



ΕΘΝΙΚΟ ΜΕΤΣΟΒΙΟ ΠΟΛΥΤΕΧΝΕΙΟ

**ΣΧΟΛΗ ΗΛΕΚΤΡΟΛΟΓΩΝ ΜΗΧΑΝΙΚΩΝ ΚΑΙ ΜΗΧΑΝΙΚΩΝ
ΥΠΟΛΟΓΙΣΤΩΝ**

Εργαστήριο Βιοϊατρικής Οπτικής και Εφαρμοσμένης Βιοφυσικής

ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ ΛΕΩΝΙΔΑ ΚΟΝΤΟΥ ΤΟΥ ΚΩΝΣΤΑΝΤΙΝΟΥ

**Μελέτη της επίδρασης του υποστρώματος στα
δομικά χαρακτηριστικά λεπτών υμενίων
κολλαγόνου με χρήση Μικροσκοπίας Ατομικής
Δύναμης**

Επιβλέποντες: κα Διδώ Γιόβα

ΑΘΗΝΑ , 29/8/2014

ΛΕΩΝΙΔΑΣ ΚΟΝΤΟΣ του ΚΩΝΣΤΑΝΤΙΝΟΥ

Copyright © Λεωνίδας Κοντός, 2014

Με επιφύλαξη παντός δικαιώματος. All rights reserved.

Απαγορεύεται η αντιγραφή, αποθήκευση και διανομή της παρούσας εργασίας, εξ ολοκλήρου ή τμήματος αυτής, για εμπορικό σκοπό. Επιτρέπεται η ανατύπωση, αποθήκευση και διανομή για σκοπό μη κερδοσκοπικό, εκπαιδευτικής ή ερευνητικής φύσης, υπό την προϋπόθεση να αναφέρεται η πηγή προέλευσης και να διατηρείται το παρόν μήνυμα. Ερωτήματα που αφορούν τη χρήση της εργασίας για κερδοσκοπικό σκοπό πρέπει να απευθύνονται προς τον συγγραφέα.

Οι απόψεις και τα συμπεράσματα που περιέχονται σε αυτό το έγγραφο εκφράζουν τον συγγραφέα και δεν πρέπει να ερμηνευθεί ότι αντιπροσωπεύουν τις επίσημες θέσεις του Εθνικού Μετσόβιου Πολυτεχνείου.

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

ΠΡΟΛΟΓΟΣ-ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ.....	4
ΠΕΡΙΛΗΨΗ.....	5
ABSTRACT.....	6
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1: ΤΟ ΚΟΛΛΑΓΟΝΟ.....	7
1.1 Γενικά	7
1.2 Σύνθεση κολλαγόνου.....	9
1.3 Ιδιότητες κολλαγόνου.....	10
1.3.1 Θερμική αποδιοργάνωση του κολλαγόνου.....	14
1.4 Βιοϋλικό κολλαγόνου.....	16
1.4.1 Λεπτά υμένα κολλαγόνου.....	17
1.5 Βιβλιογραφία.....	18
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2: ΜΙΚΡΟΣΚΟΠΙΑ ΑΤΟΜΙΚΗΣ ΔΥΝΑΜΗΣ.....	21
2.1 Βασικές αρχές	22
2.2 Λειτουργίες απεικόνισης	23
2.3 Πλεονεκτήματα και μειονεκτήματα.....	31
2.4 Εφαρμογές μικροσκοπίου ατομικής δύναμης.....	32
2.4.1 Διερεύνηση κολλαγόνου με μικροσκόπιο ατομικής δύναμης.....	34
2.5 Βιβλιογραφία.....	37
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3: ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ.....	39
3.1 Phosphate Buffered Saline.....	39
3.2 Spin Coater.....	39
3.3 Mica.....	41
3.4 Πολυστυρένιο.....	42
3.5 Βιβλιογραφία.....	44
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 4: ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΑ ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ.....	45
4.1 Φωτογραφίες με μίκα σε contact mode.....	46
4.2 Φωτογραφίες με μίκα σε tapping mode.....	48
4.3 Φωτογραφίες με μίκα και πολυστυρένιο σε contact mode.....	55
4.4 Φωτογραφίες με μίκα και πολυστυρένιο σε tapping mode.....	56
4.5 Συμπεράσματα.....	61
4.6 Βιβλιογραφία.....	61

ΠΡΟΛΟΓΟΣ-ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Η παρούσα διπλωματική εργασία έγινε στα πλαίσια της ολοκλήρωσης των σπουδών μου στη σχολή Ηλεκτρολόγων Μηχανικών και Μηχανικών Υπολογιστών. Η επιβλέπουσα καθηγήτρια είναι η κα. Διδώ Γιόβα της σχολής ΗΜΜΥ με τα πειράματα να έχουν διεκπεραιωθεί στη διάταξη AFM του τομέα Ηλεκτρομαγνητικών Εφαρμογών, Ηλεκτροπτικής και Ηλεκτρονικών Υλικών της ΣΗΜΜΥ. Θα ήθελα να ευχαριστήσω καταρχάς τη κα. Διδώ Γιόβα, τον Ανδρέα Στυλιανό, τον Στέλιο Κοντομάρη και το λοιπό προσωπικό του εργαστηρίου για τη άψογη συνεργασία και συμβολή στη διεκπεραίωση της εργασίας. Επίσης θα ήθελα να ευχαριστήσω τους φίλους μου και λοιπούς ανθρώπους οι οποίοι με στηρίζανε ψυχολογικά στη διάρκεια της εγγραφής της εργασίας. Τέλος, ευχαριστώ την οικογένεια μου και συγγενείς μου οι οποίοι ήταν δίπλα μου για ότι χρειαστώ, και κυρίως την μητέρα μου για τις θυσίες που έκανε για την ανατροφή μου και την ωρίμανση μου ως άνθρωπος.

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Το κολλαγόνο, ως η πιο κοινή πρωτεΐνη του ανθρώπινου οργανισμού (25%-35%) και βασικό δομικό στοιχείο ιστών με ύψιστη βιολογική σημασία όπως σύνδεσμοι, τένοντες και το δέρμα αποτελεί βασικό πεδίο μελέτης ερευνών λόγω της χρήσης του σε βιοϊατρικές εφαρμογές.

Στη παρούσα εργασία επιχειρήθηκε η απεικόνιση του κολλαγόνου σε δυο ξεχωριστά υποστρώματα, μίκα λόγω της δυνατότητας του για την εύκολη δημιουργία σχεδόν ατομικά επίπεδης επιφάνειας, και σφαίρες πολυστυρένιου, λόγω της δυνατότητας του να σχηματίζει εξαγωνικές συστοιχίες, δίνοντας στο κολλαγόνο τη δυνατότητα να αποκτήσει συγκεκριμένη δομή και κατεύθυνση, κάτι πολύ σημαντικό για εφαρμογές νανοτεχνολογίας. Για αυτό το λόγο, χρησιμοποιήθηκε για την απεικόνιση του κολλαγόνου στα πειράματα το AFM, ένα μικροσκόπιο με τη δυνατότητα μέτρησης κλίμακας νανομέτρων. Το AFM με τους δυο τρόπους απεικόνισης contact και non-contact (με τοπογραφία και φασική, γνωστή και ως tapping) έδωσε διαφορετικά αποτελέσματα για τις δυο μεθόδους, με την tapping μέθοδο να αποδεικνύεται (τουλάχιστο για τα πειραματικά δεδομένα) πιο αποτελεσματική στην απεικόνιση του κολλαγόνου.

Λέξεις κλειδιά

Κολλαγόνο, μίκα, πολυστυρένιο, απεικόνιση, ατομική μικροσκοπία

ABSTRACT

Collagen, as the most abundant protein in the human body (25% -35%) and basic building block of tissues with the high biological significance, such as tendons and skin, is a key research study with its use in biomedical applications.

In the current study, imaging of collagen was attempted in two separate substrates, mica because of the possibility to easily create almost atomic flat surface (perfect basal cleavage), and polystyrene spheres, because of the possibility of forming hexagonal arrays, allowing the collagen to acquire a specific structure and direction, which is very important for nanotechnology applications. For this reason, an atomic force microscope (AFM) was used for imaging of the experiments with the collagen and substrates, thanks to its capability of measuring in nanometer scale. The AFM with the two imaging modes contact and non-contact (by topography and phase, known as tapping) gave different results for the two methods, with the tapping method demonstrated (at least for the experimental data) more effective imaging of collagen and substrates.

KEY WORDS

Atomic force microscope, AFM, collagen, mica, polystyrene, contact, tapping

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1: ΤΟ ΚΟΛΛΑΓΟΝΟ

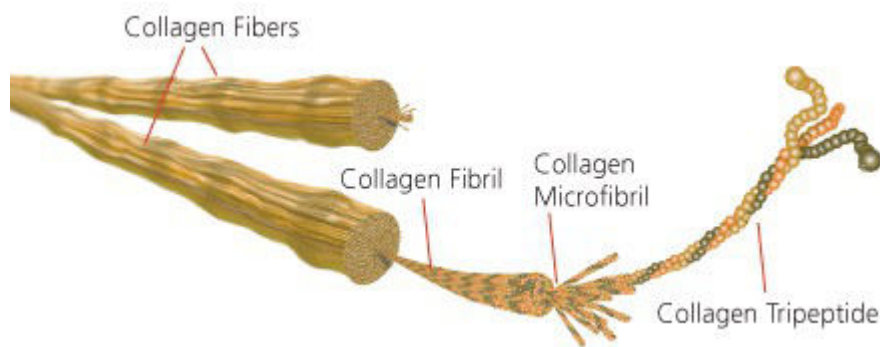
1.1 Γενικά

Το κολλαγόνο είναι μια ινώδης πρωτεΐνη και χρησιμοποιείται για τη σύνδεση και υποστήριξη άλλων σωματικών ιστών, όπως το δέρμα, τα οστά, τένοντες, τους μύες, το χόνδρο, ακόμα και στον κερατοειδή χιτώνα. Βρίσκεται αποκλειστικά στα ζώα, και είναι η πιο άφθονη πρωτεΐνη τους, σε ποσοστό από 25% έως 35%. Το κολλαγόνο έχει μεγάλη αντοχή στον εφελκυσμό, κάτι λογικό αφού αποτελεί δομικό στοιχείο συνδετικών ιστών, και μαζί με την ελαστίνη (Εικόνα 1) “συνεργάζονται” σε πολλά μέρη του σώματος [1].



ΕΙΚΟΝΑ 1.1: Μικροφωτογραφία ινιδίων που κρατάνε σταθερή τη δομή του σώματος. Η μπλε διαγώνιος γραμμή είναι ένα απλό τροποκολλαγόνο, που συνδέεται ανά 3 σε τριπλή έλικα (υπερέλικα), όπως φαίνεται και λίγο πιο κάτω από τη μέση της εικόνας. Επίσης φαίνονται η ελαστίνη (κίτρινη γραμμή σα “φίδι”) και η ρετικουλίνη (μικρές γραμμές σαν ιστοί αράχνης)

Η βασική δομική του μονάδα είναι το τροποκολλαγόνο (το οποίο είναι το μόριο του κολλαγόνου), μια υπομονάδα των ινιδίων του κολλαγόνου. Έχει μήκος 300 nm και αποτελείται από τρεις πολυπεπτιδικές αλυσίδες (οι λεγόμενες άλφα αλυσίδες) που έχουν τη μορφή αριστερόστροφης έλικας. Αυτές οι 3 αλυσίδες είναι περιτυλιγμένες μαζί σε μια δομή δεξιόστροφης τριπλής έλικας, ή υπερέλικας, η οποία είναι μια τεταρτοταγής δομή που κρατείται σταθερή χάρη σε πολλαπλούς δεσμούς υδρογόνου. Αυτή η υπερέλικα αναφέρεται και ως μικροινίδιο κολλαγόνου (Εικόνα 2), το οποίο από μόνο του είναι ασταθές, αλλά πολλά μαζί σε ινίδια κολλαγόνου, έχουν τόσο καλά διατεταγμένη μορφή που να είναι κρυσταλλικά [2].



Εικόνα 1.2: Σύσταση ινιδίων κολλαγόνου, από αριστερά προς τα δεξιά, ίνες, ινίδια, μικροινίδια και τριπεπτίδια κολλαγόνου.

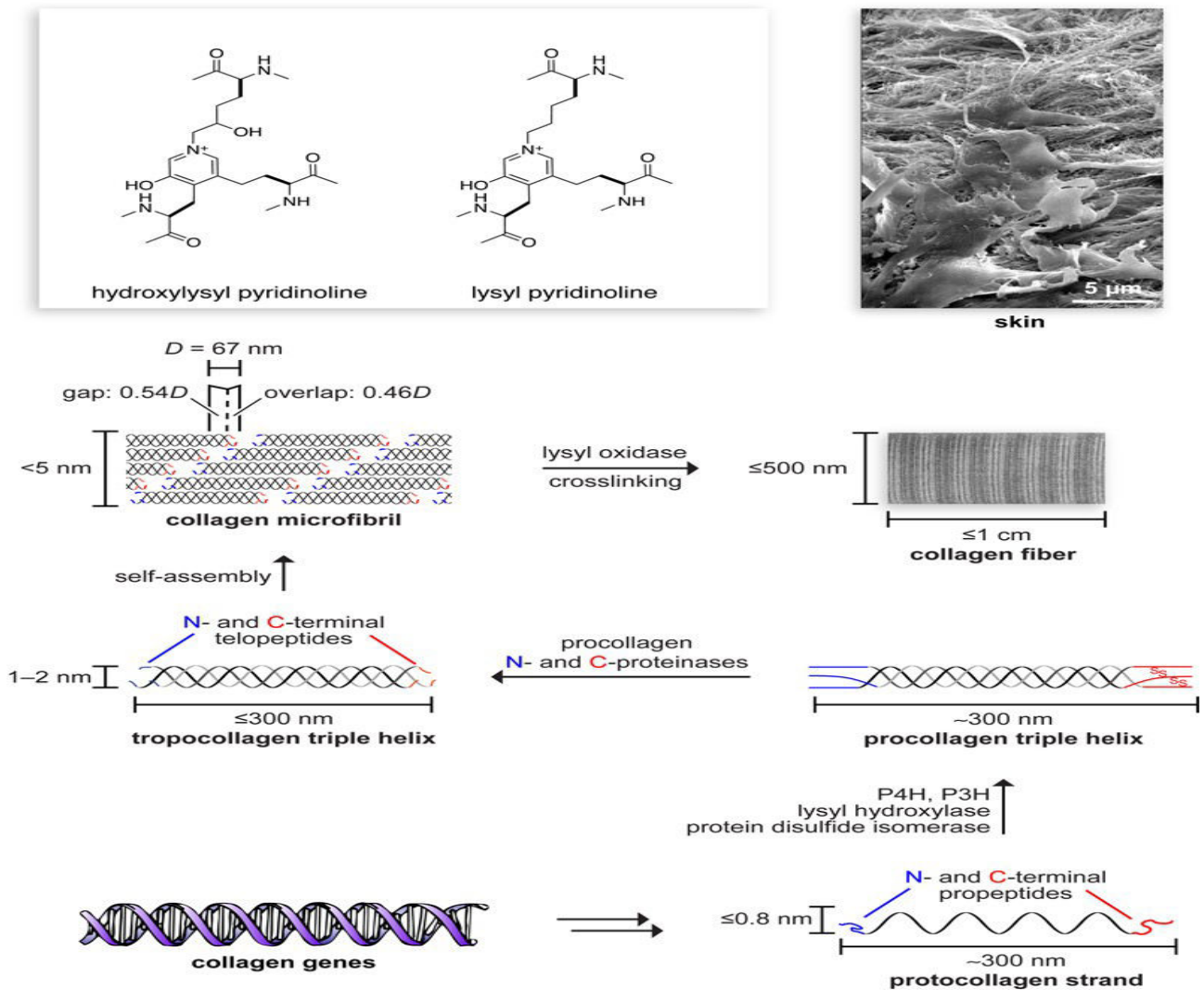
Υπάρχουν 29 είδη κολλαγόνου που έχουν εντοπιστεί. Τα παρακάτω (Πίνακας 1) αποτελούν παραπάνω από το 90% που περιέχονται στο ανθρώπινο σώμα [3]. Διάφορες γενετικές διαταραχές όπως το σύνδρομο Ehlers-Danlos, ατελής οστεογένεση, σύνδρομο Alpert, μυοπάθειες και κολλαγονοπάθειες II και IX οφείλονται σε γενετικά σφάλματα των παραπάνω γονιδίων.

ΤΥΠΟΣ	ΣΗΜΕΙΩΣΕΙΣ	ΓΟΝΙΔΙΟ
I	Αποτελεί το μεγαλύτερο μέρος του κολλαγόνου που υπάρχει στο σώμα μας. Βρίσκεται σε τένοντες, δέρμα, αρτηριακές οδούς, χόνδρους, μυϊκές ίνες, ουλές και στο οργανικό μέρος δοντιών και οστών.	COL1A1, COL1A2
II	Υαλώδεις χόνδρους (υαλώδες των ματιών)	COL2A1
III	Κοκκιώδης ιστός, που παράγεται σε πληγές πριν γίνει η σύνθεση του πιο σκληρού κολλαγόνου τύπου I.	COL3A1
IV	Φακός του ματιού, επίσης είναι μέρος των τριχοειδών αγγείων που χρησιμοποιούνται για το φιλτράρισμα του αίματος.	COL4A1, COL4A2, COL4A3, COL4A4, COL4A5, COL4A6
V	Διάμεσος ιστός, πλακούντας.	COL5A1, COL5A2, COL5A3

Πίνακας 1.1: Οι πιο κοινοί τύποι κολλαγόνου στο ανθρώπινο σώμα [3]

1.2 Σύνθεση κολλαγόνου

Η σύνθεση του κολλαγόνου ξεκινάει από τη μετάφραση γονιδίων και mRNA από τα ριβοσώματα, για τη δημιουργία α-πεπτιδίων (α1, α2 και α3 αλυσίδες που περιέχουν και ένα σηματοδοτικό πεπτιδίο) γνωστά και ως πρωτοκολλαγόνο. Στη συνέχεια, επέρχεται η αποκοπή του σηματοδοτικού πεπτιδίου από την αμινοτελική ομάδα του πεπτιδίου και η υδροξυλίωση των λυσινών και προλινών από ένζυμα (προλυλ-υδροξυλάση και λυσιλ-υδροξυλάση). Τέλος, με τη γλυκοζυλίαση των λυσινών προσθέτοντας γλυκόζη ή γαλακτόζη στις υδροξυλομάδες τους, τα προπεπτιδία στρέφονται ανά τρία δημιουργώντας μια τριπλή έλικα, το προκολλαγόνο [4]. Έπειτα μετά από μικρές τροποποιήσεις που υπόκεινται τα προκολλαγόνα στα σώματα Golgi, εκβάλλονται από το εσωτερικό του κυττάρου όπου αποκόπτονται ενζυματικά οι αμινοτελικές και καρβοξυτελικές ομάδες, για τη δημιουργία τροποκολλαγόνου [5]. Τέλος, το τροποκολλαγόνο υπόκειται σε αποαμινώση μέσω της λυσιλ-οξειδάσης, για τη δημιουργία αλδεϋδομάδων που θα σχηματίσουν σταυροδεσμούς μεταξύ των μορίων τροποκολλαγόνου [6]. Τα προκύπτοντα πολυμερή είναι τα ινίδια κολλαγόνου, η σύνθεση του οποίου αναπαρίσταται γραφικά στην παρακάτω εικόνα 1.3.

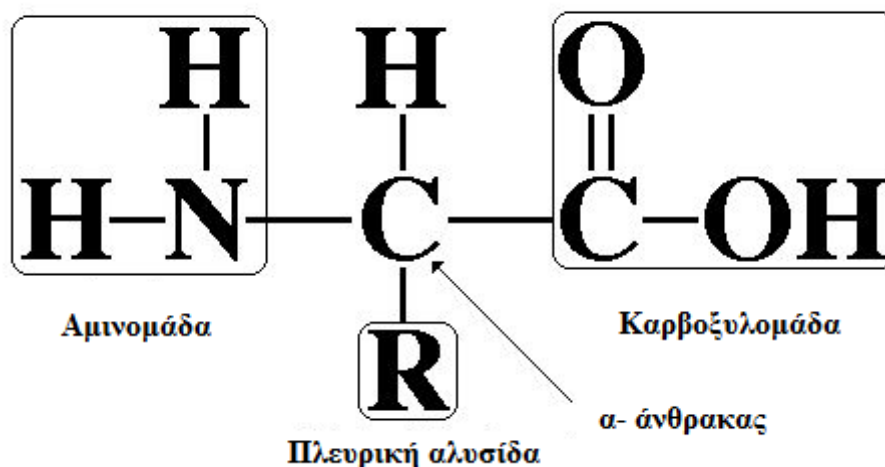


Εικόνα 1.3: Βιοσύνθεση ινιδίων κολλαγόνου [10]

1.3 Ιδιότητες Κολλαγόνου

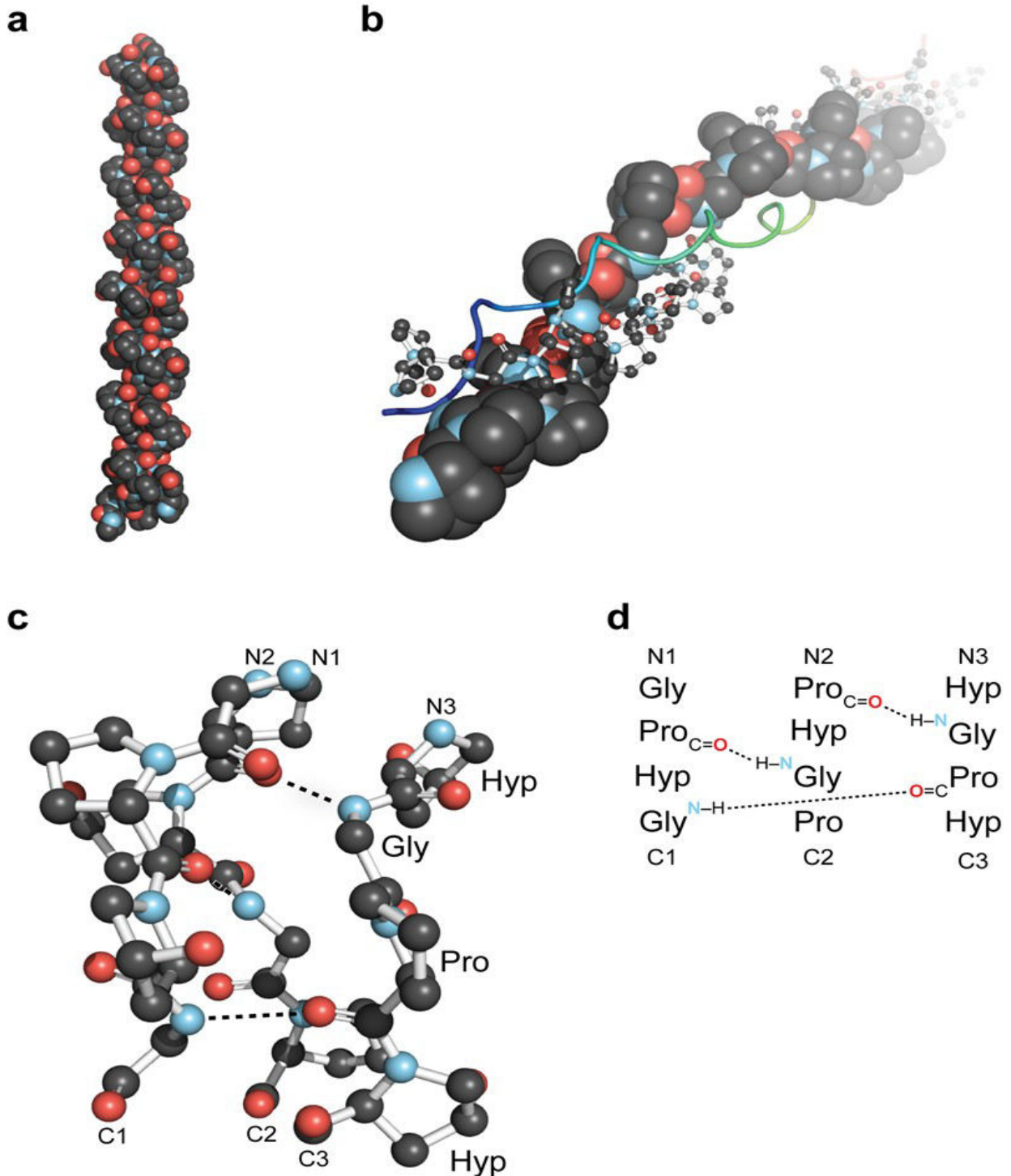
Οι δομικές ιδιότητες του κολλαγόνου, της πιο άφθονης πρωτεΐνης στο ζωικό βασίλειο έχουν αποτελέσει το αντικείμενο πολυάριθμων μελετών κατά τις τελευταίες δεκαετίες, αλλά με την άφιξη των νέων τεχνολογιών, όπως το μικροσκόπιο ατομικών δυνάμεων (Atomic Force Microscopy, AFM) και σχετικές τεχνικές με αυτό, μια νέα εποχή έρευνας έχει επέλθει. Τυπικά το κολλαγόνο αποτελεί μια πρωτεΐνη, και ως τέτοια είναι ένα βιοπολυμερές α-αμινοξέων, τα οποία είναι 20 σε αριθμό. Παρακάτω βλέπουμε στην εικόνα 1.4 τη δομή των αμινοξέων :

ΔΟΜΗ ΑΜΙΝΟΞΕΩΣ



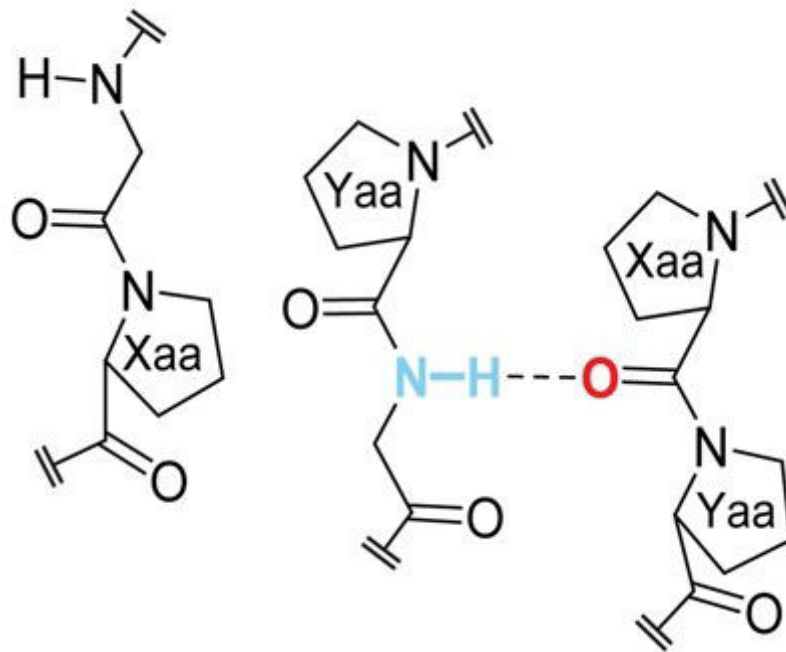
Εικόνα 1.4: Δομή αμινοξέως

Όπως βλέπουμε έχουμε στο κέντρο ένα άτομο άνθρακα που συνδέεται με μια αμινομάδα, μια καρβοξυλομάδα, ένα άτομο υδρογόνου και μια πλευρική αλυσίδα. Οι πολυπεπτιδικές αλυσίδες δημιουργούνται από τη δημιουργία πεπτιδικών δεσμών μεταξύ των αμινομάδων και καρβοξυλομάδων διαφορετικών αμινοξέων, με την απώλεια ενός μορίου νερού. Συγκεκριμένα για το κολλαγόνο, η ζωτική σημασία του ως ένα δομικό στοιχείο για τους ιστούς των ζώων απαιτεί την ύπαρξη πολλαπλών ζωτικών χαρακτηριστικών. Αυτά τα χαρακτηριστικά περιλαμβάνουν θερμική σταθερότητα, τη μηχανική αντοχή, και την ικανότητα να συμμετάσχουν σε ειδικές αλληλεπιδράσεις με άλλα βιομόρια. Οι ιδιότητες αυτές οφείλονται στη θεμελιώδη δομική μονάδα του κολλαγόνου, το τροποκολλαγόνο και την ξεχωριστή μορφή που έχει, την τριπλή έλικα που σχηματίζεται από 3 παράλληλες πολυπεπτιδικές αλυσίδες, σε αριστερόστροφη, πολυπρόλινη II-τύπου ελικοειδή μορφή [7,8], όπως φαίνεται στην εικόνα 1.5. Κάθε μια από τις 3 πολυπεπτιδικές αλυσίδες από το οποίο αποτελείται ακολουθεί την εξής σειρά: Xaa – Yaa – Γλυκίνη, με σύνηθες τις Πρόλινη – X – Γλυκίνη (σε ποσοστό 28%) ή X – Υδροξυπρόλινη – Γλυκίνη (σε ποσοστό 38%) όπου X είναι ένα οποιοδήποτε άλλο αμινοξύ.



Εικόνα 1.5: Δευτεροταγής δομή κολλαγόνου, η τριπλή έλικα [10]. a) Εικόνα τριπλής έλικας b) Πανοραμική εικόνα τριπλής έλικας με απεικόνιση κάθε πολυπεπτιδικής αλυσίδας σε σφαιρική, αλυσιδωτή και μορφή κορδέλας. c) Τμήμα τριπλής έλικας κολλαγόνου, όπου φαίνονται με διακεκομμένη γραμμή οι δεσμοί υδρογόνου μεταξύ των πολυπεπτιδικών αλυσίδων. d) Αναπαράσταση σε πίνακα του τμήματος c) .

Η σταθερότητα αυτής της τριπλής έλικας εξαρτάται από πολλούς παράγοντες [9,10] όπως:
 1) Οι δεσμοί υδρογόνου $N-H_{(Gly)}=O=C_{(Xaa)}$ (εικόνα 1.6) , με ενέργεια της τάξης $\Delta G^\circ = -1.4$ kcal/mol [11] .



Αμιδικός δεσμός

Εικόνα 1.6 : Δεσμός υδρογόνου μεταξύ 2 πολυπεπτιδικών αλυσίδων [10]

2) Η υψηλή ποσότητα της γλυκίνης και η περιοδικότητα της στο κολλαγόνο είναι σημαντική όσον αφορά τη σταθερότητα της έλικας του κολλαγόνου καθώς αυτό επιτρέπει την πολύ κοντινή σύνδεση των ινών του κολλαγόνου μέσα στο μόριο, επιτρέποντας τη δημιουργία δεσμών υδρογόνου $N-H_{(Gly)}=O=C_{(Xaa)}$ και τη σύνθεση διαμοριακών συνδέσεων. Πολλές από τις μεταλλάξεις που προκύπτουν στο κολλαγόνο οφείλονται στην αντικατάσταση της γλυκίνης από άλλα αμινοξέα.

3) Η αφθονία της προλίνης οδηγεί τις πολυπεπτιδικές αλυσίδες να πάρουν μορφή αλυσίδας πολυπρολίνης τύπου II, χάρη στην οποία μειώνεται το εντροπικό κόστος της αναδίπλωσης του κολλαγόνου, ενώ η υδροξυπρολίνη όταν βρίσκεται στη θέση Yaa οδηγεί στην εύκολη δημιουργία δεσμών υδρογόνου.

4) Διαφορετικά αμινοξέα στις θέσεις Xaa – Yaa αλλάζουν την σταθερότητα της τριπλής έλικας. Σε έρευνα των Raines et al [12], ευρέθη ότι το σημείο τήξης της $(ProFlpGly)_7$ είναι $T_m=45\text{ C}^\circ$, ενώ της $(ProHypGly)_7$ έχει μέση τιμή γύρω στους $T_m=36\text{ C}^\circ$. Παρ' όλο που το φθόριο στην φθοριοπρολίνη (Flp) δημιουργεί αδύναμους δεσμούς υδρογόνου, η υπερέλικα που σχηματίζεται από τις πολυπεπτιδικές αλυσίδες με αυτή είναι πιο σταθερή από τις αντίστοιχες με υδροξυπρολίνη, το οποίο αποδίδεται σε στερεοηλεκτρονικές επιδράσεις και σε στερικές επιδράσεις με άλλα Xaa αμινοξέα όπως η μεθυλπρολίνη [13].

Με εξασφαλισμένη τη σταθερότητα της τριπλής έλικας του κολλαγόνου, τα τροποκολλαγόνα μονομερή αυτοσυναρμολογούνται σε μακρομοριακές ίνες (τεταρτοταγείς δομές πρωτεΐνης) που είναι βασικά στοιχεία των ιστών και των οστών, με τη διαδικασία της ινιδιογένεσης να είναι εξαιρετικής σημασίας στην σωστή ανάπτυξη και φυσιολογία των ζώων. Παρ' όλο που το τροποκολλαγόνο ως μονομερές έχει τη μοναδική ιδιότητα να είναι ασταθές σε θερμοκρασία

σώματος [14] , η ινιδιογένεση του κολλαγόνου έχει μια σταθεροποιητική δράση στις τριπλές έλικες ώστε να αντέχουν μηχανική πίεση σε όλες τις διαστάσεις. Όπως αναφέρθηκε στη σύνθεση κολλαγόνου , η ινιδιογένεση μπορεί να προκύψει μόνο με την αποκοπή των αμινοτελικών (N-terminal) και καρβοξυτελικών (C-terminal) ομάδων, παρά το ότι οι καρβοξυτελικές ομάδες είναι απαραίτητες για τη δημιουργία της δομής της τριπλής έλικας των μονομερών, οι οποίες αλληλεπιδρούν με ειδικά μέρη δεσμάτος πάνω στη τριπλή έλικα. Ταυτόχρονα, οι καρβοξυτελικές ομάδες με τη βοήθεια της λυσιλ-οξειδάσης, σχηματίζουν πυριδινολινικούς σταυροδεσμούς μεταξύ των λυσινών και υδροξυλυσινών, κάνοντας τες ένα σημαντικό κομμάτι της σταθερότητας του ινιδίου κολλαγόνου [6] .

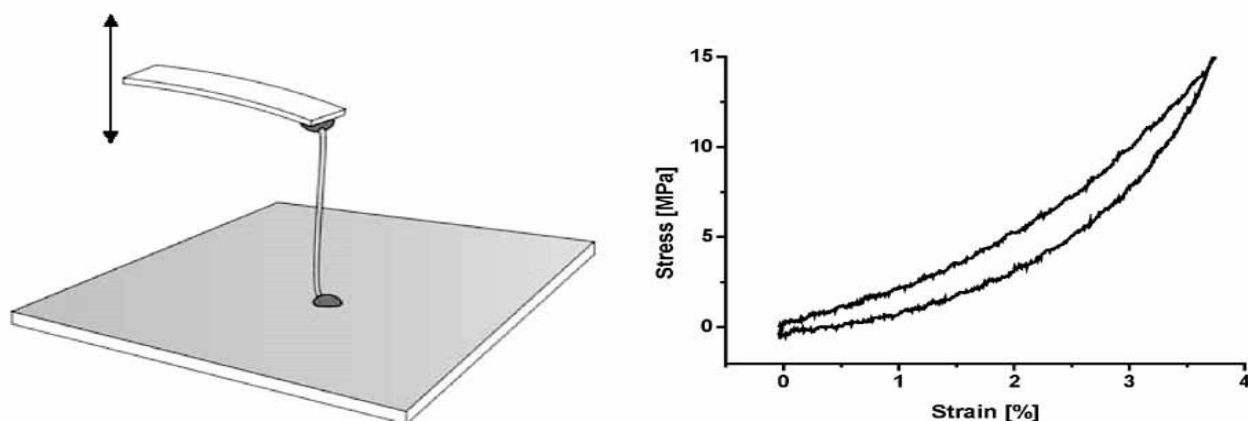
Συνεπώς τα τροποκολλαγόνα συνδυάζονται σε μικροϊνίδια και αυτά σε ινίδια όπως αναφέρθηκε και παραπάνω (εικόνα 1.2) , με τα ινίδια (τύπου I) να έχουν μια ετερότυπη περιοδική δομή 10 μικροϊνιδίων στην επιφάνεια και 4 ισαπέχοντα στο εσωτερικό τους [15] .

Χαρακτηριστικά των ινιδίων κολλαγόνου τύπου I είναι μήκος έως 1 cm, διάμετρος 500 nm (με ξεχωριστά τροποκολλαγόνα <2nm σε διάμετρο και περίπου 300 nm μήκος) και το πιο ξεχωριστό: η D-band περιοδικότητα που παρουσιάζουν με $D = 67$ nm. Όπως φαίνεται και στην εικόνα 1.3, τα μονομερή κολλαγόνα δεν είναι ακριβώς πολλαπλάσια του D, με αποτέλεσμα να προκύπτουν κενά της τάξης των $0.54D$ και επικαλύψεις της τάξης των $0.46D$.

Τα προαναφερθείσα χαρακτηριστικά δίνουν ξεχωριστές μηχανικές ιδιότητες στα ινίδια κολλαγόνου, με τις περισσότερες έρευνες πάνω στο τύπου I κολλαγόνο. Συνοπτικά θα αναφερθούμε:

1) Στην αντοχή σε θραύση (fracture strength), που ευρέθηκε [16] να είναι σε ινίδιο κολλαγόνου γύρω στα 0.5 GPa , συγκριτικά πολύ μικρότερη από του τροποκολλαγόνου (11 GPa). Αυτό εξηγείται ότι για τη θραύση ενός μονομερούς τροποκολλαγόνου απαιτείται διάσπαση ομοιοπολικών δεσμών, το οποίο δεν είναι απαραίτητο να συμβεί για το ινίδιο.

2) Στο μέτρο ελαστικότητας (Young's modulus), που με AFM μετρήσεις από την έρευνα των Dijkstra et al. [17] ευρέθηκε να είναι περίπου $E \approx 5$ GPa για τύπου I κολλαγόνο από βόειο αχίλλειο τένοντα. Επικολλώντας ένα κομμάτι κολλαγόνου μεταξύ μιας ακίδας AFM και μιας επιφάνειας γυαλιού , χρησιμοποιήθηκε φασματοσκοπία δύναμης για την εύρεση των αποτελεσμάτων που φαίνονται στη παρακάτω εικόνα 1.7.



Εικόνα 1.7 : Αριστερά η μέθοδος πειραμάτων, και δεξιά η γραφική παράσταση των αποτελεσμάτων.

3) Στο μέτρο διάτμησης (shear modulus) , που είναι και μέτρο ακαμψίας, το οποίο για κολλαγόνο από βόειο αχίλλειο τένοντα ορίστηκε στα $G = 33$ MPa [18] . Η ενυδάτωση του δείγματος μειώνει την ακαμψία του δείγματος, ενώ η ποσότητα των σταυροδεσμών έως ένα συγκεκριμένο σημείο έχουν θετική επίδραση στις μηχανικές ιδιότητες του κολλαγόνου, η υπέρβαση του οποίου οδηγεί στη δημιουργία πολύ εύθραυστου κολλαγόνου , κάτι που συμβαίνει σε ιστούς με γήρανση. [19] .

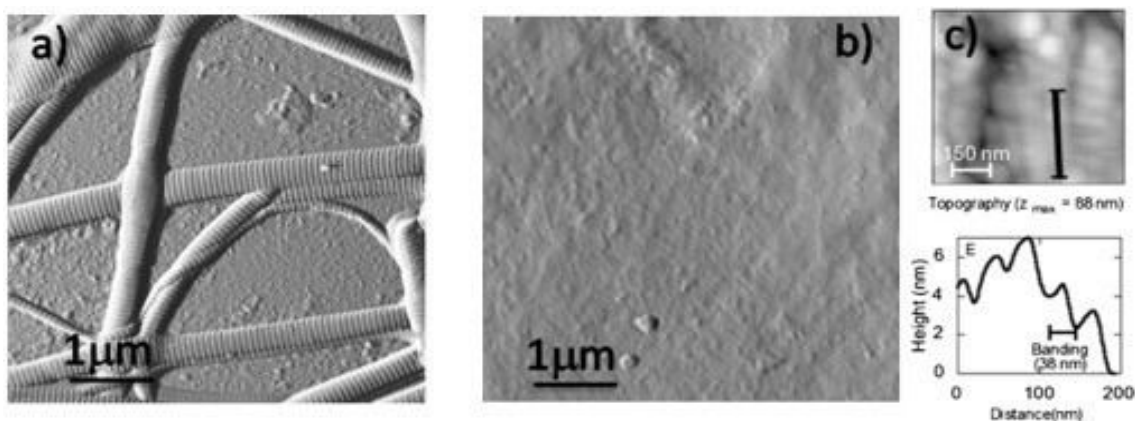
1.3.1 Θερμική αποδιοργάνωση του κολλαγόνου

Παρά το γεγονός ότι η θερμική αποδιαμόρφωση των τενόντων και των οστών έχει μελετηθεί για δεκαετίες χρησιμοποιώντας πολλές διαφορετικές μικροσκοπικές προσεγγίσεις, έχει υπάρξει μια αναζωπύρωση του ενδιαφέροντος καθώς νέες τεχνικές, όπως η μικροσκοπία σάρωσης έχουν γίνει διαθέσιμες σε αυτόν τον τομέα της έρευνας, ιδιαίτερα αν αναλογιστεί κανείς ότι το κολλαγόνο μπορεί να είναι ασταθές σε θερμοκρασία δωματίου [20], το οποίο σημαίνει ότι μπορεί να έχει μία μετουσιωμένη κατάσταση ακόμα και υπό κανονικές φυσιολογικές συνθήκες.

Το κολλαγόνο, λόγω της εξαιρετικά σταθερής εσωτερικής δομής του συμπεριφέρεται ως κρυσταλλική οντότητα. Η εφαρμογή θερμότητας αναλογικά με τη θερμοκρασία και το χρόνο στο κολλαγόνο προκαλεί συρρίκνωση (shrinkage) των ιστών, που είναι η μετάβαση του κολλαγόνου από μια αρχική κρυσταλλική εκτεταμένη κατάσταση σε μια περιτυλιγμένη συνεσταλμένη κατάσταση, λόγω αλλαγών σε μοριακή κλίμακα [21]. Η ρευστοποίηση των κρυστάλλων λόγω διάσπασης δεσμών υδρογόνου μετατρέπει το μονομερές του κολλαγόνου σε μια άμορφη τυχαία περιτυλιγμένη έλικα, πιο επεκτάσιμη. Συγκεκριμένα, σε έρευνα των Rigby & Spikes, ευρέθηκε για κολλαγόνο επιδερμίδας ψαριού ότι όσο μικρότερη ποσότητα υδροξυπρολίνης (στην οποία αναφερθήκαμε εκτεταμένα προηγουμένως πόσο σημαντική είναι στην δημιουργία δεσμών υδρογόνου που προσδίδουν σταθερότητα) περιέχεται στο κολλαγόνο, τόσο μικρότερη είναι η θερμοκρασία πλήρους αποδιαμόρφωσης T_s [22].

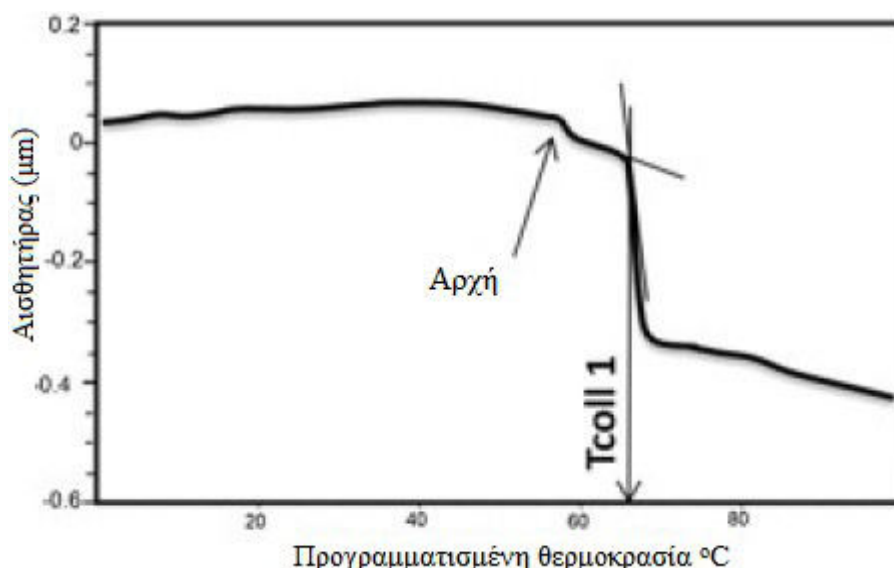
Επίσης, σε κολλαγόνο τύπου I από τένοντα ουράς αρουραίου, βρέθηκε με μικροσκοπία δεύτερης αρμονικής (second harmonic generation microscopy) ότι η συρρίκνωση του κολλαγόνου επήλθε προοδευτικά με εφαρμογή θερμότητας μέσα σε 9 λεπτά, μετά τα οποία παραμένει अपαράλλακτη. Η αποδιαμόρφωση αυτή του κολλαγόνου δεν είναι ανιχνεύσιμη έως τους 57° , όπου είναι ταυτόχρονη η ύπαρξη ινώδους και αποδιαμορφωμένου κολλαγόνου. Στους 60° η αποδιαμόρφωση είναι πλήρης [23].

Η πιο ενδιαφέρουσα έρευνα σε σχέση με το αντικείμενο αυτής της διπλωματικής έγινε από τους Laurent Bozec και Marianne Odlyha [24]. Σε αυτήν μελετήθηκε η αποδιαμόρφωση κολλαγόνου (εικόνα 1.8) σε ενυδατωμένες (με ινίδια κολλαγόνου από ουρά αρουραίου) και αφυδατωμένες (με ζελατίνη) συνθήκες, χρησιμοποιώντας μικροθερμική ανάλυση. Στη συγκεκριμένη μέθοδο διεξαγωγής πειραμάτων, ένας θερμικά ελεγχόμενος καθετήρας AFM έρχεται σε επαφή με το δείγμα εφαρμόζοντας μια σταθερή δύναμη για όλα τα δείγματα ($4 \mu\text{N}$). Αυξάνοντας προοδευτικά τη θερμοκρασία στον θερμικό καθετήρα και χρησιμοποιώντας τον καθετήρα AFM ως μια τοπική πηγή θερμότητας, παρατηρήθηκε η απώθηση του καθετήρα, η οποία μεταφράζεται σε μεταβολή θερμότητας του δείγματος και συνεπώς αλλαγή στις θερμομηχανικές ιδιότητες του. Με τα δεδομένα της απώθησης του πρόβολου του AFM σχεδιάστηκαν L-TMA (localized thermomechanical analysis, τοπική θερμομηχανική ανάλυση) καμπύλες, οι οποίες είναι μια τεχνική με το πλεονέκτημα ότι οι μετρήσεις που γίνονται απευθείας πάνω σε ένα εντοπισμένο χώρο στο δείγμα δεν το καταστρέφουν ολοκληρωτικό, κάτι που είναι σημαντικό όταν ο αριθμός δειγμάτων είναι περιορισμένος ή οι μετρήσεις πρέπει να γίνουν σε συγκεκριμένη τοπολογία του δείγματος.



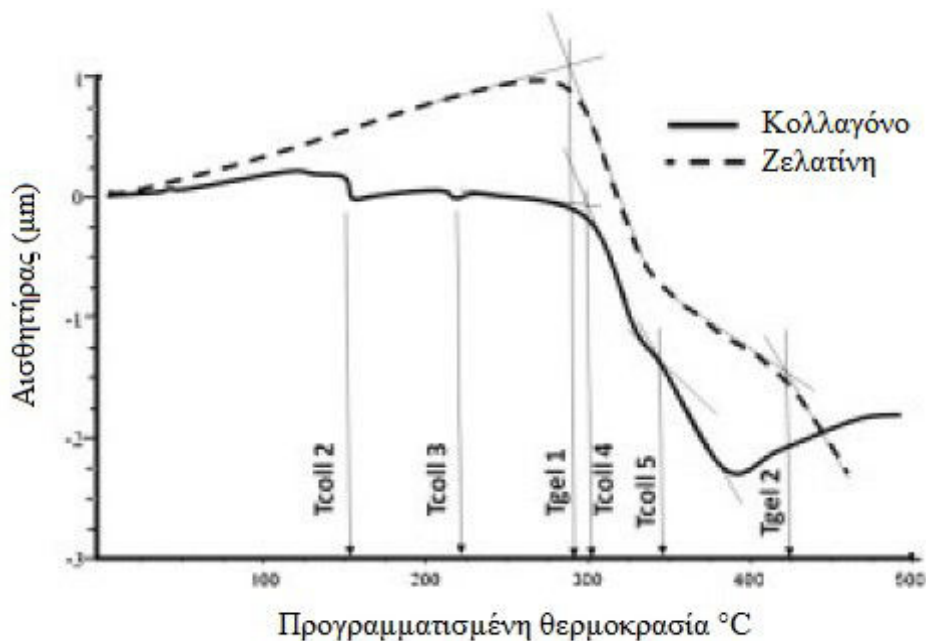
Εικόνα 1.8: Σε πλάκες γυαλιού a) Κολλαγόνο ουράς αρουραίου με εμφανή την D-band περιοδικότητα στα 67 nm b,c) Επακόλουθη ζελατίνη μετά την αποδιαμόρφωση του κολλαγόνου και παρατηρούμενη περιοδικότητα στα 38 nm. [24]

Έτσι, σε ενυδατωμένα δείγματα ευρέθη ότι το κολλαγόνο ουράς αρουραίου έχει 2 θερμοκρασιακές μεταβάσεις, με τη μερική μετάβαση του κολλαγόνου στην αποδιαμορφωμένη μορφή του στους $(58 \pm 10)^\circ\text{C}$ και τη κύρια στους $T_{\text{coll1}} = (65 \pm 10)^\circ\text{C}$ (εικόνα 1.9). Μέχρι να επέλθουν αυτές, η κατάσταση του κολλαγόνου παραμένει σχεδόν σταθερή. Η διάσπαση των δεσμών υδρογόνου (σταυροδεσμών) προκαλεί την ζελατινοποίηση του κολλαγόνου, ενώ η πρώτη μετάβαση μπορεί να εξηγηθεί από την μερική συρρίκνωση των ινιδίων.



Εικόνα 1.9 : L-TMA καμπύλη ενυδατωμένων ινιδίων κολλαγόνου με θερμοκρασίες αποδιαμόρφωσης στους 58°C και στους 65°C . [24]

Αντιστοίχως, σε άνυδρο κολλαγόνο και ζελατίνη, στο πρώτο παρατηρήθηκε πρώτα μια θερμική επέκταση των ινιδίων λόγω οίδημάτων που προκαλείται, και έπειτα πάλι 2 θερμοκρασίες μετουσίωσης $T_{\text{coll2}} = (150 \pm 10)^\circ\text{C}$ (εξάτμιση υπολείμματος νερού και υδρογονοδεσμών) και $T_{\text{coll3}} = (220 \pm 10)^\circ\text{C}$ (μετάβαση της δομής του του κολλαγόνου από τριπλή έλικα σε τυχαίο πηνίο). Στη ζελατίνη αντίθετα παρατήθηκε μόνο μια θερμοκρασία μετάβασης ($T_{\text{gell}} = (290 \pm 10)^\circ\text{C}$) επειδή οι θερμομηχανικές μεταβολές που συμβαίνουν νωρίτερα είχαν ήδη επέλθει κατά τη διαδικασία μετατροπής του κολλαγόνου σε ζελατίνη (βλέπε εικόνα 1.10)



Εικόνα 1.10: L-TMA καμπύλη άνδρου κολλαγόνου και ζελατίνης [24]

1.4 Βιοϋλικά κολλαγόνου

Η χρήση του κολλαγόνου ως βιοϋλικό αυτή τη περίοδο διανύει μια αναγέννηση στον τομέα της βιοτεχνολογίας, αφού το κολλαγόνο μπορεί να απορροφηθεί από το σώμα, είναι μη τοξικό, προκαλεί ελάχιστη ανοσοαπόκριση ακόμα και για κολλαγόνο μεταξύ διαφορετικών ειδών και διαπρέπει στη επικόλληση και βιολογική διάδραση με τα κύτταρα. Επίσης το κολλαγόνο μπορεί να επεξεργαστεί σε μια ποικιλία από διατάξεις, περιλαμβανομένων σφουγγαριών, ζελ, και υμενίων, και μπορεί να δεθεί με χημικά για να το κάνει δυνατότερο ή να αλλάξει το ρυθμό αποσταθεροποίησης [25]. Οι εφαρμογές του πολλαπλές και πάρα πολλές για να εξεταστούν καθεμία ξεχωριστά στο πλαίσιο μια διπλωματικής εργασίας – έχει χρησιμοποιηθεί για διάφορες εφαρμογές, χειρουργικές, κοσμητικές, και διανομή φαρμάκων καθώς και για βιοπροσθετικά μέλη και ιστομηχανική οργάνων. Κύτταρα τα οποία καλλιεργούνται σε κολλαγόνο συχνά φτάνουν κοντά στο να συμπεριφέρονται όπως και όταν είναι μέσα στο σώμα, εξού και γιατί το κολλαγόνο είναι πολύ υποσχόμενο όταν κάποιος προσπαθεί να αναπαράξει την φυσική λειτουργία και αναγέννηση κυττάρων.

Παρ' όλα αυτά υπάρχουν και μειονεκτήματα στη χρήση του κολλαγόνου ως κυτταρικό υπόστρωμα. Αναλόγως με το πως έχει επεξεργασθεί, μπορεί να προκαλέσει αλλαγή στην συμπεριφορά των κυττάρων (αλλαγές στην ανάπτυξη και κίνηση), να έχει ακατάλληλες μηχανικές ιδιότητες ή να υπόκειται σε σύμπτυξη (συρρίκνωση) [26]. Επειδή τα κύτταρα μπορούν να αλληλεπιδρούν με το κολλαγόνο τόσο εύκολα, έχουν τη δυνατότητα να αναδιοργανώσουν ίνες κολλαγόνου υποχρεώνοντας τεχνητές κατασκευές να χάνουν το σχήμα τους αν δεν έχουν σταθεροποιηθεί σωστά με σταυροδεσμούς ή ανάμειξη με λιγότερο ευπαθές υλικό. Ευτυχώς το κολλαγόνο μπορεί να συνδυαστεί εύκολα με άλλα βιολογικά ή συνθετικά υλικά για να βελτιώσει τις μηχανικές ιδιότητες ή να αλλάξει το τρόπο με τον οποίο μεγαλώνουν κύτταρα πάνω σ'αυτό, δημιουργώντας μέχρι και καινούργια αιμοφόρα αγγεία. Και μόνο ο προσανατολισμός που παίρνουν στο υπόστρωμα τα ινίδια μπορούν να κάνουν τα κύτταρα να παίρνουν συγκεκριμένες κατευθύνσεις ή διαφορετικά σχήματα [27].

Συγκεκριμένα, ως κυτταρικές κατασκευές που μιμούνται την ινδιακή αρχιτεκτονική έχουν χρησιμοποιηθεί πεπτιδιο-αμφίφιλα (PA, peptide- amphiphile) νανοϊνίδια [28], η αποκρυστάλλωση

των οποίων έδειξε ότι τα πολυκρυσταλλικά ορυκτά που εναποτέθηκαν πάνω στα ινίδια ήταν συνεπή με υδροξυαπατίτη (HA) που υπάρχει σε φυσικό ιστό οστού, πλησιάζοντας έτσι το χαμηλότερο επίπεδο της ιεραρχικής οργάνωσης των οστών. Ο Zhang κατάφερε να αναπτύξει ένα είδος ζελ με νανοϊνίδια αποτελούμενα από συμπληρωματικά αμφίφιλα πεπτίδια, τα οποία αυτοδιατάσσονται σε ένα φυσιολογικό μέσο, δίνοντας τη δυνατότητα για σχεδιασμό κατασκευών για κυτταρική καλλιέργεια σε τρεις διαστάσεις [29]. Αντίστοιχη έρευνα σε παρεμφερή τομέα, τη δημιουργία τεχνητών υλικών σαν το κολλαγόνο έγινε από τους Paramonov et al. [30], με τη δημιουργία κολλαγονοειδών πεπτιδικών πολυμερών (Xaa-Yaa-Gly)_n χρησιμοποιώντας χημικές τεχνικές απολίνωσης σε συνθετικά πεπτίδια τα οποία υπόκεινται σε πολυμερισμό αυθόρμητα, ενώ οι Kotch και Raine [31], ανέπτυξαν ένα πρωτόπορο σύστημα βασισμένο σε πεπτίδια για την δημιουργία υπερμορίων με την γνωστή διάταξη τριπλής έλικας που συναντάμε στο κολλαγόνο, μέσω μιας αυθόρμητης διαδικασίας αυτό-οργάνωσης.

Αν και οι παραπάνω δομές που περιγράφηκαν είναι υπεραπλουστευμένα σε σχέση με το φυσικό εξωκυττάριο πλέγμα καθώς τους λείπουν απαραίτητη χωρική και χρονική πολυπλοκότητα, αποτελούν πρόοδο στον τομέα των βιοϋλικών, της βιοτεχνολογίας και μηχανικής υλικών. Αυτή η συνεργασία σύντομα θα αποδώσει καρπούς για τη δημιουργία συνθετικών υλικών που θα επιταχύνουν την αναγέννηση των ιστών. Οι ιδανικές απομιμήσεις κολλαγόνου θα πρέπει να μιμούνται τις φυσικές και βιοχημικές ιδιότητες του κολλαγόνου, ωστόσο η υπερμοριακή δομή αποτελεί βασικό στοιχείο στις φυσικές ιδιότητες των ινιδίων κολλαγόνου όταν δρουν σαν βιοϋλικά. Έτσι, τα νανοϊνίδια και συνθετικά πολυμερή για να μπορούν να βρουν περαιτέρω εφαρμογές στα σύγχρονα πεδία ιατρικής, ειδικά στην μηχανική ιστών, πρέπει να γίνουν και άλλες προσπάθειες για τον καλύτερο έλεγχο δομών υψηλότερης τάξης του ιθαγενούς κολλαγόνου.

1.4.1 Λεπτά υμένα κολλαγόνου

Τα λεπτά υμένα κολλαγόνου δημιουργούνται από την αδρανοποίηση μονομερών διαλυμάτων κολλαγόνου που σταθεροποιούνται σε οξικές συνθήκες (συνήθως με υδροχλωρικό ή οξικό οξύ), αναγκάζοντας το τροποκολλαγόνο να αυτοοργανωθεί σε υπερμοριακές ινώδεις κατασκευές, όπου η ινιδιογένεση προκαλείται λόγω ενθάλπιας. Τοποθετώντας το διάλυμα κολλαγόνου σε υδροφοβικό υπόστρωμα (π.χ. πολυστυρένιο) αναπαράγει αποτελέσματα παρόμοια με τη δημιουργία μιας προσροφημένης μήτρας ινιδίων κολλαγόνου, η οποία είναι πολύ ομογενής και εύρωστη. Αυτά τα υμένα έχουν πολλά πλεονεκτήματα ως προς τη χρησιμοποίησή τους για διάφορες πειραματικές έρευνες [32]:

- 1) Ελάχιστη σκέδαση φωτός σε σύγκριση με τα ζελ κολλαγόνου
- 2) Ρυθμιζόμενες μηχανικές και χημικές ιδιότητες
- 3) Μια υπερμοριακή δομή παρεμφερής φυσιολογικά με τη διαμόρφωση κολλαγόνου in vivo .

1.5 Βιβλιογραφία

[1] Lodish H, Berk A, Zipursky SL, et al. "Molecular Cell Biology. 4th edition" (2000), New York, W. H. Freeman

[2] Gross, Jerome, John H. Highberger, and Francis O. Schmitt. "Collagen structures considered as states of aggregation of a kinetic unit. The tropocollagen particle." (1954), Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America vol 40.8: pp. 679.

[3] Miller, E. J. "Collagen types: Structure, distribution, and functions." (1988), Collagen 1: pp. 139-157.

- [4] Shireen R. Lamande, John F. Bateman. "Procollagen folding and assembly: The role of endoplasmic reticulum enzymes and molecular chaperones" (1999), *Seminars in Cell & Developmental Biology*, Volume 10, Issue 5: pp. 455–464
- [5] Canty EG, Kadler KE "Procollagen trafficking, processing and fibrillogenesis." (2005), *J Cell Sci.* vol 118(Pt 7): pp. 1341-1353.
- [6] Eyre DR, Paz MA, Gallop PM. "Cross-linking in collagen and elastin" (1984) *Annu Rev Biochem.* vol 53: pp. 717-748.
- [7] Berisio R, Vitagliano L, Mazzarella L, Zagari A. "Crystal structure of the collagen triple helix model [(Pro-Pro-Gly)₁₀]₃" (2002), *Protein Science* vol 11 (2): pp. 262-270
- [8] Bhattacharjee A, Bansal M. "Collagen structure: the Madras triple helix and the current scenario" (2005), *IUBMB Life*
- [9] Piez, Karl A. "Molecular and aggregate structures of the collagens." (1984), *Extracellular matrix biochemistry* : pp. 1–40
- [10] Matthew D. Shoulders and Ronald T. Raines, "Collagen Structure and Stability" (2009), *Annu Rev Biochem.* vol 78: pp. 929–958.
- [11] Boryskina OP, Bolbukh TV, Semenov MA, Gasan AI, Maleev VY. , "Energies of peptide-peptide and peptide-water hydrogen bonds in collagen: evidences from infrared spectroscopy, quartz piezogravimetry, and differential scanning calorimetry" (2007), *J. Mol. Struct.* vol 827: pp. 1–10.
- [11] Wolfie Traub, Karl A. Piez, "The Chemistry and Structure of Collagen" (1971), vol 25, pp. 243–352
- [12] Bretscher LE1, Jenkins CL, Taylor KM, DeRider ML, Raines RT. , "Conformational stability of collagen relies on a stereoelectronic effect." (2001), *J Am Chem Soc* vol 123(4): pp. 777-778.
- [13] Shoulders MD, Hodges JA, Raines RT. "Reciprocity of steric and stereoelectronic effects in the collagen triple helix" (2006), *J. Am. Chem. Soc.* vol 128: pp. 8112–8113.
- [14] Leikina E, Merts MV, Kuznetsova N, Leikin S. "Type I collagen is thermally unstable at body temperature." (2002), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* vol 99: pp. 1314–1318.
- [15] Holmes DF, Kadler KE. "The 10+4 microfibril structure of thin cartilage fibrils." (2006), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* vol 103: pp. 17249–17254.
- [16] Howard J. "Mechanics of Motor Proteins and the Cytoskeleton." (2001) Sunderland, MA: Sinauer.
- [17] van der Rijt JAJ, van der Werf KO, Bennink ML, Dijkstra PJ, Feijen J. "Micromechanical testing of individual collagen fibrils." (2006) *Macromol. Biosci.* vol 6: pp. 697–702.
- [18] Yang L, van der Werf KO, Fitie CFC, Bennink ML, Dijkstra PJ, Feijen J. "Mechanical properties of native and cross-linked type I collagen fibrils." (2008), *Biophys. J.* vol 94: pp.2204–2211.

- [19] Buehler MJ. "Nature designs tough collagen: explaining the nanostructure of collagen fibrils." (2006), Proc. Natl. Acad. Sci. USA. vol 103: pp. 12285–12290.
- [20] Leikina E., Merts M.V., Leikin S. "Type I collagen is thermally unstable at body temperature." (2002), Proc. Natl. Acad. Sci. USA. vol 99: pp. 1314–1318.
- [21] Κοντομάρης Στυλιανός Βασίλειος, "Μελέτη τροποποίησης επιφανειακών χαρακτηριστικών λεπτών υμενίων κολλαγόνου με την επίδραση μεταβολών φυσικών παραμέτρων με απεικονιστική μικροσκοπία ατομικής δύναμης." (2010), Αθήνα
- [22] Bowes, J. H., and J. A. Moss. "Hydroxyproline and the shrinkage temperature of collagen." (1960), pp. 1120-1120.
- [23] Lin SJ1, Hsiao CY, Sun Y, Lo W, Lin WC, Jan GJ, Jee SH, Dong CY. , "Monitoring the thermally induced structural transitions of collagen by use of second-harmonic generation microscopy." (2005) Opt Lett. vol 30(6): pp. 622-624.
- [24] Laurent Bozec and Marianne Odlyha, "Thermal Denaturation Studies of Collagen by Microthermal Analysis and Atomic Force Microscopy" (2011), Biophys J. vol 101(1): pp. 228-236
- [25] Han B, Huang LLH, Cheung D, Cordoba F, Nimni M. "Polypeptide growth factors with a collagen binding domain: Their potential for tissue repair and organ regeneration. In Zilla P and Greisler HP, editors. Tissue engineering of vascular prosthetic grafts." (1999), Austin: RG Landes, pp. 287-299.
- [26] Vaissiere G, Chevally B, Herbage D, Damour O. "Comparative analysis of different collagen-based biomaterials as scaffolds for long-term culture of human fibroblasts." (2000) Med Biol Eng Comput vol 38: pp. 205-210.
- [27] Tranquillo RT. "Self-organization of tissue-equivalents: The nature and role of contact guidance." (1999) Biochem Soc Symp vol 65: pp. 27-42.
- [28] Hartgerink JD, Beniash E, Stupp SI "Peptide-amphiphile nanofibers: a versatile scaffold for the preparation of self-assembling materials." (2002), Proc Natl Acad Sci USA vol 99: pp. 5133–5138
- [29] Zhang S "Fabrication of novel biomaterials through molecular self-assembly." (2003), Nat Biotechnol vol 21: pp. 1171–1178
- [30] Paramonov SE, Gauba V, Hartgerink JD "Synthesis of collagen-like peptide polymers by native chemical ligation." (2003) Macromolecules vol 38: pp. 7555–7561
- [31] Kotch FW, Raines RT "Self-assembly of synthetic collagen triple helices." (2006) Proc Natl Acad Sci USA vol 103: pp. 3028–3033
- [32] Elliott JT, Woodward JT, Umarji A, Mei Y, Tona A. "The effect of surface chemistry on the formation of thin films of native fibrillar collagen." (2007), Biomaterials. vol 28(4): pp. 576-85.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2: ΜΙΚΡΟΣΚΟΠΙΑ ΑΤΟΜΙΚΗΣ ΔΥΝΑΜΗΣ

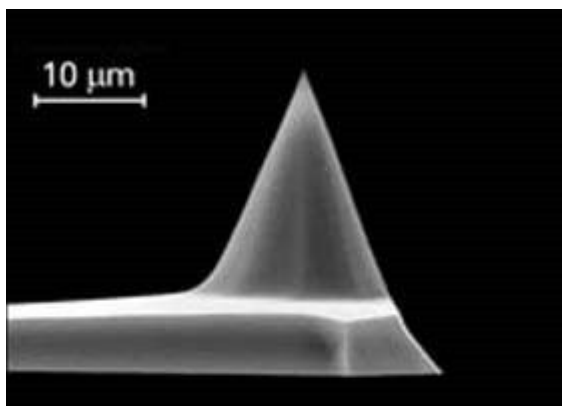
Η μικροσκοπία ατομικής δύναμης (AFM) αποτελεί έναν τύπο μικροσκοπίας σάρωσης με καθετήρα, με αποδεδειγμένη ανάλυση της τάξης των κλασμάτων του νανομέτρου, πάνω από 1000 φορές καλύτερη από το οπτικό όριο διάθλασης. Ο προάγγελος του AFM, το μικροσκόπιο σήραγγας, αναπτύχθηκε από τον Gerd Binnig και Heinrich Rohrer στις αρχές της δεκαετίας του 1980 στην IBM Research - Ζυρίχη, μια εξέλιξη που τους χάρισε το βραβείο Νόμπελ Φυσικής το 1986 ανοίγοντας το δρόμο για τους Binnig, Gerber και Quate να εφεύρουν το πρώτο ατομικό μικροσκόπιο δύναμης (επίσης συντομογραφία AFM) το 1986 [1]. Το AFM είναι ένα από τα κύρια εργαλεία για την απεικόνιση, τη μέτρηση και το χειρισμό ύλης σε κλίμακα νανομέτρων. Χρησιμοποιώντας πιεζοηλεκτρικά στοιχεία, διευκολύνονται μικροσκοπικές αλλά ακριβείς κινήσεις με ηλεκτρονικές εντολές, ενώ υπάρχει η δυνατότητα χρησιμοποιώντας ηλεκτρικά ρεύματα που διέρχονται μέσα από την ακίδα να μετρηθεί η ηλεκτρική αγωγιμότητα της εξεταζόμενης επιφάνειας [2].



Εικόνα 2.1 : Φωτογραφία ενός τυπικού AFM.

2.1 Βασικές αρχές

Το AFM λειτουργεί με μια πολύ αιχμηρή ακίδα (AFM tip, με τελική ακτίνα καμπυλότητας περίπου 10 nm, εικόνα 2.2) στην άκρη ενός πρόβολου που χρησιμοποιείται για τη σάρωση της επιφάνειας του δείγματος με προσεχτική διατήρηση της δύναμης μεταξύ της ακίδας και της επιφάνειας σε ορισμένο χαμηλό επίπεδο. Η ακίδα είναι τυπικά μικροκατασκευασμένη σιλικόνη (Si) ή νιτρίδιο σιλικόνης (Si_3N_4).

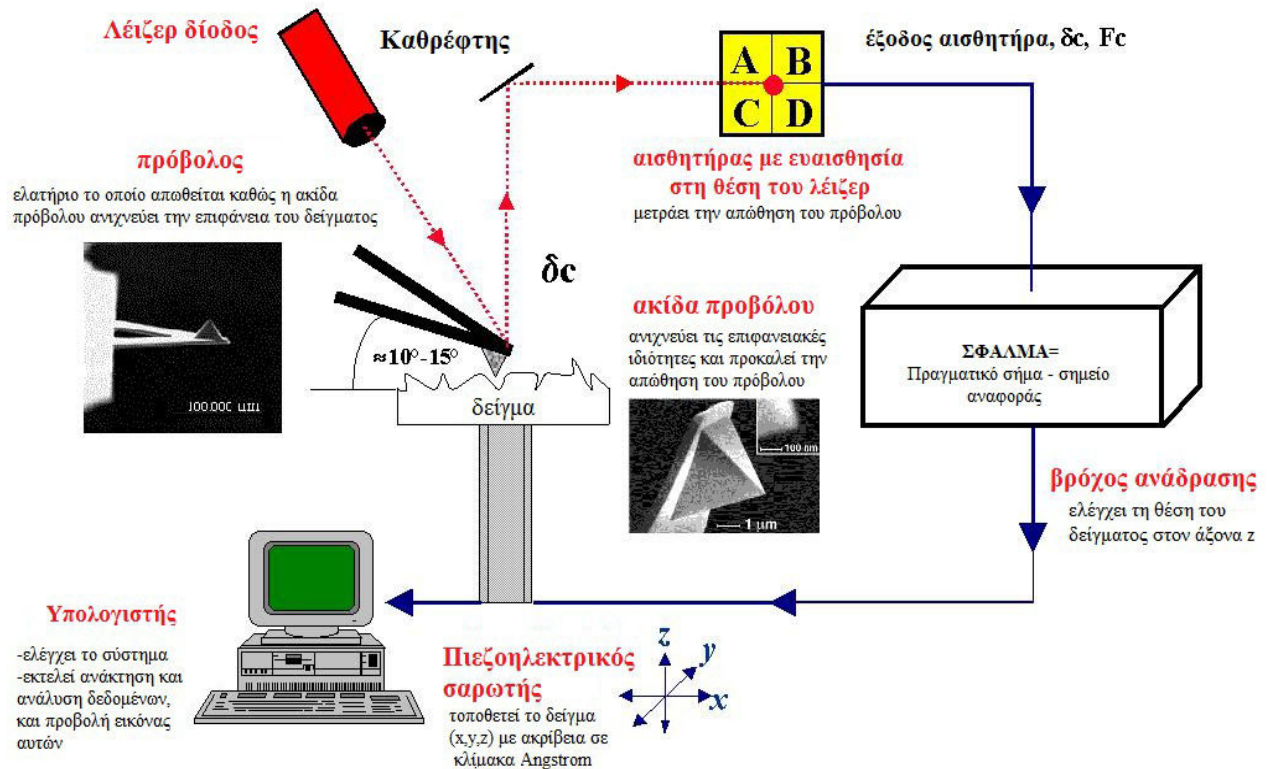


Εικόνα 2.2 : Ακίδα πρόβολου AFM

Όταν η ακίδα πλησιάζει την επιφάνεια δείγματος, δημιουργείται ελκτική αλληλεπίδραση λόγω των δυνάμεων συνάφειας από την υγρασία περιβάλλοντος, οι οποίες ωθούν την ακίδα να πλησιάζει το δείγμα. Μετά από ένα διάστημα, οι δυνάμεις γίνονται απωστικές λόγω απωστικών ηλεκτρικών δυνάμεων και ο πρόβολος κάμπτεται αντίθετα από την αρχική κατεύθυνση, σύμφωνα με τον νόμο του Hooke. Αναλόγως την κατάσταση, δυνάμεις που καταμετρώνται σε AFM περιλαμβάνουν δύναμη μηχανικής επαφής, δυνάμεις Van der Waals, επιφανειακές δυνάμεις, χημικοί δεσμοί, ηλεκτροστατικές δυνάμεις μαγνητικές δυνάμεις [3] κτλ. Μαζί με τη δύναμη, επιπρόσθετες μεταβλητές μπορούν να μετρηθούν ταυτόχρονα με τη χρήση ειδικών τύπων καθετήρα (βλέπε μικροσκοπία θερμικής ανίχνευσης, φωτοθερμική μικροφασματοσκοπία, κτλ). Η κάμψη του πρόβολου μετριέται από έναν οπτικό μοχλό, που την μεγεθύνει σε μεγάλο βαθμό και είναι ευαίσθητη σε κινήσεις της τάξης των Angstrom. Υπάρχει ποικιλία στις μεθόδους σάρωσης του δείγματος με AFM, αλλά στην απλούστερη λειτουργία η ακίδα αγγίζει απαλά το δείγμα καθώς κινείται πάνω στην επιφάνεια του. Η κίνηση του πρόβολου ελέγχεται από έναν σαρωτή, ο οποίος τυπικά είναι κατασκευασμένος από πιεζοηλεκτρικά υλικά, δίνοντας τη δυνατότητα κίνησης στους x, y, και z άξονες με μεγάλη ακρίβεια. Το σήμα από το φωτοανιχνευτή περνάει μέσα από ένα κύκλωμα ανάδρασης και στο μέρος κίνησης του άξονα z του σαρωτή, ώστε να διατηρείται η απόσταση πρόβολου-δείγματος σε μία σταθερή τιμή. Επειδή το πρόβολο δρα ως ένα ελατήριο, με αυτή η καθορισμένη απώθηση του πρόβολου συνεπάγεται η διατήρηση μιας σταθερής δύναμης πρόβολου-δείγματος. Το μέγεθος με το οποίο ο σαρωτής πρέπει να κινήσει τον z άξονα για να διατηρήσει την απώθηση του πρόβολου σταθερή είναι ισάξια της τοπογραφίας του δείγματος [4]. Στην παρακάτω εικόνα 2.3 αναπαρίσταται σχηματικά η βασική λειτουργία του AFM.

Μικροσκόπιο ατομικής δύναμης (AFM)

Γενικά στοιχεία και οι λειτουργίες τους



Εικόνα 2.3: Μικροσκόπιο ατομικής δύναμης, με τα τυπικά εξαρτήματα και την λειτουργία τους

2.2 Λειτουργίες απεικόνισης

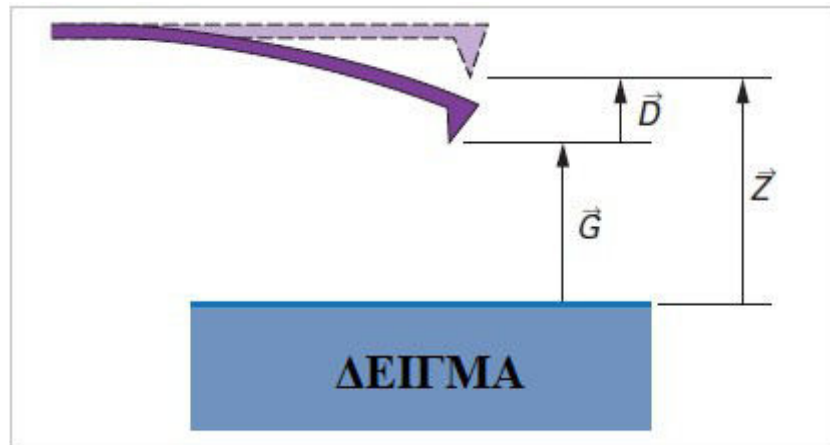
Το AFM μπορεί να λειτουργήσει με πολλούς διαφορετικούς τρόπους, αναλόγως την εφαρμογή. Γενικά, οι δυνατοί μέθοδοι απεικόνισης χωρίζονται σε στατικούς (επίσης ονομάζονται contact mode) και σε μια πληθώρα δυναμικών μεθόδων όπου η ακίδα δονείται (tapping και non-contact mode). Οι πρωταρχικές μέθοδοι απεικόνισης για ένα AFM είναι η στατική και η δυναμική μέθοδος. Στη στατική, η ακίδα σύρεται πάνω στην επιφάνεια του δείγματος και οι ιδιότητες της επιφάνειας μετρώνται απευθείας με την απόθηση της ακίδας. Με τη δυναμική μέθοδο, η ακίδα ταλαντώνεται σε ή κοντά στην θεμελιώδη ιδιοσυχνότητα του ή σε μια αρμονική. Το πλάτος της ταλάντωσης, η φάση και η συχνότητα τροποποιούνται από δυνάμεις διάδρασης μεταξύ άκρης-δείγματος. Αυτές οι αλλαγές στην ταλάντωση σε σχέση με την εξωτερική ταλάντωση αναφοράς δίνουν πληροφορίες για τα χαρακτηριστικά του δείγματος.

Μέθοδος επαφής

Ο τρόπος λειτουργίας με επαφή που συχνά αποκαλείται και στατική μέθοδος είναι εκτός από τον πιο εύκολο προς τη κατανόηση του αλλά και η θεμελιώδης βάση για τους υπόλοιπους τρόπους λειτουργίας. Χρησιμοποιείται κυρίως για την απεικόνιση σκληρών επιφανειών, όπου η

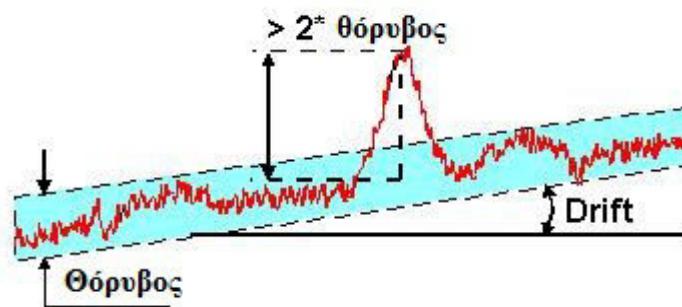
παρουσία πλευρικών δυνάμεων δεν αναμένεται να τροποποιήσει τα μορφολογικά χαρακτηριστικά. Στις πρώτες εφαρμογές του AFM που έγιναν, οι μελέτες του contact τρόπου λειτουργίας είχαν στόχο να πάρουν αποτελέσματα υψηλής ανάλυσης, και ειδικότερα η επίτευξη μοριακής και ατομικής ανάλυσης σε κρυσταλλικές επιφάνειες όπως μίκα, Au(111), κρυσταλλικά άλατα, χαλκογενή μέταλλα, πολυμερή κρύσταλλα, οργανικές στιβάδες κτλ. Οι εικόνες ύψους, απόθησης (σήμα σφάλματος) και πλευρικών δυνάμεων αυτών των ενώσεων έδειξαν μοτίβα μοριακής και ατομικής κλίμακας που αντιστοιχούν στα κρυσταλλικά πλέγματα των δειγμάτων.

Στη contact μέθοδο, η στατική εκτροπή της ακίδας χρησιμοποιείται ως σήμα ανάδρασης (εικόνα 2.4). Αυτή η κίνηση της μετρείται από μια ακτίνα laser που ανακλάται από το πρόβολο και διοχετεύεται σε ένα φωτοανιχνευτή.



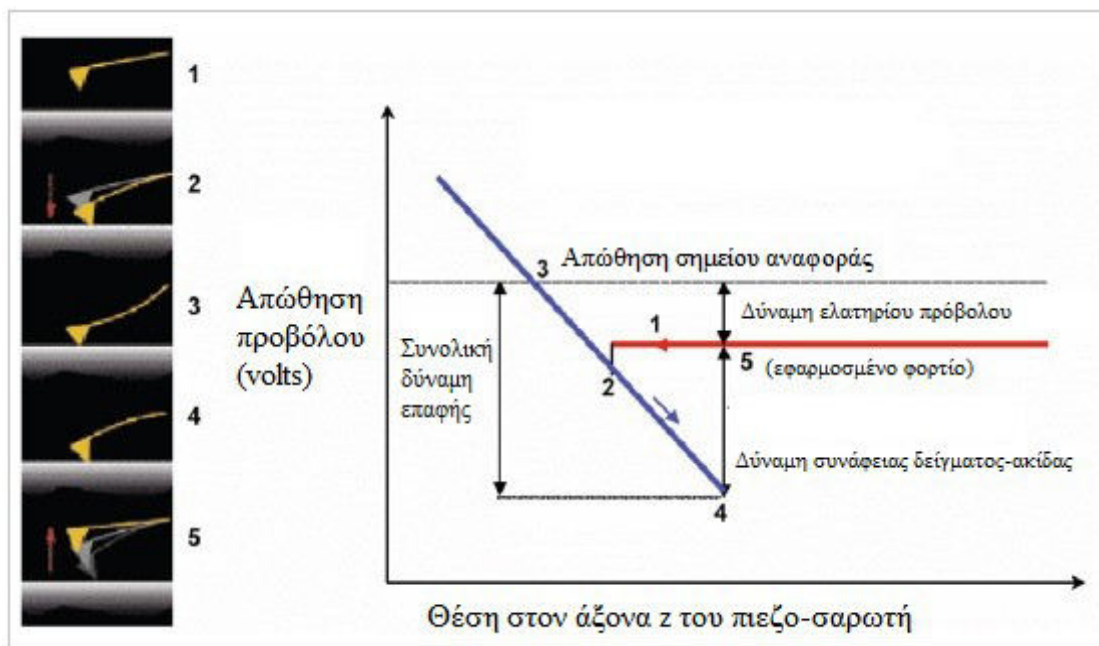
Εικόνα 2.4: Εκτροπή ενός πρόβολου που προκαλείται από τις δυνάμεις δείγματος-επιφάνειας.[5]

Ως μικροσκόπιο με ανιχνευτές σήματος, το AFM επηρεάζεται από τους περιορισμούς (εικόνα 2.5) που συναντάει κάθε σαρωτής με ανιχνευτές, τον θόρυβο, που περιορίζει την ευαισθησία του πρόβολου και το drift που προκαλείται από την θέρμανση του μετά από συγκεκριμένο χρόνο λειτουργίας [6]. Το drift εν προκειμένω στην ουσία προκαλείται από τα μέρη του AFM τα υπόκεινται σε θερμικά φαινόμενα (διαστολής ή συστολής), τα οποία λόγω της μικροσκοπικής κλίμακας των δειγμάτων που εξετάζουμε, ακόμα και διαφορά 1 K επηρεάζει τη δυνατότητα της ακίδας να προσεγγίσει το δείγμα και να μεταδώσει αξιόπιστα δεδομένα.



Εικόνα 2.5: Ορισμός του θορύβου, drift και της ελάχιστης ανιχνεύσιμης κορυφής

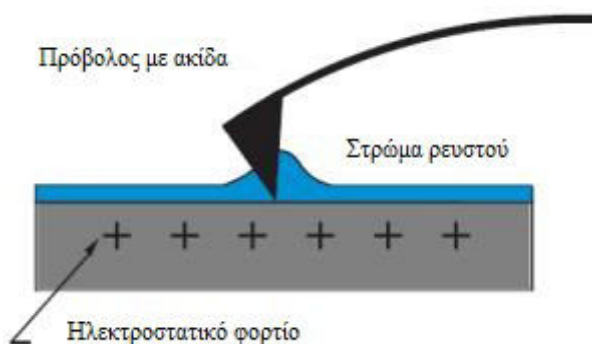
Οι καμπύλες δύναμης-απόστασης που δημιουργούνται από τους φωτοανιχνευτές είναι μια βασική AFM λειτουργία που εξηγούν τον τρόπο λειτουργίας contact καλύτερα, όπως φαίνεται στο σχήμα 2.6.



Εικόνα 2.6: Καμπύλη δύναμης-απόστασης. Η προσέγγιση (κόκκινη καμπύλη) και απομάκρυνση (μπλε καμπύλη) φαίνονται δεξιά. Η τελική δύναμη επαφής εξαρτάται από την προσκόλληση και το εφαρμοσμένο φορτίο.[5]

Αυτές οι δυνάμεις και ο έλεγχος τους είναι το πιο σημαντικό ζήτημα με το AFM επαφής, κάτι που έχει αναγνωριστεί από τις πρώτες εφαρμογές του. Εμπειρία με τη χρήση της μεθόδου έδειξε ότι τα μαλακά υλικά μπορούν να καταστραφούν πολύ εύκολα λόγω της μεγάλης κανονικής δύναμης και της παραμορφώσεως διάτμησης. Αντίστοιχα, με άκαμπτο υλικό, η απεικόνιση με contact μέθοδο μπορεί να καταστρέψει την κορυφή της ακίδας.

Τυπικά οι δυνάμεις που εφαρμόζονται σε δείγματα σε μέθοδο επαφής είναι της τάξης των δεκάδων έως εκατοντάδων nanoNewtons. Επιπρόσθετα, οι περισσότερες επιφάνειες στον αέρα είναι καλυμμένες από ένα στρώμα προσροφημένου νερού (εικόνα 2.7) και άλλων ρύπων, των οποίων η επιφανειακή τάση τραβά το άκρο της ακίδας και το πρόβολο μαζί προς τα κάτω. Ηλεκτροστατικά φορτία στην ακίδα και στο δείγμα μπορεί να δημιουργήσουν πρόσθετες δυνάμεις μεγάλης εμβέλειας και να περιπλέξουν τη απεικόνιση.



Εικόνα 2.7: Ηλεκτροστατικές και δυνάμεις επιφανειακής τάσης από το στρώμα νερού λόγω υγρασίας τραβούν την ακίδα προς την επιφάνεια.

Είναι δύσκολο εκ των προτέρων να κρίνουμε αν η μέθοδος επαφής μπορεί να χρησιμοποιηθεί για το χαρακτηρισμό ενός συγκεκριμένου δείγματος. Για αυτό το σκοπό, μελετούνται καμπύλες δύναμης-απόστασης με πρόβολο διαφορετικής ακαμψίας κάθε φορά για να οριστούν οι παράμετροι λειτουργία και το πιο κατάλληλο πρόβολο. Οι γραφικές αυτές παραστάσεις

βοηθούν στην αναγνώριση τριχοειδών δυνάμεων και πρόσφυσης, καθορίζοντας περιοχές με ελκτικές και απωστικές δυνάμεις ακίδας-δείγματος (ένα εύρος δυνάμεων για την ελαστική παραμόρφωση μεταξύ ακίδας και δείγματος, καθώς και παραμόρφωση του δείγματος και το είδος αυτής από την ακίδα)[7].

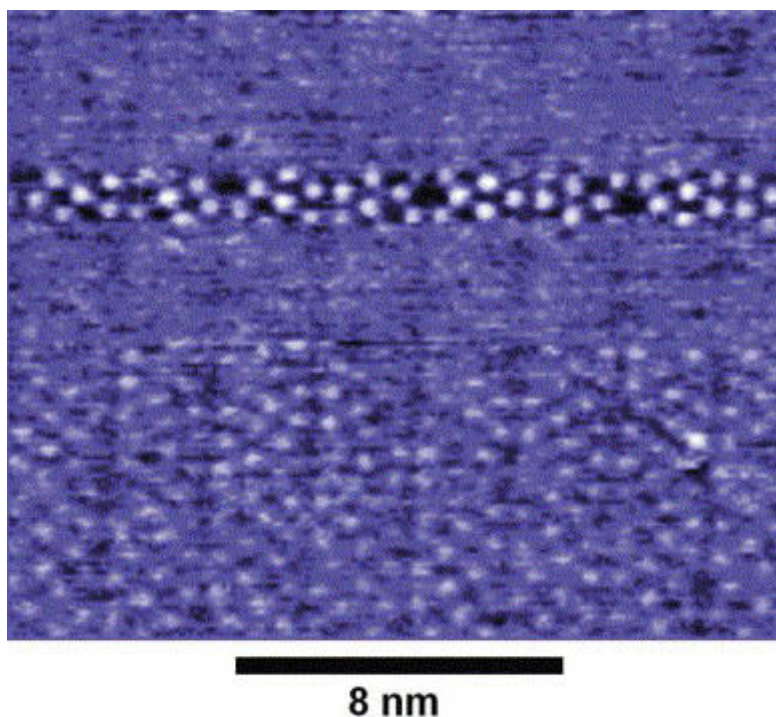
Εκτός από καμπύλες δύναμης, υπάρχουν διάφορες πρακτικές διαδικασίες για τη διασφάλιση σταθερής και με ελεγχόμενη δύναμη απεικόνιση. Μετά την εμπλοκή της ακίδας με το δείγμα, ένας χειριστής μπορεί να προσπαθήσει να χαμηλώσει τις set-point εκτροπές για να ελαχιστοποιήσει την δύναμη της ακίδας, να αυξήσει το κέρδος της ανατροφοδότησης και να βελτιστοποιήσει τον ρυθμό σάρωσης για να κάνει τη διαδικασία της απεικόνισης σταθερή. Αυτό επιτυγχάνεται όταν τα περιγράμματα ύψους στις κατευθύνσεις ανίχνευσης και επανανίχνευσης ταιριάζουν το ένα με το άλλο ή οι εικόνες ύψους είναι πρακτικά ίδια σε διαδοχικές σαρώσεις.

Στην πραγματικότητα, η παρατηρούμενη τοπογραφία δεν είναι απαραίτητα αυτή της ανώτατης στρώσης του δείγματος. Αυτό που μπορεί να συμβεί είναι ότι η απεικόνιση αναπαριστά την μορφολογία ενός πιο άκαμπτου υποστρώματος ενώ το ανώτατο στρώμα αφαιρείται από την ακίδα. Αυτή η εικασία μπορεί να ελεγχθεί πραγματοποιώντας μια μεγαλύτερη σάρωση με την ίδια δύναμη να εφαρμόζεται στην ακίδα και λοιπές συνθήκες απεικόνισης. Κατά τη διάρκεια της σάρωσης, μια αποτελεσματική δύναμη ακίδας και πιθανή ζημιά δείγματος συσχετίζονται με τον χρόνο που η ακίδα περνάει στη περιοχή του δείγματος. Έτσι, μια περιοχή κατεστραμμένη από την ακίδα φαίνεται συχνά ως ένα "παράθυρο" σε μεγαλύτερη σάρωση. Τότε συνίσταται η χρησιμοποίηση μικρότερης δύναμης ακίδας ή ενός μαλακότερου προβόλου για την απεικόνιση του ανώτατου στρώματος του δείγματος [8].

Τελικά, όπως προαναφέραμε, κοντά στην επιφάνεια του δείγματος, οι πλευρικές δυνάμεις μπορεί να είναι αρκετά δυνατές, κάνοντας την άκρη να αγγίζει το δείγμα. Αυτό οδηγεί στην ζημιά του δείγματος ή τη μετατόπιση χαλαρά προσαρτημένων αντικειμένων. Μια λύση σ' αυτό ήταν η ταλάντωση του προβόλου κατά τη διάρκεια της απεικόνισης, που οδήγησε στις μεθόδους παλλόμενης λειτουργίας και μη-επαφής.

Μέθοδος μη-επαφής

Το AFM μη-επαφής προσφέρει ιδιαίτερα πλεονεκτήματα σε σχέση με άλλες σύγχρονες τεχνικές με σάρωση όπως το AFM επαφής και το STM (scanning tunneling microscope). Η απουσία των δυνάμεων απώθησης παρούσες στο AFM επαφής του επιτρέπει την χρησιμοποίησή του στην απεικόνιση "μαλακών" δειγμάτων, και εν αντιθέσει με το STM δεν απαιτεί αγωγιμα δειγματο. Με αυτή τη μέθοδο, η άκρη της ακίδας δεν αγγίζει την επιφάνεια του δείγματος. Η ακίδα αντιθέτως ταλαντώνεται σε μια συχνότητα λίγο πιο πάνω από την ιδιοσυχνότητα του όπου το πλάτος της ταλάντωσης είναι τυπικά μερικά νανόμετρα (<10nm). Οι δυνάμεις van der Waals που είναι δυνατότερες από 1nm έως 10 nm πάνω από την επιφάνεια, ή οποιαδήποτε άλλη δύναμη μακράς εμβέλειας που εκτείνεται πάνω από την επιφάνεια λειτουργεί μειώνοντας την συχνότητα συντονισμού της ακίδας. Αυτή η μείωση σε συνδυασμό με το σύστημα ανάδρασης διατηρεί ένα σταθερό πλάτος ταλάντωσης ή συχνότητα ταλάντωσης ρυθμίζοντας τη μέση απόσταση άκρης-δείγματος, συνεπώς δίνοντας τη δυνατότητα να έχουν ανάδραση σάρωσης με το πλάτος δόνησης [10] (AM- AFM, amplitude modulation mode) ή τη μετατόπιση της συχνότητας [11] (FM- AFM, frequency modulation mode). Μετρώντας την απόσταση άκρης-δείγματος σε κάθε (x, y) σημείο δεδομένων επιτρέπει στο λογισμικό σάρωσης να κατασκευάσει μια τοπογραφική εικόνα της επιφάνειας του δείγματος. Η συχνότητα όμως μπορεί να μετρηθεί με πολύ μεγάλη ευαισθησία και έτσι η διαμόρφωση συχνότητας επιτρέπει τη χρήση πολύ άκαμπτων ακίδων. Οι άκαμπτες ακίδες δίνουν σταθερότητα πολύ κοντά στην επιφάνεια και συνεπώς αυτή η τεχνική ήταν η πρώτη AFM τεχνική που έδωσε πραγματική ατομική ανάλυση σε συνθήκες σχεδόν απόλυτου κενού (εικόνα 2.8) [12].



Εικόνα 2.8 : Πρώτη εικόνα AFM ενός διαδραστικού υλικού με ατομική ανάλυση [12].

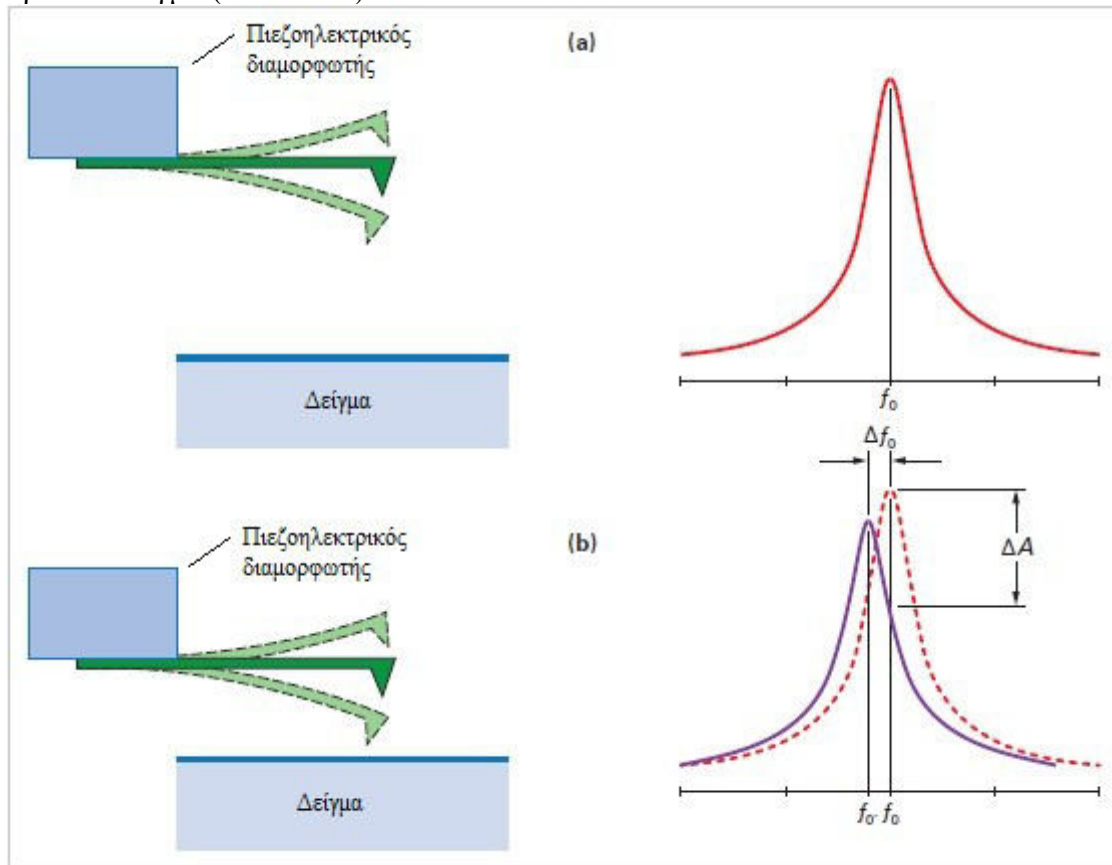
Ο AFM τρόπος απεικόνισης μη-επαφής δεν αντιμετωπίζει προβλήματα από φαινόμενα υποβάθμισης ποιότητας λόγω άκρης ή δείγματος που μερικές φορές παρατηρούνται μετά από πολλαπλές σαρώσεις με contact AFM. Αυτό κάνει το AFM μη-επαφής προτιμότερο από το AFM επαφής για τη μέτρηση μαλακών δειγμάτων. Στη περίπτωση των σκληρών δειγμάτων, εικόνες με μέθοδος επαφής και μη-επαφής μπορεί να δείχνουν ίδιες. Όμως, αν μερικά μικροστρώματα αναρροφημένου υγρού κάθονται στην επιφάνεια ενός σκληρού δείγματος, οι εικόνες μπορεί να δείχνουν αρκετά διαφορετικές. Ένα AFM που λειτουργεί σε μέθοδο επαφής θα διατρήσει το υγρό στρώμα για να απεικονίσει την επιφάνεια από κάτω, ενώ ένα AFM μη-επαφής θα ταλαντωθεί πάνω από το στρώμα υγρού για να απεικονίσει και το υγρό και την επιφάνεια.

Συνεπώς ακόμα και αν επιτευχθεί ο διαχωρισμός της ακίδας με την επιφάνεια του δείγματος, ο non-contact τρόπος λειτουργίας του AFM δίνει σημαντικά χαμηλότερη ανάλυση σε σχέση με άλλους τρόπους (επαφής και παλλόμενος). Στην πράξη, ο πρόβλος συχνά έλκεται στην επιφάνεια του δείγματος λόγω της επιφανειακής τάσης του προσροφημένου αερίου, με αποτέλεσμα να έχουμε καταστροφή του δείγματος παρόμοια με εκείνη του τρόπου επαφής και άχρηστα δεδομένα δεδομένα. Επιπλέον η μέθοδος μη-επαφής είναι γενικά μη πρακτική για συχνή σάρωση ρευστών επιφανειών επειδή οι δυνάμεις Van der Waals είναι ακόμα μικρότερες, ένας ουσιαστικός περιορισμός για τα βιολογικά δείγματα ειδικότερα.

Παλλόμενη Μέθοδος

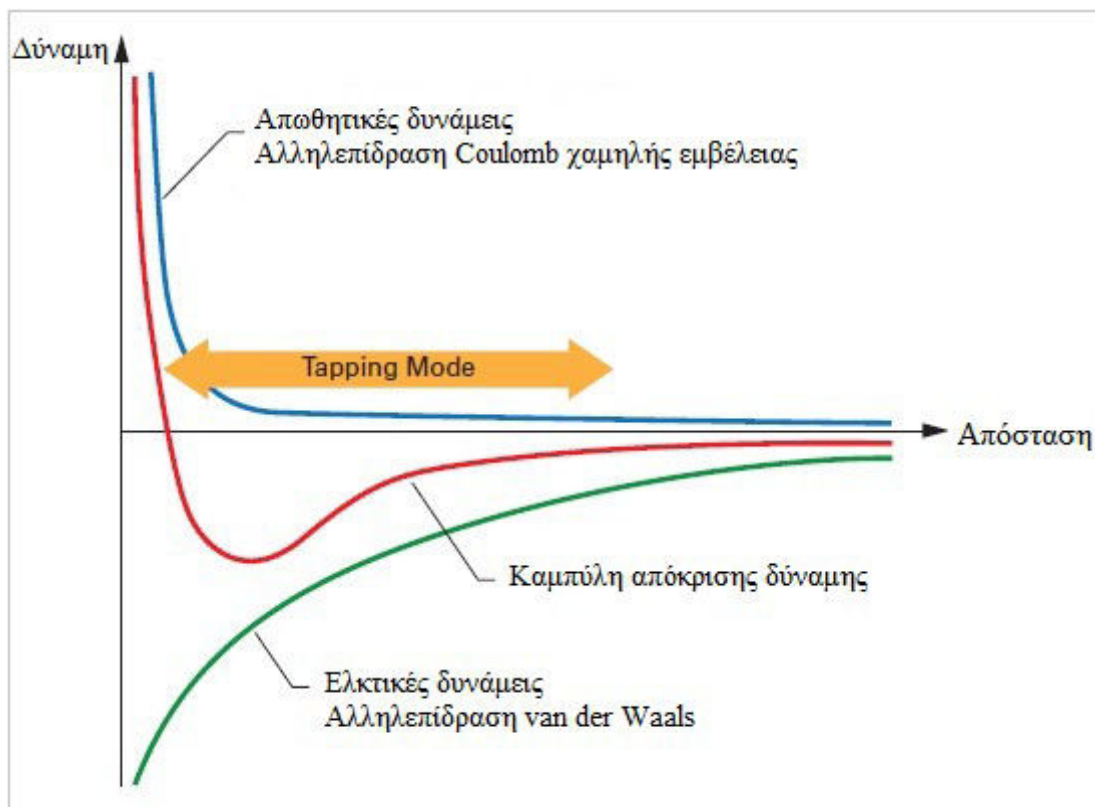
Σε συνθήκες δωματίου τα περισσότερα δείγματα δημιουργούν ένα στρώμα προσροφημένου υγρού. Για αυτό το λόγο, το να συντηρείται η απόσταση της άκρης του καθετήρα αρκετά κοντά στο δείγμα ώστε οι δυνάμεις μικρής εμβέλειας να μπορούν να γίνουν ανιχνεύσιμες ενώ ταυτόχρονα να αποφεύγει η άκρη να είναι τόσο κοντά ώστε να ακουμπάει την επιφάνεια αποτελεί μεγάλο πρόβλημα για τη δυναμική μέθοδο μη-επαφής σε συνθήκες δωματίου [13]. Η παλλόμενη μέθοδος αναπτύχθηκε για να ξεπεραστεί αυτό το πρόβλημα, με την ακίδα να ακουμπάει το δείγμα μόνο για ελάχιστο χρόνο .

Η παλλόμενη μέθοδος λειτουργίας είναι ένας τύπος τεχνικής διαμόρφωσης πλάτους (AM), στην οποία δονήσεις μεγάλους πλάτους εφαρμόζονται στο πρόβολο για την απεικόνιση του δείγματος. Η ακίδα εξαναγκάζεται σε ταλάντωση πάνω κάτω κοντά στην ιδιοσυχνότητα της από ένα μικρό πιεζοηλεκτρικό στοιχείο τοποθετημένο στην άκρη της ακίδας όπως στο non-contact mode. Όμως το πλάτος αυτής της ταλάντωσης είναι μεγαλύτερο από 10 nm, τυπικά στα 100 με 200 nm. Λόγω της αλληλεπίδραση των δυνάμεων που ασκούνται στην ακίδα όταν η άκρη έρχεται κοντά στην επιφάνεια (Van der Waals δύναμη, αλληλεπίδραση δίπολου - δίπολου, ηλεκτροστατικές δυνάμεις κτλ) αναγκάζουν το πλάτος αυτής της ταλάντωσης να μειώνεται καθώς η άκρη έρχεται κοντύτερα στο δείγμα (εικόνα 2.9).



Εικόνα 2.9: Καμπύλη συντονισμού ενός προβόλου σε παλλόμενη μέθοδο πάνω και κοντά στο δείγμα. Παρατηρητέα η μεταβολή του πλάτους συντονισμού σε χαμηλότερες συχνότητες ενώ ταυτόχρονα έχουμε και πτώση στο πλάτος.

Η καμπύλη δύναμης (εικόνα 2.10), δηλαδή οι άμεσες δυνάμεις μεταξύ της ακίδας και του δείγματος δεν μετρούνται επακριβώς από το AFM όταν είναι σε τρόπο λειτουργίας TappingMode. Η ακίδα ταλαντεύεται πάνω σε αυτή τη καμπύλη αλληλεπιδρώντας χωρίς να έχει άμεσο έλεγχο της δύναμης και μόνο μια μέση αντίδραση πολλών αλληλεπιδράσεων αναφέρεται μέσω του ενισχυτή που κλειδώνει πάνω της.



Εικόνα 2.10: Καμπύλη δύναμης τονίζοντας τη κίνηση ενός ταλαντευόμενου προβόλου σε παλλόμενο τρόπο λειτουργίας.

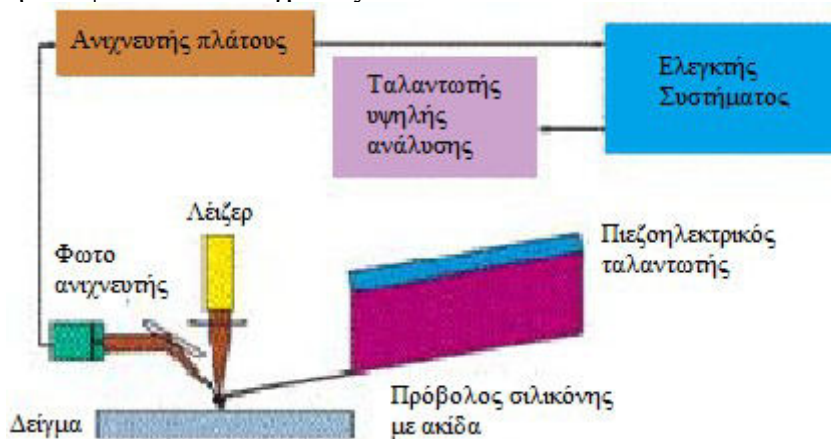
Η μείωση του πλάτους μπορεί να μετρηθεί όταν η ακίδα και το δείγμα πλησιάζουν το ένα το άλλο. Αν και αυτό δεν είναι επιζήμιο, περιορίζει τις πληροφορίες πέραν της τοπογραφίας του δείγματος και δεν μπορούν να ανατεθούν χωρίς καμία αμφιβολία σε κάποια ορισμένη ιδιότητα του δείγματος. Η εγγενώς ασταθής κατάσταση ανάδρασης σε παλλόμενη μέθοδο λειτουργίας καθιστά δύσκολο τον αυτοματισμό μερικών ρυθμίσεων σάρωσης. Οι δυνάμεις μπορούν να διαφέρουν όταν ξεφεύγουμε από μια σταθερή κατάσταση (steady-state). Όσο μεγαλύτερο το πλάτος κίνησης της ακίδας, τόσο μεγαλύτερη ενέργεια αποθηκεύεται στο μοχλό και στις δυνάμεις απεικόνισης [14]. Drift λόγω θερμοκρασιακών αλλαγών και/ ή αλλαγές στα επίπεδα των υγρών αλλάζουν την λειτουργία με υγρά.

Είναι σημαντικό να ρυθμίζεται το σύστημα ανάδρασης για να επιτυγχάνονται αξιόπιστες πληροφορίες από το AFM. Ο τρόπος λειτουργίας επαφής είναι πιο εύκολα ελέγξιμος από τον παλλόμενο τρόπο λειτουργίας, καθώς έχει ένα περίπλοκο σύστημα ταλάντωσης. Ενώ έχουν γίνει προσπάθειες [15] για την αυτόματη ρύθμιση των παραμέτρων της παλλόμενης μεθόδου, δεν υπάρχουν αποδεδειγμένες μέθοδοι πειραματισμού για τα μεγάλα εύρη δειγμάτων που συνήθως μελετούνται με το AFM, γιατί η παλλόμενη μέθοδος λειτουργεί με τη συχνότητα συντονισμού του προβόλου, του οποίου η δυναμική είναι σχετικά περίπλοκη.

Οι δυναμικές εξαρτώνται συχνά από τις ιδιότητες του δείγματος. Ταλάντωση ανάδρασης για το σκληρό μέρος του δείγματος μπορεί να επέλθει επίσης από ένα καλά ρυθμισμένο βρόχο ανάδρασης του μαλακού μέρους του δείγματος, καθώς η βελτιστοποίηση για κάθε διαφορετικό μέρος του δείγματος είναι ιδιαίτερα δύσκολη. Επίσης, η μεγάλη χρονική σταθερά (χιλιοστά του δευτερολέπτου) του συντονισμού του προβόλου αποτρέπει την στιγμιαία βελτιστοποίηση για κάθε σημείο απεικόνισης. Ο έλεγχος της άμεσου δύναμης της μεθόδου επαφής χάνεται, αλλά η παλλόμενη μέθοδος προσφέρει το αδιαμφισβήτητο πλεονέκτημα της απεικόνισης χωρίς πλευρικές δυνάμεις.

Ένας ηλεκτρονικός κινητήρας χρησιμοποιεί τον πιεζοηλεκτρικό actuator για να ελέγξει το ύψος της ακίδας πάνω από το δείγμα. Ο κινητήρας ρυθμίζει το ύψος για να συντηρείται ένα πλάτος

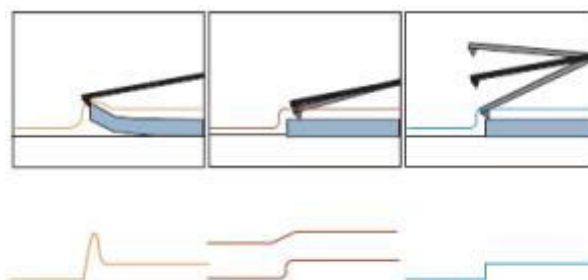
ταλάντωσης καθώς η ακίδα σαρώνει το δείγμα (εικόνα 2.11) [16]. Μια AFM εικόνα από παλλόμενο τρόπο λειτουργίας παράγεται τελικά με την απεικόνιση της δύναμης των διακεκομμένων επαφών της άκρης με την επιφάνεια του δείγματος.



Εικόνα 2.11: Block διάγραμμα για τη παλλόμενη λειτουργία του AFM[16]

Αυτή η μέθοδος ελαχιστοποιεί την ζημιά που γίνεται στην επιφάνεια και στην άκρη συγκριτικά με το μέγεθος που γίνεται σε μέθοδο επαφής[17]. Η παλλόμενη μέθοδος είναι αρκετά ευαίσθητη ακόμα και για την απεικόνιση των υποστηριζόμενων διστρωμάτων λιπιδίων ή αναρροφημένων μονών πολυμερών μορίων (π.χ. αλυσίδες συνθετικών πολυηλεκτρολυτών 0.4 nm πάχους) σε υγρό διάλυμα. Με σωστές ρυθμίσεις-σαρώσεις, η διάρθρωση των μονομερών μπορεί να μείνει απaráλλαχτη για ώρες.

Η διαφορά μεταξύ των τριών τρόπων απεικόνισης είναι εμφανής και σε δείγματα με ιδιαίτερη μορφολογία όπως φαίνεται παραστατικά στη παρακάτω εικόνα 2.12.



Εικόνα 2.12: Σύγκριση τρόπων λειτουργίας επαφής, μη-επαφής και παλλόμενης. Αριστερά στη μέθοδο επαφής, η απεικόνιση επηρεάζεται σε μεγάλο βαθμό από τις δυνάμεις τριβής και συνάφειας που μπορούν να καταστρέψουν δείγματα και να διαστρεβλώσουν τα δεδομένα της εικόνας. Η μέθοδος απεικόνισης μη-επαφής (κέντρο) γενικά προσφέρει μικρή ανάλυση και μπορεί να παρεμποδιστεί από τις προσμείξεις που παρεμβαίνουν στη ταλάντωση. Η παλλόμενη μέθοδος απεικόνισης (δεξιά) εξαλείφει τις δυνάμεις τριβής ακουμπώντας περιοδικά την επιφάνεια και ταλαντεύοντας με επαρκές πλάτος για να αποτρέψει την ακίδα από το να παγιδευτεί από δυνάμεις συνάφειας του στρώματος προσμείξεων. Οι γραφικές παραστάσεις από κάτω από τις εικόνες αναπαριστούν πιθανά απεικονιστικά δεδομένα που προκύπτουν από τις τρεις τεχνικές.

2.3 Πλεονεκτήματα και μειονεκτήματα

Το AFM, παρ'όλη την χρησιμότητα του έχει περιορισμούς που καθορίζουν την απόφαση αν ένα δείγμα θα απεικονιστεί βέλτιστα με αυτό. Αναλογιζόμενοι τα πλεονεκτήματα και μειονεκτήματα του, θα μπορεί να ληφθεί μια απόφαση.

Πλεονεκτήματα

Βασικό πλεονέκτημα του AFM σε σχέση με άλλες μεθόδους απεικόνισης (π.χ. μικροσκόπιο σάρωσης ηλεκτρονίων SEM), είναι η δυνατότητα του να δημιουργεί μια τρισδιάστατη τοπογραφία του δείγματος, σε σχέση με τις δισδιάστατες που προϋπήρχαν. Επίσης, τα δείγματα που υπόκεινται σε απεικόνιση από το AFM δεν χρειάζονται καμία περαιτέρω ειδική μεταχείριση (όπως μεταλλικές/ανθρακικές επιστρώσεις) που θα μπορούσαν να αλλάζαν ή ακόμα και να κατέστρεφαν ολοσχερώς το δείγμα, και ενώ το SEM απαιτεί δαπανηρές συνθήκες κενού για τη σωστή λειτουργία του, τα περισσότερα AFM δείγματα είναι απολύτως έτοιμα για απεικόνιση με τον ατμοσφαιρικό αέρα ή ακόμα και σε υγρό περιβάλλον, κάτι εξαιρετικά σημαντικό για την απεικόνιση βιολογικών μακρομορίων. Τυπικά, προσφέρει εξαιρετική ανάλυση, η οποία μπορεί να φτάσει όπως προαναφέραμε ακόμα σε πραγματικό ατομικό επίπεδο. Τέλος δεν απαιτεί ακριβά επιπλέον εργαλεία πέραν του AFM, και χάρη στο σχετικά μικρό μέγεθος που μπορεί να πάρει μπορεί να συνδυαστεί και με άλλα εργαλεία για διαφορετικού είδους μετρήσεις.

Μειονεκτήματα

Ένα μειονέκτημα του AFM είναι το μέγεθος εικόνας σάρωσης, με μέγιστο ύψος της τάξης των 10-20 μικρομέτρων και μια μέγιστη περιοχή σάρωσης των περίπου 150×150 μικρόμετρα, το οποίο είναι αρκετά μικρό αν αναλογιστεί κανείς ότι π.χ. το SEM μπορεί να απεικονίσει περιοχές της τάξης των τετραγωνικών χιλιοστών. Μία μέθοδος βελτίωσης του μεγέθους περιοχής σάρωσης για το AFM είναι με τη χρήση παράλληλων προβόλων για το ταυτόχρονο πέρασμα μεγαλύτερης επιφάνειας.

Η ταχύτητα σάρωσης του AFM είναι επίσης ένας περιορισμός. Ένα AFM δεν μπορεί να σαρώσει εικόνες γρήγορα απαιτώντας αρκετά λεπτά για μία τυπική σάρωση, ανάλογα με την επιθυμητή ανάλυση ενώ ένα SEM είναι ικανό για σάρωση σε σχεδόν πραγματικό χρόνο, αν και σχετικά η σάρωση είναι χαμηλής ποιότητας. Ο σχετικά αργός ρυθμός σάρωσης κατά τη διάρκεια της AFM απεικόνισης συχνά οδηγεί σε θερμικό drift στην εικόνα κάνοντας το μικροσκόπιο AFM λιγότερο κατάλληλο για τη μέτρηση ακριβών αποστάσεων μεταξύ τοπογραφικών χαρακτηριστικών της εικόνας. Ωστόσο, αρκετά σχέδια ταχείας δράσης προτάθηκαν για την αύξηση της παραγωγικότητας σάρωσης στο μικροσκόπιο AFM όπως αυτό που ονομάζεται VideoAFM [18], ενώ γίνονται μελέτες για την εξάλειψη του θερμικού drift.

Οι AFM εικόνες μπορούν επίσης να επηρεαστούν από την υστέρηση του πιεζοηλεκτρικού υλικού και παρεμβολές μεταξύ των x, y, z αξόνων που μπορεί να απαιτούν βελτίωση και φιλτράρισμα μέσω λογισμικού. Τέτοιο φιλτράρισμα θα μπορούσε να «ασιώσει» τοπογραφικά χαρακτηριστικά. Ωστόσο, νεότερα AFMs χρησιμοποιούν σαρωτές κλειστού βρόχου που εξαλείφουν σχεδόν αυτά τα προβλήματα. Μερικά AFMs χρησιμοποιούν επίσης διαχωρισμένους ορθογώνιους σαρωτές (σε αντίθεση με αυτά με ένα μόνο σωλήνα) τα οποία χρησιμεύουν επίσης στην εξάλειψη μέρος των παρεμβολών.

Όπως και με οποιαδήποτε άλλη τεχνική απεικόνισης, υπάρχει η πιθανότητα των ατελειών εικόνας, η οποία θα μπορούσε να προκληθεί από μια ακατάλληλη ακίδα, ένα περιβάλλον λειτουργίας με δύσκολες συνθήκες, ή ακόμα και από το ίδιο το δείγμα. Αυτές οι ατέλειες είναι αναπόφευκτες, ωστόσο, η εμφάνιση και η επίδρασή τους στα αποτελέσματα μπορεί να μειωθεί με διάφορες μεθόδους.

Λόγω της φύσης των AFM ακίδων, κανονικά δεν μπορούν να μετρούν κάθετα τοιχώματα ή προεξοχές. Ειδικά κατασκευασμένοι πρόβολοι και AFMs μπορούν να χρησιμοποιηθούν για τη διαμόρφωση τους προς τα πλάγια, καθώς και πάνω-κάτω (όπως με λειτουργίες δυναμικής επαφής και μη-επαφής) για τη μέτρηση πλευρικών τοιχωμάτων, με κόστος ακριβότερους πρόβλους,

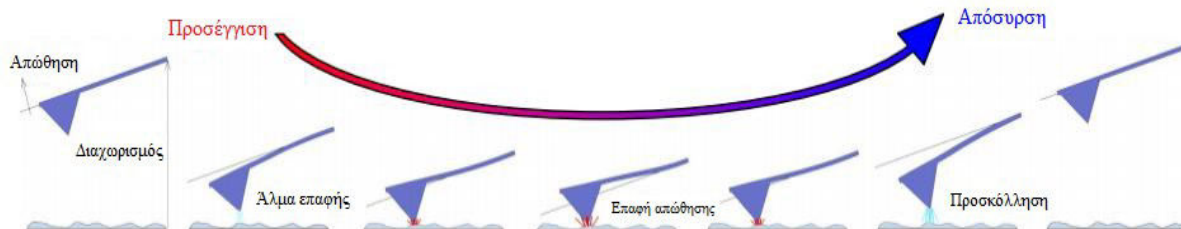
χειρότερη πλευρική ανάλυση και επιπρόσθετες ατέλειες.

2.4 Εφαρμογές μικροσκοπίου ατομικής δύναμης

Η βασική εφαρμογή ενός AFM είναι η απεικονιστική του δυνατότητα και ευελιξία. Το AFM έχει χρησιμοποιηθεί για την απεικόνιση :

- 1) Στις οργανικές επιστήμες, ινίδια ακτίνης, πρωτεΐνες, ερυθροκύτταρα, βακτήρια, γραμμικό DNA κτλ.
- 2) Στην επιστήμη υλικών και επιφάνειας, οργανικά φιλμ, τρανζίστορ, φεροηλεκτρικές δομές, φιλμ πολυμερών κτλ.

Μια άλλη σημαντική εφαρμογή του AFM (εκτός από τη δυνατότητα απεικονίσεων) είναι η φασματοσκοπία δύναμης, η άμεση μέτρηση των δυνάμεων αλληλεπίδρασης μεταξύ ακίδας-δείγματος ως συνάρτηση του διακένου μεταξύ του άκρου και του δείγματος (το αποτέλεσμα αυτής της μέτρησης ονομάζεται καμπύλη δύναμης-απόστασης). Για αυτή τη μέθοδο, η ακίδα του AFM πλησιάζει και αποσύρεται από την επιφάνεια καθώς η εκτροπή του προβόλου παρακολουθείται ως συνάρτηση της πιεζοηλεκτρικής μετατόπισης (εικόνα 2.13) [19].



Εικόνα 2.13 : Σχηματικό διάγραμμα της κίνησης της ακίδας κατά τα μέρη προσέγγισης και απόσυρσης ενός πειράματος φασματοσκοπίας δύναμης [20]

Οι δυνάμεις στις οποίες υπόκειται ο πρόβλος καθώς πλησιάζει από πάνω την επιφάνεια από μερικά μικρόμετρα μπορεί να δώσει πληροφορίες για τις αλληλεπιδράσεις μεγάλης εμβέλειας, όπως τα ηλεκτροστατικά φαινόμενα. Καθώς το πρόβλο πλησιάζει την επιφάνεια (νανόμετρα ή ατομικές αποστάσεις), δυνάμεις μικρότερης εμβέλειας όπως οι Van der Waals ή τριχοειδείς μπορούν να μετρηθούν. Όταν το σύνολο των δυνάμεων είναι ελκτικό, η ακίδα μπορεί να έλθει απότομα σε επαφή με την επιφάνεια, κάτι που αποκαλείται ως "snap-in".

Αφού το πρόβλο έχει κάνει επαφή με την επιφάνεια, μπορεί να σπρωχτεί μέσα στην επιφάνεια με κάποια δύναμη, όπου στη συγκεκριμένη περίπτωση μπορούν να διερευνηθούν οι ελαστικές και ιζώδεις ιδιότητες του δείγματος, να δοθεί το μέτρο ελαστικότητας (Young's modulus) ή η ακαμψία για διαφορετικές μέγιστες εφαρμοζόμενες δυνάμεις ή ρυθμούς καταπόνησης. Όταν το πρόβλο τραβιέται από την επιφάνεια, μπορούν να μετρηθούν δυνάμεις συνάφειας, και μονά μόρια επικολημένα μεταξύ της ακίδας και του δείγματος να εκταθούν [21].

Η φασματοσκοπία δύναμης μπορεί να πραγματοποιηθεί είτε με στατικές ή δυναμικές λειτουργίες. Στις δυναμικές λειτουργίες, πληροφορίες σχετικά με τη δόνηση προβόλου λαμβάνονται ταυτόχρονα με την στατική παραμόρφωση.

Προβλήματα με την τεχνική περιλαμβάνουν την μη άμεση μέτρηση του διαχωρισμού άκρης-δείγματος και την κοινή ανάγκη για χαμηλής ακαμψίας προβόλους που τείνουν να αγγίζουν την επιφάνεια. Αυτή η επαφή μπορεί να μειωθεί με μέτρηση σε υγρά ή χρησιμοποιώντας σκληρότερους καθετήρες, αλλά σε αυτή την περίπτωση ένας πιο ευαίσθητος αισθητήρας εκτροπής είναι απαραίτητος. Με την εφαρμογή ενός μικρού ταλαντωτή στην άκρη, η ακαμψία (κλίση δύναμης) του δεσμού μπορεί να μετρηθεί επίσης [22].

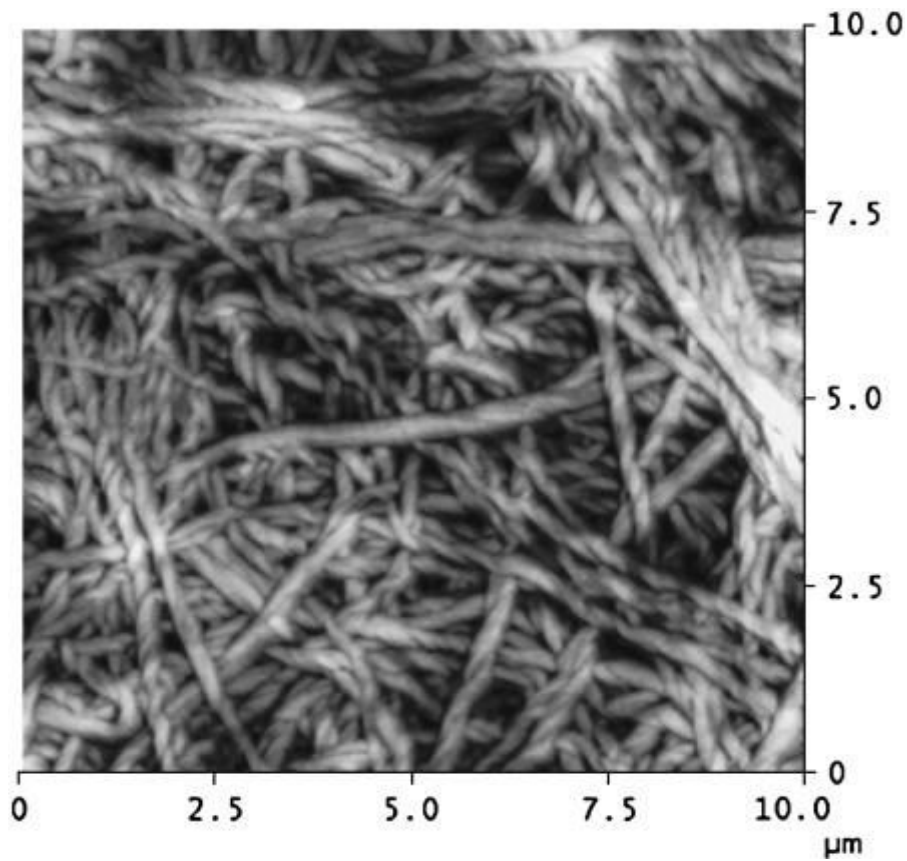
Το AFM μπορεί να χρησιμοποιηθεί επίσης για την απεικόνιση και τη χειραγώγηση ατόμων και δομών σε μια ποικιλία επιφανειών. Το άτομο, στην κορυφή της ακίδας "αισθάνεται"

μεμονωμένα άτομα από την υποκείμενη επιφάνεια όταν σχηματίζει αρχικούς χημικούς δεσμούς με κάθε άτομο. Επειδή αυτές οι χημικές αλληλεπιδράσεις τροποποιούν ελαφρά τη συχνότητα των δονήσεων του άκρη του, μπορούν να ανιχνευθούν και να χαρτογραφηθούν. Η αρχή αυτή χρησιμοποιείται για να γίνει διάκριση μεταξύ των ατόμων του πυριτίου, κασσίτερου και μόλυβδου σε μια επιφάνεια κράματος, με τη σύγκριση αυτών των «ατομικών αποτυπωμάτων» με τις τιμές που ελήφθησαν από προσομοιώσεις DFT (density functional theory) μεγάλης κλίμακας [23]. Το τέχνασμα είναι αρχικά να μετρηθούν οι δυνάμεις αυτές ακριβώς για κάθε τύπο ατόμου που αναμένεται στο δείγμα, και στη συνέχεια να συγκριθούν με τις δυνάμεις που δίνονται από τις DFT προσομοιώσεις. Διαπιστώθηκε ότι η άκρη αλληλεπιδρούσε πιο έντονα με άτομα πυριτίου, και αλληλεπιδράσε 23% και 41% λιγότερο έντονα με άτομα κασσίτερου και μόλυβδου, αντίστοιχα. Έτσι, κάθε διαφορετικό είδος του ατόμου μπορεί να ταυτοποιηθεί στο πλέγμα καθώς το άκρο κινείται σε όλη την επιφάνεια. Αυτές οι τεχνικές μπορούν να εφαρμοστούν περαιτέρω στη νανολιθογραφία και χειραγώγηση ατόμων, όπως στην χάραξη φιλμ πολυμερούς, στην ανοδική οξείδωση, χειραγώγηση DNA πάνω σε μίκα, ξεδίπλωμα πρωτεϊνών και προσκόλληση μονών κυττάρων σε επιθυμητές θέσεις.

2.4.1 Διερεύνηση Κολλαγόνου με Μικροσκόπιο Ατομικής Δύναμης

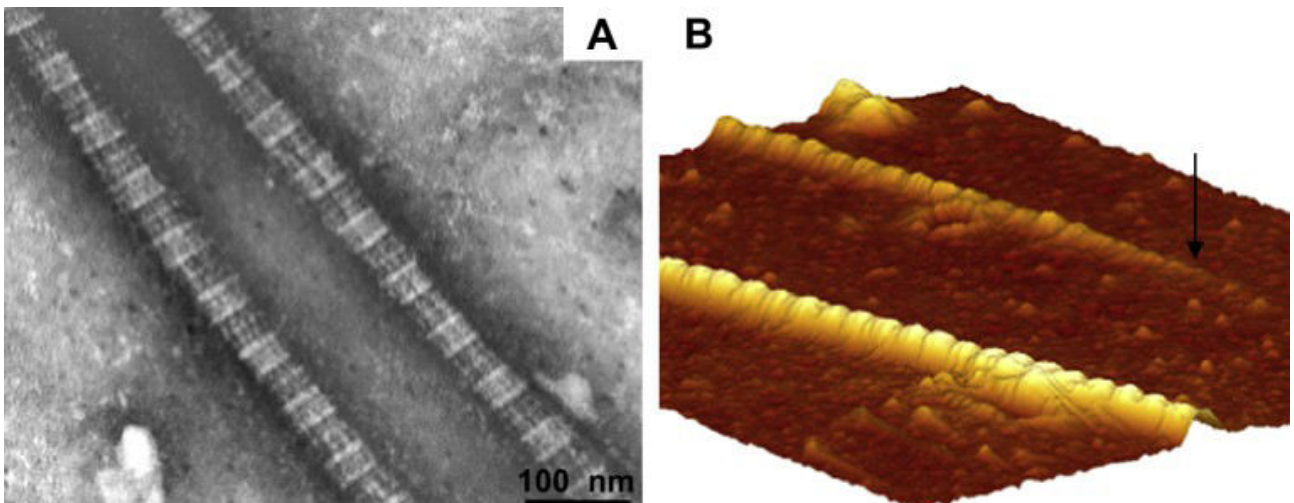
Όπως προαναφέραμε, το AFM έχει πολλές εφαρμογές και πλεονεκτήματα και σε συνδυασμό με τις ιδιότητες του κολλαγόνου και τις συνεπάγουσες εφαρμογές του σε βιοϋλικά, ήταν πολύ λογικό να γίνουν πολλαπλές έρευνες πάνω στο κολλαγόνο χρησιμοποιώντας το AFM.

Οι Freudenberg et al. ανέλυσαν τη εξαρτώμενη από το pH και ηλεκτρολύτες φόρτιση των ινιδίων κολλαγόνου με πειράματα με ρέουσα δυναμικά/ρεύματα [24], βρίσκοντας ότι η οξική-βασική συμπεριφορά του κολλαγόνου εξαρτάται από την ιονική δύναμη των διαλυμάτων του κολλαγόνου (εικόνα 2.14), ενώ η αύξηση της ιονικής δύναμης οδηγεί στην μεγαλύτερη θερμική σταθερότητα και αλλαγή της διάπλασης του κολλαγόνου (λόγω αύξησης της ελικότητας).



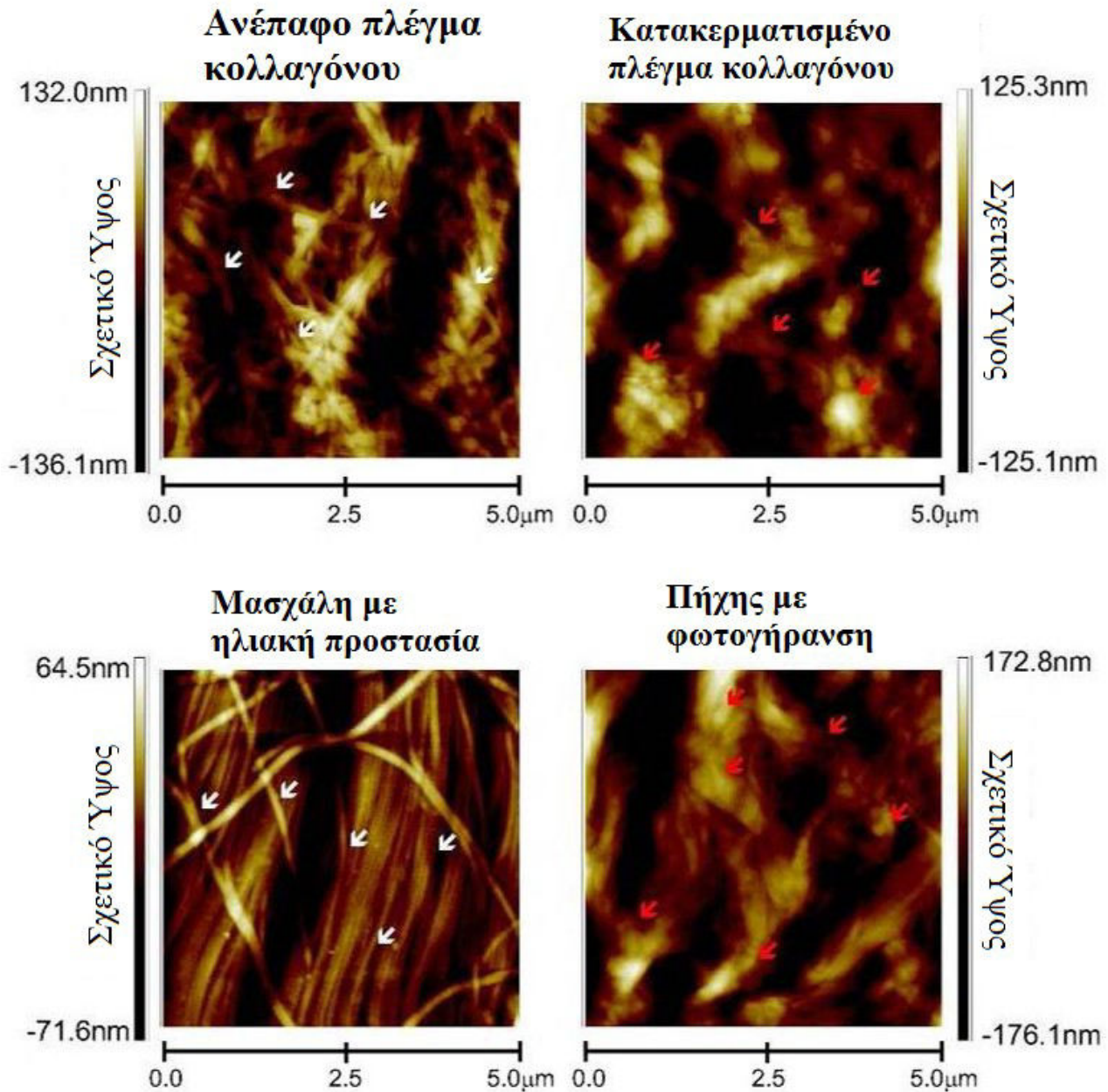
Εικόνα 2.14 : Φασική εικόνα από AFM ενός στρώματος ινών κολλαγόνου σε 10^{-2} M KCl διάλυμα

Οι Monika L. Bayer et al. ερεύνησαν τη δυνατότητα ώριμων ινοβλαστών ανθρώπινου τένοντα να ωθήσουν την έναρξη ινδιογένεσης κολλαγόνου όταν καλλιεργούνται σε ζελ ινών με σταθερό μήκος, με τις απεικονίσεις των κολλαγόνων να γίνονται με AFM σε παλλόμενη μέθοδο λειτουργίας [25].



Εικόνα 2.15 : Αριστερά η εικόνα παρουσιάζει δύο ινίδια κολλαγόνου, που έχουν την τυπική D-band περιοδικότητα του κολλαγόνου, και δεξιά η 3D ανακατασκευή της, με το βέλος να δείχνει μια άκρη ενός κολλαγόνου.

Οι Taihao Quan et al. διερεύνησαν με τη χρήση του AFM λόγω των απεικονιστικών δυνατοτήτων του την βλάβη που προκαλείται στο ανθρώπινο δέρμα όταν εκτίθεται σε υπεριώδη (UV) ηλιακή ακτινοβολία, που προκαλεί την ενεργοποίηση πολλών μελών της οικογένειας των μεταλλοπρωτεϊνάσεων, που αποδομούν τα ινίδια κολλαγόνου και άλλα συστατικά του εξωκυττάριου πλέγματος του δέρματος [26], ενισχύοντας την γήρανση και τη διαταραχή της λειτουργίας του. Στην εικόνα 2.16 φαίνονται ορισμένες από τις εικόνες που ελήφθησαν.



Εικόνα 2.16 : Απεικόνιση ινιδίων κολλαγόνου με AFM. Τα άσπρα και κόκκινα βέλη καταδεικνύουν ανέπαφα και κατακερματισμένα/αποδιοργανωμένα ινίδια κολλαγόνου αντίστοιχα.

2.5. Βιβλιογραφία

- [1] Binnig, Gerd, Calvin F. Quate, and Ch Gerber. "Atomic force microscope." (1986), Physical review letters vol 56.9 : p. 930.
- [2] K. Ganesan, S. Ilango, S. Mariyappan, M. Farrokh Baroughi, M. Kamruddin and A. K. Tyagi, "Conductive atomic force microscopy studies on dielectric breakdown behavior of ultrathin Al₂O₃ films" (2011), Appl. Phys. Lett. vol 98 : p. 092902
- [3] Meyer, E. R. N. S. T. "Atomic force microscopy." (1992), Progress in surface science vol 41.1 : pp. 3-49.
- [4] Eaton, Peter Jonathan, and Paul West. "Atomic force microscopy." (2010), Oxford University Press Vol. 10.
- [5] Bruker Nano Surfaces, "Fundamentals of Contact Mode and Tapping Mode Atomic Force Microscopy" (2012)
- [6] Gavin M. King, Ashley R. Carter, Allison B. Churnside, Louisa S. Eberle, and Thomas T. Perkins, "Ultrastable Atomic Force Microscopy: Atomic-Scale Stability and Registration in Ambient Conditions." (2009) Nano Lett. vol 9(4): pp. 1451–1456.
- [7] Hanley, Shaune J., and Derek G. Gray. "Atomic force microscopy." (1995), CRC Press, Inc. Boca Raton, Fl.
- [8] Rugar, Daniel, and Paul Hansma. "Atomic force microscopy." (1990), Physics today vol 43.10 : pp. 23-30.
- [9] S. Morita, Roland Wiesendanger, E. Meyer, "Noncontact Atomic Force Microscopy." (2002), Springer Science & Business Media, vol 1.
- [10] Y. Martin *et al.* "Atomic force microscope-force mapping and profiling on a sub 100 Angstrom scale" (1987) J. Appl. Phys. vol 61 (10): p. 4723
- [11] T.R. Albrecht *et al.*, "Frequency modulation detection using high-Q cantilevers for enhanced force microscope sensitivity" (1991), J. Appl. Phys. vol 69 (2) : p. 668
- [12] FJ Giessibl, "Atomic resolution of the silicon (111)-(7×7) surface by atomic force microscopy" (1995) Science vol 267 (5194): pp. 68-71
- [13] Putman, Constant AJ, *et al.* "Tapping mode atomic force microscopy in liquid." (1994), Applied Physics Letters vol 64.18: pp. 2454-2456.
- [14] Cleveland, J. P., *et al.* "Energy dissipation in tapping-mode atomic force microscopy." (1998), Applied Physics Letters vol 72.20: pp. 2613-2615.
- [15] Bar, G., *et al.* "Factors affecting the height and phase images in tapping mode atomic force microscopy. Study of phase-separated polymer blends of poly (ethene-co-styrene) and poly (2, 6-dimethyl-1, 4-phenylene oxide)." (1997), Langmuir vol 13.14: pp. 3807-3812.

- [16] "Atomic Force Microscopy Of Soft Or Fragile Materials Using TappingMode Imaging Technology" (2006), Veeco Instruments
- [17] Q. Zhong, D. Inniss, K. Kjoller, V.B. Elings "Fractured polymer/silica fiber surface studied by tapping mode atomic force microscopy" (1993), Surface Science Letters vol 290 issues 1–2: pp. 688–692
- [18] Kodera, Noriyuki, et al. "Video imaging of walking myosin V by high-speed atomic force microscopy." (2010), Nature vol 468.7320: pp. 72-76.
- [19] Janshoff A. , Neitzert M. , Obersorfer Y., and Fuchs H. "Force spectroscopy of molecular systems – single molecule spectroscopy of polymers and biomolecules" (2000), Angew. Chem. Int. Ed. vol 39: pp. 3212-3237
- [20] "A practical guide to AFM force spectroscopy and data analysis", JPK instruments technical note
- [21] Butt, H; Cappella, B; Kappl, M "Force measurements with the atomic force microscope: Technique, interpretation and applications" (2005) Surface Science Reports vol 59: pp. 1–152.
- [22] Hoffmann, Ahmet Oral, Ralph A. G, Peter "Direct measurement of interatomic force gradients using an ultra-low-amplitude atomic force microscope." (2001), Proceedings of the Royal Society A vol 457: p. 1161.
- [23] Sugimoto, Y; Pou, P; Abe, M; Jelinek, P; Pérez, R; Morita, S; Custance, O "Chemical identification of individual surface atoms by atomic force microscopy." (2007), Nature vol 446 (7131): pp. 64–67.
- [24] Uwe Freudenberg, Sven H. Behrens, Petra B. Welzel, Martin Müller, Milauscha Grimmer, Katrin Salchert, Tilman Taeger, Kati Schmidt, Wolfgang Pompe, and Carsten Werner, "Electrostatic Interactions Modulate the Conformation of Collagen I" (2007), Biophys J. vol 92(6): pp. 2108–2119.
- [25] Monika L. Bayer, Chin-Yan C. Yeung, Karl E. Kadler, Klaus Qvortrup, Keith Baar, René B. Svensson, S. Peter Magnusson, Michael Krogsgaard, Manuel Koch, and Michael Kjaera, "The initiation of embryonic-like collagen fibrillogenesis by adult human tendon fibroblasts when cultured under tension" (2010), Biomaterials. vol 31(18): pp. 4889–4897
- [26] Taihao Quan, Emily Little, Hehui Quan, John J. Voorhees, and Gary J. Fisher "Elevated Matrix Metalloproteinases and Collagen Fragmentation in Photodamaged Human Skin: Impact of Altered Extracellular Matrix Microenvironment on Dermal Fibroblast Function" (2013), J Invest Dermatol. vol 133(5): pp. 1362-1366

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3: ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

Στη παρούσα διπλωματική εργασία μελετήθηκε το κολλαγόνο και η θερμική του αποδιαμόρφωση εξετάζοντας το με διαφορετικούς παράγοντες, όπως η θερμοκρασία, το pH και η συγκέντρωση του διαλύματος κολλαγόνου. Στη μεθοδολογία των πειραμάτων χρησιμοποιήθηκαν επίσης ρυθμιστικό διάλυμα (buffer solution- BS), spin coater και διαφορετικά υποστρώματα (mica και πολυστυρένιο) τα οποία θα μελετηθούν εν συντομία στο συγκεκριμένο κεφάλαιο.

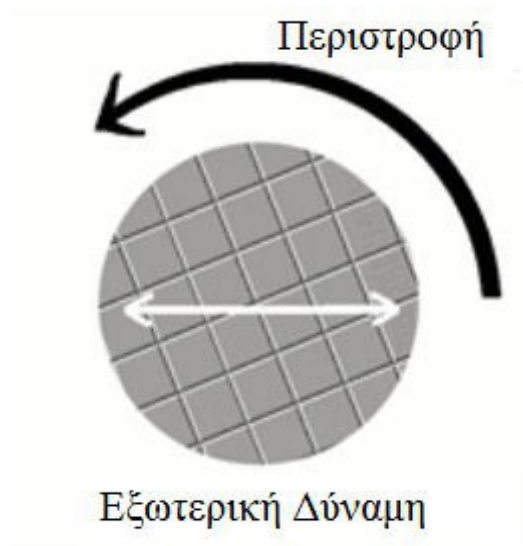
3.1 Ρυθμιστικό αλατούχο φωσφορικό διάλυμα

Τα ρυθμιστικά διαλύματα είναι ουσίες οι οποίες με τη παρουσία τους στο διάλυμα του δίνουν την ιδιότητα να αντιστέκεται στις αλλαγές του pH με την προσθήκη οξέος ή βάσης. Συνήθως αποτελούνται από μίγματα από αδύναμα οξέα ή αδύναμες βάσεις και τα άλατά τους. Η ρυθμιστική ιδιότητα τους οφείλεται στη μικρή έκταση της ηλεκτρολυτικής διάσπασης που υπόκεινται, σε σύγκριση με τα ισχυρά οξέα που υπόκεινται σε πλήρη διάλυση. Έτσι, προσθέτοντας ένα ισχυρό οξύ σε μείγμα από ένα ασθενές ρυθμιστικό οξύ και το και το αλκαλικό άλας του, το ισχυρό οξύ συνδυάζεται με το ισοδύναμο σε ποσότητα άλας, δημιουργώντας αντίστοιχη ποσότητα ασθενούς οξέος. Το τελευταίο, αντί να διαλύεται εντελώς σε ανιόντα και κατιόντα (όπως θα έκανε το ισχυρό οξύ) προσδίδει μικρή ποσότητα κατιόντων στο μείγμα έτσι επηρεάζοντας ελάχιστα το pH, το οποίο έχει σημαντικές βιολογικές εφαρμογές, κάνοντας το ισοτονικό και ατοξικό στη πλειονότητα των κυττάρων [1].

Το PBS, ρυθμιστικό αλατούχο φωσφορικό διάλυμα είναι ένα ρυθμιστικό διάλυμα το οποίο αποτελείται από φωσφορικό νάτριο (sodium phosphate), χλωριούχο νάτριο (sodium chloride) και συνήθως χλωριούχο κάλιο (potassium chloride) και φωσφορικό κάλιο (potassium phosphate) σε συγκεκριμένες συγκεντρώσεις ανάλογα με τον κατασκευαστή. Το ρυθμιστικό διάλυμα στη συγκεκριμένη μεθοδολογία χρησιμοποιήθηκε για την δυνατότητα του απεμπλοκής συσσωματωμάτων κολλαγόνου, με τη χρήση του για ξέπλυμα των υποστρωμάτων μετά τη εφαρμογή του διαλύματος κολλαγόνου, ώστε να γίνει πιο εύκολη η παρατήρηση του με το AFM.

3.2 Spin coater

Το spin coating χρησιμοποιείται για τη δημιουργία ενός ενιαίου λεπτού υγρού φιλμ πάνω σε ομοιόμορφο υπόστρωμα. Μια τυπική διαδικασία περιλαμβάνει την τοποθέτηση ενός διαλύματος στο κέντρο του υποστρώματος, και μετά την περιστροφή του σε μεγάλες ταχύτητες (συνήθως 3000 rpm). Η κεντρομόλος δύναμη (εικόνα 3.1) που αναπτύσσεται τότε θα προκαλέσει το διάλυμα να απλωθεί ενάντια στις δυνάμεις ιξώδους, και τελικά να φύγει από την άκρη του υποστρώματος, δημιουργώντας ένα λεπτό φιλμ στην επιφάνεια του [2]. Το τελικό πάχος του φιλμ και οι άλλες ιδιότητες του εξαρτώνται από τη φύση του διαλύματος (ιξώδες, ρυθμός ξήρανσης, ποσοστό στερεών, επιφανειακή τάση κλπ.) και οι παράμετροι φυσικά που επιλέχθηκαν για τη διαδικασία spin coating [3], όπως η ταχύτητα περιστροφής, επιτάχυνση κτλ. συμβάλλουν στις τελικές ιδιότητες του φιλμ. Τυπικός spin coater φαίνεται στην εικόνα 3.2.



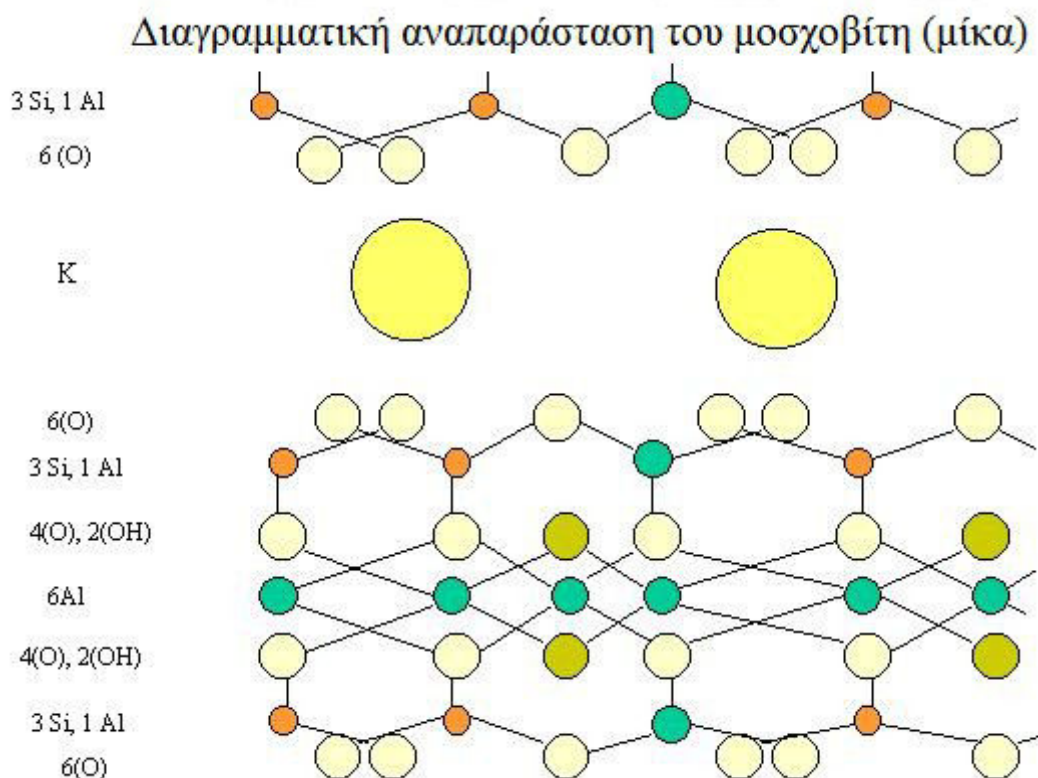
Εικόνα 3.1 : Απεικόνιση της ακτινικής δύναμης που αναπτύσσεται πάνω στο υπόστρωμα από την περιστροφή του. Το πάχος του φιλμ είναι μια ισορροπία δυνάμεων ιζώδους και φυγόκεντρων δυνάμεων, με τις ιζώδεις δυνάμεις να εξαρτώνται από το ρυθμό ξήρανσης του διαλύματος. [4]



Εικόνα 3.2: Τυπικός spin coater της Midas Systems Co Ltd. που χρησιμοποιήθηκε στα πειράματα.

3.3 Μίκα

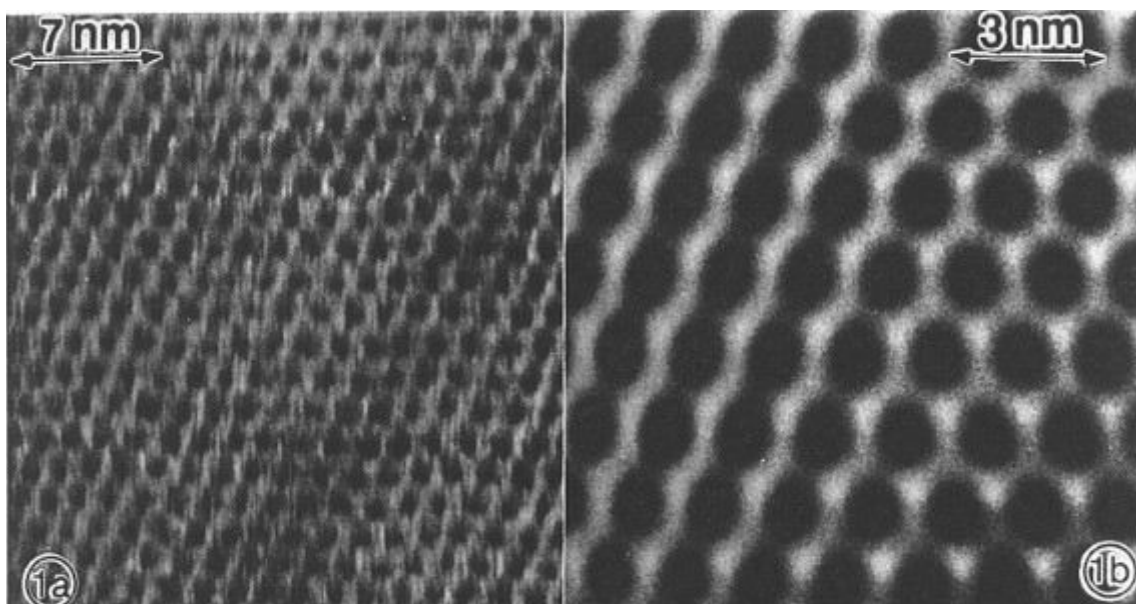
Η μίκα είναι ένα ελαφρά κιτρινωπό, διαφανές ορυκτό το οποίο ανήκει στη φυλλοπυριτική (phyllosilicate) ομάδα ορυκτών, με την παρακάτω χημική σύνθεση : $K_2Al_4Si_6Al_2O_{20}(OH,F)_4$. Είναι σκληρό, με στρώσεις κρυσταλλικό (μονοκλινές) υλικό το οποίο έχει την σημαντική ιδιότητα να θραύεται σε σχεδόν τέλεια ατομικά επίπεδα (almost perfect basal cleavage) με άτομα που έχουν μια κανονική δομή πλέγματος, κάνοντας το τέλειο για απεικονιστικές χρήσεις υψηλής ανάλυσης με AFM και τη χρήση του ως υπόστρωμα για την απεικόνιση βιολογικών δειγμάτων [5]. Η πολυεπίπεδη δομή της μίκας αποτελείται από στρώσεις πυριτικού αργιλίου ασθενώς συνδεδεμένα με στρώματα ιόντων καλίου. Τα ιόντα καλίου καταλαμβάνουν τις οπές μεταξύ των 12 ατόμων οξυγόνου, 6 από κάθε στρώμα πάνω και κάτω. Οι προκύπτοντες K-O ιονικοί δεσμοί είναι σχετικά αδύναμοι και σπάνε εύκολα, εξηγώντας τη σχεδόν τέλεια basal cleavage που έχει (εικόνα 3.3).



Εικόνα 3.3: Διαγραμματική αναπαράσταση της χημικής σύνθεσης της μίκας

Άλλο επίσης σημαντικό στοιχείο της mica είναι ότι, λόγω της ισόμορφης αντικατάστασης του τετρασθενούς πυριτίου από τρισθενές αργίλιο, έχει αρνητικά φορτισμένα δίνοντα του τη δυνατότητα να προσανατολίζει πολωμένα μόρια [6].

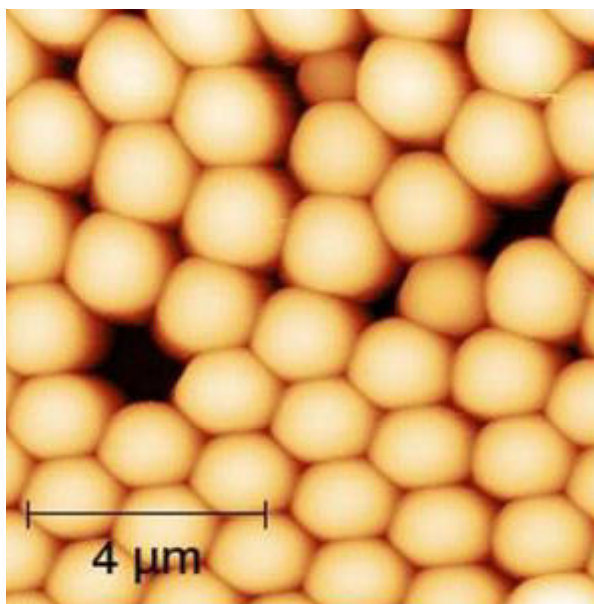
Στην εικόνα 3.4 φαίνεται η τέλεια θραύση σε ατομικό επίπεδο της μίκας.



Εικόνα 3.4: Απεικόνιση μίκα με AFM σε (1a) 7x7 nm και (1b) 3x3 nm. Τα εξάγωνα πλέγματα είναι εμφανή [6].

3.4 Πολυστυρένιο

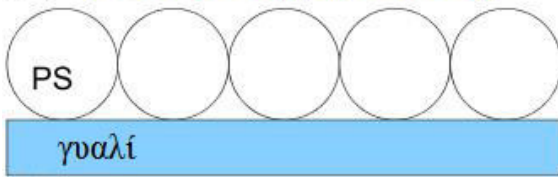
Το πολυστυρένιο είναι μια οργανική ένωση, πολυμερές του στυρένιου με χημικό τύπο $C_6H_5CH=CH_2$ και ένα από τα πιο ευρέως χρησιμοποιούμενα πλαστικά. Το πολυστυρένιο σε μορφή κολλοειδών σφαιρών έχει τη δυνατότητα αυτοσυναρμολόγησης σε πυκνή εξαγωνική συστοιχία [7].



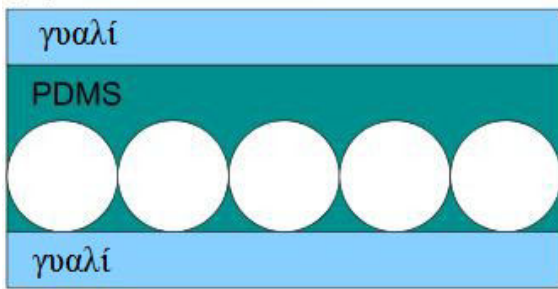
Εικόνα 3.5: Σφαιρίδια πολυστυρένιου που έχει κατατεθεί σε επιφάνεια με spin coating[6].

Λόγω της ιδιότητας τους αυτή χρησιμοποιούνται συχνά ως πρότυπα σε υποστρώματα για τη δομημένη απόθεση μετάλλων και ημιαγωγών [8] τα οποία μπορούν να χρησιμοποιηθούν για τη δημιουργία μεγάλων συστοιχιών με νανοκοιλώματα από μεταλλικά φιλμ με χαμηλό κόστος [9].

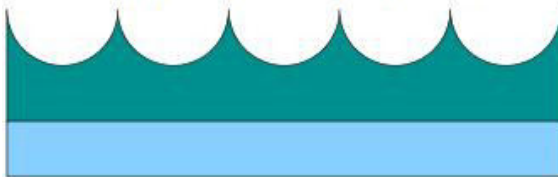
(a) 2D κολλοειδής κρύσταλλος



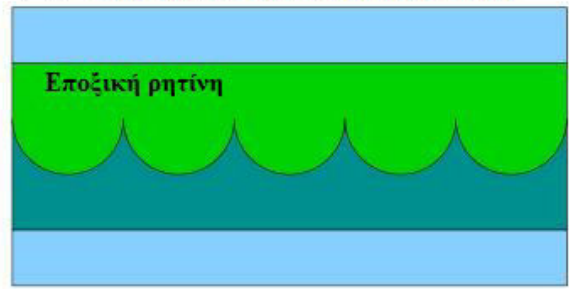
(b) Εκμαγείο πολυδιμεθυλοσιλοξάνης (PDMS)



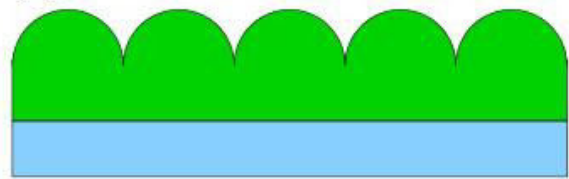
(c) Αφαίρεση υποστρώματος



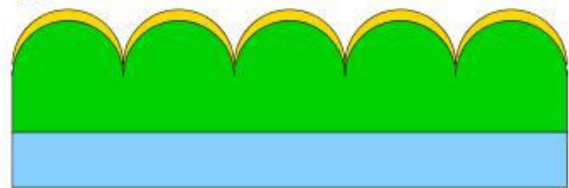
(d) Εκμαγείο εποξικής ρητίνης



(e) Αφαίρεση πολυδιμεθυλοσιλοξάνης



(f) Μεταλλική επικάλυψη



Εικόνα 3.6: Το στρώμα πολυδιμεθυλοσιλοξάνης (PDMS) εναποτίθεται στις σφαίρες πολυστυρενίου διατηρώντας τη διάταξη τους. Χρησιμοποιώντας τη εποξική ρητίνη μπορούμε να αντιστρέψουμε το εκμαγείο για τη δημιουργία μεταλλικών συστοιχιών [9].

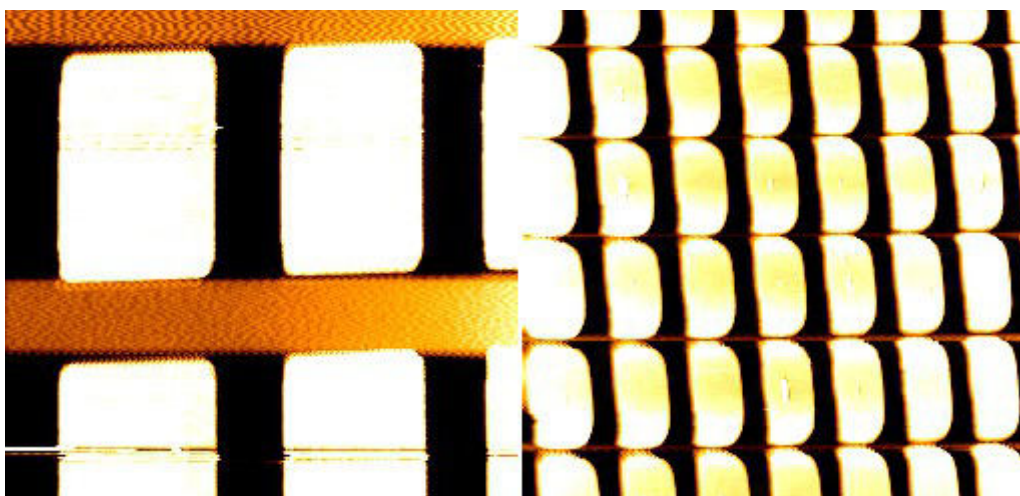
Επίσης, λόγω της προαναφερθείσας ιδιότητας τους, οι σφαίρες πολυστυρενίου σε υποστρώματα μίκας μπορούν να χρησιμοποιηθούν ως μέσο βαθμονόμησης των AFM μικροσκοπίων στο πλευρικό επίπεδο, ενώ η απόσταση μεταξύ των στρωμάτων των σφαιρών μπορεί να χρησιμοποιηθεί για το κάθετο άξονα, προσδιορίζοντας τις εκτάσεις της γραμμικότητας, ορθογωνιότητας, καθώς και τους θερμικού και instrumental drift [10]. Επίσης η ίδια η φύση της ακίδας του AFM (το πεπερασμένο μέγεθος της δεν επιτρέπει την πρόσβαση σε όλη την δομή της επιφάνειας όπως αναλύσαμε προηγουμένως στο κεφάλαιο για το AFM) δημιουργεί τεχνουργήματα στις λαμβανόμενες εικόνες. Με τις σφαίρες πολυστυρενίου ως δείγμα αναφοράς τα σφάλματα αυτά μπορούν να ποσοτικοποιηθούν ώστε να αποκτηθεί μια κατά προσέγγιση γνώση της γεωμετρίας της ακίδας (η ακτίνα καμπυλότητας της κορυφής και η κωνική γωνία) [11].

3.5 Βιβλιογραφία

- [1] McIlvaine, T. C. "A buffer solution for colorimetric comparison." (1921), *Journal of Biological Chemistry* vol 49.1: pp. 183-186.
- [2] L. E. Scriven, "Physics and Applications of DIP Coating and Spin Coating." (1988), *MRS Proceedings* vol 121
- [3] Van Hardeveld, R. M., et al. "Deposition of inorganic salts from solution on flat substrates by spin-coating: theory, quantification and application to model catalysts." (1995), *Applied surface science* vol 84.4: pp. 339-346.
- [4] Brewer Science Inc., "Equipment manual for spin coaters."
- [5] James Batteas, James Helt. "Mica Surfaces." (2008), pp. 2211-2228.
- [6] B. L. Dixon Northern, Y. L. Chen, J.N. Israelachvili, J.A.N. Zasadzinski, "Atomic Force Microscopy of Mica surface after ion replacement" (1991), *Proceedings of the 49th Annual Meeting of the Electron Microscopy Society of America*
- [7] Shawn H. Pfeil, Yale E. Goldman "High Throughput Zero Mode Waveguides via Natural Lithography"
- [8] L. Wegewitz, A. Prowald, J. Meuthen, S. Dahle, O. Höfft, F. Endres and W. Maus-Friedrichs, "Plasma chemical and chemical functionalization of polystyrene colloidal crystals" (2014), *Phys. Chem.* vol 16: pp. 18261-18267
- [9] Manuel R. Gonçalves, Taron Makaryan, Fabian Enderle, Stefan Wiedemann, Alfred Plett, Othmar Marti and Paul Ziemann "Plasmonic nanostructures fabricated using nanosphere-lithography, soft-lithography and plasma etching" (2011), *Beilstein J. Nanotechnol.* vol 2: pp. 448–458.
- [10] Van Cleef, M., Holt, S. A., Watson, G. S. and Myhra, S., "Polystyrene spheres on mica substrates: AFM calibration, tip parameters and scan artefacts." (1996), *Journal of Microscopy* vol 181: pp. 2–9.
- [11] C Odin, J.P Aimé, Z El Kaakour, T Bouhacina, "Tip's finite size effects on atomic force microscopy in the contact mode: simple geometrical considerations for rapid estimation of apex radius and tip angle based on the study of polystyrene latex balls" (1994), *Surface Science*, vol 317, issue 3: pp. 321–340

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 4: ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΑ ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

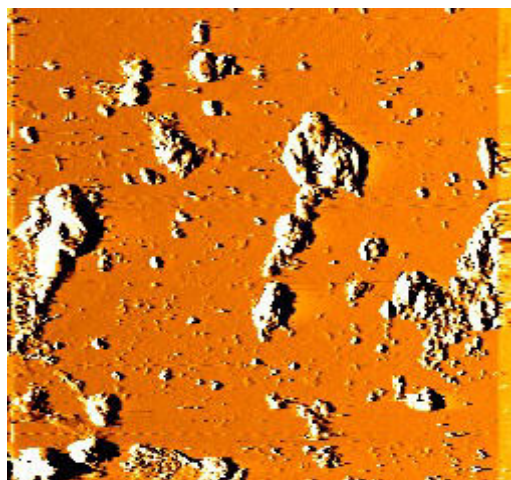
Η γενική μεθοδολογία που ακολουθήθηκε στα πειράματα τα οποία είχαν ως αποτέλεσμα τις παρακάτω εικόνες ήταν η τοποθέτηση διαλύματος κολλαγόνου τύπου I από βοδινό αγίλλειο τένοντα διαλυμένο σε οξικό οξύ CH_3COOH (σε διάφορες συγκεντρώσεις) σε δυο διαφορετικά υποστρώματα, fresh cleaved mica, και mica με σφαίρες πολυστυρένιου πριν τη τοποθέτηση του διαλύματος για απεικόνιση. Σε ορισμένα πειράματα, τα υποστρώματα ξεπλύθηκαν με PBS πριν και μετά την τοποθέτηση των διαλυμάτων, ενώ spin coater χρησιμοποιήθηκε για εξάπλωση του δείγματος ομοιόμορφα. Η εξαγωγή των εικόνων έγινε με το λογισμικό του AFM (CPII της Veeco). Μαζί με το μικροσκόπιο, η Veeco περιέχει ορισμένα grating για τη βαθμονόμηση του AFM και για να υπάρχει ένα υπόδειγμα για το τι είδους φωτογραφίες μπορεί κάποιος να περιέχει. Παρακάτω (εικόνα 4.1) παρατίθενται ορισμένες που τραβήχτηκαν σε μέθοδο μη-επαφής.



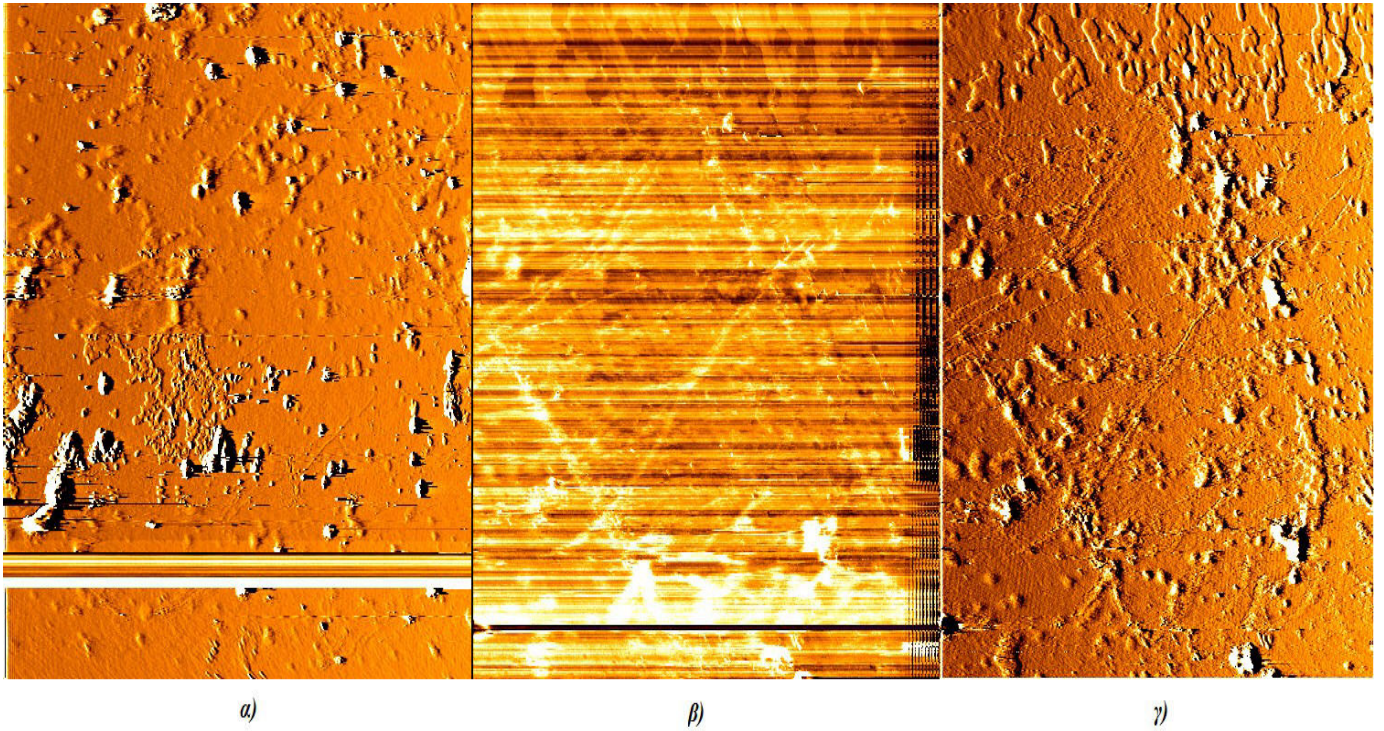
Εικόνα 4.1: 20 μm x 20 μm εικόνες gratings, με αραιές αριστερά και πιο πυκνές συστοιχίες δεξιά.

4.1 Εικόνες με μίκα σε μέθοδο επαφής

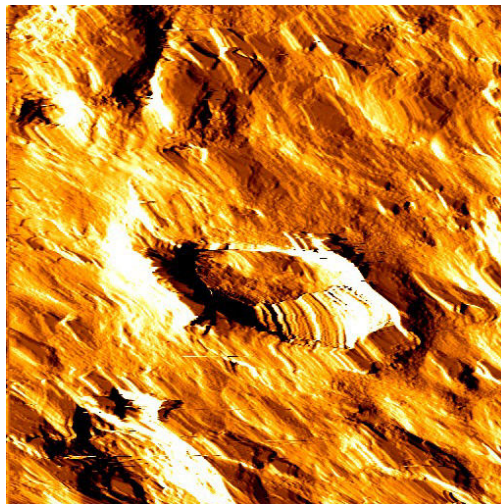
Οι παρακάτω φωτογραφίες χρησιμοποίησαν την μέθοδο απεικόνισης επαφής του AFM σε υπόστρωμα μίκα.



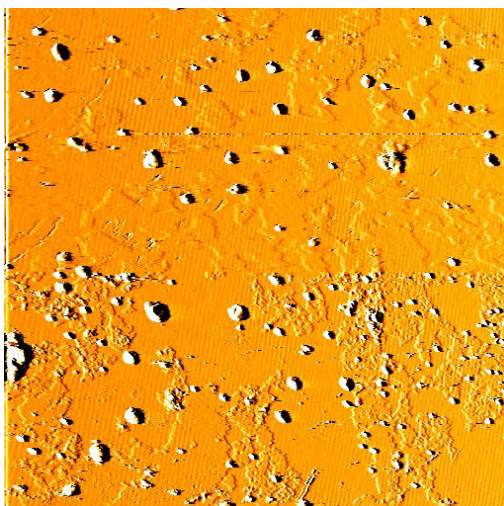
Εικόνα 4.2: 50 μm x 50 μm εικόνα δείγματος κολλαγόνου με πυκνότητα 0.6 mg/ml και ψύξη στους 30 °C για 30 min.



Εικόνα 4.3 α), β), γ): Τρεις διαφορετικές εικόνες 50 μm x 50 μm δείγματος κολλαγόνου με πυκνότητα 1,25 mg/ml και ψύξη στους 30 °C για 10 min.



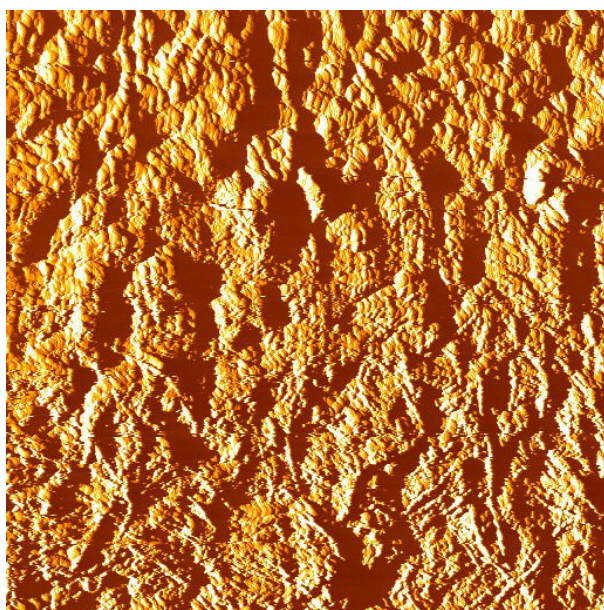
Εικόνα 4.4: Εικόνα του προηγούμενου δείγματος αλλά σε μέγεθος 10 μm x 10 μm .



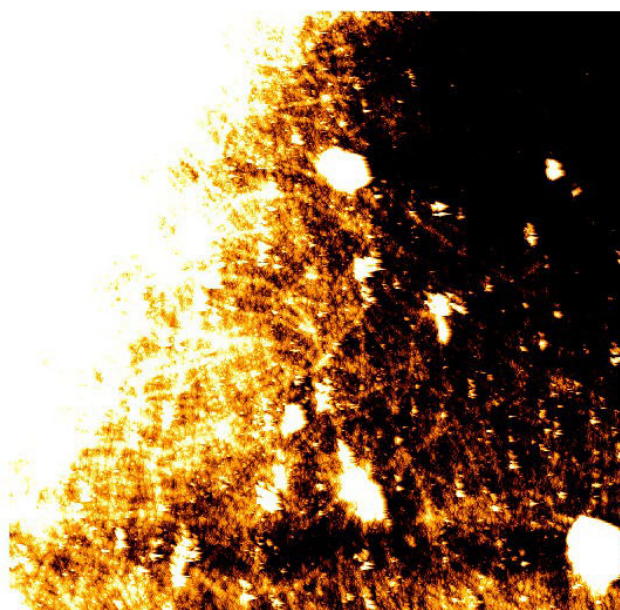
Εικόνα 4.5: Εικόνα $50\ \mu\text{m} \times 50\ \mu\text{m}$ δείγματος κολλαγόνου με πυκνότητα $1,25\ \text{mg/ml}$ και ψύξη στους $30\ ^\circ\text{C}$ για $30\ \text{min}$.

4.2 Εικόνες με μίκα σε παλλόμενη μέθοδο

Αντίστοιχα οι παρακάτω φωτογραφίες χρησιμοποίησαν παλλόμενη μέθοδο του AFM, πάλι σε μίκα.

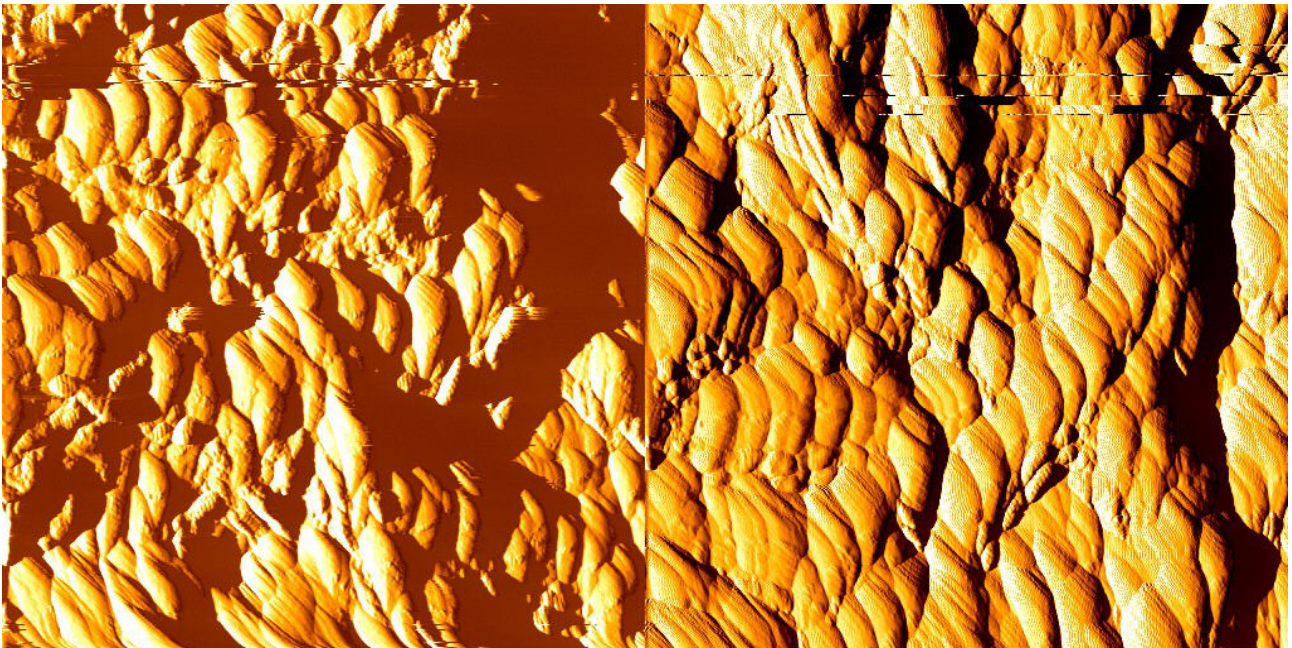


α)



β)

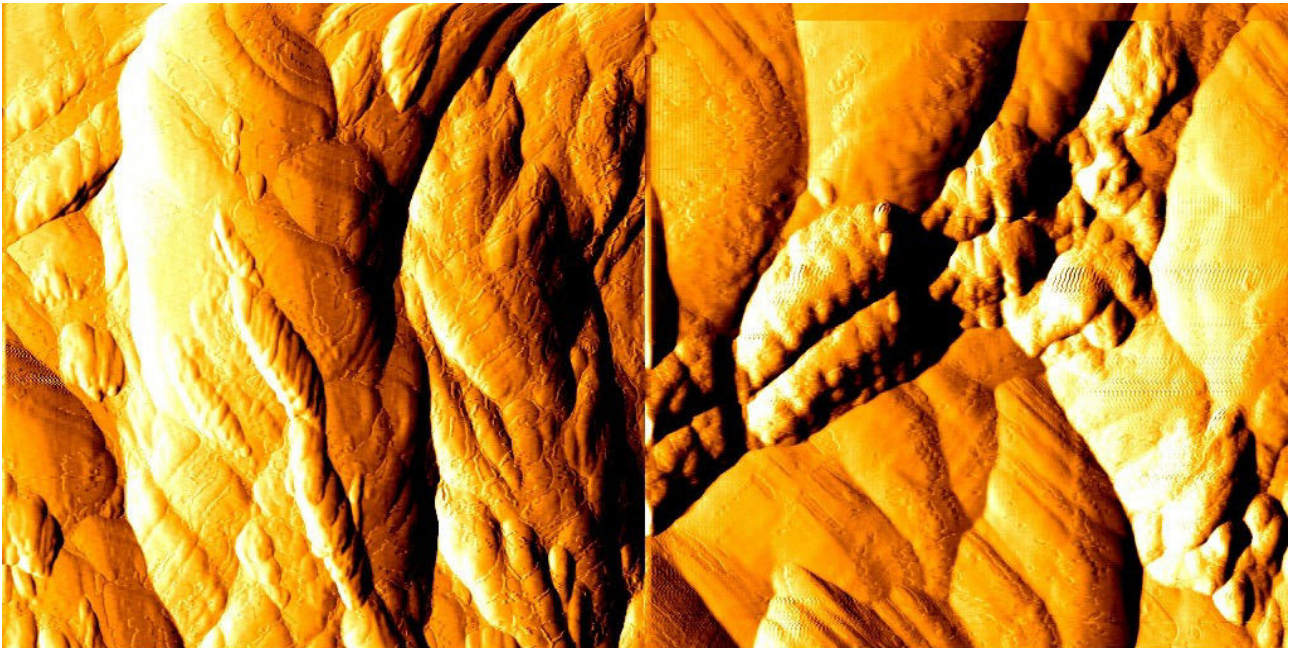
Εικόνα 4.6: Εικόνες $50\ \mu\text{m} \times 50\ \mu\text{m}$ δείγματος κολλαγόνου με πυκνότητα $8\ \text{mg/ml}$ με πλύση από PBS αλλά αφημένο να στεγνώσει φυσικά στον αέρα. Η α) είχε set δύναμη $-0.42\ \text{nN}$ και η δεύτερη β) $-0.03\ \text{nN}$ (αναφέρεται στην δύναμη που δημιουργείται μεταξύ ακίδας και δείγματος λόγω δυνάμεων που αναπτύσσονται όπως αναλύθηκε λεπτομερώς στο κεφάλαιο 2 για το AFM)



α)

β)

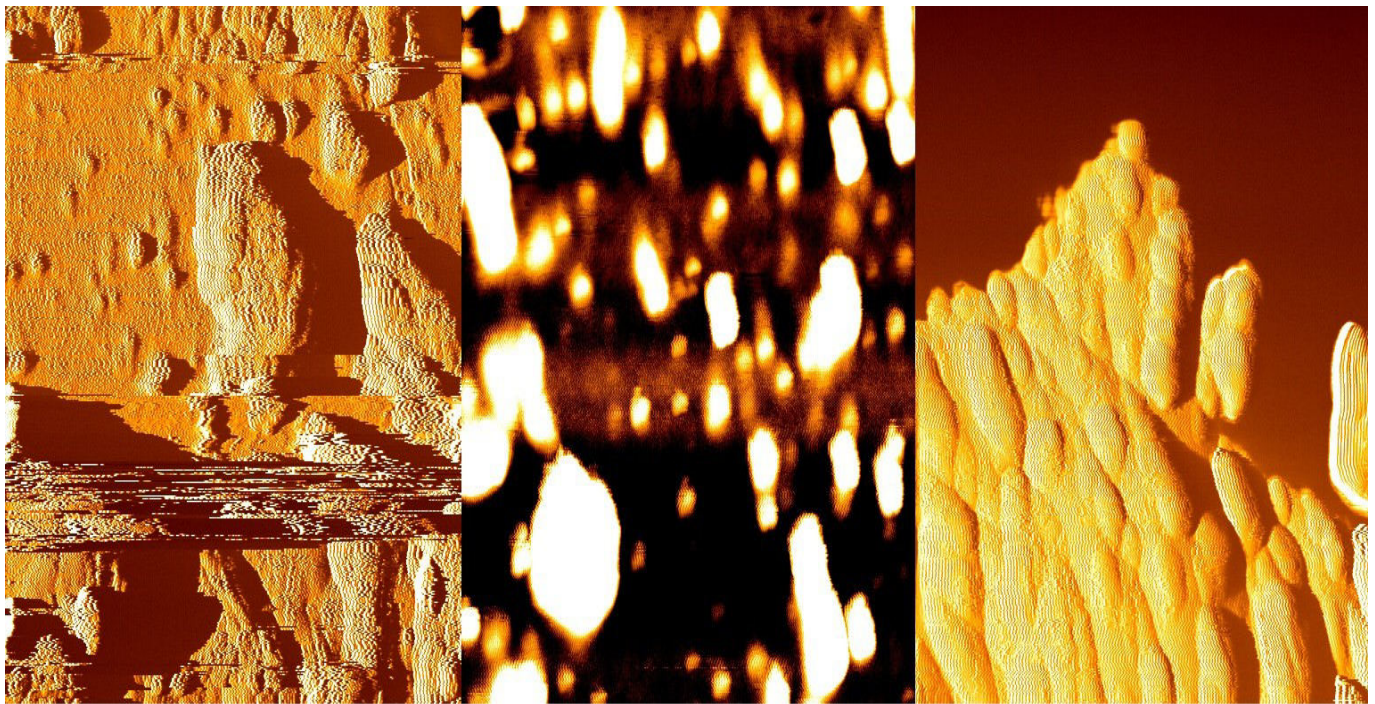
Εικόνα 4.7: Εικόνες $10\ \mu\text{m} \times 10\ \mu\text{m}$ του προηγούμενου δείγματος. Αυτές είχαν διαφορετικό gain στο σήμα που λάμβανε το AFM από τη φωτοδίοδο, με την α) στα 0.08 και τη β) στα 0.15. Η διαφορά είναι εμφανής με πιο sharp εικόνα στη δεύτερη περίπτωση.



α)

β)

Εικόνα 4.8: Εικόνες $2\ \mu\text{m} \times 2\ \mu\text{m}$ του προηγούμενου δείγματος. Αυτές πάλι είχαν διαφορετικό rate (συχνότητα) λήψης δεδομένων από τη φωτοδίοδο, με την α) στο 1 Hz και τη β) στα 2 Hz. Η πρώτη έχει σχετικά καλύτερη ανάλυση και λεπτομέρεια στη τοπογραφία του δείγματος, αλλά στη δεύτερη η λήψη της εικόνας έγινε πιο γρήγορα.



α)

β)

γ)

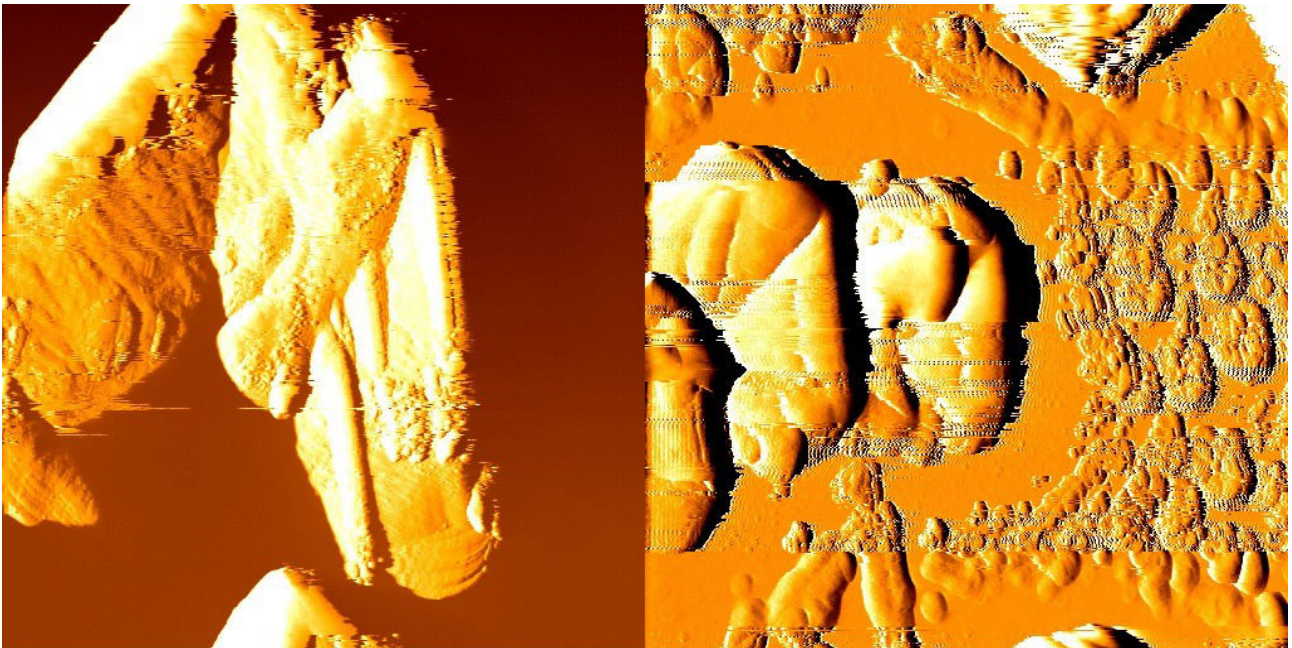
Εικόνα 4.9: Εικόνες δείγματος κολλαγόνου με πυκνότητα 1 mg/ml (pH περίπου 6.5). Οι εικόνες πάρθηκαν μετά από τοποθέτηση του διαλύματος στους 37 °C για 5h σε μίκα χωρίς ζέπλυμα και να αφήσουμε το διάλυμα να στεγνώσει. Οι εικόνες έχουν μέγεθος α) 3 μm x 3 μm, β) 2.5 μm x 2.5 μm και γ) 1 μm x 1 μm αντίστοιχα.



α)

β)

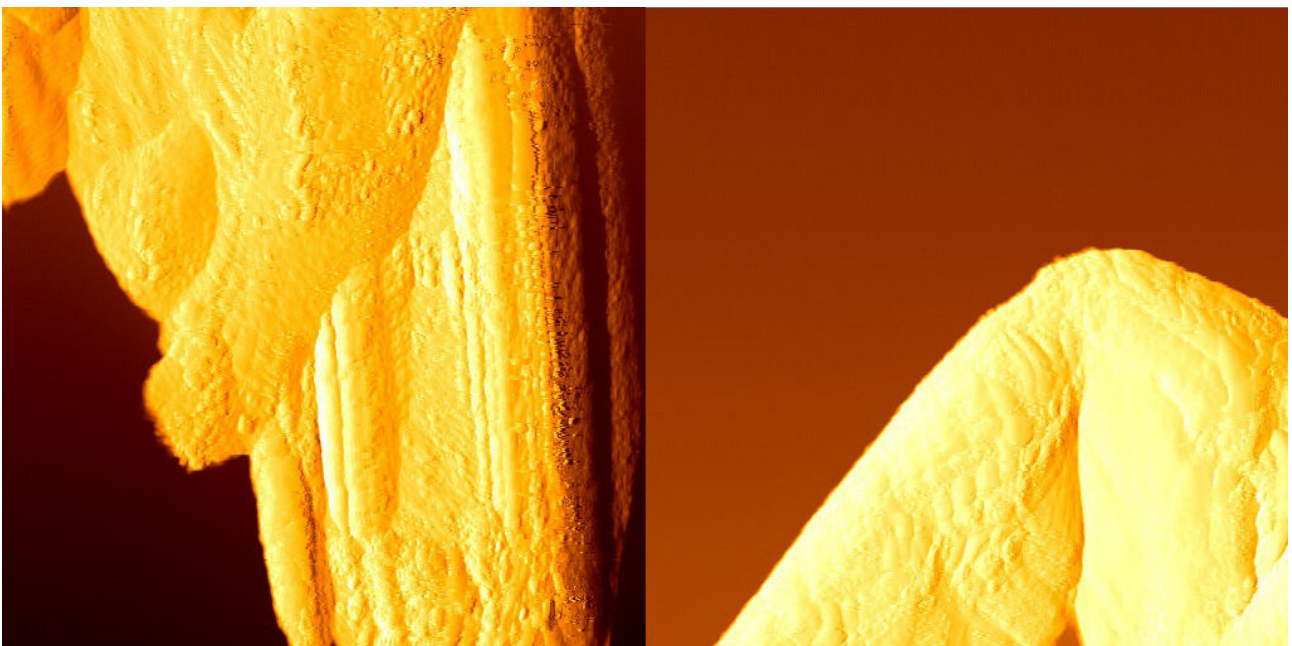
Εικόνα 4.10: Εικόνες δείγματος κολλαγόνου με πυκνότητα 0,1 mg/ml (pH περίπου 6.5). Το υπόστρωμα που χρησιμοποιήθηκε είναι μίκα fresh cleaved, που ζεπλώθηκε με PBS. Έπειτα τοποθετήθηκε το διάλυμα, αφήθηκε 10 λεπτά και μετά έγινε πάλι πλύση με PBS. Στις εικόνες φαίνεται καθαρά το πόσο αραιό είναι το δείγμα σε σχέση με τα άλλα καθώς τα συσσωματώματα κολλαγόνου είναι αραιά. Οι εικόνες έχουν μέγεθος α) 50 μm x 50 μm, β) 10 μm x 10 μm αντίστοιχα.



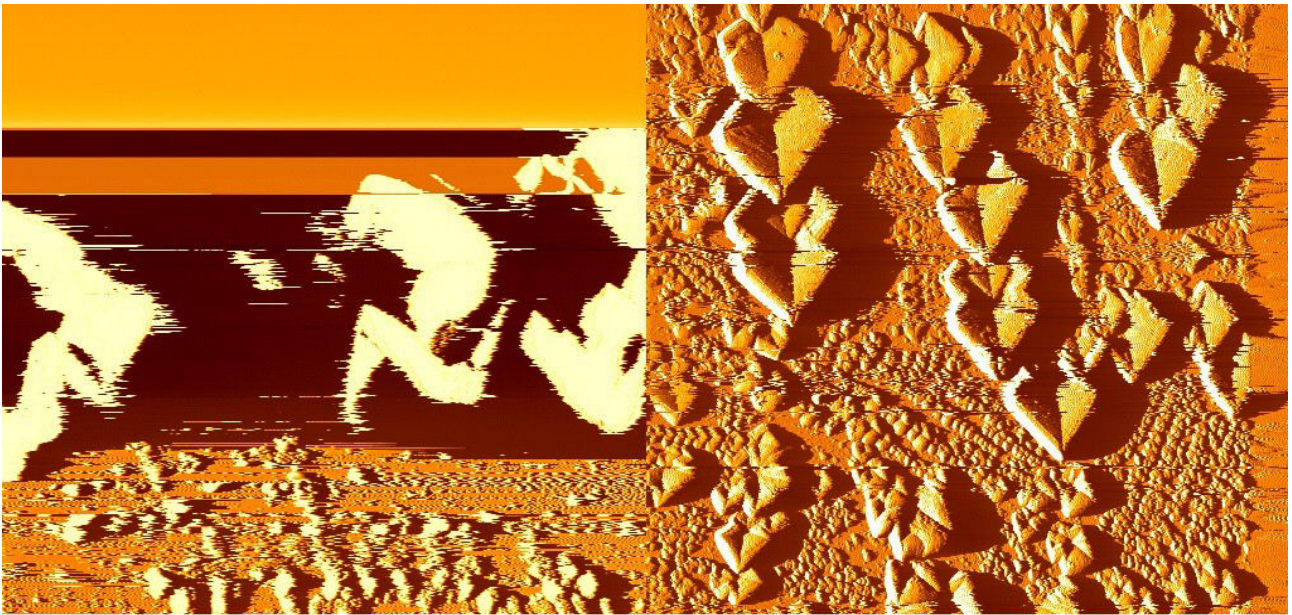
α)

β)

Εικόνα 4.11: Εικόνες δείγματος ίδιο με το προηγούμενο με μέγεθος $10 \mu\text{m} \times 10 \mu\text{m}$ με α) 0.1 gain και β) 0.2 gain (όπου gain το μέγεθος της ανάδρασης μεταξύ φωτοανιχνευτή και πιεζοηλεκτρικού σαρωτή, όπως είχε αναλυθεί λεπτομερώς στις βασικές αρχές του AFM, στο κεφάλαιο 2.1).



Εικόνα 4.12: Εικόνες δείγματος ίδιο με το προηγούμενο με μέγεθος $5 \mu\text{m} \times 5 \mu\text{m}$.

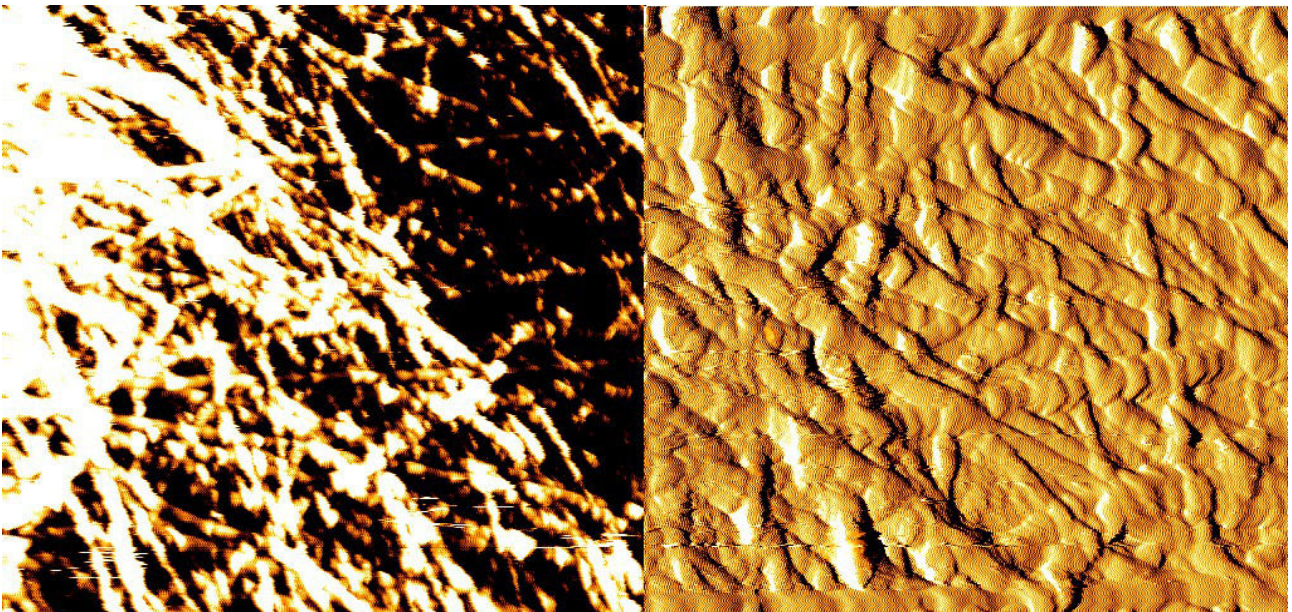


α)

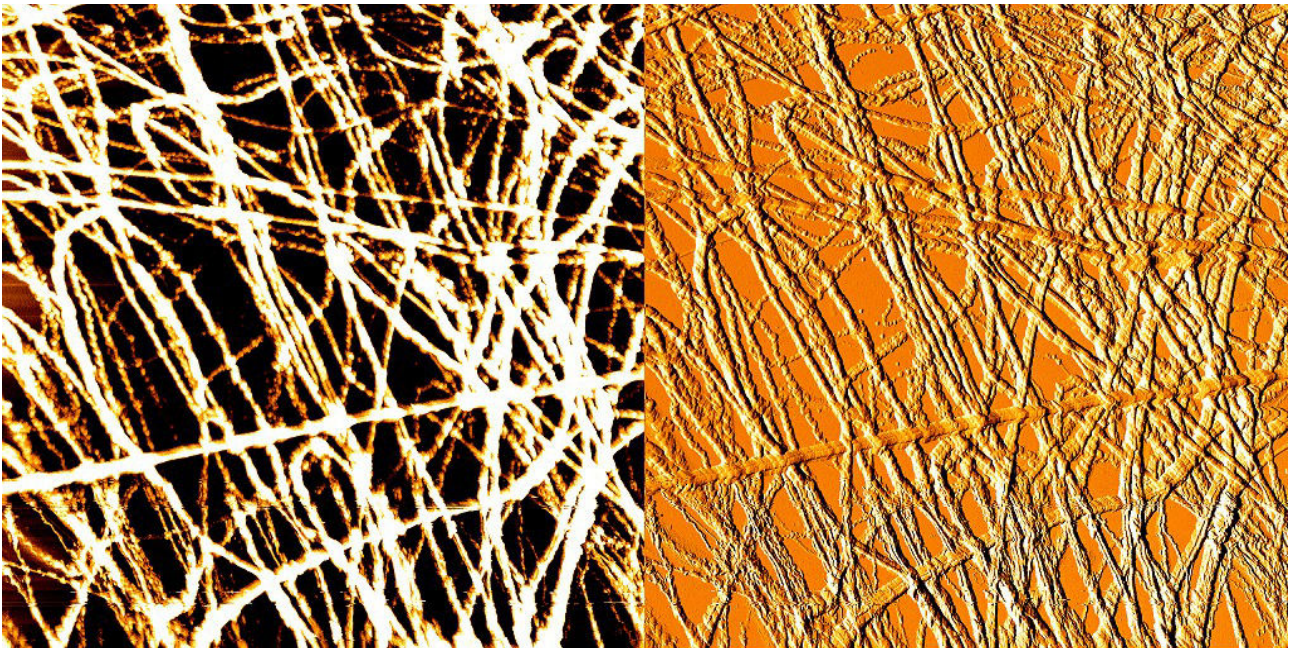
β)

Εικόνα 4.13: Εικόνες δείγματος ίδιο με το προηγούμενο, αλλά το δείγμα αφέθηκε να προσροφηθεί για α) 30 min και β) 60 min. Φαίνεται στη δεύτερη εικόνα ότι η δημιουργία δομημένων συσσωμάτων εξαρτάται από το μεγαλύτερο adsorption που έχει υποστεί το δείγμα. Και οι 2 εικόνες έχουν μέγεθος 50 μm x 50 μm .

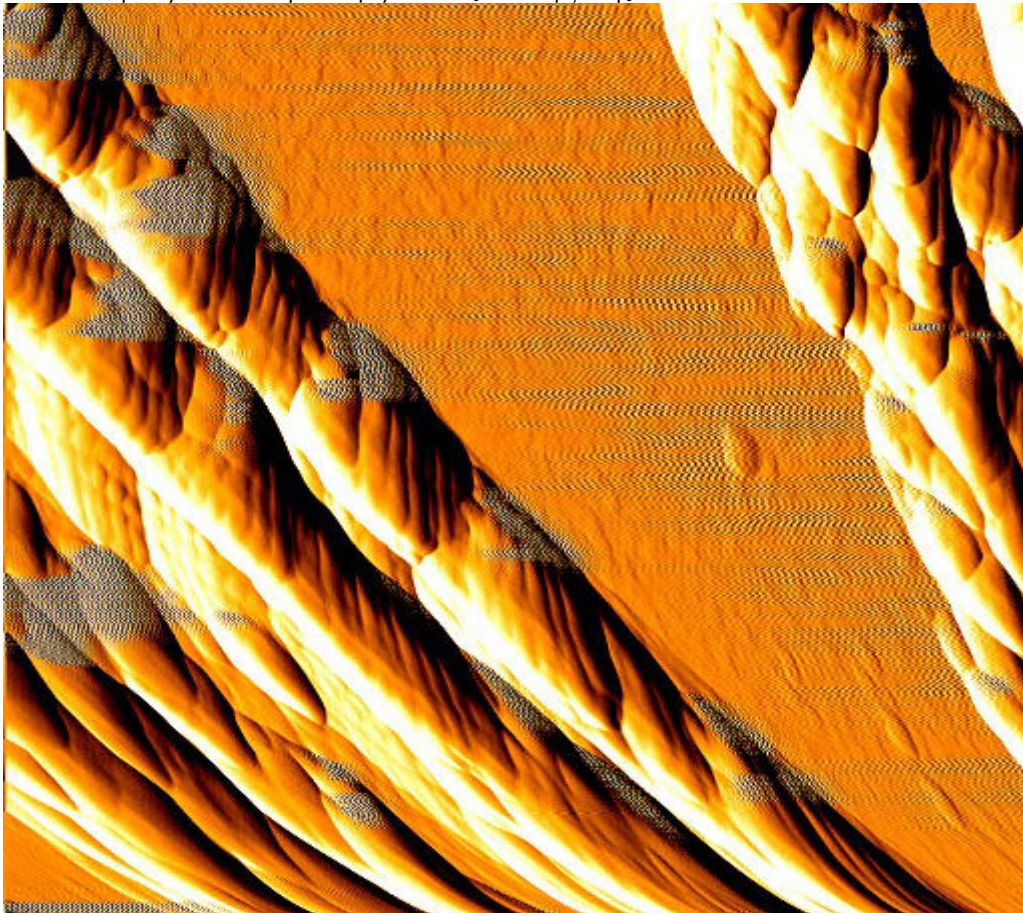
Το τελευταίο δείγμα με mica και tapping mode έδωσε τα καλύτερα αποτελέσματα, απεικονίζοντας ξεκάθαρα ινίδια κολλαγόνου. Η ρύθμιση rate στο AFM είναι μια ποσοτική αναπαράσταση του ρυθμού σάρωσης σε Hz από το πιεζοηλεκτρικό στοιχείο. Σε διαφορετικούς ρυθμούς σάρωσης έχουμε διαφορετικές ποιότητες εικόνες, λόγω του παρατεταμένου χρόνου που διατίθεται στο σύστημα να ακολουθήσει την ανάδραση που προκαλείται από το σφάλμα θέσης, αλλά με διαφορά στη ταχύτητα λήψης φωτογραφίας.



Εικόνα 4.14: Εικόνες δείγματος στο οποίο το υπόστρωμα (mica) ξεπλύθηκε πρώτα με PBS, τοποθετήθηκε επάνω του κολλαγόνο πυκνότητας 8 mg/ml (το πυκνότερο ως τώρα το οποίο βοήθησε στην απεικόνιση των ινιδίων κολλαγόνου) και τοποθετήθηκε σε spin coater στις 6000 rpm για 40 sec. Το rate λήψης φωτογραφίας είναι 1 Hz και οι εικόνες έχουν μέγεθος 50 μm x 50 μm



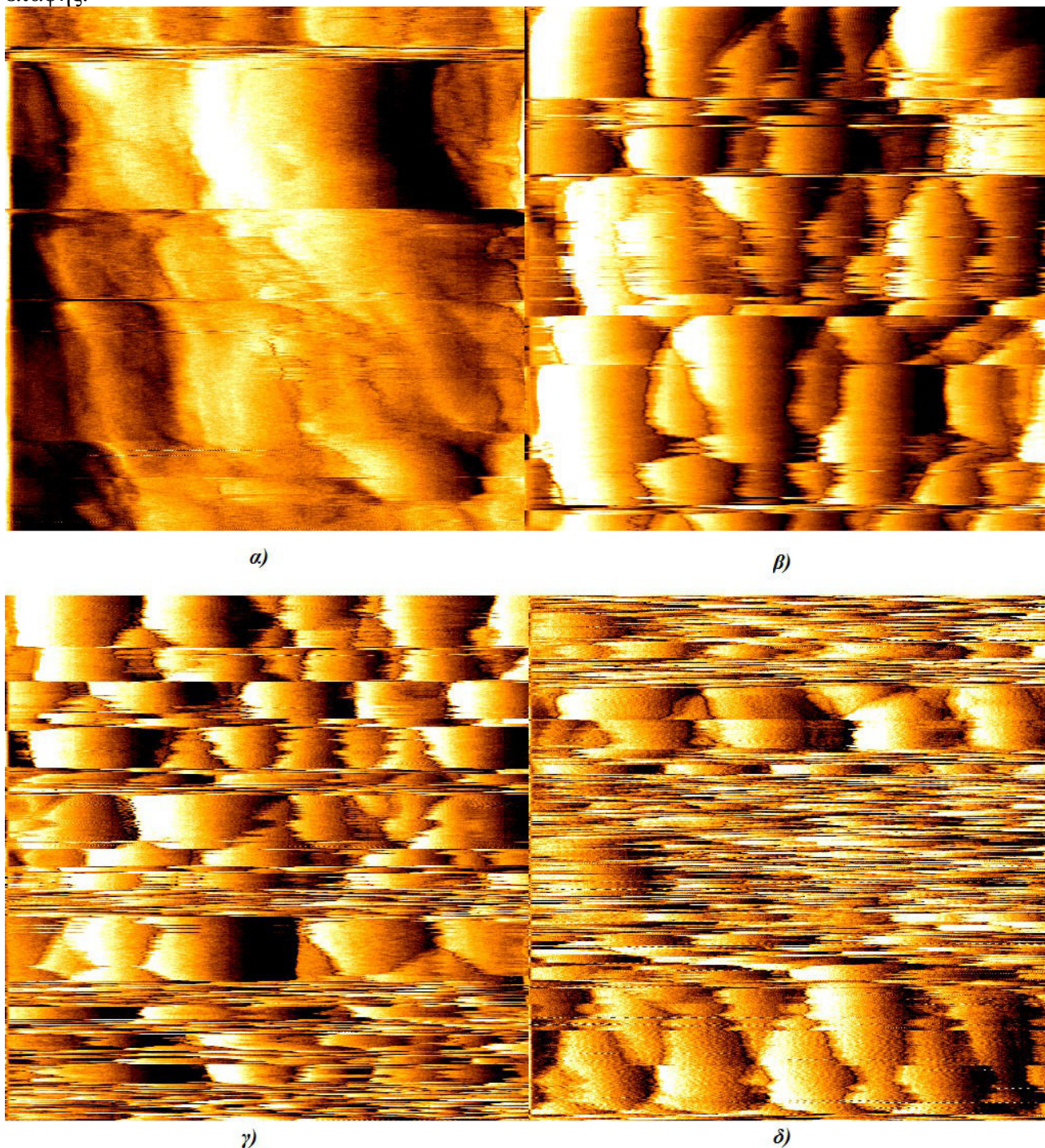
Εικόνα 4.15: Εικόνες του προηγούμενου δείγματος αλλά με rate 0.1 Hz. Το μέγεθος παραμένει ίδιο, 50 μm x 50 μm . Η ανάλυση των εικόνων ,η ευκρίνεια και η λεπτομέρεια τους είναι εμφανής.



Εικόνα 4.16: Εικόνα του προηγούμενου δείγματος αλλά με rate 0.5 Hz και μέγεθος 5 μm x 5 μm .

4.3 Εικόνες με μίκα και πολυστυρένιο σε μέθοδο επαφής

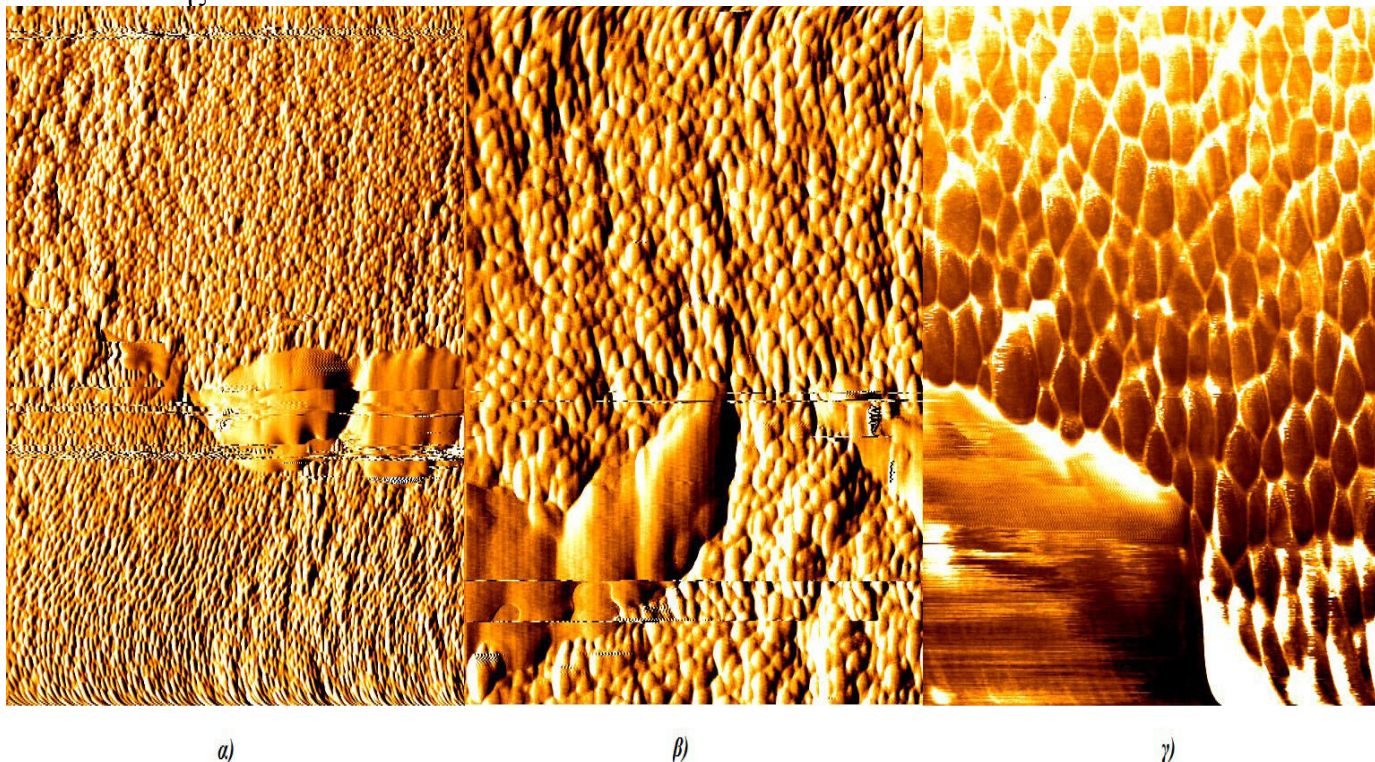
Οι επόμενες εικόνες χρησιμοποίησαν υπόστρωμα μίκας και πολυστυρενίου, με μέθοδο απεικόνισης επαφής.



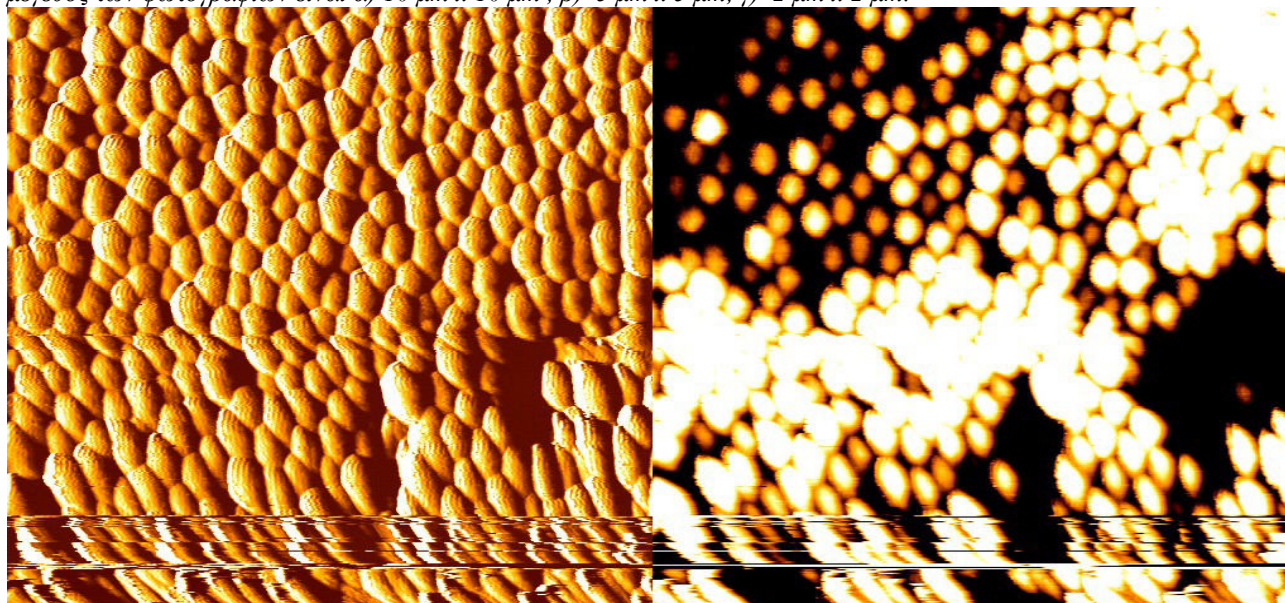
Εικόνα 4.17: Εικόνες δείγματος με *fresh cleaved* μίκα και πολυστυρένιο που αφέθηκε για 30 να στεγνώσει και υπέστη *spin coating*. Η μέθοδος που χρησιμοποιήθηκε ήταν *contact* με τις φωτογραφίες να έχουν μέγεθος $1 \mu\text{m} \times 1 \mu\text{m}$ και *rate* α),β) 2 Hz, γ) 1 Hz και δ) 0.5 Hz. Όπως παρατηρούμε, η μείωση του ρυθμού σάρωσης οδηγεί σε επιδείνωση της ποιότητας των εικόνων, γιατί οι σφαίρες πολυστυρενίου δεν είναι το καταλληλότερο υλικό για απεικόνιση με μέθοδο επαφής (λόγω ευκαμψίας των σφαιρών και την ευμεταβλησία της θέσης τους), και έτσι με χαμηλότερο *rate* δίνουμε μεγαλύτερο χρόνο στις δυσμενείς συνθήκες καθώς και το θερμικό *drift* να επηρεάσουν τη ποιότητα της εικόνας.

4.4 Εικόνες με μίκα και πολυστυρένιο σε παλλόμενη μέθοδο

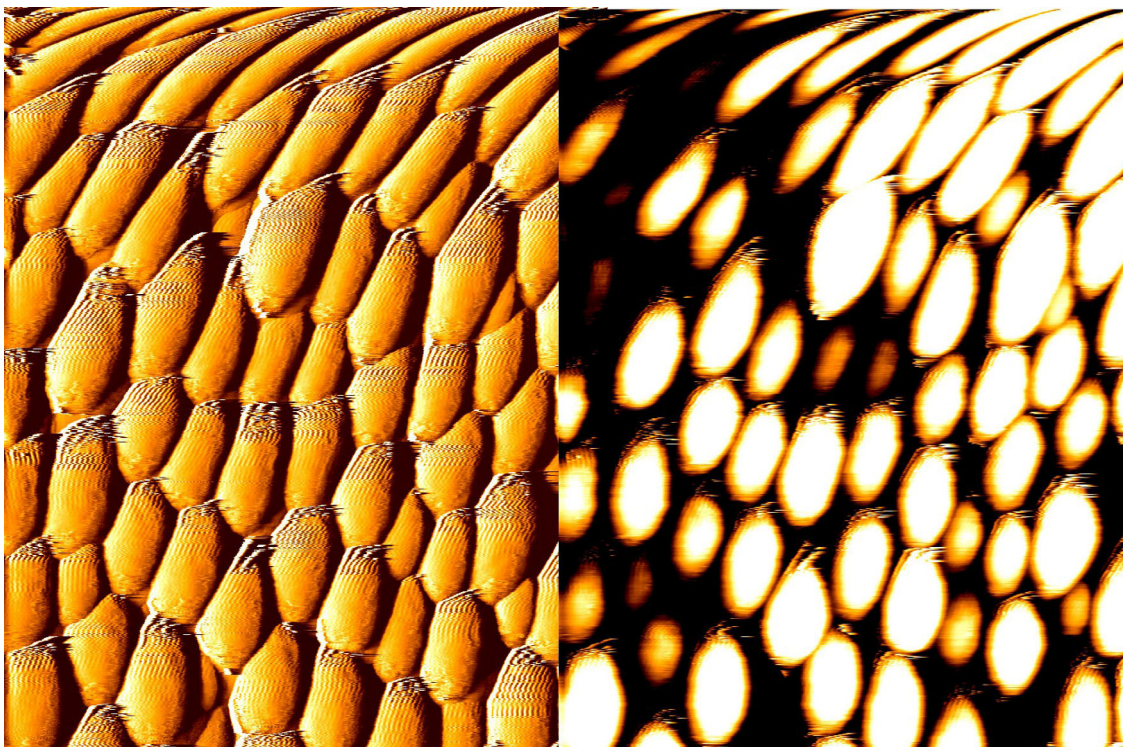
Οι επόμενες εικόνες είναι πάλι με υπόστρωμα μίκα και πολυστυρένιο, αλλά με παλλόμενη μέθοδο απεικόνισης.



Εικόνα 4.18: Εικόνες δείγματος με *fresh cleaved* μίκα και πολυστυρένιου, μαζί με κολλαγόνο πυκνότητας 1 mg/ml. Το μέγεθος των φωτογραφιών είναι α) 10 μm x 10 μm , β) 5 μm x 5 μm , γ) 2 μm x 2 μm .

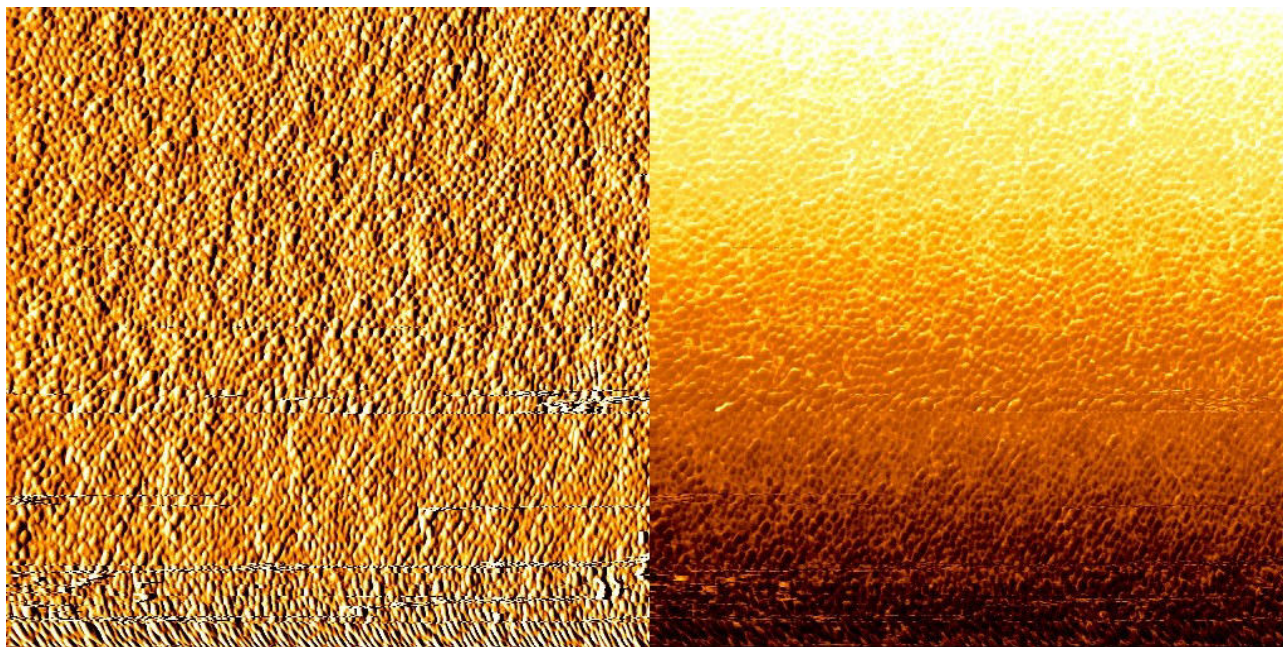


Εικόνα 4.19: Εικόνες δείγματος με *fresh cleaved* μίκα και πολυστυρένιου, το οποίο τοποθετήθηκε σε vortex (σπειροειδής δίνη που δημιουργείται από τη διαφορά περιστροφής του υποστρώματος του δείγματος και του πάνω μέρους του στρώματος του υγρού λόγω αδράνειας του, οδηγώντας το να ξεφύγει από την στέρεη επιφάνεια του μέχρι να μείνει ένα σταθερό στρώμα υγρού που κινείται με την ίδια ταχύτητα με το υπόστρωμα) με χαρτί για την απορρόφηση του έξτρα υγρού. Το μέγεθος των φωτογραφιών είναι 2.25 μm x 2.25 μm

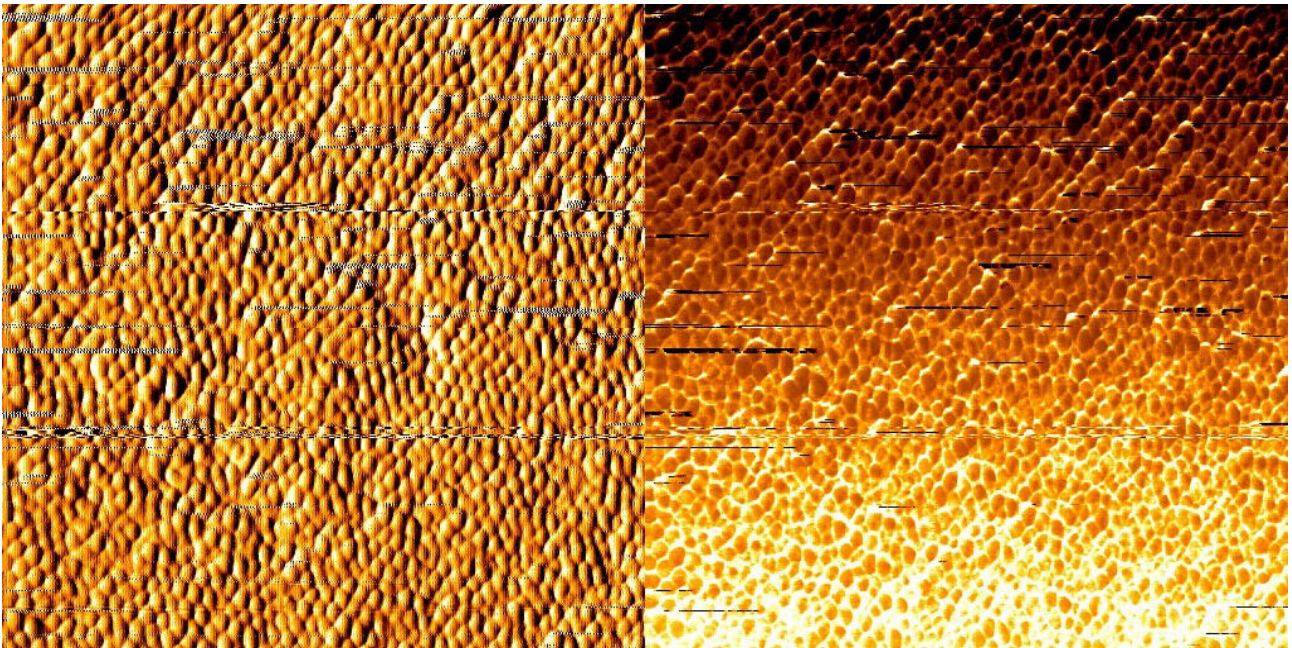


Εικόνα 4.20: Εικόνες του προηγούμενου δείγματος αλλά με μέγεθος των εικόνων να είναι 1 μm x 1 μm

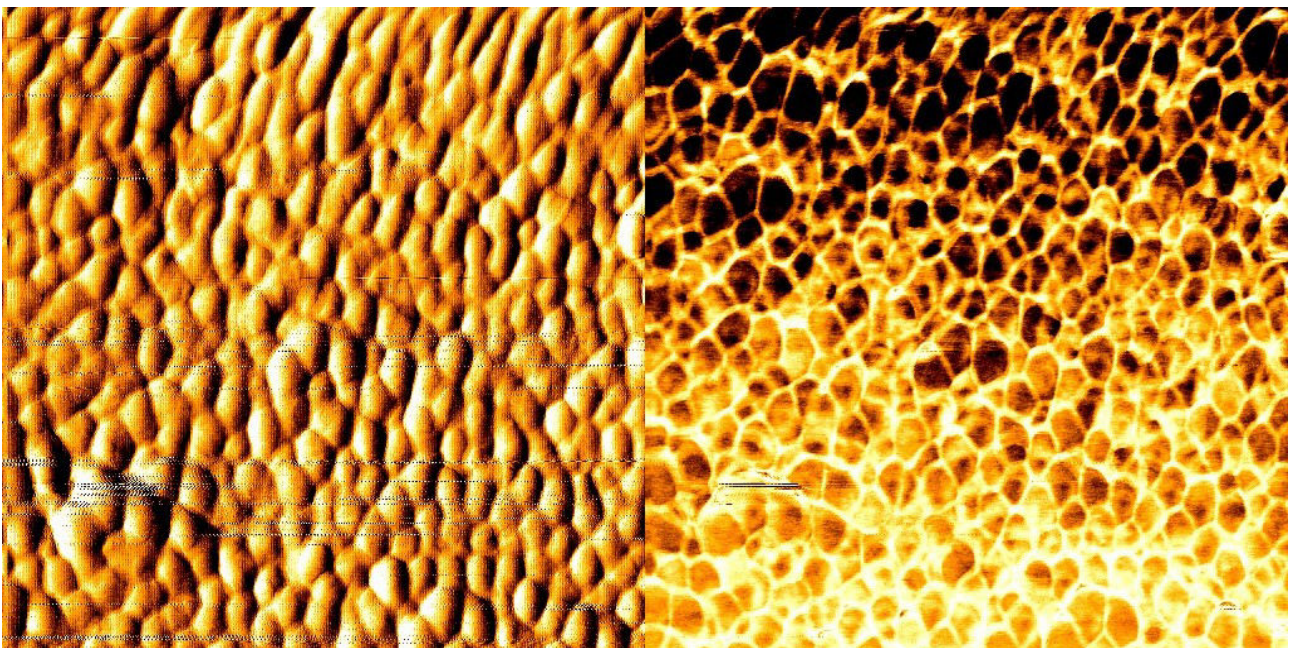
Το επόμενο δείγμα μας έδωσε τα καλύτερα αποτελέσματα με παλλόμενη μέθοδο στο συνδυασμό μίκα-πολυστενίου το οποίο τοποθετήθηκε σε spin coater στις 1000 rpm για 20 sec. Παρατίθενται σε διαφορετικά μεγέθη:



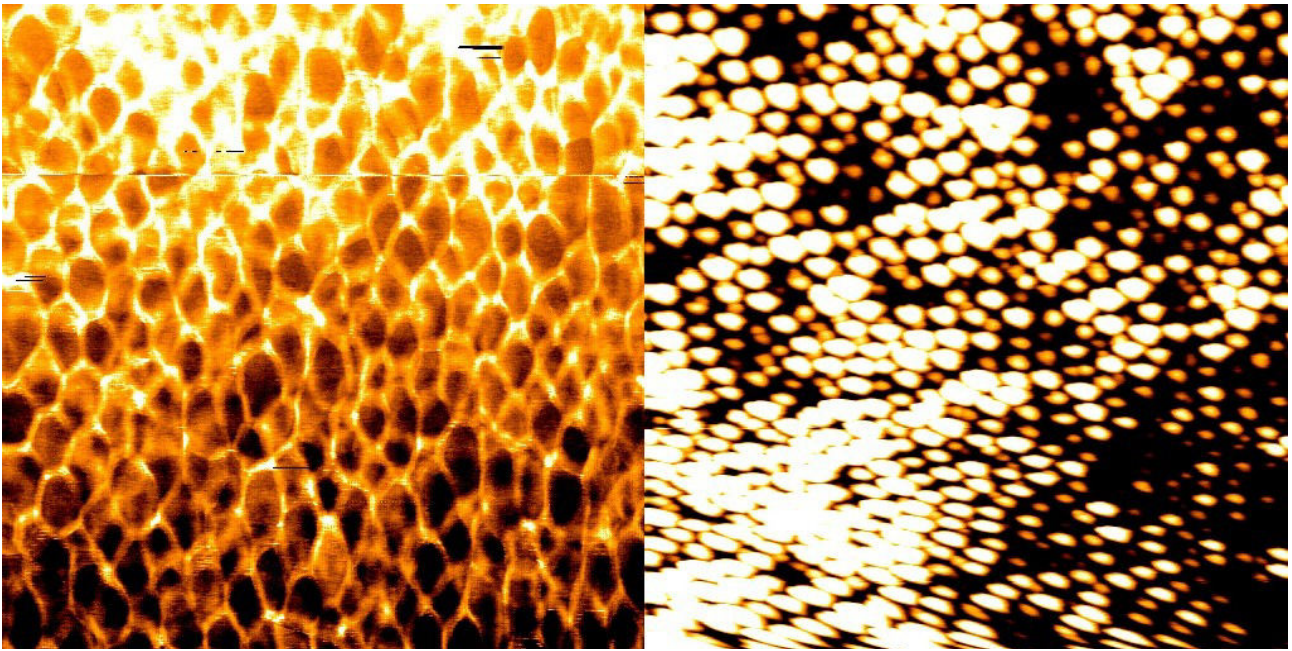
Εικόνα 4.21: Εικόνες δείγματος μίκας-πολυστενίου, μέγεθος των φωτογραφιών είναι 10 μm x 10 μm



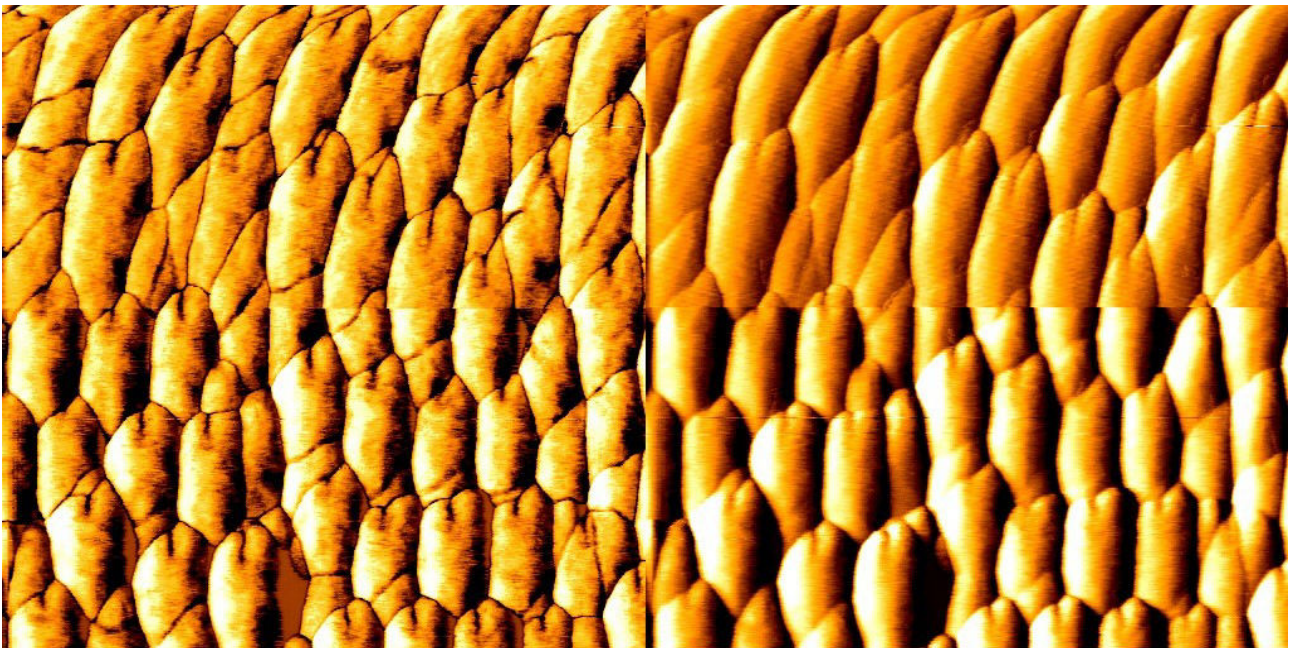
Εικόνα 4.22: Εικόνες δείγματος μίκας-πολυστυρένιου, μέγεθος των φωτογραφιών είναι 5 μm x 5 μm



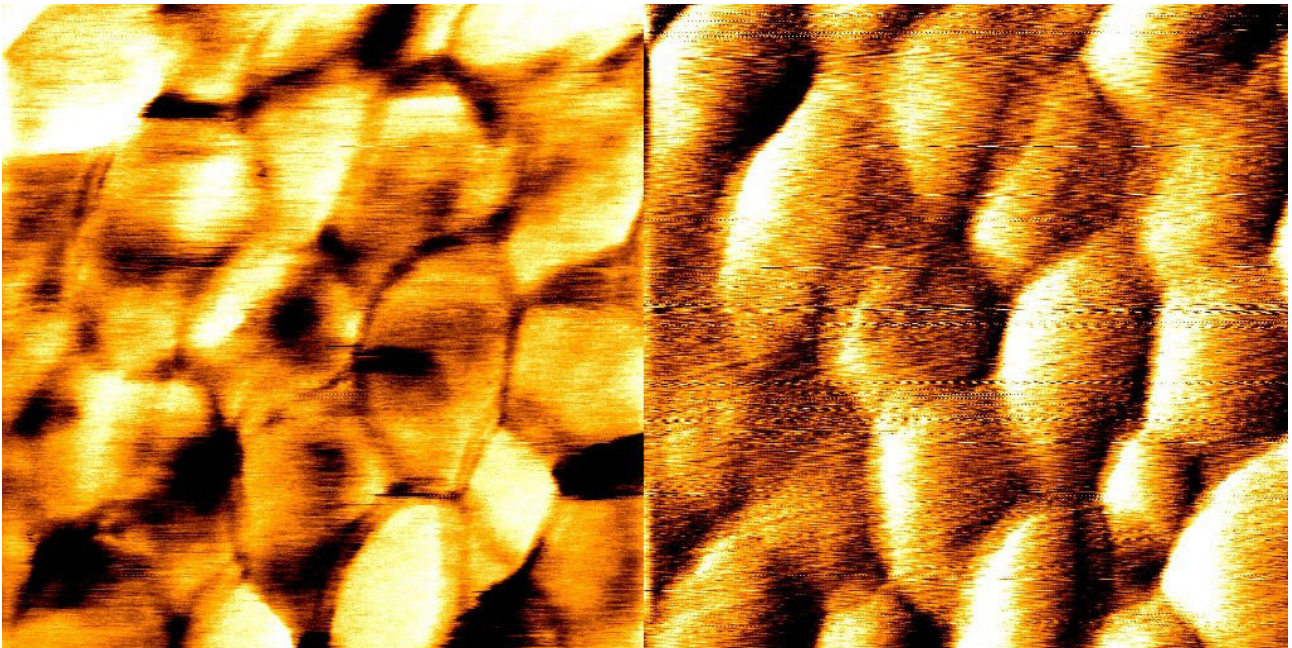
Εικόνα 4.23: Εικόνες δείγματος μίκας-πολυστυρένιου, μέγεθος των φωτογραφιών είναι 2.25 μm x 2.25 μm



Εικόνα 4.24: Εικόνες δείγματος μίκας-πολυστυρένιου, μέγεθος των φωτογραφιών είναι 2 μm x 2 μm



Εικόνα 4.25: Εικόνες δείγματος μίκας-πολυστυρένιου, μέγεθος των φωτογραφιών είναι 1 μm x 1 μm



Εικόνα 4.26: Εικόνες δείγματος μίκας-πολυστυρένιου, μέγεθος των φωτογραφιών είναι 0.5 μm x 0.5 μm

4.5 Συμπεράσματα

Σε γενικές γραμμές στη μέθοδο απεικόνισης επαφής του AFM, παρατηρήθηκαν μέτρια αποτελέσματα στην απεικόνιση των δειγμάτων, ιδιαίτερα όταν το υπόστρωμα ήταν με πολυστυρένιο. Στις εικόνες 4.2-4.5 το AFM αποδίδει σχετικά καλά στην απεικόνιση του σκληρού υποστρώματος με το κολλαγόνο. Στο πολυστυρένιο όμως (φωτογραφία 4.13) η πολύπλοκη τοπογραφία του δείγματος, καθώς και η ευκαμψία και η ευμεταβλησία θέσης των σφαιρών πολυστυρενίου οδηγεί το AFM να δημιουργεί εικόνες με υπερβολικά πολλά παράσιτα λόγω του θερμικού drift. Ταυτόχρονα, η μείωση του ρυθμού σάρωσης δημιουργεί μεγαλύτερο χρονικό ορίζοντα στο να επηρεαστεί η ακίδα από τις άσχημες συνθήκες που επικρατούν κατά την απεικόνιση του δείγματος. Αντιθέτως τα αποτελέσματα της χρήσης της παλλόμενης μεθόδου στην απεικόνιση δειγμάτων είναι πολύ καλύτερα, εξού και ο λόγος που αποτελούν την πλειονότητα των φωτογραφιών στα πειράματα που διεξήχθησαν. Δομές ινιδίων κολλαγόνου παρατηρούνται πολύ ευδιάκριτα στις φωτογραφίες 4.6 και 4.14-4.16, ενώ στην 4.13 αντίστοιχα φαίνεται η προσρόφηση κολλαγόνου υπό γωνία σε μία άκρη της τριπλής έλικας, όπως είχε υποθετηθεί από τους Michel Deyme et al[1]. Ιδιαίτερα στη περίπτωση της μίκας με το πολυστυρένιο τα αποτελέσματα είναι εντυπωσιακά, με τις εικόνες 4.17-4.22 να αναπαριστούν σχεδόν τέλεια την εξαγωνική συστοιχία που λαμβάνουν οι σφαίρες πολυστυρένιου όπως υποτέθηκε στο προηγούμενο κεφάλαιο, ενώ οι ατέλειες που δημιουργούνται είναι ελάχιστες και κυρίως στην αρχή ή το τέλος της εικόνας, καθώς η ακίδα του AFM είναι λιγότερο ευπαθής σε ανεπαίσθητες κινήσεις του AFM στο tapping mode. Επίσης, στα πειράματα παρατηρήθηκε ότι ο χαμηλότερος λήψης φωτογραφιών οδηγεί φωτογραφίες με υψηλή ευκρίνεια και λιγότερα παράσιτα, όπως στις 4.8 και 4.15-4.16, και αποτελεί έναν αντιστρόφως ανάλογο παράγοντα στη διάρκεια λήψης φωτογραφιών, ενώ αντίθετα παίζει αρνητικό ρόλο σε φωτογραφίες με μη ιδανικές συνθήκες απεικόνισης-δείγματος, και έτσι υποκύπτουν σε drift της ακίδας του AFM (εικόνα 4.17).

4.6 Βιβλιογραφία

[1] Michel Deyme, Adam Baszkin, Jacques Emile Proust, Eric Perez, and Marie Martine Boissonnade, "Collagen at interfaces I. In situ collagen adsorption at solution/air and solution/polymer interfaces." (1986), Journal of Biomedical Materials Research vol 20(7): p. 951