



**ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΙΩΑΝΝΙΝΩΝ  
ΙΑΤΡΙΚΗ ΣΧΟΛΗ**

**ΛΕΙΤΟΥΡΓΙΚΟΣ -ΚΛΙΝΙΚΟΕΡΓΑΣΤΗΡΙΑΚΟΣ ΤΟΜΕΑΣ  
ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΦΥΣΙΟΛΟΓΙΑΣ**

Διευθυντής: Καθηγητής Άγγελος Ευαγγέλου

**ΕΠΙΔΡΑΣΗ ΠΑΛΜΙΚΩΝ ΗΛΕΚΤΡΟΜΑΓΝΗΤΙΚΩΝ ΚΥΜΑΤΩΝ  
ΣΤΙΣ ΔΙΑΔΙΚΑΣΙΕΣ ΕΠΟΥΛΩΣΗΣ ΔΕΡΜΑΤΟΣ**

**ΑΘΑΝΑΣΙΟΥ Α. ΑΘΑΝΑΣΙΟΥ**

Ιατρός

**Δ Ι Δ Α Κ Τ Ο Ρ Ι Κ Η Δ Ι Α Τ Ρ Ι Β Η**

**ΙΩΑΝΝΙΝΑ 2006**



ΒΙΒΛΙΟΘΗΚΗ  
ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟΥ ΙΩΑΝΝΙΝΩΝ



026000200282



"Η έγκριση της διδακτορικής διατριβής από την Ιατρική Σχολή του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων δεν υποδηλώνει αποδοχή των γνωμών του συγγραφέα (Ν. 5343/32, άρθρο 202, παράγραφος 2, περί της νομικής κατοχύρωσης του Ιατρικού Τμήματος)."



Ημερομηνία αίτησης: 15-11-2001

**Ημερομηνία ορισμού Τριμελούς Συμβουλευτικής Επιτροπής: 458<sup>α</sup>/22-1-2002**

Μέλη Τριμελούς Συμβουλευτικής Επιτροπής:

Επιβλέπων

Ευαγγέλου Άγγελος Καθηγητής Φυσιολογίας

Μέλη

Χατζής Ιωάννης, Καθηγητής Δερματολογίας

Μπασιούκας Κωνσταντίνος, Επίκουρος Καθηγητής Δερματολογίας

**Ημερομηνία Ανασυγκρότησης Τριμελούς Συμβουλευτικής Επιτροπής: 532<sup>α</sup>/4-5-2004**

Μέλη Τριμελούς Συμβουλευτικής Επιτροπής

Επιβλέπων

Ευαγγέλου Άγγελος Καθηγητής Φυσιολογίας

Μέλη

Χατζής Ιωάννης, Καθηγητής Δερματολογίας

Μπατιστάτου Άννα, Επίκουρη Καθηγήτρια Παθολογικής Ανατομίας

**Ημερομηνία Ανασυγκρότησης Τριμελούς Συμβουλευτικής Επιτροπής: 560<sup>α</sup>/21-6-2005**

Μέλη Τριμελούς Συμβουλευτικής Επιτροπής

Επιβλέπων

Ευαγγέλου Άγγελος Καθηγητής Φυσιολογίας

Μέλη

Λυκούδης Ευστάθιος, Επίκουρος Καθηγητής Πλαστικής Χειρουργικής

Μπατιστάτου Άννα, Επίκουρη Καθηγήτρια Παθολογικής Ανατομίας

Ημερομηνία ορισμού θέματος: 30-01-2002

Ημερομηνία κατάθεσης διατριβής: 19-10-2006



**ΠΡΟΕΔΡΟΣ ΤΗΣ ΙΑΤΡΙΚΗΣ ΣΧΟΛΗΣ**

Επαμεινώνδας Τσιάνος, Καθηγητής Παθολογίας

**ΕΠΤΑΜΕΛΗΣ ΕΞΕΤΑΣΤΙΚΗ ΕΠΙΤΡΟΠΗ**

|                               |   |
|-------------------------------|---|
| <b>Ευαγγέλου Άγγελος,</b>     | Καθηγητής Φυσιολογίας, Ιατρικής Σχολής<br>Πανεπιστημίου Ιωαννίνων <i>Επιβλέπων</i>        |
| <b>Μπερής Αλέξανδρος,</b>     | Καθηγητής Ορθοπαιδικής, Ιατρικής Σχολής<br>Πανεπιστημίου Ιωαννίνων                        |
| <b>Παπαδόπουλος Γεώργιος,</b> | Καθηγητής Αναισθησιολογίας Ιατρικής Σχολής<br>Πανεπιστημίου Ιωαννίνων                     |
| <b>Στεφάνου Δημήτριος,</b>    | Αναπληρωτής Καθηγητής Παθολογικής Ανατομίας,<br>Ιατρικής Σχολής Πανεπιστημίου Ιωαννίνων   |
| <b>Μπατιστάτου Άννα,</b>      | Αναπληρώτρια Καθηγήτρια Παθολογικής Ανατομίας,<br>Ιατρικής Σχολής Πανεπιστημίου Ιωαννίνων |
| <b>Λυκούδης Ευστάθιος,</b>    | Επίκουρος Καθηγητής Πλαστικής Χειρουργικής<br>Ιατρικής Σχολής Πανεπιστημίου Ιωαννίνων     |
| <b>Καρκαμπούνας Σπυρίδων,</b> | Λέκτορας Φυσιολογίας Ιατρικής Σχολής Πανεπιστημίου<br>Ιωαννίνων                           |

**Η Διδακτορική Διατριβή εγκρίθηκε με το βαθμό : «ΑΡΙΣΤΑ»**

**Η Γραμματέας της Σχολής**

**Ευαγγελία Τσαγγαλά**



## ΠΡΟΛΟΓΟΣ

Τα τραύματα αποτελούν ένα σημαντικό ιατρικό πρόβλημα, το οποίο παίρνει μεγάλες διαστάσεις τόσο στον τομέα της υγείας όσο και στον ευρύτερο κοινωνικό τομέα. Ο πόνος, η ταλαιπωρία, η ανησυχία, η αλλαγή σωματικού ειδώλου και η έλλειψη ποιότητας ζωής κατά τα ανάλογα χρονικά διαστήματα, είναι προβλήματα που βιώνουν οι ασθενείς με τραύματα.

Η φροντίδα για το τραύμα, για τη γενική κατάσταση του ασθενούς, η επιλογή του κατάλληλου θεραπευτικού μέσου ανάλογα με το είδος του τραύματος, και η συνεργασία ασθενών και ιατρών κατέχουν θέσεις κλειδιά όσον αφορά την θεραπεία κάθε περιστατικού.

Στα πλαίσια του ιατρικού έργου, η θεραπεία και ανακούφιση των ασθενών, η συμμετοχή στον κοινωνικό προβληματισμό όσον αφορά την θεραπεία τους και η αναζήτηση νέων θεραπευτικών μέσων αποτέλεσαν τα ερεθίσματα για την εκπόνηση της παρούσας εργασίας.

Η παρούσα εργασία αποτελείται από το Γενικό και το Ειδικό Μέρος. Το Γενικό μέρος περιλαμβάνει γενικές αρχές για την επούλωση των τραυμάτων και την ηλεκτρομαγνητική ακτινοβολία.

Ενώ το ειδικό μέρος διαπραγματεύεται το σκοπό, τη μεθοδολογία που χρησιμοποιήθηκε, τα αποτελέσματα της μελέτης, τη στατιστική ανάλυση των αποτελεσμάτων, τη συζήτηση και τα συμπεράσματα στα οποία οδηγεί η παρούσα πειραματική εργασία.



Τις ευχαριστίες μου εκφράζω σε όλους όσους με βοήθησαν στην εκπόνηση αυτής της Διδακτορικής Διατριβής. Ιδιαίτερα θα ήθελα να ευχαριστήσω τον Καθηγητή Φυσιολογίας κ. Ευαγγέλου Άγγελο ο οποίος πρόθυμα αποδέχτηκε το θέμα της διατριβή αυτής και με βοήθησε με γόνιμους προβληματισμούς και σημαντικές υποδείξεις καθόλην την διάρκεια της εργασίας μου. Ένα μεγάλο ευχαριστώ οφείλω επίσης στην κ Άννα Μπατιστάτου Επίκουρη Καθηγήτρια Παθολογικής Ανατομικής για τις πολύτιμες επιστημονικές πληροφορίες στην ανάλυση των αποτελεσμάτων, καθώς και το κουράγιο που μου έδινε για την ολοκλήρωση της διατριβής αυτής. Ευχαριστώ επίσης τον Σπύρο Καρκαμπούνα Λέκτορα Φυσιολογίας που μοιράστηκε μαζί μου τις γνώσεις του για τον χειρισμό των πειραματόζων καθώς και την παραχώρηση του πειραματικού εργαστηρίου της φυσιολογίας. Επίσης ένα μεγάλο ευχαριστώ οφείλω στον Επίκουρο Καθηγητή Πλαστικής και Επανορθωτικής Χειρουργικής κ Ευστάθιο Λυκούδη για την υπομονή του καθώς και την επιμονή του στην δόμηση της διατριβής και την σωστή ανάλυση και παράθεση των αποτελεσμάτων αυτής.

Τέλος θα πρέπει να αναφερθώ και να ευχαριστήσω όλους όσους ποικιλότροπα και από διάφορες θέσεις βοήθησαν στην ολοκλήρωση των πειραμάτων. Τον Παναγιώτη Λέκκα για την φροντίδα των πειραματόζων. Τον Αντώνη Αυδίκο για την κατασκευή ειδικού κλωβού για μεταφορά και ακτινοβολήση των ζώων. Την Αφροδίτη Κατσαράκη για την στατιστική επεξεργασία των αποτελεσμάτων της εργασίας. Καθώς και όλους όσους συντέλεσαν στην παρουσίαση της Διατριβής στην σημερινή της τελική μορφή.



# ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

|          |   |
|----------|---|
| Εισαγωγή | 1 |
|----------|---|

## ΓΕΝΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

### 1 ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1<sup>ο</sup>

#### ΕΠΟΥΛΩΣΗ ΤΡΑΥΜΑΤΟΣ

|     |  |    |
|-----|--|----|
| 1.1 | Μοριακοί βιολογικοί μηχανισμοί της επούλωσης.....  | 5  |
| 1.2 | Αιμόσταση και επαγωγή της απάντησης της οξείας φλεγμονής στην αρχική βλάβη.....                      | 6  |
| 1.3 | Αναγέννηση και πολλαπλασιασμός των παρεγχυματικών κυττάρων όσο και εκείνων του συνδετικού ιστού..... | 10 |
| 1.4 | Μοριακά φαινόμενα κατά την αύξηση του κυττάρου-κυτταρικός κύκλος.....                                | 10 |

### 2 ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2<sup>ο</sup>

#### ΑΥΞΗΤΙΚΟΙ ΠΑΡΑΓΟΝΤΕΣ

|     |  |    |
|-----|--|----|
| 2.1 | Επιδερμικός αυξητικός παράγων-EGF (epidermal growth factor)                                    | 15 |
| 2.2 | Αυξητικός παράγων που προέρχεται από τα αιμοπετάλια-PDGF (platelet derived growth factor)..... | 15 |
| 2.3 | Αυξητικός παράγοντας των ινοβλαστών-FGF (fibroblast-growth-factor).....                        | 16 |
| 2.4 | Μετατρεπτικός αυξητικός παράγων  |    |





|     |                                       |    |
|-----|---------------------------------------|----|
| 5.6 | Ανωμαλίες επούλωσης.....              | 36 |
| 5.7 | Ιστολογικές διαφορές.....             | 37 |
| 5.8 | Αντιμετώπιση ανωμαλιών επούλωσης..... | 38 |

## 6 ΚΕΦΑΛΑΙΟ 6<sup>ο</sup>

### ΗΛΕΚΤΡΟΜΑΓΝΗΤΙΚΑ ΠΕΔΙΑ

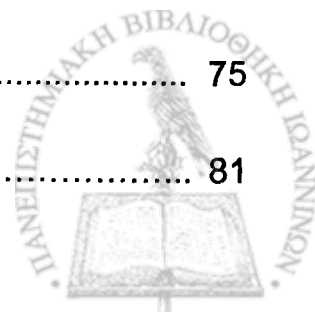
|     |   |    |
|-----|---|----|
| 6.1 | Είδη ηλεκτρομαγνητικών πεδίων.....                  | 40 |
| 6.2 | Ενέργεια ηλεκτρομαγνητικών πεδίων.....              | 45 |
| 6.3 | Ηλεκτρομαγνητικό φάσμα.....                         | 46 |
| 6.4 | Ηλεκτρομαγνητικά πεδία και κυτταρική μεμβράνη.....  | 48 |
| 6.5 | Μηχανισμός δράσης.....                              | 50 |
| 6.6 | Βιολογικές επιδράσεις ηλεκτρομαγνητικών πεδίων..... | 52 |

## ΕΙΔΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

## 7 ΚΕΦΑΛΑΙΟ 7<sup>ο</sup>

### ΣΚΟΠΟΣ ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΗΣ ΔΙΑΔΙΚΑΣΙΑΣ

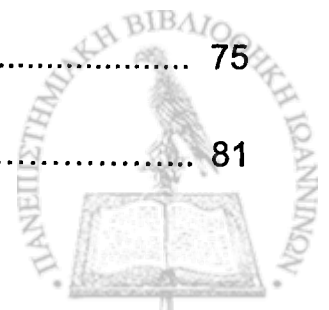
|       |                          |    |
|-------|--------------------------|----|
| 7.1.  | Υλικά και μέθοδοι.....   | 57 |
| 7.1.1 | Συσκευή P.A.P.I.M.I..... | 57 |
| 7.1.2 | Πλανίμετρο.....          | 59 |
| 7.2   | Μεθοδολογία.....         | 60 |
| 7.2.1 | Πιλοτικές μελέτες.....   | 60 |
| 7.3   | Αποτελέσματα.....        | 66 |
| 7.4   | Συζήτηση.....            | 75 |
| 7.4   | Συμπεράσματα.....        | 81 |



|          |   |    |
|----------|---|----|
|          | TGF-β (transforming growth factor-β) .....  | 16 |
| 2.5      | Αυξητικός παράγοντας αγγειακού ενδοθηλίου VEGF<br>(vascular endothelial growth factor)..... | 16 |
| 2.6      | Κυτοκίνες (cytokines).....  | 16 |
| 2.7      | Ανασταλτικοί αυξητικοί παράγοντες.....  | 17 |
| <b>3</b> | <b>ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3<sup>ο</sup></b>   |    |
|          | <b>ΣΥΝΘΕΣΗ ΤΩΝ ΠΡΩΤΕΪΝΩΝ ΤΗΣ ΕΞΩΚΥΤΤΑΡΙΑΣ ΟΥΣΙΑΣ</b>  |    |
| 3.1      | Κολλαγόνο .....   | 19 |
| 3.2      | Γλυκοπρωτεΐνες.....   | 24 |
| 3.3      | Πρωτεογλυκάνες.....   | 24 |
| <b>4</b> | <b>ΚΕΦΑΛΑΙΟ 4<sup>ο</sup></b>   |    |
|          | <b>ΔΙΕΡΓΑΣΙΕΣ ΕΠΟΥΛΩΣΗΣ</b>   |    |
| 4.1      | Αγγειογένεση .....  | 26 |
| 3.4      | Ίνωση .....   | 27 |
| 3.5      | Αναδιαμόρφωση της ουλής .....   | 27 |
| <b>5</b> | <b>ΚΕΦΑΛΑΙΟ 5<sup>ο</sup></b>   |    |
|          | <b>ΣΤΑΔΙΑ ΕΠΟΥΛΩΣΗΣ</b>   |    |
| 5.1      | Επούλωση κατά πρώτο σκοπό .....   | 30 |
| 5.2      | Επούλωση κατά δεύτερο σκοπό.....  | 33 |
| 5.3      | Επούλωση κατά τρίτο σκοπό .....   | 33 |
| 5.4      | Επούλωση τραυμάτων μερικού πάχους.....  | 34 |
| 5.5      | Ανθεκτικότητα τραύματος .....   | 34 |



|       |  |    |
|-------|--|----|
| 5.6   | Ανωμαλίες επούλωσης .....                            | 36 |
| 5.7   | Ιστολογικές διαφορές .....                           | 37 |
| 5.8   | Αντιμετώπιση ανωμαλιών επούλωσης .....               | 38 |
| 6     | <b>ΚΕΦΑΛΑΙΟ 6<sup>ο</sup></b>                        |    |
|       | <b>ΗΛΕΚΤΡΟΜΑΓΝΗΤΙΚΑ ΠΕΔΙΑ</b>                        |    |
| 6.1   | Είδη ηλεκτρομαγνητικών πεδίων .....                  | 40 |
| 6.2   | Ενέργεια ηλεκτρομαγνητικών πεδίων .....              | 45 |
| 6.3   | Ηλεκτρομαγνητικό φάσμα .....                         | 46 |
| 6.4   | Ηλεκτρομαγνητικά πεδία και κυτταρική μεμβράνη .....  | 48 |
| 6.5   | Μηχανισμός δράσης .....                              | 50 |
| 6.6   | Βιολογικές επιδράσεις ηλεκτρομαγνητικών πεδίων ..... | 52 |
|       | <b>ΕΙΔΙΚΟ ΜΕΡΟΣ</b>                                  |    |
| 7     | <b>ΚΕΦΑΛΑΙΟ 7<sup>ο</sup></b>                        |    |
|       | <b>ΣΚΟΠΟΣ ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΗΣ ΔΙΑΔΙΚΑΣΙΑΣ</b>               |    |
| 7.1.  | Υλικά και μέθοδοι.....                               | 57 |
| 7.1.1 | Συσκευή P.A.P.I.M.I.....                             | 57 |
| 7.1.2 | Πλανίμετρο .....                                     | 59 |
| 7.2   | Μεθοδολογία .....                                    | 60 |
| 7.2.1 | Πιλοτικές μελέτες .....                              | 60 |
| 7.3   | Αποτελέσματα .....                                   | 66 |
| 7.4   | Συζήτηση .....                                       | 75 |
| 7.4   | Συμπεράσματα .....                                   | 81 |



## ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Summary ..... 83

Βιβλιογραφία..... 86



## ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Η προσπάθεια επούλωσης των τραυμάτων εμφανίζεται από αρχαιοτάτων χρόνων, όπου φύλλα και αγκάθια ήταν η πρώτη θεραπευτική αγωγή γι' αυτά. Τα αγκάθια του δένδρου της ακακίας ήταν το πρώτο μέσο συρραφής τραυμάτων.<sup>(1)</sup>

Το 2250 π.Χ., στην Βαβυλώνα χρησιμοποιούσαν σησαμέλαιο στη θεραπεία των τραυμάτων και με αυτό τον τρόπο εμπόδιζαν την ανάπτυξη σταφυλόκοκκου.<sup>(2)</sup>

Το 2000 π.Χ., οι Αιγύπτιοι τοποθετούσαν στα τραύματα μίγμα από μέλι και λίπος ή ζάχαρη. Η ωσμωτική δράση αυτών των προϊόντων συντελούσε στην καταστροφή των βακτηριδίων.<sup>(3)</sup>

Το 460-370 π.Χ., ο Ιπποκράτης δίνει έμφαση στον καθαρισμό των τραυμάτων και ιδιαίτερα στο πλύσιμο τους με θαλασσινό νερό παρατηρώντας ότι τα μικρά τραύματα των ψαράδων σπάνια διαπυούνται. Η συνήθης διαδικασία ήταν να πλένεται το τραύμα με θαλασσινό νερό και μετά να καλύπτεται με ένα κομμάτι λινό ύφασμα εμποτισμένο σε κρασί ή ξύδι.<sup>(1)</sup>

Το 100 μ.Χ., οι Ρωμαίοι στρατιώτες διέλυαν ρητινώδη ουσία από σμύρνα στο νερό και μ' αυτό έπλεναν τα τραύματα, έτσι τα προστάτευαν από την ανάπτυξη σταφυλόκοκκου και άλλων θετικών κατά gram βακτηριδίων.<sup>(4)</sup>

Χρειάστηκαν πολλοί αιώνες για να φθάσει στη σημερινή της εξέλιξη η ιατρική επιστήμη με νέους σύγχρονους τρόπους θεραπείας γενικά και θεραπείας τραυμάτων ειδικά.

Στην παρούσα εργασία μελετήσαμε τις δράσεις ενός ισχυρού παλμικού (ΗΜΠ), βραχείας διάρκειας, παραγομένου μέσω μιας εξειδικευμένης συσκευής που εμπεριέχει μια γεννήτρια πλάσματος, όσο αναφορά την ταχύτητα και ποιότητα της επούλωσης χειρουργικώς προκληθέντων τραυμάτων σε επίμυες Wistar.



Η ιδιαιτερότητα του εν λόγω συστήματος έγκειται στο γεγονός ότι η βραχύτητα της διάρκειας του ηλεκτρομαγνητικού παλμού προστατεύει τον βιολογικό στόχο από την ανάπτυξη υψηλών θερμοκρασιών.

Μετά την παρέμβαση αναλύονται παράγοντες που επηρεάζουν την επίδρασή της ακτινοβολίας, γίνεται στατιστική ανάλυση αποτελεσμάτων και εστιάζεται η προσοχή στη επουλωτική της δράση.

Οι λόγοι που οδήγησαν στην διερεύνηση αυτού του τρόπου επούλωσης είναι:

Η πολυπλοκότητα των τραυμάτων που αντιμετωπίζει ο άνθρωπος στην σύγχρονη κοινωνία

Η ειδικότητα με την οποία ασχολούμαι εκ των οποίων ένα από τα αντικείμενα της είναι η καλύτερευση και βελτιστοποίηση διεργασιών επούλωσης δέρματος και αποκατάστασης ιστών γενικότερα.

Το κέντρισμα από την διεθνή βιβλιογραφία για τις επιδράσεις των Η.Μ.Π καθώς και ευρύτερου φάσματος πεδίων στην αναπλαστική ικανότητα των βιολογικών ιστών.

Η έλλειψη αντιστοίχων ερευνών στον ελλαδικό χώρο καθώς και η πολυετής ενασχόληση του εργαστηρίου φυσιολογίας με τα Η.Μ.Π και τις ποικίλες εφαρμογές τους σε διάφορους βιολογικούς στόχους.



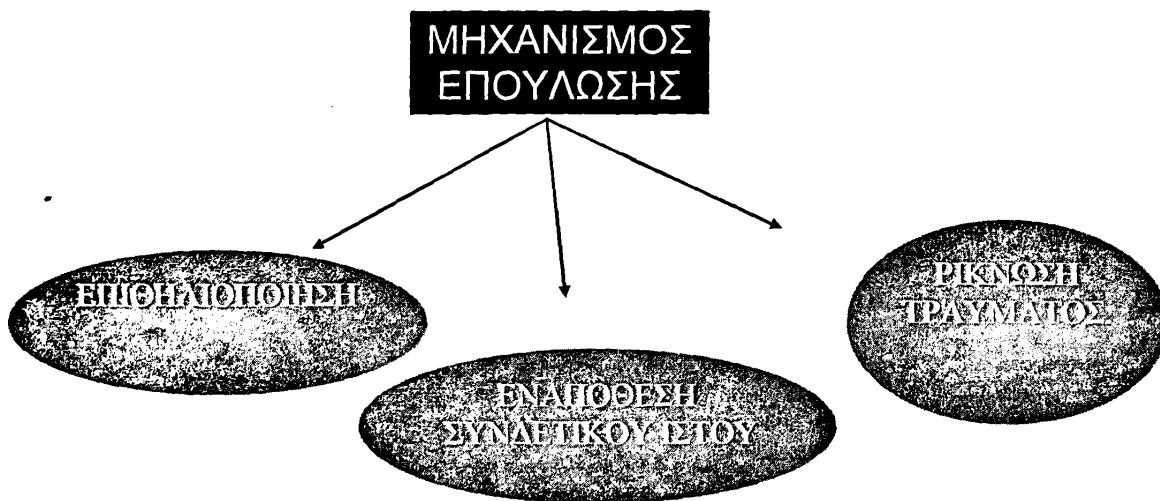


## ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1<sup>ο</sup>

### 1. ΕΠΟΥΛΩΣΗ ΤΡΑΥΜΑΤΟΣ:

#### Μοριακοί και Βιολογικοί Μηχανισμοί της επούλωσης

Η επούλωση του τραύματος είναι μια σύνθετη, συνδυαστική διεργασία στην οποία συμμετέχουν τρία κύρια φαινόμενα: η επιθηλιοποίηση, η εναπόθεση συνδετικού ιστού και η ρίκνωση του τραύματος. Τα φαινόμενα αυτά εξαρτώνται από αυξητικούς παράγοντες οι οποίοι ρυθμίζουν τη μετανάστευση, πολλαπλασιασμό και διαφοροποίηση των κυττάρων, καθώς επίσης και τη σύνθεση και διάσπαση της εξωκυττάριας ουσίας (Extracellular matrix, ECM).<sup>(6,8)</sup>



Σχήμα 1.1. Μηχανισμοί επούλωσης

Η επούλωση ξεκινά από τη στιγμή που διαταράσσεται η ακεραιότητα ενός ιστού λόγω τραυματισμού. Κατά την διαδικασία επούλωσης ενός τραύματος κινητοποιούνται οι ακόλουθες, μοριακές, κυτταρικές και βιοχημικές διεργασίες:

α. Αιμόσταση και επαγωγή της απάντησης της οξείας φλεγμονής στην αρχική βλάβη.



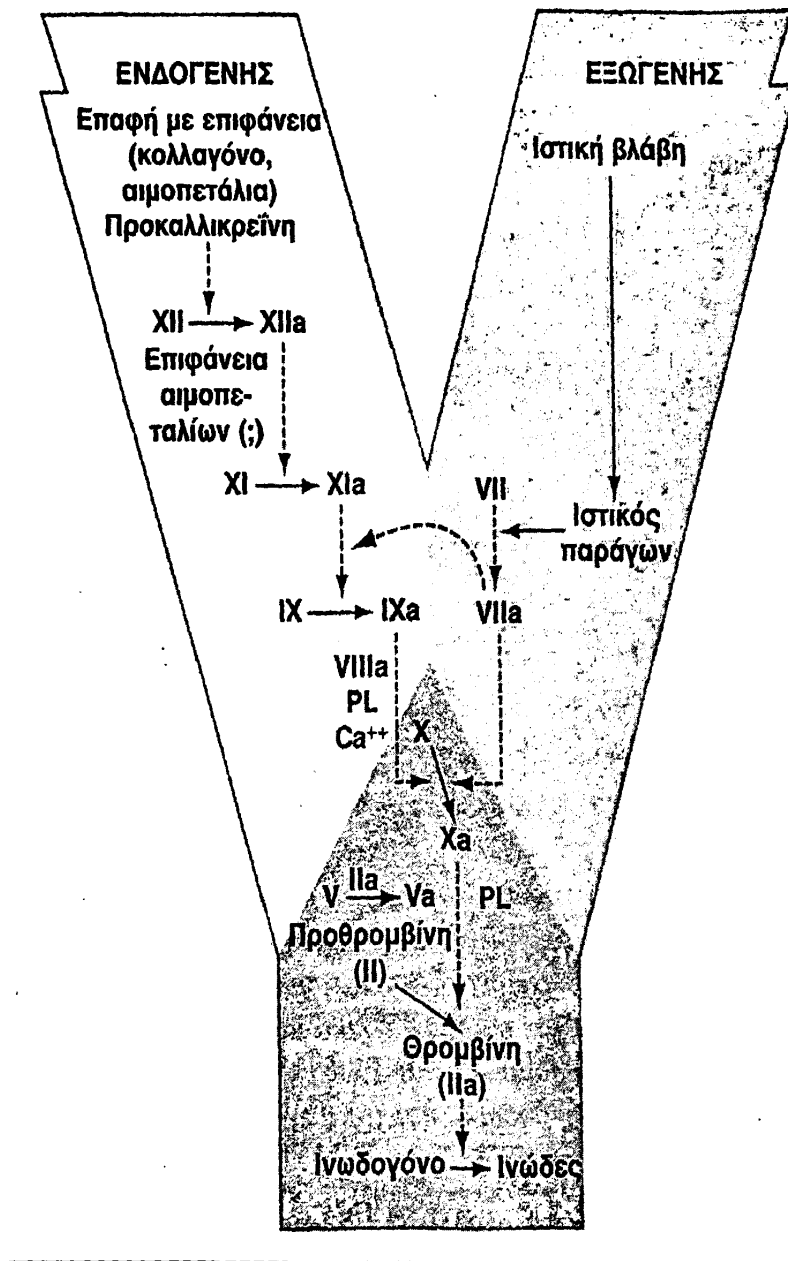


- β. Αναγέννηση και πολλαπλασιασμός τόσο των παρεγχυματικών κυττάρων όσο και εκείνων του συνδετικού ιστού.
- γ. Σύνθεση πρωτεϊνών της εξωκυττάριας ουσίας
- δ. Αναδιαμόρφωση της ουλής

## **1. 2 Αιμόσταση και επαγωγή της απάντησης οξείας φλεγμονής στην αρχική βλάβη.**

Μετά την τραυματική ρήξη του ενδοθηλίου ακολουθεί συνάθροιση των αιμοπεταλίων και ενεργοποίηση του καταρράκτη της πήξης με τελικό προϊόν τη δημιουργία «ινώδους» στοιχείου που είναι απαραίτητο για το σχηματισμό πλέγματος ινικής, όπου θα μεταναστεύσουν τα κύτταρα της φλεγμονής<sup>(9)</sup>. Τα αιμοπετάλια δεν λειτουργούν μόνο ως παθητικά στοιχεία της αιμόστασης αλλά παρέχουν επίσης την πρώτη πηγή διαλυτών μορίων που ρυθμίζουν και διαμεσολαβούν στην επούλωση. Τα α-κοκκία των αιμοπεταλίων περιέχουν αυξητικούς παράγοντες (PDGF, IGF-1, TGF-b) τους οποίους απελευθερώνουν και προετοιμάζουν την επερχόμενη φάση της φλεγμονής<sup>(9)</sup>.



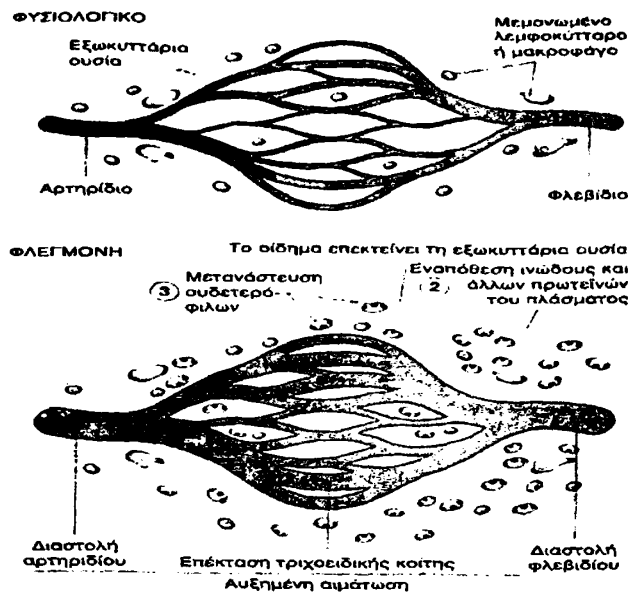


**Σχήμα 1.2.** Καταρράκτης της πήξης. Αιμοδυναμικές διαταραχές θρόμβωσης

Κατά την διάρκεια της φλεγμονής συντελούνται μεταβολές στη διάμετρο των αγγείων, «αγγειοδιαστολή», που έχουν σαν αποτέλεσμα τοπική αύξηση της αιμάτωσης, επιβράδυνση της μικροκυκλοφορίας, στάση ερυθροκυττάρων, περιθωριοποίηση των λευκοκυττάρων και διαμετανάστευση τους μέσα από το αγγειακό ενδοθήλιο οδηγώντας σε ερύθημα και θερμότητα που παρατηρούνται στα πρώτα στάδια (RUBOR – CALOR). Η μετακίνηση των λευκοκυττάρων κυρίως ουδετερόφιλα,

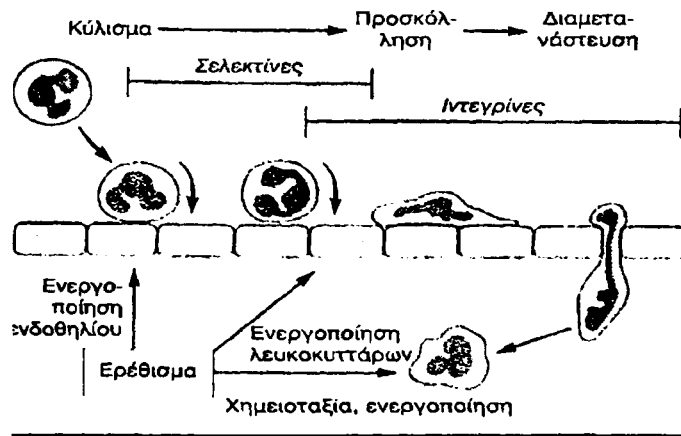


από την μικροκυκλοφορία και συνάθροιση τους στην εστία της βλάβης γίνεται υπό την επίδραση χημειοτακτικών παραγόντων.<sup>(5,6)</sup>



Σχήμα 1.3. Μεταβολές στη διάμετρο των αγγείων

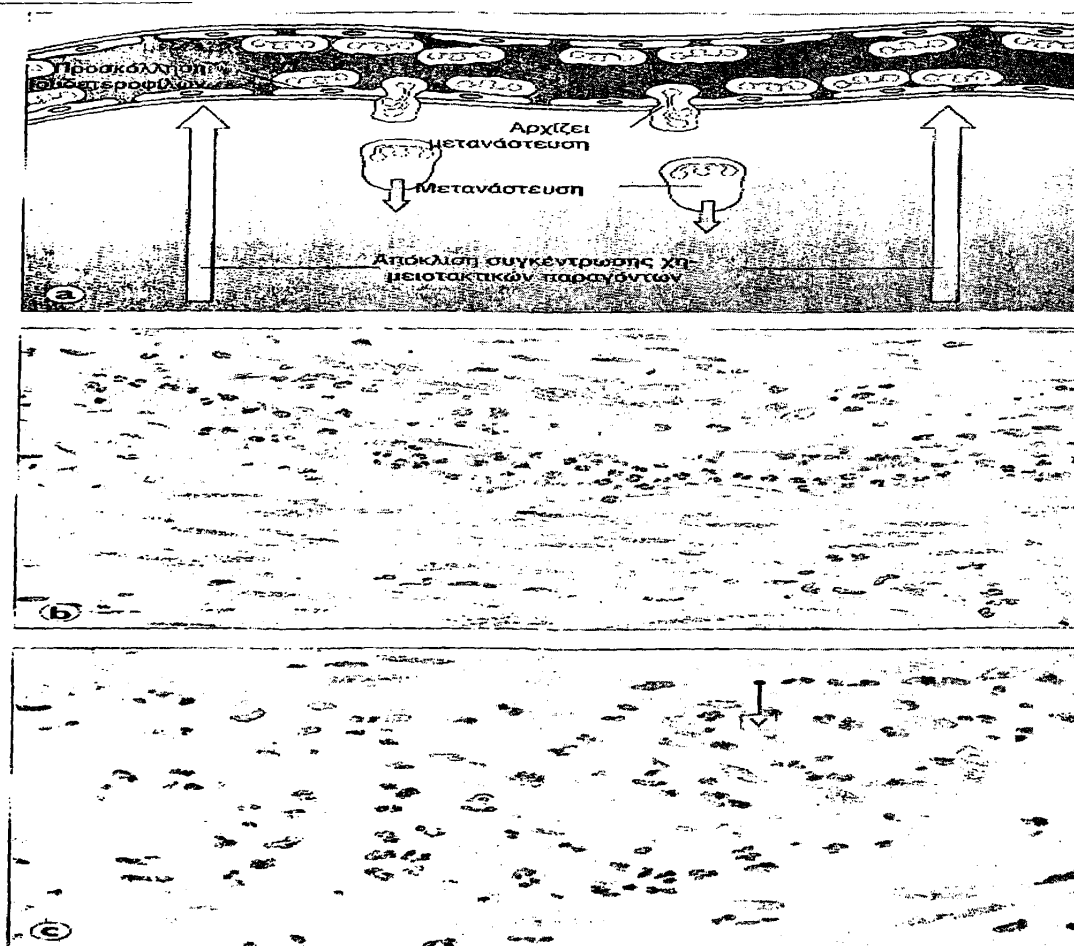
Χημειοτακτικά δρουν οι ουσίες ισταμίνη, σεροτονίνη, παράγοντες συμπληρώματος, κυτοκίνες, προσταγλανδίνες, TGF- $\beta$  καθώς και οι TNF- $\alpha$  και IL-1 που εκκρίνονται από τα μακροφάγα, αιμοπετάλια, πλασματοκύτταρα και παίζουν σημαντικό ρόλο στη διάσπαση, εναπόθεση και οργάνωση του κολλαγόνου της εξωκυττάριας ουσίας.



Σχήμα 1.4. Διαμετανάστευση των λευκοκυττάρων μέσα από κυτταρική μεμβράνη



Η φάση αυτή διαρκεί 24-48 ώρες από την έναρξη της ιστικής βλάβης, ενώ μπορεί να κατασταλεί λόγω έλλειψης  $O_2$  ή από την δράση στεροειδών ορμονών. Έτσι λοιπόν σε αυτό το στάδιο έχουμε πόνο και απώλεια λειτουργικότητας. Έχουμε δηλαδή όλα τα φαινόμενα, που στοιχειοθετούν τη φλεγμονή: RUBOR-CALOR-TUMOR-DOLOR με συνέπεια FUNCTIO LAESA.<sup>(6)</sup>



**Εικόνα 1.1.** Μετανάστευση των ουδετερόφιλων στην οξεία φλεγμονή

- A) Προσκόλληση, έναρξη μετανάστευσης και μετανάστευση των ουδετερόφιλων.
- B) Μετακίνηση ουδετερόφιλων προς το μήκος του αγγειακού τοιχώματος
- C) Διαμετανάστευση ουδετερόφιλων προς τον πάσχοντα ιστό

### **1.3 Αναγέννηση και πολλαπλασιασμός των παρεγχυματικών κυττάρων όσο και εκείνων του συνδετικού ιστού.**

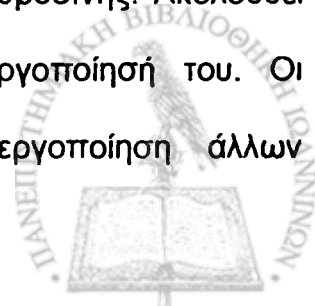
Ο πολλαπλασιασμός και η αναγέννηση των κυττάρων κατά μεγάλο μέρος ρυθμίζεται από βιοχημικούς παράγοντες που εμφανίζονται στο τοπικό μικροπεριβάλλον, οι οποίοι μπορούν να διεγείρουν ή να αναστείλουν την αύξηση των κυττάρων<sup>(6)</sup>.

Μολονότι πολλές χημικές διαμεσολαβητικές ουσίες επηρεάζουν την αύξηση των κυττάρων, οι σημαντικότερες είναι οι *πολυπεπτιδικοί αυξητικοί παράγοντες* που κυκλοφορούν στον ορό ή παράγονται τοπικά από κύτταρα με παρακρινικό μηχανισμό. Οι περισσότεροι από τους αυξητικούς παράγοντες έχουν *πλειοτροπικές* επιδράσεις, δηλ. πέρα από τη διέγερση επάγουν τη μετανάστευση, διαφοροποίηση και αναδιαμόρφωση των ιστών. Γι' αυτό εμπλέκονται και στις διάφορες φάσεις επούλωσης των τραυμάτων.<sup>(8,10)</sup>

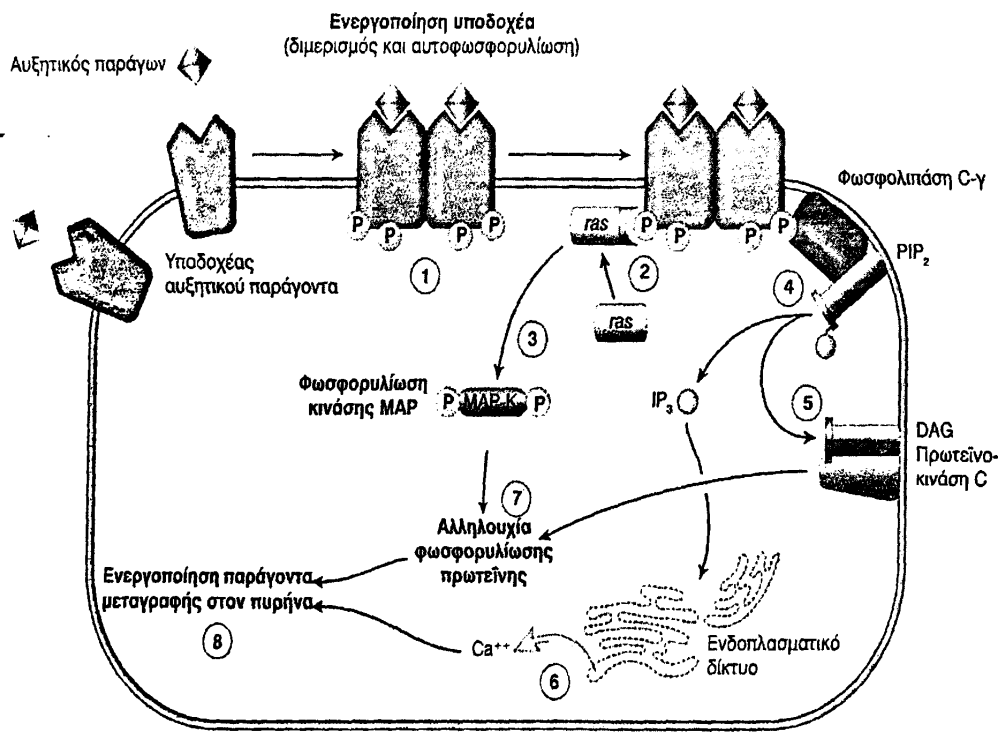
### **1.4 Μοριακά φαινόμενα κατά την αύξηση του κυττάρου-Κυτταρικός κύκλος**

Οι αυξητικοί παράγοντες επάγουν τον πολλαπλασιασμό των κυττάρων με επίδραση στην έκφραση γονιδίων που ενέχονται στην φυσιολογική ρύθμιση των οδών αύξησης δηλ των ούτω καλούμενων *πρωτοογκογονιδίων* . Μεταβολές στη δομή ή την έκφραση πρωτοογκογονιδίων μπορεί να τα μετατρέψει σε *ογκογονίδια*, τα οποία συμβάλουν στη μη ελεγχόμενη αύξηση των κυττάρων, κύριο χαρακτηριστικό των καρκίνων<sup>(11,12)</sup>.

Πιο συγκεκριμένα η αύξηση των κυττάρων επιτυγχάνεται όταν ο αυξητικός παράγοντας (ligant) δεσμεύεται με τον ειδικό υποδοχέα του στην επιφάνεια της κυτταρικής μεμβράνης και εμφανίζει δραστηριότητα κινάσης της τυροσίνης. Ακολουθεί διμερισμός του υποδοχέα και αυτοφωσφορυλίωση, δηλ. ενεργοποίησή του. Οι ενεργοποιημένες φωσφοπρωτεΐνες είτε συντελούν στην ενεργοποίηση άλλων



πρωτεϊνών, είτε συνδέονται με δευτερογενή εκτελεστικά μόρια. Στην πρώτη κατηγορία ανήκουν πρωτεΐνες που δεσμεύουν GTP, περιλαμβανομένων των G-πρωτεϊνών και των πρωτεϊνών της οικογένειας *ras*. Αυτές με τη σειρά τους φωσφορυλιώνουν (ενεργοποιούν) τις MAP (Mitogen activated protein) kinases, οι οποίες φωσφορυλιώνουν άλλες πρωτεΐνες που επηρεάζουν τους μεταγραφικούς παράγοντες του πυρήνα. Στη δεύτερη κατηγορία περιλαμβάνεται η φωσφολιπάση C- $\gamma$ , η οποία καταλύει τη διάσπαση του φωσφατιλ-διφωσφορικού σε τριφωσφορική ινositόλη και διακυκλυκερόλη. Η διφωσφορική ινositόλη κινητοποιεί τα ενδοκυττάρια αποθέματα ασβεστίου, ενώ η διακυκλυκερόλη επάγει τη μετάθεση από τη μεμβράνη της πρωτεϊνοκινάσης C. Το τελικό αποτέλεσμα είναι η αύξηση του ενδοκυττάριου ασβεστίου και η περαιτέρω φωσφορυλίωση πρωτεϊνών. (8,15)

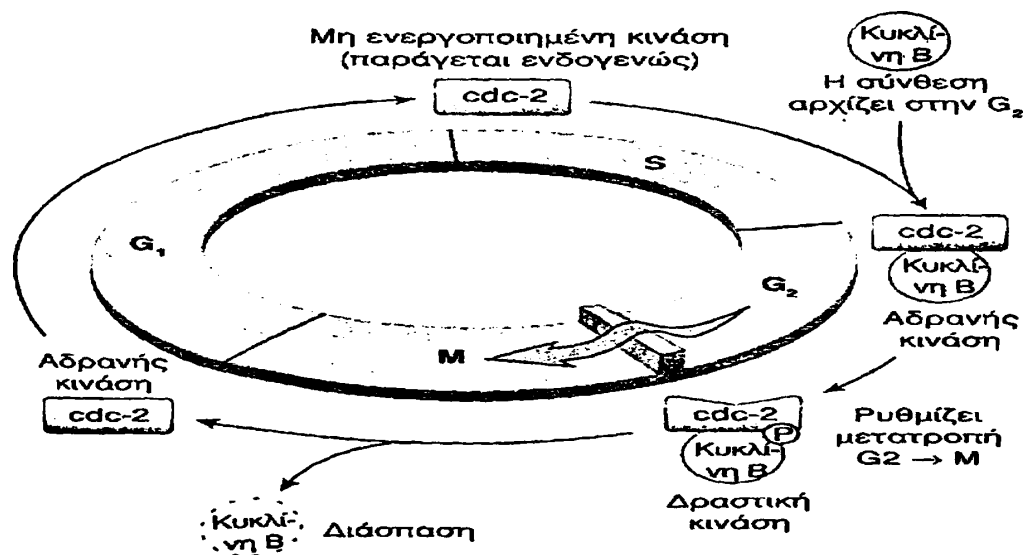


Σχήμα 1. 5. Αύξηση των κυττάρων



Η ενεργοποίηση κινάσων καθώς και άλλων δεύτερων αγγελιοφόρων, όπως το ασβέστιο, μεταδίδει σήματα αύξησης προς τον πυρήνα και προκαλεί επαγωγή της έκφρασης μεγάλου αριθμού γονιδίων (*myc*, *fos*, *jun*) που εμπλέκονται στη ρύθμιση του DNA και τη διαίρεση του κυττάρου. Αντίστροφο έλεγχο φωσφορυλίωσης πρωτεϊνών ασκούν οι φωσφατάσες, που τερματίζουν τη σηματοδότηση και απομακρύνουν τα φωσφορικά από διάφορες πρωτεΐνες.

Η είσοδος και πρόοδος των κυττάρων μέσα στον κυτταρικό κύκλο κατευθύνεται από μια οικογένεια πρωτεϊνών που ονομάζονται κυκλίνες, οι οποίες ρυθμίζουν τη διαίρεση του κυττάρου, με το σχηματισμό ενεργοποιημένων συμπλεγμάτων με ομάδα από ένζυμα, τις κινάσες και ονομάζονται κυκλινο-εξαρτώμενες κινάσες (*cycline-dependent-kinases*, *cdk*). Για παράδειγμα η *cdc-2* είναι μια κυκλινο-εξαρτώμενη η οποία ρυθμίζει τη μετάβαση από τη  $G_2$  στην M φάση.<sup>(13-15)</sup>



Σχήμα 1.6. Κυτταρικός κύκλος



Ρύθμιση της δραστηριότητας της cdc-2 κινάσης από κυκλίνη B. Η σύνδεση νεοσυντιθεμένης κυκλίνης B με ανενεργό cdc-2 κινάση στην αρχή της  $G_2$  καταλήγει σε σύμπλεγμα που μπορεί να ενεργοποιείται με φωσφορυλίωση. Αυτό το ενεργοποιημένο σύμπλεγμα κινάσης στη συνέχεια φωσφορυλιώνει διάφορες πρωτεΐνες που είναι σημαντικές για τη ρύθμιση της μετατροπής της  $G_2 \rightarrow M$ . Μετά από μίτωση, η κυκλίνη B αποσπάται από το σύμπλεγμα και διασπάται και αφήνει πίσω της την ανενεργό cdc-2 κινάση, η οποία μπορεί να επανεισέρχεται στον κύκλο στην επόμενη φάση  $G_2$ .





## ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2<sup>ο</sup>

### ΑΥΞΗΤΙΚΟΙ ΠΑΡΑΓΟΝΤΕΣ

Οι αυξητικοί παράγοντες είναι πολυπεπτίδια που επιδρούν σε διάφορους τύπους κυττάρων ή σε περιορισμένο πληθυσμό στόχο. Εκτός από την επαγωγή της αύξησης οι διαμεσολαβητικές αυτές ουσίες, μπορούν να επηρεάσουν την μετακίνηση, τη συστατικότητα και τη διαφοροποίηση των κυττάρων. Λειτουργούν με ενδοκρινικές, παρακρινικές ή αυτοκρινικές οδούς. Θα αναφερθούν κυρίως εκείνοι που έχουν ευρύ στόχο ή ενέχονται σε σημαντικές παθολογικές διεργασίες, όπως η διαμεσολάβηση αγγειογένεσης, μετανάστευση ινοβλαστών, πολλαπλασιασμός κυττάρων και εναπόθεση κολλαγόνου κατά την επούλωση των πληγών.<sup>(6-12)</sup>

#### 2.1 Επιδερμικός αυξητικός παράγων EGF (epidermal growth factor)

Είναι μιτογόνος για διάφορα επιθηλιακά κύτταρα και ινοβλάστες. Διεγείρει τη διαίρεση των κυττάρων με τη σύνδεση του με υποδοχέα κινάσης της τυροσίνης στην κυτταρική μεμβράνη. Μοιράζεται τον υποδοχέα του με τον μετατρεπτικό αυξητικό παράγοντα-α (TGF-α), ο οποίος εξασκεί παρόμοιες βιολογικές δραστηριότητες.<sup>(11)</sup>

#### 2.2 Αυξητικός παράγων που προέρχεται από τα αιμοπετάλια (Platelet-derived-growth-factor, PDGF)

Απελευθερώνεται από τα α-κοκκία των αιμοπεταλίων μετά από ενεργοποίηση, παράγεται επίσης από ενεργοποιημένα μακροφάγα, ενδοθηλιακά κύτταρα, λείες μυϊκές ίνες καθώς και από διάφορους όγκους.

Επάγει τον πολλαπλασιασμό ινοβλαστών, λείων μυϊκών ινών και μονοκυττάρων εμφανίζει όμως και άλλες ιδιότητες που προάγουν τη φλεγμονή. Συνδέεται με υποδοχείς α και β που εμφανίζουν δραστηριότητα κινάσης.<sup>(8)</sup>



### **2.3 Αυξητικός παράγοντας των ινοβλαστών (Fibroblast-growth-factor, FGF)**

Παράγεται από μακροφάγα και άλλα κύτταρα. Ανήκει στην οικογένεια πολυπεπτιδίων τα οποία δεσμεύονται με ηπαρίνη και αλλά ανιονικά μόρια. Επάγει όλες τις βαθμίδες που απαιτούνται για τη γένεση νέων αγγείων (αγγειογένεση)<sup>(9-12)</sup>.

### **2.4 Μετατρεπτικός αυξητικός παράγων (Transforming growth factor-β, TGF-β)**

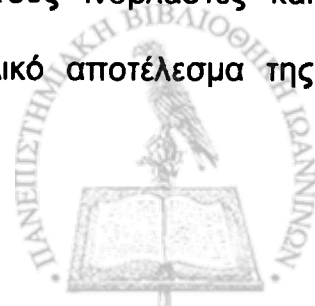
Διεγείρει την χημειοταξία των ινοβλαστών, την παραγωγή κολλαγόνου και ινοδωνεκτίνης από κύτταρα, ενώ παράλληλα αναστέλλει την διάσπαση της εξωκυττάριας ουσίας από μεταλλοπρωτεϊνάσες. Όλες αυτές οι επιδράσεις ευνοούν την ινωδογένεση και ο TGF-β εμπλέκεται όλο και περισσότερο στην ίωση, που παρατηρείται σε καταστάσεις χρόνιας φλεγμονής.<sup>(8)</sup>

### **2.5 Αυξητικός παράγοντας αγγειακού ενδοθηλίου (vascular endothelial growth factor, VEGF)**

Διαδραματίζει κεντρικό ρόλο στην ανάπτυξη καινούργιων αγγείων και στην αύξηση διαπερατότητας των αγγείων. Η τελευταία αυτή ιδιότητα οδηγεί σε αύξηση των πρωτεϊνών του πλάσματος στην εξωκυττάρια ουσία, η οποία παρέχει σημαντικό στρώμα για ανάπτυξη ινοβλαστών και ενδοθηλίου.<sup>(10)</sup>

### **2.6 Κυτοκίνες (cytokines)**

Αποτελούν επίσης σε πολλές περιπτώσεις αυξητικούς παράγοντες. Οι κυτοκίνες ιντερλευκίνη-1 (IL-1) και παράγοντας νέκρωσης όγκων ή καχεκτίνη (TNF) επάγουν τον πολλαπλασιασμό των ινοβλαστών. Είναι χημειοτακτικές για τους ινοβλάστες και διεγείρουν τη σύνθεση κολλαγόνου και κολλαγενάσης. Το τελικό αποτέλεσμα της επίδρασής τους είναι η ινωδογένεση.<sup>(9)</sup>



## 2.7 Ανασταλτικοί αυξητικοί παράγοντες

Εκτός από ειδικά σήματα που διεγείρουν και ρυθμίζουν θετικά την αύξηση, τα κύτταρα και οι ιστοί υφίστανται την επίδραση αρνητικών και ανασταλτικών σημάτων όσο αναφορά την αύξηση. Οι πολυπεπτιδικοί παράγοντες που δρουν σαν αναστολείς της αύξησης είναι ο μετατρεπτικός αυξητικός παράγων Transforming Growth Factor- $\beta$  (TGF- $\beta$ ) και η κυτοκίνη καχεκτίνη Tumor Necrosis Factor (TNF).<sup>(11)</sup>



**ΠΙΝΑΚΑΣ 2.1** Μείζονες αυξητικοί παράγοντες στην επούλωση τραύματος

|                             | EGF ή TGFα | PDGF | hFGF | TGFβ | VEGF | IL-1 ή TNF |
|-----------------------------|------------|------|------|------|------|------------|
| <b>Αγγειογένεση</b>         | +          | 0    | ++   | +    | ++   | +          |
| <b>Χημειοταξία</b>          |            |      |      |      |      |            |
| Μονοκύτταρα                 | 0          | +    | +    | +    | 0    | +          |
| Ινοβλάστες                  | 0          | +    | +    | +    | 0    | 0          |
| Ενδοθηλιακά κύτταρα         | +          | 0    | +    | -    | +    | 0          |
| <b>Πολλαπλασιασμός</b>      |            |      |      |      |      |            |
| Ινοβλάστες                  | +          | +    | +    | ±    | 0    | +          |
| Ενδοθηλιακά κύτταρα         | +          | 0    | ++   | -    | ++   | 0 ή -      |
| <b>Σύνθεση κολλαγόνου</b>   | +          | +    | +    | ++   | 0    | +          |
| <b>Έκκριση κολλαγονάσης</b> | +          | +    | +    | +    | 0    | +          |

++ Σημαντικός ρόλος

+ Διεγείρει

± Ποικίλη Επίδραση

- Αναστέλλει

0 Καμιά Επίδραση



## ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3<sup>ο</sup>

### ΣΥΝΘΕΣΗ ΤΩΝ ΠΡΩΤΕΪΝΩΝ ΤΗΣ ΕΞΩΚΥΤΤΑΡΙΑΣ ΟΥΣΙΑΣ

Η εξωκυττάρια ουσία αποτελεί σημαντικό ποσοστό οποιουδήποτε ιστού. Πέρα από την παροχή σπαργής σε μαλακούς ιστούς και ακαμψίας στα οστά, παρέχει υπόστρωμα για προσκόλληση των κυττάρων και ρυθμίζει κατά σημαντικό τρόπο την αύξηση, την κίνηση και διαφοροποίηση των κύτταρων που διαβιούν μέσα σε αυτή.<sup>(6)</sup>

Αποτελείται από ινώδεις δομικές πρωτεΐνες (κολλαγόνο και ελαστίνη) και μια διάμεση ουσία που συνίσταται από γλυκοπρωτεΐνες που εντοιχίζονται σε μια γέλη από πρωτεογλυκάνη και γλυκοζοαμινογλυκάνη<sup>(16)</sup>.

Η εξωκυττάρια ουσία (Extra Cellular Matrix, ECM) είναι εξαιρετικά οργανωμένη γύρω από επιθηλιακά κύτταρα και λείες μυϊκές ίνες όπου σχηματίζει την εξειδικευμένη βασική μεμβράνη, η οποία κατευθύνει την πολικότητα των κυττάρων και απαιτείται για την τακτική ανανέωση του επιθηλιακού ιστού.

Επί απουσίας ακέραιης βασικής μεμβράνης τα κύτταρα πολλαπλασιάζονται στην τύχη και σχηματίζουν ανοργάνωτες μάζες που δεν εμφανίζουν μορφολογική ή λειτουργική ομοιότητα με τον αρχικό ιστό. Στις περισσότερες εξωκυττάρια ουσίες υπάρχουν τρία συστατικά.<sup>(7-10)</sup>

#### 3.1 Κολλαγόνο

Είναι το κύριο ινώδες στοιχείο του συνδετικού ιστού και αποτελεί την βασική εξωκυτταρική πρωτεΐνη του ανθρώπινου σώματος.<sup>(17)</sup> Είναι το βασικό συστατικό του δέρματος, των χόνδρων, των οστών, των τενόντων, των δοντιών και των αγγείων. Υπάρχει σε όλα σχεδόν τα όργανα του σώματος και η βασική του λειτουργία είναι να συγκρατεί μαζί τα κύτταρα σε ευδιάκριτες λειτουργικές κυτταρικές ομάδες.



Εκτός από τον σημαντικό ρόλο που παίζει στους «ώριμους ιστούς», το κολλαγόνο παίζει σημαντικό ρόλο και στους υπό ανάπτυξη ιστούς.<sup>(18)</sup>

Σχηματίζεται από πρωτεΐνες που διαπλέκονται μεταξύ τους σε σχοινοειδή τριπλή έλικα. Υπάρχουν 13 τύποι κολλαγόνου μερικοί από τους οποίους είναι μοναδικοί για ορισμένα κύτταρα και ιστούς. Ορισμένοι τύποι κολλαγόνου σχηματίζουν ινίδια και αποτελούν συστατικά του συνδετικού ιστού. Ενώ άλλοι δεν σχηματίζουν ινίδια και αποτελούν συστατικά της Βασικής Μembrάνης.<sup>(21-23)</sup>

**Ο τύπος I** ανευρίσκεται σε όλους τους τύπους συνδετικού ιστού εκτός από χόνδρο και βασική μεμβράνη. Είναι ο επικρατέστερος τύπος κολλαγόνου στο δέρμα και το κύριο στοιχείο στη δημιουργία της ουλής.<sup>(18)</sup>

**Ο τύπος II** βρίσκεται κυρίως στον υαλοειδή χόνδρο και στο στέρνο.<sup>(25)</sup>

**Ο τύπος III** ανευρίσκεται στο δέρμα κυρίως σε μεγαλύτερες συγκεντρώσεις κατά την εμβρυϊκή ζωή. Είναι ο κύριος τύπος κολλαγόνου κατά τα πρώτα στάδια επούλωσης αντιπροσωπεύει το 10-20% του ολικού κολλαγόνου του χορίου στο δέρμα του ενήλικα, που όμως σταδιακά αντικαθίσταται από τον τύπο I.<sup>(18,23,25)</sup>

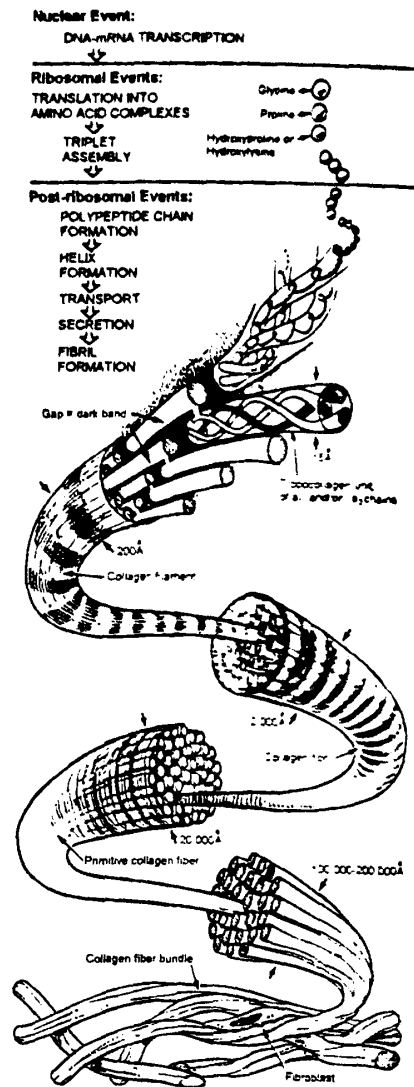
**Οι τύποι V&VII** παρατηρούνται κυρίως στη βασική μεμβράνη και αγκιστρώνουν την επιδερμίδα με το χόριο.<sup>(8,25)</sup>



**ΠΙΝΑΚΑΣ 3.1** Κυριότεροι τύποι κολλαγόνου

| <b>ΤΥΠΟΣ ΚΟΛΛΑΓΟΝΟΥ</b> | <b>ΣΥΝΘΕΣΗ</b>                 | <b>ΚΑΤΑΝΟΜΗ</b>   |
|-------------------------|--------------------------------|---|
| I                       | $[\alpha 1(I)]_2\alpha 2$      | Δέρμα, τένοντες, οστά<br>Αραχνοειδής και σκληρά<br>μήνιγγα, κερατοειδής<br>χιτώνας, ήπαρ. |
| II                      | $[\alpha 1(II)]_3$             | Χόνδρος, μεσοσπονδύλιοι<br>δίσκοι, υαλώδες σώμα.  |
| III                     | $[\alpha 1(III)]_3$            | Δέρμα, κυκλοφοριακό<br>σύστημα, μήτρα,<br>πλακούντας.                                     |
| IV                      | $[\alpha 1(IV)]_2\alpha 2(IV)$ | Βασική μεμβράνη,<br>κρυσταλλοειδής χιτώνας.   |
| V                       | $[\alpha 1(V)]_2\alpha 2(V)$   | Πλακούντας, δέρμα, ήπαρ.  |





Σχήμα 3.1 Σχηματισμός ινιδίου κολλαγόνου.

Το κολλαγόνο συντίθεται στα ριβοσωμάτια των ινοβλαστών σαν ένα μεγάλο πρόδρομο μόριο το προκολλαγόνο. Ακολούθως εκκρίνεται στο εξωκυττάριο διάστημα και υπό την επίδραση δύο ενζύμων (c-πρωτεάση προκολλαγόνου και N-πρωτεάση προκολλαγόνου) μετατρέπεται σε κολλαγόνο<sup>(18,19)</sup>.

Στο κολλαγόνο ανευρίσκονται δύο χαρακτηριστικά αμινοξέα η υδροξυπρολίνη και η υδροξυλυσίνη (σχήμα 3.1). Η πρώτη βρίσκεται σε μεγάλες ποσότητες και είναι



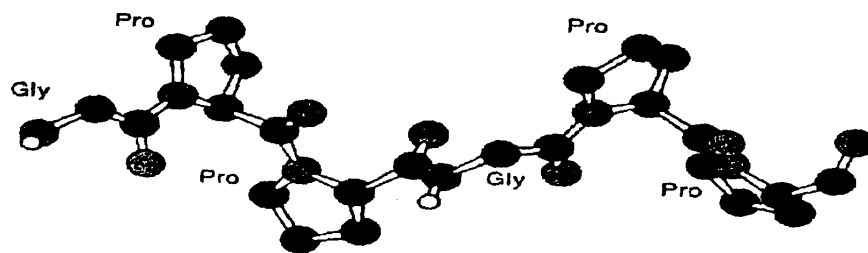


απαραίτητη για την φυσιολογική έκκριση των μορίων προκολλαγόνου έξω από τα κύτταρα, καθώς και την φυσιολογική δομή του. Ενώ η δεύτερη παίζει ρόλο στην σταθεροποίηση του εξωκυττάριου κολλαγόνου<sup>(26,27)</sup>.

Στο δέρμα ενός ενήλικα η αναλογία τύπου I και τύπου III είναι 85/15. Μελέτες απέδειξαν ότι κατά τον σχηματισμό ουλής συντίθεται καθαρά τύπος III κολλαγόνου όπου κατά την διάρκεια ωρίμανσης της ουλής αντικαθίσταται με τύπου I και σταδιακά αποκαθίσταται η φυσιολογική αναλογία των τύπων κολλαγόνου. Αντίθετα στις υπερτροφικές ουλές έχουμε υψηλή εναπόθεση τύπου III και επιβραδυνόμενη η ακόμα και ανύπαρκτη αντικατάσταση του από τον τύπο I.

Η εναπόθεση νεοσύστατου κολλαγόνου παρατηρείται ήδη από την πρώτη ημέρα τραυματισμού αλλά η διαδικασία της ινοπλασίας είναι μικρή τις πρώτες μετατραυματικές ημέρες<sup>19</sup>.

Σε ολικού πάχους τραύματα η σύνθεση είναι ζωηρή την 5<sup>η</sup> ή 7<sup>η</sup> μετατραυματική ημέρα, ενώ στα τραύματα μερικού πάχους παρατηρείται 2<sup>η</sup> ή 3<sup>η</sup> ημέρα. Η σύνθεση του κολλαγόνου μπορεί να συνεχιστεί 6 μήνες ή ένα χρόνο μετά τον τραυματισμό. Αρχικά η διάταξη των κολλαγόνων δεσμίδων είναι τυχαία, αργότερα όμως διατίθενται παράλληλα προς τις γραμμές του Langer. Είναι επίσης σημαντικό ότι μια ώριμη ουλή δεν επανακτά ποτέ την αρχική της σταθερότητα<sup>(18-21)</sup>.



Σχήμα 3.2 Μόριο κολλαγόνου



### 3.2 Γλυκοπρωτεΐνες

Οι προσκολλητικές γλυκοπρωτεΐνες έχουν σαν κύριο ρόλο τη σύνδεση των κυττάρων μεταξύ τους και με το εξωκυττάριο στρώμα. Περιλαμβάνουν την ινωδονεκτίνη, λαμινίνη και θρομβοσπονδίνη.

Συντίθενται από διάφορα κύτταρα περιλαμβανομένων των ινοβλαστών, μονοκύτταρων και ενδοθηλιακών κυττάρων.

Μια άλλη ομάδα προσκολλητικών πρωτεϊνών είναι οι ιντεγκρίνες. Η σύνδεση τους με την εξωκυττάρια ουσία επάγει τη μετακίνηση, τον πολλαπλασιασμό ή τη διαφοροποίηση του κυττάρου.

Κατά τα αρχικά στάδια επούλωσης του δέρματος μεγάλα ποσά ινωδονεκτίνης αθροίζονται στην εξωκυττάρια ουσία και επιδρούν σαν αρχικό ικρίωμα για ανάπτυξη ενδοθηλίου και ινοβλαστών<sup>(8,9,13)</sup>.

### 3.3 Πρωτεογλυκάνες

Συμβάλλουν στην ρύθμιση της δομής και της διαπερατότητας της εξωκυττάριας ουσίας. Μπορούν επίσης να είναι ενσωματωμένες πρωτεΐνες της κυτταρικής μεμβράνης και να παίζουν ρόλο στην αύξηση και διαφοροποίηση του κυττάρου.

Συμπερασματικά, για την αύξηση και διαφοροποίηση του κυττάρου απαιτούνται τουλάχιστο δύο τύποι σημάτων που επιδρούν σε συνδυασμό μεταξύ τους. Ο ένας προέρχεται από διαλυτά μόρια όπως οι πολυπεπτιδικοί αυξητικοί παράγοντες και οι παράγοντες αναστολές της αύξησης. Ο άλλος αφορά αδιάλυτα στοιχεία της εξωκυττάριας ουσίας, όπως τη λαμινίνη, ινωδονεκτίνη και κολλαγόνα<sup>(8,9)</sup>.



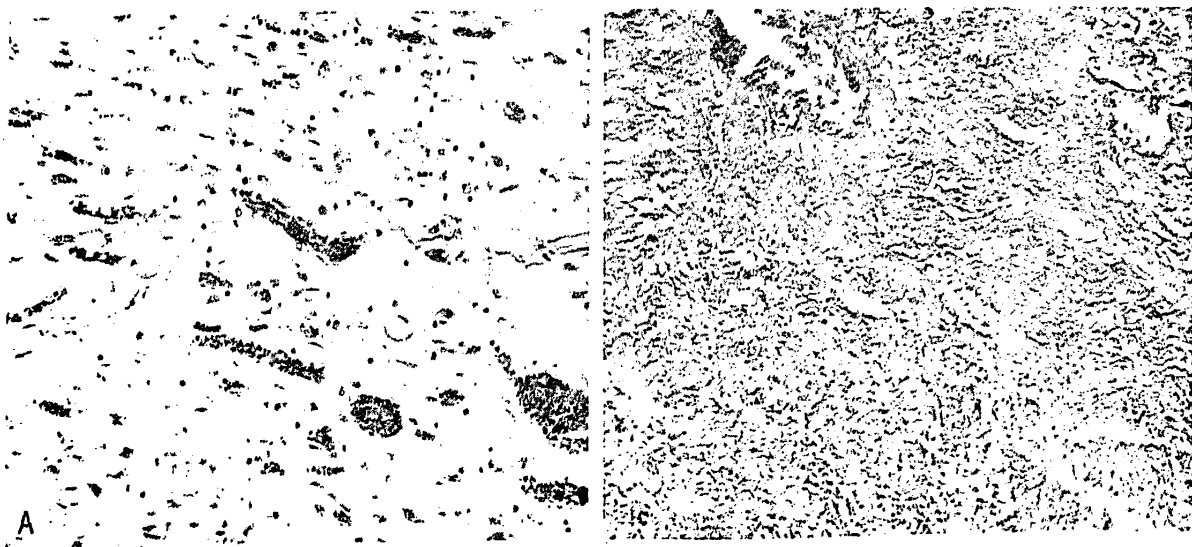
## ΚΕΦΑΛΑΙΟ 4<sup>ο</sup>

### ΜΗΧΑΝΙΣΜΟΣ ΕΠΟΥΛΩΣΗΣ

Η επούλωση ενός τραύματος γίνεται μέσω διεργασιών οργάνωσης και σχηματισμού κοκκιώδους και τελικά ουλώδους ιστού. Στην διεργασία αυτή διακρίνονται τρεις συνιστώσες

- α) Σχηματισμός νέων αιμοφόρων αγγείων (Angiogenesis)
- β) Ίνωση (Proliferation)
- γ) Ωρίμανση και αναδιαμόρφωση ουλής. (Remodeling)

Ο όρος κοκκιώδης ιστός χαρακτηρίζεται από πολλαπλασιασμό των ινοβλαστών με νέα με λεπτό τοίχωμα τριχοειδή, σε χαλαρή εξωκυττάρια ουσία. Πήρε το όνομα του από την μαλακή ρόδινη κοκκιώδη εμφάνιση του όπως φαίνεται κάτω από την εσχάρα πληγής του δέρματος. Στην συνέχεια γίνεται συνάθροιση μεσοκυττάριας ουσίας συνδετικού ιστού και καταλήγει σε ίνωση (ουλοποίηση) <sup>(6,8,28)</sup>.



Εικόνα 4.1. Α. Κοκκιώδης ιστός με πολλά αιμοφόρα αγγεία οίδημα και χαλαρή ECM,



που περιέχει μικρό αριθμό κυττάρων φλεγμονής. Σ' αυτό το σημείο μπορεί να παρατηρείται ελάχιστο κολλαγόνο. Β. Ωριμη ουλή με τριχρωματική χρώση, όπου παρατηρείται πυκνό κολλαγόνο, με ελάχιστα μόνο διάσπαρτα αγγεία.

#### 4.1 Αγγειογένεση (Angiogenesis)

Τα καινούργια αγγεία προέρχονται με εκβλάστηση από τα προϋπάρχοντα αγγεία, η ανάπτυξη των οποίων γίνεται σε τέσσερις βαθμίδες με την ακόλουθη σειρά:

A: Πρωτεολυτική διάσπαση της Βασικής Μembrάνης του αρχικού αγγείου (εκβλάστηση τριχοειδούς)

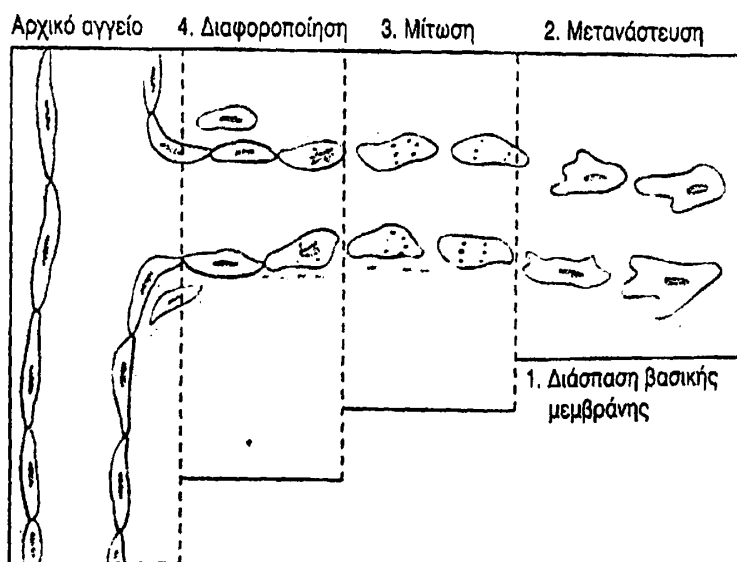
B: Μετανάστευση ενδοθηλιακών κυττάρων προς το αγγειογεννητικό ερέθισμα.

Γ: Πολλαπλασιασμός ενδοθηλιακών κυττάρων .

Δ: Ωρίμανση και οργάνωση σε τριχοειδείς σωλήνες.

Τα καινούργια αγγεία εμφανίζουν διαρροή εξαιτίας της ατελούς διαμόρφωσης των διενδοθηλιακών συνδέσεων. Έτσι εξηγείται το οίδημα που υπάρχει στις υπό επούλωση πληγές.

Παράγοντες που επάγουν την αγγειογένεση είναι ο b-FGF και ο VEGF.



Σχήμα 4.2 Οι τέσσερις βαθμίδες της αγγειογένεσης



## 4.2 Ύψωση (Proliferation)

Είναι η μετανάστευση και πολλαπλασιασμός των ινοβλαστών στην θέση της βλάβης και εναπόθεση της εξωκυττάριας ουσίας (ECM) από αυτά τα κύτταρα. Με συνέπεια την παραγωγή και συσσώρευση κολλαγόνου στην περιοχή της βλάβης.

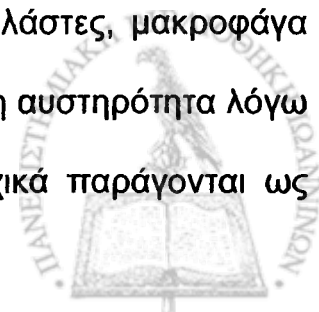
Η κολλαγονοσυνθεση φτάνει στο μέγιστο περί την 1η-2η εβδομάδα, ενώ η εναπόθεση κολλαγόνου περί την 3η- 4η εβδομάδα. Η επιστράτευση και διέγερση των ινοβλαστών κατευθύνεται από διάφορους αυξητικούς παράγοντες όπως το ενεργοποιημένο ενδοθήλιο και τα διάφορα κύτταρα της φλεγμονής (μακροφάγα, λεμφοκύτταρα), τα οποία παράγουν PDGF, b-FGF, TGF-β<sup>(8,10)</sup>.

## 4.3 Αναδιαμόρφωση της ουλής (remodeling)

Η τελευταία και πλέον μακροχρόνια φάση της επούλωσης είναι η αναδιαμόρφωση της ουλής. Η καθαρή εναπόθεση του κολλαγόνου σε όλους τους ιστούς, συμπεριλαμβανομένων και των τραυμάτων, είναι αποτέλεσμα της ισορροπίας μεταξύ κολλαγονολυτικής και κολλαγονοσυνθετικής δραστηριότητας, τέτοιας ώστε η παραγωγή και η καταστροφή του κολλαγόνου αποτελούν συνεχείς και αντίθετες, δυναμικές διεργασίες.

Τα διάφορα είδη κολλαγόνου όπως επίσης και άλλα συστατικά της εξωκυττάριας ουσίας (ECM) διασπώνται από μία οικογένεια πρωτεϊνών τις μεταλλοπρωτεϊνάσες. Σε αυτές περιλαμβάνονται οι κολλαγονάσες οι οποίες διασπούν το ινιδιακό κολλαγόνο των τύπων I, II και III, οι γελατινάσες (κολλαγονάση τύπου IV) οι οποίες διασπούν το άμορφο κολλαγόνο και την ινοδωνεκτίνη, και οι στρωμολυσίνες οι οποίες καταβολίζουν διάφορα συστατικά της εξωκυττάριας ουσίας<sup>(18,26)</sup>.

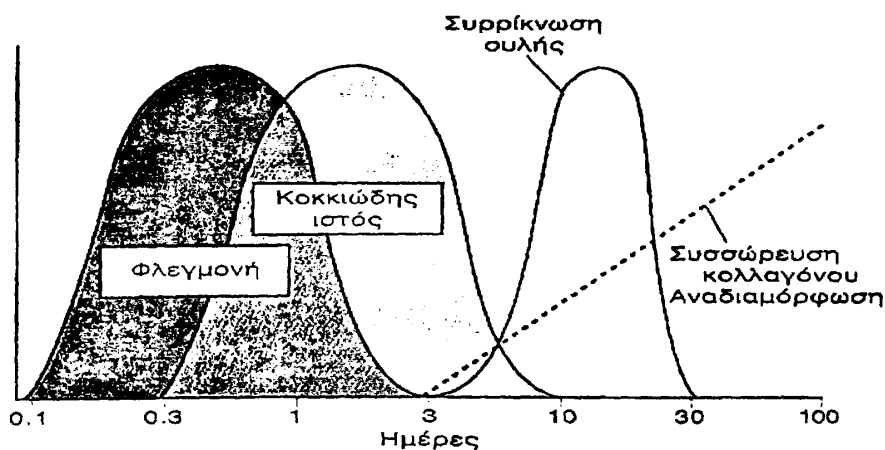
Η παραγωγή τους γίνεται από διάφορους τύπους κυττάρων (ινοβλάστες, μακροφάγα ουδετερόφιλα) και ο έλεγχος της δράσης τους καθορίζεται με μεγάλη αυστηρότητα λόγω της δυνατότητας μεγάλης ιστικής καταστροφής. Έτσι λοιπόν αρχικά παράγονται ως



ανενεργείς πρόδρομες ουσίες (ζυμογόνα) που πρέπει να ενεργοποιηθούν. Αυτό γίνεται από ορισμένες χημικές ουσίες τις πρωτεάσες (πχ πλασμίνη), που βρίσκονται στις θέσεις της βλάβης.

Επιπρόσθετα, οι ενεργοποιημένες κολλαγενάσες μπορούν τάχιστα να αναστέλλονται από ειδικούς ιστικούς αναστολείς της πρωτεΐνάσης (TIMP), που παράγονται από τα περισσότερα κύτταρα του μεσεγχύματος.

Ο έλεγχος παραγωγής και συσσώρευσης κολλαγόνου καθώς και η διαμόρφωση συνδετικού ιστού είναι απαραίτητος για την αναδιαμόρφωση της ουλής και την αποκατάσταση της βλάβης. Επισήμως αρχίζει περί την 3η εβδομάδα από τον τραυματισμό και μπορεί να διαρκέσει μήνες ή χρόνια<sup>(6,8,9,10,13)</sup>.



Σχήμα 4.3. Οι φάσεις της επούλωσης τραυμάτων

## ΚΕΦΑΛΑΙΟ 5<sup>ο</sup>

### ΔΙΕΡΓΑΣΙΕΣ ΕΠΟΥΛΩΣΗΣ

Η επούλωση ενός τραύματος διαπιστώνεται κλινικά με την αλληλεπίδραση τριών διεργασιών :

- Επιθηλιοποίηση
- Σύσπαση τραύματος
- Εναπόθεση συνδετικού ιστού.

Στην πραγματικότητα αυτές οι διαδικασίες δρουν ανταγωνιστικά και ανάλογα με τον τύπο τραύματος μια από αυτές κυριαρχεί.<sup>(8)</sup>

Έτσι λοιπόν σε τραύματα μερικού πάχους κυριαρχεί η επιθηλιοποίηση, ενώ τραύματα που συμπλησιαζονται με ράμματα κυριαρχεί η διαδικασία της εναπόθεσης συνδετικού ιστού. Τέλος σε τραύματα που αφήνονται να επουλωθούν μόνα τους κυριαρχεί η διαδικασία της σύσπασης.<sup>(9,10)</sup>

| Μηχανισμός<br>επούλωσης       | Κατά πρώτο<br>σκοπό | Κατά δεύτερο<br>σκοπό | Μερικού<br>πάχους |
|-------------------------------|---------------------|-----------------------|-------------------|
| Σύσπαση τραύματος             | 0                   | +++                   | 0                 |
| Επιθηλιοποίηση                | +                   | +                     | +++               |
| Εναπόθεση<br>συνδετικού ιστού | +++                 | ++                    | 0                 |

**Πίνακας 5.1** Αλληλεπίδραση τριών διεργασιών, σύσπαση τραύματος, επιθηλιοποίηση και εναπόθεση συνδετικού ιστού.



Η επούλωση ενός τραύματος μπορεί να γίνει κατά:

- Πρώτο σκοπό
- Δεύτερο σκοπό
- Τρίτο σκοπό

Η διαδικασία αυτή εξαρτάται από το είδος του τραύματος, ενώ ξεχωριστή οντότητα αποτελεί η επούλωση τραυμάτων μερικού πάχους.

### 5.1 Επούλωση κατά πρώτο σκοπό

Είναι η ιδεώδης μορφή επούλωσης. Λαμβάνει χώρα σε χειρουργικές τομές όπου τα χείλη του τραύματος συγκλίνουν δια συρραφής

Ο στενός χώρος της τομής γεμίζει με ινώδες και πήγμα αίματος, η δε αφυδάτωση στην επιφάνεια προκαλεί σχηματισμό εσχάρας, η οποία θα καλύψει την θέση επούλωσης.

**1η- 2η Ημέρα:** Τα ουδετερόφιλα μεταναστεύουν προς τον θρόμβο του ινώδους, ενώ τα κύτταρα της βασικής στοιβάδας εμφανίζουν αυξημένη μιτωτική δραστηριότητα.

**3η Ημέρα:** Τα ουδετερόφιλα έχουν αντικατασταθεί από μακροφάγα. *Κοκκιώδης ιστός* εισβάλλει στον χώρο της τομής ενώ ίνες κολλαγόνου καθίστανται εμφανείς στα όρια της τομής. Ο *κοκκιώδης ιστός* είναι ένα ικρίωμα που αποτελείται από τριχοειδή αιμοφόρα αγγεία, μακροφάγα και συνδετικογεννητικά κύτταρα όπου η τελική ουλή θα αναπτυχθεί και θα ωριμάσει. Τα επιθηλιακά κύτταρα πολλαπλασιάζονται κεντρομόλα κατά μήκος του χορίου και εναποθέτουν συστατικά της βασικής μεμβράνης στην πορεία τους.

**4η-5η Ημέρα:** Κυριαρχεί η φάση της νεοαγγείωσης, η *αγγειογένεση* είναι η διαδικασία εκβλάστησης νέων αγγείων που προέρχονται από τα προϋπάρχοντα αγγεία. Οι παράγοντες οι οποίοι επάγουν την αγγειογένεση είναι ο b-FGF και ο VEGF).





Η διαδικασία αυτή κορυφώνεται καθώς ο κοκκιώδης ιστός γεμίζει το χώρο της τομής. Τα ινίδια του κολλαγόνου γίνονται πολυπληθέστερα και γεφυρώνουν την τομή, ενώ η επιδερμίδα αποκτά το φυσιολογικό της πάχος με κερατινοποίηση της επιφανειακής στιβάδας.

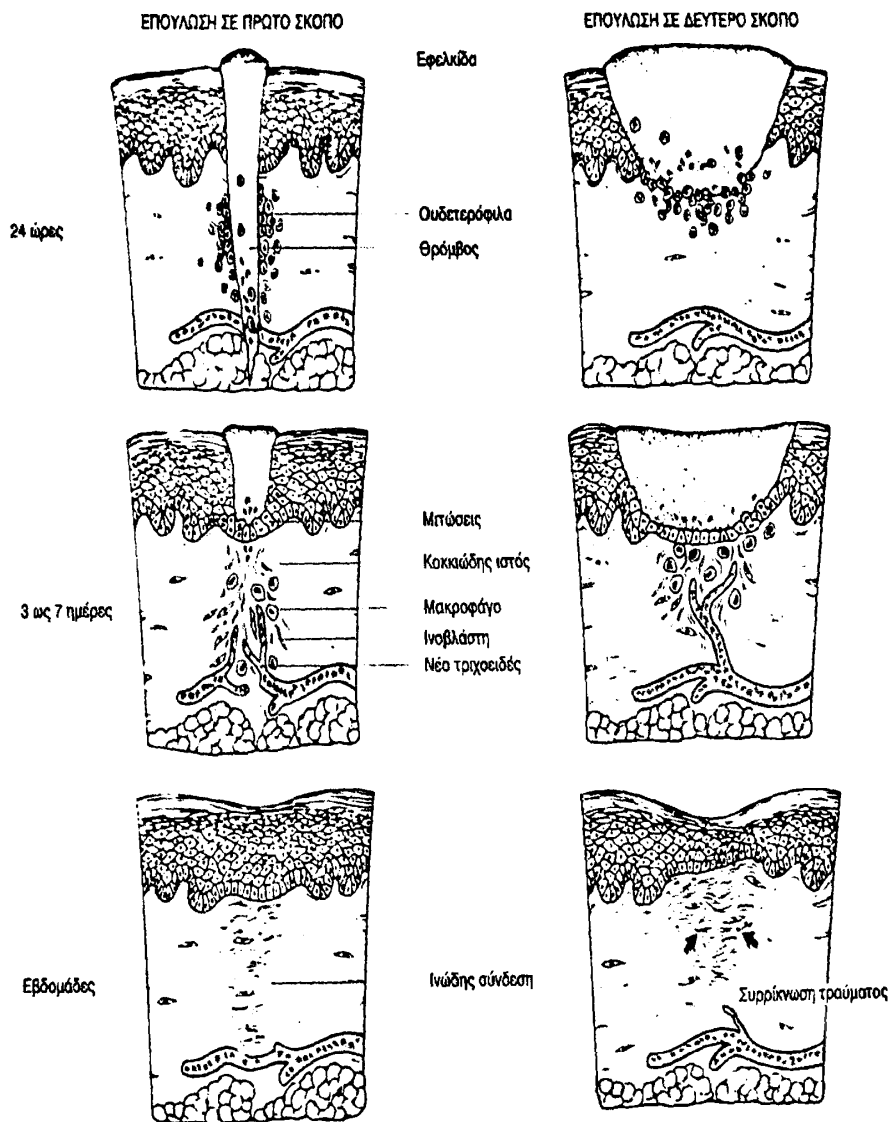
**2η Εβδομάδα:** Συνεχίζεται η συσσώρευση κολλαγόνου και ο πολλαπλασιασμός ινοβλαστών, ενώ η λευκοκυτταρική διήθηση το οίδημα και η αυξημένη αγγείωση περιορίζονται σε σημαντικό βαθμό.

**1ος Μήνας:** Η ουλή αποτελείται από κυτταροβριθή συνδετικό ιστό ,χωρίς κύτταρα φλεγμονής, που καλύπτεται από φυσιολογική επιδερμίδα.

Η ίνωση επιτυγχάνεται με τη μετανάστευση και πολλαπλασιασμό των ινοβλαστών στην θέση της βλάβης και εναπόθεση της εξωκυττάριας ουσίας (ECM) από αυτά τα κύτταρα, με συνέπεια την παραγωγή και συσσώρευση κολλαγόνου στην περιοχή της βλάβης. Η κολλαγονοσύνθεση φτάνει στο μέγιστο περί την 1η-2η εβδομάδα , ενώ η εναπόθεση κολλαγόνου περί την 3η- 4η εβδομάδα.

Η επιστράτευση και διέγερση των ινοβλαστών κατευθύνεται από διάφορους αυξητικούς παράγοντες, όπως το ενεργοποιημένο ενδοθήλιο και τα διάφορα κύτταρα της φλεγμονής (μακροφάγα, λεμφοκύτταρα) τα οποία παράγουν PDGF, b-FGF, TGF- $\beta$ (8,10,29,30).





Σχήμα 5.1 Βαθμίδες ίασης τραύματος σε πρώτο σκοπό (αριστερά) και σε δεύτερο σκοπό δεξιά.

## 5.2 Επούλωση κατά δεύτερο σκοπό

Όταν η απώλεια κυττάρων ή ιστού είναι περισσότερο εκτεταμένη όπως σε έμφραγμα, φλεγμονώδη ελκοποίηση, μεγάλα τραύματα η διεργασία αποκατάστασης είναι περισσότερο πολύπλοκη.

Στις περιπτώσεις αυτές παρατηρείται εκτεταμένη ανάπτυξη κοκκιώδους ιστού από τα όρια του τραύματος που με τον καιρό ακολουθείται από συσσώρευση εξωκυττάριας ουσίας και ουλοποίηση. Η κατάσταση αυτή ορίζεται ως *ουλοποίηση κατά δεύτερο σκοπό*. Ενώ η επούλωση ενός τραύματος με αυτόν τον τρόπο δεν μπορεί να αποκαταστήσει την αρχική αρχιτεκτονική του ιστού.

Αυτή η μορφή διαφέρει από την πρωτογενή ουλοποίηση από πολλές απόψεις: Μεγαλύτερος όγκος νεκρωτικών απορριμμάτων που θα πρέπει να απομακρυνθούν (εντονότερη φλεγμονή) που συνεπάγεται μεγαλύτερη πιθανότητα δευτερογενούς βλάβης. Δημιουργούνται μεγαλύτερα ποσά κοκκιώδους ιστού, για την πλήρωση του ελλείμματος που καταλήγει σε μεγαλύτερη μάζα ουλώδους ιστού.

Επίσης εμφανίζεται το φαινόμενο ρίκνωσης τραύματος όπου οφείλεται στη σύσπαση των μυοϊνοβλαστών στο στάδιο σχηματισμού κοκκιώδους ιστού, με συνέπεια ένα μεγάλο τραύμα να μπορεί να περιοριστεί σε διάστημα 6 εβδομάδων έως και 10% του αρχικού του μεγέθους.<sup>(8,28)</sup>

## 5.3 Επούλωση κατά τρίτο σκοπό

Συνήθως αφορά ρυπαρά ή μη σαφώς αφοριζόμενα τραύματα (εγκαύματα-ισχαιμικές νεκρώσεις, ή περιπτώσεις που το μέγεθος της ιστικής βλάβης δεν είναι ακόμα ξεκάθαρο), τα οποία μένουν ανοιχτά ώστε να αποφευχθεί η φλεγμονή και επακόλουθη πιθανή διάσπαση.



Στην αρχική φάση οι δυνάμεις του ξενιστή (φαγοκυττάρωση, αγγειογένεση) αντιμετωπίζουν τους βλαπτικούς παράγοντες (λοιμογόνους, αγγειακής αιτιολογίας) επάγοντας τους μηχανισμούς νεαροποίησης του τραύματος.

Σε δεύτερη φάση και σε καλύτερες συνθήκες, η επούλωση που ακολουθεί είναι ανεπίπλεκτη και το αποτέλεσμα είναι όπως στην επούλωση κατά Πρώτο σκοπό.<sup>(6-9,28)</sup>

#### 5.4 Επούλωση τραυμάτων μερικού πάχους

Αφορούν στο επιθήλιο και ανώτερο χόριο, συνήθως επουλώνονται με επιθηλιοποίηση μόνο. Κύτταρα από τους τριχικούς θυλάκους και τους πόρους των σμηγματογόνων αδένων πολλαπλασιάζονται και καλύπτουν το εκτεθειμένο χόριο. Συνήθως δε γίνεται παρά ελάχιστη κολλαγονοσύνθεση και δε συμβαίνει σχεδόν ποτέ σύσπαση του τραύματος.<sup>(13,16)</sup>

#### 5.5 Ανθεκτικότητα τραύματος.

Τα τραύματα που έχουν συρραφεί προσεκτικά, εμφανίζουν ανθεκτικότητα σε έλξη περίπου 70%, σε σχέση με το άθικτο δέρμα, λόγω της παρουσίας ραμμάτων. Μετά την αφαίρεση η ανθεκτικότητα περιορίζεται αρχικά στο 10% ενώ στην συνέχεια αυξάνεται ραγδαία σε 4 εβδομάδες ώσπου τελικά να αποκτήσει 70-80% της φυσιολογικής ανθεκτικότητας σε 3 μήνες. Το γεγονός αυτό οφείλεται στην υπερίσχυση σύνθεσης του κολλαγόνου έναντι της διάσπασής του, στους 2 πρώτους μήνες.

Τοπικοί και συστηματικοί παράγοντες που επηρεάζουν την επούλωση είναι:

**Η λοίμωξη:** Επιβραδύνει την φάση της φλεγμονής και αυξάνει την ιστική βλάβη .

**Η διατροφή:** Η ανεπάρκεια πρωτεϊνών και ιδιαίτερα η στέρηση της βιταμίνης C, αναστέλλουν την σύνθεση κολλαγόνου και επιβραδύνουν την ίαση.



**τα στεροειδή:** εμποδίζουν τον σχηματισμό κοκκιώδους ιστού, η δε ανοσοκαταστατική τους δράση προδιαθέτει την λοίμωξη.

**Ο τύπος του ιστού:** πλήρης αποκατάσταση παρατηρείται μόνο σε ιστούς που αποτελούνται από σταθερά και ασταθή κύτταρα.

**Ο σακχαρώδης διαβήτης:** σχετίζεται με την κακή επούλωση λόγω αγγειακών αλλοιώσεων της κακής αιμάτωσης και αυξημένη ευαισθησία στην λοίμωξη<sup>(8,9,13,16)</sup>.

| <b>Τοπικοί παράγοντες</b>  | <b>Γενικοί παράγοντες</b>        |
|----------------------------|----------------------------------|
| Παροχή αίματος             | Ηλικία                           |
| Απονεύρωση                 | Αναιμία                          |
| Αιμάτωμα                   | Αντιφλεγμονώδη φάρμακα           |
| Λοίμωξη – τοπική           | Κυτταροτοξικά                    |
| Μηχανική τάση              | Ορμόνες                          |
| Προστασία – όπως επιθέματα | Λοίμωξη-συστηματική              |
| Χειρουργική τεχνική        | Ίκτερος                          |
| Υλικό ράμματος και τεχνική | Κακοήθης νόσος                   |
| Τύπος ιστού                | Κακοήθη θρέψη                    |
|                            | Παχυσαρκία                       |
|                            | Θερμοκρασία                      |
|                            | Τραύμα, υπογκαιμία και υποξαιμία |
|                            | Ουραιμία                         |
|                            | Έλλειψη βιταμινών                |
|                            | Έλλειψη ιχνοστοιχείων            |

**Πίνακας 5.2.** Παράγοντες που επηρεάζουν την επούλωση στην χειρουργική πράξη.



## 5.6 Ανωμαλίες επούλωσης

Οι Υπερτροφικές ουλές και τα χηλοειδή είναι μορφές υπερβολικής επούλωσης που απαντώνται μόνο στον άνθρωπο

Συμβαίνουν σε 5-15% των τραυμάτων και 5-15 φορές συχνότερα σε μη λευκούς. Τραύματα που δημιουργούνται κάθετα ως προς τις δερματικές γραμμές ή εντοπίζονται σε περιοχές με παχύ χόριο (ράχη) ή σε ευπαθείς θέσεις όπως το λοβίο του ωτός, η προστερνική χώρα, και ο δελτοειδής μπορεί να καταλήξουν με υπερτροφικές ουλές ή χηλοειδή.<sup>(30,31,32)</sup>

Οι υπερτροφικές ουλές αναπτύσσονται εξ ορισμού μέσα στα όρια της αρχικής ουλής, ενώ τα χηλοειδή αναπτύσσονται πέραν των αρχικών ορίων. Οι υπερτροφικές ουλές αρχίζουν να αναπτύσσονται μέσα σε μερικές εβδομάδες από τον τραυματισμό, ενώ τα χηλοειδή μπορούν να αναπτυχθούν μέχρι και ένα χρόνο αργότερα<sup>(32-38)</sup>.



Εικόνα 5.2. Υπερτροφικές ουλές

## 5.7 Ιστολογικές διαφορές

Ιστολογικά παρατηρούνται σημαντικές διάφορες μεταξύ υπερτροφικών ουλών και χηλοειδών και στις δυο οντότητες παρατηρείται αγγειοβρίθεια, αυξημένη πυκνότητα εμφάνισης μεσεγχυματικών κύτταρων και πεπαχυσμένη επιδερμική στιβάδα.

Οι ίνες του κολλαγόνου οργανώνονται σε δίνες. Στις υπερτροφικές ουλές οι ίνες του κολλαγόνου είναι περισσότερο επίπεδες και περισσότερο ομοιογενείς στην εμφάνιση από ότι στο φυσιολογικό δέρμα ή στις ουλές, βιοχημικά υπάρχουν διαφορές ανάμεσα στις υπερτροφικές ουλές, τα χηλοειδή τις ουλές και το φυσιολογικό άθικτο δέρμα.<sup>(8)</sup>

Η σύνθεση κολλαγόνου στα χηλοειδή είναι 20 φορές μεγαλύτερη από τι στο φυσιολογικό δέρμα και 3 φορές μεγαλύτερη από τι στις υπερτροφικές ουλές. Παρατηρείται, ελαττωμένη δραστηριότητα αναστολέων των πρωτεασών του ορού (α1 αντιθρυψίνη και α2 μακροσφαιρίνη), που καταλήγει σε ελαττωμένη αποδόμηση του κολλαγόνου, αυξημένη δραστηριότητα της κολλαγονάσης και μειωμένη σύνδεση (cross linkage) των ινιδίων μεταξύ τους σε σύγκριση με τις ώριμες ουλές.<sup>(26,27)</sup>

Όσον αφορά στην θεμέλια ουσία, φαίνεται να περιέχει περισσότερο υαλουρονικό οξύ και ινοσυνδετίνη στις ανώμαλες ουλές.

Το κολλαγόνο στο φυσιολογικό δέρμα είναι τύπου III σε αναλογία 21%, ενώ στα χηλοειδή σε αναλογία 32%, το οποίο επιπλέον δεν έχει «ωριμάσει» με τη δημιουργία δεσμών μεταξύ των αλύσων με αποτέλεσμα τη μη επίτευξη σταθερότητας στην ουλή<sup>(33)</sup>.

Αναφορικά με τη δράση των αυξητικών παραγόντων, έχει βρεθεί ότι ελαττώνεται η δράση των ινοβλαστών με την έκθεση σε EGF, ενώ δεν επηρεάζεται από την έκθεση σε TNF-α ή PDGF. Επιπλέον ινοβλάστες από υπερτροφικές ουλές δεν ανταποκρίνονται στην επαγωγική δράση του TGF-β, όπως συμβαίνει με τους ινοβλάστες του φυσιολογικού δέρματος<sup>(6,32,33)</sup>.



## 5.8 Αντιμετώπιση ανωμαλιών επούλωσης

Η ιδανική αντιμετώπιση των υπερτροφικών ουλών και των χηλοειδών δεν είναι ακόμα ξεκάθαρη. Η θεραπευτική τους αντιμετώπιση είναι εμπειρική και η συχνότητα υποτροπής τους μεγάλη.

Η χειρουργική εξαίρεση ως μόνο μέσο έχει το μεγαλύτερο ποσοστό υποτροπής. Μπορεί να βοηθηθεί από περί-εγχειρητική ακτινοθεραπεία ή τοπικές εγχύσεις στεροειδών, προσπάθειες δηλαδή να ελαττωθεί η τοπική μετεγχειρητική φλεγμονώδης απάντηση. Πρόσφατα ανακοινώθηκε ότι η χορήγηση ακτινοβολίας μετά την εκτομή ελαττώνει την υπότροπη των χηλοειδών<sup>(33)</sup>.

Όσον αφορά την μη χειρουργική αντιμετώπιση των χηλοειδών κατατάσσεται αδρά σε δυο κατηγορίες.

**Φυσική** : Η ακτινοθεραπεία (από μόνη της δε φαίνεται να έχει κάποιο ρόλο), υπέρηχοι, κρυοθεραπεία, πίεση με επιθέματα σιλικόνης (εφαρμογή για μακρό χρονικό διάστημα 4-6 μήνες νυχθημερόν), laser ( δεν υπάρχουν ακόμη επαρκή στοιχεία για να υποστηρίξουν τη χρήση του)

**Φαρμακολογική** : Η χορήγηση στεροειδών ενδοβλαβικά με πιθανές παρενέργειες που περιλαμβάνουν την ατροφία, τον αποχρωματισμό και τελαγγειαεκτασίες. Με πενικιλαμίνη, ρετινοϊκό οξύ, θειική δεξτράνη, τζέλ σιλικόνης, ταινίες ψευδαργύρου ενώ πρόσφατα έχει διερευνηθεί η δράση της ιντερφερόνης ( $\gamma$  για τις υπερτροφικές ουλές και  $\alpha_2$  για τα χηλοειδή)<sup>(8,32,33)</sup>.





## ΚΕΦΑΛΑΙΟ 6<sup>ο</sup>

### ΗΛΕΚΤΡΟΜΑΓΝΗΤΙΚΑ ΠΕΔΙΑ

Οι περισσότερες διαδικασίες που συναντούμε στην φύση είναι αργά μεταβαλλόμενες προς μία κατάσταση ισορροπίας.<sup>39)</sup> Οποιαδήποτε διαταραχή από την κατάσταση αυτή μπορεί να εξηγηθεί στα πλαίσια εφαρμογής μιας δύναμης.

Όπως επίσης η επαναφορά του συστήματος σε μια νέα κατάσταση δυναμικής ισορροπίας σχετίζεται με την εφαρμογή εξωτερικών δυνάμεων οι οποίες μπορούν να επιταχύνουν την φυσική τάση του συστήματος να επανέλθει εκ νέου σε κατάσταση ισορροπίας<sup>(40)</sup>. Γίνεται κατανοητό ότι ο ρόλος της δύναμης σε μία διαδικασία αποτελεί τον κύριο παράγοντα που καθορίζει την εξέλιξη του συστήματος. Πρέπει να τονίσουμε στο σημείο αυτό ότι όλες οι επιδρώσες δυνάμεις για να ικανοποιούν τα χαρακτηριστικά που περιγράψαμε πιο πάνω πρέπει να 'ναι μικρής εμβέλειας έτσι ώστε να μην προκαλέσουν μόνιμες αλλοιώσεις στο αρχικό σύστημα οδηγώντας το σε μια άλλη μορφή.

Στα πλαίσια της διατριβής αυτής διερευνάται ο ρόλος των ηλεκτρομαγνητικών δυνάμεων που προκαλούνται από την εφαρμογή, έντασης ενέργειας  $35-80 \times 10^6$  W, περιόδου  $T=10^{-6}$  sec, μικρής διάρκειας EMF στην διαδικασία επούλωσης τραύματος κατά δεύτερο σκοπό σε επίμυες Wistar. Είναι αναγκαίο, για αυτό το λόγο, να αναφέρουμε κάποια στοιχεία όσον αφορά το Η/Μ πεδίο.

Η έννοια του πεδίου δυνάμεων ικανοποιεί την ανάγκη για την κατανόηση των αλληλεπιδράσεων μεταξύ δύο σωμάτων που βρίσκονται σε απόσταση μεταξύ τους. Στα πλαίσια της θεωρίας αυτής ως πεδίο ορίζεται ο χώρος μέσα στον οποίο εάν φέρουμε το κατάλληλο υπόθεμα θα του ασκηθεί μία δύναμη<sup>(41)</sup>.

Εξ ορισμού γίνεται σαφές ότι κάθε είδος δύναμης παράγεται από την κατάλληλη στοιχειώδη αλληλεπιδρώσα ποσότητα. Ως παραδείγματα αναφέρουμε, την βαρυτική



δύναμη η οποία προέρχεται από την αλληλεπίδραση στοιχειωδών μαζών, την ισχυρή πυρηνική η οποία προέρχεται από την αλληλεπίδραση αδρονίων (πρωτόνια, νετρόνια). Πριν προχωρήσουμε στην πηγή παραγωγής των ηλεκτρομαγνητικών δυνάμεων πρέπει να τονίσουμε ότι κάθε πεδίο έχει και ένα εύρος στο οποίο κάνει αισθητή την παρουσία του. Το εύρος του βαρυτικού είναι άπειρο, γι'αυτό οι δυνάμεις αυτές είναι υπεύθυνες για οτιδήποτε συμβαίνει σε κοσμολογική κλίμακα, ενώ το εύρος των πυρηνικών δυνάμεων περιορίζεται στο χώρο του πυρήνα και για μεγαλύτερες αποστάσεις μηδενίζονται. Για αποστάσεις μεγαλύτερες ή ίσες της ατομικής διάστασης και μικρότερες των μερικών χιλιομέτρων οι δυνάμεις που παίζουν τον κύριο λόγο είναι οι ηλεκτρομαγνητικές. Ειδικότερα οι διεργασίες που λαμβάνουν χώρα σε μοριακό επίπεδο καθορίζονται εξ' ολοκλήρου από ηλεκτρομαγνητικές δυνάμεις.

Ένα από τα χαρακτηριστικότερα παραδείγματα όπου οι νόμοι του ηλεκτρομαγνητικού πεδίου βρίσκουν καθολική εφαρμογή είναι το ανθρώπινο σώμα καθώς οι ποσότητες καλίου και νατρίου που μεταφέρονται με το αίμα καθιστούν ένα μεταβαλλόμενο ηλεκτρομαγνητικό πεδίο χαμηλής έντασης το οποίο είναι δυνατό να αλληλεπιδράσει με οποιοδήποτε εξωτερικό ερέθισμα της ίδιας μορφής<sup>(56-58)</sup>. Το ηλεκτρομαγνητικό πεδίο αποτελεί την ταυτόχρονη διάδοση στο χώρο ενός ηλεκτρικού και ενός μαγνητικού πεδίου.

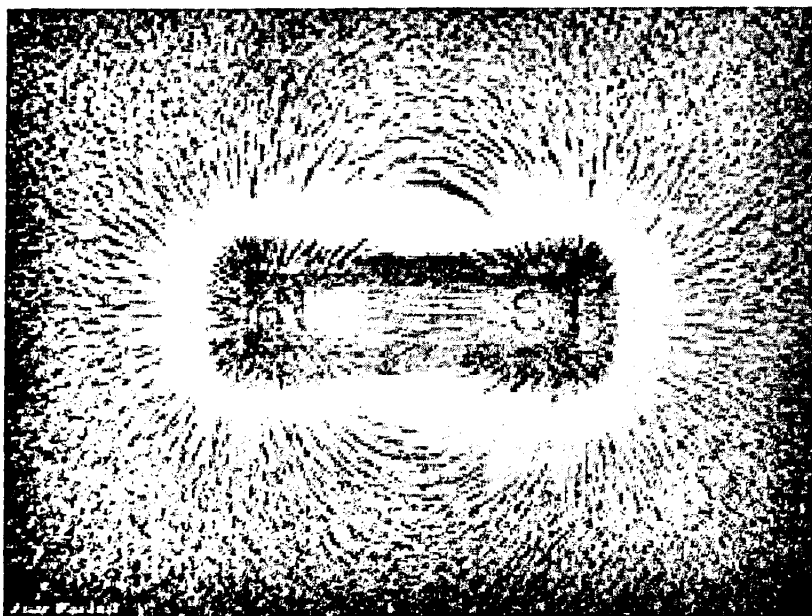
## 6.1 Είδη ηλεκτρομαγνητικών πεδίων

Στο σημείο αυτό πρέπει να κάνουμε διάκριση μεταξύ των στατικών και των δυναμικά εξελισσόμενων ηλεκτρικών και μαγνητικών πεδίων. Τα στατικά πεδία-ηλεκτροστατικό, μαγνητοστατικό - παράγονται από την ύπαρξη στο χώρο ακίνητων φορτίων και στοιχειωδών μαγνητικών ποσοτήτων αντίστοιχα. Αποτελούν μια ιδεατή περίπτωση του γενικότερου ηλεκτρομαγνητικού πεδίου και αναφέρονται σε συστήματα που ακινητοποιούν το ένα ως προς το άλλο ή το ένα κινείται με σταθερή ταχύτητα ως



προς το άλλο (αδρανειακά). Κάθε φορά όμως που έχουμε αλλαγή της ταχύτητας ενός φορτισμένου σωματιδίου τότε παράγονται στο χώρο μεταβαλλόμενα ηλεκτρομαγνητικά πεδία. Τόσο το ηλεκτρικό όσο και το μαγνητικό έχουν την ίδια πηγή παραγωγής (μεταβαλλόμενης ταχύτητας φορτία) για αυτό το λόγο η ύπαρξη μαγνητικού πεδίου στο χώρο συμβαδίζει πάντοτε με την ύπαρξη του αντίστοιχου ηλεκτρικού. Ορίζουμε ως ηλεκτρομαγνητική αλληλεπίδραση τις δυνάμεις που αναπτύσσονται μεταξύ δύο κατανομών φορτίου όταν η μία επιταχύνεται ή επιβραδύνεται ως προς την άλλη.

Για να περιγράψουμε ένα πεδίο χρησιμοποιούμε την έννοια των δυναμικών γραμμών. Η δυναμική γραμμή αποτελεί επινόηση σχηματικής περιγραφής του πεδίου και έχει επαληθευτεί από πειραματικές διεργασίες. <sup>(41,42)</sup>



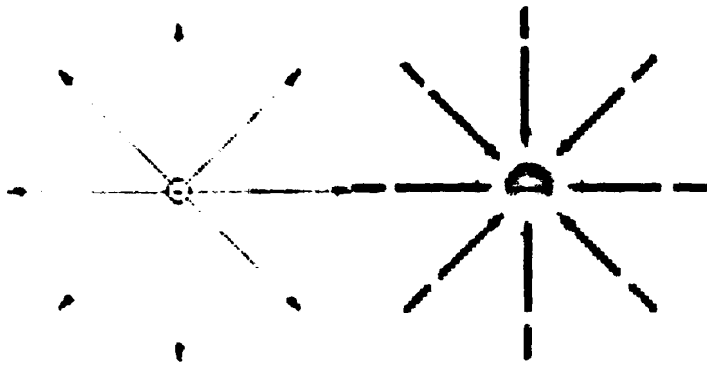
Εικόνα 6.1. Δυναμικές γραμμές ρινισμάτων σιδήρου γύρω από έναν φυσικό μαγνήτη. Με N και S σημειώνονται ο βόρειος και ο νότιος πόλος του μαγνήτη.

Εφοδιάζουμε τις δυναμικές γραμμές με τις παρακάτω ιδιότητες:

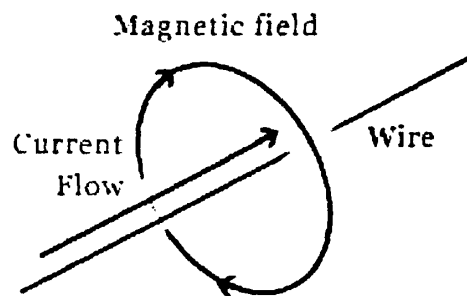
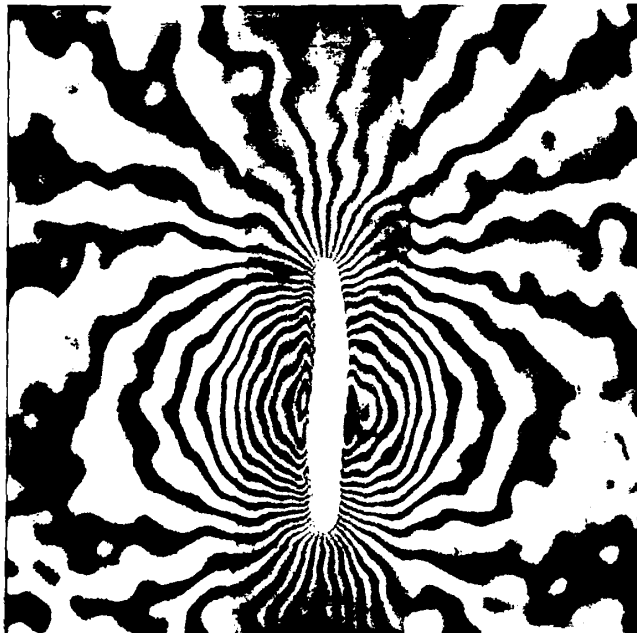
- α) η ένταση του πεδίου είναι εφαιπτόμενη σε κάθε σημείο της δυναμικής γραμμής
- β) η πυκνότητα ή η αραιότητα τους είναι ανάλογη του μέτρου της έντασης του πεδίου  
(σχετίζεται με την χωροθέτηση του βρόχου πάνω στο ξύλινο κουτί)



γ) είναι ανοικτές για το ηλεκτροστατικό πεδίο , ενώ για το ηλεκτρικό και το μαγνητικό πεδίο είναι κλειστές



Σχήμα 6.1α,β . Οι δυναμικές γραμμές ηλεκτροστατικού πεδίου για θετικό και αρνητικό αντίστοιχα φορτίο.



Εικόνα 6.2. Μαγνητικές δυναμικές γραμμές που δημιουργούνται γύρω από έναν ρευματοφόρο αγωγό σε συνθετικό νανοσωλήνα άνθρακα- σιδήρου και δίπλα του σχηματικά η μορφή των δυναμικών γραμμών σε σχέση με το ρεύμα που διαρρέει τον αγωγό



Οι τελευταίες είναι χαρακτηριστικές μη διατηρητικών πεδίων όπου το έργο της δύναμης εξαρτάται από την διαδρομή που ακολουθεί το σώμα. Η συνολικά μεταφερόμενη ενέργεια σε ένα σημείο του χώρου είναι και το τελικό ζητούμενο σε μία διεργασία χρήσης ηλεκτρομαγνητικών πεδίων.

Για να γίνει κατανοητός ο ρόλος των ηλεκτρομαγνητικών πεδίων είναι αναγκαία μία σύντομη μαθηματική περιγραφή τους. Κάθε ηλεκτρομαγνητικό πεδίο είναι το αποτέλεσμα της ταυτόχρονης διάδοσης στο χώρο ενός ηλεκτρικού και ενός μαγνητικού, τα οποία χωρίς λάθος της γενικότητας μπορούν να περιγράψουν από τις παρακάτω σχέσεις

$$E = E_0 \sin\left[2\pi\left(\frac{t}{T} - \frac{x}{\lambda}\right)\right]$$

(1.1)

$$B = B_0 \sin\left[2\pi\left(\frac{t}{T} - \frac{x}{\lambda}\right)\right]$$

(1.2)

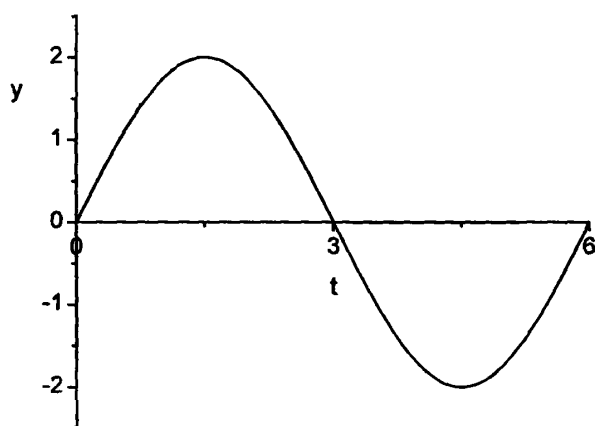
Οι σχέσεις (1.1) και (1.2) περιγράφουν ένα ηλεκτρικό και ένα μαγνητικό πεδίο αντίστοιχα σε μεγάλη απόσταση από την πηγή παραγωγής τους. Στις παραπάνω σχέσεις οι ποσότητες  $E_0$  και  $B_0$  ε και εκφράζουν τα πλάτη (εντάσεις) του ηλεκτρικού και του μαγνητικού πεδίου τα οποία υπακούουν στην παρακάτω σχέση:

$$\frac{E_0}{B_0} = c$$

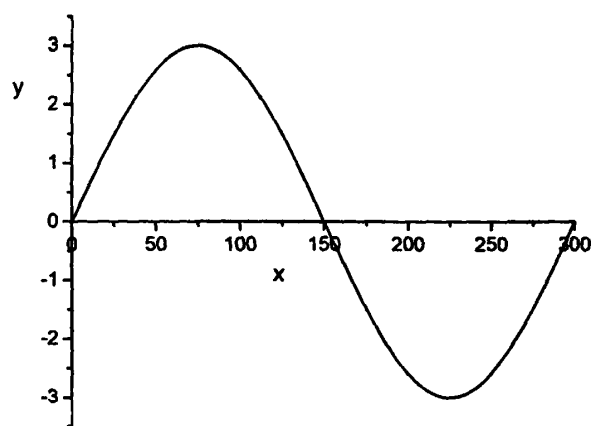
(1.3)



όπου η ταχύτητα του φωτός στο μέσο που διαδίδεται το πεδίο και εάν το μέσο αυτό είναι το κενό ή ο αέρας τότε έχει την τιμή  $3 \times 10^8$  m/sec. Η ίδια τιμή πρέπει να εξασφαλίζεται και από τον λόγο  $\lambda / T$ . Όπου  $T$  είναι η περίοδος του κύματος (Εικ.5) ενώ η παράμετρος  $\lambda$  εκφράζει το μήκος κύματος, απόστασης που διανύει το κύμα σε χρόνο μιας περιόδου (Εικ.6). Το κύμα εκτελεί δύο κινήσεις, ευθύγραμμη και ομαλή κατά την διεύθυνση διάδοσης, και ταλαντωτική κάθετη στην διάδοση όσο αφορά τα πεδία  $E$  και  $B$ . Η συνολική εικόνα ενός κύματος φαίνεται στην παρακάτω εικόνα.



Σχήμα 6.3 Γραφική παράσταση της απομάκρυνσης σαν συνάρτηση του χρόνου για μία περίοδο



Σχήμα 6.4 Γραφική παράσταση της απομάκρυνσης σαν συνάρτηση της μετατόπισης του κύματος για απόσταση ίση με ένα μήκος κύματος

Η συνολική εικόνα ενός ηλεκτρομαγνητικού κύματος φαίνεται στην παρακάτω εικόνα όπου η διάδοσης του κύματος γίνεται κατά τον άξονα τον  $x$ , ενώ το ηλεκτρικό και το μαγνητικό πεδίο ταλαντώνονται κατά τις διευθύνσεις  $y$  και  $z$  αντίστοιχα.

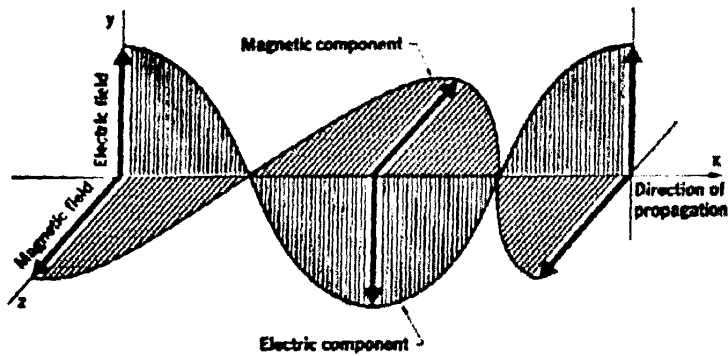


Figure 12-6. Electromagnetic wave. The electric and magnetic fields are each at right angles to the direction of propagation. Shown is a graph of the two fields at a given instant.

### Σχήμα 6.5 Ηλεκτρομαγνητικό κύμα

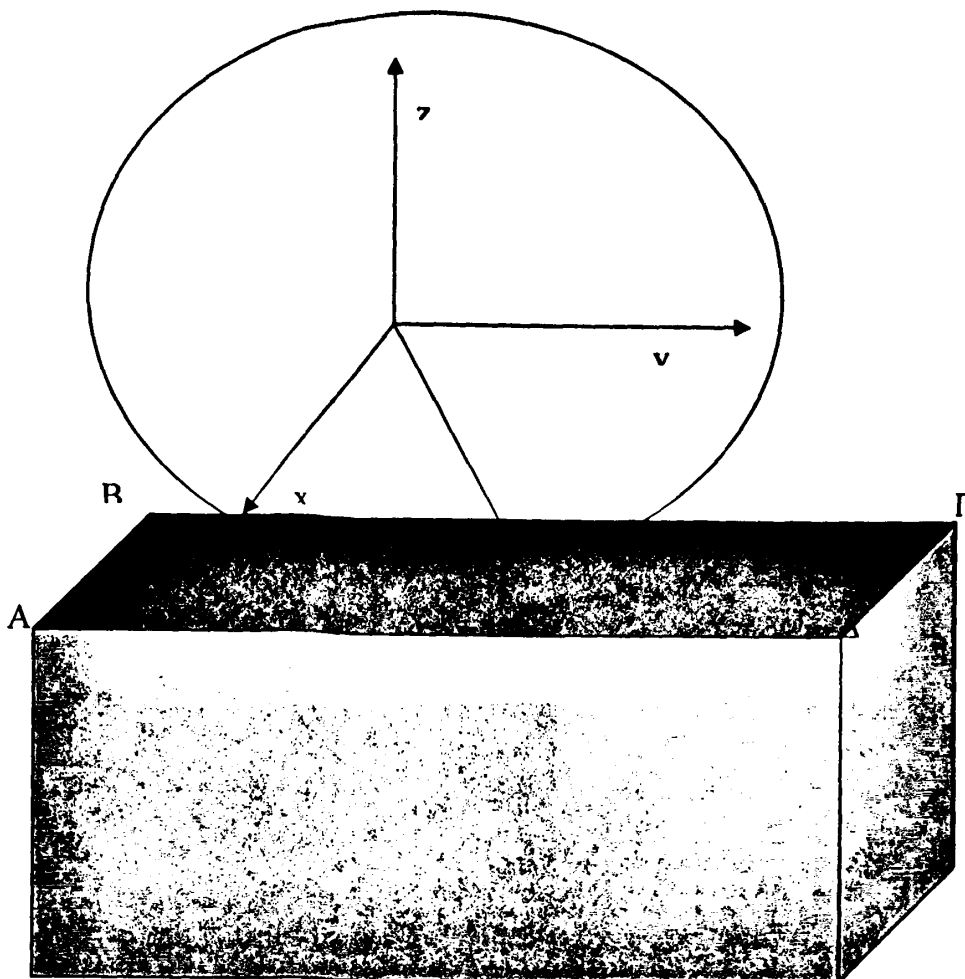
#### 6.2 Ενέργεια ηλεκτρομαγνητικών πεδίων

Έστω η πηγή παραγωγής ενός Η/Μ είναι ένα ταλαντούμενο φορτίο στην αρχή ενός τριόρθογώνιου συστήματος αναφοράς. Τότε σε απόσταση  $r$  από την αρχή των αξόνων το ποσό της ενέργειας που προσπίπτει σε μία στοιχειώδη επιφάνεια  $dS$  δίνεται από το διάνυσμα Poynting <sup>(41,77,82)</sup>

$$\mathbf{s} = \frac{1}{2\mu_0} \mathbf{E} \times \mathbf{B}$$

(1.4)



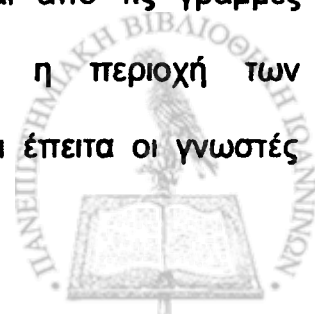


**Σχήμα 6.6.** Ενέργεια ανά μονάδα εμβαδού και ανά μονάδα χρόνου που μεταφέρουν τα πεδία κύματος.

### 6.3 Ηλεκτρομαγνητικό φάσμα.

Στο παρακάτω σχήμα παρίσταται το ηλεκτρομαγνητικό φάσμα.

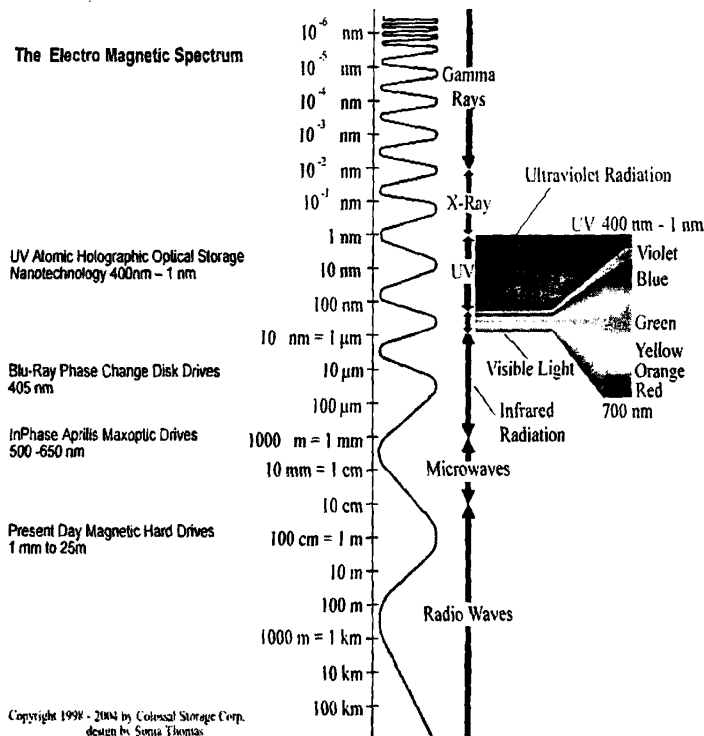
Κάθε περιοχή συχνοτήτων έχει τις δικές της εφαρμογές. Ξεκινώντας από τις χαμηλές συχνότητες εμφανίζεται η ακτινοβολία που εκπέμπεται από τις γραμμές μεταφοράς ηλεκτρικού ρεύματος, στην συνέχεια βρίσκεται η περιοχή των ραδιοσυχνοτήτων, ακολουθεί το οπτικό τμήμα του φάσματος και έπειτα οι γνωστές





υπέρουθρες και υπεριώδεις ακτινοβολίες. Στις μεγαλύτερες συχνότητες υπάρχουν οι ακτίνες X και γ. Η περιοχή από τις υψηλές ραδιοσυχνότητες έως τις υπέρυθρες ονομάζεται μικροκυματική.<sup>(41)</sup>

Κατά την ακτινοβολήση μιας περιοχής με Η/Μ πεδίο πέρα από τον παράγοντα της απόστασης και την ένταση των πεδίων ένας εξίσου σημαντικός παράγοντας είναι το μέτρο του μήκους κύματος. Ενδεικτικά αναφέρουμε τις τρεις γενικές κατηγορίες  $\lambda < 400\text{nm}$  υπεριώδες φάσμα, περιοχή ορατού φωτός, το μήκος κύματος μεταξύ 400 και 700 nm και τέλος περιοχή του υπερέυθρου. Η ταξινόμηση στις τρεις μεγάλες περιοχές γίνεται με κριτήριο, πέρα από την ανθρώπινη όραση, το ποσό της ενέργειας που μεταφέρει μία φωτεινή δέσμη και τις διαταραχές που μπορεί να προκαλέσει σ' έναν οργανισμό. Ο αναλυτικός διαχωρισμός φαίνεται στο παρακάτω σχήμα.



Σχήμα 6.7. Ο αναλυτικός διαχωρισμός

Ο διαχωρισμός των ακτινοβολιών είναι πολύ χρήσιμος σε ότι έχει να κάνει με τα βιολογικά τους αποτελέσματα. Στις υψηλές συχνότητες η ηλεκτρομαγνητική ακτινοβολία



έχει αρκετή δράση ώστε να μπορεί να αλλάξει τις βιολογικές δομές του κυττάρου αλλά με συνακόλουθη αύξηση της θερμοκρασίας του<sup>(62-64,76,79-82)</sup>. Ενώ τα ΗΜΠ χαμηλών

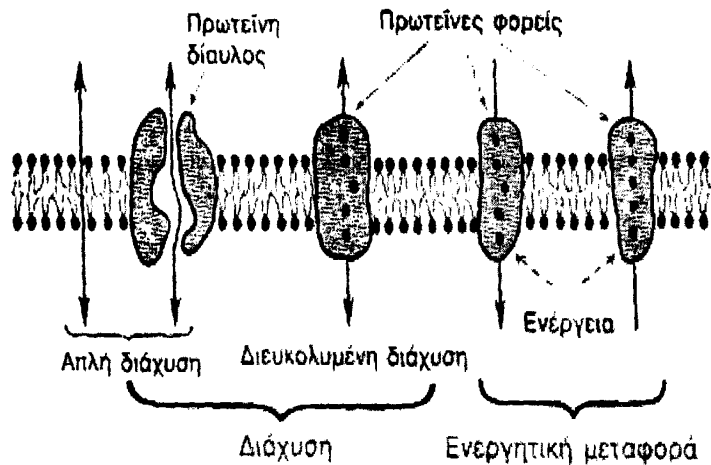
συχνοτήτων επιδρούν στους ιστούς μέσω ηλεκτροδιέγερσης των κυττάρων φαινόμενο που αναλύεται εκτενέστερα παρακάτω.

#### 6.4 Ηλεκτρομαγνητικά πεδία και κυτταρική μεμβράνη.

Είναι γνωστό από την φυσιολογία πως στις δυο πλευρές της κυτταρικής μεμβράνης υπάρχει ένας μεγάλος αριθμός ελεύθερων ιόντων ( $K^+$ ,  $Na^+$ ,  $Cl^-$ ,  $Ca^{2+}$ ) το οποίο ελέγχει τον κυτταρικό όγκο και παίζει σημαντικό ρόλο στην ομοιόσταση και το ηλεκτρικό φορτίο της κυτταρικής μεμβράνης<sup>(42)</sup>.

Η ιοντική ροή διαμέσου της κυτταρικής μεμβράνης εξαρτάται από τη συγκέντρωση των ιόντων και το ηλεκτροχημικό δυναμικό ανάμεσα στις δυο πλευρές της κυτταρικής μεμβράνης. Σε καταστάσεις ηρεμίας το ηλεκτρικό δυναμικό της κυτταρικής μεμβράνης για τα περισσότερα κύτταρα κυμαίνεται ανάμεσα από  $-60$  mV έως  $-90$  mV , με την εσωτερική πλευρά φορτισμένη αρνητικά και την εξωτερική θετικά. Η κατάσταση αυτή ονομάζεται δυναμικό ηρεμίας της μεμβράνης. Η κυτταρική μεμβράνη αποτελείται από μια λιπιδική διπλοστιβάδα, με μεγάλο αριθμό πρωτεϊνών, («μεταφορικές, πρωτεΐνες διάυλοι και πρωτεΐνες φορείς), οι οποίες επιπλέουν μέσα στο λιπιδικό στρώμα, και από τις οποίες πολλές διαπερνούν όλο το πάχος της μεμβράνης.





Σχήμα 6.8 Δομή κυτταρικής μεμβράνης.

Ένας από τους μηχανισμούς ανταλλαγής ιόντων μεταξύ ενδοκυττάριου και εξωκυττάριου χώρου είναι διαμέσου των πρωτεϊνικών διαμεμβρανικών διαύλων όπου όταν ένα ιόν φτάσει την ηλεκτρεργετική δύναμη των ιόντων\*\*, που απαιτείται ενεργοποιούνται οι διάυλοι και η δίοδος τους μέσα από αυτούς, με συνέπεια ανακατανομή φορτίων μεμβράνης και επίδραση στην κυτταρική λειτουργία. (42,63-71)

Η ηλεκτρεργετική δύναμη των ιόντων, δίνεται από την

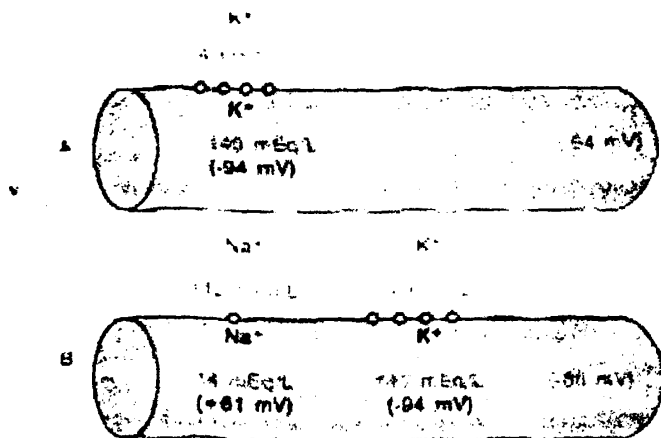
\*\*Εξίσωση Νερνστ:  $EM\Phi (mV) = \pm 61mV \log \frac{\text{Συγκ. μέσα}}{\text{Συγκ. έξω}}$



### 6.5 Μηχανισμός δράσης των ηλεκτρομαγνητικών πεδίων

Η μελέτη των δράσεων των ΗΜΠ στους βιολογικούς ιστούς αποτελεί αντικείμενο έντονης έρευνας τόσο για τις σημαντικές εφαρμογές των τεχνολογιών ΗΜΠ στην κλινική πράξη, όσο και για την μελέτη της λεγόμενης «ηλεκτρομαγνητικής ρύπανσης», (76,77,89-98).

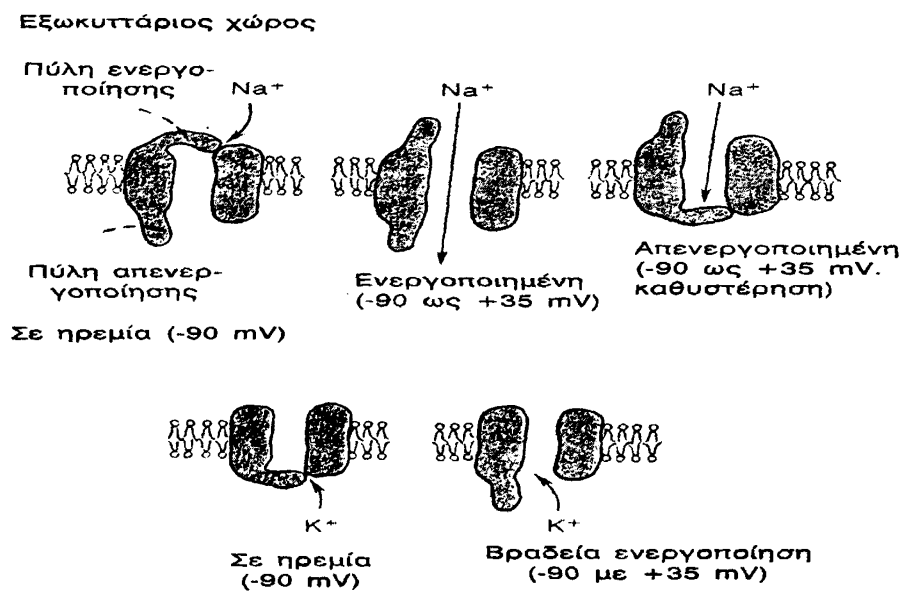
Έχει αποδειχτεί ότι τα παλμικά ΗΜΠ μπορούν να προκαλέσουν ενεργοποίηση των ηλεκτροχημικών διαμεμβρικών ιοντικών καναλιών της κυτταρικής μεμβράνης προκαλώντας ανακατανομή του ιοντικού φορτίου της. Πιο συγκεκριμένα, το εξωτερικό παλμικό ηλεκτρομαγνητικό πεδίο ασκεί μια ταλαντούμενη ώση στα ελεύθερα ιόντα που υπάρχουν στην έσω και έξω πλευρά της κυτταρικής μεμβράνης. Όταν το εύρος της ταλάντωσης φτάσει τα  $-61 \text{ mV}$ , δηλαδή την ηλεκτρεργετική δύναμη των ιόντων\*\*, ενεργοποιείται η δίοδος τους από τους πρωτεϊνικούς διαμεμβρανικούς διαύλους και κατά συνέπεια επιδρούν στην λειτουργία του κυττάρου.



Σχήμα 6.9 Φυσιολογικό δυναμικό ηρεμίας.



Η διαφορά μεταξύ των συνεχόμενων ΗΜ πεδίων με τα παλμικά ΗΜ πεδία είναι στο αποτέλεσμα της ενέργειας που ασκούν πάνω στα ιόντα της κυτταρικής μεμβράνης. Τα συνεχόμενα ΗΜ πεδία δημιουργούν θερμική ενέργεια, όπου είναι ένα είδος τυχαίας (χασοπικής) ενέργειας σε κάθε πιθανή κατεύθυνση, η οποία επηρεάζει μεν τους ηλεκτροχημικούς υποδοχείς και κατά συνέπεια τη διαπερατότητα τους, αυξάνοντας όμως την θερμοκρασία στους ιστούς, όπου επιδρά με όλες της βλαβερές συνέπειες που προκύπτουν από αυτό. Σε αντίθεση όμως τα παλμικά ΗΜ πεδία, τα οποία προκαλούν στοχευμένη ταλάντωση των ιόντων, επηρεάζουν αυτή καθαυτή την ηλεκτρεργετική δύναμη της ενεργοποιώντας έτσι τους ηλεκτροχημικούς πρωτεϊνικούς διαύλους χωρίς αύξηση της θερμοκρασίας. Από έρευνες που έχουν γίνει, έχει διαπιστωθεί πως τα παλμικά ΗΜΠ είναι δύο φορές πιο αποτελεσματικά από τα συνεχόμενα ΗΜΠ. <sup>(54,82-87)</sup>



Σχήμα 6.10 Ενεργοποίηση διαύλων κυτταρικής μεμβράνης.



## 6.6 Βιολογικές επιδράσεις των ηλεκτρομαγνητικών πεδίων.

Κατά τις τελευταίες τρεις δεκαετίες πολυάριθμες μελέτες έχουν αποδείξει ότι τα ΗΜΠ έχουν πολλαπλές επιδράσεις στους ζωντανούς οργανισμούς, τόσο αρνητικές όσο και θετικές. Μερικές από αυτές είναι και οι εξής : μεταβολή του ρυθμού κυτταρικού πολλαπλασιασμού, μεταβολή των επιπέδων σύνθεσης των mRNA και των πρωτεϊνών, αλλαγές στις ιδιότητες των κυτταρικών μεμβρανών, όπως και επίδραση στην μεταφορά ιόντων  $Ca^{2+}$ ,  $Na^+$ ,  $K^+$ , με συνέπεια την εμφάνιση μεταβολών στην ηλεκτρική και μεταβολική συμπεριφορά , δράσεις στην διαφοροποίηση αρχέγονων βλαστικών κυτάρων, μεταβολή στην έκφραση γονιδίων, όπως του *myc*, *fos*, *jun*, μεταβολή της σύνθεσης πρωτεϊνών όπως της P53 με συνακόλουθη μεταβολή των ρυθμών απόπτωσης σε φυσιολογικά και καρκινικά κύτταρα.<sup>(99-114)</sup> Επίσης τα ΗΜΠ φαίνεται ότι δρουν με έμμεσο ή άμεσο τρόπο στην παραγωγή μελατονίνης από την επίφυση με αποτέλεσμα την εμφάνιση διαταραχών στον κερκαδιάνιο ρυθμό του οργανισμού και των ορμονικών ρυθμών<sup>(59,65,66,72,115)</sup>. Τα ΗΜΠ κάποιων συχνοτήτων και εντάσεων επίσης μεταβάλλουν την κυτταροτοξική συμπεριφορά των T λεμφοκυττάρων<sup>(73,116-118)</sup>. Υπάρχουν μελέτες που δείχνουν ότι τα ΗΜΠ είναι σε θέση να λειτουργήσουν ως συν - καρκινογόνοι παράγοντες, κατόπιν προχορήγησης βενζο[α]πυρενίου<sup>(113)</sup>, ενώ άλλες μελέτες δείχνουν ότι τα ΗΜΠ έχουν την ιδιότητα να αναστέλλουν σε στατιστικά σημαντικό βαθμό την ανάπτυξη όγκων σε αθυμικούς μύες και σε άλλα μοντέλα νεοπλασματικής νόσου<sup>(99,102,103)</sup>. Ακόμη φαίνεται ότι τα ΗΜΠ έχουν την ιδιότητα να αναστέλλουν την ανάπτυξη λειομυοσάρκωματικών κυττάρων, ενώ αναστέλλουν και την ανάπτυξη όγκων σε επίμυες Wistar<sup>(60,61,114)</sup>. Οι δράσεις των ΗΜΠ στους οργανισμούς φαίνεται να συσχετίζεται τόσο με την ιδιότητά τους να δημιουργούν θερμικές μεταβολές στα κύτταρα (αύξηση θερμοκρασίας και έκφραση πρωτεϊνών θερμικού stress)<sup>(74)</sup> αλλά και στα συστήματα μεταγωγής σήματος των κυττάρων και κατά κύριο λόγο εκεί όπου οι διαμεσολαβητές έχουν χαρακτήρα ελευθέρων ριζών<sup>(107,119-124)</sup>.

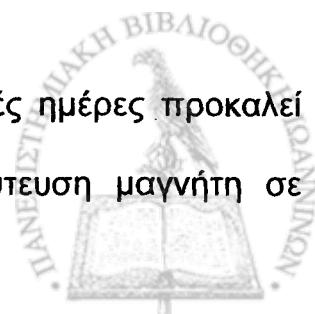


Σε έρευνες με εθελοντές βρέθηκε ότι ο άνθρωπος αντιδρά με συμπτώματα όπως σκοτοδίνη, ζάλη, ναυτία, μεταλλική γεύση στο στόμα, εκλάμψης στα μάτια όταν εκτίθεται σε πεδία 2-4T.<sup>(43-45)</sup> Ενώ έκθεση σε 5 T προκαλεί μείωση της ροής αίματος στην αορτή κατά 5-10%.<sup>(83)</sup> Παρόλα αυτά δεν παρατηρήθηκε μετά από έκθεση σε πεδίο 8T κλινικά σημαντική μεταβολή στον καρδιακό και αναπνευστικό ρυθμό, στην συστολική και διαστολική πίεση αίματος και στην εσωτερική θερμοκρασία του σώματος<sup>(44)</sup>. Ανεπηρέαστη παρέμεινε επίσης η πνευματική λειτουργία των εθελοντών<sup>(45)</sup>.

Υπάρχουν ενδείξεις επίσης ότι τα παραγόμενα από τις οθόνες υπολογιστών στατικά ηλεκτρικά πεδία μπορούν να επιβαρύνουν δερματοπάθειες, όταν υπάρχει προδιάθεση<sup>(84)</sup>, χωρίς όμως οι ενδείξεις αυτές να υποστηρίζονται από επιδημιολογικά στοιχεία. Το ΗΜΠ πεδίο προκαλεί βιολογικές αντιδράσεις (με την προϋπόθεση ότι έχει την ενέργεια που απαιτείται για αυτή την διαδικασία) μέσω επαγωγής ηλεκτρικού φορτίου στην επιφάνεια δέρματος. Αυτές οι αντιδράσεις εξαρτώνται από την ένταση του πεδίου τις περιβαντολογικές συνθήκες την υγρασία καθώς και την ατομική ευαισθησία του εκτιθέμενου. Σε έκθεση των εθελοντών στα 60Hz, 10% δήλωσε αντίληψη του πεδίου στα 2-5kVm<sup>-1</sup> ενώ 5% δήλωσε ενόχληση στα 15-20 kVm<sup>-1</sup><sup>(56)</sup>. Αλληλεπίδραση εννοούμε ουσιαστικά την επιλεκτική μεταφορά ιόντων μέσο της μεμβράνης των κυττάρων διαδικασία πολύ ευαίσθητη στις μεταβολές δυναμικού<sup>(85)</sup>. Τέτοια ηλεκτρικός ευαίσθητα κύτταρα βρίσκονται σχεδόν σε όλο τον οργανισμό αλλά αναλόγως με τους ιστούς που αφορίζουν εμφανίζουν μικρότερη η μεγαλύτερη ηλεκτρική ευαισθησία. Έτσι πχ τα μυϊκά κύτταρα παρουσιάζουν μεγαλύτερη ηλεκτρική ευαισθησία από ότι τα κύτταρα του νεφρού η του ήπατος<sup>(86)</sup>.

Το κατώφλι έντασης του ηλεκτρικού πεδίου ικανό να διεγείρει τα κύτταρα του νευρικού ιστού είναι 6 Vm<sup>-1</sup> για συχνότητες μέχρι 3KHz<sup>(56,57,67-69)</sup>.

Σε πειραματόζωα η έκθεση τους σε ισχυρά πεδία 7-8T για μερικές ημέρες προκαλεί αναστολή της ανάπτυξης καρκινικών κυττάρων<sup>(46)</sup>. Ενώ η εμφύτευση μαγνήτη σε



επίμυες ενισχύει το ανοσοποιητικό σύστημα.<sup>(48-51)</sup> Όσο αναφορά το νευρικό σύστημα έκθεση μέχρι τα 2T δεν επιφέρει σοβαρές επιδράσεις<sup>(52,53,71)</sup>. Ενώ για πάνω από τα 2T οι ενδείξεις είναι αντιφατικές<sup>(87)</sup>, όριο που φαίνεται να ισχύει και για το καρδιαγγειακό σύστημα<sup>(58)</sup>. Τέλος σε in Vitro μελέτες έχουν προκύψει επιδράσεις σε ερυθροκύτταρα<sup>(47-54)</sup> και οστεοβλάστες<sup>(55)</sup> κάτω από την επίδραση πολύ ισχυρών πεδίων (8T).







## ΚΕΦΑΛΑΙΟ 7<sup>ο</sup>

### 7 ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΗ ΔΙΑΔΙΚΑΣΙΑ

Σκοπός της πειραματικής αυτής εργασίας είναι η μελέτη της δράσης ενός ισχυρού παλμικού ΗΜΠ βραχείας διάρκειας, το οποίο παράγεται μέσω μιας εξειδικευμένης συσκευής που εμπεριέχει μια γεννήτρια πλάσματος, ως αναφορά την επούλωση χειρουργικώς προκληθέντων τραυμάτων, σε επίμυες Wistar. Η ιδιαιτερότητα του εν λόγω συστήματος έγκειται στο γεγονός ότι η βραχύτητα της διάρκειας του ηλεκτρομαγνητικού παλμού προστατεύει τον βιολογικό στόχο από την ανάπτυξη υψηλών θερμοκρασιών. Συμβάλλοντας στην δημιουργία *ηλεκτροδιαπερατότητας* της μεμβράνης.<sup>(88)</sup>

#### 7.1 Υλικά και Μέθοδοι

Οι συσκευές που χρησιμοποιήθηκαν για την επίτευξη του πειράματος αυτού ήταν :

- A) Μια γεννήτρια πλάσματος παραγωγής υψηλής εντάσεως αλλά χαμηλής συχνότητας παλμικού ηλεκτρομαγνητικού πεδίου.(PAPIMI)
- B) Μια συσκευή μέτρησης επιφανείας εμβαδού ακαθορίστου σχήματος (πλανίμετρο)

##### 7.1.1 Η συσκευή "PAP.I.M.I" (Pappas, ion, magnetic, inductor)

Πρόκειται για μια συσκευή εκπομπής παλμικών ηλεκτρομαγνητικών κυμάτων μεγάλης εντάσεως, στιγμιαίας ισχύος και απειροελάχιστης χρονικής διάρκειας (εκατομμυριοστό του δευτερολέπτου), η οποία καταλήγει μέσω ενός μονωμένου καλωδίου σε ένα κυκλικό βρόγχο 30εκ. όπου μεταφέρει την ένταση του πεδίου στον εκάστοτε ιστό που εφαρμόζεται.

Η δομή της βασίζεται σε έναν σωλήνα thyatron και μια τράπεζα φορτίου που λειτουργεί σε πολύ υψηλό δυναμικό, προκαλώντας ένα φυσικό μικροσπινθήρα που μετασχηματίζει

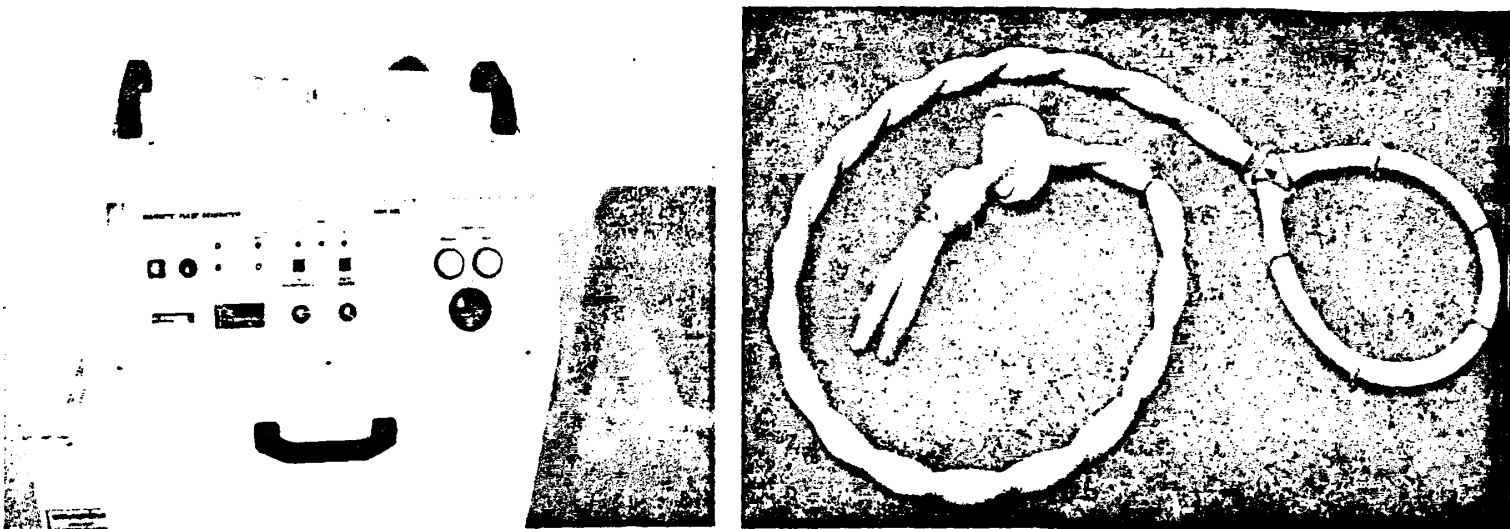


την υψηλή τάση σε εκρήξεις υψηλού μαγνητικού ρεύματος με την μορφή πολλών ισχυρών και ταχύτατων μαγνητικών παλμών.

Με αυτόν τον τρόπο επιτυγχάνεται βιο-ενεργοποίηση των πυρήνων των ατόμων δηλαδή πυρηνικός βιοσυντονισμός και βιο-διέγερση με μηδενική πρακτικά διατιθέμενη θερμική ενέργεια παλμών.

Η σημαντικότερη διαφορά μεταξύ της βιοενέργειας και θερμότητας είναι ότι η βιοενέργεια προκαλεί σύνθεση ή σχηματισμό σύνθετων δομών βιομορίων, ενώ αντίθετα η θερμότητα προκαλεί αποδιοργάνωση ή καταστροφή σύνθετων βιομορίων αυξάνοντας τη εντροπία ενός συστήματος.

Τα τεχνικά χαρακτηριστικά της συσκευής που χρησιμοποιήθηκε στην συγκεκριμένη πειραματική εργασία ήταν 35-80 joule/παλμό ενέργειας,  $1 \times 10^{-6}$  δευτ διάρκεια κύματος,  $35-80 \times 10^6$  W ισχύ κύματος, ένταση πεδίου της τάξεως των 125 gauss, διάρκεια παλμού με εύρος από 0,1μs, έως 10μs, παλμικότητα από 1 έως 10 Hz (παλμοί/δευτ) και συχνότητα παλμού 750 KHz .



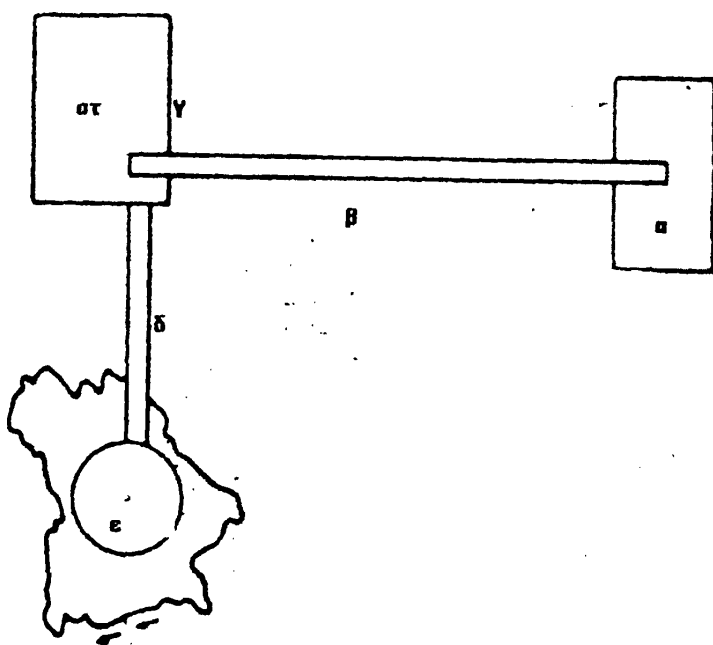
Εικόνα 7.1 α) .Συσκευή "PAP.I.M.I" β) ο βρόγχος, "κεραία" της συσκευής.

### 7.1.2 Πλανίμετρο (εμβαδόμετρο)

Το πλανίμετρο είναι ένα όργανο ακριβούς μέτρησης επιφανειών ακανονίστου σχήματος. Το πλανίμετρο κατασκευάστηκε το 1814 από τον Βαυαρό μηχανικό J.H. Herman και η λειτουργία του βασίζεται στην αρχή του Vernier.<sup>(106)</sup>

Τα βασικά μέρη του οργάνου είναι: το σημείο στήριξης, ο βραχίονας περιστροφής, η συσκευή με τις κλίμακες μετρήσεων, ο δευτερεύων βραχίονας και ο μεγεθυντικός φακός δια του οποίου μετράται η ζητούμενη επιφάνεια (The planimeter instructions, HAFF, GmbH). Η συσκευή καταγραφής μετρήσεων είναι προσαρμοσμένη στον ένα βραχίονα. Με αυτόν τον βραχίονα περιγράφεται η προς μέτρηση επιφάνεια με τη μετακίνηση του μεγεθυντικού φακού επί του μετρούμενου σχήματος. Το αποτέλεσμα αναγράφεται επί της οθόνης σε τετραγωνικά εκατοστά ( $\text{cm}^2$ ) (σχήμα 6).

Η πλανιμετρική μέθοδος είναι η μέθοδος επιλογής για την ακριβή και ταχεία μέτρηση, χρειάζεται περίπου ένα λεπτό την φορά για τη μέτρηση κάθε επιφανείας του εμβαδού τραυμάτων.



**Σχήμα 7.2.** Πλανίμετρο - Εμβαδόμετρο. Διακρίνονται τα βασικά μέρη του οργάνου.

- α. σημείο στήριξης
- β. βραχίονας περιστροφής
- γ. συσκευή με κλίμακες μετρήσεων
- δ. βραχίονας
- ε. μεγεθυντικός φακός
- στ. κλίμακες μετρήσεων

Η περιγραφή-μέτρηση της επιφάνειας γίνεται μετακινώντας το μεγεθυντικό φακό σύμφωνα με τη φορά των δεικτών του ρολογιού. Το εμβαδόν της επιφάνειας αναγράφεται κατ' ευθείαν στις κλίμακες μετρήσεων σε τετραγωνικά εκατοστά.

## 7.2 Μεθοδολογία

Για την πραγματοποίηση της εν λόγω πειραματικής εργασίας ελήφθη ειδική άδεια από την Επιτροπή Ηθικής και Δεοντολογίας για την Προστασία και Ορθή Χρήση των Πειραματόζων.

### 7.2.1 Πιλοτικές μελέτες

Δεδομένου ότι η επίδραση των παλμικών Ηλεκτρομαγνητικών πεδίων στις διαδικασίες επούλωσης φαίνεται ότι εξαρτάται όχι μόνο από το είδος της ηλεκτρομαγνητικής ακτινοβολίας αλλά και από τα μεσοδιαστήματα ηρεμίας μεταξύ των διαδοχικών παλμών δοκιμάστηκαν όσο αναφορά το σκέλος αυτό πιλοτικά τρία μοντέλα εκπομπής.

1<sup>ον</sup> ) Ένα με παλμικότητα πεδίου συχνότητας 1 παλμού/δευτερόλεπτο.

2<sup>ον</sup> ) Ένα με παλμικότητα πεδίου συχνότητας 8 παλμών/δευτερόλεπτο.

3<sup>ον</sup> ) Ένα με παλμικότητα πεδίου συχνότητας 3 παλμών/δευτερόλεπτο.

Τα υπόλοιπα χαρακτηριστικά του κύματος δηλαδή, συχνότητα, διάρκεια και ένταση παλμού διατηρήθηκαν σταθερά.



Στο κάθε μοντέλο συμπεριλήφθηκαν από 12 πειραματόζωα ως ομάδα ελέγχου και 12 ως ομάδα πειράματος. Τα ζώα των ομάδων της πιλοτικής μελέτης χειρίσθηκαν με την ίδια μεθοδολογία και συνθήκες που περιγράφεται παρακάτω στις τελικές ομάδες του πειράματος.

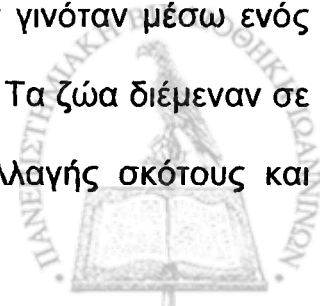
Τα ζώα των ομάδων πειραματισμού εκτέθηκαν επί 10ήμερο για 20 λεπτά ημερησίως στο κάθε μοντέλο και έγινε πλανιμετρική εκτίμηση της ταχύτητας σύγκλισης του τραύματος .

Από την σύγκριση αυτή προέκυψε ότι τα μοντέλα με παλμικότητα 1 και 8 παλμοί/δευτερόλεπτο αντίστοιχα δεν επέδειξαν διαφορές στην ταχύτητα επούλωσης του τραύματος σε σύγκριση με την ομάδα ελέγχου. Μάλιστα τα ζώα που εκτέθηκαν σε συχνότητα 8 παλμών /δευτερόλεπτο παρουσίασαν απώλεια προσανατολισμού και το νευρολογικό φαινόμενο της «στροφής» (το κεφάλι τους είναι μόνιμα στραμμένο προς μία κατεύθυνση δεξιά ή αριστερά ενώ όταν κρατούνται από την ουρά περιστρέφονται γύρω από τον εαυτό τους) από την τρίτη ημέρα έκθεσης στο Η.Μ.Π.

Αντίθετα τα πειραματόζωα που εκτέθηκαν σε πεδίο με παλμικότητα 1 παλμού/δευτερόλεπτο δεν παρουσίασαν καμία απολύτως διαφορά από την ομάδα ελέγχου. Ενώ το 3<sup>ο</sup> πειραματικό μοντέλο παρουσίασε σημαντική διαφορά επούλωσης από την 3<sup>η</sup> κιόλας ημέρα έκθεσης των πειραματόζωων σε αυτό.

Βάσει λοιπόν αυτής της προκαταρκτικής μελέτης επελέγη σαν τελικό μοντέλο έκθεσης των ζώων το 3<sup>ο</sup> πεδίο (3 παλμοί /δευτερόλεπτο),όπου έγινε και η ακόλουθη συστηματική μελέτη.

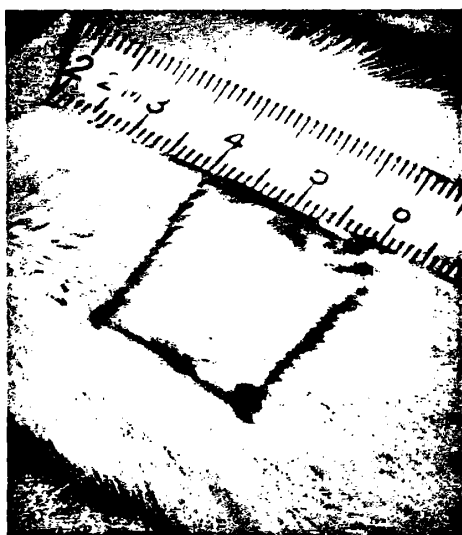
Χρησιμοποιήθηκαν 48 αρένες επίμυες Wistar, ηλικίας τεσσάρων μηνών και μέσου βάρους  $200 \pm 30$  γρ. Τα ζώα τοποθετήθηκαν ανά ένα σε κλωβούς από πλεξιγλάς που φέρουν μεταλλικό πλέγμα από πάνω τους. Η διατροφή των ζώων γινόταν μέσω ενός τυποποιημένου φυράματος και η υδροδοσία από νερό του δικτύου. Τα ζώα διέμεναν σε εκτροφείο σταθερών συνθηκών με θερμοκρασία  $22^{\circ}$  C και εναλλαγής σκότους και



φωτός ανά 12 ώρες. Εγκλιματίστηκαν στο πειραματικό εργαστήριο της Φυσιολογίας για μια περίοδο τριών ημερών και εξετάστηκαν για στοιχεία νόσου.

Κατά την ημέρα 0 -ορίσθηκε η ημέρα ενάρξεως του πειράματος- όλα τα πειραματόζωα, αναισθητοποιήθηκαν με ενδοπεριτοναϊκή χορήγηση Κεταμίνης και Μιδαζολάμης ( 3,5 και 7 mgg αντιστοίχως ανά kg βάρους σώματος ) και έγινε προετοιμασία για άσηπτη χειρουργική εκτομή στην ραχιαία τους επιφάνεια. Έπειτα σχεδιάστηκε ένα τετράγωνο διαστάσεων 2 X 2 εκ και βάσει αυτού εκτελέστηκε τομή και αφαίρεση δέρματος ολικού πάχους η οποία συμπεριελάμβανε και το *panculus carnosum* των επιμύων.

Ο σχεδιασμός του τραύματος έγινε στην ράχη έτσι ώστε να μην μπορούν να επιδράσουν άλλοι παράγοντες στην επούλωση όπως πείραγμα με την γλώσσα τους η τριβή με κάποιο σημείο του κλωβού. Αυτός ήταν επίσης ο λόγος που απομονώθηκαν ανά ένα στα κλουβιά τους όπως και για την αποφυγή φαινομένων κανιβαλισμού.



**Εικόνα 7.2.1**



**Εικόνα 7.2.2**

**Εικόνα 7.2.1** Σχεδιασμός τετραγώνου 2x2εκ στην ραχιαία επιφάνεια του επίμιου

**Εικόνα 7.2.2** Εκτομή δέρματος και το *panculus carnosum* των επιμύων.

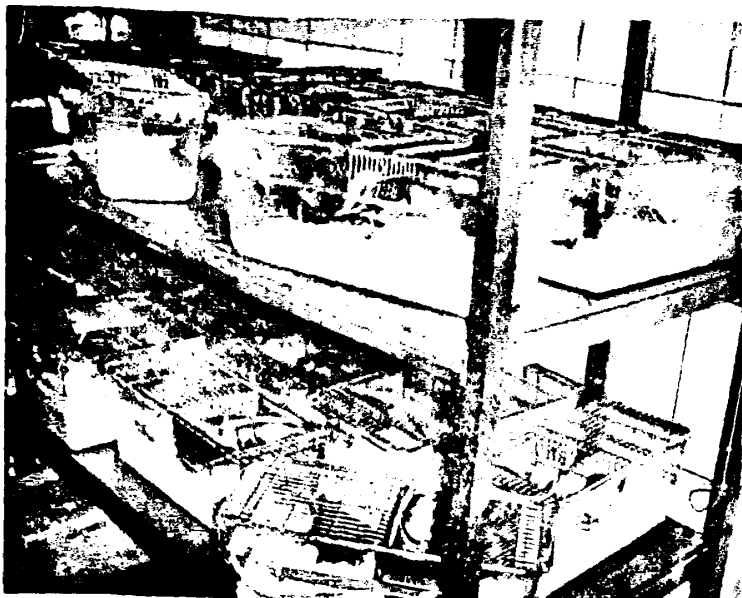


Τα ζώα χωρίστηκαν τυχαία σε δύο ισάριθμες ομάδες ανά 24, την ομάδα ελέγχου (ΟΕ) και την ομάδα πειράματος (ΟΠ). Κατά την ημέρα 0, ημέρα έναρξης του πειράματος, όλα τα ζώα ανά τέσσερα τοποθετήθηκαν σε ένα ειδικά κατασκευασμένο ξύλινο κλωβό-χωρίς μεταλλικές συνδέσεις για να μην αλληλεπιδρά με το μαγνητικό πεδίο- διαστάσεων (32x16x15εκ) ο οποίος ήταν χωρισμένος σε ισάριθμα τετράγωνα διαστάσεων (8x16x15εκ) μέσα στα οποία τα ζώα διατηρούταν ακινητοποιημένα και χωρίς να έρχονται σε επαφή μεταξύ τους. Ο ξύλινος αυτός κλωβός είχε πάνω ένα πλαστικό πλέγμα πάνω στο οποίο ήτανε κάθετα τοποθετημένος ο βρόγχος της κεραίας - διαστάσεων (35X15εκ)-της συσκευής εκπομπής ηλεκτρομαγνητικών πεδίων PAPIMI, σε σταθερή απόσταση 5εκ πάνω από το τραύμα. Η ταξινόμηση των πειραματόζων ήτανε τέτοια έτσι ώστε όλα τα ζώα να ισαπείχαν από την περίμετρο του βρόγχου της κεραίας και να ήτανε ομοιόμορφα ταξινομημένα μέσα στο ηλεκτρομαγνητικό πεδίο.

Τα ποντίκια της ομάδας πειράματος (Ο.Π) αφού τοποθετήθηκαν ανά τέσσερα στον ειδικό κλωβό εκτέθηκαν επί ημερησίας βάσεως για 20 λεπτά στα παλμικά ΗΜΠ της συσκευής Papimi (35-80 joule/παλμό ενέργειας,  $1 \times 10^{-6}$  δευτ διάρκεια κύματος, 35-80x10<sup>6</sup> W ένταση κύματος, ισχύς πεδίου της τάξεως των 125 gauss, διάρκεια παλμού με εύρος από 0,1μs, έως 10μs, και συχνότητα 3Hz). Ενώ αντίθετα τα ζώα της ομάδας ελέγχου υποβλήθηκαν στην ίδια διαδικασία αλλά με την συσκευή κλειστή. Δηλαδή τα ζώα μεταφέρονταν καθημερινά στον ίδιο χώρο με τις ίδιες συνθήκες με την διαφορά ότι η Ο.Π δεχόντανε ακτινοβολία ενώ η Ο.Ε όχι. Μετά το τέλος της πειραματικής διαδικασίας τα πειραματόζωα επέστρεφαν στα κλουβιά τους ανά ένα ενώ δεν χορηγήθηκε αντιβιοτική ή άλλου είδους φαρμακευτική αγωγή πέραν τον αναισθητικών φαρμάκων της πρώτης ημέρας.

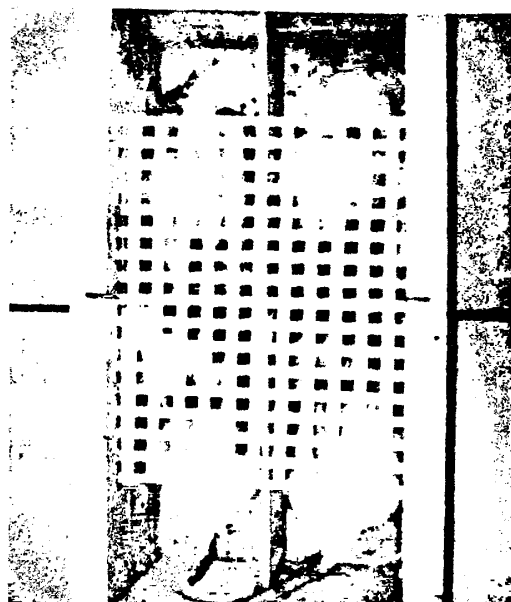






**Εικ 7.2.3**

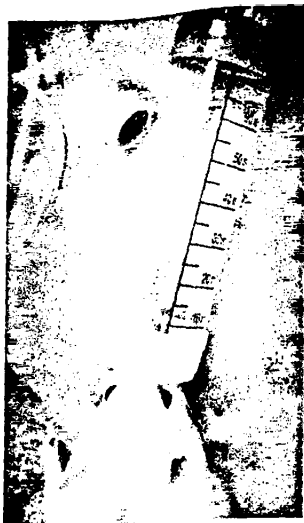
*Εικ 7.2.3 Τα πειραματόζωα φυλάσσονταν ανά ένα στο πειραματικό χειρουργείο του εργαστηρίου της φυσιολογίας του Παν/μιου Ιωαννίνων.*



**Εικ7.2.4**

*Εικ 7.2.4 Ο ξύλινος κλωβός μέσα στον οποίο τοποθετούνταν τα πειραματόζωα και το πλαστικό πλέγμα επάνω στο οποίο ακουμπούσε ο βρόγχος της συσκευής PAPIMI.*

Την 3η, 6η, 9η, 12η, 18η και 22η ημέρα σε τέσσερα πειραματόζωα από την κάθε ομάδα έγινε ευθανασία, με την χρήση αιθέρα και διενεργήθηκαν βιοψίες που περιλάμβαναν όλη την δερματική βλάβη της ραχιαία επιφάνειας καθώς και τμήμα υγιούς δέρματος γύρω από αυτήν. Τα ληφθέντα ιστοτεμάχια φωτογραφήθηκαν από σταθερή απόσταση με ψηφιακή φωτογραφική μηχανή τοποθετημένης σε τρίποδο και τα εμβαδά τους μετρήθηκαν με την μέθοδο της πλανιμετρίας. Η μέτρηση έγινε τοποθετώντας μια διάφανη μεμβράνη πάνω από το ληφθέν παρασκεύασμα και σχεδιάζοντας με έναν ανεξίτηλο μαρκαδόρο με λεπτή γραφίδα τα όρια της πάνω σε αυτήν. Για την μέτρηση του εμβαδού επιφανείας χρησιμοποιήθηκε η συσκευή πλανιμετρίας (HAFF planimeters, N° 317 E, W-Germany) με απόκλιση  $1\text{mm}^2$ . Τα στοιχεία της συσκευής παρατίθενται στο παραπάνω κεφάλαιο.



**Εικ 7.2.5.**

**Εικ7.2.5.** Η αναισθητοποίηση των πειραματοζώων με αιθέρα.



**Εικ 7.2.6.**

**Εικ7.2.6.** Τα ιστοτεμάχια που εληφθησαν για βιοψία συμπεριλαμβάνουν την βλάβη μαζί με υγιή ιστό. Δεξιά είναι τα τεμάχια της ΟΠ και αριστερά της ΟΕ την 6<sup>η</sup> ημέρα.

Τα παρασκευάσματα αφού μετρήθηκαν και φωτογραφήθηκαν από σταθερή απόσταση, μονιμοποιήθηκαν σε διάλυμα φορμόλης 10%. Έπειτα τα μονιμοποιημένα ιστοτεμάχια κοπήκανε σε λεπτές τομές 5χιλ και έγινε χρώση με αιματοξυλίνη –ηωσίνη.

Λαμβάνοντας υπόψη ότι ή επούλωση των τραυμάτων των πειραματοζώων έγινε κατά δεύτερο σκοπό οι ακόλουθοι ιστολογικοί παράμετροι εκτιμήθηκαν ποιοτικά και σταδιοποιήθηκαν από το 1 έως το 6 σαν σειρά γεγονότων που εμφανίσθηκαν. Έτσι λοιπόν τα στάδια ήταν τα ακόλουθα:

**Στάδιο 1:** η εναπόθεση ινικής και δημιουργία θρόμβου στο τραύμα.

**Στάδιο 2:** Ανώριμος κοκκιώδης ιστός και νεόπλαστα αγγεία.

**Στάδιο 3:** Ωριμος κοκκιώδης ιστός με διαμορφωμένα αγγεία.

**Στάδιο 4:** Εναπόθεση χαλαρού πλέγματος ινοβλαστών και κολλαγόνου στο τραύμα.

**Στάδιο 5:** Ωριμοι ινοβλάστες, πυκνό κολλαγόνο και σχεδόν ολοκληρωμένη επιθηλιοποίηση.

**Στάδιο 6:** Πλήρης επιθηλιοποίηση και σύγκλιση του τραύματος.



### Στατιστική ανάλυση.

Η στατιστική ανάλυση έγινε με την μέθοδο Mann – Whitney U test, στο τμήμα στατιστικής υπηρεσίας του Παν/μίου Ιωαννίνων. Βάσει της οποίας οι παρατηρηθείσες διαφορές θεωρήθηκαν στατιστικά σημαντικές από το επίπεδο του 5 % (  $p < 0,05$  ), Γεγονός που πιστοποιείται και από τις ιστολογικές μελέτες.

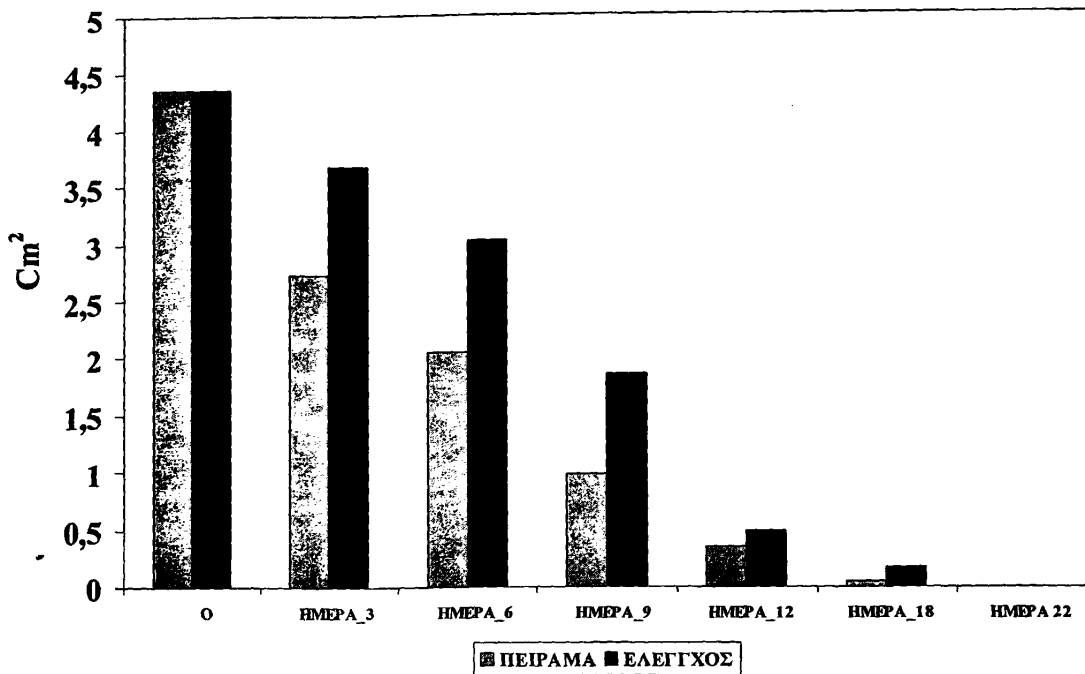
### 7.3 ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

Κατά την διάρκεια των αναισθησιολογικών χειρισμών (ημέρα 0) είχαμε απώλεια δύο πειραματόζων της ομάδας ελέγχου, τα οποία αντικαταστάθηκαν. Κατόπιν καθ' όλη την διάρκεια του πειράματος όλα τα ζώα ευρίσκονται σε καλή κατάσταση υγείας και δεν παρουσίασαν μολύνσεις από τις χειρουργικές επεμβάσεις.

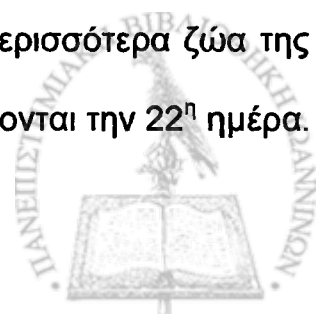
Τα δεδομένα που λάβαμε από τον πλανιμετρικό προσδιορισμό των εμβαδών της επιφανείας των τραυμάτων των επιμύων κατά την 3<sup>η</sup>, 6<sup>η</sup>, 9<sup>η</sup>, 12<sup>η</sup>, 18<sup>η</sup> και 22<sup>η</sup> ημέρα από την χειρουργική εκτομή, δείχνουν ότι στα πειραματόζωα της ομάδας πειράματος παρατηρείται στατιστικώς σημαντική αύξηση της ταχύτητας επούλωσης (  $p < 0,02$  ) την 3<sup>η</sup>, 6<sup>η</sup> και 9<sup>η</sup> ημέρα. Από την 9<sup>η</sup> και μετά ενώ παρατηρείται ταχύτερος ρυθμός και καλύτερη ποιότητα επούλωσης στην ομάδα πειράματος χωρίς να παρουσιάζει όμως στατιστικώς σημαντική διαφορά σε σχέση με την ομάδα ελέγχου. Μια άλλη σημαντική παρατήρηση που προκύπτει επίσης από την πλανιμετρική καθώς και μακροσκοπική μελέτη σύγκλισης τραυμάτων των πειραματικών μας ομάδων είναι ότι τα περισσότερα τραύματα της ομάδας πειράματος παρουσιάζουν σχεδόν πλήρη σύγκλιση των τραυμάτων την 18<sup>η</sup> ημέρα ενώ τα τραύματα της ομάδας ελέγχου επουλώνονται αργότερα την 22<sup>η</sup> ημέρα.

Τα δεδομένα αυτά παρατίθενται με ακρίβεια στις στήλες της γραφικής παράστασης του γραφήματος 7.3.1.





**Γράφημα 7.3.1** Κατά της πρώτες ημέρες της εφαρμογής του παλμικού ΗΜΠ παρατηρούμε μια επουλωτική διεργασία ιδιαίτερως αυξημένη στην ομάδα πειράματος, πράγμα το οποίο αντικατοπτρίζεται στο μικρότερο ύψος της στήλης που περιγράφει μαθηματικώς την επούλωση. Αυτή η μείωση είναι σαφώς μεγαλύτερη στην ομάδα πειράματος, σε σύγκριση με την αντίστοιχη της ομάδας ελέγχου. Οι διαφορές ύψους των στηλών αρχίζουν και συγκλίνουν σε πολύ μεγάλο βαθμό από την 12<sup>η</sup> ημέρα και μετά για να ταυτιστούν πλήρως την 22<sup>η</sup> ημέρα. Επίσης την 18<sup>η</sup> ημέρα τα περισσότερα ζώα της ΟΠ έχουν σχεδόν επουλωθεί σε αντίθεση με την ΟΕ οπού επουλώνονται την 22<sup>η</sup> ημέρα.



Τα δεδομένα που ελήφθησαν από την μέτρηση των τραυματικών επιφανειών με την μέθοδο της πλανιμετρίας παρατίθενται στον πίνακα 7.3.1

| ΕΠΙΦΑΝΕΙΑ ΤΡΑΥΜΑΤΟΣ (εκ <sup>2</sup> ) |      |      |      |      |      |      |    |
|--|------|------|------|------|------|------|----|
| ΗΜΕΡΑ                                  | 0    | 3    | 6    | 9    | 12   | 18   | 22 |
| ΟΠ                                     | 4.36 | 2.73 | 2.05 | 0.98 | 0.35 | 0.05 | 0  |
| ΟΕ                                     | 4.36 | 3.68 | 3.03 | 1.85 | 0.48 | 0.17 | 0  |

**Πίνακας 7.3.1** Επιφάνεια τραύματος σε εκ<sup>2</sup>. Κατά την ημέρα 0, την ημέρα δημιουργίας τραυματικής επιφάνειας στην ράχη των πειραματόζων είναι σχεδόν αδύνατο να προκύψουν απόλυτα ίδια ισοεμβαδικά τραύματα και αυτό εξαιτίας των διαφορετικών δυνάμεων ελκυσμού κάθε δέρματος, διαφορετικής αντίδρασης κάθε οργανισμού σε αναισθησιολογικά φάρμακα, η ακόμα και σε διαφορετικούς χειρουργικούς χειρισμούς. Έτσι λοιπόν υπολογίστηκε ο μέσος όρος των εμβαδών τις κάθε ομάδας που προέκυψε από τις μετρήσεις της κάθε βιοψίας χωρίς αυτό να επηρεάζει την στατιστική σημαντικότητα των αποτελεσμάτων μας. Εκτός από την ημέρα 0 όπου μετρήθηκε το εμβαδόν όλων των πειραματόζων και της ΟΠ και της ΟΕ και υπολογίστηκε ο μέσος όρος τους που προέκυψε 4.36 εκ<sup>2</sup>.

Η στατιστική ανάλυση έγινε με την μέθοδο Mann – Whitney U test, βάσει της οποίας οι παρατηρηθείσες διαφορές θεωρήθηκαν στατιστικά σημαντικές από το επίπεδο του 5 % ( $p < 0,05$ ), όπως βλέπουμε στον πίνακα 7.2.



| ΕΜΒΑΔΟΝ ΕΠΟΥΛΩΣΗΣ ΤΡΑΥΜΑΤΟΣ<br>(ΜΕΤΡΗΣΕΙΣ ΣΕ εκ <sup>2</sup> ) |                      |                  |                      |                   |                      |                 |                       |                   |                       |                 |                       |
|--|----------------------|------------------|----------------------|-------------------|----------------------|-----------------|-----------------------|-------------------|-----------------------|-----------------|-----------------------|
| Ημέρα 0  | 3 <sup>η</sup> Ημέρα |                  | 6 <sup>η</sup> Ημέρα |                   | 9 <sup>η</sup> Ημέρα |                 | 12 <sup>η</sup> Ημέρα |                   | 18 <sup>η</sup> ημέρα |                 | 22 <sup>η</sup> Ημέρα |
|  | Mean±Sd              | Median (range)   | Mean±Sd              | Median (range)    | Mean±Sd              | Median (range)  | Mean±Sd               | Median (range)    | Mean±Sd               | Median (range)  |                       |
| Ομάδα ελέγχου  | 2.75±0.3             | 2.7<br>(2.4-3.1) | 2.07±0.17            | 2.05<br>(1.9-2.3) | 1±0.36               | 1<br>(0.6-1.4)  | 0.35±0.13             | 0.35<br>(0.2-0.5) | 0.06±0.05             | 0.05<br>(0-0.1) | 0                     |
| Πειραματική ομάδα  | 3.6±0.28             | 3.7<br>(3.2-3.8) | 3.05±0.13            | 3.05<br>(2.9-3.2) | 1.8±0.13             | 1.85<br>(1.7-2) | 0.5±0.08              | 0.5<br>(0.4-0.6)  | 0.15±0.13             | 0.15<br>(0-0.3) | 0                     |
| P  | 0.0201               |                  | 0.0209               |                   | 0.021                |                 | 0.1 (n.s)             |                   | 0.22 (n.s)            |                 |                       |

**Πίνακας 7.3.2.** Εμβαδόν επούλωσης των τραυμάτων, μέσες τιμές και SD

Από τα δεδομένα του πίνακα μας βλέπουμε ότι μέχρι την 9<sup>η</sup> ημέρα παρατηρείται στατιστικώς σημαντική διαφορά στην επούλωση μεταξύ των δύο ομάδων, ενώ από την 12<sup>η</sup> και μετά παρόλο που έχουμε συνεχιζόμενη αύξηση του ρυθμού επούλωσης στην Ο.Π δεν είναι στατιστικώς σημαντική σε σχέση με την Ο.Ε.

### **Παθολογοανατομική εκτίμηση.**

**Ημέρα 3<sup>η</sup>:** Στην ομάδα ελέγχου παρατηρούμε άφθονα πολυμορφοπύρρηνα λευκοκύτταρα, ινική και πολύ χαλαρό κοκκιώδη ιστό που καλύπτουν την τραυματική περιοχή (στάδιο 1). Αντίθετα στην ομάδα πειράματος κάτω από το επιπολής στρώμα θρόμβου που έχει σχηματιστεί αναγνωρίζεται οίδηματώδης χαλαρός κοκκιώδης ιστός με άφθονα πολυμορφοπύρρηνα ουδετερόφιλα κοκκιοκύτταρα και νεόπλαστα αιμοφόρα αγγεία. (στάδιο 2) Εικόνα 7.3.1

**Ημέρα 6<sup>η</sup>** : Τα αποτελέσματα στην ομάδα ελέγχου είναι παρόμοια με αυτά της ομάδος πειράματος κατά την 3<sup>η</sup> ημέρα, τα πολυμορφοπύρρηνα ουδετερόφιλα είναι πολύ πιο άφθονα, ενώ αναγνωρίζεται επίσης χαλαρός συνδετικός ιστός και νεόπλαστα τριχοειδή (στάδιο 2). Στην ομάδα πειράματος αναγνωρίζεται ένα σαφώς αναπτυγμένο αγγειακό δίκτυο, το οποίο περιβάλλεται από δικτυωτό συνδετικό ιστό και αρκετούς ινοβλάστες. Ο συνδετικός ιστός είναι ακόμα χαλαρός και οι ινοβλάστες είναι διεγερμένοι. Τα κύτταρα της οξείας φλεγμονής έχουν σαφώς υποχωρήσει, αν και αναγνωρίζονται ακόμα (στάδιο 3).

**Ημέρα 9<sup>η</sup>** : Η ομάδα ελέγχου έχει μορφολογικά χαρακτηριστικά όμοια με αυτά της ομάδας πειράματος την 6<sup>η</sup> μέρα (στάδιο 3). Στην ομάδα πειράματος δεν αναγνωρίζονται πια φλεγμονώδη κύτταρα. Οι ίνες κολλαγόνου έχουν γίνει πιο πυκνές και σχηματίζουν δεσμίδες παράλληλες προς την επιδερμίδα. Αναγνωρίζονται



άφθονοι αποπλατυσμένοι-ώριμοι ινοβλάστες και πυκνό, πιο ώριμο δίκτυο τριχοειδών (στάδιο 4). Εικόνα 7.3.2

**Ημέρα 12<sup>η</sup>** : Στην ομάδα ελέγχου οι ίνες του κολλαγόνου είναι πιο λεπτές, ενώ παρατηρούνται πιο πολλοί ώριμοι ινοβλάστες και τριχοειδή αιμοφόρα αγγεία. Εν τούτοις έχει γίνει αρκετή επιθηλιοποίηση (στάδιο 4). Στην ομάδα πειράματος αναγνωρίζεται ουλώδης ιστός με σχεδόν πλήρη επιθηλιοποίηση. Λίγοι ώριμοι ινοβλάστες αναγνωρίζονται στο χόριο, όπου υπερτερούν οι ίνες κολλαγόνου διατεταγμένες παράλληλα προς την επιδερμίδα. (στάδιο 5).

Από την 12<sup>η</sup> ημέρα οι ιστολογικές διαφορές ανάμεσα στις δύο ομάδες αρχίζουν να συγκλίνουν.

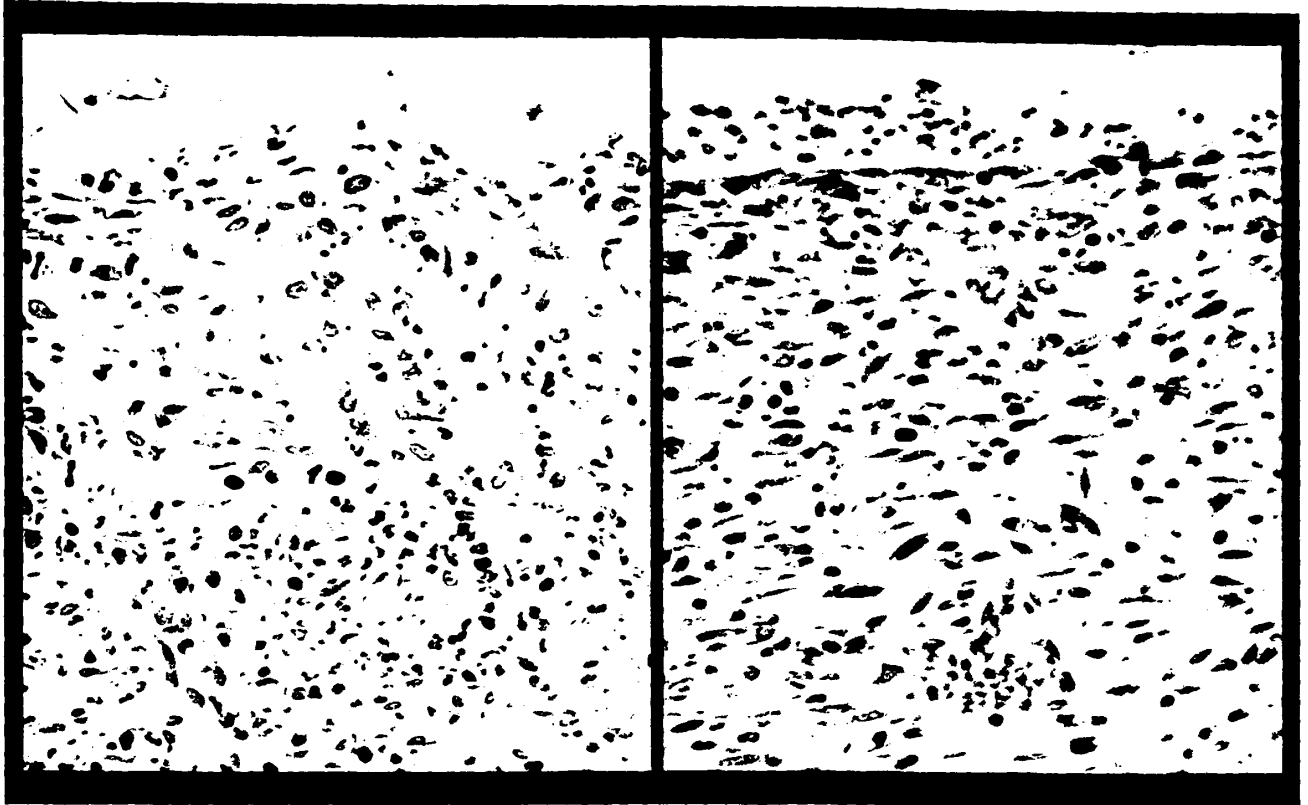
**Ημέρα 18<sup>η</sup>** : Στην ομάδα ελέγχου το επιθήλιο είναι ακόμα ανώριμο, με λίγες στιβάδες, ενώ δεν παρατηρείται θηλώδες χόριο (στάδιο 5). Ενώ στην ομάδα πειράματος παρατηρείται σχεδόν πλήρης κάλυψη του τραύματος από κερατινοποιημένο πλακώδες επιθήλιο ενώ κάτω από αυτό παρατηρείται ένας ώριμος και καλά διαμορφωμένος κοκκιώδης ιστός (στάδιο 6). Εικόνα 7.3.3

**Ημέρα 22<sup>η</sup>** : Πλήρης αποκατάσταση και στις δυο ομάδες.

Παρατίθενται οι συγκριτικές διαφορές μεταξύ των δύο ομάδων στις κυριότερες φάσεις επούλωσης.







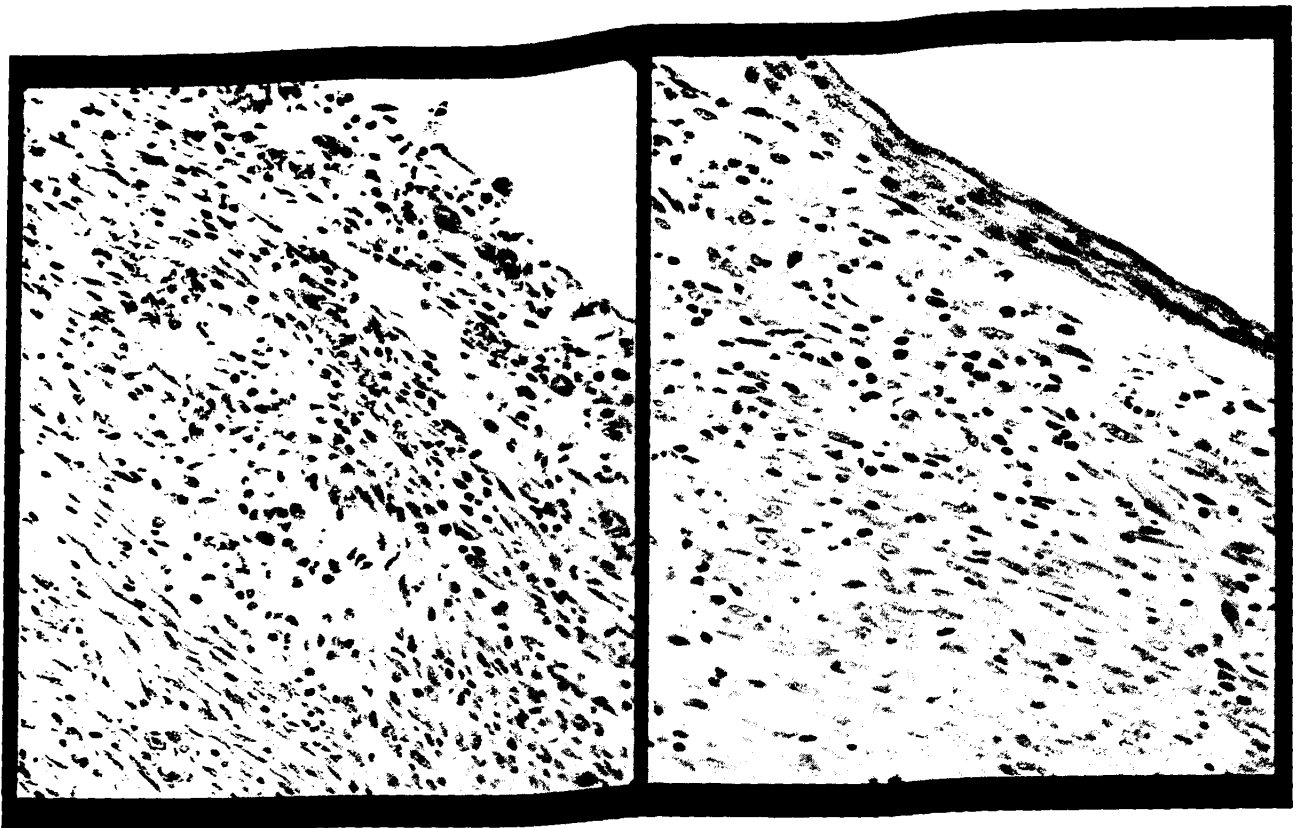
**Εικόνα 7.3.1**

**Ημέρα 3<sup>η</sup> Ομάδα ελέγχου (αριστερά).**

Άφθονα πολυμορφοπύρρηνα λευκοκύτταρα ινική και ιδιαίτερα χαλαρός κοκκιώδης ιστός καλύπτει την τραυματική περιοχή. (Στάδιο 1)

**Ημέρα 3<sup>η</sup> Ομάδα πειράματος (δεξιά).**

Κοκκιώδης ιστός με πολυμορφοπύρρηνα λευκοκύτταρα, ινοβλάστες και νεόπλαστα αγγεία.(Στάδιο 2)



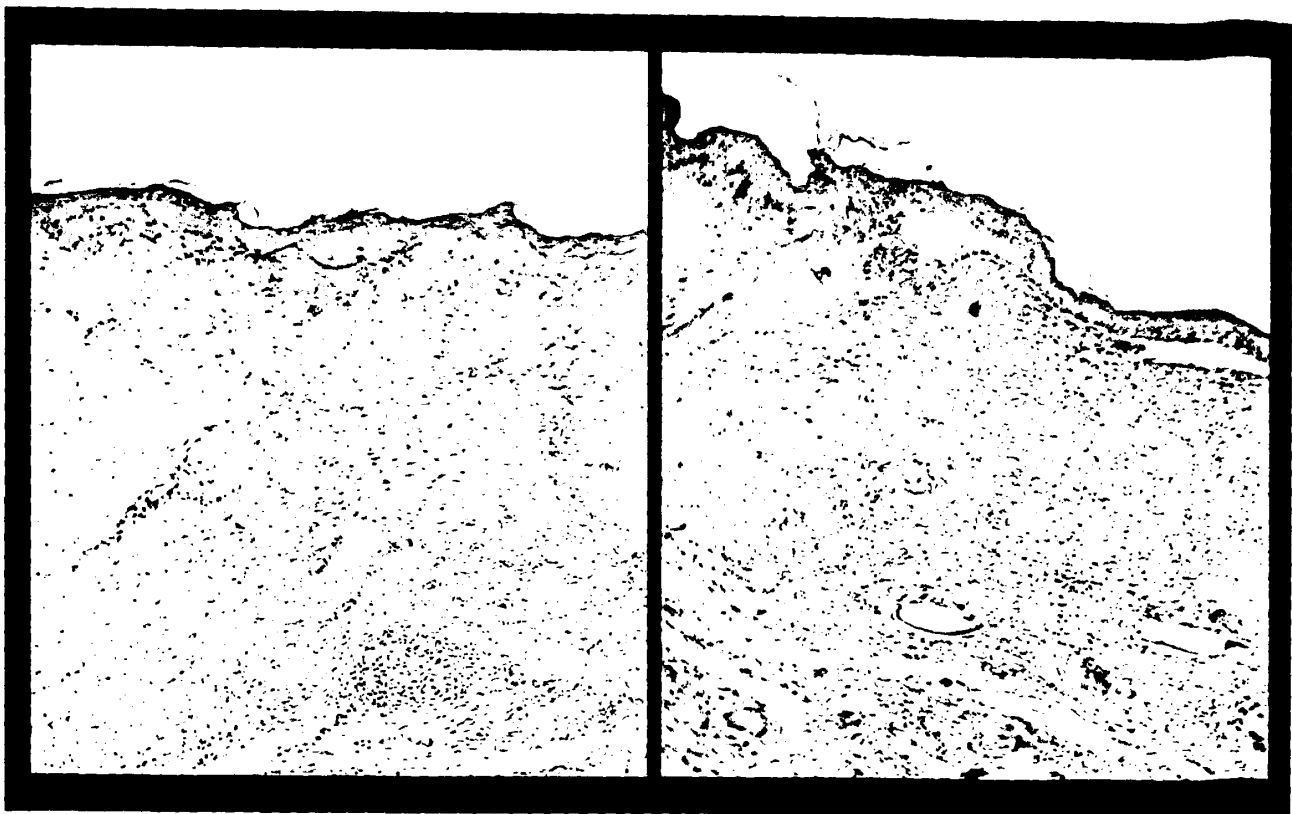
**Εικόνα 7.3.2:**

**Ημέρα 9<sup>η</sup> Ομάδα ελέγχου (αριστερά).**

Ωριμος συνδετικός ιστός με καλά ανεπτυγμένο αγγειακό δίκτυο και σχετικά ώριμους ινοβλάστες (Στάδιο3).

**Ημέρα 9<sup>η</sup> Ομάδα πειράματος (δεξιά).**

Πυκνό αγγειακό δίκτυο με ώριμους ινοβλάστες και δεσμίδες κολλαγόνου. Η επιθηλιοποίηση έχει αρχίσει.(Στάδιο 4.)



**Εικόνα 7.3.2:**

**Ημέρα 18<sup>η</sup> Ομάδα ελέγχου (αριστερά).**

Παρατηρείται ένα πρώιμο επιθηλιακό στρώμα, κάτω από το οποίο υπάρχουν ώριμοι ινοβλάστες και ίνες κολλαγόνου. (Στάδιο 5).

**Ημέρα 9<sup>η</sup> Ομάδα πειράματος (δεξιά).**

Ωριμο στάδιο επούλωσης με καλοσχηματισμένη επιδερμίδα και πυκνό συνδετικό ιστό κάτω από αυτήν. Οι ίνες του κολλαγόνου είναι παράλληλα διατεταγμένες με την επιφάνεια του δέρματος. (Στάδιο 6).

## ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Στην παρούσα εργασία μελετήσαμε τις βιολογικές δράσεις της εφαρμογής ενός ισχυρού παλμικού ηλεκτρομαγνητικού πεδίου βραχείας διάρκειας ( $10^{-6}$  sec), παραγόμενου από την συσκευή PAP. I.MI σε ένα μοντέλο χειρουργικού τραύματος, του οποίου η διεργασία επούλωσης έγινε κατά δεύτερο σκοπό στην ραχιαία επιφάνεια 24 επιμύων Wistar, ενώ άλλοι 24 αποτέλεσαν την ομάδα μαρτύρων. Οι αποτυπώσεις των ακριβών διαστάσεων εκάστου τραύματος έγιναν με την μέθοδο της πλανιμετρίας ενώ ταυτοχρόνως διενεργήθηκαν τακτικές βιοψίες για τον ιστολογικό έλεγχο της πορείας επούλωσης.

Τα δεδομένα μας υποδεικνύουν ότι οι ισχυροί ηλεκτρομαγνητικοί παλμοί επιτάχυναν στατιστικά σημαντικά την διαδικασία επούλωσης στην ομάδα πειράματος κατά τις πρώτες 9ημέρες, σε σχέση με την Ομάδα Ελέγχου, ενώ κατόπιν παρόλο που συνεχίστηκε η αυξημένη επουλωτική διαδικασία καθώς και καλύτερη ποιότητα επούλωσης στην Ο.Π. οι διαφορές της ταχύτητας επούλωσης μεταξύ των δύο ομάδων άρχισαν να συγκλίνουν και να γίνονται στατιστικά μη σημαντικές.

Τα συμπεράσματά μας αυτά φαίνεται ότι συμπίπτουν καλά με τα δεδομένα της διεθνούς βιβλιογραφίας<sup>(89-98,124)</sup>.

Υπάρχουν επίσης διάφορες θεωρίες οι οποίες αιτιολογούν τις δράσεις των ΗΜΠ επί των βιολογικών όντων και ειδικότερα επί των διαδικασιών αναγέννησης των ιστών και του κυτταρικού πολλαπλασιασμού. Οι θεωρίες αυτές φαίνεται να απολήγουν στο εξής ενιαίο θεωρητικό πλαίσιο: Τα ΗΜΠ είναι σε θέση να αλλοιώσουν την δομή των κυτταρικών μεμβρανών και με τον τρόπο αυτό να μεταβάλουν την διαβατότητα των διαφόρων εξειδικευμένων διαύλων δια των οποίων μετακινούνται τα διάφορα ιόντα, τα οποία, ως γνωστόν, παίζουν σημαντικούς ρόλους για τις συνολικές λειτουργίες των κυττάρων<sup>(125-127)</sup>. Δύο από τις σπουδαιότερες κυτταρικές λειτουργίες στις οποίες



τα δυναμικά των μεμβρανών και η διέλευση των ιόντων έχουν κεφαλαιώδη σημασία αντιπροσωπεύονται 1<sup>ov</sup>) από την παραγωγή χημικής ενέργειας υπό την μορφή τριφωσφορικής αδενοσίνης ( ATP) και 2<sup>ov</sup>) από την μεταβολή των ενδοκυττάρων επιπέδων του ελεύθερου ιόντος ασβεστίου, το οποίο, ως γνωστόν, αποτελεί έναν οικουμενικό διαμεσολαβητή δευτέρου τύπου<sup>(128)</sup>. Τόσο το επίπεδο της ενεργειακής παραγωγής του κυττάρου όσο και η διαμεσολάβηση δευτέρου βαθμού η οποία εξαρτάται από το ασβέστιο είναι άμεσα εξαρτημένοι από τις δομές και λειτουργίες των κυτταρικών μεμβρανών<sup>(129,130)</sup>. Πολύ χαρακτηριστικά η παραγωγή ATP εκ μέρους των μιτοχονδρίων ευρίσκεται σε στενότατη συνάφεια με την ύπαρξη ενός ηλεκτροχημικού πρηνούς το οποίο διαμορφώνεται μέσω διαδικασιών ενεργού άντλησης ιόντων κατά μήκος των μιτοχονδριακών μεμβρανών<sup>(130)</sup>. Όταν, για τον οποιοδήποτε λόγο, το πρηνές αυτό υποβαθμίζεται τότε η ροή των ηλεκτρονίων κατά μήκος της αναπνευστικής αλυσίδας δυσχεραίνεται με αποτέλεσμα την μείωση του ρυθμού της οξειδωτικής φωσφορυλίωσης<sup>(130)</sup>, πράγμα το οποίο συμβαίνει κατά κύριο λόγο όταν το κύτταρο ισχαιμεί. Συνεπώς η διατήρηση ενός φυσιολογικού ηλεκτροχημικού πρηνούς στο επίπεδο των μιτοχονδρίων είναι ικανή και αναγκαία συνθήκη για την παραγωγή ATP και συνακόλουθα για την πραγματοποίηση ενός υψηλού ρυθμού συνθέσεων από το κύτταρο (αναβολική δραστηριότητα). Φαίνεται ότι τα παλμικά πεδία έχουν την ικανότητα να ενισχύουν την αναπνευστική λειτουργία των μιτοχονδρίων και συνεπώς να αυξάνουν την ποσότητα της παραγομένης ATP<sup>(131-136)</sup>. Αν, από την άλλη μεριά τα ΗΜΠ έχουν την δυνατότητα να προκαλέσουν μια μικρή αύξηση της κινητοποίησης του ιονισμένου ασβεστίου τόσο ως μεταφορά από το εξωκυττάριο περιβάλλον προς τα μέσα και αντιστρόφως, όσο και ως απελευθέρωση του εν λόγω ιόντος από τις ενδοκυττάριες του αποθήκες, τότε είναι λογικό να συμπεράνουμε ότι μέσω των πεδίων έχουμε τον τρόπο να



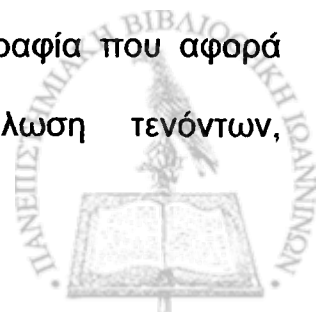
ενεργοποιήσουμε πλήρως τις λειτουργίες των κυτταρικών συνθέσεων<sup>(137-140)</sup>. Είναι προφανές ότι, υπό συγκεκριμένες συνθήκες, όπως αυτή του τραυματισμού, τα ΗΜΠ είναι σε θέση να ευοδώσουν συνολικά τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό, την ανάπτυξη των κυττάρων και συνακόλουθα, την επιθηλιοποίηση, καθώς και όλα τα βήματα του μηχανισμού που οδηγεί στην αποκατάσταση της βλάβης. Συνεπώς στο σημείο αυτό τα ΗΜΠ φαίνεται να έχουν δράσεις παρόμοιες με εκείνες των αυξητικών παραγόντων, ή, εναλλακτικά να επιβοηθούν είτε την σύνθεσή τους είτε την δράση τους<sup>(141-145)</sup>.

Είναι επίσης πιθανόν οι πρώτες δράσεις των ηλεκτρομαγνητικών πεδίων να συσχετίζονται με την παραγωγή μικρών ποσοτήτων ελευθέρων ριζών στο εσωτερικό των κυττάρων οι οποίες έχουν την ιδιότητα να λειτουργούν ως διαμεσολαβητικά μόρια στα συστήματα της ενδοκυττάριας επικοινωνίας<sup>(146-150)</sup>.

Οι ενέργειες που εκπέμπονται από την τεχνολογία ΡΑΡ.Ι.ΜΙ φαίνεται ότι είναι σε θέση να ενεργοποιήσουν το ύδωρ των ιστών προκαλώντας φαινόμενα παλμικής ραδιόλυσης του ύδατος, με αποτέλεσμα την παραγωγή μικρών ποσοτήτων ελευθέρων ριζών. Μη δημοσιευθέντα ακόμη δεδομένα του εργαστηρίου Φυσιολογίας υποδεικνύουν ότι οι παλμοί της συσκευής ενεργοποιούν το ύδωρ το οποίο επί μικρά χρονικά διαστήματα εκπέμπει σήματα χαρακτηριστικά της παρουσίας ελευθέρων ριζών .

Επίσης, άλλα δεδομένα, προερχόμενα εκ της διεθνούς βιβλιογραφίας φαίνεται ότι στηρίζουν την υπόθεση ότι τα ΗΜΠ διεγείρουν διαδικασίες παραγωγής πρωτεϊνών οξειάς φάσης (πρωτεΐνες θερμικού stress)<sup>(107)</sup>.

Όσο αναφορά την επίδραση της ηλεκτρομαγνητικής ακτινοβολίας στην επούλωση ιστών υπάρχει μια πολύ μεγάλη αναφορά στην διεθνή βιβλιογραφία που αφορά θετικές επιδράσεις στην επαγωγή οστεοβλαστών, επούλωση τενόντων,



αναδημιουργία νευραξόνων, νεοαγγειογένεση, βελτίωση επιβίωσης κρημνών, θεραπεία διαβητικών άκρων, και επιτάχυνσης δημιουργίας συνδετικού ιστού γενικότερα<sup>(89.-97,100,151-158)</sup>. Ενώ όσο αναφορά την επίδραση των Η.Μ.Π στην επούλωση ελλειμμάτων δέρματος ολικού πάχους κατά δεύτερο σκοπό (όπως στην εργασία μας) τα αποτελέσματα είναι αντιφατικά. Έτσι λοιπόν σε ένα σχετικό πείραμα που πραγματοποίησε ο Milgram J και συν.το 2004.<sup>(110)</sup> επάνω στην επούλωση τραυμάτων ολικού πάχους κατά 2<sup>ο</sup> σκοπό σε επίμυες Wistar και μάλιστα με την ίδια συσκευή με αυτήν που χρησιμοποιήσαμε στο πείραμα μας, παρατήρησε ήπια αύξηση επιθηλιοποίησης στην πειραματική ομάδα αλλά χωρίς στατιστικώς σημαντικά αποτελέσματα, σε σχέση με την ομάδα ελέγχου

Ενώ το 1996 και 1998 ο Ottani και συν.<sup>(155)</sup> και ο Pattino και συν<sup>(156)</sup>, αντίστοιχα ανακοίνωσαν την εξαιρετικά θετική επίδραση των χαμηλών συχνοτήτων παλμικών Η.Μ.Π με στατιστικώς σημαντική διαφορά στην επουλωτική διαδικασία σε τραύματα ολικού πάχους.

Εάν συγκρίνουμε τη μελέτη μας με αυτήν των Milgram J. και συν. παρατηρούμε ότι: χρησιμοποιήσαμε και οι δύο την ίδια συσκευή εκπομπής Η.Μ.Π, δηλ τα ίδια χαρακτηριστικά Ηλεκτρομαγνητικού Κύματος (δηλ. συχνότητα και ένταση πεδίου].

Οι διαφορά στα δύο μοντέλα έκθεσης όμως αφορά i) τη συχνότητα παλμών ανά λεπτό (3 παλμοί/δευτ εμείς και 5 παλμοί/δευτ αυτοί) και ii) ο διαφορετικός χρόνος έκθεσης των πειραματόζωνων (20λεπτά/24ώρο και 5λεπτά /24ωρο αντίστοιχα). Αυτό συνεπάγεται συνολική ακτινοβολία 3600 παλμών ανά ημερήσια θεραπεία (3600 pulse per treatment), στην μελέτη μας και 1500 παλμοί ανά ημερήσια θεραπεία (1500 pulse per treatment) αντίστοιχα. Η σημασία της παλμικής συχνότητας του πεδίου στις επουλωτικές επιδράσεις



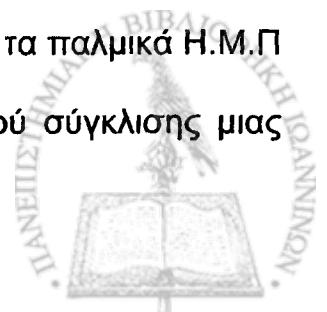
Φαίνεται και από τις πιλοτικές μας μελέτες στις οποίες παλμικότητες του πεδίου 1 παλμός/δευτ και 8παλμοί/δευτ δεν είχαν κανένα αποτέλεσμα στην επούλωση.

Βάσει λοιπόν των δεδομένων μας υποδεικνύεται ότι η υψηλότερη ενέργεια και η συνολική διάρκεια (χρόνος) εφαρμογών που χρησιμοποιήσαμε, είχε μια ουσιαστικότερη επίδραση στην διέγερση του επουλωτικού μηχανισμού, καθόσον η επιτάχυνση της επούλωσης υπήρξε στατιστικώς σημαντική εν συγκρίσει με την προαναφερθείσα πειραματική εργασία, στην οποία καταγράφηκε μόνο μια μη στατιστικώς σημαντική τάση αύξησης του ρυθμού επούλωσης.

Σύμφωνα λοιπόν με τα αποτελέσματα μας παρατηρήθηκε μια στατιστικώς σημαντική επιτάχυνση της επούλωσης τις πρώτες εννέα ημέρες από την εφαρμογή των παλμικών ηλεκτρομαγνητικών πεδίων στην πειραματική ομάδα. Αυτό πιστοποιήθηκε επίσης τόσο με πλανιμετρική όσο και με ιστολογική αξιολόγηση.

Οι ιστολογικές παρατηρήσεις έδειξαν κυρίως μια αύξηση της επουλωτικής διαδικασίας στην ομάδα πειράματος που ξεκινά από την 3<sup>η</sup> κιάλας ημέρα με τον σχηματισμό χαλαρού συνδετικού ιστού, νεόπλαστων αγγείων και καταλήγει σε γρηγορότερη επιθηλιοποίηση και καλύτερη «αρχιτεκτονική» - παράλληλα διατεταγμένα προς την επιφάνεια- των ινιδίων κολλαγόνου. Πρέπει επίσης να τονιστεί ότι από την 12<sup>η</sup> έως την 22<sup>η</sup> (ημέρα πλήρους επούλωσης τραύματος σε όλες της ομάδες), ότι παρόλο την μη , στατιστικώς σημαντική επιτάχυνση της επούλωσης στην ομάδα πειράματος η επουλωτική διαδικασία αυτής υπερίσχυε της ομάδας ελέγχου σε όλες τις μέρες της πειραματικής διαδικασίας. Με αποκορύφωση λοιπόν την 18<sup>η</sup> ημέρα όπου τα περισσότερα πειραματόζωα της Ο.Π είχαν πλήρως επουλωθεί, σε σχέση με την Ο.Ε. (Πίνακας 7.3.1, Γράφημα 7.3.2.)

Η επιτάχυνση της επούλωσης με μια μη επεμβατική μέθοδο όπως τα παλμικά Η.Μ.Π μπορεί να παίξει πολύ σημαντικό ρόλο στην αύξηση του ρυθμού σύγκλισης μιας





τραυματικής επιφάνειας. Μειώνοντας τον χρόνο έκθεσης ενός τραύματος στο εξωτερικό περιβάλλον, μειώνονται οι πιθανότητες συσσώρευσης βακτηριδίων.

Είναι γνωστό επίσης ότι τα παλμικά Η.Μ.Π υποβοηθούν την έκλυση αυξητικών παραγόντων, υποβοηθούν την παραγωγή κυτοκινών, συμβάλουν στην μείωση της οξείας φάσης φλεγμονής δημιουργώντας έτσι ένα περιβάλλον για την καλύτερη αναπλαστική και επουλωτική δραστηριότητα ενός τραύματος.

Συμπερασματικά λοιπόν καταλήγουμε ότι τα βραχείας διάρκειας παλμικά Η.Μ.Π επιταχύνουν και προάγουν την ποιότητα επούλωσης στο συγκεκριμένο πειραματικό μοντέλο. Τα αποτελέσματα αυτά φαίνεται να εξαρτώνται πέρα από τις ιδιότητες των πεδίων στους ιστούς, από την συχνότητα παλμών ανά δευτερόλεπτο (pulse per sec) και από τον χρόνο έκθεσης των ιστών μέσα σε αυτά. Περαιτέρω μελέτες χρειάζονται για τον καθορισμό των "ιδανικών" χαρακτηριστικών των παλμικών Η.Μ.Π τα οποία θα αποδώσουν την μέγιστη επουλωτική δραστηριότητα των ιστών.



## ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

Τα συμπεράσματα που προκύπτουν από την εργασία μας και την επισκόπηση της λοιπής βιβλιογραφίας μας είναι

- 1) Τα παλμικά ΗΜΠ βραχείας διάρκειας, χαμηλής παλμικής συχνότητας συμβάλουν σημαντικά στην επούλωση τραυμάτων ολικού πάχους, προκαλώντας σημαντική επιτάχυνση της επουλωτικής διεργασίας κατά τις πρώτες ημέρες εφαρμογής του πεδίου.
- 2) Τα παλμικά ΗΜΠ συμβάλουν θετικά στην ποιότητα επούλωσης
- 3) Οι συνιστώσες ενέργειας της παλμικότητας και της συχνότητας του πεδίου φαίνεται να παίζουν σημαντικό ρόλο στην επίτευξη των παραπάνω στόχων.
- 4) Περαιτέρω μελέτες είναι απαραίτητες προκειμένου να καθορισθούν τα ιδανικά χαρακτηριστικά (ένταση πεδίου, χρόνο έκθεσης, συχνότητα παλμού) των Ηλεκτρομαγνητικών πεδίων με τα οποία μπορούμε να εξασφαλίσουμε την καλύτερη επουλωτική επίδραση διατηρώντας τον λόγο αποτελέσματος/ παρενεργειών υπέρ του ασθενούς, αναπτύσσοντας ισχυρά αλλά και ασφαλή θεραπευτικά ηλεκτρομαγνητικά μέσα.

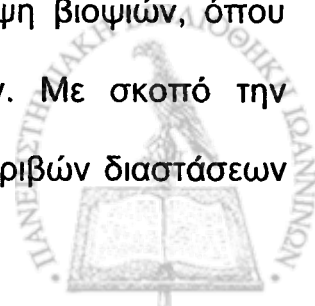


## ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Ένα μεγάλο εύρος Ηλεκτρομαγνητικών πεδίων έχουν πειραματικά εξεταστεί προκειμένου να μελετηθούν οι επιδράσεις τους στην διαδικασία επούλωσης τραυμάτων. Σκοπός της παρούσης μελέτης είναι η διερεύνηση της επίδρασης ενός ισχυρού παλμικού ηλεκτρομαγνητικού πεδίου βραχείας διάρκειας στην κατά δεύτερο επούλωση χειρουργικών τραυμάτων σκοπό σε επίμυες Wistar.

Για τον σκοπό αυτό χρησιμοποιήθηκαν συνολικά 48 άρρενες επίμυες Wistar (24 ζώα ομάδα ελέγχου και 24 ζώα ομάδα πειράματος), ηλικίας τεσσάρων μηνών και βάρους  $200 \pm 30$  γρ.

Τα πειραματόζωα αναισθητοποιήθηκαν και έπειτα στην ραχιαία επιφάνεια του σώματος αυτών δημιουργήσαμε χειρουργικό τραύμα διαστάσεων  $2 \times 2 \text{ cm}^2$ . Όλα τα ζώα τοποθετήθηκαν ανα τέσσερα σε ένα ειδικά κατασκευασμένο ξύλινο κλωβό χωρισμένο σε ισάριθμα διαμερίσματα χωρίς να έρχονται σε επαφή μεταξύ τους και διατηρώντας τα ακινητοποιημένα. Ο κλωβός αυτός τοποθετήθηκε κάτω από τον "βρόγχο", κεραία της συσκευής εκπομπής παλμικών ηλεκτρομαγνητικών πεδίων ΡΑΡΙ.ΜΙ με χαρακτηριστικά ( $1 \times 10^{-6}$  δευτ διάρκεια κύματος,  $35-80 \times 10^6 \text{ W}$  ισχύ κύματος, ένταση πεδίου της τάξεως των 125 gauss, διάρκεια παλμού με εύρος από 0,1μs, έως 10μs, παλμικότητα 3Hz) για 20λεπτα/ημερησίως για 22 ημέρες. Με την διαφορά ότι στα ζώα της ομάδος πειράματος η συσκευή ήταν ενεργοποιημένη ενώ στα ζώα της ομάδος ελέγχου ήταν απενεργοποιημένη. Έτσι τα πειραματόζωα υποβλήθηκαν σε ίδιες συνθήκες «stress» εκτός από την έκθεση της Ομάδος ελέγχου στο Η.Μ.Π. Κατά την 3<sup>η</sup>, 6<sup>η</sup>, 9<sup>η</sup>, 12<sup>η</sup>, 18<sup>η</sup> και 22<sup>η</sup> ημέρα σε τέσσερα πειραματόζωα από την κάθε ομάδα (Ο.Π και Ο.Ε) γινόταν ευθανασία και λήψη βιοψιών, όπου περιελάβανε όλη την ραχιαία επιφάνεια των πειραματόζωων. Με σκοπό την πραγματοποίηση ιστοπαθολογικών ελέγχων και μέτρηση των ακριβών διαστάσεων



του χειρουργικού τραύματος. Οι διαστάσεις του τραύματος εκτιμήθηκαν με την μέθοδο της πλανιμετρίας.

Σύμφωνα λοιπόν με τα ευρήματα μας παρατηρείται στατιστικά σημαντική επιτάχυνση του ρυθμού επούλωσης του τραύματος κατά τις πρώτες εννέα ημέρες στην ομάδα πειράματος. Από την 9<sup>η</sup> έως την ημέρα πλήρους επούλωσης τραυμάτων δεν παρατηρήθηκε στατιστικά σημαντική διαφορά σε σχέση με την ομάδα ελέγχου.

Ο ρυθμός επούλωσης στην ομάδα πειράματος ήταν ταχύτερος και ολοκληρώθηκε νωρίτερα την 18<sup>η</sup> ημέρα σε σχέση, με την ομάδα ελέγχου Τα δεδομένα μας αυτά πιστοποιήθηκαν τόσο με ιστολογικές όσο και με πλανιμετρικές μετρήσεις.

Από την πειραματική αυτή εργασία διαπιστώνεται ότι τα βραχείας διάρκειας παλμικά Η.Μ.Π επιταχύνουν και προάγουν την ποιότητα επούλωσης στο συγκεκριμένο πειραματικό μοντέλο. Περαιτέρω μελέτες χρειάζονται για τον καθορισμό των "ιδανικών" χαρακτηριστικών των παλμικών Η.Μ.Π, τα οποία θα συμβάλλουν στην μέγιστη επουλωτική δραστηριότητα των ιστών.



## ABSTRACT

### EFFECTS OF A POWERFUL, SHORT DURATION PULSED ELECTROMAGNETIC FIELD ON THE SECONDARY HEALING OF SKIN WOUNDS IN WISTAR RATS

A variety of pulsed electromagnetic fields (PEMF) have already been experimentally used in an effort to promote wound healing. Aim of the present study was to investigate the effects of short duration PEMF on secondary healing of full thickness skin wounds in a rat model.

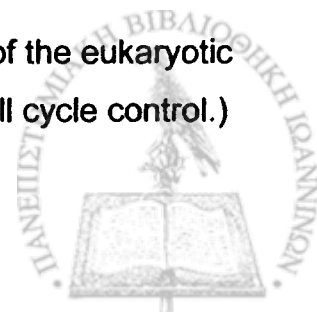
Full thickness skin wounds sized 2 by 2 cm were surgically inflicted in two groups of male Wistar rats, 24 animals each. In the first group (experimental group - EG) the animals, were placed and immobilized four each time in a special constructed box without having any contact between them. The box was exposed to a short duration PEMF (35-80 joule/pulse energy, wave duration  $1 \times 10^{-6}$  sec, wave power  $35-80 \times 10^6$  W and repetitive frequency of 3Hz) for 20 min daily. In the second group (control group - CG), the animals were subjected to the same procedure, but with the device not activated. On days 3, 6, 9, 12, 18, and 22 following the infliction of skin defect, the size and healing process of each wound were recorded and evaluated, by means of planimetry and histological examination.

According to our findings with the planimetry, there was a statistically significant acceleration of the healing process for the first nine days in EG, whereas a great improvement of healing process was identified at each time of histological examination, compared to the control group.



## BIBΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

1. B. Knight. The history of wound treatment. *Nurs Times* 1981, 77:43 Suppl 2: 5-8.
2. G. Manjo The healing Hand. Man and wound in the Ancient World. Harvard University press London 1991.
3. D. Hauben The evolution of wound healing by first intention (A short history of wound treatment). *Koroth* 1985, 8: 11, 77-88.
4. M. Gelbart Times ' great Healers. *Nurs Times* 1998, 94:34, 65-69
5. M. Benbow Methods of wound debridment. *Nurs Times* 1998. 94: 78-83.
6. JG McCarthy. Introduction to Plastic Surgery. In: McCarthy JG (ed), *Plastic Surgery*. Philadelphia, WB Saunders, 1990; Vol 1, Ch 1, pp 48-54.
7. RG Bennett. The fundamentals of cutaneous surgery. St Louis, Mosby, 1990, pp 463-471.
8. V.Kumar, R.Cotran ,S.Robbins .Basic Pathology, 6<sup>th</sup> edition,WB Saunders Company 51:64, Philadelphia 2000.
9. F. Grinnell. Wound healing:biochemical and clinical aspects. WB Saunders Company Philadelphia 1993.
10. B. Achauer, E.Eriksson, B. Guyuron, et all. *Plastic Surgery: Normal Wound Healing* 37:51, Mosby 2000.
11. MH McGrath. Peptide growth factors and wound healing. *Clin Plast Surg.* 1990; 17(3):421.
12. V. Moulin. Growth factors in wound healing. *Eur J Cell Biol*, 1995; 68:1.
13. T.Boulikas. Phosphorylation of transcription factors and control of the cell cycle. *Crit Rev Eucaryot Gene Expr* 5:1, 1995.
14. DO Morgan. Principals of CDK regulation. *Nature* 374:131, 1995. (A description of the interconnected regulatory mechanisms controlling cellular proliferation.)
15. EA Nigg. Cyclin-dependent protein kinases, Key regulators of the eukaryotic cell cycle . *Bioessay* 17:471,1995. (A review of cyclin-cdk cell cycle control.)



16. R Clark, PM Henson. The molecular and Cellular Biology of Wound Repair. New York Plenum 1996. (A comprehensive volume on wound repair.)
17. J. Myllyharju, KI Kivirikko. Collagens and collagen-related diseases. Feb 2001; Ann Med, 33(1):7-21
18. W. Henkel, RW Glanville. Covalent crosslinking between molecules of type I and type III collagen. The involvement of the N-terminal, nonhelical regions of the alpha 1 (I) and alpha 3 (III) chains in the formation of intermolecular crosslinks. Feb 1982; Eur J Biochem, 122(1):205-13.
19. DR Keene, LY Sakai, HP Bachinger, RE Burgeson . Type III collagen can be present on banded collagen fibrils regardless of fibril diameter. Nov 1987; J Cell Biol, 105(5):2393-402.
20. DR Keene, E. Engvall, RW Engville. Ultrastructure of type VI collagen in human skin and cartilage suggest an anchoring function for this filamentous network. Nov 1988; J Cell Biol. 107(5);1995-2006.
21. P. Bornstein and W. Traub. The chemistry and biology of collagen. 1979; In: The proteins, Newrath H. and Hill P.L. (eds), vol. 4, Acad. Press, New York, 1979, p.411.
22. EJ Miller, S. Gay. Collagen: an overview. 1982; Methods Enzymol, 82 Pt A: 3-
23. L. Ala-Kokko, S Kontusaari, CT Baldwin, H. Kuivaniemi, DJ Prockop. Structure od cDNA clones coding of the entire prepro alpha 1 (III) chai of human type III procollagen. Differences in protein structure from type I procollagen and conservation of codon preferences. Jun 1989; J. Biochem, 1; 260(2): 509-16.
24. DE Birk, JM Fitch, JP Babiarz, TF Linsenmayer. Collagen type I and type V are present in the same fibril in the avian corneal stroma. Mar 1988; J Cell Biol, 106(3):999-1008.
25. K. Nakayasu, M. Tanaka, H. Konomi, T. Hayashi. Distribution of types I, II, III, IV and V collagen in normal and keratoconus corneas. 1986; Ophthalmic Res. 18(1):1-10.

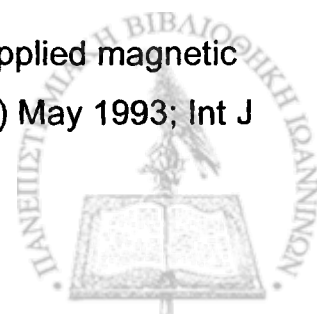


26. CJ. Doillon, MG. Dunn, E Bender. Collagen Fiber formation in repair tissue: development of strength and toughness. *Coll Rel Res* 5:481-492, 1985.
27. RA Berg, DJ Prockop. The thermal transition of a non-hydroxylated form of collagen. Evidence for a role for hydroxyproline in stabilizing the triple-helix of collagen. May 1973; *Biochem Biophys Res Commun* 1;52(1):115-20.
28. MA Karasek. Mechanisms of angiogenesis in normal diseased skin. *Int J Dermatol*, 1991; 30:831.
29. GL Brown et al. Enhancement of wound healing by topical treatment with epidermal growth factor. *N Eng J Med*. 1989; 321:76.
30. MC Robson, BD Stenberg, JP Heggors. Wound healing alterations caused by infection. *Clin Plast Surg*. 1990;17(3):485.
31. JR Ellis, SL Schor. Differential effects of TGF- $\beta$ 1 on hyaluronan synthesis by fetal and adult skin fibroblasts: implications for cell migration and wound healing. *Exp Cell Res*. 1996; 228:326.
32. Ι. Ιωαννοβίτς . Διαταραχές επούλωσης. Πλαστική Χειρουργική pp23:33, Λίτσας 1990.
33. R.Rorich,J.Robinson:Wound healing. *Selected Readings in plastic surgery* 9:1-17, 1999.
34. SJ Mathes, L-J Feng, TK Hunt. Coverage of the infected wound. *Ann Surg*, 1983; 198:420.
35. JC Murray. Scars and keloids. *Dermatol Clin*. 1993; 11:697.
36. LD Ketchum, IK Cohen, FW Masters. Hypertrophic scars and keloids. A collective review. *Plast Reconstr Surg*. 1974; 53:140.
37. GS Brody, STJ Peng, RF Landel. The etiology of hypertrophic scar contracture: another view. *Plast Reconstr Surg*. 1981; 67:673
38. J. Slavin. Fibroblast growth Factors at the heart of angiogenesis. *Cell Bioll Int* 19:431, 1995.
39. Ilya Prigogine. *From Being to Becoming: Time and Complexity in the Physical Sciences*. San Francisco, 1980.





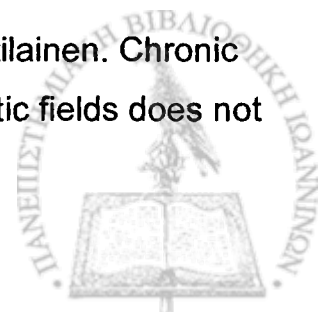
40. M P. Murphy, Luke J. O'Neill. What is life? The next Fifty Years: Speculations on the future of Biology. 1995; Cambridge University Press
41. E N. Purcell, Gerhard Gade. Electromagnetics, Courses of Physics University of Berkeley. 1999.
42. Guyton and Hall. Φυσιολογία του Άνθρωπου και Μηχανισμοί των νόσων. (Επιστημονικές Εκδόσεις Παρισιανού) 2001;4(39-51), 5:(55-62).
43. JF Schenk, CL Dumoulin, RW Redington, HY Kressel, RT Elliot, IL McDougal. Human exposure to 4 tesla magnetic fields in a whole body scanner. 1992; Med Phys, 19, 1089-98.
44. DW Chakeres, R. Bornstein, A. Kangarlu. Randomized comparison of cognitive function in humans at 0 and 8 Tesla. Sept 2003 (2003a); J Magn Reson Imaging 18(3):342-5.
45. DW Chakeres, A. Kangarlu, H. Boudoulas, DC Young. Effect of static magnetic fields exposure of up to 8 Tesla on sequential human vital signs measurements. Sept .2003 (2003b); J Magn Reson Imaging 18(3)346-52.
46. M. Ogiue-Ikeda, H. Kotani, M. Iwasaka Inhibition of leukemia cell growth under magnetic fields of up to 8 T. 2001; 37(4),2912-14.
47. M. Obsakken, J. Griffith, P. Taczanowsky. A gross morphologic, histologic, hematologic, and blood chemistry study of adult and neonatal mice chronically exposed to high magnetic fields. Aug 1986; Magn Reson Med 3(4):502-17.
48. BD Jankovic, D Maric, J. Ranin, J. Veljic. Magnetic fields, brain and immunity: effect on humoral and cell-mediated immune responses. Jul 1991; Int J Neurosci 59(1-3):25-43.
49. BD Jankovic, K Jovanova-Nesic, V Nikolic. Locus ceruleus and immunity III. Compromised immune function (antibody production, hypersensitivity skin reactions and experimental allergic encephalomyelitis) in rats with lesioned locus ceruleus is restored by magnetic fields applied to the brain. (1993a) Mar-Apr 1993; Int J Neurosci 69(1-4):251-69.
50. BD Jankovic, K Jovanova-Nesic, V Nikolic, P Nicolic. Brain-applied magnetic fields and immune response: role of the pineal gland. (1993b) May 1993; Int J Neurosci 70(1-2):127-34.



51. BD Jankovic, P Nicolic, V Cupic, K Hladini. Potentiation of immune responsiveness in aging by static magnetic fields applied to the brain. Role of the pineal gland. May 1994; Ann N Y Acad Sci 31;719:410-8.
52. CT Gaffey, TS Tenforde. Changes in the electrocardiograms of rats and dogs exposed to DC magnetic fields. 1979; CA Berkeley, University of California, Lawrence Berkeley Laboratory, LBL-9085.
53. CT Gaffey, TS Tenforde. Alterations in the rat electrocardiogram induced by stationary magnetic fields. 1981; Bioelectromagnetics 2(4):357-70.
54. T Suda, S Ueno. Control of the orientation of erythrocytes by magnetic and electric fields. 1999; J Appl Phys 85(8), 5711-13.
55. H Kotani, M Iwasaka, A Curtis, S Ueno. Magnetic orientation of collagen and bone mixture. 2000; J Appl Phys, 87(9), 6191-3.
56. JP Reilly. Cardiac sensitivity of stimulation. IN Applied Bioelectricity: from Electrical Stimulation to Electropathology. 1998; New York, Springer, Chapter 6, pp 194-239.
57. JP Reilly. Electrophysiology in the zero to MHz range as a basis for electric and magnetic field exposure standards. IN Health Effects of Electromagnetic Fields in the Frequency Range 300 Hz to 10 MHz. 1999; Munich, ICNIRP 8/99, pp 69-104.
58. PJ Cooper, A Garny, P Kohl. Cardiac electrophysiology: theoretical considerations of a potential target for weak electromagnetic field effects. 2003; Radiat Prot Dosimetry 106(4):363-8.
59. GR Warman, HM Tripp, VL Warman, J Arendt. Circadian neuroendocrine physiology and electromagnetic fields studies: precautions and complexities. 2003; Radiat Prot Dosimetry 106(4):369-73.
60. AGNIR. ELF electromagnetic fields and the risk of cancer. Report of an Advisory Group on Non-Ionizing Radiation. 2001a; Doc NRNB, 12(1), 1-179.
61. IARC (2002). Static and extremely low frequency electric and magnetic fields . IARC Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans, Volume 80. Lyon. International Agency for Research on Cancer.



62. ICNIRP (1999). Health Effects of Electromagnetic Fields in the Frequency Range 300 Hz to 10 MHz. Proceedings International Seminar, Maastricht, the Netherlands, June 1999. Munich, ICNIRP 8/99.
63. SM Michaelson and EC Elson. Modulated fields and 'window' effects. In: C Polk and E Postow eds. Biological effects of electromagnetic fields. 1996; Boca Raton, FL: CRC Press; 1996: 435-533.
64. AGNIR. Health effects from radio frequency electromagnetic fields. Report of an Advisory Group on Non-Ionizing Radiation. 2003; Doc NRPB, 14(2), 1-177.
65. K. Mann, J. Roscke, B. Connemman, H. Beta. No effects of pulsed high-frequency electromagnetic fields on the neuroendocrine system. Feb 1998; 67(2):139-44.
66. K. Radon, D. Parera, DM Rose, D. Jung, L. Vollrath. No effects of pulsed radio frequency electromagnetic fields on melatonin, cortisol, and selected markers of the immune system in man. May 2001; 22(4):289-7.
67. S. Sarkar, S. Ali, J. Behari. Effect of low power microwave on the mouse genome: a direct DNA analysis. Jan 1994; Mutate Res. 320(1-2):141-7.
68. H. Lai, NP Singh. Acute low-intensity microwave exposure increases DNA single-strand breaks in rat brain cells. 1995; Bioelectromagnetics. 16 (3):207-10.
69. H. Lai, NP Singh. Single- and double-strand DNA breaks in rat brain cells after acute exposure to radiofrequency electromagnetic radiation. Apr 1996; Int J Radiat Biol. 69(4):513-21.
70. RS Malyapa, EW Ahern, C. Bi, WL Straube, M. LaRegina, WF Pickard, JL Roti Roti. DNA damage in rat brain cells after in vivo exposure to 2450 MHz electromagnetic radiation and various methods of euthanasia. Jun 1998; Radiat Res. 149(6):637-45.
71. L. Vollrath, R. Spessert, T. Kratzsch, M. Keiner, H. Hollmann. No short-term effects of high-frequency electromagnetic fields on the mammalian pineal gland. 1997; Bioelectromagnetics. 18(5): 376-87.
72. P. Heikkinen, T. Kumlin, JT Laitinen, H. Komulainen, J. Juutilainen. Chronic exposure to 50 Hz magnetic fields or 900 MHz electromagnetic fields does not



alter nocturnal 6-hydroxymelatonin sulfate secretion in CBA/S mice. 1999; *Electro-Magnetobiol*, 18(1):33-42.

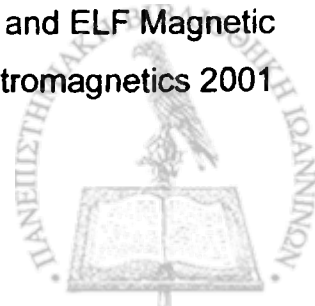
73. MR Scarfi, MB Lioi, G. D'Ambrosio, R. Massa, O. Zeni, R. Di Pietro, D. Di Berardino. Genotoxic effects of mitomycin-C and microwave radiation on bovine lymphocytes. 1996; *Electro-Magnetobiol*, 15, 99-107.
74. SF Cleary, G. Cao, LM Liu, PM Egle, KR Shelton. Stress proteins are not induced in mammalian cells exposed to radiofrequency or microwave radiation. 1997; *Bioelectromagnetics*, 18(7):499-505.
75. S Kwee and P Rasmak. Changes in cell proliferation due to environmental non-ionizing radiation: 2. Microwave radiation. 1998; *Bioelectrochem Bioenerg.* 44, 251-5.
76. PA Valberg, R. Kavet and CN Rafferty. Can low-level 50/60 Hz electric and magnetic fields cause biological effects? 1997; *Radiat. Res.* 148 PP. 21-21.
77. X Balcavage, T. Alvager, J. Swez, CW Goff, MT Fox, S. Abdullyava and MW King. A mechanism for action of extremely low frequency electromagnetic fields on biological systems. 1996; *Biochem. Res. Commun.* 222 pp. 374-378.
78. FS Barnes. Interaction of DC and ELF electric fields with biological materials and systems. 1996; In: C. Polk and E. Postow, Editors, *CRC Handbook of Biological Effects of Electromagnetic Fields*, CRC Press, Boca Raton, FL pp. 27-96.
79. BH Honig, WL Hubbell and RF Flewelling. Electrostatic interactions in membranes and proteins. 1986; *Annu. Rev. Biophys. Chem.* 15 pp. 163-193.



80. RK Adair. Biological effects on the cellular level of electric field pulses. 1991; Health Phys. 61 3 pp. 395&#x2013;399.
81. A.Chiabrera, B. Bianco, E. Moggia and T. Tommasi. Interaction mechanism between electromagnetic fields and ion absorption: endogenous forces and collision frequency. 1994; Bioelectrochem. Bioenergetics 35, pp. 33&#x2013;37.
82. DJ Panagopoulos, N. Messini, A. Karabarbounis, AL Filippelis, LH Margaritis. A mechanism for action of oscillating electric fields on cells. 2000; Biochem. Biophys. Res. Commun. 272 3 pp.634&#x2013;640.
83. Y. Kinouchi, H. Yamaguchi, TS Tenforde. Theoretical analysis of magnetic field interactions with aortic blood flow 1996; Bioeletromagnetics 17(1):21-32.
84. AGNIR. Health effects related to the use of visual display units. Report of an advisory group on Non-Ionizing Radiation. 1994; Doc NRPB, 5(2), 1-75.
85. B. Hille. Ion Channels of Excitable Membranes (3<sup>rd</sup> edition). 2001; Sunderland. Sinauer Associates.
86. WA Catterall. Structure and regulation of voltage-gated Ca<sup>+2</sup> channels. 2000; Annu Rev Cell Dev Biol;16:521-55.
87. J. Weiss, RC Herrick, KH Taber, C. Contact, GA Plishker. Bio-effects of high magnetic fields: a study using a simple animal model. 1992; Magn Reson Imaging. 10(4):689-94.
88. JC.Weaver.Electroporation Review. Journal of Cellular Biochemistry, Harvard-MIT. April 1993, 51:426
89. RK Aaron, DM Ciombor, BJ Simson. Treatment of nonunions with electric and electromagnetic fields. Clin.Orthop. 2004 Feb;(419):21-9
90. N. Cullum, EA Nelson, K. Flemming, T. Sheldon. Systematic reviews of wound care management(5) beds,(6) compression, (7)laser therapy, therapeutic ultrasound, electrotherapy and electromagnetic therapy. Health technol.Asses.2001:5(9):1-221
91. DH Trock. Electromagnetic fields and magnets .Investigational treatment for musculoskeletal disorders. Dis Clin North Am 2000 Feb; 26(1) 52-62 viii.



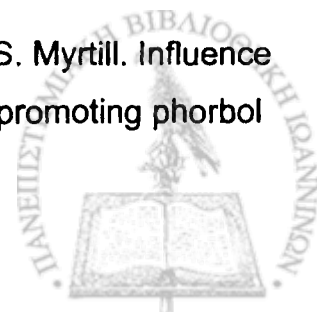
92. JT Ryaby. Clinical effects of electromagnetic and electric fields on fracture healing. Clin.Orthop. 1998 Oct;(355 suppl):205-15
93. MW Otter, KJ Mcleod, CT Rubin. Effects of electromagnetic fields in experimental fracture repair. Clin.Orthop.1998 Oct;(355 suppl):S90-104.
94. JA Beech. Bioelectric potential gradients may initiate cell cycling: ELF and zeta potential gradients may mimic this effect. Bioelectromagnetics.1997;18(5):341-8.
95. RK Aaron, DM Ciombor. Therapeutic effects of electromagnetic fields in stimulation of connective tissue repair. J. Cell. Biochem. 1993 May;52(1):42-6
96. CA Basset. Beneficial effects of electromagnetic fields. J. Cell. Biochem. 1993 Apr;51(4)387-93.
97. L. Vodovnik, R. Karba. Treatment of chronic wounds by mean of electric and electromagnetic fields.Part 1. Med.Biol.Eng Comput.1992 May;30(3):257-66
98. RA Luber. Effects of Low energy electromagnetic fields (pulsed and DC) on membrane signal transduction processes in biological systems. Health Physiol.1991 jul;61(1):15-28
99. S.Tofani, M. Cintorino, D. Barone, M. Berardelli, M.M de Santi, A Ferrara, R Orlassino, P Ossola, K.Rolfo, S.A Tripodi, and P. Tosi. Increased Mouse Survival, Tumor Growth Inhibition and Decreased Immunoreactive P53 after exposure to Magnetic Fields.. Bioelectromagnetics, 2002; 23:230-238.
100. JL Walker, JM Evans, P. Resing, S. Guarnieri, P.Meade, BS Sisken. Enhancement of functional recovery following a crush lesion to the rat sciatic nerve by exposure to pulsed electromagnetic fields .Exp. Neurol.1994,feb;125(2):302-305.
101. MY Maciar, JH Battocletti, CH Sutton, FA Pintar, DJ Maiman. Directed and enhanced neurite growth with pulsed electromagnetic field stimulation. Bioelectromagnetics 2000 May;21(4):272-86.
102. S.Tofani, M. Cintorino, D. Barone, M. Berardelli, M.M de Santi, A Ferrara, R Orlassino, P Ossola, K.Rolfo, S.A Tripodi, and P. Tosi. Static and ELF Magnetic Fields induce tumor growth inhibition and apoptosis. Bioelectromagnetics 2001 ; 22 : 419 – 428.



103. BI Islamov, RN Balabanova, et al. Effect of bioresonance therapy on antioxidant system in lymphocytes in patients with rheumatoid arthritis *Bull Exp Biol Med* 134(3):248-250,2002
104. Q. Tao, A. Henderson. EMF induces differentiation in HL – 60 cells. *J. Cell Biochem.* 1999 May 1; 73(2) : 212-7.
105. L. Stonati, A. Testa, P. Villani, C. Marino, GA Lovisolo, D.Conti, F. Russo, AM Fresegna, F. Cordelli. Absence of genotoxicity in human blood cells exposed to 50 Hz magnetic fields as assessed by comet assay, chromosome aberration , micronucleus , and sister chromatid exchange analyses. *Bioelectromagnetics* 2004, Jan; 25(1): 41 – 8.
106. V. Sergey, V. Tokalov and O. Herwing Gutzeit. Weak electromagnetic fields (50 Hz) elicit a stress response in human cells. *Envir. Res.* 94 (2004) 145-151.
107. L. Han, H. Lin, M. Head, M Blank , R Goodman Application of magnetic fields – induced heat shock protein 70 for presurgical cytoprotection. *J. Cell Biochem.* 1998 ; 78. 371-379.
108. B. Junkersdorf, H. Bauer, HO Gutzeit. Electromagnetic fields enhance the stress response at elevate temperature in the nematode *Caenorabditis Elegans*. *Bioelectromagnetics* . 2000. 21.100-106.
109. LN Heynick, SA Johnston, PA Mason. Radio frequency electromagnetic fields : cancer , mutagenesis and genotoxicity. *Bioelectromagnetics* 2003 ; Suppl 6 : S 74 – 100.
110. J. Milgram, R. Shahar, T. Levin–Harrus, and P. Kass. The effect of short high, intensity magnetic field pulses on the healing of skin wounds in rat. *Bioelectromagnetics* 25 : 271 – 277(2004).
111. G. Chen, BL Upham, W Sun, CC Changes, EJ Rothwell, KM Chen, H Yamasaki, JE Trosko. Effect of electromagnetic field exposure on chemically induced differentiation of field erythroleucemia cells.



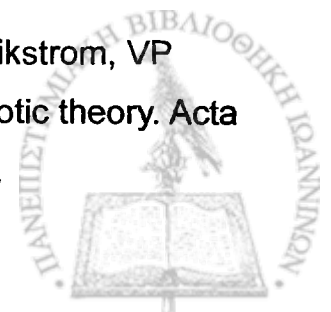
112. HP Rodenman, HP Peterson, K. Schwenke, KH Von Wangenheim. Terminal differentiation of human fibroblasts is induced by radiation.. Scanning Microscop. 1991 , Dec ; 5(4) : 1135-42.
113. M. Simko, D. Richard, R. Kriehuber, DG Weiss. Mutat. Micronucleus induction in Syrian hamster embryo cells following exposure to 50 Hz magnetic fields , benzo[a]pyrene TPA in vitro. Res. 2001 Aug 22 ; 495 (1-2) : 43-50.
114. S. Karkabounas, K. Havelas, J. Binolis, E. Theodosopoulou, O. Kostoula, A. Avdikos, G. Hatzivazis, A. Zouridakis, C. Charalabopoulos, K. Mateeskou, I. Yioti, A. Metsios, and Angelos Evangelou. Effects of very low intensity radiofrequency static EMFs on sarcoma cell lines. Exp Oncol. Feb 2005. In press
115. RJ Reiter. Static and extremely low frequency electromagnetic field exposure : reported effects on the circadian production of melatonin. J Cell Biochem 1993 Apr; 1(4):394 – 403
116. C. Albinucci, JB Garcia, M. Palmi, G. Sgaragli, A. Benocci, A. Meini, F. Pessina, C. Rossi, C. Bonechi, GP Pessina. The effect of exposure to high flux density static and pulsed magnetic fields on lymphocyte function. Bioelectromagnetics 2003 Sep; 24(3) : 373 – 9.
117. C. Albinucci, JB Garcia, M. Palmi, G. Sgaragli, A. Benocci, A. Meini, F. Pessina, C. Rossi, C. Bonechi, GP Pessina. The effect of strong static magnetic field on lymphocytes. Bioelectromagnetics 2003, Feb; 24 (2) : 109 – 117.
118. K. Ikeda, Y. Shinmura, H. Mizoe, H. Yoshizawa, A. Yoshida, S. Kanao, H. Sumitani, S. Hasebe, T. Motomura, T. Yakamawa, F. Mizuno, Y. Otaka, H. Hirose. No effects of extremely low frequency magnetic fields found on cytotoxic activities and cytokine production of human peripheral blood mononuclear cells in vitro. Bioelectromagnetics 2003 Jan; 24 (1):21-31.
119. Electromagnetic fields induced changes in lipid second messengers. Clejan S, Ide C, Walker C, Wolf E, Corb M, Beckman B. J. Lipid Mediat. Cell Signal. 1996 May , 13(3): 301-24.
120. D. Richard, S. Lange, T. Viergutz, R. Kriehuber, DG`Weiss, S. Myrtil. Influence of 50 Hz electromagnetic fields in combination with a tumor promoting phorbol





ester on protein kinase C and cell cycle in human cells. *Mol. Cell Biochem.* 2002 Mar ; 232 ( 1 -2 ) : 133 – 41.

121. W. Grudler, F. Kaiser, F. Keilmann, J. Walleczek. Mechanisms of electromagnetic interactions with cellular systems. *Naturwissenschaften* 1992 ; 79 : 551 – 559.
122. M. Lander. An essential role of free radicals and derived species in signal transduction . *FASEB J.*1997; 11: 118-124.
123. JC Scaiamo, N. Monhat, FI Cozens, J. Mc Lean, A. Thansandote. Application of the radical pair mechanism to free radicals in organised systems: can the effects of 60 Hz be predicted from studies under static fields ? *Bioelectromagnetics* 1994 ; 15: 549-554.
124. J. Walleczek. Magnetokinetics effects on radical pairs : A paradigm for magnetic field interactions with biological systems at lower thermal energy. *And. Chemother.* 1995; 250: 395-420.
125. A. Mandonero. Influence of magnetic fields on calcium salts crystal formation: an explanation of the "pulsed emf" technique for bone healing. *J.Biomed.Eng* 1990 sep;12(5):410-4.
126. BH Honing, WL Hubbell, RF Flewelling. Electrostatic interactions in membranes and proteins. *Ann Rev Biophys Chem* 1986; 15: 153 – 193.
127. B. Chiabrera, B. Bianco, E. Moggia and T. Tommasi. Interaction mechanism between electromagnetic fields and ion absorption : endogenous forces and collision frequency. *Bioelectrochem Bioenergetics* 1994; 35 : 33 – 37.
128. CF Blackman, SG Benane, JA Elder, DE House, JA Lampe and JM Faulk. Induction of calcium – ion efflux from brain tissue by radiofrequency radiation : effect of sample number and modulation frequency on the power density window. *Bioelectromagnetics* 1980; 1 : 35 – 43.
129. E. Carafoli. The ambivalent nature of calcium signal. *J Endocrinol Invest* 2004; 27(6 supp) : 134 –136.
130. HV Westerhoff, SL Helgerson, SM Theg, O. Van Koster, M.Wikstrom, VP Skulachev, Z. Dancshary. The present state of the chemiosmotic theory. *Acta Biochim Biophys Acad Sci Hung* 1983; 18 ( 3 –4 ) : 129 – 149.



131. C. Schimitz, E. Keller, T. Freuding, J. Silny, H.Katzz. 50-Hz magnetic field exposure influences DNA repair and mitochondrial DNA synthesis of distinct cell types in brain and kidney of adult mice. *Acta Neuropathol. (Berl)* 2004 Mar;107 (3):257-64
132. Z. Somsoy: Radiation response of cell organeller. *Micron*.2000 Apr;31(2):165-81
133. P. Rolfe. Cellular Interactions with NIR EM energy. *Med Biol Eng Comput.* 1992 jul;30(4):CE 29-32
134. W. De Locker, PH Delpport, N. Cheng. Effects of pulsed electromagnetic fields on rat skin metabolism. *Biochem. Biophys.Acta*,1989 jun 26,982(1):9-14
135. VR Faitel' berg, LA Shapovalova. Changer in the functional state of the rat liver and kidney mitohondria under the effect of Electromagnetic fields. *UK Biohim.Zh.*1975 Jul-Aug;47(4):491-4.
136. PC Vernier, L. San Y,Match, CM Craft, MA Gundersen. Nanoelectropulse – induced phosphatidylserine translocation. *Biophys. J.* 2004 jun;86(6):4040-8
137. T. Ikehara, KH Park, H. Yamaguchi, K. Hosokawa, H. Houchi, M. Azuma, K. Minakuchi, H. Hashimoto, M. Kitamura, Y. Kinouchi, K. Yoshizaki, H. Miyamoto. Effects of time varying strong magnetic field on release of cytosolic free  $Ca^{2+}$  from intracellular stores in cultural bovine adrenal chromaffin cells. *Bioelectromagnetics* 2002 Oct; 23(7): 505 – 515.
138. H. Ozawa et al. Electric fields stimulate DNA synthesis of mouse osteoblast – like cells ( MC3 T3 ) E1) by a mechanism involving calcium ions. *J Cell Physiol* 1989 ; 138 : 477 – 483.
139. SM Bawin, and WR Adey. Sensitivity of calcium bibding in cerebral tissue to weak environmental electric fields oscilating at low frequency. *Proc Natl Acad Sce USA*, 1976; 73 : 1999 – 2003.
140. J. Walleczek, and RP Liburdy. Non thermal 60 Hz sinusoidal magnetic – field exposure enhances  $Ca^{2+}$  uptake in rat thymocytes dependence of mitogen activation. *FEBS Lett* 1990; 271 : 157 – 160.



141. FM Longo, T. Yang, S. Hamilton, JF Hyde, J. Walker, L. Jennes, R. Stach, BF Sisken. Electromagnetic fields influence NGF activity and levels following sciatic Nerve Transection. *J. Neurosc. Res.* 1999, Jan 15 ; 55(2) : 230 – 237.
142. M. Kanje, A. Rusovan, B. Sisken, G. Lundhorg. Pretreatment of rats with pulsed electromagnetic fields enhances regeneration of the sciatic nerve. *Bioelectromagnetics*, 1993; 14 (4) : 353 – 359.
143. RK Aaron, BD Boyan, DM Ciombor, Z. Schwartz, BJ Simon. Stimulation of growth factor synthesis by electric and electromagnetic fields. *Clin Orthop.* 2004 Feb; (419) : 30 – 37.
144. Murabayashi, A. Oshikawa, Y. Mitamura. Functional modulation of activated lymphocytes by time – varying magnetic fields. *Ther Apher Dial* 2004 Jun ; 8(3): 206 –211.
145. OM Tepper, MJ Callaghan, EJ Chang, RD Galliano, KABhatt, S. Baharestani, J. Gan, B. Simon, RA Hopper, JP Levine, GC Gurtner. Electromagnetic fields increase in vivo and in vitro angiogenesis through epithelial release of FGF – 2.
146. S. Cannistraro, G. Martino, L. Sportelli: Effects of pulsed electric fields on rat liver homogenate paramagnetic species. *Radiat Environ Biophys.* 1980 ; 18 (2) : 123 – 128.
147. H. Lai, NP Siugh. Magnetic – field – induced DNA strand breaks in brain cells of the rat. *Environ Health Perspect* 2004 May; 112 (6) : 687 – 694.
148. M. Simko, D. Richard, R. Kriehuber, DG Weiss. Micronucleus induction of Syrian hamster embryo cells following exposure to 50 Hez magnetic fields , benzo[a]pyrene , and TPA in vitro. *Mutat. Res.* 2001 Aug 22; 495 (1 –2) : 43 – 50.
149. RW Eveson, CR Timmel, B. Brochlehurst, PJ Hore, KA McLauchlan. The effects of weak magnetic fields on radical recombination reactions in micelles. *Int J Radiat Biol* 2000 Nov; 76 (11) : 1509 – 1522.
150. P. Bonnafous, M. Vernhes, J. Teissie, B. Gabriel. The generation of reactive – oxygen species associated with long – lasting pulse – induced electropermeabilisation of mammalian cells is based on a non destructive



- alteration of plasma membrane. *Biochim. Biophys. Acta* 1999 Nov 9; 1461 (1); 123 –134.
151. E Robotti, AG Zimblar, D Kenna, JA Grossman. 1999. The effect of pulsed electromagnetic fields on flexor tendon healing in chickens. *J Hand Surg [Br]*. 24(1): 56-8.
152. K.Fleming, N Cullum: Electromagnetic therapy for the treatment of venous leg ulcers. *Cochrane Database Syst Rev* 2006;(2):CD002933.
153. JT Ryaby. Clinical effects of electromagnetic and electric fields on fracture healing. *Clin.Orthop*1998. (355 suppl):205-15.
154. MS Agren, MA Engle, PM Mertz.1994.Collagenase during burn wound healing: Influence of a hydrogel dressing and pulsed electrical stimulation. *Plast. Reconstr. Surg.* 94:518-524.
155. V Ottani, De Pasquale V, Govoni P, Franchi M., Zaniol P, and Ruggeri A.. Effects of pulsed extremely – low frequency magnetic fields on skin wounds in the rat. *Bioelectromagnetics* 1988;9: 53-62.
156. O Patino, Grana D, Bolgiani A, Prezzavento G, Merlo A.. Effect of magnetic fields on skin wound healing. Experimental study. *Medicina* 1996 (B Aires) 56(1): 41-4
157. MS Markov,A Pilla.Electromagnetic field stimulation of soft tissues:Pulsed radiofrequency treatment of postoperative pain and edema. *Wounds* 1995;7;143
158. B.Kinney.Pulsed electromagnetic field therapy in plastic surgery. *Aesthetic Surgery J* 2005;25;87-92.

