ανάλυση (DMA) είναι η πλέον κατάλληλη μέθοδος για τη μελέτη ιξωδοελαστικών και ελαστομερών υλικών, λαμβάνοντας υπόψιν ότι μπορεί να καθοριστεί τόσο η ελαστική όσο και η ιξώδης συμπεριφορά του δείγματος κατά τη διάρκεια ενός πειράματος [127].

#### 2.6.1 Μελέτη της συμπεριφοράς στον εφελκυσμό

Οι δοκιμές εφελκυσμού πραγματοποιήθηκαν σε ξηρό περιβάλλον σε θερμοκρασία δωματίου και σε υδατικό περιβάλλον διαλύματος PBS (pH=7,4) στους 37°C. Οι συνθήκες που χρησιμοποιήθηκαν για τη μέτρηση και η προετοιμασία των δοκιμίων αναφέρονται στο Παράρτημα 2.9. Η μηχανική απόκριση των φυσικά σχηματιζόμενων υδροπηκτωμάτων χιτοζάνης (πάχους ~1mm), τόσο σε ξηρό όσο και σε υδατικό περιβάλλον, ανέδειξε την ελαστομερική συμπεριφορά του υλικού, με μεγάλες τιμές παραμόρφωσης και συνεχόμενη αύξηση της τάσης με την αύξηση της παραμόρφωσης, όπως φαίνεται και στο διάγραμμα τάσης - παραμόρφωσης (σ-ε) (Εικόνα 32) [79]. Οι μηχανικές ιδιότητες, δηλαδή, η αντοχή σε εφελκυσμό ( $\sigma$ ) (μέγιστη τάση που μπορεί να υποστεί η μεμβράνη, σε MPa), καθώς και το φορτίο (L) (μέγιστο φορτίο που ασκείται στη μεμβράνη, σε N), η επιμήκυνση κατά τη θραύση ( $\epsilon_{max}$ ) (μέγιστη παραμόρφωση της μεμβράνης πριν τη θραύση, σε %) και το μέτρο ελαστικότητας E (μέτρο δυσκαμψίας της μεμβράνης, σε MPa), που θεωρούνται βασικές παράμετροι για τη μηχανική απόκριση των μεμβρανών χιτοζάνης, συνοψίζονται στον Πίνακα 6.

Το μέτρο ελαστικότητας της μεμβράνης σε ξηρό περιβάλλον κυμαίνεται μεταξύ 0,37-0,5 MPa και παρουσία διαλύματος PBS κυμαίνεται μεταξύ 0,18-0,36 MPa. Όπως είναι αναμενόμενο, παρουσία υγρού περιβάλλοντος, υπάρχει μείωση των τιμών όλων των μηχανικών ιδιοτήτων, ενώ αξιοσημείωτη είναι και η μείωση της μέγιστης αντοχής σε ποσοστό μεγαλύτερο του 50% σε σχέση με την αντοχή της μεμβράνης σε ξηρό περιβάλλον (Πίνακας 6).

Η ικανότητα της αντοχής σε εφελκυσμό είναι άρρηκτα συνδεδεμένη με τις δυνάμεις συνοχής στην πολυμερική μήτρα, εξαιτίας των διαμοριακών αλληλεπιδράσεων, και επηρεάζεται τόσο από τη συγκέντρωση όσο και από τον τύπο του βασικού διαλύματος που χρησιμοποιείται στη διαδικασία εξουδετέρωσης [102]. Συμπερασματικά, το επιθυμητό μέτρο ελαστικότητας, το οποίο θα πρέπει να κυμαίνεται από μερικές δεκάδες kPa μέχρι και 1MPa [128], που να προσεγγίζει δηλαδή αυτό του μυοκαρδίου, επιτεύχθηκε με την παρασκευή μεμβράνης χιτοζάνης μέσω της συγκεκριμένης μεθόδου ζελατινοποίησης και τη χρήση διαλύματος NaOH.



**Εικόνα 32.** Διάγραμμα τάσης- παραμόρφωσης μεμβράνης χιτοζάνης σε ξηρό (*dry*) και υγρό (*wet*) περιβάλλον (διάλυμα PBS, 37°C) ( $n=5$ ).

**Πίνακας 6.** Μέσες τιμές και τυπική απόκλιση μηχανικών ιδιοτήτων μεμβρανών χιτοζάνης σε ξηρό και υγρό περιβάλλον (διάλυμα PBS, 37°C).

Αντοχή σε εφελκυσμό					
CS_NaOH μεμβράνες	Μέγιστο φορτίο, $L_{max}$ (N)	Πάχος (mm)	Μέγιστη αντοχή, $\sigma_{max}$ (MPa)	Μέγιστη παραμόρφωση, $\epsilon_{max}^*$ (%)	Μέτρο Young, E (MPa)
Ξηρό	0,38±0,09	0,82±0,11*	0,13±0,03	35±4*	0,41±0,05
PBS	0,13±0,03	0,94±0,06*	0,04±0,01	34,7±3,4*	0,29±0,06

\* Δεν υπάρχει σημαντική διαφορά μεταξύ των τιμών ( $p \leq 0,05$ ).

### Σύγκριση με τις μηχανικές ιδιότητες του καρδιακού ιστού

Τα αποτελέσματα, όπως περιγράφονται παραπάνω, έδειξαν ότι το υδροπήκτωμα χιτοζάνης σε μορφή μεμβράνης, το οποίο παρασκευάστηκε με τη μέθοδο ζελατινοποίησης και τη χρήση διαλύματος εξουδετέρωσης NaOH, μπορεί να χρησιμοποιηθεί ως επικαρδιακό εμφύτευμα, όσον αφορά στην παράμετρο της δυσκαμψίας. Τα βιοϋλικά που χρησιμοποιούνται ως ικρίωματα στην ιστομηχανική μυοκαρδίου είναι απαραίτητο να αναπτύσσουν την κατάλληλη ενδοτικότητα και ταυτόχρονα να μπορούν να ανταπεξέλθουν στα διαστολικά φορτία που τους ασκούνται. Ιδανικά, η ενδοτικότητα (compliance) του ικρίωματος (που ορίζεται ως  $1/E$ , όπου E είναι το μέτρο δυσκαμψίας) θα πρέπει να είναι η ίδια με αυτή του κολλαγόνου του μυοκαρδίου.

Στον Πίνακα 7 συνοψίζονται οι πιο σημαντικές μηχανικές ιδιότητες (μέτρο δυσκαμψίας και αντοχή σε εφελκυσμό) του καρδιακού τοιχώματος επίμου και ανθρώπου, καθώς και των πιθανών βιοϋλικών για χρήση στο μυοκάρδιο.

**Πίνακας 7.** Πιθανά ή υπό εξέταση βιοϋλικά που έχουν χρησιμοποιηθεί στην μηχανική ιστών μυοκαρδίου.

<b>Βιοϋλικά</b>	<b>Μέτρο ελαστικότητας</b>	<b>Αντοχή σε εφελκυσμό</b>	<b>Αποικοδόμηση (μήνες)</b>	<b>Βιβλιογραφικές αναφορές</b>
<b>PGA*</b>	7–10GPa	70MPa	2–12	[129],[130]
<b>PLLA*</b>	1–4GPa	30–80MPa	2–12	[129]
<b>PHB*</b>	2–3GPa	36MPa	Αποικοδομήσιμο	[131]
<b>TMC*</b>	6MPa	12MPa	Αποικοδομήσιμο	[132]
<b>PPD*</b>	0,6GPa	12MPa	6	[130],[133]
<b>PGS*</b>	0,04–1,2MPa	0,2–0,5MPa	Αποικοδομήσιμο	[134],[135],[56]
<b>Chitosan</b>	0,4MPa	0,13MPa	Αποικοδομήσιμο	[79],[106],[136]
<b>Alginate</b>	2 GPa	63 MPa	1	[137],[138],[139]
<b>Collagen fiber</b>	2–46MPa	1–7MPa	Αποικοδομήσιμο	[130],[140]
<b>Collagen gel (calf skin)</b>	0,002–0.022MPa	1–9MPa	Αποικοδομήσιμο	[141]
<b>Μυοκάρδιο επίμυ</b>	0,001–0,14MPa	30–70 kPa		[142],[143]
<b>Μυοκάρδιο Ανθρώπου</b>	0,02–0,5MPa	3–15 kPa		[144],[145]

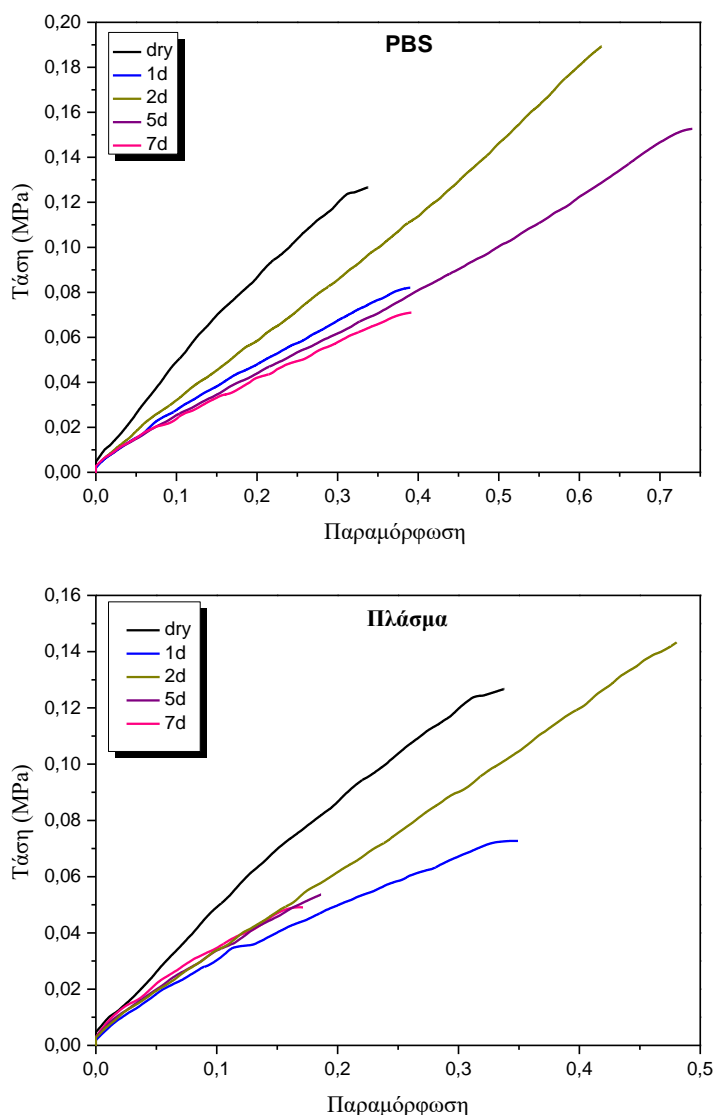
\*PGA: poly(glycerol sebacate), PLLA: poly L-lactic acid, PHB: Polyhydroxybutyrate, TMC: Trimethylene carbonate, PPD: p-Phenylenediamine.

Τα περισσότερα βιοϋλικά, συμπεριλαμβανομένων και των ινών κολλαγόνου, είναι πολύ πιο άκαμπτα από το μυοκάρδιο. Αυτό εξηγεί γιατί οι κατασκευές της ιστομηχανικής στερούνται συσταλτικής λειτουργίας. Από την άλλη μεριά, τα πηκτώματα κολλαγόνου θεωρούνται αρκετά αδύναμα. Από τα δεδομένα που παρατίθενται παρακάτω, η χιτοζάνη θεωρείται ένα από πιο υποσχόμενα υποψήφια υλικά για τη μηχανική ιστών μυοκαρδίου, όσον αφορά τη μηχανική της συμβατότητα, εφόσον το μέτρο δυσκαμψίας της ταιριάζει με αυτό του καρδιακού μυ στο τέλος της διαστολής (200–500 kPa).

### 2.6.2 Μελέτη υποβάθμισης μηχανικών ιδιοτήτων σε υγρό περιβάλλον

Με βάση τη μελέτη της ρόφησης και την ποσότητα υγρού που απορροφούν οι μεμβράνες, ιδιαίτερα σημαντική θεωρείται και η μελέτη υποβάθμισης των μηχανικών ιδιοτήτων τους σε υγρό περιβάλλον.

Οι μηχανικές ιδιότητες των αποικοδομήσιμων μεμβρανών χιτοζάνης εξετάστηκαν ενδεδειγμένα μετά την εμβάπτιση τους σε διάλυμα PBS (pH=7,4) και πλάσμα αίματος στους 37°C, για το χρονικό διάστημα των 7 ημερών. Αξιοσημείωτη υποβάθμιση των μηχανικών ιδιοτήτων παρατηρείται στις μεμβράνες χιτοζάνης, όπως φαίνεται και στις καμπύλες σ-ε (Εικόνα 33) σύμφωνα με τις οποίες υφίσταται αλλαγή η συμπεριφορά του υλικού, σε συνάρτηση με το χρόνο εμβάπτισης του σε διάλυμα PBS και πλάσμα αίματος. Συγκεκριμένα, και στα δύο διαγράμματα παρατηρείται μια μεγάλη μείωση του μέτρου ελαστικότητας στις πρώτες 24 ώρες μετά την εμβάπτιση των μεμβρανών σε υδατικό περιβάλλον, ενώ στις 48 ώρες εμβάπτισης παρατηρείται αύξηση του μέτρου ελαστικότητας, καθώς και μεγάλη παραμόρφωση των μεμβρανών στο 60% και 50%, για το περιβάλλον του PBS και του πλάσματος, αντίστοιχα. Επίσης, οι καμπύλες σ-ε, μετά από 5 και 7 ημέρες εμβάπτισης των μεμβρανών σε PBS παρουσιάζουν, όπως είναι αναμενόμενο, μικρότερη κλίση, άρα και μικρότερο μέτρο ελαστικότητας, ενώ η μεμβράνη στις 5 ημέρες εμβάπτισης διατηρεί και αυξάνει ακόμα περισσότερο τη δυνατότητα παραμόρφωσής της στο 70%, πριν το σημείο θραύσης της. Αντίστοιχα, παρουσία πλάσματος παρατηρείται παρόμοια συμπεριφορά των δειγμάτων στις 5 και 7 ημέρες εμβάπτισής τους, δεδομένης της κλίσης της καμπύλης σ-ε, ενώ οι μεμβράνες παραμορφώνονται λιγότερο από 20%. Το γενικό συμπέρασμα που προκύπτει είναι ότι οι μεμβράνες χιτοζάνης εμφανίζουν μεγαλύτερες τιμές τάσεων και παραμορφώσεων σε περιβάλλον PBS σε σύγκριση με το πλάσμα αίματος, όπου οι τιμές είναι ελαφρώς μειωμένες.

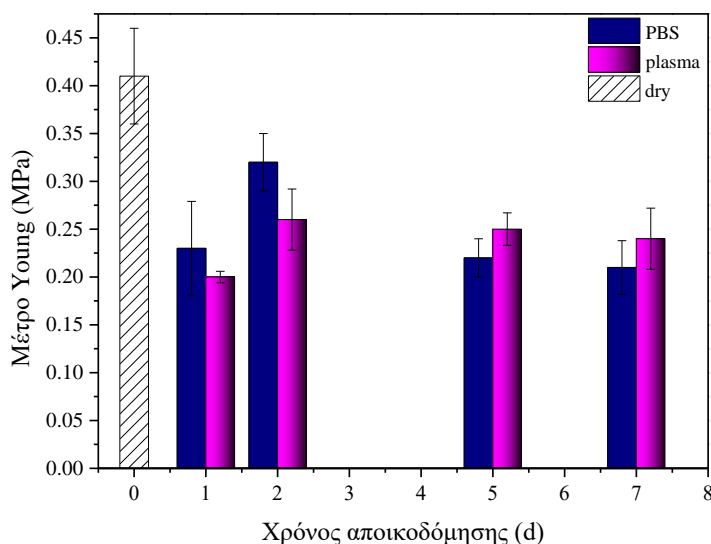


**Εικόνα 33.** Διαγράμματα τάσης-παραμόρφωσης ( $\sigma$ - $\epsilon$ ) μεμβρανών χιτοζάνης, πριν και μετά την εμβάπτιση τους σε διάλυμα PBS και πλάσμα αίματος για 1 ημέρα (1d), 2 ημέρες (2d), 5 ημέρες (5d) και 7 ημέρες (7d).

Ειδικότερα για το πως μεταβάλλονται τα μεγέθη, όπως το μέτρο ελαστικότητας, η μέγιστη αντοχή σε εφελκυσμό, καθώς και η μέγιστη παραμόρφωση που υφίστανται οι μεμβράνες, σε συνάρτηση με το χρονικό διάστημα αποικοδόμησής τους, παρουσιάζονται στα παρακάτω ραβδογράμματα. Συγκεκριμένα, αναφέρονται οι μέσοι όροι των μεγεθών αυτών, καθώς και η σταθερή απόκλιση, σε συνάρτηση με το χρονικό διάστημα που μελετάται.

Το μέτρο ελαστικότητας των μεμβρανών, το οποίο υπολογίστηκε από την κλίση της καμπύλης  $\sigma$ - $\epsilon$ , σε συνάρτηση με το χρόνο αποικοδόμησης παρουσιάζει τη

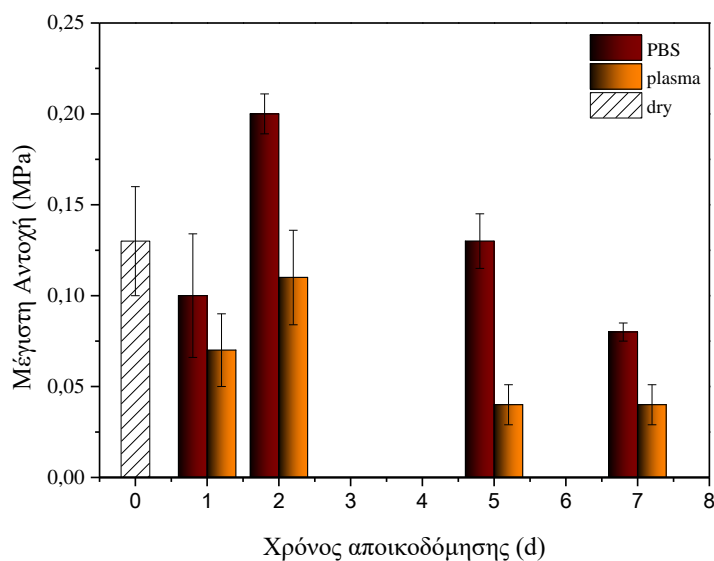
μεγαλύτερη αύξηση τη 2<sup>η</sup> ημέρα εμφάνισης, τόσο σε διάλυμα PBS όσο και σε πλάσμα αίματος, ενώ την 5<sup>η</sup> και την 7<sup>η</sup> ημέρα δεν υπάρχουν σημαντικές μεταβολές στις τιμές τους (Εικόνα 34).



**Εικόνα 34.** Υποβάθμιση του μέτρου δυσκαμψίας των μεμβρανών σε υδατικό περιβάλλον (διάλυμα PBS και πλάσμα αίματος) στο χρονικό διάστημα των 7 ημερών (n=5).

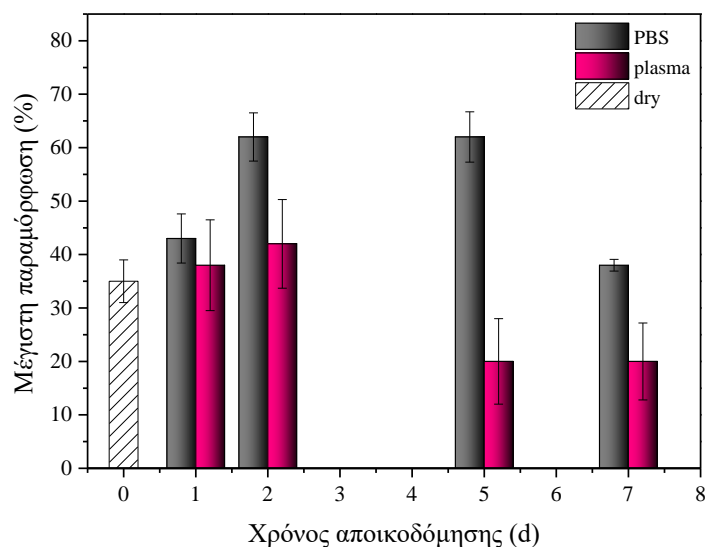
Η μέγιστη αντοχή σε εφελκυσμό παρουσιάζει μεγάλες διαφορές στις τιμές μεταξύ των δύο διαφορετικών υδατινών μέσων, όπως φαίνεται στο διάγραμμα της Εικόνα 35. Την 1<sup>η</sup> ημέρα παρατηρείται μείωση της μέγιστης αντοχής και στα δύο μέσα εμφάνισης, ενώ η μεγαλύτερη αύξηση της τιμής εντοπίζεται τη δεύτερη ημέρα εμφάνισης των μεμβρανών, τόσο στο PBS όσο και στο πλάσμα, φτάνοντας τα 0,20 και τα 0,11MPa, αντίστοιχα. Την 5<sup>η</sup> και την 7<sup>η</sup> ημέρα αποικοδόμησης των μεμβρανών σε PBS παρατηρείται μείωση της αντοχής από 0,13 σε 0,08MPa, ενώ στο πλάσμα η τιμή της μέγιστης αντοχής κυμαίνεται σε πολύ χαμηλές τιμές και είναι σταθερή, περίπου στα 0,04MPa.





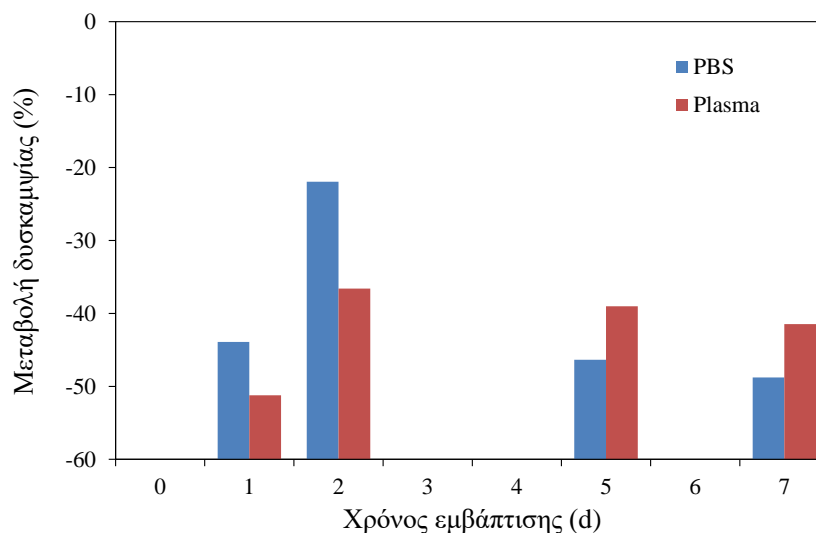
**Εικόνα 35.** Υποβάθμιση της μέγιστης αντοχής των μεμβρανών σε υδατικό περιβάλλον (διάλυμα PBS και πλάσμα αίματος) στο χρονικό διάστημα των 7 ημερών ( $n=5$ ).

Μεγάλο ενδιαφέρον παρουσιάζουν επίσης, οι παραμορφώσεις που υφίστανται οι μεμβράνες, μετά την εμβάπτιση τους στα υδατικά διαλύματα (Εικόνα 36). Συγκεκριμένα, τη 2<sup>η</sup> και την 5<sup>η</sup> ημέρα μετά τη εμβάπτιση σε PBS, παρατηρείται αύξηση της παραμόρφωσης στο 65%, ενώ την 7<sup>η</sup> ημέρα η παραμόρφωση μειώνεται περίπου στο 40%, προσεγγίζοντας την παραμόρφωση της στεγνής μεμβράνης. Στο πλάσμα, παρατηρείται μία μικρή αύξηση της παραμόρφωσης τη 2<sup>η</sup> ημέρα από 38% στο 42%, ενώ την 5<sup>η</sup> και την 7<sup>η</sup> ημέρα το ποσοστό παραμόρφωσης των μεμβρανών μειώνεται κατά ~50% σε σχέση με τη στεγνή μεμβράνη.



**Εικόνα 36.** Μεταβολή της μέγιστης παραμόρφωσης των μεμβρανών σε διάλυμα PBS και πλάσμα αίματος, στο χρονικό διάστημα των 7 ημερών ( $n=5$ ).

Το ποσοστό μεταβολής της δυσκαμψίας των μεμβρανών βάσει του χρονικού διαστήματος εμβάπτισής τους σε PBS και πλάσμα αίματος στους 37°C, παρατίθεται στην Εικόνα 37, όπου το ποσοστό μείωσης της δυσκαμψίας προσδιορίζεται από τη σχέση  $(E_{\text{degrading}} - E_{\text{original}})/E_{\text{original}}$ . Το  $E_{\text{degrading}}$  αναφέρεται στο μέτρο ελαστικότητας των μεμβρανών χιτοζάνης που προκύπτει στις 1, 2, 5 και 7 ημέρες μετά την εμβάπτιση, ενώ το  $E_{\text{original}}$  είναι το μέτρο ελαστικότητας της αρχικής μεμβράνης πριν την εμβάπτισή της (dry). Την πρώτη ημέρα εμβάπτισης σε PBS, παρατηρήθηκε μια ραγδαία μείωση της δυσκαμψίας της χιτοζάνης στο ~45%, διατηρώντας μόλις το 55% της αρχικής της δυσκαμψίας, λόγω της μεγάλης ποσότητας υγρού που προσλαμβάνει η μεμβράνη τις πρώτες 24 ώρες και τη «χαλάρωση» των αλυσίδων του δικτύου της, ενώ τη δεύτερη ημέρα παρατηρείται αύξηση της δυσκαμψίας. Στις 5 ημέρες, η μείωση της δυσκαμψίας επανέρχεται σε αυτήν του πρώτου 24ώρου και στις 7 ημέρες εμβάπτισης μειώνεται ελαφρώς. Παρόμοια συμπεριφορά παρατηρείται και στο πλάσμα αίματος, με μία ακόμη μεγαλύτερη αρχική μείωση του ποσοστού δυσκαμψίας, διατηρώντας το 50% της αρχικής δυσκαμψίας στις 24 ώρες και το ~60% στις 48 ώρες. Στις 5 και 7 ημέρες, η μείωση της δυσκαμψίας είναι ελάχιστη.



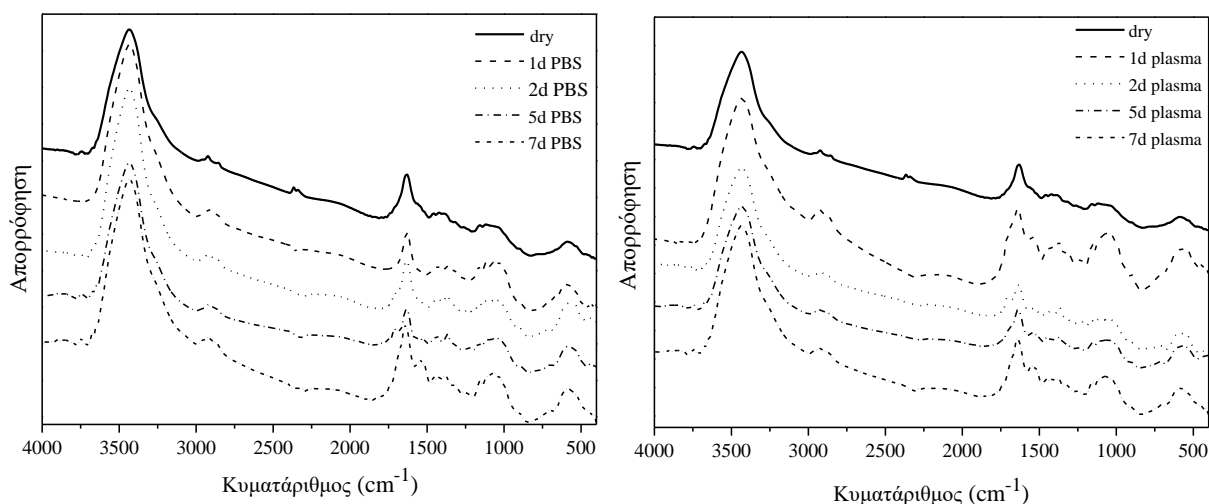
**Εικόνα 37.** Ποσοστό μείωσης δυσκαμψίας των μεμβρανών χιτοζάνης κατά τη διάρκεια εμβάπτισής τους σε διάλυμα PBS και πλάσμα αίματος (37°C).

Συμπερασματικά, υπάρχουν αρκετά σημαντικές διαφορές στις τιμές των μεγεθών, κυρίως της μέγιστης αντοχής σε εφελκυσμό και της μέγιστης παραμόρφωσης για τα δύο μέσα εμβάπτισης. Αξίζει να σημειωθούν οι μεγάλες μειώσεις τιμών των μηχανικών ιδιοτήτων μετά την εμβάπτιση των μεμβρανών σε πλάσμα αίματος σε σύγκριση με το PBS. Αυτό αποδίδεται στο γεγονός ότι το πλάσμα αίματος περιέχει πρωτεΐνες που δρουν ως ένζυμα και υδρολύουν τους γλυκοζιδικούς δεσμούς που υφίστανται μεταξύ των εξαμελών δακτυλίων της χιτοζάνης [146].

Επίσης, έντονο ενδιαφέρον παρουσιάζει η αύξηση των τιμών όλων των μηχανικών ιδιοτήτων που μελετήθηκαν, τη δεύτερη ημέρα εμβάπτισης των μεμβρανών, τόσο σε διάλυμα PBS όσο και σε πλάσμα αίματος. Η συμπεριφορά αυτή μπορεί να συσχετιστεί με τις καμπύλες ρόφησης, όπως μελετήθηκαν στην παράγραφο 2.5, σύμφωνα με τις οποίες υπάρχει μια τάση σταθεροποίησης της διόγκωσής τους στις 2 ημέρες, παρουσία υγρού περιβάλλοντος. Παράγοντες όπως η κρυσταλλικότητα, η κατανομή των αμινομάδων στις αλυσίδες της χιτοζάνης και το μοριακό βάρος, επηρεάζουν την ικανότητα ρόφησης του πολυμερούς, οδηγώντας σε αλλαγές της δομής και της ευκαμψίας των αλυσιδών του, οι οποίες σχετίζονται με την καλή διευθέτηση και τάξη των αλυσιδών στο πολυμερικό δίκτυο [147].

Φώς στο ερώτημα αυτό επιχειρήθηκε να δώσει η χρήση της φασματοσκοπίας FT-IR των μεμβρανών μετά τον εφελκυσμό. Συγκεκριμένα, για τον έλεγχο της αλλαγής της δομής των μεμβρανών, μετά την υποβάθμιση των μηχανικών τους

ιδιοτήτων σε διάλυμα PBS και πλάσμα αίματος, κρίθηκε σκόπιμη η λήψη φασμάτων FT-IR στα θραύσματα των μεμβρανών μετά τον εφελκυσμό τους. Όπως φαίνεται στην Εικόνα 38, δεν παρατηρείται κάποια δομική αλλαγή στα συγκεκριμένα φάσματα παρά την εμβάπτισή τους στα υδατικά διαλύματα στο χρονικό διάστημα των 7 ημερών, πράγμα που σημαίνει ότι δεν υφίσταται κάποια αλληλεπίδραση μεταξύ της μεμβράνης και των δύο υγρών που έρχεται σε επαφή και προφάνως, δεν τροποποιείται η δομή της μετά την ανάπτυξη εφελκυστικής τάσης. Αυτό ισχυροποιεί την υπόθεση που αναφέρθηκε παραπάνω για τη συσχέτιση της συμπεριφοράς των μεμβρανών της χιτοζάνης στη διόγκωση και των μηχανικών ιδιοτήτων, στους διάφορους χρόνους εμβάπτισης σε PBS και πλάσμα αίματος.

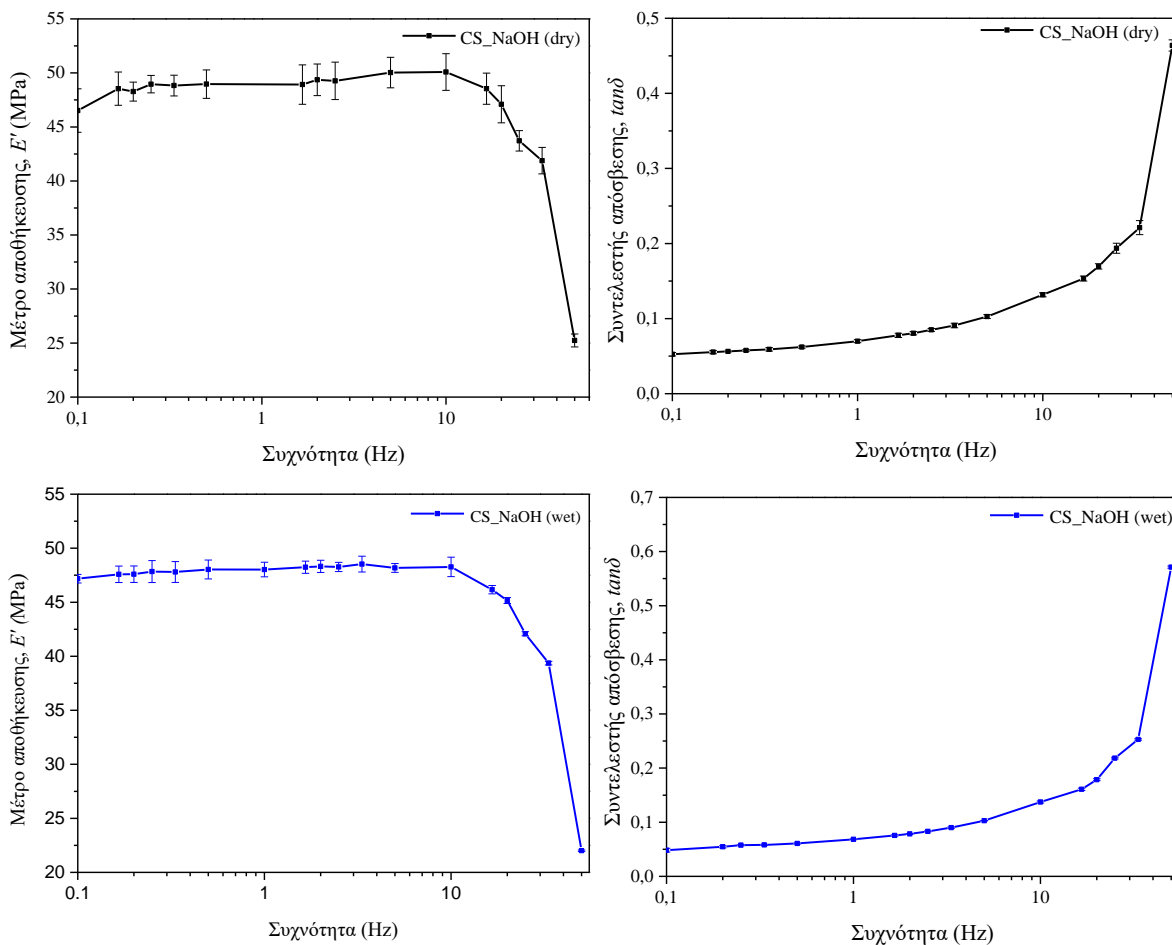


**Εικόνα 38.** Φάσματα FT-IR των θραυσμάτων των μεμβρανών μετά τον εφελκυσμό αφού πρώτα είχαν εμβάπτιστεί σε διάλυμα PBS και πλάσμα αίματος στο διάστημα των 7 ημερών.

### 2.6.3 Δυναμική Μηχανική Ανάλυση

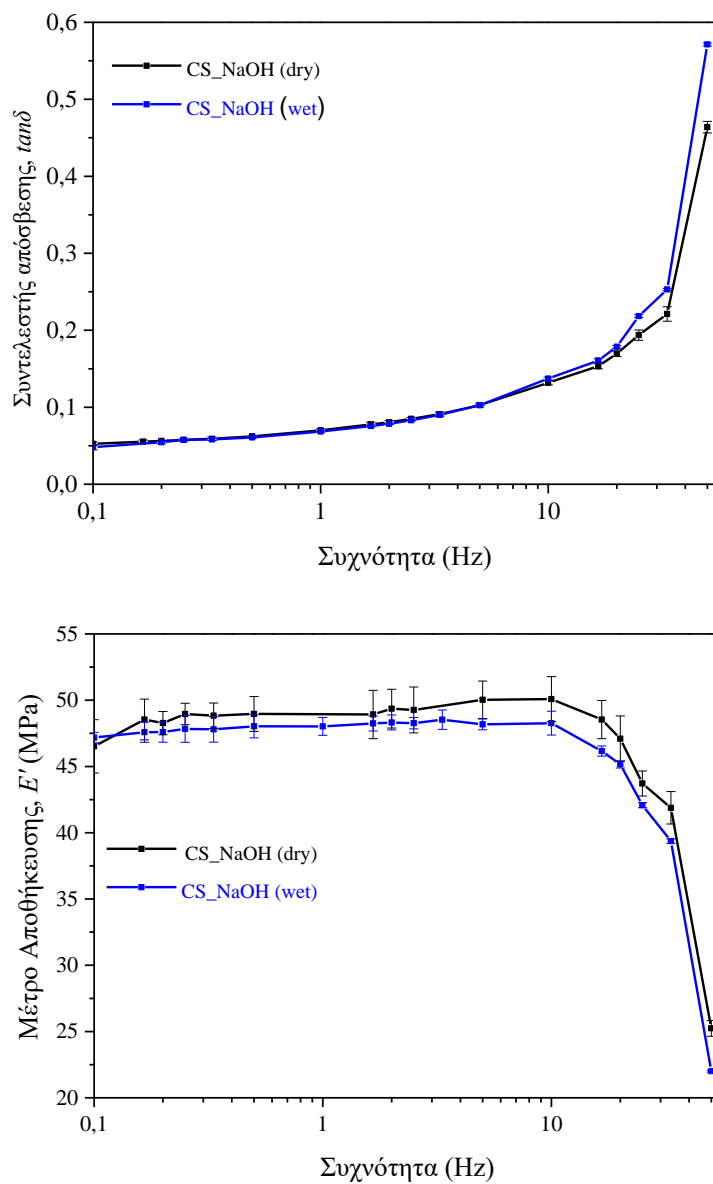
Για τη μελέτη των εξωδοελαστικών ιδιοτήτων της μεμβράνης χιτοζάνης στο εύρος συχνοτήτων από 0,1 έως 50Hz, πραγματοποιήθηκε δυναμική μηχανική ανάλυση, προσομοιάζοντας τις φυσιολογικές συνθήκες του οργανισμού, δηλαδή τη θερμοκρασία των 37°C και την καρδιακή συχνότητα του επίμου στα 4,5-5,5Hz. Οι συνθήκες που χρησιμοποιήθηκαν για τη μέτρηση και η προετοιμασία των δοκιμίων αναφέρονται στο παράρτημα 2.10.

Οι καμπύλες της μεταβολής του μέτρου αποθήκευσης,  $E'$ , και του συντελεστή απωλειών,  $\tan\delta$ , συναρτήσει της συχνότητας των μεμβρανών, αμέσως μετά την παρασκευή τους και κατόπιν παραμονής τους σε υγρό περιβάλλον (διάλυμα PBS), παρουσιάζονται στην Εικόνα 39. Παρατηρείται ότι, με την αύξηση της συχνότητας, το μέτρο αποθήκευσης δεν μεταβάλλεται ως προς το εύρος των συχνοτήτων που πάλλεται ο καρδιακός μυς, αλλά παραμένει σταθερό έως τα 46-48 MPa, προκρίνοντας τη μεμβράνη χιτοζάνης κατάλληλη για τη συγκεκριμένη εφαρμογή. Με την περαιτέρω αύξηση της συχνότητας παρατηρείται το φαινόμενο μείωσης του  $E'$ , το οποίο οφείλεται στη μείωση της πυκνότητας του πολυμερικού δικτύου και στην «χαλάρωση» του, λόγω της μειωμένης κίνησης των αλυσιδών της χιτοζάνης. Ανάλογη συμπεριφορά παρατηρείται και στη μεταβολή του μέτρου αποθήκευσης των μεμβρανών μετά την εμβάπτισή τους σε υγρό περιβάλλον διαλύματος PBS. Ο συντελεστής απόσβεσης,  $\tan\delta$ , είναι ο λόγος του μέτρου απωλειών ( $E''$ ) προς το μέτρο αποθήκευσης ( $E'$ ) και αποτελεί μέτρο της μηχανικής απόσβεσης. Το διάγραμμα του  $\tan\delta$  δείχνει ότι με την αύξηση των συχνοτήτων, ο συντελεστής απωλειών δεν μεταβάλλεται για το εύρος των συχνοτήτων του καρδιακού μυ, ενώ με την περαιτέρω αύξησή τους οι τιμές του  $\tan\delta$  αυξάνονται. Αντίστοιχη συμπεριφορά του  $\tan\delta$  παρατηρείται και στο υγρό περιβάλλον.



**Εικόνα 39.** Καμπύλες μεταβολής του μέτρου αποθήκευσης,  $E'$  και της  $\tan\delta$  συναρτήσεως της συχνότητας των μεμβρανών χιτοζάνης σε ξηρό και υγρό περιβάλλον ( $n=5$ ).

Στα διαγράμματα της παρουσιάζεται η απόκριση της μεμβράνης σε υγρό περιβάλλον, όσον αφορά στις δυναμικές μηχανικές ιδιότητες (μέτρο αποθήκευσης και συντελεστής απωλειών), σε σύγκριση με το ξηρό περιβάλλον. Τα διαγράμματα δείχνουν ότι το μέτρο αποθήκευσης είναι ελαφρώς μειωμένο στο υγρό περιβάλλον, καθιστώντας τη μεμβράνη πιο εύκαμπτη. Η καμπύλη του  $\tan\delta$  στο υγρό περιβάλλον συμπίπτει με αυτή στο ξηρό, με μια μικρή διαφορά αύξησης σε πολύ υψηλές συχνότητες. Λαμβάνοντας υπόψιν ότι ο συντελεστής  $\tan\delta$  παρέχει σημαντικές πληροφορίες για τις ενεργειακές μεταβάσεις ενός υλικού, οι οποίες σχετίζονται άμεσα με την αλλαγή της μοριακής κίνησης σε ορισμένες θερμοκρασίες, διαπιστώνεται ότι σε υψηλές συχνότητες οι μηχανικές ιδιότητες της μεμβράνης υποβαθμίζονται λόγω της παρουσίας υδατικού περιβάλλοντος.



**Εικόνα 40.** Επίδραση της αποθήκευσης σε υγρό περιβάλλον (37 °C) των μεμβρανών χιτοζάνης, στις δυναμικές μηχανικές ιδιότητες στο εύρος συχνοτήτων 0,1 - 50Hz (n=5).

### III-3: ΑΛΛΗΛΕΠΙΔΡΑΣΗ ΜΕΜΒΡΑΝΗΣ ΑΠΟ ΥΔΡΟΠΗΚΤΩΜΑ ΧΙΤΟΖΑΝΗΣ ΜΕ ΚΥΤΤΑΡΑ ΚΑΙ ΚΑΡΔΙΑΚΟ ΙΣΤΟ

#### 1. *IN VITRO* ΒΙΟΛΟΓΙΚΟΣ ΕΛΕΓΧΟΣ ΑΝΑΠΤΥΞΗΣ ΚΥΤΤΑΡΩΝ ΣΕ ΜΕΜΒΡΑΝΗ ΧΙΤΟΖΑΝΗΣ

Για τον βιολογικό έλεγχο της μεμβράνης χιτοζάνης χρησιμοποιήθηκαν κυτταροκαλλιέργειες με ινοβλάστες (NIH3T3). Στην καρδιά, οι ινοβλάστες αποτελούν το 60-70% της κυτταρικής της μάζας, ενώ αναγνωρίζονται για το δομικό ρόλο που διαδραματίζουν στη σύνθεση και αναδιαμόρφωση της εξωκυττάριας θεμέλιας ουσίας του συνδετικού ιστού [148]. Οι κυτταροκαλλιέργειες βοήθησαν να ελεγχθεί η κυτταροτοξικότητα του βιοϋλικού και η κυτταρική βιωσιμότητα. Η κυτταροτοξικότητα των βιοϋλικών αποτελεί μια πολύ σημαντική παράμετρο κατά το σχεδιασμό ενός εμφυτεύματος, διότι, για να μπορέσει να χρησιμοποιηθεί με επιτυχία σε βιοϊατρικές εφαρμογές, θα πρέπει να μπορεί να ενισχύει τη βιωσιμότητα των κυττάρων, τον πολλαπλασιασμό τους και τη διαφοροποίησή τους.

Ο *in vitro* έλεγχος πραγματοποιήθηκε σε δύο στάδια: Το πρώτο στάδιο περιλαμβάνει (α) την επιβίωση των κυττάρων στην επιφάνεια της μεμβράνης χιτοζάνης και το δεύτερο στάδιο (β) το ρυθμό ανάπτυξης των κυττάρων στη μεμβράνη. Τα πειράματα αυτά έγιναν στο εργαστήριο Γενικής Βιολογίας του Τμήματος Ιατρικής του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων υπό την ευγενική επίβλεψη του Επίκουρου Καθηγητή κ. Κούκλη και της Δρ. κ. Βιολέτας Μαλταμπέ.

Πριν την καλλιέργεια των κυττάρων πραγματοποιήθηκε αποστείρωση της μεμβράνης. Αρχικά, η μεμβράνη εμβαπτίστηκε για 24 ώρες σε 70% v/v αιθανόλη και έπειτα εκτέθηκε για 5 λεπτά σε ακτινοβολία UV σε εστία νηματικής ροής (laminar flow). Ακολούθησαν εκπλύσεις με διάλυμα PBS και στη συνέχεια η μεμβράνη τοποθετήθηκε σε θρεπτικό μέσο (DMEM, 10% (v/v) FBS, 2 mM L-γλουταμίνη και 50 U/ml πενικιλίνη/στρεπτομυκίνη) και επώαστηκε σε κλίβανο για 7 ημέρες. Στο χρονικό διάστημα αυτό, ελέγχθηκε η μεμβράνη για την ανάπτυξη μικροοργανισμών. Δεν παρατηρήθηκε μόλυνση του θρεπτικού μέσου, ούτε ανίχνευση μικροοργανισμών. Έχοντας διασφαλίσει τις στείρες συνθήκες της μεμβράνης, μελετήθηκε στη συνέχεια



η *in vitro* καλλιέργεια κυττάρων στην επιφάνεια της μεμβράνης για τον έλεγχο αρχικά της βιωσιμότητας τους καθώς και του ρυθμού ανάπτυξής τους.

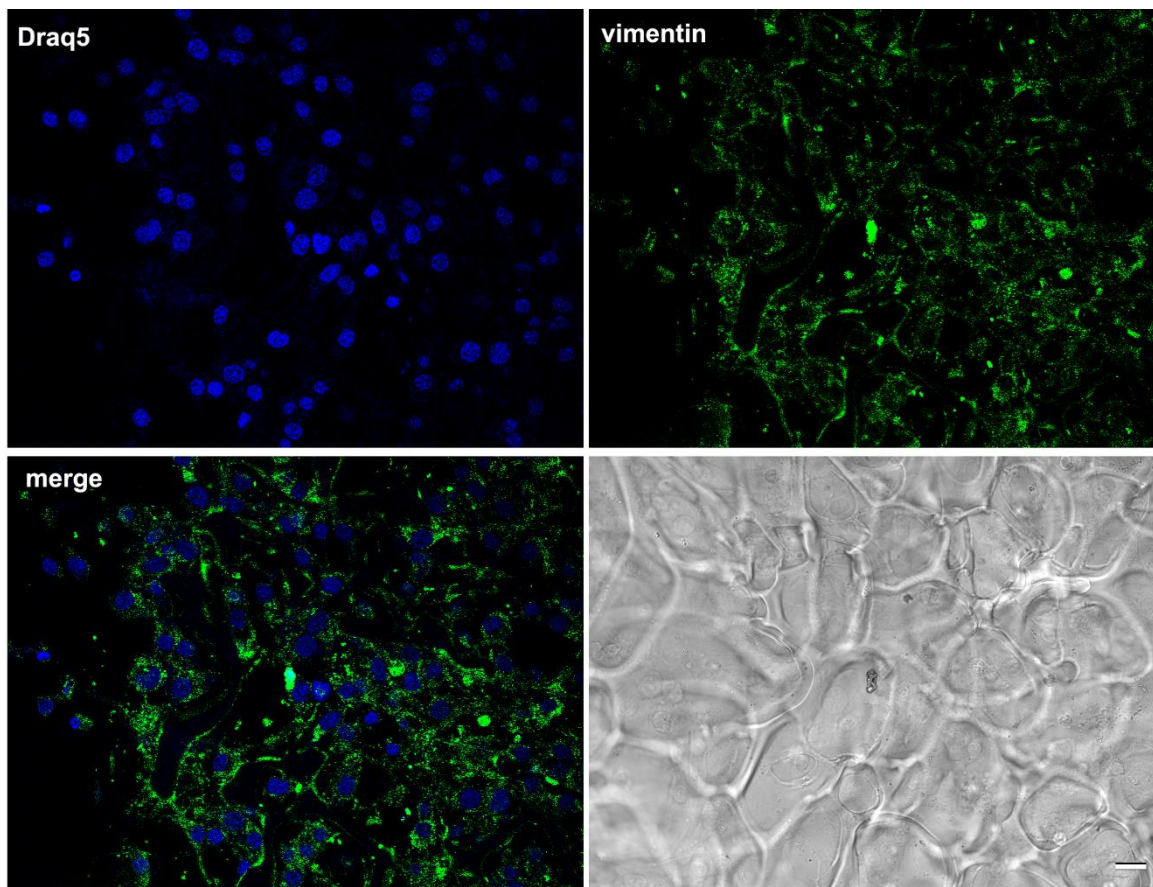
(α) Επιβίωση κυττάρων στην επιφάνεια της μεμβράνης χιτοζάνης

Για την υλοποίηση αυτών των πειραμάτων, αρχικά πραγματοποιήθηκε η καλλιέργεια των κυττάρων και συγκεκριμένα ινοβλαστών, οι οποίοι καλλιεργήθηκαν σε θρεπτικό μέσο DMEM (Dulbecco's Modified Eagle's Medium) υψηλής συγκέντρωσης γλυκόζης (4,5 g/L), 10% (v/v) FBS, 2 mM L-γλουταμίνη και 50 U/ml πενικιλίνη/στρεπτομυκίνη. Η καλλιέργεια των κυττάρων έγινε σε ειδικά διαμορφωμένο χώρο, ο οποίος διατηρείται στείρος με τη χρήση υπερϊώδους ακτινοβολίας. Όλοι οι χειρισμοί των κυττάρων έλαβαν χώρα εντός εστίας νηματικής ροής (AURA 200 MAC, BioAir Instruments, HeraSafe™). Τα κύτταρα αναπτύχθηκαν σε επωαστικό κλίβανο (Forma Scientific, CO<sub>2</sub> Water-jacketed Incubator, HeraCell™) σταθερής θερμοκρασίας, κάτω από κατάλληλες συνθήκες υγρασίας και ατμόσφαιρας εμπλουτισμένης με 5% CO<sub>2</sub>. Οι εκπλύσεις των κυττάρων πραγματοποιήθηκαν με ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών αλάτων (PBS) (Invitrogen), ενώ η αποκόλληση των κυττάρων από το τριβλίο επιτεύχθηκε με τη χρήση διαλύματος τρυψίνης/EDTA (trypsin/EDTA solution, Invitrogen 0,05% /0,02% w/v).

Για τη μελέτη της μορφολογίας, της επιβίωσης και της ανάπτυξης των ινοβλαστών στη μεμβράνη, ακολούθησε ο έμμεσος ανοσοφθορισμός των κυττάρων, μια μορφολογική μέθοδο, κατά την οποία χρησιμοποιούνται φθορίζοντα αντισώματα για την ανίχνευση αντιγόνου ή αντισώματος σε ιστούς ή κύτταρα. Στο συγκεκριμένο πείραμα ανοσοφθορισμού, το αντίσωμα που χρησιμοποιείται, ανιχνεύει τη βιμεντίνη, μία πρωτεΐνη ενδιάμεσων ινιδίων, η οποία αποτελεί μέρος του κυτταρικού σκελετού των κυττάρων. Για τα πειράματα ανοσοφθορισμού, η διαδικασία που ακολουθήθηκε ήταν η εξής. Οι καλυπτρίδες και η μεμβράνη χιτοζάνης επιστρώνονται με 0,1% w/v διάλυμα ζελατίνης για την καλύτερη προσκόλληση των κυττάρων. Τα NIH3T3 που αναπτύχθηκαν προσκολλούμενα στις καλυπτρίδες ή στη μεμβράνη χιτοζάνης, εκπλύθηκαν δύο φορές με PBS και μονιμοποιήθηκαν σε διάλυμα φορμαλδεΐδης 3,7% v/v για 10 λεπτά. Τα μονιμοποιηθέντα κύτταρα εκπλύθηκαν τρεις φορές με PBS και στη συνέχεια επώαστηκαν με διάλυμα χρώσης A και B σε θερμοκρασία δωματίου για 10 λεπτά. Το διάλυμα χρώσης A αποτελείται από ισοτονικό διάλυμα PBS που

περιέχει 0,1% w/v Triton X-100 και 0,2% w/v ζελατίνη από δέρμα ιχθύος, ενώ το B περιέχει τα ίδια διαλύματα με μεγαλύτερη συγκέντρωση του Triton X-100 (0,5% w/v). Το Triton X-100 διαλυτοποιεί τα μεμβρανικά λιπίδια και χρησιμοποιείται για να γίνουν τα κύτταρα διαπερατά στα αντισώματα. Ακολούθησε η προσθήκη του πρωτογενούς αντισώματος με κατάλληλη αραίωση σε διάλυμα χρώσης A και επώαση σε θερμοκρασία δωματίου για 1 ώρα. Ακολούθησαν 3 πλύσεις των 5 λεπτών με διάλυμα χρώσης A και επώαση με το δευτερογενές αντίσωμα σε θερμοκρασία δωματίου σε σκοτεινό μέρος για 1 ώρα. Τα κύτταρα εκπλύθηκαν 3 φορές με διάλυμα χρώσης A για 5 λεπτά και ακολούθησε η χρώση των πυρήνων με Draq5 (1:5000 σε PBS) για 5 λεπτά. Τέλος, τα κύτταρα εκπλύθηκαν 2 φορές με PBS και οι καλυπτρίδες επικολλήθηκαν σε αντικειμενοφόρους πλάκες με τη χρήση 10μl διαλύματος 1 mg/ml p-φαινυλενεδιαμίνης (Sigma), αντιδραστήριο που χρησιμοποιείται για τη σταθεροποίηση του φθορισμού (anti-fade).

Τα αποτελέσματα του μορφολογικού ελέγχου των κυττάρων στη μεμβράνη φαίνονται στην Εικόνα 41. Παρατηρείται ότι, έπειτα από τον ανοσοφθορισμό των κυττάρων που έχουν αναπτυχθεί δύο μέρες στη μεμβράνη έναντι της πρωτεΐνης βιμεντίνης, τα κύτταρα εμφανίζουν τη φυσιολογική μορφολογία των ινοβλαστών, επιβιώνουν και αναπτύσσονται φυσιολογικά.



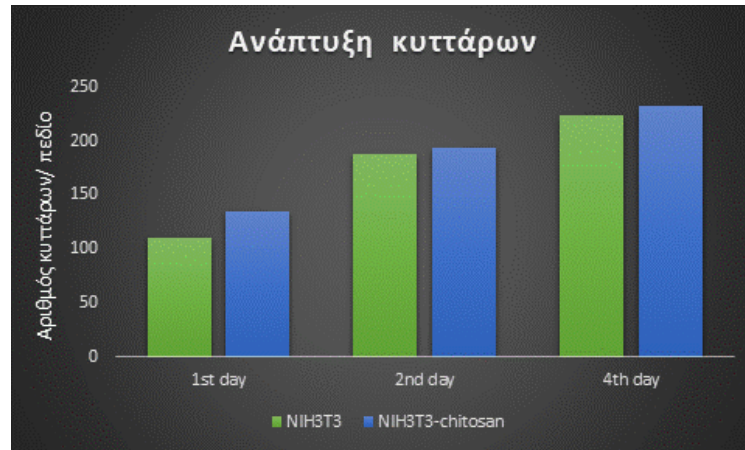
**Εικόνα 41.** Μορφολογικός έλεγχος των κυττάρων στη μεμβράνη χιτοζάνης με ανοσοφθορισμότων κυττάρων που έχουν αναπτυχθεί δύο μέρες στη μεμβράνη έναντι της πρωτεΐνης βιμεντίνης (γραμμή κλίμακας 20μm).

### (β) Ρυθμός ανάπτυξης κυττάρων στη μεμβράνη χιτοζάνης

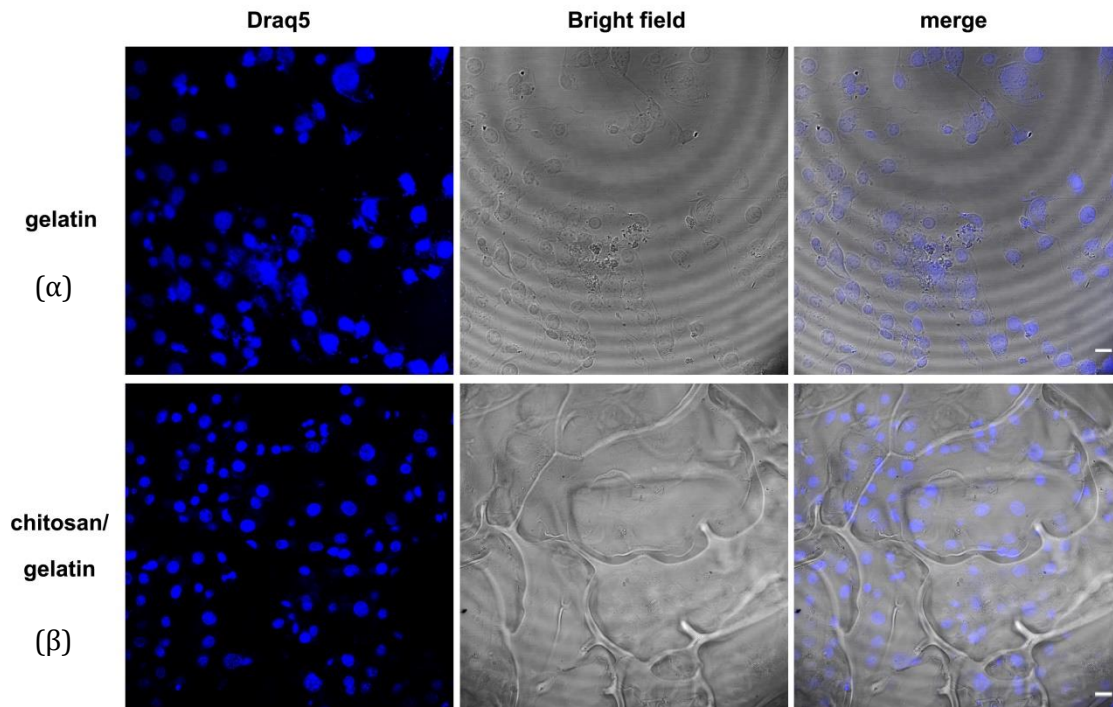
Για τον έλεγχο του ρυθμού ανάπτυξης των κυττάρων στη μεμβράνη χιτοζάνης, τα κύτταρα καλλιεργήθηκαν και μελετήθηκαν για χρονικό διάστημα τεσσάρων ημερών. Ως δείγμα ελέγχου, χρησιμοποιήθηκαν κύτταρα τα οποία αναπτύσσονται σε καλυπτρίδες και επιστρώθηκε ο ίδιος αριθμός κυττάρων σε κάθε περίπτωση (δηλαδή κύτταρα σε καλυπτρίδα και κύτταρα σε μεμβράνη χιτοζάνης). Για τη μέτρηση των κυττάρων στη μεμβράνη χιτοζάνης και στις καλυπτρίδες πραγματοποιήθηκε μονιμοποίηση των κυττάρων κάθε 24 ώρες, χρώση με Draq5 και παρατήρηση και φωτογράφιση των κυττάρων σε μικροσκόπιο confocal (συνεστιακό). Σε κάθε περίπτωση, φωτογραφήθηκαν 10 τυχαία πεδία και μετρήθηκε ο αριθμός των κυττάρων με τη χρήση του προγράμματος Fiji (Image J). Μετρήθηκαν περίπου 1500 κύτταρα ανά περίπτωση και υπολογίστηκε ο αριθμός των κυττάρων ανά πεδίο.

Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι, η ανάπτυξη των κυττάρων στην καλυπτρίδα και στη μεμβράνη είναι ίδια, χωρίς σημαντικές διαφορές (Εικόνα 42Α). Αυτό σημαίνει ότι τα κύτταρα στη μεμβράνη αναπτύσσονται με τον ίδιο ρυθμό, όπως τα κύτταρα στην καλυπτρίδα. Στην Εικόνα 42Β φαίνεται ενδεικτικά η ανάπτυξη των κυττάρων στην καλυπτρίδα και στη μεμβράνη χιτοζάνης, έπειτα από μια ημέρα καλλιέργειας των κυττάρων.

Συμπερασματικά, τα αποτελέσματα αυτά επιβεβαιώνουν τη βιοσυμβατότητα του υλικού και την ανάπτυξη των ινοβλαστών στη μεμβράνη από υδροπήκτωμα χιτοζάνης, η οποία παρήχθη με τη μέθοδο της ζελατινοποίησης, προκρίνοντάς την ως υποσχόμενο βιοϋλικό για χρήση στο μυοκάρδιο και για τη *in vivo* μελέτη σε εργαστηριακά ζώα, όπως αναλύεται στην επόμενη παράγραφο.



(A)



(B)

**Εικόνα 42.** Μελέτη της ανάπτυξης των κυττάρων σε μεμβράνη χιτοζάνης. Α) Στατιστική ανάλυση του αριθμού των NIH3T3 κυττάρων που αναπτύχθηκαν σε καλυπτρίδες ή σε μεμβράνη χιτοζάνης για τέσσερις ημέρες. Β) Χαρακτηριστική εικόνα από την ανάπτυξη των κυττάρων σε καλυπτρίδα και στη μεμβράνη χιτοζάνης έπειτα από μια ημέρα καλλιέργειας των κυττάρων. (α) Κύτταρα σε καλυπτρίδα, (β) κύτταρα σε μεμβράνη χιτοζάνης.

## 2. *IN VIVO* ΜΕΛΕΤΗ ΔΙΕΠΙΦΑΝΕΙΑΣ ΜΕΜΒΡΑΝΗΣ ΧΙΤΟΖΑΝΗΣ/ΚΑΡΔΙΑΚΟΥ ΙΣΤΟΥ

Μετά τον επιτυχή *in vitro* έλεγχο (παράγραφος 1), ακολούθησε ο *in vivo* έλεγχος της μεμβράνης, ο οποίος πραγματοποιήθηκε με εμφύτευση της μεμβράνης σε φυσιολογικούς επίμυες τύπου Wistar και βάρους 270-350g. Στο παράρτημα 3 δίνονται οι πληροφορίες που αφορούν στο ιατρικό πρωτόκολλο, σύμφωνα με την ευρωπαϊκή νομοθεσία και που ακολουθήθηκε στην παρούσα εργασία.

Η φυσιολογία αυτού του τύπου ζώου έχει πολλές ομοιότητες με αυτή του ανθρώπου. Οι *in vivo* δοκιμές παρέχουν σημαντικές πληροφορίες για την απόκριση των ζώων παρουσία εμφυτευμάτων. Τα εμφυτεύματα των μεμβρανών χιτοζάνης που χρησιμοποιήθηκαν ήταν σε ορθογώνιο σχήμα και είχαν διαστάσεις 30x10x1 mm<sup>3</sup> (Εικόνα 43). Ακολούθησε η διαδικασία αποστείρωσης των εμφυτευμάτων, όπως ακριβώς αναφέρθηκε και στον *in vitro* έλεγχο.

Η πειραματική διαδικασία που ακολουθήθηκε περιελάμβανε το στάδιο της αναισθησίας και της διασωλήνωσης, το στάδιο της χειρουργικής διαδικασίας και το στάδιο της εμφύτευσης του βιοϋλικού. Η απόδοση του υλικού αξιολογήθηκε με 2 τρόπους. Ο πρώτος αφορούσε στη μακροσκοπική εξέταση του εμφυτεύματος και του ιστού και ο δεύτερος στη φλεγμονώδη αντίδραση ξένου σώματος. Για την πρώτη εξέταση χρησιμοποιήθηκαν 26 αρουραίοι, ενώ για την δεύτερη (αντίδραση ξένου σώματος) χρησιμοποιήθηκαν 15 αρουραίοι. Τα περάματα της εμφύτευσης και της μακροσκοπικής εξέτασης του εμφυτεύματος έγιναν στο Πειραματικό Εργαστήριο του Ερευνητικού Καρδιαγγειακού Ινστιτούτου υπό την ευγενική επίβλεψη του Καθηγητή Καρδιολογίας κ. Θεόφилου Κωλέττη και η μελέτη της φλεγμονώδους αντίδρασης ξένου σώματος στο Εργαστήριο Ανατομίας, Ιστολογίας, Εμβρυολογίας με τη ευγενική βοήθεια της Επίκουρης Καθηγήτριας κ. Αντωνίας Χαρχαντή, και οι δύο στο Τμήμα Ιατρικής του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων.



**Εικόνα 43.** Μεμβράνη χιτοζάνης πριν την εμφύτευση της επικαρδιακά.

#### *Αναισθησία- Διασωλήνωση*

Η αναισθητοποίηση των επίμυων πραγματοποιούνταν με τη χρήση ειδικής μάσκας [149], από την οποία ελάμβαναν αναισθητικό ισοφλουράνιο για 2-3 λεπτά, προκειμένου να επιτευχθεί η διασωλήνωσή τους στο επόμενο στάδιο (Εικόνα 44). Η διασωλήνωση της τραχείας των αρουραίων γινόταν με τη χρήση φλεβοκαθετήρα μεγέθους 18G, μία μέθοδος αρκετά εύκολη και αξιόπιστη, η οποία χρησιμοποιείται για ενδοτραχειακή διασωλήνωση σε ποντίκια [150]. Ο φλεβοκαθετήρας συνδεόταν με κατάλληλο αναπνευστήρα (Harvard Apparatus, με τις ακόλουθες ρυθμίσεις: εισπνεόμενος όγκος=2ml, συχνότητα=72 αναπνοές το λεπτό). Η επιτυχία της διασωλήνωσης επιβεβαιωνόταν με την καλή έκπτωση του θώρακα, όσο ο επίμυς ήταν συνδεδεμένος στον αναπνευστήρα (model 7025, Ugo Basile, Comerio, Italy). Η αναισθησία διατηρούταν με τη χορήγηση μίγματος 100% οξυγόνου (1-2 L/min) και 2% ισοφλουρανίου. Η χορήγηση του μίγματος ισοφλουρανίου και οξυγόνου έχει πολύ καλά αποτελέσματα με χαμηλή θνητότητα και γι'αυτό το λόγο επιλέχθηκε για τη διεξαγωγή των συγκεκριμένων πειραμάτων.



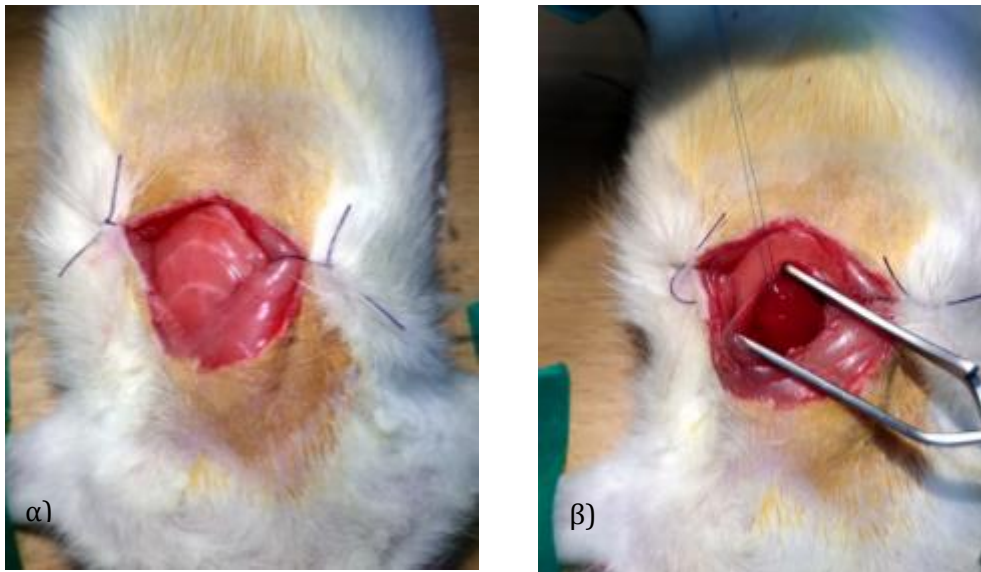


**Εικόνα 44.** Διασωλήνωση επίμυ υπό εισπνευστική αναισθησία.

#### *Διαδικασία χειρουργικής επέμβασης*

Μετά τη χορήγηση αναισθησίας, υπό άσηπτες συνθήκες, έλαβε χώρα αριστερή πλάγια θωρακοτομή, με το διαχωρισμό των στιβάδων των θωρακικών μυών και την αποκάλυψη του θωρακικού κλωβού (Εικόνα 45α). Με τη βοήθεια μιας κυρτής λαβίδας διατέμνονταν οι μεσοπλευριοί μύες (ανάμεσα σε 5η και 6η πλευρά, περίπου 2mm αριστερά του στέρνου) και το χάσμα που δημιουργείται διανοιγόταν με ήπιες πιεστικές κινήσεις. Μετά την τοποθέτηση ειδικού πλευρικού διαστολέα, με τη βοήθεια ειδικών λαβίδων, διαχωριζόταν το περικάρδιο και γινόταν τοποθέτηση ράμματος 6-0 (Ethicon, Johnson and Johnson, Medical Inc.) στην κορυφή της καρδιάς. Με τη χρήση του ράμματος, εξωτερικευόταν η καρδιά και ασκώντας ελαφριά δύναμη αποκαλυπτόταν ο χώρος εξόδου της δεξιάς κοιλίας (Εικόνα 45β).

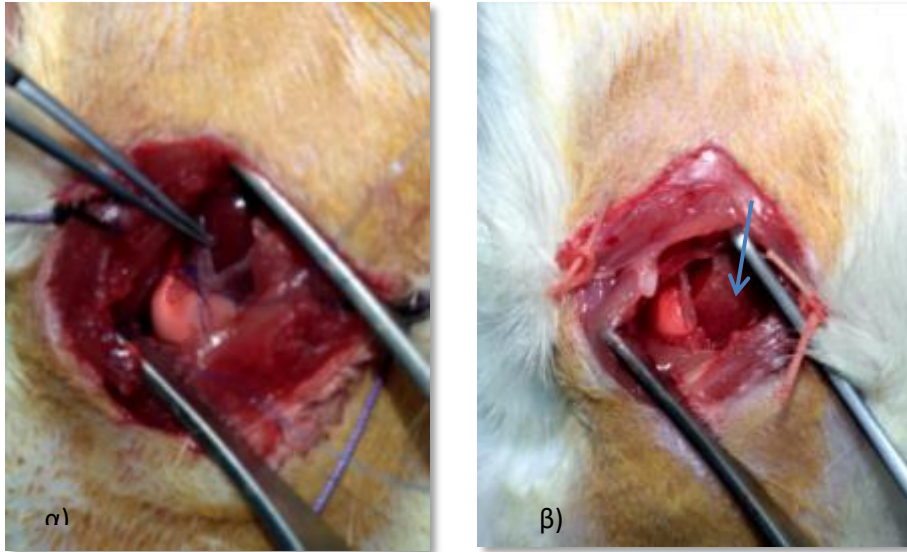




**Εικόνα 45.** Αριστερή πλάγια θωρακοτομή με α) αποκάλυψη του θωρακικού κλωβού και β) εξωτερική της καρδιάς με τη χρήση ράμματος 6-0 και αποκάλυψη της δεξιάς κοιλίας.

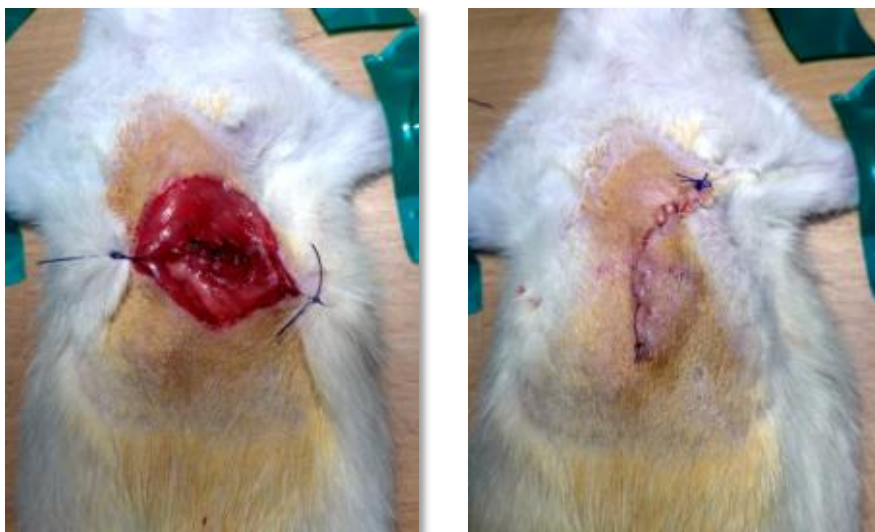
#### *Εμφύτευση βιοϋλικού*

Στη συνέχεια ακολούθησε η εμφύτευση της μεμβράνης επικαρδιακά του μυοκαρδίου, καλύπτοντας τόσο τη δεξιά όσο και την αριστερή κοιλία. Η πρόσδεση και σταθεροποίηση του εμφυτεύματος πραγματοποιήθηκε με χρήση ράμματος, αλλά και χωρίς, όπως φαίνεται στην Εικόνα 46 (α & β). Προτιμήθηκε η εμφύτευση χωρίς τη χρήση ράμματος, ως ένας πιο εύκολος και γρήγορος τρόπος πρόσδεσης της μεμβράνης για τη λιγότερη δυνατή ταλαιπωρία του ζώου και την αποφυγή πρόκλησης αρρυθμιών (βραδυκαρδία).



**Εικόνα 46.** Πρόσδεση και σταθεροποίηση του εμφυτεύματος επικαρδιακά του μυοκαρδίου α) με τη χρήση ράμματος και β) χωρίς ράμμα.

Μετά την εμφύτευση της μεμβράνης, τοποθετήθηκε ράμμα 3-0 εκατέρωθεν των πλευρών του θώρακα, στο σημείο που είχε προκληθεί το χάσμα, για την καλύτερη πρόσδεσή τους. Πριν την εφαρμογή του τελευταίου ράμματος, γινόταν εξισορρόπηση της πίεσης από την τραχεία (για την απομάκρυνση του εγκλωβισμένου αέρα από τη θωρακική κοιλότητα). Τέλος, γινόταν συρραφή του δέρματος με τη χρήση ράμματος 2-0 και εφαρμογή αντιβιοτικών για την αποφυγή μολύνσεων στη χειρουργηθείσα περιοχή (Εικόνα 47).



**Εικόνα 47.** Συρραφή πλευρών θώρακα με τη χρήση ράμματος 3-0 (αριστερά) και δέρματος με τη χρήση ράμματος 2-0 (δεξιά).

## 2.1 Μακροσκοπική εξέταση εμφυτεύματος-ιστού

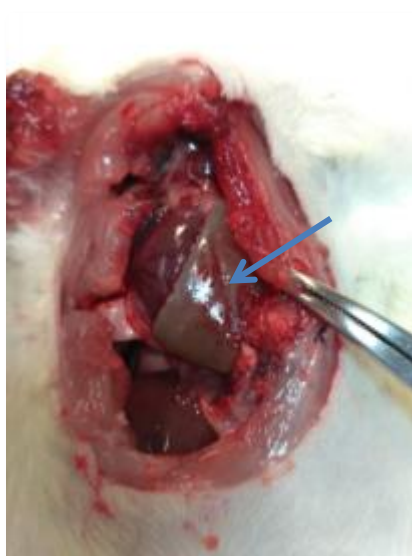
Τα εμφυτευόμενα βιοϋλικά εξετάστηκαν μακροσκοπικά, μετά από 7, 21 και 30 ημέρες εμφύτευσής τους (Ομάδα Α, Β, Γ, αντίστοιχα), με στόχο τον έλεγχο για τη σταθερότητά τους επικαρδιακά, την αποικοδόμησή τους, καθώς και την απόκριση του ιστού έναντι του εμφυτεύματος (δημιουργία συμφύσεων κλπ.). Τα αποτελέσματα συγκρίθηκαν με ζώα ομάδας ελέγχου και ομάδας εικονικής επέμβασης. Μετά από τα παραπάνω χρονικά διαστήματα παραμονής του εμφυτεύματος στον καρδιακό ιστό (ομοίως και τα για ζώα ομάδας ελέγχου και εικονικής επέμβασης), ακολούθησε ευθανασία, τηρώντας όλους τους κανόνες περί ευθανασίας των εργαστηριακών ζώων, σύμφωνα με την ευρωπαϊκή νομοθεσία.

### Πειραματικά ευρήματα

Στις ομάδες ελέγχου και εικονικής επέμβασης δεν παρατηρήθηκε κάποια αξιοσημείωτη αντίδραση του ιστού. Έτσι, τα αποτελέσματα για τις Ομάδες Α, Β και Γ, έχουν ως ακολούθως.

### **Ομάδα Α**

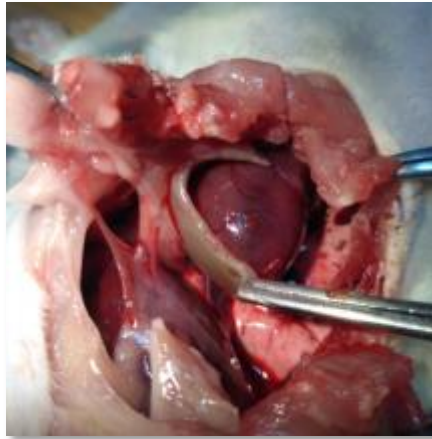
Μετά από 7 ημέρες εμφύτευσης, η μεμβράνη χιτοζάνης εντοπίστηκε στο μυοκάρδιο της δεξιάς κοιλίας ανέπαφη, χωρίς σημαντικές ενδείξεις αποικοδόμησής της. Επίσης, δεν ανιχνεύτηκαν συμφύσεις ή κάποια αντίδραση του ιστού στην περικαρδιακή κοιλότητα και επιφανειακά στους μύες του θώρακα. Τέλος, παρατηρείται ότι στις 7 ημέρες μετά την επέμβαση, η διαδικασία της επούλωσης του δέρματος έχει ήδη ξεκινήσει (Εικόνα 48).



**Εικόνα 48.** Εντοπισμός μεμβράνης χιτοζάνης 7 ημέρες μετά την εμφύτευση της (επάνω), χωρίς την ύπαρξη συμφύσεων στους θωρακικούς μύες (αριστερά), ενώ παρατηρείται η έναρξη της διαδικασίας επούλωσης του δέρματος (δεξιά).

### Ομάδα Β

Σύμφωνα με τον έλεγχο, στις 21 ημέρες εμφύτευσης, δεν παρατηρήθηκαν συμφύσεις ή καποια αντίδραση του μυοκαρδίου ή των γειτονικών ιστών. Το εμφύτευμα εντοπίζεται στη δεξιά κοιλία του καρδιακού μυ, φανερά, όμως, συρρικνωμένο, αποτελώντας ένδειξη για αποικοδόμηση και υποβάθμιση των ιδιοτήτων του υλικού (Εικόνα 49).



**Εικόνα 49.** Εντοπισμός εμφυτεύματος 21 ημέρες μετά την τοποθέτησή του επικαρδιακά, με σημαντικές ενδείξεις αποικοδόμησής του.

### Ομάδα Γ

Μετά από ένα μήνα αλληλεπίδρασης της μεμβράνης με το μυοκάρδιο, η μεμβράνη εντοπίστηκε στην επιφάνεια της δεξιάς κοιλίας, χωρίς την παρουσία συμφήσεων ή αντίδραση του ιστού, που δείχνει ότι υπήρχε ομαλή εξέλιξη, όσον αφορά στη συμβατότητα του εμφυτεύματος με τον ιστό. Παρόλα αυτά, το εμφύτευμα παρουσίασε αποικοδόμηση σε μεγάλο ποσοστό, καθώς και μεγάλο βαθμό συρρίκνωσης, τα οποία ήταν εμφανή και με απλή οπτική παρατήρηση. Συμφήσεις δεν παρατηρήθηκαν ούτε στους θωρακικούς μύες, ενώ είχε γίνει πλήρης επούλωση του δέρματος, χωρίς την ύπαρξη πληγής από τα ράμματα (Εικόνα 50).



**Εικόνα 50.** Εντοπισμός μεμβράνης 30 ημέρες μετά την τοποθέτησή της επικαρδιακά με μεγάλο ποσοστό συρρίκνωσης και αποικοδόμησης (επάνω), χωρίς την ύπαρξη συμφύσεων στους θωρακικούς μύες (αριστερά) και πλήρης επούλωση του δέρματος, χωρίς την ύπαρξη πληγής (δεξιά).

### Αξιολόγηση μακροσκοπικής εξέτασης

Τα αποτελέσματα από τις εμφυτεύσεις στα εργαστηριακά ζώα δίνουν σημαντικές πληροφορίες για τη βελτιστοποίηση των πειραμάτων σύνθεσης, αλλά και της τελικής σύστασης του βιοϋλικού. Η ίδια διαδικασία εμφύτευσης, όπως αναφέρθηκε παραπάνω, ακολουθήθηκε και για τις αρχικές μεμβράνες, η περιγραφή των οποίων έγινε στα προηγούμενα κεφάλαια. Συγκεκριμένα, δοκιμάστηκαν 4 διαφορετικές μεμβράνες (με κάποιες παραλλαγές), οι οποίες εμφυτεύθηκαν στα ζώα. Λαμβάνοντας υπόψιν, όλες τις δυσκολίες λόγω χειρουργικών και μεταχειρουργικών



επιπλοκών στα ζώα (π.χ. υπήρξαν περιπτώσεις όπου διαπιστώθηκε συρρίκνωση των πνευμόνων και προσκόλλησή τους επάνω στο μυοκάρδιο, ειδικά μετά την εμφύτευση των μεμβρανών) και αντιμετωπίζοντας προβλήματα διαφορετικής φύσης σε κάθε ζώο κάθε φορά, καταλήγουμε στο συμπέρασμα ότι η μεμβράνη χιτοζάνης CS\_MMW είναι η πιο κατάλληλη επιλογή για τη συγκεκριμένη ιατρική εφαρμογή, επειδή πληροί τα βασικά κριτήρια για το συγκεκριμένο ιατρικό πρωτόκολλο, δηλαδή εμφανίζει ευκολία στην εφαρμογή της στο μυοκάρδιο και έχει καλή βιολογική απόκριση. Σε ότι αφορά στο τελευταίο, η μελέτη αντίδραση ξένου σώματος, που παρουσιάζεται στη συνέχεια, μπορεί να το επιβεβαιώσει.

## 2.2 Φλεγμονώδης αντίδραση ξένου σώματος

Το στάδιο των *in vivo* πειραμάτων συμπεριλαμβάνει και τον έλεγχο της βιοσυμβατότητας της μεμβράνης χιτοζάνης και πραγματοποιείται μέσω της αντίδρασης ξένου σώματος. Οι αλληλεπιδράσεις μεταξύ βιοϋλικού και ιστού διαδραματίζουν σημαντικό ρόλο στην αντίδραση ξένου σώματος και την αξιολόγηση της βιοσυμβατότητας. Η αντίδραση ξένου σώματος συμβαίνει, υπό φυσιολογικές συνθήκες, από τον οργανισμό για να προστατευτεί από την παρουσία οποιουδήποτε ξένου σώματος. Είναι πολύ σημαντική η κατανόηση της αντίδρασης του εμφυτεύματος σε σχέση με τον ιστό του ξενιστή, καθώς και η αντίδραση του ξενιστή σε σχέση με το εμφύτευμα, για την καλύτερη αντιμετώπιση και την αποφυγή επιπλοκών στον οργανισμό ή ανεπάρκειας του εμφυτεύματος.

Υπάρχουν αρκετές μελέτες στην *in vivo* αξιολόγηση εμφυτευμάτων σε καρδιαγγειακούς ιστούς, όπως η χρήση βιοαποικοδομήσιμου, ελαστικού εμφυτεύματος από PEUU (polyester urethane urea), το οποίο χρησιμοποιήθηκε στη δεξιά κοιλία επίμυων για αντικατάσταση χειρουργικής βλάβης και επέδειξε μέτριο βαθμού έντασης φλεγμονώδη αντίδραση, χωρίς κάποια ένδειξη οξείας θρόμβωσης [151]. Επίσης, τα φυσικά υδροπηκτώματα χιτοζάνης έχουν μελετηθεί σε προηγούμενες εργασίες, όσον αφορά στη βιοσυμβατότητα και τη βιοαπορροφησιμότητά τους, σε ζωικό πρότυπο επίμου, ως καρδιακά εμφυτεύματα [79], υποδόρια εμφυτεύματα [105, 152], εμφυτεύματα για την επούλωση πληγών [104] και εμφυτεύματα για εφαρμογή στην ιστική μηχανική χόνδρου [153]. Σε γενικές γραμμές, όπως προκύπτει από τη βιβλιογραφία, έχει διαπιστωθεί ότι αυτά τα

υλικά προκαλούν ελάχιστη αντίδραση ξένου σώματος, ενώ στις περισσότερες περιπτώσεις δεν παρατηρείται σημαντική ινώδης ενθυλάκωση. Βραχυπρόθεσμα, παρατηρείται μια σημαντική συσσώρευση ουδετερόφιλων στη γειτονία των εμφυτευμάτων, αλλά διαλύεται άμεσα χωρίς να αναπτύσσεται χρόνια φλεγμονώδης αντίδραση. Η επίδραση της χιτοζάνης στα φλεγμονώδη κύτταρα μπορεί να διαδραματίσει σημαντικό ρόλο στην επαγωγή κυτταρικού πολλαπλασιασμού τοπικά και τελικά στην ενσωμάτωση του εμφυτευόμενου υλικού στον ιστό του ξενιστή.

### Προετοιμασία δειγμάτων για ιστολογική αξιολόγηση

Για τον *in vivo* έλεγχο της επίδρασης της μεμβράνης χιτοζάνης στο μυοκάρδιο χρησιμοποιήθηκαν συνολικά 15 επίμυες, οι οποίοι ταξινομήθηκαν σε 5 Ομάδες μελέτης, μετά από τυχαίοποιημένη κατηγοριοποίησή τους. Τα ζώα διαβίωσαν ένα ανά κλουβί και είχαν διατροφή υψηλής περιεκτικότητας σε φυτικές ίνες και νερό. Κάθε ζώο ζυγίζοταν κατά την άφιξη και κατά τη διάρκεια περιοδικών ελέγχων, όπου εξεταζόταν για στοιχεία επαρκούς σίτισης και δραστηριότητας. Οι ομάδες κατηγοριοποιήθηκαν ως εξής:

**Ομάδα Α:** Ελέγχου

**Ομάδα Β:** Εικονικής επέμβασης

**Ομάδα Γ:** 7 ημερών (μετά την εμφύτευση της μεμβράνης χιτοζάνης)

**Ομάδα Δ:** 21 ημερών (μετά την εμφύτευση της μεμβράνης χιτοζάνης)

**Ομάδα Ε:** 30 ημερών (μετά την εμφύτευση της μεμβράνης χιτοζάνης)

Η Ομάδα Α αναφέρεται σε επίμυες, στους οποίους αφαιρέθηκε ο καρδιακός ιστός, χωρίς να υποστούν κάποια άλλη παρέμβαση. Η Ομάδα Β αποτελείται από επίμυες που έχουν υποστεί εικονική επέμβαση, δηλαδή χωρίς την εμφύτευση μεμβράνης, ενώ οι Ομάδες Γ, Δ και Ε αφορούν σε επίμυες που τους έχει αφαιρεθεί ο καρδιακός μυς στις 7, 21 και 30 ημέρες, αντίστοιχα, μετά την επικαρδιακή εμφύτευση των μεμβρανών.

Η διαδικασία που ακολουθήθηκε για την προετοιμασία των δειγμάτων ήταν η εξής: Η καρδιά αφαιρέθηκε μετά του εμφυτευόμενου ικριώματος και ακολούθησε ο



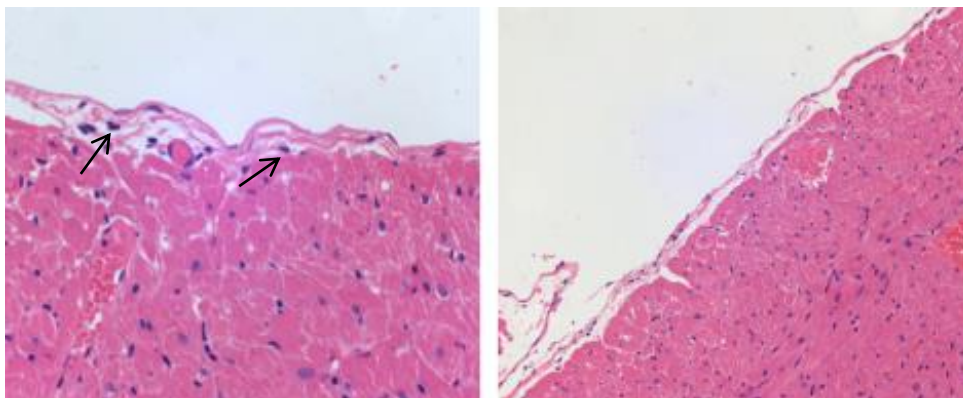
καθαρισμός της από το εγκλωβισμένο αίμα με φυσιολογικό ορό (έπειτα από καθετηριασμό της αορτής). Στη συνέχεια, οι ιστοί τοποθετήθηκαν σε ειδικά δοχεία που περιείχαν μονιμοποιητικό διάλυμα (10% v/v ουδέτερης φορμόλης) και ελήφθησαν εγκάρσιες τομές κατά τον κάθετο άξονα των κοιλιών, έτσι ώστε να μελετηθεί ολόκληρη η επικαρδιακή επιφάνεια που ερχόταν σε επαφή με τον εμφυτευόμενο ικρίωμα. Κατόπιν υπεβλήθησαν σε ειδική διαδικασία μονιμοποίησης, με διαδοχική αφυδάτωση σε αιθανόλη και ξυλόλιο και αφού βυθίστηκαν σε παραφίνη, παρασκευάστηκαν για ιστολογική εξέταση. Ελήφθησαν 3 συνεχόμενες τομές των 3-4 μm ανά ιστικό δείγμα, οι οποίες χρησιμοποιήθηκαν για την χρώση αιματοξυλίνης-ηωσίνης (H&E). Στη συνέχεια, πραγματοποιήθηκε, μορφολογική εκτίμηση για την διαβάθμιση των μορφολογικών αλλοιώσεων αντίδρασης ξένου σώματος-ίνωσης-σηματισμού ινώδους ιστού στην επικαρδιακή επιφάνεια των κοιλιών, υπό την παρουσία οπτικού μικροσκοπίου.

Η σύγκριση έγινε μεταξύ των αποτελεσμάτων των Ομάδων Α, Β, Γ, Δ και Ε για να αξιολογηθεί μορφολογικά η βιοσυμβατότητα του ικριώματος μέσω της έντασης της αντίδρασης ξένου σώματος-ίνωσης-σηματισμού ινώδους ιστού, σε διαφορετικά χρονικά διαστήματα εμφύτευσης (7, 21 και 30 ημερών).

### Ιστολογικά ευρήματα κατά την επικαρδιακή επιφάνεια

#### **Ομάδα Α**

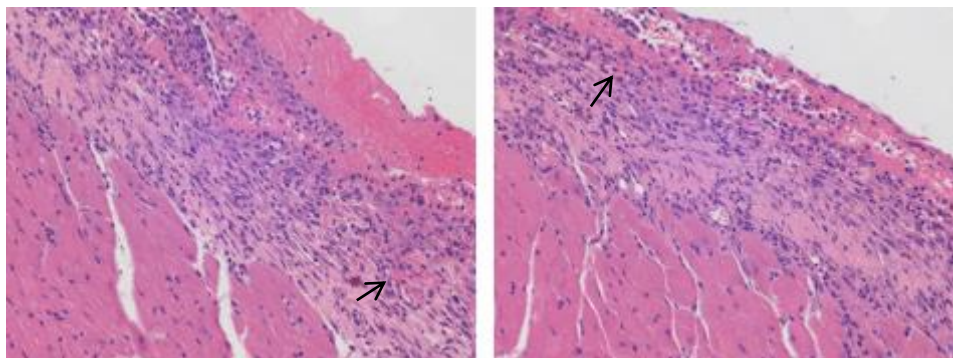
Στην Ομάδα ελέγχου το επικάρδιο υφίσταται φυσιολογική επικαρδιακή επικάλυψη, από πεπλατυσμένα μεσοθηλιακά κύτταρα, με φυσιολογική υποεπικαρδιακή στοιβάδα (μικρή ποσότητα χαλαρού συνδετικού ιστού) και παρουσία φυσιολογικού αριθμού μαστοκυττάρων (Εικόνα 51).



**Εικόνα 51.** Χαρακτηριστικές εικόνες επικάλυψης από μεσοθηλιακά κύτταρα σε φυσιολογικό επικάρδιο.

### Ομάδα Β

Στα εργαστηριακά ζώα που έχουν υποστεί εικονική επέμβαση, απομονώθηκε ο καρδιακός ιστός, μετά το πέρας των 7 ημερών και αναγνωρίστηκε κατά την επικαρδιακή επιφάνεια, μικρού έως και μετρίου βαθμού έντασης φλεγμονώδης αντίδραση, αποτελούμενη από λεμφοκύτταρα, μακροφάγα και αρκετά ουδετερόφιλα πολυμορφοπύρρηνα λευκοκυττάρα, κυρίως πλησίον αιμορραγικών διαποτίσεων (Εικόνα 52).

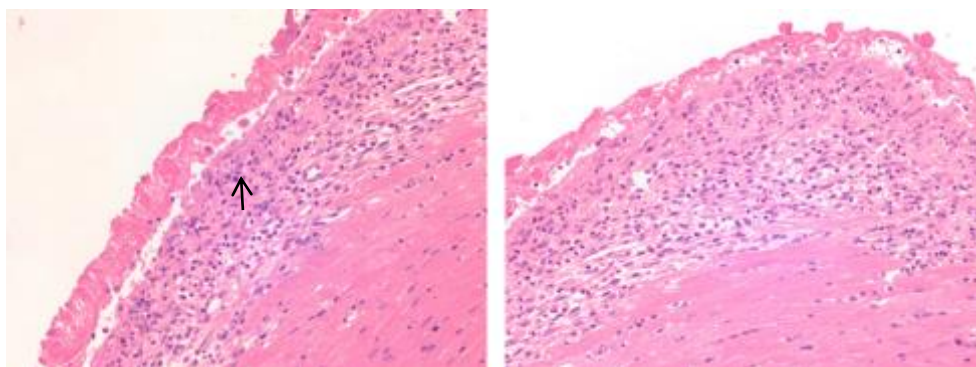


**Εικόνα 52.** Χαρακτηριστικές εικόνες φλεγμονώδους αντίδρασης στην επιφάνεια του επικαρδίου, 7 ημέρες μετά την εικονική επέμβαση.

### Ομάδα Γ

Η πιο συνηθισμένη *in vivo* αντίδραση του εμφυτεύματος χιτοζάνης είναι η φλεγμονώδης αντίδραση με την ύπαρξη των πολυμορφοπύρρηνων κυττάρων, κυρίως ουδετερόφιλων [154]. Αυτό επιβεβαιώνεται τις πρώτες 7 ημέρες μετά την επαφή του επικαρδίου με τη χιτοζάνη, όπου παρατηρείται κατά την επικαρδιακή επιφάνεια, μικρού βαθμού έντασης φλεγμονώδης αντίδραση, αποτελούμενη κυρίως από

μακροφάγα εντοπιζόμενα προς τις ανώτερες στοιβάδες σε άμεση επαφή με το εμφυτευόμενο ικρίωμα και λιγότερα ουδετερόφιλα πολυμορφοπύρηννα λευκοκύτταρα. Στοιχεία νέκρωσης δεν αναγνωρίστηκαν (Εικόνα 53). Η δραστικότητα των ουδετερόφιλων κυττάρων εξαρτάται από το βαθμό αποακετυλίωσης της χιτοζάνης. Η μερικώς αποακετυλιωμένη χιτοζάνη (50–92% DDA) [155, 156], όπως αυτή που χρησιμοποιείται στην παρούσα μελέτη, εμφανίζει μικρή *in vivo* αλληλεπίδραση, προκαλώντας μικρής έντασης και ελεγχόμενου βαθμού προσέλκυσης των ουδετερόφιλων, όταν εμφυτεύεται ως φυσικά σχηματιζόμενο προϊόν σε διάφορες μορφές, σε σύγκριση με το μεγαλύτερο βαθμό έντασης των ουδετερόφιλων που εμφανίζονται στην Ομάδα Β. Γενικά, τα ουδετερόφιλα πολυμορφοπύρηννα κύτταρα παρατηρείται ότι αλληλεπιδρούν με τη χιτοζάνη ανεξάρτητα από την περιοχή της εμφύτευσης [157]. Αυτό σημαίνει ότι τα ουδετερόφιλα αναγνωρίζουν το φυσικό πολυσακχαρίτη χιτοζάνης, ακόμα και αν δεν προϋπάρχει κάποια βλάβη στον ιστό.

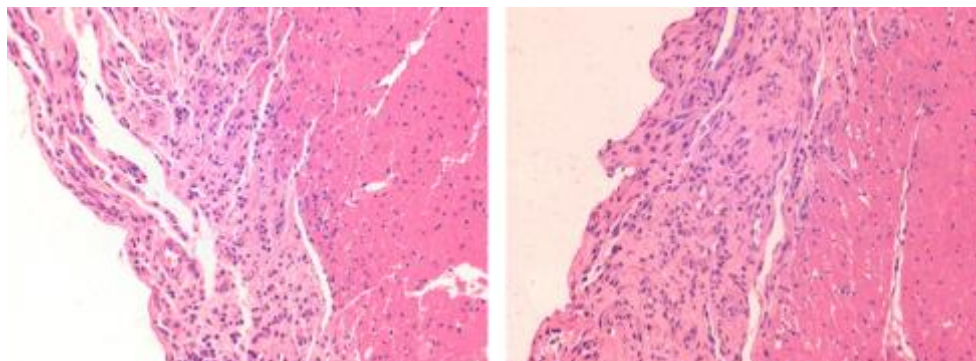


**Εικόνα 53.** Χαρακτηριστικές εικόνες μικρού βαθμού έντασης φλεγμονώδους αντίδρασης στην επιφάνεια του επικαρδίου αποτελούμενη κυρίως από μακροφάγα, 7 ημέρες μετά την αλληλεπίδρασή του με το εμφύτευμα.

#### Ομάδα Δ

Στις 21 ημέρες μετά την εμφύτευση του βιοϋλικού, παρατηρείται μείωση των φλεγμονωδών στοιχείων στο επικάρδιο, με υπεροχή της ινοβλαστικής αντίδρασης και παρουσία μέτριου αριθμού νεόπλαστων αγγείων, άφθονων μακροφάγων και σπάνιων ουδετεροφίλων πολυμορφοπύρηννων λευκοκυττάρων (Εικόνα 54). Πρόκειται για στοιχεία που υποδηλώνουν την καλύτερη δυνατή-λειτουργική εξέλιξη της φλεγμονώδους αντίδρασης έναντι του εμφυτευόμενου ικριώματος, με

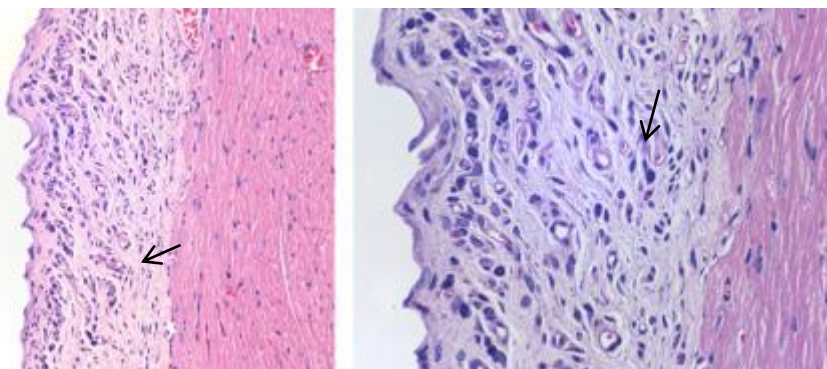
δημιουργία αγγειοβριθούς φλεγμονώδους κοκκιώδους ιστού, χωρίς στοιχεία νέκρωσης.



**Εικόνα 54.** Χαρακτηριστικές εικόνες μείωσης των φλεγμονωδών στοιχείων στο επικάρδιο, με υπεροχή της ινοβλαστικής αντίδρασης και παρουσία νεόπλαστων αγγείων, 21 ημέρες μετά την επαφή του με το εμφύτευμα.

### Ομάδα Ε

Στις 30 ημέρες μετά την επικαρδιακή εμφύτευση, το υδροπηκτώμα σε μορφή μεμβράνης ήταν ορατό στην επιφάνεια του επικαρδίου με μερική αποικοδόμηση, η οποία ήταν ορατή σε μακροσκοπικό επίπεδο. Τα αποτελέσματα αυτά συμφωνούν και με τη βιβλιογραφία [79], ενώ αξίζει να σημειωθεί η αισθητή μείωση των φλεγμονωδών στοιχείων, με υπεροχή των νεόπλαστων αγγείων (αγγειοβριθής κοκκιώδης φλεγμονώδης ιστός), σε ένα υπόστρωμα αποτελούμενο κυρίως από χαλαρό συνδετικό ιστό, που φαίνεται να οδηγεί σε πλήρη ομαλή-λειτουργική εξέλιξη της φλεγμονώδους αντίδρασης έναντι του εμφυτευόμενου ικριωμάτος, χωρίς την παρουσία πυκνού κολλαγονοποιημένου ιστού, όπως φαίνεται στην Εικόνα 55.



**Εικόνα 55.** Χαρακτηριστικές εικόνες υπεροχής των νεόπλαστων αγγείων σε ένα υπόστρωμα χαλαρού συνδετικού ιστού, 30 ημέρες μετά την επικαρδιακή εμφύτευση του υλικού.

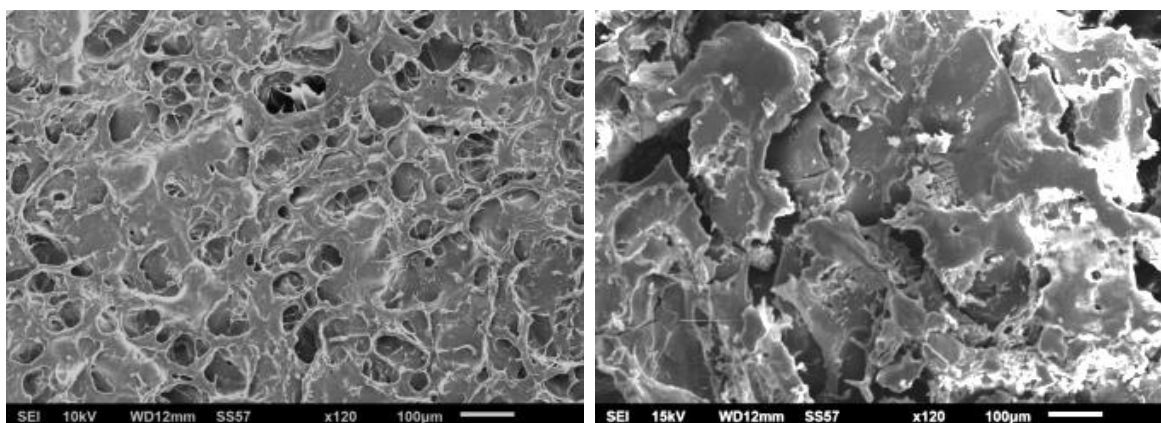
### Ιστολογική αξιολόγηση

Με βάση τη μορφολογική αξιολόγηση που πραγματοποιήθηκε από παθολογοανατόμο που δεν γνώριζε τους χειρισμούς που έγιναν στα ζώα και αφορούσε στην ανεύρεση και ημιποσοτική βαθμονόμηση της α) φλεγμονώδους αντίδρασης, β) της παρουσίας στοιχείων ενεργότητας της φλεγμονής, γ) των αιμορραγικών διαποτίσεων ή/και νεκρώσεων, δ) της ινοβλαστικής αντίδρασης, και ε) της αγγειογένεσης σε κάθε χρονικό στάδιο (κατά την 7<sup>η</sup>, 21<sup>η</sup> και 30<sup>η</sup> ημέρα από την εμφύτευση του ικρίωματος), συμπεραίνεται ότι παρατηρήθηκε η καλύτερη δυνατή εξέλιξη, ως απόκριση στο εμφυτευόμενο ικρίωμα της μεμβράνης χιτοζάνης. Η «άμεση» δομική και λειτουργική αλληλεπίδραση του επικαρδίου με το εμφυτευόμενο ικρίωμα, αποδεικνύεται από τη σημαντική μείωση των φλεγμονωδών στοιχείων και την εμφανή αύξηση των νέων αγγείων σε ένα χαλαρό υπόστρωμα, που προσομοιάζει αυτό της φυσιολογικής υποεπικαρδιακής στοιβάδας (4<sup>η</sup> εβδομάδα).

### 3. ΜΟΡΦΟΛΟΓΙΚΟΣ ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΜΟΣ ΔΙΕΠΙΦΑΝΕΙΑΣ ΜΕΜΒΡΑΝΗΣ-ΜΥΟΚΑΡΔΙΟΥ

Η βιοαποδοχή της μεμβράνης της χιτοζάνης στο μυοκάρδιο, ανέδειξε αμέσως το μεγάλο ενδιαφέρον που έχει η διερεύνηση της μορφολογίας του εμφυτεύματος και του καρδιακού ιστού, μετά τη μεταξύ τους αλληλεπίδραση. Για το λόγο αυτό, πραγματοποιήθηκε μορφολογικός χαρακτηρισμός της μικροδομής των μεμβρανών και του επικαρδίου, δύο και επτά ημέρες μετά την εμφύτευση, μέσω της ηλεκτρονικής μικροσκοπίας σάρωσης (SEM). Η προετοιμασία των δειγμάτων και οι συνθήκες που εφαρμόστηκαν αναφέρονται αναλυτικά στο παράρτημα 2.6.

Αρχικά, οι εικόνες SEM που ελήφθησαν από τις λυοφιλοποιημένες μεμβράνες, έδειξαν την ύπαρξη μεγάλων μορφολογικών διαφορών στην επιφάνειά τους, όσο αυξάνεται το χρονικό διάστημα εμφύτευσης (Εικόνα 56). Παρατηρείται ότι η ύπαρξη των πόρων ελαχιστοποιείται στις 7 ημέρες αλληλεπίδρασης και η μικροδομή που προκύπτει διαφέρει σημαντικά από τη μικροδομή των 2 ημερών, αλλά και από την αρχική μικροδομή της μεμβράνης, πριν την εμφύτευση (βλέπε Εικόνα 26). Αυτό σημαίνει ότι λαμβάνουν χώρα σημαντικές αλληλεπιδράσεις μεταξύ υλικού και μυοκαρδίου που οδηγούν σε αυτές τις αλλαγές και διαμορφώνουν τις συγκεκριμένες μικροδομές.

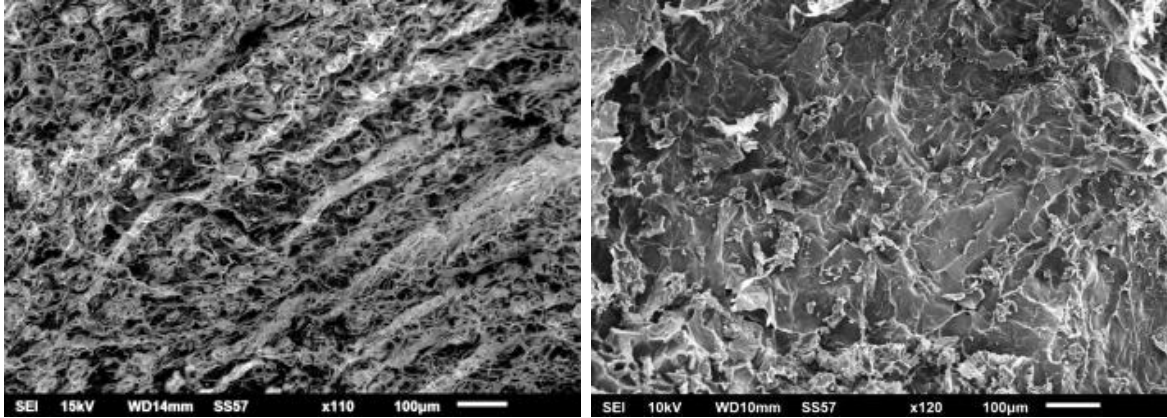


**Εικόνα 56.** Μικροδομή λυοφιλοποιημένων δειγμάτων μεμβρανών χιτοζάνης, δύο (αριστερά) και επτά ημέρες (δεξιά) μετά την εμφύτευση τους επικαρδιακά

Στη συνέχεια, πραγματοποιήθηκε η παρατήρηση της μικροδομής της εξωκυττάριας μήτρας της δεξιάς κοιλίας του μυοκαρδίου, πριν την αλληλεπίδραση και μετά την αλληλεπίδρασή της με τη μεμβράνη (Εικόνα 57). Παρατηρείται αλλαγή

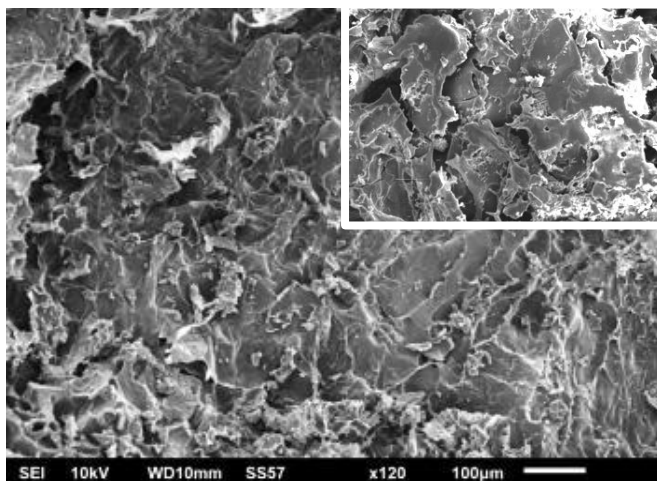


στη μορφολογία της δομής της ECM μετά την επαφή της με τη μεμβράνη, χωρίς την ύπαρξη ορατών πόρων στην επιφάνεια και εμφανίζοντας μια πιο συμπαγή μορφή.



**Εικόνα 57.** Μικροδομή λυοφιλοποιημένων δειγμάτων της εξωκυττάριας μήτρας (ECM) του ιστού επίμυων, πριν (αριστερά) και μετά την αλληλεπίδραση με τη μεμβράνη χιτοζάνης (δεξιά).

Τέλος, αξίζει να σημειωθεί η δομική ομοιότητα που παρατηρείται μεταξύ της εξωκυττάριας μήτρας του μυοκαρδίου και της δομής της χιτοζάνης, μετά την αλληλεπίδραση του επικαρδίου επίμου με την επιφάνεια της χιτοζάνης με την οποία ήρθε σε επαφή (Εικόνα 58). Ο πολυσακχαρίτης της χιτοζάνης είναι δομικά όμοιος με τις γλυκοζαμινογλυκάνες, οι οποίες αποτελούν το κύριο συστατικό της εξωκυττάριας μήτρας που βρίσκεται στους ιστούς [158]. Η εξωκυττάρια μήτρα παίζει σπουδαίο ρόλο στη σωστή λειτουργία των κυττάρων, καθώς και στη συνολική φυσιολογική λειτουργία του ιστού. Συνεπώς, η ομοιότητα αυτή αποτελεί ένα πολύ σημαντικό εύρημα, αφού υποδηλώνει ότι η μεμβράνη μετά την εμφύτευσή της, μιμείται το φυσικό ιστό. Αυτό αποτελεί ένα ισχυρό επιχείρημα για την επιλογή της χιτοζάνης ως βιοϋλικό για χρήση στο μυοκάρδιο.



**Εικόνα 58.** Μορφολογία δείγματος ECM, μετά την αλληλεπίδρασή της με τη μεμβράνη. Στη μικρή εικόνα φαίνεται συγκριτικά, η μικροδομή λυοφιλοποιημένης μεμβράνης χιτοζάνης, 7 ημέρες μετά την εμφύτευσή της.



#### 4. ΦΥΣΙΚΟΧΗΜΙΚΗ ΜΕΛΕΤΗ ΔΙΕΠΙΦΑΝΕΙΑΣ ΜΕΜΒΡΑΝΗΣ – ΜΥΟΚΑΡΔΙΟΥ

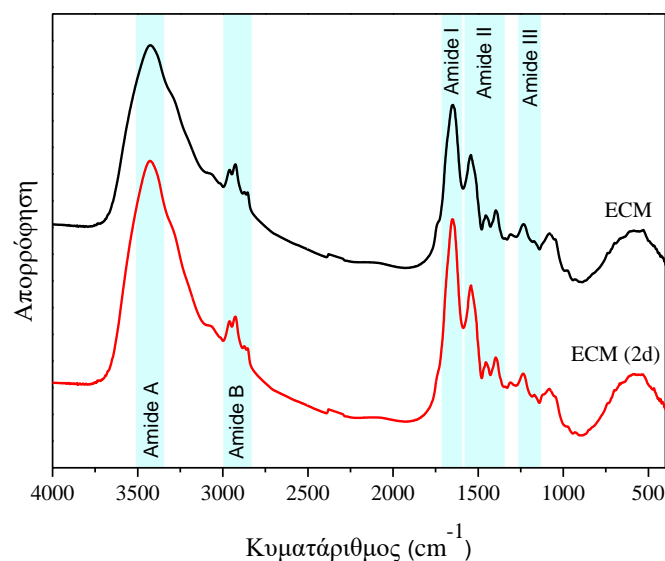
Τα πειραματικά αποτελέσματα που προέκυψαν μετά την ολοκλήρωση των σταδίων του *in vitro* και *in vivo* ελέγχου, ήταν ιδιαίτερος θετικά για την χιτοζάνη ως εμφύτευμα. Λαμβάνοντας υπόψη και και τη μεγάλη ομοιότητα στη μορφολογία και μικροδομή της χιτοζάνης και της εξωκυττάριας μήτρας του μυοκαρδίου, κρίθηκε απαραίτητη και η διερεύνηση των φυσικοχημικών χαρακτηριστικών των μεμβρανών αυτών μετά την εμφύτευσή τους στο επικάρδιο, καθώς και η αλληλεπίδραση που αναπτύσσεται μεταξύ του εμφυτευόμενου υλικού και του επικαρδίου. Για το λόγο αυτό, εξετάστηκε αρχικά η δομή των μεμβρανών αλλά και του ιστού μετά από τη μεταξύ τους επαφή, μέσω της φασματοσκοπίας FT-IR και στη συνέχεια εξετάστηκε η διεπιφάνεια μεμβράνης-ιστού, μέσω της φασματοσκοπίας XPS (πειραματική μελέτη) και μέσω της θεωρίας συναρτησιακών της ηλεκτρονιακής πυκνότητας (DFT) (θεωρητική μελέτη).

Στα πειράματα FT-IR και XPS χρησιμοποιήθηκαν δείγματα μεμβράνης και εξωκυττάριας μήτρας μυοκαρδίου (ECM), όπως ακριβώς αναφέρονται στην προηγούμενη παράγραφο 3, δηλαδή μετρήσεις σε μεμβράνη χιτοζάνης και ECM ως έχουν και μετά από διαχωρισμό της διεπιφάνειάς τους μετά από την πάροδο συγκεκριμένου χρονικού διαστήματος εμφύτευσης. Η δε προετοιμασία των δειγμάτων έγινε όπως απαιτεί η κάθε μέθοδος χαρακτηρισμού και περιγράφεται στο Παράρτημα 2.

##### 4.1 Φασματοσκοπία υπερύθρου

Τα φάσματα απορρόφησης υπερύθρου για την εξωκυττάρια μήτρα της δεξιάς κοιλίας, πριν και μετά την επαφή της με τη μεμβράνη, στην περιοχή  $400-4000\text{ cm}^{-1}$  παρουσιάζονται στην Εικόνα 59. Δεν υπάρχουν διαφορές μεταξύ τους. Η ζώνη απορρόφησης amide A σχετίζεται με τη δόνηση τάσης του  $-\text{NH}$ , συζευγμένη με δεσμούς υδρογόνου, καθώς και με τη δόνηση τάσης των O-H. Η κορυφή αυτή αναμένεται βιβλιογραφικά στα  $3400-3440\text{ cm}^{-1}$  και ταυτοποιείται πειραματικά στα  $3426\text{ cm}^{-1}$ . Οι κορυφές της ζώνης amide B εντοπίζονται στα  $2927$  και  $2870\text{ cm}^{-1}$  και αντιστοιχούν σε ασύμμετρες και συμμετρικές δονήσεις τάσης  $-\text{CH}_2$ , αντίστοιχα. Οι κύριες απορροφήσεις στα φάσματα των ιστών, όπως και του μυοκαρδίου,

βρίσκονται στις ζώνες amide I, II και III. Η ζώνη απορρόφησης amide I ( $1600-1700\text{ cm}^{-1}$ ) προκύπτει από τις δονήσεις τάσης του αμιδίου  $\text{-C=O}$  στα  $1648\text{ cm}^{-1}$ , ενώ η ζώνη amide II είναι πιο περίπλοκη, αφού προκύπτει από δονήσεις κάμψης  $\text{-NH}$  (60%), συζευγμένες με δονήσεις τάσης  $\text{-C-N}$  (40%) στα  $1546\text{ cm}^{-1}$ . Στη ζώνη amide II, περιλαμβάνονται επίσης άλλες δύο κορυφές στα  $1456$  και  $1398\text{ cm}^{-1}$  που αντιστοιχούν σε δονήσεις κάμψης του  $\text{-CH}_2$  και συμμετρικές δονήσεις κάμψης του  $\text{-CH}_3$ , αντίστοιχα. Τόσο η ζώνη απορρόφησης amide I, όσο και η amide II, λόγω της ιδιαίτερης διαμόρφωσής τους, χρησιμοποιούνται για τον προσδιορισμό της δευτεροταγούς δομής της πρωτεΐνης. Η φασματοσκοπία υπερύθρου, λόγω της δυνατότητας λήψης πολλαπλών φασμάτων και υπολογισμού του μέσου όρου τους, μπορεί να παρέχει ταυτόχρονα πληροφορίες σχετικά με όλες τις πρωτεΐνες που βρίσκονται στον ιστό. Επομένως, είναι αδύνατον τα φάσματα να εμφανίζουν συγκεκριμένες απορροφήσεις των αμιδίων σε συγκεκριμένες δευτεροταγείς δομές της κάθε πρωτεΐνης ξεχωριστά. Παρόλα αυτά, η εμφάνιση του amide I στα  $\sim 1650\text{ cm}^{-1}$  (μέγιστο) στον καρδιακό ιστό των αρουραίων, υποδηλώνει ότι οι πρωτεΐνες του ιστού υιοθετούν μία διαμόρφωση  $\alpha$ -έλικας [159]. Αυτό επιβεβαιώνεται και από τη χαρακτηριστική κορυφή της ζώνης amide II στα  $1546\text{ cm}^{-1}$ . Η ζώνη του amide III αποτελείται από δύο βασικές κορυφές. Η πρώτη κορυφή βρίσκεται στα  $1233\text{ cm}^{-1}$  και σχετίζεται με τη δόνηση κάμψης του  $\text{-NH}$ , τη δόνηση τάσης του  $\text{C-N}$  και τη δόνηση τάσης  $\text{-C-H}$ , ενώ η δεύτερη στα  $1177\text{ cm}^{-1}$  αντιπροσωπεύει τη δόνηση τάσης του  $\text{C-O}$ . Η απορρόφηση στα  $1081\text{ cm}^{-1}$  οφείλεται στη συμμετρική δόνηση τάσης του  $\text{PO}_2^-$ , εξαιτίας των νουκλεϊκών οξέων και λόγω ελάχιστων συνεισφορών από τις ομάδες  $\text{PO}_2^-$  των φωσφολιπιδίων της κυτταρικής μεμβράνης [160, 161]. Τέλος, η κορυφή στα  $\sim 600\text{ cm}^{-1}$  οφείλεται σε δονήσεις τάσης σκελετού. Οι τύποι δονήσεων του φάσματος IR για τον ιστό της δεξιάς κοιλίας αναφέρονται συνοπτικά στον Πίνακα 8.

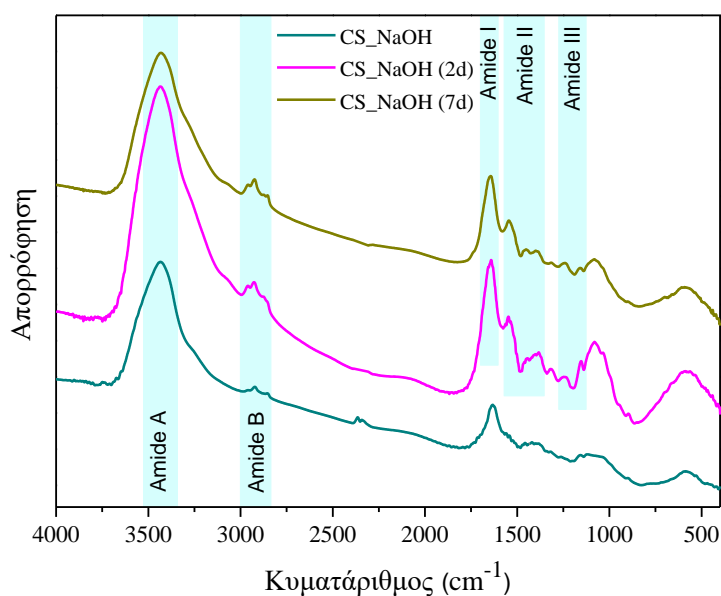


**Εικόνα 59.** Φάσματα FT-IR της ECM της δεξιάς κοιλίας, πριν και μετά την επαφή της με τη μεμβράνη.

**Πίνακας 8.** Χαρακτηριστικές ζώνες απορρόφησης και τύποι δονήσεων του φάσματος της ECM της δεξιάς κοιλίας.

ECM Κυματάριθμος (cm <sup>-1</sup> )	Ζώνες απορρόφησης	Τύποι δονήσεων
3426	Amide A	δόνηση τάσης -NH δόνηση τάσης O-H
2927	Amide B	δόνηση τάσης -CH <sub>2</sub> (ασύμμετρη)
2870		δόνηση τάσης -CH <sub>2</sub> (συμμετρική)
1648	Amide I	δόνηση τάσης -C=O
1546	Amide II	δόνηση κάμψης -NH δόνηση τάσης -C-N
1456		δόνηση κάμψης -CH <sub>2</sub>
1398		δόνηση κάμψης -CH <sub>3</sub>
1233	Amide III	δόνηση κάμψης -NH δόνηση τάσης -C-N δόνηση τάσης -C-H
1177		δόνηση τάσης -C-O
1081		δόνηση τάσης PO <sub>2</sub> <sup>-</sup>
~600		δόνηση τάσης σκελετού

Στην Εικόνα 60 παρουσιάζονται τα φάσματα της μεμβράνης χιτοζάνης, δύο και επτά ημέρες μετά την εμφύτευσή της επικαρδιακά, σε σύγκριση με το φάσμα της χιτοζάνης πριν την εμφύτευση, το οποίο μελετήθηκε στην Ενότητα III-2 (παρ. 2.2.2). Αρχικά, παρατηρούμε ότι τα δύο φάσματα μετά την εμφύτευση είναι όμοια μεταξύ τους και εμφανίζουν τις ίδιες χαρακτηριστικές κορυφές στις ζώνες απορρόφησης των amide A, amide B, amide I, amide II και amide III (Πίνακας 9). Συγκριτικά με το φάσμα της αρχικής μεμβράνης αξίζει να σημειωθεί η μετατόπιση των ζωνών amide I, II και III, η οποία οφείλεται στην αλληλεπίδραση με την εξωκυττάρια μήτρα και τη συνεχή αποπρωτονίωση των αμινομάδων. Επίσης, πολύ σημαντική θεωρείται και η ύπαρξη μιας νέας χαρακτηριστικής κορυφής στα  $1545\text{ cm}^{-1}$ , η οποία ανήκει στη ζώνη amide II και αντιστοιχεί σε δονήσεις κάμψης -NH και δονήσεις τάσης C-N. Αυτή η κορυφή υποδηλώνει την αλληλεπίδραση και το σχηματισμό δεσμών υδρογόνου μεταξύ των αλυσιδών της χιτοζάνης και των πρωτεϊνών της ECM. Τέλος, πιο ισχυρές εμφανίζονται και οι κορυφές που αντιστοιχούν σε δονήσεις τάσης C-O-C του γλυκοζιδικού δεσμού στα δύο φάσματα (στα  $1154$  και  $1160\text{ cm}^{-1}$ , αντίστοιχα), καθώς και οι κορυφές στα  $1081$  και  $1082\text{ cm}^{-1}$  που αντιστοιχούν σε δονήσεις τάσης του σκελετού πυρανόζης, επικαλυπτόμενες με τις δονήσεις τάσης του  $\text{PO}_2^-$ , εξαιτίας των νουκλεϊκών οξέων και των φωσφολιπιδίων της κυτταρικής μεμβράνης.



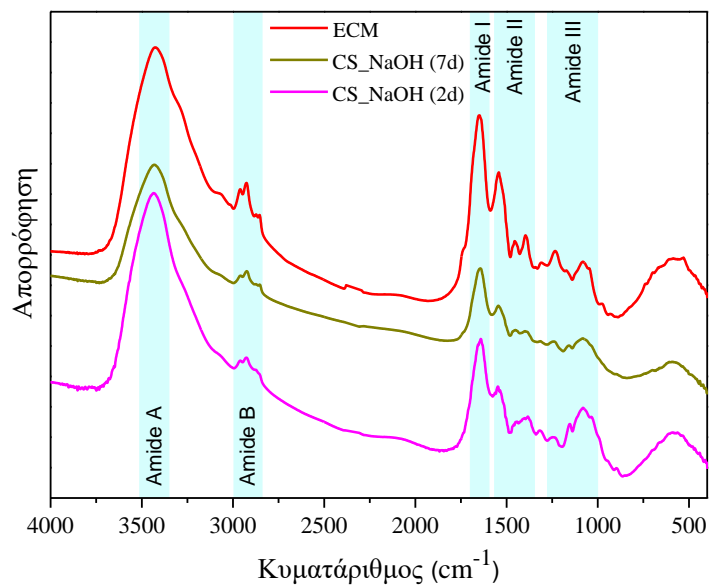
**Εικόνα 60.** Φάσματα FT-IR των μεμβρανών χιτοζάνης δύο και επτά ημέρες μετά την εμφύτευσή τους σε σύγκριση με το φάσμα χιτοζάνης πριν εμφυτευτεί.

**Πίνακας 9.** Χαρακτηριστικές ζώνες απορρόφησης και τύποι δονήσεων των φασμάτων των μεμβρανών χιτοζάνης, δύο και επτά ημέρες μετά την εμφύτευση τους.

CS_NaOH(2d) Κυματάρθμος (cm <sup>-1</sup> )	CS_NaOH(7d) Κυματάρθμος (cm <sup>-1</sup> )	Ζώνες απορρόφησης	Τύποι δονήσεων
3437	3433	Amide A	δόνηση τάσης -NH δόνηση τάσης O-H
2928	2924	Amide B	ασύμμετρη δόνηση τάσης - CH <sub>2</sub>
2872	2872		συμμετρική δόνηση τάσης - CH <sub>2</sub>
1641	1647	Amide I	δόνηση τάσης -C=O
1545	1545	Amide II	δόνηση κάμψης -NH δόνηση τάσης C-N
1443	1455		δόνηση κάμψης -CH <sub>2</sub>
1390	1397		δόνηση κάμψης -CH <sub>3</sub>
1241	1238	Amide III	δόνηση κάμψης -NH δόνηση τάσης -C-N δόνηση τάσης -C-H
1154	1160		δόνηση τάσης C-O-C του γλυκοζιδικού δεσμού
1081	1082		δόνηση τάσης σκελετού πυρανόξης δόνηση τάσης PO <sub>2</sub> <sup>-</sup>
~600	~600		δόνηση τάσης σκελετού

Στην Εικόνα 61 παρουσιάζονται συγκριτικά τα φάσματα απορρόφησης της ECM και της χιτοζάνης σε δύο διαφορετικά χρονικά διαστήματα μετά την εμφύτευση της. Αυτό που αξίζει να σημειωθεί είναι ότι υπάρχει πλήρης ταύτιση των τριών φασμάτων, τα οποία εμφανίζουν τις ίδιες χαρακτηριστικές κορυφές στις ζώνες απορρόφησης των amide A, amide B, amide I, amide II και amide III. Αυτή η διαπίστωση είναι πολύ σημαντική, καθώς ενισχύει τα αποτελέσματα απο το μορφολογικό χαρακτηρισμό που προηγήθηκαν (παρ.3) και επιβεβαιώνει τη θεωρία ότι το εμφύτευμα θα πρέπει να έχει δομική ομοιότητα με την εξωκυττάρια μήτρα του

οργάνου που ερχεται σε επαφή, η οποία ευνοεί τη φυσιολογική λειτουργία των κυττάρων, την ανάπτυξη και τον πολλαπλασιασμό τους [70].



**Εικόνα 61.** Φάσματα FT-IR της ECM και της χιτοζάνης, δύο και επτά ημέρες μετά την εμφύτευσή της.

## 4.2 Φασματοσκοπία XPS

Η χημική σύσταση της διεπιφάνειας της μεμβράνης χιτοζάνης και της εξωκυττάριας μήτρας (ECM) του επικαρδίου που έρχεται σε επαφή με τη μεμβράνη, προσδιορίστηκε ποιοτικά και ποσοτικά, μέσω της φασματοσκοπίας φωτοηλεκτρονίων ακτίνων X, με απώτερο στόχο τη μελέτη των αλληλεπιδράσεων που αναπτύσσονται μεταξύ τους. Συγκεκριμένα, μελετήθηκαν δείγματα από εμπορική σκόνη χιτοζάνης (MMW), μεμβράνη χιτοζάνης, καθώς και η διεπιφάνεια μεμβράνης χιτοζάνης και καρδιακού ιστού, μετά την αλληλεπίδρασή και το διαχωρισμό τους. Η προετοιμασία των δειγμάτων αναφέρεται στο παράρτημα 2.11. Τα πειράματα έγιναν στο εργαστήριο που είναι εγκατεστημένο το όργανο του XPS στο Τμήμα Φυσικής του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων με την ευγενική συνεργασία του Καθηγητή κ. Γ. Ευαγγελάκη.

Για την καλύτερη παρακολούθηση του κειμένου, η χημική σύσταση, καθώς και τα ποσοστά συνεισφοράς των χαρακτηριστικών ομάδων της επιφάνειας των δειγμάτων που εξετάστηκαν με τη φασματοσκοπία XPS αναφέρονται συνοπτικά στον Πίνακα 10. Για τους υπολογισμούς αυτούς ήταν απαραίτητη η απομόνωση (deconvolution) και η ολοκλήρωση των εμβαδών των κορυφών των φασμάτων XPS που έγινε με χρήση ειδικού λογισμικού.

Αρχικά, καταγράφηκαν τα φάσματα XPS των δειγμάτων χιτοζάνης σε μορφή σκόνης, της μεμβράνης από υδροπήκτωμα χιτοζάνης και των μεμβρανών χιτοζάνης, δύο και επτά ημέρες μετά την επικαρδιακή τους εμφύτευση. Το φάσμα ευρείας σάρωσης των δειγμάτων αυτών επιβεβαίωσε την ύπαρξη των στοιχείων του άνθρακα, οξυγόνου και του αζώτου. Έτσι, τα δείγματα μελετήθηκαν για τις περιοχές του C1s (Εικόνα 62), O1s (Εικόνα 63) και N1s (Εικόνα 64).

**Πίνακας 10.** Ποιοτικός και ποσοτικός προσδιορισμός της χημικής σύστασης των δειγμάτων *CS\_powder*, *CS\_NaOH*, *CS\_NaOH (2d)*, *CS\_NaOH (7d)*, *ECM* και *ECM (2d)*.

Δείγματα		Χαρακτηριστική ομάδα	Δεσμική ενέργεια (eV)	% Συνεισφορά χαρακτηριστικών ομάδων	% Ατομικά ποσοστά	
<b>CS_powder</b>	C1s	C-C, C-H	284.5	50.8%	72%	
		C-O-C, N-C=O	288.3	37.4%		
		O-C=O	289.8	11.8%		
	O1s	COO <sup>-</sup>	528.5	8.9%	26%	
		N-C=O	531.9	30.7%		
		C-O	533.3	11.3%		
		O-H	536.1	49.1%		
	N1s	NH <sub>2</sub>	399	75.6%	2%	
		N-C=O	401.5	24.4%		
	<b>CS_NaOH</b>	C1s	C-C, C-H	284.5	25.2%	71.4%
O-C=O			288.8	42.1%		
COO <sup>-</sup>			290.7	27.3%		
N-C=O			292.8	5.4%		
O1s		N-C=O	531.7	18.3%	24.6%	
		O-H	536.7	81.7%		
N1s		N-C=O, NH <sub>2</sub> NH <sub>3</sub> <sup>+</sup>	399.1	84.8%	4%	
			401			15.2%
<b>CS_NaOH (2d)</b>		C1s	C-C, C-H	284.5	67.1%	75.8%
			C-N	285.7	25.7%	
	C-O-C, N-C=O		287.9	7.2%		
	O1s	COO <sup>-</sup>	527.3	6.7%	18.9%	
		O-C=O	532.1	93.3%		
	N1s	N-C=O, NH <sub>2</sub> NH <sub>3</sub> <sup>+</sup>	399.7	88.4 %	5.3%	
401.9			11.6%			
<b>CS_NaOH (7d)</b>	C1s	C-C, C-H	284.5	87.4%	80.1%	
		C-N, C-O	286.5	12.6%		
	O1s	C=O	530.8	45%	15.1%	
		O-C=O	532.1	55%		
	N1s	NH <sub>2</sub> N-C=O	398.8	49.7%	4.8%	
			399.8	50.3 %		



**Πίνακας 10.** (συνέχεια)

<b>ECM</b>	C1s	C-C, C-H	284.5	60.2 %	65.4%
		C-O	286.1	16.9%	
		O-C=O	288.7	22.9%	
	O1s	COO <sup>-</sup>	529.3	41.6%	27.7%
		N-C=O	531.6	35.8%	
		C-O	533.5	13.8%	
		O-H	536.1	8.8%	
	N1s	NH <sub>3</sub>	397.5	16.3%	5.9%
		NH <sub>2</sub>	399.8	83.7%	
	P2p	PF <sub>6</sub> <sup>-</sup>	136.4	38.4%	1%
		[NH <sub>4</sub> ] <sup>+</sup> PF <sub>6</sub> <sup>-</sup>	137	6.6%	
		[NH <sub>4</sub> ] <sup>+</sup> PF <sub>6</sub> <sup>-</sup>	137.5	55%	
<b>ECM (2d)</b>	C1s	C-C, C-H	284.5	29.6%	77.9%
		C-O-C, N-C=O	287.4	49.5%	
		O-C=O	288.7	20.9%	
	O1s	N-C=O	531.2	25.9%	16.3%
		C-O	533.2	27.3%	
		O-H	534.8	46.8%	
	N1s	NH <sub>2</sub> , NH <sub>3</sub> <sup>+</sup>	402.4	69.9%	1%
		NaNO <sub>2</sub>	403.8	30.1 %	
	P2p	Na <sub>3</sub> PO <sub>4</sub>	136	36.5%	
		PF <sub>6</sub> <sup>-</sup>	136.7	34.2%	
		P <sub>2</sub> O <sub>5</sub>	135.2	29.3%	

Στο φάσμα στην περιοχή C1s (Εικόνα 62), το CS powder αναπαρίσταται με τρεις κορυφές. Η πρώτη κορυφή στα 284.5 eV αντιστοιχεί κυρίως στην κύρια κορυφή του άνθρακα και στο δεσμό C-H (carbon surface contaminant), επικαλύπτοντας τον χημικό δεσμό C-NH<sub>2</sub> και αποτελώντας το 50.8% της συνολικής έντασης του άνθρακα [162, 163]. Η δεύτερη κορυφή στα 288.3 eV αντιστοιχεί στους δεσμούς C-O-C και N-C=O, οι οποίοι καταλαμβάνουν το 37.4% της ποσότητας του άνθρακα. Επίσης, υπάρχει και μία τρίτη κορυφή με δεσμική ενέργεια 289.8 eV, η οποία οφείλεται σε καρβοξυλικούς δεσμούς (O-C=O) σε ποσοστό 11.8%, οι οποίοι πιθανόν να προέρχονται από ακαθαρσίες της σκόνης (impurities).

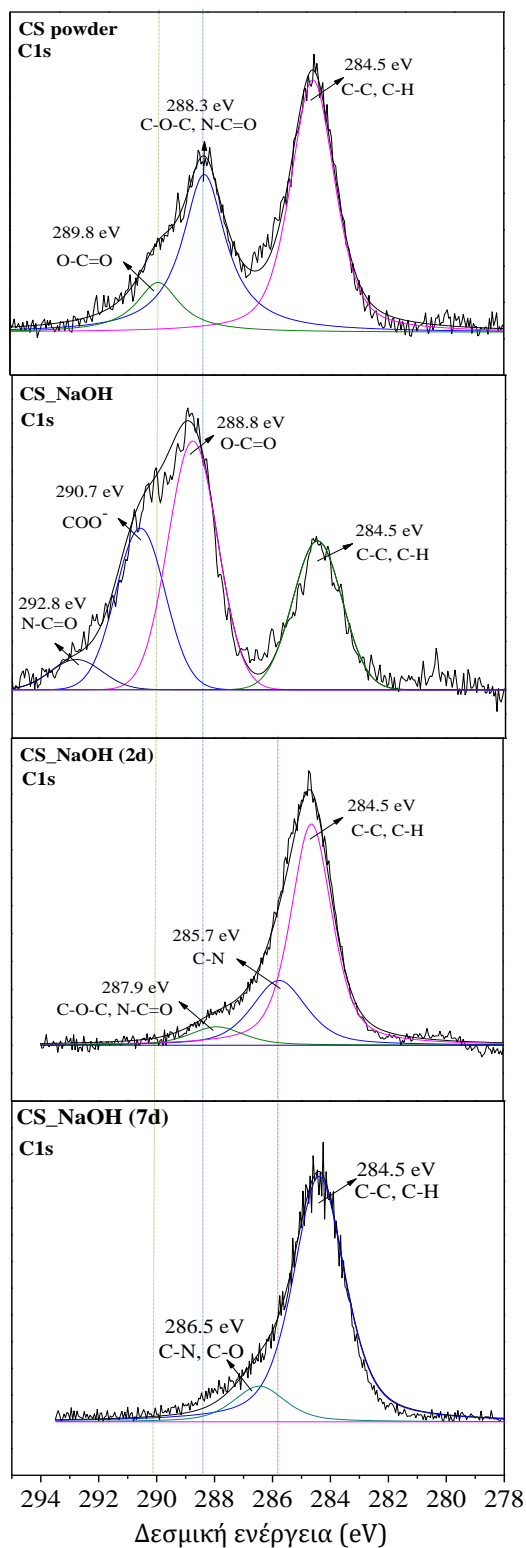
Οι κορυφές του φάσματος στην περιοχή C1s της μεμβράνης CS\_NaOH, αντιστοιχούν σε τέσσερεις διαφορετικούς δεσμούς του άνθρακα με ενέργειες δεσμών στα 284.5, 288.8, 290.7 και 292.8 eV. Παρατηρείται μείωση του ποσοστού του

δεσμού C-C από 50.8%, όπως αναφέρεται στο φάσμα C1s του CS powder, σε 25.2% στο φάσμα C1s του CS\_NaOH, με ταυτόχρονη αύξηση του ποσοστού των καρβοξυλομάδων (O-C=O, 288.8 eV) και μετατόπιση της κορυφής τους σε μικρότερη δεσμική ενέργεια, καθώς και ύπαρξη νέας κορυφής που αντιστοιχεί σε καρβοξυλικά ιόντα ((COO-), 290 eV). Επίσης, παρατηρείται έντονη μετατόπιση της κορυφής που αντιστοιχεί σε δεσμό N-C=O της δομικής μονάδας N-ακετυλογλυκοζαμίνης στα 292.8 eV [164] και μεγάλη μείωση του ποσοστού του στο 5.4 %. Η αύξηση των καρβοξυλομάδων οφείλεται στο όξινο περιβάλλον που απαιτείται για τη διάλυση της σκόνης χιτοζάνης και συγκεκριμένα στην παρουσία των ιόντων CH<sub>3</sub>COO<sup>-</sup>, τα οποία αλληλεπιδρούν με τις πρωτονιομένες αμινομάδες της χιτοζάνης [165]. Η ύπαρξη των καρβοξυλικών ιόντων στα 290.7 eV, η οποία πιθανόν να οφείλεται στην εξουδετέρωση του όξινου διαλύματος χιτοζάνης με διάλυμα NaOH, όπως και η πολύ μεγάλη μείωση του ποσοστού των αμιδίων, επιβεβαιώνουν τη διαδικασία ζελατινοποίησης και το σχηματισμό υδροπηκτώματος, λόγω της αποπρωτονίωσης των αμινομάδων στις αλυσίδες της χιτοζάνης.

Μετά τον προσδιορισμό των χαρακτηριστικών ομάδων στην επιφάνεια της σκόνης και της μεμβράνης της χιτοζάνης, ακολούθησε ο χαρακτηρισμός της μεμβράνης χιτοζάνης μετά την εμφύτευσή της επικαρδιακά [CS\_NaOH (2d), CS\_NaOH (7d)], καθώς και η μελέτη της αλληλεπίδρασης μεταξύ της εξωκυττάριας μήτρας του επικαρδίου και της μεμβράνης χιτοζάνης μετά την εμφύτευσή της.


Η αλληλεπίδραση μεταξύ της επιφάνειας της μεμβράνης και της εξωκυττάριας μήτρας στην περιοχή του C1s, είναι εμφανής λόγω της ύπαρξης μίας νέας κορυφής στα 285.7 eV, η οποία σχετίζεται με τη δημιουργία δεσμών C-N, εξαιτίας της αντίδρασης σύζευξης μεταξύ των καρβοξυλομάδων από τα αμινοξέα των πρωτεϊνών της εξωκυττάριας μήτρας και των αμινομάδων της μεμβράνης [166]. Επίσης, η ύπαρξη νέας κορυφής στα 287.9 eV του φάσματος της μεμβράνης αντιπροσωπεύει τις χαρακτηριστικές ομάδες του C-O-C και N-C=O, επιβεβαιώνοντας την ύπαρξη αλληλεπιδράσεων μεταξύ ιστού και μεμβράνης. Στο φάσμα της μεμβράνης των επτά ημερών μετά την εμφύτευση παρατηρείται μείωση του αριθμού των κορυφών, οπότε και των δεσμών του άνθρακα που σχηματίζονται στην επιφάνεια της μεμβράνης. Το μεγαλύτερο ποσοστό του άνθρακα αντιστοιχεί στο δεσμό C-C, ενώ παρατηρείται μείωση του ποσοστού του δεσμού C-N, όπου, σε συνδυασμό με την απουσία των

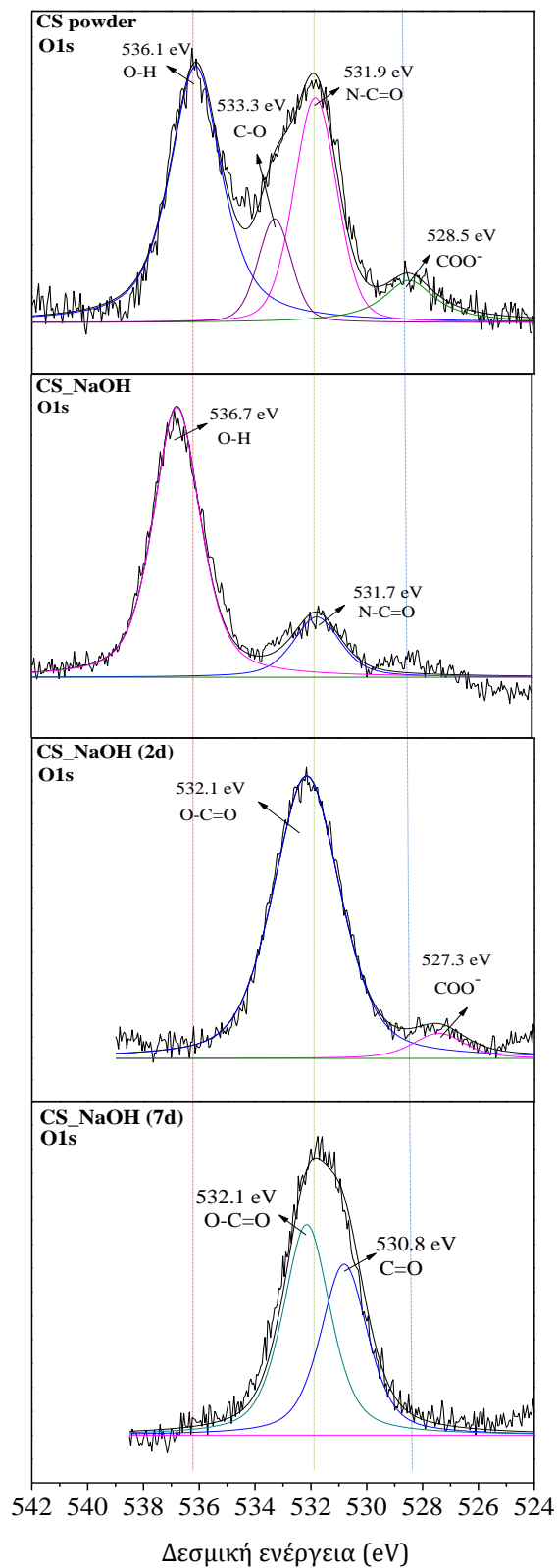
ομάδων C-O-C και N-C=O, οδηγεί στο συμπέρασμα μίας πιθανής έναρξης υδρόλυσης του γλυκοζιδικού δεσμού που συνδέει τις μονάδες των γλυκοζαμινών της χιτοζάνης.



**Εικόνα 62.** Φάσματα XPS στην περιοχή του C1s για τη σκόνη χιτοζάνης και τις μεμβράνες CS\_NaOH, CS\_NaOH (2d) και CS\_NaOH (7d).

Στο φάσμα της περιοχής O1s (Εικόνα 63), παρατηρούνται τρεις κορυφές για το δείγμα CS powder και δύο κορυφές για το δείγμα CS\_NaOH, μετά την επεξεργασία της σκόνης προς σχηματισμό της μεμβράνης. Η κορυφή στα 536.1 eV του CS\_powder αντιστοιχεί στις πρωτοταγείς και δευτεροταγείς υδροξυλομάδες στις θέσεις C-6 και C-3 των μονάδων γλυκοζαμίνης στην αλυσίδα της χιτοζάνης [167]. Παρατηρείται μια ελάχιστη μετατόπιση της κορυφής αυτής κατά 0.6 eV στο φάσμα του CS\_NaOH, ενώ η απουσία της φαίνεται ξεκάθαρα στα φάσματα μετά από 2 και 7 ημέρες αλληλεπίδρασης της χιτοζάνης με τον ιστό. Η κορυφή στα 531.9 eV στη σκόνη και στα 531.7 eV στη μεμβράνη οφείλεται στην ύπαρξη των δεσμών N-C=O της δομικής μονάδας N-ακετυλογλυκοζαμίνης στις αλυσίδες της χιτοζάνης. Ο σχηματισμός υδροπηκτώματος σε μορφή μεμβράνης οφείλεται στη δημιουργία δεσμών υδρογόνου μεταξύ των αλυσίδων, όπως υποδηλώνεται στο φάσμα της CS\_NaOH, με τη μείωση της συνολικής ποσότητας του οξυγόνου στο 23.8%, καθώς και τη μείωση του ποσοστού των δεσμών N-C=O που αντιστοιχεί σε δεσμική ενέργεια 531.7 eV [168]. Παρατηρείται μια μεγάλη μείωση αυτού του δεσμού της τάξης του ~50%, στο φάσμα του οξυγόνου της μεμβράνης λόγω της παρουσίας NaOH και της αποπρωτονίωσης των αμινομάδων [169]. Τα καρβοξυλικά ιόντα (COO<sup>-</sup>) και ο δεσμός C-O εντοπίζονται σε δεσμικές ενέργειες των 528.5 eV και 533.3 eV, αντίστοιχα, στο φάσμα του CS\_powder, ενώ δεν εντοπίζονται στο φάσμα της μεμβράνης, επιβεβαιώνοντας και τη μείωση της συνολικής έντασης του οξυγόνου μετά τη διαδικασία εξουδετέρωσης με τη χρήση διαλύματος NaOH.

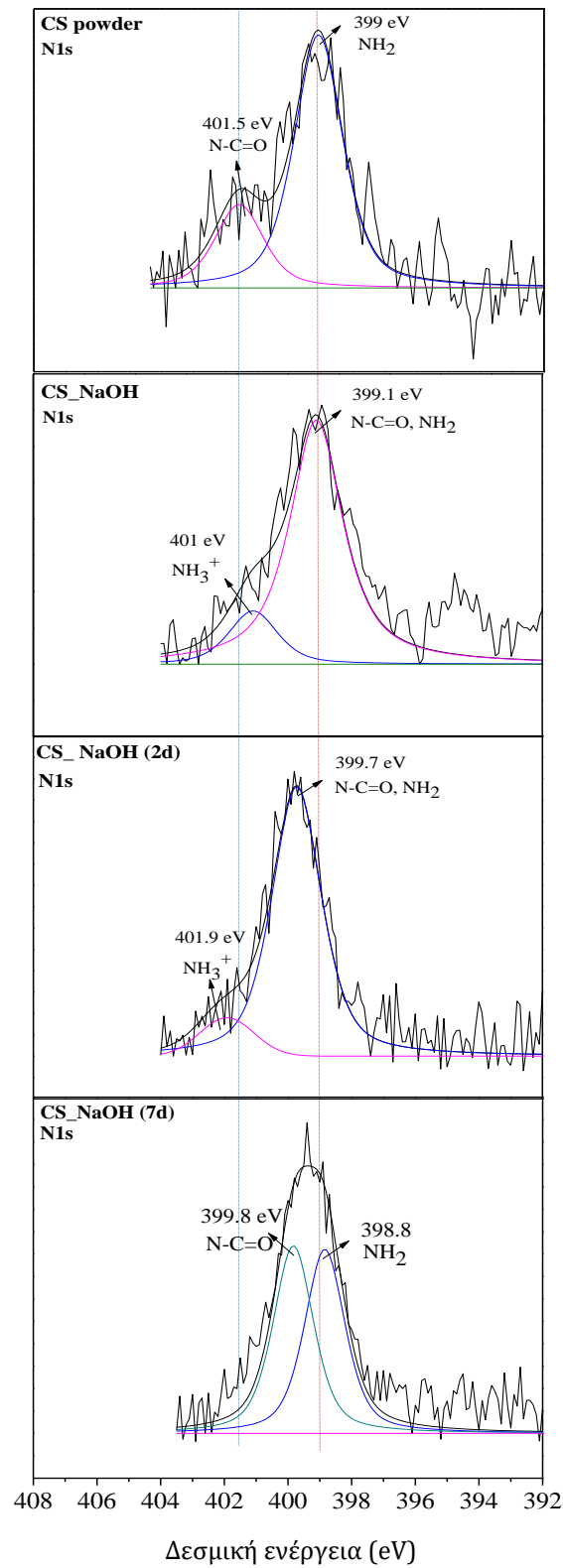
Στο φάσμα της χιτοζάνης δύο ημέρες μετά την εμφύτευσή της, φαίνεται έντονα η αλληλεπίδραση που υφίσταται, μέσω της ύπαρξης δύο κορυφών στα 532.1 eV (ομάδα O-C=O) και στα 527.3 eV (ομάδα COO<sup>-</sup>) και της συνολικής μετατόπισης του φάσματος σε χαμηλότερες δεσμικές ενέργειες. Στις επτά ημέρες μετά την εμφύτευση παρατηρείται μείωση του ποσοστού των δεσμών O-C=O, η οποία επιβεβαιώνεται και με τη συνολική μείωση του ποσοστού οξυγόνου στη χιτοζάνη. Επίσης, πολύ σημαντική θεωρείται και η ύπαρξη του δεσμού C=O, ο οποίος ανήκει στην ευρύτερη ομάδα της αλδεΐδης που σχηματίζεται στη θέση C1 της N-ακετυλογλυκοζαμίνης, λόγω της σχάσης του γλυκοζιδικού δεσμού () , επιβεβαιώνοντας και το συμπέρασμα της υδρόλυσης του γλυκοζιδικού δεσμού [170], όπως αναφέρθηκε στο αντίστοιχο φάσμα της χιτοζάνης στην περιοχή του C1s.



**Εικόνα 63.** Φάσματα XPS στην περιοχή του O1s για τη σκόνη και τις μεμβράνες CS\_NaOH, CS\_NaOH (2d) και CS\_NaOH (7d)

Στην περιοχή N1s (Εικόνα 64) στο φάσμα της σκόνης (CS\_powder), η κορυφή στα 399 eV αντιστοιχεί σε αμινομάδες, ενώ η κορυφή στα 401.5 eV αντιστοιχεί στους δεσμούς N-C=O της δομικής μονάδας της N-ακετυλογλυκοζαμίνης στις αλυσίδες της χιτοζάνης [171]. Η εξουδετέρωση και η αποπρωτονίωση των αμινομάδων έχει ως επακόλουθο την αύξηση του ποσοστού των αμινών στην κύρια αλυσίδα της μεμβράνης CS\_NaOH ενώ η συνύπαρξή τους με τις πρωτονιωμένες αμινομάδες οφείλεται στην τιμή της pKa των αμινομάδων της χιτοζάνης (pKa ~6.5) [169].

Στο φάσμα της μεμβράνης δύο ημέρες μετά την εμφύτευσή της [CS\_NaOH(2d)], παρατηρείται μόνο μια μικρή μετατόπιση του φάσματος προς μεγαλύτερες δεσμικές ενέργειες. Επίσης, πρέπει να σημειωθεί η ύπαρξη των πρωτονιωμένων αμινομάδων σε μορφή αμμωνιακών αλάτων στα 401.9 eV [169], ακόμη και δύο ημέρες μετά την εμφύτευσή της γύρω από το μυοκάρδιο, σε ποσοστό 11% της συνολικής έντασης του αζώτου. Παρόλα αυτά, επτά ημέρες μετά την τοποθέτηση της μεμβράνης δεν εντοπίζονται κορυφές που να αντιστοιχούν σε πρωτονιωμένες αμινομάδες. Δηλαδή, υπάρχει πλήρης αποπρωτονίωση των αμινομάδων στις αλυσίδες της χιτοζάνης, καθώς και μείωση της συνολικής ποσότητας του αζώτου σε σύγκριση με την ποσότητα αζώτου στις δύο ημέρες μετά την εμφύτευση.

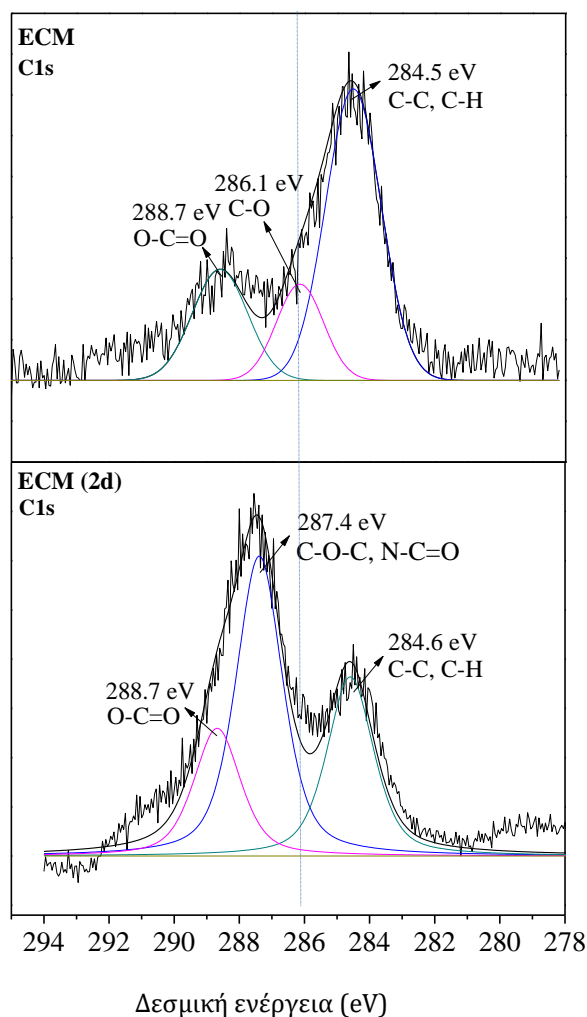


**Εικόνα 64.** Φάσματα XPS στην περιοχή του N1s για τη σκόνη και τις μεμβράνες CS\_NaOH, CS\_NaOH (2d) και CS\_NaOH (7d.)

Στη συνέχεια, καταγράφηκαν τα φάσματα XPS των δειγμάτων της εξωκυττάριας μήτρας πριν και μετά την επαφή της με τη μεμβράνη [ECM, ECM (2d)] και μελετάται η αλληλεπίδραση μεταξύ της εξωκυττάριας μήτρας του επικαρδίου και της μεμβράνης χιτοζάνης. Από το φάσμα ευρείας σάρωσης στην επιφάνεια της εξωκυττάριας θεμέλιας ουσίας του επικαρδίου, ανιχνεύθηκαν, εκτός από τα στοιχεία του άνθρακα, του οξυγόνου και του αζώτου, και το στοιχείο του φωσφόρου, το οποίο μελετάται στην περιοχή P2p.

Η φυσιολογική εξωκυττάρια θεμέλια ουσία του επικαρδίου στην περιοχή του C1s παρουσιάζει τρεις διαφορετικές κορυφές στα 284.5, 286.1 και 288.7 eV (Εικόνα 65). Η πρώτη κορυφή αποτελεί την κύρια κορυφή του άνθρακα, ενώ η δεύτερη και η τρίτη οφείλονται στις ομάδες των C-O και O-C=O, αντίστοιχα, οι οποίες βρίσκονται στις αλυσίδες των αμινοξέων των πρωτεϊνών [172]. Η αλληλεπίδραση μεταξύ της επιφάνειας της μεμβράνης και της εξωκυττάριας μήτρας μετά από δύο ημέρες εμφύτευσης είναι εμφανής στο δεύτερο φάσμα με την ύπαρξη νέας κορυφής στα 287.4 eV, η οποία αντιπροσωπεύει τις χαρακτηριστικές ομάδες του N-C=O και C-O-C, επιβεβαιώνοντας την ύπαρξη των αλληλεπιδράσεων μεταξύ των πρωτεϊνών του ιστού και της μεμβράνης, ενώ παράλληλα, εντοπίζεται και μία μικρή μείωση του ποσοστού των καρβοξυλομάδων μετά την εμφύτευση της μεμβράνης.

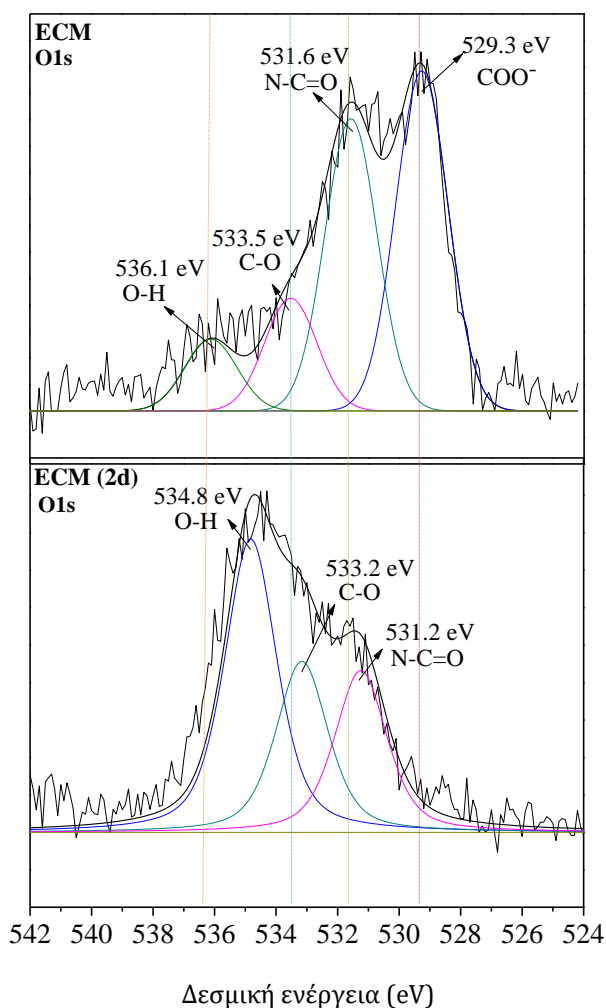




**Εικόνα 65.** Φάσματα XPS στην περιοχή του C1s για την εξωκυττάρια μήτρα πριν και μετά την αλληλεπίδρασή της με τη μεμβράνη (ECM, ECM 2d).

Στην Εικόνα 66 παρατίθενται τα φάσματα XPS των ίδιων δειγμάτων την περιοχή του O1s. Το φάσμα της επιφάνειας της εξωκυττάριας μήτρας πριν την αλληλεπίδραση εμφανίζει τέσσερις κορυφές στα 529.3 eV, 531.6 eV, 533.5 eV και 536.1 eV. Η πρώτη κορυφή είναι χαρακτηριστική των ιόντων COO<sup>-</sup> που βρίσκονται στις αλυσίδες των πρωτεϊνών [173], η δεύτερη αντιστοιχεί στα αμίδια στις γλυκοζαμινογλυκάνες του ιστού, η τρίτη στο δεσμό C-O που απαντάται στις αλυσίδες των αμινοξέων των πρωτεϊνών και η τέταρτη σε προσροφημένο νερό που βρίσκεται στην εξωκυττάρια μήτρα. Μετά την τοποθέτηση της μεμβράνης επικαρδιακά για 2 ημέρες, παρατηρείται μια σημαντική μεταβολή στα ποσοστά αυτών των δεσμών, καθώς επίσης και στο συνολικό ποσοστό του οξυγόνου στην ECM. Συγκεκριμένα,

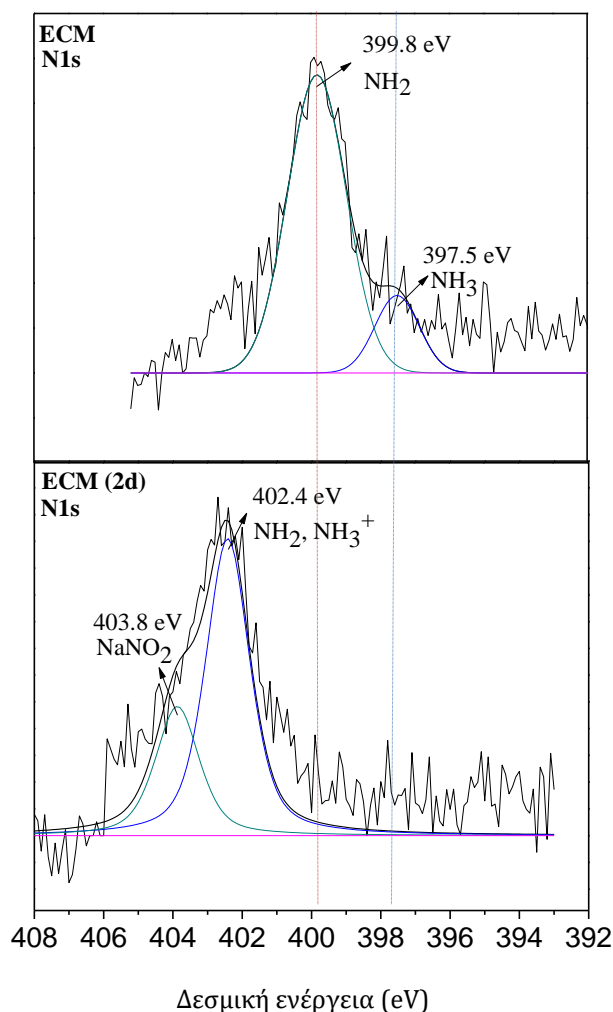
παρατηρείται η απουσία της κορυφής των ιόντων καρβοξυλίου και η μείωση των δεσμών N-C=O που έχει ως αποτέλεσμα τη μείωση του συνολικού ποσοστού του οξυγόνου, λόγω, πιθανώς, σχηματισμού δεσμών υδρογόνου στη διεπιφάνεια ιστού-μεμβράνης. Επίσης, ιδιαίτερα σημαντική θεωρείται και η κορυφή στα 534.8 eV στο φάσμα της ECM(2d), που αντιστοιχεί σε προσροφημένο οξυγόνο και νερό, σε ποσοστό 46.8% [174].



**Εικόνα 66.** Φάσματα XPS στην περιοχή του O1s για την εξωκυττάρια μήτρα πριν την αλληλεπίδραση και μετά την αλληλεπίδραση με τη μεμβράνη (ECM, ECM 2d).

Στο φάσμα της εξωκυττάριας μήτρας στην περιοχή του N1s (Εικόνα 67), μετά την αλληλεπίδρασή της με τη μεμβράνη, παρατηρείται μία σημαντική μετατόπιση των κορυφών σε υψηλότερες δεσμικές ενέργειες, ενώ ισχυρή είναι και η παρουσία των πρωτονιωμένων αμινομάδων με δεσμική ενέργεια 402.4 eV, όπου σε συνύπαρξη

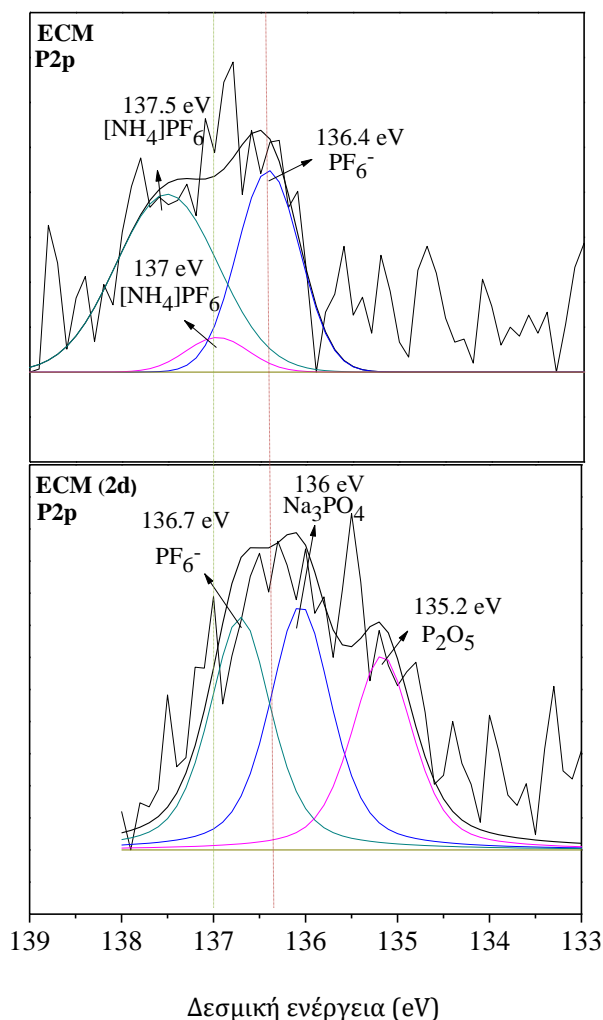
με τις μη πρωτονιωμένες αμινομάδες αποτελούν το ~70% της συνολικής ποσότητας του αζώτου. Η ύπαρξη αυτών των φορτισμένων αμινομάδων είναι εξέχουσα σημασίας, αφού καταγράφονται μόνο στο φάσμα της εξωκυττάριας μήτρας μετά την επαφή της με τη μεμβράνη και όχι πριν, και πιθανώς οφείλονται στο σχηματισμό ιοντικών δεσμών μεταξύ των αλυσιδών της χιτοζάνης και των πρωτεϊνών της ECM.



**Εικόνα 67.** Φάσματα XPS στην περιοχή του N1s της ECM και ECM 2d.

Ο φώσφορος (P) παρόλο που δεν υπάρχει σαν στοιχείο στις αλυσίδες των πρωτεϊνών, καταγράφεται στα φάσματα της εξωκυττάριας ουσίας, πιθανώς λόγω των νουκλεϊκών οξέων και των φωσφολιπιδίων στη διπλοστοιβάδα της κυτταρικής μεμβράνης [160]. Όπως φαίνεται στο φάσμα του φωσφόρου (Εικόνα 68), κυριαρχούν τα ιόντα του εξαφθοριούχου φωσφόρου και αμμονιακών αλάτων, ενώ

μετά την αλληλεπίδραση της ECM με τη μεμβράνη, εμφανίζονται χαρακτηριστικές κορυφές οξειδίων του φωσφόρου και φωσφορικού νατρίου.



**Εικόνα 68.** Φάσματα XPS στην περιοχή του P2p για την εξωκυττάρια μήτρα πριν και μετά την επαφή της με τη μεμβράνη (ECM, ECM 2d).

Από τα ατομικά ποσοστά των στοιχείων, όπως φαίνονται και στον Πίνακα 10, εξάγεται το συμπέρασμα ότι, μετά τη ζελατινοποίηση της χιτοζάνης σε μορφή μεμβράνης, η ποσότητα του άνθρακα στην επιφάνεια της μειώθηκε ελάχιστα, σε σχέση με τη σκόνη χιτοζάνης, ενώ επίσης μειώθηκε το ποσοστό του οξυγόνου και διπλασιάστηκε αυτό του αζώτου.

Στις **2 ημέρες** μετά την εμφύτευση, στη μεμβράνη παρατηρείται αύξηση της ποσότητας του άνθρακα, μείωση στην ποσότητα του οξυγόνου και μεγάλη αύξηση

στο ποσοστό του αζώτου, λόγω των ηλεκτροστατικών αλληλεπιδράσεων στη διεπιφάνεια της χιτοζάνης και του καρδιακού ιστού.

Στις **7 ημέρες** αυξάνεται στη μεμβράνη ακόμα περισσότερο η ποσότητα του άνθρακα φτάνοντας το 80% του συνολικού δείγματος, ενώ ταυτόχρονα μειώνεται η ποσότητα του οξυγόνου και του αζώτου, οδηγώντας στο συμπέρασμα ότι πιθανόν πρόκειται για την έναρξη υδρόλυσης του υδροπηκτώματος.

Παράλληλα, στην επιφάνεια του επικαρδίου μετά την επαφή του με τη χιτοζάνη, παρατηρείται μεγάλη αύξηση στην ποσότητα του άνθρακα και μείωση στην ποσότητα του οξυγόνου και του αζώτου, λόγω των ιοντικών αλληλεπιδράσεων και του σχηματισμού δεσμών υδρογόνου μεταξύ των πρωτεϊνών της εξωκυττάριας μήτρας και των αλυσιδών της χιτοζάνης. Η ποσότητα του φωσφόρου παραμένει σταθερή στο 1%, τόσο πριν όσο και μετά την εμφύτευση.

### 4.3 Θεωρητικοί υπολογισμοί μέσω της θεωρίας συναρτησιακών της ηλεκτρονιακής πυκνότητας (DFT)

#### A. Συνοπτική περιγραφή θεωρητικού υποβάθρου

Ο κλάδος της θεωρητικής χημείας αφορά στην εφαρμογή μαθηματικών μοντέλων και εργαλείων της φυσικής, στοχεύοντας στην ανάλυση χημικών διεργασιών. Οι υπολογιστικές μέθοδοι κατηγοριοποιούνται 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 Schrödinger, 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. 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 Schrödinger για πολυατομικά συστήματα υλοποιείται δια μέσου των μεθόδων (α) *ab initio*, (β) ημιεμπειρικών (semiempirical), (γ) εμπειρικών (empirical), και (δ) θεωρίας συναρτησοειδών πυκνότητας (Density Functional Theory, DFT). Η μέθοδος DFT χρησιμοποιεί την ηλεκτρονιακή πυκνότητα,  $\rho$ , αντί της κυματοσυνάρτησης,  $\Psi$ , 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) [175]. Οι υπολογισμοί έγιναν χρησιμοποιώντας ειδικό λογισμικό υπό την ευγενική επίβλεψη του Αναπληρωτή Καθηγητή κ. Δ. Παπαγιάννη.

#### B. Θεωρία των Hartree-Fock

Ο Hartree διατύπωσε την ιδέα ότι το κάθε ηλεκτρόνιο, ενός πολυηλεκτρονιακού συστήματος  $N$  ηλεκτρονίων και  $n$  πυρήνων, κινείται μέσα σε ένα πεδίο δυναμικού  $V(\mathbf{r}_i)$  σφαιρικής συμμετρίας. Το πεδίο αυτό είναι άθροισμα του πεδίου δυναμικού που

οφείλεται στους  $n$  θετικά φορτισμένους πυρήνες και του πεδίου δυναμικού που προκύπτει από τα υπόλοιπα  $N-1$  ηλεκτρόνια του συστήματος. Με βάση την παραπάνω μεθοδολογία τα ολοκληρώματα που προκύπτουν ονομάζονται τελεστές Coulomb, τα οποία όταν τα εισάγουμε στην μονοηλεκτρονιακή εξίσωση Schrödinger, προκύπτει η εξίσωση Hartree. Η μέθοδος Hartree βελτιώθηκε από τον Fock με την εισαγωγή της έννοιας της αντισυμμετρίας των ηλεκτρονιακών κυματοσυναρτήσεων, σύμφωνα με την οποία τα περισσότερα μόρια αποτελούνται από διπλά κατειλημμένα τροχιακά, με τα δυο ηλεκτρόνια να έχουν αντίθετο spin. Οι συναρτήσεις spin,  $\alpha$  και  $\beta$ , ορίζονται ως εξής

$$\alpha(\uparrow) = 1 \quad \beta(\downarrow) = 1$$

$$\alpha(\downarrow) = 0 \quad \beta(\uparrow) = 0$$

και έχουν τιμή ίση με τη μονάδα για ένα ηλεκτρόνιο με spin, προς τα πάνω ή προς τα κάτω. Πολλαπλασιασμός στη συνέχεια της συνάρτησης του κάθε τροχιακού με το  $\alpha$  ή  $\beta$  συντελεί στο να συμπεριληφθεί το spin του ηλεκτρονίου και στην ολική κυματοσυνάρτηση,  $\Psi$ .

Η μέθοδος HF [176] αποτέλεσε την πρώτη προσέγγιση στα προβλήματα πολλών σωματιδίων. Με βάση την εξίσωση Schrödinger και υιοθετώντας την προσέγγιση πακτωμένων πυρήνων (Born-Oppenheimer), αλλά και την αρχή της αντισυμμετρίας, προέκυψαν οι εξισώσεις Hartree-Fock, οι οποίες αποτελούν την εφαρμογή της μεθόδου των μεταβολών για την εύρεση των βέλτιστων τροχιακών spin που εισέρχονται στην κυματοσυνάρτηση της βασικής κατάστασης ενός ηλεκτρονιακού συστήματος:

$$\Psi_0(1,2,\dots, N) = |\chi_1(1) \chi_2(2) \dots \chi_N(N)|$$

Η προς ελαχιστοποίηση συνάρτηση είναι η ενέργεια της βασικής κατάστασης του συστήματος που δίνεται από τη σχέση:

$$E_0 = \frac{|\langle \Psi_0 | \hat{H} | \Psi_0 \rangle|}{\langle \Psi_0 | \Psi_0 \rangle}$$

όπου  $\hat{H}$  είναι ο τελεστής Hamilton. Η ελαχιστοποίηση της ενέργειας οδηγεί στις εξισώσεις Hartree-Fock:

$$f_i(1)\chi_i(1) = \varepsilon_i\chi_i(1), = 1, 2, \dots, N$$

όπου  $\epsilon_i$  είναι η ενέργεια του τροχιακού spin  $i$  και  $f_i$  ο τελεστής Fock. Έτσι, στη θεωρία HF ένα πολυηλεκτρονικό πρόβλημα ανάγεται σε μια σειρά μονοηλεκτρονικών προβλημάτων, όπου ο τελεστής Fock είναι άθροισμα δυο μονοηλεκτρονικών τελεστών.

### Γ. Θεωρία Συναρτησιακών της ηλεκτρονικής πυκνότητας (DFT)

Η Θεωρία Συναρτησοειδούς Πυκνότητας (Density Functional Theory) βασίζεται στη χρήση της ολικής πυκνότητας των ηλεκτρονίων,  $\rho$ , αντί της κυματοσυνάρτησης πολλών σωματιδίων  $\Psi$ , όπως στην εξίσωση του Schrödinger. Σύμφωνα με αυτή τη θεωρία, η ενέργεια της κυματοσυνάρτησης μιας βασικής κατάστασης μπορεί να ορισθεί μόνο με βάση την ηλεκτρονική πυκνότητα και όταν η πυκνότητα είναι ακριβώς ίση με την πραγματική ηλεκτρονική πυκνότητα, τότε η ενέργεια αντιστοιχεί σε ένα ελάχιστο. Οι Hohenberg και Kohn [177] απέδειξαν ότι, σε ένα σύστημα  $N$  ηλεκτρονίων, η πολυηλεκτρονική κυματοσυνάρτηση  $\Psi(1,2,\dots,N)$  είναι ένας μοναδικός συναρτησιακός παράγοντας της ηλεκτρονικής πυκνότητας  $\rho(\mathbf{r})$ . Το επίθετο συναρτησοειδές προέρχεται από το γεγονός ότι η ενέργεια του μορίου είναι συνάρτηση της ηλεκτρονικής πυκνότητας, που γράφεται ως  $E(\rho)$ , και η ηλεκτρονική πυκνότητα είναι με τη σειρά της συνάρτηση της θέσης  $\rho(\mathbf{r})$  και στα μαθηματικά η συνάρτηση μιας συνάρτησης ονομάζεται συναρτησοειδές. Τα κατελιημμένα τροχιακά χρησιμοποιούνται για την ηλεκτρονική πυκνότητα μέσω της σχέσης:

$$\rho(\mathbf{r}) = N \int |\Psi|^2 d\mathbf{r}_1 d\mathbf{r}_2 \dots d\mathbf{r}_N d\omega_1 \dots d\omega_N$$

Οι συναρτησιακές της DFT κατανέμουν την ηλεκτρονική ενέργεια σε διάφορες συνιστώσες, οι οποίες είναι η κινητική ενέργεια των ηλεκτρονίων, η αλληλεπίδραση ηλεκτρονίων-πυρήνα και οι απώσεις των πυρήνων (δυναμική ενέργεια), οι απώσεις μεταξύ των ηλεκτρονίων (άπωση Coulomb) και η ενέργεια συσχέτισης- ανταλλαγής των ηλεκτρονίων, που περιλαμβάνει το υπόλοιπο μέρος των αλληλεπιδράσεων ηλεκτρονίου-ηλεκτρονίου. Ο τελευταίος αυτός όρος αναφέρεται στην ενέργεια ανταλλαγής που προέρχεται από την αντισυμμετρία της κυματοσυνάρτησης και στη συσχέτιση λόγω των κινήσεων των επιμέρους ηλεκτρονίων και χωρίζεται σε δύο μέρη, το μέρος της ανταλλαγής,  $E^x(P)$  και το μέρος της συσχέτισης,  $E^c(P)$ .



Υπάρχουν συναρτησιακές που αποτελούν συνδυασμό της συναρτησιακής της ανταλλαγής με τη συναρτησιακή της συσχέτισης, όπως η BLYP. Επειδή όμως, ακόμη και η θεωρία HF περιλαμβάνει έναν όρο ανταλλαγής, γι' αυτό προτάθηκε η δημιουργία μικτών συναρτησιακών (υβριδικές συναρτησιακές), που περιλαμβάνουν τους όρους ανταλλαγής της HF και της DFT, αλλά και τους όρους συσχέτισης της DFT. Μια ευρέως γνωστή υβριδική τριπαραμετρική συνάρτηση είναι η B3LYP του Becke [178]. Η συναρτησιακή ανταλλαγής-συσχέτισης της B3LYP είναι:

$$E_{B3LYP}^c = E_{LD}^x + C_0 (E_{HF}^x - E_{LD}^x) + C_x \Delta E_{B88}^x + E_{VWN}^c + C_c (E_{LYP}^c - E_{VMN}^c)$$

Σε αυτόν τον τύπο, ο Becke χρησιμοποιεί μια σειρά από διαφορετικές συναρτήσεις, καθώς και 3 παραμέτρους [179]. Οι τιμές των παραμέτρων υπολογίστηκαν ίσες με  $C_0=0,20$ ,  $C_x=0,72$  και  $C_c=0,81$ . Το γεγονός ότι οι ίδιες τιμές των παραμέτρων χρησιμοποιούνται από διαφορετικές συναρτησιακές, αποδεικνύει την ορθότητα της επιλογής του Becke να χρησιμοποιήσει μίγμα των όρων ανταλλαγής της HF και της DFT. Συνοψίζοντας, τα υπολογιστικά προγράμματα αυτού του τύπου συνιστώνται ιδιαίτερα για ενεργειακούς υπολογισμούς συγκεκριμένης γεωμετρίας και υπολογισμούς βελτιστοποίησης της γεωμετρίας και των συχνοτήτων.

Δ. Θεωρητικοί υπολογισμοί (DFT) αλληλεπίδρασης χιτοζάνης – μυοκαρδίου και ερμηνεία των αποτελεσμάτων

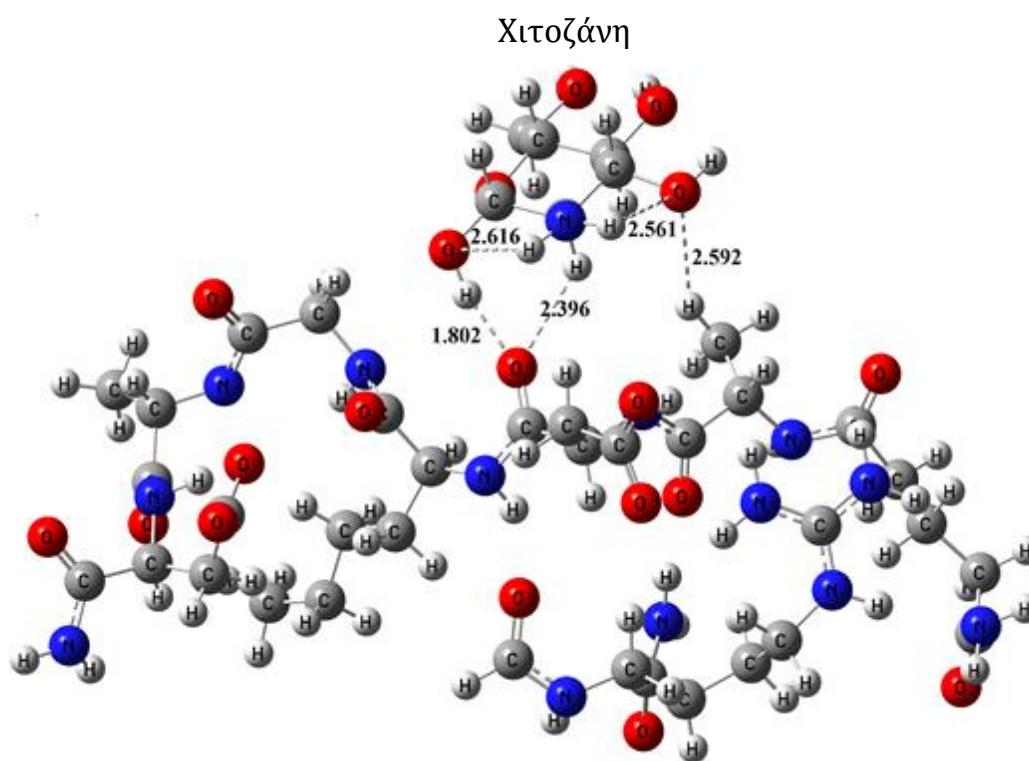
Όπως αναφέρθηκε και στις ενότητες των πειραματικών αποτελεσμάτων, τα φάσματα IR δεν παρείχαν πληροφορίες για τον τρόπο σχηματισμού του υδροπηκτώματος της χιτοζάνης και τις αλληλεπιδράσεις που υφίστανται στη διεπιφάνεια μεμβράνης και επικαρδίου. Στα φάσματα IR καταγράφονταν μόνο οι δονήσεις που οφείλονται στις δομικές μονάδες της χιτοζάνης, πριν και μετά την αλληλεπίδρασή της με το επικάρδιο και οι δονήσεις του επικαρδίου πριν και μετά την επαφή του με τη μεμβράνη. Τα αποτελέσματα από τα φάσματα XPS έριξαν περισσότερο φως στην αλληλεπίδραση της διεπιφάνειας χιτοζάνης-μυοκαρδίου και του ποιοτικού και ποσοτικού προσδιορισμού των δεσμών που σχηματίστηκαν μεταξύ τους. Προς επιβεβαίωση αυτών των αλληλεπιδράσεων (π.χ. σχηματισμός δεσμών υδρογόνου) μεταξύ των ατόμων των μορίων και για τον προσδιορισμό της ενέργειας συμπλοκοποίησης χρησιμοποιήθηκε η υπολογιστική μέθοδος DFT. Για

τους θεωρητικούς υπολογισμούς, χρησιμοποιήθηκε η δομή της χιτοζάνης, ενώ για την εξωκυττάρια μήτρα του μυοκαρδίου, επιλέχθηκε η προσομοίωση της πρωτεϊνικής δομής του κολλαγόνου τύπου I, ως το κύριο βασικό συστατικό της εξωκυττάριας θεμέλιας ουσίας του μυοκαρδιακού ιστού [180].

Έτσι, σε πρώτη φάση, πραγματοποιήθηκε ο θεωρητικός υπολογισμός και ο σχεδιασμός της διαμόρφωσης της χιτοζάνης και του κολλαγόνου τύπου I, καθώς και ο υπολογισμός του θεωρητικού φάσματος IR που δίνει η χιτοζάνη. Ενδεικτικά, έγινε προσομοίωση ενός αντιπροσωπευτικού τμήματος της πρωτεΐνης. Έπειτα από κάποιες δοκιμές, προέκυψαν προσεγγιστικά δύο ισχυρές διαμορφώσεις.

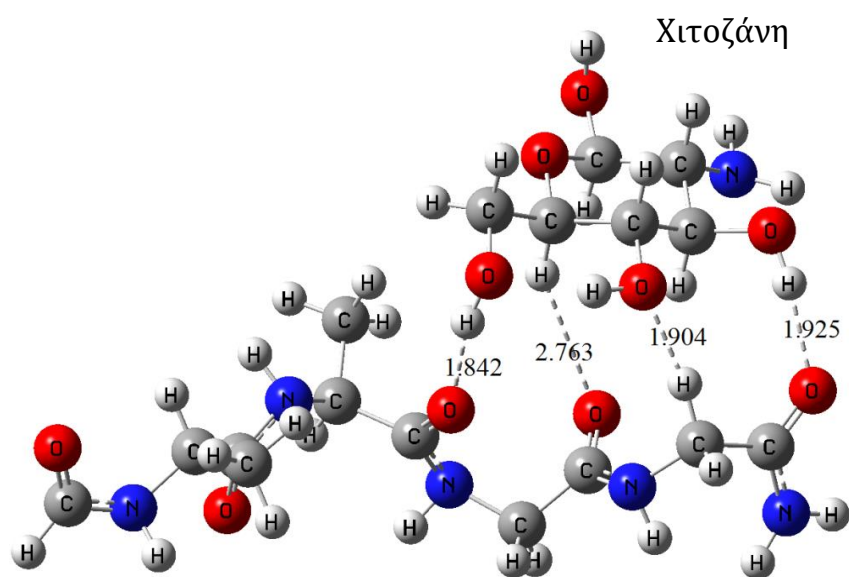
Σε δεύτερη φάση, μέσω των κβαντομηχανικών υπολογισμών, μελετήθηκε η αλληλεπίδραση της χιτοζάνης με τις δύο αυτές διαφορετικές διαμορφώσεις της πρωτεΐνης και υπολογίστηκε η ενέργεια αλληλεπίδρασης της ευνοϊκότερης διαμόρφωσης, σύμφωνα με το θεώρημα του Hohenberg-Kohn. Σύμφωνα με τους DFT υπολογισμούς, οι δύο διαμορφώσεις βρέθηκε να παρουσιάζουν διαφορά ενέργειας 8-10 kcal/mol. Στη συνέχεια, υπολογίστηκαν με την ίδια μεθοδολογία οι συχνότητες του συστήματος και έτσι αποτυπώθηκε το φάσμα IR της χιτοζάνης μετά την αλληλεπίδρασή της με το κολλαγόνο.

Η ενέργεια συμπλοκοποίησης που αφορά στην πρώτη διαμόρφωση υπολογίστηκε στα 14,9 kcal/mol, υποδηλώνοντας μια αρκετά ισχυρή αλληλεπίδραση μεταξύ των λειτουργικών ομάδων της χιτοζάνης και της πρωτεΐνης (Εικόνα 69). Οι αποστάσεις αλληλεπίδρασης των ατόμων των δυο δομών κυμαίνονται στα ~2,5 Å, οι οποίες διαμορφώνονται από το σχηματισμό δεσμών υδρογόνου ανάμεσα στα υδροξυλικά άτομα υδρογόνου και οξυγόνου του μορίου της χιτοζάνης και στα αλειφατικά άτομα του υδρογόνου και το καρβοξυλικό οξυγόνο του κολλαγόνου.



**Εικόνα 69.** Τυχαία διαμόρφωση συστήματος χιτοζάνης και κολλαγόνου με ενέργεια αλληλεπίδρασης  $\Delta E=14,9$  kcal/mol, σύμφωνα με τη μέθοδο B3LYP/6-31G.

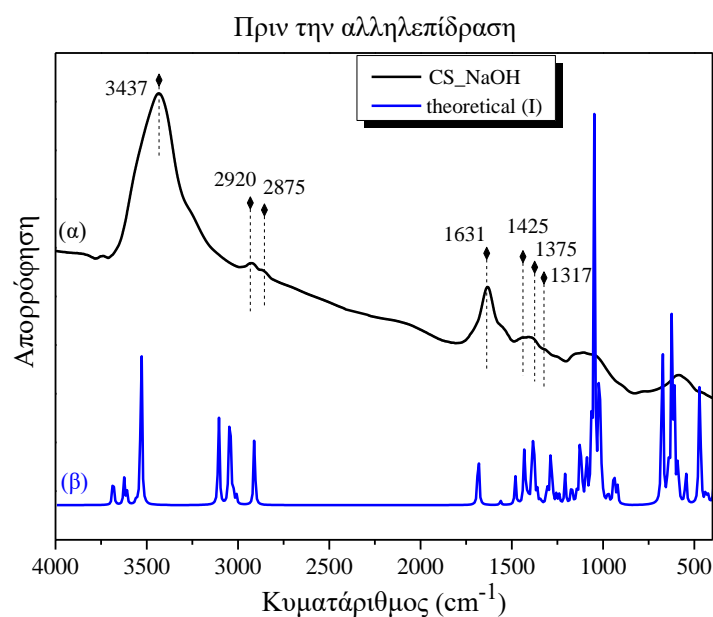
Στη δεύτερη διαμόρφωση, η ενέργεια συμπλοκοποίησης υπολογίστηκε στα 23,2 kcal/mol (Εικόνα 70), αποτελώντας την ισχυρότερη και ευνοϊκότερη διαμόρφωση όλων των δοκιμών, αφού συμμετέχουν όλα σχεδόν τα άτομα των δυο μερών που μπορούν να αλληλεπιδράσουν. Η χιτοζάνη αξιοποιεί όλες τις θέσεις πρόσδεσης με την πρωτεΐνη, σχηματίζοντας τέσσερεις δεσμούς υδρογόνου με πολύ μικρότερες αποστάσεις αλληλεπίδρασης. Επομένως, η μεγαλύτερη ενέργεια αλληλεπίδρασης δικαιολογείται από τα χαρακτηριστικά αυτής της σύνδεσης. Όλοι οι ενεργειακοί υπολογισμοί πραγματοποιήθηκαν με την εφαρμογή του προγράμματος Gaussian 09, σε επίπεδο DFT με τη χρήση της B3LYP συναρτησιακής και το σύνολο βάσης 6-31G για την προσομοίωση των μοριακών τροχιακών.



**Εικόνα 70.** Ευνοϊκότερη διαμόρφωση συστήματος χιτοζάνης-κολλαγόνου με ενέργεια συμπλοκοποίησης  $\Delta E=23,2$  kcal/mol, σύμφωνα με τη μέθοδο B3LYP/6-31G.

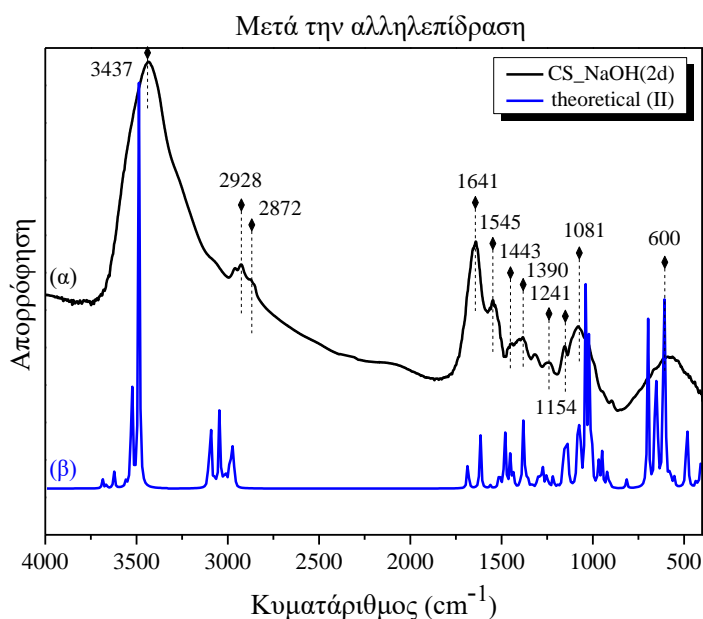
Με βάση το μοντέλο της ευνοϊκότερης διαμόρφωσης, υπολογίστηκαν τα θεωρητικά φάσματα IR για τη χιτοζάνη πριν και μετά την αλληλεπίδρασή της με την πρωτεΐνη. Οι υπολογισμοί έγιναν στο εύρος  $400-4000\text{ cm}^{-1}$  χρησιμοποιώντας το λογισμικό πακέτο Gauss View.

Αρχικά, στην Εικόνα 71 συγκρίνεται το θεωρητικά υπολογισμένο φάσμα IR με το πειραματικό φάσμα της χιτοζάνης, πριν έρθει σε επαφή με την πρωτεΐνη. Παρατηρείται ότι οι κορυφές του θεωρητικού φάσματος συμπίπτουν με αυτές του πειραματικού. Διακρίνονται οι περιοχές δονήσεων, όπως ακριβώς είχαν περιγραφεί στο πειραματικό φάσμα (Ενότητα III-2, παρ. 2.2.2). Συγκεκριμένα, στην περιοχή των υψηλών συχνοτήτων ( $>2500\text{ cm}^{-1}$ ) καταγράφονται οι απορροφήσεις λόγω των δονήσεων τάσης των ατόμων του H στις μεθυλενομάδες ( $-\text{CH}_2$ ), αμινομάδες ( $-\text{NH}$ ) και στις μονάδες του υδροξυλίου ( $-\text{OH}$ ). Επίσης, παρατηρούνται οι ζώνες amide I, amide II και amide III στα  $1631\text{ cm}^{-1}$ ,  $1425\text{ cm}^{-1}$  και  $1317\text{ cm}^{-1}$ , αντίστοιχα, ενώ οι κορυφές από τα  $1260-800\text{ cm}^{-1}$  αντιστοιχούν σε δονήσεις τάσης C-O-C του γλυκοζιδικού δεσμού στην κύρια αλυσίδα της χιτοζάνης.



**Εικόνα 71.** Φάσματα FT-IR της χιτοζάνης, (α) πειραματικό φάσμα και (β) θεωρητικό φάσμα υπολογισμένο με τη μέθοδο DFT.

Στην Εικόνα 72 παρουσιάζεται το πειραματικό και το θεωρητικό φάσμα IR της χιτοζάνης μετά την αλληλεπίδραση με την πρωτεΐνη. Παρατηρούνται οι ζώνες των amide I, II και III, οι οποίες είναι μετατοπισμένες σε σχέση με το προηγούμενο φάσμα της χιτοζάνης (Εικόνα 71) και οφείλονται στην αλληλεπίδρασή της με την εξωκυττάρια μήτρα του ιστού. Επιβεβαιώνεται και η ύπαρξη της κορυφής στα  $1545 \text{ cm}^{-1}$ , η οποία αντιστοιχεί σε δονήσεις κάμψης -NH και δονήσεις τάσης C-N. Αυτή η κορυφή είναι σημαντική, διότι υποδηλώνει την αλληλεπίδραση και το σχηματισμό δεσμών υδρογόνου μεταξύ των αλυσιδών της χιτοζάνης και των πρωτεϊνών της ECM. Και σε αυτήν την περίπτωση, παρατηρείται καλή συμφωνία του θεωρητικού φάσματος με το πειραματικό, επιβεβαιώνοντας την καλή θεωρητική προσέγγιση της μεθόδου προσομοίωσης που χρησιμοποιήθηκε.



**Εικόνα 72.** Φάσματα FT-IR της χιτοζάνης μετά την αλληλεπίδραση με το κολλαγόνο τύπου I, (α) πειραματικό φάσμα και (β) θεωρητικό φάσμα υπολογισμένο με τη μέθοδο DFT.

Συμπερασματικά, μέσω των θεωρητικών υπολογισμών DFT επιβεβαιώνονται οι αλληλεπιδράσεις μεταξύ του ιστού και της χιτοζάνης και προσδιορίζεται η ισχύς αυτών των αλληλεπιδράσεων μέσω του υπολογισμού της ενέργειας συμπλοκοποίησης. Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι υπάρχει ισχυρή σύνδεση της πρωτεΐνης με την επιφάνεια της χιτοζάνης, εξαιτίας του σχηματισμού δεσμών υδρογόνου της τάξης των 23 kcal/mol (ευνοϊκότερη διαμόρφωση). Τέλος, τα πειραματικά και θεωρητικά φάσματα IR έδειξαν καλή συμφωνία, αποτελώντας σημαντική ένδειξη αξιοπιστίας της μεθόδου προσομοίωσης.

## 5. ΜΗΧΑΝΙΚΗ ΜΕΛΕΤΗ ΔΙΕΠΙΦΑΝΕΙΑΣ ΧΙΤΟΖΑΝΗΣ – ΜΥΟΚΑΡΔΙΟΥ ΜΕΣΩ ΤΗΣ ΜΕΘΟΔΟΥ ΤΩΝ ΠΕΠΕΡΑΣΜΕΝΩΝ ΣΤΟΙΧΕΙΩΝ

Στην παρούσα διδακτορική διατριβή έγινε μία θεωρητική προσέγγιση προσομοίωσης της δεξιάς κοιλίας της καρδιάς και ακολούθησε υπολογιστική μοντελοποίηση με τη μέθοδο των πεπερασμένων στοιχείων προκειμένου να προσδιοριστούν οι κατάλληλες ιδιότητες της μεμβράνης από υδροπήκτωμα χιτοζάνης που όταν τοποθετηθεί εξωτερικά του τοιχώματος της κοιλίας, στην οποία ασκείται αυξημένη πίεση αίματος (μεγαλύτερη του φυσιολογικού), να επιφέρει μείωση, κυρίως της αυξημένης τοιχωματικής τάσης που προκύπτει και επαναφορά της καρδιάς στη φυσιολογική της λειτουργία. Τα πεπερασμένα στοιχεία είναι η πιο διαδεδομένη μέθοδος για τη μοντελοποίηση της μηχανικής της καρδιάς. Το πρόγραμμα υπολογιστικής μοντελοποίησης που χρησιμοποιήθηκε είναι η πλατφόρμα λογισμικού πεπερασμένων στοιχείων ANSYS.

Η ανάλυση με πεπερασμένα στοιχεία (finite element analysis – F.E.A) είναι μία μέθοδος προσεγγιστικής και αριθμητικής επίλυσης προβλημάτων συνεχούς μέσου (μηχανικής στερεού, προβλημάτων πεδίου, μηχανικής ρευστών κλπ.) αυθαίρετης γεωμετρίας, οριακών συνθηκών και φορτίων. Βασίζεται στο συνδυασμό μεταβλητών μεθόδων και τοπικών προσεγγίσεων που ισχύουν σε περιορισμένη περιοχή του μέσου (πεπερασμένο στοιχείο) για τη διακριτοποίηση (υποδιαίρεση-προσομοίωση) του προβλήματος. Επανάληψη της τοπικής διακριτοποίησης στον υπόλοιπο χώρο του μέσου καταλήγει στην προσεγγιστική λύση με τεχνικές γραμμικής άλγεβρας.

Τα βασικά στάδια της μεθόδου για την επίλυση του προβλήματος, όπως μελετώνται αναλυτικά στις παρακάτω παραγράφους, είναι:

- Η κατασκευή της γεωμετρίας (φυσιολογική και ασθενής δεξιά κοιλία) για το ρευστό (αίμα) και το τοίχωμα του μυοκαρδίου και η κατασκευή μεμβράνης που περιβάλλει το τοίχωμα.
- Η διακριτοποίηση της κατασκευής (ρευστό και τοίχωμα) με ένα σύνολο στοιχείων που συνδέονται σε συνοριακούς κόμβους.
- Η περιγραφή των εξισώσεων ισορροπίας που αντιστοιχούν στις άγνωστες κομβικές μετατοπίσεις και η επίλυσή τους.

- Ο ορισμός των συνοριακών συνθηκών και ιδιοτήτων του ρευστού και του τοιχώματος.
- Ο υπολογισμός των κατανομών των τάσεων, παραμορφώσεων και συνολικών μετατοπίσεων των στοιχείων του μυοκαρδίου για δεδομένες μετατοπίσεις στους κόμβους.
- Η ερμηνεία των αποτελεσμάτων της ανάλυσης (τάσεις, παραμορφώσεις και μετατοπίσεις), με βάση τις δεδομένες παραδοχές- περιορισμούς του προβλήματος.

Για τους υπολογισμούς χρησιμοποιήθηκαν τα υπολογιστικά συστήματα του Εργαστηρίου Βιοϊατρικής Τεχνολογίας και της Μονάδας Ιατρικής Τεχνολογίας και Ευφών Πληροφοριακών Συστημάτων υπό την ευγενική επίβλεψη του Καθηγητή κ. Δ. Φωτιάδη και την ευγενική συνεργασία του Δρ. κ. Α. Σακκελάρου.

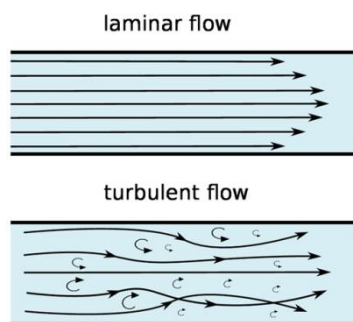
### 5.1 Συνοπτική περιγραφή στοιχείων μηχανικής των ρευστών

Η μηχανική των ρευστών (Ρευστομηχανική) είναι ο κλάδος των φυσικών επιστημών που έχει ως αντικείμενό του τη στατική, την κινηματική και τη δυναμική των ρευστών. Η στατική των ρευστών επικεντρώνεται στη μελέτη και τον υπολογισμό των δυνάμεων τις οποίες ασκούν τα ακίνητα ρευστά πάνω σε επιφάνειες πεπερασμένων διαστάσεων. Η κινηματική των ρευστών ασχολείται με την περιγραφή της κίνησης των ρευστών και εξετάζει τα μεγέθη που έχουν άμεση σχέση με αυτήν, όπως για παράδειγμα η ταχύτητα, η επιτάχυνση και η παροχή του ρευστού. Τέλος, η δυναμική των ρευστών, η οποία αποτελεί και τον πιο σημαντικό τομέα της ρευστομηχανικής, έχει ως αντικείμενο τις μεταβολές της ενέργειας και τις δυνάμεις που αναπτύσσονται κατά τη ροή των ρευστών.

Η ροή των πραγματικών ρευστών ονομάζεται ιξώδης και διακρίνεται σε δύο είδη, τα οποία διαφέρουν μεταξύ τους ως προς την εσωτερική δομή. Τα δύο είδη της ιξώδους ροής είναι η στρωτή και η τυρβώδης ροή. *Στρωτή ροή* ονομάζεται η ιξώδης ροή κατά την οποία τα σωματίδια του ρευστού κινούνται ομαλώς και κατά στρώματα (ή στοιβάδες). Σε κάθε τέτοιο στρώμα, η κατανομή της ταχύτητας του ρευστού είναι ομοιόμορφη σε όλη την έκταση της εγκάρσιας διατομής του στρώματος. Επομένως, κατά τη στρωτή ροή, η μόνη κίνηση που παρατηρείται είναι



κατά τη διεύθυνση της ροής, αφού κατά την κάθετη προς αυτή διεύθυνση δεν υπάρχει συνιστώσα ταχύτητας. *Τυρβώδης ροή* είναι η ιξώδης ροή κατά την οποία τα σωματίδια του ρευστού κινούνται σε ακανόνιστες τροχιές προς όλες τις διευθύνσεις κατά εντελώς τυχαίο τρόπο. Το κύριο χαρακτηριστικό γνώρισμα της τυρβώδους ροής είναι ότι οι ιδιότητες του ρευστού σε τυχαίο σημείο του πεδίου ροής διακυμαίνονται συνεχώς και με εντελώς τυχαίο τρόπο (Εικόνα 73).



**Εικόνα 73.** Στρωτή και τυρβώδης ροή.

Στη μηχανική ρευστών, ο αριθμός Reynolds (Re) είναι μια αδιάστατη ποσότητα, η οποία χρησιμοποιείται για τον προσδιορισμό όμοιων προτύπων ροής σε διαφορετικές καταστάσεις ροής ρευστών. Η έννοια του αριθμού Reynolds εισήχθη από τον Stokes το 1851, αλλά πήρε το όνομά του από τον Reynolds (1842–1912), ο οποίος καθιέρωσε την χρήση του το 1883. Ο αριθμός Reynolds χρησιμοποιείται ως κριτήριο που χαρακτηρίζει το είδος της ροής. Για ροή σε αγωγούς κυκλικής διατομής, ο αριθμός Reynolds ορίζεται από την σχέση

$$Re = \frac{\rho v d}{\mu}$$

όπου  $\rho$  είναι η πυκνότητα του ρευστού,  $v$  η μέση ταχύτητά του,  $d$  η εσωτερική διάμετρος του αγωγού και  $\mu$  το δυναμικό ιξώδες.

Η ροή σε αγωγό μετατρέπεται από στρωτή σε τυρβώδη για τιμές Re μεγαλύτερες από 2000 και μικρότερες από 4000. Στην πράξη όμως, η μετατροπή της ροής από στρωτή σε τυρβώδη γίνεται όταν ο αριθμός Reynolds υπερβεί την τιμή 2000 ( $Re_c=2000$ ). Η τιμή αυτή αποτελεί ένα ανώτερο όριο για την ευστάθεια της στρωτής ροής.

Ανάλογα με την πυκνότητά τους τα ρευστά διακρίνονται σε δύο είδη, τα ασυμπιεστά και τα συμπιεστά. Ασυμπιεστά ρευστά είναι εκείνα των οποίων η

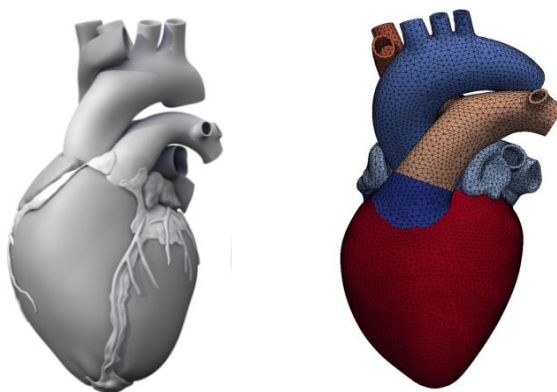
πυκνότητα  $\rho$  είναι σταθερή. Στην κατηγορία των συμπιεστών ρευστών ανήκουν ουσιαστικά τα αέρια. Η πυκνότητα των αερίων μεταβάλλεται σημαντικά με μεταβολή της πίεσης και της θερμοκρασίας.

Με βάση τις σχέσεις που συνδέουν την ιξώδη τάση με τον αντίστοιχο ρυθμό παραμόρφωσης, τα ρευστά ταξινομούνται σε δύο βασικές κατηγορίες: Τα νευτωνικά και Μη Νευτωνικά ρευστά. Νευτωνικά ρευστά ονομάζονται τα ρευστά στα οποία η εξάρτηση της ιξώδους τάσης από το ρυθμό παραμόρφωσης του ρευστού είναι γραμμική, υπακούοντας το νόμο του Νεύτωνα, από όπου προέρχεται και η ονομασία τους. Νευτωνικά ρευστά θεωρούνται όλα τα αέρια και τα περισσότερα υγρά (π.χ. νερό). Το χαρακτηριστικό των νευτωνικών ρευστών είναι ότι το ιξώδες αποτελεί για αυτά πραγματική ιδιότητα, η τιμή της οποίας εξαρτάται από τη μοριακή φύση και την κατάσταση (πίεση και θερμοκρασία) στην οποία βρίσκεται το ρευστό. Μη Νευτωνικά ρευστά ονομάζονται τα ρευστά εκείνα στα οποία η εξάρτηση της ιξώδους τάσης από τον ρυθμό παραμόρφωσης του ρευστού είναι μη γραμμική [181].

## 5.2 Βιβλιογραφική ανασκόπηση

Η υπολογιστική μοντελοποίηση του καρδιακού τοιχώματος και της καρδιακής ροής αναδεικνύεται ως μια από τις πιο σύγχρονες, μη επεμβατικές μεθόδους για την ανάλυση της λειτουργίας της υγιούς και της ασθενούς καρδιάς [182-185]. Σύμφωνα με τη βιβλιογραφία, υπάρχουν λίγες αναφορές που μελετούν τη μοντελοποίηση της δεξιάς κοιλίας και την απόκριση της σε συνθήκες υπερφόρτισης πίεσης και υπερτροφίας (νόσος πνευμονικής υπέρτασης). Συγκεκριμένα, η ομάδα των Raush κ.συν. μελέτησε την υπερτροφία του τοιχώματος της δεξιάς και αριστερής κοιλίας, χρησιμοποιώντας τη θεωρία της μηχανικής του συνεχούς μέσου για να εξηγήσει και να προβλέψει την οξεία και χρόνια μεταβολή της λειτουργίας της καρδιάς, μετά από πνευμονική και συστηματική υπέρταση, αντίστοιχα [186]. Η ομάδα των Genet κ.συν. έδειξε ότι μέσω της υπολογιστικής μοντελοποίησης μπορούν να προβλεφθούν οι μεταβολές στο πάχος του τοιχώματος, στο μέγεθος της κοιλότητας και της γεωμετρίας της καρδιάς, οι οποίες συμφωνούν με κλινικές παρατηρήσεις σε ασθενείς με διαστολική και συστολική ανεπάρκεια. Το μοντέλο που κατασκευάστηκε (Εικόνα 74) αναφέρεται και στις 4 κοιλότητες του καρδιακού μυ και χρησιμοποιείται για το σχεδιασμό θεραπείας, με βάση την πρόοδο της καρδιακής ανεπάρκειας σε κάθε

ασθενή ξεχωριστά (patient- specific) [187]. Άλλες μελέτες επικεντρώθηκαν στην προσέγγιση της μικροδομής των πνευμονικών αρτηριών μέσω πεπερασμένων στοιχείων για τη μελέτη της υπερελαστικής συμπεριφοράς τους, αρχικά σε επίμυες με πνευμονική υπέρταση [188] και έπειτα σε κλινικές μελέτες παιδιών με πνευμονική υπέρταση [189]. Το μοντέλο μιμούταν τις δομικές διαμορφώσεις των πρωτεϊνών στην εξωκυττάρια μήτρα, καταλήγωντας στο συμπέρασμα ότι η πυκνότητα δικτύωσης των μοριακών αλυσιδών συνδέεται με ένα βιολογικό μηχανισμό αναδιαμόρφωσης μέσω του οποίου οι πνευμονικές αρτηρίες γίνονται πιο δύσκαμπτες στην πνευμονική υπέρταση.



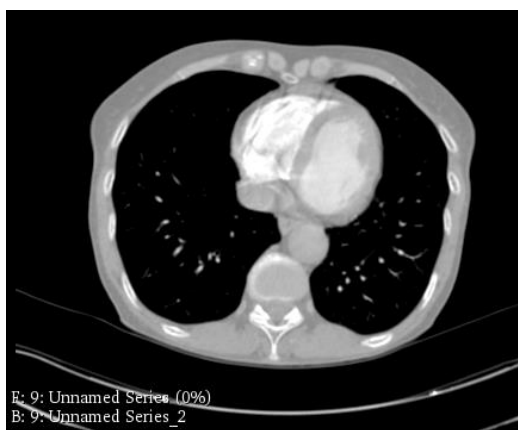
**Εικόνα 74.** Ανατομικό μοντέλο καρδιάς από μαγνητική τομογραφία (αριστερά) και διακριτοποιημένο μοντέλο πεπερασμένων στοιχείων με 208561 τετράεδρα στοιχεία και 47323 κόμβους (δεξιά) [187].

Ελάχιστες αναφορές μελετούν την αύξηση της τοιχωματικής τάσης, μετά από υπερφόρτιση πίεσης και την εφαρμογή βιοϋλικών (σε μορφή patch) στη δεξιά κοιλία για τη βελτίωση της λειτουργίας της. Συγκεκριμένα, η ομάδα των Kheyfets κ.συν. ανέδειξε τον προσδιορισμό της τοιχωματικής τάσης που ασκούνται στις πνευμονικές αρτηρίες ως δείκτη καλής λειτουργίας της δεξιάς κοιλίας και διάγνωσης της προοδευτικά μεταβαλλόμενης νόσου της πνευμονικής υπέρτασης [190]. Τέλος, αξίζει να σημειωθεί η ερευνητική μελέτη της ομάδας των Tang κ.συν., η οποία επικεντρώνεται στην ανάπτυξη υπερελαστικών μοντέλων προσομοίωσης της αριστερής και δεξιάς κοιλίας, οι γεωμετρίες των οποίων προήλθαν από συγκεκριμένο ασθενή με βαριάς μορφής διάταση της δεξιάς κοιλίας, χρησιμοποιώντας patch από διαφορετικά υλικά, για τον έλεγχο της επίδρασης αυτών των υλικών στη λειτουργία της κοιλίας. Τα αποτελέσματα ήταν ενθαρρυντικά, αφού έδειξαν μείωση της τάσης

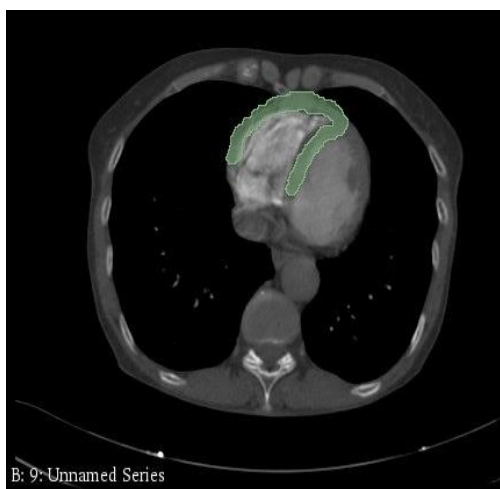
στην περιοχή που τοποθετήθηκε το patch, καθώς και βελτιωμένη λειτουργία και επαναφορά της δεξιάς κοιλίας [191].

### 5.3 Κατασκευή γεωμετρίας

Η κατασκευή της γεωμετρίας της δεξιάς κοιλίας πραγματοποιήθηκε χρησιμοποιώντας αξονική τομογραφία ασθενούς με φυσιολογική λειτουργία της καρδιάς (patient-specific), η οποία ελήφθη από τον αξονικό τομογράφο του Ακτινολογικού τμήματος του Πανεπιστημιακού Νοσοκομείου Ιωαννίνων (Εικόνα 75). Ακολούθησε σκιαγράφιση της δεξιάς κοιλίας σε 40 τομές [192], χαρακτηρίζοντας αρχικά το τοίχωμα και ύστερα το ρευστό, με τη χρήση πλατφόρμας λογισμικού 3D slicer (Εικόνα 77 και Εικόνα 76). Στη συνέχεια, βάσει αυτών των τομών, δημιουργήθηκε η τρισδιάστατη δομή της κοιλίας, όπως φαίνεται στην Εικόνα 78.



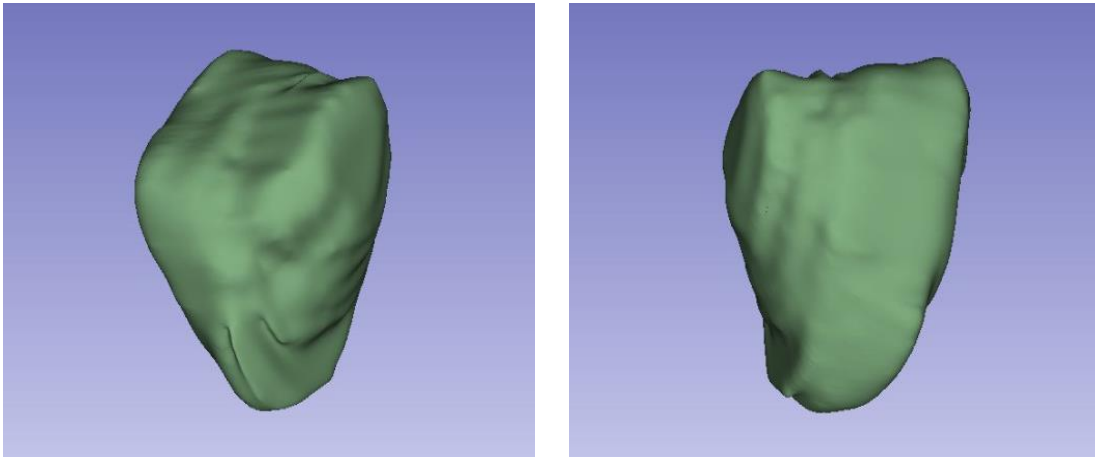
**Εικόνα 75.** Απεικόνιση της καρδιάς από αξονική τομογραφία, στην πλατφόρμα λογισμικού 3D slicer.



**Εικόνα 77.** Χαρακτηρισμός του τοιχώματος της δεξιάς κοιλίας στο 3D slicer.



**Εικόνα 76.** Χαρακτηρισμός του ρευστού της δεξιάς κοιλίας στο 3D slicer.



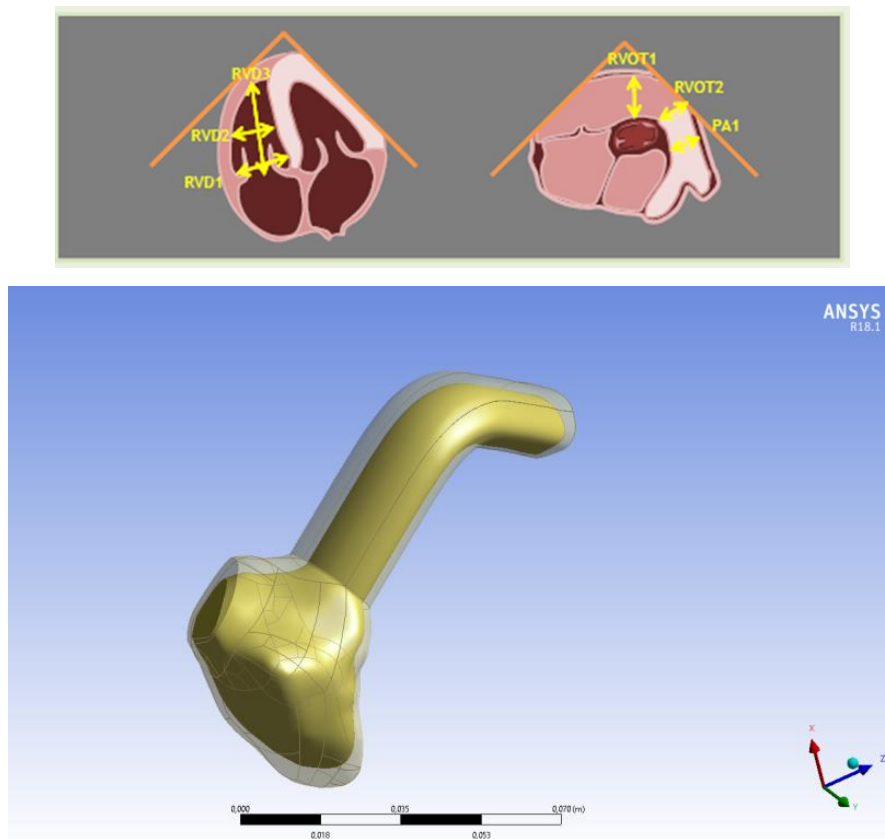
**Εικόνα 78.** Τρισδιάστατη γεωμετρία της δεξιάς κοιλίας.

Λόγω της μη ομαλής και λείας επιφάνειας του τοιχώματος της γεωμετρίας, έγινε επεξεργασία χρησιμοποιώντας την πλατφόρμα λογισμικού Geomagic για τη βέλτιστοποίηση των χαρακτηριστικών της. Οι διαστάσεις της δεξιάς κοιλίας, της τριγλώχινας βαλβίδας και της πνευμονικής βαλβίδας και αρτηρίας που χρησιμοποιήθηκαν και συμφωνούν με τις αντίστοιχες τιμές της βιβλιογραφίας [193, 194] όπως φαίνονται στον Πίνακα 11.

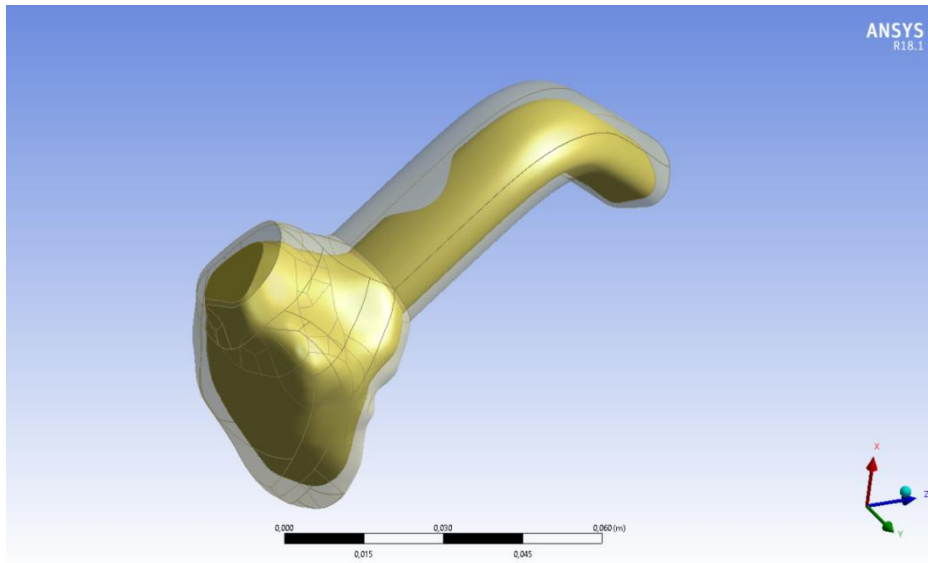
Η τελική βελτιστοποιημένη γεωμετρία που περιλαμβάνει το ρευστό και το τοίχωμα μαζί, μεταφέρθηκε στο πρόγραμμα πεπερασμένων στοιχείων ANSYS, από το οποίο χρησιμοποιήθηκαν το λογισμικό Ansys Mechanical για δομική ανάλυση και το λογισμικό Ansys CFX (Fluid Flow) για ανάλυση ροής ρευστών. Με βάση την αρχική γεωμετρία της καρδιάς κατασκευάστηκαν τα εξής 3 μοντέλα: 1) Το μοντέλο της φυσιολογικής δεξιάς κοιλίας, όπως απεικονίζεται στην Εικόνα 79, 2) το μοντέλο της ασθενούς καρδιάς, μετά από αύξηση της πίεσης και στένωση της πνευμονικής αρτηρίας (Εικόνα 80), και 3) το μοντέλο της ασθενούς δεξιάς κοιλίας με την τοποθέτηση μεμβράνης επικαρδιακά (Εικόνα 81).

**Πίνακας 11.** Εκτίμηση διαστάσεων δεξιάς κοιλότητας, τριγλώχινας και πνευμονικής βαλβίδας, καθώς και πνευμονικής αρτηρίας για την κατασκευή της γεωμετρίας της δεξιάς κοιλίας.

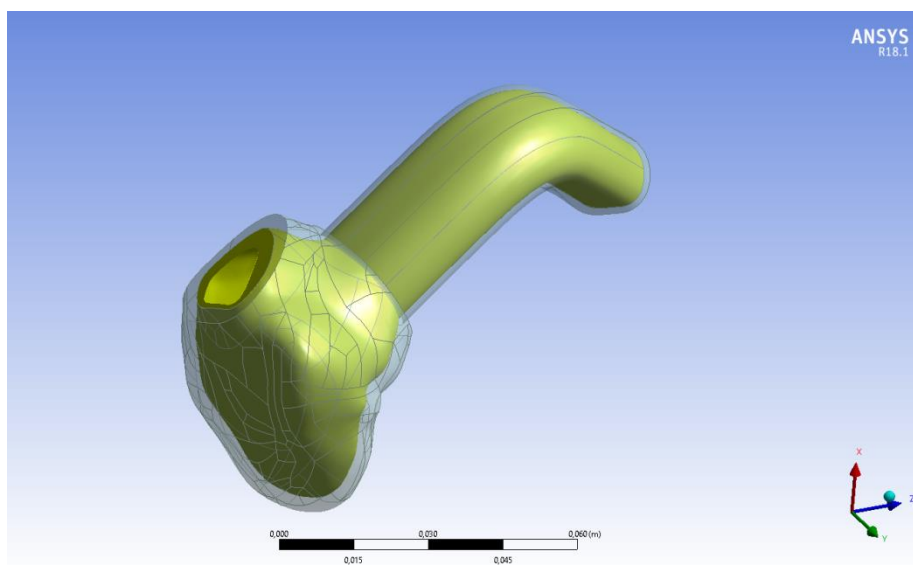
Δεξιά κοιλία	Φυσιολογικές τιμές
<b>Διαστάσεις (4 κοιλότητων)</b>	
Βασική διάμετρος (RVD1) (cm)	2,0 – 2,8
Διάμετρος στη μεσότητα (RVD2) (cm)	2,7 – 3,3
Μήκος βάση – κορυφή (RVD3) (cm)	7,1 – 7,9
<b>Διαστάσεις τριγλώχινας βαλβίδας</b>	
Μέση διάμετρος τριγλώχινας βαλβίδας (cm)	2,8±0,5
Εμβαδόν βαλβίδας (Valve area) (cm <sup>2</sup> )	4-6
<b>Διαστάσεις πνευμονικής βαλβίδας</b>	
Εμβαδόν βαλβίδας (Valve area) (cm <sup>2</sup> )	2,65 ±0,52
<b>Διάμετρος πνευμονικής αρτηρίας (PA1)</b>	1,5 – 2,1 (Φυσιολογική)
Στέλεχος πνευμονικής αρτηρίας (cm)	2,2 – 2,5 (Ήπια επιβάρυνση)



**Εικόνα 79.** Απεικόνιση μοντέλου ρευστού και τοιχώματος της φυσιολογικής δεξιάς κοιλίας.



**Εικόνα 80.** Απεικόνιση μοντέλου ρευστού και τοιχώματος της ασθενούς δεξιάς κοιλίας (στένωση πνευμονικής αρτηρίας).



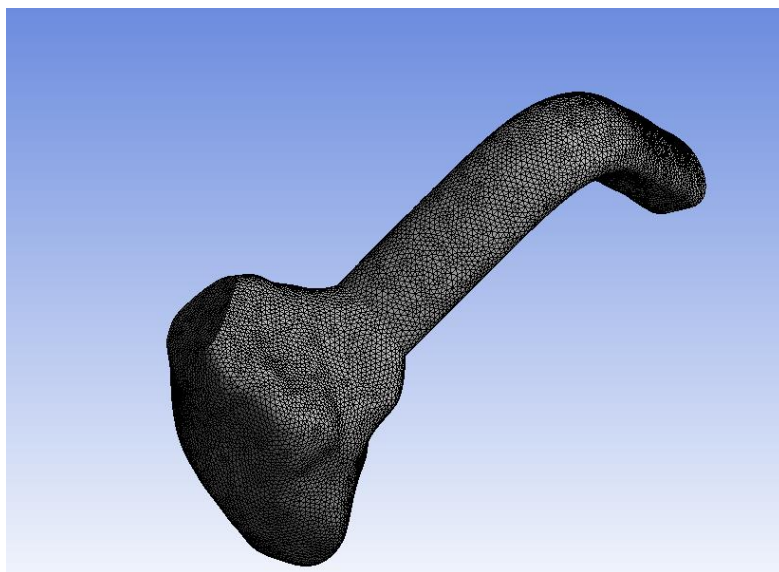
**Εικόνα 81.** Απεικόνιση μοντέλου της ασθενούς δεξιάς κοιλίας με την τοποθέτηση μεμβράνης επικαρδιακά.

#### 5.4 Διακριτοποίηση

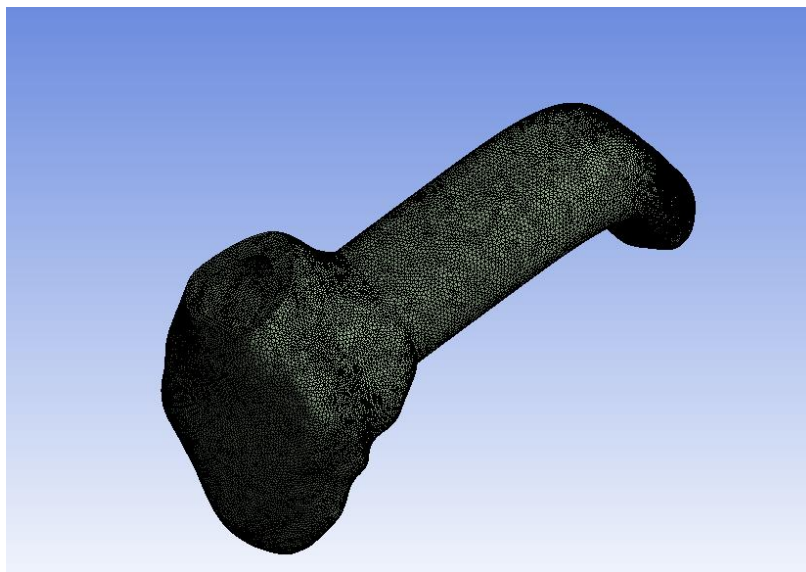
Το επόμενο στάδιο που ακολουθείται, είναι η διακριτοποίηση των μοντέλων με πεπερασμένα στοιχεία, δηλαδή η δημιουργία πλέγματος. Χρησιμοποιώντας τετράεδρα στοιχεία και με βάση το μέγεθος των στοιχείων (element size), κατασκευάστηκε ένα πλέγμα για το ρευστό με 595573 στοιχεία (elements) και



μέγεθος στοιχείων  $8 \times 10^{-4}$  και ένα πλέγμα για το τοίχωμα της δεξιάς κοιλίας με 792345 στοιχεία και μέγεθος στοιχείων  $6.5 \times 10^{-4}$ . Με το ίδιο μέγεθος των στοιχείων του τοιχώματος κατασκευάστηκε και το πλέγμα της μεμβράνης. Σύμφωνα με προηγούμενες μελέτες [195], η χρήση πυκνού πλέγματος για το τοίχωμα της κοιλίας οδηγεί σε πιο ακριβή και ασφαλή αποτελέσματα, σε σύγκριση με ένα πιο αραιό πλέγμα λιγότερων στοιχείων. Στην Εικόνα 82 και Εικόνα 83 απεικονίζονται τα πλέγματα για το ρευστό και το τοίχωμα, αντίστοιχα.



**Εικόνα 82.** Δημιουργία πλέγματος ρευστού της κοιλίας με 595573 τετράεδρα στοιχεία.



**Εικόνα 83.** Δημιουργία πλέγματος τοιχώματος της κοιλίας με 792345 τετράεδρα στοιχεία.



### 5.5 Περιγραφή εξισώσεων

Οι εξισώσεις που χρησιμοποιήθηκαν για την επίλυση του προβλήματος αναλύονται παρακάτω.

Αρχικά, ορίστηκε το μέγεθος της μηχανικής τάσης από την σχέση:

$$\sigma = \frac{F}{A_0}$$

όπου  $F$  είναι το φορτίο που εφαρμόζεται κάθετα στη διατομή του δοκιμίου και μετριέται σε N και  $A_0$  είναι το αρχικό εμβαδόν της κάθετης διατομής του δοκιμίου πριν την εφαρμογή οποιουδήποτε φορτίου. Το  $A_0$  εκφράζεται σε  $m^2$ , ενώ οι μονάδες της μηχανικής τάσης σε MPa.

Η μηχανική παραμόρφωση είναι αδιάστατο μέγεθος και ορίζεται από τη σχέση

$$\varepsilon = \frac{l_i - l_0}{l_0} = \frac{\Delta l}{l_0}$$

όπου  $l_0$  είναι το αρχικό μήκος, του δοκιμίου πριν την εφαρμογή οποιουδήποτε φορτίου,  $l_i$  το στιγμιαίο μήκος, και  $\Delta l$  η μεταβολή του στιγμιαίου μήκους ως προς το αρχικό μήκος.

Για λόγους απλούστευσης του προβλήματος, το τοίχωμα της δεξιάς κοιλίας και η μεμβράνη που τοποθετείται επικαρδιακά, θεωρούνται ως γραμμικά ελαστικά υλικά, δηλαδή υφίστανται μικρές παραμορφώσεις υπό την επίδραση τάσεων με γραμμικό τρόπο και περιγράφονται από την εξίσωση

$$\sigma = E\varepsilon$$

Αυτή η σχέση είναι γνωστή ως νόμος του Hooke και η σταθερά αναλογίας  $E$  είναι το μέτρο ελαστικότητας ή μέτρο Young με μονάδες μέτρησης GPa ή psi. Το μέτρο ελαστικότητας θεωρείται ως το μέτρο δυσκαμψίας του υλικού ή η αντίστασή του στην ελαστική παραμόρφωση.

Ο λόγος των εγκάρσιων παραμορφώσεων προς την αξονική παραμόρφωση, ονομάζεται λόγος Poisson ( $\nu$ ) και ορίζεται σύμφωνα με τη σχέση

$$\nu = -\frac{\varepsilon_x}{\varepsilon_z} = -\frac{\varepsilon_y}{\varepsilon_z}$$

Το αρνητικό πρόσημο που εμπεριέχεται στην εξίσωση υποδηλώνει ότι το  $\nu$  είναι πάντοτε θετικό, καθώς τα  $\varepsilon_x$  και  $\varepsilon_z$  έχουν πάντοτε αντίθετα πρόσημα. Η μέγιστη τιμή του  $\nu$  είναι 0,50 [196].

Στην παρούσα εργασία, ο συντελεστής Reynolds υπολογίστηκε 4066, επομένως η ροή χαρακτηρίζεται ως τυρβώδης ( $Re > 2000$ ). Το ρευστό θεωρήθηκε ασυμπίεστο και νευτωνικό και έτσι για την επίλυση του προβλήματος χρησιμοποιήθηκαν οι παρακάτω εξισώσεις [197]:

$$\text{Εξίσωση συνέχειας: } \nabla \cdot v = 0$$

$$\text{Εξίσωση Navier- Stokes: } \rho \left[ \frac{\partial v}{\partial t} + (v - v_g) \cdot \nabla v \right] = \nabla \sigma_{fluid/solid}$$

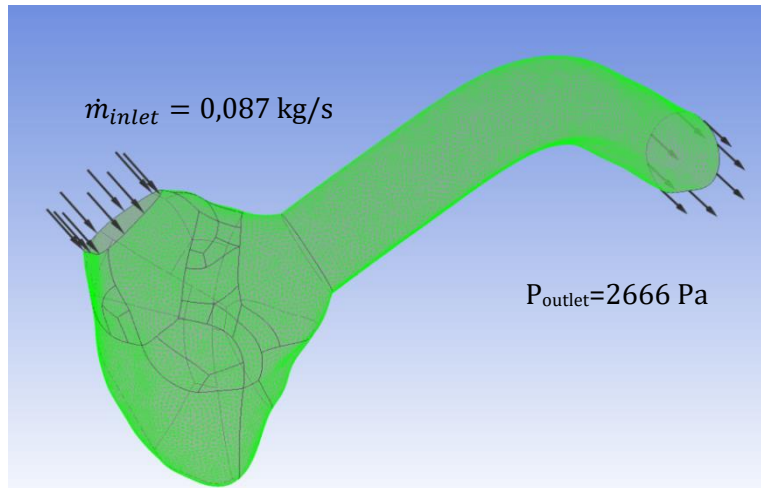
όπου  $\sigma_{fluid/solid}$  είναι ο Cauchy stress tensor και ισχύει για τα ρευστά με  $0 \leq v \leq v_g$  και για τα στερεά με  $v = v_g$ , όπου  $v_g$  η ταχύτητα στη διεπιφάνεια ρευστού- στερεού.

### 5.6 Συνοριακές συνθήκες

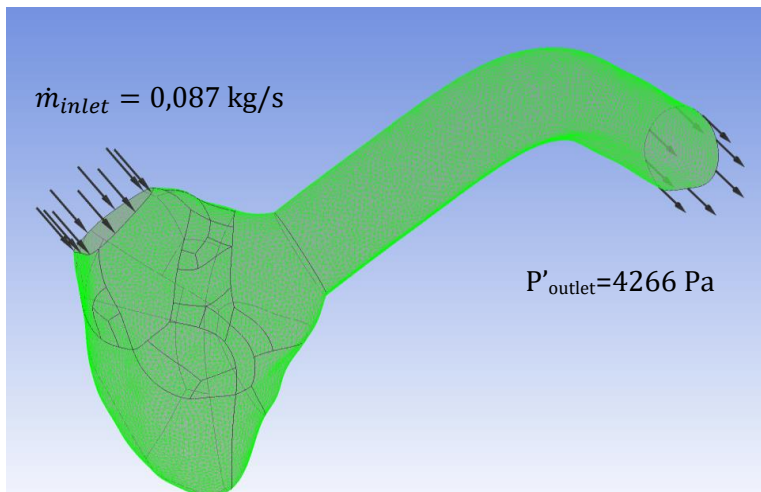
Οι συνοριακές συνθήκες που τέθηκαν για το ρευστό είναι ο ρυθμός ροής μάζας του αίματος κατά την είσοδο και η φυσιολογική ή η αυξημένη πίεση κατά την έξοδο, για την υγιή και την ασθενή δεξιά κοιλία αντίστοιχα, όπως φαίνονται στον Πίνακα 12 [198] και στις Εικόνα 84 και Εικόνα 85. Η πίεση στη δεξιά κοιλία υπό φυσιολογικές συνθήκες είναι συνήθως στα 20mm Hg ή 2666 Pa, ενώ μετά από πνευμονική υπέρταση (ήπιας επιβάρυνσης) αυξάνεται στα 32mm Hg ή 4266 Pa [199]. Για τα Νευτώνεια ρευστά ισχύει η συνθήκη μη ολίσθησης (no-slip and no-penetration condition), σύμφωνα με την οποία, η ταχύτητα του ρευστού που βρίσκεται σε επαφή με το τοίχωμα είναι μηδέν και το τοίχωμα δεν ολισθαίνει.

**Πίνακας 12.** Συνοριακές συνθήκες ρευστού [198].

Συνοριακές συνθήκες	Τιμές
Ρυθμός ροής μάζας, $\dot{m}$ (kg/s)	0,087
Φυσιολογική πίεση, P (Pa)	2666
Αυξημένη πίεση, P' (Pa)	4266

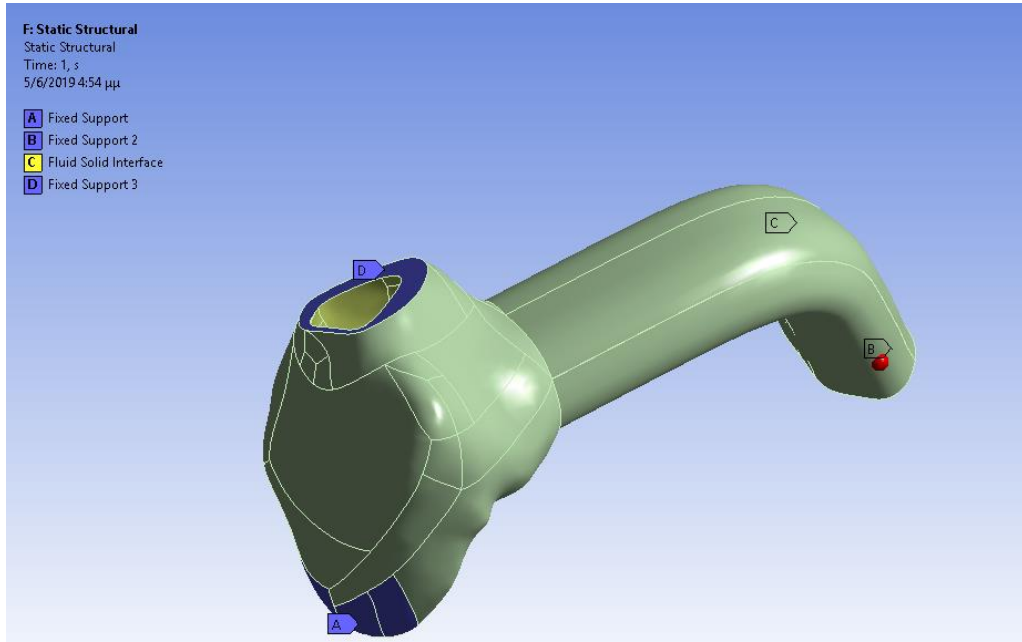


**Εικόνα 84.** Συνοριακές συνθήκες για το ρευστό υγιούς δεξιάς κοιλίας.

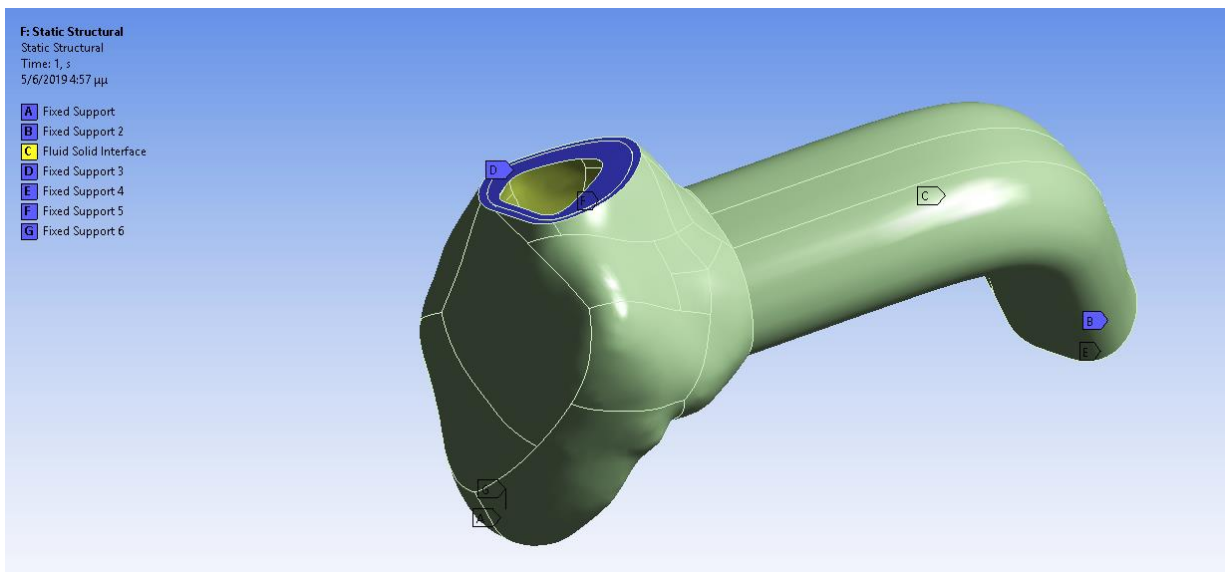


**Εικόνα 85.** Συνοριακές συνθήκες για το ρευστό ασθενούς δεξιάς κοιλίας.

Πολύ σημαντική θεωρείται και η επιβολή των κατάλληλων οριακών συνθηκών με σκοπό την παρεμπόδιση της μετατόπισης και της περιστροφής του μυοκαρδίου και την όσον δυνατόν καλύτερη προσομοίωσή του, αναφορικά με τα πραγματικά σημεία στήριξης, μέσα στη θώρακική κοιλότητα. Συγκεκριμένα, χρησιμοποιώντας το εργαλείο fixed support, για το μοντέλο της φυσιολογικής κοιλίας τέθηκαν σημεία στήριξης στην τριγλώχινα βαλβίδα (D), στην κορυφή της κοιλίας (A), στην πνευμονική αρτηρία (B) και στη διεπιφάνεια αλληλεπίδρασης του τοιχώματος με το ρευστό (fluid solid interface) (C) (Εικόνα 86). Όσον αφορά στο μοντέλο της ασθενούς κοιλίας με την τοποθέτηση μεμβράνης, τέθηκαν ακριβώς τα ίδια σημεία στήριξης με τη φυσιολογική κοιλία (Εικόνα 87).



**Εικόνα 86.** Απεικόνιση των σημείων στήριξης της κοιλίας.



**Εικόνα 87.** Απεικόνιση των σημείων στήριξης της μεμβράνης σε επαφή με την κοιλία.

## 5.7 Ιδιότητες

Στη συνέχεια, ορίστηκαν οι ιδιότητες του ρευστού, του τοιχώματος του μυοκαρδίου και της μεμβράνης χιτοζάνης. Ως ιδιότητες ρευστού χρησιμοποιήθηκαν η πυκνότητα και το ιξώδες του Πίνακας 13, ενώ θεωρώντας το τοίχωμα της κοιλίας και τη μεμβράνη χιτοζάνης ως γραμμικά ελαστικά υλικά, τέθηκαν οι αντίστοιχες τιμές της πυκνότητας, του μέτρου ελαστικότητας και του λόγου Poisson (Πίνακας 14 και 15). Αξίζει να σημειωθεί ότι η επιλογή των τιμών του μέτρου ελαστικότητας για τη μεμβράνη χιτοζάνης ( $E=0,3-0,7\text{MPa}$ ) έγινε λαμβάνοντας υπόψιν το μέτρο ελαστικότητας του μυοκαρδίου του ανθρώπου ( $E=0,2-0,5\text{MPa}$ ) και του επίμυ ( $E=0,14\text{MPa}$ ) στο τέλος της διαστολής, δεδομένου ότι το μέτρο δυσκαμψίας των βιοϋλικών που χρησιμοποιούνται στο μυοκάρδιο κυμαίνεται μεταξύ μερικών δεκάδων kPa μέχρι και 1 MPa [200].

**Πίνακας 13.** *Ιδιότητες ρευστού [198].*

Ιδιότητες ρευστού	Τιμές
Πυκνότητα, $\rho$ ( $\text{kg}/\text{m}^3$ )	1050
Δυναμικό ιξώδες ( $\text{Pa}\cdot\text{s}$ )	0,0035

**Πίνακας 14.** *Ιδιότητες τοιχώματος μυοκαρδίου [144, 145].*

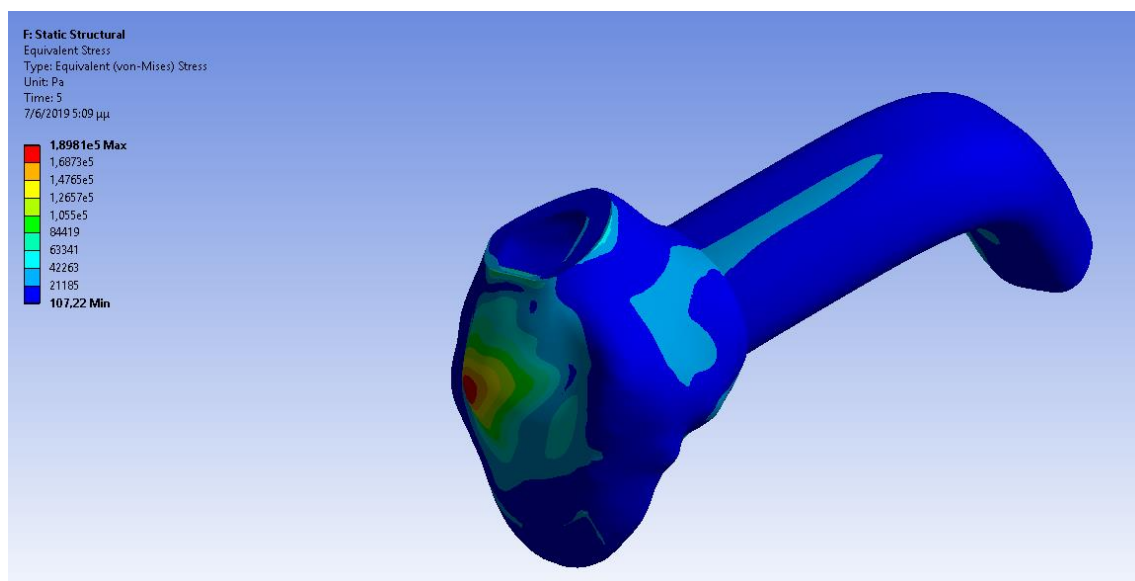
Ιδιότητες τοιχώματος	Τιμές
Πυκνότητα, $\rho$ ( $\text{kg}/\text{m}^3$ )	1200
Μέτρο Young, $E$ (MPa)	0,35
Λόγος Poisson, $\nu$	0,4

**Πίνακας 15.** *Ιδιότητες μεμβράνης χιτοζάνης.*

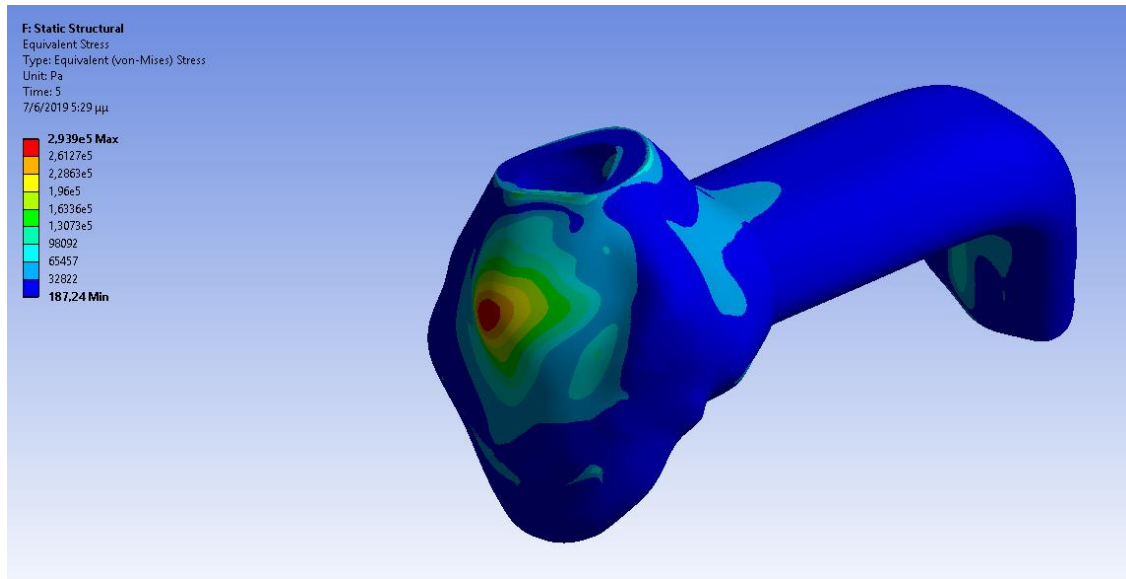
Ιδιότητες μεμβράνης	Τιμές
Μέτρο Young, $E$ (MPa)	0,3-0,7
Λόγος Poisson, $\nu$	0,4

## 5.8 Εκτίμηση συμπεριφοράς δεξιάς κοιλίας με πνευμονική υπέρταση μετά από εφαρμογή μεμβράνης

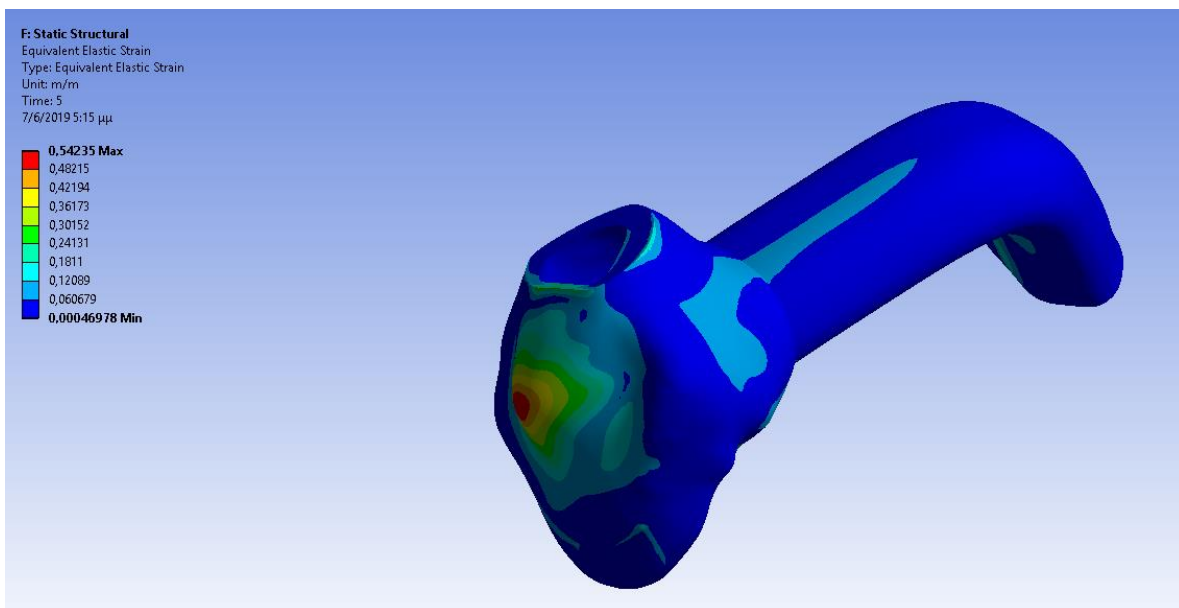
Λαμβάνοντας υπόψιν όλες τις παραπάνω παραμέτρους, πραγματοποιήθηκε η επίλυση του προβλήματος και η αξιολόγηση των αποτελεσμάτων. Τα τρία διαφορετικά μοντέλα που προέκυψαν (φυσιολογική δεξιά κοιλία, ασθενής δεξιά κοιλία και ασθενής δεξιά κοιλία με την τοποθέτηση μεμβράνης), μελετήθηκαν ως προς τη συνολική μετατόπιση, την ισοδύναμη τάση και την ισοδύναμη ελαστική παραμόρφωση σε μια χρονική στιγμή του καρδιακού κύκλου. Ενδεικτικά, οι κατανομές των τιμών αυτών των μεγεθών παρουσιάζονται συγκριτικά για τη φυσιολογική και την ασθενή κοιλία από την Εικόνα 88 έως την Εικόνα 93. Όπως ήταν αναμενομένο και επιβεβαιώνεται και από τα αποτελέσματα, συγκρίνοντας τις τιμές, παρατηρείται μια τάση (trend) αύξησης της μέγιστης τάσης που ασκείται στο τοίχωμα της κοιλίας μετά την υπερφόρτιση πίεσης, καθώς και αύξηση της μέγιστης παραμόρφωσης και της μέγιστης συνολικής μετατόπισης του μυοκαρδίου.



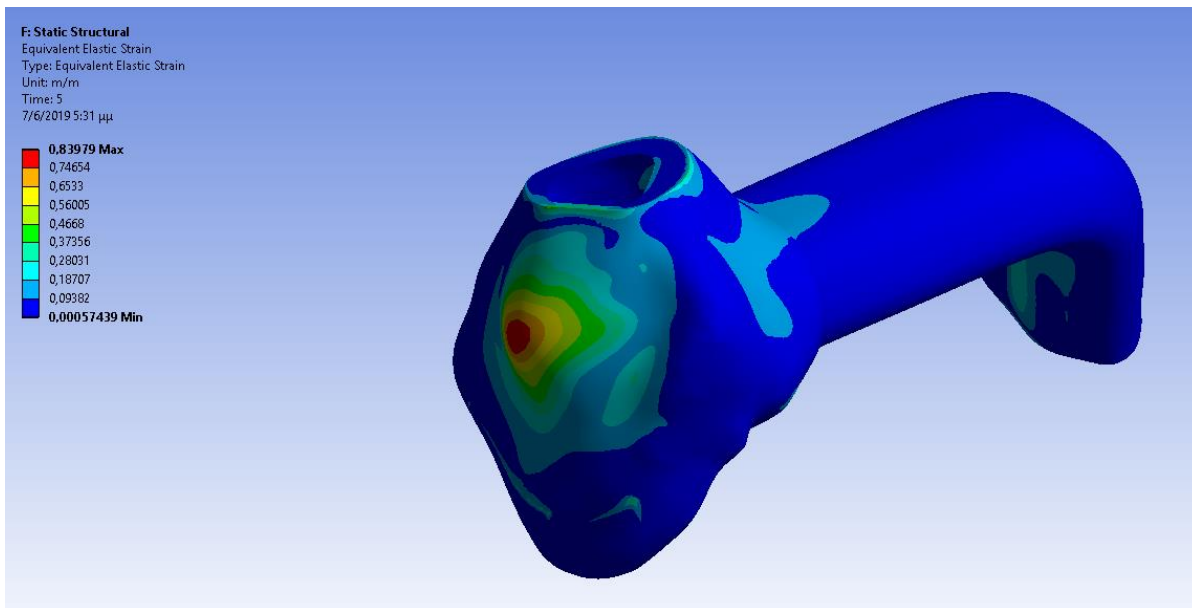
**Εικόνα 88.** Απεικόνιση της κατανομής της ισοδύναμης τάσης στο τοίχωμα της φυσιολογικής δεξιάς κοιλίας.



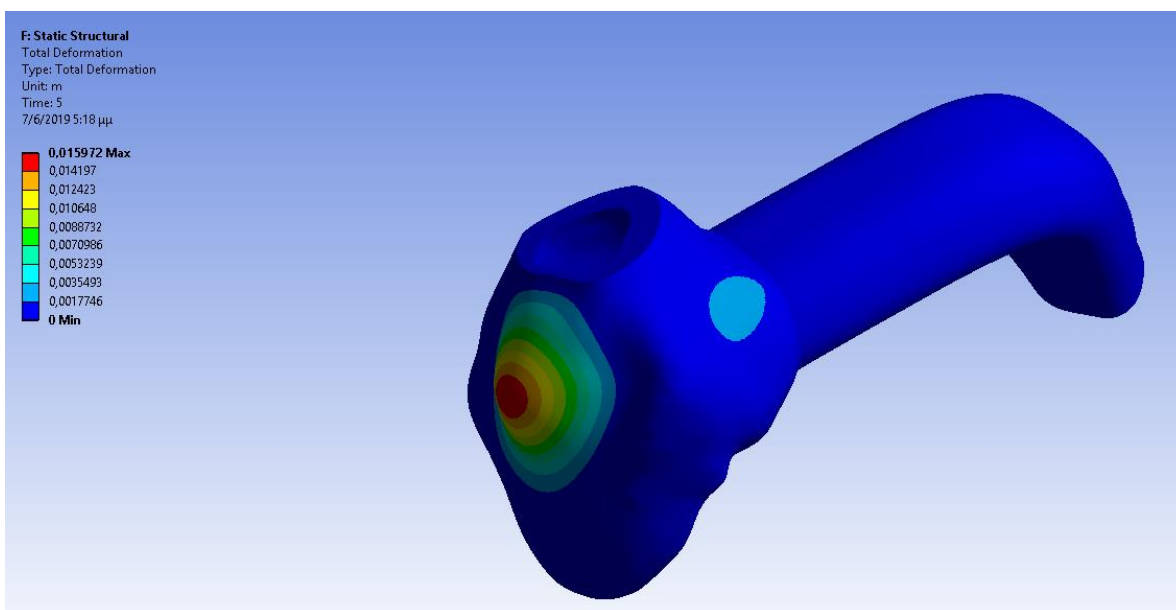
**Εικόνα 89.** Απεικόνιση της κατανομής της ισοδύναμης τάσης στο τοίχωμα της ασθενούς δεξιάς κοιλίας.



**Εικόνα 90.** Απεικόνιση της κατανομής της ισοδύναμης παραμόρφωσης στο τοίχωμα της φυσιολογικής δεξιάς κοιλίας.

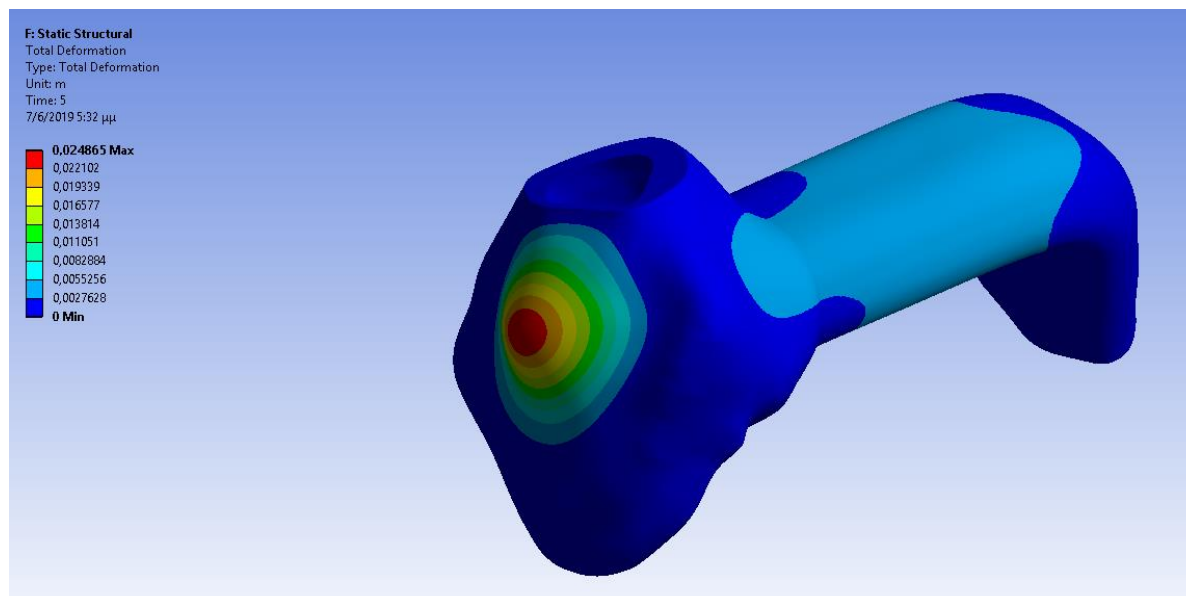


**Εικόνα 91.** Απεικόνιση της κατανομής της ισοδύναμης παραμόρφωσης στο τοίχωμα της ασθενούς δεξιάς κοιλίας.



**Εικόνα 92.** Απεικόνιση της κατανομής της συνολικής μετατόπισης στο τοίχωμα της φυσιολογικής δεξιάς κοιλίας.





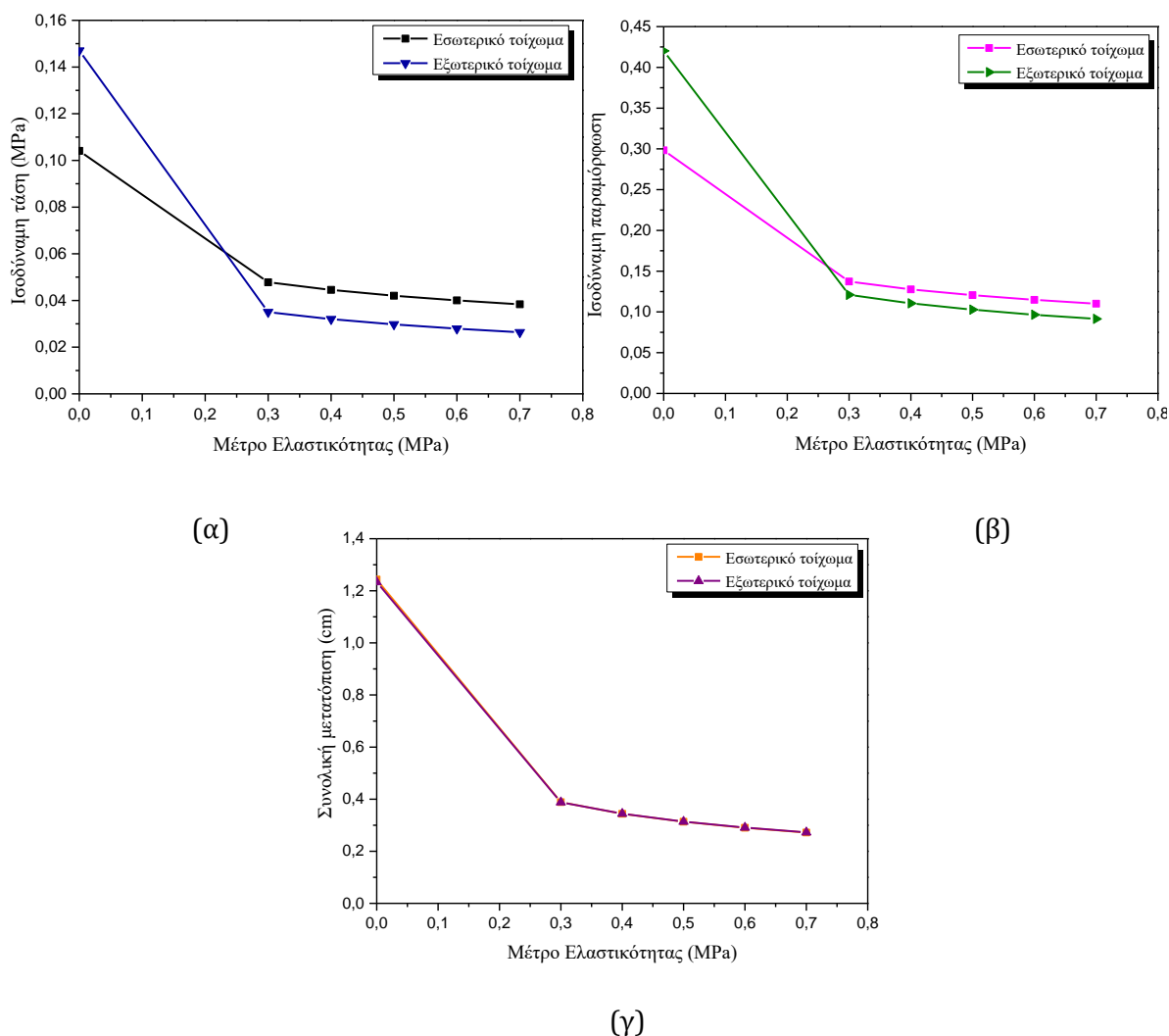
**Εικόνα 93.** Απεικόνιση της κατανομής της συνολικής μετατόπισης στο τοίχωμα της ασθενούς δεξιάς κοιλίας.

#### Εφαρμογή μεμβράνης στη δεξιά κοιλία

Ιδιαίτερα σημαντική για την αξιολόγηση των υπολογιστικών ευρημάτων θεωρείται η μελέτη της αλληλεπίδρασης της μεμβράνης με τη δεξιά κοιλία, όσον αφορά στη μεταβολή της τάσης, παραμόρφωσης και μετατόπισης που υφίσταται το μυοκάρδιο, τόσο στο εσωτερικό όσο και στο εξωτερικό του τοίχωμα, σε συνάρτηση με τα διαφορετικά μέτρα ελαστικότητας ( $E=0,3-0,7\text{MPa}$ ) που τέθηκαν για τη μεμβράνη. Υπενθυμίζεται ότι, στην παρούσα εργασία η μεμβράνη της χιτοζάνης που παρασκευάστηκε είχε μέτρο ελαστικότητας  $E= 0,4\text{ MPa}$ . Δοκιμάστηκαν μεμβράνες διαφορετικού πάχους (1, 2 και 3mm), διότι, όπως αναφέρθηκε και στην Εισαγωγή της παρούσας διατριβής, σύμφωνα με το νόμο Laplace, η τοιχωματική τάση σχετίζεται και εξαρτάται από το πάχος του τοιχώματος της κοιλίας. Τα αποτελέσματα που προέκυψαν παρουσιάζονται συγκριτικά παρακάτω.

Μεμβράνη πάχους 1mm (Εικόνα 94)

Μετά την τοποθέτηση μεμβράνης πάχους 1mm στο εξωτερικό τοίχωμα της ασθενούς κοιλίας παρατηρείται ότι για  $E=0,3$  MPa, η τάση που ασκείται στο εσωτερικό τοίχωμα του μυοκαρδίου μειώνεται στο 50%, ενώ για  $E_{\text{μεμβρ.}} > 0,3$  MPa η τάση σχεδόν σταθεροποιείται. Στο εξωτερικό τοίχωμα παρατηρείται ακόμα μεγαλύτερη μείωση του μεγέθους της τάσης (>50%) που ασκείται στο τοίχωμα μετά την υπερφόρτιση πίεσης και την τοποθέτηση μεμβράνης ( $E= 0,3$  MPa). Για μεγαλύτερα μέτρα ελαστικότητας της μεμβράνης, οι διαφορές στις τιμές των τάσεων είναι πάρα πολύ μικρές, ενώ φαίνεται να υπάρχει σταθεροποίηση των τιμών [Εικόνα 94(α)]. Η παραμόρφωση που υφίσταται το μυοκάρδιο μετά την τοποθέτηση της μεμβράνης, μειώνεται στο ~50% (για  $E_{\text{μεμβρ.}}=0,3\text{MPa}$ ) για το εσωτερικό τοίχωμα, ενώ ελάχιστες μειώσεις των τιμών της παραμόρφωσης παρατηρούνται μετά την τοποθέτηση μεμβρανών με μεγαλύτερα μέτρα ελαστικότητας. Για το εξωτερικό τοίχωμα, η μείωση της παραμόρφωσης αυξάνεται σε ποσοστό ~70% μετά την εφαρμογή της μεμβράνης, ενώ επίσης, ελάχιστη μείωση παρατηρείται και με την εφαρμογή μεμβρανών με μεγαλύτερα μέτρα ελαστικότητας [Εικόνα 94(β)]. Αντίστοιχα, για τη συνολική μετατόπιση του μυοκαρδίου, όπως φαίνεται στο διάγραμμα [Εικόνα 94(γ)], η μείωση των τιμών μετά την τοποθέτηση της μεμβράνης είναι ίδια και για το εσωτερικό και για το εξωτερικό τοίχωμα. Η μεγαλύτερη μείωση (>50%) εμφανίζεται μετά την τοποθέτηση της μεμβράνης με  $E=0,3\text{MPa}$ , ενώ η μείωση αυτή είναι σχεδόν σταθερή για μεμβράνες με  $E>0,3$  MPa.

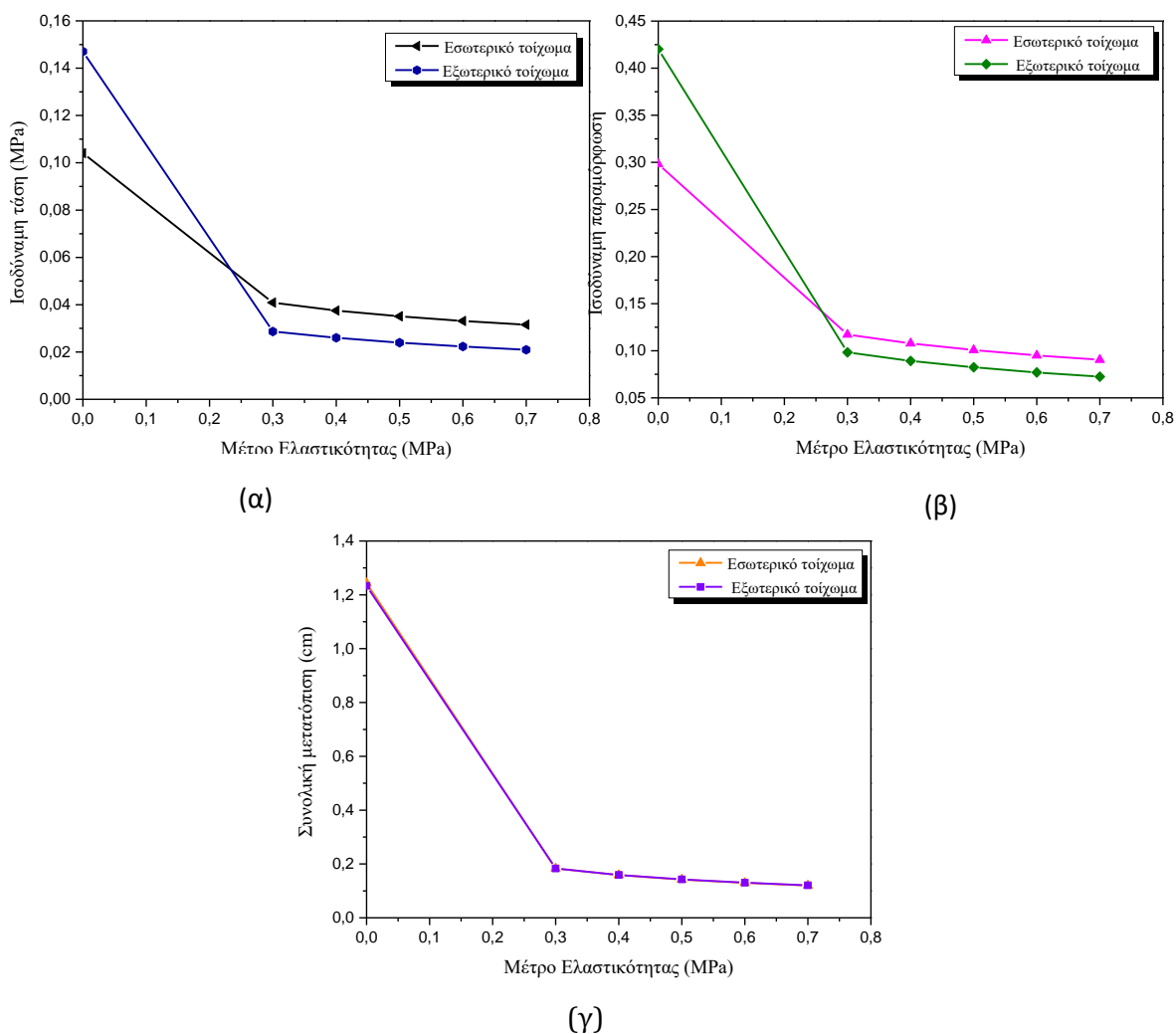


**Εικόνα 94.** Μεταβολή (α) της ισοδύναμης τάσης, (β) της ισοδύναμης παραμόρφωσης και (γ) της συνολικής μετατόπισης στο εσωτερικό και το εξωτερικό τοίχωμα του μυοκαρδίου, ως συνάρτηση του μέτρου ελαστικότητας της μεμβράνης πάχους 1 mm.

### Μεμβράνη πάχους 2mm (Εικόνα 95)

Αντίστοιχη μελέτη πραγματοποιήθηκε και για τη μεμβράνη πάχους 2mm, όπου παρατηρήθηκε παρόμοια συμπεριφορά με τη μεμβράνη του 1mm, τόσο στο εσωτερικό όσο και στο εξωτερικό τοίχωμα. Συγκεκριμένα, στη μεμβράνη πάχους 2mm, η μείωση της τάσης είναι μεγαλύτερη στο εξωτερικό τοίχωμα σε σχέση με το εσωτερικό [Εικόνα 95(α)], όπως ακριβώς συμβαίνει και με την παραμόρφωση του μυοκαρδίου, εσωτερικά και εξωτερικά. Όπως είναι αναμενόμενο, μεγαλύτερη επίδραση της μεμβράνης πάχους 2mm παρατηρείται στην παραμόρφωση του εξωτερικού τοιχώματος, ενώ η τοποθέτηση μεμβρανών με μέτρα ελαστικότητας

$E > 0,3$  MPa δεν φαίνεται να επηρεάζει σε μεγάλο βαθμό τη μείωση της παραμόρφωσης [Εικόνα 95(β)]. Η συνολική μετατόπιση που υφίσταται το μυοκάρδιο μετά την υπερφόρτιση πίεσης και την τοποθέτηση μεμβράνης, είναι ίδια και για το εσωτερικό και για το εξωτερικό του τοίχωμα, όπου η μείωση της μετατόπισης ξεπερνά το 50% μετά την εφαρμογή της μεμβράνης [Εικόνα 95(γ)].

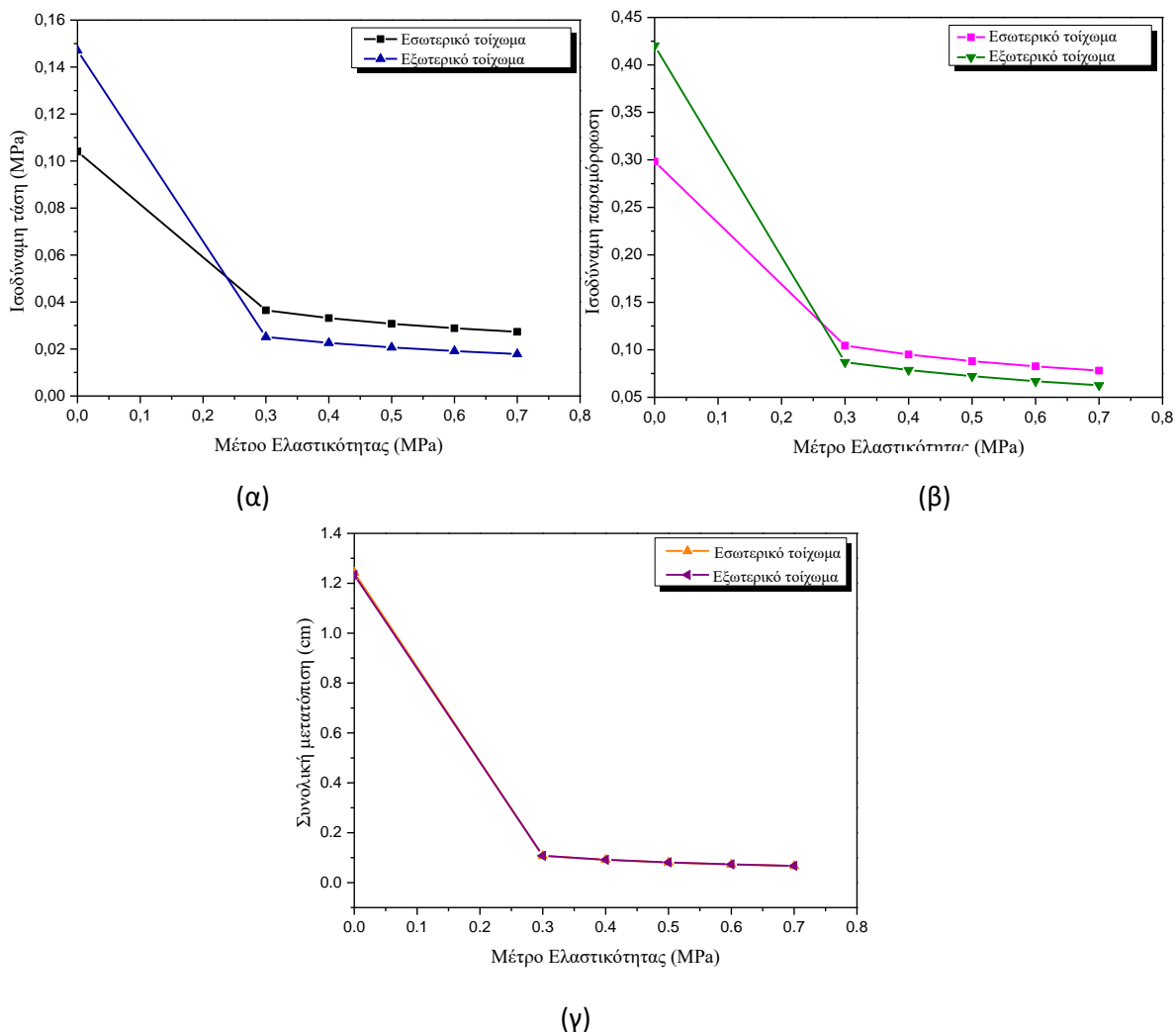


**Εικόνα 95.** Μεταβολή (α) της ισοδύναμης τάσης, (β) της ισοδύναμης παραμόρφωσης και (γ) της συνολικής μετατόπισης για το εσωτερικό και εξωτερικό τοίχωμα του μυοκαρδίου, ως συνάρτηση του μέτρου ελαστικότητας της μεμβράνης πάχους 2 mm.

### Μεμβράνη πάχους 3mm (Εικόνα 96)

Μετά την εφαρμογή μεμβράνης πάχους 3mm παρατηρείται μείωση των τιμών και των 3 μεγεθών (ισοδύναμη τάση, ισοδύναμη παραμόρφωση και συνολική μετατόπιση) τόσο στο εσωτερικό όσο και στο εξωτερικό τοίχωμα του μυοκαρδίου. Η

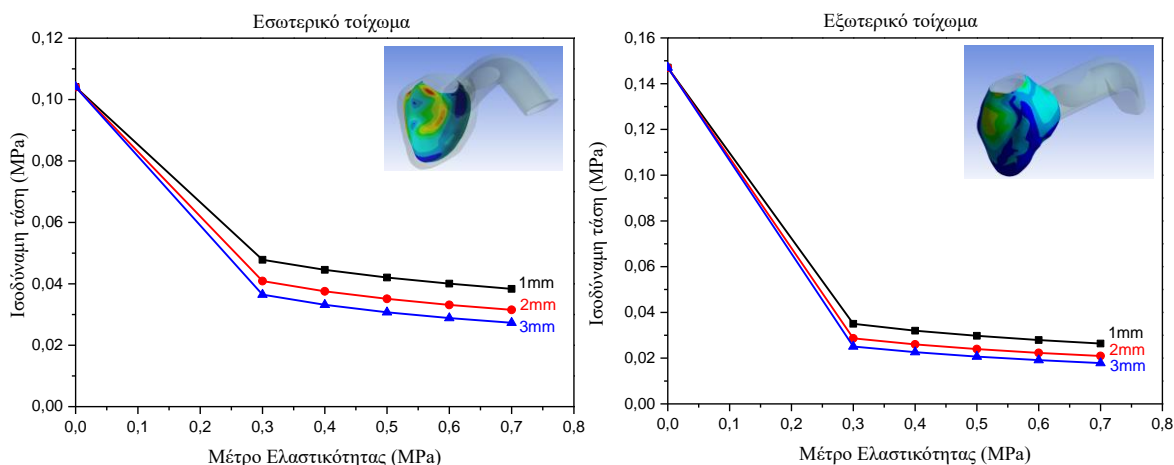
συμπεριφορά είναι παρόμοια όπως και στις προηγούμενες μεμβράνες, με μεγαλύτερη μείωση των τιμών στο εξωτερικό τοίχωμα, δηλαδή αυτό που έρχεται σε άμεση επαφή με τη μεμβράνη, σε σύγκριση με το εσωτερικό.



**Εικόνα 96.** Μεταβολή (α) της ισοδύναμης τάσης, (β) της ισοδύναμης παραμόρφωσης και (γ) της συνολικής μετατόπισης στο εσωτερικό και εξωτερικό τοίχωμα του μυοκαρδίου, ως συνάρτηση του μέτρου ελαστικότητας της μεμβράνης πάχους 3mm.

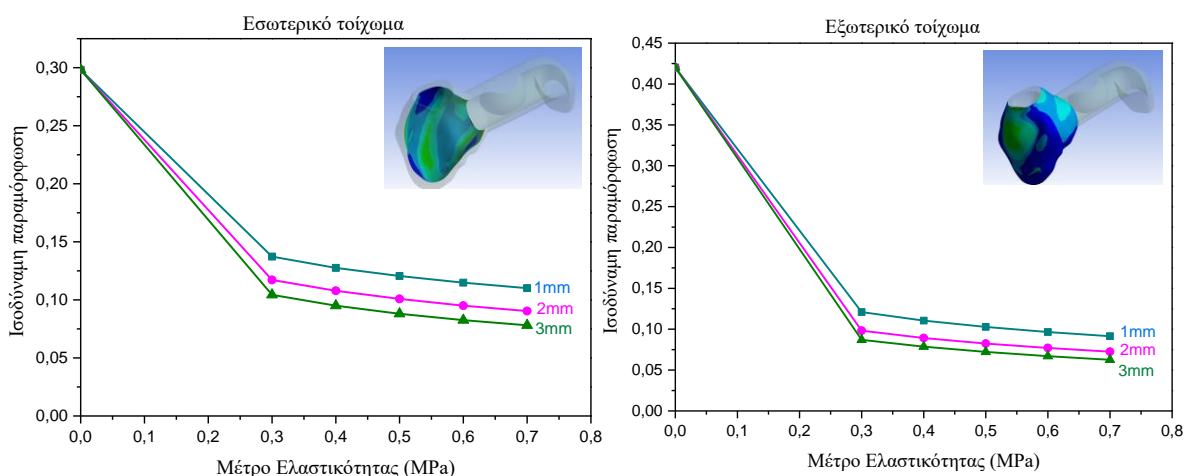
Συγκριτικά, παρουσιάζονται παρακάτω τα διαγράμματα για την μεταβολή της ισοδύναμης τάσης, της ισοδύναμης παραμόρφωσης και της συνολικής μετατόπισης της δεξιάς κοιλίας του μυοκαρδίου, για το εσωτερικό και το εξωτερικό της τοίχωμα, μετά την εφαρμογή μεμβρανών διαφορετικού πάχους. Παρατηρείται ότι η τάση που ασκείται στο εσωτερικό τοίχωμα του μυοκαρδίου μειώνεται όσο αυξάνεται το πάχος της μεμβράνης που περιβάλλει το μυοκάρδιο, με ακόμα μεγαλύτερη μείωση της

τάσης στο εξωτερικό τοίχωμα του μυοκαρδίου, που έρχεται σε άμεση επαφή με τη μεμβράνη (Εικόνα 97). Αυτή η διαπίστωση επιβεβαιώνει το νόμο Laplace, σύμφωνα με τον οποίο η τοιχωματική τάση είναι αντιστρόφως ανάλογη του πάχους του τοιχώματος.



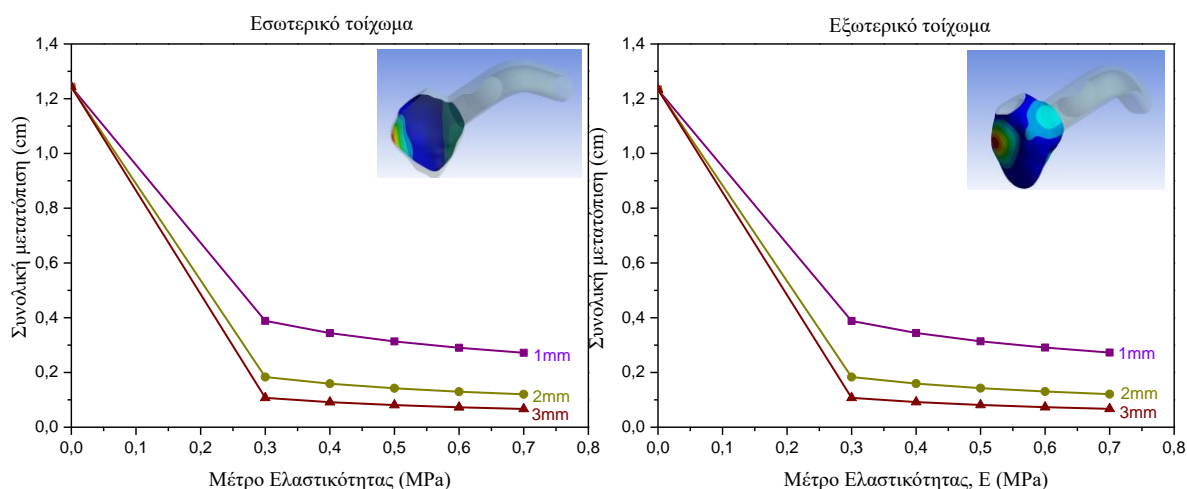
**Εικόνα 97.** Συγκριτικά διαγράμματα μεταβολής της ισοδύναμης τάσης στο εσωτερικό και εξωτερικό τοίχωμα του μυοκαρδίου, μετά την τοποθέτηση μεμβρανών πάχους 1, 2 και 3mm.

Για την παραμόρφωση που υφίσταται η κοιλία, η μείωση των τιμών της σχετίζεται με το αυξανόμενο πάχος της μεμβράνης που τοποθετείται γύρω από αυτήν, ενώ συγκριτικά στο εσωτερικό και εξωτερικό της τοίχωμα, μεγαλύτερη μείωση παραμόρφωσης εμφανίζεται στο εξωτερικό τοίχωμα, όπως φαίνεται και στα διάγραμματα (Εικόνα 98).



**Εικόνα 98.** Συγκριτικά διαγράμματα μεταβολής της ισοδύναμης παραμόρφωσης στο εσωτερικό και εξωτερικό τοίχωμα του μυοκαρδίου, μετά την τοποθέτηση μεμβρανών πάχους 1, 2 και 3mm.

Η συνολική μετατόπιση της δεξιάς πλευράς του μυοκαρδίου παρουσιάζει παρόμοια συμπεριφορά με τα μεγέθη της τάσης και της παραμόρφωσης, όσον αφορά στη μεταβολή της λόγω της παρουσίας μεμβρανών με διαφορετικά πάχη. Τα διαγράμματα της μετατόπισης για το εσωτερικό και το εξωτερικό τοίχωμα, εμφανίζουν μεγαλύτερη μείωση όταν η μεμβράνη που περιβάλλει το μυοκάρδιο έχει πάχος 3mm, ενώ η μεγαλύτερη διαφορά μείωσης της μετατόπισης εμφανίζεται κατά την εφαρμογή της μεμβράνης των 2 mm, σε σχέση με τη μεμβράνη πάχους 1 mm (Εικόνα 99).



**Εικόνα 99.** Συγκριτικά διαγράμματα μεταβολής της συνολικής μετατόπισης στο εσωτερικό και εξωτερικό τοίχωμα του μυοκαρδίου, μετά την τοποθέτηση μεμβρανών πάχους 1, 2 και 3mm.

### Παραδοχές-Περιορισμοί

Για την προσέγγιση του προβλήματος της υπερφόρτισης πίεσης του μυοκαρδίου που έχει ως συνέπεια, κατά κύριο λόγο, την αύξηση της τοιχωματικής τάσης, μέσω της μεθόδου των πεπερασμένων στοιχείων, τέθηκαν κάποιες παραδοχές – περιορισμοί, με σκοπό την απλούστευσή του. Οι σημαντικές παραδοχές που τέθηκαν για την μοντελοποίηση είναι για το ρευστό (αίμα) ότι πρόκειται για νευτώνιο και ασυμπίεστο, με σταθερή ροή, και για το τοίχωμα της κοιλίας ότι είναι γραμμικά ελαστικό, όπως και η μεμβράνη χιτοζάνης που περιβάλλει την κοιλία για να περιορίσει τις μεταβολές των μεγεθών που αναλύθηκαν παραπάνω. Επίσης, άλλη μία παραδοχή που τέθηκε είναι ότι μετά την αύξηση της πίεσης δεν αλλάζουν οι διαστάσεις της κοιλίας αλλά παραμένουν σταθερές. Τέλος, η παρούσα μελέτη επικεντρώθηκε στην κατανομή των μεγεθών της ισοδύναμης τάσης, παραμόρφωσης και μετατόπισης και όχι στις απόλυτες τιμές τους.





## **IV. ΓΕΝΙΚΗ ΣΥΖΗΤΗΣΗ, ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ ΚΑΙ ΠΡΟΤΑΣΕΙΣ ΓΙΑ ΜΕΛΛΟΝΤΙΚΗ ΕΡΕΥΝΑ**



#### **IV. ΓΕΝΙΚΗ ΣΥΖΗΤΗΣΗ, ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ ΚΑΙ ΠΡΟΤΑΣΕΙΣ ΓΙΑ ΜΕΛΛΟΝΤΙΚΗ ΕΡΕΥΝΑ**

Η πνευμονική αρτηριακή υπέρταση (ΠΑΥ, pulmonary arterial hypertension, PAH) είναι μια νόσος με δραματικές επιπτώσεις στην υγεία και στην ποιότητα ζωής των πασχόντων. Παρά την πρόοδο στη θεραπεία της ΠΑΥ, η λειτουργική κατάσταση και η επιβίωση των ασθενών παραμένουν χαμηλές. Οι δε παθογενετικοί της μηχανισμοί αποτελούν πεδίο συνεχούς έρευνας.

Όπως διαπιστώθηκε από την βιβλιογραφική ανασκόπηση, η υπάρχουσα γνώση προέρχεται κυρίως από πειραματικές και κλινικές μελέτες στην αριστερή κοιλία, χωρίς να λαμβάνονται υπόψη οι σημαντικές διαφορές μεταξύ δεξιάς και αριστερής κοιλίας, ενώ για την αντιμετώπιση της πνευμονικής υπέρτασης εφαρμόζονται φαρμακολογικές θεραπείες και χρησιμοποιούνται συσκευές για μηχανική υποστήριξη της δεξιάς κοιλίας. Δεν υπάρχει, όμως, συστηματική ερευνητική δραστηριότητα που να αφορά στο σχεδιασμό και στην ανάπτυξη εμφυτευμάτων για την αντιμετώπιση της νόσου.

Η παρούσα εργασία επικεντρώνεται στη χάραξη, εν είδει οδικού χάρτη, μίας στρατηγικής ανάπτυξης βιοϋλικών για κατασκευή εμφυτευμάτων που μπορούν να χρησιμοποιηθούν για την αντιμετώπιση της πνευμονικής υπέρτασης. Προς επίτευξη αυτού του στόχου, η έρευνα που πραγματοποιήθηκε είχε δύο διακριτά στάδια. Το πρώτο αφορούσε στην επιλογή, στην πρόκριση και στην βελτιστοποίηση του βιοϋλικού που μπορεί να χρησιμοποιηθεί για το σκοπό αυτό και το δεύτερο επικεντρώθηκε στη μελέτη της διεπιφάνειας μεταξύ του εμφυτεύματος και του καρδιακού ιστού όπου τοποθετείται η μεμβράνη. Παράγοντες όπως ο τύπος του υλικού, το σχήμα του εμφυτεύματος, η αποικοδόμηση, οι επιφανειακές χημικές ιδιότητες, καθώς και οι χημικές και οι μηχανικές ιδιότητες της κύριας μάζας, παίζουν πολύ σημαντικό ρόλο στη βιοσυμβατότητα ενός βιοϋλικού και στην καταλληλότητά του για συγκεκριμένες βιοϊατρικές εφαρμογές. Επομένως, είναι πολύ σημαντικό να επιλεγθεί ο τύπος του βιοϋλικού και η διαδικασία παρασκευής του για να

επιτευχθούν οι ιδανικές ιδιότητες, τόσο στην επιφάνεια όσο και στην κύρια μάζα, λαμβάνοντας υπόψη την τελική περιοχή εμφύτευσης και εφαρμογής του εμφυτεύματος.

Τα αποτελέσματα της υπολογιστικής μοντελοποίησης με πεπερασμένα στοιχεία αναδείχτηκαν ως ακρογωνιαίος λίθος για την προσέγγιση της νόσου. Πιο συγκεκριμένα, η υπολογιστική μηχανική αποδείχτηκε ως χρήσιμο εργαλείο για τον προσδιορισμό των κατάλληλων ιδιοτήτων που πρέπει να έχει ένα υλικό για να ανταποκριθεί στις απαιτήσεις για την αντιμετώπιση της συγκεκριμένης πάθησης. Μέσω συγκεκριμένων παραδοχών και περιορισμών που τέθηκαν στην προσομοίωση του μοντέλου της δεξιάς κοιλίας, τα συμπεράσματα που προέκυψαν αφορούν στην επιβεβαίωση ότι η τάση (trend) που υπερισχύει από την προσομοίωση του μοντέλου αυτού είναι η μείωση των μεγεθών της τοιχωματικής τάσης, της παραμόρφωσης και της συνολικής μετατόπισης της ασθενούς κοιλίας, στην οποία ασκείται αυξημένη πίεση, μετά την τοποθέτηση μεμβρανών διαφορετικών μέτρων ελαστικότητας και πάχους. Η υπολογιστική μοντελοποίηση προσέγγισε με επιτυχία την καρδιαγγειακή νόσο της υπέρτασης και ανέδειξε τη θετική επίδραση του εμφυτευόμενου υλικού, όπως επίσης και τις πιθανές τροποποιήσεις των ιδιοτήτων του για περαιτέρω έρευνα και μελέτη.

Στη συνέχεια, αφού προσδιορίστηκαν οι κατάλληλες ιδιότητες που πρέπει να έχει το υλικό, προτάθηκαν οχτώ κριτήρια πρόκρισης, τα οποία πρέπει να ικανοποιεί το υλικό για να μπορεί να επιλεγεί ως υποψήφιο για χρήση στην αντιμετώπιση της νόσου με πειραματική τεχνικές. Τα κριτήρια αυτά εφαρμόστηκαν για την αξιολόγηση μιας σειράς υδροπηκτωμάτων που αναπτύχθηκαν, (όπως αναφέρθηκαν και μελετήθηκαν στα προηγούμενα κεφάλαια της διατριβής), και τελικά, εφαρμόζοντας τα κριτήρια πρόκρισης, επιλέχθηκε και έγινε πλήρης χαρακτηρισμός του υδροπηκτώματος χιτοζάνης σε μορφή μεμβράνης.

Από τα αποτελέσματα κρίθηκε ότι, μετά τον προσδιορισμό του βαθμού αποακετυλίωσης της χιτοζάνης στο ~80%, ήταν απαραίτητη η διερεύνηση της κρυσταλλικότητάς της, η οποία είναι άμεσα συνδεδεμένη με το DDA. Μετά την εξουδετέρωση του πολυκατιόντος χιτοζάνης με διάλυμα NaOH, άλλαξε η διαμόρφωση της δομής του κρυστάλλου τύπου I στο πολυμερικό της δίκτυο της χιτοζάνης, η οποία είναι χαρακτηριστική του κρυσταλλικού πολύμορφου («tendon

polymorph») και συνδέεται με την απώλεια των δεσμών υδρογόνου και της αποπρωτονίωσης των αμινομάδων στις αλυσίδες της. Ο δομικός χαρακτηρισμός της μεμβράνης με φασματοσκοπία υπερύθρου επιβεβαίωσε την απομάκρυνση των όξινων ομάδων από το πολυμερικό δίκτυο της χιτοζάνης, ενώ παρατηρήθηκε μικρή μετατόπιση των κορυφών λόγω της αποπρωτονίωσης των αμινομάδων κατά τη διαδικασία εξουδετέρωσης. Αυτή η αποπρωτονίωση μειώνει το «κέλυφος ενυδάτωσης» (hydration shell) των αμινομάδων και επιτρέπει το σχηματισμό δεσμών υδρογόνου μεταξύ των αλυσιδών χιτοζάνης.

Από μορφολογικής άποψης, η μελέτη της μικροδομής της μεμβράνης χιτοζάνης με παρατήρηση με ηλεκτρονική μικροσκοπία έδειξε ότι εμφανίζει πορώδη δομή, πιθανόν εξαιτίας του τρόπου παρασκευής της και του σχηματισμού 3D μακροπορώδους δομής, κατά τη διάρκεια της ζελατινοποίησης. Το μεγαλύτερο ποσοστό πόρων βρέθηκε ότι αντιστοιχεί σε πόρους μεγέθους 50 μm. Από την ανάλυση των θερμικών ιδιοτήτων της μεμβράνης συμπεραίνουμε ότι η θερμοκρασία θέρμανσης επηρεάζει σε σημαντικό βαθμό τη δομή της, εξαιτίας των μη ομοιοπολικών δεσμών που αναπτύσσονται στο πολυμερικό της δίκτυο και οφείλονται στον τρόπο παρασκευής τους και στη μέθοδο εξουδετέρωσης (φυσικά σχηματιζόμενα υδροπηκτώματα) και καταρρέουν με τη θέρμανση, ενώ δεν παρατηρείται κάποιο θερμικό φαινόμενο σε φυσιολογικές συνθήκες του οργανισμού.

Η μελέτη διόγκωσης των μεμβρανών σε υγρό περιβάλλον ανέδειξε (1) την υψηλή υδροφιλικότητα της μεμβράνης, στην οποία οφείλεται και η αύξηση του βάρους τους στο 300%, και (2) τη σχέση διόγκωσης-αποικοδόμησης, η οποία εξαρτάται από παραμέτρους όπως οι διαστάσεις των δειγμάτων της μεμβράνης, ο βαθμός αποακετυλίωσης, η κρυσταλλικότητα κ.α. Το συμπέρασμα που προέκυψε από τη μελέτη αυτή είναι ότι οι μεμβράνες, απορροφώντας επαρκή ποσότητα υγρού, αποκτούν ιδιότητες παρόμοιες με αυτές του ζωντανού ιστού, όσον αφορά στη σταθερότητα σε φυσιολογικές συνθήκες, επηρεάζεται, όμως, η μηχανική τους απόδοση λόγω του υγρού περιβάλλοντος, οδηγώντας στην υποβάθμιση των μηχανικών ιδιοτήτων. Οι μηχανικές αυτές ιδιότητες, οι οποίες θα πρέπει να μιμούνται αυτές του φυσικού ιστού [126], παρουσίασαν σημαντική υποβάθμιση, παρουσία υγρού περιβάλλοντος (PBS, πλάσμα αίματος). Παρόλα αυτά, οι μετρήσεις αντοχής σε εφελκυσμό έδειξαν ότι το επιθυμητό μέτρο ελαστικότητας, το οποίο θα πρέπει να

κυμαίνεται από μερικές δεκάδες kPa μέχρι και 1MPa [128], που να προσεγγίζει, δηλαδή, αυτό του μυοκαρδίου, επιτεύχθει με τη παρασκευή μεμβράνης χιτοζάνης μέσω της συγκεκριμένης μεθόδου ζελατινοποίησης και τη χρήση διαλύματος NaOH. Ενισχυτική σε αυτά τα αποτελέσματα έρχεται και η βιβλιογραφία όπου η χιτοζάνη προτείνεται ως ένα πολλά υποσχόμενο βιοϋλικό για στην ιστική μηχανική του μυοκαρδίου, όσον αφορά στη μηχανική της συμβατότητα, εφόσον το μέτρο δυσκαμψίας της συμπίπτει με αυτό του καρδιακού ιστού στο τέλος της διαστολής. Περαιτέρω μελέτη των ιξωδοελαστικών ιδιοτήτων της μεμβράνης χιτοζάνης ως συνάρτηση τη συχνότητας στο εύρος από 4,5 - 5,5Hz (καρδιακή συχνότητα επίμυ), και σε φυσιολογικές συνθήκες του οργανισμού (37°C), έδειξε ότι το μέτρο αποθήκευσης δεν μεταβάλλεται στο συγκεκριμένο εύρος συχνοτήτων που πάλλεται ο καρδιακός μυς, αλλά παραμένει σταθερό, καθιστώντας τη μεμβράνη χιτοζάνης κατάλληλη για τη συγκεκριμένη εφαρμογή.

Η επιτυχία ενός εμφυτεύματος καθορίζεται, επίσης, και από την πρωτεϊνική και κυτταρική αντίδραση στο υλικό. Πειράματα για τις πρωτεϊνικές/κυτταρικές αλληλεπιδράσεις με τα βιοϋλικά και για την εκτίμηση της τη βιοσυμβατότητας διεξάγονται *in vitro* ή *in vivo*. Τα πειράματα πραγματοποιούνται σε ελεγχόμενο εργαστηριακό περιβάλλον, ενώ τα πειράματα *in vivo* απαιτούν την εμφύτευση βιοϋλικών σε ζωντανούς οργανισμούς, όπως σε δοκιμές σε ζώα [201]. Έτσι, αφού ολοκληρώθηκε ο πλήρης χαρακτηρισμός της χιτοζάνης, ακολούθησε η μελέτη της διεπιφάνειας μεταξύ του εμφυτεύματος και του καρδιακού ιστού και ελέγχθηκαν οι αλληλεπιδράσεις του βιοϋλικού με το βιολογικό περιβάλλον. Ο *in vitro* έλεγχος της ανάπτυξης NIH3T3 ινοβλαστών σε μεμβράνη χιτοζάνης έδειξε κυτταρική βιωσιμότητα και επιβεβαίωσε τη βιοσυμβατότητα του υλικού και την ικανότητά της να ευνοεί την ανάπτυξη των ινοβλαστών, προκρίνοντας έτσι τη μεμβράνη για *in vivo* μελέτη. Ο *in vivo* έλεγχος με εμφύτευση της μεμβράνης επικαρδιακά σε ζωικό πρότυπο επίμυων, έδειξε καλή απόκριση του υλικού, χωρίς να δημιουργεί προβλήματα στους γύρω ιστούς και στην επιβίωση των ζώων, με ενδείξεις αποικοδόμησης. Η μελέτη αντίδρασης ξένου σώματος κατέγραψε την καλύτερη δυνατή εξέλιξη ως απόκριση του εμφυτευόμενου υλικού με την εμφάνιση νέων αγγείων σε ένα χαλαρό υπόστρωμα που μιμείται αυτό της φυσιολογικής υποεπικαρδιακής στοιβάδας.

Ο μορφολογικός έλεγχος της μεμβράνης σε σύγκριση με την εξωκυττάρια μήτρα της δεξιάς κοιλίας ανέδειξε τη δομική ομοιότητα μεταξύ της εξωκυττάριας μήτρας του μυοκαρδίου και της δομής της χιτοζάνης, μετά τη μεταξύ τους αλληλεπίδραση, υποδηλώνοντας ότι η μεμβράνη, μετά την εμφύτευση της, μιμείται το φυσικό ιστό, και τα εύρημα αυτό αποτελεί ένα ισχυρό επιχείρημα για την επιλογή της ως βιοϋλικό για χρήση στο μυοκάρδιο.

Τα πειραματικά αποτελέσματα που προέκυψαν μετά την ολοκλήρωση των σταδίων του *in vitro* και *in vivo* ελέγχου ήταν ιδιαίτερος θετικά για τη χιτοζάνη ως εμφύτευμα. Έτσι, ακολούθησε η διερεύνηση των φυσικοχημικών χαρακτηριστικών του εμφυτεύματος, μετά την εμφύτευσή του επικαρδιακά. Με τη χρήση φασμάτων FT-IR αποδείχτηκε η δομική ομοιότητα των μεμβρανών, 2 και 7 ημέρες μετά την εμφύτευσή τους, με την εξωκυττάρια μήτρα του καρδιακού ιστού, που σε συνδυασμό και με τη μορφολογική τους ομοιότητα, ισχυροποίησαν την επιλογή του συγκεκριμένου υλικού. Τα φάσματα της εξωκυττάριας μήτρας πριν και μετά την εμφύτευση δεν δείχνουν δομικές αλλαγές στη σύσταση της δεξιάς κοιλίας Έτσι, έγινε περαιτέρω διερεύνηση της χημικής σύστασης της επιφάνειας της εξωκυττάριας μήτρας (ECM), πριν και μετά την εμφύτευση, όπως και της διεπιφάνειας της μεμβράνης χιτοζάνης και της ECM του επικαρδίου που έρχεται σε επαφή με τη μεμβράνη, με ποιοτική και ποσοτική ανάλυση μέσω XPS. Τα αποτελέσματα αυτής της ανάλυσης έδειξαν ισχυρές αλληλεπιδράσεις στη διεπιφάνεια των δύο υλικών, οι οποίες οφείλονται στην ανάπτυξη ιοντικών αλληλεπιδράσεων και σχηματισμό δεσμών υδρογόνου μεταξύ των πρωτεϊνών της εξωκυττάριας μήτρας και των αλυσιδών της χιτοζάνης. Τα θεωρητικά αποτελέσματα από την προσέγγιση μέσω της υπολογιστικής μεθόδου DFT, ήρθαν σε απόλυτη συμφωνία με τα πειραματικά αποτελέσματα του XPS, επιβεβαιώνοντας την ύπαρξη ισχυρών αλληλεπιδράσεων μεταξύ της μεμβράνης και των πρωτεϊνών της εξωκυττάριας μήτρας, οι οποίες προσδιορίστηκαν μέσω υπολογισμού της ενέργειας συμπλοκοποίησης.

Σε μία πιο ευρεία προσέγγιση, η παραπάνω συγκεντρωτική γενική συζήτηση των πειραματικών και υπολογιστικών ευρημάτων της διατριβής αυτής επιβεβαιώνει ότι η επιστήμη και η μηχανική των βιοϋλικών, ως αποτέλεσμα της σύγχρονης έρευνας και της τεχνολογίας αιχμής, εντάσσεται σε ένα ταχέως αναπτυσσόμενο και εξελισσόμενο πεδίο και ακολουθεί την εξέλιξη διαφορετικών επιστημών. Κάτω από

αυτό το πρίσμα, κρίνεται απαραίτητος ο συνδυασμός όλων των πεδίων της επιστήμης και η ανάπτυξη μιας στρατηγικής, όπως εκτενώς περιγράφεται στην παρούσα διατριβή, για την επίτευξη του τελικού στόχου, που έχει όχι μόνο εξαιρετικό επιστημονικό και ερευνητικό ενδιαφέρον αλλά και καθαρά ανθρωποκεντρικό χαρακτήρα. Λόγω αυτών των χαρακτηριστικών, είναι βέβαιο ότι, ενώ στην αρχή, όταν ξεκίνησε η διατριβή αυτή, υπήρχε φτωχή, σχετικά, βιβλιογραφία στο αντικείμενο, σύντομα θα αρχίσουν να εμφανίζονται καλά εμπεριστατωμένες δημοσιεύσεις με διεπιστημονική ενόραση και τεκμηρίωση και σε αυτό το μέχρι σήμερα σχετικά αχαρτογράφητο επιστημονικά, πεδίο.

Για αυτούς τους λόγους και επειδή οι καρδιαγγειακές παθήσεις αποτελούν πεδίο τόσο αιχμής όσο και μεγάλων επιστημονικών προκλήσεων στη σύγχρονη εποχή, με οδηγό τον Οδικό Χάρτη που προτάθηκε στην παρούσα διατριβή και τα ευρήματά της, για την ολοκλήρωση της ενότητας αυτής παρατίθενται μερικές προτάσεις για μελλοντική έρευνα. Συγκεκριμένα, προτείνεται η μελέτη μεμβρανών ως συστήματα χορήγησης φαρμάκων, όπου εκτός από τις φυσικοχημικές, μηχανικές και βιολογικές ιδιότητες, να συνδυάζουν και τη σταδιακή απελευθέρωση φαρμάκων, με στόχο την αντιμετώπιση της νόσου συνδυαστικά και μέσω φαρμακολογικής θεραπείας. Επίσης, πολύ σημαντική θεωρείται η μελέτη των αιμοδυναμικών παραμέτρων σε επίμυες, τόσο για τον έλεγχο της απόδοσης του υλικού, όσο και για την αξιολόγησή του όσον αφορά στη θεραπεία της νόσου (αναδιαμόρφωση δεξιάς κοιλίας, μείωση τοιχωματικής τάσης). Σε συνέχεια των αιμοδυναμικών μελετών, προτείνονται συγκριτικές μελέτες και αναλύσεις για την επίδραση της υπερφόρτισης πίεσης στο μυοκάρδιο της αριστερής κοιλίας. Τέλος, η υπολογιστική μοντελοποίηση μπορεί να παρέχει πολύ σημαντικές και ουσιαστικές πληροφορίες για την επιλογή του εμφυτεύματος με τις κατάλληλες ιδιότητες στη συγκεκριμένη ιατρική εφαρμογή. Γι'αυτό το λόγο, προτείνεται η περαιτέρω εις βάθος μελέτη του μοντέλου της δεξιάς κοιλίας και η συστηματική δοκιμή και πρόβλεψη των ιδιοτήτων των βιοϋλικών στην περίπτωση της πνευμονικής υπέρτασης, πριν αυτά δοκιμαστούν *in vivo*.



## ΠΑΡΑΡΤΗΜΑΤΑ

### ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ 1: ΧΗΜΙΚΑ ΑΝΤΙΔΡΑΣΤΗΡΙΑ

Στον Πίνακα 16 παρουσιάζονται συνοπτικά τα αντιδραστήρια που χρησιμοποιήθηκαν για την πειραματική διαδικασία παρασκευής των υδροπηκτωμάτων με βάση το PEG, το αλγινικό και τη χιτοζάνη.

**Πίνακας 16.** Κατάλογος χημικών αντιδραστηρίων για τη σύνθεση των υδροπηκτωμάτων.

Αντιδραστήρια	Χημικός τύπος	Εταιρεία (Lot number #)
Poly (ethylene glycol)	$\text{HO}(\text{C}_2\text{H}_4\text{O})_n\text{H}$	Merck (S6614888530)
Triethylamine	$(\text{C}_2\text{H}_5)_3\text{N}$	Merck (S6068952023)
Dichloromethane	$\text{CH}_2\text{Cl}_2$	Merck (K45900544438)
Sebacoyl chloride (97%)	$\text{ClCO}(\text{CH}_2)_8\text{COCl}$	Alpha Aesar (10178808)
Acryloyl chloride	$\text{C}_3\text{H}_3\text{ClO}$	Sigma Aldrich (STBB9134V)
Ethyl acetate	$\text{CH}_3\text{COOC}_2\text{H}_5$	Merck (K46858223529)
Diethyl ether	$(\text{C}_2\text{H}_5)_2\text{O}$	Sigma Aldrich (STBF9899V)
2-Hydroxy-4'-(2-hydroxyethoxy)-2-methylpropiophenone (Irgacure D-2959)	$\text{C}_{12}\text{H}_{16}\text{O}_4$	Sigma Aldrich (MKBS2790V)
Fumaryl chloride (95%)	$\text{C}_4\text{H}_2\text{Cl}_2\text{O}_2$	Sigma Aldrich (MKBB6374V)
Alginic acid sodium salt	$\text{C}_6\text{H}_9\text{NaO}_7$	Sigma Aldrich (MKBP7317V)
Calcium chloride dehydrated (97%)	$\text{CaCl}_2$	Fluka (1171532)
Gluconolactone (GDL)	$\text{C}_6\text{H}_{10}\text{O}_6$	Sigma Aldrich (109K0194)

**Πίνακας 16** (συνέχεια)

<b>Chitosan (Medium Molecular Weight)</b>	$(C_6H_{11}NO_4)_n$	Sigma Aldrich (STBG5137V)
<b>Chitosan (Low Molecular Weight)</b>	$(C_6H_{11}NO_4)_n$	Sigma Aldrich (STBG5431V)
<b><math>\beta</math>- Glycerol phosphate disodium salt pentahydrate (<math>\beta</math>-GP)</b>	$C_3H_7Na_2O_8P \cdot 5H_2O$	Sigma Aldrich (BCBV6468)
<b>Acetic acid (glacial)</b>	$CH_3COOH$	Merck (K35298063543)
<b>Hydrochloric acid (37%)</b>	HCl	Merck (K50544917834)
<b>Sodium hydroxide</b>	NaOH	Merck (B1504298748)
<b>Potassium hydroxide</b>	KOH	Riedel-de Haen (41270)
<b>Phosphate Buffer Saline</b>	(PBS)	Sigma Aldrich (SLBW0551)
<b>Normal Saline</b>	0,9% NaCl	Εμπορικό ιατρικό σκεύασμα (1900055)

## ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ 2: ΦΥΣΙΚΟΧΗΜΙΚΕΣ ΜΕΘΟΔΟΙ ΜΕΛΕΤΗΣ ΙΔΙΟΤΗΤΩΝ ΥΛΙΚΩΝ

Στο συγκεκριμένο παράρτημα περιγράφονται αναλυτικά οι μέθοδοι που χρησιμοποιήθηκαν για τη μελέτη και το χαρακτηρισμό των υλικών. Παρουσιάζονται οι βασικές αρχές λειτουργίας αυτών των μεθόδων, οι συνθήκες που χρησιμοποιήθηκαν για την υλοποίηση των δοκιμών και η προετοιμασία των δειγμάτων που πραγματοποιήθηκε για την κάθε μέθοδο ξεχωριστά.

### 2.1 Μέθοδος λυοφιλοποίησης

Η λυοφιλοποίηση (freeze drying) των υδροπηκτωμάτων είναι απαραίτητη για τις περισσότερες μεθόδους χαρακτηρισμού των υλικών. Η διαδικασία της λυοφιλοποίησης περιλαμβάνει την ψύξη του υδροπηκτώματος στους  $-60^{\circ}\text{C}$  και την τοποθέτησή του στη συσκευή λυοφιλοποίησης (Freeze Dryer) (Biobase Bioindustry, Shandong, Co. Ltd) για 24 ώρες, όπου μέσω της διαδικασίας εξάχνωσης, λαμβάνεται το τελικό προϊόν σε μορφή πορώδους αφρού ή ξηρής σκόνης. Η μέθοδος της λυοφιλοποίησης εφαρμόστηκε στις μεμβράνες χιτοζάνης, πριν και μετά την εμφύτευση τους επικαρδιακά σε επίμυ, καθώς και στον καρδιακό ιστό του επίμυ και συγκεκριμένα στο μυοκάρδιο της δεξιάς κοιλίας, πριν και μετά την επαφή της με τη μεμβράνη.

### 2.2 Χρωματογραφία Αποκλεισμού Μεγεθών (SEC)

Η χρωματογραφία αποκλεισμού μεγεθών είναι μία μέθοδος που χρησιμοποιείται για το μοριακό χαρακτηρισμό του πολυμερούς που εξετάζεται, δηλαδή τον προσδιορισμό των μοριακών χαρακτηριστικών του, όπως το μέσο μοριακό βάρος κατ' αριθμό  $M_n$ , το μέσο μοριακό βάρος κατά βάρος  $M_w$  και το συντελεστή πολυδιασποράς  $I$ , όπου  $I = M_w/M_n$ . Η διαδικασία που ακολουθείται είναι η εξής: Διάλυμα πολυμερούς, συνήθως τετραϋδροφουράνιο, ως εκλουστικό μέσο, πιέζεται με ειδική αντλία υψηλής πίεσης στο άκρο στήλης. Το πολυμερές παρασύρεται από το διαλύτη στις στήλες του οργάνου, όπου πραγματοποιείται η διαδικασία διαχωρισμού. Οι στήλες περιέχουν κόκκους από πορώδες υλικό. Τα μεγάλα μακρομόρια με διαστάσεις μεγαλύτερες από το μέγεθος των πόρων δεν μπορούν να διεισδύσουν μέσα σε αυτούς, αλλά περνούν ανάμεσά τους και εξέρχονται πρώτα από το άλλο άκρο της στήλης. Αντίθετα, τα μικρότερα μακρομόρια εισέρχονται μέσα στα

πόρους των κόκκων, κινούμενα με μικρότερη ταχύτητα και έτσι η έκλουσή τους από τη στήλη καθυστερεί [202].

Για της μετρήσεις χρωματογραφίας αποκλεισμού μεγεθών (SEC) το όργανο που χρησιμοποιήθηκε ήταν το PL-GPC-50 της εταιρίας Polymers Laboratory, που είναι εξοπλισμένο με αντλία (Spectra System P1000), θερμοστατούμενο φούρνο (Lab Alliance) σε θερμοκρασία 35°C, τρεις στήλες σε σειρά (PLgel 5 mm Mixed-C, 300×7,5 mm), ανιχνευτή δείκτη διάθλασης (RI, Shodex RI-101), ανιχνευτή απορρόφησης υπερύθρου (UV, SpectraSystem UV1000) και έχει βαθμονομηθεί με μία σειρά 8 πρότυπων δειγμάτων πολυστυρενίου (Mp: 4300 έως 3000000 g/mol). Ο χαρακτηρισμός έλαβε χώρα σε θερμοκρασία 35°C. Ο διαλύτης του οργάνου που χρησιμοποιήθηκε ήταν το τετραϋδροφουράνιο (THF). Στην παρούσα εργασία, η συγκεκριμένη τεχνική χρησιμοποιήθηκε για τον προσδιορισμό των μοριακών βαρών των σύνθετων πολυμερών (PEG, PEGDA, PEGSDA, OPF), ως η πρώτη και η πιο γρήγορη μέθοδος που χρησιμοποιείται για τον ποιοτικό έλεγχο των πολυμερών.

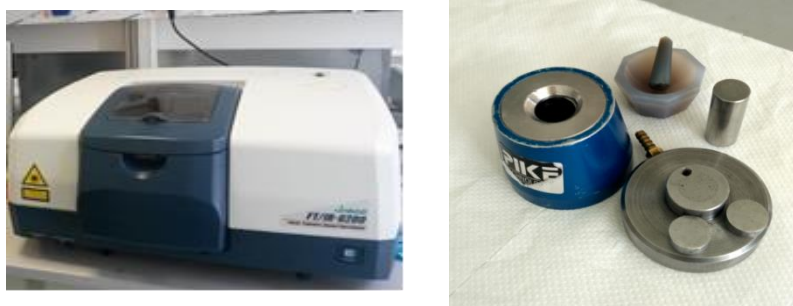
### 2.3 Φασματοσκοπία μέσου υπερύθρου μετασχηματισμού Fourier (FT-IR)

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. Η φασματοσκοπία υπερύθρου σχετίζεται με την αλληλεπίδραση ενός μορίου μιας ένωσης με την ηλεκτρομαγνητική ακτινοβολία. Όταν η υπέρυθη ακτινοβολία προσπίπτει σε ένα υλικό, μπορεί να το διαπεράσει, να σκεδαστεί ή να απορροφηθεί από αυτό. Στην περιοχή του υπερύθρου 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 ή τάσης (stretch), παραμόρφωσης (deformation), κάμψης (bending), αιώρησης (rocking) και συστροφής (twisting). Λαμβάνοντας υπόψιν ότι κάθε λειτουργική ομάδα αποτελείται από ένα συγκεκριμένο συνδυασμό δεσμών, αυτή παρουσιάζει και ένα χαρακτηριστικό σύνολο απορροφήσεων στο υπέρυθρο. Παρατηρώντας ποιες συχνότητες απορροφώνται από ένα μόριο και ποιες όχι, είναι δυνατό να προσδιοριστούν οι λειτουργικές ομάδες που υπάρχουν στο μόριο. Επομένως, το φάσμα IR μπορεί να

λειτουργήσει ως ένα είδος δακτυλικού αποτυπώματος για μια συγκεκριμένη ένωση [203].

Η καταγραφή των φασμάτων μέσου υπερύθρου πραγματοποιήθηκε με φασματόμετρο FT/IR-6200 της εταιρείας Jasco (Εικόνα 100). Τα δείγματα που μετρήθηκαν χρησιμοποιώντας την τεχνική των συμπιεσμένων διαφανών δισκίων KBr, ήταν οι σκόνες των συνθετικών πολυμερών (PEG, PEGDA, PEGSDA, OPF), η σκόνη χιτοζάνης (εμπορική) και τα λυοφιλοποιημένα δείγματα της όξινης μεμβράνης και της μεμβράνης μετά την εξουδετέρωση. Επίσης, ελήφθησαν φάσματα του λυοφιλοποιημένου καρδιακού ιστού (μυοκάρδιο δεξιάς κοιλίας), πριν και μετά την επαφή του με τη μεμβράνη, καθώς και των λυοφιλοποιημένων μεμβρανών χιτοζάνης μετά την εμφύτευσή τους επικαρδιακά. Η προετοιμασία των δειγμάτων έγινε ως εξής: Αρχικά, απομονώθηκε ο καρδιακός ιστός επίμυ και ακολούθησε ο καθαρισμός του από το εγκλωβισμένο αίμα με φυσιολογικό ορό (έπειτα από καθετηριασμό της αορτής). Στη συνέχεια, απομονώθηκε (με νυστέρι) το μυοκάρδιο της δεξιάς κοιλίας και το δείγμα τοποθετήθηκε στους  $-60^{\circ}\text{C}$  για 24 ώρες και λυοφιλοποιήθηκε. Παρομοίως, οι μεμβράνες χιτοζάνης, στα χρονικά διαστήματα των 2 και 7 ημερών, μετά την εμφύτευση τους επικαρδιακά, αποκολλήθηκαν από το μυοκάρδιο και καθαρίστηκαν από τα υπολείμματα αίματος με τη χρήση φυσιολογικού ορού. Τοποθετήθηκαν στους  $-60^{\circ}\text{C}$  για 24 ώρες και λυοφιλοποιήθηκαν.

Κάθε δισκίο παρασκευάστηκε ως εξής: Αναμίχθηκε σκόνη δείγματος (περίπου 5% κ.β.) και σκόνη KBr (95% κ.β.) σε γουδί από αχάτη μέχρι να σχηματιστεί ομοιογενές μίγμα λεπτόκκοκης σκόνης. Η άλεση των δύο συστατικών πρέπει να είναι παρά πολύ καλή ώστε τα σωματίδια να αποκτήσουν μέγεθος μικρότερο του μήκους κύματος της προσπίπτουσας ακτινοβολίας από την πηγή του οργάνου. Με αυτόν τον τρόπο αποφεύγονται φαινόμενα σκέδασης, τα οποία έχουν ως αποτέλεσμα χαμηλής ποιότητας φάσματα. Στη συνέχεια το μίγμα των κόνεων τοποθετήθηκε σε καλούπι και συμπιέστηκε μονοαξονικά (10 T) με υδραυλική πρέσα, ώστε να δημιουργηθεί συμπιεσμένο δισκίο διαμέτρου 1 cm και ύψους 1-1,5 mm. Το κάθε δείγμα παρεμβλήθηκε στην πορεία της δέσμης του φασματόμετρου και ελήφθη φάσμα απορρόφησης ή διαπερατότητας του υλικού. Τα τελικά φάσματα είναι ο μέσος όρος 32 φασμάτων, που μετρήθηκαν στην περιοχή  $400-4000\text{ cm}^{-1}$  με διακριτική ικανότητα  $4\text{ cm}^{-1}$ .



**Εικόνα 100.** Φασματοφωτόμετρο FT/IR-6200 της εταιρείας Jasco (αριστερά) και σκεύη για την παρασκευή των δισκίων με KBr (δεξιά).

#### 2.4 Μέθοδος τιτλοδότησης για προσδιορισμό βαθμού αποακετυλίωσης της χιτοζάνης

Όπως προαναφέρθηκε και στην εισαγωγή, η χιτοζάνη προκύπτει από τη μερική αποακετυλίωση της χιτίνης. Πρόκειται για ένα συμπολυμερές που αποτελείται από μονάδες N-ακετυλογλυκοζαμίνης και D-γλυκοζαμίνης. Το γραμμομοριακό κλάσμα των μονάδων της N-ακετυλογλυκοζαμίνης στην αλυσίδα, προσδιορίζεται ως:

$$DD = 100 \frac{nGlcN}{nGlcN + nGlcNAc}$$

και ονομάζεται βαθμός αποακετυλίωσης (DD), όπου nGlcN είναι ο μέσος όρος των μονάδων D-γλυκοζαμίνης και nGlcNAc είναι ο μέσος όρος των μονάδων N-ακετυλογλυκοζαμίνης. Σε κάποιες εργασίες, ο βαθμός ακετυλίωσης ορίζεται ως, DA = 100 - DD. Ο βαθμός αποακετυλίωσης αποτελεί μία πολύ σημαντική δομική παράμετρο που αξίζει να μελετηθεί, αφού επηρεάζει τις φυσικοχημικές ιδιότητες της χιτοζάνης, όπως τη διαλυτότητα, την αποικοδόμηση, την κρυσταλλικότητα, το ιζώδες και τη βιοσυμβατότητά της [71].

Η πειραματική διαδικασία που ακολουθήθηκε για τον προσδιορισμό του βαθμού αποακετυλίωσης ήταν η εξής: Σκόνη χιτοζάνης (0,2 g) διαλύθηκε σε 20 ml υδροχλωρικού οξέος 0,1M και 25 ml αποσταγμένου νερού. Μετά από 30 λεπτά συνεχούς ανάδευσης, προστίθενται ακόμα 25 ml αποσταγμένο νερό, ενώ η ανάδευση συνεχίζεται για 30 λεπτά. Όταν ολοκληρωθεί η διάλυση της χιτοζάνης, το διάλυμά της τιτλοδοτείται με διάλυμα NaOH 0,1M, χρησιμοποιώντας προχοΐδα ακρίβειας 0,01 ml. Ο βαθμός αποακετυλίωσης υπολογίζεται χρησιμοποιώντας τη σχέση:

$$DD[\%] = 2.03 \cdot \frac{V_2 - V_1}{m + 0.0042 \cdot (V_2 - V_1)}$$

όπου  $m$  είναι η μάζα του δείγματος,  $V_1$ ,  $V_2$  οι όγκοι του διαλύματος 0,1M NaOH που αντιστοιχούν στα σημεία καμπής, 2,03 ο συντελεστής που προκύπτει από το μοριακό βάρος της δομικής μονάδας της χιτίνης, και 0,0042 ο συντελεστής που προκύπτει από τη διαφορά των μοριακών βαρών των δομικών μονάδων της χιτίνης και της χιτοζάνης [204].

## 2.5 Περίθλαση Ακτίνων-X (XRD)

Το φαινόμενο της περίθλασης των ακτίνων X ανακαλύφθηκε το 1912 από τον Max von Laue και παρέχει μια απλή και πρακτική μέθοδο για την ποιοτική ταυτοποίηση κρυσταλλικών ενώσεων. Οι ακτίνες X είναι μια μη καταστροφική μέθοδος χαρακτηρισμού υλικών μέσω της οποίας πραγματοποιείται ο προσδιορισμός της κρυσταλλικής ή της άμορφης φύσης του εξεταζόμενου δείγματος. Στην περίπτωση των κρυσταλλικών στερεών, η διαπλεγματική απόσταση ( $d$ ), είναι της ίδιας τάξης μεγέθους με το μήκος κύματος ( $\lambda$ ) της προσπίπτουσας ακτινοβολίας X. Η σχέση μεταξύ της γωνίας  $\theta$ , του μήκους κύματος  $\lambda$  των ακτίνων X, αλλά και της διαπλεγματικής απόστασης  $d$  δίνεται από την εξίσωση Bragg:  $n\lambda = 2d\sin\theta$ , όπου  $n$  είναι η τάξη της περίθλασης [205].

Στην παρούσα εργασία, η περίθλαση ακτίνων X των δειγμάτων πραγματοποιήθηκε με το περιθλασίμετρο D8 Advance της εταιρείας Bruker, χρησιμοποιώντας σύστημα μονοχρωμάτορα περιθλωμένης δέσμης και ακτινοβολία Cu με  $\lambda_{Cu} = 1,54 \text{ \AA}$  (Εικόνα 101). Τα διαγράμματα περίθλασης καταγράφηκαν σε εύρος γωνιών ( $2\theta$ ) από  $2^\circ$  έως  $40^\circ$ , με βήμα περιστροφής  $0,1^\circ$  και ρυθμό σάρωσης  $1^\circ/\text{min}$ . Τα δείγματα τα οποία μετρήθηκαν ήταν η σκόνη χιτοζάνης (εμπορική), η όξινη μεμβράνη και η μεμβράνη μετά από εξουδετέρωση με NaOH. Για την παρασκευή των δύο τελευταίων πραγματοποιήθηκε λυοφιλοποίηση, λαμβάνοντας ως τελικό προϊόν πορώδεις αφρούς.



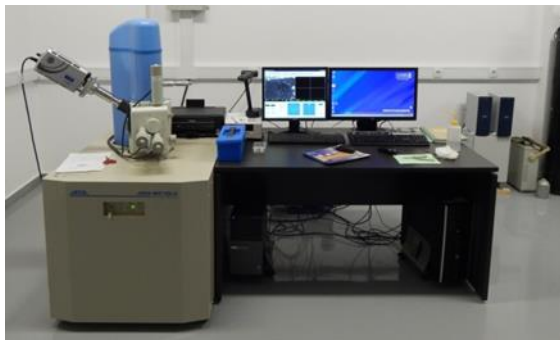
**Εικόνα 101.** Περιθλασίμετρο Ακτίνων-Χ Bruker, D8 Advance.

## 2.6 Ηλεκτρονική μικροσκοπία σάρωσης (SEM)

Η ηλεκτρονική μικροσκοπία σάρωσης (SEM) αποτελεί μια από τις σημαντικότερες μεθόδους μελέτης και διερεύνησης της μικροδομής των υλικών. Επιτρέπει τη μεγεθυμένη απεικόνιση ενός δείγματος με διακριτική ικανότητα της τάξης του nm, μέσω της αλληλεπίδρασης του με μια δέσμη ηλεκτρονίων υψηλής ενέργειας. 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 υλικό. Από τα άτομα των στοιχείων εκπέμπονται κυρίως δευτερογενή (secondary) και οπισθοσκεδαζόμενα (backscattered) ηλεκτρόνια. Η ένταση των εκπεμπόμενων ηλεκτρονίων επηρεάζεται από τα χαρακτηριστικά της επιφάνειας. Έτσι το SEM δίνει πληροφορίες που αφορούν κυρίως στη μορφολογία και στη σύσταση της επιφανείας. Επομένως, χρησιμοποιείται για την εξέταση μικροδομής στερεών δειγμάτων δίνοντας εικόνες υψηλού βαθμού διείσδυσης.

Στην παρούσα διατριβή χρησιμοποιήθηκε ηλεκτρονικό μικροσκόπιο σάρωσης (SEM - JEOL 6510 LV) (Εικόνα 102) για την εξέταση της μικροδομής και για τη λήψη εικόνων υψηλού βαθμού διείσδυσης σε λυοφιλοποιημένες μεμβράνες χιτοζάνης, καθώς και σε λυοφιλοποιημένο μυοκαρδιακό ιστό επίμυ.





**Εικόνα 102.** Ηλεκτρονικό μικροσκόπιο σάρωσης (Oxford company, Jeol 6510LV).

Πριν από τη λήψη των εικόνων, προηγείται η προετοιμασία των δειγμάτων. Τα δείγματα, αφού προετοιμάστηκαν με την ίδια διαδικασία όπως ακριβώς αναφέρθηκε στο FT-IR, τοποθετήθηκαν σε δειγματοφορέα Cu με χρήση αγωγίμης κόλλας, όπως είναι ο κολλοειδής άνθρακας και ακολούθησε η διαδικασία επιμετάλλωσης υπό κενό (στόχος Au - Pd) για 30 δευτερόλεπτα, σύμφωνα με την οποία, δημιουργείται ένα αγωγίμο επικαλυπτικό στρώμα στην επιφάνεια των δειγμάτων, έτσι ώστε να δημιουργηθεί μια αγωγίμη επιφάνεια, η οποία είναι απαραίτητη σε συσκευές που λειτουργούν υπό κενό και στην περίπτωση μη αγωγίμων δειγμάτων, όπως είναι τα βιολογικά δείγματα (Εικόνα 103). Έπειτα, τα δείγματα τοποθετήθηκαν στο ηλεκτρονικό μικροσκόπιο σάρωσης, όπου με την επιβολή χαμηλής τάσης (10-15 kV) ελήφθησαν εικόνες υψηλού βαθμού διεύθυνσης.



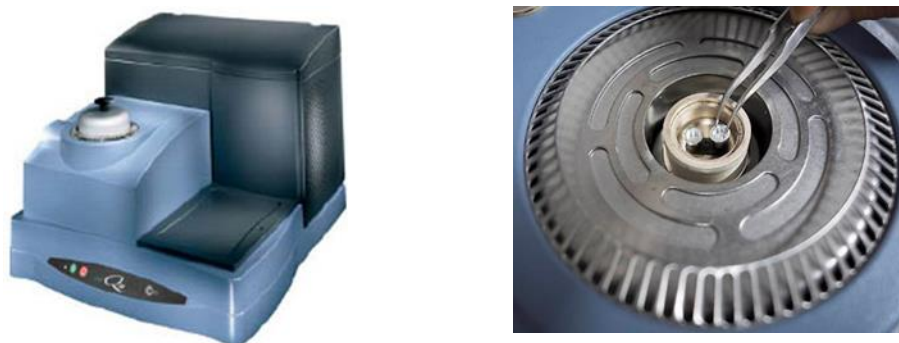
**Εικόνα 103.** Δείγματα μεμβρανών χιτοζάνης (επάνω μέρος) και ιστοί μυοκαρδίου επίμυων (κάτω μέρος) μετά από λυοφιλοποίηση και τοποθέτησή τους στη συσκευή επιμετάλλωσης.

## 2.7 Θερμική ανάλυση (DSC)

Η διαφορική θερμιδομετρία σάρωσης είναι μια τεχνική θερμικής ανάλυσης που μελετά τον τρόπο με τον οποίο αλλάζουν οι φυσικές ιδιότητες ενός υλικού ως συνάρτηση της θερμοκρασίας. Κατά την τεχνική αυτή, το εξεταζόμενο δείγμα, και το

υλικό αναφοράς (συνήθως α-αλουμίνα) υπόκεινται σε ένα ελεγχόμενο πρόγραμμα θέρμανσης ή ψύξης, το οποίο είναι γραμμικό σε σχέση με το χρόνο. Αρχικά, η θερμοκρασιακή διαφορά ανάμεσα στο δείγμα και στο υλικό αναφοράς είναι μηδενική, καθώς το δείγμα δεν υπόκειται σε καμία φυσικοχημική μεταβολή. Σε περίπτωση που λάβει χώρα οποιαδήποτε διεργασία, τότε ανάμεσα στο δείγμα και το υλικό αναφοράς αναπτύσσεται μια θερμοκρασιακή διαφορά  $\Delta T$ , η οποία είναι παροδική και αποτυπώνεται στα διαγράμματα DSC. Στο θερμογράφημα DSC εμφανίζονται τόσο ενδόθερμα (τήξη, μετάβαση στην υαλώδη κατάσταση κτλ) όσο και εξώθερμα φαινόμενα (κρυστάλλωση, πολυμερισμός κτλ.) [206].

Τα δείγματα για τα οποία ελήφθησαν θερμογραφήματα και μελετήθηκε η συμπεριφορά τους σε συνάρτηση με τη θερμοκρασία ήταν η εμπορική σκόνη χιτοζάνης, η όξινη μεμβράνη και η μεμβράνη μετά την εξουδετέρωση. Τα δείγματα των δύο τελευταίων μετρήθηκαν μετά απο λυοφιλοποίηση. Για τις μετρήσεις χρησιμοποιήθηκε το θερμιδόμετρο DSC Q20, της TA (Εικόνα 104) και έγιναν ως εξής: ζυγίστηκαν ~5 mg ξηρής κονιοποιημένης χιτοζάνης εντός καψιδίου αλουμινίου και σφραγίστηκαν με ειδική πρέσα. Το σφραγισμένο καψίδιο τοποθετήθηκε με τη βοήθεια λαβίδας στον υποδοχέα δείγματος, ενώ ένα άδειο σφραγισμένο καψίδιο αλουμινίου τοποθετήθηκε στον υποδοχέα αναφοράς. Μετά την τοποθέτησή τους, ρεύμα αζώτου αφέθηκε να διέλθει διαμέσου των υποδοχέων. Καταγράφηκε το θερμογράφημα από 0 – 420 °C, με ταχύτητα θέρμανσης 1 K / min.



**Εικόνα 104.** Θερμιδόμετρο DSC Q20, της TA.

## 2.8 Ρόφηση

Η αντίσταση των πολυμερών στην υγρασία είναι άμεσα συνδεδεμένη με τις υδρόφιλες ομάδες, το βαθμό δικτύωσης των μορίων και την παρουσία των ιοντικών

πολικών ομάδων στη δομή των μεμβρανών χιτοζάνης, τα οποία τους επιτρέπουν να έχουν μεγαλύτερη ευαισθησία στο μέσο, με το οποίο αλληλεπιδρούν [207]. Η απορρόφηση του διαλύτη οδηγεί σε διόγκωση της μεμβράνης και σε αύξηση του βάρους της. Τα μόρια του διαλύτη διαχέονται μέσα στο πολυμερικό δίκτυο και διαχωρίζουν τις μακρομοριακές αλυσίδες, προκαλώντας τη διόγκωση του υλικού. Ωστόσο, από τη στιγμή που το πολυμερικό δίκτυο περιέχει μικροκενά (που δημιουργούνται κατά τον πολυμερισμό) και υπάρχει ελεύθερος όγκος μεταξύ των αλυσίδων, ένα μέρος του διαλύτη διευθετείται σε αυτά δίχως να προκαλείται μεταβολή στον όγκο του υλικού. Συνεπώς, η μεταβολή των διαστάσεων υλικού σε ένα διαλύτη είναι περίπλοκο και δύσκολο να προβλεφθεί φαινόμενο και εξαρτάται από τη χημική δομή της μήτρας [106].

Η πειραματική διαδικασία που ακολουθήθηκε για τον προσδιορισμό της ρόφησης ήταν η ακόλουθη: Παρασκευάστηκαν δισκία χιτοζάνης με διαστάσεις 12mm x 1mm, τα οποία αρχικά ζυγίζονται και έπειτα τοποθετούνται σε ξηραντήρα στους 37±1°C, ο οποίος περιέχει silica gel ως ξηραντικό μέσο (Εικόνα 105). Μετά από 24 ώρες τα δείγματα ζυγίζονται με ακρίβεια ± 0.0001 mg, με τη βοήθεια αναλυτικού ζυγού. Η ίδια διαδικασία επαναλαμβάνεται μέχρι να σταθεροποιηθεί το βάρος των δισκίων, μετά από 42 ώρες ( $m_i$ ). Στη συνέχεια, τα δισκία χωρίζονται σε δύο ομάδες: η πρώτη ομάδα αφορά στα δισκία που βυθίζονται σε αποσταγμένο νερό και η δεύτερη, στα δισκία που βυθίζονται σε ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών αλάτων (PBS), στους 37±1°C. Σε τακτά χρονικά διαστήματα, τα δισκία απομακρύνονται από το υδατικό περιβάλλον, απομάκρυνεται η ορατή υγρασία, και τέλος, ζυγίζονται ( $m_t$ ). Στη συνέχεια, βυθίζονται ξανά στο νερό και στο διάλυμα PBS, αντίστοιχα, στους 37±1°C. Η διαδικασία αυτή συνεχίστηκε μέχρι να μην παρατηρηθεί σημαντική μεταβολή στο βάρος των δισκίων και είχε διάρκεια 6 ημέρες. Η αύξηση του βάρους των δειγμάτων, WI (weight increase), εκφρασμένο επί τοις %, υπολογίζεται από τη σχέση:

$$WI(\%) = 100 \frac{m_s - m_i}{m_i}$$

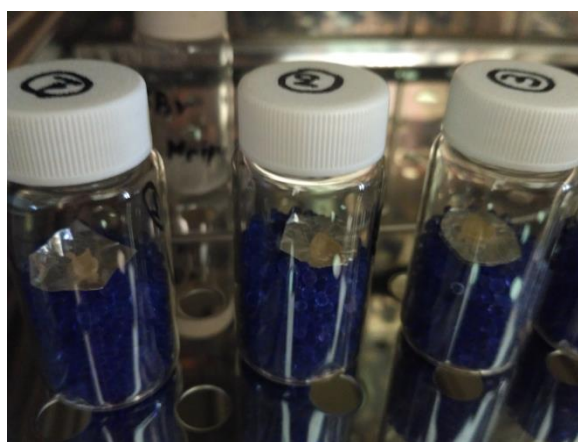
Όπου το  $m_s$  εκφράζει το βάρος του κορεσμένου δείγματος μετά από την παραμονή του στο υγρό και  $m_i$  το αρχικό βάρος του δείγματος πριν τη βύθιση του.

Με παρόμοια διαδικασία με αυτή που προαναφέρθηκε στη ρόφηση, ακολουθεί η εκρόφηση, όπου τα δείγματα μεταφέρονται σε ξηραντήρα στους 37±1°C. Το ποσοστό

του αποσταγμένου νερού ή του διαλύματος PBS που εκροφάται από τα δείγματα, WD (weight decrease) εκφρασμένη επί τοις % υπολογίζεται από την ακόλουθη σχέση:

$$WD(\%) = 100 \frac{m_s - m_d}{m_s}$$

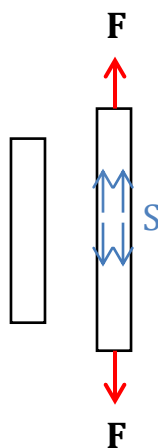
όπου το  $m_d$  αντιπροσωπεύει το βάρος του δείγματος μετά από παραμονή του στο ξηραντήρα. Τέλος, τα δισκία επανατοποθετούνται σε νερό ή σε διάλυμα PBS στους 37°C, και ένας δεύτερος κύκλος ρόφησης-εκρόφησης καταγράφεται για 24 ώρες.



**Εικόνα 105.** Τοποθέτηση δισκίων σε ξηραντήρες με silica gel ως ξηραντικό μέσο.

## 2.9 Αντοχή στον εφελκυσμό

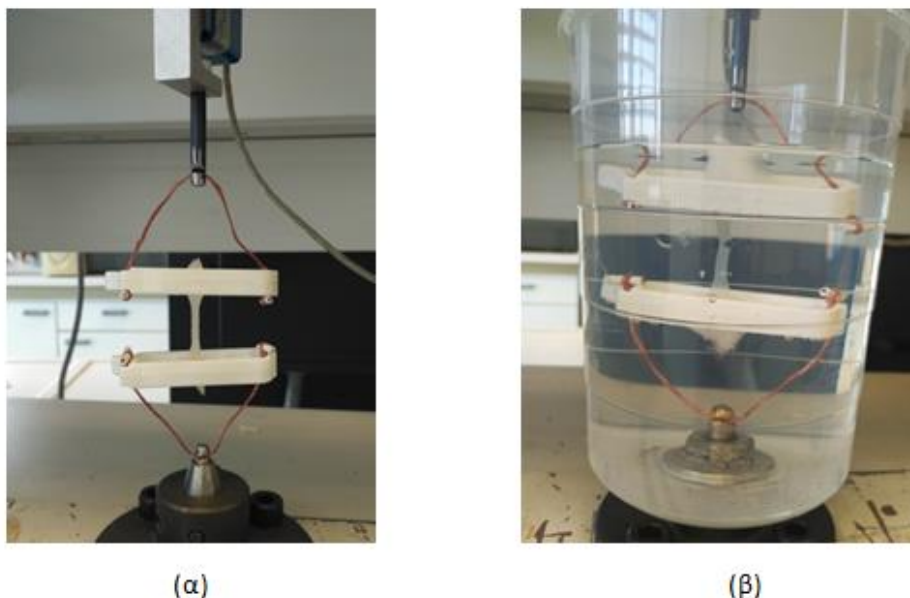
Η δοκιμή του εφελκυσμού είναι η συνηθέστερη, άλλα άκρως σημαντική μηχανική δοκιμή, η οποία συνίσταται στην υποβολή δοκιμίου του προς χαρακτηρισμό υλικού, σε εφελκυστική καταπόνηση κατά τη διάρκεια της οποίας καταγράφεται η προκαλούμενη επιμήκυνση ( $\Delta l$ ). Εφελκυσμός ονομάζεται η καταπόνηση δοκιμίου όταν οι εφαρμοζόμενες δυνάμεις, που είναι ίσες και αντίθετες, ενεργούν κατά μήκος του άξονα του δοκιμίου, τείνουν, δε, να αυξήσουν το μήκος του (Εικόνα 106). Το εφαρμοζόμενο φορτίο και η αντίστοιχη επιμήκυνση καταγράφονται και σχεδιάζεται η καμπύλη τάσης εφελκυσμού-παραμόρφωσης. Τα δοκίμια εφελκυσμού είναι συνήθως ράβδοι κυκλικής διατομής ή παραλληλεπίπεδα τυποποιημένων διαστάσεων.



**Εικόνα 106.** Σχηματική αναπαράσταση δυνάμεων εφελκυσμού ( $F$ ), καθώς και των αντίστοιχων τάσεων ( $S$ ) που αναπτύσσονται στο υλικό.

Για την καλύτερη κατανόηση αν το υλικό που χρησιμοποιείται στη συγκεκριμένη εφαρμογή έχει αποδεκτές ιδιότητες, διεξήχθησαν δοκιμές εφελκυσμού, εφαρμόζοντας μονοαξονικό φορτίο και καταγράφοντας την αντίστοιχη επιμήκυνση [208]. Η μηχανική καταπόνηση των δειγμάτων πραγματοποιήθηκε χρησιμοποιώντας εφελκυσόμετρο AGS-H της εταιρείας Shimadzu. Για την προετοιμασία των δειγμάτων, οι μεμβράνες χιτοζάνης μορφοποιήθηκαν σε δοκίμια (dog bones) με διαστάσεις  $25 \times 3,5 \times 1 \text{ mm}^3$  και τοποθετήθηκαν ανάμεσα από τις σιαγόνες του εφελκυσόμετρου. Για τις συγκεκριμένες δοκιμές, χρησιμοποιήθηκε δυναμοκελί (load cell) 50 N, ενώ τα δείγματα οδηγήθηκαν στη θραύση με ταχύτητα μετατόπισης κεφαλής 5 mm/min. Οι μετρήσεις πραγματοποιήθηκαν σε ξηρό περιβάλλον σε θερμοκρασία δωματίου και σε διάλυμα PBS ( $37 \pm 1^\circ\text{C}$ ), χρησιμοποιώντας ειδική κατασκευή, τόσο για ξηρό και όσο και για υγρό περιβάλλον (Εικόνα 107).

Από τις τιμές φορτίου-μετατόπισης που ελήφθησαν κατασκευάστηκαν τα διαγράμματα τάσης -παραμόρφωσης και προσδιορίστηκε το μέτρο ελαστικότητας από την κλίση της ευθείας στη γραμμική περιοχή. Από τις μετρήσεις εφελκυσμού και τα διαγράμματα τάσης-παραμόρφωσης συλλέγονται και άλλες σημαντικές πληροφορίες για τις ιδιότητες των υλικών, όπως η μέγιστη τάση  $\sigma_{\max}$ , η επί τοις εκατό παραμόρφωση στη θραύση  $\varepsilon_{\max}$  και το μέγιστο φορτίο  $L_{\max}$ .



**Εικόνα 107.** Μηχανική καταπόνηση μεμβρανών χιτοζάνης σε ιδιοκατασκευή για (α) ξηρό και (β) υγρό περιβάλλον (διάλυμα PBS,  $37\pm 1^\circ\text{C}$ ).

Παρομοίως, πραγματοποιήθηκε και η μελέτη υποβάθμισης μηχανικών ιδιοτήτων των τελικών μεμβρανών χιτοζάνης σε υδατικό περιβάλλον (PBS, πλάσμα αίματος). Οι μεμβράνες έχοντας μορφοποιηθεί σε dog bones, χωρίστηκαν σε 2 ομάδες των 4 μεμβρανών και εμβαπτίστηκαν για τα χρονικά διαστήματα των 1, 2, 5 και 7 ημερών σε διάλυμα PBS και πλάσμα αίματος, αντίστοιχα, και τοποθετήθηκαν στο πυριαντήριο στους  $37\pm 1^\circ\text{C}$  (Εικόνα 108). Πριν και μετά την εμβάπτιση τους στα δύο διαλύματα, γινόταν μέτρηση του πάχους τους με τη χρήση παχύμετρου και ακολουθούσαν οι μετρήσεις εφελκυσμού στο υγρό περιβάλλον.



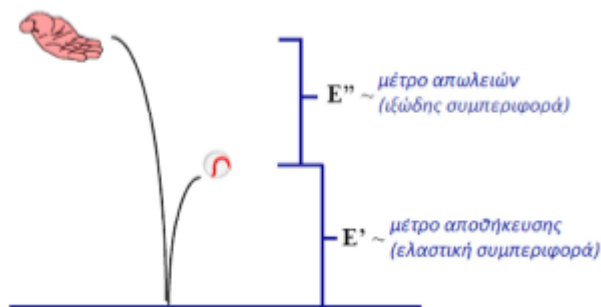
**Εικόνα 108.** Εμβάπτιση μεμβρανών σε υδατικά διαλύματα (PBS και πλάσμα), για το χρονικό διάστημα των 1, 2, 5 και 7 ημερών ( $37\pm 1^\circ\text{C}$ ).

## 2.10 Δυναμική Μηχανική Ανάλυση (DMA)

Η δυναμική μηχανική ανάλυση, DMA, (dynamic mechanical analysis) είναι μια θερμοανλυτική τεχνική που χρησιμοποιείται για τον προσδιορισμό των ιξωδοελαστικών ιδιοτήτων των υλικών ως συνάρτηση του χρόνου, της θερμοκρασίας ή της συχνότητας παραμόρφωσης. Ειδικότερα, με την τεχνική αυτή μελετάται η συμπεριφορά των υλικών όταν αυτά υπόκεινται σε παραμόρφωση (ή τάση) εξαιτίας της εφαρμογής περιοδικής ημιτονοειδούς τάσης (ή παραμόρφωσης) ορισμένης συχνότητας ή εύρους συχνοτήτων, ενώ μεταβάλλεται η θερμοκρασία ή ισοθερμοκρασιακά ως συνάρτηση του χρόνου. Διαφόρων τύπων φόρτιση μπορεί να εφαρμοστεί, όπως ο εφελκυσμός (tensile), η θλίψη (compression), η διάτμηση (shear) και η κάμψη (bending). Σε όλες τις περιπτώσεις φόρτισης, η διέγερση είναι αρμονική συνάρτηση του χρόνου και μετράται η ιξωδοελαστική απόκριση του υλικού [209, 210].

Στη δυναμική μηχανική ανάλυση των υλικών χρησιμοποιείται το δυναμικό μέτρο ελαστικότητας,  $E^*$ , (dynamic mechanical modulus) που εκφράζεται σαν μιγαδικός αριθμός, αναλύεται σε δυο συνιστώσες και ορίζεται ως  $E^* = E' + iE''$ , όπου το  $E'$  αντιστοιχεί στο πραγματικό μέρος και καλείται μέτρο αποθήκευσης (storage modulus), ενώ το  $E''$  στο φανταστικό μέρος και ονομάζεται μέτρο απώλειας (loss modulus). Το  $E'$  αποτελεί μέτρο της δυναμικής δυσκαμψίας του υλικού και είναι δείκτης της ελαστικής συμπεριφοράς του. Εκφράζει το ποσό της ενέργειας που αποθηκεύεται στο υλικό κατά τη διάρκεια μιας περιόδου και αποδίδεται ξανά σε κάθε κύκλο εφαρμοζόμενης τάσης. Αντίθετα, το  $E''$  είναι ένας δείκτης της ιξώδους συμπεριφοράς του υλικού και εκφράζει το ποσό της ενέργειας που διαχέεται με τη μορφή θερμότητας σε κάθε κύκλο εφαρμοζόμενης τάσης, εξαιτίας εσωτερικών μοριακών δονήσεων. Ένα παράδειγμα του δυναμικού μέτρου ελαστικότητας είναι η αναπήδηση της μπάλας από το δάπεδο, όπως απεικονίζεται σχηματικά στην Εικόνα 109 [210, 211].





**Εικόνα 109.** Αναπήδηση μπάλας από δάπεδο. Το ύψος αναπήδησης της μπάλας είναι μικρότερο από το ύψος από όπου αφέθηκε, διότι κατά την κρούση της μπάλας στο δάπεδο απωλέσθηκε μέρος της αρχικής ενέργειας,  $E''$ , λόγω τριβής και εσωτερικών μοριακών κινήσεων.

Μια εξίσου σημαντική ιξωδοελαστική ιδιότητα, η οποία συσχετίζει το μέτρο αποθήκευσης,  $E'$ , με το μέτρο απώλειας,  $E''$ , είναι η εφαπτόμενη της γωνίας  $\delta$ ,  $\tan\delta$ , ή συντελεστής απωλειών (loss factor) ή μηχανική απόσβεση (mechanical damping), όπου η γωνία  $\delta$  εκφράζει τη διαφορά φάσης μεταξύ της εφαρμοζόμενης τάσης και παραμόρφωσης. Είναι αδιάστατο μέγεθος και ορίζεται ως ο λόγος της ενέργειας που χάνεται μετατρέπόμενη σε θερμότητα προς την ενέργεια που αποθηκεύεται στο υλικό και αποδίδεται ξανά, σε κάθε κύκλο εφαρμοζόμενης τάσης:

$$\tan\delta = \frac{\text{μέτρο απώλειας}}{\text{μέτρο αποθήκευσης}} = \frac{E''}{E'}$$

Για τη μελέτη των δυναμικών μηχανικών ιδιοτήτων στην παρούσα διατριβή, παρασκευάστηκαν δοκίμια μεμβρανών χιτοζάνης διαστάσεων 40 mm x 10 mm x 1 mm. Οι δοκιμές έγιναν με τη βοήθεια του δυναμικού μηχανικού αναλυτή NETZSCH DMA 242C, στον οποίο προσαρμόστηκε το εξάρτημα για τον εφελκυσμό (tension clamp) ως τρόπος φόρτισης (Εικόνα 110). Για το κάθε δοκίμιο εφαρμόστηκε ένα εύρος συχνοτήτων από 0,1 έως 50 Hz υπό σταθερό ρυθμό παραμόρφωσης (δύναμη 0,5N με πλάτος ταλάντωσης 10μm) και η καταγραφή της θερμοκρασίας έγινε στους  $37\pm 1^\circ\text{C}$  για να προσομοιάζει τις φυσιολογικές συνθήκες του οργανισμού. Τα δοκίμια εξετάστηκαν και κατόπιν εμβάπτισή τους σε διάλυμα PBS, στους  $37\pm 1^\circ\text{C}$ . Καθώς η ιξωδοελαστική απόκριση του δοκιμίου μεταβάλλεται με τη συχνότητα, καταγράφονται το μέτρο αποθήκευσης,  $E'$ , (storage modulus), το μέτρο απωλειών,  $E''$ , (loss modulus) καθώς και ο συντελεστής απωλειών,  $\tan\delta$ , (tangent delta), του δείγματος συναρτήσει της συχνότητας.



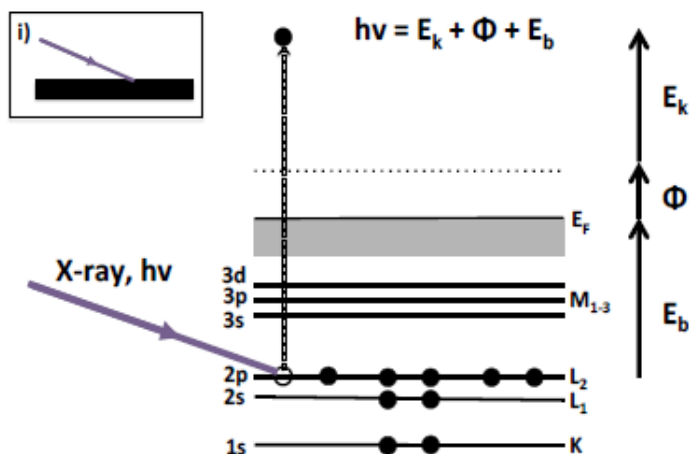


**Εικόνα 110.** Δυναμικός μηχανικός αναλυτής DMA 242C, NETZSCH.

### 2.11 Φασματοσκοπία φωτοηλεκτρονίων ακτίνων-X (XPS)

Η φασματοσκοπία φωτοηλεκτρονίων από ακτίνες X (XPS) είναι μία μη καταστρεπτική τεχνική και χρησιμοποιείται για τη χημική ανάλυση και την ταυτοποίηση της χημικής κατάστασης των στοιχείων στην επιφάνεια ενός υλικού, αποτελώντας μία άμεση μέθοδο για τον ποιοτικό και ποσοτικό προσδιορισμό της χημικής σύστασης της επιφάνειας του υλικού [212, 213]. Η τεχνική αυτή βασίζεται στην ενεργειακή ανάλυση των ηλεκτρονίων που εξάγονται κυρίως από εσωτερικές ηλεκτρονιακές στάθμες των ατόμων του στερεού όταν αυτό εκτίθεται σε ακτίνες X συγκεκριμένης ενέργειας. Στη φασματοσκοπία XPS το δείγμα εκτίθεται, υπό συνθήκες υπερυψηλού κενού, σε μία μονοχρωματική δέσμη ακτίνων X (ενέργειας  $h\nu$ ) που προκαλεί φωτοϊονισμό και εκπομπή φωτοηλεκτρονίων. Το φάσμα XPS απεικονίζει το ενεργειακό φάσμα των εκπεμπομένων φωτοηλεκτρονίων και αποτελείται από μία σειρά από διακριτές ταινίες που ανταποκρίνονται στις χαρακτηριστικές στοιβάδες της ηλεκτρονικής δομής του ατόμου. Η κινητική ενέργεια  $E_k$  των εκπεμπομένων φωτοηλεκτρονίων δίνεται από τη σχέση:  $E_k = h\nu - E_b + \Delta\Phi$  όπου  $h = 6.62 \times 10^{-23}$  Js είναι η σταθερά του Planck,  $\Delta\Phi$  η διαφορά του έργου εξόδου ανάμεσα στο στερεό και τον ανιχνευτή και  $E_b$  η ενέργεια δέσμησης του φωτοηλεκτρονίου που προέρχεται από εσωτερική στοιβάδα (core electron) (Εικόνα 111). Όταν η επιφάνεια ενός στερεού εκτεθεί σε ακτίνες X κατάλληλης ενέργειας, το υλικό απορροφά διακριτά κβάντα ενέργειας με επακόλουθο την εκπομπή φωτοηλεκτρονίων. Η εκπομπή του φωτοηλεκτρονίου γίνεται σε 3 στάδια: 1)

απορρόφηση των ακτίνων X και διέγερση του ηλεκτρονίου από τη βασική στην τελική κατάσταση που βρίσκεται επάνω από τη στάθμη Fermi, 2) μεταφορά του ηλεκτρονίου στην επιφάνεια και 3) διαφυγή του ηλεκτρονίου στο κενό.



**Εικόνα 111.** Ενεργειακό διάγραμμα εκπομπής φωτοηλεκτρονίων. Ακτίνα X με ενέργεια  $h\nu$  προσπίπτει στην επιφάνεια και το εκπέμπεται ηλεκτρόνιο.

Στην παρούσα διατριβή, η φασματοσκοπία φωτοηλεκτρονίων ακτίνων X πραγματοποιήθηκε για τον προσδιορισμό των ενεργειών των δεσμών μεταξύ των στοιχείων του C, O, N στην επιφάνεια της χιτοζάνης και για τη μελέτη της διεπιφάνειας μεταξύ της χιτοζάνης και της εξωκυττάριας μήτρας του επικαρδίου. Τα φάσματα XPS καταγράφηκαν χρησιμοποιώντας φασματοφωτόμετρο της εταιρείας SPECS εξοπλισμένο με πηγή ακτίνων X διπλής ανόδου Al-Mg και ένα ημισφαιρικό αναλυτή ηλεκτρονίων πολλαπλών καναλιών (HSA-Phoibos 100). Σε όλες τις μετρήσεις χρησιμοποιήθηκαν μονοχρωματική ακτινοβολία Mg στα 1253,6 eV και ένας ενεργειακός αναλυτής των 20 eV. Οι δεσμικές ενέργειες υπολογίστηκαν με βάση την κορυφή του C1s στα 284,5 eV ως αναφορά (reference). Αρχικά καταγράφηκαν φάσματα ευρείας σάρωσης (wide scans) και στη συνέχεια έγιναν λεπτομερείς μετρήσεις. Η χημική σύσταση της επιφάνειας προσδιορίζεται από τις σχετικές εντάσεις των κορυφών στο φάσμα XPS.

Τα ατομικά ποσοστά της χημικής σύστασης των δειγμάτων υπολογίστηκαν χρησιμοποιώντας Shirley background και εμπειρικούς συντελεστές ευαισθησίας για το XPS. Τα δείγματα που μετρήθηκαν ήταν η σκόνη χιτοζάνης, οι επιφάνειες των

μεμβρανών χιτοζάνης μετά την εξουδετέρωση, πριν και μετά την εμφύτευσή τους, καθώς και ο ιστός μυοκαρδίου (δεξιά κοιλία), πριν και μετά την επαφή του με τη μεμβράνη. Η προετοιμασία των δειγμάτων της καρδιάς και των μεμβρανών μετά την εμφύτευση είναι η ίδια, όπως ακριβώς αναφέρεται στη φασματοσκοπία FT-IR. Μετά τη λυοφιλοποίησή τους, τα δείγματα τοποθετήθηκαν σε δειγματοφορέα Si με υπόστρωμα αγώγιμης κόλλας (κολλοειδής άνθρακας). Οι μεμβράνες τοποθετήθηκαν ως έχουν, με την επιφάνεια που είχε έρθει σε επαφή με το μυοκάρδιο να δέχεται τις ακτίνες X που απαιτεί η μέτρηση. Ο ιστός δεν δύναται να χρησιμοποιηθεί ως έχει, εξαιτίας της καμπυλότητας της επιφάνειάς του (μη επίπεδη επιφάνεια) που δεν επέτρεπε να πραγματοποιηθεί σωστά η μέτρηση. Γι' αυτό το λόγο, χρησιμοποιήθηκε ένα πολύ λεπτό στρώμα της επιφάνειάς του, αφού πρώτα κονιορτοποιήθηκε. Τέλος, τα δείγματα που εξετάστηκαν, τα οποία είχαν διαστάσεις 10 x 10 mm<sup>2</sup>, τοποθετήθηκαν στον υποδοχέα, ο οποίος με μία ειδική διάταξη εισέρχεται από τον εξωτερικό χώρο της ατμόσφαιρας στο θάλαμο υπερ-υψηλού κενού της διάταξης.

### ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ 3: *IN VIVO* ΕΜΦΥΤΕΥΣΕΙΣ

Το ιατρικό πρωτόκολλο, το οποίο εφαρμόστηκε στην *in vivo* μελέτη των βιοϋλικών, βασίζεται: 1) στον προσδιορισμό και στη βελτιστοποίηση της μεθόδου πρόσδεσης των εμφυτευμάτων στον καρδιακό μυ, 2) στον έλεγχο απόκρισης των ζωικών προτύπων παρουσία των εμφυτευμάτων και 3) στη μελέτη αποικοδόμησης των υλικών σε συνάρτηση με τον χρόνο της επικαρδιακής τους εμφύτευσης.

Τα ζωικά μοντέλα που χρησιμοποιήθηκαν ήταν φυσιολογικοί ενήλικοι επίμυες τύπου Wistar και βάρους 270-350g. Η φροντίδα των ζώων πραγματοποιείται σύμφωνα με τις διατάξεις της συνθήκης του Ελσίνκι. Όλα τα εργαστηριακά ζώα έλαβαν την κατάλληλη φροντίδα, σύμφωνα με την ευρωπαϊκή νομοθεσία (European Union directive for the protection of animals used for scientific purposes, 2010/63/EU) που αφορά την διεξαγωγή πειραμάτων σε ζώα, καθώς και τις διατάξεις της Ελληνικής νομοθεσίας (ΠΔ 56/2013). Πολύ σημαντικό κομμάτι της ευρωπαϊκής νομοθεσίας αποτελεί η εφαρμογή της συνθήκης των 3Rs, η οποία στοχεύει: α) στην πλήρη δικαιολόγηση και ενσυνείδηση για την χρήση των ζώων στο συγκεκριμένο πρωτόκολλο και όχι κάποια άλλη εναλλακτική μέθοδο πειραματισμού που δεν χρησιμοποιεί ζώα (Αντικατάσταση-Replacement), β) στη διασφάλιση του μικρότερου αριθμού ζώων εργαστηρίου, χωρίς να επηρεαστούν τα ερευνητικά αποτελέσματα και γ) στην ελάττωση του πόνου και της κακουχίας των ζώων (Βελτίωση-Refinement). Σύμφωνα, λοιπόν, με τα παραπάνω τα ζώα στεγάζονταν σε σταθερές ομάδες (1-2 επίμυες σε κάθε κλωβό), ελέγχονταν σε καθημερινή βάση η σχετική υγρασία, η θερμοκρασία και η κυκλική εναλλαγή σκότους/φωτός, ενώ παράλληλα είχαν ελεύθερη πρόσβαση σε τροφή και νερό. Ειδική μέριμνα δίνεται στη χρήση αναισθητικών παραγόντων, με σκοπό να ελαχιστοποιηθεί ο πόνος και η κακουχία των ζώων εργαστηρίου. Η χρήση αναλγητικών δεν είναι εφικτή καθώς επηρεάζει την διαδικασία της αναδιαμόρφωσης των κοιλιών.

Ως εμφυτευόμενα βιοϋλικά, μελετήθηκαν οι μεμβράνες PEGDA και τα υδροπηκτώματα χιτοζάνης σε μορφή μεμβράνης, μέσω διαφορετικών μεθόδων παρασκευής τους, όπως με τη μέθοδο αργής ενστάλλαξης, τη χρήση διαλύματος εξουδετέρωσης β-GP και τη μέθοδο ζελατινοποίησης. Τα πειράματα αυτά πραγματοποιήθηκαν σε συνεργασία με την Καρδιολογική Κλινική του Τμήματος Ιατρικής του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων, υπό την επίβλεψη του Καθηγητή κ.

Θεόφιλου Κωλέττη. Όλες οι χειρουργικές επεμβάσεις πραγματοποιήθηκαν στο Πειραματικό Εργαστήριο του Ερευνητικού Καρδιαγγειακού Ινστιτούτου, υπό άσηπτες συνθήκες.



## ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΚΕΣ ΑΝΑΦΟΡΕΣ

1. Hooper, M.M., et al., Goal-oriented treatment and combination therapy for pulmonary arterial hypertension. *Eur Respir J*, 2005. **26**(5): p. 858-63.
2. Sitbon, O., et al., Long-term intravenous epoprostenol infusion in primary pulmonary hypertension: prognostic factors and survival. *J Am Coll Cardiol*, 2002. **40**(4): p. 780-8.
3. W.H.O., *Global health risks : mortality and burden of disease attributable to selected major risks*. World Health Organization, 2009.
4. W.H.O., *The global burden of disease : 2004 update*. World Health Organization, 2008.
5. <http://www.incardiology.gr/kardia/kardia.html>.
6. Τουτούζας, Π.Χ., *Καρδιακές Παθήσεις*. 1992: Αθήνα: Εκδόσεις Παρισιάνος.
7. Μουτσόπουλος, Χ., *Βασικές Αρχές Παθολογίας*. 2010: Αθήνα: Ιατρικές Εκδόσεις.
8. D'Alonzo, G.E., et al., Survival in patients with primary pulmonary hypertension. Results from a national prospective registry. *Ann Intern Med*, 1991. **115**(5): p. 343-9.
9. Hooper, M.M., et al., Definitions and diagnosis of pulmonary hypertension. *J Am Coll Cardiol*, 2013. **62**(25): p. 032.
10. Newman, J.H., Pulmonary hypertension. *Am J Respir Crit Care Med*, 2005. **172**(9): p. 1072-7.
11. Ryan, J.J., et al., Right ventricular adaptation and failure in pulmonary arterial hypertension. *Can J Cardiol*, 2015. **31**(4): p. 391-406.
12. Bogaard, H.J., et al., The right ventricle under pressure: cellular and molecular mechanisms of right-heart failure in pulmonary hypertension. *Chest*, 2009. **135**(3): p. 794-804.
13. Silverman, K.J., G.M. Hutchins, and B.H. Bulkley, Cardiac sarcoid: a clinicopathologic study of 84 unselected patients with systemic sarcoidosis. *Circulation*, 1978. **58**(6): p. 1204-11.
14. Follansbee, W.P., et al., A controlled clinicopathologic study of myocardial fibrosis in systemic sclerosis (scleroderma). *J Rheumatol*, 1990. **17**(5): p. 656-62.
15. Rich, S. and B.H. Brundage, High-dose calcium channel-blocking therapy for primary pulmonary hypertension: evidence for long-term reduction in pulmonary arterial pressure and regression of right ventricular hypertrophy. *Circulation*, 1987. **76**(1): p. 135-41.
16. Rich, S., E. Kaufmann, and P.S. Levy, The effect of high doses of calcium-channel blockers on survival in primary pulmonary hypertension. *N Engl J Med*, 1992. **327**(2): p. 76-81.
17. Sitbon, O., et al., Long-term response to calcium channel blockers in idiopathic pulmonary arterial hypertension. *Circulation*, 2005. **111**(23): p. 3105-11.

18. Galie, N., et al., *Guidelines on diagnosis and treatment of pulmonary arterial hypertension. The Task Force on Diagnosis and Treatment of Pulmonary Arterial Hypertension of the European Society of Cardiology. Eur Heart J, 2004. 25(24): p. 2243-78.*
19. Barst, R.J., et al., *Survival in primary pulmonary hypertension with long-term continuous intravenous prostacyclin. Ann Intern Med, 1994. 121(6): p. 409-15.*
20. Shapiro, S.M., et al., *Primary pulmonary hypertension: improved long-term effects and survival with continuous intravenous epoprostenol infusion. J Am Coll Cardiol, 1997. 30(2): p. 343-9.*
21. Apostolopoulou, S.C., et al., *Effect of the oral endothelin antagonist bosentan on the clinical, exercise, and haemodynamic status of patients with pulmonary arterial hypertension related to congenital heart disease. Heart (British Cardiac Society), 2005. 91(11): p. 1447-1452.*
22. Benza, R.L., et al., *Efficacy of bosentan in a small cohort of adult patients with pulmonary arterial hypertension related to congenital heart disease. Chest, 2006. 129(4): p. 1009-15.*
23. Galie, N., et al., *Sildenafil citrate therapy for pulmonary arterial hypertension. N Engl J Med, 2005. 353(20): p. 2148-57.*
24. Sastry, B.K., *Pharmacologic treatment for pulmonary arterial hypertension. Curr Opin Cardiol, 2006. 21(6): p. 561-8.*
25. Kolettis, T., et al., *Characterisation of a rat model of pulmonary arterial hypertension. Hellenic J Cardiol, 2007. 48(4): p. 206-10.*
26. Megalou, A.J., et al., *Transforming growth factor- $\beta$  inhibition attenuates pulmonary arterial hypertension in rats. International Journal of Clinical and Experimental Medicine, 2010. 3(4): p. 332-340.*
27. Μεγάλου, Α., *Ο ρόλος του μεταμορφωτικού αυξητικού παράγοντα- $\beta$  (TGF) στην πνευμονική υπέρταση [Διδακτορική Διατριβή]. 2013, Πανεπιστήμιο Ιωαννίνων.*
28. Goldstein, J.A. and M.J. Kern, *Percutaneous mechanical support for the failing right heart. Cardiol Clin, 2012. 30(2): p. 303-10.*
29. Moazami, N., et al., *Mechanical support for isolated right ventricular failure in patients after cardiectomy. J Heart Lung Transplant, 2004. 23(12): p. 1371-5.*
30. Furukawa, K., T. Motomura, and Y. Nose, *Right ventricular failure after left ventricular assist device implantation: the need for an implantable right ventricular assist device. Artif Organs, 2005. 29(5): p. 369-77.*



31. Klima, U., et al., Severe right heart failure after heart transplantation. A single-center experience. *Transpl Int*, 2005. **18**(3): p. 326-32.
32. Bhama, J.K., et al., Clinical experience using the Levitronix CentriMag system for temporary right ventricular mechanical circulatory support. *J Heart Lung Transplant*, 2009. **28**(9): p. 971-6.
33. McGee, E.C., Jr., et al., Biventricular continuous flow VADs demonstrate diurnal flow variation and lead to end-organ recovery. *Ann Thorac Surg*, 2011. **92**(1): p. 081.
34. Simon, M.A., Assessment and treatment of right ventricular failure. *Nat Rev Cardiol*, 2013. **10**(4): p. 204-18.
35. Chen, Q.-Z., et al., Biomaterials in cardiac tissue engineering: Ten years of research survey. *Materials Science and Engineering: R: Reports*, 2008. **59**(1-6): p. 1-37.
36. Daskalopoulos, E.P., et al., Attenuation of post-infarction remodeling in rats by sustained myocardial growth hormone administration. *Growth Factors*, 2015. **12**: p. 1-9.
37. Kontonika, M., et al., Prolonged intra-myocardial growth hormone administration ameliorates post-infarction electrophysiologic remodeling in rats. *Growth Factors*, 2017: p. 1-11.
38. Kolettis, T.M., et al., Tissue engineering for post-myocardial infarction ventricular remodeling. *Mini-Reviews in Medicinal Chemistry*, 2011. **11**(3): p. 263-270.
39. Ratner B.D., H.A.S., Schoen F.J., Lemons J.E. , *Biomaterials Science (second edition) "An Introduction to Materials in Medicine."*, E.A. Press, Editor. 2004: California.
40. Peppas, N.A., et al., Hydrogels in Biology and Medicine: From Molecular Principles to Bionanotechnology. *Advanced Materials*, 2006. **18**(11): p. 1345-1360.
41. Hoffman, A.S., Hydrogels for biomedical applications. *Adv Drug Deliver Rev*, 2002. **54**.
42. Zhu, J. and R.E. Marchant, Design properties of hydrogel tissue-engineering scaffolds. *Expert review of medical devices*, 2011. **8**(5): p. 607-626.
43. Scott, J.E., Extracellular matrix, supramolecular organisation and shape. *Journal of anatomy*, 1995. **187 ( Pt 2)**(Pt 2): p. 259-269.
44. Rhodes, J.M. and M. Simons, The extracellular matrix and blood vessel formation: not just a scaffold. *J Cell Mol Med*, 2007. **11**(2): p. 176-205.
45. Ma, P.X., Biomimetic materials for tissue engineering. *Adv Drug Deliv Rev*, 2008. **60**(2): p. 184-98.
46. Chen, R. and J.A. Hunt, Biomimetic materials processing for tissue-engineering processes. *Journal of Materials Chemistry*, 2007. **17**(38): p. 3974-3979.
47. Tibbitt, M.W. and K.S. Anseth, Hydrogels as extracellular matrix mimics for 3D cell culture. *Biotechnol Bioeng*, 2009. **103**(4): p. 655-63.

48. Brandl, F., F. Sommer, and A. Goepferich, *Rational design of hydrogels for tissue engineering: impact of physical factors on cell behavior*. *Biomaterials*, 2007. **28**(2): p. 134-46.
49. Drury, J.L. and D.J. Mooney, *Hydrogels for tissue engineering: scaffold design variables and applications*. *Biomaterials*, 2003. **24**(24): p. 4337-4351.
50. Slaughter, B.V., et al., *Hydrogels in regenerative medicine*. *Adv Mater*, 2009. **21**(32-33): p. 3307-29.
51. Kopecek, J., *Hydrogel Biomaterials: A Smart Future? Vol. 28*. 2008. 5185-92.
52. Kofidis, T., et al., *A novel bioartificial myocardial tissue and its prospective use in cardiac surgery*. *Eur J Cardiothorac Surg*, 2002. **22**(2): p. 238-43.
53. Leor, J., Y. Amsalem, and S. Cohen, *Cells, scaffolds, and molecules for myocardial tissue engineering*. *Pharmacol Ther*, 2005. **105**(2): p. 151-63.
54. Silva, A.K.A., D. Letourneur, and C. Chauvierre, *Polysaccharide nanosystems for future progress in cardiovascular pathologies*. *Theranostics*, 2014. **4**(6): p. 579-591.
55. Hamidi, S., et al., *Fucoidan promotes early step of cardiac differentiation from human embryonic stem cells and long-term maintenance of beating areas*. *Tissue Eng Part A*, 2014. **20**(7-8): p. 1285-94.
56. Chen, Q.Z., et al., *Characterisation of a soft elastomer poly(glycerol sebacate) designed to match the mechanical properties of myocardial tissue*. *Biomaterials*, 2008. **29**(1): p. 47-57.
57. Klouda, L. and A.G. Mikos, *Thermoresponsive hydrogels in biomedical applications*. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, 2008. **68**(1): p. 34-45.
58. P. Prabhakaran, M., et al., *Biomimetic material strategies for cardiac tissue engineering*. Vol. 31. 2011. 503-513.
59. Ulery, B.D., L.S. Nair, and C.T. Laurencin, *Biomedical Applications of Biodegradable Polymers*. *J Polym Sci B Polym Phys*, 2011. **49**(12): p. 832-864.
60. Leor, J., 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): p. 1014-23.
61. Μπάρκα, Ε., *Κατασκευή και χαρακτηρισμός βιοαποδομούμενων ιστοτεχνολογικών ικτριωμάτων για την πρόληψη της αναδιαμόρφωσης της αριστερής κοιλίας μετά το οξύ έμφραγμα του μυοκαρδίου [Διδακτορική Διατριβή]*. 2016, Πανεπιστήμιο Ιωαννίνων.
62. Barka, E., et al., *Optimization of Ca<sup>2+</sup> content in alginate hydrogel injected in myocardium*. *Journal of Biomedical Materials Research - Part B Applied Biomaterials*, 2019. **107**(2): p. 223-231.

63. Landa, N., et al., *Effect of injectable alginate implant on cardiac remodeling and function after recent and old infarcts in rat. Circulation, 2008. 117(11): p. 1388-96.*
64. Rocca, D.G., et al., *An injectable capillary-like microstructured alginate hydrogel improves left ventricular function after myocardial infarction in rats. Int J Cardiol, 2016. 220: p. 149-54.*
65. Buxton, A.N., et al., *Design and characterization of poly(ethylene glycol) photopolymerizable semi-interpenetrating networks for chondrogenesis of human mesenchymal stem cells. Tissue Eng, 2007. 13(10): p. 2549-60.*
66. Kim, J., et al., *Synthesis and evaluation of novel biodegradable hydrogels based on poly(ethylene glycol) and sebacic acid as tissue engineering scaffolds. Biomacromolecules, 2008. 9(1): p. 149-157.*
67. Wang, H., et al., *Injectable biodegradable hydrogels for embryonic stem cell transplantation: improved cardiac remodelling and function of myocardial infarction. Journal of cellular and molecular medicine, 2012. 16(6): p. 1310-1320.*
68. Vilaeti, A.D., et al., *Short-term ventricular restraint attenuates post-infarction remodeling in rats. International Journal of Cardiology, 2013. 165(2): p. 278-284.*
69. Dodane V, V.V., *Pharmaceutical applications of chitosan. Pharm Sci Technol Today, 1998. 1: p. 246-53.*
70. Vunain, E., A.K. Mishra, and B.B. Mamba, *1 - Fundamentals of chitosan for biomedical applications, in Chitosan Based Biomaterials Volume 1, J.A. Jennings and J.D. Bumgardner, Editors. 2017, Woodhead Publishing. p. 3-30.*
71. Dash, M., et al., *Chitosan—A versatile semi-synthetic polymer in biomedical applications. Progress in Polymer Science, 2011. 36(8): p. 981-1014.*
72. Pavinatto, F.J., L. Caseli, and O.N. Oliveira, *Chitosan in Nanostructured Thin Films. Biomacromolecules, 2010. 11(8): p. 1897-1908.*
73. Paul, W. and C.P. Sharma, *Chitosan, a drug carrier for the 21st century: A review. Vol. 10. 2000. 5-22.*
74. Chatelet, C., O. Damour, and A. Domard, *Influence of the degree of acetylation on some biological properties of chitosan films. Biomaterials, 2001. 22(3): p. 261-268.*
75. Croisier, F. and C. Jérôme, *Chitosan-based biomaterials for tissue engineering. European Polymer Journal, 2013. 49(4): p. 780-792.*
76. Yip, J., et al., *Chitosan/Clotrimazole microcapsules for Tinea pedis treatment: in-vitro antifungal and cytotoxicity study. Vol. 106. 2014. 1-7.*

77. Iyer, P., K.J. Walker, and S.V. Madhally, *Increased matrix synthesis by fibroblasts with decreased proliferation on synthetic chitosan-gelatin porous structures. Biotechnol Bioeng*, 2012. **109**(5): p. 1314-25.
78. Lu, W.N., 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): p. 1437-47.
79. Fiamingo, A., et al., *Chitosan Hydrogels for the Regeneration of Infarcted Myocardium: Preparation, Physicochemical Characterization, and Biological Evaluation. Biomacromolecules*, 2016. **17**(5): p. 1662-72.
80. Allaert, F.A., *Effect of NaCl + Chitosan 3% vs. NaCl on high blood pressure parameters of healthy volunteers with prehypertension. Minerva Cardioangiol*, 2017. **65**(6): p. 563-576.
81. Bokura, H. and S. Kobayashi, *Chitosan decreases total cholesterol in women: a randomized, double-blind, placebo-controlled trial. Eur J Clin Nutr*, 2003. **57**(5): p. 721-5.
82. Pittler, M.H., et al., *Randomized, double-blind trial of chitosan for body weight reduction. Eur J Clin Nutr*, 1999. **53**(5): p. 379-81.
83. Lehtimaki, T., et al., *Microcrystalline chitosan is ineffective to decrease plasma lipids in both apolipoprotein E epsilon 4 carriers and non-carriers: a long-term placebo-controlled trial in hypercholesterolaemic volunteers. Basic Clin Pharmacol Toxicol*, 2005. **97**(2): p. 98-103.
84. Huang, H., Y. Zou, and H. Chi, *Quantitative assessment of the effects of chitosan intervention on blood pressure control. Drug Design, Development and Therapy*, 2018. **12**: p. 67-75.
85. Uludag, H., P. De Vos, and P.A. Tresco, *Technology of mammalian cell encapsulation. Adv Drug Deliv Rev*, 2000. **42**(1-2): p. 29-64.
86. Edlund, U. and A.C. Albertsson, *Polyesters based on diacid monomers. Advanced Drug Delivery Reviews*, 2003. **55**(4): p. 585-609.
87. Wang, H., et al., *Injectable biodegradable hydrogels for embryonic stem cell transplantation: improved cardiac remodelling and function of myocardial infarction. J Cell Mol Med*, 2012. **16**(6): p. 1310-20.
88. Williams, D.F., *On the mechanisms of biocompatibility. Biomaterials*, 2008. **29**(20): p. 2941-53.
89. Langer, R. and D.A. Tirrell, *Designing materials for biology and medicine. Nature*, 2004. **428**(6982): p. 487-92.

90. Cheng, J.Y., et al., *Matrix components and scaffolds for sustained islet function. Tissue Eng Part B Rev*, 2011. **17**(4): p. 235-47.
91. Chi, N.H., et al., *Cardiac repair using chitosan-hyaluronan/silk fibroin patches in a rat heart model with myocardial infarction. Carbohydr Polym*, 2013. **92**(1): p. 591-7.
92. Kolettis, T.M., et al., *Tissue engineering for post-myocardial infarction ventricular remodeling. Mini Rev Med Chem*, 2011. **11**(3): p. 263-70.
93. Imani, M., et al., *Monitoring of Polyethylene Glycol-diacrylate-based Hydrogel Formation by Real Time NMR Spectroscopy. Vol. 16. 2007. 13-20.*
94. Kinard, L.A., F.K. Kasper, and A.G. Mikos, *Synthesis of oligo(poly(ethylene glycol) fumarate). Nat Protoc*, 2012. **7**(6): p. 1219-27.
95. Kim, J., et al., *Potential of hydrogels based on poly(ethylene glycol) and sebacic acid as orthopedic tissue engineering scaffolds. Tissue Eng Part A*, 2009. **15**(8): p. 2299-307.
96. Simon-Yarza, T., I. Bataille, and D. Letourneur, *Cardiovascular Bio-Engineering: Current State of the Art. J Cardiovasc Transl Res*, 2017. **10**(2): p. 180-193.
97. Augst, A.D., H.J. Kong, and D.J. Mooney, *Alginate hydrogels as biomaterials. Macromol Biosci*, 2006. **6**(8): p. 623-33.
98. Lu, S., et al., *Exploration of the nature of a unique natural polymer-based thermosensitive hydrogel. Soft Matter*, 2016. **12**(2): p. 492-9.
99. Lieder, R., et al., *Solution casting of chitosan membranes for in vitro evaluation of bioactivity. Biological Procedures Online*, 2013. **15**: p. 11-11.
100. Campos, M., et al., *Effects of Neutralization Process on Preparation and Characterization of Chitosan Membranes for Wound Dressing. Vol. 229. 2005. 253-257.*
101. Rinaudo, M., *Chitin and chitosan: Properties and applications. Progress in Polymer Science*, 2006. **31**(7): p. 603-632.
102. Llanos, J.H.R., L.C.d.O. Vercik, and A.s. Vercik, *Physical Properties of Chitosan Films Obtained after Neutralization of Polycation by Slow Drip Method. Journal of Biomaterials and Nanobiotechnology*, 2015. **Vol.06No.04**: p. 16.
103. Mohamed, H., et al., *Optimized formulation of vancomycin loaded thermoreversible hydrogel for treatment of orthopedic infections. Vol. 5. 2014. 2936.*
104. Dooley, T.P., et al., *Dense chitosan surgical membranes produced by a coincident compression-dehydration process. Journal of biomaterials science. Polymer edition*, 2013. **24**(5): p. 621-643.
105. Rami, L., et al., *Physicochemical modulation of chitosan-based hydrogels induces different biological responses: interest for tissue engineering. J Biomed Mater Res A*, 2014. **102**(10): p. 3666-76.

106. Ren, D., et al., *The enzymatic degradation and swelling properties of chitosan matrices with different degrees of N-acetylation. Carbohydr Res*, 2005. **340**(15): p. 2403-10.
107. Wan, Y., et al., *Chitosan-based solid electrolyte composite membranes: I. Preparation and characterization. Journal of Membrane Science*, 2006. **280**(1): p. 666-674.
108. Lima, C.G.A., et al., *DC conductivity and dielectric permittivity of collagen–chitosan films. Materials Chemistry and Physics*, 2006. **99**(2): p. 284-288.
109. He, Q., et al., *Preparation of chitosan films using different neutralizing solutions to improve endothelial cell compatibility. J Mater Sci Mater Med*, 2011. **22**(12): p. 2791-802.
110. Zong, Z., et al., *Characterization of chemical and solid state structures of acylated chitosans. Polymer*, 2000. **41**(3): p. 899-906.
111. Brugnerotto, J., et al., *An infrared investigation in relation with chitin and chitosan characterization. Polymer*, 2001. **42**(8): p. 3569-3580.
112. Mauricio-Sánchez, R.A., et al., *FTIR spectroscopy studies on the spontaneous neutralization of chitosan acetate films by moisture conditioning. Vibrational Spectroscopy*, 2018. **94**: p. 1-6.
113. Kam, H.M., E. Khor, and L.Y. Lim, *Storage of partially deacetylated chitosan films. Journal of Biomedical Materials Research*, 1999. **48**(6): p. 881-888.
114. K. Wilmshurst, J., *Infrared Investigation of Acetic Acid and Acetic Acid-d Vapors and a Vibrational Assignment for the Monomeric Acids. Vol. 25. 1956. 1171-1173.*
115. Takara, E.A., J. Marchese, and N.A. Ochoa, *NaOH treatment of chitosan films: Impact on macromolecular structure and film properties. Carbohydrate Polymers*, 2015. **132**: p. 25-30.
116. Kumar Pt, S., et al., *Flexible, Micro-Porous Chitosan-Gelatin Hydrogel/Nano Fibrin Composite Bandages for Treating Burn Wounds. Vol. 110. 2014. 65081–65087.*
117. Nunthanid, J., et al., *Physical properties and molecular behavior of chitosan films. Drug Dev Ind Pharm*, 2001. **27**(2): p. 143-57.
118. Neto, C.G.T., et al., *Thermal Analysis of Chitosan Based Networks. Carbohydrate Polymers*, 2005. **62**(2): p. 97-103.
119. Ruini, F., et al., *Chitosan membranes for tissue engineering: comparison of different crosslinkers. Biomed Mater*, 2015. **10**(6): p. 1748-6041.
120. Balau, L., et al., *Physico-chemical properties of Chitosan films. Central European Journal of Chemistry*, 2004. **2**(4): p. 638-647.
121. Ahmad, S., et al., *Preparation and Evaluation of Skin Wound Healing Chitosan-Based Hydrogel Membranes. AAPS PharmSciTech*, 2018. **19**(7): p. 3199-3209.

122. *Silva, J.M., et al., Nanostructured 3D Constructs Based on Chitosan and Chondroitin Sulphate Multilayers for Cartilage Tissue Engineering. Plos One, 2013. 8(2): p. e55451.*
123. *Chen, R., J. Hwang Lin, and M. Huaw Yang, Relationship between the chain flexibilities of chitosan molecules and the physical properties of their casted films. Vol. 24. 1994. 41-46.*
124. *Gocho, H., et al., Effect of polymer chain end on sorption isotherm of water by chitosan. Vol. 41. 2000. 87-90.*
125. *Ruini, F., et al., Chitosan membranes for tissue engineering: comparison of different crosslinkers. Biomedical materials (Bristol, England), 2015. 10(6): p. 065002.*
126. *Radisic, M., et al., Biomimetic approach to cardiac tissue engineering. Philosophical transactions of the Royal Society of London. Series B, Biological sciences, 2007. 362(1484): p. 1357-1368.*
127. *Ferry, J.D., Viscoelastic properties of polymers. 1980, New York: Wiley.*
128. *Wall, S.T., et al., Theoretical impact of the injection of material into the myocardium: a finite element model simulation. Circulation, 2006. 114(24): p. 2627-35.*
129. *Garlotta, D., A Literature Review of Poly(Lactic Acid). Vol. 9. 2001. 63-84.*
130. *Webb, A.R., J. Yang, and G.A. Ameer, Biodegradable polyester elastomers in tissue engineering. Expert Opin Biol Ther, 2004. 4(6): p. 801-12.*
131. *Ramsay, B.A., et al., Biodegradability and mechanical properties of poly-(beta-hydroxybutyrate-co-beta-hydroxyvalerate)-starch blends. Applied and environmental microbiology, 1993. 59(4): p. 1242-1246.*
132. *Pego, A.P., et al., Biodegradable elastomeric scaffolds for soft tissue engineering. J Control Release, 2003. 87(1-3): p. 69-79.*
133. *Pezzin, A.P.T., et al., Poly(para-dioxanone) and poly(L-lactic acid) blends: thermal, mechanical, and morphological properties. Journal of Applied Polymer Science, 2003. 88(12): p. 2744-2755.*
134. *Wang, Y., et al., A tough biodegradable elastomer. Nat Biotechnol, 2002. 20(6): p. 602-6.*
135. *Gao, J., P.M. Crapo, and Y. Wang, Macroporous elastomeric scaffolds with extensive micropores for soft tissue engineering. Tissue Eng, 2006. 12(4): p. 917-25.*
136. *Zainol, I., et al., Enzymatic degradation study of porous chitosan membrane. Vol. 13. 2009. 316-319.*
137. *Kolettis, T., Effects of myocardial alginate injections on ventricular arrhythmias after experimental ischemia-reperfusion. 2014. 28(2), 79-82.*
138. *Kong, H.J., et al., Controlling Degradation of Hydrogels via the Size of Crosslinked Junctions. Advanced Materials, 2004. 16(21): p. 1917-1921.*

139. Strand, A., et al., *Enhanced strength, stiffness and elongation potential of paper by spray addition of polysaccharides. Cellulose*, 2019. **26**(5): p. 3473-3487.
140. Misof, K., et al., *Collagen from the osteogenesis imperfecta mouse model (oim) shows reduced resistance against tensile stress. The Journal of clinical investigation*, 1997. **100**(1): p. 40-45.
141. Roeder, B.A., et al., *Tensile mechanical properties of three-dimensional type I collagen extracellular matrices with varied microstructure. J Biomech Eng*, 2002. **124**(2): p. 214-22.
142. Yin, F.C., et al., *Mechanical properties of myocardium from hypertrophied rat hearts. A comparison between hypertrophy induced by senescence and by aortic banding. Circulation research*, 1980. **46**(2): p. 292-300.
143. Takaoka, H., et al., *Heart size-independent analysis of myocardial function in murine pressure overload hypertrophy. Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 2002. **282**(6).
144. Nakano, K., et al., *Myocardial stiffness derived from end-systolic wall stress and logarithm of reciprocal of wall thickness. Contractility index independent of ventricular size. Circulation*, 1990. **82**(4): p. 1352-61.
145. Watanabe, S., et al., *Myocardial stiffness is an important determinant of the plasma brain natriuretic peptide concentration in patients with both diastolic and systolic heart failure. Eur Heart J*, 2006. **27**(7): p. 832-8.
146. Nuno Cerqueira, N.B., Maria João Ramos and Pedro Alexandrino Fernandes ed. *Glycosidases – A Mechanistic Overview. Carbohydrates - Comprehensive Studies on Glycobiology and Glycotechnology*. 2012, Chuan-Fa Chang, IntechOpen.
147. Wan, Y., et al., *Ionic conductivity and related properties of crosslinked chitosan membranes. Journal of Applied Polymer Science*, 2003. **89**(2): p. 306-317.
148. Camelliti, P., T.K. Borg, and P. Kohl, *Structural and functional characterisation of cardiac fibroblasts. Cardiovascular Research*, 2005. **65**(1): p. 40-51.
149. Balafas, E., et al., *A Low Cost Face Mask for Inhalation Anaesthesia in Rats. Vol. 38*. 2011. 111-115.
150. Papastefanou, A., et al., *A simple method of endotracheal intubation in mice. Archives of Biological Sciences*, 2014. **66**(1): p. 241-244.
151. Fujimoto, K.L., et al., *In vivo evaluation of a porous, elastic, biodegradable patch for reconstructive cardiac procedures. Ann Thorac Surg*, 2007. **83**(2): p. 648-54.
152. Malaise, S., et al., *Bioresorption mechanisms of chitosan physical hydrogels: a scanning electron microscopy study. Mater Sci Eng C Mater Biol Appl*, 2014. **42**: p. 374-84.



153. Suh, J.K. and H.W. Matthew, *Application of chitosan-based polysaccharide biomaterials in cartilage tissue engineering: a review. Biomaterials, 2000. 21(24): p. 2589-98.*
154. Lafantaisie-Favreau, C.-H., et al., *Subchondral pre-solidified chitosan/blood implants elicit reproducible early osteochondral wound-repair responses including neutrophil and stromal cell chemotaxis, bone resorption and repair, enhanced repair tissue integration and delayed matrix deposition. BMC musculoskeletal disorders, 2013. 14: p. 27-27.*
155. Chevrier, A., et al., *Chitosan-glycerol phosphate/blood implants increase cell recruitment, transient vascularization and subchondral bone remodeling in drilled cartilage defects. Osteoarthritis Cartilage, 2007. 15(3): p. 316-27.*
156. Tomihata, K. and Y. Ikada, *In vitro and in vivo degradation of films of chitin and its deacetylated derivatives. Biomaterials, 1997. 18(7): p. 567-75.*
157. Hoemann, C.D., et al., *Scaffold-guided subchondral bone repair: implication of neutrophils and alternatively activated arginase-1+ macrophages. Am J Sports Med, 2010. 38(9): p. 1845-56.*
158. Vunain E., M.A.K., et al. , *Chitosan Based Biomaterials, in Volume 1: Fundamentals. 2017, Woodhead Publishing. p. 226-227.*
159. Liu, X., et al., *Development and analysis of a novel collagen composite encapsulating a natural pharmic amino acid, dencichine. Polymer Composites, 2016. 37(7): p. 2027-2036.*
160. Lui, K., et al., *Modification of the extracellular matrix following myocardial infarction monitored by FTIR spectroscopy. Biochim Biophys Acta, 1996. 1(2): p. 73-7.*
161. Asthana, S., et al., *Evaluation extracellular matrix–chitosan composite films for wound healing application. Journal of Materials Science: Materials in Medicine, 2015. 26(8): p. 220.*
162. Silva, S.S., et al., *Plasma surface modification of chitosan membranes: characterization and preliminary cell response studies. Macromol Biosci, 2008. 8(6): p. 568-76.*
163. Alexey, D., et al., *X-Ray Photoelectron Spectroscopy Reference Data for Identification of the C3N4 Phase in Carbon–Nitrogen Films. Vol. 9. 2000. 1904-1907.*
164. Gervais, M., et al., *Surface studies of polypeptidic block copolymers by electron spectroscopy for chemical analysis: Poly(Nε-trifluoroacetyl-l-lysine)-polysarcosine diblock copolymers. Polymer, 1986. 27(10): p. 1513–1520.*
165. Hassan, M.K., T.A. Elkhooly, and F.M. Reicha, *The Effect of Different Solvents for Chitosan Solubilization on The Crystal Growth of in situ Prepared Hydroxyapatite. Egyptian Journal of Physics, 2017. 45(1): p. 29-38.*

166. Zhou, L., et al., *X-ray photoelectron spectroscopic and Raman analysis of silk fibroin-Cu(II) films*. *Biopolymers*, 2006. **82**(2): p. 144-51.
167. Zhang, J., et al., *Chitosan modification and pharmaceutical/biomedical applications*. *Marine drugs*, 2010. **8**(7): p. 1962-1987.
168. Fen, Y.W., et al., *X-ray photoelectron spectroscopy and atomic force microscopy studies on crosslinked chitosan thin film*. Vol. 6. 2011.
169. Amaral, I.F., P.L. Granja, and M.A. Barbosa, *Chemical modification of chitosan by phosphorylation: an XPS, FT-IR and SEM study*. *J Biomater Sci Polym Ed*, 2005. **16**(12): p. 1575-93.
170. Il'ina, A.V. and V.P. Varlamov, *Hydrolysis of Chitosan in Lactic Acid*. *Applied Biochemistry and Microbiology*, 2004. **40**(3): p. 300-303.
171. Oh, D.X., et al., *Dopamine-Mediated Sclerotization of Regenerated Chitin in Ionic Liquid*. *Materials (Basel, Switzerland)*, 2013. **6**(9): p. 3826-3839.
172. Rezaei, S.M. and Z.A. Mohd Ishak, *Grafting of collagen onto interpenetrating polymer networks of poly(2-hydroxyethyl methacrylate) and poly(dimethyl siloxane) polymer films for biomedical applications*. Vol. 8. 2014. 39-49.
173. Fang, J., et al., *Protein retention on plasma-treated hierarchical nanoscale gold-silver platform*. Vol. 5. 2015. 13379.
174. Biniak, S., et al., *Chemistry and Physics of Carbon*. Vol. 27. 2001. 125-225.
175. Bockstedte, M., et al., *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): p. 187-222.
176. Hartree, D.R., *The Calculations of Atomic Structures*. *Acta Cryst.*, 1957. **11**: p. 376.
177. Hohenberg, P. and W. Kohn, *Inhomogeneous Electron Gas*. *Physical Review*, 1964. **136**(3B): p. B864-B871.
178. Becke, A.D., *Density-functional thermochemistry. III. The role of exact exchange*. *The Journal of Chemical Physics*, 1993. **98**(7): p. 5648-5652.
179. Pople, J.A., et al., *Gaussian-1 theory: A general procedure for prediction of molecular energies*. *The Journal of Chemical Physics*, 1989. **90**(10): p. 5622-5629.
180. Chang, C.W., et al., *Cardiac extracellular matrix proteomics: Challenges, techniques, and clinical implications*. *Proteomics Clin Appl*, 2016. **10**(1): p. 39-50.
181. Παπαϊωάννου, Α.Θ., *Μηχανική των Ρευστών*. 2000, Αθήνα: Εκδόσεις Κοράλι.
182. Cheng, Y., H. Oertel, and T. Schenkel, *Fluid-structure coupled CFD simulation of the left ventricular flow during filling phase*. *Ann Biomed Eng*, 2005. **33**(5): p. 567-76.

183. Taylor, C.A. and M.T. Draney, *EXPERIMENTAL AND COMPUTATIONAL METHODS IN CARDIOVASCULAR FLUID MECHANICS. Annual Review of Fluid Mechanics, 2004. 36(1): p. 197-231.*
184. Wong, K.K., et al., *Cardiac flow analysis applied to phase contrast magnetic resonance imaging of the heart. Ann Biomed Eng, 2009. 37(8): p. 1495-515.*
185. Zheng, X., et al., *Computational modeling and analysis of intracardiac flows in simple models of the left ventricle. European Journal of Mechanics - B/Fluids, 2012. 35: p. 31-39.*
186. Rausch, M.K., et al., *Computational modeling of growth: systemic and pulmonary hypertension in the heart. Biomech Model Mechanobiol, 2011. 10(6): p. 799-811.*
187. Genet, M., et al., *Modeling Pathologies of Diastolic and Systolic Heart Failure. Ann Biomed Eng, 2016. 44(1): p. 112-27.*
188. Zhang, Y., Dunn, M. L., Drexler, E. S., McCowan, C. N., Slifka, A. J., Ivy, D. and S. D., R., *Implementation and Application of a Microstructural Orthotropic Hyperelastic Model of Pulmonary Artery Mechanics under Normotensive and Hypertensive Conditions. Ann. Biomed. Eng, 2005. 33: p. 1042-1052.*
189. Zhang, Y., et al., *Application of a microstructural constitutive model of the pulmonary artery to patient-specific studies: validation and effect of orthotropy. J Biomech Eng, 2007. 129(2): p. 193-201.*
190. Kheyfets, V., et al., *The role of wall shear stress in the assessment of right ventricle hydraulic workload. Pulm Circ, 2015. 5(1): p. 90-100.*
191. Tang, D., et al., *Effect of Patch Mechanical Properties on Right Ventricle Function Using MRI-Based Two-Layer Anisotropic Models of Human Right and Left Ventricles. Comput Model Eng Sci, 2010. 56(2): p. 113-130.*
192. Leonardi, B., et al., *Computational modelling of the right ventricle in repaired tetralogy of Fallot: can it provide insight into patient treatment? Eur Heart J Cardiovasc Imaging, 2013. 14(4): p. 381-6.*
193. <https://www.e-cardio.gr/>.
194. Capps, S.B., R.C. Elkins, and D.M. Fronk, *Body surface area as a predictor of aortic and pulmonary valve diameter. J Thorac Cardiovasc Surg, 2000. 119(5): p. 975-82.*
195. Κατσαρού, Δ., *Εμβιομηχανική προσέγγιση αριστερής κοιλίας [Διπλωματική εργασία]. 2018, Πανεπιστήμιο Ιωαννίνων.*
196. Callister, W.D., *Επιστήμη και Τεχνολογία των Υλικών. 2004, Αθήνα: Εκδόσεις Τζιόλα.*
197. Krittian, S., et al., *Partitioned fluid-solid coupling for cardiovascular blood flow: left-ventricular fluid mechanics. Ann Biomed Eng, 2010. 38(4): p. 1426-41.*

198. Hasaballa, A., et al., *Modeling the Effects of Myocardial Fiber Architecture and Material Properties on the Left Ventricle Mechanics during Rapid Filling Phase*. Vol. 9. 2015. 161-167.
199. Lumens, J., *Patient-Specific Cardiovascular Modeling in Pulmonary Hypertension-Assessment of Hemodynamic and Mechanical Ventricular Interaction [PhD thesis]*. 2010, University of Maastricht.
200. Chen, Q.-Z., et al., *Characterisation of a soft elastomer poly(glycerol sebacate) designed to match the mechanical properties of myocardial tissue*. *Biomaterials*, 2008. **29**(1): p. 47-57.
201. J.S. Temenoff, M.A.G., *Βιοϋλικά: Η διεπαφή μεταξύ της Επιστήμης των Υλικών και της Βιολογίας*, ed. Utopia. 2017.
202. Καραγιαννίδης Γ., Σ.Ε., *Χημεία Πολυμερών*. 2006: Εκδόσεις ΖΗΤΗ.
203. McMurry, J., *Οργανική Χημεία-Τόμος Ι*. Vol. 6η έκδοση. 2007: Πανεπιστημιακές εκδόσεις Κρήτης.
204. Czechowska-Biskup, R., et al., *Determination of degree of deacetylation of chitosan - Comparison of methods*. Vol. 2012. 2012. 5-20.
205. Atkins, P.W., *Φυσικοχημεία Τόμος Ι*. 2011: Πανεπιστημιακές Εκδόσεις Κρήτης
206. Δ. Αναγνωστόπουλος, Δ.Γ., Μ.Α. Καρακασίδης και Δ. Παπαγιάννης, *Εργαστήριο Υλικών Ι : Τεχνικές Χαρακτηρισμού Υλικών*. 2015: Τμήμα Μηχανικών Επιστήμης Υλικών, Πανεπιστήμιο Ιωαννίνων.
207. Tasselli, F., et al., *Mechanical, swelling and adsorptive properties of dry-wet spun chitosan hollow fibers crosslinked with glutaraldehyde*. *Reactive and Functional Polymers*, 2013. **73**(1): p. 218-223.
208. Ratakonda, S., et al., *Assessing viscoelastic properties of chitosan scaffolds and validation with cyclical tests*. *Acta Biomater*, 2012. **8**(4): p. 1566-75.
209. Menard, K., *Dynamic Mechanical Analysis: A Practical Introduction*. 1999 CRC Press LLC.
210. Λάλια-Καντούρη Μ, Λ.Σ., Παπανικολάου Γ. , *Θερμική Ανάλυση: Θεωρία-Οργανολογία-Εφαρμογές*, Ε.Ε.Θ.Α. Εκδόσεις Παρισιανού, Editor. 2006: Αθήνα.
211. Καραμπέλα, Μ., *Σύνθεση και μελέτη ιδιοτήτων οδοντιατρικών νανοσύνθετων υλικών πολυμεθακρυλικής μήτρας [διδακτορική διατριβή]*, in Αριστοτέλειο Πανεπιστήμιο Θεσσαλονίκης. 2010.
212. Kumirska, J., et al., *Application of spectroscopic methods for structural analysis of chitin and chitosan*. *Marine drugs*, 2010. **8**(5): p. 1567-1636.

213. *Ahmed, T.A. and B.M. Aljaeid, Preparation, characterization, and potential application of chitosan, chitosan derivatives, and chitosan metal nanoparticles in pharmaceutical drug delivery. Drug Design, Development and Therapy, 2016. 10: p. 483-507.*



---

## ΒΙΟΓΡΑΦΙΚΟ ΣΗΜΕΙΩΜΑ

---

### Ι. ΣΤΟΙΧΕΙΑ ΒΙΟΓΡΑΦΙΚΟΥ

#### Α. ΑΤΟΜΙΚΑ ΣΤΟΙΧΕΙΑ

Όνομα : Μαρία  
Επώνυμο : Ρουμπή  
Όν. Πατρός : Αθανάσιος  
Όν. Μητρός : Αθανασία  
Χρον. Γεννήσεως : 20/04/1989  
Τόπος Γεννήσεως : Μαρούσι Αττικής  
Οικ. Κατάσταση : Άγαμη

#### Β. ΑΚΑΔΗΜΑΪΚΟΙ ΤΙΤΛΟΙ & ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ

- Δίπλωμα (& Integrated Master) Μηχανικού Επιστήμης Υλικών Πανεπιστημίου Ιωαννίνων, 2013 (βαθμός 8.45, "Λίαν Καλώς").
- Διδακτορική Διατριβή: Τμήμα Μηχανικών Επιστήμης Υλικών Πανεπιστημίου Ιωαννίνων (2014-2019).

*Τίτλος Διδακτορικής Διατριβής:* «Ανάπτυξη εμφυτευμάτων για χρήση στο μυοκάρδιο της δεξιάς κοιλίας μετά από πνευμονική υπέρταση»

*Συμβουλευτική Επιτροπή:* Σ. Αγαθόπουλος (Επιβλέπων Καθηγητής Τ.Μ.Ε.Υ), Θ. Κωλέττης (Καθηγητής Καρδιολογίας Τμήματος Ιατρικής), Δ. Φωκάς (Αναπληρωτής Καθηγητής Τ.Μ.Ε.Υ)

#### Γ. ΣΠΟΥΔΕΣ – ΕΡΕΥΝΗΤΙΚΗ ΔΡΑΣΤΗΡΙΟΤΗΤΑ

1995-2000 : Δημοτικό Σχολείο, Βαθύ Αυλίδας, Εύβοια.

2001-2003 : Γυμνάσιο, Βαθύ Αυλίδας, Εύβοια.

2004-2006 : Λύκειο, Βαθύ Αυλίδας, Εύβοια.

2007-2013 : Πανεπιστημιακές Σπουδές, Τμήμα Μηχανικών Επιστήμης Υλικών, Πανεπιστήμιο Ιωαννίνων.

2014-2019 : Μεταπτυχιακές Σπουδές (Υποψήφια Διδάκτωρ).

Τμήμα Μηχανικών Επιστήμης Υλικών, Εργαστήριο Κεραμικών και Σύνθετων Υλικών, Πολυτεχνική Σχολή, Πανεπιστήμιο Ιωαννίνων.

**Δ. ΜΕΛΟΣ ΕΠΙΣΤΗΜΟΝΙΚΩΝ ΕΤΑΙΡΕΙΩΝ ΚΑΙ ΕΠΙΜΕΛΗΤΗΡΙΩΝ**

1. Ελληνική Εταιρεία Βιοϋλικών (ΕΕΒ) (associated member of the European Society of Biomaterials).
2. Ελληνική Κεραμική Εταιρεία (ΕΚΕ).
3. Μέλος Τεχνικού Επιμελητηρίου Ελλάδας (ΤΕΕ).

**Ε. ΕΠΙΜΟΡΦΩΣΗ**

1. Παρακολούθηση μαθημάτων Διδακτορικών Σπουδών (με Εξετάσεις):
  - Τεχνικές Χαρακτηρισμού Υλικών - Αναλυτικές Τεχνικές (φασματοσκοπικές τεχνικές μικροσκοπίας, θεωρία - εργαστηριακές ασκήσεις).
  - Μηχανική Βιολογικών Ιστών
  - Προχωρημένα Θέματα Βιοϊατρικής Τεχνολογίας.
  - Προηγμένα υλικά-Τεχνολογία σε Μικρο- και Νανο-διαστάσεις.
  - Καταλυτικά και Μοριακά Υλικά - Διεργασίες.
2. Training school “Non living Materials meet living Biology”, 9-12 May 2017, Patras, Greece.
3. Certification on Laboratory Animal Science European Union Functions Course, Felasa Category A,B,C,D (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, October 2018) (με Εξετάσεις).

**ΣΤ. ΣΥΜΜΕΤΟΧΗ ΣΕ ΕΡΕΥΝΗΤΙΚΑ ΕΡΓΑ**

1. «Επίδραση βιολογικού ικρίωματος και αυξητικής ορμόνης στην αναδιαμόρφωση της αριστεράς κοιλίας μετά από έμφραγμα του μυοκαρδίου σε επίμυες». Το έργο διεξήχθη σε συνεργασία του Τμήματος Μηχανικών Επιστήμης Υλικών με το Πειραματικό Κέντρο του Πανεπιστημιακού Γενικού Νοσοκομείου Ιωαννίνων και του Ερευνητικού - Πειραματικού Κέντρου της ΕΛΠΕΝ. (Φεβρ.2014 – Οκτ.2014).
2. «Μελέτη ερεθισματοαγωγού συστήματος καρδιάς ομάδας επίμυων με μη ελεγχόμενη επιληψία και ομάδας ελέγχου». Το έργο διεξήχθη στις εγκαταστάσεις του Κέντρου Πειραματοζώων του Πανεπιστημιακού Νοσοκομείου Ιωαννίνων. (Αυγ.2014 – Δεκ.2014).



3. «Επίδραση των αυξητικών παραγόντων και βιολογικών ικριωμάτων στο μυοκάρδιο της δεξιάς κοιλίας σε πρότυπο πνευμονικής υπέρτασης σε επίμυες». Το έργο διεξήχθη σε συνεργασία του Τμήματος Μηχανικών Επιστήμης Υλικών με το Ερευνητικό- Πειραματικό Κέντρο της ΕΛΠΕΝ. (Οκτ.2014 – Οκτ.2016).
4. «Επίδραση βιολογικού ικριώματος και αυξητικής ορμόνης στην αναδιαμόρφωση της αριστεράς κοιλίας μετά από έμφραγμα του μυοκαρδίου σε επίμυες». Το έργο διεξήχθη στο πειραματικό εργαστήριο του Ερευνητικού Καρδιαγγειακού Ινστιτούτου, στα πλαίσια του προγράμματος υποτροφιών του Ερευνητικού Κέντρου της Φαρμακοβιομηχανίας ΕΛΠΕΝ. (2012-2016).

#### **Z. ΥΠΟΤΡΟΦΙΕΣ - ΒΡΑΒΕΥΣΕΙΣ**

1. Υποτροφία για υποψήφιους Διδάκτορες από το Ίδρυμα Κρατικών Υποτροφιών για το ακαδημαϊκό έτος 2017/2018.
2. Επίσης, έχουν απονεμηθεί
  - η υποτροφία «Δημήτρη Καρασούλη 2013» για τη μεγαλύτερη βαθμολογία Διπλώματος στην ορκωμοσία του Ιουνίου του ακαδημαϊκού έτους 2012-2013, και
  - η υποτροφία για υποψήφιους Διδάκτορες από το Ίδρυμα Ωνάση για το ακαδημαϊκό έτος 2017/2018 (την οποία δεν αποδέχτηκε).

#### **H. ΕΠΙΣΤΗΜΟΝΙΚΕΣ ΔΡΑΣΤΗΡΙΟΤΗΤΕΣ**

1. Πρακτική Άσκηση στα πλαίσια του προγράμματος Πρακτικής Άσκησης του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων: Ελληνική Εταιρία Κεραμικών και Πυρίμαχων Υλικών (τέως ΕΚΕΠΥ, τώρα ΕΒΕΤΑΜ), Θήβα, Βοιωτία, (<http://www.cereco.gr>), Ιούλιος - Σεπτέμβριος 2011 (2 μήνες).
2. Πρακτική Άσκηση στα πλαίσια Υποτροφίας Πρακτικής Άσκησης (placement) Erasmus (κοινοτικό πρόγραμμα Δια Βίου Μάθησης, LLP/ERASMUS) του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων: Ερευνητικό Εργαστήριο Επιφανειών και Λεπτών Υμενίων του Ινστιτούτου Προηγμένων Υλικών Zernike, Τμήματος Μαθηματικών και Φυσικών Επιστημών, Πανεπιστήμιο Groningen, Ολλανδία (<http://www.rug.nl/research/surfaces-thin-films/>), υπό τη Διευθύντρια

Καθηγήτρια Δρ. Petra Rudolf (Βραβείο Καρτέσιος 2007), 1 Νοεμβρίου 2012 - 31 Μαρτίου 2013 (5 μήνες).

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

1. Εργαστήρια μαθήματος «Γενική Ανόργανη Χημεία» (Ακαδ. Έτ. 2014 - 2016).
2. Εργαστήρια μαθήματος «Φυσικοχημεία» (Ακαδ. Έτ. 2014-2017).
3. Εργαστήρια Μαθήματος «Υλικά Ι: Κεραμικά και Σύνθετα Υλικά» (Ακαδ. Έτ. 2014-2016).
4. Επίβλεψη 2 Διπλωματικών Εργασιών (Ι. Τασιούλα, Δ. Κατσαρού).

## III. ΕΡΕΥΝΗΤΙΚΟ ΕΡΓΟ

### A. ΔΗΜΟΣΙΕΥΣΕΙΣ ΣΕ ΕΠΙΣΤΗΜΟΝΙΚΑ ΠΕΡΙΟΔΙΚΑ ΜΕ ΚΡΙΤΕΣ

1. V. Maltabe, E. Barka, M. Kontonika, D. Florou, M. Kouvara-Pritsouli, **M. Roumpi**, S. Agathopoulos, Th. M. Kolettis, P. Kouklis, *Isolation of an ES-derived cardiovascular multipotent cell population based on VE-cadherin promoter activity*. Stem Cells Int, (2016), 8305624(10):22.
2. M. Kontonika, E. Barka, **M. Roumpi**, A. D Vilaeti, G. G. Baltogiannis, A. P. Vlahos, S. Agathopoulos, Th. M. Kolettis, *Intra-myocardial growth hormone administration ameliorates arrhythmogenesis during ischemia-reperfusion in rats*. Journal of Electrocardiology, (2017), 50(2):207-210
3. M. Kontonika, E. Barka, **M. Roumpi**, V. La Rocca, P. Lekkas, E. P. Daskalopoulos, A. D. Vilaeti, G. G. Baltogiannis, A. P. Vlahos, S. Agathopoulos, Th. M. Kolettis, *Prolonged intra-myocardial growth hormone administration ameliorates post-infarction electrophysiologic remodeling in rats*. Growth Factors, (2017), 6:1-11
4. Th. M. Kolettis, E. Bagli, E. Barka, D. Kouroupis, M. Kontonika, A. D. Vilaeti, M. Markou, **M. Roumpi**, V. A. Maltabe, V. La Rocca, S. Agathopoulos, Th. Fotsis, *Medium-term electrophysiologic effects of a cellularized-scaffold implanted in rats after myocardial infarction*. Cureus, (2018), 10(7): e2959. DOI 10.7759/cureus.2959.

**B. ΠΑΡΟΥΣΙΑΣΕΙΣ ΣΕ ΕΠΙΣΤΗΜΟΝΙΚΑ ΣΥΝΕΔΡΙΑ**

1. Γ. Πότση, **M. Ρουμπή**, Κ. Σπύρου, Μ. Μπαϊκούση, Δ. Μοσχόβας, Α. Αυγερόπουλος, P. Rudolf, Δ. Γουρνής, *Εφαρμογή υβριδικών νανοδομών τιτανίας για την ανάπτυξη καινοτόμων νανοσύνθετων πολυμερών*, 6<sup>ο</sup> Πανελλήνιο Συμπόσιο Πορωδών Υλικών, 9-10/09/2013, Καβάλα.
2. K. Giaka, E. Barka, C. Tourmousoglou, **M. Roumpi**, D. Chatzistefanidis, T. M. Kolettis, S. Markoula, *Chronic prolongation of QT and RR intervals in an animal epilepsy model*, 11<sup>th</sup> European Congress on Epileptology, 29/6/2014-3/7/2014, Stocholm, Sweden.
3. Ε. Μπάρκα, Μ. Κοντονίκα, Α. Βιλαέτη, **M. Ρουμπή**, Κ. Γκιάκα, Α. Παπαλόης, Θ. Κωλέττης, Σ. Αγαθόπουλος, *Ανάπτυξη βιοδιασπώμενου ικριώματος με βάση το αλγινικό οξύ και μελέτη της επίδρασής του στις κοιλιακές αρρυθμίες έπειτα από πειραματική ισχαιμία – επαναιμάτωση μυοκαρδίου*, 6<sup>ο</sup> Πανελλήνιο Συνέδριο Ελληνικής Εταιρείας Εμβιομηχανικής (ΕΛΕΜΒΙΟ), 10-12/10/2014, Πάτρα.
4. **M. Ρουμπή**, Ε. Μπάρκα, Α. Βλάχος, Α. Παπαλόης, Θ. Κωλέττης, Σ. Αγαθόπουλος, *Πνευμονική Υπέρταση: Στρατηγική αντιμετώπισής της με βιοϋλικά*, 10<sup>η</sup> Επετειακή Εκδήλωση της Ελληνικής Εταιρείας Βιοϋλικών, 26-28/11/2015, Αθήνα.
5. Μ. Τζόκα, Ε. Μπάρκα, **M. 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<sup>ο</sup> Πανελλήνιο Συνέδριο Εμβιομηχανικής, 24-26/06/2016, Νοσοκομείο Υγεία, Αθήνα.
6. Ε. Μπάρκα, Α. Βιλαέτη, Μ. Κοντονίκα, Ε. Μπαγκλή, Δ. Κουρούπης, Β. Μαλταμπέ, **M. Ρουμπή**, Α. Παπαλόης, Π. Κούκλης, Θ. Φώτσης, Θ. Κωλέττης, Σ. Αγαθόπουλος, *Νέο καινοτόμο βιοϋλικό της ιστοτεχνολογίας με βάση το υδροπήκτωμα αλγινικού για εφαρμογή στο μυοκάρδιο μετά από οξύ έμφραγμα*, 7<sup>ο</sup> Πανελλήνιο Συνέδριο Εμβιομηχανικής, 24-26/06/2016, Νοσοκομείο Υγεία, Αθήνα.
7. Γ. Παπατόλιος, Κ. Ψαρράς, Δ. Γιαννής, Β. Ντούρος, Γ. Γερόπουλος, Θ. Ε. Παυλίδης, Μ. Τζόκα, Ε. Μπάρκα, **M. Ρουμπή**, Σ. Αγαθόπουλος, *Διαφυγή αναστομώσεων παχέος εντέρου: Μείζων πρόκληση της χειρουργικής και στρατηγικές σχεδιασμού ενισχυτικών βιομεμβρανών*, 7<sup>ο</sup> Πανελλήνιο Συνέδριο Εμβιομηχανικής, 24-26/06/2016, Νοσοκομείο Υγεία, Αθήνα.

8. Β. Ντούρος, Κ. Ψαρράς, Γ. Παπατόλιος, Δ. Γιαννής, Γ. Γερόπουλος, Θ. Ε. Παυλίδης, Μ. Τζόκα, Ε. Μπάρκα, **Μ. Ρουμπή**, Σ. Αγαθόπουλος, *Ενδοπεριτοναϊκές συμφύσεις: Συχνότατο πρόβλημα της χειρουργικής και επιτακτική ανάγκη επινόησης δραστικών αντισυμφυτικών υλικών*, 7<sup>ο</sup> Πανελλήνιο Συνέδριο Εμβιομηχανικής, 24-26/06/2016, Νοσοκομείο Υγεία, Αθήνα.
9. Μ. 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 and in vivo performance*, 28<sup>th</sup> Annual Meeting of the International Society for Ceramics in Medicine (Bioceramics 28), 18-21/10/2016, Charlotte, NC USA.
10. V 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<sup>ο</sup> Πανελλήνιο Συνέδριο Ελληνικής Εταιρείας Βιοχημείας και Μοριακής Βιολογίας (EEBMB), 25-27/11/2016, Ιωάννινα.
11. E. Barka, M. Kontonika, E. Bagli, D. Kouroupis, M. Markou, A. Vilaeti, **M. Roumpi**, D. Papayannis, Th. Fotsis, Th. Kolettis, S. Agathopoulos, *Tissue-engineering alginate scaffolds ameliorates post-myocardial infarction electrophysiologic remodeling*, Euromat-2017, 17-22/09/2017, Thessaloniki, Greece.
12. **M. Roumpi**, M. Karabela, S. Agathopoulos, *Development and physicochemical characterization of implants for cardiac repair*, 12<sup>th</sup> Hellenic Polymer Society International Conference, 30/09-3/10/2018, Ioannina, Greece.
13. **Μ. Ρουμπή**, Μ. Καράμπελα, Π. Λέκκας, Θ. Κωλέττης, Σ. Αγαθόπουλος, *Ανάπτυξη και χαρακτηρισμός μεμβρανών χιτοζάνης για τη μηχανική υποστήριξη του μυοκαρδίου μετά από πνευμονική υπέρταση*, 11<sup>ο</sup> Συνέδριο Ελληνικής Εταιρείας Βιοϋλικών, 23-24/11/2018, Αθήνα.

## Γ. ΠΑΡΑΚΟΛΟΥΘΗΣΗ ΣΥΝΕΔΡΙΩΝ & ΣΕΜΙΝΑΡΙΩΝ

1. Ημερίδα «Συνδυασμός μεταλλικών και κεραμικών υλικών σε τεχνολογικές εφαρμογές», 3/4/2009, Επιστημονικό και Τεχνολογικό Πάρκο Ηπείρου, Ιωάννινα.

2. 4<sup>ο</sup> Πανελλήνιο Συνέδριο της Ελληνικής Εταιρείας Εμβιομηχανικής (ΕΛΕΜΒΙΟ), 4-6 Ιουνίου, 2010, Ιωάννινα.
3. 8η διημερίδα Ελληνικής Εταιρείας Βιοϋλικών (Ε.Ε.Β.), 15-16 Νοεμβρίου, 2013, Αθήνα.
4. 6<sup>ο</sup> Πανελλήνιο Συνέδριο της Ελληνικής Κεραμικής Εταιρείας (Ε.Κ.Ε.), 3-4 Απριλίου, 2014, Αθήνα.
5. 6<sup>ο</sup> Πανελλήνιο Συνέδριο Ελληνικής Εταιρείας Εμβιομηχανικής (ΕΛΕΜΒΙΟ), 10-12 Οκτωβρίου 2014, Πάτρα.
6. 10<sup>η</sup> Επετειακή Εκδήλωση της Ελληνικής Εταιρείας Βιοϋλικών, 26-28 Νοεμβρίου 2015, Αθήνα.
7. 6<sup>ο</sup> Πανελλήνιο Συνέδριο Μεταλλικών Υλικών, 7-9 Δεκεμβρίου 2016, Ιωάννινα.
8. Training school “Non living Materials meet living Biology”, 9-12 May 2017, Patras, Greece.
9. 28<sup>th</sup> European Conference on Biomaterials, 4-8 September 2017, Athens, Greece
10. Certification on Laboratory Animal Science European Union Functions Course (Felasa Functions A,B,C,D), LAS Course as stated in articles 23 of the Directive 2010/63/EU, according to European Felasa Directions, on experimental animals (Mice & Rats), KAT Hospital, Athens, October 2018.

#### **Δ. ΕΠΙΣΚΕΨΕΙΣ ΣΕ ΕΡΕΥΝΗΤΙΚΑ ΚΕΝΤΡΑ ΚΑΙ ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΑ**

1. Ερευνητικό-Πειραματικό Κέντρο της Φαρμακευτικής Βιομηχανίας ΕΛΠΕΝ για τη διεξαγωγή των εμφυτεύσεων.
2. Πειραματικό Κέντρο, Πανεπιστημιακό Γενικό Νοσοκομείο Ιωαννίνων.
3. Εργαστήριο Ανατομίας, Ιατρική Σχολή, Πανεπιστήμιο Ιωαννίνων.
4. Εργαστήριο Βιολογίας, Ιατρική Σχολή, Πανεπιστήμιο Ιωαννίνων.
5. Εργαστήριο Μυοσκελετικών Παθήσεων, Νοσοκομείο ΚΑΤ (Αθήνα) κατά τη διεξαγωγή του LAS EU Functions Course.

#### **Ε. ΕΘΕΛΟΝΤΙΚΕΣ ΣΥΜΜΕΤΟΧΕΣ**

1. 28<sup>th</sup> European Conference on Biomaterials, 4 – 8 September 2017, Athens, Greece.

