ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ
ΤΜΗΜΑ ΙΑΤΡΙΚΗΣ
ΔΕΡΜΑΤΟΛΟΓΙΚΗ ΚΛΙΝΙΚΗ
ΔΙΕΥΘΥΝΤΡΙΑ: ΚΑΘΗΓΗΤΡΙΑ ΣΟΦΙΑ ΓΕΩΡΓΙΟΥ

ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ

ΘΕΜΑ: «ΠΡΩΤΟΤΥΠΗ ΘΕΡΑΠΕΙΑ ΕΠΙΜΟΛΥΣΜΕΝΩΝ ΧΡΟΝΙΩΝ ΕΛΚΩΝ ΜΕ ΠΑΘΟΓΟΝΑ ΜΙΚΡΟΒΙΑ ΜΕ ΤΗ ΒΟΗΘΕΙΑ ΚΑΙΝΟΤΟΜΟΥ ΣΥΣΚΕΥΗΣ ΠΑΡΑΓΩΓΗΣ ΒΡΑΧΥΒΙΩΝ ΡΑΔΙΟΚΥΜΑΤΙΚΩΝ ΠΑΛΜΩΝ (RF) ΠΟΛΥ ΥΨΗΛΗΣ ΤΑΣΗΣ ΣΕ ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΟΝΤΕΛΟ.»

ΣΤΑΥΡΟΣ Β. ΜΠΑΛΑΣΗΣ

ΙΑΤΡΟΣ ΠΛΑΣΤΙΚΟΣ ΧΕΙΡΟΥΡΓΟΣ

ΠΑΤΡΑ

ΙΟΥΝΙΟΣ 2026

"Πανεπιστήμιο Πατρών, Τμήμα Ιατρικής

Σταύρος Β. Μπαλάσης

© 2026 - Με την επιφύλαξη παντός δικαιώματος.

ΤΡΙΜΕΛΗΣ ΣΥΜΒΟΥΛΕΥΤΙΚΗ ΕΠΙΤΡΟΠΗ

1. **Σοφία Γεωργίου**,MD, PhD
   Καθηγήτρια Δερματολογίας, Ιατρική Σχολή Πανεπιστημίου Πατρών,
2. **Κωνσταντίνος Παπαγεωργίου**, PhD
   Πυρηνικός Φυσικός και Φυσικός Στοιχειωδών Σωματιδίων, Καθηγητής Πειραματικής Φυσικής, Τμήμα Μηχανικών Οικονομίας και Διοίκησης, Πολυτεχνική Σχολή, Πανεπιστήμιο Αιγαίου
3. **Φεβρωνία Κολονίτσιου**, MD, PhD
   Αναπληρώτρια Καθηγήτρια Μικροβιολογίας, Ιατρική Σχολή Πανεπιστημίου Πατρών

ΕΠΤΑΜΕΛΗΣ ΕΞΕΤΑΣΤΙΚΗ ΕΠΙΤΡΟΠΗ

1. **Σοφία Γεωργίου**,MD, PhD
   Καθηγήτρια Δερματολογίας, Ιατρική Σχολή Πανεπιστημίου Πατρών
2. **Κωνσταντίνος Παπαγεωργίου**, PhD
   Πυρηνικός Φυσικός και Φυσικός Στοιχειωδών Σωματιδίων, Καθηγητής Πειραματικής Φυσικής, Τμήμα Μηχανικών Οικονομίας και Διοίκησης, Πολυτεχνική Σχολή, Πανεπιστήμιο Αιγαίου
3. **Φεβρωνία Κολονίτσιου**, MD, PhD
   Αναπληρώτρια Καθηγήτρια Μικροβιολογίας, Ιατρική Σχολή Πανεπιστημίου Πατρών
4. **Μάρκος Μαραγκός**,MD, PhD
   ΚαθηγητήςΠαθολογίας, Ιατρική Σχολή Πανεπιστημίου Πατρών
5. **Νικόλαος Μαστρονικολής**,MD, PhD
   Καθηγητής Ωτορινολαρυγγολογίας, Ιατρική Σχολή Πανεπιστημίου Πατρών
6. **Ανδρέας Παναγόπουλος**,MD, PhD
   Καθηγητής Ορθοπαιδικής, Ιατρική Σχολή Πανεπιστημίου Πατρών
7. **Νικόλαος Γιορμέζης**, MD, PhD
   Επίκουρος Καθηγητής Μικροβιολογίας, Ιατρική Σχολή Πανεπιστημίου Πατρών

Στα παιδιά μου Μάρα και Ορέστη

Στη συζυγό μου Μέμα

Στους γονείς μου

«Η επιτυχία δεν είναι οριστική· η αποτυχία δεν είναι μοιραία: το θάρρος να συνεχίζεις είναι αυτό που μετρά.» — Winston Churchil

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Ολοκληρώνοντας την παρούσα διδακτορική διατριβή, νιώθω την ανάγκη να ευχαριστήσω δημοσίως όλους όσους συνέβαλαν στην εκπόνησή της.

Πρώτα από όλα θα ήθελα να εκφράσω την ειλικρινή μου ευγνωμοσύνη στην επιβλέπουσα καθηγήτριά μου, κ. Σοφία Γεωργίου, για την εμπιστοσύνη που μου έδειξε, την αμέριστη συμπαράσταση και την πολύτιμη καθοδήγηση σε όλα τα στάδια αυτής της εργασίας.

Θερμά ευχαριστώ τον καθηγητή κ. Κωνσταντίνο Παπαγεωργίου, μέλος της τριμελούς συμβουλευτικής επιτροπής, χωρίς τη συμβολή του οποίου αυτή η διατριβή δε θα μπορούσε να υλοποιηθεί. Αρχικά μου εμπιστεύτηκε την πρωτότυπη συσκευή που εμπνεύστηκε και κατασκεύασε για να υλοποιήσω την πειραματική διαδικασία. Έπειτα αφιέρωσε ατελείωτες ώρες, τόσο στο σχεδιασμό της πειραματικής διαδικασίας, όσο και στο εργαστήριο, δίνοντάς μου εποικοδομητικές συμβουλές και με ενθάρρυνε να συνεχίσω την προσπάθεια σε κάθε δυσκολία που εμφανίστηκε σε αυτή την πορεία.

Ιδιαίτερα ευχαριστώ την αναπληρώτρια καθηγήτρια κ. Φεβρωνία Κολονίτσιου, μέλος της τριμελούς συμβουλευτικής επιτροπής, για την αδιάλειπτη συμπαράσταση και βοήθεια στο μικροβιολογικό εργαστήριο. Οι συμβουλές της και οι καθοδήγησή της συνέβαλαν στην ολοκλήρωση αυτής της πειραματικής μελέτης.

Θα ήταν παράλειψη μου να μην ευχαριστήσω την καθηγήτρια Βιολογίας του Τμήματος Ιατρικής κ. Ζωή Λυγερού, για την σημαντική βοήθεια και καθοδήγηση που μου προσέφερε για την απεικόνιση με συνεστιακή μικροσκοπία, αλλά και τον επίκουρο καθηγητή Μικροβιολογίας του τμήματος Ιατρικής κ. Νικόλαο Γιορμέζη για την συμβολή του στη δημιουργία του μοντέλου βιομεμβράνης.

Το μεγαλυτερο όμως ευχαριστώ ανήκει στην οικογένειά μου, τη σύζυγό μου Μέμα και τα παιδιά μου Μάρα και Ορέστη, για την αμέριστη αγάπη, υπομονή και στήριξή τους όλα αυτά τα χρόνια. Χωρίς τη δική τους ενθάρρυνση, η ολοκλήρωση αυτής της διαδρομής θα ήταν αδύνατη

Σταύρος Β. Μπαλάσης

ΔΗΜΟΣΙΕΥΣΕΙΣ ΣΕ ΔΙΕΘΝΗ ΕΠΙΣΤΗΜΟΝΙΚΑ ΠΕΡΙΟΔΙΚΑ ΜΕΤΑ ΑΠΟ ΚΡΙΣΗ

1. **Original Article**
   Balasis, S., Papageorgiou, K., Georgiou, S., Kolonitsiou, F., Giormezis, N., Kyriakopoulos, A., Oikonomou, C., & Papageorgiou, G. F. (2025). Multi-Resistant Staphylococcus aureus Growth Inhibition Using an Innovative High Voltage Nanosecond Pulser: In Vitro Experimental Results. *MicrobiologyOpen*, *14*(6), e70126. https://doi.org/10.1002/mbo3.70126

ΠΑΡΟΥΣΙΑΣΕΙΣ ΣΕ ΣΥΝΕΔΡΙΑ

1. Εναλλακτικές πειραματικές μέθοδοι αντιμετώπισης λοιμώξεων ελκών Σ. Μπαλάσης *1ο Συνέδριο ΕΙΕ-ΚλιμΑΜεΑ: Οι Υπηρεσίες Αποκατάστασης στο Τριτοβάθμιο Γενικό Νοσοκομείο – Rehabilitation 2030 Call for Action*, Αθήνα, 3-4 Φεβρουαρίου 2024.

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Πρωτότυπη θεραπεία επιμολυσμένων χρονίων ελκών με παθογόνα μικρόβια με την βοήθεια καινοτόμου συσκευής παραγωγής βραχύβιων ραδιοκυματικών παλμών (RF) πολύ υψηλής τάσης σε πειραματικό μοντέλο.

Εισαγωγή: Η επιμόλυνση χρονίων ελκών με παθογόνα μικρόβια είναι πολύ συχνή, αυξάνει τη νοσηρότητα και η αντιμετώπιση αυτών των λοιμώξεων είναι δύσκολη αφού δημιουργούνται πολύ συχνά πολυανθεκτικά μικροβιακά στελέχη. Η αντιμετώπιση των μικροβίων με ραδιοκυματικούς παλμούς έχει εφαρμοστεί σε περιορισμένο βαθμό στην απολύμανση υγρών και τροφίμων αλλά καθόλου στην αντιμετώπιση χρονίων ελκών

Σκοπός: Σκοπός της εργασίας μας ήταν η μελέτη της αποτελεσματικότητας της ανάσχεσης μικροβιακών κυττάρων από καλλιέργειες χρονίων ελκών με βραχύβιους ραδιοκυματικούς παλμούς υψηλής τάσης από καινοτόμο πρωτότυπη συσκευή σε πειραματικό μοντέλο βιομεμβράνης.

Υλικό-Μέθοδος: Ανθεκτικά μικρόβια από χρόνια έλκη απομονώθηκαν και ανακαλλιεργήθηκαν. Εξετάστηκε η αποτελεσματικότητα της εφαρμογής ραδιοκυματικών παλμών αρχικά in-vitro και εν συνεχεία σε πειραματικό μοντέλο βιομεμβράνης σε διαφορετικές συνθήκες έντασης ηλεκτρικού πεδίου, πλάτους παλμού, συχνότητας παλμών και χρόνου εφαρμογής παλμών.

Αποτελέσματα: Η εφαρμογή βραχύβιων ραδιοκυματικών παλμών in-vitro πέτυχε μείωση του αριθμού των μικροβιακών κυττάρων κατά 3,49 λογαριθμικές κλίμακες ($p<.001$)για τα Gram-θετικά βακτήρια και κατά 4,62 λογαριθμικές κλίμακες ($p<.001$)για τα Gram-αρνητικά βακτήρια με ισχυρή επίδραση της έντασης του ηλεκτρικού πεδίου και του χρόνου εφαρμογής . Η εφαρμογή των βέλτιστων αυτών συνθηκών σε πειραματικό μοντέλο βιομεμβράνης πέτυχε μείωση του πάχους της βιομεμβράνης κατά 75% ($p<.001$) και ανάσχεση του πληθυσμού των μικροβιακών κυττάρων κατά 99,5% ($p<.001$).

Συμπέρασμα: Η εφαρμογή βραχύβιων ραδιοκυματικών παλμών πολύ υψηλής τάσης από την πρωτότυπη συσκευή πέτυχε ανάσχεση ανάπτυξης ανθεκτικών μικροβίων in-vitro και σε πειραματικό μοντέλο βιομεμβράνης.

Λέξεις κλειδιά: ανθεκτικά μικρόβια, χρόνια έλκη, ραδιοκυματικοί παλμοί υψηλής τάσης, πειραματικό μοντέλο βιομεμβράνης

ABSTRACT

Original treatment of chronic ulcers infected with pathogenic microbes with the help of an innovative device producing short-lived radio wave pulses (radiofrequency, RF) of very high voltage in an experimental model.

Introduction: Contamination of chronic ulcers with pathogenic microbes is very common, increases morbidity and the treatment of these infections is difficult since multidrug-resistant microbial strains are very often created. The treatment of microbes with radio wave pulses has been applied to a limited extent in the disinfection of liquids and foods but not at all in the treatment of chronic ulcers.

Aim: The purpose of our work was to study the effectiveness of inhibiting microbial cells from chronic ulcer cultures with short-lived high-voltage radiowave pulses from an innovative prototype device in an experimental biofilm model.

Results: The application of short-lived radiowave pulses in-vitro achieved a reduction in the number of microbial cells by 3.49 logarithmic scales ($p<.001$) for Gram-positive bacteria and by 4.62 logarithmic scales ($p<.001$) for Gram-negative bacteria with a strong effect of the electric field intensity and the application time. The application of these optimal conditions in an experimental biofilm model achieved a reduction in the thickness of the biofilm by 75% ($p<.001$) and an arrest of the population of microbial cells by 99.5% ($p<.001$).

Conclusion: The application of short-lived very high-voltage radiowave pulses from the prototype device achieved inhibition of the growth of resistant microbes both in vitro and in an experimental biofilm model.

Keywords: resistant microbes, chronic ulcers, high-voltage radiowave pulses, experimental biomembrane model

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

ΔΗΜΟΣΙΕΥΣΕΙΣ ΣΕ ΔΙΕΘΝΗ ΕΠΙΣΤΗΜΟΝΙΚΑ ΠΕΡΙΟΔΙΚΑ ΜΕΤΑ ΑΠΟ ΚΡΙΣΗ 7

ΠΕΡΙΛΗΨΗ 8

ABSTRACT 9

ΓΕΝΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

***ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1: ΔΕΡΜΑ* 13**

1.1 ΑΝΑΤΟΜΙΑ ΔΕΡΜΑΤΟΣ 13
1.1.1 Εμβρυολογική προέλευση 13
1.1.2 Ανατομικές δομές δέρματος 14
1.1.3 Αγγειακή άρδευση δέρματος 16
1.1.4 Νεύρωση δέρματος 17

1.2 ΦΥΣΙΟΛΟΓΙΑ- ΛΕΙΤΟΥΡΓΙΑ ΔΕΡΜΑΤΟΣ 17
1.2.1 Καλυπτήρια ιδιότητα 17
1.2.2 Θερμορυθμιστική ιδιότητα 18
1.2.3 Αισθητήρια ιδιότητα 18

***ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2: ΕΛΚΗ ΔΕΡΜΑΤΟΣ- ΦΥΣΙΟΛΟΓΙΚΗ ΕΠΟΥΛΩΣΗ* 20**

2.1 Αιμόσταση 20
2.1.1 Αγγειοσύσπαση 20
2.1.2 Πρώιμη Αιμόσταση (Δημιουργία Αιμοπεταλιακού Θρόμβου) 20
2.1.3 Πήξη και ενίσχυση του αιμοπεταλιακού θρόμβου 21

2.2 Παραγωγική φάση 21
2.2.1 Φλεγμονώδης φάση επούλωσης 21
2.2.2 Φάση Πολλαπλασιασμού – Σχηματισμός Κοκκιώδους Ιστού και Νεοαγγείωση 25

2.3 Φάση Επανεπιθηλιοποίησης 28

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3: ΧΡΟΝΙΑ ΕΛΚΗ 30

3.1 Ορισμός 30

3.2 Παθοφυσιολογικά χαρακτηριστικά χρονίων ελκών 30

3.3 Θεραπευτική προσέγγιση χρόνιων ελκών 34

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 4: ΗΛΕΚΤΡΟΜΑΓΝΗΤΙΚΑ ΚΥΜΑΤΑ 38

4.1 Ηλεκτρομαγνητική θεωρία και εξισώσεις του Maxwell 38

4.2 Θεωρία ηλεκτρομαγνητικών κυμάτων 39
4.2.1 Ραδιοκύματα 41

4.3 Ραδιοσυχνοτικά Κύματα και οι Βιοϊατρικές Εφαρμογές τους 42
4.3.1 Θερμικές Επιπτώσεις 42
4.3.2 Μη Θερμικές Επιπτώσεις 42
4.3.3 Επαγωγή πρωτεΐνης θερμικού σοκ (HSP) 42
4.3.4 Βιοϊατρικές Εφαρμογές των Κυμάτων RF 43

4.4 Παλμική ισχύς ραδιοκυμάτων 44

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 5: ΗΛΕΚΤΡΟΔΙΑΤΡΗΣΗ ΚΥΤΤΑΡΙΚΗΣ ΜΕΜΒΡΑΝΗΣ 45

5.1 Μηχανιστική Βάση της Ηλεκτροδιάτρησης 45

5.1.1 Δυναμική Σχηματισμού Πόρων 45
5.1.2 Αναστρέψιμη Ηλεκτροδιάτρηση (RE) 45
5.1.3 Μη αναστρέψιμη ηλεκτροδιάτρηση (IRE) 46

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 6: ΜΗ ΑΝΑΣΤΡΕΨΙΜΗ ΗΛΕΚΤΡΟΔΙΑΤΡΗΣΗ (ΗΛΕΚΤΡΟΠΟΡΗΣΗ) ΒΑΚΤΗΡΙΑΚΩΝ ΚΥΤΤΑΡΩΝ 48

***Μηχανισμοί, πρωτόκολλα και εφαρμογές* 48**

6.1 Εισαγωγή 48

6.2 Μηχανισμοί Μη Αντιστρεπτής Ηλεκτροδιάτρησης 48
6.2.1 Σχηματισμός και Διαστολή Πόρων 48
6.2.2 Απώλεια Ακεραιότητας και Ομοιόστασης της Μεμβράνης 48
6.2.3 Δευτερογενής Κυτταρική Βλάβη 49

6.3 Ηλεκτρικές Παράμετροι που Επηρεάζουν την Βακτηριακή IRE 49
6.3.1 Ένταση Ηλεκτρικού Πεδίου 49
6.3.2 Πλάτος παλμών και Αριθμός Παλμών 49
6.3.3 Αγωγιμότητα Μέσου και Θερμοκρασία 49

6.4 Διαφορές στην Βακτηριακή Ευαισθησία στην Μη Αναστρέψιμη Ηλεκτροδιάτρηση(IRE) 50
6.4.1 Gram-θετικά έναντι Gram-αρνητικών βακτηρίων 50
6.4.2 Μορφολογία Κυττάρων και Επιδράσεις Μεγέθους 51
6.4.3 Σύνθεση και Ρευστότητα Λιπιδίων Μεμβρανών 51
6.4.4 Φάση Ανάπτυξης και Φυσιολογική Κατάσταση 52
6.4.5 Βακτήρια που Σχηματίζουν Σπόρια 52
6.4.6 Βακτήρια που σχετίζονται με βιοφίλμ 52
6.4.7 Επιπτώσεις για τη Βελτιστοποίηση της Διαδικασίας 52

6.5 Εφαρμογές της Βακτηριακής Μη Αναστρέψιμης Ηλεκτροδιάτρησης 53
6.5.1 Έλεγχος εν τω βάθειΛοιμώξεων 53
6.5.2 Ασφάλεια και Απολύμανση Τροφίμων 54
6.5.3 Πειραματικά Δεδομένα και Συνεργιστικές Εφαρμογές 54

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 7: Περιγραφή της Πειραματικής συσκευής RFπαλμών υψηλής συχνότητας 55

7.1 Κύκλωμα παραγωγής της υψηλής τάσης εξόδου 56

7.2 Κύκλωμα παραγωγής παλμών υψηλών συχνοτήτων 56

7.3 Ηλεκτρονικό κύκλωμα ελέγχου διακόπτη υψηλών συχνοτήτων MOSFET 57

ΕΙΔΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 8: ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΣ ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟΥ ΜΟΝΤΕΛΟΥ 59

8.1 Σχεδιασμός της Μελέτης (Study Design) 59

8.2 Υλικό Έρευνας (Materials) 59

8.3 Μέθοδος στατιστικής επεξεργασίας πειραματικών δεδομένων 62

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 9: ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΗ ΔΙΑΔΙΚΑΣΙΑ 63

9.1 In-vitro αναστολή πολλαπλασιασμού των πολυανθεκτικών στελεχών 63
9.1.1 Gram+ βακτήρια 63
9.1.2 Gram – αρνητικά βακτήρια 64

9.2 Βραχύβια ραδιοκύματα σε βιομεμβράνες 65
9.2.1 Δημιουργία Βιομεμβράνης 65
9.2.2 Σχεδιαστικές απαιτήσεις ηλεκτροδίου εφαρμογής ραδιοκυματων 66

9.2.3 Ανοσοφθορισμός και συνεστιακή μικροσκοπία 66

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 10. ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΑ ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ 68

10.1 In- vitro πειραματικά αποτελέσματα 68
10.1.1 Επίδραση της έντασης ηλεκτρικού πεδίου στη μείωση μικροοργανισμών 68
10.1.2 Επίδραση του πλάτους του ραδιοκυματικού παλμού 72
10.1.3 Επίδραση της συχνότητας επανάληψης του παλμού 74
10.1.4 Επίδραση του χρόνου εφαρμογής των ηλεκτρικών παλμών στην μείωση των βακτηρίων. 75
10.1.5 Συνδυαστική επίδραση παραμέτρων υψίσυχνωνραδιοκυματικών παλμώνυψηλής ενέργειας 81

10.2 Πειραματικά αποτελέσματα σε βιομεμβράνες 84
10.2.1 Επίδραση πλάτους παλμού στο πάχος βιομεμβράνης και στην επιβίωση βακτηριακών κυττάρων 86
10.2.2 Επίδραση συχνότητας επανάληψης παλμού στο πάχος βιομεμβράνης και στην επιβίωση βακτηριακών κυττάρων 87
10.2.3 Επίδραση χρόνου εφαρμογής παλμών στο πάχος βιομεμβράνης και στην επιβίωση βακτηριακών κυττάρων 88

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 11: ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ-ΣΥΖΗΤΗΣΗ-ΜΕΛΛΟΝΤΙΚΑ ΣΧΕΔΙΑ 92

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ- ΑΝΑΦΟΡΕΣ 97

ΓΕΝΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1: ΔΕΡΜΑ

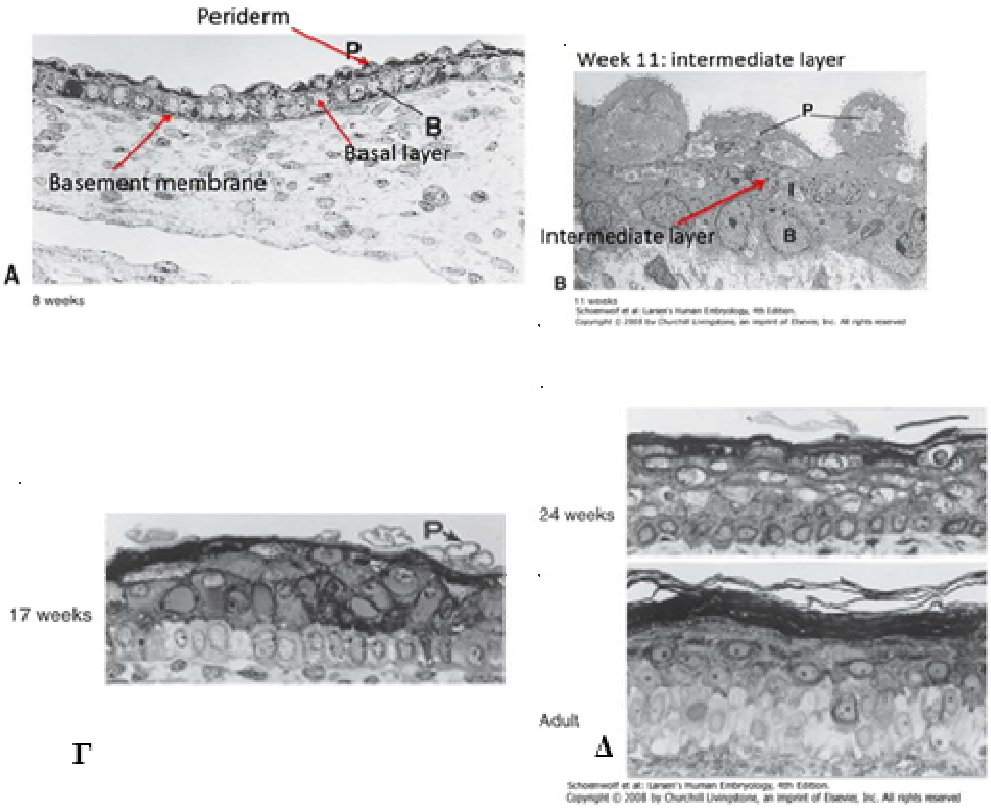
1.1 ΑΝΑΤΟΜΙΑ ΔΕΡΜΑΤΟΣ

Το δέρμα είναι το μεγαλύτερο όργανο του ανθρώπινου σώματος, αντιπροσωπεύοντας περίπου το 15-16% του συνολικού σωματικού βάρους και καλύπτοντας μια μέση επιφάνεια 1,5-2,0 m^2 στους ενήλικες. Πέρα από το ότι λειτουργεί ως προστατευτικόςφραγμός, το δέρμα εκτελεί κρίσιμες λειτουργίες στη θερμορύθμιση, την ανοσολογική άμυνα, την αισθητηριακή αντίληψη, την απέκκριση και τη σύνθεση βιταμίνης D. Η δομική του πολυπλοκότητα αντανακλά τους ποικίλους ρόλους του στη διατήρηση της ομοιόστασης.Το δέρμα αποτελείται από τρία κύρια στρώματα: την επιδερμίδα, το χόριο και το υποδόριο. Η επιδερμίδα είναι ένα πολύστοιβο πλακώδες επιθήλιο που σχηματίζεται κυρίως από κερατινοκύτταρα, τα οποία συνοδεύονται από μελανοκύτταρα, κύτταρα Langerhans και κύτταρα Merkel (Burns et al., 2010). Η εξωτερική στιβάδα της επιδερμίδας,η κεράτινη στιβάδα, είναι πλούσια σε κερατινοκύτταρα ενσωματωμένα μέσα σε μια λιπιδική μήτρα, αποτελώντας τον κύριο φραγμό κατά της διαδερμικής απώλειας νερού και της εισβολής παθογόνων. Το χόριο, που αποτελείται κυρίως από ίνες κολλαγόνου και ελαστίνης, παρέχει μηχανική αντοχή, ελαστικότητα και δομική υποστήριξη (Burns *et al.*, 2010). Τέλος, το υποδόριο, που αποτελείται κυρίως από λιπώδη ιστό, λειτουργεί ως δεξαμενή ενέργειας και παρέχει προστασία από εξωτερικές μηχανικές καταπονήσεις.

1.1.1 Εμβρυολογική προέλευση

Η επιδερμίδα προέρχεται από το επιπολήςεξώδερμα, και η εν τω βάθει στοιβάδα του, το χόριο αναπτύσσεται από το υποκείμενο μεσέγχυμα. Ήδη από την τέταρτη εβδομάδα κύησης η επιδερμίδα αρχίζει να αναπτύσσεται από το επιπολής εξώδερμα καθώς η νευρική ακρολοφία διαχωρίζεται από το υπερκείμενο εξώδερμα, ενώ μέσα λίγες εβδομάδες αποτελείται ήδη από 5 στοιβάδες.

Αρχικά μια μονοκύτταρη στοιβάδα εξωδερμικών κυττάρων καλύπτει το έμβρυο. Στην αρχή του δεύτερου μήνα αυτό το επιθήλιο διαιρείται και προστίθεται μια στοιβάδα αποπλατυσμένων κυττάρων το περιδέρμιο (Εικόνα $1.1^{Α,Β}$). Με επιπλέον πολλαπλασιασμό των κυττάρων στο τέλος του τέταρτου μήνα η επιδερμίδα αποκτά την τελική της μορφή με τις τέσσερις στοιβάδες (Εικόνα $1.1^{Γ,Δ}$) (Schoenwolf and Larsen, 2009).



Εικόνα 1.1: Εμβρυολογική ανάπτυξη δέρματος Πηγή (Schoenwolf and Larsen, 2009)

1.1.2 Ανατομικές δομές δέρματος

1.1.2.1 *Επιδερμίδα*

Η επιδερμίδα είναι το εξωτερικό στρώμα, που αποτελείται κυρίως από πολύστοιβο πλακώδες κερατινοποιημένο επιθήλιο. Το μέσο πάχος της ποικίλλει από 0,05 mm στα βλέφαρα έως 1,5 mm στις παλάμες και τα πέλματα. Η επιδερμίδα είναι ανάγγεια, λαμβάνει θρεπτικά συστατικά μέσω διάχυσης από το χόριο και αποτελείται κυρίως από κερατινοκύτταρα (~90%), μαζί με μελανοκύτταρα, κύτταρα Langerhans και κύτταρα Merkel (Mescher and Junqueira, 2013). Από το βαθύτερο έως το επιφανειακό, η επιδερμίδα οργανώνεται στις ακόλουθες στιβάδες:

1. Βασική στοιβάδα (germinativum):
    - Μία μονο στιβάδα βασικών κερατινοκυττάρων που συνδέονται με τη βασική μεμβράνη μέσω ημιδεσμοσωμάτων.
    - Περιέχει μελανοκύτταρα (υπεύθυνα για τη σύνθεση μελανίνης) και κύτταρα Merkel (μηχανοϋποδοχείς).
    - Η ενεργή μιτωτική διαίρεση αναπληρώνει τα κύτταρα που χάθηκαν από τα επιφανειακά στρώματα.
2. Ακανθωτή στοιβάδα:
    - Αρκετές σειρές κερατινοκυττάρων που διασυνδέονται με δεσμοσώματα, δίνοντας μια «ακανθώδη» εμφάνιση στο μικροσκόπιο.

- Τα κύτταρα Langerhans, ένας εξειδικευμένος πληθυσμός δενδριτικών ανοσοκυττάρων, είναι άφθονα εδώ.

3. Κοκκώδης στοιβάδα:

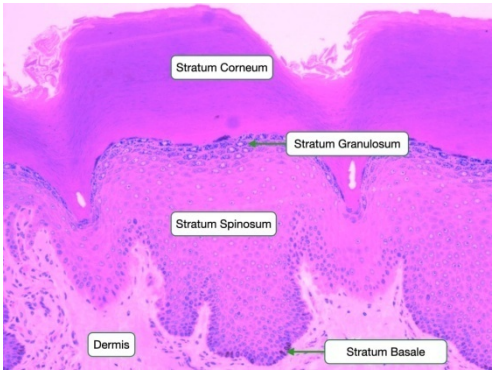
- Αποτελείται από πεπλατυσμένα κερατινοκύτταρα που περιέχουν κόκκους κερατοϋαλίνης και ελασματοειδή σώματα, κρίσιμα για τον σχηματισμό του επιδερμικού φραγμού.

4. Διαυγής στοιβάδα (υπάρχει μόνο στο παχύ δέρμα):

- Ένα ημιδιαφανές στρώμα που παρατηρείται στις παλάμες και τα πέλματα.
- Τα κύτταρα δεν έχουν πυρήνες και οργανίδια, αποτελούμενα κυρίως από πυκνά νημάτια κερατίνης.

5. Κεράτινη στιβάδα:

- Η εξωτερική στιβάδα-φραγμός που αποτελείται από απύρηνα, πεπλατυσμένα κερατινοκύτταρα («κερατινοκύτταρα») ενσωματωμένα σε μια λιπιδική μήτρα.
- Παρέχει μηχανική προστασία και αποτρέπει την διαδερμική απώλεια νερού (Εικόνα 1.2).



Εικόνα 1.2: Ιστολογική τομή δέρματος με χρώση αιματοξυλίνης-ηωσίνης

1.1.2.2 ***Χόριο***

Το χόριο βρίσκεται κάτω από την επιδερμίδα και παρέχει μηχανική αντοχή, ελαστικότητα και θερμορύθμιση. Αποτελείται κυρίως από συνδετικό ιστό και παρουσιάζει πλούσια αγγείωση και νεύρωση (Wheater *et al.*, 2014). Διακρίνεται σε:

1. Θηλώδες χόριο:

- Λεπτό, επιφανειακό στρώμα που αποτελείται από χαλαρό συνδετικό ιστό.
- Περιέχει δερματικές θηλές, προεξοχές που μοιάζουν με δάχτυλα και διαπλέκονται με τις επιδερμικές καταδύσεις, ενισχύοντας τη μηχανική σταθερότητα και αυξάνοντας την επιφάνεια για την ανταλλαγή θρεπτικών συστατικών.

2. Δικτυωτό χόριο:

- Παχύτερο, βαθύτερο στρώμα που αποτελείται από πυκνό ακανόνιστο συνδετικό ιστό.
- Πλούσιο σε ίνες κολλαγόνου τύπου Ι και ελαστικές ίνες, παρέχοντας αντοχή σε εφελκυσμό και ελαστικότητα.

Στο χόριο απαντώνται και τα εξαρτήματα του δέρματος:

- Θυλάκια τρίχας και σμηγματογόνοι αδένες (τριχοσμηγματογόνοι θύλακοι)
- Ιδρωτοποιοί αδένες:
- Εκκρινείς αδένες: ευρέως κατανεμημένοι, κρίσιμοι για τη θερμορύθμιση.
- Αποκρινείς αδένες: βρίσκονται στις μασχάλες, στις πρωκτογεννητικές περιοχές και ενεργοποιούνται κατά την εφηβεία.
- Αισθητικοί υποδοχείς:
- Σωματίδια Meissner: λεπτή αφή.
- Σωματίδια Pacinian: δόνηση και βαθιά πίεση.
- Ελεύθερες νευρικές απολήξεις: ανίχνευση πόνου και θερμοκρασίας.
- Αγγειακά δίκτυα: ρυθμίζουν τη ροή του αίματος στο δέρμα και την απαγωγή της θερμότητας(Wheater *et al.*, 2014).

1.1.2.3 ***Υποδόριος ιστός***

Το υποδόριο είναι το βαθύτερο στρώμα, που αποτελείται κυρίως από λιπώδη ιστό που συνυφαίνεται με διαφράγματα συνδετικού ιστού. Οι λειτουργίες του περιλαμβάνουν:

• Αποθήκευση ενέργειας.

• Προστατευτική προστασία και μηχανική προστασία.

• Θερμομόνωση.

• Διέλευση μεγαλύτερων αιμοφόρων αγγείων και λεμφαγγείων.

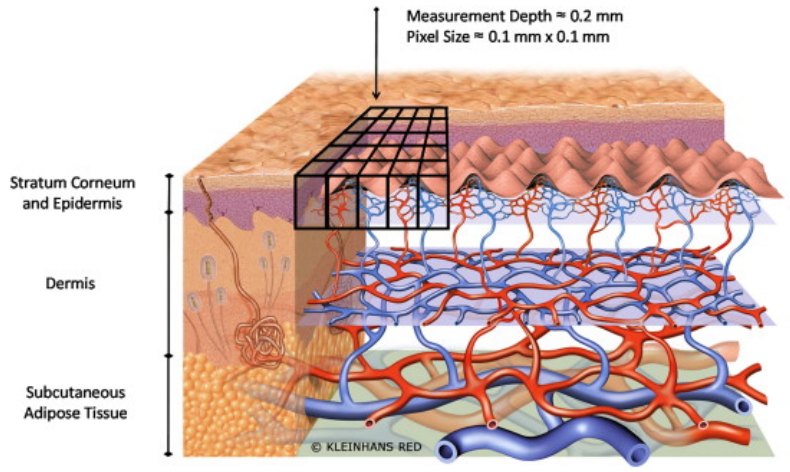
1.1.3 Αγγειακή άρδευση δέρματος

Το δέρμα τροφοδοτείται πλούσια από ένα διπλό αγγειακό πλέγμα:

• Επιφανειακό πλέγμα στο θηλώδες χόριο.

• Βαθύ πλέγμα στη δερματο-υποδερμική συμβολή.

Αυτή η διάταξη υποστηρίζει τη θερμορύθμιση μέσω αρτηριοφλεβικών αναστομώσεων(Εικόνα 1.3).



Εικόνα 1.3:Αγγειακή άρδρευση δέρματος,πηγή(Raju et al., 2012)(αναπαραγωγή κατόπιν αδείας)

1.1.4 Νεύρωση δέρματος

Η νεύρωση του δέρματος περιλαμβάνει:

• Σωματοαισθητικές ίνες: μεσολαβούν στην αφή, τον πόνο, τη θερμοκρασία και την πίεση.

• Αυτόνομες ίνες: ρυθμίζουν τους ιδρωτοποιούς αδένες, τα αιμοφόρα αγγεία και τον ορθωτήρα μυ των τριχών.

1.2 ΦΥΣΙΟΛΟΓΙΑ- ΛΕΙΤΟΥΡΓΙΑ ΔΕΡΜΑΤΟΣ

Το δέρμα είναι το όργανο που αφορίζει την ανθρώπινη οντότητα από το φυσικό περιβάλλον. Επιτελεί πλήθος λειτουργιών

1.2.1 Καλυπτήρια ιδιότητα

Η καλυπτήρια λειτουργία του δέρματος είναι κεντρικής σημασίας για τη φυσιολογία του. Η κεράτινη στιβάδα λειτουργεί ως η κύρια άμυνα κατά της απώλειας νερού, των χημικών ουσιών και της μικροβιακής εισβολής. Αυτός ο φραγμός διατηρείται μέσω του μοντέλου «φυσικών δομών», στο οποίο τα κερατινοκύτταρα σχηματίζουν τα τούβλα και οι λιπιδικές διπλοστοιβάδες παρέχουν το κονίαμα. Η διαταραχή αυτού του φραγμού, είτε λόγω γενετικής προδιάθεσης είτε λόγω περιβαλλοντικών επιπτώσεων όπως απορρυπαντικά ή υπεριώδη ακτινοβολία, μπορεί να οδηγήσει σε παθήσεις όπως η ατοπική δερματίτιδα και η αυξημένη ευαισθησία του δέρματος. Το δέρμα αποτελεί το μεγαλύτερο όργανο του ανθρώπινου σώματος και η καλυπτήρια λειτουργία του θεωρείται θεμελιώδης για την επιβίωση και την υγεία. Μέσω της εκτεταμένης του επιφάνειας, το δέρμα σχηματίζει ένα φυσικό φραγμό που διαχωρίζει το εσωτερικό περιβάλλον του οργανισμού από εξωτερικούς φυσικούς, χημικούς και βιολογικούς παράγοντες. Η ακεραιότητα της επιδερμίδας, και ιδιαίτερα της κεράτινης στριβάδας, είναι κρίσιμη για τη διατήρηση της ομοιόστασης, καθώς αποτρέπει τη μηχανική βλάβη, την είσοδο μικροοργανισμών και την υπερβολική απώλεια ύδατος (Burns*et al.*, 2010).

Η επιδερμίδα λειτουργεί ως η πρώτη γραμμή άμυνας μέσω του λεγόμενου «brick-and-mortar» μοντέλου, «τούβλων-τσιμεντοκονίας», όπου τα κερατινοκύτταρα (τα «τούβλα») περιβάλλονται από λιπιδικά διπλοστρώματα (το «κονίαμα»), σχηματίζοντας έναν αδιαπέραστο φραγμό. Το στρώμα αυτό συμβάλλει στη μείωση της διαπερατότητας και στην προστασία από χημικές ουσίες, αλλεργιογόνα και ρύπους. Παράλληλα, η συνεχής ανανέωση των κερατινοκυττάρων και η απομάκρυνση των νεκρών κυττάρων διασφαλίζουν την ανανέωση του καλυπτήριου φραγμού.

Εκτός από τον μηχανικό φραγμό, το δέρμα διαθέτει και ανοσολογική λειτουργία που ενισχύει την καλυπτήρια δράση του. Κύτταρα όπως τα κερατινοκύτταρα, τα κύτταρα του Langerhans και τα δερματικά δενδριτικά κύτταρα εκκρίνουν κυτταροκίνες και αντιμικροβιακά πεπτίδια, περιορίζοντας την αποίκιση παθογόνων. Το όξινο pH της επιφάνειας του δέρματος (ο λεγόμενος «όξινος μανδύας») δρα επιπλέον ως φυσικός μηχανισμός άμυνας έναντι βακτηρίων και μυκήτων (Burns *et al.*, 2010).

Η καλυπτήρια λειτουργία του δέρματος επιβαρύνεται σημαντικά από περιβαλλοντικούς παράγοντες όπως η υπεριώδης ακτινοβολία, οι ατμοσφαιρικοί ρύποι και η παρατεταμένη χρήση ερεθιστικών ουσιών, οι οποίοι

οδηγούν σε αποδόμηση του φραγμού και αυξημένη διαπερατότητα. Παθολογικές καταστάσεις, όπως η ατοπική δερματίτιδα και η ψωρίαση, χαρακτηρίζονται από διαταραχές της καλυπτήριας λειτουργίας, με συνέπεια αυξημένη ευαισθησία σε λοιμώξεις και αφυδάτωση (James, 2019).

Συνολικά, η καλυπτήρια λειτουργία του δέρματος αποτελεί κρίσιμη συνιστώσα της φυσιολογίας του, διασφαλίζοντας την ακεραιότητα του οργανισμού απέναντι σε εξωτερικές προκλήσεις και συμβάλλοντας στη διατήρηση της γενικής ομοιόστασης.

1.2.2 Θερμορυθμιστική ιδιότητα

Το δέρμα αποτελεί το μεγαλύτερο όργανο του ανθρώπινου σώματος και συμβάλλει καθοριστικά στη διατήρηση της ομοιόστασης, μεταξύ άλλων μέσω της θερμορυθμιστικής του λειτουργίας. Η θερμορύθμιση είναι μια σύνθετη διεργασία που διασφαλίζει τη σταθερότητα της εσωτερικής θερμοκρασίας του σώματος, παρά τις εξωτερικές μεταβολές, και στηρίζεται σε μηχανισμούς όπως η αγγειοδιαστολή, η αγγειοσύσπαση, η εφίδρωση και η μόνωση μέσω του υποδόριου ιστού.

Η αγγειοδιαστολή και η αγγειοσύσπαση των δερματικών αγγείων αποτελούν θεμελιώδεις αντιδράσεις για την απώλεια ή τη διατήρηση θερμότητας. Σε υψηλές θερμοκρασίες, τα δερματικά τριχοειδή διαστέλλονται, αυξάνοντας τη ροή αίματος προς την επιφάνεια και διευκολύνοντας την αποβολή θερμότητας μέσω ακτινοβολίας και αγωγής. Αντίθετα, σε συνθήκες ψύχους, η αγγειοσύσπαση μειώνει τη ροή αίματος προς το δέρμα, περιορίζοντας την απώλεια θερμότητας και συμβάλλοντας στη διατήρηση της θερμοκρασίας των ζωτικών οργάνων.

Η εφίδρωση αποτελεί τον πλέον αποτελεσματικό μηχανισμό απώλειας θερμότητας όταν η περιβάλλουσα θερμοκρασία υπερβαίνει αυτή του σώματος. Οι ιδρωτοποιοί αδένες εκκρίνουν ιδρώτα, ο οποίος με την εξάτμιση απομακρύνει θερμότητα, μειώνοντας τη θερμοκρασία του σώματος. Η αποτελεσματικότητα αυτού του μηχανισμού εξαρτάται από την υγρασία του περιβάλλοντος, καθώς υψηλά επίπεδα υγρασίας περιορίζουν την εξάτμιση.

Επιπλέον, ο υποδόριος λιπώδης ιστός δρα ως μόνωση, μειώνοντας την απώλεια θερμότητας σε ψυχρό περιβάλλον. Η θερμορυθμιστική λειτουργία του δέρματος δεν είναι ομοιόμορφη σε όλα τα άτομα, επηρεάζεται από παράγοντες όπως η ηλικία, το φύλο, η φυσική κατάσταση και παθολογικές καταστάσεις. Για παράδειγμα, η γήρανση συνδέεται με μειωμένη ικανότητα αγγειοδιαστολής και εφίδρωσης, γεγονός που αυξάνει τον κίνδυνο θερμοπληξίας στους ηλικιωμένους.

Συνολικά, το δέρμα αποτελεί κρίσιμο όργανο στη θερμορύθμιση, ενεργώντας ως διεπαφή μεταξύ εσωτερικού και εξωτερικού περιβάλλοντος και συντονίζοντας μηχανισμούς που εξασφαλίζουν την επιβίωση και την ομοιόσταση του οργανισμού(James, 2019).

1.2.3 Αισθητήρια ιδιότητα

Το δέρμα, πέραν του ρόλου του ως φυσικού και ανοσολογικού φραγμού, αποτελεί ένα εξαιρετικά εξειδικευμένο αισθητηριακό όργανο που επιτρέπει την αλληλεπίδραση του ανθρώπινου οργανισμού με το περιβάλλον. Η αισθητηριακή λειτουργία του δέρματος βασίζεται στην παρουσία ποικίλων υποδοχέων που εντοπίζονται στην επιδερμίδα και στο χόριο, και οι οποίοι μετατρέπουν εξωτερικά ερεθίσματα όπως αφή,

πίεση, δόνηση, θερμοκρασία και πόνο σε νευρικά σήματα τα οποία μεταφέρονται στο κεντρικό νευρικό σύστημα (Hall, Hall and Guyton, 2021).

Οι μηχανοϋποδοχείς αποτελούν μια κατηγορία αισθητηρίων υποδοχέων υπεύθυνων για την αντίληψη της αφής και της πίεσης. Οι υποδοχείς του Merkel εξειδικεύονται στην ανίχνευση στατικών ερεθισμάτων και λεπτής αφής, ενώ τα σωμάτια του Meissner ανιχνεύουν δυναμικές μεταβολές και κινήσεις της επιφάνειας του δέρματος (Johnson, Yoshioka and Vega–Bermudez, 2000). Τα σωμάτια του Pacini ανταποκρίνονται σε ταχείες δονήσεις, ενώ τα σωμάτια του Ruffini σχετίζονται με την ανίχνευση παρατεταμένης πίεσης και διάτασης του δέρματος (Johnson, Yoshioka and Vega–Bermudez, 2000). Η εξειδίκευση αυτή εξασφαλίζει την ακρίβεια και την πολυπλοκότητα της απτικής αντίληψης.

Η θερμοαισθητικότητα διαμεσολαβείται από θερμοϋποδοχείς, οι οποίοι είναι ελεύθερες νευρικές απολήξεις ευαίσθητες σε θερμά και ψυχρά ερεθίσματα. Οι υποδοχείς αυτοί εκφράζουν διαύλους της οικογένειας TRP (TransientReceptorPotential), όπως ο TRPV1 για υψηλές θερμοκρασίες και ο TRPM8 για ψυχρά ερεθίσματα. Η λειτουργία τους είναι κρίσιμη όχι μόνο για την αίσθηση της θερμοκρασίας αλλά και για την ενεργοποίηση προστατευτικών αντιδράσεων.

Η αλγοαισθητικότητα (αντίληψη του πόνου) είναι επίσης στενά συνδεδεμένη με το δέρμα, μέσω των ελεύθερων νευρικών απολήξεων που λειτουργούν ως νοσοϋποδοχείς. Αυτοί ενεργοποιούνται από μηχανικά, θερμικά ή χημικά ερεθίσματα και διαδραματίζουν σημαντικό ρόλο στην άμυνα του οργανισμού, προειδοποιώντας για δυνητικά βλαπτικούς παράγοντες.

Η αισθητηριακή λειτουργία του δέρματος διαφοροποιείται ανάλογα με την ανατομική περιοχή, με περιοχές όπως τα δάκτυλα και τα χείλη να εμφανίζουν υψηλή πυκνότητα υποδοχέων και επομένως μεγαλύτερη ευαισθησία . Επιπλέον, οι λειτουργίες αυτές επηρεάζονται από την ηλικία, παθολογικές καταστάσεις (π.χ. διαβητική νευροπάθεια) και περιβαλλοντικούς παράγοντες.

Συνολικά, η αισθητηριακή λειτουργία του δέρματος είναι κρίσιμη για την αλληλεπίδραση του ατόμου με το περιβάλλον, προσφέροντας πληροφορίες απαραίτητες για την επιβίωση, την κοινωνική επικοινωνία και την ποιότητα ζωής (Abraira and Ginty, 2013).

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2: ΕΛΚΗ ΔΕΡΜΑΤΟΣ- ΦΥΣΙΟΛΟΓΙΚΗ ΕΠΟΥΛΩΣΗ

Το έλκος αποτελεί μια λύση της συνέχειας του δέρματος και επαφή του υποδέρματος με το περιβάλλον. Αυτή η κατάσταση πυροδοτεί μια σειρά μηχανισμών στον ανθρώπινο οργανισμό προκειμένου να αποκατασταθεί η ιστική βλάβη και να αποκατασταθεί η συνέχεια του δέρματος. Πρόκειται για μια σύνθετη διαδικασία η οποία περιγράφεται στα παρακάτω στάδια:

2.1 Αιμόσταση

Η αιμόσταση σηματοδοτεί την πρώτη φάση της επούλωσης ενός έλκους μέσω της οποίας επιτυγχάνεται η διακοπή της αιμορραγίας μετά από τον τραυματισμό των αγγείων. Διακρίνεται σε τρεις φάσεις: την φάση της αγγειοσύσπασης, την φάσης της πρωτογενούς αιμόστασης και τη φάση της δευτερογενούς αιμόστασης. Κυρίαρχο ρόλο σε αυτή τη φάση έχουν τα αιμοπετάλια, τα οποία ενεργοποιούνται με την επαφή τους με την υπενδοθηλιακή στοιβάδα.

2.1.1 Αγγειοσύσπαση

Αμέσως μετά τον τραυματισμό οι λείες μυϊκές ίνες των αγγείων συσπώνται αντανακλαστικά με την επίδραση τοπικών αγγειοσυσπαστικών όπως η ενδοθηλίνη που απελευθερώνεται από το κατεστραμμένο ενδοθήλιο των αγγείων. Οι κατεχολαμίνες της κυκλοφορίας και οι προσταγλανδίνες που εκκρίνονται από τους τραυματισμένους ιστούς ενισχύουν την αγγειοσυσπαστική δράση (Godo and Shimokawa, 2017). Επιπλέον ενισχυτική δράση στην σύσπαση των λείων μυϊκών ινών των αγγείων προκαλεί η παραγωγή αυξητικού παράγοντα εκ των αιμοπεταλίων (PDGF) (Pierce *et al.*, 1991). Αξίζει να σημειωθεί πως αυτή η αντανακλαστική αγγειοσύσπαση περιορίζει παροδικά την αιμορραγία καθώς η επακόλουθη υποξία και οξείδωση οδηγούν σε χάλαση των μυϊκών ινών και υποτροπή της αιμορραγίας (Teller and White, 2009).

2.1.2 Πρώιμη Αιμόσταση (Δημιουργία Αιμοπεταλιακού Θρόμβου)

Η λύση της συνέχειας του αγγειακού ενδοθηλίου φέρνει σε επαφή τα αιμοπετάλια με τη θρομβογόνο υπενδοθηλιακή στοιβάδα. Τα αιμοπετάλια με τους G επιφανειακούς υποδοχείς των προσδένονται στην υπενδοθηλιακή στιβάδα και ενεργοποιούν το εσωτερικό μονοπάτι σηματοδότησης, το οποίο προκαλεί ενεργοποίηση των ιντεγκρινών (Πίνακας 2.1) και μέσω αυτής αύξηση της προσκόλλησης μεταξύ αιμοπεταλίων και εξωκυττάριας ουσίας (Pradhan *et al.*, 2017).

Πίνακας 2.1. Ιντεγκρίνες αιμοπεταλίων

Ιντεγκρίνη	**Δράση**
αIIbβ3	πρόσδεση με ινωδογόνο, ινωδονεκτίνη και von Willebrand
α2β1	πρόσδεση με κολλαγόνο

Η ενεργοποίηση του εξωγενούς μονοπατιού σηματοδότησης, η οποία ακολουθεί, ενισχύει την ενεργοποίηση των αιμοπεταλίων και τροποποιεί την ακτίνη του κυτταροσκελετού, η οποία είναι η κυριότερη πρωτεΐνη των αιμοπεταλίων και στην ενεργοποιημένη κατάσταση αποτελεί το 70% του πρωτεϊνικού

περιεχομένου των αιμοπεταλίων. Στον Πίνακας 2.2 αναφέρονται τα προϊόντα ενεργοποιήσης των αιμοπεταλίων τα οποία παίζουν σημαντικό ρόλο στα επόμενα στάδια της επούλωσης. Η αλλαγή στη διαμόρφωση της ακτίνης μετασχηματίζει τα αιμοπετάλια από δίσκους σε στρογγυλούς σχηματισμούς που σχηματίζουν ψευδοπόδια, τα οποία προσκολλώνται στην εξωκυττάρια ουσία, συσπώνται και σφραγίζουν το ενδοθηλιακό έλλειμμα (Sorrentino *et al.*, 2015).

Πίνακας 2.2. Προϊόντα ενεργοποίησης αιμοπεταλίων

Προϊόντα εκκριτικών κοκκίων	**υποδοχείς επιφανειακής μεμβράνης**	**αυξητικοί παράγοντες και κυττοκίνες**
ADP	ιντεγκρίνες	PDGF
σεροτονίνη	γλυκοπρωτεΐνη Ib-IX-V	TGF-β
ισταμίνη	γλυκοπρωτεΐνηVI	EGF
Ca^{++}		IGF

2.1.3 Πήξη και ενίσχυση του αιμοπεταλιακού θρόμβου

Ο πρωτογενής αιμοπεταλιακός θρόμβος παρέχει την επιφάνεια για την ενεργοποίηση και σύνθεση του μηχανισμού της πήξης. Είτε με την ενεργοποίηση του ενδογενούς, είτε του εξωγενούς μονοπατιού πήξης λόγω της έκθεσης στην υπενδοθηλιακή ουσία οδηγούμαστε στην ενεργοποίηση του παράγοντα Χ, ο οποίος με τη σειρά του μετατρέπει την προθρομβίνη σε θρομβίνη και τελικά ευοδώνεται ο πολυμερισμός του ινωδογόνου σε ινική. Με την επίδραση του παράγοντα XIII διασυνδέεται το δίκτυο ινικής και δεσμεύεται με τον πρωτογενή αιμοπεταλιακό θρόμβο επιτυγχάνοντας την οριστική αιμόσταση με την ωρίμανση και τη δημιουργία του οριστικού θρόμβου.

Ο θρόμβος αποτελεί μια προσωρινή ουσία στην οποία διεισδύουν άλλα κύτταρα στις μετέπειτα φάσεις της επούλωσης. Παρόλη τη θεμελιώδη σημασία των αιμοπεταλίων στην αιμόσταση και την επούλωση, η απουσία τους δεν εμποδίζει την επούλωση ελκών (Szpaderska *et al.*, 2003). Σε περιπτώσεις πειραματικών μοντέλων θρομβοπενίας παρατηρούνται αυξημένα μακροφάγα και Τ- κύτταρα χωρίς να επηρεάζεται η απελευθέρωση αυξητικών παραγόντων, η σύνθεση του κολλαγόνου, η αγγειογέννεση και η επανεπιθηλιοποίηση, πράγμα που δείχνει ότι η διαδικασία επούλωσης είναι μια σύνθετη διαδικασία και υπάρχει διασύνδεση και αλληλοκάλυψη μεταξύ των διαφόρων φάσεων αυτής (Szpaderska *et al.*, 2003).

2.2 Παραγωγική φάση

2.2.1 Φλεγμονώδης φάση επούλωσης

Αποτελεί την φάση κατά την οποία γίνεται επιστράτευση της κυτταρικής ανοσίας του οργανισμού ως απάντηση στην ιστική καταστροφή. Η πρώιμη σηματοδότηση για την κυτταρική απάντηση του οργανισμού γίνεται με ενεργοποίηση μη ειδικών μονοπατιών μεταγραφής, όπως Ca^{++}, αντιδραστικές ρίζες οξυγόνου (ROS), παραπροϊόντα κυτταρικού θανάτου, ενώ η ενεργοποίηση του μεταγραφικού μηχανισμού χρειάζεται χρόνο. Η αύξηση του ενδοκυττάριου Ca^{++}στα άκρα του έλκους, αντίθετα, συμβαίνει στα πρώτα λεπτά μετά τον τραυματισμό (Lansdown, 2002). Επίσης οι χυμοκίνες, οι λιπιδικοί μεσολαβητές, το υπεροξείδιο του H_2

(H_2O_2), και τα (Damage-associated molecular patterns) DAMPs που εκκρίνονται από τα τραυματισμένα κύτταρα παρέχουν τα πρώτα σήματα για την επιστράτευση των ουδετερόφιλων πολυμορφοπύρηνων. Επιπρόσθετα η ταχεία παραγωγή H_2O_2 στο έλκος αφενός ελαχιστοποιεί τις μικροβιακές μολύνσεις, αφετέρου ενεργοποιεί την ανάπλαση των κερατινοκυττάρων, ευοδώνει την αγγειογένεση πέρα από την επιστράτευση των ουδετερόφιλων (Van Der Vliet and Janssen-Heininger, 2014).

Οι χυμοκίνες είναι μικρές πρωτεΐνες που περιέχουν κυστεΐνη στο μόριό τους, προσδένονται στα κύτταρα στους G πρωτεϊνικούς υποδοχείς (GPCRs) και η ενεργοποίησή τους οδηγεί σε απευθείας κυτταρική κίνηση (χημειοταξία). Έτσι οι χυμοκίνες έλκουν ουδετερόφιλα και λεμφοκύτταρα, αλλά έχουν και αγγειογεννητικήδράση. Η ύπαρξη βακτηρίων στο έλκος, πολυμερισμένη ινική και προφλεγμονώδεις παράγοντες όπως ο TNF-α αποτελούν ισχυρούς εκλυτικούς παράγοντες για τις χυμοκίνες (Martins-Green et al., 2013).

Πρώιμη φλεγμονώδης Φάση

Σε αυτή τη φάση η φλεγμονώδης αντίδραση καθορίζεται κυρίως από τη δράση των ουδετερόφιλων.

Ουδετερόφιλα

Τα ουδετερόφιλα πολυμορφοπύρηνα δεν παρατηρούνται στο φυσιολογικό δέρμα, παράγονται στο μυελό των οστών από τα προμυελοκύτταρα και είναι τα πρώτα κύτταρα που επιστρατεύονται στην περιοχή του έλκους με τη μεσολάβηση των χυμοκινών. Έτσι μέσα στο πρώτο 24ωρο τα ουδετερόφιλα αποτελούν το 50% των κυττάρων που βρίσκουμε στο έλκος. Πάνω από 30 ξεχωριστοί επιφανειακοί υποδοχείς βοηθούν τα ουδετερόφιλα να εντοπίσουν και να οδηγηθούν στις περιοχές ιστικής βλάβης μεταξύ των οποίων είναι και οι ιντεγκρίνες, οι GPCRs, οι Fc υποδοχείς. Τα ενεργοποιημένα ουδετερόφιλα με τη σειρά τους εκκρίνουν παράγοντες που ενισχύουν και παρατείνουν τη διήθηση της περιοχής της ιστικής βλάβης με νέα ουδετερόφιλα. Η δράση τους επιτυγχάνεται με την απελευθέρωση του περιεχομένου των εκκριτικών τους κοκκίων, τα οποία προκαλούν οξειδωτική έκρηξη και καταστρέφουν τα μικροβιακά κύτταρα, ξεκινούν τη διαδικασία της φαγοκυττάρωσης και δημιουργούν εξωκυτταρικές ουδετεροφιλικές παγίδες (Su and Richmond, 2015). Τα βασεόφιλα κοκκία περιέχουν μια σειρά από οξειδωτικά ένζυμα (μυελοπεροξειδάση, λυσοζύμη, πρωτεάσες, καθεψίνη G, ελαστάση). Τα δευτερογενή- ειδικά κοκκία των ουδετερόφιλων παράγουν και περιέχουν μια σειρά ειδικών πρωτεϊνών [human cationic antimicrobial protein (hCAP-18), λακτοφερίνη, μεταλλοπρωτεάση 8 (MMP-8), κολλαγενάση-2]. Τέλος τα εκκριτικά κυστίδια, που παράγονται τελευταία, περιέχουν ιντεγκρίνες, αυξητικούς παράγοντες, και υποδοχείς κυτοκινών (Wilgus et al., 2013).

Γίνεται λοιπόν εύκολα κατανοητό ότι τα ουδετερόφιλα πολυμορφοπύρηνα αποτελούν την πρώτη γραμμή άμυνας του οργανισμού στην περιοχή του έλκους. Οι πρωτεάσες παίζουν βασικό ρόλο στην αντιμικροβιακή δράση, αλλά και στη διαπίδυση των ουδετερόφιλων από τα αιμοφόρα αγγεία. Επιπλέον τα ινίδια χρωματίνης των ουδετερόφιλων σχηματίζουν τις εξωκυτταρικές ουδετεροφιλικές παγίδες (NETs) είτε μετά από λύση του ουδετερόφιλου, είτε μετά από ενεργοποίηση του υποδοχέα των αιμοπεταλίων, περιέχουν πρωτεάσες που συντελούν στην παγίδευση και καταστροφή ιών, βακτηρίων και μυκήτων (Levin et al., 2016).

Μια πολύ σημαντική παράμετρος στην ομαλή επούλωση του τραύματος είναι η διαδικασία καθαρισμού του από τα ουδετερόφιλα. Αυτή ξεκινά είτε με τη νέκρωση τους, είτε με την απόπτωσή τους και την

επακόλουθη εγκόλπωση τους από τα μακροφάγα. Σε αυτή τη διαδικασία σημαντικό ρόλο παίζει η κυτταρική πρωτεΐνη CCN1 μιας και αποτελεί τη γέφυρα πρόσδεσης των μακροφάγων και των ουδετερόφιλων και έτσι ευοδώνει την φαγοκυττάρωση μέσα από την ενεργοποίηση του Rac-1 εξαρτώμενου κυτταρικού μονοπατιού (Jun et al., 2015). Η αποτυχία απομάκρυνσης των ενεργοποιημένων ουδετερόφιλων από την περιοχή του τραύματος οδηγεί σε παρατεταμένη φλεγμονώδη τοπική αντίδραση και μετάπτωση σε χρόνιο έλκος (Chen and Rogers, 2007; Choi et al., 2015).

Όψιμη φλεγμονώδης φάση

Για να ξεκινήσει αυτή η φάση της επούλωσης του τραύματος, τα ουδετερόφιλα πρέπει να αποβληθούν μέσω διεργασιών νέκρωσης και απόπτωσης. Σε αυτή τη φάση τα μακροφάγα αναλαμβάνουν αυτή τη δράση και αποτελούν τον κύριο κυτταρικό τύπο του τραύματος.(Εικόνα 2.1)

Μακροφάγα

Αν και τα μακροφάγα βρίσκονται στους ιστούς, γνωστά ως ιστικά μακροφάγα, πολλαπλασιάζονται κατά την διαδικασία επούλωσης, οι περισσότερη έρευνα εστιάζει στην επιστράτευση των μονοκυττάρων από τον μυελό των οστών και τη διαφοροποίησή τους στην περιοχή του έλκους σε μακροφάγα. Συνήθως στην επιφάνειά τους εκφράζουν CD45+/CD11b+/CD66B-, εμφανίζονται στην περιοχή του έλκους το πρώτο 24ωρο, η μέγιστη συγκέντρωση τους εμφανίζεται την $3^{η}$ -$5^{η}$ ημέρα, ενώ μετά τη $10^{η}$ μέρα επανέρχονται στα αρχικά επίπεδα (Yanez*et al.*, 2017).

Τα μακροφάγα επιστρατεύονται σε απάντηση της δράσης των αιμοπεταλίων, των μαστοκυττάρων και των παραγόντων τοπικής υποξίας, όπως ο stromal-derived factor 1 (SDF1/CXCL12). Τα ίδια τα μακροφάγα μέσω της χημειοτακτικής τους πρωτεΐνης (MCP-1) ελκύουν πρόσθετα μονοκύτταρα και ενισχύουν τη φλεγμονώδη αντίδραση των μακροφάγων (DiPietro et al., 1995).

Στην αρχική φάση της επούλωσης τα μακροφάγα αναφέρονται ως M1 μακροφάγα και η δράση τους είναι κυρίως βακτηριοκτόνος και προφλεγμονώδης. Τα μακροφάγα αναγνωρίζουν παθογόνα και τα εγκολπώνουν στα φαγοσώματα, όπου με τη δράση των ROS ασκούν τη βακτηριοκτόνο δράση τους (Slauch, 2011). Επίσης εκκρίνουν μια σειρά από μεταλλοπρωτεϊνάσες οι οποίες πέπτουν την εξωκυττάρια ουσία και το θρόμβο και τα προϊόντα των τελευταίων αποτελούν ισχυρό ανοσοδιεγερτικό μηχανισμό για την επέκταση του μηχανισμού τοπικής φλεγμονώδους αντίδρασης (Tomlin and Piccinini, 2018). Κρίσιμη λειτουργία των μακροφάγων όπως προαναφέραμε είναι η φαγοκυττάρωση των ενεργοποιημένων ουδετερόφιλων (Choi et al., 2015).

Με την αποδρομή της φλεγμονής τα μακροφάγα μετατρέπονται σε διαφορετικού τύπου κύτταρα με αντιφλεγμονώδη φαινότυπο και λέγονται πια M2 μακροφάγα (Schulz et al., 2021). Η δράση τους, κυρίως μέσω του VEGF που εκκρίνουν φαίνεται να συνδέεται με αγγειογένεση και αύξηση της πυκνότητας των νεοαγγείων καθώς και της λειτουργικότητάς των (Okuno *et al.*, 2011).

Τ λεμφοκύτταρα

Τα Τ λεμφοκύτταρα, που προσελκύονται ειδικά από την IL-1, αποτελούν τον τελευταίο τύπο κυττάρων που μεταναστεύουν στο τραύμα. Ειδικά τα δενδριτικά επιδερμικά Τ κύτταρα (DETCs) παίζουν σημαντικό ρόλο για να ξεκινήσουν τη διαδικασία επιθηλιοποίησης. Είκοσι τέσσερις έως 48 ώρες μετά τον τραυματισμό,

τα DETCs αλλάζουν τη μορφολογία τους από δενδριτικά σε στρογγυλά και ενεργοποιούνται από αυτό για να απελευθερώσουν τον παράγοντα ανάπτυξης κερατινοκυττάρων (KGF)-1 και -2 και τον IGF-1. Αυτό οδηγεί σε πολλαπλασιασμό των κερατινοκυττάρων στο τραύμα. Η σημασία των DETCs καταδείχθηκε από μελέτες σε επίμυες με έλλειψη DETCs, στις οποίες υπήρξε σημαντική καθυστέρηση στο κλείσιμο του τραύματος.

Μαστοκύτταρα

Τα προγονικά κύτταρα των μαστοκυττάρων προέρχονται από τον μυελό των οστών και μεταναστεύουν σε περιαγγειακές περιοχές του συνδετικού ιστού του δέρματος και του βλεννογόνου, όπου διαφοροποιούνται σε μαστοκύτταρα.Στο δέρμα, λειτουργούν κυρίως ως παράγοντες αλλεργικών αντιδράσεων, μεσολαβώντας στις αντιδράσεις ανοσοσφαιρίνης Ε (IgE). Τα μαστοκύτταρα αλληλεπιδρούν με διάφορους άλλους τύπους κυττάρων κατά την επούλωση τραυμάτων

Στα πρώιμα στάδια της επούλωσης των πληγών, τα μαστοκύτταρα απελευθερώνουν αντιμικροβιακά πεπτίδια που αποτρέπουν τις λοιμώξεις του δέρματος.Συνθέτουν τα ένζυμα χυμάση και τρυπτάση, σημαντικά για την αποικοδόμηση της εξωκυτταρικής μεμβράνης (ECM), καθώς και ισταμίνες και VEGF που προκαλούν αγγειακή διαπερατότητα και επιτρέπουν την εισροή ουδετερόφιλων. Η τρυπτάση και η ισταμίνη των μαστοκυττάρων ενισχύουν τον πολλαπλασιασμό των ινοβλαστών και τη σύνθεση κολλαγόνου, ενώ η ισταμίνη των μαστοκυττάρων έχει βρεθεί ότι διεγείρει τον πολλαπλασιασμό και την επανεπιθηλιοποίηση των κερατινοκυττάρων (Guth et al., 2024).

Ο αυξημένος αριθμός μαστοκυττάρων εμπλέκεται σε ουλές και ίνωση του δέρματος. Τα τραύματα σε ποντίκια κατά την εμβρυϊκή ημέρα 15 επουλώνονται χωρίς ουλή, ενώ τα τραύματα κατά την εμβρυϊκή ημέρα 18 εμφανίζουν ουλή. Είναι ενδιαφέρον ότι η έγχυση χυμάσης μαστοκυττάρων σε τραύματα κατά την εμβρυϊκή ημέρα 15 μπορεί να μετατρέψει την επούλωση χωρίς ουλή σε σχηματισμό ουλής. Επίσης υπάρχουν ενδείξεις ότι υπάρχει μειωμένος αριθμός μαστοκυττάρων και μειωμένη αποκοκκίωση στην επούλωση τραυμάτων σε διαβητικούς ασθενείς, αλλά απαιτούνται περισσότερες μελέτες για να χαρακτηριστεί ο ρόλος αυτών των κυττάρων σε καταστάσεις μειωμένης επούλωσης τραυμάτων(Ng, 2010; Wulff and Wilgus, 2013).

Δενδριτικά κύτταρα

Λίγο μετά τον τραυματισμό ή τη φλεγμονή, τα κατεστραμμένα κερατινοκύτταρα που βρίσκονται πολύ κοντά στη βλάβη αυξάνουν γρήγορα και παροδικά τα σχετικά με το στρες αντιγόνα. Τα γδ Τ κύτταρα της επιδερμίδας και του χορίου ενεργοποιούνται πλήρως μέσω της αναγνώρισης των αντιγόνων από τον TCR και τους συν-διεγερτικούς υποδοχείς. Τα ενεργοποιημένα επιδερμικά γδ Τ κύτταρα αλλάζουν τη μορφολογία τους, με σύσπαση των δενδριτών τους και στρογγυλοποιούνται εντός 24 ωρών μετά τον τραυματισμό (Jamesonet *al.*, 2002). Εντός 48 ωρών, τα επιδερμικά γδ Τ κύτταρα εκκρίνουν κυτοκίνες και αυξητικούς παράγοντες για τη ρύθμιση της φλεγμονής και του πολλαπλασιασμού, όπως KGF-1, KGF-2, IL-13, IFN-γ, TNF-α, IGF-1, IL-2 και IL-17 (Hu*etal.*, 2022).

Σε πειραματικό μοντέλο δερματικών ελλειμμάτων με TCR δ knockout επίμυες, οι έρευνες έδωσαν κρίσιμες γνώσεις σχετικά με τον ρόλο των γδ Τ κυττάρων στην επούλωση δερματικών ελκών και τα ευρήματα έδειξαν ότι τα γδ Τ κύτταρα διαδραματίζουν κρίσιμο ρόλο στην προαγωγή της επούλωσης δερματικών ελκών. Μεταγενέστερες μελέτες διαπίστωσαν ότι διαφορετικοί υποπληθυσμοί αυτών των

κυττάρων παίζουν διακριτούς ρόλους και τα Vγ4 Τ κύτταρα βρέθηκαν να περιορίζουν τον ρυθμό επούλωσης τραυμάτων, ενώ τα Vγ5 Τ κύτταρα, από την άλλη πλευρά, βρέθηκαν να προάγουν την επούλωση τραυμάτων.

Έχουν αναφερθεί αρκετοί μηχανισμοί που εμπλέκονται στη ρύθμιση του δερματικού φραγμού και στην επούλωση τραυμάτων από τα γδ Τ κύτταρα. Ένας τέτοιος μηχανισμός περιλαμβάνει τη διατήρηση της ομοιόστασης του δέρματος. Τα επιδερμικά γδ Τ κύτταρα ποντικού, αποικίζουν στην επιδερμίδα κατά το εμβρυϊκό στάδιο και εκκρίνουν παράγοντες όπως IL-13, IGF-1 και παράγοντα διέγερσης αποικιών κοκκιοκυττάρων-μακροφάγων για την προώθηση της ανάπτυξης της επιδερμίδας και των κυττάρων Langerhans (Kadow *et al.*, 2011). Ένας άλλος μηχανισμός περιλαμβάνει τη ρύθμιση της φλεγμονής στο σημείο της βλάβης. Τα γδ Τ κύτταρα εκκρίνουν χυμοκίνες και κυτοκίνες όπως CCL3 (MIP-1a), CCL4 (MIP-1b), CCL5 (Rantes), IL-17A, IFN-γ και IL-10 για την προώθηση της χημειοταξίας των ανοσοκυττάρων και την επίδραση στη λειτουργία των ουδετερόφιλων, των κοκκιοκυττάρων, των μακροφάγων και άλλων ανοσοκυττάρων (Chen et al., 2021; Fagundes et al., 2023; Hu et al., 2024). Επιπλέον, τα γδ Τ κύτταρα επηρεάζουν τη διαδικασία επαναεπιθηλιοποίησης εκκρίνοντας IGF-1 και παράγοντα ανάπτυξης κερατινοκυττάρων 1 και 2, οι οποίοι διεγείρουν τον πολλαπλασιασμό και τη μετανάστευση των κερατινοκυττάρων για την προώθηση της επανεπιθηλιοποίησης. Ο IGF-1 που εκκρίνεται από τα γδ Τ κύτταρα μπορεί περαιτέρω να σχηματίσει έναν βρόχο θετικής ανάδρασης με την IL-15 κερατινοκυττάρων για να ενισχύσει τη διαδικασία επανεπιθηλιοποίησης. Διάφορες μελέτες έχουν επίσης αναφέρει ότι τα γδ Τ κύτταρα εμπλέκονται στην ανοσοδιαμεσολαβούμενη ανάπτυξη διαφόρων δερματικών παθήσεων. Για παράδειγμα, μελέτες που διεξήχθησαν σε ποντίκια έχουν αποκαλύψει ότι τα Vγ4 Τ κύτταρα που μοιάζουν με μνήμης επιδεινώνουν τα συμπτώματα της ψωρίασης μετά από δευτερογενή έκθεση σε αλλεργιογόνα(Ramírez-Valle et al., 2015).

2.2.2 Φάση Πολλαπλασιασμού – Σχηματισμός Κοκκιώδους Ιστού και Νεοαγγείωση

Στη φάση πολλαπλασιασμού, το τραύμα ξεκινά με την επιδιόρθωση των ιστών. Λόγω του σχηματισμού ενός νέου στρώματος από τους ινοβλάστες, της βλάστησης νέων αιμοφόρων αγγείων και της εναπόθεσης του εξωκυττάριου ιστού ή εξωκυττάριας ουσίας (ECM), καθώς και της σύνθεσης κολλαγόνου, αυτή η φάση ονομάζεται επίσης φάση κοκκιοποίησης και ο παραγόμενος ιστός ως κοκκιώδης ιστός. Ο σχηματισμός του κοκκιώδους ιστού προκύπτει κυρίως από ενεργοποιημένους ινοβλάστες, οι οποίοι συνθέτουν νέα ECM και συστέλλουν το τραύμα.

Κεντρικό ρόλο στη φάση πολλαπλασιασμού παίζει το ίδιο το μικρο- και μακροαγγειακό σύστημα και η αποκατάστασή του (Sorg *et al.*, 2018). Έτσι, το αγγειακό σύστημα δε συμβάλλει μόνο στην αρχική αιμόσταση, μειώνει την απώλεια αίματος, αλλά παρέχει επίσης κυτοκίνες και αυξητικούς παράγοντες που προέρχονται από θρόμβους αίματος. Το προσωρινό μικροπεριβάλλον του τραύματος με τις κρίσιμες κυτοκίνες και αυξητικούς παράγοντες αντιπροσωπεύει το σημείο εκκίνησης για τον σχηματισμό νέων αγγείων, διασφαλίζοντας έτσι την αποκατάσταση της ροής του αίματος, απαραίτητη για την παροχή οξυγόνου και θρεπτικών συστατικών και για τη διατήρηση του κυτταρικού μεταβολισμού και τη διατήρηση της διαδικασίας επούλωσης. Για καλύτερη κατανόηση, η φάση της αγγειογένεσης μπορεί επίσης να υποδιαιρεθεί

σε δύο φάσεις. Στην προ-αγγειογενετική φάση, που υπάρχει υπερβολική παραγωγή αιμοφόρων αγγείων, το αγγειακό δίκτυο βιώνει μια διαδικασία ωρίμανσης και στην επακόλουθη αντι-αγγειογενετική φάση, η οποία τελικά οδηγεί σε σημαντική μείωση του αριθμού των αγγείων(Sorg *et al.*, 2018).

Τα τοπικά μικροαγγειακά ενδοθηλιακά κύτταρα και, σε πολύ μικρότερο βαθμό, τα περικύτταρα εμπλέκονται αρχικά στις αγγειογενετικές διεργασίες. Η διαδικασία σχηματισμού νέων αγγείων με βλάστηση απαιτεί την ανίχνευση χαμηλών επιπέδων οξυγόνου στον ιστό για την ενεργοποίηση των ενδοθηλιακών κυττάρων από αυξητικούς παράγοντες που ανταποκρίνονται στην υποξία, όπως ο αγγειακός ενδοθηλιακός αυξητικός παράγοντας (VEGF) που εκκρίνεται από τα επιδερμικά κύτταρα, τα μακροφάγα και τον υποδόριο λιπώδη ιστό (Adam et al., 2013). Αρχικά, η βασική μεμβράνη των τριχοειδών αποικοδομείται από ένζυμα (Van Hinsbergh and Koolwijk, 2008). Μετά από αυτό, τα ενδοθηλιακά κύτταρα αρχίζουν να πολλαπλασιάζονται. Τα ενδοθηλιακά κύτταρα κορυφής (Endothelial "tipcells"), επεκτείνουν τα φιλοπόδια (λεπτές, δυναμικές, κυτταρικές προεξοχές που μοιάζουν με δάχτυλα, γεμάτες με νημάτια ακτίνης που λειτουργούν ως αισθητηριακές «κεραίες» για τα κύτταρα) κατά μήκος μιας προ-αγγειογενετικής κλίσης που υποδεικνύει τον ακριβή προσανατολισμό του αναπτυσσόμενου τριχοειδούς βλαστού μέσω της εξωκυττάριας ουσίας (ECM) (Gerhardt, 2008). Τα φιλοπόδια εκκρίνουν μεγάλες ποσότητες πρωτεολυτικών ενζύμων για να παρέχουν μια οδό για τον νεοσχηματισμένο τριχοειδή βλαστό μέσω της ECM (Van Hinsbergh and Koolwijk, 2008). Τα κύτταρα κορυφής είναι εξοπλισμένα με πολλούς υποδοχείς VEGF-A που τους επιτρέπουν να ανιχνεύουν τις ακριβείς συγκεντρώσεις VEGF στην ECM και στη συνέχεια να ευθυγραμμίζονται προς την υψηλότερη κλίση (Sorg*et al.*, 2018). Το κύτταρο κορυφής ακολουθείται άμεσα από ένα κύτταρο μίσχου,ένα πολλαπλασιαζόμενο ενδοθηλιακό κύτταρο (ECM) που επιμηκύνει ένα βλαστό σχηματίζοντας τον κορμό ενός νέου τριχοειδούς αγγείου. Όταν τα κύτταρα κορυφής συναντώνται μεταξύ τους, συντήκονται και δημιουργούν έναν αυλό, ξεκινώντας τη ροή του αίματος, αναδημιουργώντας οξυγονωμένη ροή αίματος και μειώνοντας την έκκριση VEGF, ενώ ταυτόχρονα μπορούν να συνδεθούν με άλλα νεοαγγεία ή υπάρχοντα αγγεία. Αυτά τα νεοσχηματισμένα αγγεία είναι ανώριμα και εξακολουθούν να παρουσιάζουν διαρροή. Αυτό επιτρέπει την ευκολότερη διείσδυση ανοσοκυττάρων στην περιοχή του τραύματος μέχρι να αποκατασταθεί πλήρως η ροή του αίματος και το αιμοφόρο αγγείο να σφραγιστεί από περικύτταρα (Morikawa et al., 2019). Κατά συνέπεια, εάν οι περιβάλλοντες ιστοί λάβουν κατάλληλες ποσότητες οξυγόνου, η συγκέντρωση VEGF μειώνεται και ξεκινά η διαδικασία αγγειακής ωρίμανσης. Η ωρίμανση και η σταθεροποίηση των νεοσχηματισμένων τριχοειδών αγγείων απαιτεί την προσέλκυση και προσκόλληση περικυττάρων στο εξωτερικό αγγειακό ενδοθήλιο και την εναπόθεση ECM, η οποία συνοδευόμενη απόκατάλληλη μηχανική φόρτιση και σηματοδότηση μέσω του κυτταροσκελετού, οδηγεί στη διαφοροποίηση του μικροπεριβάλλοντος των νεοσχηματισμένων αγγείων (Yamashiro and Yanagisawa, 2020).

Είναι ενδιαφέρον ότι ο VEGF δεν δρα μόνο στα ενδοθηλιακά κύτταρα αλλά και στους ινοβλάστες, γεγονός που με τη σειρά του μπορεί επίσης να προωθήσει τη διαδικασία αγγειογένεσης σε τραύματα. Για παράδειγμα, μια πρόσφατη μελέτη κατέδειξε ότι η υπερέκφραση του VEGF σε ινοβλάστες οδηγεί σε αυξημένη αγγειογένεση και σχηματισμό κοκκιώδους ιστού στην πρώιμη φάση της διαδικασίας επούλωσης (Shams*et al.*, 2022).

Η όλη διαδικασία σχηματισμού καθώς και ωρίμανσης των αγγείων δεν φαίνεται να ακολουθεί ένα αναγνωρίσιμο πρότυπο εκ πρώτης όψεως. Αν και θα μπορούσε να περιγραφεί μια διαδικασία κατά την οποία ένας δακτύλιος κυκλικά διατεταγμένων αγγείων σχηματίζεται αρχικά απευθείας στην άκρη του τραύματος, του οποίου η οργάνωση είναι ακανόνιστη και η ροή του αίματος υποτυπώδης. Καθώς η διαδικασία συνεχίζεται, αυτός ο αγγειακός δακτύλιος στην άκρη του τραύματος συστέλλεται προς το κέντρο του τραύματος, αφήνοντας ακτινωτά αγγεία που τροφοδοτούν το εσωτερικό του τραύματος και δημιουργούν μια σύνδεση με το μη τραυματισμένο δέρμα. Αυτά τα αγγεία είναι πιο ομοιόμορφα στον βαθμό οργάνωσής τους και η ροή του αίματος μπορεί να περιγραφεί ως σχεδόν φυσιολογική. Εάν προκύψουν διαταραχές στη διαδικασία νεοαγγείωσης, αυτό μπορεί να οδηγήσει σε έναν φαύλο κύκλο και σε διαταραχές επούλωσης τραυμάτων ή χρόνια έλκη, όπως συνήθως εμφανίζονται σε φλεβική ανεπάρκεια, αρτηριοσκληρωτικές παθήσεις ή έλκη διαβητικού ποδιού.

Στο πλαίσιο της βελτίωσης της αγγείωσης, η μεταμόσχευση τρισδιάστατων μικροαγγειακών θραυσμάτων που προέρχονται από λιπώδη ιστό βρίσκεται υπό έντονη διερεύνηση (Rojas-Rodriguez et al., 2014). Τα μικροαγγειακά θραύσματα έχουν υψηλό αγγειογενετικό δυναμικό επειδή, με βάση ένα τυχαιοποιημένο μείγμα λειτουργικών αρτηριδίων, τριχοειδών αγγείων και φλεβιδίων, μπορούν να συναρμολογηθούν γρήγορα σε νέα μικροαγγειακά δίκτυα μετά τη μεταμόσχευσή τους σε ιστικά ελαττώματα. Επομένως, αυτή θα μπορούσε επίσης να είναι μια νέα στρατηγική για τη βελτίωση της επούλωσης δερματικών τραυμάτων μέσω επιταχυνόμενης αγγείωσης, ωρίμανσης αιμοφόρων αγγείων καθώς και επιθηλιοποίησης (Aubin et al., 2015).

Ινοβλάστες

Οι ινοβλάστες είναι κεντρικοί μεσολαβητές της διαδικασίας επούλωσης τραυμάτων, ενορχηστρώνοντας την εναπόθεση εξωκυττάριας μήτρας (ECM), την αναδιαμόρφωση των ιστών και την ενδοκυτταρική σηματοδότηση. Μετά τον τραυματισμό, οι ινοβλάστες μεταναστεύουν στην κοίτη του τραύματος, πολλαπλασιάζονται και εκκρίνουν κολλαγόνο, φιμπρονεκτίνη και άλλα συστατικά της ECM που είναι απαραίτητα για τον σχηματισμό κοκκιώδους ιστού και τη δομική ακεραιότητα (Jiang *et al.*, 2023; Knoedler *et al.*, 2023). Η ετερογένεια των ινοβλαστών, συμπεριλαμβανομένων διακριτών υποπληθυσμών με εξειδικευμένες λειτουργίες, αναγνωρίζεται ολοένα και περισσότερο ως καθοριστικός παράγοντας των αποτελεσμάτων της επούλωσης τραυμάτων, με ορισμένα υποσύνολα να οδηγούν στην επιθηλιακή-μεσεγχυματική μετάβαση και την αγγειογένεση κατά τη διάρκεια της πολλαπλασιαστικής φάσης(Gharbia *et al.*, 2023; Jiang *et al.*, 2023).

Ένα βασικό γεγονός στην επούλωση τραυμάτων είναι η διαφοροποίηση των ινοβλαστών σε μυοϊνοβλάστες (Εικόνα 2.1), μια διαδικασία που προκαλείται κυρίως από τον μετατρεπτικό αυξητικό παράγοντα-β1 (TGF-β1) και ρυθμίζεται από το μικροπεριβάλλον του τραύματος (Hinz, 2016; Ramklowan et al., 2023). Οι μυοϊνοβλάστες χαρακτηρίζονται από την έκφραση της α-ακτίνης των λείων μυών και τις ενισχυμένες συσταλτικές ιδιότητες, επιτρέποντας τη συστολή και το κλείσιμο του τραύματος (Ramklowan *et al.*, 2023). Αυτά τα κύτταρα παράγουν και οργανώνουν επίσης πρωτεΐνες ECM, διευκολύνοντας την αντοχή

και την αποκατάσταση των ιστών. Η μετάβαση από ινοβλάστη σε μυοϊνοβλάστη ρυθμίζεται αυστηρά. Η δυσλειτουργία μπορεί να οδηγήσει σε μειωμένη επούλωση ή παθολογική ίνωση (Hinz, 2016; Smith, 2018).

Η αλληλεπίδραση μεταξύ ινοβλαστών, μυοϊνοβλαστών και άλλων κυτταρικών συστατικών —όπως τα ανοσοποιητικά και ενδοθηλιακά κύτταρα— συμβαίνει μέσω άμεσης επαφής, παρακρινούς σηματοδότησης και αναδιαμόρφωσης της εξωκυττάριας ουσίας (ECM) (Knoedler *et al.*, 2023; Lacina *et al.*, 2024). Κατά τη φάση πολλαπλασιασμού, οι μυοϊνοβλάστες και οι ινοβλάστες συντονίζονται με μακροφάγα και ενδοθηλιακά κύτταρα για την προώθηση της αγγειογένεσης και του σχηματισμού κοκκιώδους ιστού (Lacina et al., 2024; Rai et al., 2023). Η παρατεταμένη ή υπερβολική ενεργοποίηση των μυοϊνοβλαστών, που συχνά προκαλείται από επίμονη φλεγμονή ή ανώμαλη σηματοδότηση κυτοκινών (π.χ., ιντερλευκίνη-6), μπορεί να οδηγήσει σε χρόνια τραύματα ή υπερτροφικές ουλές (Hinz, 2016; Lacina et al., 2024).

Πρόσφατες εξελίξεις στη μεταγραφωμική μονοκυττάρων και στα μοντέλα συνκαλλιέργειας in vitro έχουν διευκρινίσει τους μοριακούς μηχανισμούς που διέπουν τη λειτουργία και την ετερογένεια των ινοβλαστών και των μυοϊνοβλαστών (Gharbia et al., 2023; Ramklowan et al., 2023). Οι δυσλειτουργικές σηματοδοτικές οδοί, όπως οι μειωμένες αλληλεπιδράσεις υαλουρονάνης-CD44-EGFR, έχουν εμπλακεί σε ελαττωματική διαφοροποίηση των μυοϊνοβλαστών και σε χρόνια παθολογία τραυμάτων (Morris *et al.*, 2025). Η κατανόηση των δυναμικών ρόλων και της ρύθμισης των ινοβλαστών και των μυοϊνοβλαστών είναι κρίσιμη για την ανάπτυξη στοχευμένων θεραπειών για την ενίσχυση της επούλωσης τραυμάτων και την πρόληψη της ίνωσης (Monika et al., 2021; Talbott et al., 2022).

2.3 Φάση Επανεπιθηλιοποίησης

Για τη διαδικασία επιθηλιοποίησης, η κινητικότητα των κυττάρων μέσω των μηχανισμών προεξοχής, προσκόλλησης και έλξης είναι ιδιαίτερα σημαντική. Αυτή η διαδικασία ενεργοποιείται ήδη λίγες ώρες μετά τον τραυματισμό, κατά την οποία υπάρχει μετασχηματισμός των ακίνητων κερατινοκυττάρωντου πλακώδους επιθηλίου σε επίπεδα μεταναστευτικά κερατινοκύτταρα.

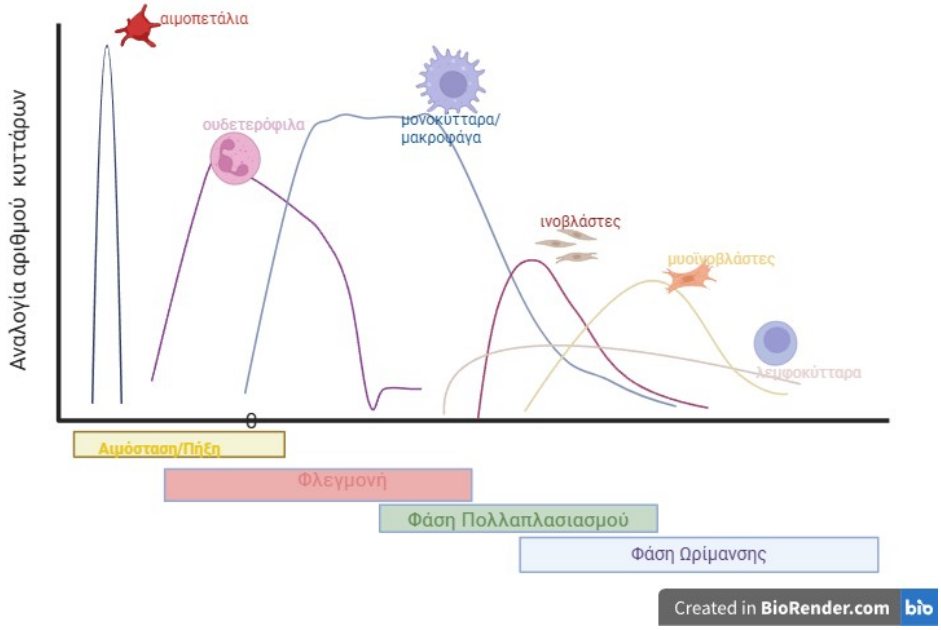
Κερατινοκύτταρα

Τα βασικά κερατινοκύτταρα εκφράζουν τις κερατίνες K5, K14 και K15, ενώ τα διαφοροποιημένα κερατινοκύτταρα εκφράζουν τις K1 και K10. Οι πολλαπλές κυτταρικές και μοριακές διεργασίες που εμπλέκονται στην έναρξη, τη διατήρηση και την ολοκλήρωση της επιθηλιοποίησης είναι απαραίτητες για το επιτυχές κλείσιμο του τραύματος, συμπεριλαμβανομένου του σχηματισμού μιας προσωρινής κοίτης τραύματος που σχηματίζεται από ένα αδιάλυτο πρωτεϊνικό εξίδρωμα, της μετανάστευσης επιδερμικών κερατινοκυττάρων από τις άκρες του τραύματος, του πολλαπλασιασμού των κερατινοκυττάρων που τροφοδοτούν την προωθούμενη και μεταναστευτική επιθηλιακή προσεκβολή, της στρωματοποίησης και διαφοροποίησης του νεοεπιθηλίου, της αναμόρφωσης μιας άθικτης ζώνης βασικής μεμβράνης και της ανασύστασης εξειδικευμένων κυττάρων που κατευθύνουν τις αισθητηριακές λειτουργίες, τη χρώση και τις ανοσολογικές παραμέτρους. Η αναγέννηση μιας λειτουργικής επιδερμίδας εξαρτάται από την ανασύσταση της δερμοεπιδερμιδικής συμβολής, η οποία αγκυρώνει την επιδερμίδα στο χόριο (Fisher and Rittié, 2018;

Rousselle et al., 2019)και από την τελική διαφοροποίηση των κερατινοκυττάρων σε ένα προστατευτικό κερατινοποιημένο στρώμα (Litjens et al., 2006).

Το ασβέστιο είναι ο κύριος ρυθμιστής της διαφοροποίησης των κερατινοκυττάρων (Bikle et al., 2012a). Μια διαβάθμιση ασβεστίου εντός της επιδερμίδας διευκολύνει τη διαφοροποίηση των κερατινοκυττάρων καθώς διασχίζουν διάφορα στρώματα, σχηματίζοντας τελικά την ημιπερατή κεράτινη στιβάδα(Hennings *et al.*, 1980). Η βασική και η ακανθωτή στιβάδα έχουν χαμηλότερες συγκεντρώσεις ασβεστίου και η συγκέντρωση ασβεστίου αυξάνεται σταδιακά προς την κοκκιώδη στιβάδα και μειώνεται ξανά στην κεράτινη στιβάδα. Το ασβέστιο είναι απαραίτητο για τη διαφοροποίηση των κερατινοκυττάρων, διεγείροντας τη διαφοροποίηση των κερατινοκυττάρων στη βασική και την ακανθώδη στιβάδα, καθώς και πυροδοτώντας την τελική διαφοροποίηση των κυττάρων στην κοκκιώδη στιβάδα. Το ασβέστιο είναι γνωστό ότι ρυθμίζει την έκφραση γονιδίων ειδικών για τη διαφοροποίηση των κερατινοκυττάρων, όπως η τρανσγλουταμινάση, η ινβολουκρίνη, η λορικρίνη, η κυτοκερατίνη 1, η κυτοκερατίνη 10 και η φιλαγγρίνη (Bikle et al., 2012b).

Μετά τον τραυματισμό, τα κερατινοκύτταρα στην άκρη του τραύματος χαλαρώνουν τις προσκολλήσεις τους μεταξύ τους και στο βασικό υμένα για να κλείσουν το έλλειμμα, σχηματίζοντας τη μεταναστευτική επιθηλιακή προσεκβολή. Οι ιντεγκρίνες εκφράζονται επίσης στα υπερβασικά κερατινοκύτταρα, κάτι που οδηγεί σε αυξημένη σηματοδότηση Erk-MAPK και σύνθεση φλεγμονωδών κυτοκινών, προκαλώντας υπερπολλαπλασιασμό των κερατινοκυττάρων και ενεργοποίηση των ανοσοκυττάρων (Trappmann et al., 2012). Οι υποδοχείς ιντεγκρίνης α5β1, ανβ6 και ανβ1 αυξάνονται επίσης στα κερατινοκύτταρα κατά την επούλωση του τραύματος (Haapasalmi *et al.*, 1996; Grose *et al.*, 2002). Η σηματοδότηση των ιντεγκρίνων είναι κρίσιμη και η απώλεια των ιντεγκρίνων των κερατινοκυττάρων έχει βρεθεί ότι επηρεάζει αρνητικά την επούλωση του τραύματος (Koivisto *et al.*, 2014).



Εικόνα 2.1: Κύτταρα βασικοί «παίκτες» στην επούλωση του τραύματος.Created in BioRender.com

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3: ΧΡΟΝΙΑ ΕΛΚΗ

3.1 Ορισμός

Ως χρόνιο τραύμα ορίζεται το τραύμα που δεν καταφέρνει να προχωρήσει μέσα από τις φυσιολογικές φάσεις της επούλωσης με ομαλό και έγκαιρο τρόπο, οδηγώντας σε μια παρατεταμένη και συχνά ατελή αποκατάσταση της ανατομικής και λειτουργικής ακεραιότητας. Υπό φυσιολογικές συνθήκες, η επούλωση τραυμάτων είναι μια εξαιρετικά συντονισμένη διαδικασία που αποτελείται από τέσσερα επικαλυπτόμενα στάδια: αιμόσταση, φλεγμονή, πολλαπλασιασμός και αναδιαμόρφωση. Τα οξέα τραύματα συνήθως ακολουθούν αυτήν την αλληλουχία και επιτυγχάνουν κλείσιμο εντός ενός προβλέψιμου χρονικού πλαισίου, γενικά εντός 4 έως 6 εβδομάδων. Αντίθετα, τα χρόνια τραύματα παραμένουν σε στασιμότητα, συνήθως στη φλεγμονώδη φάση, λόγω εγγενών ή εξωγενών παραγόντων που διαταράσσουν τους φυσιολογικούς μηχανισμούς επούλωσης.

Τα χρόνια τραύματα συχνά σχετίζονται με υποκείμενες παθοφυσιολογικές καταστάσεις όπως ο σακχαρώδης διαβήτης, η περιφερική αγγειακή νόσος, η φλεβική ανεπάρκεια, η ισχαιμία που προκαλείται από πίεση ή η λοίμωξη. Αυτοί οι παράγοντες συμβάλλουν σε μια ανισορροπία μεταξύ προφλεγμονωδών και αντιφλεγμονωδών σημάτων, σε μειωμένη αγγειογένεση, σε υπερβολική δραστηριότητα πρωτεάσης και σε μειωμένη διαθεσιμότητα αυξητικών παραγόντων, τα οποία όλα καθυστερούν την επούλωση.

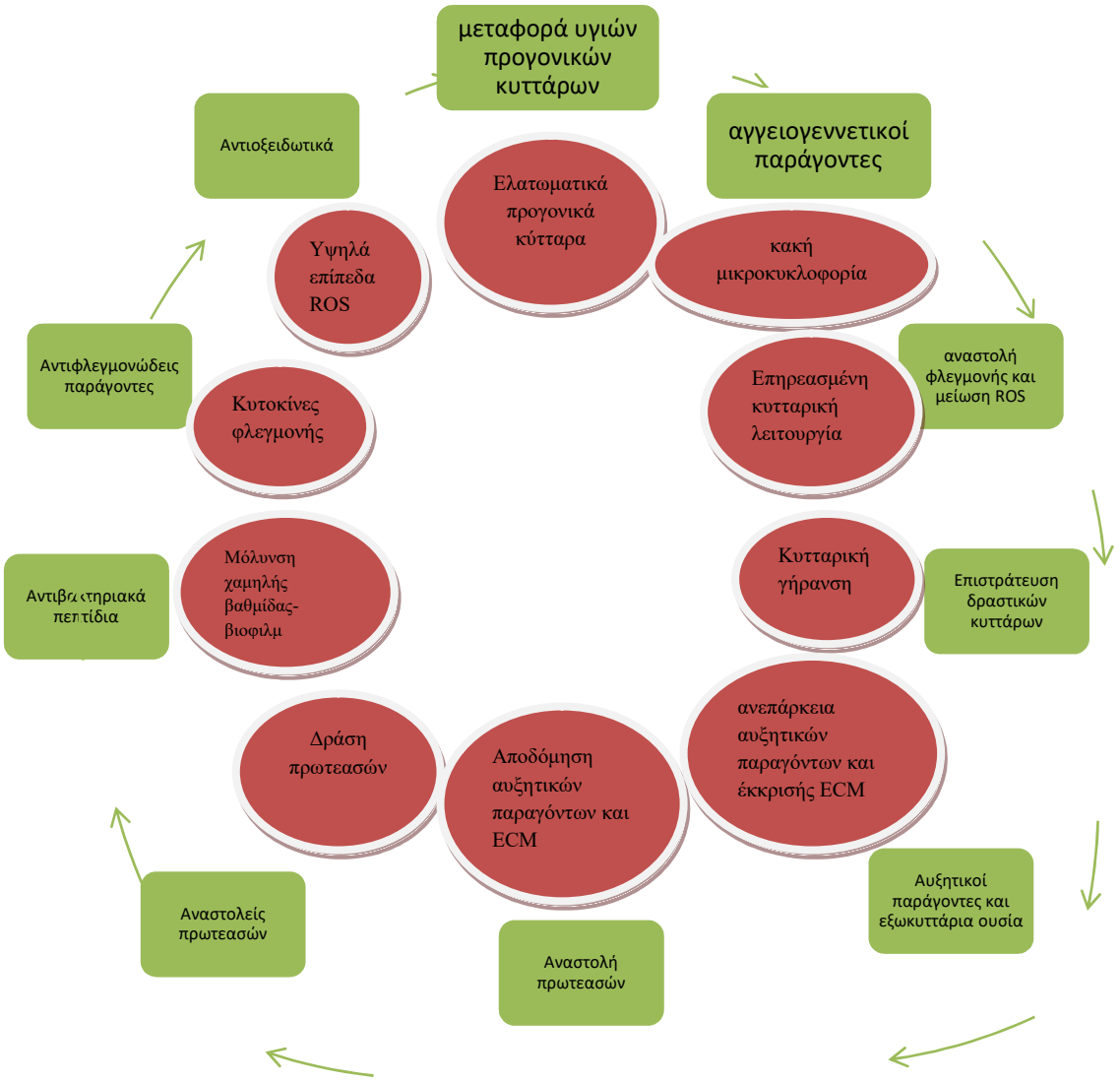
Η κλινική βαρύτητα των χρόνιων τραυμάτων είναι σημαντική, με σημαντικές επιπτώσεις στην ποιότητα ζωής των ασθενών και στο κόστος υγειονομικής περίθαλψης. Η κατανόηση του ορισμού των χρόνιων τραυμάτων είναι επομένως απαραίτητη, καθώς καθοδηγεί την έγκαιρη εφαρμογή στοχευμένων διαγνωστικών και θεραπευτικών στρατηγικών που αποσκοπούν στην αντιμετώπιση των υποκείμενων αιτιών και στην αποκατάσταση της φυσιολογικής δυναμικής επούλωσης(Nunan, Harding and Martin, 2014).

3.2 Παθοφυσιολογικά χαρακτηριστικά χρονίων ελκών

Η δημιουργία ενός χρόνιου έλκους συνήθως οφείλεται σε πολλούς επιβαρυντικούς παράγοντες , καθένας από τους οποίους συμβάλει με τη δική του βαρύτητα. Σχηματικά στην Εικόνα 3.1 παρουσιάζονται οι κύριες παθοφυσιολογικές μεταβολές που οδηγούν στη δημιουργία χρονίων ελκών. Αυτή η γνώση μας επιτρέπει να παρέμβουμε θεραπευτικά και να πετύχουμε επούλωση τέτοιων χρόνιων ελκών.

Παρατεταμένη Φλεγμονή

Τα χρόνια έλκη συνήθως παγιδεύονται στη φλεγμονώδη φάση. Τα αυξημένα επίπεδα προφλεγμονωδών κυτοκινών - όπως ο παράγοντας νέκρωσης όγκων-άλφα (TNF-α) και οι ιντερλευκίνες - διατηρούν τη βλάβη των ιστών, στρατολογούν υπερβολικά ουδετερόφιλα και δημιουργούν επίμονο οξειδωτικό στρες (Loots *et al.*, 1998). Αυτή η μη ισορροπημένη αντίδραση καθυστερεί την εξέλιξη στην πολλαπλασιαστική φάση. Η ανάλυση του υγρού τραύματος από χρόνια τραύματα, σε σύγκριση με οξέα χειρουργικά τραύματα, καταδεικνύει αυξημένα επίπεδα πρωτεάσης, αυξημένα επίπεδα προφλεγμονωδών κυτοκινών (Mast and Schultz, 1996; Yager and Nwomeh, 1999; Medina *et al.*, 2005)



Εικόνα 3.1: Προκλήσεις στη θεραπείαχρόνιων ελκών.

Ανισορροπία πρωτεασών και αυξητικών παραγόντων

Τα χρόνια τραύματα εμφανίζουν υψηλά επίπεδα μεταλλοπρωτεϊνασών (MMPs) και μειωμένους αναστολείς μεταλλοπρωτεϊνασών (TIMPs) στους ιστούς, οδηγώντας σε αποικοδόμηση της εξωκυτταρικής μήτρας (Trengove *et al.*, 1999).

Την ίδια στιγμή οι βασικοί αυξητικοί παράγοντες όπως ο VEGF και ο PDGF μειώνονται, εμποδίζοντας την αγγειογένεση και τη δραστηριότητα των ινοβλαστών. Ο GM-CSF ο οποίος είναι επίσης ένας ισχυρός ενεργοποιητής του πολλαπλασιασμού των κερατινοκυττάρων και έχει αποδειχθεί ότι επιταχύνει την επούλωση των πληγών και η υπερέκφρασή του σε ποντίκια οδηγεί σε αυξημένη επαναεπιθηλιοποίηση και κλείσιμο τραυμάτων, ενώ η εξάντληση του GM-CSF επηρεάζει σημαντικά την επούλωση τραυμάτων (Schirmacher *et al.*, 2001; Fang *et al.*, 2007). Στα χρόνια έλκη, η επούλωση επηρεάζεται από μια διαρκή ανισορροπία μεταξύ πρωτεολυτικών ενζύμων και αυξητικών παραγόντων εντός του μικροπεριβάλλοντος του τραύματος. Υπό φυσιολογικές συνθήκες, οι πρωτεάσες όπως οι μεταλλοπρωτεϊνάσες μήτρας (MMPs)

ρυθμίζονται αυστηρά από ενδογενείς αναστολείς, διευκολύνοντας την αναδιαμόρφωση της εξωκυτταρικής ουσίας (ECM) και την ελεγχόμενη δραστηριότητα των αυξητικών παραγόντων. Ωστόσο, το εξίδρωμα του χρόνιου έλκους εμφανίζει επίμονα αυξημένα επίπεδα MMPs (συμπεριλαμβανομένων των MMP-1, -2, -8, -9 και -13) και σερινοπρωτεασών όπως η ελαστάση των ουδετερόφιλων, ταυτόχρονα με μειωμένα επίπεδα αναστολέων ιστών μεταλλοπρωτεϊνασών (TIMPs) και άλλων αντιπρωτεασών, με αποτέλεσμα την υπερβολική πρωτεόλυση των συστατικών της ECM, των υποδοχέων και των πεπτιδικών αυξητικών παραγόντων που είναι κρίσιμοι για την επιδιόρθωση (π.χ., PDGF, EGF, VEGF, TGF-β) (Yager *et al.*, 1997). Αυτή η ανισορροπία αναστολέα πρωτεάσης όχι μόνο αποικοδομεί τόσο τους ενδογενείς όσο και τους εξωγενώς εφαρμοζόμενους αυξητικούς παράγοντες, μειώνοντας τη βιοδιαθεσιμότητα και την αποτελεσματικότητά τους στη σηματοδότηση, αλλά διαιωνίζει επίσης ένα χρόνιο φλεγμονώδες περιβάλλον που καταστέλλει περαιτέρω την κυτταρική απόκριση σε μιτογόνες ενδείξεις, συμβάλλοντας στην καθυστερημένη επαναεπιθηλιοποίηση, την αγγειογένεση και τον σχηματισμό κοκκιώδους ιστού σε έλκη όπως το διαβητικό πόδι και τα φλεβικά έλκη των ποδιών.Οι θεραπευτικές στρατηγικές που στοχεύουν στην αποκατάσταση της ισορροπίας, συμπεριλαμβανομένων των επιθεμάτων που τροποποιούν την πρωτεάση και των σκευασμάτων αυξητικών παραγόντων ανθεκτικών στην πρωτεάση, υπογραμμίζουν την κεντρική θέση αυτής της ανισορροπίας στην παθοφυσιολογία των χρόνιων τραυμάτων και αντιπροσωπεύουν ενεργούς τομείς έρευνας για την ενίσχυση των αποτελεσμάτων επούλωσης (Boeringer et al., 2020).

Διαταραγμένη αγγειογένεση και υποξία

Η κακή αγγείωση έχει ως αποτέλεσμα την υποξία των ιστών, μειώνοντας τον πολλαπλασιασμό των ινοβλαστών και τη σύνθεση κολλαγόνου. Η αρτηριακή νόσος, ο διαβήτης και η φλεβική ανεπάρκεια επιδεινώνουν τις ισχαιμικές καταστάσεις, διαιωνίζοντας την κακή παροχή οξυγόνου (Sen *et al.*, 2009). Επιπρόσθετα μειώνεται η ικανότητα επιδιόρθωσης τραυμάτων και ελκών λόγω ελαττωματικής λειτουργίας των περικυττάρων επηρεάζοντας τη διαδικασία της νεοαγγειογένεσης και της δημιουργίας κοκκιώδους ιστού (Bodnar *et al.*, 2016).

Κυτταρική γήρανση

Τα κερατινοκύτταρα και οι ινοβλάστες σε χρόνια τραύματα συχνά εμφανίζουν φαινότυπο γήρανσης—μειωμένη μεταναστευτική ικανότητα, ανώμαλη μορφολογία και εξασθενημένη απόκριση σε αυξητικούς παράγοντες. Αυτό εμποδίζει την επαναεπιθηλιοποίηση και την επιδιόρθωση των ιστών (Wall *et al.*, 2008; Wei *et al.*, 2022).

Μόλυνση και σχηματισμός βιοφίλμ

Τα χρόνια τραύματα συχνά αποικίζονται από πολυμικροβιακά βιοφίλμ, τα οποία προστατεύουν τα βακτήρια από την ανοσολογική άμυνα και τα αντιβιοτικά (Ciofu *et al.*, 2022). Τα βιοφίλμ επιδεινώνουν τη φλεγμονή και παρατείνουν τη χρονιότητα του τραύματος (James *et al.*, 2008). Έχει εκτιμηθεί ότι περίπου το 65% των λοιμώξεων που προκαλούνται από μικροοργανισμούς σχετίζονται σημαντικά με τον σχηματισμό βιοφίλμ και τα κύτταρα στο βιοφίλμ εμφανίζουν μεγαλύτερη αντοχή σε αντιμικροβιακούς παράγοντες σε σύγκριση με τα πλαγκτονικά βακτηριακά κύτταρα (Rahim *et al.*, 2017a).

Το βιοφίλμ ή ο βιοϋμένας ορίζεται ως μία δομημένη κοινότητα μικροοργανισμών εγκλωβισμένων σε εξωκυττάρια πολυσακχαριδική μήτρα, η οποία προσκολλάται σε επιφάνειες ιστών ή βιοϋλικών (Ismaila *et al.*, 2025). Ο σχηματισμός του βιοϋμενίου αποτελείται από τρεις φάσεις: αρχική και μη αναστρέψιμη προσκόλληση, δημιουργία βακτηριακών μικροαποικιών και διασπορά ώριμου βιοϋμενίου. Στην τελευταία φάση, τα κύτταρα από το βιοϋμένιο διασπείρονται και μπορούν να προκαλέσουν μικροβιαιμία και γενικευμένη σήψη (Ismaila *et al.*, 2025). Τα βακτηριακά είδη σε μεμονωμένες ή μικτές αποικίες λαμβάνουν πρωτεϊνικά υποστρώματα και θρεπτικά συστατικά από το υγρό υπόστρωμα του τραύματος, το οποίο παρέχει ένα ιδανικό περιβάλλον για την ανάπτυξη βιοφίλμ (Stoodley *et al.*, 2002; Ismaila *et al.*, 2025). Επιπλέον, οι βακτηριακές κοινότητες εντός του βιοϋμενίου είναι ανθεκτικές σε αντιμικροβιακούς παράγοντες, αντισώματα και τοξίνες(Ciofu *et al.*, 2022). Σε αντίθεση με τις ελεύθερες (planktonic) μορφές βακτηρίων, τα βακτήρια μέσα στον βιοϋμένα εμφανίζουν έως και 1000 φορές μεγαλύτερη αντοχή στα αντιβιοτικά και στους ανοσολογικούς μηχανισμούς του ξενιστή (El-Azizi *et al.*, 2005; Ciofu *et al.*, 2022). Αυτό οδηγεί σε εμμένουσα φλεγμονή, ανθεκτικότητα στη θεραπεία και καθυστέρηση της επούλωσης.

Η σύνθεση του βιοφίλμ μπορεί να ποικίλλει ανάλογα με τον τύπο του βακτηριακού στελέχους και τις χρόνιες παθήσεις των τραυμάτων (Stoodley *et al.*, 2002; Ghafoor, Hay and Rehm, 2011).Σε χρόνια έλκη, η παρουσία βιοϋμένων έχει επιβεβαιωθεί με σύγχρονες τεχνικές μικροσκοπίας και μοριακής βιολογίας. Τα βακτήρια σε βιοϋμένα, όπως *Staphylococcus aureus* και *Pseudomonas aeruginosa*, σχηματίζουν πολυμικροβιακές κοινότητες που απελευθερώνουν τοξίνες και ενζυματικούς παράγοντες, προκαλώντας καταστροφή ιστών και εμμένουσα φλεγμονώδη απόκριση (A. Z. Shen *et al.*, 2025a). Το μικροπεριβάλλον του βιοϋμένα χαρακτηρίζεται από υποξία και χαμηλό pH, συνθήκες που περαιτέρω αναστέλλουν τον πολλαπλασιασμό των ινοβλαστών και την αγγειογένεση, βασικές διεργασίες της επούλωσης (A. Z. Shen *et al.*, 2025a), ενώ ταυτόχρονα μειώνουν την κινητικότητα ινοβλαστών και κερατινοκυττάρων πράγμα που οδηγεί σε καθυστέρηση της κοκκιοποίησης και της επανεπιθηλιοποίησης (Jeffery Marano *et al.*, 2015). Επίσης μελέτες in-vivo έχουν δείξει ότι ο σχηματισμός βιοφίλμ αυξάνει τα επίπεδα προφλεγμονωδών κυτοκινών όπως η IL-1β, ο TNF-α και η IL-6, ενώ παράλληλα αναστέλλει σημαντικούς ανοσοτροποποιητές, συμπεριλαμβανομένων των TLR-2, TLR-4, S100A8 και S100A9 (Almuhanna, 2025).

Η κλινική σημασία του βιοϋμένα στα χρόνια έλκη είναι διπλή: αφενός ευθύνεται για την καθυστέρηση της επούλωσης (Dinić *et al.*, 2024) και αφετέρου για την αποτυχία των συνήθων αντιμικροβιακών παρεμβάσεων. Η απομάκρυνση του βιοϋμένα μέσω επιθετικού χειρουργικού ή ενζυμικού καθαρισμού, σε συνδυασμό με την εφαρμογή τοπικών αντιμικροβιακών ουσιών, θεωρείται απαραίτητη στρατηγική στη σύγχρονη αντιμετώπιση (Wolcott, Kennedy and Dowd, 2009). Επιπλέον, νέες θεραπευτικές προσεγγίσεις όπως οι νανοτεχνολογικές εφαρμογές, τα αντιβιοφιλμικά πεπτίδια και τα βιοδραστικά επιθέματα βρίσκονται υπό μελέτη με σκοπό τη βελτίωση της θεραπείας (Percival *et al.*, 2015).

Συμπερασματικά,ο βιοϋμένας αποτελεί σημαντικό εμπόδιο στην επούλωση των χρόνιων ελκών. Η κατανόηση του ρόλου του και η ανάπτυξη στοχευμένων παρεμβάσεων είναι κρίσιμες για την αποτελεσματική θεραπεία και τη μείωση των επιπλοκών.

3.3 Θεραπευτική προσέγγιση χρόνιων ελκών

Τα χρόνια δερματικά έλκη είναι τραύματα που δεν εξελίσσονται μέσω μιας φυσιολογικής και έγκαιρης αλληλουχίας αποκατάστασης, επιμένοντας για περισσότερο από 4 εβδομάδες. Οι πιο συνηθισμένοι τύποι είναι τα αρτηριακά έλκη, τα φλεβικά έλκη, τα έλκη διαβητικού ποδιού και τα έλκη πίεσης (Powers *et al.*, 2016; Bowers and Franco, 2020).Αυτά τα έλκη είναι ιδιαίτερα διαδεδομένα, ιδιαίτερα μεταξύ ηλικιωμένων και διαβητικών πληθυσμών, και σχετίζονται με σημαντική νοσηρότητα, θνησιμότητα και κόστος υγειονομικής περίθαλψης (Powers *et al.*, 2016).

Η αρχική αξιολόγηση απαιτεί λεπτομερές ιστορικό και κλινική εξέταση, με λεπτομερή καταγραφή της θέσης, του μεγέθους, του βάθους, της παροχέτευσης και του τύπου ιστού του τραύματος (Bowers and Franco, 2020; Singer et al., 2017). Για τα έλκη των κάτω άκρων, η αγγειακή αξιολόγηση -συμπεριλαμβανομένης της ψηλάφησης των παλμών των ποδοκνημικών και της μέτρησης του αστραγαλοβραχιόνιου δείκτη- είναι απαραίτητη για τον εντοπισμό της αρτηριακής ανεπάρκειας (Singer et al., 2017). Τα άτυπα ή μη επουλούμενα τραύματα θα πρέπει να υποβάλλονται σε βιοψία για τον αποκλεισμό κακοήθειας ή άλλων ασυνήθιστων αιτιολογιών.

Η γενική διαχείριση ακολουθεί το πλαίσιο TIME:

• Απολύμανση ιστών: Αφαίρεση μη βιώσιμου ιστού για την προαγωγή της επούλωσης, χρησιμοποιώντας χειρουργικές, ενζυματικές ή αυτολυτικές μεθόδους (Armstrong et al., 2023; Singer et al., 2017).

• Έλεγχος λοιμώξεων: Αναγνώριση και διαχείριση τοπικής ή συστηματικής λοίμωξης, με αντιβιοτικά που προορίζονται για κλινικά μολυσμένα τραύματα (Singer et al., 2017).

• Ισορροπία υγρασίας: Διατήρηση ενός βέλτιστου υγρού περιβάλλοντος τραύματος για τη διευκόλυνση της επούλωσης και την πρόληψη της διαβροχής (Singer et al., 2017).

• Αξιολόγηση άκρων: Αξιολόγηση των άκρων τραύματος για υποσκαφή ή μη ανάπτυξη επουλωτικού ιστού (Singer et al., 2017).

Η διαχείριση παρέχεται καλύτερα από μια διεπιστημονική ομάδα για την αντιμετώπιση συννοσηροτήτων και τη βελτιστοποίηση της φροντίδας του τραύματος (American Diabetes Association Professional Practice Committee et al., 2025).

Η εξειδικευμένη αντιμετώπιση του έλκους περιλαμβάνει:

• Αρτηριακά έλκη: Ενδείκνυται άμεση παραπομπή σε αγγειακή χειρουργική επέμβαση για επαναγγείωση.

• Φλεβικά έλκη: Βασικές μέθοδοι είναι η θεραπεία συμπίεσης, η ανύψωση του ποδιού, η άσκηση, η προετοιμασία της κλίνης του τραύματος και ο καθαρισμός. Επικουρικές θεραπείες όπως δερματικό μόσχευμα μερικού πάχους ή κυτταρική θεραπεία λαμβάνονται υπόψη εάν η τυπική θεραπεία αποτύχει μετά από 4-6 εβδομάδες (Rochon *et al.*, 2023).

• Διαβητικά έλκη ποδιού: Η αποφόρτιση με συνοδό χρήση γυψονάρθηκα ή μη αφαιρούμενο περιπατητικό νάρθηκα μέχρι το ύψος του γονάτου είναι η πιο αποτελεσματική μέθοδος. Ο τακτικός καθαρισμός, η διαχείριση λοιμώξεων και η επαναγγείωση για ισχαιμικά τραύματα είναι απαραίτητες. Η υποκείμενη οστεομυελίτιδα πρέπει να αποκλειστεί και να αντιμετωπιστεί εάν υπάρχει (American Diabetes Association Professional Practice Committee et al., 2025).

• Έλκη πίεσης: Συνιστώνται αποφόρτιση με επιφάνειες στήριξης (οι κλίνες με αερόστρωμα ή άλλα αφρώδη υλικά είναι ανώτερες από τις τυπικές κλίνες), συχνή αλλαγή θέσης, υποστήριξη θρέψης και χρήση ειδικών υδροκολλοειδών και αφρωδών επιθεμάτων. Συνιστώνται συμπληρωματικές θεραπείες για ανθεκτικές περιπτώσεις (Qaseem *et al.*, 2015).

Τα επιθέματα και οι τοπικές θεραπείες θα πρέπει να επιλέγονται με βάση τα χαρακτηριστικά του τραύματος:

• Επιθέματα υδροκολλοειδή, αλγινικά, αφρώδη και υδρογέλης χρησιμοποιούνται για τη διατήρηση της υγρασίας και τη διαχείριση των εξιδρωμάτων (Skórkowska-Telichowska *et al.*, 2013; Qaseem *et al.*, 2015).

• Επιθέματα εμποτισμένα με αντισηπτικά(π.χ., που περιέχουν άργυρο) μπορούν να χρησιμοποιηθούν για μολυσμένα τραύματα, αλλά δεν συνιστώνται για μακροχρόνια χρήση λόγω κυτταροτοξικότητας

• Τα ξηρά τραύματα απαιτούν επιθέματα που προάγουν και διατηρούν την υγρασία. Τα εξιδρωματικά τραύματα απαιτούν απορροφητικά επιθέματα.

Προηγμένες και συμπληρωματικές θεραπείες εξετάζονται εάν υπάρχει <50% μείωση στο μέγεθος του τραύματος μετά από 4 εβδομάδες κατάλληλης τυπικής φροντίδας (Rochon *et al.*, 2023). Οι επιλογές περιλαμβάνουν:

• Θεραπεία τραυμάτων με αρνητική πίεση (NPWT ή VAC-therapy): τυχαιοποιημένες μελέτες δείχνουν σημαντική βελτίωση για έλκη διαβητικού ποδιού και μετεγχειρητικά τραύματα (American Diabetes Association Professional Practice Committee et al., 2025).

• Παράγοντες ανάπτυξης (π.χ., αυξητικός παράγοντας που προέρχεται από αιμοπετάλια): Έχει αποδειχθεί ότι βελτιώνουν την επούλωση σε σοβαρά έλκη (Qaseem *et al.*, 2015, American Diabetes Association Professional Practice Committee *et al.*, 2025).

• Βιομηχανικά υποκατάστατα δέρματος και ιστοί ακυτταρικής μήτρας: Χρησιμοποιούνται για χρόνια, επιφανειακά έλκη (American Diabetes Association Professional Practice Committee et al., 2025).

• Τοπική οξυγονοθεραπεία (υπερβαρικό οξυγόνο): Οι μετα-αναλύσεις υποδηλώνουν όφελος σε έλκη διαβητικού ποδιού που δεν ανταποκρίνονται στην τυπική φροντίδα (Nikolić et al., 2026).

• Ηλεκτρική διέγερση, υπερήχοι: αποτελούν καινοτόμες μεθόδους, αν και η αποτελεσματικότητά τους δεν τεκμηριώνεται από μεγάλες πολυκεντρικές μελέτες (American Diabetes Association Professional Practice Committee et al., 2025; Qaseem et al., 2015; Sharma et al., 2025a).

Οι χειρουργικές επεμβάσεις προορίζονται για έλκη που απειλούν τα άκρα, μη επουλωνόμενα έλκη ή σε περιπτώσεις με μεγάλα ιστικά ελλείμματα. Χειρουργικοί καθαρισμοί, τοποθέτηση δερματικού μοσχεύματος και οι επανορθωτικές επεμβάσεις με δερματικούς κρημνούς θα πρέπει να εκτελούνται από έμπειρες ομάδες (Qaseem *et al.*, 2015; American Diabetes Association Professional Practice Committee *et al.*, 2025).

Η μακροχρόνια παρακολούθηση και η εκπαίδευση των ασθενών είναι κρίσιμες για την πρόληψη της υποτροπής και τη βελτιστοποίηση των αποτελεσμάτων, αν και αυτές οι πτυχές δεν εξετάζονται πλήρως στην αναφερόμενη βιβλιογραφία.

Μοντέρνες θεραπευτικές παρεμβάσεις

Οι θεραπευτικές παρεμβάσεις που στοχεύουν στους μοριακούς μηχανισμούς της φυσιολογίας των χρόνιων τραυμάτων έχουν προχωρήσει σημαντικά, με έμφαση σε αντιφλεγμονώδεις παράγοντες, αντιοξειδωτικά, υποκινητές αγγειογένεσης και στρατηγικές κατά του βιοϋμενίου. Οι αντιφλεγμονώδεις θεραπείες περιλαμβάνουν τόσο φαρμακολογικούς παράγοντες όσο και πλατφόρμες που βασίζονται σε βιοϋλικά, σχεδιασμένες να ρυθμίζουν την υπερβολική και παρατεταμένη φλεγμονώδη απόκριση που χαρακτηρίζει τα χρόνια τραύματα. Οι πρόσφατες εξελίξεις στα βιοϋλικά, όπως οι υδρογέλες και τα νανοϊνώδη ικριώματα, επιτρέπουν την εντοπισμένη και παρατεταμένη χορήγηση αντιφλεγμονωδών ενώσεων, συμπεριλαμβανομένων φυσικών βιοδραστικών ουσιών όπως η κουρκουμίνη και οι πολυφαινόλες, οι οποίες δρουν μέσω των οδών NF-κB και Nrf2 για τη μείωση της παραγωγής κυτοκινών και του οξειδωτικού στρες (Xu *et al.*, 2021; J. Shen *et al.*, 2025).

Οι αντιοξειδωτικές στρατηγικές ενσωματώνονται ολοένα και περισσότερο σε επιθέματα τραυμάτων και τοπικά σκευάσματα. Παράγοντες όπως το ασκορβικό οξύ (βιταμίνη C), οι τοκοφερόλες (βιταμίνη E) και οι πολυφαινόλες έχουν δείξει αποτελεσματικότητα στη μείωση των δραστικών ειδών οξυγόνου, προστατεύοντας έτσι τα κυτταρικά συστατικά και υποστηρίζοντας τη λειτουργία των ινοβλαστών και των κερατινοκυττάρων. Αυτά τα αντιοξειδωτικά συχνά χορηγούνται χρησιμοποιώντας προηγμένα βιοϋλικά για την ενίσχυση της σταθερότητας και της βιοδιαθεσιμότητάς τους, με στοιχεία που υποστηρίζουν τον ρόλο τους στην επιτάχυνση της επαναεπιθηλιοποίησης και της αναγέννησης των ιστών (Stanescu *et al.*, 2025; Mylona *et al.*, 2026).

Οι υποκινητές της αγγειογένεσης είναι κρίσιμοι για την αποκατάσταση της αγγειακής παροχής σε χρόνια τραύματα. Οι θεραπείες που βασίζονται σε αυξητικούς παράγοντες, συμπεριλαμβανομένων εκείνων που χρησιμοποιούν τροποποιητές της οδού VEGF και HIF-1α, βρίσκονται υπό διερεύνηση, με ορισμένες να ενσωματώνονται σε υποκατάστατα δέρματος ιστών και επιδέσμους υδρογέλης. Αυτές οι προσεγγίσεις στοχεύουν στην τόνωση της νεοαγγείωσης και στη βελτίωση της οξυγόνωσης, διευκολύνοντας έτσι τον σχηματισμό κοκκιώδους ιστού και την επούλωση του τραύματος (Bonnici *et al.*, 2023; Sharma *et al.*, 2025b).

Οι στρατηγικές κατά του βιοϋμενίου είναι απαραίτητες λόγω της υψηλής συχνότητας εμφάνισης λοιμώξεων που σχετίζονται με το βιοϋμένιο σε χρόνια τραύματα. Οι συμβατικές μέθοδοι, όπως η απολέπιση και τα αντισηπτικά, συμπληρώνονται από νέες προσεγγίσεις, συμπεριλαμβανομένων των αντιμικροβιακών πεπτιδίων (π.χ., LL-37), των αναστολέων ανίχνευσης απαρτίας, της θεραπείας με βακτηριοφάγους και των ενζύμων αποικοδόμησης της μήτρας. Τα επιθέματα με τη νανοτεχνολογία και τα νανοσωματίδια με πεπτίδια έχουν δείξει πολλά υποσχόμενα αποτελέσματα στη διάσπαση των βιοϋμενίων και στη μείωση του μικροβιακού φορτίου, κάτι που είναι κρίσιμο για την επίλυση της επίμονης φλεγμονής και την προαγωγή της επούλωσης (Bielska and Miłowska, 2025; Boleti et al., 2025; A. Z. Shen et al., 2025b).

Τα θρεπτικά συστατικά και τα μικροθρεπτικά συστατικά όπως ο ψευδάργυρος, το σελήνιο, η αργινίνη και τα ωμέγα-3 λιπαρά οξέα αναγνωρίζονται για τον συνεργιστικό τους ρόλο στη ρύθμιση της φλεγμονής, του οξειδωτικού στρες και του κυτταρικού πολλαπλασιασμού. Αυτοί οι παράγοντες ενσωματώνονται όλο και περισσότερο σε σχήματα φροντίδας τραυμάτων, με στοιχεία που υποστηρίζουν τη συμβολή τους στη

βελτίωση των αποτελεσμάτων επούλωσης, αν και η βέλτιστη δοσολογία και οι συνδυασμοί απαιτούν περαιτέρω κλινική επικύρωση (Stanescu *et al.*, 2025; Mylona *et al.*, 2026).

Οι αναδυόμενες θεραπείες περιλαμβάνουν επίσης τοπικά προβιοτικά, συμβιωτικά και μεταβιοτικά, τα οποία ρυθμίζουν το μικροβίωμα του τραύματος, μειώνουν τη φλεγμονή και προάγουν την αγγειογένεση και την αναγέννηση των ιστών. Ενώ τα προκλινικά δεδομένα είναι πολλά υποσχόμενα, απαιτούνται ισχυρές κλινικές δοκιμές για να τεκμηριωθεί η αποτελεσματικότητα και η ασφάλειά τους στη διαχείριση χρόνιων τραυμάτων (Machado *et al.*, 2025)

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 4: ΗΛΕΚΤΡΟΜΑΓΝΗΤΙΚΑ ΚΥΜΑΤΑ

4.1 Ηλεκτρομαγνητική θεωρία και εξισώσεις του Maxwell

Η ηλεκτρομαγνητική θεωρία, περιγράφει και ερμηνεύει τα φαινόμενα της δημιουργίας και διάδοσης των ηλεκτρομαγνητικών κυμάτων, δηλαδή των τοπικών και χρονικών μεταβολών του ηλεκτρικού και μαγνητικού πεδίου και αποτελεί θεμέλιο της σύγχρονης φυσικής και ηλεκτρολογικής μηχανικής, περιγράφοντας τη συμπεριφορά και την αλληλεπίδραση των ηλεκτρικών και μαγνητικών πεδίων. Η ενοποίηση αυτών των δύο πεδίων σε ένα ενιαίο θεωρητικό πλαίσιο επιτεύχθηκε τον 19ο αιώνα από τον James Clerk Maxwell, ο οποίος διατύπωσε ένα σύνολο τεσσάρων θεμελιωδών εξισώσεων, γνωστών σήμερα ως εξισώσεις του Maxwell ("VIII. A dynamical theory of the electromagnetic field," 1865). Οι εξισώσεις αυτές παρέχουν πλήρη περιγραφή της παραγωγής, διάδοσης και αλληλεπίδρασης των ηλεκτρομαγνητικών κυμάτων, θέτοντας τις βάσεις για καινοτόμεςτεχνολογίες.

Ο Maxwell προέβλεψε θεωρητικά την ύπαρξη των ηλεκτρομαγνητικών κυμάτων το 1864, ενοποιώντας τους νόμους των Coulomb, Faraday, Ampère και Gauss και εισάγοντας επιπλέον τον όρο του ρεύματος μετατόπισης ώστε να εξασφαλίσει τη διατήρηση του ηλεκτρικού φορτίου και να καταστήσει τις εξισώσεις συμβατές με το νόμο της συνέχειας (Jackson, 2009).Η ιστορική παρατήρηση του Maxwell ήταν πως αν επιχειρηθεί ο συνδυασμός, ανά δύο, των κλασσικών νόμων του ηλεκτρομαγνητισμού, οι νόμοι αυτοί αποδεικνύονται ασυμβίβαστοι μεταξύ τους. Τη μόνη απόκλιση από τα πειραματικά αποτελέσματα παρουσίασε ο νόμος του Ampere και αυτό γιατί παρότι ο νόμος του Ampere προϋποθέτει την ύπαρξη μαγνητικού πεδίου μόνο σε περιοχές του χώρου όπου οι κλειστές καμπύλες (αμπεριανοί βρόχοι) περικλείουν ρεύμα αγωγιμότητας. Έτσι, απέδειξε ότι η πηγή δημιουργίας του μαγνητικού πεδίου στα σημεία αυτά είναι η χρονική μεταβολή της έντασης του ηλεκτρικού πεδίου και αυτό το εξέφρασε μέσω της υποθετικής ποσότητας του ρεύματος μετατόπισης I_d, που ορίζεται ως:

$$I_d = \varepsilon_0 \frac{d\Phi_E}{dt} = \varepsilon_0 \int_S \frac{\partial \vec{E}}{\partial t} \cdot d\vec{S}$$

Η ηλεκτρομαγνητική θεωρία του Maxwellδιατυπώνεται υπό τη μορφή μιας ομάδας ολοκληρωτικών ή διαφορικών εξισώσεων, οι οποίες λέγονται εξισώσεις του Maxwellκαι παρουσιάζονται στον ακόλουθο πίνακα (Πίνακας 4.1):

ΝΟΜΟΣ	***ΟΛΟΚΛΗΡΩΤΙΚΗ ΜΟΡΦΗ***	***ΔΙΑΦΟΡΙΚΗ ΜΟΡΦΗ***
1ΟΣ ΝΟΜΟΣ GAUSS ΓΙΑ ΗΛΕΚΤΡΙΚΟ ΠΕΔΙΟ	$\oint_s \vec{E} \cdot \overrightarrow{dS} = \frac{q_{encl}}{\varepsilon_o} = \frac{1}{\varepsilon_o}$	$\vec{\nabla} \cdot \vec{E} = \frac{\rho}{\varepsilon_o}$
2ΟΣ ΝΟΜΟΣ GAUSSΓΙΑ ΤΟ ΜΑΓΝΗΤΙΚΟ ΠΕΔΙΟ	$\oint_c \vec{E} \cdot \overrightarrow{dl} = -\frac{d\Phi_B}{dt} = -\int_s \frac{\partial \vec{B}}{\partial t} \cdot d\vec{S}$	$\vec{\nabla} \cdot \vec{E} = -\frac{\partial \vec{B}}{\partial t}$
3ΟΣ ΝΟΜΟΣ FARADAY	$\oint_c \vec{E} \cdot \overrightarrow{dl} = -\frac{d\Phi_B}{dt} = -\int_s \frac{\partial \vec{B}}{\partial t} \cdot d\vec{S}$	$\vec{\nabla} \cdot \vec{E} = -\frac{\partial \vec{B}}{\partial t}$
4ΟΣ ΝΟΜΟΣ AMPERE-MAXWELL	$\oint_c \vec{B} \cdot \overrightarrow{dl} = \mu_o \cdot (I + Id)$ $= \mu_o I + \mu_o \varepsilon_o \int_s \frac{\partial \vec{E}}{\partial t} \cdot d\vec{s}$	$\nabla^{\rightarrow} \cdot B^{\rightarrow} = \mu_o\ (J^{\rightarrow} + (Jd)^{\rightarrow})$ $= \mu_o\ J^{\rightarrow} + \mu_o\ \varepsilon_o\ (\partial E^{\rightarrow})/\partial t$

Πίνακας 4.1: οι εξισώσεις του Maxwell για τον ηλεκτρομαγνητισμό

Η 1η εξίσωση είναι ο νόμος του Gauss για τον ηλεκτρισμό και συσχετίζει το ηλεκτρικό φορτίο με το ηλεκτρικό πεδίο που προκαλείται από αυτό. Επίσης είναι ισοδύναμη με το νόμο του Coulomb.

Η 2η εξίσωση είναι ο νόμος του Gauss για το μαγνητισμό, και ορίζει ότι η συνολική μαγνητική ροή που διέρχεται από μια κλειστή επιφάνεια είναι μηδενική.

Η 3η εξίσωση είναι ο νόμος του Faraday για την επαγωγή, ο οποίος ορίζει ότι οι μεταβολές στη μαγνητική ροή έχουν ως αποτέλεσμα τη δημιουργία ηλεκτρικού πεδίου.

Η 4η εξίσωση είναι ο νόμος του Ampere για το μαγνητισμό με την προσθήκη από τον Maxwell του ρεύματος μετατόπισης με σκοπό την, κατ' αντιστοιχία προς την 3η εξίσωση, απόδειξη της παραγωγής μαγνητικού πεδίου από χρονικά μεταβαλλόμενο ηλεκτρικό πεδίο.

4.2 Θεωρία ηλεκτρομαγνητικών κυμάτων

Ηλεκτρομαγνητικό (Η/Μ) κύμα ονομάζεται μία διαταραχή η οποία διαδίδεται στον χώρο, χωρίς μάλιστα να απαιτείται μέσο διάδοσης και η οποία μεταφέρει ενέργεια ηλεκτρικού και μαγνητικού πεδίου. Ένα ηλεκτρομαγνητικό κύμα δημιουργείται από μία πηγή (πομπός), που ακτινοβολείται από μια κεραία και διαδίδεται στο χώρο με την ταχύτητα του φωτός.

Η ταχύτητα διάδοσης c, η συχνότητα f και το μήκος κύματος λ ενός ηλεκτρομαγνητικού κύματος συνδέονται με τη θεμελιώδη εξίσωση της κυματικής:

$$\lambda = \frac{c}{f}$$

Τα φυσικά μεγέθη που μεταβάλλονται και χαρακτηρίζουν ένα Η/Μ κύμα είναι η ένταση του ηλεκτρικού πεδίου ***E*** και η ένταση του μαγνητικού πεδίου ***B.***

Τα Η/Μ κύματα είναι εγκάρσια, δηλαδή οι συνιστώσες του ηλεκτρικού και μαγνητικού πεδίου είναι κάθετες στην κατεύθυνση διάδοσης του κύματος και κάθετες μεταξύ τους σε οποιαδήποτε σημείο του χώρου όπου διαδίδεται το Η/Μ. Οι ιδιότητες των ηλεκτρομαγνητικών κυμάτων είναι:

- ***Διαδίδονται ευθύγραμμα*** με ταχύτητα ίση με την ταχύτητα του φωτός στο κενό (300,000 km/sec)
- ***Διάθλαση*****,** δηλαδή αλλάζουν κατεύθυνση καθώς περνάν από ένα μέσο σε ένα άλλο με διαφορετική πυκνότητα ή δείκτη διάθλασης, διερχόμενα από υλικά με διαφορετική διηλεκτρική σταθερά.
- ***Ανάκλαση*****,** είναι το φαινόμενο κατά το οποίο ένα κύμα "αναπηδά" όταν συναντά μια επιφάνεια, αντί να τη διαπεράσει. Το κύμα επιστρέφει στο ίδιο μέσο από το οποίο προήλθε, αλλά με διαφορετική κατεύθυνση. σύμφωνα με τους νόμους της ανάκλασης
- ***Συμβολή,*** είναι το φαινόμενο κατά το οποίο δύο ή περισσότερα κύματα συναντώνται στο ίδιο σημείο του χώρου και αλληλεπιδρούν, δημιουργώντας ένα νέο κύμα με διαφορετικό πλάτος από τα αρχικά.
- ***Περίθλαση***, είναι το φαινόμενο κατά το οποίο ένα κύμα εκτρέπεται από την ευθεία πορεία του όταν συναντά εμπόδιο ή περνά μέσα από στενή οπή, με διαστάσεις συγκρίσιμες με το μήκος κύματος του.
- ***Πόλωση,*** είναι το φαινόμενο κατά το οποίο το ηλεκτρικό πεδίο του κύματος ταλαντώνεται σε συγκεκριμένη διεύθυνση ή επίπεδο, αντί να αλλάζει τυχαία κατεύθυνση όπως συμβαίνει στο μη πολωμένο φως.

Η πόλωση παίζει σημαντικό ρόλο στη μετάδοση των Η/Μ κυμάτων και σχετίζεται με το διάνυσμα της έντασης του ηλεκτρικού πεδίου Ε.

Αν η διεύθυνση ταλάντωσης του διανύσματος Ε είναι κατακόρυφη (κάθετη στην επιφάνεια του εδάφους), τότε λέμε ότι το Η/Μ κύμα είναι κατακόρυφα πολωμένο και παράγονται από κατακόρυφες κεραίες.

Αν η διεύθυνση ταλάντωσης του διανύσματος Ε είναι οριζόντια (παράλληλη στην επιφάνεια του εδάφους), τότε λέμε ότι το Η/Μ κύμα είναι οριζόντια πολωμένο τα οποία παράγονται από οριζόντιες κεραίες

Η πόλωση ενός ραδιοκύματος είναι η ίδια κατεύθυνση με το επίπεδο του ηλεκτρικού του πεδίου. Η συχνότητα ενός Η/Μ κύματος αποτελεί ένα σημαντικό χαρακτηριστικό από το οποίο εξαρτώνται οι ιδιότητες και εφαρμογές του, παρακάτω απεικονίζεται το φάσμα των ηλεκτρομαγνητικών κυμάτων (Πίνακας 4.2)

Ζώνες του ηλεκτρομαγνητικού φάσματος			
Περιοχή του φάσματος	**Μήκος κύματος(m)**	**Συχνότητες (Hz)**	**Ενέργεια φωτονίων(eV)**
Ραδιοκύματα	$1\text{-}10^{8}$	$0\text{-}3\times10^{8}$	$0 - 1{,}24\times10^{-6}$
Μικροκύματα	$1\text{- }10^{-3}$	$3\times10^{8} - 3\times10^{11}$	$1{,}24\times10^{-6} - 1{,}24\times10^{-3}$
Υπέρυθρη ακτινοβολία	$10^{-3} – 740\times10^{-9}$	$3\times10^{11} – 4\times10^{14}$	$1{,}24\ 10^{-3} - 1{,}6$
Ορατό φως	$740\times10^{-9} – 380\times10^{-9}$	$4\times10^{14}\text{-}8\times10^{14}$	1,6 - 3,2
Υπεριώδης ακτινοβολία	$380\times10^{-9} –10^{-8}$	$8\times10^{14} - 3\times10^{16}$	3,2 - 124
Ακτίνες Χ	$10^{-8} –10^{-11}$	$3\times10^{17} - 3\times10^{19}$	$124 – 124\times10^{3}$
Ακτίνες γ	$10^{-11} –10^{-12}$	$3\times10^{19} - 3\times10^{20}$	$124\times10^{3} - 1{,}24\times10^{6}$
Κοσμικές ακτίνες	10^{-12}-	3×10^{20} -	$1{,}24\times10^{6}$ -

Πίνακας 4.2:Το φάσμα των ηλεκτρομαγνητικών κυμάτων

4.2.1 Ραδιοκύματα

Τα ραδιοκύματα είναι ηλεκτρομαγνητικά κύματα σε περιοχές συχνοτήτων από περίπου 3 kHzμέχρι 300 GHz ενώ το μήκος κύματος των ραδιοκυμάτων είναι μεταξύ των τιμών 1mm και 10Km.

Τα ραδιοκύματα είναι ηλεκτρομαγνητικά πεδία που:

1. μπορούν να ακτινοβολούνται προς όλες τις κατευθύνσεις για ευρεία εκπομπή
2. μπορούν να ακτινοβολούνται προς συγκεκριμένες περιοχές του χώρου όπου ενδεχομένως βρίσκεται ένας μετακινούμενος δέκτης
3. μπορούν να ακτινοβολούνται προς σταθερούς δέκτες που βρίσκονται σε γνωστές θέσεις.

Όταν συναντούν αντικείμενα κατά τη διάδοσή τους, τα ραδιοκύματα μπορεί να ανακλαστούν, να απορροφηθούν ή να διαπεράσουν το αντικείμενο μερικώς ή ολικώς κατά τρόπο αντίστοιχο με ότι συμβαίνει με το φως.

Τα ραδιοκύματα ανήκουν στην κατηγορία των μη ιοντιζουσών ακτινοβολιών καθώς δεν είναι ικανά να διασπάσουν χημικούς δεσμούς ή να αποσπάσουν ηλεκτρόνια από άτομα, προκαλώντας ιοντισμό της ύλης όπως η ραδιενέργεια (ακτίνες Χ , ακτίνες γ). Σε αντίθεση με τον ιοντισμό, που είναι επικίνδυνος γιατί μπορεί να οδηγήσει σε αλλοιώσεις του γενετικού υλικού και να προκαλέσει επιβλαβή αποτελέσματα στην υγεία (όπως ο καρκίνος), η κυριότερη βιολογική επίδραση των ραδιοκυμάτων υπό ορισμένες συνθήκες είναι η αύξηση της θερμοκρασίας των ιστών που εκτίθενται σε αυτά.

Γνωρίζοντας ότι για την δημιουργία επαναλαμβανόμενων παλμών μικρής διάρκειας σε δοκίμιο δημιουργείται μαγνητικό πεδίο από την ένταση και ηλεκτρικό πεδίο από την υψηλή τάση έτσι εκμεταλλευόμενοι τις ιδιότητες της ακτινοβολίας H/M φάσματος μπορούμε να κατασκευάσουμε γεννήτρια RF συχνοτήτων.

4.3 Ραδιοσυχνοτικά Κύματα και οι Βιοϊατρικές Εφαρμογές τους

Τα κύματα ραδιοσυχνοτήτων (RF) αποτελούν μέρος του μη ιονίζοντος ηλεκτρομαγνητικού φάσματος, που βρίσκεται μεταξύ εξαιρετικά χαμηλών συχνοτήτων και μικροκυμάτων, εκτεινόμενα από 3 kHz έως 300 GHz (Ulaby and Ravaioli, 2023). Η ικανότητά τους να προκαλούν ελεγχόμενες θερμικές και μη θερμικές βιολογικές επιδράσεις έχει μεταμορφώσει τη διαγνωστική και θεραπευτική ιατρική (Foster and Repacholi, 2004). Τα συστήματα που βασίζονται σε RF χρησιμοποιούνται πλέον στην ογκολογία, τη δερματολογία, την καρδιολογία, τη νευρολογία και την ελάχιστα επεμβατική χειρουργική, ενώ η αναδυόμενη έρευνα διερευνά την ενσωμάτωσή τους με τη νανοτεχνολογία και τις πλατφόρμες βιοαισθητήρα.

Η κατανόηση της μοριακής βάσης των αλληλεπιδράσεων RF-ιστού είναι κρίσιμη για τις βιοϊατρικές εφαρμογές.

4.3.1 Θερμικές Επιπτώσεις

Η διηλεκτρική θέρμανση που προκαλείται από RF συμβαίνει όταν πολικά μόρια (π.χ. νερό) ταλαντώνονται με εναλλασσόμενα πεδία, μετατρέποντας την ηλεκτρομαγνητική ενέργεια σε θερμότητα(Foster and Schwan, 1989). Η ελεγχόμενη θέρμανση των ιστών στηρίζει:

• Μετουσίωση πρωτεϊνών (≥60 °C)

• Συρρίκνωση κολλαγόνου και νεοκολλαγένεση (42–55 °C)

• Εκτομή ιστών (>90 °C)(Chu and Dupuy, 2014)

4.3.2 Μη Θερμικές Επιπτώσεις

Οι εκθέσεις σε RF χαμηλής έντασης (<1 W/cm²) μπορούν να προκαλέσουν υποθερμική βιολογική διαμόρφωση (Wust *et al.*, 2020):

• Πύλη Ιοντικών Καναλιών: Τα πεδία RF επηρεάζουν τα κανάλια Na^+ και Ca^{2+} που ελέγχονται από τάση, μεταβάλλοντας τη διεγερσιμότητα(Pall, 2013).

• Διαμόρφωση Δυναμικού Κυτταρικής Μεμβράνης: Τα μικρορεύματα που προκαλούνται από RF αναδιοργανώνουν τις λιπιδική διπλοστοιβάδα και τη συσσωμάτωση υποδοχέων (Miyakoshi, 2013).

• Αλλαγές στην έκφραση γονιδίων: Ορισμένες συχνότητες τροποποιούν την σηματοδότηση κυτοκινών (π.χ., IL-6, TNF-α) και προάγουν την επούλωση τραυμάτων (Hernández-Bule *et al.*, 2023; Toledano-Macías *et al.*, 2024).

• Αντιδραστικές ρίζες οξυγόνου (ROS): Η ελεγχόμενη παραγωγή ROS επηρεάζει την αγγειογένεση και τις κυτταρικές αντιδράσεις στο στρες (Kazemi *et al.*, 2015).

4.3.3 Επαγωγή πρωτεΐνης θερμικού σοκ (HSP)

Η μέτρια έκθεση σε ραδιοσυχνότητες (RF) ενεργοποιεί την ανοδική ρύθμιση των HSP70 και HSP90, ενισχύοντας τους μηχανισμούς αναδίπλωσης πρωτεϊνών και κυτταρικής επιδιόρθωσης, που σχετίζονται τόσο με την αφαίρεση όγκων όσο και με την αναζωογόνηση του δέρματος (Byun *et al.*, 2024).

4.3.4 Βιοϊατρικές Εφαρμογές των Κυμάτων RF

Εκτομή RF (RFA)

Η RFA χρησιμοποιεί ρεύματα υψηλής συχνότητας για την θερμική καταστροφή στοχευμένων ιστών. Βασικές εφαρμογές:

• ***Ογκολογία*****:** Αφαίρεση όγκων ήπατος, νεφρού, πνεύμονα και θυρεοειδούς. Η πηκτική νέκρωση που προκαλείται από RF επιτυγχάνει πλήρη βλάβη σε όγκους <3 cm (Ahmed et al., 2011).

• ***Καρδιολογία*****:** Θεραπεία της κολπικής μαρμαρυγής μέσω καταστροφής με καθετήρα έκτοπων εστιών αγωγιμότητας (Calkins *et al.*, 2017).

• ***Ιατρική Πόνου*****:** Η παλμική RF ρυθμίζει την αγωγιμότητα των νεύρων ελαχιστοποιώντας παράλληλα τη θερμική βλάβη (Hata *et al.*, 2011; Li *et al.*, 2011).

Μηχανισμός: Τα εντοπισμένα ρεύματα RF αυξάνουν τη θερμοκρασία του ιστού στους 60–100 °C, προκαλώντας μετουσίωση πρωτεϊνών, μικροαγγειακή απόφραξη και μη αναστρέψιμο κυτταρικό θάνατο (Hong and Georgiades, 2010).

Δερματολογία και Αισθητική Ιατρική

Η ενέργεια RF παρέχει ελεγχόμενη δερματική θέρμανση για την τόνωση της αναδιαμόρφωσης κολλαγόνου, της σύνθεσης ελαστίνης και της αγγειογένεσης (Byun et al., 2024; Elsaie et al., 2010). Ο κλασματικός μικροβελονισμός RF συνδυάζει μηχανικό μικροτραυματισμό με χορήγηση RF, ενισχύοντας τη νεοκολλαγένεση και βελτιώνοντας τις ουλές ακμής και τη χαλάρωση του δέρματος (Nilforoushzadeh *et al.*, 2023).

Νευρωνική Διαμόρφωση

Η παλμική ραδιοσυχνότητα (PRF) σε χαμηλότερα επίπεδα επηρεάζει τη νευρωνική διεγερσιμότητα χωρίς να προκαλεί θερμική καταστροφή (Cohen and Soriano, 2018). Αναδυόμενες χρήσεις περιλαμβάνουν:

• Χρόνιο νευροπαθητικό πόνο (Cohen and Soriano, 2018)

• Διαμόρφωση γαγγλίων ραχιαίας ρίζας

• Πειραματική νευροδιαμόρφωση στην επιληψία και την κατάθλιψη (Pérez-Suárez *et al.*, 2017).

Χορήγηση φαρμάκων με ενίσχυση ραδιοσυχνοτήτων και νανοϊατρική

Τα νανοσωματίδια και οι φορείς υδρογέλης που ανταποκρίνονται σε ραδιοσυχνότητες επιτρέπουν την απελευθέρωση φαρμάκων κατ' απαίτηση σε στοχευμένες θέσεις (Rejinold et al., 2015). Τα νανοσωματίδια χρυσού και οξειδίου του σιδήρου απορροφούν ενέργεια ραδιοσυχνοτήτων, θερμαίνοντας τοπικά για να προκαλέσουν ελεγχόμενη θεραπευτική απελευθέρωση και συνεργιστική υπερθερμία όγκου (Rejinold et al., 2015).

Υπερθερμία καρκίνου

Η υπερθερμία ραδιοσυχνοτήτων θερμαίνει επιλεκτικά τον ιστό του όγκου στους 42–45 °C, ενισχύοντας τη χημειοευαισθησία και την ακτινοευαισθησία (Wust et al., 2002). Τα νανοσωματίδια που καθοδηγούνται από ραδιοσυχνότητες μπορούν να συγκεντρώσουν τα θερμαντικά αποτελέσματα εντός των όγκων, ελαχιστοποιώντας την καταστροφή υγιών κυττάρων (Cifuentes-Rius *et al.*, 2017).

4.4 Παλμική ισχύς ραδιοκυμάτων

Ο όρος παλμική ισχύς (pulsed power) περιγράφει την παραγωγή βραχέων ηλεκτρικών παλμών που σχετίζονται με πολύ υψηλή ηλεκτρική ισχύ και επομένως με πλάτη υψηλής τάσης και ρεύματος.

Ένας παλμός χαρακτηρίζεται από το σχήμα του, τους χρόνους ανόδου και καθόδου διάρκεια του παλμού (duration time). Η συνολική διάρκεια των παλμών υψηλής ισχύος που εξετάζονται εδώ είναι της τάξεως των μερικών νανοδευτερολέπτων(ns).

Τα κυκλώματα παλμικής ισχύος βρίσκουν σημαντικές εφαρμογές σε πολλές νέες τεχνολογίες και στρατιωτικά προγράμματα, όπως για παράδειγμα ραντάρ, γεννήτριες μικροκυμάτων υψηλής ισχύος και ηλεκτρομαγνητικοί εκτοξευτές ("railguns"). Επίσης χρησιμοποιούνται και σε άλλες εφαρμογές όπως σε παλμικά συστήματα λέιζερ υψηλής ισχύος (pulsedhighpowerlasersystems), τα οποία χρησιμοποιούνται στην κατασκευή αυτοκινήτων, ή δημιουργία κρουστικών κυμάτων για τη λιθοτριψία των νεφρών

Όσον αφορά τις ιατρικές και βιολογικές εφαρμογές πρόσφατα, τόσο η μοντελοποίηση βιολογικών κυττάρων όσο και οι πειραματικές παρατηρήσεις έδειξαν ότι η έκθεση των κυττάρων των θηλαστικών σε παλμούς υψηλών τάσης και εξαιρετικά σύντομης διάρκειας (μερικά έως δεκάδες νανοδευτερόλεπτα), μπορεί να ενεργοποιήσει προγραμματισμένο θάνατο στα κύτταρα (απόπτωση,) μέσω ενδοκυτταρικών επιδράσεων που είναι διακριτές από την κλασική ηλεκτροφορητική επίδραση. Μια τέτοια διαδικασία, που αναφέρεται ως νανο-ηλεκτροδιάτρηση (nano-electroperturbation), παρουσιάζει ενδιαφέρον για δυνητική πιθανότητα θεραπείας κατά του καρκίνου

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 5: ΗΛΕΚΤΡΟΔΙΑΤΡΗΣΗ ΚΥΤΤΑΡΙΚΗΣ ΜΕΜΒΡΑΝΗΣ

Θεραπευτικά πρωτόκολλα για αναστρέψιμα και μη αναστρέψιμα σχήματα

Η ηλεκτροδιάτρηση αναφέρεται στην δημιουργία πόρων νανοκλίμακας στη λιπιδική διπλοστιβάδα των κυτταρικών μεμβρανών μέσω ενός εφαρμοζόμενου ηλεκτρικού πεδίου. Ανάλογα με την ένταση του ηλεκτρικού πεδίου, τη περίοδο του παλμού, την συχνότητα επανάληψης και άλλες παραμέτρους, η ηλεκτροδιάτρηση μπορεί να είναι αναστρέψιμη (Reversible Electroporation, RE) , επιτρέποντας στα κύτταρα να επιβιώσουν μετά την επανασφράγιση της μεμβράνης, ή μη αναστρέψιμη (Irreversable electroporation, IRE), με αποτέλεσμα μόνιμη διαπερατότητα και κυτταρικό θάνατο. Η αναστρέψιμη ηλεκτροδιάτρηση (RE) έχει αξιοποιηθεί για μοριακή και γονιδιακή χορήγηση, ενώ η μη αναστρέψιμη ηλεκτροδιάτρηση (IRE) έχει αξιοποιηθεί σε μη θερμική καταστροφή ιστών, ιδίως στην ογκολογία και στις επεμβατικές διαδικασίες. Η ηλεκτροδιάτρηση παρακάμπτει τους θερμικούς μηχανισμούς, διατηρώντας την εξωκυτταρική μήτρα και τις ζωτικές δομές, διευκολύνοντας παράλληλα την ακριβή παρέμβαση.

5.1 Μηχανιστική Βάση της Ηλεκτροδιάτρησης

5.1.1 Δυναμική Σχηματισμού Πόρων

Η λιπιδική διπλοστιβάδα εμφανίζει ανά τακτά διαστήματα υδρόφοβους πόρους. Τα εξωτερικά ηλεκτρικά πεδία μειώνουν την ενέργεια ενεργοποίησης που απαιτείται για την επέκταση αυτών σε υδρόφιλους πόρους, μια διαδικασία που διέπεται από την τάση της άκρης της μεμβράνης και την ενέργεια δημιουργίας πόρων (Aycock and Davalos, 2019; Davalos et al., 2005). Οι προσομοιώσεις υποδηλώνουν ότι οι υδρόφοβοι πόροι (<1 nm) σχηματίζονται γρήγορα και επανασφραγίζονται, ενώ οι υδρόφιλοι πόροι (1-10 nm) διαρκούν από λεπτά έως ώρες ανάλογα με τις συνθήκες (Goldberg et al., 2018). Το διαμεμβρανικό δυναμικό (TMP) που προκαλείται από ένα εξωτερικό ηλεκτρικό πεδίο ΔΨm μπορεί να εκτιμηθεί χρησιμοποιώντας μοντέλα όπως η εξίσωση Schwan (εξίσωση 1), επιτρέποντας προβλέψεις της πιθανότητας δημιουργίας πόρων.

$$\Delta\Psi = 1{,}5 \cdot R \cdot E \cdot \cos\theta \quad (1)$$

Όπου ΔΨ: Το επαγόμενο διαμεμβρανικό δυναμικό (σε Volts),

1,5**:** Ένας γεωμετρικός συντελεστής που προκύπτει από τη σφαιρική δομή του κυττάρου,

R: η ακτίνα του κυττάρου,

E: η ένταση του εξωτερικού ηλεκτρικού πεδίου και

$\cos\theta$: η γωνία ως προς τη διεύθυνση του ηλεκτρικού πεδίου. Η μέγιστη τιμή εμφανίζεται στους πόλους του κυττάρου (όπου δηλαδή θ=0ͦ ή θ=180ͦ)

5.1.2 Αναστρέψιμη Ηλεκτροδιάτρηση (RE)

Η RE συνήθως προκύπτει όταν η διαμεμβρανική διαφορά δυναμικού υπερβαίνει ένα όριο (~0,5 V συνήθως) προκαλώντας παροδική διαπερατότητα που επιτρέπει τη μοριακή μεταφορά, ακολουθούμενη από επιδιόρθωση και επανασφράγιση της μεμβράνης (School of Biomedical Engineering and Sciences, Virginia Tech-Wake Forest University, Blacksburg, VA, USA *et al.*, 2017a; Potočnik, Miklavčič and Maček Lebar,

2019). Η RE χρησιμοποιείται κλινικά στην ηλεκτροχημειοθεραπεία, η οποία συνδυάζει την RE με κυτταροτοξικούς παράγοντες (π.χ., μπλεομυκίνη, σισπλατίνη) για την ενίσχυση της ενδοκυτταρικής πρόσληψης και της κυτταροτοξικότητας των όγκων - με ποσοστά απόκρισης περίπου 80% για τους δερματικούς όγκους (Hampton, 2011). Η RE είναι επίσης θεμελιώδης στην ηλεκτρομεταφορά γονιδίων, στον εμβολιασμό με DNA και στα συστήματα χορήγησης φαρμάκων (Au et al., 2011). Για την εφαρμογή των παραπάνω μεθόδων έχουν διαμορφωθεί μαθηματικά μοντέλα που βελτιστοποιούν τις παραμέτρους παλμού για τη χορήγηση φαρμάκων, ελαχιστοποιώντας παράλληλα τη θερμική βλάβη (Mondal and Dalal, 2023).

5.1.3 Μη αναστρέψιμη ηλεκτροδιάτρηση (IRE)

5.1.3.1 *Βιοφυσικοί μηχανισμοί*

Η IRE προκύπτει όταν το διαμεμβρανικό δυναμικό υπερβαίνει ένα κρίσιμο όριο (≥ 1,0 V)δημιουργώντας εκτεταμένες διαταραχέςτης κυτταρικής μεμβράνης, κρίσιμες για τη διατήρηση της κυτταρικής ομοιόστασης (School of Biomedical Engineering and Sciences, Virginia Tech-Wake Forest University, Blacksburg, VA, USA et al., 2017b). Σε αντίθεση με τις μεθόδους θερμικής εκτομής, η IRE προκαλεί κυτταρικό θάνατο μέσω απόπτωσης ή νέκρωσης χωρίς σημαντική θέρμανση, διατηρώντας την εξωκυτταρική δομή και κρίσιμες δομές όπως τα αιμοφόρα αγγεία και τα νεύρα (Batista Napotnik et al., 2021; Beebe et al., 2003; Yano et al., 2011). Οι παράμετροι του ηλεκτρικού πεδίου - ισχύς, διάρκεια παλμού, αριθμός - είναι καθοριστικές: Η IRE συνήθως χρησιμοποιεί πεδία άνω των 1000 V/cm, εκατοντάδες παλμούς μικροδευτερολέπτων (Batista Napotnik et al., 2021).

5.1.3.2 *Κλινικές και προκλινικές εφαρμογές*

Η IRE έχει κερδίσει έδαφος ως μη θερμική τεχνική εκτομής ιστών στη θεραπεία όγκων, όπως καρκίνοι του παγκρέατος, του ήπατος, των νεφρών και του προστάτη (Liu et al., 2024; Spiliopoulos et al., 2023; Yun et al., 2023). Το σύστημα NanoKnife®, που διατίθεται στο εμπόριο από το 2009, αποτελεί παράδειγμα κλινικής εφαρμογής της μεθόδου (Xiang *et al.*, 2025). Τα πλεονεκτήματα περιλαμβάνουν σαφώς καθορισμένες ζώνες καταστροφής καρκινικών κυττάρων και ελάχιστη νοσηρότητα από καταστροφή των πέριξ υγιών ιστών. Η IRE προστατεύει το αγγειακό σύστημα και την εξωκυττάρια ουσία, καθιστώντας το κατάλληλο για ανατομικά πολύπλοκες ή κρίσιμες περιοχές (Amin *et al.*, 2024), γεγονός που την καθιστά ως μέθοδο εκλογής περιλαμβάνουν καυτηριασμό για τη θεραπεία αρρυθμιών, όπου η ακρίβεια του IRE μπορεί να μειώσει τους κινδύνους θερμικής βλάβης (Amin *et al.*, 2024). Η IRE δείχνει επίσης πολλά υποσχόμενη στην ανοσοτροποποίηση, ενδεχομένως αυξάνοντας την αποτελεσματικότητα της ανοσοθεραπείας (Geboers *et al.*, 2025).Στον Πίνακας 5.1 παρουσιάζονται συνοπτικά οι διαφορές μεταξύ αναστρέψιμης και μη-αναστρέψιμης ηλεκτροδιάτρησης.

Χαρακτηριστικό	Αναστρέψιμη Ηλεκτροδιάτρηση (RE)	Μη αναστρέψιμη Ηλεκτροδιάτρηση (IRE)
TMP δυναμικο	~0.5 V	≳ 1.0 V
Παράμετροι παλμού	Ασθενή πεδία (≈300 V/cm–1.5 kV/cm), λίγοι παλμοί	Ισχυρά πεδία (≳1000 V/cm), πολυάριθμοι παλμοί (εύρος μs) (Stehling *et al.*, 2016)
αποτέλεσμα	Παροδική διαπερατότητα· επιβίωση και επανασφράγιση κυττάρων (Potočnik et al., 2019)	Μόνιμη διαπερατότητα· κυτταρικός θάνατος μέσω απόπτωσης/νέκρωσης (Beebe*et al.*, 2003)
Μηχανισμός	Προσωρινός σχηματισμός και επούλωση νανοπόρων(Yarmush et al., 2014)	Μόνιμες βλάβες κυτταρικής μεμβράνης σε επίπεδο νανοκλίμακας(Lee et al., 2012)
Κλινική Εφαρμογή	Ηλεκτροχημειοθεραπεία, μεταφορά γονιδίων, μοριακή χορήγηση (Miklavčič *et al.*, 2014)	Μη θερμική καταστροφή (π.χ., όγκοι, καρδιακός ιστός) (Liu*et al.*, 2024)
Ιστική εκλεκτικότητα	Λιγότερο κρίσιμη· κυρίως επικεντρωμένη στην χορήγηση	Υψηλή επιλεκτικότητα· διατηρεί τις εξωκυτταρικές και αγγειακές δομές(Amin *et al.*, 2024)

Πίνακας 5.1: Διαφορές αναστρέψιμης και μη αναστρέψιμης ηλεκτροδιάτρησης

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 6: ΜΗ ΑΝΑΣΤΡΕΨΙΜΗ ΗΛΕΚΤΡΟΔΙΑΤΡΗΣΗ (ΗΛΕΚΤΡΟΠΟΡΗΣΗ) ΒΑΚΤΗΡΙΑΚΩΝ ΚΥΤΤΑΡΩΝ

Μηχανισμοί, πρωτόκολλα και εφαρμογές

6.1 Εισαγωγή

Αυτό το κεφάλαιο εξετάζει τους θεμελιώδεις μηχανισμούς της μη αναστρέψιμης ηλεκτροδιάτρησης βακτηριακών κυττάρων, συμπεριλαμβανομένης της βιοφυσικής της μεμβράνης, των ηλεκτρικών παραμέτρων που διέπουν τον σχηματισμό πόρων, των δομικών διαφορών μεταξύ Gram-θετικών και Gram-αρνητικών βακτηρίων και των κυτταρικών αποκρίσεων που οδηγούν σε μη αναστρέψιμη βλάβη και θάνατο.

Η έκθεση βιολογικών κυττάρων σε επαρκώς ισχυρά ηλεκτρικά πεδία οδηγεί σε αύξηση της διαπερατότητας της μεμβράνης (Kotnik and Miklavčič, 2006) και έχει ως αποτέλεσμα μόνιμη βλάβη της μεμβράνης, απώλεια ομοιόστασης και τελικά κυτταρικό θάνατο με μια διαδικασία που περιγράφεται ως μη αναστρέψιμη ηλεκτροδιάτρηση (IRE).

Στα βακτηριακά συστήματα, η μη αναστρέψιμη ηλεκτροδιάτρηση έχει τραβήξει αυξανόμενη προσοχή ως μια μη θερμική στρατηγική απενεργοποίησης μικροβίων με εφαρμογές στη συντήρηση τροφίμων, την επεξεργασία νερού, την αποστείρωση και την αντιμικροβιακή έρευνα (Zand *et al.*, 2021). Σε αντίθεση με τα χημικά απολυμαντικά ή τις θερμικές επεξεργασίες, η IRE μπορεί να απενεργοποιήσει τα βακτήρια γρήγορα, ελαχιστοποιώντας παράλληλα τον σχηματισμό τοξικών παραπροϊόντων και διατηρώντας τις φυσικοχημικές ιδιότητες των επεξεργασμένων υλικών.

6.2 Μηχανισμοί Μη Αντιστρεπτής Ηλεκτροδιάτρησης

6.2.1 Σχηματισμός και Διαστολή Πόρων

Όπως έχει ήδη αναφερθείη ηλεκτροδιάτρηση ξεκινά με τον σχηματισμό υδρόφιλων πόρων εντός της λιπιδικής διπλοστιβάδας. Μοριακές δυναμικές προσομοιώσεις και πειραματικά στοιχεία υποδηλώνουν ότι η δημιουργία πόρων περιλαμβάνει τον αναπροσανατολισμό των λιπιδικών κεφαλών υπό υψηλή ηλεκτρική τάση, δημιουργώντας ελαττώματα γεμάτα με νερό. Στην μη αντιστρεπτή ηλεκτροδιάτρηση, οι πόροι είτε αναπτύσσονται πέρα από μια κρίσιμη ακτίνα είτε σχηματίζονται σε τόσο υψηλή πυκνότητα που η ακεραιότητα της μεμβράνης δεν μπορεί να αποκατασταθεί.

Η μετάβαση από την αναστρέψιμη στην μη αντιστρεπτή ηλεκτροδιάτρηση επηρεάζεται τόσο από την ένταση του ηλεκτρικού πεδίου όσο και από τη χρονική διάρκεια του παλμού και την συχνότητα εφαρμογής τους. Οι σύντομοι παλμοί υψηλής έντασης μπορούν να προκαλέσουν εκτεταμένο σχηματισμό πόρων, ενώ οι μεγαλύτεροι σε χρονική διάρκεια παλμοί προάγουν τη διαστολή και τη συγχώνευση πόρων, οδηγώντας τελικά σε καταστροφική αστοχία της μεμβράνης.

6.2.2 Απώλεια Ακεραιότητας και Ομοιόστασης της Μεμβράνης

Η μόνιμη διαπερατότητα της κυτταροπλασματικής μεμβράνης έχει ως αποτέλεσμα την ανεξέλεγκτη διαρροή ενδοκυτταρικών συστατικών, συμπεριλαμβανομένων ιόντων, μεταβολιτών, νουκλεοτιδίων και

πρωτεϊνών. Η διασπορά των ιόντων, ιδιαίτερα της πρωτονιοκινητικής δύναμης, διαταράσσει τη σύνθεση ATP και βασικές μεταβολικές διεργασίες.

Στα βακτηριακά κύτταρα, η μη αναστρέψιμη ηλεκτροδιάτρηση θέτει επίσης σε κίνδυνο λειτουργίες που σχετίζονται με τη μεμβράνη, όπως η μεταφορά θρεπτικών συστατικών, η βιοσύνθεση του κυτταρικού τοιχώματος και η μεταγωγή σήματος. Η αδυναμία αποκατάστασης της οσμωτικής ισορροπίας συχνά οδηγεί σε οίδημα, λύση ή μεταβολική κατάρρευση των κυττάρων.

6.2.3 Δευτερογενής Κυτταρική Βλάβη

Πέρα από τη διαταραχή της μεμβράνης, η μη αναστρέψιμη ηλεκτροδιάτρηση μπορεί να προκαλέσει δευτερογενή βλάβη στις ενδοκυτταρικές δομές (Kotnik and Miklavčič, 2006). Η έκθεση σε ηλεκτρικό πεδίο έχει συσχετιστεί με μετουσίωση πρωτεϊνών, απενεργοποίηση ενζύμων και βλάβη στο DNA, αν και αυτές οι επιδράσεις θεωρούνται γενικά δευτερογενείς της βλάβης της μεμβράνης. Οι αντιδραστικές ρίζες οξυγόνου που παράγονται κατά την έκθεση σε παλμικό ηλεκτρικό πεδίο μπορεί να συμβάλλουν περαιτέρω στο οξειδωτικό στρες και τον κυτταρικό θάνατο.

6.3 Ηλεκτρικές Παράμετροι που Επηρεάζουν την Βακτηριακή IRE

6.3.1 Ένταση Ηλεκτρικού Πεδίου

Η ένταση του ηλεκτρικού πεδίου των ραδιοκυματικών παλμώνείναι ο κυρίαρχος παράγοντας που διέπει την μη αναστρέψιμη ηλεκτροδιάτρηση (Álvarez, 2003). Οι τιμές κατωφλίου για την βακτηριακή απενεργοποίηση κυμαίνονται συνήθως από 5 έως 30 kV/cm, ανάλογα με το είδος, τη φάση ανάπτυξης και την αγωγιμότητα του μέσου (Haberl Meglič et al., 2024). Τα Gram-θετικά βακτήρια γενικά απαιτούν υψηλότερες εντάσεις πεδίου λόγω της προστατευτικής επίδρασης του παχύρρευστου στρώματος πεπτιδογλυκάνης (Pillet et al., 2016a).

6.3.2 Πλάτος παλμών και Αριθμός Παλμών

Το πλάτος των παλμών επηρεάζει τη διάρκεια ζωής των βακτηρίων. Οι παλμοί μικροδευτερολέπτων(μs) και χιλιοστών του δευτερολέπτου(ms) χρησιμοποιούνται συνήθως σε μελέτες βακτηριακήςηλεκτροδιάτρησης, με μεγαλύτερες διάρκειες να αυξάνουν την πιθανότητα μη αναστρέψιμης βλάβης(Haberl Meglič et al., 2024). Παλμοί με πλάτος σε επίπεδο ns (280-600ns) έχουν εφαρμοστεί κυρίως σε παστερίωση υγρών , αποστείρωση τροφίμων (Poudel et al., 2021a). Εφαρμογή παλμών με υψηλή συχνότητα επανάληψης μπορούν να έχουν αθροιστικές επιδράσεις, οδηγώντας σε προοδευτική αποσταθεροποίηση της μεμβράνης ακόμη και σε χαμηλότερες εντάσεις πεδίου (Álvarez, 2003; Pillet et al., 2016a).

6.3.3 Αγωγιμότητα Μέσου και Θερμοκρασία

Η αγωγιμότητα του μέσου επηρεάζει την απαγωγή ενέργειας και την τοπική θέρμανση Joule. Ενώ η μη αναστρέψιμη ηλεκτροπόρηση θεωρείται μη θερμική διεργασία, μπορεί να συμβεί υπερβολική θέρμανση σε υψηλές αγωγιμότητες, περιπλέκοντας την ερμηνεία των μηχανισμών απενεργοποίησης. Επομένως, ο προσεκτικός έλεγχος της θερμοκρασίας είναι απαραίτητος για τη διάκριση της IRE από τη θερμική θανάτωση (Rubinsky et al., 2016; Shafiee et al., 2009).

6.4 Διαφορές στην Βακτηριακή Ευαισθησία στην Μη Αναστρέψιμη Ηλεκτροδιάτρηση(IRE)

Η ευαισθησία των βακτηρίων στην μη αναστρέψιμη ηλεκτροδιάτρηση ποικίλλει σημαντικά μεταξύ των ειδών και διέπεται από δομικές, φυσιολογικές και ηλεκτροχημικές διαφορές στο βακτηριακό κυτταρικό περίβλημα. Οι διακυμάνσεις στην αρχιτεκτονική του κυτταρικού τοιχώματος, τη σύνθεση της μεμβράνης, τη μορφολογία και τη φυσιολογική κατάσταση επηρεάζουν έντονα την κατανομή του ηλεκτρικού πεδίου κατά μήκος της κυτταρικής μεμβράνης και καθορίζουν το όριο για μη αναστρέψιμη βλάβη (Shafiee et al., 2009).

Το περίβλημα του βακτηριακού κυττάρου παίζει κρίσιμο ρόλο στον προσδιορισμό της ευαισθησίας στην ηλεκτροδιάτρηση. Τα Gram-αρνητικά βακτήρια διαθέτουν ένα σύνθετο πολυστρωματικό περίβλημα που αποτελείται από μια εσωτερική κυτταροπλασματική μεμβράνη, ένα λεπτό στρώμα πεπτιδογλυκάνης και μια εξωτερική μεμβράνη που περιέχει λιποπολυσακχαρίτες. Τα Gram-θετικά βακτήρια δεν έχουν εξωτερική μεμβράνη, αλλά εμφανίζουν ένα σημαντικά παχύτερο στρώμα πεπτιδογλυκάνης που περιβάλλει την κυτταροπλασματική μεμβράνη.

Από ηλεκτρικής άποψης, η κυτταροπλασματική μεμβράνη είναι η κύρια θέση ηλεκτροδιάτρησης λόγω της χαμηλής αγωγιμότητας και των διηλεκτρικών ιδιοτήτων της σε σχέση με το περιβάλλον μέσο. Όταν εφαρμόζεται ένα εξωτερικό ηλεκτρικό πεδίο, συμβαίνει συσσώρευση φορτίου κατά μήκος της μεμβράνης, με αποτέλεσμα την ανάπτυξη ενός διαμεμβρανικού δυναμικού. Μόλις αυτό το επαγόμενο διαμεμβρανικό δυναμικό υπερβεί ένα κρίσιμο όριο (συνήθως ~0,5–1 V), συμβαίνουν δομικές αναδιατάξεις των λιπιδίων της μεμβράνης, οδηγώντας σε σχηματισμό πόρων (Kotnik and Miklavčič, 2006).Το μέγεθος, το σχήμα, η σύνθεση της μεμβράνης και η ακαμψία του κυτταρικού περιβλήματος επηρεάζουν σημαντικά την κατανομή του ηλεκτρικού πεδίου και το προκύπτον διαμεμβρανικό δυναμικό στα βακτηριακά κύτταρα. Τα ραβδόμορφα βακτήρια, όπως η *E.coli*, παρουσιάζουν μη ομοιόμορφη ενίσχυση πεδίου στους πόλους των κυττάρων, ενώ οι κόκκοι εμφανίζουν πιο ομοιογενή απόκριση (Pillet et al., 2016a).

6.4.1 Gram-θετικά έναντι Gram-αρνητικών βακτηρίων

Ένας από τους σημαντικότερους καθοριστικούς παράγοντες της βακτηριακής απόκρισης στην μη αναστρέψιμη ηλεκτροπόρωση είναι η διάκριση μεταξύ των δομών του περιβλήματος των Gram-θετικών και Gram-αρνητικών κυττάρων(Pillet et al., 2016a).

Τα Gram-αρνητικά βακτήρια διαθέτουν μια σχετικά λεπτή στιβάδα πεπτιδογλυκάνης (2-7 nm) που βρίσκεται μεταξύ της εσωτερικής κυτταροπλασματικής μεμβράνης και μιας εξωτερικής μεμβράνης πλούσιας σε λιποπολυσακχαρίτες (LPS). Η εξωτερική μεμβράνη εισάγει ένα πρόσθετο διηλεκτρικό φράγμα που αρχικά εξασθενεί το εφαρμοζόμενο ηλεκτρικό πεδίο. Ωστόσο, μόλις διακοπεί, εκθέτει την κυτταροπλασματική μεμβράνη, η οποία υφίσταται ταχέως ηλεκτροπόρηση. Ως αποτέλεσμα, τα Gram-αρνητικά βακτήρια γενικά εμφανίζουν χαμηλότερα κρίσιμα όρια ηλεκτρικού πεδίου για μη αναστρέψιμη ηλεκτροπόρηση σε σύγκριση με τα Gram-θετικά είδη. Αντίθετα, τα Gram-θετικά βακτήρια χαρακτηρίζονται από ένα παχύ, έντονα διασταυρωμένο στρώμα πεπτιδογλυκάνης (20-80 nm) που περιβάλλει την κυτταροπλασματική μεμβράνη. Αυτή η άκαμπτη δομή παρέχει μηχανική σταθερότητα και μπορεί να προστατεύσει μερικώς τη μεμβράνη από

την ηλεκτρική καταπόνηση, αυξάνοντας έτσι την ισχύ ή τη διάρκεια του παλμού του ηλεκτρικού πεδίου που απαιτείται για την πρόκληση μη αναστρέψιμης διαπερατότητας. Επιπλέον, τα τειχοϊκά και λιποτειχοϊκά οξέα που είναι ενσωματωμένα στο τοίχωμα των Gram-θετικών κυττάρων επηρεάζουν την πυκνότητα φορτίου της επιφάνειας, ενδεχομένως αλλοιώνοντας την τοπική κατανομή του ηλεκτρικού πεδίου και τη δυναμική του σχηματισμού πόρων.

Πειραματικές μελέτες αναφέρουν σταθερά υψηλότερη αντοχή των Gram-θετικών βακτηρίων όπως τα *Staphylococcus aureus* και *Listeria monocytogenes* σε σύγκριση με τα Gram-αρνητικά είδη όπως τα *Escherichia coli* ή *Salmonella enterica* υπό πανομοιότυπες συνθήκες παλμού ηλεκτρικού πεδίου (Campelo *et al.*, 2023).

6.4.2 Μορφολογία Κυττάρων και Επιδράσεις Μεγέθους

Η βακτηριακή μορφολογία επηρεάζει σημαντικά τη συμπεριφορά ηλεκτροδιάτρησης λόγω της επίδρασής της στο επαγόμενο διαμεμβρανικό δυναμικό. Τα ραβδόμορφα βακτήρια βιώνουν μη ομοιόμορφη ενίσχυση ηλεκτρικού πεδίου, με μέγιστο διαμεμβρανικό δυναμικό να εμφανίζεται στους κυτταρικούς πόλους που ευθυγραμμίζονται με το διάνυσμα ηλεκτρικού πεδίου. Αυτή η εντοπισμένη ενίσχυση διευκολύνει τον σχηματισμό πόρων και προάγει μη αναστρέψιμη βλάβη σε χαμηλότερες εντάσεις εφαρμοζόμενου πεδίου (Gowrisree et al., 2007; Pillet et al., 2016a).

Τα σφαιρικά βακτήρια, όπως οι κόκκοι, εμφανίζουν μια πιο ομοιογενή κατανομή ηλεκτρικού πεδίου, απαιτώντας συχνά υψηλότερες εντάσεις πεδίου για την επίτευξη συγκρίσιμων επιπέδων μη αναστρέψιμης ηλεκτροδιάτρησης. Τα νηματοειδή ή επιμήκη βακτήρια μπορεί να εμφανίζουν πολλαπλές περιοχές υψηλού πεδίου κατά μήκος του μήκους τους, αυξάνοντας την πιθανότητα συσσωμάτωσης πόρων και ρήξης μεμβράνης υπό παρατεταμένη παλμική ροή.

Το μέγεθος των κυττάρων παίζει επίσης ρόλο, καθώς τα μεγαλύτερα βακτηριακά κύτταρα βιώνουν υψηλότερα επαγόμενα διαμεμβρανικά δυναμικά για ένα δεδομένο εξωτερικό ηλεκτρικό πεδίο. Συνεπώς, μικρότερα βακτήρια ή κύτταρα σε στατική φάση, τα οποία συχνά εμφανίζουν μειωμένο μέγεθος, μπορεί να εμφανίσουν αυξημένη αντίσταση στην μη αναστρέψιμη ηλεκτροπόρηση.

6.4.3 Σύνθεση και Ρευστότητα Λιπιδίων Μεμβρανών

Η λιπιδική σύνθεση της κυτταροπλασματικής μεμβράνης επηρεάζει τις ηλεκτρικές και μηχανικές της ιδιότητες, συμπεριλαμβανομένης της ρευστότητας της κυτταρικής μεμβράνης, της διηλεκτρικής σταθεράς και της ευαισθησίας στον σχηματισμό πόρων. Οι βακτηριακές μεμβράνες που είναι πλούσιες σε κορεσμένα λιπαρά οξέα ή κυκλοπροπανικά λιπαρά οξέα εμφανίζουν μειωμένη ρευστότητα, η οποία μπορεί να αυξήσει την αντίσταση στην επέκταση των πόρων και την αποτυχία επανασφράγισης (Tarek, 2005).

Αντίστροφα, οι μεμβράνες με υψηλότερες αναλογίες ακόρεστων λιπαρών οξέων τείνουν να είναι πιο ρευστές και ευάλωτες σε μη αναστρέψιμη ηλεκτροδιάτρηση. Προσαρμοστικές αλλαγές στη σύνθεση των λιπιδίων της μεμβράνης, όπως αυτές που συμβαίνουν κατά τη διάρκεια ψυχρού σοκ ή περιορισμού θρεπτικών συστατικών, μπορεί επομένως να μεταβάλλουν την ευαισθησία των βακτηρίων στην επεξεργασία με ηλεκτρικό πεδίο.

6.4.4 Φάση Ανάπτυξης και Φυσιολογική Κατάσταση

Η βακτηριακή φυσιολογική κατάσταση είναι ένας κρίσιμος παράγοντας στα αποτελέσματα της μη αναστρέψιμης ηλεκτροπόρησης. Τα κύτταρα στην εκθετική φάση ανάπτυξης είναι γενικά πιο ευάλωτα στην ηλεκτροπόρηση από τα κύτταρα στατικής φάσης. Αυτή η αυξημένη ευαισθησία αποδίδεται στην υψηλότερη μεταβολική δραστηριότητα, την αυξημένη ρευστότητα της μεμβράνης και τη χαμηλότερη έκφραση πρωτεϊνών απόκρισης στο στρες (Pillet, 2017).

Τα κύτταρα στατικής φάσης συχνά εμφανίζουν παχυσμένα κυτταρικά τοιχώματα, αλλοιωμένη σύνθεση μεμβράνης και ενισχυμένους μηχανισμούς ανοχής στο στρες, τα οποία συλλογικά αυξάνουν την αντίσταση στην μη αναστρέψιμη ηλεκτροπόρηση. Επιπλέον, τα αδρανή ή επίμονα κύτταρα μπορεί να επιβιώσουν από έκθεση σε ηλεκτρικό πεδίο που είναι θανατηφόρα για ενεργά διαιρούμενους πληθυσμούς, θέτοντας προκλήσεις για πλήρη μικροβιακή απενεργοποίηση.

6.4.5 Βακτήρια που Σχηματίζουν Σπόρια

Τα ενδοσπόρια που παράγονται από βακτήρια όπως τα είδη *Bacillus* και *Clostridium* αντιπροσωπεύουν μια ακραία περίπτωση αντίστασης στην μη αναστρέψιμη ηλεκτροπόρωση. Τα σπόρια διαθέτουν πολλαπλά προστατευτικά στρώματα, συμπεριλαμβανομένου ενός φλοιού, ενός περιβλήματος και ενός αφυδατωμένου πυρήνα, τα οποία μειώνουν δραστικά την ηλεκτρική αγωγιμότητα και περιορίζουν την ανάπτυξη διαμεμβρανικού δυναμικού.

Ως αποτέλεσμα, οι εντάσεις του ηλεκτρικού πεδίου που επαρκούν για την μη αναστρέψιμη ηλεκτροδιάτρηση των φυτικών κυττάρων συχνά έχουν ελάχιστες επιπτώσεις στα σπόρια. Η απενεργοποίηση των σπορίων συνήθως απαιτεί συνεργιστικές προσεγγίσεις, συνδυάζοντας παλμικά ηλεκτρικά πεδία με θερμότητα, πίεση ή χημικούς παράγοντες για να ξεπεραστεί η εξαιρετική τους αντίσταση (Pillet et al., 2016b).

6.4.6 Βακτήρια που σχετίζονται με βιοφίλμ

Τα βακτήρια εντός βιοφίλμ εμφανίζουν σημαντικά αυξημένη ανοχή στην μη αναστρέψιμη ηλεκτροδιάτρηση σε σύγκριση με τα πλαγκτονικά κύτταρα. Η εξωκυτταρική πολυμερική ουσία (EPS) λειτουργεί ως φυσικό και ηλεκτρικό φράγμα, εξασθενώντας το εφαρμοζόμενο ηλεκτρικό πεδίο και μειώνοντας την αποτελεσματική του ισχύ σε κυτταρικό επίπεδο (Pillet, 2017).

Επιπλέον, τα βακτήρια που σχετίζονται με βιοφίλμ συχνά εμφανίζουν αλλοιωμένη γονιδιακή έκφραση, μειωμένους ρυθμούς ανάπτυξης και ενισχυμένες αντιδράσεις στο στρες, τα οποία συμβάλλουν στην αντίσταση στην ηλεκτροδιάτρηση. Η ετερογενής κατανομή του ηλεκτρικού πεδίου εντός των βιοφίλμ μπορεί να οδηγήσει σε ατελή απενεργοποίηση, απαιτώντας υψηλότερες ισχύς πεδίου ή συνδυασμένες στρατηγικές επεξεργασίας (Pillet, 2017).

6.4.7 Επιπτώσεις για τη Βελτιστοποίηση της Διαδικασίας

Η κατανόηση των βακτηριακών διαφορών στην ευαισθησία στις μη αναστρέψιμες ηλεκτροδιάτρηση είναι απαραίτητη για το σχεδιασμό αποτελεσματικών πρωτοκόλλων επεξεργασίας. Οι παράμετροι του ηλεκτρικού πεδίου πρέπει να προσαρμόζονται ώστε να στοχεύουν τους πιο ανθεκτικούς υποπληθυσμούς, όπως τα Gram-θετικά βακτήρια, τα κύτταρα στατικής φάσης ή τα βακτήρια με ενσωματωμένο βιοφίλμ. Η στόχευση ανά

είδος μπορεί να βελτιώσει την αποτελεσματικότητα , ελαχιστοποιώντας παράλληλα την κατανάλωση ενέργειας και τις ανεπιθύμητες θερμικές επιπτώσεις (Haberl Meglič et al., 2024).

6.5 Εφαρμογές της Βακτηριακής Μη Αναστρέψιμης Ηλεκτροδιάτρησης

Η μη αναστρέψιμη ηλεκτροδιάτρηση έχει διερευνηθεί εκτενώς για την μικροβιακή απενεργοποίηση στην επεξεργασία τροφίμων, συμπεριλαμβανομένης της παστερίωσης υγρών τροφίμων όπως το γάλα, οι χυμοί φρούτων και τα υγρά προϊόντα αυγών (Πίνακας 6.1). Εφαρμόζεται επίσης στην επεξεργασία νερού και λυμάτων για τη μείωση των παθογόνων και τον έλεγχο του βιοφίλμ.

Σε ιατρικά και εργαστηριακά περιβάλλοντα, οι μέθοδοι που βασίζονται στην IRE διερευνώνται για την αποστείρωση θερμοευαίσθητων υλικών και ως πρόσθετα σε αντιμικροβιακές στρατηγικές, ιδιαίτερα κατά των ανθεκτικών στα αντιβιοτικά βακτηρίων (Rubinsky, 2007).Στον Πίνακας 6.1παρουσιάζονται συνοποτικά τα χρησιμοποιούμενα πρωτόκολλα εφαρμογής των IRE. Σε όλες τις μελέτες που αναφέρονται το πλάτος των παλμών που χρησιμοποιούνται είναι της τάξης του μικροδευτερόλεπτου (μs), ενώ δεν υπάρχουν μελέτες με πλάτη παλμού στην τάξη των ns.

Πεδίο Εφαρμογής	**Μικροοργανισμός**	**Παράμετροι**	**Αποτέλεσμα**
In vitroθνητότητα βακτηρίων	*S. aureus*, *S. pyogenes*, *E. coli*, *P. aeruginosa*	~2000 V; 100 παλμοί (μεμονομένοι); δύο στάδια (1500 V, και έπειτα 1250 V; 50–100παλμοί)	Ως 3 $\log_{10}$ μείωση πλήρης εξόντωση σε συνέργεια με oxacillin(Muñoz et al., 2019)
Αποστείρωση ασφάλειας τροφίμων (*B. cereus*)	*B. cereus*	Θανατηφόραεπίπεδα PEF	TEM δείχνει μη αναστρέψιμη καταστροφή μεμβράνης· υποστηρίζει μηχανισμό απενεργοποίησης (Rowan *et al.*, 2000)
Μικρορευστική εκχύλιση	*E. coli*, *S. cerevisiae*	~10 παλμοί υψηλού πεδίου σε τσιπ· ροή με ψύξη	Αποτελεσματική διαπερατότητα και ανάκτηση ενδοκυτταρικών συστατικών· μειωμένη βιωσιμότητα (Rockenbach *et al.*, 2019)

Πίνακας 6.1: Πρωτόκολλα IRE και πεδία εφαρμογής

6.5.1 Έλεγχος εν τω βάθειΛοιμώξεων

Η IRE δείχνει πολλά υποσχόμενη για τη θεραπεία εν τω βάθει λοιμώξεων με μη θερμική αδρανοποίηση μικροβίων. Αξιοσημείωτο είναι ότι ο συνδυασμός της IRE με υπο-ανασταλτικές συγκεντρώσεις οξακιλλίνης

εξαλείφει τον *S. aureus*, υποδηλώνοντας μια πιθανή θεραπευτική συνέργεια σε λοιμώξεις που κατά τα άλλα είναι δύσκολο να προσπελαστούν (Muñoz et al., 2019).

6.5.2 Ασφάλεια και Απολύμανση Τροφίμων

Η PEF υψηλής έντασης μπορεί να απενεργοποιήσει παθογόνα βακτήρια όπως τον *B.cereus*, προσφέροντας μια φυσική μέθοδο αποστείρωσης για τρόφιμα και νερό, με οπτικοποίηση που επιβεβαιώνει τη διάσπαση του κυτταρικού περιβλήματος (Cserhalmi *et al.*, 2002).

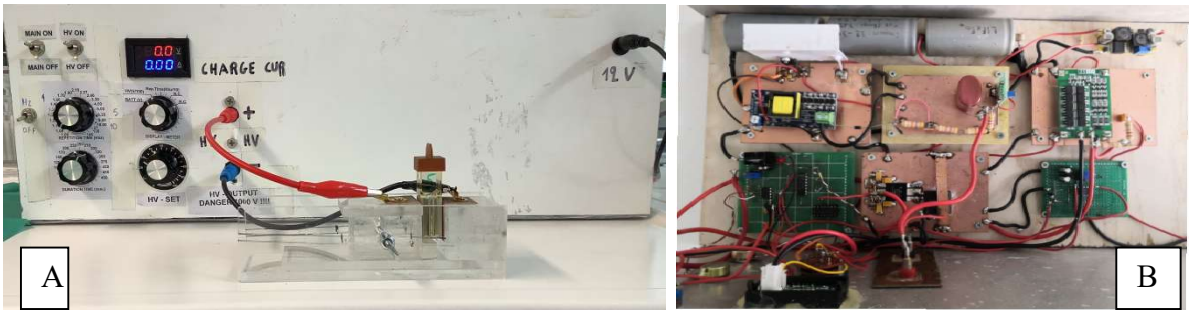
6.5.3 Πειραματικά Δεδομένα και Συνεργιστικές Εφαρμογές

Ορισμένες μελέτες έχουν καταδείξει την αποτελεσματικότητα της IRE στη μείωση ή την εξάλειψη των βιοφίλμ. Η έρευνα για τα βιοφίλμ *Pseudomonas aeruginosa*, μια κοινή αιτία νοσοκομειακών λοιμώξεων, έχει δείξει ότι η IRE μπορεί να μειώσει σημαντικά τη βιομάζα και τη βιωσιμότητα του βιοφίλμ in vitro (Khan et al., 2016a). Παρόμοια αποτελέσματα έχουν αναφερθεί και για άλλα παθογόνα, συμπεριλαμβανομένων των *Staphylococcus epidermidis* και *Escherichia coli* (Juncker et al., 2022).

Επιπλέον, ένας βασικός τομέας έρευνας είναι ο συνδυασμός της IRE με συμβατικά αντιμικροβιακά (Korem et al., 2018a). Μια μελέτη για τα βιοφίλμ του *S. aureus* διαπίστωσε ότι οι υποθανατηφόροι παλμοί IRE, οι οποίοι από μόνοι τους είχαν ελάχιστη επίδραση, ενίσχυσαν δραματικά την αποτελεσματικότητα της γενταμικίνης. Αυτή η συνέργεια υποδηλώνει ότι η IRE μπορεί να προετοιμάσει το βιοφίλμ αυξάνοντας τη διαπερατότητά του, καθιστώντας τα ενδημικά βακτήρια πιο ευάλωτα στην χορήγηση φαρμάκων (Juncker et al., 2022). Αυτή η συνδυασμένη μέθοδος θα μπορούσε να αποτελέσει μια ισχυρή νέα θεραπευτική στρατηγική για την υπέρβαση της εγγενούς αντοχής των βιοφίλμ (Balato et al., 2025).

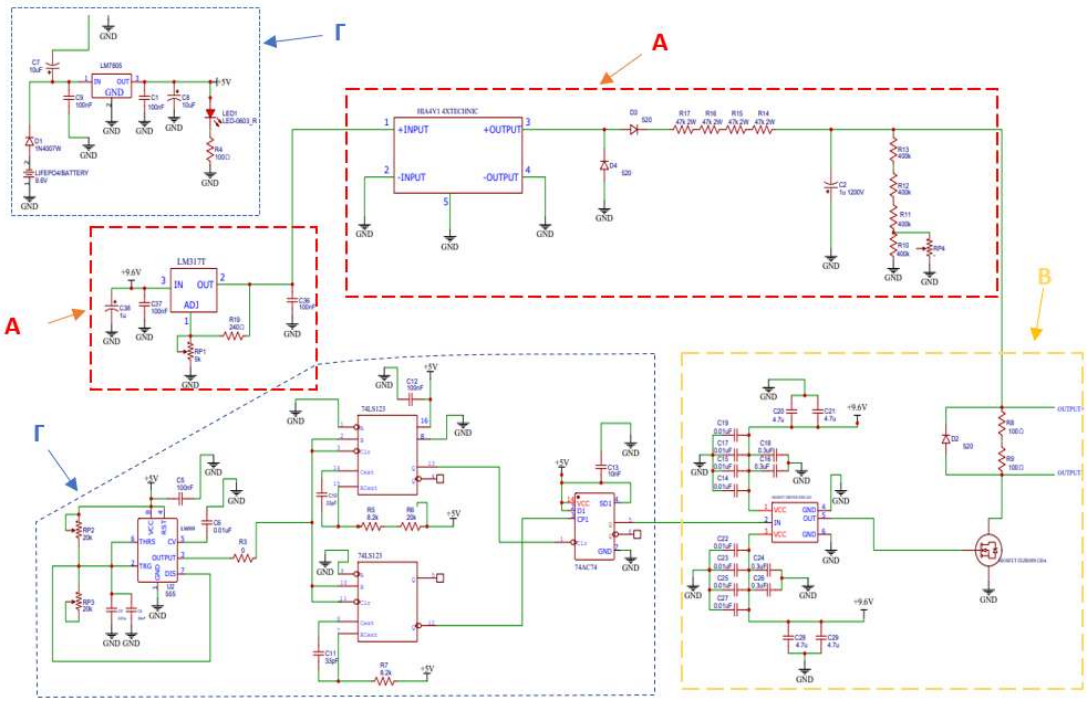
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 7: Περιγραφή της Πειραματικής συσκευής RFπαλμών υψηλής συχνότητας

Η πρωτότυπη συσκευή σχεδιάσθηκε από τον Καθηγητή της Πολυτεχνικής Σχολής του Πανεπιστημίου Αιγαίου κ. Κ. Παπαγεωργίου και το αρχικό πρωτότυπο κατασκευάστηκε στο ερευνητικό εργαστήριο Φυσικής στα πλαίσια εκπόνησης της διπλωματικής εργασίας της φοιτήτριας κ. Ε. Πολυχρόνη (Εικόνα 7.1). Συνοπτικά παρουσιάζονται τα κύρια μέρη της συσκευής.



7.1 Η πρωτότυπη συσκευή παραγωγής ραδιοκυματικών παλμών. Α: πρόσθια άποψη με διακόπτες για ρύθμιση πλάτους παλμού, συχνότητας επανάληψης παλμών και έντασης ηλεκτρικού πεδίου, Β: άποψη του εσωτερικού με τα ηλεκτρονικά κυκλώματα της συσκευής

Το ηλεκτρονικό κύκλωμα της πρωτότυπης συκευήςπαραγωγής ραδιοκυματικών παλμών RF υψηλής τάσης και πολύ μικρής χρονικής διάρκειας (highvoltagenanosecondpulser) απεικονίζεται στο **Σχήμα 7.1**.



Σχήμα 7.1 Ηλεκτρονικό διάγραμμα παραγωγής RF παλμών υψηλών συχνοτήτων

Το κύκλωμα αυτό υποδιαιρείται σε 3 επιμέρους ηλεκτρονικά κυκλώματα (Α,Β,Γ) με διακριτό σκοπό και λειτουργία το κάθε ένα από αυτά τα οποία περιγράφονται αναλυτικά παρακάτω.

7.1 Κύκλωμα παραγωγής της υψηλής τάσης εξόδου

Πιο συγκεκριμένα για το κύκλωμα παραγωγής της υψηλής τάσης εξόδου (κύκλωμα Α) χρησιμοποιήθηκαν μετατροπείς συνεχούς ρεύματος υψηλής τάσης για τη μετατροπή των (0-12) VDC σε (200-1000) VDC. Το ολοκληρωμένο κύκλωμα LM317T τροφοδοτεί τη μονάδα υψηλής τάσης HIA4V1 4XTECHNIC χρησιμοποιώντας μεταβλητή τάση από (0-9) VDC. Το ποτενσιόμετρο αυτό είναι εγκατεστημένο στην πρόσοψη της συσκευής καθώς χρησιμοποιείται για να ρυθμίσει την τάση που εισάγεται στο ολοκληρωμένο κύκλωμα HIA4V1 4XTECHNIC ανύψωσης τάσης (0-9) VDC ώστε να επιτύχει τάσεις στον πυκνωτή αποθήκευσης από (200-1000) V.

Οι δίοδοι υψηλής τάσης (D3–D4) χρησιμοποιήθηκαν για την εξομάλυνση της υψηλής τάσης και την προστασία από αιχμές.Η ισχύς του ολοκληρωμένου κυκλώματος υψηλής τάσης, υπολογίζεται σε 10 W.

Το σύστημα φορτίζει έναν πυκνωτή 1 μF/2000V, ο οποίος χρησιμοποιείται για την παροχή υψηλών τάσεων (HV) στα άκρα των διπολικών ακροδεκτών σε εξαιρετικά βραχεία διαστήματα όπως καθορίζονται από την διάρκεια του σχετικού παλμού.

Για την τροφοδοσία του κυκλώματος τοποθετήθηκαν 3 μπαταρίες φωσφορικού σιδήρου - λιθίου(LiFePo4) υψηλής ποιότητας και με υψηλή απόδοση σε ένταση ρεύματος (χαμηλή εσωτερική αντίσταση) πηγή τροφοδοσίας για την παροχή των 9,6V. Επιλέχθηκαν λόγω του διπλάσιου χρόνου ζωής (σε σύγκριση με τις Lionκαι Ni-Cdμπαταρίες), της ασφάλειας λειτουργίας έναντι των Lion, της υψηλής έντασης εκφόρτωσης, της σταθερής τάσης λειτουργίας, της υψηλής χωρητικότητας και του χαμηλού βάρους.

7.2 Κύκλωμα παραγωγής παλμών υψηλών συχνοτήτων

Για να ικανοποιηθούν οι προδιαγραφές σχεδιασμού του κυκλώματος παραγωγής ραδιοκυματικών παλμών υψηλών συχνοτήτων (κύκλωμα Β) που απαιτούσαν διάρκεια παλμών της τάξεως των νανοδευτερολέπτων (ns), επιλέχθηκε ως διακόπτης ένα εξαιρετικά γρήγορο RF MOSFET, IXZR08N120A από την IXYS με μέγιστη αντοχή στην τάση εξόδου τα 1200 V. Ένας οδηγός (Driver) υψηλού ρεύματος χρησιμοποιήθηκε για την πόλωση του MOSFET σε εξαιρετικά σύντομους ρυθμούς. Ο οδηγός απαιτείται λόγω του εξαιρετικά υψηλού ρεύματος (στιγμιαία) που χρειάζεται για να φορτίσει την χωρητικότητα της πύλης MOSFET. Η φόρτιση της πύλης, γεφυρώνει τα σημεία του αγωγού D (Drain) και της πηγής S (Source) του MOSFET με αποτέλεσμα αυτό να δρα ως ηλεκτρονικός διακόπτης πολύ μεγάλης ταχύτητας.

Ο οδηγός MOSFET Driver DEIC420 τροφοδοτείται χρησιμοποιώντας απευθείας τους πόλους της μπαταρίας, ώστε να είναι διαθέσιμη η μέγιστη δυνατή ένταση ρεύματος. Τρεις διαφορετικοί πυκνωτές, εύρους χωρητικότητας, χρησιμοποιούνται για να σταθεροποιήσουν την παροχή ρεύματος στον οδηγό MOSFET DRIVER την στιγμή της ζήτησης. Τα διαφορετικά εύρη χωρητικότητας χρησιμοποιούνται για να καλύψουν διαφορετικούς θορύβους υψηλής συχνότητας. Η είσοδος CMOS / TTL του DRIVER, συνδέεται με

την έξοδο του κυκλώματος παραγωγής παλμών. Η πηγή (source) του MOSFET συνδέεται με τη γείωση και τον αγωγό (drain) συνδέεται με την υψηλή τάση, μέσω των αντιστάσεων R8 και R9 που σκοπό έχει τον περιορισμό ρεύματος. Μια δίοδος γρήγορης μεταγωγής (D2 στο σχέδιο) τοποθετείται ανάστροφα, ώστε να προστατεύσει το MOSFET από αντίστροφες τάσεις και επαγωγικά φορτία, αν και το ίδιο το MOSFET, διαθέτει εσωτερικά παρόμοιο δίοδο αυτοπροστασίας.

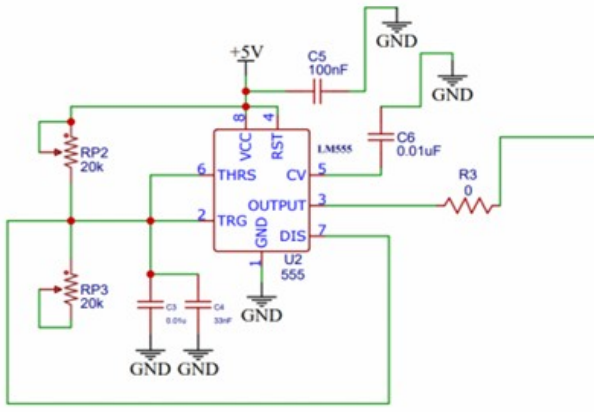
7.3 Ηλεκτρονικό κύκλωμα ελέγχου διακόπτη υψηλών συχνοτήτων MOSFET

Ένα κύκλωμα γεννήτριας παλμών νανοδευτερολέπτων κατασκευάστηκε χρησιμοποιώντας δύο ψηφιακά ICs CMOS όπως απεικονίζεται στο κύκλωμα Γ του ηλεκτρονικού διαγράμματος (**σχήμα 7.1**).

Το πρώτο ολοκληρωμένο κύκλωμα (74LS123) είναι ένας επανασκανδαλιζόμενοςμονοσταθήςπολυδονητής (retriggerable monostable multivibrator) και το άλλο ολοκληρωμένο κύκλωμα (74AC74) είναι ένα D-flipflop. Ο κάθε πολυδονητής παράγει 2 όμοιους παλμούς αφού το σήμα εισόδου του προέρχεται από την κοινή έξοδο του ταλαντωτή (LM555). Εξαιτίας όμως της χαμηλής ακρίβειας χρονισμού του ηλεκτρονικού κυκλώματος από το ρολόι αυτό και για την κάλυψη των απαιτήσεων της εφαρμογής, η περίοδος του ενός από τους δύο πανομοιότυπους παλμούς τροποποιείται ελάχιστα χρονικά με την βοήθεια μιας εξωτερικής μεταβλητής αντίστασης (R6) επιλεγόμενης περιόδου (pulse duration), που ένας εξ' αυτών διαφοροποιείται ανάλογα με την τιμή μιας εξωτερικής μεταβλητής αντίστασης (R6). Η μεταβλητή αυτή αντίσταση, είναι τοποθετημένη στο πάνελ της συσκευής, ώστε να υπάρχει η δυνατότητα από τον χρήστη άμεσης μεταβολής της τιμή του περιόδου του παλμού (pulseduration).

Με τον τρόπο αυτό οδηγώντας τους παλμούς αυτούς που πλέον δεν είναι πανομοιότυποι στις εισόδους του D-flip-flop (74AC74) τέτοιο τρόπο, ώστε στην έξοδό του εμφανίζεται ένας παλμός με περίοδο ίση με την χρονική διαφορά των 2 παλμών που εισάγονται.

Η διαδικασία αυτή επαναλαμβάνεται από ένα σήμα ρολογιού (repetition time) που παράγεται από το ολοκληρωμένο κύκλωμα χρονισμού LM555 που απεικονίζεται στο σχήμα 7.2 και είναι σε τυπική συνδεσμολογία ασταθούς πολυδονητή, ώστε να δημιουργήσει τετραγωνικό παλμό TTL (0-5) V, με συχνότητα (1-146) kHz.



Σχήμα 7.2 Ολοκληρωμένο κύκλωμα ταλαντωτή (LM555)

Η τυπική συνδεσμολογία του LM555 ως ασταθούς πολυδονητή, βασίζεται στην χωρητικότητα του πυκνωτή (C3), και της μεταβλητής αντίστασης (RP3) που τοποθετείται ως ποτενσιόμετρο στο πάνελ της συσκευής που επιτρέπει στο χρήστη, μεταβολή του χρόνου επανάληψης (repetition time) από (1-146) kHz.

Οι τροφοδοσίες όλων των κυκλωμάτων της συγκεκριμένης πλακέτας, γίνεται στα +5V και αυτό επιτυγχάνεται από το ολοκληρωμένο ρυθμιστή τάσης (LM7805) που, μπορεί να εξυπηρετήσει παροχές ρεύματος έως 1 Α και τάση εξαιρετικά σταθερή +5V.

ΕΙΔΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 8: ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΣ ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟΥ ΜΟΝΤΕΛΟΥ

8.1 Σχεδιασμός της Μελέτης (Study Design)

Πρόκειται για μία πειραματική μελέτη in-vitro, η οποία διεξήχθηκε στο Μικροβιολογικό Εργαστήριο του Πανεπιστημιακού Νοσοκομείου Πατρών από τον Ιούλιο 2021 μέχρι και Απρίλιο 2026. Η μελέτη χωρίστηκε σε δύο στάδια. Το πρώτο στάδιο βασίστηκε στη χρήση καλλιεργειών βακτηριακών στελεχών, τα οποία απομονώθηκαν από μολυσμένα χρόνια δερματικά έλκη, με σκοπό τη συστηματική διερεύνηση της αποτελεσματικότητας της πειραματικής συσκευής στην αναστολή του πολλαπλασιασμού αυτών υπό ελεγχόμενες εργαστηριακές συνθήκες. Στο δεύτερο στάδιο αναπτύχθηκε και αξιοποίηθηκε ένα in vitro μοντέλο βιομεμβράνης προερχόμενης από πολυανθεκτικά βακτήρια που απομονώθηκαν από χρόνια δερματικά έλκη, με στόχο τη μελέτη της αποτελεσματικότητας της εφαρμογής βραχυχρόνιων ηλεκτρομαγνητικών παλμών υψηλής έντασης υπό ελεγχόμενες εργαστηριακές συνθήκες.

Ηθική και Δεοντολογία: Για τα κλινικά δείγματα που χρησιμοποιήθηκαν για την μελέτη λάβαμε έγκριση από την Επιτροπή Ηθικής του ΠΓΝΠ (Αρ.πρωτ.: 193/4-5-2023) καθώς και έντυπη ενυπόγραφη συγκατάθεση από τους ασθενείς.

8.2 Υλικό Έρευνας (Materials)

- **Πηγή Δειγμάτων:** Για την διεξαγωγή της in-vitro πειραματικής διαδικασίας χρησιμοποιήθηκαν στελέχη *S.aureus* και *E.coli* τα οποία απομονώθηκαν από χρόνια δερματικά έλκη, καθώς και επίσης χρησιμοποιήθηκε πρότυπο στέλεχος *S.epidermidis*.
- **Υλικά και μέθοδοι**
  - ***TripticSoyBroth (TSB):*** Περιέχει πεπτόνη καζεΐνης (τρυπτόνη) και πεπτόνη σόγιας, τα οποία παρέχουν αμινοξέα και πεπτίδια μακράς αλυσίδας για την ανάπτυξη των βακτηρίων. Περιέχει επίσης γλυκόζη (πηγή ενέργειας), χλωριούχο νάτριο (για οσμωτική ισορροπία) και φωσφορικό δικάλιο (ρυθμιστικό διάλυμα)
  - ***LuriaBertany (LB):*** περιέχει Τρυπτόνη (10 g/L): Παρέχει τα απαραίτητα αμινοξέα και πεπτίδια για την ανάπτυξη βακτηρίων, Εκχύλισμα ζύμης (5 g/L): Παρέχει βιταμίνες, άζωτο και άνθρακα, Χλωριούχο νάτριο (NaCl): Διατηρεί την οσμωτική ισορροπία. Άγαρ (15 g/L)
  - ***Brain-Heart Infusion Agar*:** Η τυπική σύσταση ανά λίτρο (g/liter) περιλαμβάνει: Στερεά εκχυλίσματα καρδιάς & εγκεφάλου (Brain-Heart Infusion Solids): 17.5 g (παρέχουν πλούσια θρεπτικά συστατικά, αμινοξέα και βιταμίνες), Tryptose (ή ProteosePeptone): 10.0 g (πηγή αζώτου και άνθρακα),

Γλυκόζη (Glucose): 2.0 g (πηγή ενέργειας), Χλωριούχο Νάτριο (SodiumChloride): 5.0 g (διατηρεί την ωσμωτική ισορροπία), Δισόξινο Φωσφορικό Νάτριο (DisodiumPhosphate): 2.5 g (ρυθμιστής pH), Άγαρ (Agar): 12.0 - 15.0g (στερεοποιητικός παράγοντας)

- ***Αιματούχο άγαρ:*** Για την καλλιέργεια και απομόνωση των μικροοργανισμών χρησιμοποιήθηκε αιματούχο άγαρ (Blood Agar) σε τρυβλία των 90 mm, αποτελούμενο από θρεπτική βάση Columbia Agar Base εμπλουτισμένη με 5% αίμα προβάτου

- ***MacConkey Agar:***. Χρησιμοποιήθηκε για επιλεκτική απομόνωση και καλλιέργεια των Gram-αρνητικών βακτηρίων, μετά από επώαση στους 37°C για 24 ώρες σε αερόβιες συνθήκες. Τα λακτόζη θετικά στελέχη (π.χ. *E. coli*) σχηματίζουν ροζ αποικίες λόγω της παραγωγής οξέος από τη ζύμωση της λακτόζης

❖ Χρώσεις- Ανοσοφθορισμός:

- ***Gram χρώση:***Η ταυτοποίηση των βακτηρίων πραγματοποιήθηκε αρχικά με τη μέθοδο της κατά Gram χρώσης. Η διαδικασία περιλαμβάνει τα εξής στάδια:

1. Παρασκευή επιχρίσματος**:** Μικρή ποσότητα αποικίας από καλλιέργεια μεταφέρθηκε σε αντικειμενοφόρο πλάκα, μονιμοποιήθηκε με τη χρήση θερμότητας και αφέθηκε να στεγνώσει.
2. Το επίχρισμα καλύφθηκε με κρυσταλλικό ιώδες (crystal violet) για 1 λεπτό και στη συνέχεια ξεπλύθηκε με απεσταγμένο νερό.
3. Προστέθηκε διάλυμα Lugol (ιωδιούχο κάλιο) για 1 λεπτό, ώστε να σχηματιστεί το σύμπλοκο κρυσταλλικού ιώδους-ιωδίου στο εσωτερικό των κυττάρων.
4. Αποχρωματισμός**:** Εφαρμόστηκε μείγμα αιθυλικής αλκοόλης και ακετόνης για λίγα δευτερόλεπτα μέχρι την απομάκρυνση της περίσσειας χρώματος, ακολουθούμενο από άμεση έκπλυση με νερό.
5. Αντιχρώση: Χρησιμοποιήθηκε σαφρανίνη (ή φουξίνη) για 30 δευτερόλεπτα για τη χρώση των αποχρωματισμένων κυττάρων.
6. Μικροσκόπηση**:** Μετά το στέγνωμα, τα δείγματα εξετάστηκαν σε οπτικό μικροσκόπιο με τη χρήση καταδυτικού φακού (100x).

Αποτελέσματα: Τα Gram-θετικά βακτήρια εμφανίζονται ιώδη (λόγω του παχέος στρώματος πεπτιδογλυκάνης του κυτταρικού τοιχώματος), ενώ τα Gram-αρνητικά εμφανίζονται ερυθρά/ροζ.

- ***SYTO/PI*****:** LIVE/DEAD™ BacLight™ Bacterial Viability Kit (L7012, Invitrogen™, Thermo Fisher Scientific, Eugene, OR, USA). Η χρώση SYTO9 και ιωδιούχου προπιδίου (PI) είναι μια τυπική δοκιμασία χρώσης ζωντανών/νεκρών βακτηρίων, όπου το SYTO9 (πράσινο) βάφει όλα τα κύτταρα, ενώ το PI (κόκκινο) εισέρχεται μόνο στις κατεστραμμένες μεμβράνες, μειώνοντας τον πράσινο φθορισμό και εκπέμποντας κόκκινο, εντοπίζοντας τα νεκρά κύτταρα. Χρησιμοποιείται για μικροσκοπία ή κυτταρομετρία ροής, συνήθως με συγκεντρώσεις 50 nM–20 μM και σύντομους χρόνους επώασης.

❖ **Εργαστηριακός εξοπλισμός- όργανα που χρησιμοποίηθηκαν**:

- **Φασματοφωτόμετρο**: Η τυποποίηση της θολερότητας πραγματοποιήθηκε με τη χρήση του πυκνόμετρου DensiCHEK Plus (bioMérieux, Marcy-l'Étoile, France) στα 580 nm.η πυκνότητα του βακτηριακού εναιωρήματος ρυθμίστηκε με ακρίβεια στα 0,5 της κλίμακας McFarland (περίπου $1,5\times10^8$ CFU/mL)
- **Κλίβανος επώασης** : Η καλλιέργεια των βακτηριακών στελεχών πραγματοποιήθηκε σε θρεπτικό ζωμό και τρυβλία. Αμφότερα τοποθετήθηκαν σε κλίβανο CO_2 (Forma Series, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) και επωάστηκαν υπό ελεγχόμενες συνθήκες (37 °C, 5% CO_2 και υψηλή υγρασία) για διάστημα 24 ωρών.
- **Οπτικό μικροσκόπιο**: Η μικροσκοπική εξέταση και η μορφολογική αξιολόγηση των δειγμάτων πραγματοποιήθηκε με τη χρήση οπτικού μικροσκοπίου Nikon Eclipse E400 (Nikon Corporation, Tokyo, Japan).
- **Συνεστιακό μικροσκόπιο**: Η βιωσιμότητα των βακτηρίων και η τρισδιάστατη δομή τους αξιολογήθηκαν μέσω συνεστιακού μικροσκοπίου σάρωσης λέιζερ (CLSM). Τα δείγματα βάφτηκαν με τις φθορίζουσες χρωστικές SYTO9 (για τη σήμανση των ζωντανών κυττάρων) και ιωδιούχο προπίδιο (Propidium Iodide - PI) (για τη σήμανση των νεκρών κυττάρων με κατεστραμμένη μεμβράνη). Η παρατήρηση πραγματοποιήθηκε σε συνεστιακό μικροσκόπιο Leica TCS SP5 (Leica Microsystems GmbH, Wetzlar, Germany). Για την καταγραφή της τρισδιάστατης αρχιτεκτονικής, ελήφθησαν διαδοχικές οπτικές τομές κατά τον άξονα Z (Z-stack) με μέγεθος βήματος (step size) 0,5 μm.
- **Κυβέττες ηλεκτροπόρησης** με 0.1 εκδιάκενο (Gene Pulser/MicroPulser Electroporation Cuvettes, Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA)
- **Αντικειμενοφόρες πλάκες**: Η καλλιέργεια των κυττάρων πραγματοποιήθηκε σε θαλάμους οκτώ θέσεων με αποσπώμενη αντικειμενοφόρο πλάκα (Millicell® EZ SLIDE 8-well glass slide, Merck Millipore, USA, Cat. No. PEZGS0816), οι οποίοι επιτρέπουν την απευθείας χρώση και μικροσκοπική εξέταση των κυττάρων.
- **Ηλεκτρόδιο μεταφοράς παλμών**:Χρησιμοποιήθηκαν εύκαμπτα ηλεκτρόδια παρεμβολής (interdigitated electrodes - IDEs) με υπόστρωμα τερεφθαλικού πολυαιθυλενίου (PET) (μοντέλο IDE/PET/5/10/50-E, Gold Sparrow). Τα ηλεκτρόδια αποτελούνταν από αγώγιμη στρώση Cu/Ni/Au (πάχους 12 μm, 3 μm και 1 μm αντίστοιχα), με πλάτος γραμμής και διάκενο 50 μm, και συνολικές διαστάσεις υποστρώματος 10 mm × 5 mm. Η περιοχή του μικροαισθητήρα χωρίς ηλεκτρόδια (5χ5mm) χρησιμοποιήθηκε σαν περιοχή μάρτυρα.

❖ Μικροβιολογικές Μέθοδοι (Microbiological Methods)

- **Χρώση Gram (Gram Staining)**

Η ταυτοποίηση της μορφολογίας και της δομής του κυτταρικού τοιχώματος των βακτηριακών στελεχών πραγματοποιήθηκε με τη μέθοδο της χρώσης Gram.

- **Βιοχημική Ταυτοποίηση Στελεχών**
  - **Δοκιμασία Καταλάσης (Catalase Test)**

Η δοκιμασία βασίζεται στην ικανότητα του ενζύμου καταλάση να διασπά το υπεροξείδιο του υδρογόνου σε νερό και οξυγόνο.

  - **Δοκιμασία Πηκτάσης (CoagulaseTest)**

Χρησιμοποιήθηκε για τη διαφοροποίηση του *Staphylococcus aureus* (πηκτάση θετικός) από τους υπόλοιπους σταφυλόκοκκους (CoNS – Coagulase Negative *Staphylococci*).

  - **Αυτοματοποιημένη Ταυτοποίηση και Αντιβιόγραμμα (VITEK 2)**

Η τελική ταυτοποίηση των στελεχών σε επίπεδο είδους (ID) και ο προσδιορισμός της ελάχιστης ανασταλτικής συγκέντρωσης (MIC) των αντιβιοτικών (AST) πραγματοποιήθηκαν με το αυτοματοποιημένο σύστημα VITEK 2 Compact (bioMérieux, France).

8.3 Μέθοδος στατιστικής επεξεργασίας πειραματικών δεδομένων

Η στατιστική επεξεργασία των δεδομένων πραγματοποιήθηκε με τη χρήση του λογισμικού IBM SPSS Statistics 29.0 (IBM Corp. (2022). *IBM SPSS Statistics forWindows, Version 29.0*. Armonk, NY: IBM,USA). Τα περιγραφικά στατιστικά για τα αποτελέσματα παρουσιάζονται ως μέσος όρος ± τυπική απόκλιση (SD). Η ομοιογένεια των διακυμάνσεων αξιολογήθηκε με το τεστ Levene.

Οι σχέσεις μεταξύ της μείωσης του μικροβιακού πληθυσμού και των επιμέρους μεταβλητών διερευνήθηκαν με t-test και με ανάλυση διακύμανσης μιας κατεύθυνσης (one-way ANOVA). Όταν παρατηρήθηκαν στατιστικά σημαντικές διαφορές, πραγματοποιήθηκαν πολλαπλές συγκρίσεις με το post hoc τεστ Tukey. Σε περιπτώσεις μη ομοιογένειας διακυμάνσεων εφαρμόστηκε το τεστ Games–Howell.

Η διερεύνηση της σχέσης μεταξύ των μεταβλητών των ραδιοκυματικών παλμών (χρόνου θεραπείας, ένταση παλμού, πλάτος παλμού, συχνότητα παλμών) και της μικροβιακής μείωσης (ΔLogCFU) πραγματοποιήθηκε με γραμμική παλινδρόμηση. Η καταλληλότητα του μοντέλου αξιολογήθηκε μέσω του συντελεστή προσδιορισμού (R^2).

Το επίπεδο στατιστικής σημαντικότητας ορίστηκε σε $p< 0.05$. Όπου κρίθηκε απαραίτητο, παρουσιάζονται διαστήματα εμπιστοσύνης 95%.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 9: ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΗ ΔΙΑΔΙΚΑΣΙΑ

9.1 In-vitro αναστολή πολλαπλασιασμού των πολυανθεκτικών στελεχών

Ο πειραματικός σχεδιασμός ακολούθησε καθιερωμένες αρχές μικροβιολογικής έρευνας, δίνοντας έμφαση στην αναπαραγωγιμότητα, την αξιοπιστία και την ασφάλεια των αποτελεσμάτων. Τα στελέχη που μελετήθηκαν προέρχονταν από κλινικά δείγματα χρόνιων δερματικών ελκών (πολυανθεκτικά στελέχη *S.aureus* και *E.coli)* και χαρακτηρίστηκαν ως πολυανθεκτικά βάσει διεθνώς αποδεκτών κριτηρίων. Η in vitro καλλιέργεια επέτρεψε την παρακολούθηση του πολλαπλασιασμού και της βιωσιμότητας των μικροοργανισμών, καθώς και την αξιολόγηση της αποτελεσματικότητας της πειραματικής συσκευής σε διαφορετικές πειραματικές παραμέτρους. Για την εξασφάλιση της εγκυρότητας των δεδομένων εφαρμόστηκαν κατάλληλοι μάρτυρες και επαναλήψεις, ενώ όλα τα πειράματα πραγματοποιήθηκαν σύμφωνα με τους κανόνες βιοασφάλειας και τις δεοντολογικές κατευθυντήριες οδηγίες. Η συλλογή και ανάλυση των δεδομένων βασίστηκε σε ποιοτικές και ποσοτικές προσεγγίσεις, με τη χρήση κατάλληλων στατιστικών εργαλείων. Η μεθοδολογία αυτή επιλέχθηκε ώστε να προσφέρει μια ολοκληρωμένη εικόνα της in vitro συμπεριφοράς των βακτηρίων, συμβάλλοντας στην καλύτερη κατανόηση των μηχανισμών αντοχής και της δυναμικής τους σε ελεγχόμενο περιβάλλον.

9.1.1 Gram+ βακτήρια

Για την πειραματική διαδικασία χρησιμοποιήθηκε πολυανθεκτικό στέλεχος *S.aureus* (MRSA), το οποίο απομονώθηκε από κλινικό δείγμα ασθενούς με χρόνια έλκη. Η ταυτοποίηση του στελέχους και ο έλεγχος ευαισθησίας στα αντιβιοτικά επιβεβαιώθηκαν με το σύστημα VITEK® 2 και με Etest. Το στέλεχος ενοφθαλμίστηκε σε υγρό θρεπτικό υλικό Luria-Bertani (LB broth) και επωάστηκε για **24 ώρες** στους **37 °C**, υπό συνθήκες **5% CO_2**, σε κλίβανο σταθερού περιβάλλοντος (**FormaSeries, ThermoFisherScientific, Waltham, MA, USA**). Μετά το πέρας της επώασης, έγινε βακτηριακό εναιώρημα πυκνότητας **0,5 της κλίμακας McFarland** με τη χρήση του πυκνόμετρου **DensiCHEKPlus (bioMérieux, Marcy-l'Étoile, France)** στα **580 nm**. Στη συνέχεια, πραγματοποιήθηκε **αραίωση 1:10** σε φυσιολογικό ορό προκειμένου να επιτευχθεί η τελική συγκέντρωση εργασίας των **$1,5\times10^7$ CFU/mL**. 70μl τελικού μικροβιακού εναιωρήματος τοποθετήθηκαν σε κυβέττα ηλεκτροπόρησης με διάκενο 0.1 cm (**Gene Pulser/MicroPulser Electroporation Cuvettes**, Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA) και εφαρμόστηκαν βραχύβιοι ραδιοκυματικοί παλμοί (100-450)ns διάρκειας παλμού, συχνότητας (1-1000)Hz, με ένταση ηλεκτρικού πεδίου (7-11)kV/cm για χρονικά διαστήματα (20, 50, 80, 100,120, 150, 200) s. Αμέσως μετά την εφαρμογή των ραδιοκυματικών παλμών, πραγματοποιήθηκαν άμεσα σειριακές δεκαδικές αραιώσεις σε φυσιολογικό ορό (0.9% NaCl). Ποσότητα 100 μL από κάθε αραίωση εμβολιάστηκε σε τρυβλία με τη μέθοδο της επιφανειακής επίστρωσης (spread plate). Η καλλιέργεια των βακτηριακών στελεχών πραγματοποιήθηκε σε τρυβλία με αιματούχο άγαρ. Τα τρυβλία τοποθετήθηκαν σε κλίβανο CO_2 (**Forma Series, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA**) και επωάστηκαν υπό ελεγχόμενες συνθήκες (**37 °C, 5% CO_2** και υψηλή υγρασία) για διάστημα **24 ωρών**. Έπειτα μετρήθηκαν οι αποικίες μικροβιακών κυττάρων που επιβίωσαν από την εφαρμογή της μεθόδου.

Για κάθε κυβέττα χρησιμοποιήθηκε και μια κυβέττα μάρτυρας, στην οποία δεν εφαρμόστηκαν ραδιοκυματικοί παλμοί, αλλά ανακαλλιεργήθηκε σαν διάλυμα μάρτυρας.Η αποτελεσματικότητα της μεθόδου αξιολογήθηκε με τον προσδιορισμό των βιώσιμων κυττάρων (CFU/mL). Η μείωση του μικροβιακού πληθυσμού υπολογίστηκε σε λογαριθμική κλίμακα (log reduction) χρησιμοποιώντας τον τύπο:

$\Delta LogCFU = LogCFU_t - LogCFU_o$

όπου CFU_t ο πληθυσμός των αποικιών των μικροβίων μετά τη θεραπεία RF και CFU_o ο πληθυσμός των αποικιών των μικροβίων της ομάδας ελέγχου.

9.1.2 Gram – αρνητικά βακτήρια

Για την πειραματική διαδικασία χρησιμοποιήθηκε πολυανθεκτικό στέλεχος *E.coli* το οποίο απομονώθηκε από κλινικό δείγμα ασθενούς με χρόνια έλκη. Η ταυτοποίηση του στελέχους και ο έλεγχος ευαισθησίας στα αντιβιοτικά επιβεβαιώθηκαν με το σύστημα VITEK® 2. Για τις ανάγκες των πειραμάτων, το στέλεχος *E.coli* εμβολιάστηκε σε υγρό θρεπτικό υλικό TSB (TrypticSoyBroth) και επωάστηκε στατικά για**24 ώρες** στους **37 °C**, με την παρουσία **5% CO_2**, σε κλίβανο σταθερού περιβάλλοντος (**FormaSeries, ThermoFisherScientific, Waltham, MA, USA**). Μετά το πέρας της επώασης, έγινε βακτηριακό εναιώρημα πυκνότητας **0,5 της κλίμακας McFarland** με τη χρήση του πυκνόμετρου **DensiCHEKPlus (bioMérieux, Marcy-l'Étoile, France)** στα **580 nm**. Στη συνέχεια, πραγματοποιήθηκε **αραίωση 1:10** σε φυσιολογικό ορό προκειμένου να επιτευχθεί η τελική συγκέντρωση εργασίας των **$1,5\times10^7$ CFU/mL**. 70μl τελικού βακτηριακού εναιωρήματος τοποθετήθηκαν σε κυβέττα ηλεκτροπόρησης με 0.1 cm διάκενο (**Gene Pulser/MicroPulser Electroporation Cuvettes**, Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA) και εφαρμόστηκαν βραχύβιοι ραδιοκυματικοί παλμοί (100-450)ns διάρκειας παλμού, συχνότητας (1-1000)Hz, με ένταση ηλεκτρικού πεδίου (7-11)kV/cmγια χρονικά διαστήματα (20, 50, 80, 100,120, 150, 200) s. Αμέσως μετά την εφαρμογή των ραδιοκυματικών παλμών, πραγματοποιήθηκαν άμεσα σειριακές δεκαδικές αραιώσεις σε φυσιολογικό ορό (0.9% NaCl). Ποσότητα 100 μL από κάθε αραίωση εμβολιάστηκε σε τρυβλία με τη μέθοδο της επιφανειακής επίστρωσης (spread plate). Η καλλιέργεια των βακτηριακών στελεχών πραγματοποιήθηκε σε τρυβλία με MacConkey Agar. Τα τρυβλία τοποθετήθηκαν σε κλίβανο CO_2 (**Forma Series, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA**) και επωάστηκαν υπό ελεγχόμενες συνθήκες (**37 °C, 5% CO_2** και υψηλή υγρασία) για διάστημα **24 ωρών**. Έπειτα μετρήθηκαν οι αποικίες μικροβιακών κυττάρων που επιβίωσαν από την εφαρμογή της μεθόδου. Επίσης για κάθε κυβέττα χρησιμοποιήθηκε και μια κυβέττα μάρτυρας, στην οποία δεν εφαρμόστηκαν ραδιοκυματικοί παλμοί, αλλά ανακαλλιεργήθηκε σαν διάλυμα μάρτυρας. Και σε αυτή την περίπτωση η αποτελεσματικότητα της μεθόδου αξιολογήθηκε με τον προσδιορισμό των βιώσιμων κυττάρων (CFU/mL). Η μείωση του μικροβιακού πληθυσμού υπολογίστηκε σε λογαριθμική κλίμακα (log reduction) χρησιμοποιώντας τον τύπο:

$\Delta LogCFU = LogCFU_t - LogCFU_o$

όπου CFU_t ο πληθυσμός των αποικιών των μικροβίων μετά τη θεραπεία RF και CFU_o ο πληθυσμός των αποικιών των μικροβίων της ομάδας ελέγχου.

9.2 Βραχύβια ραδιοκύματα σε βιομεμβράνες

Ο πειραματικός σχεδιασμός επιλέχθηκε ώστε να προσομοιώνει, κατά το δυνατόν, τις φυσιολογικές συνθήκες που ευνοούν την ανάπτυξη βιομεμβρανών, διασφαλίζοντας ταυτόχρονα την επαναληψιμότητα και τη συγκρισιμότητα των αποτελεσμάτων. Το in vitro μοντέλο επέτρεψε τη συστηματική παρακολούθηση της επίδρασης των ηλεκτρικών πεδίων στη βιομεμβράνη, καθώς και την αξιολόγηση της σταθερότητας και της ανθεκτικότητάς της σε διαφορετικές πειραματικές μεταβλητές. Ιδιαίτερη έμφαση δόθηκε στη χρήση κατάλληλων πειραματικών μαρτύρων και επαναλήψεων, με σκοπό την ενίσχυση της αξιοπιστίας των δεδομένων. Η συλλογή των αποτελεσμάτων βασίστηκε σε συνδυασμό ποιοτικών και ποσοτικών μεθόδων ανάλυσης, ενώ η επεξεργασία τους πραγματοποιήθηκε με τη χρήση κατάλληλων στατιστικών εργαλείων. Όλες οι πειραματικές διαδικασίες διεξήχθησαν στο Τμήμα Ιατρικής του Πανεπιστημίου Πατρών, σύμφωνα με τις ισχύουσες κατευθυντήριες οδηγίες βιοασφάλειας και δεοντολογίας. Η εφαρμοζόμενη μεθοδολογία κρίθηκε κατάλληλη για τη διερεύνηση των μηχανισμών που διέπουν τη δημιουργία και τη συμπεριφορά των βιομεμβρανών σε in vitro συνθήκες, προσφέροντας χρήσιμα συμπεράσματα για τη βιολογική τους σημασία.

9.2.1 Δημιουργία Βιομεμβράνης

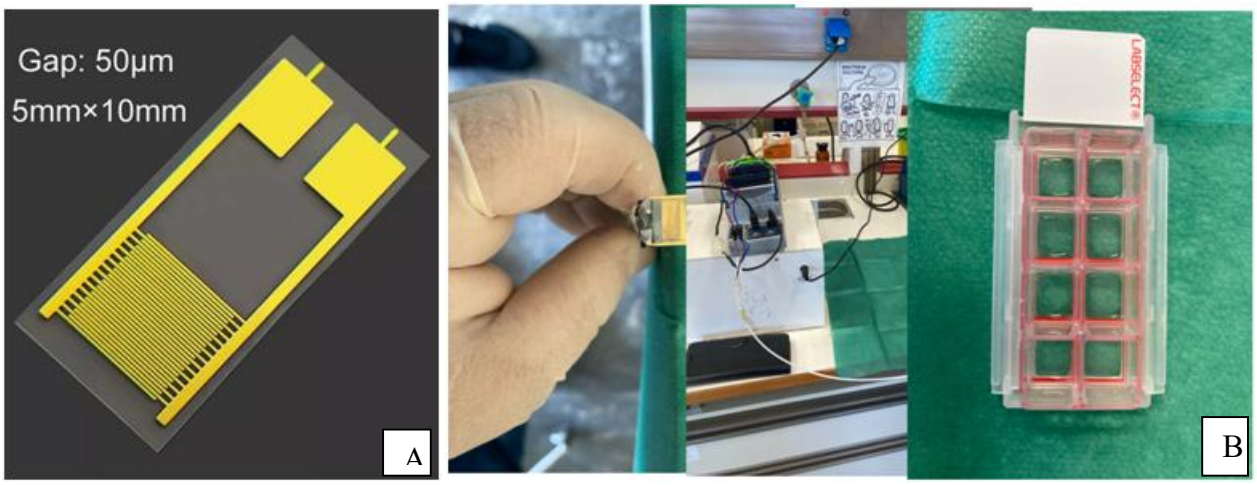
Για τη δημιουργία βιομεμβράνης χρησιμοποιήθηκαν τόσο πρότυπα, όσο και κλινικά μικροβιακά στελέχη ικανά να παράγουν βιομεμβράνη. Αρχικά σύμφωνα με το πρωτόκολλο κατά (Jurcisek et al., 2011), ανακαλλιεργήθηκε στέλεχος *S.epidermidis* σε TSB θρεπτικό ζωμό για 24 ώρες .Οι βακτηριακές αποικίες αραιώθηκαν σε TSB και η OD490 ρυθμίστηκε στο 0,65.Το βακτηριακό εναιώρημα που προέκυψε αραιώθηκε στη συνέχεια 1:6 (1 mL βακτηριακό εναιώρημα + 5 mL προθερμασμένου TSB) και επωάστηκε στους 37°C με 5% CO_2για περίπου 3 ώρες, προκειμένου να επιτευχθεί η μεσαία λογαριθμική φάση.Το εναιώρημα μέσης λογαριθμικής ανάπτυξης αραιώθηκε σε αναλογία 1:2500 με προθερμασμένο TSB και τοποθετήθηκαν 200 μL του τελικού εναιωρήματος σε κάθε φρεάτιο μιας αντικειμενοφόρου πλάκας 8 φρεατίων (8wells sliding chamber) (Εικόνα 9.1) και καλλιεργήθηκε στους 37^{o}C σε αερόβιες συνθήκες. Μετά από 24 ώρες έγινε έλεγχος δημιουργίας βιομεμβράνης με χρήση χρωστικής σαφρανίνης.



Εικόνα 9.1:αντικειμενοφόρος πλάκα με 8 θέσεις ανάπτυξης βιομεμβράνης (8wells sliding chamber)

9.2.2 Σχεδιαστικές απαιτήσεις ηλεκτροδίου εφαρμογής ραδιοκυματων

Η ανάπτυξη του μοντέλου βιομεμβράνης σε 8 wells chamber plate,το οποίο έχει διαστάσεις ανάπτυξης βιομεμβράνης (10x5)mm, ανέδειξε την αναγκαιότητα χρήσης ειδικού τύπου ηλεκτροδίου για μεταφορά του παλμού στην επιφάνεια της δημιουργηθείσας βιομεμβράνης. Για το λόγο αυτό χρησιμοποιήθηκαν μικροαισθητήρες με απόσταση ηλεκτροδίων 50nm και διαστάσεων (5x5)mm, όπως φαίνεται στην Εικόνα 9.2Α. Η περιοχή του μικροαισθητήρα χωρίς ηλεκτρόδια (5χ5mm) χρησιμοποιήθηκε σαν περιοχή μάρτυρα.



Εικόνα 9.2 Α:μικροαισθητήρας με απόσταση ηλεκτροδίων 50μm, Β: Η συνδεσμολογία του μικροαισθητήρα με την πρωτότυπη συσκευή κατά την εφαρμογή στο μοντέλο βιομεμβράνης

Στη συνέχεια έγινε εφαρμογή ραδιοκυματικών παλμών σε βιομεμβράνη σύμφωνα με το παρακάτω πρωτόκολλο: Ενέργεια ηλεκτρικού πεδίου: 10kV/cm, πλάτος παλμού: 100ns , 450ns, ρυθμός επαναληψιμότητας παλμών: 1Hz, 5Hz, 1kHz, χρόνος εφαρμογής παλμών: 120s, 200s.

Αμέσως μετά την εφαρμογή των παλμών, με αποστειρωμένες συνθήκες και σύμφωνα με το πρωτόκολλο κατά (Jurcisek et al., 2001) οι βιομεμβράνες στις αντικειμενοφόρες πλάκες χρησιμοποιήθηκαν για ανοσοφθορισμό και συνεστιακή μικροσκοπία.

9.2.3 Ανοσοφθορισμός και συνεστιακή μικροσκοπία

Η τεχνική του ανοσοφθορισμού σε συνδυασμό με τη συνεστιακή μικροσκοπίαεφαρμόστηκε στην παρούσα διατριβή για τη διερεύνηση της δομικής οργάνωσης και της χωρικής κατανομής των συστατικών της βιομεμβράνης σε μικροσκοπικό επίπεδο πριν αλλά και μετά από την εφαρμογή βραχυχρόνιων ραδιοκυματικών παλμών. Η λήψη των εικόνων φθορισμού πραγματοποιήθηκε με το συνεστιακό μικροσκόπιο σάρωσης λέιζερ **Leica TCS SP5** (Leica Microsystems CMS GmbH, Mannheim, Germany) Η συγκεκριμένη μεθοδολογική προσέγγιση επιλέχθηκε λόγω της δυνατότητάς της να προσφέρει υψηλή ειδικότητα στην ανίχνευση κυτταρικών πληθυσμών εντός της πολύπλοκης αρχιτεκτονικής της βιομεμβράνης. Μέσω της χρήσης φθοριζόντων δεικτών SYTO9/PI και σύμφωνα με το πρωτόκολλο κατά (Jurcisek et al., 2011) κατέστη δυνατή η απεικόνιση των ζωντανών και νεκρών μικροβιακών κυττάρων όσο και της επιμέρους δομικής μορφής της βιομεμβράνης. Ο έλεγχος της βιωσιμότητας πραγματοποιήθηκε με τη διπλή χρώση SYTO9 και Ιωδιούχου Προπιδίου (PI). Για την αποφυγή φασματικής επικάλυψης, εφαρμόστηκε διαδοχική σάρωση

γραμμών (sequential line scanning). Το SYTO9 διεγέρθηκε στα 488 nm (λέιζερ Αργόνου) με εύρος ανίχνευσης εκπομπής 500–540 nm. Το PI διεγέρθηκε στα 543 nmμε εύρος ανίχνευσης εκπομπής 610–660 nm. Οι εικόνες συλλέχθηκαν με τη χρήση αντικειμενικού φακού 100× και η επεξεργασία τους έγινε με το λογισμικό Leica LAS AF.

Αρχικά από κάθε φρεάτιο, αφαιρέθηκε το επωαστικό μέσο (TSB) και πλύθηκε η βιομεμβράνη δύο φορές απαλά με αποστειρωμένο φυσιολογικό ορό. Προστέθηκαν 200 μL χρώσης LIVE/DEAD™ BacLight™ BacterialViabilityKit (L7012, Invitrogen™, ThermoFisherScientific, Eugene, OR, USA) (3 μL συστατικού A + 3 μL συστατικού B ανά mL φυσιολογικού ορού) σε κάθε φρεάτιο και επωάστηκε σε θερμοκρασία δωματίου για 15 λεπτά με προστασία της καλλιέργειας από το φως από αυτό το σημείο και μετά. Μετά την επώαση αναρροφήθηκε η χρωστική και πλύθηκε δύο φορές απαλά με αποστειρωμένο φυσιολογικό ορό. Προστέθηκαν 200 μL ουδέτερης φορμόλης σε κάθε φρεάτιο και για 30 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου για να μονιμοποίηση του δείγματος. Έπειτα αφαιρέθηκε το μονιμοποιητικό υλικό με πλύση δύο φορές με φυσιολογικό ορό. Αφαιρέθηκαν τα πλαστικά φρεάτια από την αντικειμενοφόρο πλάκα, προστέθηκε αρκετός φυσιολογικός ορός σε κάθε φρεάτιο, έτσι ώστε όταν τοποθετηθεί μια καλυπτρίδα στο παρέμβυσμα, να μην υπάρχουν φυσαλίδες αέρα. Η καλυπτρίδα σφραγίστηκε στις άκρες με μέσο στερέωσης βερνίκι νυχιών για τη σφράγιση των πλακιδίων.Αφού το σφραγιστικό στέγνωσε για περίπου 1 ώρα οι αντικειμενοφόρες πλάκες εξετάστηκαν με συνεστιακή μικροσκοπία.

Η συνεστιακή μικροσκοπία επέτρεψε τη συλλογή οπτικών τομών σε διαφορετικά βάθη, προσφέροντας τρισδιάστατη απεικόνιση της βιομεμβράνης και ακριβέστερη κατανόηση της ετερογένειας, της οργάνωσής της και του πάχους της πριν και μετά την εφαρμογή βραχυχρόνιων ραδιοκυματικών παλμών. Η μείωση του οπτικού υποβάθρου και η αυξημένη ανάλυση συνέβαλαν στη σαφέστερη απεικόνιση των αλληλεπιδράσεων μεταξύ των μικροβιακών κυττάρων και του περιβάλλοντός τους. Για τη διασφάλιση της αξιοπιστίας των αποτελεσμάτων χρησιμοποιήθηκαν κατάλληλοι μάρτυρες και πραγματοποιήθηκαν επαναλαμβανόμενες παρατηρήσεις. Ελήφθησαν οπτικές τομές κατά τον άξονα Z (Z-stacks) με χρήση αντικειμενικού φακού 100× και σταθερό βήμα 0,5 μm σε όλο το βάθος του βιοφίλμ, μέσω του λογισμικού Leica LAS AF. Η ποσοτική ανάλυση και ο υπολογισμός του όγκου και του πάχους του βιοφίλμ πραγματοποιήθηκαν με την επεξεργασία των Z-stacks στο λογισμικό ImageJ (National Institutes of Health, ΗΠΑ), επιτρέποντας τόσο ποιοτική όσο και ποσοτική αξιολόγηση των χαρακτηριστικών της βιομεμβράνης. Η εφαρμογή της μεθόδου συνέβαλε ουσιαστικά στην κατανόηση της χωρικής δυναμικής και της δομικής πολυπλοκότητας των βιομεμβρανών σε in vitro συνθήκες.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 10. ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΑ ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

Στο κεφάλαιο αυτό παρουσιάζουμε την ανάλυση των αποτελεσμάτων της πειραματικής διαδικασίας, τόσο στην in-vitro εφαρμογή ραδιοκυματικών παλμών σε καλλιέργειες πολυανθεκτικών βακτηρίων που προέρχονται από επιμολυσμένα χρόνια έλκη δέρματος σε κυβέττες ηλεκτροπόρησης, όσο και στην εφαρμογή ραδιοκυματικών παλμών σε in-vitro πειραματικό μοντέλο βιομεμβράνης πολυανθεκτικών βακτηρίων που επίσης προέρχονται από χρόνια επιμολυσμένα έλκη δέρματος.

10.1 In- vitro πειραματικά αποτελέσματα

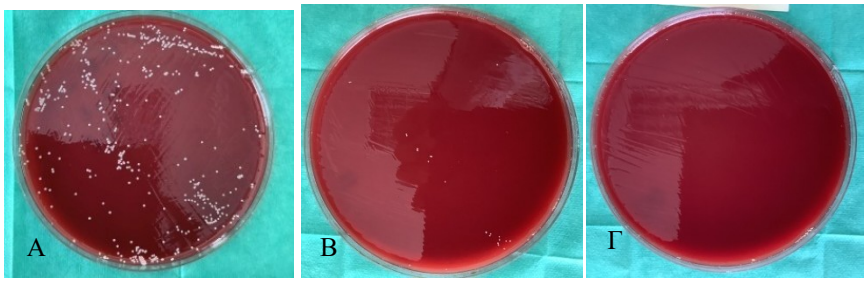
Η εφαρμογή βραχύβιων ραδιοκυματικών παλμών υψηλής συχνότητας σε καλλιέργειες πολυανθεκτικών βακτηρίων από δερματικά έλκη είχε ως αποτέλεσμα την ανάσχεση της ανάπτυξης των βακτηριακών κυττάρων. Μελετήθηκε η επίδραση της αύξησης της έντασης του πεδίου, του πλάτους του παλμού, της συχνότητας των παλμών και ο χρόνος εφαρμογής των ραδιοκυμάτων στην μείωση του μικροβιακού πληθυσμού, τόσο σε Gram- θετικά, όσο και σε Gram-αρνητικά βακτήρια. Τα αποτελέσματα παρουσιάζονται αναλυτικά στις επόμενες παραγράφους όπου υπολογίζεται η μεταβολή του μικροβιακού πληθυσμού σε log CFU/mL μετά την εφαρμογή διαφορετικών πρωτοκόλλων εφαρμογής ραδιοκυματικών παλμών μετά από στατιστική ανάλυση με SPSS. Γίνεται ανάλυση με στατιστική μέθοδο t-test ανά ζεύγη, ανάλυση διακύμανσης με τη στατιστική μέθοδο ANOVA και ανάλυση με posthoc γραμμικής παλινδρόμησης με επίπεδο στατιστικής σημαντικότητας p=0,05.

Ο λόγος των διακυμάνσεων ελέγθηκε με το *F*-test, $F(df_{between}df_{within})$, όπου $df_{between}$ είναι οι βαθμοί ελευθερίας μεταξύ των ομάδων που συγκρίνουμε και df_{within}είναι οι βαθμοί ελευθερίας που αφορούν το σφάλμα των μετρήσεων σε κάθε ομάδα. Στατιστικά σημαντικά θεωρήθηκαν τα αποτελέσματα για $p<.05$.

10.1.1 Επίδραση της έντασης ηλεκτρικού πεδίου στη μείωση μικροοργανισμών

Gram- θετικά βακτήρια

Μελετήθηκε η επίδρασητης έντασης του ηλεκτρικού πεδίου των ραδιοκυματικών παλμών στην ανάσχεση της ανάπτυξης Gram-θετικών βακτηρίων. Στην Εικόνα 10.1 παρουσιάζονται ενδεικτικές εικόνες από τις ανακαλλιέργειες Gram-θετικών βακτηριακών κυττάρων μετά από την εφαρμογή ραδιοκυματικών παλμών.



Εικόνα 10.1: ΑνακαλλιέργειαGram-θετικών βακτηρίων (*S.aureus*),Α: τρυβλίο Petri μάρτυρας (χωρίς εφαρμογή ραδιοκυματικών παλμών), Β: τρυβλίο Petri με εφαρμογή ραδιοκυματικών παλμών (μέσος χρόνος εφαρμογής: 100s), Γ:τρυβλίο Petri με εφαρμογή ραδιοκυματικών παλμών (υψηλός χρόνος εφαρμογής: 200s),

Στο Σχήμα 10.1 απεικονίζεται η μεταβολή του μικροβιακού πληθυσμού σε log CFU/mL σαν συνάρτηση της έντασης του ηλεκτρικού πεδίου των εφαρμοζόμενων ραδιοκυματικών παλμών. Η αύξηση της έντασης του πεδίου από 7kV/cm σε 11,5kV/cm οδήγησε σε προοδευτική μείωση του μικροβιακού πληθυσμού μικροβιακών κυττάρων *S.aureus*. Πραγματοποιήθηκαν πολλαπλές συγκριτικές αναλύσεις με χρήση paired t-test και ανάλυση ANOVA για την αξιολόγηση των διαφορών στο ΔLogCFU μεταξύ των εντάσεων του ηλεκτρικού πεδίου (7,0, 8,5, 10,0 και 11,5 kV/cm). Οι διαδικασίες Tukey HSD, Bonferroni και Games-Howell (Field, 2018) παρήγαγαν εξαιρετικά συνεπή αποτελέσματα και για τους δύο μικροοργανισμούς (Πίνακας 10.1). Η διαδικασία Games-Howell χρησιμοποιήθηκε αντί για την Tukey όταν παραβιαζόταν η αρχή της ομοσκεδαστικότητας (Levene's test $p < 0.05$).

Εντάσεις ηλεκτρικού πεδίου 10,0kV/cm και 11,5 kV/cm παρήγαγαν σημαντικά υψηλότερες μικροβιακές μειώσεις από ό,τι τα 7,0kV/cm και 8,5 kV/cm ($p < 0,001$). Η μέγιστη μείωση καταγράφηκε στην υψηλότερη ένταση πεδίου, όπου ο πληθυσμός μειώθηκε κατά περίπου 2,79 log CFU/mL.

Η αύξηση της τιμής της έντασης του ηλεκτρικού πεδίου οδήγησε σε στατιστικά σημαντική μείωση του αριθμού των επιβιοσάντων βακτηρίων.Για τον έλεγχο των διαφορών μεταξύ των ομάδων χρησιμοποιήθηκε η ανάλυση διακύμανσης μονής κατεύθυνσης (one-way ANOVA), με τη χρήση τηςστατιστικής δοκιμασίας *F* (F-test). Το επίπεδο στατιστικής σημαντικότητας ορίστηκε σε $p<.05$. Τα αποτελέσματα έδωσαν $F(3,157)=17,5$, $p<.001$, στατιστικά σημαντική διαφορά μεταξύ των διαφορετικών εντάσεων ηλεκτρικού πεδίου. Πολλαπλές συγκρίσεις μετά την ολοκλήρωση της μελέτης με τη διαδικασία Games-Howell, λόγω παραβίασης της αρχής της ομοσκεδαστικότητας (Levene's test , $p<.001$) έδειξαν ότι σε εντάσεις ηλεκτρικού πεδίου 10,0 και 11,5 kV/cm παρατηρήθηκαν σημαντικά υψηλότερες μειώσεις ΔLogCFU σε σύγκριση με 7,0 και 8,5 kV/cm ($p < 0,001$) για τον *S. aureus*. Δεν παρατηρήθηκαν σημαντικές διαφορές μεταξύ 7,0 και 8,5 kV/cm ή μεταξύ 10,0 και 11,5 kV/cm, υποδηλώνοντας ένα φαινόμενο κατωφλίου γύρω στα 10 kV/cm (Σχήμα 10.2).

Πίνακας πολλαπλών συγκρίσεων

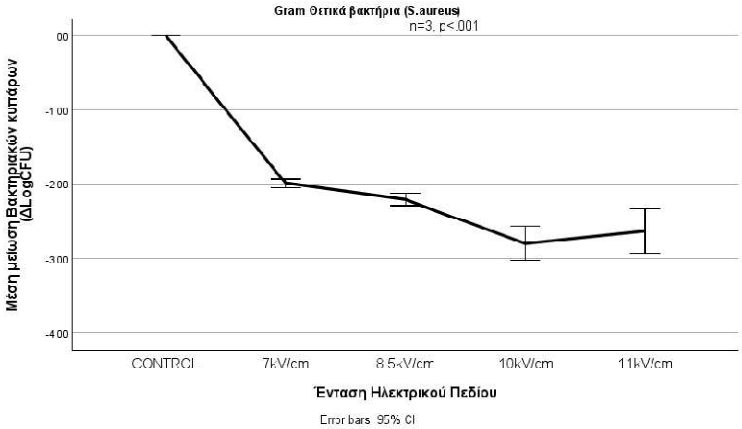
Εξαρτημένη μεταβλητή: ΔLogCFU

post-hoc διαδικασία Games-Howell

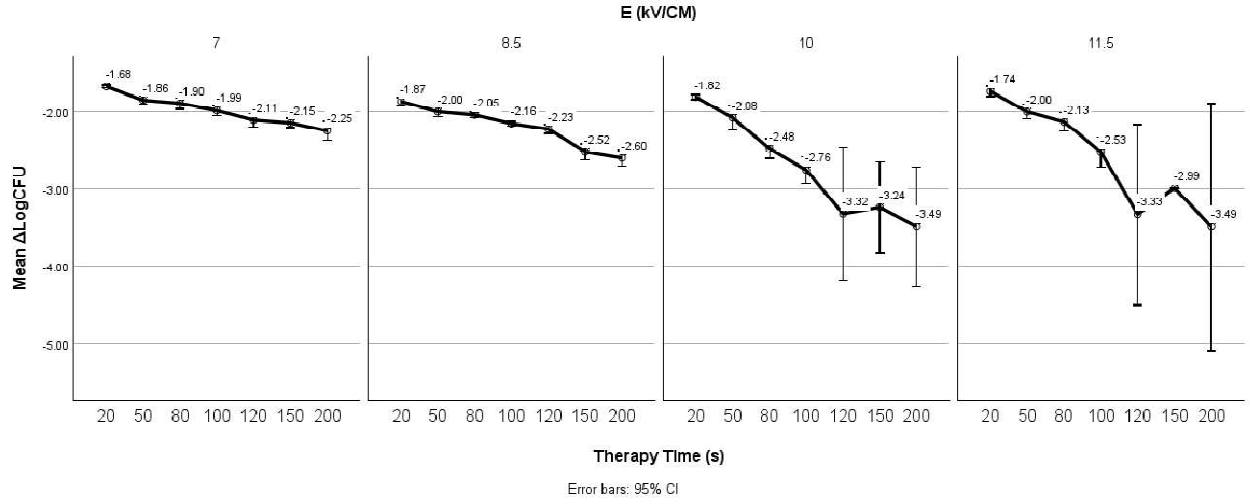
Βακτήριο	Ei (kV/cm)	Ej (kV/cm)	Μέση διαφορά (CFUi-CFUj)(logCFU/ml)	σ	S
S.aureus	7.0	8.5	.21375*	0,05016	0,000
		10.0	.80386*	0,11893	0,000
		11.5	.63758*	0,15296	0,001
	8.5	7.0	-.21375*	0,05016	0,000
		10.0	.59010*	0,12186	0,000
		11.5	.42382*	0,15525	0,048
	10.0	7.0	-.80386*	0,11893	0,000
		8.5	-.59010*	0,12186	0,000
		11.5	-0,16628	0,18902	0,815
	11.5	7.0	-.63758*	0,15296	0,001
		8.5	-.42382*	0,15525	0,048

		10.0	0,16628	0,18902	0,815
*. Η μέση διαφορά ορίστηκε στατιστικά σημαντική στο 0.05 επίπεδο.					

Πίνακας 10.1: post-hoc συγκρίσεις επίδρασης της έντασης του ηλεκτρικού πεδίου των ραδιοκυματικών παλμών στην ανάσχεση της ανάπτυξης Gram-θετικών βακτηρίων. Η μέση διαφορά μεταξύ των ομάδων μελέτης εκφράζεται ως ΔLogCFU. Ei: είναι η ένταση του πεδίου της ομάδας αναφοράς, Ej: είναι η ένταση του πεδίου των υπόλοιπων ομάδων της μελέτης



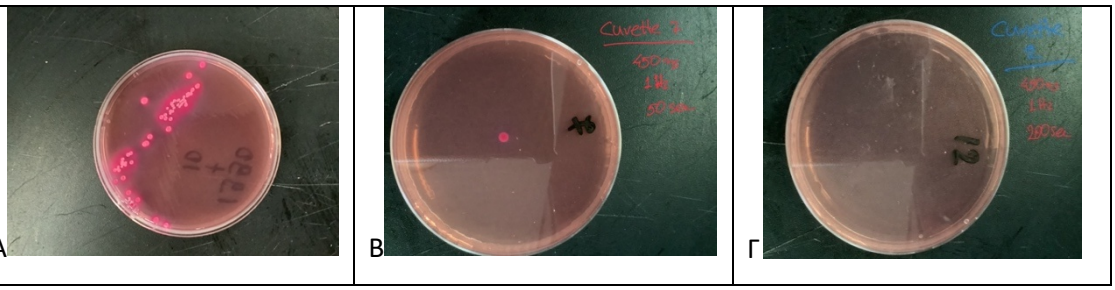
Σχήμα 10.1: Επίδραση της έντασης του ηλεκτρικού πεδίου στην ανάσχεση της ανάπτυξης Gram-θετικών βακτηρίων κατά τη διάρκεια της θεραπείας με παλμικά ηλεκτρικά πεδία. Η βακτηριακή αναγωγή εκφράζεται ως log CFU/mL. Οι γραμμές σφάλματος αντιπροσωπεύουν το 95% διάστημα εμπιστοσύνης (95% CI) τριών ανεξάρτητων σειρών μετρήσεων (n = 3).



Σχήμα 10.2: Αυξανόμενη αναστολή ανάπτυξης μικροβιακών κυττάρων με την αύξηση της έντασης του ηλεκτρικού πεδίου και του χρόνου θεραπείας.Στον οριζόντιο άξονα απεικονίζεται χρόνος εφαρμογής ραδιοκυματικών παλμών σες. Στον κατακόρυφο άξονα παρουσιάζεται η μέση μείωση των βακτηριακών κυττάρων εκφρασμένη ως ΔLogCFU. (Balasis *et al.*, 2025)

Gram-αρνητικά βακτήρια

Στην Εικόνα 10.2 παρουσιάζονται ενδεικτικές εικόνες μετά από την ανακαλλιέργεια Gram-αρνητικών βακτηρίων (*E.coli*). Στο Σχήμα 10.3.απεικονίζεται η μεταβολή του μικροβιακού πληθυσμού για τα Gram-αρνητικά βακτήρια σε log CFU/mL σαν συνάρτηση της έντασης του ηλεκτρικού πεδίου των εφαρμοζόμενων ραδιοκυματικών παλμών. Παρατηρήθηκε ότι η αύξηση της έντασης του ηλεκτρικού πεδίου είχε ως αποτέλεσμα μεγαλύτερη μείωση του μικροβιακού πληθυσμού σε σύγκριση με τα Gram- θετικά βακτήρια.



Εικόνα 10.2: ανακαλλιέργεια Gram-αρνητικών βακτηρίων (*E.coli*), Α: τρυβλίο Petri μάρτυρας (χωρίς εφαρμογή ραδιοκυματικών παλμών), Β: τρυβλίοPetriμε εφαρμογή ραδιοκυματικών παλμών (μέσος χρόνος εφαρμογής: 50s), Γ: τρυβλίο Petri με εφαρμογή ραδιοκυματικών παλμών (υψηλός χρόνος εφαρμογής: 200s),

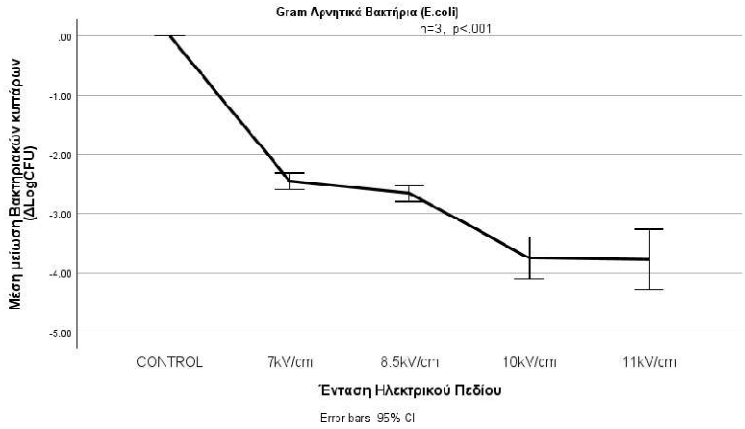
Συγκεκριμένα, στην ένταση 11,5 kV/cm καταγράφηκε μείωση της τάξης των 3,78 log CFU/mL, η οποία ήταν σημαντικά μεγαλύτερη σε σύγκριση με τις χαμηλότερες εντάσεις $F(3,157)=22.9$, $p<.001$). Οι συγκρίσεις ανά ζεύγη έδειξαν ότι οι θεραπείες στα 10,0kV/cm και 11,5 kV/cm οδήγησαν σε σημαντικά μεγαλύτερες μειώσεις ΔLogCFU (-3.7±1.3σ) σε σύγκριση με 7,0 kV/cm και 8,5 kV/cm (-2,4±.2σ, p< 0,001 σε όλες τις δοκιμές post-hoc). Δεν παρατηρήθηκε στατιστικά σημαντική διαφορά μεταξύ: 7,0 kV/cm έναντι 8,5 kV/cm (p> 0,05), όπως και 10,0 kV/cm έναντι 11,5 kV/cm (p> 0,05)Πίνακας 10.2.

Αυτά τα αποτελέσματα υποδηλώνουν τον σχηματισμό δύο στατιστικά ομοιογενών υποσυνόλων που αντιστοιχούν σε χαμηλές και υψηλές εντάσεις ηλεκτρικού πεδίου.

Πίνακας Πολλαπλών Συγκρίσεων					
Εξαρτημένη μεταβλητή: ΔLogCFU					
Posthocδοκιμασία: Games-Howell					
Βακτηριακό κύτταρο	Ei (kV/cm)	Ej(kV/cm)	Μέση διαφορά (CFUi-CFUj)(logCFU/ml))	σ	s
E.coli	7.0	8.5	0,20810	0,09953	0,165
		10.0	1.30095*	0,18883	0,000
		11.5	1.32992*	0,25722	0,000
	8.5	7.0	-0,20810	0,09953	0,165
		10.0	1.09286*	0,18822	0,000
		11.5	1.12182*	0,25677	0,001
	10.0	7.0	-1.30095*	0,18883	0,000
		8.5	-1.09286*	0,18822	0,000
		11.5	0,02897	0,30279	1,000
	11.5	7.0	-1.32992*	0,25722	0,000
		8.5	-1.12182*	0,25677	0,001

		10.0	-0,02897	0,30279	1,000
*. Σημειώνεται όταν η μέση διαφορά είναι στατιστικά σημαντική στο επίπεδο 0.05.					

Πίνακας 10.2: post-hocσυγκρίσεις επίδρασης της έντασης του ηλεκτρικού πεδίου των ραδιοκυματικών παλμών στην ανάσχεση της ανάπτυξης Gram-αρνητικών βακτηρίων. Ημέση διαφορά μεταξύ των ομάδων μελέτης εκφράζεται ως ΔLogCFU



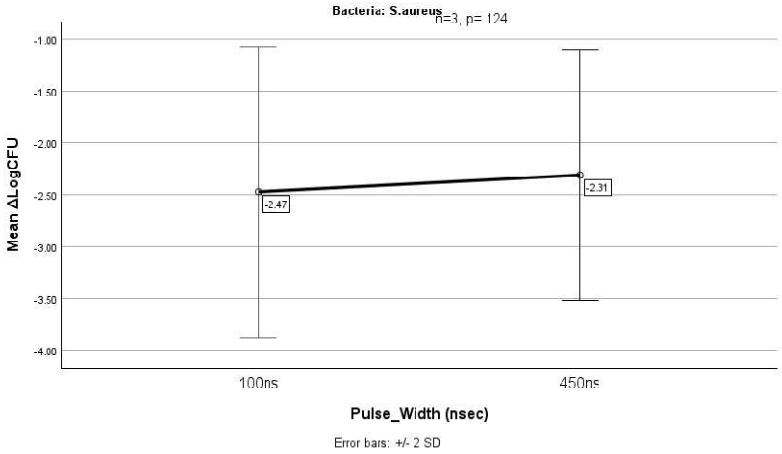
Σχήμα 10.3: Επίδραση της έντασης του ηλεκτρικού πεδίου στην ανάσχεση της ανάπτυξης Gram-αρνητικών βακτηρίων κατά τη διάρκεια της θεραπείας με παλμικά ηλεκτρικά πεδία. Η βακτηριακή αναγωγή εκφράζεται ως log CFU/mL. Οι γραμμές σφάλματος αντιπροσωπεύουν το 95% διάστημα εμπιστοσύνης (95% CI) τριών ανεξάρτητων σειρών μετρήσεων (n = 3).

Η σύγκριση των αποτελεσμάτων μεταξύ Gram-θετικών και Gram-αρνητικών βακτηρίων έδειξε ότι τα Gram-αρνητικά βακτήρια παρουσίασαν μεγαλύτερη ευαισθησία στην εφαρμογή PEF, καθώς επιτεύχθηκαν υψηλότερα επίπεδα μικροβιακής μείωσης στις ίδιες συνθήκες επεξεργασίας. Ο δείκτης η ^{2} για μέτρηση του μεγέθους του αποτελέσματος ήταν η^2=0.305 για τα Gram- αρνητικά βακτήρια, και η^2=0,251 για τα Gram-θετικά.

10.1.2 Επίδραση του πλάτους του ραδιοκυματικού παλμού

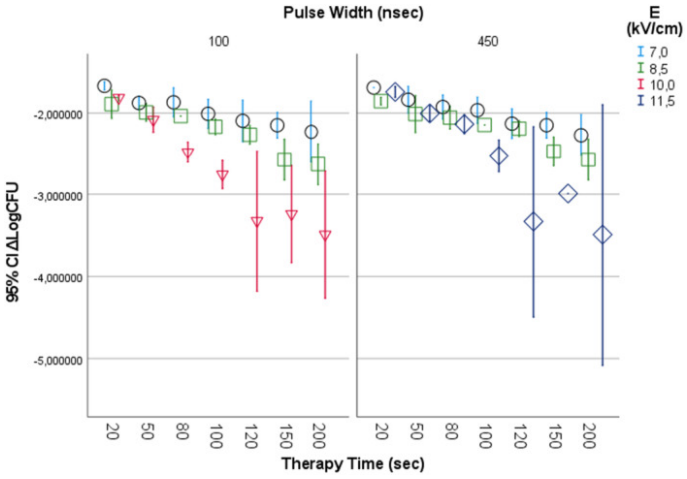
Gram-θετικά βακτήρια

Τα αποτελέσματα της επίδρασης του πλάτους ραδιοκυματικούπαλμού στον πληθυσμό των Gram-θετικών βακτηρίων παρουσιάζονται στο Σχήμα 10.4



Σχήμα 10.4: Επίδραση του πλάτους του παλμού στην απενεργοποίηση Gram-θετικών βακτηρίων κατά τη διάρκεια της θεραπείας με Παλμικά Ηλεκτρικά Πεδία. Η βακτηριακή αναγωγή εκφράζεται ως log CFU/mL. Οι γραμμές σφάλματος αντιπροσωπεύουν την τυπική απόκλιση τριών ανεξάρτητων πειραμάτων (n = 3).

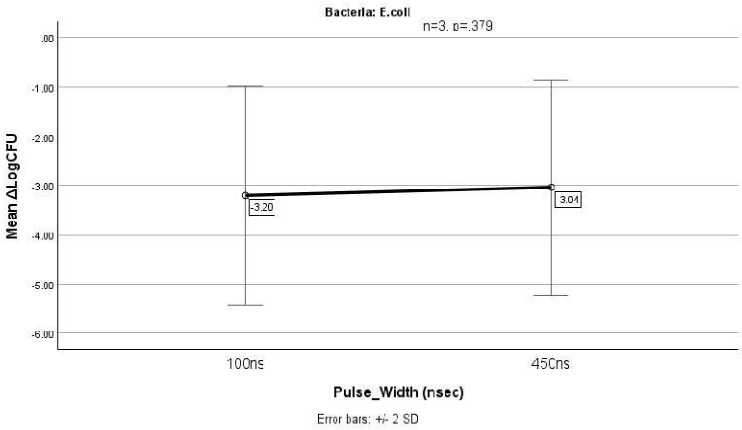
Με αύξηση του πλάτους παλμού από 100 ns σε 450 ns δεν παρατηρήθηκε στατιστικά σημαντική αύξηση της μικροβιακής μείωσης $F(1,159)=2.4$, p=.124. Η μέγιστη τιμή μείωσης (ΔLogCFU=-3.49) παρατηρήθηκε στο μικρότερο πλάτος παλμού (100ns) Σχήμα 10.5



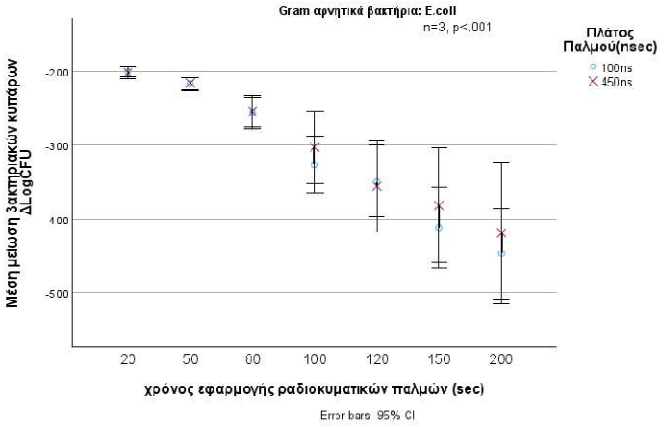
Σχήμα 10.5: Αυξανόμενη αναστολή ανάπτυξης μικροβιακών κυττάρων με την αύξηση της έντασης του ηλεκτρικού πεδίου και του χρόνου θεραπείας. Στον οριζόντιο άξονα παρουσιάζεται ο χρόνος εφαρμογής ραδιοκυματικών παλμών σες. Στον κάθετο άξονα παρουσιάζεται η μέση μείωση των βακτηριακών κυττάρων εκφρασμένη ως ΔLogCFU, οι γραμμές σφάλματος δείχνουν το διάστημα εμπιστοσύνης 95%. Στην αριστερή στήλη εμφανίζεται η μείωση των βακτηριακών κυττάρων για πλάτος παλμού 100ns, ενώ η δεξιά στήλη δείχνει την μείωση των βακτηριακών κυττάρων για πλάτος παλμού 450ns. Η μεταβολή του πλάτους παλμού δεν επηρεάζει σημαντικά το αποτέλεσμαγια κάθε ένταση εφαρμοζόμενου ηλεκτρικού πεδίου.(Balasis *et al.*, 2025)

Gram-αρνητικά βακτήρια

Ανάλογη τάση παρατηρήθηκε και στα Gram-αρνητικά βακτήρια. Όπως φαίνεται στο Σχήμα 10.6, με αύξηση του πλάτους παλμού από 100 ns σε 450 ns δεν παρατηρήθηκε στατιστικά σημαντική αύξηση της μικροβιακής μείωση ς$F(1,159)=.77$, p=.379).



Σχήμα 10.6:Επίδραση του πλάτους του παλμού στην απενεργοποίηση Gram-αρνητικών βακτηρίων κατά τη διάρκεια της θεραπείας με Παλμικά Ηλεκτρικά Πεδία. Η βακτηριακή αναγωγή εκφράζεται ως log CFU/mL. Οι γραμμές σφάλματος αντιπροσωπεύουν την τυπική απόκλιση τριών ανεξάρτητων πειραμάτων (n = 3).

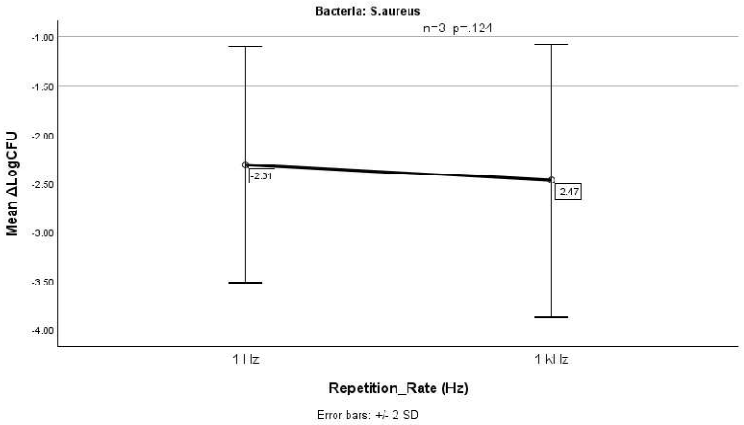


Σχήμα 10.7:Αυξανόμενη αναστολή ανάπτυξηςGramαρνητικών μικροβιακών κυττάρων με την αύξηση του χρόνου θεραπείας. Στον οριζόντιο άξονα παρουσιάζεται ο χρόνος εφαρμογής ραδιοκυματικών παλμών σε s. Στον κάθετο άξονα παρουσιάζεται η μέση μείωση των βακτηριακών κυττάρων εκφρασμένη ως ΔLogCFU, οι γραμμές σφάλματος δείχνουν το διάστημα εμπιστοσύνης 95%. Η μεταβολή του πλάτους παλμού δεν επηρεάζει σημαντικά το αποτέλεσμα.

10.1.3 Επίδραση της συχνότητας επανάληψης του παλμού

Gram-θετικά βακτήρια

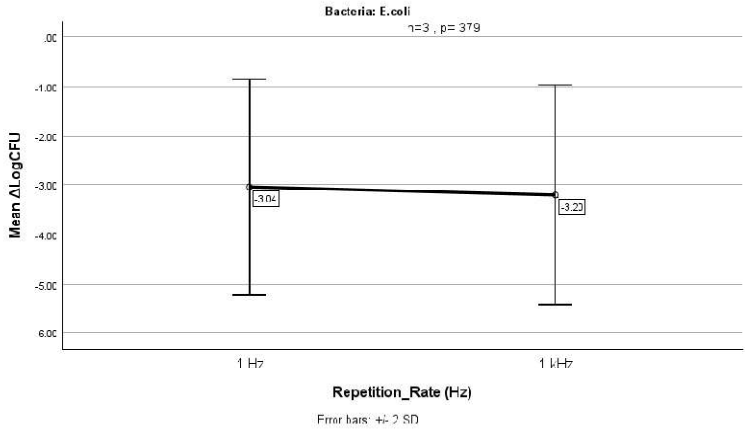
Όπως δείχνει το Σχήμα 10.8 δεν παρατηρήθηκε στατιστικά σημαντική διαφορά μείωσης των μικροβιακών κυττάρων με τη μεταβολή της συχνότητας επανάληψης των παλμών (1Hz- 1000Hz) $F(1,159)=2.4$, $p=.124$). Η μέγιστη τιμή μείωσης (ΔLogCFU=-3.49) παρατηρήθηκε στη μεγαλύτερη συχνότητα παλμού(1kHz).



Σχήμα 10.8: Επίδραση της συχνότητας του παλμού στην απενεργοποίηση Gram-θετικών βακτηρίων κατά τη διάρκεια της θεραπείας με Παλμικά Ηλεκτρικά Πεδία. Η βακτηριακή αναγωγή εκφράζεται ως log CFU/mL. Οι γραμμές σφάλματος αντιπροσωπεύουν την τυπική απόκλιση τριών ανεξάρτητων πειραμάτων (n = 3).

Gram-αρνητικά βακτήρια

Αντίστοιχα και για τα Gram- αρνητικά βακτήρια δεν παρατηρήθηκε στατιστικά σημαντική διαφορά μείωσης των μικροβιακών κυττάρων με τη μεταβολή της συχνότητας των παλμών (1Hz- 1000Hz) και με τη μεταβολή του πλάτους του παλμού (100-450 ns) $F(1,159)=.77$, $p=.379$).όπως φαίνεται στο Σχήμα 10.9



Σχήμα 10.9: Επίδραση της συχνότητας του παλμού στην απενεργοποίηση Gram-αρνητικών βακτηρίων κατά τη διάρκεια της θεραπείας με Παλμικά Ηλεκτρικά Πεδία. Η βακτηριακή αναγωγή εκφράζεται ως log CFU/mL. Οι γραμμές σφάλματος αντιπροσωπεύουν την τυπική απόκλιση τριών ανεξάρτητων πειραμάτων (n = 3).

10.1.4 Επίδραση του χρόνου εφαρμογής των ηλεκτρικών παλμών στην μείωση των βακτηρίων.

Η αύξηση του χρόνου εφαρμογής των ηλεκτρομαγνητικών παλμών (χρόνος θεραπείας) οδήγησε σε σημαντική αύξηση της μικροβιακής απενεργοποίησης και για τα δύο βακτήρια. Η απόκριση ακολούθησε μια δοσοεξαρτώμενη συμπεριφορά με τρεις περιοχές χρονικής εφαρμογής των ραδιοκυματικών παλμών: χαμηλή

επίδραση (20-50s), μεταβατική περιοχή(80-100s) και τελικό plateau(>120s). Αυτό υποδηλώνει ύπαρξη ορίου ηλεκτροπόρησης, πέρα από το οποίο η περαιτέρω αύξηση του χρόνου θεραπείας δεν προσφέρει ουσιαστικό επιπλέον όφελος.

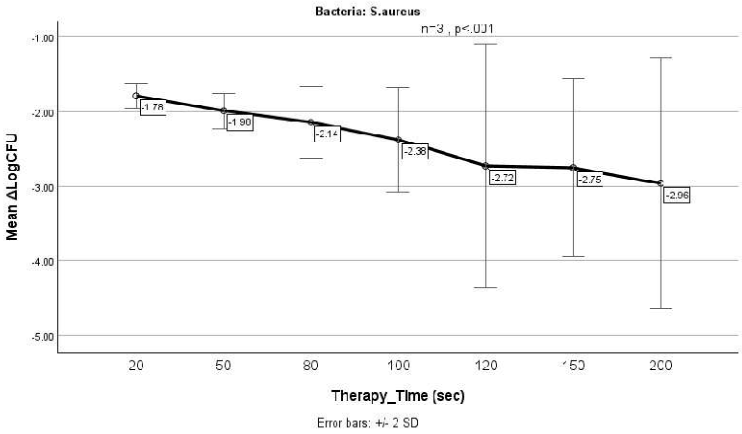
Τα περιγραφικά στατιστικά της μεταβλητής ΔLogCFU για διαφορετικούς χρόνους εφαρμογής των ραδιοκυματικών παλμών (χρόνο θεραπείας) φαίνονται στον Πίνακας 10.3.

Περιγραφικά στατιστικά ΔLogCFU σε σχεση με χρόνο θεραπείας				
Εξαρτημένη μεταβλητή: ΔLogCFU				
Βακτηριακά κύτταρα	Χρόνοςεφαρμογής ραδιοκυματικών παλμών(s)	Μέση τιμή (logCFU/ml)	N	σ
S.aureus	20	-1,7806	22	0,08456
	50	-1,9844	22	0,12092
	80	-2,1399	22	0,24064
	100	-2,3763	24	0,35027
	120	-2,7230	23	0,81513
	150	-2,7460	24	0,59714
	200	-2,9580	24	0,84150
E.coli	20	-2,0077	22	0,10663
	50	-2,1532	22	0,12811
	80	-2,5405	22	0,31118
	100	-3,1563	24	0,67086
	120	-3,5165	23	0,82760
	150	-3,9871	24	0,99302
	200	-4,3458	24	1,17177

Πίνακας 10.3: περιγραφικά στατιστικά δεδομένα της επίδρασης του χρόνου εφαρμογής ραδιοκυματικών παλμών στη μείωση του μικροβιακού πληθυσμού Gram-θετικών και Gram-αρνητικών βακτηριακών κυττάρων.

Gram-θετικά βακτήρια

Σύμφωνα με το Σχήμα 10.10 παρατηρήθηκε σταδιακή μείωση του μέσου όρου της ΔLogCFU με την αύξηση του χρόνου θεραπείας, από −1.78±.1σ στα 20s έως −2.95±.84σ στα 200s για τον *S.aureus*. Η ανάλυση διακύμανσης μιας κατεύθυνσης (one-way ANOVA) έδειξε ότι η αύξηση του χρόνου θεραπείας επηρέασε στατιστικά σημαντικά τη ΔLogCFU ($F(1,159) = 87.6$, $\eta^2 = .378$, $p < 0.001$), όπου F είναι η στατιστική δοκιμασία F για δείγμα πληθυσμού 160, (1, 159) οι βαθμοί ελευθερίας df, η^2το μέγεθος επίδρασης =.378και πιθανότητα ισχύος μηδενικής υπόθεσης= .001 για τον *S.aureus.*



Σχήμα 10.10: Επίδραση του χρόνου εφαρμογής του ηλεκτρικού πεδίου στην απενεργοποίηση Gram-θετικών βακτηρίων κατά τη διάρκεια της θεραπείας με Παλμικά Ηλεκτρικά Πεδία. Η βακτηριακή αναγωγή εκφράζεται ως log CFU/mL. Οι γραμμές σφάλματος αντιπροσωπεύουν την τυπική απόκλιση τριών ανεξάρτητων πειραμάτων (n = 3).

Οι συγκρίσεις γραμμικής παλινδρόμησης Games-Howell (

Πίνακας 10.4) έδειξαν ότι οι χρόνοι θεραπείας 100 s και άνω παρήγαγαν σημαντικά χαμηλότερες τιμές ΔlogCFU σε σύγκριση με τους μικρότερους χρόνους έκθεσης ($p < .001$). Δεν παρατηρήθηκαν σημαντικές διαφορές μεταξύ των μικρότερων διαρκειών (20-80 s). Τα αποτελέσματα της χρήσης της δοκιμασίας Dunnett,η οποία επιτρέπει τον έλεγχο του οικογενειακού σφάλματος (Type I error), διασφαλίζοντας ότι η στατιστική σημαντικότητα δεν οφείλεται σε πολλαπλές συγκρίσεις παρουσιάζονται στον Πίνακας 10.5 χρησιμοποιώντας ως έλεγχο το χρόνο θεραπείας 200s, και τα οποία έδειξαν ότι όλοι οι χρόνοι θεραπείας έως 120 s διέφεραν σημαντικά από την κατάσταση ελέγχου, ενώ τα 150 s όχι ($p = .274$), υποδεικνύοντας ένα φαινόμενο πλατό πέραν των 150 s.

Πίνακας πολλαπλών συγκρίσεων					
Εξαρτημένη μεταβλητή: ΔLogCFU					
Δοκιμασία: Games-Howell					
Βακτηριακό κύτταρο	Ti	Tj	Μέση Διαφορά (LogCFU/ml) (Ti-Tj)	σ	s
S.aureus					
		80	.35926*	0,05438	0,000
		100	.59564*	0,07374	0,000
		120	.94233*	0,17092	0,000
		150	.96536*	0,12322	0,000
		200	1.17737*	0,17271	0,000
	50	20	-.20378*	0,03146	0,000
		80	0,15548	0,05742	0,130
		100	.39186*	0,07601	0,000
		120	.73855*	0,17191	0,004
		150	.76158*	0,12459	0,000
		200	.97358*	0,17369	0,000
	80	20	-.35926*	0,05438	0,000
		50	-0,15548	0,05742	0,130
		100	0,23637	0,08800	0,128
		120	.58307*	0,17754	0,041
		150	.60610*	0,13225	0,001
		200	.81810*	0,17927	0,002
	100	20	-.59564*	0,07374	0,000
		50	-.39186*	0,07601	0,000
		80	-0,23637	0,08800	0,128
		120	0,34670	0,18439	0,508
		150	0,36972	0,14131	0,150
		200	0,58173	0,18606	0,053
	120	20	-.94233*	0,17092	0,000
		50	-.73855*	0,17191	0,004
		80	-.58307*	0,17754	0,041
		100	-0,34670	0,18439	0,508
		150	0,02303	0,20916	1,000
		200	0,23503	0,24165	0,957
	150	20	-.96536*	0,12322	0,000
		50	-.76158*	0,12459	0,000
		80	-.60610*	0,13225	0,001
		100	-0,36972	0,14131	0,150
		120	-0,02303	0,20916	1,000
		200	0,21201	0,21062	0,950
	200	20	-1.17737*	0,17271	0,000
		50	-.97358*	0,17369	0,000
		80	-.81810*	0,17927	0,002
		100	-0,58173	0,18606	0,053
		120	-0,23503	0,24165	0,957
		150	-0,21201	0,21062	0,950
*. Η μέση διαφορά είναι στατιστικά σημαντική στο επίπεδο 0.05.					

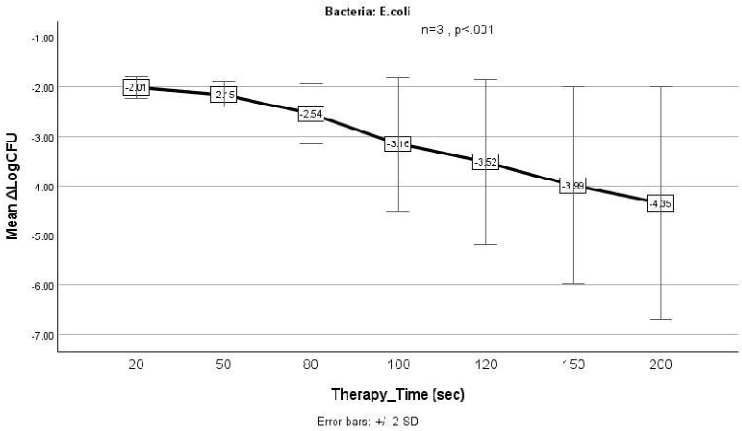
Πίνακας 10.4: Πίνακας δοκιμασίας γραμμικής παλινδρόμησης Games-Howell για την επίδραση του χρόνου εφαρμογής ραδιοκυματικών παλμών στην μείωση των Gram θετικών βακτηριακών κυττάρων. Ti:είναι η ομάδα ελέγχου χρόνου θεραπείας, Tj: αντιπροσωπεύει τις ομάδες χρόνου θεραπείας προς σύγκριση

Πίνακας πολλαπλών συγκρίσεων					
Εξαρτημένη μεταβλητή: ΔLogCFU					
Δοκιμασία Dunnett (t-test διπλής κατεύθυνσης)					
Βακτηριακό κύτταρο	Ti	Tj	Μέση Διαφορά (LogCFU/ml) (Ti-Tj)	σ	s
S.aureus	20	200	1.17737*	0,15705	0,000
	50	200	.97358*	0,15705	0,000
	80	200	.81810*	0,15705	0,000
	100	200	.58173*	0,15360	0,001
	120	200	0,23503	0,15526	0,464
	150	200	0,21201	0,15360	0,558
*. Η μέση διαφορά είναι στατιστικά σημαντική στο επίπεδο 0.05.					

Πίνακας 10.5: Πίνακας δοκιμασίας γραμμικής παλινδρόμησης Dunnettγια την επίδραση του χρόνου εφαρμογής ραδιοκυματικών παλμών στην μείωση των βακτηριακών κυττάρων. Ως ομάδα ελέγχου έχει οριστεί η ομάδα για χρόνο εφαρμογής 200s. Tj:αντιστοιχεί στην ομάδα έλέγχου χρόνου θεραπείας, Ti: αντιστοιχεί στις ομάδες σύγκρισης χρόνου θεραπείας.

Gram-αρνητικά βακτήρια

Όπως φαίνεται στο Σχήμα 10.11 παρατηρήθηκε σταδιακή σημαντικότερη μείωση του μέσου όρου της ΔLogCFU με την αύξηση του χρόνου θεραπείας, από −2.00±.08σ στα 20s έως −4.34±1.1σ στα 200s για την *E.coli.* Η ανάλυση διακύμανσης μιας κατεύθυνσης (one-way ANOVA) έδειξε ότι η αύξηση του χρόνου θεραπείας επηρέασε στατιστικά σημαντικά τη ΔLogCFU ($F(1,159)=198$, $\eta^2=.578$ $p < 0.001$). Ακολούθως οι συγκρίσεις γραμμικής παλινδρόμησης Games- Howell (Πίνακας 10.6) αποκάλυψαν ότι οι χρόνοι θεραπείας 100 s και άνω παρήγαγαν σημαντικά χαμηλότερες τιμές ΔlogCFU σε σύγκριση με τους μικρότερους χρόνους έκθεσης ($p < .001$). Δεν παρατηρήθηκαν σημαντικές διαφορές μεταξύ των μικρότερων διαρκειών (20-80 s). Οι συγκρίσεις Dunnett (Πίνακας 10.7) χρησιμοποιώντας 200 s ως έλεγχο έδειξαν ότι όλοι οι χρόνοι θεραπείας έως 150 s διέφεραν σημαντικά από την κατάσταση ελέγχου, ενώ τα 150 s όχι ($p = .345$), υποδεικνύοντας ένα φαινόμενο πλατό πέραν των 150 s.



Σχήμα 10.11: Επίδραση του χρόνου εφαρμογής του ηλεκτρικού πεδίου στην απενεργοποίηση Gram-αρνητικών βακτηρίων κατά τη διάρκεια της θεραπείας με Παλμικά Ηλεκτρικά Πεδία. Η βακτηριακή αναγωγή εκφράζεται ως log CFU/mL. Οι γραμμές σφάλματος αντιπροσωπεύουν την τυπική απόκλιση τριών ανεξάρτητων πειραμάτων (n = 3).

Πίνακας πολλαπλών συγκρίσεων					
Εξαρτημένη μεταβλητή: ΔLogCFU					
Δοκιμασία: Games-Howell					
Βακτηριακό κύτταρο	Ti	Tj	Μέση Διαφορά (LogCFU/ml) (Ti-Tj)	σ	s
E.coli	20	50	.14545*	0,03554	0,003
		80	.53273*	0,07013	0,000
		100	1.14852*	0,13881	0,000
		120	1.50879*	0,17406	0,000
		150	1.97936*	0,20397	0,000
		200	2.33811*	0,24026	0,000
	50	20	-.14545*	0,03554	0,003
		80	.38727*	0,07175	0,000
		100	1.00307*	0,13964	0,000
		120	1.36334*	0,17472	0,000
		150	1.83390*	0,20453	0,000
		200	2.19265*	0,24074	0,000
	80	20	-.53273*	0,07013	0,000
		50	-.38727*	0,07175	0,000
		100	.61580*	0,15216	0,005
		120	.97607*	0,18488	0,000
		150	1.44663*	0,21328	0,000
		200	1.80538*	0,24822	0,000
	100	20	-1.14852*	0,13881	0,000
		50	-1.00307*	0,13964	0,000
		80	-.61580*	0,15216	0,005
		120	0,36027	0,22030	0,661
		150	.83083*	0,24462	0,024
		200	1.18958*	0,27561	0,002
	120	20	-1.50879*	0,17406	0,000
		50	-1.36334*	0,17472	0,000
		80	-.97607*	0,18488	0,000
		100	-0,36027	0,22030	0,661
		150	0,47056	0,26621	0,576
		200	0,82931	0,29494	0,097
	150	20	-1.97936*	0,20397	0,000
		50	-1.83390*	0,20453	0,000
		80	-1.44663*	0,21328	0,000
		100	-.83083*	0,24462	0,024
		120	-0,47056	0,26621	0,576
		200	0,35875	0,31352	0,911
	200	20	-2.33811*	0,24026	0,000
		50	-2.19265*	0,24074	0,000
		80	-1.80538*	0,24822	0,000
		100	-1.18958*	0,27561	0,002
		120	-0,82931	0,29494	0,097
		150	-0,35875	0,31352	0,911
*. Η μέση διαφορά είναι στατιστικά σημαντική στο επίπεδο 0.05.					

Πίνακας 10.6: Πίνακας δοκιμασίας γραμμικής παλινδρόμησης Games-Howell για την επίδραση του χρόνου εφαρμογής ραδιοκυματικών παλμών στην μείωση των Gramαρνητικών βακτηριακών κυττάρων. Ti:είναι η ομάδα ελέγχου χρόνου θεραπείας, Tj: αντιπροσωπεύει τις ομάδες χρόνου θεραπείας προς σύγκριση

Πίνακας πολλαπλών συγκρίσεων					
Εξαρτημένη μεταβλητή: ΔLogCFU					
Δοκιμασία Dunnett (t-test διπλής κατεύθυνσης)					
Βακτηριακό κύτταρο	Ti	Tj	Μέση Διαφορά (LogCFU/ml) (Ti-Tj)	σ	s
E.coli	20	200	2.33811*	0,21577	0,000
	50	200	2.19265*	0,21577	0,000
	80	200	1.80538*	0,21577	0,000
	100	200	1.18958*	0,21103	0,000
	120	200	.82931*	0,21331	0,001
	150	200	0,35875	0,21103	0,345
*. Η μέση διαφορά είναι στατιστικά σημαντική στο επίπεδο 0.05.					

Πίνακας 10.7: Πίνακας δοκιμασίας γραμμικής παλινδρόμησης Dunnett για την επίδραση του χρόνου εφαρμογής ραδιοκυματικών παλμών στην μείωση των Gramαρνητικών βακτηριακών κυττάρων. Ως ομάδα ελέγχου έχει οριστεί η ομάδα για χρόνο εφαρμογής 200s. Tj:αντιστοιχεί στην ομάδα ελέγχου χρόνου θεραπείας, Ti: αντιστοιχεί στις ομάδες σύγκρισης χρόνου θεραπείας.

10.1.5 Συνδυαστική επίδραση παραμέτρων υψίσυχνωνραδιοκυματικών παλμώνυψηλής ενέργειας

Από τη στατιστική ανάλυση συνδυασμένων ζευγών και συσχετισμών (Paired Samples t-test και Correlations) προέκυψε ότι κυρίαρχοι παράγοντες στη μείωση του αριθμού των μικροβιακών κυττάρων είναι ο χρόνος θεραπείας και η ένταση του πεδίου, καθώς εμφάνισαν τις ισχυρότερες αρνητικές συσχετίσεις ($r = -0.620$ και $r = -0.435$ αντίστοιχα, $p< 0.001$), υποδεικνύοντας ότι η αύξηση αυτών των παραμέτρων οδηγεί σε συστηματική μείωση του μικροβιακού φορτίου. Η διάρκεια παλμού και η συχνότητα των παλμών αν και παρουσίασαν σημαντικές διαφορές ως απόλυτα μεγέθη (T-test), δεν εμφάνισαν στατιστικά σημαντική γραμμική συσχέτιση με τη μείωση του αριθμού των μικροβιακών κυττάρων ($p = 0.150$).

Ακολούθως για να καθορίσουμε το βαθμό συμβολής του κάθε παράγοντα στη μείωση του βακτηριακού πληθυσμού ακολούθησε ανάλυση διακύμανσης παραγόντων (two-way ANOVA). Τα αποτελέσματα για τα Gram-θετικά μικρόβια παρουσιάζονται στον Πίνακας 10.8, ενώ αυτά για τα Gram-αρνητικά παρουσιάζονται στον Πίνακας 10.9

Δοκιμασία επίδρασης μεταβλητών						
Εξαρτημένη μεταβλητή: ΔLogCFU						
Βακτηριακό κύτταρο		Type III άθροισμα τετραγώνων	Βαθμοί ελευθερίαςdf	F-test	S	η_p^2
S.aureus	Διορθωμένο μοντέλο	49.858[a]	27	12,141	<.001	0,711
	Χρόνος εφαρμογής_(s)	25,603	6	28,056	<.001	0,559
	Ενταση πεδίου kV/cm	15,254	3	33,430	<.001	0,430
	Χρόνος εφαρμογής *Ενταση πεδίου	7,266	18	2,654	<.001	0,264
	Σφάλμα εντός των ομάδων	20,229	133	0,152		
R^2= ,711						

Πίνακας 10.8: Αποτελέσματα της ανάλυσης διακύμανσης (ANOVA) για τη μεταβολή του πληθυσμού του βακτηρίου *S.aureus* ως προς την ένταση πεδίου και τον χρόνο θεραπείας. Τα αθροίσματα τετραγώνων υπολογίστηκαν με τη μέθοδο TypeIII, αποτιμώντας τη μοναδική συνεισφορά κάθε παράγοντα και της αλληλεπίδρασης αυτών στο μοντέλο.df: Βαθμοί ελευθερίας, F: Στατιστικό κριτήριο Fisher, S: Στατιστική σημαντικότητα (p-value), η_p^2: Μερικός συντελεστής η^2 (μέγεθος επίδρασης), R^2 : Ο συντελεστής προσδιορισμού υποδηλώνει ότι το μοντέλο ερμηνεύει το 71,1% της συνολικής μεταβλητότητας των δεδομένων.Η αλληλεπίδραση «Χρόνος*Ένταση» (p<.001) υποδεικνύει ότι η επίδραση της έντασης του πεδίου διαφοροποιείται ανάλογα με τη διάρκεια εφαρμογής του.

Δοκιμασία επίδρασης μεταβλητών						
Εξαρτημένη μεταβλητή: ΔLogCFU						
Βακτηριακό κύτταρο		Type III άθροισμα τετραγώνων	Βαθμοί ελευθερίας df	F-test	S	η_p^2
	Διορθωμένο μοντέλο	192,797	27	71,410	<.001	0,988
E.coli	Χρόνος εφαρμογής_sec	1503,269	1	83064,872	<.001	0,998
	Ενταση πεδίου kVcm	110,037	6	1013,374	<.001	0,979
	Χρόνος εφαρμογής *Ενταση πεδίου	50,927	3	938,014	<.001	0,955
	Σφάλμα εντός των ομάδων	2,407	133	0,018		
R^2 = ,988						

Πίνακας 10.9: Αποτελέσματα της ανάλυσης διακύμανσης (ANOVA) για τη μεταβολή του πληθυσμού του βακτηρίου *E. Coli* ως προς την ένταση πεδίου και τον χρόνο θεραπείας Τα αθροίσματα τετραγώνων υπολογίστηκαν με τη μέθοδο TypeIII, αποτιμώντας τη μοναδική συνεισφορά κάθε παράγοντα και της αλληλεπίδρασης αυτών στο μοντέλο. df: Βαθμοί ελευθερίας, F: Στατιστικό κριτήριο Fisher, S: Στατιστική σημαντικότητα (p-value), η_p^2: Μερικός συντελεστής η^2 (μέγεθος επίδρασης), R^2 : Ο συντελεστής προσδιορισμού υποδηλώνει ότι το μοντέλο ερμηνεύει το 98,8% της συνολικής μεταβλητότητας των δεδομένων. Η αλληλεπίδραση «Χρόνος*Ένταση» (p<.001) υποδεικνύει ότι η επίδραση της έντασης του πεδίου διαφοροποιείται ανάλογα με τη διάρκεια εφαρμογής του.

Με την ανάλυση διακύμανσης δύο παραγόντων (two-way ANOVA) για την αξιολόγηση της επίδρασης της έντασης του ηλεκτρικού πεδίου και του χρόνου εφαρμογής των παλμών στη μείωση του πληθυσμού των μικροβιακών κυττάρων για το βακτήριο *E.coli* αποδείχθηκε ότι το συνολικό μοντέλο ήταν στατιστικά σημαντικό, $F(27,133) = 394.564$, $p < .001$, εξηγώντας το 98.8% της διακύμανσης ($R^2 = .988$, Adjusted $R^2 = .985$).

Παρατηρήθηκε σημαντική κύρια επίδραση της έντασης του πεδίου , $F(3,133) = 938.014$, $p < .001$, partial $\eta^2 = .955$, καθώς και του χρόνου εφαρμογής, $F(6,133) = 1013.374$, $p < .001$, partial $\eta^2 = .979$.

Επιπλέον, εντοπίστηκε στατιστικά σημαντική αλληλεπίδραση μεταξύ των δύο παραγόντων, $F(18,133) = 79.717$, $p < .001$, partial $\eta^2 = .915$, υποδηλώνοντας ότι η επίδραση της έντασης του πεδίου στη μείωση του μικροβιακού φορτίου εξαρτάται από τη διάρκεια της θεραπείας.

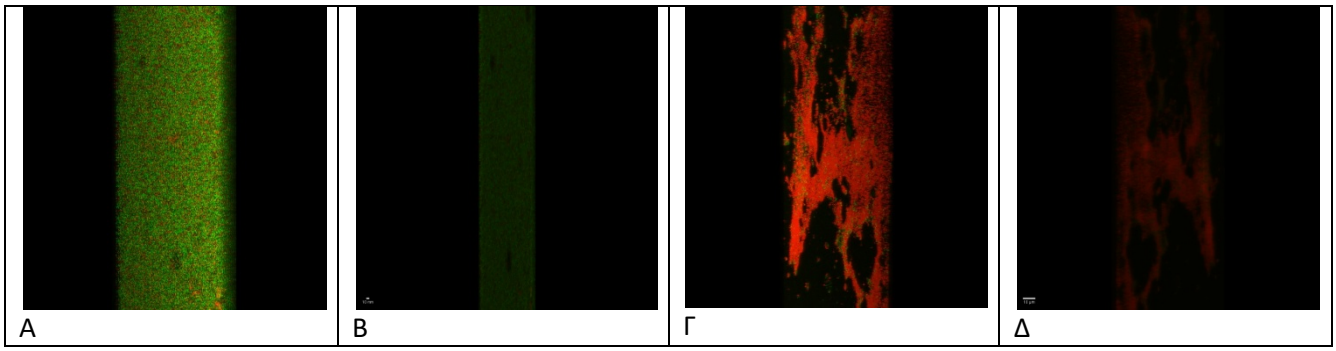
Με την ανάλυση διακύμανσης δύο παραγόντων (two-way ANOVA) για την αξιολόγηση της επίδρασης της έντασης του ηλεκτρικού πεδίου και του χρόνου εφαρμογής των παλμών στη μείωση του πληθυσμού των μικροβιακών κυττάρων για το βακτήριο *S.aureus* αποδείχθηκε επίσης ότι το συνολικό μοντέλο, δηλαδή η ένταση ηλεκτρικού πεδίου ηλεκτρομαγνητικού παλμού σε συνδυασμό με το χρόνο εφαρμογής των ραδιοκυματικών παλμών ήταν στατιστικά σημαντικό, $F(27,133) = 12.141$, $p < .001$, εξηγώντας το 71.1% της διακύμανσης ($R^2 = .711$, Adjusted $R^2 = .653$). Και σε αυτήν την περίπτωση διαπιστώθηκε σημαντική κύρια επίδρασητου χρόνου εφαρμογής των παλμών, $F(6,133) = 28.056$, $p < .001$, partial $\eta^2 = .559$ κατά πρώτο λόγο και της έντασης του πεδίου, $F(3,133) = 33.430$, $p < .001$, partial $\eta^2 = .430$ κατά δεύτερο λόγο.

Επιπλέον, παρατηρήθηκε στατιστικά σημαντική αλληλεπίδραση μεταξύ των δύο παραγόντων, $F(18,133) = 2.654$, $p< .001$, partial $\eta^2 = .264$, υποδηλώνοντας ότι η επίδραση της έντασης μεταβάλλεται ανάλογα με τη διάρκεια του χρόνου θεραπείας.

Τα αποτελέσματα αν και στατιστικά σημαντικά και για τις δύο κατηγορίες μικροοργανισμών καταδεικνύουν σαφείς διαφορές στη συμπεριφορά αυτών ως προς την απόκρισή τους στους εξεταζόμενους παράγοντες.

10.2 Πειραματικά αποτελέσματα σε βιομεμβράνες

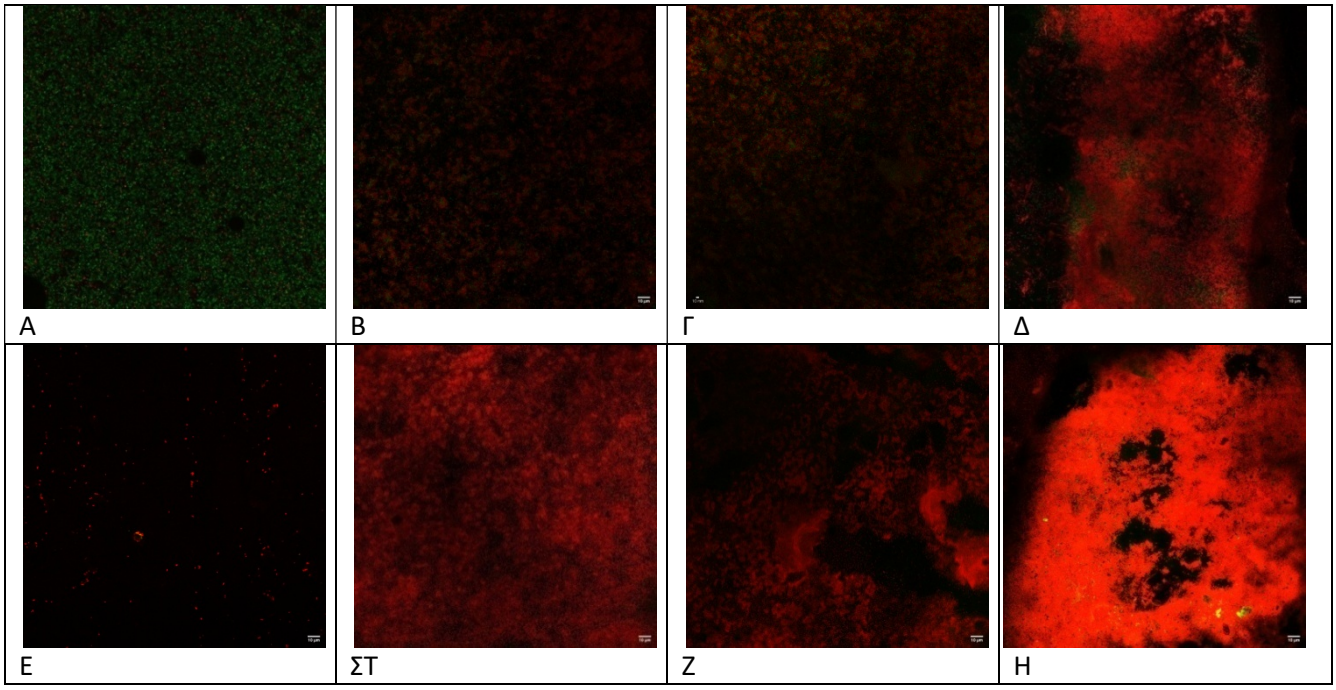
Τα αποτελέσματα της επίδρασης των βραχύβιων ραδιοκυματικών κυμάτων σε βιομεμβράνες μελετήθηκαν με χρήση συνεστιακής μικροσκοπίας. Έγινε εφαρμογή ηλεκτρικού πεδίου έντασης πεδίου 10 kV/cm, για χρόνο εφαρμογής 120s και 200s με πλάτος παλμού 100ns και 450nsκαι συχνότητες επανάληψης παλμών (1,5, 1000)Hz. Παρατηρήθηκε σημαντική μείωση στο πάχος της βιομεμβράνης καθώς και σημαντική μικροβιοκτόνος δράση.



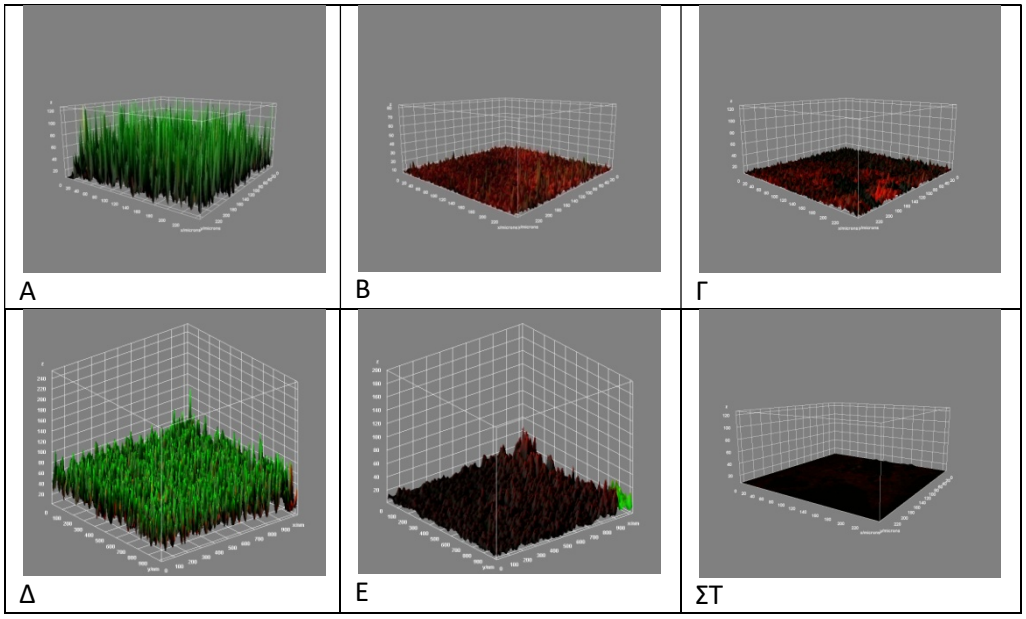
Εικόνα 10.3: Εικόνες συνεστιακής μικροσκοπίας με χρώση SYTO9/PI. Τα ζωντανά μικροβιακά κύτταρα χρωματίζονται πράσινα, ενώ τα νεκρά με κόκκινο χρώμα. Α, Β: βιομεμβράνες μάρτυρες (χωρίς εφαρμογή ραδιοκυματικών παλμών), Γ: βιομεμβράνες μετά από εφαρμογή ραδιοκυματικών παλμών (1Hz, 100ns, 200s), Δ: βιομεμβράνες μετά από εφαρμογή ραδιοκυματικών παλμών (5Hz, 450ns, 200s)

Η βιομεμβράνη θετικός μάρτυρας (χωρίς εφαρμογή ραδιοκυματικών παλμών) ανερχόταν σε πάχος 81,95(±1.77σ)nm, και ο λόγος ζωντανών προς νεκρά βακτηριακά κύτταρα [(Live/Dead)×100%]ήταν 99%. Στον αρνητικό μάρτυρα (βιομεμβράνη χωρίς ακτινοβόληση ραδιοκυματικών παλμών με εφαρμογή διαλύματος ισοπροπυλικής αλκοόλης) το πάχος ανερχόταν σε 8.21(±2.91σ)nm και ο λόγος [(Live/Dead)×100%] ήταν 0,3(±.31σ)%.

ΣτηνΕικόνα 10.3 και στην Εικόνα 10.4 παρουσιάζονται ενδεικτικές εικόνες από την μελέτη της βιομεμβράνης με χρήση συνεστιακής μικροσκοπίας και χρώση SYTO9/PI μετά από την εφαρμογή ραδιοκυματικών παλμών .



Εικόνα 10.4: Απεικόνιση αποτελεσμάτων εφαρμογής ραδιοκυματικών παλμών σε βιομεμβράνες με χρήση συνεστιακής μικροσκοπίας και χρώση SYTO9/PI. Α: βιομεμβράνη μάρτυρας, Ε: βιομεμβράνη αρνητικός μάρτυρας (με εφαρμογή διαλύματος ισοπροπυλικήςαλκόλης), Β, Γ, Δ: βιομεμβράνη με εφαρμογή ραδιοκυματικών παλμών για χρόνο εφαρμογής 120s. ΣΤ, Ζ, Η: βιομεμβράνη με εφαρμογή ραδιοκυματικών παλμών για χρόνο εφαρμογής 200s.



Εικόνα 10.5: Τρισδιάστατη απεικόνιση βιομεμβράνης με χρήση του προγράμματος ImageJκαι συνεστιακή μικροσκοπία με χρώση SYTO9/PI. Α, Δ: βιομεμβράνη μάρτυρας (χωρίς εφαρμογή ραδιοκυματικών παλμών), ΣΤ: βιομεμβράνη αρνητικός μάρτυρας (χωρίς εφαρμογή ραδιοκυματικών παλμών με προσθήκη ισοπροπυλικής αλκοόλης), Β, Γ, Ε: βιομεμβράνη μετά από εφαρμογή ραδιοκυματικών παλμών.

Στον Πίνακας 10.10 που ακολουθεί φαίνεται το πάχος της βιομεμβράνης και ο λόγος ζωντανών προς νεκρά βακτηριακά κύτταρα [(Live/Dead)×100%] μετά από την εφαρμογή των ραδιοκυματικών παλμών.

χρόνος εφαρμογής ραδιοκυματικών παλμών (s)	Πλάτος παλμού (ns)	Συχνότητα επανάληψης Παλμών (Hz)	Πάχος βιομεμβράνης(nm)	(Live/Dead)×100%
120	100	1	22.8 (±3.83σ)	0,69(±.21σ)
120	100	5	24.54(±3.39σ)	0,49(±.14σ)
120	100	1000	28.36 (±3.16σ)	0.57(±.19σ)
120	450	1	28.82(±3.1σ)	0.49(±.13σ)
120	450	5	26.54(±2.00σ)	0.55(±.31σ)
120	450	1000	27.98(±3.67σ)	3.12(±7.71σ)
200	100	1	18.95(±2.03σ)	0,54(±.38σ)
200	100	5	17.15(±3.93σ)	0.32(±.16σ)
200	100	1000	22.11(±3.03σ)	0.68(±0.49σ)
200	450	1	23.32(±3.60σ)	0.35(±.13σ)
200	450	5	19.50(±2.13σ)	0.78(±.46σ)
200	450	1000	22.45(±3.33σ)	0.61(±.58σ)

Πίνακας 10.10: Συγκεντρωτικός πίνακας αποτελεσμάτων εφαρμογής ραδιοκυματικών παλμών σε βιομεμβράνηπολυανθεκτικούGram- θετικού μικροβίου.

10.2.1 Επίδραση πλάτους παλμού στο πάχος βιομεμβράνης και στην επιβίωση βακτηριακών κυττάρων

Η δοκιμασία Levene υπέδειξε παραβίαση της ομοιογένειας των διακυμάνσεων, $F(2,1024)=72.5$, $p<.001$. Ως εκ τούτου, για την ανάλυση των δεδομένων χρησιμοποιήθηκε η δοκιμασία Welch ANOVA.Στις περιπτώσεις αυτές, η Welch ANOVA θεωρείται καταλληλότερη από την παραδοσιακή ANOVA, καθώς προσαρμόζει τους βαθμούς ελευθερίας και ελαχιστοποιεί την πιθανότητα στατιστικού σφάλματος λόγω των διαφορών στη διασπορά των δεδομένων. Ο συντελεστής F του Welch , $F(2, 651.063)=1207.4$, $p<.001$ έδειξε ισχυρή αρνητική σχέση μεταξύ του πάχους βιομεμβράνης και του πλάτους παλμού.

Ο δείκτης μεγέθους αποτελέσματος $\eta^2=0.653$ υποδηλώνει το πλάτος παλμού ερμηνεύει το 65.3% της διακύμανσης του πάχους της βιομεμβράνης, γεγονός που αποδεικνύει ιδιαίτερα ισχυρή επίδραση.

Εφαρμόζοντας γραμμική παλινδρόμηση και για τις πολλαπλές συγκρίσεις η δοκιμασία Games-Howell έδειξε ότι όλες οι πειραματικές ομάδες διέφεραν σημαντικά μεταξύ τους ως προς το πάχος του βιοϋμενίου ($p<.001$). Η ομάδα ελέγχου παρουσίασε το μέγιστο πάχος βιοϋμενίου, ενώ η εφαρμογή παλμού εύρους 100ns οδήγησε στη μεγαλύτερη μείωση αυτού. Παρόλο που η ομάδα των 450ns παρουσίασε επίσης σημαντική μείωση σε σχέση με τον έλεγχο, το πάχος του βιοϋμενίου ήταν ελαφρώς αυξημένο σε σύγκριση με την ομάδα των 100ns (μέση διαφορά 2.04, <.001)

Αντίστοιχα ο συντελεστής F του Welch , $F(2, 454.338)=2396.120$, $p<.001$ έδειξε ισχυρή αρνητική σχέση μεταξύ του λόγου ζωντανών/νεκρών βακτηριακών κυττάρων [(Live/Dead)×100%] και του πλάτους παλμού.

Ο δείκτης μεγέθους αποτελέσματος $\eta^2=0.784$ υποδηλώνει το πλάτος παλμού ερμηνεύει το 78.4% της διακύμανσης του λόγου ζωντανών/νεκρών βακτηριακών κυττάρων [(Live/Dead)×100%], γεγονός που αποδεικνύει ιδιαίτερα ισχυρή επίδραση.

Εφαρμόζοντας γραμμική παλινδρόμηση και για τις πολλαπλές συγκρίσεις η δοκιμασία Games-Howell έδειξε ότι όλες οι πειραματικές ομάδες διέφεραν σημαντικά με την ομάδα ελέγχου ως προς το λόγο

ζωντανών/νεκρών βακτηριακών κυττάρων [(Live/Dead)×100%] (p<.001). Η ομάδα ελέγχου παρουσίασε το μέγιστο λόγο ζωντανών/νεκρών βακτηριακών κυττάρων [(Live/Dead)×100%], ενώ η εφαρμογή παλμού εύρους 100ns οδήγησε στη μεγαλύτερη μείωση αυτού. Παρόλο που η ομάδα των 450ns παρουσίασε επίσης σημαντική μείωση σε σχέση με την ομάδα ελέγχου, ο λόγος ζωντανών/νεκρών βακτηριακών κυττάρων [(Live/Dead)×100%] ήταν ελαφρώς αυξημένος σε σύγκριση με την ομάδα των 100ns (μέση διαφορά 0.65, p=.036)

10.2.2 Επίδραση συχνότητας επανάληψης παλμού στο πάχος βιομεμβράνης και στην επιβίωση βακτηριακών κυττάρων

Και σε αυτή την περίπτωση λόγω παραβίασης της ομοιογένειας των διακυμάνσεων (Levene's test p<.001) για την ανάλυση των δεδομένων χρησιμοποιήθηκε η δοκιμασία Welch ANOVA. Ο συντελεστής F του Welch , F(3, 423.202)=808.78, p<.001 έδειξε ισχυρή αρνητική σχέση μεταξύ του πάχους βιομεμβράνης και του πλάτους παλμού.

Ο δείκτης μεγέθους αποτελέσματος η^2=0.653 υποδηλώνει η συχνότητα επανάληψης του παλμού ερμηνεύει το 65.3% της διακύμανσης του πάχους της βιομεμβράνης, γεγονός που αποδεικνύει ιδιαίτερα ισχυρή επίδραση.

Εφαρμόζοντας γραμμική παλινδρόμηση και για τις πολλαπλές συγκρίσεις η δοκιμασία Games-Howell έδειξε ότι όλες οι πειραματικές ομάδες διέφεραν σημαντικά με την ομάδα ελέγχου ως προς το πάχος του βιοϋμενίου (p<.001). Η ομάδα ελέγχου παρουσίασε το μέγιστο πάχος βιοϋμενίου, ενώ η εφαρμογή παλμών με συχνότητα επανάληψης 5 Hz οδήγησε στη μεγαλύτερη μείωση αυτού (μέση τιμή 21.73±4.85σ). Παρόλο που η ομάδα των 1kHz παρουσίασε επίσης σημαντική μείωση σε σχέση με τον έλεγχο, το πάχος του βιοϋμενίου ήταν ελαφρώς αυξημένο σε σύγκριση με την ομάδα των 5 Hz (μέση διαφορά 3.404, <.001)

Αντίστοιχα ο συντελεστής F του Welch , F(3, 1596.146)=427.933, p<.001 έδειξε ισχυρή αρνητική σχέση μεταξύ του λόγου ζωντανών/νεκρών βακτηριακών κυττάρων [(Live/Dead)×100%] και της συχνότητας επανάληψης του παλμού.

Ο δείκτης μεγέθους αποτελέσματος η^2=0.784 υποδηλώνει η συχνότητα επανάληψης του παλμού ερμηνεύει το 78.4% της διακύμανσης του λόγου ζωντανών/νεκρών βακτηριακών κυττάρων [(Live/Dead)×100%], γεγονός που αποδεικνύει ιδιαίτερα ισχυρή επίδραση.

Εφαρμόζοντας γραμμική παλινδρόμηση και για τις πολλαπλές συγκρίσεις η δοκιμασίαGames-Howell έδειξε ότι όλες οι πειραματικές ομάδες διέφεραν σημαντικά με την ομάδα ελέγχου ως προς το λόγο ζωντανών/νεκρών βακτηριακών κυττάρων [(Live/Dead)×100%] (p<.001). Η ομάδα ελέγχου παρουσίασε το μέγιστο λόγο ζωντανών/νεκρών βακτηριακών κυττάρων [(Live/Dead)×100%], (μέση τιμή 88.45±30σ) ενώ η εφαρμογή παλμώνμε συχνότητα επανάληψης 1Hz οδήγησε στη μεγαλύτερη μείωση αυτού. Παρόλο που η ομάδα των 1kHz παρουσίασε επίσης σημαντική μείωση σε σχέση με την ομάδα ελέγχου, ο λόγος ζωντανών/νεκρών βακτηριακών κυττάρων [(Live/Dead)×100%] ήταν ελαφρώς αυξημένος σε σύγκριση με την ομάδα των 1Hz (μέση διαφορά -0.89, p=.044)

10.2.3 Επίδραση χρόνου εφαρμογής παλμών στο πάχος βιομεμβράνης και στην επιβίωση βακτηριακών κυττάρων

Και σε αυτή την περίπτωση λόγω παραβίασης της ομοιογένειας των διακυμάνσεων (Levene's test p<.001) για την ανάλυση των δεδομένων χρησιμοποιήθηκε η δοκιμασία Welch ANOVA. Ο συντελεστής F του Welch , F(2, 678.917)=1082.227, p<.001 έδειξε συσχέτιση μεταξύ του πάχους βιομεμβράνης και του χρόνου εφαρμογής των παλμών.

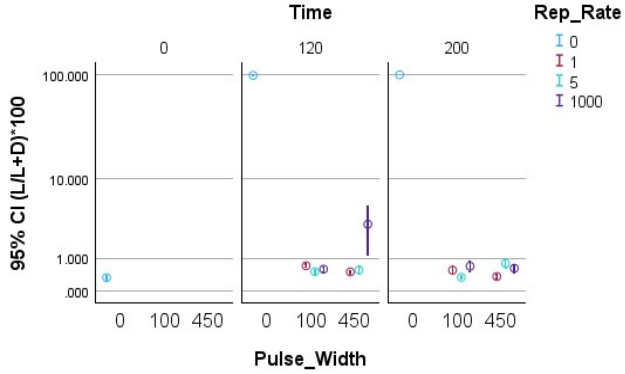
Ο δείκτης μεγέθους αποτελέσματος η^2=0.139 υποδηλώνει ο χρόνος εφαρμογής των παλμών ερμηνεύει το 13.9% της διακύμανσης του πάχους της βιομεμβράνης, γεγονός που δείχνει μέτρια προς ισχυρή επίδραση.

Εφαρμόζοντας γραμμική παλινδρόμηση και για τις πολλαπλές συγκρίσεις η δοκιμασία Games-Howell έδειξε ότι όλες οι πειραματικές ομάδες διέφεραν σημαντικά με την ομάδα ελέγχου ως προς το πάχος του βιοϋμενίου (p<.001). Η ομάδα ελέγχου παρουσίασε το μέγιστο πάχος βιοϋμενίου, ενώ η εφαρμογή παλμών για 200s οδήγησε στη μεγαλύτερη μείωση αυτού (μέση τιμή 17.15±3.93σ). Η ομάδα των 120s παρουσίασε επίσης σημαντική μείωση σε σχέση με τον έλεγχο, το πάχος του βιοϋμενίου ήταν ελαφρώς αυξημένο σε σύγκριση με την ομάδα των 200s στο όριο της στατιστικής σημαντικότητας (μέση διαφορά 4.193,p=.046)

Αντίστοιχα ο συντελεστής F του Welch , F(2, 642.831)=558.886, p<.001 έδειξε συσχέτιση μεταξύ του λόγου ζωντανών/νεκρών βακτηριακών κυττάρων [(Live/Dead)×100%] και του χρόνου εφαρμογής των παλμών.

Ο δείκτης μεγέθους αποτελέσματος η^2=0.065 υποδηλώνει ο χρόνος εφαρμογής των παλμών ερμηνεύει το 6.5% της διακύμανσης του λόγου ζωντανών/νεκρών βακτηριακών κυττάρων [(Live/Dead)×100%], γεγονός που αποδεικνύει μέτρια επίδραση.

Εφαρμόζοντας γραμμική παλινδρόμηση και για τις πολλαπλές συγκρίσεις η δοκιμασία Games-Howell έδειξε ότι όλες οι πειραματικές ομάδες διέφεραν σημαντικά με την ομάδα ελέγχου ως προς το λόγο ζωντανών/νεκρών βακτηριακών κυττάρων [(Live/Dead)×100%](p<.001). Η ομάδα ελέγχου παρουσίασε το μέγιστο λόγο ζωντανών/νεκρών βακτηριακών κυττάρων [(Live/Dead)×100%], (μέση τιμή 88.45%±30σ) ενώ για χρόνο εφαρμογής παλμών200 s παρατηρήθηκε η μεγαλύτερη μείωση αυτού (μέση τιμή 0.32%±0.16σ). Η μέση διαφορά με την ομάδα των 120s ήταν (-1.94±3.1σ), p=.812, στατιστικά μη σημαντική διαφορά (Σχήμα 10.12).



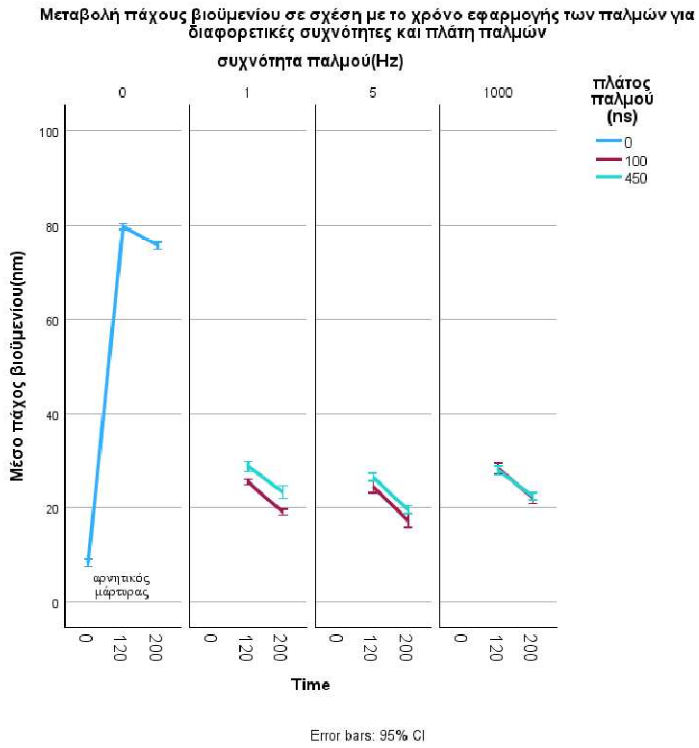
10.12: Γραφική παράσταση επιβίωσης βακτηριακών κυττάρων εντός της βιομεμβράνης μετά από την εφαρμογή ραδιοκυματικών παλμών σε σχέση με το πλάτος παλμού και τη συχνότητα επανάληψης των παλμών για διαφορετικούς χρόνους θεραπείας

Η ανάλυση πολλαπλών συγκρίσεων (pairwise comparisons) ανέδειξε στατιστικά σημαντικές διαφορές μεταξύ της ομάδας ελέγχου (NGT_CNTR) και όλων των πειραματικών συνθηκών ($p< 0.001$), με μεγάλες διαφορές στο πάχος του βιοφίλμ, γεγονός που υποδηλώνει ισχυρή επίδραση της εφαρμοζόμενης θεραπείας.

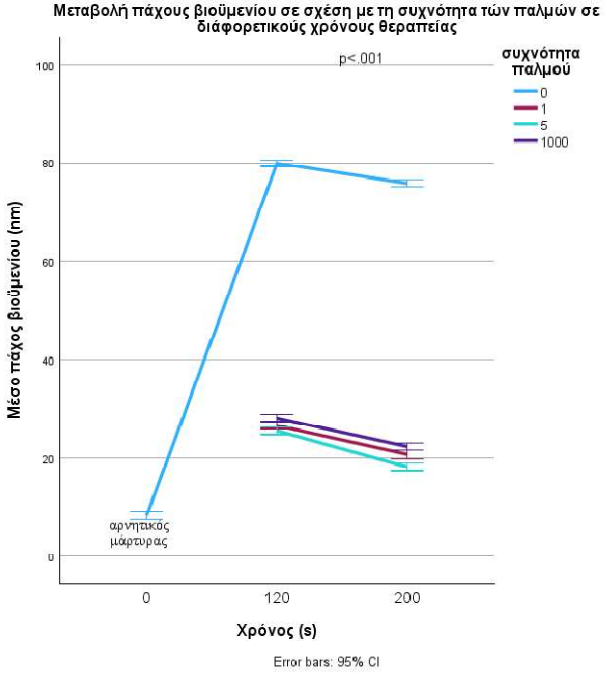
Μεταξύ των πειραματικών ομάδων, παρατηρήθηκαν μικρότερες αλλά σε αρκετές περιπτώσεις στατιστικά σημαντικές διαφορές, κυρίως ως προς τη μεταβολή της συχνότητας εφαρμογής παλμών (Repetition Rate). Συγκεκριμένα, η μετάβαση από χαμηλές συχνότητες (Hz) σε υψηλότερες (kHz) συνοδεύτηκε από σημαντικές μεταβολές στο πάχος του βιοφίλμ. Σε συνθήκες εφαρμογής ραδιοκυματικών παλμών πλάτους παλμού των 100ns, η αύξηση της συχνότητας από το 1Hz στα 5Hz οδήγησε σε στατιστικά σημαντική μείωση του βάθους (Mean Difference= 2.259, $p= .049$), ενώ η περαιτέρω αύξηση στο 1kHz εμφάνισε στατιστικά σημαντική μεταβολή στην αποδοτικότητα της μεθόδου (Mean Difference = 2.432, $p= .011$).

Η τιμή του πλάτους παλμού από τα 100ns στα 450ns είχε σημαντική επίδραση στο πάχος του βιοϋμενίου. Συγκεκριμένα, η ομάδα 100ns/1Hz παρουσίασε στατιστικά σημαντικά μεγαλύτερη μείωση πάχους βιοϋμενίου (περισσότερο αποδοτική) σε σχέση με την ομάδα 450ns/1Hz (Mean Difference = 3.271, $p< .001$). Η επίδραση του πλάτους παλμού σε υψηλότερες τιμές (450ns) φάνηκε να εμφανίζει μικρότερη αποτελεσματικότητα σε υψηλότερη συχνότητα επανάληψης παλμών, γεγονός που πιθανώς να οφείλεται στην οριακή λειτουργία της πρωτότυπης συσκευής.

Συνολικά, τα αποτελέσματα υποδεικνύουν ότι, όλα τα πρωτόκολλα θεραπείας παρουσιάζουν στατιστικά σημαντικά διαφοροποίηση από την ομάδα ελέγχου ως προς το υπολειπόμενο πάχος βιομεμβράνης, εξαρτώμενα κυρίως από τη συχνότητα επανάληψης παλμών και δευτερευόντως από το πλάτος παλμού και από το χρόνο θεραπείας, όπως φαίνεται τους παρακάτω πίνακες. Και απεικονίζεται στοΣχήμα 10.13 και Σχήμα 10.14.

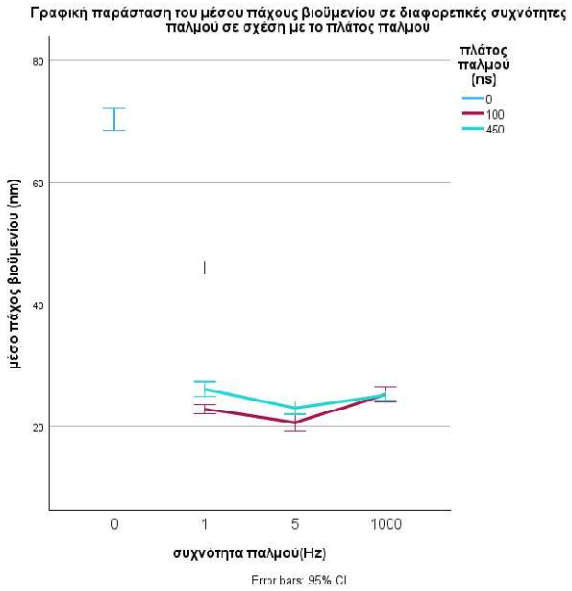


Σχήμα 10.13: Επίδραση του χρόνου θεραπείας στο πάχος του βιοφίλμ σε διαφορετικές συνθήκες πλάτους παλμού. Παρατηρείται ισχυρή χρονικά εξαρτώμενη απόκριση, με στατιστικά σημαντικές διαφορές σε όλα τα χρονικά σημεία ($p < .001$). Οι διακυμάνσεις μεταξύ των επιπέδων πλάτους παλμού υποδεικνύουν μια μέτρια επίδραση στο πάχος του βιοφίλμ, η οποία γίνεται αμελητέα στις υψηλότερες συχνότητες παλμού. Στο αριστερό κάτω άκρο του σχήματος παρουσιάζεται το πάχος του βιοϋμενίου στις συνθήκες του αρνητικού μάρτυρα.

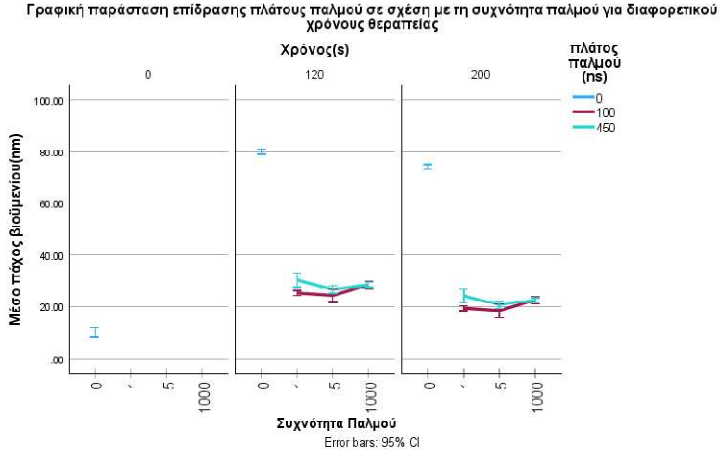


Σχήμα 10.14:Αλληλεπίδραση μεταξύ χρόνου έκθεσης και συχνότητας παλμού στο πάχος του βιοφίλμ. Οι σε μεγάλο βαθμό παράλληλες τάσεις υποδηλώνουν μη σημαντικά αλληλεπιδραστικά φαινόμενα, υποδεικνύοντας ότι οι παράγοντες δρουν ανεξάρτητα. Στην αριστερή κάτω πλευρά του σχήματος σημειώνεται το πάχος του βιοϋμενίου του αρνητικού μάρτυρα.

Θεωρώντας ως εξαρτημένη μεταβλητή τη συχνότητα εφαρμογής των ηλεκτρομαγνητικών παλμών, απεικονίζεται η επίδραση τους πλάτους των παλμών στο υπολειπόμενο πάχος της βιομεμβράνηςΣχήμα 10.15 και Σχήμα 10.16.



Σχήμα 10.15: Επίδραση της συχνότητας παλμού στο πάχος του βιοφίλμ(βιοϋμενίου). Η αύξηση της συχνότητας παλμού σχετίζεται με μείωση του πάχους του βιοφίλμ, ιδιαίτερα σε χαμηλότερα επίπεδα (1 και 5), με στατιστικά σημαντικές διαφορές (p < .001). Σε υψηλές συχνότητες η επίδραση του πλάτους παλμού είναι αμελητέα.



Σχήμα 10.16: Επίδραση της συχνότητας παλμού στο βάθος του βιοφίλμ. Η αύξηση της συχνότητας παλμού σχετίζεται με μείωση του βάθους του βιοφίλμ, ιδιαίτερα σε χαμηλότερα επίπεδα (1 και 5), με στατιστικά σημαντικές διαφορές (p < .001). Η επίδραση ποικίλλει ανάλογα με τις συνθήκες πλάτους παλμού. Σε υψηλές συχνότητες η επίδραση του πλάτους παλμού είναι αμελητέα.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 11: ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ-ΣΥΖΗΤΗΣΗ-ΜΕΛΛΟΝΤΙΚΑ ΣΧΕΔΙΑ

Η μικροβιακή αντοχή αποτελεί μία από τις σημαντικότερες παγκόσμιες απειλές για τη δημόσια υγεία, καθώς περιορίζει την αποτελεσματικότητα των αντιβιοτικών και αυξάνει τη νοσηρότητα, τη θνητότητα και το κόστος περίθαλψης. Η συνεχής εμφάνιση πολυανθεκτικών στελεχών καθιστά επιτακτική την ανάπτυξη νέων καινοτόμων θεραπευτικών μη φαρμακευτικών προσεγγίσεων, πέραν της συμβατικής αντιμικροβιακής αγωγής, ικανών να αντιμετωπίσουν ανθεκτικά μικρόβια με ασφαλή και αποτελεσματικό τρόπο, περιορίζοντας παράλληλα την περαιτέρω εξέλιξη της μικροβιακής αντοχής.

Η καινοτομία αυτής της μελέτης ήταν να διερευνηθεί η επίδραση βραχύβιων ηλεκτρομαγνητικών παλμών υψηλής ενέργειας, από πρωτότυπη συσκευή παραγωγής RF παλμών υψηλής έντασης, σε πολυανθεκτικά βακτηριακά στελέχη που απαντώνται σε επιμολυσμένα χρόνια δερματικά έλκη καθώς επίσης η συμβολή τους στην αντιμετώπιση τέτοιων ανθεκτικών βακτηρίων σε πειραματικό μοντέλο βιομεμβράνης.

Διερευνήθηκε η αντιμικροβιακή δράση των παραγόμενων ραδιοκυματικών παλμών σε διαφορετικές εντάσεις ηλεκτρικού πεδίου, για διαφορετικά πλάτη παλμού πάντοτε σε κλίμακα ns, για διαφορετικές συχνότητες επανάληψης παλμών και για διαφορετικούς χρόνους εφαρμογής των παλμών (χρόνος θεραπείας). Τα πολυανθεκτικά στελέχη που μελετήθηκαν απομονώθηκαν από καλλιέργειες χρόνιων δερματικών ελκών

Η παρούσα μελέτη σε ότι αφορά το κύριο ερευνητικό ερώτημα ανέδειξε τη δραστικότητα της πρωτότυπης συσκευής παραγωγής ραδιοκυματικών παλμών πολύ μεγάλης έντασης ηλεκτρικού πεδίου σε ανθεκτικά βακτήρια in- vitro. Παρατηρήθηκε αυξημένη αναστολή ανάπτυξης βακτηριακών κυττάρων με την αύξηση της έντασης του ηλεκτρικού πεδίου, η οποία φτάνει σε πλατό περίπου σε τιμές έντασης ηλεκτρικού πεδίου 10kV/cm. Ο χρόνος εφαρμογής των ραδιοκυματικών παλμών είναι ισχυρός παράγοντας αναστολής ανάπτυξης των βακτηριακών κυττάρων. Μάλιστα σε χρόνους θεραπείας μεγαλύτερους από 120s παρατηρήσαμε την βέλτιστη απόδοση της συσκευής με μείωση του μικροβιακού πληθυσμού κατά περίπου 4 λογαριθμικές κλίμακες (Balasis et al., 2025). Το πλάτος του παλμού, το οποίο στη μελέτη μας ήταν της τάξης των (100-450)ns δε φάνηκε να επηρεάζει σημαντικά το αποτέλεσμα. Επίσης η συχνότητα επανάληψης των παλμών δε φάνηκε να επηρεάζει το τελικό απότέλεσμα.

Στη δεύτερη φάση δημιουργήθηκε πειραματικό μοντέλο βιομεμβράνης ανθεκτικών βακτηρίων και εφαρμόστηκαν οι βέλτιστες συνθήκες που βρέθηκαν στο πρώτο στάδιο με τη βοήθεια ειδικού ηλεκτροδίου (interdigital sensor 50μm). Τα αποτελέσματα ήταν επίσης πολύ ενθαρρυντικά μιας και παρατηρήθηκε σχεδόν καθολική καταστροφή της αρχιτεκτονικής της δομής και του πάχους της βιομεμβράνης με ταυτόχρονη πλήρη ανάσχεση ανάπτυξης των βακτηριακών κυττάρων εντός της βιομεμβράνης(>99,5% σε επίπεδο στατιστικής σημαντικότητας 5σ).

Τα αποτελέσματα της παρούσας μελέτης έδειξαν ότι η αύξηση του χρόνου εφαρμογής ραδιοκυματικών παλμών (χρόνου θεραπείας) οδήγησε σε προοδευτική μείωση του αριθμού των επιβιωσάντων βακτηριακών κυττάρων, ο οποίος μετρήθηκε με τη διαφορά της τελικής μείον την αρχική CFU/ml, εκφρασμένη ως ΔLogCFU, υποδηλώνοντας την ύπαρξη σαφούς σχέσης δόσης–απόκρισης. Η σημαντική επίδραση που

παρατηρήθηκε μέσω της ανάλυσης ANOVA και επιβεβαιώθηκε με τη γραμμική παλινδρόμηση δείχνει ότι ο χρόνος θεραπείαςαποτελεί καθοριστικό παράγοντα για τη μικροβιακή αδρανοποίηση.

Η παρατηρούμενη μείωση του μικροβιακού πληθυσμού μπορεί να αποδοθεί στη σταδιακή αύξηση του στρες που υφίστανται τα μικροβιακά κύτταρα, οδηγώντας σε βλάβες στη κυτταρική μεμβράνη, αποδιάταξη πρωτεϊνών και διαταραχή βασικών μεταβολικών λειτουργιών. Ανάλογες τάσεις έχουν αναφερθεί και σε προηγούμενες μελέτες, όπου η αύξηση της έντασης επεξεργασίας συσχετίστηκε με μεγαλύτερη λογαριθμική μείωση μικροοργανισμών. Συμπερασματικά λοιπόν η αντιμικροβιακή δράση των ραδιοκυματικών παλμών εξηγείται με το φαινόμενο της μη αναστρέψιμης ηλεκτροπόρησης της κυτταρικής μεμβράνης. Μάλιστα έτσι εξηγείται και η διαφορά στην αποτελεσματικότητα της μεθοδολογίας ανάσχεσης μεταξύ διαφορετικών μικροβιακών ειδών, με τα Gram- θετικά βακτήρια να είναι πιο ανθεκτικά από τα Gram- αρνητικά λόγω των δομικών διαφορών στα κυτταρικά περιβλήματα και το μέγεθος των μικροβιακών κυττάρων.

Η σχεδόν γραμμική σχέση μεταξύ χρόνου θεραπείας και ΔLogCFU υποδηλώνει ότι, εντός του εξεταζόμενου εύρους τιμών, ο ρυθμός μικροβιακής αδρανοποίησης παραμένει σχετικά σταθερός. Ωστόσο, η αυξημένη διακύμανση που παρατηρήθηκε σε υψηλά επίπεδα χρόνου εφαρμογής ενδέχεται να σχετίζεται με ετερογένεια στον μικροβιακό πληθυσμό ή με την παρουσία πιο ανθεκτικών υποπληθυσμών.

Τα ενθαρρυντικά αποτελέσματα της μελέτης ανοίγουν μια νέα προοπτική στην αντιμετώπιση χρόνιων επιμολυσμένων δερματικών ελκών και ενίσχυσαν τη διεθνή βιβλιογραφία στην έρευνα γύρω από φυσικές/ηλεκτρομαγνητικές μεθόδους αντιμετώπισης λοιμώξεων. Η εφαρμογή ραδιοκυματικών παλμών σε ανθεκτικά μικρόβια μέσω πρωτότυπης συσκευής συνδυάζει την βιοϊατρική τεχνολογία και την καθημέρα ιατρική πράξη. Η μέθοδος θα μπορούσε να αποτελέσει εναλλακτική ή συμπληρωματική θεραπευτική προσέγγιση.

Βέβαια ο περιορισμένος αριθμός βακτηριακών στελεχών που μελετήθηκε στο πειραματικό και όχι σε κλινικό μοντέλο κάνει αναγκαία την περαιτέρω διερεύνηση της αποδοτικότητας της πρωτότυπης συκευής σε κλινικά πια μοντέλα. Επιπρόσθετα θα χρειαστεί να σχεδιαστούν νέες πιο μακροχρόνιες μελέτες για τον προσδιορισμό των επιδράσεων και των πιθανών παρενέργειων της μεθόδου, καθώς επίσης τη διερεύνηση της συνεισφοράς των μοριακών μηχανισμών δράσης της μεθόδου.

Η απουσία σημαντικών διαφορών στην βακτηριακή ανάσχεση μεταξύ της ομάδας χαμηλής έντασης (7,0–8,5 kV/cm) και της ομάδας υψηλής έντασης (10,0–11,5 kV/cm) υποδηλώνει την ύπαρξη μιας έντασης κατωφλίου ηλεκτρικού πεδίου κοντά στα 10 kV/cm. Κάτω από αυτό το όριο, η μικροβιακή απενεργοποίηση παραμένει περιορισμένη, ενώ πάνω από αυτό, οι μηχανισμοί διάσπασης της μεμβράνης φαίνεται να φτάνουν σε αποτελεσματικά επίπεδα.

Αυτή η συμπεριφορά είναι σύμφωνη με τη θεωρία της ηλεκτροπόρησης, όπου πρέπει να ξεπεραστεί ένα κρίσιμο διαμεμβρανικό δυναμικό πριν συμβεί μη αναστρέψιμη διαπερατότητα της μεμβράνης.

Από την άποψη της μηχανικής και της βελτιστοποίησης των διεργασιών, η αύξηση της έντασης του ηλεκτρικού πεδίου πέραν των 10 kV/cm δεν αποφέρει στατιστικά σημαντική πρόσθετη μικροβιακή μείωση. Συνεπώς η ένταση ηλεκτρικού πεδίου 10 kV/cm μπορεί να αντιπροσωπεύουν μια βέλτιστη λειτουργική

ένταση**,** ενώ ταυτόχρονα υψηλότερες εντάσεις μπορεί να αυξήσουν την κατανάλωση ενέργειας χωρίς αναλογικά οφέλη μικροβιακής απενεργοποίησης.

Μετά από τα ενθαρρυντικά αποτελέσματα της μελέτης μας η μέθοδος θα μπορούσε να δοκιμαστεί και να εφαρμοστεί πέρα από τα in-vitro μοντέλα και σε ζωντανά μοντέλα δερματικών ελκών.

Τα χρόνια έλκη αποτελούν ένα πολύ σημαντικό πρόβλημα σε όλα τα συστήματα υγείας, καθώς αυξάνουν την ανάγκη για νοσηλεία, αυξάνουν το κόστος θεραπείας (Vella *et al.*, 2024)και μειώνουν την ποιότητα ζωής των ασθενών.

Η επιμόλυνση των χρονίων ελκών είναι πολύ συχνή και η δημιουργία βιολογικής ψευδομεμβράνης ή βιοϋμενίου (biofilm) είναι από τις κυριότερες αιτίες (Rahim *et al.*, 2017b; Versey *et al.*, 2021). Στο περιβάλλον του ξενιστή, αυτή η εξωκυτταρική πολυμερική ουσία που εκκρίνεται από κάθε βακτήριο παρέχει προστασία έναντι των λευκών αιμοσφαιρίων, των αντισωμάτων, ακόμη και των θεραπευτικών αντιβιοτικών στο περιβάλλον του ξενιστή (Leid *et al.*, 2005).

Η αντιμετώπιση με χειρουργικούς καθαρισμούς και τοπικά αντισηπτικά είναι αποτελεσματική μεθοδολογία (Gompelman, VanAstenandPeters, 2016)

Η αντιβιοτική αγωγή σε περιπτώσεις λοιμώξεων μαλακών μορίων συμβάλλει στην κλινική ίαση σε περίπου 65% των περιπτώσεων, ενώ μόνο σε περίπου 60% των περιπτώσεων πετυχαίνει εξάλειψη των παθογόνων μικροβίων (Siami *et al.*, 2001). Τα βακτήρια μέσα σε ένα βιοφίλμ είναι ανθεκτικά σε συγκέντρωση αντιβιοτικών έως και 1000 φορές μεγαλύτερη, παρόλο που οι ίδιοι οργανισμοί είναι ευαίσθητοι όταν αναπτύσσονται σε θρεπτικό ζωμό. Η ευαισθησία των οργανισμών σε ένα διαταραγμένο βιοφίλμ είναι ενδιάμεση σε σχέση με αυτή των οργανισμών σε ένα άθικτο βιοφίλμ και σε πλαγκτονική κατάσταση (El-Azizi *et al.*, 2005; Stewart *et al.*, 2019).

Η καλλιέργεια ιστοτεμαχίου ενός χρόνιου έλκους πολύ συχνά αναδεικνύει συμμετοχή πολλών παθογόνων μικροβίων (Serena *et al.*, 2021).

Η χορήγηση αντιβιοτικών φαρμάκων είτε ενδοφλέβια, είτε από του στόματος δεν μπορεί να είναι αποδοτική σε περιπτώσεις πολυανθεκτικών μικροβιακών λοιμώξεων.

Οι βραχύβιοι ηλεκτρομαγνητικοί παλμοί επιδρούν στην δομή της κυτταρικής μεμβράνης και δημιουργούν πόρους (ηλεκτροδιάτρηση ή ηλεκτροπόρηση). Επίσης οι ηλεκτρομαγνητικοί παλμοί δημιουργούν πόρους σε τασεοευαίσθηταιοντικά κανάλια της μεμβράνης (Rems *et al.*, 2020) (Lea Rems 2019).

Στα μέχρι τώρα πειραματικά δεδομένα γίνονται αναφορές για συνεργική δράση ηλεκτροπόρησης και αντιβιοτικής θεραπείας (Vadlamani *et al.*, 2018; Muñoz *et al.*, 2019) με συσκευές που παράγουν παλμούς με πλάτος της τάξης του μs,σε αντίθεση με τη δική μας μελέτη που παρατηρήσαμε εξίσου ή και καλύτερα αποτελέσματα χωρίς να χρησιμοποιήσουμε συνεργική αντιβιοτική θεραπεία, χρησιμοποιώντας όμως ηλεκτρικά πεδία με πλάτος παλμού της τάξεως του ns.

Ηλεκτρικά πεδία έχουν εφαρμοστεί σε βιομεμβράνες που σχηματίζονται σε συνθετικό πλέγμα. 1500 V με διάρκεια παλμού 50 μs και συχνότητα 2 Hz οδηγεί σε καταστροφή 100-80% των βακτηρίων όταν εφαρμοστούν 121 ± 14 V/mm για 300 παλμούςκαι 235 ± 6.1 V/mm για 150 παλμούς, πράγμα που δείχνει ότι

αυξανομένων των χορηγούμενων παλμών αυξάνεται η αποδοτικότητα της θεραπείας.(Khan *et al.*, 2016b) πράγμα στο οποίο συμφωνούν τα αποτελέσματα και της δικής μας μελέτης (Balasis *et al.*, 2025).

Η χρήση παλμών ηλεκτρικών πεδίων με το μηχανισμό της μη αναστρέψιμης ηλεκτροπόρησης μπορεί να χρησιμοποιηθεί ως εναλλακτικός τρόπος του χειρουργικού καθαρισμού ελκών (Das and Berthiaume, 2021). Τα αποτελέσματα της εφαρμογής της μεθόδου μας στο πειραματικό μοντέλο της βιομεμβράνης μας επιτρέπουν να χρησιμοποιήσουμε τη πρωτότυπη συσκευή για την αντιμετώπιση χρόνιων ελκών που παρουσιάζουν επιμολυσμένα βιοφίλμ.

Συνεργική δράση αραιού διαλύματος οξικού οξέος και υψίσυχνων ηλεκτρικών παλμών 25kV/cm, πλάτους 900ns με 15kHz συχνότητα αναστέλλει την ανάπτυξη *P.aeruginosa* (0,01% επιβίωση) σε in-vivo πειραματικό μοντέλο χωρίς να προκαλεί φαινόμενα ηλεκτροπόρησης στους εν τω βάθει ιστούς (Novickij et al., 2018b), χωρίς να γίνεται όμως μελέτη σε βιομεμβράνη χρόνιου έλκους. Επιπλέον μελέτες δείχνουν ότι η συνεργική δράση αραιών διαλυμάτων οργανικών οξέων πετυχαίνει καλύτερα αποτελέσματα στην αναστολή ανάπτυξης μικροβίων με χρήση ηλεκτρικών πεδίων μικρότερης έντασης (Novickij *et al.*, 2019). Επίσης πολύ καλά αποτελέσματα αναφέρονται στη συνεργική χρήση υπεροξειδίου του υδρογόνου και ηλεκτρικών παλμών (μονοπολικών) σε καλλιέργειες *E. coli,* χωρίς να παρατηρούνται αντίστοιχα καλά αποτελέσματα με χρήση μόνο ηλεκτρικών παλμών (Rosenzweig *et al.*, 2024). Στη μελέτη μας αποδεικνύουμε τη δραστικότητα βραχύβιων ηλεκτρικών παλμών σε βιομεμβράνες χρησιμοποιώντας βραχύτερους παλμούς (100 ns) με ηλεκτρικό πεδίο μικρότερης έντασης (10kV/cm) κάνοντας χρήση ειδικών ηλεκτροδίων με απόσταση μεταξύ τους 50-100 μm. Παρόμοια αποτελέσματα σε βιομεμβράνες *C.acnes* αναφέρουν οι Poudel et al χρησιμοποιώντας παλμούς 280 ns, εντάσεως πεδίου 28kV/cm, χωρίς όμως να αναφέρουν αντίστοιχα αποτελέσματα σε αντίστοιχα ελεύθερες πλανγκτονικές μορφές των μικροβίων (Poudel *et al.*, 2021). Σε αντίθεση, στην μελέτη μας οι βραχύβιοι ηλεκτρικοί παλμοί έχουν αντίστοιχα καλή δράση τόσο στις ελεύθερες μορφές των μικροβίων, όσο και στις βιομεμβράνες αυτών.

Η συνεργική δράση ηλεκτρικών παλμών με πλάτος παλμού της τάξεως μs μέχρι και 500ns και αντιβιοτικής θεραπείας έχει μελετηθεί και παρουσιάζονται ενθαρρυντικά αποτελέσματα καθώς επιτυγχάνεται δραστική μείωση του μικροβιακού πληθυσμού με μικρότερες συγκεντρώσεις αντιβιοτικής θεραπείας, αλλά και με μικρότερης έντασης ηλεκτρικά πεδία τόσο σε in-vitro όσο και σε in-vivo πειραματικά μοντέλα (Korem *et al.*, 2018b; Novickij, Švedienė, *et al.*, 2018; Muñoz *et al.*, 2019; Rubin *et al.*, 2019a)

Σε όλες τις μελέτες ο κυριότερος παράγοντας για την βακτηριοκτόνο δράση είναι η αύξηση της έντασης του ηλεκτρικού πεδίου πράγμα με το οποίο συμφωνούν και τα πειραματικά δεδομένα της δικής μας μελέτης.

Τα Gram- βακτήρια φαίνεται να είναι πιο ευαίσθητα στους ηλεκτρομαγνητικούς παλμούς (Rubin *et al.*, 2019b) το οποίο επιβεβαιώνεται και στη δική μας μελέτη. Η διαφορετική δομική σύσταση της κυτταρικής μεμβράνης είναι η πιθανότερη αιτιολογία, καθώς ο γλυκοκάλυκας των Gram+ βακτηρίων είναι πολύ πυκνή κατασκευή και διασπάται δύσκολα, καθώς επίσης το μικρότερο μέγεθος των Gram+ βακτηρίων απαιτεί μεγαλύτερη ένταση ηλεκτρικού πεδίου ώστε να υπερνικηθεί ο ουδός μη επιστρέψιμης δημιουργίας πόρου (Gowrisree et al., 2007).

Στους περιορισμούς της μελέτης περιλαμβάνεται η χρήση και δοκιμασία της πρωτότυπης συσκευής παραγωγής ηλεκτρομαγνητικών παλμών μόνο σε Gram- θετικά και Gram- αρνητικά ανθεκτικά βακτήρια in-vitro και σε συνθήκες βιομεμβράνης ex-vivo, χωρίς να μελετηθεί το σύνολο των παθογόνων που απομονώνονται σε καλλιέργειες επιμολυσμένων χρόνιων ελκών. Για την επέκταση της εφαρμογής της μεθόδου πρέπει να επεκταθεί η δοκιμή της συσκευής σε ευκαρυωτικά κύτταρα (μύκητες), όπως επίσης πρέπει να δοκιμαστεί και σε ζωντανά πειραματικά μοντέλα.

Μελλοντικές Κατευθύνσεις της Έρευνας

Στους άμεσους μελλοντικούς χρόνους προτεραιότητα είναι η βελτιστοποίηση της πρωτότυπης συσκευής με επιπλέον ρύθμιση των συχνοτήτων και της έντασης παλμών ώστε να βελτιωθεί η ακρίβεια και η φορητότητα της συσκευής, να αυτοματικοποιηθεί η μέθοδος, να μειωθεί η ενεργειακή κατανάλωση.

- Η παρούσα μελέτη διερεύνησε τη δραστικότητα της πρωτότυπης συσκευής τόσο σε Gram- θετικά, όσο και σε Gram- αρνητικά ανθεκτικά βακτήρια, χωρίς όμως να επεκταθεί στο σύνολο των παθογόνων μικροβίων που παρατηρούνται στα χρόνια έλκη. Στα μελλοντικά σχέδια είναι η μελέτη της επίδρασης των ραδιοκυματικών παλμών τόσο σε προκαρυωτικά, όσο και σε ευκαρυωτικά κύτταρα (μύκητες).
- Κατά την εφαρμογή των ραδιοκυματικών παλμών σε μοντέλο βιομεμβράνης έγινε χρήση νέων προηγμένων ηλεκτροδίων, τα οποία πέτυχαν μείωση της εφαρμοζόμενης έντασης του ηλεκτρικού πεδίου στους ακροδέκτες κάνοντας πιο ασφαλή τη χρήση της συσκευής. Στα μελλοντικά σχέδια μας είναι η ανάπτυξη τέτοιων εύκαμπτων ειδικών μικροηλεκτροδίων – μικροαισθητήρων που θα συνεργάζονται με τη συσκευή, ενσωματωμένα σε επιθέματα, διαφόρων μεγεθών ώστε να πετύχουμε εφαρμογή των ραδιοκυματικών παλμών σε όλη την επιφάνεια των ελκών ενώ ταυτόχρονα θα υπάρχει και η δυνατότητα εξατομίκευσης ανά ασθενή και ανά έλκος για βέλτιστο αποτέλεσμα.
- Η συνδυαστική χρήση της μεθόδου με την κλασική αντιβιοτική θεραπευτική αγωγή θα αποτελέσει ένα νέο πεδίο μελέτης πιθανών συνεργιστικών δράσεων. Επίσης στο μέλλον θα πρέπει να διερευνηθεί η συνεργιστική δράση της μεθόδου με τις μοντέρνες μεθόδους με χρήση νανοτεχνολογίας ιδίως στην αντιμετώπιση λοιμώξεων εμφυτεύσιμων ιατρικών συσκευών, στις οποίες η βιομεμβράνη αποτελεί κύριο παράγοντα αντοχής των μικροβίων.
- Για να αναπτυχθεί ένα θεραπευτικό πρωτόκολλο για χρήση σε ασθενείς και να διευρυνθεί η εφαρμογή της μεθόδου σε χρόνιες νοσοκομειακές λοιμώξεις θα απαιτηθούν προκλινικές μελέτες ασφάλειας της μεθόδου.
- Έτσι θα δωθεί η δυνατότητα να αξιοποιηθεί η μέθοδος συμβάλλοντας στην αντιμετώπιση της παγκόσμιας μικροβιακής αντοχής, δίνοντας παράλληλα νέες προοπτικές ανάπτυξης βιοϊατρικής τεχνολογίας με ταυτόχρονη ενίσχυση της διεπιστημονικής συνεργασίας μεταξύ μικροβιολογίας, βιοϊατρικής μηχανικής, φυσικής και κλινικής ιατρικής.

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ- ΑΝΑΦΟΡΕΣ

Abraira, V.E., Ginty, D.D., 2013. The Sensory Neurons of Touch. Neuron 79, 618–639. https://doi.org/10.1016/j.neuron.2013.07.051

Adam, M.G., Berger, C., Feldner, A., Yang, W.-J., Wüstehube-Lausch, J., Herberich, S.E., Pinder, M., Gesierich, S., Hammes, H.-P., Augustin, H.G., Fischer, A., 2013. Synaptojanin-2 Binding Protein Stabilizes the Notch Ligands DLL1 and DLL4 and Inhibits Sprouting Angiogenesis. Circ. Res. 113, 1206–1218. https://doi.org/10.1161/CIRCRESAHA.113.301686

Ahmed, M., Brace, C.L., Lee, F.T., Goldberg, S.N., 2011. Principles of and Advances in Percutaneous Ablation. Radiology 258, 351–369. https://doi.org/10.1148/radiol.10081634

Almuhanna, Y., 2025. Microbial Biofilms as Barriers to Chronic Wound Healing: Diagnostic Challenges and Therapeutic Advances. J. Clin. Med. 14, 8121. https://doi.org/10.3390/jcm14228121

Álvarez, I., 2003. The influence of process parameters for the inactivation of Listeria monocytogenes by pulsed electric fields. Int. J. Food Microbiol. 87, 87–95. https://doi.org/10.1016/S0168-1605(03)00056-4

American Diabetes Association Professional Practice Committee, ElSayed, N.A., McCoy, R.G., Aleppo, G., Balapattabi, K., Beverly, E.A., Briggs Early, K., Bruemmer, D., Callaghan, B.C., Echouffo-Tcheugui, J.B., Ekhlaspour, L., Frykberg, R.G., Garg, R., Garg, S.J., Giurini, J.M., Khunti, K., Lal, R., Lingvay, I., Matfin, G., Pandya, N., Pekas, E.J., Pilla, S.J., Polsky, S., Segal, A.R., Seley, J.J., Stanton, R.C., Bannuru, R.R., 2025. 12. Retinopathy, Neuropathy, and Foot Care: Standards of Care in Diabetes—2025. Diabetes Care 48, S252–S265. https://doi.org/10.2337/dc25-S012

Amin, A.M., Nazir, A., Abuelazm, M.T., Ibrahim, A.A., Elbenawi, H., Aboutaleb, A., Ellabban, M., Arnaout, M., Turkmani, M., Abdelazeem, B., Volgman, A.S., 2024. Efficacy and safety of pulsed-field versus conventional thermal ablation for atrial fibrillation: A systematic review and meta-analysis. J. Arrhythmia 40, 1059–1074. https://doi.org/10.1002/joa3.13118

Armstrong, D.G., Tan, T.-W., Boulton, A.J.M., Bus, S.A., 2023. Diabetic Foot Ulcers: A Review. JAMA 330, 62. https://doi.org/10.1001/jama.2023.10578

Au, J.T., Wong, J., Mittra, A., Carpenter, S., Haddad, D., Carson, J., Jayaraman, S., Monette, S., Solomon, S.B., Ezell, P., Fong, Y., 2011. Irreversible electroporation is a surgical ablation technique that enhances gene transfer. Surgery 150, 474–479. https://doi.org/10.1016/j.surg.2011.07.007

Aubin, K., Vincent, C., Proulx, M., Mayrand, D., Fradette, J., 2015. Creating capillary networks within human engineered tissues: Impact of adipocytes and their secretory products. Acta Biomater. 11, 333–345. https://doi.org/10.1016/j.actbio.2014.09.044

Aycock, K.N., Davalos, R.V., 2019. Irreversible Electroporation: Background, Theory, and Review of Recent Developments in Clinical Oncology. Bioelectricity 1, 214–234. https://doi.org/10.1089/bioe.2019.0029

Balasis, S., Papageorgiou, K., Georgiou, S., Kolonitsiou, F., Giormezis, N., Kyriakopoulos, A., Oikonomou, C., Papageorgiou, G., 2025. Multi-Resistant *Staphylococcus aureus* Growth Inhibition Using an Innovative High Voltage Nanosecond Pulser: In Vitro Experimental Results. MicrobiologyOpen 14, e70126. https://doi.org/10.1002/mbo3.70126

Balato, M., Roscetto, E., Petrarca, C., Vitelli, M., Aversa, M., Galdiero, U., Catania, M.R., Costanzo, L., Soto, S.M., Mariconda, M., Balato, G., 2025. Electric fields unlock a transient vulnerability window for vancomycin-based treatment of staphylococcal biofilms. Sci. Rep. 15, 41991. https://doi.org/10.1038/s41598-025-26053-6

Batista Napotnik, T., Polajžer, T., Miklavčič, D., 2021. Cell death due to electroporation – A review. Bioelectrochemistry 141, 107871. https://doi.org/10.1016/j.bioelechem.2021.107871

Beebe, S.J., Fox, P.M., Rec, L.J., Willis, L.K., Schoenbach, K.H., 2003. Nanosecond, high-intensity pulsed electric fields induce apoptosis in human cells. FASEB J. 17, 1–23. https://doi.org/10.1096/fj.02-0859fje

Bielska, B., Miłowska, K., 2025. Therapeutic Potential of Chitosan-Based and Related Nanocomposite Systems in Wound Management: A Review. Int. J. Mol. Sci. 26, 11748. https://doi.org/10.3390/ijms262311748

Bikle, D.D., Xie, Z., Tu, C.-L., 2012a. Calcium regulation of keratinocyte differentiation. Expert Rev. Endocrinol. Metab. 7, 461–472. https://doi.org/10.1586/eem.12.34

Bikle, D.D., Xie, Z., Tu, C.-L., 2012b. Calcium regulation of keratinocyte differentiation. Expert Rev. Endocrinol. Metab. 7, 461–472. https://doi.org/10.1586/eem.12.34
Bodnar, R.J., Satish, L., Yates, C.C., Wells, A., 2016. Pericytes: A newly recognized player in wound healing. Wound Repair Regen. 24, 204–214. https://doi.org/10.1111/wrr.12415
Boeringer, T., Gould, L.J., Koria, P., 2020. Protease-Resistant Growth Factor Formulations for the Healing of Chronic Wounds. Adv. Wound Care 9, 612–622. https://doi.org/10.1089/wound.2019.1043
Boleti, A.P.D.A., Jacobowski, A.C., Frihling, B.E.F., Cruz, M.V., Santos, K.F.D.P., Migliolo, L., De Andrade, L.R.M., Macedo, M.L.R., 2025. Wound Healing: Molecular Mechanisms, Antimicrobial Peptides, and Emerging Technologies in Regenerative Medicine. Pharmaceuticals 18, 1525. https://doi.org/10.3390/ph18101525
Bonnici, L., Suleiman, S., Schembri-Wismayer, P., Cassar, A., 2023. Targeting Signalling Pathways in Chronic Wound Healing. Int. J. Mol. Sci. 25, 50. https://doi.org/10.3390/ijms25010050
Bowers, S., Franco, E., 2020. Chronic Wounds: Evaluation and Management. Am. Fam. Physician 101, 159–166.
Burns, T., Breathnach, S., Cox, N., Griffiths, C. (Eds.), 2010. Rook's Textbook of Dermatology, 1st ed. Wiley. https://doi.org/10.1002/9781444317633
Byun, K.-A., Kim, H.M., Oh, S., Batsukh, S., Son, K.H., Byun, K., 2024. Radiofrequency Treatment Attenuates Age-Related Changes in Dermal–Epidermal Junctions of Animal Skin. Int. J. Mol. Sci. 25, 5178. https://doi.org/10.3390/ijms25105178
Calkins, H., Hindricks, G., Cappato, R., Kim, Y.-H., Saad, E.B., Aguinaga, L., Akar, J.G., Badhwar, V., Brugada, J., Camm, J., Chen, P.-S., Chen, S.-A., Chung, M.K., Nielsen, J.C., Curtis, A.B., Davies, D.W., Day, J.D., d'Avila, A., De Groot, N.M.S. (Natasja), Di Biase, L., Duytschaever, M., Edgerton, J.R., Ellenbogen, K.A., Ellinor, P.T., Ernst, S., Fenelon, G., Gerstenfeld, E.P., Haines, D.E., Haissaguerre, M., Helm, R.H., Hylek, E., Jackman, W.M., Jalife, J., Kalman, J.M., Kautzner, J., Kottkamp, H., Kuck, K.H., Kumagai, K., Lee, R., Lewalter, T., Lindsay, B.D., Macle, L., Mansour, M., Marchlinski, F.E., Michaud, G.F., Nakagawa, H., Natale, A., Nattel, S., Okumura, K., Packer, D., Pokushalov, E., Reynolds, M.R., Sanders, P., Scanavacca, M., Schilling, R., Tondo, C., Tsao, H.-M., Verma, A., Wilber, D.J., Yamane, T., 2017. 2017 HRS/EHRA/ECAS/APHRS/SOLAECE expert consensus statement on catheter and surgical ablation of atrial fibrillation. Heart Rhythm 14, e275–e444. https://doi.org/10.1016/j.hrthm.2017.05.012
Campelo, S.N., Huang, P.-H., Buie, C.R., Davalos, R.V., 2023. Recent Advancements in Electroporation Technologies: From Bench to Clinic. Annu. Rev. Biomed. Eng. 25, 77–100. https://doi.org/10.1146/annurev-bioeng-110220-023800
Chen, C., Meng, Z., Ren, H., Zhao, N., Shang, R., He, W., Hao, J., 2021. The molecular mechanisms supporting the homeostasis and activation of dendritic epidermal T cell and its role in promoting wound healing. Burns Trauma 9, tkab009. https://doi.org/10.1093/burnst/tkab009
Chen, W.Y.J., Rogers, A.A., 2007. Recent insights into the causes of chronic leg ulceration in venous diseases and implications on other types of chronic wounds. Wound Repair Regen. 15, 434–449. https://doi.org/10.1111/j.1524-475X.2007.00250.x
Choi, J.S., Kim, K.-H., Lau, L.F., 2015. The matricellular protein CCN1 promotes mucosal healing in murine colitis through IL-6. Mucosal Immunol. 8, 1285–1296. https://doi.org/10.1038/mi.2015.19
Chu, K.F., Dupuy, D.E., 2014. Thermal ablation of tumours: biological mechanisms and advances in therapy. Nat. Rev. Cancer 14, 199–208. https://doi.org/10.1038/nrc3672
Cifuentes-Rius, A., Ivask, A., Das, S., Penya-Auladell, N., Fabregas, L., Fletcher, N.L., Houston, Z.H., Thurecht, K.J., Voelcker, N.H., 2017. Gold Nanocluster-Mediated Cellular Death under Electromagnetic Radiation. ACS Appl. Mater. Interfaces 9, 41159–41167. https://doi.org/10.1021/acsami.7b13100
Ciofu, O., Moser, C., Jensen, P.Ø., Høiby, N., 2022. Tolerance and resistance of microbial biofilms. Nat. Rev. Microbiol. 20, 621–635. https://doi.org/10.1038/s41579-022-00682-4
Cohen, B.R., Soriano, E.T., 2018. Pulsed Radiofrequency Neuromodulation in Interventional Pain Management—A Growing Technology. J. Radiol. Nurs. 37, 181–187. https://doi.org/10.1016/j.jradnu.2018.04.002
Cserhalmi, Zs., Vidács, I., Beczner, J., Czukor, B., 2002. Inactivation of Saccharomyces cerevisiae and Bacillus cereus by pulsed electric fields technology. Innov. Food Sci. Emerg. Technol. 3, 41–45. https://doi.org/10.1016/S1466-8564(01)00052-2

Das, B., Berthiaume, F., 2021. Irreversible Electroporation as an Alternative to Wound Debridement Surgery. Surg. Technol. Online 39. https://doi.org/10.52198/21.STI.39.WH1452
Davalos, R.V., Mir, L.M., Rubinsky, B., 2005. Tissue Ablation with Irreversible Electroporation. Ann. Biomed. Eng. 33, 223–231. https://doi.org/10.1007/s10439-005-8981-8
Dinić, M., Verpile, R., Burgess, J.L., Ming, J., Marjanovic, J., Beliz, C.N., Plano, L., Hower, S., Thaller, S.R., Banerjee, S., Lev-Tov, H., Tomic-Canic, M., Pastar, I., 2024. Multi-drug resistant *Staphylococcus epidermidis* from chronic wounds impair healing in human wound model. Wound Repair Regen. 32, 799–810. https://doi.org/10.1111/wrr.13231
DiPietro, L.A., Polverini, P.J., Rahbe, S.M., Kovacs, E.J., 1995. Modulation of JE/MCP-1 expression in dermal wound repair. Am. J. Pathol. 146, 868–875.
El-Azizi, M., Rao, S., Kanchanapoom, T., Khardori, N., 2005. In vitro activity of vancomycin, quinupristin/dalfopristin, and linezolid against intact and disrupted biofilms of staphylococci. Ann. Clin. Microbiol. Antimicrob. 4, 2. https://doi.org/10.1186/1476-0711-4-2
Elsaie, M.L., Choudhary, S., Leiva, A., Nouri, K., 2010. Nonablative Radiofrequency for Skin Rejuvenation. Dermatol. Surg. 36, 577–589. https://doi.org/10.1111/j.1524-4725.2010.01510.x
Fagundes, B.O., de-Sousa, T.R., Victor, J.R., 2023. Gamma-delta (ΓΔ) T cell-derived cytokines (IL -4, IL -17, IFN -γ and IL -10) and their possible implications for atopic dermatitis development. Int. J. Dermatol. 62, 443–448. https://doi.org/10.1111/ijd.16364
Fang, Y., Gong, S.-J., Xu, Y.-H., Hambly, B.D., Bao, S., 2007. Impaired cutaneous wound healing in granulocyte/ macrophage colony-stimulating factor knockout mice. Br. J. Dermatol. 157, 458–465. https://doi.org/10.1111/j.1365-2133.2007.07979.x
Field, A., 2018. Discovering statistics using IBM SPSS statistics, 5th edition. ed, SAGE edge. SAGE, Los Angeles London New Delhi Singapore Washington DC Melbourne.
Fisher, G., Rittié, L., 2018. Restoration of the basement membrane after wounding: a hallmark of young human skin altered with aging. J. Cell Commun. Signal. 12, 401–411. https://doi.org/10.1007/s12079-017-0417-3
Foster, K.R., Repacholi, M.H., 2004. Biological Effects of Radiofrequency Fields: Does Modulation Matter? Radiat. Res. 162, 219–225. https://doi.org/10.1667/RR3191
Foster, K.R., Schwan, H.P., 1989. Dielectric properties of tissues and biological materials: a critical review. Crit. Rev. Biomed. Eng. 17, 25–104.
Geboers, B., Timmer, F., Vos, D., Scheffer, H., Bakker, J., Ruarus, A., Vroomen, L., Stam, A., Lougheed, S., Schouten, E., Puijk, R., Van Den Tol, P., Lagerwaard, F., De Vries, J., Bruynzeel, A., Meijerink, M., De Gruijl, T., 2025. Systemic immunomodulation by irreversible electroporation versus stereotactic ablative body radiotherapy in locally advanced pancreatic cancer: the CROSSFIRE trial. J. Immunother. Cancer 13, e010222. https://doi.org/10.1136/jitc-2024-010222
Gerhardt, H., 2008. VEGF and endothelial guidance in angiogenic sprouting. Organogenesis 4, 241–246. https://doi.org/10.4161/org.4.4.7414
Ghafoor, A., Hay, I.D., Rehm, B.H.A., 2011. Role of Exopolysaccharides in Pseudomonas aeruginosa Biofilm Formation and Architecture. Appl. Environ. Microbiol. 77, 5238–5246. https://doi.org/10.1128/AEM.00637-11
Gharbia, F.Z., Abouhashem, A.S., Moqidem, Y.A., Elbaz, A.A., Abdellatif, A., Singh, K., Sen, C.K., Azzazy, H.M.E., 2023. Adult skin fibroblast state change in murine wound healing. Sci. Rep. 13, 886. https://doi.org/10.1038/s41598-022-27152-4
Godo, S., Shimokawa, H., 2017. Endothelial Functions. Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol. 37. https://doi.org/10.1161/ATVBAHA.117.309813
Goldberg, E., Suárez, C., Alfonso, M., Marchese, J., Soba, A., Marshall, G., 2018. Cell membrane electroporation modeling: A multiphysics approach. Bioelectrochemistry 124, 28–39. https://doi.org/10.1016/j.bioelechem.2018.06.010
Gompelman, M., Van Asten, S.A.V., Peters, E.J.G., 2016. Update on the Role of Infection and Biofilms in Wound Healing: Pathophysiology and Treatment. Plast. Reconstr. Surg. 138, 61S-70S. https://doi.org/10.1097/PRS.0000000000002679
Gowrisree, V., Udayakumar, K., Gautam, P., 2007. Electrical Field Modelling of E. coli Bacteria. Asian J. Biochem. 2, 198–207. https://doi.org/10.3923/ajb.2007.198.207

Grose, R., Hutter, C., Bloch, W., Thorey, I., Watt, F.M., Fässler, R., Brakebusch, C., Werner, S., 2002. A crucial role of β1 integrins for keratinocyte migration in vitro and during cutaneous wound repair. Development 129, 2303–2315. https://doi.org/10.1242/dev.129.9.2303

Guth, C., Limjunyawong, N., Pundir, P., 2024. The evolving role of mast cells in wound healing: insights from recent research and diverse models. Immunol. Cell Biol. 102, 878–890. https://doi.org/10.1111/imcb.12824

Haapasalmi, K., Zhang, K., Tonnesen, M., Olerud, J., Sheppard, D., Salo, T., Kramer, R., Clark, R.A.F., Uitto, V.-J., Larjava, H., 1996. Keratinocytes in Human Wounds Express αvβ6 Integrin. J. Invest. Dermatol. 106, 42–48. https://doi.org/10.1111/1523-1747.ep12327199

Haberl Meglič, S., Slokar, D., Miklavčič, D., 2024. Inactivation of antibiotic-resistant bacteria Escherichia coli by electroporation. Front. Microbiol. 15, 1347000. https://doi.org/10.3389/fmicb.2024.1347000

Hall, J.E., Hall, M.E., Guyton, A.C., 2021. Guyton and Hall textbook of medical physiology, 14th edition. ed. Elsevier, Philadelphia, PA.

Hampton, T., 2011. Electric pulses help with chemotherapy, may open new paths for other agents. JAMA 305, 549–551. https://doi.org/10.1001/jama.2011.92

Hata, J., Perret-Karimi, D., DeSilva, C., Leung, D., Betesh, N., Luo, Z.D., Dawodu, S., Sinavsky, K., Stokes, O.J., English, S., 2011. Pulsed Radiofrequency Current in the Treatment of Pain. Crit. Rev. Phys. Rehabil. Med. 23, 213–240. https://doi.org/10.1615/CritRevPhysRehabilMed.v23.i1-4.150

Hennings, H., Michael, D., Cheng, C., Steinert, P., Holbrook, K., Yuspa, S.H., 1980. Calcium regulation of growth and differentiation of mouse epidermal cells in culture. Cell 19, 245–254. https://doi.org/10.1016/0092-8674(80)90406-7

Hernández-Bule, M.L., Toledano-Macías, E., Martínez-Pascual, M.A., Úbeda, A., Fernández-Guarino, M., 2023. Effects of RF Currents on Cytokines Production in Human Keratinocytes, in: The 2nd International Electronic Conference on Biomedicines. Presented at the International Electronic Conference on Biomedicines, MDPI, p. 29. https://doi.org/10.3390/ECB2023-14096

Hinz, B., 2016. The role of myofibroblasts in wound healing. Curr. Res. Transl. Med. 64, 171–177. https://doi.org/10.1016/j.retram.2016.09.003

Hong, K., Georgiades, C., 2010. Radiofrequency Ablation: Mechanism of Action and Devices. J. Vasc. Interv. Radiol. 21, S179–S186. https://doi.org/10.1016/j.jvir.2010.04.008

Hu, W., Shang, R., Yang, J., Chen, C., Liu, Z., Liang, G., He, W., Luo, G., 2022. Skin γδ T Cells and Their Function in Wound Healing. Front. Immunol. 13, 875076. https://doi.org/10.3389/fimmu.2022.875076

Hu, W., Zhang, X., Sheng, H., Liu, Z., Chen, Y., Huang, Y., He, W., Luo, G., 2024. The mutual regulation between γδ T cells and macrophages during wound healing. J. Leukoc. Biol. 115, 840–851. https://doi.org/10.1093/jleuko/qiad087

Ismaila, I., Mitsan, O., Daniel, U., Theophilus, E., Ishaleku, D., Mercy, O., Isitekhale, S., Usman, R.U., Mohammed Sheidu, J., Ozegya, U.D., 2025. BACTERIAL BIOFILM: A REVIEW ON FORMATION, CLINICAL IMPORTANCE, DETECTION AND CONTROL MEASURES. https://doi.org/10.5281/ZENODO.17013604

Jackson, J.D., 2009. Classical electrodynamics, 3. ed., [Nachdr.]. ed. Wiley, Hoboken, NY.

James, G.A., Swogger, E., Wolcott, R., Pulcini, E. deLancey, Secor, P., Sestrich, J., Costerton, J.W., Stewart, P.S., 2008. Biofilms in chronic wounds. Wound Repair Regen. 16, 37–44. https://doi.org/10.1111/j.1524-475X.2007.00321.x

James, W.D., 2019. Andrews' Diseases of the Skin: Clinical Dermatology, 13th ed. ed. Elsevier, Philadelphia.

Jameson, J., Ugarte, K., Chen, N., Yachi, P., Fuchs, E., Boismenu, R., Havran, W.L., 2002. A Role for Skin γδ T Cells in Wound Repair. Science 296, 747–749. https://doi.org/10.1126/science.1069639

Jeffery Marano, R., Jane Wallace, H., Wijeratne, D., William Fear, M., San Wong, H., O'Handley, R., 2015. Secreted biofilm factors adversely affect cellular wound healing responses in vitro. Sci. Rep. 5, 13296. https://doi.org/10.1038/srep13296

Jiang, D., Guo, R., Machens, H.-G., Rinkevich, Y., 2023. Diversity of Fibroblasts and Their Roles in Wound Healing. Cold Spring Harb. Perspect. Biol. 15, a041222. https://doi.org/10.1101/cshperspect.a041222

Johnson, K.O., Yoshioka, T., Vega–Bermudez, F., 2000. Tactile Functions of Mechanoreceptive Afferents Innervating the Hand: J. Clin. Neurophysiol. 17, 539–558. https://doi.org/10.1097/00004691-200011000-00002

Jun, J.-I., Kim, K.-H., Lau, L.F., 2015. The matricellular protein CCN1 mediates neutrophil efferocytosis in cutaneous wound healing. Nat. Commun. 6, 7386. https://doi.org/10.1038/ncomms8386
Juncker, R.B., Lazazzera, B.A., Billi, F., 2022. Pulsed Electromagnetic Fields Disrupt Staphylococcus epidermidis Biofilms and Enhance the Antibiofilm Efficacy of Antibiotics. Microbiol. Spectr. 10, e01949-22. https://doi.org/10.1128/spectrum.01949-22
Jurcisek, J.A., Dickson, A.C., Bruggeman, M.E., Bakaletz, L.O., 2011. In vitro Biofilm Formation in an 8-well Chamber Slide. J. Vis. Exp. 2481. https://doi.org/10.3791/2481
Kadow, S., Jux, B., Zahner, S.P., Wingerath, B., Chmill, S., Clausen, B.E., Hengstler, J., Esser, C., 2011. Aryl Hydrocarbon Receptor Is Critical for Homeostasis of Invariant γδ T Cells in the Murine Epidermis. J. Immunol. 187, 3104–3110. https://doi.org/10.4049/jimmunol.1100912
Kazemi, E., Mortazavi, S.M.J., Ali-Ghanbari, A., Sharifzadeh, S., Ranjbaran, R., Mostafavi-Pour, Z., Zal, F., Haghani, M., 2015. Effect of 900 MHz Electromagnetic Radiation on the Induction of ROS in Human Peripheral Blood Mononuclear Cells. J. Biomed. Phys. Eng. 5, 105–114.
Khan, S.I., Blumrosen, G., Vecchio, D., Golberg, A., McCormack, M.C., Yarmush, M.L., Hamblin, M.R., Austen, W.G., 2016a. Eradication of multidrug-resistant pseudomonas biofilm with pulsed electric fields. Biotechnol. Bioeng. 113, 643–650. https://doi.org/10.1002/bit.25818
Khan, S.I., Blumrosen, G., Vecchio, D., Golberg, A., McCormack, M.C., Yarmush, M.L., Hamblin, M.R., Austen, W.G., 2016b. Eradication of multidrug-resistant pseudomonas biofilm with pulsed electric fields. Biotechnol. Bioeng. 113, 643–650. https://doi.org/10.1002/bit.25818
Knoedler, S., Broichhausen, S., Guo, R., Dai, R., Knoedler, L., Kauke-Navarro, M., Diatta, F., Pomahac, B., Machens, H.-G., Jiang, D., Rinkevich, Y., 2023. Fibroblasts – the cellular choreographers of wound healing. Front. Immunol. 14, 1233800. https://doi.org/10.3389/fimmu.2023.1233800
Korem, M., Goldberg, N.S., Cahan, A., Cohen, M.J., Nissenbaum, I., Moses, A.E., 2018a. Clinically applicable irreversible electroporation for eradication of micro-organisms. Lett. Appl. Microbiol. 67, 15–21. https://doi.org/10.1111/lam.12996
Korem, M., Goldberg, N.S., Cahan, A., Cohen, M.J., Nissenbaum, I., Moses, A.E., 2018b. Clinically applicable irreversible electroporation for eradication of micro-organisms. Lett. Appl. Microbiol. 67, 15–21. https://doi.org/10.1111/lam.12996
Kotnik, T., Miklavčič, D., 2006. Theoretical Evaluation of Voltage Inducement on Internal Membranes of Biological Cells Exposed to Electric Fields. Biophys. J. 90, 480–491. https://doi.org/10.1529/biophysj.105.070771
Lacina, L., Kolář, M., Pfeiferová, L., Gál, P., Smetana, K., 2024. Wound healing: insights into autoimmunity, ageing, and cancer ecosystems through inflammation and IL-6 modulation. Front. Immunol. 15, 1403570. https://doi.org/10.3389/fimmu.2024.1403570
Lansdown, A.B.G., 2002. Calcium: a potential central regulator in wound healing in the skin. Wound Repair Regen. 10, 271–285. https://doi.org/10.1046/j.1524-475X.2002.10502.x
Lee, E.W., Wong, D., Prikhodko, S.V., Perez, A., Tran, C., Loh, C.T., Kee, S.T., 2012. Electron Microscopic Demonstration and Evaluation of Irreversible Electroporation-Induced Nanopores on Hepatocyte Membranes. J. Vasc. Interv. Radiol. 23, 107–113. https://doi.org/10.1016/j.jvir.2011.09.020
Leid, J.G., Willson, C.J., Shirtliff, M.E., Hassett, D.J., Parsek, M.R., Jeffers, A.K., 2005. The Exopolysaccharide Alginate Protects *Pseudomonas aeruginosa* Biofilm Bacteria from IFN-γ-Mediated Macrophage Killing. J. Immunol. 175, 7512–7518. https://doi.org/10.4049/jimmunol.175.11.7512
Levin, R., Grinstein, S., Canton, J., 2016. The life cycle of phagosomes: formation, maturation, and resolution. Immunol. Rev. 273, 156–179. https://doi.org/10.1111/imr.12439
Li, W., Fan, Q., Ji, Z., Qiu, X., Li, Z., 2011. The Effects of Irreversible Electroporation (IRE) on Nerves. PLoS ONE 6, e18831. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0018831
Litjens, S.H.M., De Pereda, J.M., Sonnenberg, A., 2006. Current insights into the formation and breakdown of hemidesmosomes. Trends Cell Biol. 16, 376–383. https://doi.org/10.1016/j.tcb.2006.05.004
Liu, Xinyu, Wang, H., Zhao, Z., Zhong, Q., Wang, X., Liu, Xing, Chen, J., Han, C., Shi, Z., Liang, Q., 2024. Advances in irreversible electroporation for prostate cancer. Discov. Oncol. 15, 713. https://doi.org/10.1007/s12672-024-01570-4
Loots, M.A.M., Lamme, E.N., Zeegelaar, J., Mekkes, J.R., Bos, J.D., Middelkoop, E., 1998. Differences in Cellular Infiltrate and Extracellular Matrix of Chronic Diabetic and Venous Ulcers Versus Acute Wounds. J. Invest. Dermatol. 111, 850–857. https://doi.org/10.1046/j.1523-1747.1998.00381.x

Machado, P., Ribeiro, F.N., Giublin, F.C.W., Mieres, N.G., Tonin, F.S., Pontarolo, R., Sari, M.H.M., Lazo, R.E.L., Ferreira, L.M., 2025. Next-Generation Wound Care: A Scoping Review on Probiotic, Prebiotic, Synbiotic, and Postbiotic Cutaneous Formulations. Pharmaceuticals 18, 704. https://doi.org/10.3390/ph18050704

Martins-Green, M., Petreaca, M., Wang, L., 2013. Chemokines and Their Receptors Are Key Players in the Orchestra That Regulates Wound Healing. Adv. Wound Care 2, 327–347. https://doi.org/10.1089/wound.2012.0380

Mast, B.A., Schultz, G.S., 1996. Interactions of cytokines, growth factors, and proteases in acute and chronic wounds. Wound Repair Regen. 4, 411–420. https://doi.org/10.1046/j.1524-475X.1996.40404.x

Medina, A., Scott, P.G., Ghahary, A., Tredget, E.E., 2005. Pathophysiology of Chronic Nonhealing Wounds: J. Burn Care Rehabil. 26, 306–319. https://doi.org/10.1097/01.BCR.0000169887.04973.3A

Mescher, A.L., Junqueira, L.C.U., 2013. Junqueira's basic histology: text and atlas, Thirteenth edition. ed. McGraw-Hill Medical, New York.

Miklavčič, D., Mali, B., Kos, B., Heller, R., Serša, G., 2014. Electrochemotherapy: from the drawing board into medical practice. Biomed. Eng. OnLine 13, 29. https://doi.org/10.1186/1475-925X-13-29

Miyakoshi, J., 2013. Cellular and Molecular Responses to Radio-Frequency Electromagnetic Fields. Proc. IEEE 101, 1494–1502. https://doi.org/10.1109/JPROC.2013.2248111

Mondal, N., Dalal, D.C., 2023. Modelling of reversible tissue electroporation and its thermal effects in drug delivery. Eur. J. Pharm. Biopharm. 190, 47–57. https://doi.org/10.1016/j.ejpb.2023.07.005

Monika, P., Waiker, P.V., Chandraprabha, M.N., Rangarajan, A., Murthy, K.N.C., 2021. Myofibroblast progeny in wound biology and wound healing studies. Wound Repair Regen. 29, 531–547. https://doi.org/10.1111/wrr.12937

Morikawa, S., Iribar, H., Gutiérrez-Rivera, A., Ezaki, T., Izeta, A., 2019. Pericytes in Cutaneous Wound Healing, in: Birbrair, A. (Ed.), Pericyte Biology in Disease, Advances in Experimental Medicine and Biology. Springer International Publishing, Cham, pp. 1–63. https://doi.org/10.1007/978-3-030-16908-4_1

Morris, N.G., Woods, E.L., Dally, J., Midgley, A.C., Steadman, R., Moseley, R., 2025. Dysfunctional pericellular hyaluronan deposition contributes to attenuated CD44/EGFR co-localization and impaired myofibroblast differentiation in chronic wound fibroblasts. Exp. Cell Res. 450, 114646. https://doi.org/10.1016/j.yexcr.2025.114646

Muñoz, N.M., Minhaj, A.A., Dupuis, C.J., Ensor, J.E., Golardi, N., Jaso, J.M., Dixon, K.A., Figueira, T.A., Galloway-Peña, J.R., Hill, L., Shelburne, S.A., Tam, A.L., 2019. What Are the Effects of Irreversible Electroporation on a Staphylococcus aureus Rabbit Model of Osteomyelitis? Clin. Orthop. 477, 2367–2377. https://doi.org/10.1097/CORR.0000000000000882

Mylona, P., Tsoumakas, K., Mariolis-Sapsakos, T., Kechris, I., Boki, D., Tairis, N., Loutas, T., Theodosopoulou, E., 2026. Innovative Therapeutic Strategies for Chronic Ulcer Healing, in: Vlamos, P. (Ed.), GeNeDIS 2024, Advances in Experimental Medicine and Biology. Springer Nature Switzerland, Cham, pp. 425–434. https://doi.org/10.1007/978-3-032-03402-1_45

Ng, M.F., 2010. The role of mast cells in wound healing. Int. Wound J. 7, 55–61. https://doi.org/10.1111/j.1742-481X.2009.00651.x

Nikolić, D., Pasternak, J., Manojlović, V., Budinski, S., Nikolić, M.B., Batinić, N., 2026. Hyperbaric Oxygen Therapy for Chronic Venous Leg Ulcers: A Prospective Randomised Controlled Trial. Int. Wound J. 23, e70856. https://doi.org/10.1111/iwj.70856

Nilforoushzadeh, M.A., Heidari-Kharaji, M., Shahverdi, M., Nouri, M., Enamzadeh, R., Nobari, N.N., Fakhim, T., Rafiee, S., 2023. Microneedle fractional radiofrequency in the treatment of periorbital dark circles. J. Cosmet. Dermatol. 22, 2218–2224. https://doi.org/10.1111/jocd.15870

Novickij, V., Lastauskienė, E., Staigvila, G., Girkontaitė, I., Zinkevičienė, A., Švedienė, J., Paškevičius, A., Markovskaja, S., Novickij, J., 2019. Low concentrations of acetic and formic acids enhance the inactivation of Staphylococcus aureus and Pseudomonas aeruginosa with pulsed electric fields. BMC Microbiol. 19, 73. https://doi.org/10.1186/s12866-019-1447-1

Novickij, V., Švedienė, J., Paškevičius, A., Markovskaja, S., Girkontaitė, I., Zinkevičienė, A., Lastauskienė, E., Novickij, J., 2018a. Pulsed Electric Field-Assisted Sensitization of Multidrug-Resistant *Candida Albicans* to Antifungal Drugs. Future Microbiol. 13, 535–546. https://doi.org/10.2217/fmb-2017-0245

Novickij, V., Zinkevičienė, A., Perminaitė, E., Čėsna, R., Lastauskienė, E., Paškevičius, A., Švedienė, J., Markovskaja, S., Novickij, J., Girkontaitė, I., 2018b. Non-invasive nanosecond electroporation for

biocontrol of surface infections: an in vivo study. Sci. Rep. 8, 14516. https://doi.org/10.1038/s41598-018-32783-7
Nunan, R., Harding, K.G., Martin, P., 2014. Clinical challenges of chronic wounds: searching for an optimal animal model to recapitulate their complexity. Dis. Model. Mech. 7, 1205–1213. https://doi.org/10.1242/dmm.016782
Okuno, Y., Nakamura-Ishizu, A., Kishi, K., Suda, T., Kubota, Y., 2011. Bone marrow-derived cells serve as proangiogenic macrophages but not endothelial cells in wound healing. Blood 117, 5264–5272. https://doi.org/10.1182/blood-2011-01-330720
Pall, M.L., 2013. Electromagnetic fields act *via* activation of voltage-gated calcium channels to produce beneficial or adverse effects. J. Cell. Mol. Med. 17, 958–965. https://doi.org/10.1111/jcmm.12088
Percival, S.L., Suleman, L., Vuotto, C., Donelli, G., 2015. Healthcare-associated infections, medical devices and biofilms: risk, tolerance and control. J. Med. Microbiol. 64, 323–334. https://doi.org/10.1099/jmm.0.000032
Pérez-Suárez, J., Torres Díaz, C.V., López Manzanares, L., Navas García, M., Pastor, J., Barrio Fernández, P., G. De Sola, R., 2017. Radiofrequency Lesions through Deep Brain Stimulation Electrodes in Movement Disorders: Case Report and Review of the Literature. Stereotact. Funct. Neurosurg. 95, 137–141. https://doi.org/10.1159/000454891
Pierce, G.F., Mustoe, T.A., Altrock, B.W., Deuel, T.F., Thomason, A., 1991. Role of platelet-derived growth factor in wound healing. J. Cell. Biochem. 45, 319–326. https://doi.org/10.1002/jcb.240450403
Pillet, F., 2017. Electroporation of Biofilms, in: Miklavčič, D. (Ed.), Handbook of Electroporation. Springer International Publishing, Cham, pp. 403–416. https://doi.org/10.1007/978-3-319-32886-7_27
Pillet, F., Formosa-Dague, C., Baaziz, H., Dague, E., Rols, M.-P., 2016a. Cell wall as a target for bacteria inactivation by pulsed electric fields. Sci. Rep. 6, 19778. https://doi.org/10.1038/srep19778
Pillet, F., Marjanovič, I., Reberšek, M., Miklavčič, D., Rols, M.-P., Kotnik, T., 2016b. Inactivation of spores by electric arcs. BMC Microbiol. 16, 148. https://doi.org/10.1186/s12866-016-0764-x
Potočnik, T., Miklavčič, D., Maček Lebar, A., 2019. Effect of electroporation and recovery medium pH on cell membrane permeabilization, cell survival and gene transfer efficiency in vitro. Bioelectrochemistry 130, 107342. https://doi.org/10.1016/j.bioelechem.2019.107342
Poudel, A., Oludiran, A., Sözer, E.B., Casciola, M., Purcell, E.B., Muratori, C., 2021a. Growth in a biofilm sensitizes Cutibacterium acnes to nanosecond pulsed electric fields. Bioelectrochemistry 140, 107797. https://doi.org/10.1016/j.bioelechem.2021.107797
Poudel, A., Oludiran, A., Sözer, E.B., Casciola, M., Purcell, E.B., Muratori, C., 2021b. Growth in a biofilm sensitizes Cutibacterium acnes to nanosecond pulsed electric fields. Bioelectrochemistry 140, 107797. https://doi.org/10.1016/j.bioelechem.2021.107797
Powers, J.G., Higham, C., Broussard, K., Phillips, T.J., 2016. Wound healing and treating wounds. J. Am. Acad. Dermatol. 74, 607–625. https://doi.org/10.1016/j.jaad.2015.08.070
Pradhan, S., Khatlani, T., Nairn, A.C., Vijayan, K.V., 2017. The heterotrimeric G protein Gβ1 interacts with the catalytic subunit of protein phosphatase 1 and modulates G protein–coupled receptor signaling in platelets. J. Biol. Chem. 292, 13133–13142. https://doi.org/10.1074/jbc.M117.796656
Qaseem, A., Humphrey, L.L., Forciea, M.A., Starkey, M., Denberg, T.D., for the Clinical Guidelines Committee of the American College of Physicians*, 2015. Treatment of Pressure Ulcers: A Clinical Practice Guideline From the American College of Physicians. Ann. Intern. Med. 162, 370–379. https://doi.org/10.7326/M14-1568
Rahim, K., Saleha, S., Zhu, X., Huo, L., Basit, A., Franco, O.L., 2017a. Bacterial Contribution in Chronicity of Wounds. Microb. Ecol. 73, 710–721. https://doi.org/10.1007/s00248-016-0867-9
Rahim, K., Saleha, S., Zhu, X., Huo, L., Basit, A., Franco, O.L., 2017b. Bacterial Contribution in Chronicity of Wounds. Microb. Ecol. 73, 710–721. https://doi.org/10.1007/s00248-016-0867-9
Rai, V., Moellmer, R., Agrawal, D.K., 2023. Role of fibroblast plasticity and heterogeneity in modulating angiogenesis and healing in the diabetic foot ulcer. Mol. Biol. Rep. 50, 1913–1929. https://doi.org/10.1007/s11033-022-08107-4
Raju, S., Sanford, P., Herman, S., Olivier, J., 2012. Postural and Ambulatory Changes in Regional Flow and Skin Perfusion. Eur. J. Vasc. Endovasc. Surg. 43, 567–572. https://doi.org/10.1016/j.ejvs.2012.01.019
Ramírez-Valle, F., Gray, E.E., Cyster, J.G., 2015. Inflammation induces dermal $V\gamma4^{+}$ γδT17 memory-like cells that travel to distant skin and accelerate secondary IL-17–driven responses. Proc. Natl. Acad. Sci. 112, 8046–8051. https://doi.org/10.1073/pnas.1508990112

Ramklowan, D.S.H., Snyman, C., Van De Vyver, M., Niesler, C.U., 2023. Establishment of fibroblast and myofibroblast phenotypes for use in in vitro co-culture models. Biochimie 207, 96–101. https://doi.org/10.1016/j.biochi.2022.10.017

Rejinold, N.S., Jayakumar, R., Kim, Y.-C., 2015. Radio frequency responsive nano-biomaterials for cancer therapy. J. Controlled Release 204, 85–97. https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2015.02.036

Rems, L., Kasimova, M.A., Testa, I., Delemotte, L., 2020. Pulsed Electric Fields Can Create Pores in the Voltage Sensors of Voltage-Gated Ion Channels. Biophys. J. 119, 190–205. https://doi.org/10.1016/j.bpj.2020.05.030

Rochon, P.J., Reghunathan, A., Kapoor, B.S., Kalva, S.P., Fidelman, N., Majdalany, B.S., Abujudeh, H., Caplin, D.M., Eldrup-Jorgensen, J., Farsad, K., Guimaraes, M.S., Gupta, A., Higgins, M., Kendi, A.T., Khilnani, N.M., Patel, P.J., Dill, K.E., Hohenwalter, E.J., 2023. ACR Appropriateness Criteria® Lower Extremity Chronic Venous Disease. J. Am. Coll. Radiol. 20, S481–S500. https://doi.org/10.1016/j.jacr.2023.08.011

Rockenbach, A., Sudarsan, S., Berens, J., Kosubek, M., Lazar, J., Demling, P., Hanke, R., Mennicken, P., Ebert, B.E., Blank, L.M., Schnakenberg, U., 2019. Microfluidic Irreversible Electroporation—A Versatile Tool to Extract Intracellular Contents of Bacteria and Yeast. Metabolites 9, 211. https://doi.org/10.3390/metabo9100211

Rojas-Rodriguez, R., Gealekman, O., Kruse, M.E., Rosenthal, B., Rao, K., Min, S., Bellve, K.D., Lifshitz, L.M., Corvera, S., 2014. Adipose Tissue Angiogenesis Assay, in: Methods in Enzymology. Elsevier, pp. 75–91. https://doi.org/10.1016/B978-0-12-411619-1.00005-7

Rosenzweig, Z., Garcia, J., Thompson, G.L., Perez, L.J., 2024. Inactivation of bacteria using synergistic hydrogen peroxide with split-dose nanosecond pulsed electric field exposures. PLOS ONE 19, e0311232. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0311232

Rousselle, P., Montmasson, M., Garnier, C., 2019. Extracellular matrix contribution to skin wound re-epithelialization. Matrix Biol. 75–76, 12–26. https://doi.org/10.1016/j.matbio.2018.01.002

Rubin, A.E., Usta, O.B., Schloss, R., Yarmush, M., Golberg, A., 2019a. Selective Inactivation of *Pseudomonas aeruginosa* and *Staphylococcus epidermidis* with Pulsed Electric Fields and Antibiotics. Adv. Wound Care 8, 136–148. https://doi.org/10.1089/wound.2018.0819

Rubin, A.E., Usta, O.B., Schloss, R., Yarmush, M., Golberg, A., 2019b. Selective Inactivation of *Pseudomonas aeruginosa* and *Staphylococcus epidermidis* with Pulsed Electric Fields and Antibiotics. Adv. Wound Care 8, 136–148. https://doi.org/10.1089/wound.2018.0819

Rubinsky, B., 2007. Irreversible Electroporation in Medicine. Technol. Cancer Res. Treat. 6, 255–259. https://doi.org/10.1177/153303460700600401

Rubinsky, L., Guenther, E., Mikus, P., Stehling, M., Rubinsky, B., 2016. Electrolytic Effects During Tissue Ablation by Electroporation. Technol. Cancer Res. Treat. 15, NP95–NP103. https://doi.org/10.1177/1533034615601549

Schirmacher, P., Mann, A., Breuhahn, K., Blessing, M., 2001. Keratinocyte-Derived Granulocyte-Macrophage Colony Stimulating Factor Accelerates Wound Healing: Stimulation of Keratinocyte Proliferation, Granulation Tissue Formation, and Vascularization. J. Invest. Dermatol. 117, 1382–1390. https://doi.org/10.1046/j.0022-202x.2001.01600.x

Schoenwolf, G.C., Larsen, W.J. (Eds.), 2009. Larsen's human embryology, 4th ed., Thoroughly rev. and updated. ed. Churchill Livingstone/Elsevier, Philadelphia.

School of Biomedical Engineering and Sciences, Virginia Tech-Wake Forest University, Blacksburg, VA, USA, Lorenzo, M.F., Arena, C.B., School of Biomedical Engineering and Sciences, Virginia Tech-Wake Forest University, Blacksburg, VA, USA, Laboratory for Therapeutic Directed Energy, Department of Physics, Elon University, Elon, NC, USA, Davalos, R.V., School of Biomedical Engineering and Sciences, Virginia Tech-Wake Forest University, Blacksburg, VA, USA, 2017a. Maximizing Local Access to Therapeutic Deliveries in Glioblastoma. Part III: Irreversible Electroporation and High-Frequency Irreversible Electroporation for the Eradication of Glioblastoma, in: Department of Neurosurgery, University Hospitals Leuven, Leuven, Belgium, De Vleeschouwer, S. (Eds.), Glioblastoma. Codon Publications, pp. 373–393. https://doi.org/10.15586/codon.glioblastoma.2017.ch19

School of Biomedical Engineering and Sciences, Virginia Tech-Wake Forest University, Blacksburg, VA, USA, Lorenzo, M.F., Arena, C.B., School of Biomedical Engineering and Sciences, Virginia Tech-Wake Forest University, Blacksburg, VA, USA, Laboratory for Therapeutic Directed Energy,

Department of Physics, Elon University, Elon, NC, USA, Davalos, R.V., School of Biomedical Engineering and Sciences, Virginia Tech-Wake Forest University, Blacksburg, VA, USA, 2017b. Maximizing Local Access to Therapeutic Deliveries in Glioblastoma. Part III: Irreversible Electroporation and High-Frequency Irreversible Electroporation for the Eradication of Glioblastoma, in: Department of Neurosurgery, University Hospitals Leuven, Leuven, Belgium, De Vleeschouwer, S. (Eds.), Glioblastoma. Codon Publications, pp. 373–393. https://doi.org/10.15586/codon.glioblastoma.2017.ch19

Schulz, C., Petzold, T., Ishikawa-Ankerhold, H., 2021. Macrophage Regulation of Granulopoiesis and Neutrophil Functions. Antioxid. Redox Signal. 35, 182–191. https://doi.org/10.1089/ars.2020.8203

Sen, C.K., Gordillo, G.M., Roy, S., Kirsner, R., Lambert, L., Hunt, T.K., Gottrup, F., Gurtner, G.C., Longaker, M.T., 2009. Human skin wounds: A major and snowballing threat to public health and the economy. Wound Repair Regen. 17, 763–771. https://doi.org/10.1111/j.1524-475X.2009.00543.x

Serena, T.E., Bowler, P.G., Schultz, G.S., D'souza, A., Rennie, M.Y., 2021. Are Semi-Quantitative Clinical Cultures Inadequate? Comparison to Quantitative Analysis of 1053 Bacterial Isolates from 350 Wounds. Diagnostics 11, 1239. https://doi.org/10.3390/diagnostics11071239

Shafiee, H., Garcia, P.A., Davalos, R.V., 2009. A Preliminary Study to Delineate Irreversible Electroporation From Thermal Damage Using the Arrhenius Equation. J. Biomech. Eng. 131, 074509. https://doi.org/10.1115/1.3143027

Shams, F., Moravvej, H., Hosseinzadeh, S., Mostafavi, E., Bayat, H., Kazemi, B., Bandehpour, M., Rostami, E., Rahimpour, A., Moosavian, H., 2022. Overexpression of VEGF in dermal fibroblast cells accelerates the angiogenesis and wound healing function: in vitro and in vivo studies. Sci. Rep. 12, 18529. https://doi.org/10.1038/s41598-022-23304-8

Sharma, R., Hruska, J., Peter, L., Randlova, K., Kuca, K., 2025a. Trends in the Treatment of Chronic Wounds. Curr. Med. Chem. 32, 5370–5396. https://doi.org/10.2174/0109298673312649240829103906

Sharma, R., Hruska, J., Peter, L., Randlova, K., Kuca, K., 2025b. Trends in the Treatment of Chronic Wounds. Curr. Med. Chem. 32, 5370–5396. https://doi.org/10.2174/0109298673312649240829103906

Shen, A.Z., Taha, M., Ghannoum, M., Tyring, S.K., 2025a. Biofilms and Chronic Wounds: Pathogenesis and Treatment Options. J. Clin. Med. 14, 7784. https://doi.org/10.3390/jcm14217784

Shen, A.Z., Taha, M., Ghannoum, M., Tyring, S.K., 2025b. Biofilms and Chronic Wounds: Pathogenesis and Treatment Options. J. Clin. Med. 14, 7784. https://doi.org/10.3390/jcm14217784

Shen, J., Tong, Z., Han, B., Zhang, Z., Xian, Z., Yuan, Y., Duan, X., Han, S., Liu, P., Wang, Z., 2025. Synergistic Wound Healing: Unraveling the Multi-Target Effects of Traditional Chinese Medicine and Its Biomaterials on Chronic Wound Pathways. Int. J. Nanomedicine Volume 20, 12889–12912. https://doi.org/10.2147/IJN.S513585

Singer, A.J., Tassiopoulos, A., Kirsner, R.S., 2017. Evaluation and Management of Lower-Extremity Ulcers. N. Engl. J. Med. 377, 1559–1567. https://doi.org/10.1056/NEJMra1615243

Skórkowska-Telichowska, K., Czemplik, M., Kulma, A., Szopa, J., 2013. The local treatment and available dressings designed for chronic wounds. J. Am. Acad. Dermatol. 68, e117–e126. https://doi.org/10.1016/j.jaad.2011.06.028

Slauch, J.M., 2011. How does the oxidative burst of macrophages kill bacteria? Still an open question. Mol. Microbiol. 80, 580–583. https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.2011.07612.x

Smith, P., 2018. Role of myofibroblasts in normal and pathological periodontal wound healing. Oral Dis. 24, 26–29. https://doi.org/10.1111/odi.12773

Sorg, H., Tilkorn, D.J., Mirastschijski, U., Hauser, J., Kraemer, R., 2018. Panta Rhei: Neovascularization, Angiogenesis and Nutritive Perfusion in Wound Healing. Eur. Surg. Res. 59, 232–241. https://doi.org/10.1159/000492410

Sorrentino, S., Studt, J.-D., Medalia, O., Tanuj Sapra, K., 2015. Roll, adhere, spread and contract: Structural mechanics of platelet function. Eur. J. Cell Biol. 94, 129–138. https://doi.org/10.1016/j.ejcb.2015.01.001

Spiliopoulos, S., Reppas, L., Filippiadis, D., Delvecchio, A., Conticchio, M., Memeo, R., Inchingolo, R., 2023. Irreversible electroporation for the management of pancreatic cancer: Current data and future directions. World J. Gastroenterol. 29, 223–231. https://doi.org/10.3748/wjg.v29.i2.223

Stanescu, C., Chiscop, I., Mihalache, D., Boev, M., Tamas, C., Stoleriu, G., 2025. The Roles of Micronutrition and Nutraceuticals in Enhancing Wound Healing and Tissue Regeneration: A Systematic Review. Molecules 30, 3568. https://doi.org/10.3390/molecules30173568
Stehling, M.K., Guenther, E., Mikus, P., Klein, N., Rubinsky, L., Rubinsky, B., 2016. Synergistic Combination of Electrolysis and Electroporation for Tissue Ablation. PLOS ONE 11, e0148317. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0148317
Stewart, P.S., White, B., Boegli, L., Hamerly, T., Williamson, K.S., Franklin, M.J., Bothner, B., James, G.A., Fisher, S., Vital-Lopez, F.G., Wallqvist, A., 2019. Conceptual Model of Biofilm Antibiotic Tolerance That Integrates Phenomena of Diffusion, Metabolism, Gene Expression, and Physiology. J. Bacteriol. 201. https://doi.org/10.1128/JB.00307-19
Stoodley, P., Sauer, K., Davies, D.G., Costerton, J.W., 2002. Biofilms as Complex Differentiated Communities. Annu. Rev. Microbiol. 56, 187–209. https://doi.org/10.1146/annurev.micro.56.012302.160705
Su, Y., Richmond, A., 2015. Chemokine Regulation of Neutrophil Infiltration of Skin Wounds. Adv. Wound Care 4, 631–640. https://doi.org/10.1089/wound.2014.0559
Szpaderska, A.M., Egozi, E.I., Gamelli, R.L., DiPietro, L.A., 2003. The Effect of Thrombocytopenia on Dermal Wound Healing. J. Invest. Dermatol. 120, 1130–1137. https://doi.org/10.1046/j.1523-1747.2003.12253.x
Talbott, H.E., Mascharak, S., Griffin, M., Wan, D.C., Longaker, M.T., 2022. Wound healing, fibroblast heterogeneity, and fibrosis. Cell Stem Cell 29, 1161–1180. https://doi.org/10.1016/j.stem.2022.07.006
Tarek, M., 2005. Membrane Electroporation: A Molecular Dynamics Simulation. Biophys. J. 88, 4045–4053. https://doi.org/10.1529/biophysj.104.050617
Teller, P., White, T.K., 2009. The Physiology of Wound Healing: Injury Through Maturation. Surg. Clin. North Am. 89, 599–610. https://doi.org/10.1016/j.suc.2009.03.006
Toledano-Macías, E., Martínez-Pascual, M.A., Cecilia-Matilla, A., Bermejo-Martínez, M., Pérez-González, A., Jara, R.C., Sacristán, S., Hernández-Bule, M.L., 2024. Radiofrequency Currents Modulate Inflammatory Processes in Keratinocytes. Int. J. Mol. Sci. 25, 10663. https://doi.org/10.3390/ijms251910663
Tomlin, H., Piccinini, A.M., 2018. A complex interplay between the extracellular matrix and the innate immune response to microbial pathogens. Immunology 155, 186–201. https://doi.org/10.1111/imm.12972
Trappmann, B., Gautrot, J.E., Connelly, J.T., Strange, D.G.T., Li, Y., Oyen, M.L., Cohen Stuart, M.A., Boehm, H., Li, B., Vogel, V., Spatz, J.P., Watt, F.M., Huck, W.T.S., 2012. Extracellular-matrix tethering regulates stem-cell fate. Nat. Mater. 11, 642–649. https://doi.org/10.1038/nmat3339
Trengove, N.J., Stacey, M.C., Macauley, S., Bennett, N., Gibson, J., Burslem, F., Murphy, G., Schultz, G., 1999. Analysis of the acute and chronic wound environments: the role of proteases and their inhibitors. Wound Repair Regen. 7, 442–452. https://doi.org/10.1046/j.1524-475X.1999.00442.x
Ulaby, F.T., Ravaioli, U., 2023. Fundamentals of applied electromagnetics, Eighth edition, global edition. ed. Pearson, Harlow.
Vadlamani, A., Detwiler, D.A., Dhanabal, A., Garner, A.L., 2018. Synergistic bacterial inactivation by combining antibiotics with nanosecond electric pulses. Appl. Microbiol. Biotechnol. 102, 7589–7596. https://doi.org/10.1007/s00253-018-9215-y
Van Der Vliet, A., Janssen-Heininger, Y.M.W., 2014. Hydrogen Peroxide as a Damage Signal in Tissue Injury and Inflammation: Murderer, Mediator, or Messenger? J. Cell. Biochem. 115, 427–435. https://doi.org/10.1002/jcb.24683
Van Hinsbergh, V.W.M., Koolwijk, P., 2008. Endothelial sprouting and angiogenesis: matrix metalloproteinases in the lead. Cardiovasc. Res. 78, 203–212. https://doi.org/10.1093/cvr/cvm102
Vella, V., Derreumaux, D., Aris, E., Pellegrini, M., Contorni, M., Scherbakov, M., Bagnoli, F., 2024. The Incidence of Skin and Soft Tissue Infections in the United States and Associated Healthcare Utilization Between 2010 and 2020. Open Forum Infect. Dis. 11, ofae267. https://doi.org/10.1093/ofid/ofae267
Versey, Z., Da Cruz Nizer, W.S., Russell, E., Zigic, S., DeZeeuw, K.G., Marek, J.E., Overhage, J., Cassol, E., 2021. Biofilm-Innate Immune Interface: Contribution to Chronic Wound Formation. Front. Immunol. 12, 648554. https://doi.org/10.3389/fimmu.2021.648554

VIII. A dynamical theory of the electromagnetic field, 1865. . Philos. Trans. R. Soc. Lond. 155, 459–512. https://doi.org/10.1098/rstl.1865.0008
Wall, I.B., Moseley, R., Baird, D.M., Kipling, D., Giles, P., Laffafian, I., Price, P.E., Thomas, D.W., Stephens, P., 2008. Fibroblast Dysfunction Is a Key Factor in the Non-Healing of Chronic Venous Leg Ulcers. J. Invest. Dermatol. 128, 2526–2540. https://doi.org/10.1038/jid.2008.114
Wei, X., Li, M., Zheng, Z., Ma, J., Gao, Y., Chen, L., Peng, Y., Yu, S., Yang, L., 2022. Senescence in chronic wounds and potential targeted therapies. Burns Trauma 10, tkab045. https://doi.org/10.1093/burnst/tkab045
Wheater, P.R., O'Dowd, G., Woodford, P., Young, B., 2014. Wheater's functional histology: a text and colour atlas ; [study smart with student consult], 6. ed., internat. ed., repr. ed, 4190 Study smart with student consult. Elsevier Churchill Livingstone, Philadelphia, Pa.
Wilgus, T.A., Roy, S., McDaniel, J.C., 2013. Neutrophils and Wound Repair: Positive Actions and Negative Reactions. Adv. Wound Care 2, 379–388. https://doi.org/10.1089/wound.2012.0383
Wolcott, R.D., Kennedy, J.P., Dowd, S.E., 2009. Regular debridement is the main tool for maintaining a healthy wound bed in most chronic wounds. J. Wound Care 18, 54–56. https://doi.org/10.12968/jowc.2009.18.2.38743
Wulff, B.C., Wilgus, T.A., 2013. Mast cell activity in the healing wound: more than meets the eye? Exp. Dermatol. 22, 507–510. https://doi.org/10.1111/exd.12169
Wust, P., Hildebrandt, B., Sreenivasa, G., Rau, B., Gellermann, J., Riess, H., Felix, R., Schlag, P., 2002. Hyperthermia in combined treatment of cancer. Lancet Oncol. 3, 487–497. https://doi.org/10.1016/S1470-2045(02)00818-5
Wust, P., Kortüm, B., Strauss, U., Nadobny, J., Zschaeck, S., Beck, M., Stein, U., Ghadjar, P., 2020. Non-thermal effects of radiofrequency electromagnetic fields. Sci. Rep. 10, 13488. https://doi.org/10.1038/s41598-020-69561-3
Xiang, J.-C., Xia, Z.-Y., Sun, J.-X., Wang, S.-G., Xia, Q.-D., 2025. Real-world safety of irreversible electroporation therapy for tumors with nanoknife: MAUDE database analysis. BMC Surg. 25, 390. https://doi.org/10.1186/s12893-025-03136-9
Xu, Z., Liang, B., Tian, J., Wu, J., 2021. Anti-inflammation biomaterial platforms for chronic wound healing. Biomater. Sci. 9, 4388–4409. https://doi.org/10.1039/D1BM00637A
Yager, D.R., Chen, S.M., Ward, S.I., Olutoye, O.O., Diegelmann, R.F., Kelman Cohen, I., 1997. Ability of chronic wound fluids to degrade peptide growth factors is associated with increased levels of elastase activity and diminished levels of proteinase inhibitors. Wound Repair Regen. 5, 23–32. https://doi.org/10.1046/j.1524-475X.1997.50108.x
Yager, D.R., Nwomeh, B.C., 1999. The proteolytic environment of chronic wounds. Wound Repair Regen. 7, 433–441. https://doi.org/10.1046/j.1524-475X.1999.00433.x
Yamashiro, Y., Yanagisawa, H., 2020. The molecular mechanism of mechanotransduction in vascular homeostasis and disease. Clin. Sci. 134, 2399–2418. https://doi.org/10.1042/CS20190488
Yanez, D.A., Lacher, R.K., Vidyarthi, A., Colegio, O.R., 2017. The role of macrophages in skin homeostasis. Pflüg. Arch. - Eur. J. Physiol. 469, 455–463. https://doi.org/10.1007/s00424-017-1953-7
Yano, M., Yano, M., Abe, K., Katsuki, S., Akiyama, H., 2011. Gene expression analysis of apoptosis pathway in HeLa S3 cells subjected to nanosecond pulsed electric fields, in: 2011 IEEE Pulsed Power Conference. Presented at the 2011 IEEE Pulsed Power Conference (PPC), IEEE, Chicago, IL, USA, pp. 1221–1225. https://doi.org/10.1109/PPC.2011.6191588
Yarmush, M.L., Golberg, A., Serša, G., Kotnik, T., Miklavčič, D., 2014. Electroporation-Based Technologies for Medicine: Principles, Applications, and Challenges. Annu. Rev. Biomed. Eng. 16, 295–320. https://doi.org/10.1146/annurev-bioeng-071813-104622
Yun, J.H., Fang, A., Khorshidi, F., Habibollahi, P., Kutsenko, O., Etezadi, V., Hunt, S., Nezami, N., 2023. New Developments in Image-Guided Percutaneous Irreversible Electroporation of Solid Tumors. Curr. Oncol. Rep. 25, 1213–1226. https://doi.org/10.1007/s11912-023-01452-y
Zand, E., Schottroff, F., Steinacker, E., Mae-Gano, J., Schoenher, C., Wimberger, T., Wassermann, K.J., Jaeger, H., 2021. Advantages and limitations of various treatment chamber designs for reversible and irreversible electroporation in life sciences. Bioelectrochemistry 141, 107841. https://doi.org/10.1016/j.bioelechem.2021.107841