

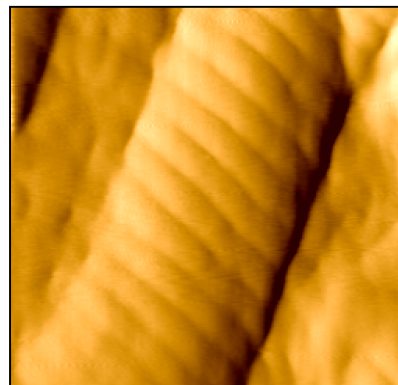


ΕΘΝΙΚΟ ΜΕΤΣΟΒΙΟ ΠΟΛΥΤΕΧΝΕΙΟ



ΕΘΝΙΚΟ ΜΕΤΣΟΒΙΟ ΠΟΛΥΤΕΧΝΕΙΟ  
ΣΧΟΛΗ ΗΛΕΚΤΡΟΛΟΓΩΝ ΜΗΧΑΝΙΚΩΝ ΚΑΙ  
ΜΗΧΑΝΙΚΩΝ ΥΠΟΛΟΓΙΣΤΩΝ

*«Μελέτη ινών κολλαγόνου σε νανοκλίμακα υπό την επίδραση  
laser χαμηλής ισχύος στην περιοχή του ερυθρού»*



ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ

Στεριώτης Γρηγόρης

Επιβλέπουσα: Διδώ Γιόβα  
Καθηγήτρια Ε.Μ.Π.

Αθήνα, Ιούλιος 2014

## Ευχαριστίες

Ευχαριστώ θερμά την καθηγήτρια κυρία Διδώ Γιόβα, η οποία μου έδωσε την ευκαιρία να εργαστώ και να συνεργαστώ στο Εργαστήριο Βιοϊατρικής Οπτικής και Εφαρμοσμένης Βιοφυσικής και μου εμπιστεύτηκε την περάτωση αυτής της εργασίας.

Ευχαριστώ θερμά τους υποψήφιους διδάκτορες Στυλιανό Βασίλειο Κοντομάρη και Κυριακή Σαμπάνη, για την άψογη συνεργασία, καθώς και την καθοδήγηση και τη στήριξή τους ανελλιπώς καθ' όλη τη διάρκεια της εκπόνησης της εργασίας.

Ευχαριστώ θερμά όλους τους εργαζόμενους στο Εργαστήριο, που με καλωσόρισαν και με τη φιλική τους συμπεριφορά συνέβαλαν στην ευχάριστη εμπειρία της εκπόνησης αυτής της εργασίας.

# Περιεχόμενα

Ευχαριστίες.....	2
Πρόλογος.....	5
1.1 Κολλαγόνο .....	6
1.2 Χημική σύσταση .....	9
1.2.1 Πρωτεΐνες.....	9
1.2.2 Αμινοξέα .....	9
1.2.3 Πολυπεπτιδική αλυσίδα .....	10
1.3 Τα τέσσερα δομικά επίπεδα του κολλαγόνου.....	11
1.3.1 Πρωτοταγής δομή .....	11
1.3.2 Δευτεροταγής δομή.....	12
1.3.3 Τριτοταγής δομή.....	13
1.3.4 Τεταρτοταγής δομή .....	16
1.4 Δημιουργία του κολλαγόνου .....	17
1.5 Η σταθερότητα της έλικας του κολλαγόνου.....	21
1.6 Σταυροδεσμοί κολλαγόνου .....	22
1.7 Βιβλιογραφία .....	24
2.1 Μικροσκόπιο Ατομικής Δύναμης AFM.....	26
2.2 Διάταξη Μικροσκοπίου Ατομικής Δύναμης.....	28
2.3 Αρχή λειτουργίας AFM .....	30
2.4 Τρόποι λειτουργίας μικροσκοπίου AFM .....	31
2.5 Μέθοδοι Απεικόνισης AFM .....	33
2.5.1 Μέθοδος Επαφής (Contact mode) .....	33
2.5.2 Μέθοδος ενδιάμεσης παλλόμενης επαφής (Tapping mode).....	34
2.6 Απεικονιστική μικροσκοπία AFM για μελέτη κολλαγόνου .....	35
2.6.1 Ιστορική αναδρομή.....	35
2.6.2 Μελέτη του κολλαγόνου με μικροσκοπία ατομικής δύναμης .....	35
2.7 Μελέτη τοπογραφίας και μηχανικών ιδιοτήτων μορίου κολλαγόνου .....	37
2.8 Βιβλιογραφία .....	38
3.1 Στατιστική σημαντικότητα πειραματικών αποτελεσμάτων .....	41
4.1 Πειραματική Διαδικασία .....	46
4.1.1 Ομογενοποίηση.....	46
4.1.2 Επεξεργασία της βάσης του δείγματος .....	46

4.1.3 Τοποθέτηση και περιστροφή δείγματος στη συσκευή φυγόκεντρης επίστρωσης (spin coater) .....	47
4.1.4 Ακτινοβολήση με LASER.....	48
4.1.5 Απεικόνιση στο AFM.....	51
4.1.6 Επεξεργασία εικόνων AFM .....	52
4.2 Πείραμα διακριτών δόσεων ακτινοβολήσης μικρής χρονικής διάρκειας.....	53
4.3 Πείραμα διακριτών δόσεων ακτινοβολήσης μεγάλης χρονικής διάρκειας.....	73
4.4 Πείραμα συνεχούς ακτινοβολήσης.....	78
4.5 Διαδικασία μετρήσεων και χρήση λογισμικού .....	90
4.6 Βιβλιογραφία .....	95
4.7 Συμπεράσματα.....	96

## Πρόλογος

Οι μη επεμβατικές θεραπείες χρησιμοποιούνται ολοένα και περισσότερο τα τελευταία χρόνια σε πολλούς τομείς της ιατρικής, όπως στην επούλωση των πληγών και στην εξαφάνιση των ρυτίδων. Μια πολλά υποσχόμενη μη επεμβατική θεραπεία για ασθένειες του δέρματος είναι η θεραπεία με κόκκινο φως. Έχει αναφερθεί ότι το κόκκινο και το υπέρυθρο φως έχει θεραπευτικές επιδράσεις στο ανθρώπινο δέρμα. Συγκεκριμένα, έχει αποδειχθεί ότι το κόκκινο φως έχει όχι μόνο αντιφλεγμονώδη και αναλγητικά αποτελέσματα στο ανθρώπινο δέρμα, αλλά επίσης βοηθά την αναγεννητική ικανότητα των ιστών. Ως πηγή του κόκκινου φωτός χρησιμοποιούνται lasers με εκπομπή ακτινοβολίας χαμηλής ισχύος. Παρά το γεγονός ότι οι θεραπευτικές επιδράσεις με laser χαμηλής ισχύος για πρώτη φορά καταγράφηκαν περίπου πριν από 50 χρόνια (1960 δεκαετία), εφαρμόστηκε στον τομέα της δερματολογίας μόλις πρόσφατα. Ως εκ τούτου, αυτή η νέα, πολλά υποσχόμενη στον τομέα της ιατρικής, θεραπεία χρησιμοποιείται ολοένα και περισσότερο.

Οι θετικές επιδράσεις της θεραπείας έχουν οδηγήσει τους ερευνητές στο να προσπαθήσουν να καθορίσουν τις βέλτιστες συνθήκες και παραμέτρους για πιο αποτελεσματική χρήση του laser χαμηλής ισχύος. Ωστόσο η αποδοχή της βιοδιέγερσης σε κλινικό επίπεδο δεν είναι ακόμα διαδεδομένη καθώς δεν είναι γνωστοί οι μηχανισμοί δράσης του φωτός σε κυτταρικό και μοριακό επίπεδο. Παρόλο που αρκετές πειραματικές μελέτες έχουν προσπαθήσει να περιγράψουν τα αποτελέσματα της επίδρασης του laser χαμηλής ισχύος μεταβάλλοντας διάφορες παραμέτρους με στόχο τη βελτιστοποίηση της διαδικασίας επούλωσης πληγών, ο μηχανισμός δράσης του laser δεν έχει πλήρως αποσαφηνιστεί, ενώ η επίδραση του σε επιμέρους στοιχεία του ιστού, όπως το κολλαγόνο είναι ακόμα υπό διερεύνηση. Σκοπός, λοιπόν, της διπλωματικής εργασίας είναι η διερεύνηση της επίδρασης της ακτινοβολίας laser χαμηλής ισχύος στην περιοχή του ερυθρού, σε ίνες κολλαγόνου.

## 1.1 Κολλαγόνο

Το κολλαγόνο είναι μια πρωτεΐνη, που ισοδυναμεί με το 1/4 της συνολικής πρωτεΐνης που υπάρχει στο σώμα μας, ενώ το ποσοστό αυτό αγγίζει το 75% όσον αφορά το δέρμα. Βρίσκεται σε ολόκληρο το ανθρώπινο σώμα: οστά, χόνδροι, σύνδεσμοι, αιμοφόρα αγγεία, δέρμα. Είναι ένα πρωτεύον συστατικό στο συνδετικό ιστό και δρα σαν το κύριο πλέγμα στήριξης του σώματος, υπάρχει σε όλα σχεδόν τα όργανα και χρησιμεύει για να συγκρατεί τα κύτταρα σε ευδιάκριτες λειτουργικές κυτταρικές ομάδες και είναι η βασική πρωτεΐνη στο σώμα που εξασφαλίζει την ελαστικότητα και την αναγέννηση του δέρματος, των χόνδρων και των οστών. Εκτός αυτών, αποτελεί ένα απαραίτητο συστατικό για την αναγέννηση κατεστραμμένων ιστών και τη συνεχή ανανέωση των κυττάρων του δέρματος. Το κολλαγόνο λοιπόν, ανήκει σε μια οικογένεια ινωδών εξωκυτταρικών πρωτεϊνών, που εμφανίζεται σε όλους τους πολυκύτταρους οργανισμούς κυρίως ως δομικό συστατικό. Λόγω αυτής της αφθονίας του στον ανθρώπινο οργανισμό, το κολλαγόνο έχει χρησιμοποιηθεί σαν μια θεραπευτική βοήθεια σε ασθενείς με εγκαύματα, για αποκατάσταση οστών και μια ποικιλία οδοντιατρικών, ορθοπεδικών και χειρουργικών επεμβάσεων. Το κολλαγόνο που χρησιμοποιείται για ιατρικούς σκοπούς προέρχεται κυρίως από νεαρά βόδια, γουρούνια ή και άνθρωπο σε μερικές περιπτώσεις. Πολλές είναι και οι βιομηχανικές χρήσεις του κολλαγόνου και της ζελατίνης που παράγεται από αυτό αν θερμανθεί, κυρίως σε φαρμακευτικές και κοσμητικές βιομηχανίες.

Το κολλαγόνο αποτελείται από τρεις πολυπεπτιδικές αλυσίδες ίδιου μεγέθους και έχει δομή ελικομένης ράβδου. Κάθε μια από τις πολυπεπτιδικές αλυσίδες έχει μια ελικοειδή διαμόρφωση. Επίσης οι τρεις ελικοειδείς αλυσίδες τυλίγονται η μια γύρω από την άλλη σχηματίζοντας ένα άκαμπτο καλώδιο, το μόριο δηλαδή του κολλαγόνου. Η βασική δομική μονάδα του κολλαγόνου είναι το τροποκολλαγόνο. Πρόκειται για μια από τις πιο επιμήκεις γνωστές πρωτεΐνες. Το κολλαγόνο εμφανίζει την ιδιότητα να σχηματίζει αδιάλυτες ίνες με ιδιαίτερη αντοχή στον εφελκυσμό. Η ανθεκτικότητα του κολλαγόνου είναι πράγματι αξιοσημείωτη, αφού χρειάζεται φορτίο τουλάχιστον 10 κιλών για να σπάσει μια ίνα διαμέτρου 1mm.

Μέχρι σήμερα έχουν προσδιοριστεί περίπου 29 τύποι κολλαγόνου, οι οποίοι κωδικοποιούνται από 20 τουλάχιστον γονίδια. Η ποικιλία αυτή υπάρχει λόγω του πλήθους των δομικών ρόλων που κατέχει. Επίσης, το κολλαγόνο δημιουργεί σχηματισμούς σαν ιμάντες στους τένοντες και στους συνδέσμους, πυκνές επιφάνειες

στο δέρμα και σκελετικά πλαίσια που ενισχύονται με ασβέστιο στα οστά και τα δόντια και πολλές άλλες δομές υποστήριξης σε ολόκληρο το σώμα. Η ανθεκτικότητα του κολλαγόνου είναι πράγματι αξιοσημείωτη, αφού χρειάζεται φορτίο τουλάχιστον 10 κιλών για να σπάσει μια ίνα διαμέτρου 1mm. Μπορούν σχεδόν όλοι οι τύποι κολλαγόνου σύμφωνα με τα δομικά χαρακτηριστικά τους να διαχωριστούν σε μεγαλύτερες κατηγορίες<sup>[1,2]</sup>, δηλαδή σε:

- Μεγάλες ίνες (τύποι I, II, III, V, XI)
- Μικρο – ίνες (τύπος VI)
- Δίκτυα ινών (τύποι IV, VIII, X)
- Σταθερές ίνες (τύπος VII)

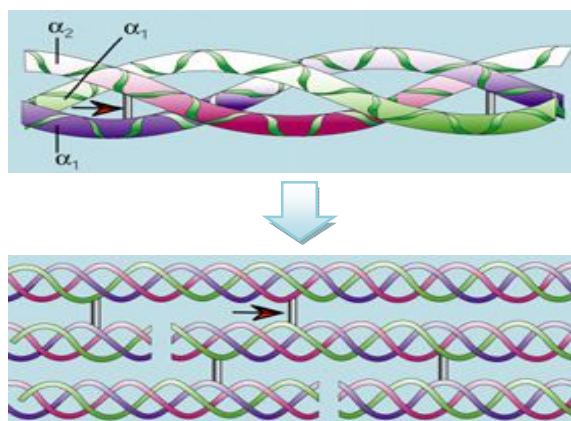
Στον Πίνακα 1.1 φαίνονται μερικοί τύποι κολλαγόνου, οι ιστοί στους οποίους βρίσκονται και οι διαταραχές που προκαλούν στον ανθρώπινο οργανισμό.

ΤΥΠΟΣ	ΣΥΝΘΕΣΗ	ΙΣΤΟΣ	ΔΙΑΤΑΡΑΧΕΣ
I	$(\alpha 1(I))_2\alpha 2(I),(\alpha 1(I))_3$	Τένοντες, οστά, κερατοειδής, δέρμα, αρτηρίες, δόντια, όργανα	Ατελής Οστεογένεση
II	$(\alpha(II))_3$	Αρθρικοί και ινώδη χόνδροι	Δυσπλασία στους χόνδρους
III	$(\alpha(III))_3$	Αορτή, αγγεία, δέρμα, έντερο, πνεύμονας, μήτρα	Σύνδρομο EDS (Vascular)
IV	$(\alpha 1(IV))_2\alpha 2(IV)$	Βασικές μεμβράνες (οφθαλμοί και νεφρά)	Σύνδρομο Alport
V	$\alpha 1(V)\alpha 2(V)\alpha 3(V), (\alpha 1(V))_3$	Κερατοειδής, πλακούντας, έντερο, οστά, Αιμοφόρα αγγεία, δέρμα	Σύνδρομο EDS (classical)
VI	$\alpha 1(VI)\alpha 2(VI)\alpha 3(VI)$	Πλακούντας, δέρμα, καρδιά	Μυοπάθεια
VII	$(\alpha 1(VII))_3$	Δέρμα, επιθήλια	Επιδερμικές αλλοιώσεις
VIII	$\alpha 1(VIII)\alpha 2(VIII)$	Οφθαλμοί	Περιπλοκή κερατοειδή
IX	$\alpha 1(IX)\alpha 2(IX)\alpha 3(IX)$	Αρθρικοί χόνδροι, οφθαλμοί, μεσοσπονδύλιοι δίσκοι	Σύνδρομο Menkes
X	$(\alpha 1(X))_3$	Υπερτροφικοί χόνδροι, ούλα	Δυσπλασία στους χόνδρους
XI	$\alpha 1(XI)\alpha 2(XI)\alpha 3(XI)$	Αρθρικοί χόνδροι, οστά, μεσοσπονδύλιοι δίσκοι	Χαλάρωση αρθρώσεων
XII	$(\alpha 1(XII))_3$	Τένοντες, δέρμα	Ρευματοειδή αρθρίτιδα
XIII	$\alpha 1(XIII)$	Επιδερμίδα, πλακούντας, οστά, χόνδροι, μύες	Δερματικές αλλοιώσεις και Μυοσκελετικές ανωμαλίες

**Πίνακας 1.1 Διάφοροι τύποι κολλαγόνου**

Το κολλαγόνο τύπου I, το οποίο είναι το πιο κοινό αποτελείται από 3 πολυπεπτιδικές αλυσίδες του ίδιου μήκους: δύο ίδιες  $\alpha_1(I)$  και μια ομόλογη με αυτές  $\alpha_2(I)$ . Επομένως, ο μοριακός τύπος του μπορεί να παρασταθεί σαν  $\alpha_1(I)_2 \alpha_2(I)$ . Είναι υπεύθυνο για την επούλωση ιστών και βρίσκεται στους τένοντες, στις μυϊκές ίνες και στα οστά. Αρκετά ανθρώπινα γονίδια είναι υπεύθυνα για την παραγωγή συστατικών που συνθέτουν το κολλαγόνο. Ένα από αυτά είναι το *COL1A1* (*collagen, type I, alpha 1*), το οποίο παράγει ένα συστατικό του κολλαγόνου τύπου I, που ονομάζεται *αλυσίδα προ-άλφα 1 (I)*. Αυτή η αλυσίδα συνδυάζεται με μια άλλη *αλυσίδα προ-άλφα 1 (I)* και με μια *αλυσίδα προ-άλφα 2 (I)* για να κάνουν το μόριο του *προκολλαγόνου τύπου I*.<sup>[3,6,12,16,18,22]</sup>

Αυτή η τριπλή δομή του μοριακού προκολλαγόνου πρέπει να υποστεί διεργασία από ένζυμα έξω από το κύτταρο. Όταν ολοκληρωθεί αυτή η διεργασία τα μόρια αυτά αυτό-οργανώνονται σε μακριά, λεπτά ινίδια μέσω σταυροδεσμών στο χώρο μεταξύ των κυττάρων. Αυτοί οι σταυροδεσμοί είναι η αιτία για τη μεγάλη ανθεκτικότητα των ινών κολλαγόνου τύπου I.



**Εικόνα 1.1** Δημιουργία προκολλαγόνου από τις πολυπεπτιδικές αλυσίδες

Το γονίδιο *COL1A1* βρίσκεται στο χρωμοσόμο 17 και ανωμαλία σε αυτό ή μετάλλαξη είναι υπεύθυνη για διάφορες διαταραχές στον ανθρώπινο οργανισμό, όπως φαίνονται και στον Πίνακα 1. Μερικές ασθένειες είναι το σύνδρομο Ehlers-Danlos (EDS) κλασικός τύπος, το EDS Arthrochalasia και η Ατελής Οστεογένεση. Οι ασθένειες αυτές τονίζουν τη σημαντικότητα του κολλαγόνου τύπου I για περαιτέρω μελέτη.

Άλλοι τύποι κολλαγόνου έχουν και τις τρεις αλυσίδες της δομικής τους αλυσίδας ίδιες και μπορούν να αναπαρασταθούν σαν  $\alpha_1(II)_3$ ,  $\alpha_1(III)_3$ ,  $\alpha_1(IV)_3$ .



## 1.2 Χημική σύσταση

### 1.2.1 Πρωτεΐνες

Η χημική σύσταση των πρωτεϊνών είναι απλή. Οι πρωτεΐνες είναι βιοπολυμερή των μονομερών α-αμινοξέων (ή L-α-αμινοξέων όπως αναφέρονται σε κάποια βιβλιογραφία) , ο αριθμός των οποίων σε ένα μόριο ποικίλλει από μερικές εκατοντάδες μέχρι μερικές χιλιάδες. Οι πρωτεΐνες δομούνται από 20 μόνο φυσικά α-αμινοξέα αλλά οι συνδυασμοί αυτών παρέχουν ένα τεράστιο αριθμό πρωτεϊνικών μορίων. Για παράδειγμα αν υποθέσουμε ότι περιοριζόμαστε σε πολυπεπτιδικές αλυσίδες, που αποτελούνται μόνο από 100 αμινοξικά κατάλοιπα , έναν αριθμό σχετικά μικρό για μια πραγματική πρωτεΐνη, κάθε κατάλοιπο μπορεί να επιλεγεί κατά 20 διαφορετικούς τρόπους, όσα και τα α-αμινοξέα. Έτσι  $20^{100}$  διαφορετικά είδη πρωτεϊνικών μορίων αυτού του μεγέθους μπορούν να δημιουργηθούν.

### 1.2.2 Αμινοξέα

Τα αμινοξέα είναι οργανικές ενώσεις οι οποίες έχουν όλες την ίδια γενική δομή. Ένα κεντρικό άτομο άνθρακα C συνδέεται με 4 διαφορετικά άτομα ή ομάδες ατόμων. Οι ομάδες αυτές είναι:

- 1) Ένα άτομο υδρογόνου (-H )
- 2) Μια καρβοξυλομάδα (-COOH)
- 3) Μια αμινομάδα (-NH<sub>2</sub>)
- 4) Και μια από 20 διαφορετικές πλευρικές αλυσίδες διαφόρων χημικών τύπων (-R)

Εάν συνδεθούν η αμινομάδα ενός αμινοξέος με την καρβοξυλομάδα ενός άλλου, τότε δημιουργείται δεσμός μεταξύ των δύο αμινοξέων. Ο δεσμός αυτός μεταξύ δυο αμινοξέων ονομάζεται πεπτιδικός δεσμός και δημιουργείται ύστερα από την αντίδραση της αμινομάδας ενός αμινοξέος με την καρβοξυλομάδα ενός άλλου. Η ομάδα C<sub>a</sub>-CO-NH-C<sub>a</sub> ονομάζεται πεπτιδική ομάδα.

Το μόριο που προκύπτει ονομάζεται δι-πεπτίδιο και τα μέρη του που δημιουργούνται από τα αρχικά αμινοξέα με τις χαρακτηριστικές τους πλευρικές αλυσίδες R και R<sub>2</sub> ονομάζονται αμινοξικά κατάλοιπα. Με τον τρόπο αυτό σχηματίζονται οι πεπτιδικές αλυσίδες (πολυπεπτιδικές αλυσίδες) οι οποίες στη συνέχεια συνδέονται κατάλληλα προκειμένου να δημιουργήσουν τα πρωτεϊνικά μόρια. [5,11,15,21]



**Εικόνα 1.2** Δομή αμινοξέων

### 1.2.3 Πολυπεπτιδική αλυσίδα

Μια πολυπεπτιδική αλυσίδα έχει κατεύθυνση αφού έχει διαφορετικά άκρα. Από το ένα άκρο είναι η αμινική ομάδα και από το άλλο η καρβοξυλική ομάδα. Αρχή της πολυπεπτιδικής αλυσίδας θεωρείται κατά συνθήκη η αμινική ομάδα. Η πολυπεπτιδική αλυσίδα αποτελείται από ένα επαναλαμβανόμενο μέρος που αποτελεί την κύρια αλυσίδα και από ένα μεταβλητό μέρος, τις χαρακτηριστικές πλευρικές αλυσίδες ή ομάδες των αμινοξικών καταλοίπων. Οι πρωτεΐνες μπορούν να αποτελούνται από μία, δύο η και περισσότερες πολυπεπτιδικές αλυσίδες ίδιες η διαφορετικές μεταξύ τους.

## 1.3 Τα τέσσερα δομικά επίπεδα του κολλαγόνου

Οι πρωτεΐνες κατατάσσονται σε τέσσερα επίπεδα δομικής οργάνωσης. Παρακάτω παρουσιάζεται ξεχωριστά το κάθε επίπεδο για το μόριο του κολλαγόνου.

### 1.3.1 Πρωτοταγής δομή

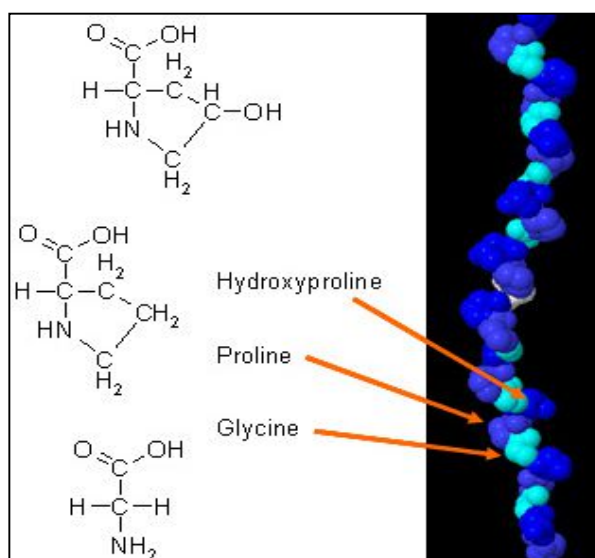
Αναφέρεται στο γραμμικό αριθμό και τη διάταξη των παρόντων αμινοξέων, δηλαδή στην διάταξη των αμινοξέων σε μια πολυπεπτιδική αλυσίδα και επομένως εδώ μιλάμε για την αλληλουχία αμινοξέων στο κολλαγόνο.

Στο κολλαγόνο το κάθε τρίτο αμινοξύ είναι γλυκίνη και πολύ συχνά εμφανίζεται η αλληλουχία γλυκίνη-προλίνη/λυσίνη-υδροξυπρολίνη/υδροξυλυσίνη. Δηλαδή η πρωτοταγής δομή είναι  $(\text{Γλυ}-\text{X}-\text{Y})_n$ , όπου X μπορεί να είναι προλίνη ή λυσίνη και Y υδροξυπρολίνη ή υδροξυλυσίνη, αντίστοιχα. Η γραμμική διάταξη των αμινοξέων σε μια πολυπεπτιδική αλυσίδα και συνεπώς η αλληλουχία των αμινοξέων στο κολλαγόνο, αποδεικνύουν την πρωτοταγή δομή του. Στο κολλαγόνο το κάθε τρίτο αμινοξύ είναι γλυκίνη και συχνά εμφανίζεται η αλληλουχία:

- γλυκίνη (-Γλυ-) -
- προλίνη ή λυσίνη (-X-) -
- υδροξυπρολίνη ή υδροξυλυσίνη (-Y-) -

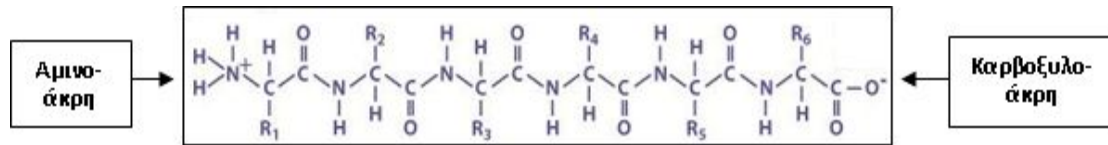
Δηλαδή η πρωτοταγής δομή είναι:

... - Γλυ - X - Y - Γλυ - X - Y - ...



Εικόνα 1.3 Πρωτοταγής δομή κολλαγόνου

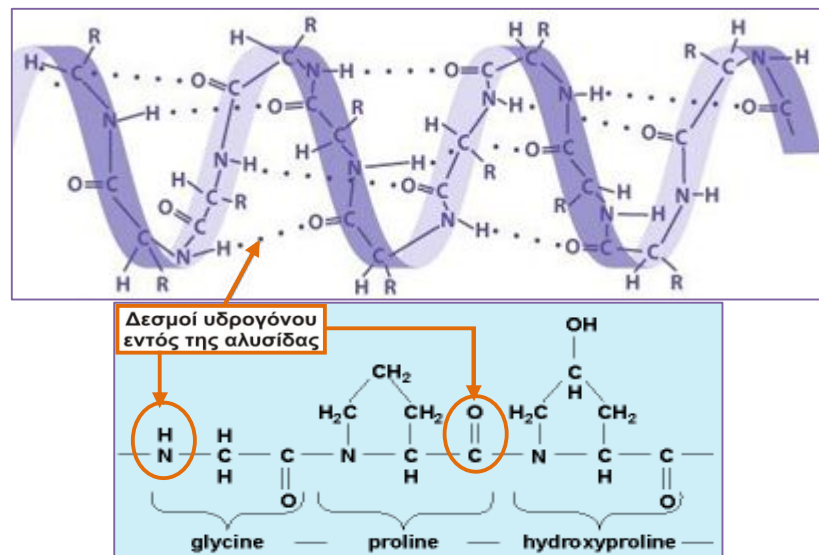
Η δομή αυτή χαρακτηρίζεται από το υψηλό ποσοστό της γλυκίνης που αποτελεί το 1/3 όλων των αμινοξέων και της προλίνης που αποτελεί το 22% περίπου του μορίου (11% προλίνη και 11% υδροξυπρολίνη).



Εικόνα 1.4 Αλληλουχία αμινοξέων (... - Γλυ - X - Υ - ...)

### 1.3.2 Δευτεροταγής δομή

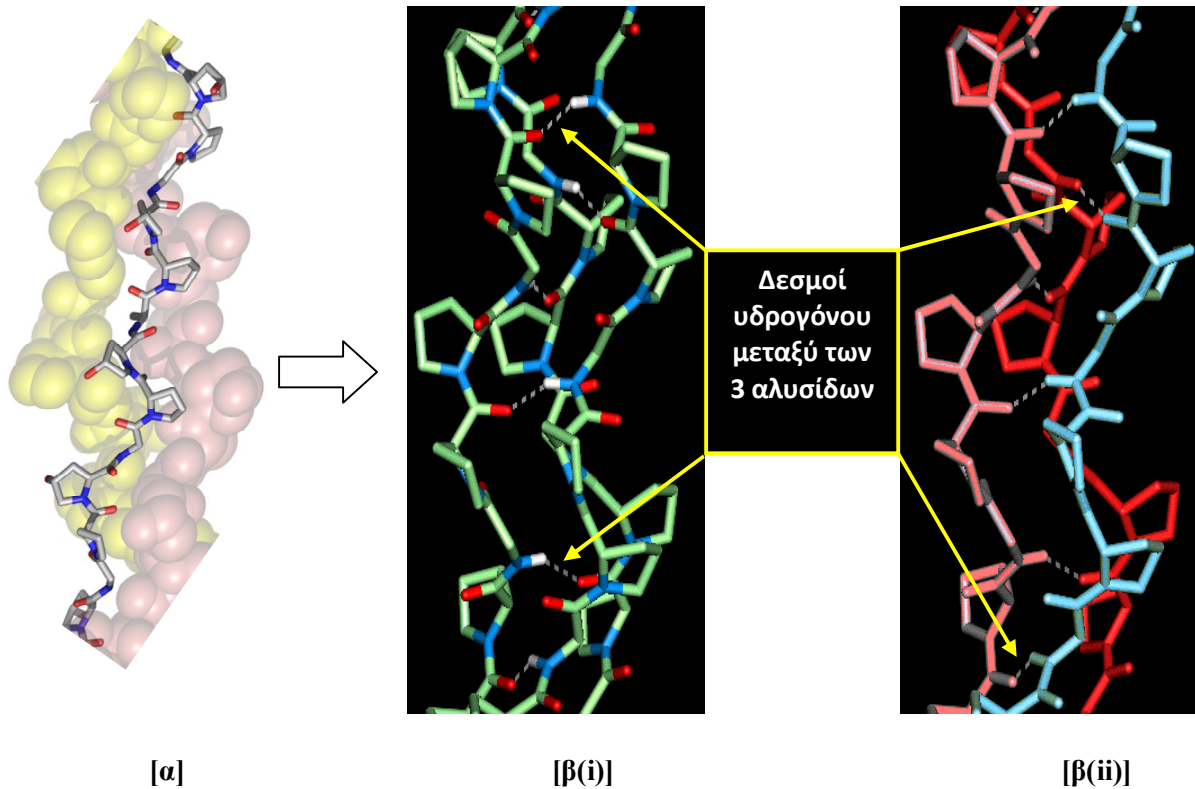
Η χωρική αναδίπλωση των πεπτιδίων του κολλαγόνου, έτσι ώστε να σταθεροποιούνται οι αλληλεπιδράσεις μέσω της δημιουργίας σπονδυλωτής πολυπεπτιδικής στερεοδομής αποτελεί τη δευτεροταγή δομή του. Η δομή αυτή χαρακτηρίζεται από τις γωνίες ενδίπλωσης μεταξύ των πεπτιδίων, ενώ για να συντηρείται η αναδίπλωση είναι απαραίτητη και η σύνδεση στο εσωτερικό της αλυσίδας με τη δημιουργία δεσμών υδρογόνου. Δότες υδρογόνου είναι οι ομάδες NH της γλυκίνης και δέκτες οι ομάδες C=O της προλίνης ή άλλου αμινοξέος. <sup>[14,18,21]</sup>



Εικόνα 1.5 Δευτεροταγής δομή κολλαγόνου

### 1.3.3 Τριτοταγής δομή

Η τριτοταγής δομή αναφέρεται σε συγκεκριμένη συμπαγή στερεοδιάταξη ολόκληρης της πολυπεπτιδικής αλυσίδας και περιλαμβάνει τη χωρική σχέση μεταξύ των δευτεροταγών δομών στην τρισδιάστατη μορφή των πολυπεπτιδικών αλυσίδων της συγκεκριμένης πρωτεΐνης. Για το κολλαγόνο η τριτοταγής δομή συνίσταται στην τριπλή έλικα των πολυπεπτιδικών αλυσίδων που είναι διατεταγμένες με τέτοιο τρόπο ώστε να δημιουργείται το μόριο κολλαγόνου σχήματος ράβδου. Η βασική δομική μονάδα του κολλαγόνου είναι το τροποκολλαγόνο το οποίο και έχει μοριακή μάζα 285.000 περίπου. Θερμοδυναμικές μελέτες και μελέτες με το ηλεκτρονικό μικροσκόπιο έδειξαν ότι το τροποκολλαγόνο έχει σχήμα ράβδου μήκους 3.000 και διαμέτρου 15 Å. Το τροποκολλαγόνο αποτελείται από τρεις πολυπεπτιδικές αλυσίδες ίδιου μεγέθους των οποίων η σύνθεση εξαρτάται από τον τύπο του κολλαγόνου. Πρόκειται για μια από τις πιο επιμήκεις γνωστές πρωτεΐνες της οποίας κάθε μια από τις τρεις πολυπεπτιδικές αλυσίδες έχει ελικοειδή διαμόρφωση. Οι τρεις ελικοειδείς αλυσίδες τυλίγονται η μια γύρω από την άλλη σχηματίζοντας ένα άκαμπτο υπερελικόμενο καλώδιο. Το βήμα της υπερέλικας είναι 0.29 nm και ο αριθμός των αμινοξέων ανά στροφή είναι 3. Μεταξύ των τριών αλυσίδων δημιουργούνται δεσμοί υδρογόνου. Δότες υδρογόνου είναι οι ομάδες NH της γλυκίνης της μιας αλυσίδας και δέκτες οι ομάδες CO των αμινοξέων της άλλης αλυσίδας. Η κατεύθυνση των δεσμών υδρογόνου είναι κάθετη στον κεντρικό άξονα της ράβδου του τροποκολλαγόνου.



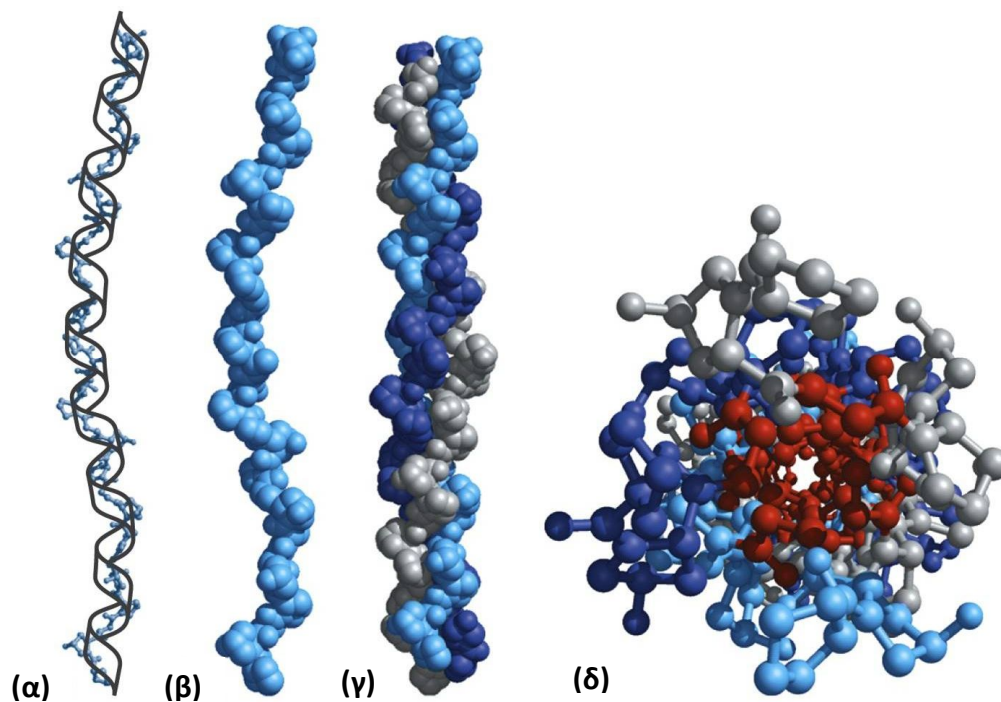
**Εικόνα 1.6** Τριτοταγής δομή του κολλαγόνου

*[α]* Μια πολυπεπτιδική αλυσίδα (με κόκκινο χρώμα χαρακτηρίζεται η γλυκίνη)

*[β(i)]* Οι 3 πολυπεπτιδικές αλυσίδες συγκρατούνται με δεσμούς υδρογόνου, που αναπτύσσονται μεταξύ μιας ομάδας NH της γλυκίνης της μια αλυσίδας και της ομάδας C=O της προλίνης της άλλης αλυσίδας, κρατούν σταθερή την τριπλή έλικα του κολλαγόνου

*[β(ii)]* Κάθε πολυπεπτιδική αλυσίδα επισημαίνεται με διαφορετικό χρώμα, για να γίνει εμφανής η υπερελικομένη δομή που δημιουργούν και καλείται τριπλή έλικα.

Ο τρόπος κατασκευής της τριπλής έλικας εξηγεί την ύπαρξη της γλυκίνης ανά τρία αμινοξέα. Κάθε τρίτο αμινοξύ πρέπει να είναι η γλυκίνη διότι στο εσωτερικό της έλικας δεν υπάρχει αρκετός χώρος για τους ογκώδεις δακτυλίους της προλίνης και της υδροξυπρολίνης. Αυτή η απλότητα είναι το πλεονέκτημα για τη δομή της πρωτεΐνης. Η γλυκίνη είναι λοιπόν ένα πολύ σημαντικό αμινοξύ ακριβώς επειδή καταλαμβάνει πολύ μικρό χώρο, επιτρέποντας στις πολυπεπτιδικές αλυσίδες να πλησιάσουν πολύ κοντά η μία στην άλλη, προσδίδοντας έτσι την ιδιότητα της ανθεκτικότητας



**Εικόνα 1.7** Χωρική απεικόνιση τριτοταγής δομής κολλαγόνου

*α) Διαμόρφωση μιας πολυπεπτιδικής έλικας*

*β) Χωρική δομή της πολυπεπτιδικής έλικας*

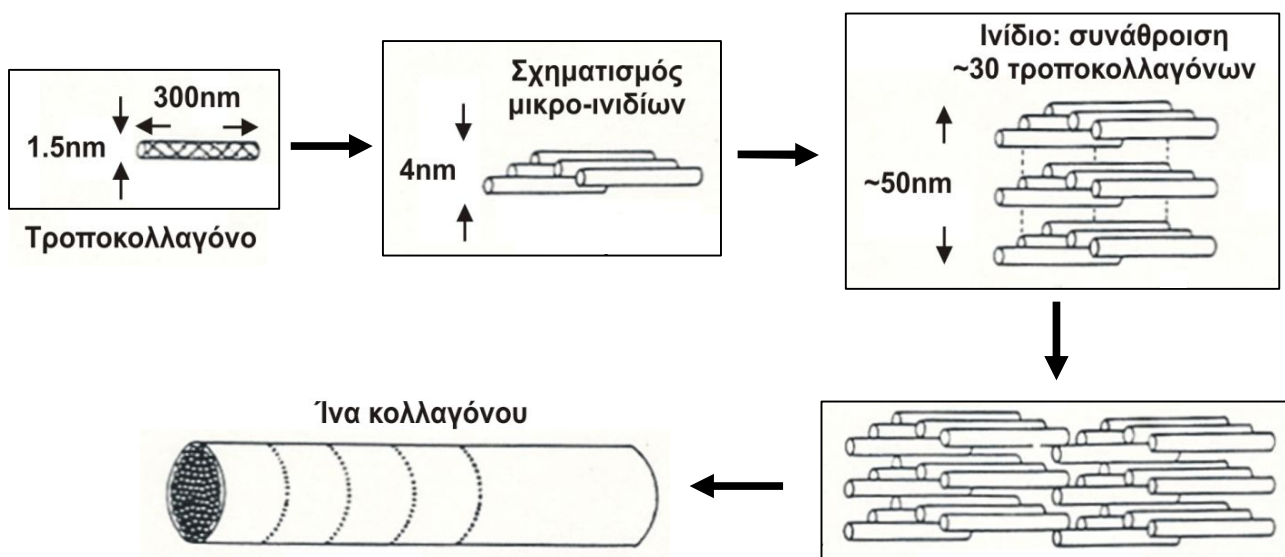
*γ) Οι 3 πολυπεπτιδικές έλικες (ένα χρώμα για κάθε μία) σχηματίζουν τη χωρική δομή της τριπλής έλικας του κολλαγόνου*

*δ) Διατομή της τριπλής έλικας του κολλαγόνου, το κόκκινο χρώμα αντιστοιχεί στη γλυκίνη*

### 1.3.4 Τεταρτοταγής δομή

Η τακτοποίηση στο χώρο, πληθυσμού πολυπεπτιδικών αλυσίδων κολλαγόνου, δηλαδή δομών τροποκολλαγόνου, αποδεικνύουν την *τεταρτοταγή* δομή του. Οι διασυνδέσεις μεταξύ των δομικών μονάδων, τροποκολλαγόνου, χαρακτηρίζουν την τελική στερεοδομή, εφόσον συγκρατούν μεταξύ τους τα μόρια σε μεγαλύτερες μονάδες. Για να δημιουργηθεί λοιπόν η τεταρτογενής δομή του κολλαγόνου οι δομικές μονάδες (τροποκολλαγόνο) διατάσσονται ώστε να διαμορφώσουν μικρο-ινίδια, ινίδια και τελικά ίνες κολλαγόνου. Τρία ελικοειδής πεπτίδια ενώνονται για να δημιουργήσουν το τροποκολλαγόνο και πέντε τροποκολλαγόνα δημιουργούν μια μορφή μικρο-ινιδίου. Το κάθε μικρό-ινίδιο έχει διάμετρο περίπου 4 nm ενώ το κάθε ινίδιο αποτελείται από περίπου 30 τροποκολλαγόνα και έχει διάμετρο περίπου 50 nm.

Η δομή της διπλολειτουργικής (bifunctional) διαδικασίας της διασύνδεσης είναι το σχετικά σύνθετο προϊόν μιας χημικής αντίδρασης της οποίας τα προϊόντα είναι η λυσίνη και η υδροξυλυσίνη. Αυτή η αντίδραση συνεχίζεται καθώς ο οργανισμός ωριμάζει καθιστώντας την εξαγωγή και λήψη του κολλαγόνου από ιστούς γηραιότερων ζώων δυσκολότερη, όπως αναφέρθηκε και προηγουμένως



**Εικόνα 1.7** Τεταρτοταγής δομή κολλαγόνου

*Τα μόρια κολλαγόνου αυτό-οργανώνονται (self-assembled) έτσι ώστε να δημιουργήσουν μικρό – ινίδια, ινίδια και τελικά ίνες κολλαγόνου.*



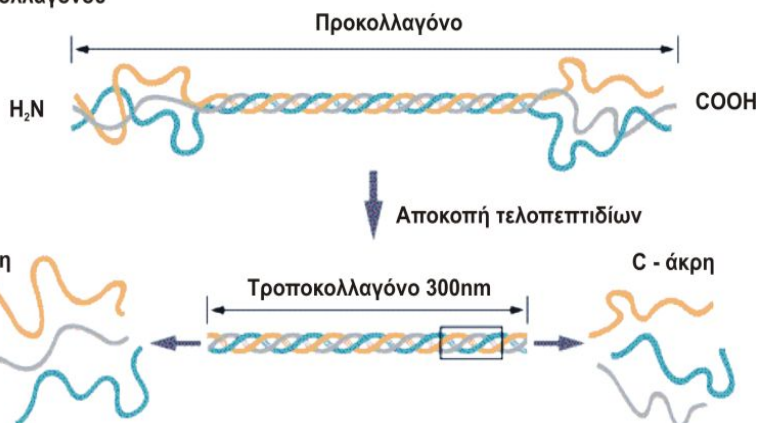
## 1.4 Δημιουργία του κολλαγόνου

Το κολλαγόνο συνθέτεται μέσα σε ινοβλάστες του συνδετικού ιστού σαν ένα πεπτίδιο μεγαλύτερου μοριακού βάρους από το τροποκολλαγόνο που ονομάζεται προκολλαγόνο. Ουσιαστικά οι ινοβλάστες παράγουν πρόδρομες αλυσίδες (προ-α1 και προ α2). Κάθε πρόδρομη αλυσίδα έχει 1300 κατάλοιπα. Ωστόσο, για τη δημιουργία του τροποκολλαγόνου δεν αρκεί η ύπαρξη των τριών αλυσίδων από τις οποίες αποτελείται. Απόδειξη για αυτό αποτελεί το γεγονός ότι ενώ οι τρεις αλυσίδες δίνουν γρήγορα τη δομή του τροποκολλαγόνου *in vivo*, *in vitro* η ίδια διαδικασία απαιτεί μέρες. Αυτό που λείπει στην *in vitro* διαδικασία είναι κάποια επιπλέον πεπτίδια, τα οποία λέγονται τελοπεπτίδια και υπάρχουν σε αλυσίδες που προϋπάρχουν των αλυσίδων του τροποκολλαγόνου. Αυτές οι προ-αλυσίδες ενώνονται και φτιάχνουν το προκολλαγόνο, από το οποίο αναπτύσσονται τα προπεπτίδια για να δώσουν το τροποκολλαγόνο.

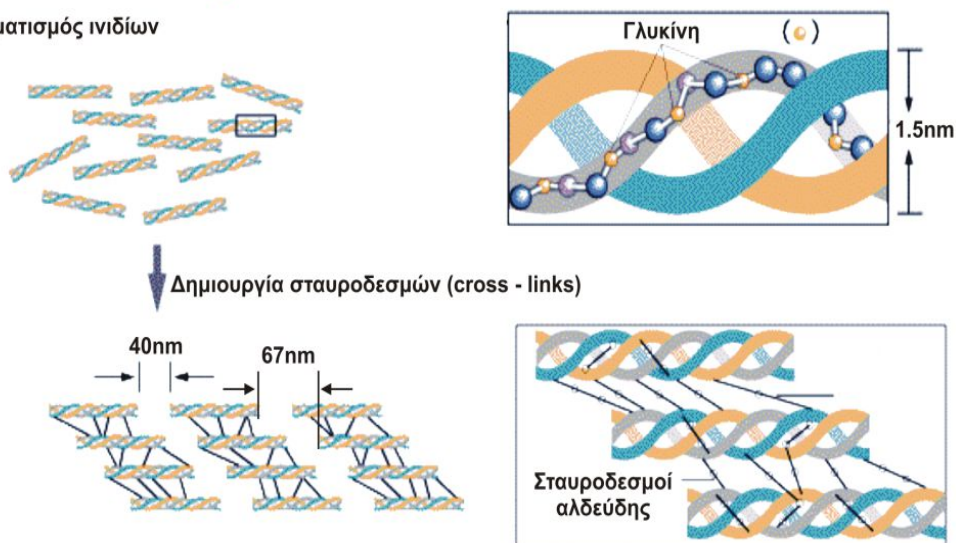
Αναλυτικά, στους ινοβλάστες η αλληλουχία των αμινοξέων δημιουργεί μια α-έλικα. Ακολουθεί υδροξυλίωση καταλοίπων προλίνης (Pro) ή λυσίνης (Lys) για το σχηματισμό υδροξυπρολίνη (HyPro: το αμινοξύ αυτό υπάρχει μόνο στο κολλαγόνο) ή υδροξυλιωμένη λυσίνη (HyLis: το αμινοξύ αυτό είναι πολύ σημαντικό για τη δημιουργία των διασυνδέσεων και για τη τελική δημιουργία των ινιδίων) με την βοήθεια του ενζύμου *protocollagen hydroxylase*. Απαραίτητη είναι η ύπαρξη ασκορβικού οξέος, ενώ στην υδροξυλίωση σημαντικό ρόλο παίζει και η βιταμίνη C. Η σταθερότητα του κολλαγόνου εξαρτάται από την περιεκτικότητα σε HyPro. Στη συνέχεια σάκχαρα προστίθενται στα υδροξυλιωμένα κατάλοιπα Lys (HyLys), δηλαδή συμβαίνει γλυκοζυλίωση μερικών υδροξυλυσινών από την παρουσία γλυκόζης και γαλακτόζης, η οποία μπορεί να επηρεάσει το μέγεθος του ινιδίου. Επομένως το κολλαγόνο φέρει υδατάνθρακες συνδεδεμένους ομοιοπολικά με τις υδροξυλυσίνες. Πολύ κοινός είναι ο δισακχαρίτης της γλυκόζης και της γαλακτόζης. Ο αριθμός των υδατανθρακικών μονάδων ανά μόριο τροποκολλαγόνου εξαρτάται από τον ιστό. Το κολλαγόνο στα ινίδια έχει σχετικά λίγος υδατάνθρακες, ενώ εκείνο που βρίσκεται σε πολύ λεπτά στρώματα είναι πλούσιο σε υδατάνθρακες.

Ακολουθως δημιουργούνται τριπλές έλικες από τις πρόδρομες αλυσίδες και μόνο μια περιοχή στο N-άκρο και C-άκρο δεν βρίσκονται σε μορφή έλικας. Ο σχηματισμός των αλυσίδων δημιουργείται με τη δημιουργία διθειωδών δεσμών κατά πάσα πιθανότητα στα άκρα (επιπλέον κομμάτια) των πρόδρομων αλυσίδων, στη C-άκρη δηλαδή του προκολλαγόνου, μεταξύ των τριών α-ελίκων. Οι δεσμοί αυτοί ονομάζονται πεπτίδια εγγραφής και είναι καθοριστικοί για την ευθυγράμμιση της τριπλής έλικας και τελικά για τη δημιουργία του προκολλαγόνου. Ακολουθεί η έκκριση του γλυκοσυλιωμένου, πλέον, πρωτοκολλαγόνου στο εξωκυτταρικό χώρο. Στο εξωκυτταρικό χώρο γίνεται αποχωρισμός των επιπλέον τμημάτων των πρόδρομων αλυσίδων (των πεπτιδίων εγγραφής) με τη βοήθεια του ενζύμου procollagen peptidase (ένα ένζυμο το οποίο υδρολύει πεπτιδικούς δεσμούς) για τη δημιουργία των μορίων τροποκολλαγόνου. Δηλαδή το πρωτοκολλαγόνο χάνει από το N-τελικό άκρο και πιθανώς από το C-τελικό άκρο πεπτίδια που δεν είναι μέρος της τριπλής έλικας.

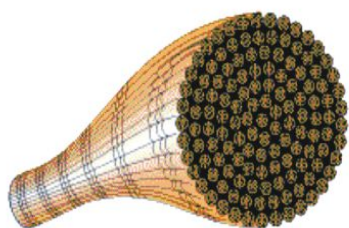
α) Σχηματισμός του τροποκολλαγόνου



β) Σχηματισμός ινιδίων



↓ Σχηματισμός ίνας κολλαγόνου



**Εικόνα 1.8** Δημιουργία ίνας κολλαγόνου

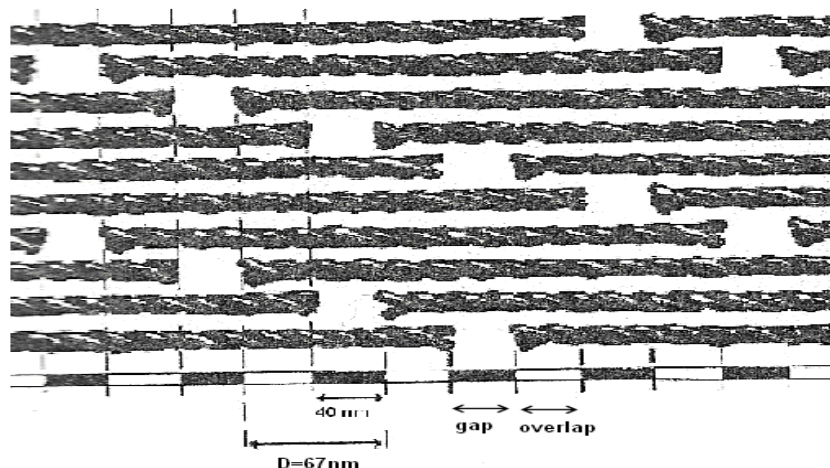
α) Τα τελοπεπτιδία αναγκάζουν τις 3 πολυπεπτιδικές αλυσίδες να διαταχθούν σε υπερέλικα. Έπειτα αποκόπτονται για να δώσουν τους σταυροδεσμούς και το μόριο κολλαγόνου (τροποκολλαγόνο).

β) Περίπου 30 μόρια οργανώνονται για να δημιουργήσουν 1 ινίδιο κολλαγόνου. Οι σταυροδεσμοί προσδίδουν στα ινίδια την ιδιότητα της ανθεκτικότητας. Πληθυσμός ινιδίων οργανώνεται σε μία χωροδιάταξη κατά ένα κύριο άξονα, δημιουργώντας την ίνα κολλαγόνου.

Ακολουθεί η αυτοσυγκρότηση των μορίων του τροποκολλαγόνου (πλευρική και γραμμική ένωση) για την δημιουργία ινιδίων κολλαγόνου. Οι δια-συνδέσεις που δημιουργούνται μεταξύ των παρακείμενων μονάδων σταθεροποιεί τις ινώδεις κατασκευές. Οι τύποι των δια-συνδέσεων εξαρτώνται από τον αριθμό των τροποκολλαγόνων που συμμετέχουν. Έτσι, διακρίνονται σε δισθενείς (bivalent) που συνδέουν την N ή την C άκρη (π.χ. τα τελοπεπτίδια) του ενός μορίου, τροποκολλαγόνου, με την ελικοειδή περιοχή του άλλου και σε τρισθενής (σταθερές ώριμες δια-συνδέσεις) που συνδέουν την N ή την C άκρη δύο μορίων στην ελικοειδή περιοχή ενός τρίτου. Στη συνέχεια γίνεται απαμίνωση των Lys και HyLys για τη δημιουργία αλδεϋδών και ακολουθεί σχηματισμός ομοιοπολικών δεσμών μεταξύ αυτών των αλδεϋδών και καταλοίπων Lys και HyLys που «δένουν» μόρια τροποκολλαγόνου το ένα με το άλλο (ή είναι και ενδομοριακά) δημιουργώντας το αδιάλυτο ώριμο κολλαγόνο μια δομή εξαιρετικά σταθερή και ανθεκτική.

Τα μόρια του κολλαγόνου σε ένα ινίδιο δεν είναι διατεταγμένα το ένα ακριβώς κάτω από το άλλο. Από έρευνας που έχουν γίνει με ηλεκτρονική μικροσκοπία έχει βρεθεί το τα τροποκολλαγόνα της ίδιας σειράς απέχουν μεταξύ τους 40 nm, ενώ οι διαδοχικές σειρές μετακινούνται κατά 67 nm. Η δομή επαναλαμβάνεται κάθε πέντε σειρές. Το κενό των 40 nm μεταξύ ενός τροποκολλαγόνου και του επόμενου είναι ο χώρος που χρειάζονται τα τελοπεπτίδια για την ανάπτυξη των δια-συνδέσεων, συνεπώς έχει ιδιαίτερη σημασία. Ο ακριβής τρόπος δημιουργίας των δια-συνδέσεων και γενικά η διάταξη των τροποκολλαγόνων σε ένα ινίδιο έχει ερμηνευτεί πλήρως και αποτελεί αντικείμενο έρευνας.

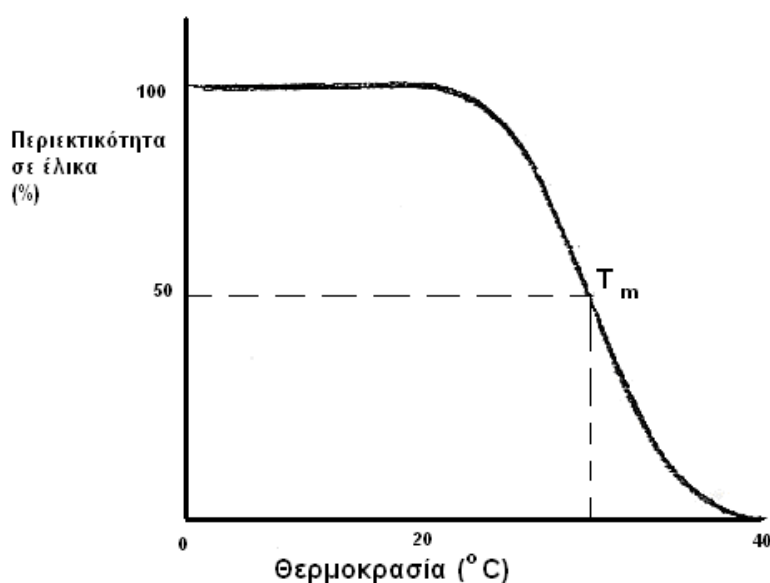
Το κολλαγόνο όπως αναφέρθηκε είναι αδιάλυτο στο νερό αλλά όταν θερμανθεί μετατρέπεται σε ένα ευδιάλυτο παρασκεύασμα τη ζελατίνη. Η ζελατίνη αποτελείται από τις α υπομονάδες του κολλαγόνου και από διμερή μορφώματα, τις β υπομονάδες, που το καθένα τους περιλαμβάνει από δύο α υπομονάδες ενωμένες με αμιδιμικούς δεσμούς.



**Εικόνα 1.9** Δομικό σχέδιο της ίνας κολλαγόνου

## 1.5 Η σταθερότητα της έλικας του κολλαγόνου

Η αύξηση της θερμοκρασίας στο διάλυμα κολλαγόνου οδηγεί σε σημαντικές αλλαγές στη δομή και στις φυσικές του ιδιότητες [5]. Έχει παρατηρηθεί ότι με αύξηση της θερμοκρασίας έχουμε μείωση του ιξώδους, κάτι που υποδεικνύει ότι το μόριο έχει χάσει πλέον το σχήμα της ράβδου. Μετά από κάποια θερμοκρασία η ελικοειδής δομή των αλυσίδων του κολλαγόνου καταστρέφεται. Η θερμική ενέργεια υπερνικά δηλαδή τις δυνάμεις που σταθεροποιούν την τριπλή έλικα του κολλαγόνου. Με αύξηση της θερμοκρασίας του κολλαγόνου πάνω από 40 °C αρχίζει η αποδιαμόρφωση των ινών του[5]. Η σχεδόν κρυσταλλική δομή των μορίων του κολλαγόνου καταρρέει σε τυχαίες αλυσίδες ζελατίνης. Τα κολλαγόνα των θηλαστικών αποδιαμορφώνονται περίπου τους 40 °C. Η σταθερότητα της τριπλής έλικας πιστεύεται ότι οφείλεται στους δεσμούς υδρογόνου του νερού στα υδροξυπρολικά κατάλοιπα. Μετά από κάποια θερμοκρασία, περίπου στους 53 °C, η αλλαγή είναι μη αναστρέψιμη εξαιτίας των συσσωματωμάτων που δημιουργούνται λόγω καθίζησης της πρωτεΐνης [5]. Το κολλαγόνο κατά τη θέρμανση μετατρέπεται σε προσανατολισμένα ισοτροπικά μακρομόρια. Η χαρακτηριστική θερμοκρασία στην οποία χάνεται το μισό της ελικοειδούς δομής ονομάζεται θερμοκρασία τήξης και συμβολίζεται με  $T_m$ . Η θερμοκρασία αυτή είναι κριτήριο σταθερότητας της ελικοειδούς δομής. Στην περίπτωση άθικτων ινών η αντίστοιχη σταθερά που χρησιμοποιείται είναι η θερμοκρασία συρρίκνωσης  $sT$  στην οποία μία ίνα συρρικνώνεται σημαντικά. Κολλαγόνο από διαφορετικά είδη έχει διαφορετικές τιμές  $T_m$ . Όσο μεγαλύτερες είναι οι τιμές των δύο προαναφερθεισών θερμοκρασιών τόσο μεγαλύτερη είναι και η σταθερότητα της τριπλής έλικας.



Εικόνα 1.10 Καμπύλη τήξης μορίων κολλαγόνου σε διάλυμα

## 1.6 Σταυροδεσμοί κολλαγόνου

Τα μόρια του κολλαγόνου, οι τριπλές έλικες δηλαδή που αποτελούν τα τροποκολλαγόνα, διατάσσονται σε συγκεκριμένες δομές ώστε να δημιουργήσουν τα ινίδια και τις ίνες σχηματίζοντας έτσι την τεταρτογενή δομή του κολλαγόνου. Τα τροποκολλαγόνα συνδέονται μεταξύ τους μέσω των σταυροδεσμών (cross-links). Ο Varzar παρουσίασε το 1964 ότι οι ίνες κολλαγόνου συνδέονται μεταξύ τους με σταυροδεσμούς, παρόλο που η φύση των σταυροδεσμών ήταν ακόμη άγνωστη. Υπόθεσε ότι το κολλαγόνο περιέχει δύο τύπους σταυροδεσμών: ενζυματική διαμόρφωση και έμμεση διαμόρφωση. [7] Αυτή η έμμεση μορφή σήμερα είναι γνωστή ως γλυκίωση (glycation). Το μόνο ένζυμο το οποίο απαιτείται για την διαμόρφωση του σταυροδεσμού είναι η οξειδάση λυσίνης (lysyl oxidase) η οποία βρέθηκε από τον Siegel το 1976.



*Εικόνα 1.11 Οι σταυροδεσμοί του κολλαγόνου*

Οι σταυροδεσμοί είναι ισοσθενείς δεσμοί που ενώνουν μια πολυμερική αλυσίδα με μια άλλη. Οι σταυροδεσμοί εμποδίζουν την κλειστή 'συσκευασία' των πολυμερικών αλυσίδων, αποτρέποντας τη διαμόρφωση κρυσταλλικών περιοχών.

Η περιορισμένη μοριακή κινητικότητα μιας δομής με σταυροδεσμούς οριοθετεί την προέκταση ενός πολυμερικού υλικού κάτω από την επίδραση μιας δύναμης.

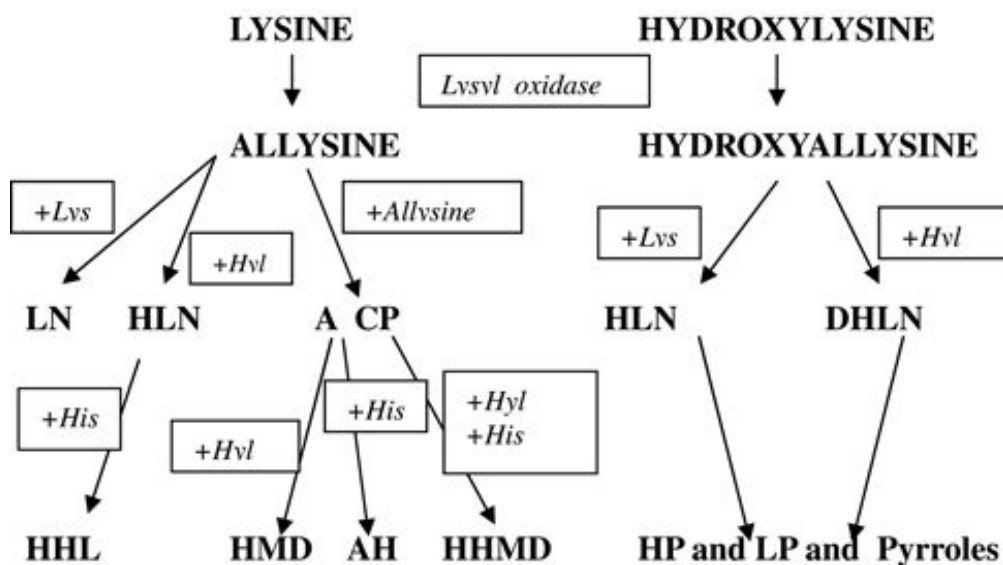
Στις περισσότερες περιπτώσεις ο σταυροδεσμός είναι μη αντιστρέψιμος. Όταν πραγματοποιηθεί ο δεσμός το προϊόν είναι πολύ σκληρό ή μη ανακυλώσιμο.

Η δύναμη των ινών του κολλαγόνου εξαρτάται από τη διαμόρφωση ισοσθενών σταυροδεσμών μεταξύ των τελοπεπτιδίων και των διπλανών ελικοειδών τμημάτων των μορίων. Το κολλαγόνο τύπου I έχει 4 θέσεις σταυροδεσμών: μία σε κάθε τελοπεπτίδιο και δύο ακόμα σε συγκεκριμένες θέσεις στην τριπλή έλικα (στα

υπόλοιπα 87 και 930). Ένα εγγενές ελάττωμα που μπορεί να εμποδίζει τη δημιουργία σταυροδεσμού στο κολλαγόνο οδηγεί σε διάφορες ασθένειες, όπως το σύνδρομο Ehlers-Danlos και το σύνδρομο Marfan.

Η κατανομή των υδροφοβικών και φορτισμένων αμινοξέων στην α-αλυσίδα του κολλαγόνου τύπου I προσδιορίζει ότι τα μόρια του κολλαγόνου κινούνται αργά κ διατεταγμένα στην δεξιά πλευρά το ένα ως προς στο άλλο. Απαραίτητη απαίτηση για τη συνέχιση του σταυροδεσμού είναι τα μόρια του κολλαγόνου να συσσωματώνονται έτσι ώστε το κάθε μόριο να είναι σε διαμήκη τοποθέτηση, περίπου σε απόσταση ίση με το ένα τέταρτο από το μήκος του, σε σχέση με το γείτονα του.

Ο σταυροδεσμός είναι βασισμένος στην αλδεϋδική διαμόρφωση από ένα τελοπεπτιδίο λυσίνης (lysine) ή ένα υδροξυλισινικό υπόλοιπο (hydroxylysine residue), τα οποία καταλύει η οξείδωση λυσίνης. Η οξείδωση τη λυσίνης συνδέεται σε μια ισχυρά διατηρήσιμη ακολουθία (Hyl-Gly-His-Arg) αντίθετα από τα ελαστικά N- και C- άκρα ενός διπλανού μορίου. Το μονοπάτι του σταυροδεσμού διαχωρίζεται σε δύο κλάσεις εξαρτώμενες από την υδροξυλίωση του υπολοίπου της λυσίνης: τη διαδρομή της αλυσίνης η οποία κυριαρχεί στο δέρμα, τον κερατοειδή χιτώνα σκληρό χιτώνα του ματιού, και τη διαδρομή της υδροξυ-αλυσίνης η οποία κυριαρχεί στα κόκαλα, τον χόνδρο, τους συνδέσμους και τους χόνδρους. Η βάση για αυτή τη διαφορά είναι η διαφορετική υδροξυλική δραστηριότητα, η οποία φαίνεται να καθορίζει το τύπο του σταυροδεσμού.<sup>[2,7,16,17]</sup>



**Εικόνα 1.12** Οι δύο διαφορετικές διαδρομές του σταυροδεσμού

## 1.7 Βιβλιογραφία

- [1] Σ. Ψιλοδημητρακόπουλος, “Συνδυασμένη Απεικονιστική Μικροσκοπία Γέννησης Δεύτερης Αρμονικής και Διφωτονικά Διεγειρόμενου Φθορισμού Δομών Κολλαγόνου”, Μεταπτυχιακή Εργασία, Εργαστήριο Βιοϊατρικής Οπτικής & Εφαρμοσμένης Βιοφυσικής Σ.Η.Μ.Μ.Υ. Ε.Μ.Π., Αθήνα, (2005)
- [2] J.C. Brown, “Structure and Binding Properties of Collagen Type XIV Isolated from Human Placenta”, *J. Cell Biol.*, 120, 557 (1993)
- [3] Σ. Χαμοδράκας, “Θέματα Μοριακής Βιοφυσικής”, Εκδόσεις Συμμετρία, Αθήνα (1993)
- [4] Γ. Ράπτη, “Μελέτη Θερμικής Αποδιαμόρφωσης Κολλαγόνου με Οπτικές Μεθόδους ”, Μεταπτυχιακή Εργασία, Εργαστήριο Βιοϊατρικής Οπτικής & Εφαρμοσμένης Βιοφυσικής Σ.Η.Μ.Μ.Υ. Ε.Μ.Π.
- [5] Μ. Δημάκη, “Μελέτη της Ικανότητας Παραγωγής Οπτικής Δεύτερης Αρμονικής από Κολλαγόνο για το σχεδιασμό Μετρητή Μήκους Κύματος Laser”, Διπλωματική Εργασία, Εργαστήριο Βιοϊατρικής Οπτικής & Εφαρμοσμένης Βιοφυσικής Σ.Η.Μ.Μ.Υ. Ε.Μ.Π.,(Αθήνα 2000)
- [6]Α. Τρακατέλλης, “Βιοχημεία Α΄ Τόμος”, 2<sup>η</sup> Έκδοση, Εκδοτικός Οίκος Αφών Κυριακίδη, Θεσσαλονίκη
- [7] M.L. Sassi, “Carboxyterminal degradation products of type I collagen”, Departement of Clinical Chemistry University of Oulu, Finland
- [8]Α. Steinbüchel and R.H Marchessault, “Biopolymers for Medicinal and Pharmaceutical Applications”, WILEY-VCH (2005)
- [9]P. Urena and M.C. de Vernejoul, “Circulating biochemical markerw of bone remodeling uremic patients”, *Kidney Int.*, 55, 2141 (1999)
- [10] R.M. Williams, W.R. Zipfel and W.W. Webb, “Interpenteing Second Harmonic Genaration Images of Collagen I Fibrils” *Biophys. J. BioFAST*, 10, 1529 (2004)
- [11] D.A. Kleinman, “Nonlinear Dielectric Polarization in Optical Media”, *Phys. Rev.*, 126 , 1997 (1962)
- [12] V. I Shcheslavskiy, G. I. Petrov, V. V. Yakovlev, “Nonlinear optical properties of collagen in solution”, *Chem. Phys. Lett.*, 402, 170 2005



- [13] T. Verbiest, M. Kauranen, A. Persoons, M. Ikonen, J. Kurkela, H. Lemmetyinen, "Nonlinear Optical Activity and Biomolecular Chirality", *J. Am. Chem. Soc.*, 116, 9203 (1994)
- [14] M.M Giraud-Gullie, "Liquid crystalline phases of sonicated type I collagen", *Biol. Cell*, 67, 97 (1989)
- [15] W. Wang, J.B. Wyckoff, V.C. Frohlich, Y. Oleynikov, S. Huttermaier, J. Zavadil, L. Cermak, E.P. Bottinger, R.H. Singer and J.G. White, "Single cell behavior in metastatic primary mammary tumors correlated with gene expression patterns revealed by molecular profiling", *Cancer. Res.*, 62, 6278 (2002)
- [16] L. Moreaux, O. Sandre, and J. Mertz. "Membrane imaging by secondharmonic generation microscopy", *J. Opt. Soc. Am. B.*, 17,1685–1694. (2000)
- [17] J. Mertz, and L. Moreaux., "Second-harmonic generation by focused excitation of inhomogeneously distributed scatterers", *Opt. Commun.*, 196,325–330 (2001)
- [18] B.M. Kim, J. Eichler and L.B. Da Silva, "Frequency doubling of ultrashort laser pulses in biological tissue", *Appl. Opt.*, 38, 7145 (1999)
- [19] Y. Guo, P.P. Ho, H. Savage, D. Harris, P. Sacks, S. Schantz, F. Liu, N. Zhadin and R.R. Alfano, "Second harmonic tomography of tissues", *Opt. Lett.*, 22, 1323 (1997)
- [20] S.W. Chu, S.P. Tai, M.C. Chan, C.K. Sun, I.C. Hsiao, C.H. Lin, Y.C. Chen and B.L. Lin, "Thickness dependence of optical second harmonic generation in collagen fibrils", *Opt. Express*, 15, 12005-12010 (2007)
- [21] W.R. Zipfel, R.M. Williams, R. Cristie, A.Y. Nikitin, B.T. Hyman and W.W. Webb, "Live tissue intrinsic emission microscopy using multiphoton excited intrinsic fluorescence and second harmonic generation", *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 100, 7075 (2003)
- [22] E. Brown, T. Mckee, E. Ditomaso, A. Pluen, B. Seed, Y. Boucher and R.K. Jain, "Dynamic imaging of collagen and its modulation in vivo using second harmonic generation", *Nat. Med.*, 9, 796 (2003)

## 2.1 Μικροσκόπιο Ατομικής Δύναμης AFM

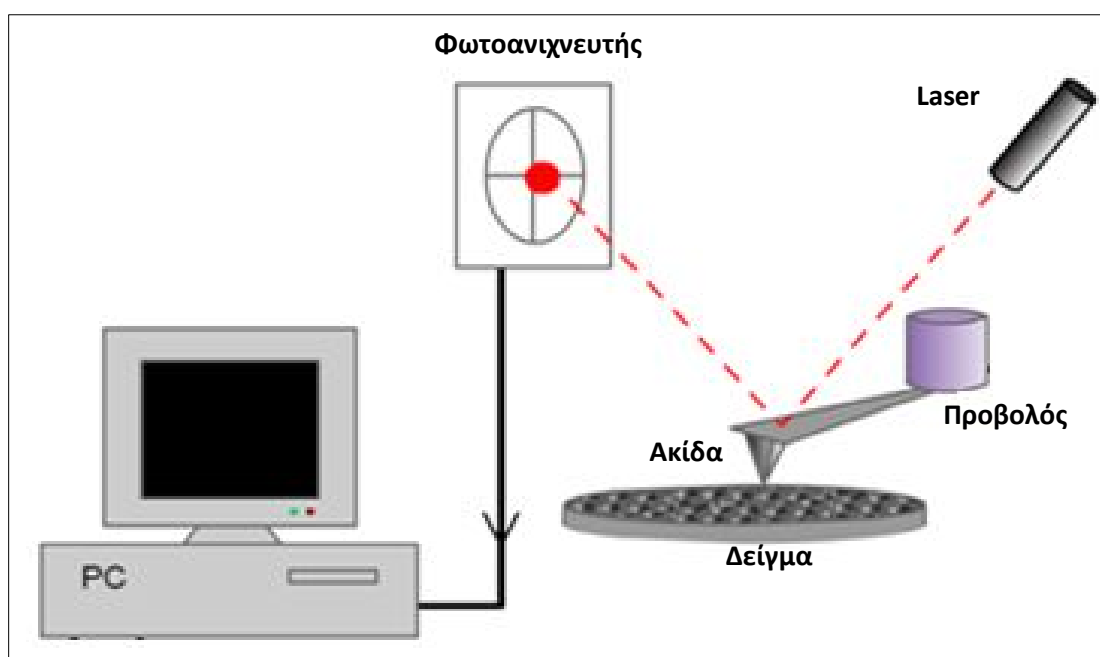
Το μικροσκόπιο ατομικής δύναμης - Atomic Force Microscope (AFM) δουλεύει στηριζόμενο στη σάρωση που εκτελεί μια λεπτή κεραμική ή από ημιαγώγιμο υλικό ακίδα, πάνω από μια επιφάνεια, κατά τον ίδιο περίπου τρόπο που η βελόνα ενός πικάπ σαρώνει τα αυλάκια ενός δίσκου βινυλίου. Η αιχμή της ακίδας τοποθετείται στην άκρη ενός μοχλοβραχίονα που μπορεί να ταλαντεύεται ενώ είναι στερεωμένος στο άλλο άκρο. Καθώς η ακίδα έλκεται ή απωθείται από την επιφάνεια που σαρώνει, ο μοχλοβραχίονας αυτός αποκλίνει. Το μέγεθος της απόκλισης καταγράφεται από μια δέσμη λέιζερ η οποία ανακλάται σε αμβλεία γωνία από το άκρο του μοχλοβραχίονα που ταλαντώνεται. Το γράφημα της απόκλισης της δέσμης λέιζερ σε σχέση με τη θέση της ακίδας πάνω στην επιφάνεια του δείγματος, μας δίνει την ανάλυση της επιφάνειας στα όρη και κοιλάδες που περιέχει. Με τη μέθοδο αυτή μπορούμε να ανιχνεύσουμε την επιφάνεια ενός δείγματος με τη βοήθεια μιας οξείας ακίδας, μήκους λίγων μικρομέτρων και διαμέτρου μικρότερης από 10nm. Η ακίδα αυτή είναι τοποθετημένη στο ελεύθερο άκρο μιας ειδικής βάσης η οποία έχει μήκος 100 – 200μm. Οι δυνάμεις που αναπτύσσονται μεταξύ της επιφάνειας και της ακίδας προκαλούν στη βάση της ακίδας μια καμπή ή μια απόκλιση. Αυτές οι αποκλίσεις ή οι κάμψεις της βάσης της ακίδας με τη χρήση ενός απλού laser μπορούν να μετρηθούν από έναν ανιχνευτή και με τη βοήθεια ενός υπολογιστή να δημιουργήσουν ένα χάρτη της επιφάνειας. Η συγκεκριμένη τεχνική χρησιμοποιείται για τη μελέτη τοπογραφίας επιφανειών μεγάλου εύρους δειγμάτων όπως μονωτές, ημιαγωγοί, καθώς επίσης και ηλεκτρικά αγωγίμων υλικών, ενώ έχει γίνει και ένα πολύ ισχυρό όργανο για τη μελέτη βιολογικών δειγμάτων.

Οι εφαρμογές που στηρίζονται στην μικροσκοπία ατομικής δύναμης έχουν αυξηθεί δραματικά τα τελευταία χρόνια μεταξύ των οποίων υπάρχουν πολλές βιολογικές εφαρμογές. Μεταξύ αυτών περιλαμβάνονται μελέτες στο DNA, σε πρωτεΐνες, σε ιούς, κύτταρα και σε ολόκληρους ιστούς και όργανα. Επιπρόσθετα στην απεικόνιση, το AFM μπορεί να χρησιμοποιηθεί σαν ένας αισθητήρας δυνάμεων για να εκτιμηθεί η αντοχή των δεσμών μεταξύ διαφορετικών βιολογικών μορίων, να βοηθήσει στον προσδιορισμό μηχανικών ιδιοτήτων σε νανοκλίμακα και να βοηθήσει στην καταγραφή της πρωτεϊνικής δυναμικής.

Τα πλεονεκτήματα τα οποία έχει το AFM για παρατήρηση βιολογικών δειγμάτων είναι η ικανότητα να παρέχει πληροφορίες σε νανομετρική κλίμακα για δομικές, δυναμικές και μηχανικές ιδιότητες. Μελλοντικές έρευνες λοιπόν, θα κινηθούν προς τον προσδιορισμό με υψηλή-ανάλυση της δομής, τη μελέτη μηχανικών ιδιοτήτων και τον προσδιορισμό της αλληλεπίδρασης δυνάμεων, αλλά και την παρακολούθηση βιολογικών διαδικασιών και δυναμικής. Ερευνητές εργάζονται ήδη σε υψηλή ανάλυση για τη δομή των πρωτεϊνών και του DNA. Χρησιμοποιούνται μέθοδοι που περιλαμβάνουν και τη χρήση cryo-AFM για να αυξήσουν την ακαμψία και τη σταθερότητα των δειγμάτων. Προσπαθούν επίσης να ερευνήσουν μόρια σε μια επιφάνεια για να μετρήσουν μηχανικές ιδιότητες κάθε μεμονωμένου μορίου. Τέτοιες ιδέες μπορεί να αξιοποιηθούν αν χρησιμοποιηθεί το AFM ως βιοαισθητήρας στην ιατρική για να προσδιοριστούν πλήρως οι χημικοί ή βιολογικοί παράμετροι σε βιολογικά δείγματα. Τέλος, η ικανότητα παρακολούθησης κίνησης σε υδατικό περιβάλλον, αξιοποιείται για να καταγραφούν βιολογικές διαδικασίες, δυναμικής και μακρομοριακής συγκέντρωσης που συμβαίνουν σε πραγματικό χρόνο.<sup>[1,2,3,5,8,11,14,15,20]</sup>

## 2.2 Διάταξη Μικροσκοπίου Ατομικής Δύναμης

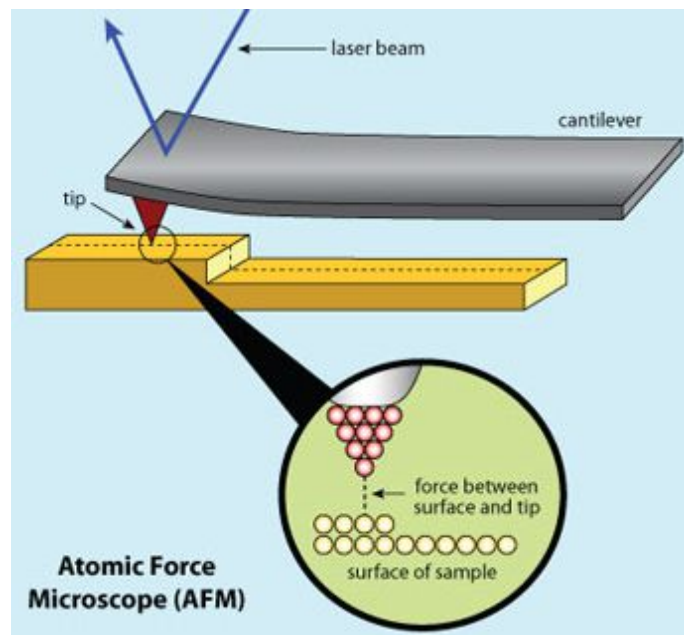
Το AFM δουλεύει στηριζόμενο στη σάρωση που εκτελεί μια λεπτή κεραμική ή από ημιαγώγιο υλικό ακίδα (tip), πάνω από μια επιφάνεια. Η αιχμή της ακίδας τοποθετείται στην άκρη ενός προβολού (cantilever) που μπορεί να ταλαντεύεται, ενώ είναι στερεωμένος στο άλλο άκρο. Καθώς η ακίδα έλκεται ή απωθείται από την επιφάνεια που σαρώνει, ο προβολός αυτός αποκλίνει. Το μέγεθος της απόκλισης καταγράφεται από μια δέσμη λέιζερ η οποία ανακλάται σε αμβλεία γωνία από το άκρο του προβολού που ταλαντώνεται. Το γράφημα της απόκλισης της δέσμης λέιζερ σε σχέση με τη θέση της ακίδας πάνω στην επιφάνεια του δείγματος, δίνει την ανάλυση της επιφάνειας σε όρη και κοιλάδες που περιέχει αυτή, δηλαδή τη μορφολογία της επιφάνειας.



**Εικόνα 2.1** Σχηματική απεικόνιση συστήματος AFM

Το AFM μπορεί να δουλέψει με την ακίδα σε επαφή με το δείγμα, είτε με την ακίδα να χτυπά ελαφρά την επιφάνεια. Τότε καταγράφονται οι μεταβολές που παρατηρούνται ως προς τη σκληρότητα της επιφάνειας ή ως προς την τάση προσκόλλησης της ακίδας στην επιφάνεια. Με τη μέθοδο της Μικροσκοπίας

Ατομικής Δύναμης, πετυχαίνουμε διακριτική ικανότητα επί της επιφανείας από Angstroms μέχρι μερικά μικρά του μέτρου. Η ακτίνα της ακίδας είναι της τάξης των 20 νανομέτρων. Η δύναμη που ασκείται μεταξύ ακίδας και επιφάνειας είναι της τάξης των  $10^{-11}$  έως  $10^{-6}$  N. [5,7,8,9,11,15,16,23]



**Εικόνα 2.2** Μεγέθυνση προβολού AFM και ακίδας

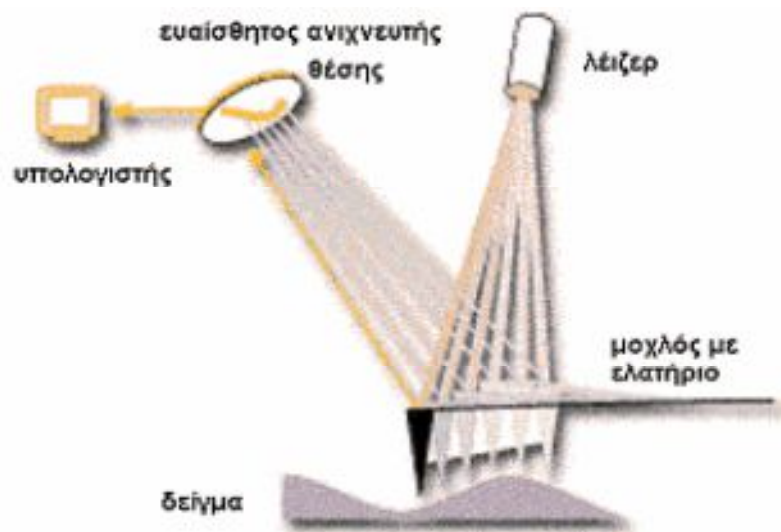
## 2.3 Αρχή λειτουργίας AFM

Στο μικροσκόπιο AFM μετρούνται διαφορές στις δυνάμεις οι οποίες αναπτύσσονται μεταξύ ακίδας και επιφάνειας. Οι δυνάμεις αυτές εμφανίζονται ανεξαρτήτως από το αν η μελετώμενη επιφάνεια είναι αγωγική ή μη. Η ακίδα βρίσκεται στο άκρο ελάσματος. Όπως είναι γνωστό από το νόμο του *Hooke* η σχέση μεταξύ δύναμης  $F$  και παραμόρφωσης  $\Delta x$  ενός ελατηρίου δίνεται από τη σχέση:

$$F = K \cdot \Delta x$$

Η κίνηση του ελάσματος παρακολουθείται καθώς μια δέσμη laser ανακλάται από την πίσω επιφάνεια του και ανιχνεύεται από ένα φωτοανιχνευτή. Για διαφορετικές θέσεις του ελάσματος το φως προσπίπτει και σε διαφορετικές περιοχές στο φωτοανιχνευτή PSD (*Position – Sensitive Detector*). Ο φωτοανιχνευτής αυτός είναι σε θέση να ανιχνεύσει τις χωρικές μεταβολές της έντασης του προσπίπτοντος φωτός. Ο ανιχνευτής χωρίζεται σε τεταρτημόρια και αποτελείται από δύο μέρη, το «πάνω» και το «κάτω».

Καθώς το φως προσπίπτει σε αυτόν, η διαφορά τάσης μεταξύ των δύο αυτών περιοχών αποτελεί μέτρο της παραμόρφωσης του ελάσματος.



**Εικόνα 2.3** Αρχή λειτουργίας AFM. Η δέσμη laser έχει εστιαστεί στην ακίδα του προβολού για βέλτιστο σήμα στον φωτοανιχνευτή

## 2.4 Τρόποι λειτουργίας μικροσκοπίου AFM

Ένα AFM μπορεί να λειτουργήσει με διάφορους τρόπους λειτουργίας. Καταρχήν, με τη χρήση του μηχανισμού ανάδρασης μπορούμε να διατηρήσουμε τη δύναμη σταθερή σε μία τιμή, καθώς η παραμόρφωση του ελάσματος διατηρείται επίσης σταθερή (αφού όπως είδαμε η σχέση δύναμης - παραμόρφωσης είναι γραμμική). Ο μηχανισμός ανάδρασης εξυπηρετεί στο να διατηρεί την τάση που δίνεται από το φωτοανιχνευτή σταθερή με το να μετακινεί το δείγμα ή το έλασμα κατά τον κατακόρυφο άξονα με τη βοήθεια πιεζοηλεκτρικού κρυστάλλου. Κατά αυτό τον τρόπο, καθώς η ακίδα μετακινείται στο παράλληλο της επιφάνειας επίπεδο, αυτή ακολουθεί την τοπογραφία της επιφάνειας. Ο τρόπος λειτουργίας αυτός ονομάζεται λειτουργία σταθερής ανάκλασης (*Constant Cantilever Deflection Mode*) ή αλλιώς λειτουργία σταθερής δύναμης (*Constant Force Mode*).

Δεύτερος τρόπος λειτουργίας είναι να διατηρείται σταθερή η απόσταση της ακίδας από την επιφάνεια, ενώ μετρούνται οι αλλαγές στη δύναμη (δηλαδή αλλαγές στην παραμόρφωση του ελάσματος) και ονομάζεται λειτουργία σταθερού ύψους (*Constant Height Mode*).

Ένας τρίτος τρόπος είναι να τεθεί η ακίδα σε ταλάντωση, καθώς αυτή σαρώνει την επιφάνεια (*Tapping mode*). Κατά την κίνηση αυτή είναι πιθανό το πλάτος και η φάση της ταλάντωσης αυτής να μεταβληθεί. Προκειμένου να παρατηρηθεί η χημική σύσταση σε ένα δείγμα, διατηρείται σταθερό το πλάτος με τη βοήθεια του μηχανισμού ανάδρασης, ενώ οι μεταβολές στη φάση δίνουν πληροφορίες για τα χημικά είδη τα οποία αποτελούν την επιφάνεια (*phase images*).

Εξάλλου, η σύσταση της επιφάνειας μπορεί να μελετηθεί και παρακολουθώντας την κίνηση της ακίδας καθώς αυτή ταλαντώνεται (*phase images*). Τότε η φάση της ταλάντωσης διαφοροποιείται ανάλογα με τη σύσταση της επιφάνειας του δείγματος. Για αυτή τη λειτουργία, απαιτείται η επιφάνεια να είναι σχεδόν επίπεδη.

Όσο αφορά τη μικροσκοπία AFM, ιδιαίτερη προσοχή πρέπει να δοθεί στην κατασκευή του ελάσματος, αφού πρέπει να επιτρέπεται ικανοποιητική παραμόρφωση για δυνάμεις της τάξης του pN και επομένως η σταθερά ελατηρίου θα πρέπει να είναι όσο μικρότερη γίνεται.

Ταυτόχρονα όμως θα πρέπει η συχνότητα συντονισμού  $\omega_0$  να είναι αρκετά υψηλή προς αποφυγή κραδασμών. Συνδυάζοντας τις δύο αυτές απαιτήσεις και λαμβάνοντας υπόψη τη σχέση:

$$\omega_0 = \sqrt{\frac{K}{m}}$$

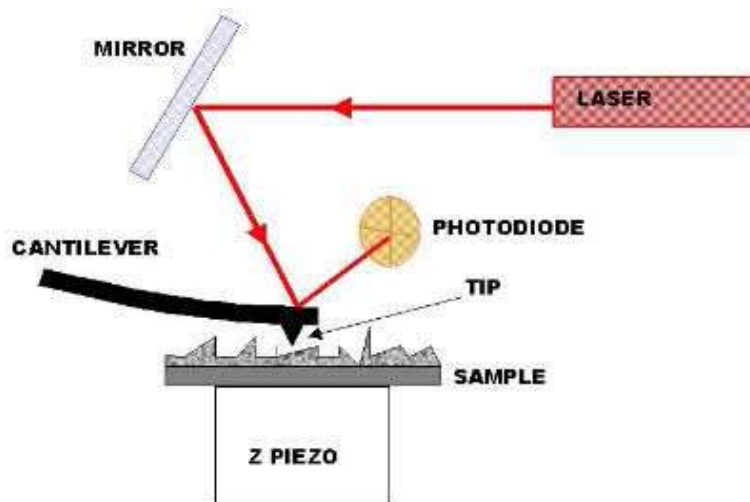
Παρατηρείται ότι αυτές ικανοποιούνται για πολύ μικρή μάζα και επομένως πολύ μικρές γεωμετρικές διαστάσεις. Χαρακτηριστικές τιμές του  $K$  και των διαστάσεων του προβολού είναι, 1N/m και 100 x 20 x 1 μm αντίστοιχα. Προκειμένου δηλαδή το έλασμα να μετακινηθεί κατά 1 nm, πρέπει να του ασκηθεί η δύναμη ίση με 1 nN.<sup>[13,15,19]</sup>



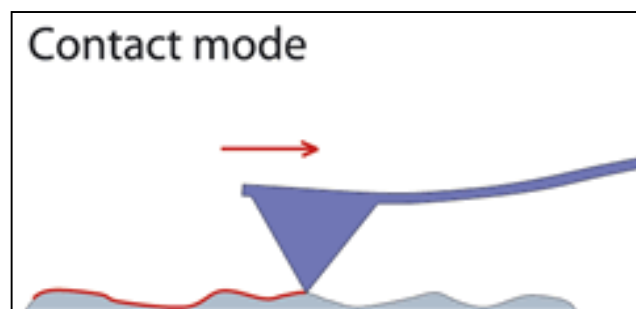
## 2.5 Μέθοδοι Απεικόνισης AFM

### 2.5.1 Μέθοδος Επαφής (Contact mode)

Η μέθοδος αυτή, η οποία είναι και η πιο κοινότερη μέθοδος σάρωσης του δείγματος, λειτουργεί με την ακίδα να βρίσκεται σε συνεχή επαφή με την επιφάνεια. Η δύναμη που ασκεί η ακίδα έχει μέση τιμή  $10^{-9}$  N. Σε αυτή τη μέθοδο διακρίνουμε 2 υποπεριπτώσεις. Η πρώτη είναι η μέθοδος σταθερής δύναμης (constant force mode). Η μέθοδος αυτή έχει το χαρακτηριστικό ότι καθώς σαρώνεται το δείγμα η δύναμη που ασκεί η ακίδα στην επιφάνεια του δείγματος διατηρείται σταθερή. Η δεύτερη μέθοδος είναι η μέθοδος σταθερού ύψους με την οποία επιτυγχάνουμε μεγάλη ευαισθησία κατά τον άξονα των z. Όμως η δύναμη της ακίδας στο δείγμα αυξομειώνεται ανάλογα με την κατανομή της επιφάνειας με αποτέλεσμα μερικές φορές να δημιουργείται ζημιά στην ακίδα ή στο δείγμα.



Εικόνα 2.4 Contact Mode

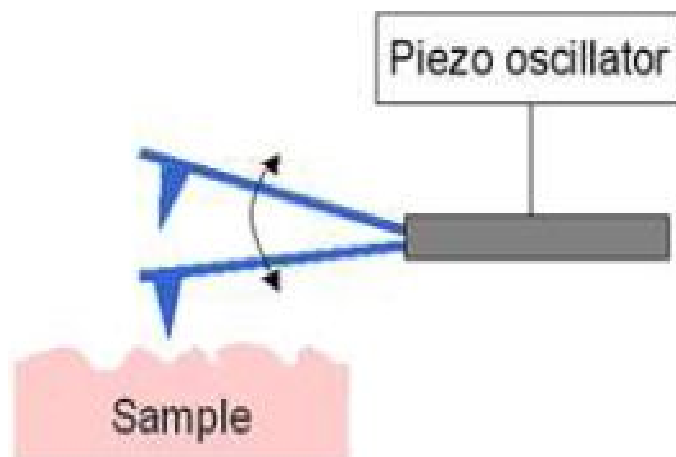


Εικόνα 2.5 Η ακίδα βρίσκεται σε συνεχή επαφή με το δείγμα

## 2.5.2 Μέθοδος ενδιάμεσης παλλόμενης επαφής (Tapping mode)

Η απεικονιστική μέθοδος ενδιάμεσης παλλόμενης επαφής (*tapping mode*) είναι μια από τις διάφορες μεθόδους απεικόνισης του AFM μικροσκοπίου. Η κεφαλή σάρωσης του AFM είναι γνωστή ως προβολός (*cantilever*), είναι γενικά ένας λεπτός ορθογώνιος μοχλός μήκους μερικών εκατοντάδων μικρομέτρων και μερικών μικρομέτρων πλάτους. Βέβαια διάφορα είδη σχημάτων και μεγεθών είναι διαθέσιμα σήμερα. Το ένα άκρο του προβολού είναι στερεωμένο σε μία άκαμπτη βάση, η οποία συνήθως ονομάζεται «chip», συνδεδεμένη με τη βάση στήριξης της ακίδας. Στο άλλο άκρο ο προβολός είναι τελείως ελεύθερος. Στη μέθοδο *tapping* ο προβολός αφήνεται ελεύθερος να ταλαντωθεί πάνω κάτω στη συχνότητα συντονισμού του. Μια εικόνα μέσω της μεθόδου αυτής παρέχεται από την απεικόνιση της δύναμης που ασκεί η ταλαντευόμενη αιχμή με την επιφάνεια του δείγματος. Τα κυριότερα πλεονεκτήματα αυτής της μεθόδου είναι η μείωση των πλευρικών δυνάμεων οι οποίες μπορεί να κινήσουν ή να καταστρέψουν το δείγμα. Αυτή η μέθοδος έχει πρόσφατα προσαρμοστεί για απεικόνιση σε υγρά και είναι ιδιαίτερα κατάλληλη για απεικόνιση βιολογικών δειγμάτων ασθενώς απορροφημένων από την επιφάνεια. Ωστόσο η κάθετη δύναμη μπορεί να έχει μια απόλυτη τιμή συγκρίσιμη με αυτή στην *contact mode*, ειδικά στα υγρά, όπου η δύναμη προσκόλλησης απουσιάζει.

Για αυτό τα βιολογικά δείγματα ακόμα αποδιαμορφώνονται αν και που δεν μετακινούνται πλευρικά από την ακίδα. Ωστόσο, εξαιτίας της ελάττωσης της πλευρικής δύναμης, αυτή η μέθοδος χρησιμοποιείται όλο και περισσότερο για απεικόνιση βιολογικών δειγμάτων στον αέρα και στα υγρά.<sup>[16,17,26]</sup>



Εικόνα 2.6 *Tapping mode* Η ακίδα ταλαντώνεται ακουμπώντας την επιφάνεια του δείγματος

## **2.6 Απεικονιστική μικροσκοπία AFM για μελέτη κολλαγόνου**

### **2.6.1 Ιστορική αναδρομή**

Η πρώτη απόπειρα μελέτης κολλαγόνου έγινε από τους Chernoff et al όπου για πρώτη φορά παρατηρήθηκαν αμυδρές ίνες κολλαγόνου. Το πρόβλημα όμως ήταν ότι δεν απεικονίστηκε ο χαρακτηριστικός D-σταυροδεσμός. Στη συνέχεια οι Baselt και Revenko κατάφεραν να απεικονίσουν ίνες με το χαρακτηριστικό D-σταυροδεσμό με τη βοήθεια του AFM. Ο Gutschmann και οι συνεργάτες του προχώρησαν ένα βήμα πιο πέρα καθώς παρουσίασαν μια λεπτομερέστατη μελέτη ινών κολλαγόνου που πάρθηκαν από τένοντες ουράς ποντικιού. Το αποτέλεσμα που προέκυψε ήταν ότι η ίνα του κολλαγόνου αποτελείται από ένα σκληρό περίβλημα με την δομή στο εσωτερικό του να είναι μικρότερης πυκνότητας με αποτέλεσμα να έχει τα χαρακτηριστικά της ευλυγισίας και της ελαστικότητας. Σε μια μετέπειτα δημοσίευση ο Gutschmann και οι συνεργάτες του προσπάθησαν να συνδέσουν την αντοχή της ίνας με τον D-σταυροδεσμό της κάτι που δεν ήταν δυνατόν καθώς η ‘αντοχή’ της ίνας δεν εξαρτάται από ένα μόνο χαρακτηριστικό. Γενικά τα περισσότερα αποτελέσματα που πάρθηκαν με τη βοήθεια του AFM ήταν σε συμφωνία με τη δομή της ίνας του κολλαγόνου.

### **2.6.2 Μελέτη του κολλαγόνου με μικροσκοπία ατομικής δύναμης**

Οι έρευνες σήμερα, στην περίπτωση του κολλαγόνου, γίνονται σε διάφορες κατευθύνσεις όπως στη μελέτη της μορφολογίας των ινών κολλαγόνου ,τόσο από φυσικό κολλαγόνο (δεν έχει υποστεί επεξεργασία και προέρχεται απευθείας από τον οργανισμό) όσο και από επεξεργασμένο κολλαγόνο. Επίσης ερευνάται η μορφολογία του μονομερούς κολλαγόνου (του τροποκολλαγόνου, του μορίου δηλαδή του κολλαγόνου) όπως και η μελέτη των μηχανικών ιδιοτήτων του κολλαγόνου, τόσο σε επίπεδο ίνας όσο και σε μοριακό επίπεδο . Απαιτείται και στις δύο περιπτώσεις ειδική προετοιμασία του δείγματος. Το ‘φυσικό’ κολλαγόνο αφαιρείται από βιολογικό ιστό (όπως από ουρές ποντικών) και εν συνεχεία αποχωρίζονται οι ίνες του είτε σε απεσταγμένο νερό είτε σε διάλυμα NaCl με τη βοήθεια νυστεριού.

Οι καλύτερες ίνες από αυτές που έχουν αποχωριστεί τοποθετούνται σε υπόστρωμα mica και αποξηραίνονται στον ατμοσφαιρικό αέρα. Το ανασχηματισμένο κολλαγόνο προέρχεται από διάλυση φυσικού κολλαγόνου σε οξικό οξύ και τοποθέτηση του πάνω σε υπόστρωμα mica όπου αποξηραίνεται. Ένα από τα βασικά πλεονεκτήματα της μικροσκοπίας ατομικής δύναμης είναι η δυνατότητα για μελέτη του κολλαγόνου κάτω από φυσιολογικές συνθήκες. Έχουν γίνει πολλές μελέτες των ινών κολλαγόνου χρησιμοποιώντας μια σειρά από πειραματικές τεχνικές, αλλά πιο πρόσφατα η μικροσκοπία ατομικής δύναμης έχει χρησιμοποιηθεί για την μελέτη του κολλαγόνου κάτω από φυσιολογικές συνθήκες, το οποίο ήταν ανέφικτο από προηγούμενες τεχνικές όπως η κρυσταλλογραφία διάθλασης ακτίνων-X ή μικροσκοπία διάδοσης ηλεκτρονίων (TEM). Με τη χρήση του AFM οι ερευνητές έχουν τη δυνατότητα σύγκρισης αποτελεσμάτων μοριακής κλίμακας με αποτελέσματα μακρο-κλίμακας καθώς μπορεί όχι μόνο να απεικονίζει αλλά και να εκτελεί μετρήσεις δύναμης.<sup>[27,2830,31]</sup>

## 2.7 Μελέτη τοπογραφίας και μηχανικών ιδιοτήτων μορίου κολλαγόνου

Παρόλο που η μηχανική συμπεριφορά των τενόντων και των οστών μελετάται για δεκαετίες, υπάρχει ακόμα σχετικά μικρή κατανόηση της μοριακής βάσης για τις συγκεκριμένες ιδιότητες τους. Αν και δομικά αποτελούνται από το ίδιο κολλαγόνο τύπου I, τα κόκαλα και οι τένοντες έχουν αναπτύξει διαφορετικές λειτουργίες στους ζωντανούς οργανισμούς. Σε μια προσπάθεια κατανόησης της σύνδεσης μεταξύ των μηχανικών ιδιοτήτων αυτών των δομών κολλαγόνου στη μακρο- και μικρο-κλίμακα, γίνεται μελέτη με AFM σε μόρια τροποκολλαγόνου από κολλαγόνο τύπου I, τόσο τοπολογικά όσο και με φασματοσκοπία δύναμης.

Έχουν γίνει λίγες έρευνες της δομής του κολλαγόνου στο επίπεδο της τριπλής έλικας του μορίου του τροποκολλαγόνου χρησιμοποιώντας AFM. Έχει παρουσιαστεί μια επιστημονική ανάλυση για *in vitro* επαγόμενη διαμόρφωση πλέγματος κολλαγόνου σε δύο διαστάσεις, όπου κατόρθωσαν να απομονώσουν ένα ξεχωριστό μονομερές κολλαγόνου και παρατηρήθηκε ότι το μονομερές δεν υφίσταται μετουσίωση κατά την προσρόφηση σε φύλλο mica.

Άλλα αποτελέσματα έδειξαν ότι ο προσανατολισμός που επιτεύχθηκε σε μια επιφάνεια mica εξαρτάται από τη συγκέντρωση του μονομερούς που χρησιμοποιήθηκε. Αυτό είναι ένα πρώτο βήμα για την ελεγχόμενη εναπόθεση, το επιφανειακό πρότυπο και την ινιδιογένεση. Διαδικασίες οι οποίες πρέπει να ελεγχτούν και ρυθμιστούν για την ανάπτυξη τεχνητών υλικών με βάση το κολλαγόνο προκειμένου να αξιοποιηθούν στη μηχανική των ιστών.

Η κατανόηση της μηχανικής απόκρισης του τροποκολλαγόνου τύπου I μπορεί να οδηγήσει σε μια πιο ολοκληρωμένη κατανόηση των χαρακτηριστικών των καμπυλών δύναμης-τάνυσης των τενόντων. Τα αποτελέσματα τέτοιων δεδομένων μπορούν να οδηγήσουν σε καλύτερη κατανόηση των βλαβών που προκαλούνται στους τένοντες. Αυτές, λοιπόν οι μελέτες είναι μια προκαταρκτική προσέγγιση, για ένα ολοκληρωμένο μοντέλο του κολλαγόνου, ξεκινώντας από ένα ξεχωριστό μόριο μέχρι ολόκληρο ιστό.

## 2.8 Βιβλιογραφία

- [1] S. Kasas, N. H. Thomson, B. L. Smith, P. K. Hansma, J. Miklossy, H. G. Hansma, “Biological Applications of the AFM: From Single Molecules to Organs”, *Int. J. Imag. Syst. Tech.*, 8, 151–161 (1997)
- [2] B. Samori, C. Nigro, V. Armentano, S. Cimieri, G. Zuccheri, and C. Quagliariello. “DNA supercoiling imaged in 3 dimensions by scanning force microscopy”, *Angew. Chem. Int. Edit.*, 32, 1461–1463 (1993)
- [3] H. G. Hansma, D. E. Laney, M. Bezanilla, R. L. Sinsheimer, and P. K. Hansma. “Applications for atomic force microscopy of DNA”, *Biophys. J.*, 68, 1672–1677 (1995)
- [4] N. H. Thomson, S. Kasas, B. Smith, H. G. Hansma, and P. K. Hanassemsma. “Reversible binding of DNA to mica for AFM imaging”, *Langmuir*, 12, 5905–5908 (1996)
- [5] S. Karrasch, M. Dolder, F. Schabert, J. Ramsden, and A. Engel. “Covalent binding of biological samples to solid supports for scanning probe microscopy in buffer solution”, *Biophys. J.*, 65, 2437–2446 (1993) .
- [6] S. Karrasch, R. Hegerl, J. H. Hoh, W. Baumeister, and A. Engel. “Atomic force microscopy produces faithful high-resolution images of protein surfaces in an aqueous environment”, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 91, 836–838 (1994) .
- [7] W. H. Han, J. X. Mou, J. Sheng, J. Yang, and Z. F. Shao. “Cryoatomic force microscopy—a new approach for biological imaging at high resolution”, *Biochemistry*, 34, 8215–8220 (1995) .
- [8] S. Kasas, N. H. Thomson, B. L. Smith, H. G. Hansma, X. Zhu, M. Guthold, C. Bustamante, E. T. Kool, M. Kashiev, and P. K. Hansma. “Escherichia coli RNA polymerase activity observed using atomic force microscopy”, *Biochemistry*, 26, 461–468 (1997)
- [9] Y. L. Lyubchenko, P. I. Oden, D. Lampner, S. M. Lindsay, and K. A. Dunker. “Atomic force microscopy of DNA and bacteriophage in air, water and propanol—the role of adhesion forces”, *Nucleic AcidsRes.*, 21, 1117–1123 (1993)
- [10] H. J. Butt, E. K. Wolff, S. A. C. Gould, B. D. Northern, C. M. Peterson, and P. K. Hansma. “Imaging cells with the atomic force microscope”, *J. Struct. Biol.*, 105, 54–61 (1990).

- [11] M. Radmacher, R. W. Tillmann, M. Fritz, and H. E. Gaub. “From molecules to cells—imaging soft samples with the atomic force microscope”, *Science*, 257, 1900–1905 (1992) .
- [12] S. Kasas, A. Berdal, and M. R. Celio. “Tooth structure studied using the atomic force microscope”, *SPIE Proc.*, 1855, 17–25 (1993).
- [13] T. Ushiki, M. Shigeno, and K. Abe. “Atomic force microscopy of embedment-free sections of cells and tissues”, *Arch. Histol. Cytol.*, 57, 427–432 (1994) .
- [14] N. J. Fullwood, A. Hammiche, H. M. Pollock, D. J. Hourston, and M. Song. “Atomic force microscopy of the cornea and sclera”, *Curr. Eye Res.*, 14, 529–535 (1995) .
- [15] I. Aragno, P. Odetti, F. Altamura, O. Cavalleri, and R. Rolandi. “Structure of rat tail tendon collagen examined by atomic force microscope”, *Experientia*, 51, 1063–1067 (1995) .
- [16] D. R. Baselt, J. P. Revel, and J. D. Baldeschwieler. “Subfibrillar structure of type-I collagen observed by atomic force microscopy,” *Biophys. J.*, 65, 2644–2655 (1993) .
- [17] E. A. G. Chernoff and D. A. Chernoff. “Atomic force microscope images of collagen fibers”, *J. Vac. Sci. Technol. A.*, 10, 596–599 (1992).
- [18] L. J. Gathercole, M. J. Miles, T. J. McMaster, and D. F. Holmes. “Scanning probe microscopy of collagen-I and pn-collagen-I assemblies and the relevance to scanning tunnelling microscopy contrast generation in proteins,” *J. Chem. Soc. Faraday Trans.*, 89, 2589–2594 (1993) .
- [19] P. Odetti, I. Aragno, F. Altamura, and R. Rolandi. “Study of aging rat tail collagen using atomic force microscope,” *Aging Clin. Exp. Res.*, 7, 352–357 (1995) .
- [20] I. Revenko, F. Sommer, D. T. Minh, R. Garrone, and J. M. Franc. “Atomic force microscopy study of the collagen fibre structure,” *Biol. Cell*, 80, 67–69 (1994).
- [21] M. B. Shattuck, M. G. L. Gustafsson, K. A. Fisher, K. C. Yanagimoto, A. Veis, R. S. Bhatnagar, and J. Clarke. “Monomeric collagen imaged by cryogenic force microscopy”, *J. Microsc.* 174, Rp1–Rp2 (1994) .
- [22] L. Bozec and M. Horton “Topography and Mechanical Properties of Single Molecules of Type I Collagen Using Atomic Force Microscopy ” *Biophys. J.*, 88 , 4223–4231 (2005)

- [23] A.J Hodge, J.A. Petruska , A.J. Bailey “The subunit structure of the tropocollagen macromolecule and its relation to various ordered aggregation states.” In: “Structure and Function of Connective and Skeletal Tissue” (Fitton-Jackson S, Harkness RD, Partridge SM, Tristram GR, eds) Butterworths, London, 31-41 (1965)
- [24] M. Marchini, M. Morocutti M, P.P. Castellani , L Leonardi , A. Ruggeri A “The banding pattern of rat tail tendon freezeetched collagen fibrils”, *Connect Tissue Res* 11, 175-184 (1983)
- [25] M. Mertig, U. Thiele, J. Bradt, G. Leibiger, W. Pompe, and H. Wendrock, “Scanning force microscopy and geometric analysis of two dimensional collagen network formation”, *Surf. Interfac. Anal.*, 25, 514–521 (1997)
- [26] Y Sun , Z. Luo, A. Fertala, and K. An. . “Direct quantification of the flexibility of type I collagen monomer”, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 295, 382–386 (2002)
- [27] F.D. Schmitt, C. E. Hall, and M. A. Jakns. 1942. Electron microscopy investigations of the structure of collagens. *J. Cell. Comp. Physiol.*, 20, 11–33 (1942)
- [28] Gutschmann, T., G. E. Fantner, M. Venturoni, A. Ekani-Nkodo, J. B. Thompson, J. H. Kindt, D. E. Morse, D. K. Fygenson, and P. K. Hansma. , “ Evidence that collagen fibrils in tendons are inhomogeneously structured in a tubelike manner”, *Biophys. J.* 84, 2593–2598 (2003)
- [29] Gutschmann, T., G. E. Fantner, J. H. Kindt, M. Venturoni, S. Danielsen, and P. K. Hansma, “ Force spectroscopy of collagen fibers to investigate their mechanical properties and structural organisation”, *Biophys. J.*, 86, 3186–3193 (2004)
- [30] C.K Sun, S.W. Chu, S.P. Tai, and M.C. Chan, “Origins of Backward Second-Harmonic-Generation Emission in a Biological Sample Examined by Laser Scanning Microscopes”, *C.L.E.O.*, 1524-1526 (2005)
- [31] S.W. Chu, S.P. Tai, M.C. Chan, C.K. Sun, I.C. Hsiao, C.H. Lin, Y.C. Chen and B.L. Lin, “Thickness dependence of optical second harmonic generation in collagen fibrils”, *Opt. Express*, 15, 12005-12010 (2007)
- [32] K. Glunde, A.P. Pathak and Z. M. Bhujwalla “Molecular–functional imaging of cancer: to image and imagine”, *Trends Mol. Med.*, 13, 287-297 (2007)



### 3.1 Στατιστική σημαντικότητα πειραματικών αποτελεσμάτων

Με τη βοήθεια της παρακάτω ανάλυσης προσδιορίζεται εάν τα πειραματικά αποτελέσματα που προέκυψαν κατά τη διάρκεια των πειραμάτων έχουν στατιστική σημαντικότητα, δηλαδή προσδιορίζεται η πιθανότητα να οφείλονται σε τυχαίους παράγοντες. Το πρώτο στάδιο είναι η πραγματοποίηση μετρήσεων σε ένα δείγμα αναφοράς, το οποίο έχει θεωρητικά απολύτως ελεγχόμενα φυσικά χαρακτηριστικά (μετρήσεις διαστάσεων ινών κολλαγόνου σε υμένιο κολλαγόνου με ελεγχόμενη διαδικασία δημιουργίας). Στη συνέχεια πραγματοποιούνται πάλι μετρήσεις στα ίδια χαρακτηριστικά υπό την επίδραση εξωτερικών παραγόντων (ακτινοβολία για διάφορους χρόνους). Οι τιμές καταγράφονται σε πίνακα:

Δείγμα Αναφοράς ( $X$ )	Ακτινοβολία για χρόνο $\Delta t_1$ ( $Y$ )	Ακτινοβολία για χρόνο $\Delta t_2$ ( $Z$ )	...	Ακτινοβολία για χρόνο $\Delta t_i$ ( $Q$ )
$X_1$	$Y_1$	$Z_1$	• • •	$Q_1$
$X_2$	$Y_2$	$Z_2$	• • •	$Q_2$
• • •	• • •	• • •	• • •	• • •
$X_N$	$Y_N$	$Z_N$	• • •	$Q_N$

**Πίνακας 3.1** Καταγραφή των μετρήσεων ενός δείγματος αναφοράς

Στη συνέχεια τα στάδια που ακολουθούν είναι:

- ✓ Υπολογισμός μέσου όρου τιμών κάθε διαδικασίας

$$Mean(X) = \frac{X_1 + X_2 + \dots + X_N}{N} = \frac{\sum_{i=1}^N X_i}{N}$$

$$Mean(Y) = \frac{Y_1 + Y_2 + \dots + Y_N}{N} = \frac{\sum_{i=1}^N Y_i}{N}$$

·  
·  
·

$$Mean(Q) = \frac{Q_1 + Q_2 + \dots + Q_N}{N} = \frac{\sum_{i=1}^N Q_i}{N}$$

- ✓ Υπολογισμός μέσου όρου όλων των τιμών

$$\hat{\mu} = \frac{\sum_{i=1}^N X_i + \sum_{i=1}^N Y_i + \dots + \sum_{i=1}^N Q_i}{\sum_{i=1}^N N}$$

- ✓ Υπολογισμός εκτιμώμενης επίδρασης (estimated effect):  $\hat{A}_i = Mean_i - \hat{\mu}$

$$\hat{A}_X = Mean(X) - \hat{\mu}$$

$$\hat{A}_Y = Mean(Y) - \hat{\mu}$$

·  
·  
·

$$\hat{A}_Q = Mean(Q) - \hat{\mu}$$

- ✓ Υπολογισμός βαθμών ελευθερίας

Έχουμε  $k$  συνθήκες (X,Y,...Q)  $\Rightarrow df_{treat} = k - 1$

Έχουμε  $\sum_{i=1}^N N$  μετρήσεις  $\Rightarrow df_{tot} = \sum_{i=1}^N N - 1$

$$df_{treat} + df_{res} = df_{tot} \Rightarrow df_{res} = df_{tot} - df_{treat}$$

- ✓ Υπολογισμός αθροίσματος τετραγώνων (SS<sub>treat</sub> = "sum of squares between treatment groups")

$$SS_{treat} = \sum A_i^2 \cdot \text{αριθ. μετρήσεων}$$

- ✓ Υπολογισμός ολικού αθροίσματος τετραγώνων (SS<sub>tot</sub> = "Total sum of squares")

$$SS_{tot} = \sum_{i=1}^N (X_i - \bar{\mu})^2 + \sum_{i=1}^N (Y_i - \bar{\mu})^2 + \dots + \sum_{i=1}^N (Q_i - \bar{\mu})^2$$

$$SS_{tot} = SS_{treat} + SS_{res} \Rightarrow SS_{treat} = SS_{tot} - SS_{res}$$

Για τον υπολογισμό των 'μέσων τετραγώνων' MS (mean square) γενικά ισχύει:

$$MS = \frac{SS}{df}$$

$$MS_{treat} = \frac{SS_{treat}}{df_{treat}}$$

$$MS_{res} = \frac{SS_{res}}{df_{res}}$$

$$F = \frac{MS_{treat}}{MS_{res}}$$

Ανάλογα με τους βαθμούς ελευθερίας του εκάστοτε προβλήματος, υπολογίζεται η τιμή του  $F$  και από κατάλληλους πίνακες προσδιορίζεται η  $p$  – value.

Οι αποδεκτές τιμές της  $p$  – value στη διεθνή βιβλιογραφία είναι  $p < 0,05$ , που σημαίνει ότι η πιθανότητα τα πειραματικά αποτελέσματα να έχουν προέλθει από τυχαίους παράγοντες είναι  $< 5\%$ . Ανάλογα με το όριο στατιστικής σημαντικότητας γίνεται και η αναζήτηση του εκάστοτε πίνακα. Όρια στατιστικής σημαντικότητας:

$$p < 0,05$$

$$p < 0,01$$

$$p < 0,001$$

$$p < 0,0001$$

.

.

.

Στη συνέχεια ακολουθεί πίνακας με τις ανώτατες τιμές του  $F$  στο όριο στατιστικής σημαντικότητας  $p < 0,05$  ανάλογα με τους βαθμούς ελευθερίας.

**Critical values of  $F$  for the 0.05 significance level:**

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
1	161.45	199.50	215.71	224.58	230.16	233.99	236.77	238.88	240.54	241.88
2	18.51	19.00	19.16	19.25	19.30	19.33	19.35	19.37	19.39	19.40
3	10.13	9.55	9.28	9.12	9.01	8.94	8.89	8.85	8.81	8.79
4	7.71	6.94	6.59	6.39	6.26	6.16	6.09	6.04	6.00	5.96
5	6.61	5.79	5.41	5.19	5.05	4.95	4.88	4.82	4.77	4.74
6	5.99	5.14	4.76	4.53	4.39	4.28	4.21	4.15	4.10	4.06
7	5.59	4.74	4.35	4.12	3.97	3.87	3.79	3.73	3.68	3.64
8	5.32	4.46	4.07	3.84	3.69	3.58	3.50	3.44	3.39	3.35
9	5.12	4.26	3.86	3.63	3.48	3.37	3.29	3.23	3.18	3.14
10	4.97	4.10	3.71	3.48	3.33	3.22	3.14	3.07	3.02	2.98
11	4.84	3.98	3.59	3.36	3.20	3.10	3.01	2.95	2.90	2.85
12	4.75	3.89	3.49	3.26	3.11	3.00	2.91	2.85	2.80	2.75
13	4.67	3.81	3.41	3.18	3.03	2.92	2.83	2.77	2.71	2.67
14	4.60	3.74	3.34	3.11	2.96	2.85	2.76	2.70	2.65	2.60
15	4.54	3.68	3.29	3.06	2.90	2.79	2.71	2.64	2.59	2.54
16	4.49	3.63	3.24	3.01	2.85	2.74	2.66	2.59	2.54	2.49
17	4.45	3.59	3.20	2.97	2.81	2.70	2.61	2.55	2.49	2.45
18	4.41	3.56	3.16	2.93	2.77	2.66	2.58	2.51	2.46	2.41
19	4.38	3.52	3.13	2.90	2.74	2.63	2.54	2.48	2.42	2.38
20	4.35	3.49	3.10	2.87	2.71	2.60	2.51	2.45	2.39	2.35
21	4.33	3.47	3.07	2.84	2.69	2.57	2.49	2.42	2.37	2.32
22	4.30	3.44	3.05	2.82	2.66	2.55	2.46	2.40	2.34	2.30
23	4.28	3.42	3.03	2.80	2.64	2.53	2.44	2.38	2.32	2.28
24	4.26	3.40	3.01	2.78	2.62	2.51	2.42	2.36	2.30	2.26
25	4.24	3.39	2.99	2.76	2.60	2.49	2.41	2.34	2.28	2.24
26	4.23	3.37	2.98	2.74	2.59	2.47	2.39	2.32	2.27	2.22
27	4.21	3.35	2.96	2.73	2.57	2.46	2.37	2.31	2.25	2.20
28	4.20	3.34	2.95	2.71	2.56	2.45	2.36	2.29	2.24	2.19
29	4.18	3.33	2.93	2.70	2.55	2.43	2.35	2.28	2.22	2.18
30	4.17	3.32	2.92	2.69	2.53	2.42	2.33	2.27	2.21	2.17
31	4.16	3.31	2.91	2.68	2.52	2.41	2.32	2.26	2.20	2.15
32	4.15	3.30	2.90	2.67	2.51	2.40	2.31	2.24	2.19	2.14
33	4.14	3.29	2.89	2.66	2.50	2.39	2.30	2.24	2.18	2.13
34	4.13	3.28	2.88	2.65	2.49	2.38	2.29	2.23	2.17	2.12
35	4.12	3.27	2.87	2.64	2.49	2.37	2.29	2.22	2.16	2.11

**Πίνακας 3.1** Ανώτατες τιμές του  $F$  στο όριο στατιστικής σημαντικότητας

## 4.1 Πειραματική Διαδικασία

### 4.1.1 Ομογενοποίηση

Χρησιμοποιήθηκε κολλαγόνο τύπου I από αχίλλειο τένοντα βοδινού (*Fluka* 27662), το οποίο διαλύθηκε σε οξικό οξύ ( $\text{CH}_3\text{COOH}$  0.5M) με συγκέντρωση 8mg/ml. Το διάλυμα αυτό αφού ομογενοποιήθηκε, αποθηκεύτηκε σε θερμοκρασία 4°C για 24h. Το pH του διαλύματος κολλαγόνου ήταν περίπου 3.

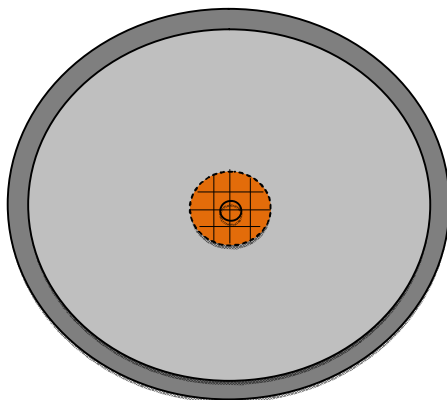


**Εικόνα 4.1** Ομογενοποίηση του δείγματος

### 4.1.2 Επεξεργασία της βάσης του δείγματος

Σε μεταλλικό δίσκο διαμέτρου ~12mm τοποθετείται ένα αυτοκόλλητο διπλής όψης (double face) διαμέτρου περίπου 10mm. Χρησιμοποιείται μεταλλική βάση για να κάνει καλή εφαρμογή με τον μαγνήτη στην ειδική θέση που έχει το AFM για την τοποθέτηση του δείγματος. Τοποθετείται έπειτα ένα πλέγμα βαθμονόμησης (*G2761C Finder Grid F1 Copper της Agar Scientific*) διαμέτρου ~2mm για να βοηθήσει στη μετέπειτα απεικονιστική επεξεργασία στο AFM.

Το πλέγμα κολλάει στο μεταλλικό δισκάκι, λόγω του double face αυτοκόλλητου και πάνω από αυτό κολλάει ένα φύλλο mica διαμέτρου 9.5mm (*fresh cleaved mica discs : V1,71856-01 της Electron Microscopy Science*) έτσι ώστε η επιφάνεια που θα ακουμπάει το διάλυμα κολλαγόνου να είναι όσο πιο λεία γίνεται.



**Εικόνα 4.2** Μεταλλικό δισκάκι και πλέγμα

#### **4.1.3 Τοποθέτηση και περιστροφή δείγματος στη συσκευή φυγόκεντρης επίστρωσης (spin coater)**

Στη συνέχεια, 50 μl από το ομογενοποιημένο διάλυμα του 1<sup>ου</sup> βήματος, εναποτέθηκαν στη βάση που κατασκευάστηκε στο 2<sup>ο</sup> βήμα.

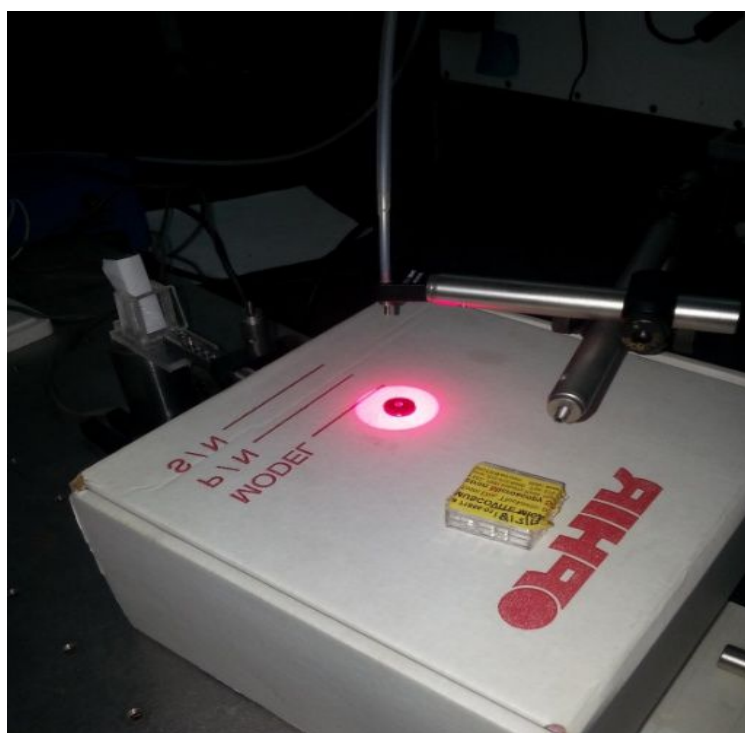
Έπειτα, τοποθετήθηκε στο spin coater (*WS-400B-6NPP/LITE της Laurell Technologies*) με συνθήκες 6000rpm για 40sec. Έχουμε, λοιπόν, τη δυνατότητα επίστρωσης ενός πολύ λεπτού υμενίου κολλαγόνου, το οποίο να είναι τόσο λεπτό ώστε να έχει μια στιβάδα μόνο από ίνες.<sup>[1,2,3,4]</sup>



**Εικόνα 4.3** Spin Coater

#### 4.1.4 Ακτινοβολήση με LASER

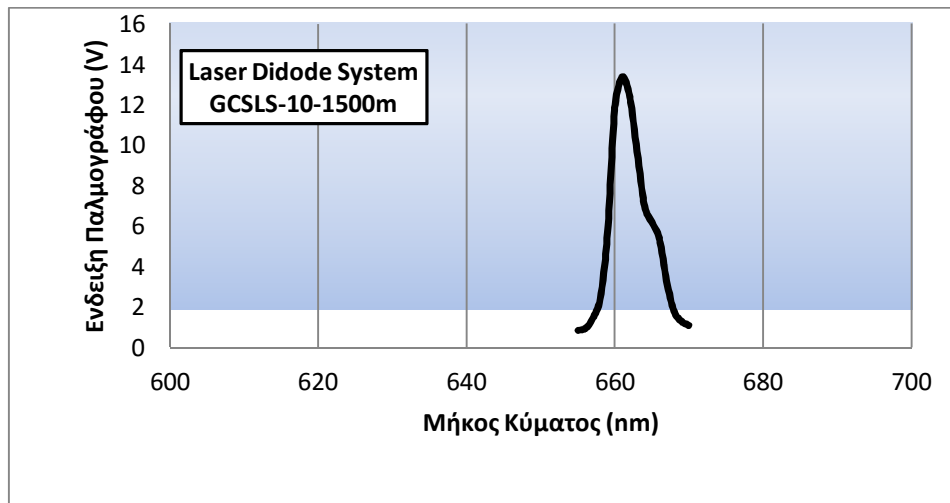
Κατά την πειραματική διαδικασία, διάφορα δείγματα κολλαγόνου ακτινοβολήθηκαν με μονοχρωματικό φως ερυθρού χρώματος (laser) σε διάφορες, στον αριθμό και στη διάρκεια, δόσεις και παράλληλα αποκτήθηκαν εικόνες με το AFM τόσο πριν όσο και μετά την ακτινοβολήση. Για την ακτινοβολήση των διαλυμάτων κολλαγόνου στον αέρα χρησιμοποιήθηκε σύστημα διοδικού laser (GCSLS-10-1500m, China Daheng Group, Inc.) με μήκος κύματος στα 661 nm και εφοδιασμένο με οπτική ίνα με διαχύτη δέσμης επίπεδης κυκλικής συμμετρίας. Η ακτινοβολήση των δειγμάτων πραγματοποιήθηκε σε απόσταση 4 cm από την πηγή της ακτινοβολίας. Η πυκνότητα της ενέργειας της ακτινοβολίας για αυτή την απόσταση για 45 δευτερόλεπτα ήταν  $0,4 \text{ J/cm}^2$ . Η ακτινοβολήση των δειγμάτων επαναλήφθηκε διαδοχικά για περισσότερες επαναλήψεις αυξάνοντας έτσι και τη προσφερόμενη δόση.



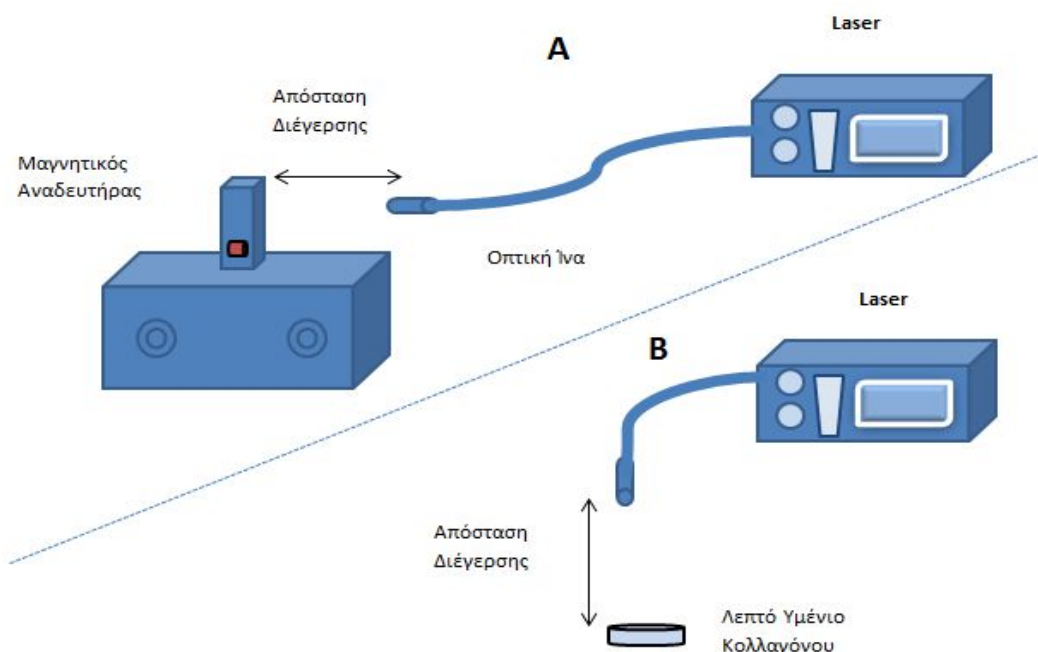
**Εικόνα 4.4** Ακτινοβολήση δείγματος με laser



Πρέπει να σημειωθεί ότι μεταξύ της κάθε επανάληψης το δείγμα αφηνόταν σε ηρεμία, ώστε τα πιθανά παρατηρούμενα φαινόμενα να μην οφείλονται σε θερμικές επιδράσεις της ακτινοβολίας laser. Ο Πίνακας 4.1 παρουσιάζει τις παραμέτρους της ακτινοβολήσης που χρησιμοποιήθηκαν και ο Πίνακας 4.2 τις δόσεις της ακτινοβολήσης και τις μεθόδους χαρακτηρισμού. Η φασματοσκοπία φθορισμού πραγματοποιήθηκε για όλες τις χρησιμοποιούμενες δόσεις, ενώ για την απεικόνιση AFM επιλέχθηκαν πέντε διαφορετικά δείγματα (0, A, B, C, D) για ακτινοβολήση μετά από 0, 5, 10, 15 και 20 επαναλήψεις των 45 sec.<sup>[1,2,4,5,6,7]</sup>



**Εικόνα 4.5** Μήκος κύματος εκπομπής της διάταξης διοδικού laser



**Εικόνα 4.6** Διάταξη ακτινοβολήσης με laser χαμηλής ισχύος

<b>LASER GCSLS-10-1500M</b>	
<b>Frequency</b>	<i>Continuous</i>
<b>Power</b>	<i>7 mW</i>
<b>Power Density</b>	<i>8,9 mW/cm<sup>2</sup></i>
<b>Spot Size</b>	<i>0,785 cm<sup>2</sup></i>
<b>Energy Density</b>	<i>4 J/cm<sup>2</sup></i>
<b>Time per Point</b>	<i>45 sec</i>

**Πίνακας 4.1** Παράμετροι ακτινοβολήσης

<b>Δόσεις</b>			
<b>Επαναλήψεις</b>	<b>Time (sec)</b>	<b>Energy Density (J.cm<sup>-2</sup>)</b>	
<b>0</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	
<b>A</b>	<b>1</b>	<b>45</b>	<b>0,4</b>
	<b>2</b>	<b>90</b>	<b>0,8</b>
	<b>3</b>	<b>135</b>	<b>1,2</b>
	<b>4</b>	<b>180</b>	<b>1,6</b>
	<b>5</b>	<b>225</b>	<b>2,0</b>
	<b>6</b>	<b>270</b>	<b>2,4</b>
	<b>7</b>	<b>315</b>	<b>2,8</b>
	<b>8</b>	<b>360</b>	<b>3,2</b>
<b>B</b>	<b>9</b>	<b>405</b>	<b>3,6</b>
	<b>10</b>	<b>450</b>	<b>4,0</b>
	<b>11</b>	<b>495</b>	<b>4,4</b>
	<b>12</b>	<b>540</b>	<b>4,8</b>
	<b>13</b>	<b>585</b>	<b>5,2</b>
<b>C</b>	<b>14</b>	<b>630</b>	<b>5,6</b>
	<b>15</b>	<b>675</b>	<b>6,0</b>
	<b>16</b>	<b>720</b>	<b>6,4</b>
	<b>17</b>	<b>765</b>	<b>6,8</b>
	<b>18</b>	<b>810</b>	<b>7,2</b>
	<b>19</b>	<b>855</b>	<b>7,6</b>
<b>D</b>	<b>20</b>	<b>900</b>	<b>8,0</b>

**Πίνακας 4.2** Δόσεις και μέθοδοι χαρακτηρισμού

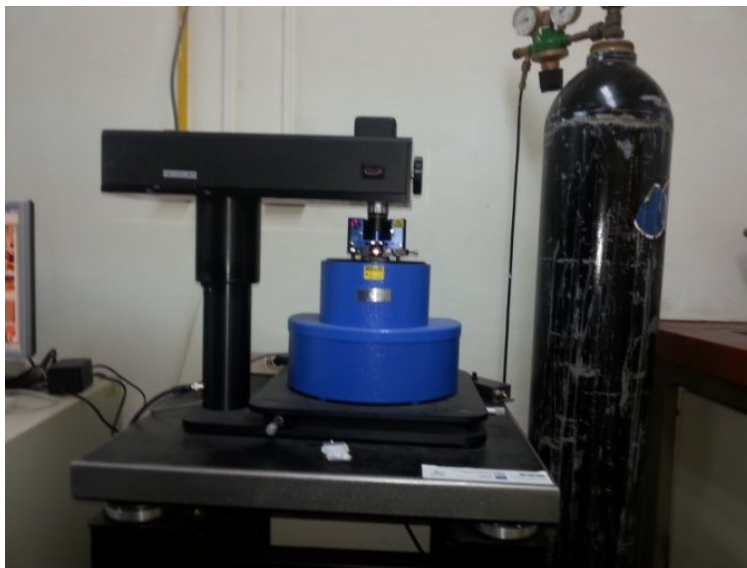
#### 4.1.5 Απεικόνιση στο AFM

Με τη βοήθεια του AFM(*CPII της Veeco*), στο λεπτό υμένιο κολλαγόνου, μπορούν να μελετηθούν ο προσανατολισμός και οι διαστάσεις των ινών και των ινιδίων του κολλαγόνου, αλλά και οι δομικές ιδιότητες μεμονωμένων ινών.

Στο μικροσκόπιο ατομικής δύναμης χρησιμοποιήθηκε η απεικονιστική μέθοδος *contact* με ακίδες σε σχήμα πυραμίδας (τύπου *MLCT της Veeco*). Η εστίαση του μικροσκοπίου πραγματοποιήθηκε σε συγκεκριμένες ίνες του δείγματος με σκοπό την καταγραφή των διαστάσεων της εκάστοτε ίνας αλλά και της *D-Band* αυτής, σε όλα τα στάδια του πειράματος, συγκρίνοντας έτσι τις τυχούσες διαφορές και καταγράφοντας τα κατάλληλα πορίσματα.

Κατά τη μελέτη των δειγμάτων στο AFM χρησιμοποιήθηκε *προβολός (CONT20A-CP)* με τα εξής χαρακτηριστικά:

- Μήκος ( Length = 515 – 535  $\mu\text{m}$  )
- Πάχος ( Thick = 3.5 – 4.5  $\mu\text{m}$  )
- Πλάτος ( width = 30 – 40  $\mu\text{m}$  )
- Σταθερά Ελατηρίου ( K = 0.9 N / m )
- Συχνότητα Ταλάντωσης (  $f_0 = 26 – 25$  kHz ) [μόνο για τη μέθοδο tapping]



**Πίνακας 4.7 Μικροσκόπιο AFM**

Για κάθε δείγμα λήφθηκαν εικόνες σε τρεις διαφορετικές διαστάσεις, 50X50, 10X10 και 2X2 μm σε διάφορες περιοχές του δείγματος.

Όλα τα πειράματα διεξάγονταν στον αέρα και σε θερμοκρασία δωματίου.<sup>[1,2,3,5,6,7]</sup>

#### **4.1.6 Επεξεργασία εικόνων AFM**

Χρησιμοποιώντας τα προγράμματα επεξεργασίας εικόνων, **IP** AutoProbe image, το οποίο συνοδεύει το AFM και το WSxM 5.0 Develop 6.5,<sup>[2,3,5,6]</sup> καταγράφηκαν εννιά διαφορετικές μετρήσεις του ύψους και του πάχους της κάθε ίνας αλλά και του D-Band αυτής και εν συνεχεία υπολογίστηκαν η μέση τιμή και η τυπική απόκλιση των μετρήσεων για κάθε στάδιο του πειράματος ξεχωριστά. Η όλη επεξεργασία αναλύεται στην επόμενη παράγραφο.

## 4.2 Πείραμα διακριτών δόσεων ακτινοβολήσης μικρής χρονικής διάρκειας

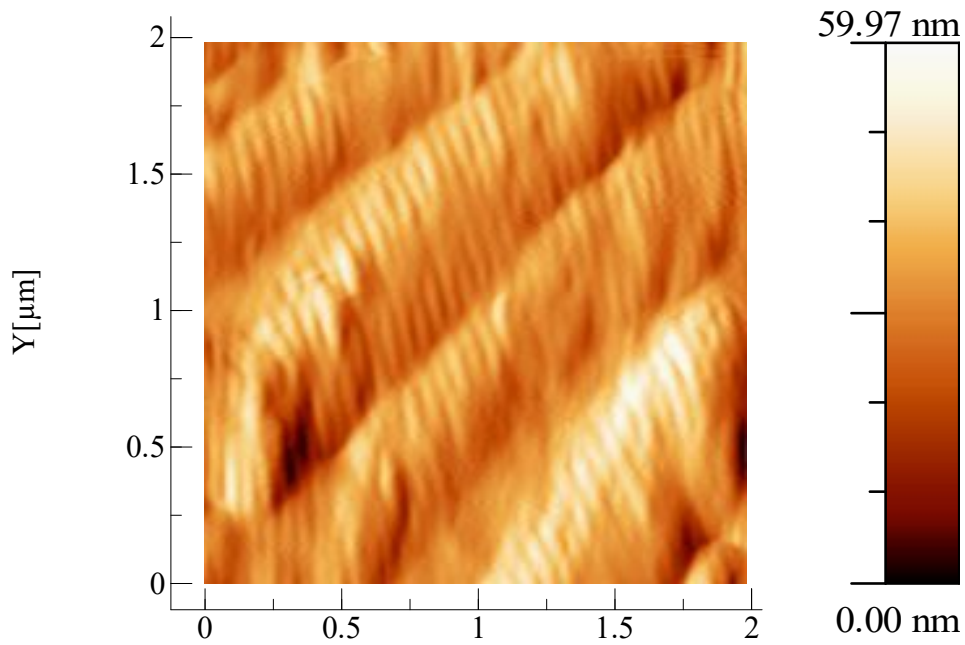
Στο συγκεκριμένο πείραμα πραγματοποιήθηκαν είκοσι ακτινοβολήσεις των σαράντα πέντε δευτερολέπτων στο δείγμα κολλαγόνου, με παύση ενός λεπτού μετά από την κάθε μία. Το συγκεκριμένο δείγμα κολλαγόνου δημιουργήθηκε δέκα μέρες πριν το πείραμα και έτσι δεν πρόλαβαν οι ίνες και τα D-Band αυτών να μορφοποιηθούν κατάλληλα. Παρ' όλα αυτά με την χρήση ακτίνας laser παρατηρείται ότι η D-Band σχηματίζεται ταχέως και εν τέλει μετά από τις είκοσι πέντε ακτινοβολήσεις είναι όχι μόνο εμφανής αλλά και μετρήσιμη. Επίσης λόγω δυσκολίας καταγραφής των γεωμετρικών χαρακτηριστικών των ινών, το πείραμα επικεντρώθηκε και στη διαμόρφωση του πάχους των ινών που η διαφορά πριν και μετά το laser είναι εμφανής. Οι ίνες δεν έχουν πάρει ακόμα την απαιτούμενη κυλινδρική μορφή και έτσι το ύψος σε αυτό το στάδιο των πειραμάτων αγνοήθηκε. Οι μετρήσεις που καταγράφηκαν πριν την χρήση laser αλλά και μετά από κάθε πέντε δόσεις παρουσιάζονται παρακάτω.

Στους πίνακες που ακολουθούν καταγράφονται 9 διαφορετικές μετρήσεις του πάχους της ίνας χωρίς αλλά και μετά από κάθε ακτινοβολήση. Ο τρόπος με τον οποίο πραγματοποιήθηκε η κάθε μέτρηση φαίνεται στην επόμενη εικόνα. Οι εικόνες είναι screen shots από το πρόγραμμα πρόγραμμα WSxM 5.0 Develop 6.5.

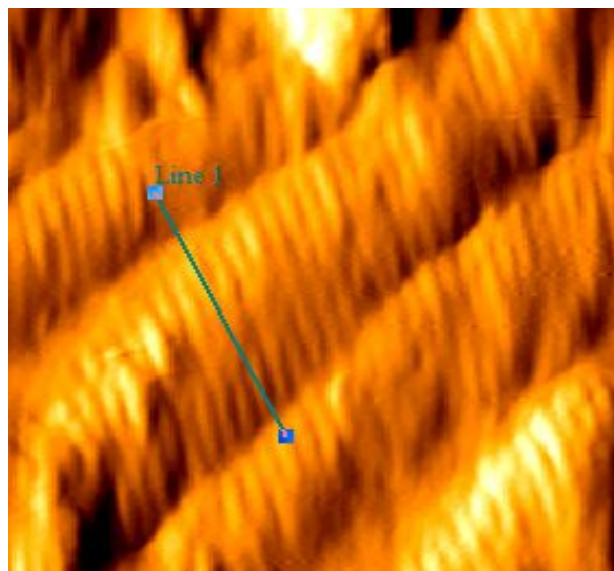
Δείγμα χωρίς ακτινοβολήση :

	Πάχος (nm)
Μέτρηση 1	599.0
Μέτρηση 2	590.0
Μέτρηση 3	644.0
Μέτρηση 4	622.0
Μέτρηση 5	614.0
Μέτρηση 6	588.0
Μέτρηση 7	592.0
Μέτρηση 8	596.0
Μέτρηση 9	599.0
Μέση τιμή	<b>604.9</b>
Τυπική Απόκλιση	<b>18.5</b>

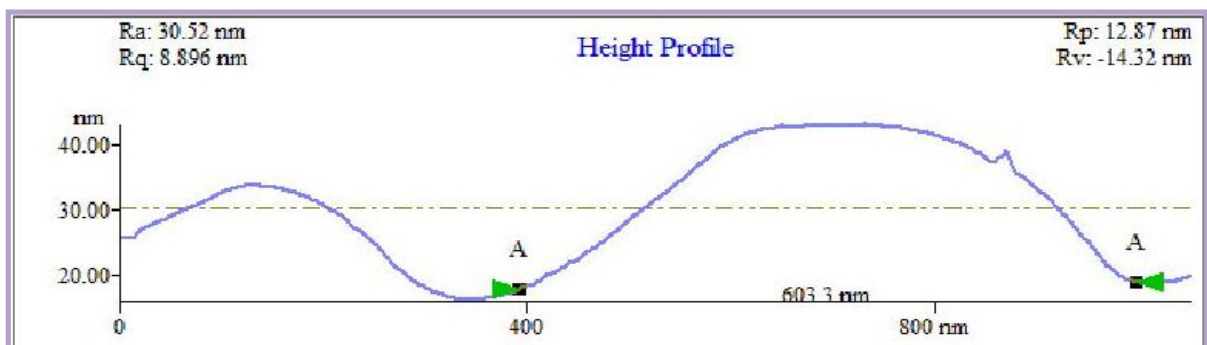
**Πίνακας 4.3** Μετρήσεις των παχών της ίνας χωρίς ακτινοβολήση και υπολογισμός της μέσης τιμής και της τυπικής απόκλισης



**Εικόνα 4.8** Εικόνα 2μm x 2μm της ίνας με το πρόγραμμα *WSxM 5.0 Develop 6.5*



**Εικόνα 4.9** Εικόνα 2μm x 2μm, μέτρηση της ίνας με το πρόγραμμα *IP AutoProbe*



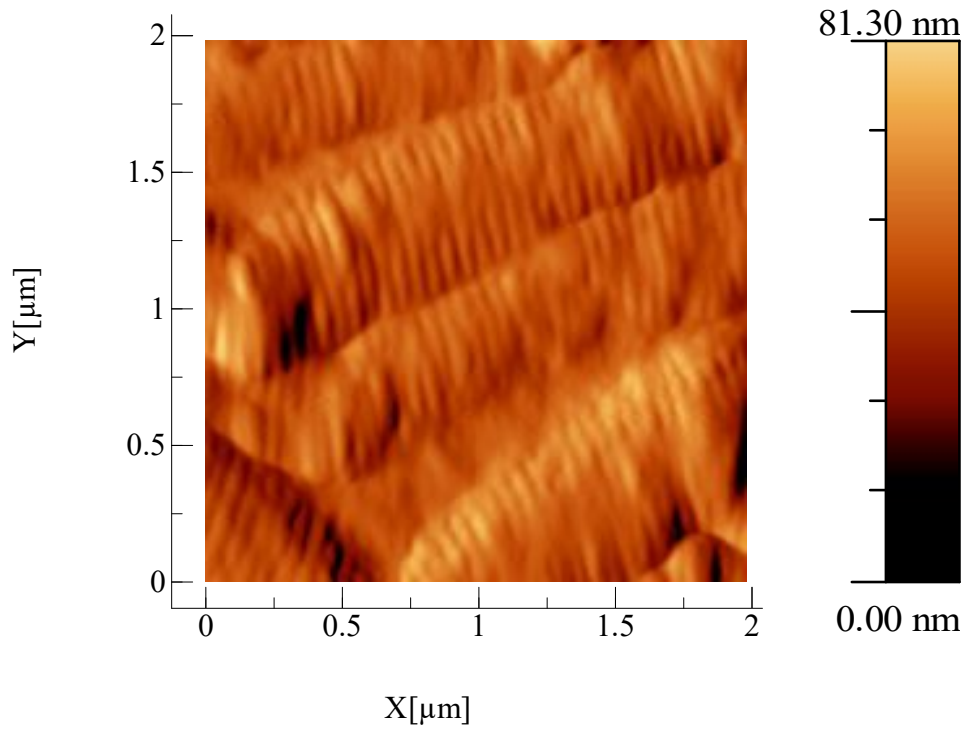
**Εικόνα 4.10** Τοπική μέτρηση πάχους της ίνας με το πρόγραμμα *IP AutoProbe image*

Δείγμα μετά τις πέντε πρώτες ακτινοβολήσεις των 45 sec ανά 1 min :

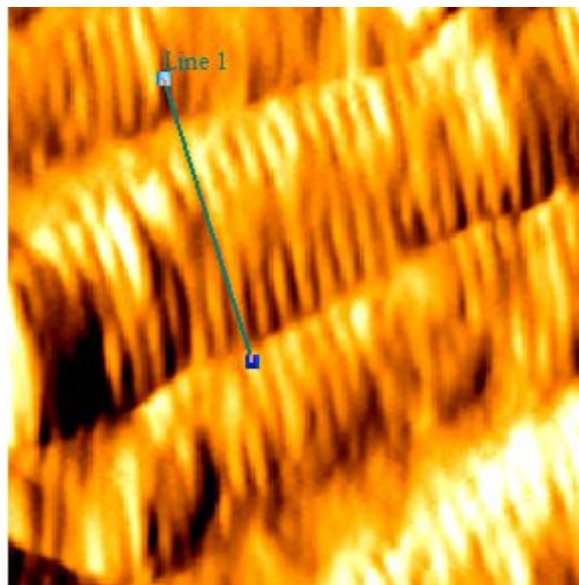
	Πάχος (nm)
Μέτρηση 1	574.0
Μέτρηση 2	572.0
Μέτρηση 3	578.0
Μέτρηση 4	595.0
Μέτρηση 5	599.0
Μέτρηση 6	582.0
Μέτρηση 7	575.0
Μέτρηση 8	576.0
Μέτρηση 9	562.0
Μέση τιμή	<b>579.2</b>
Τυπική Απόκλιση	<b>11.4</b>

**Πίνακας 4.4** Μετρήσεις των παχών της ίνας μετά τις πέντε πρώτες ακτινοβολήσεις και υπολογισμός της μέσης τιμής και της τυπικής απόκλισης

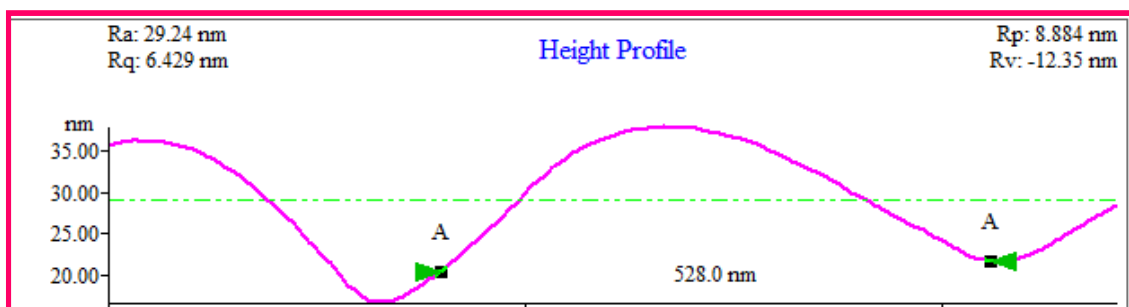




**Εικόνα 4.11** Εικόνα 2μm x 2μm της ίνας με το πρόγραμμα *WSxM 5.0 Develop 6.5*



**Εικόνα 4.12** Εικόνα 2μm x 2μm, μέτρηση της ίνας με το πρόγραμμα *IP AutoProbe*

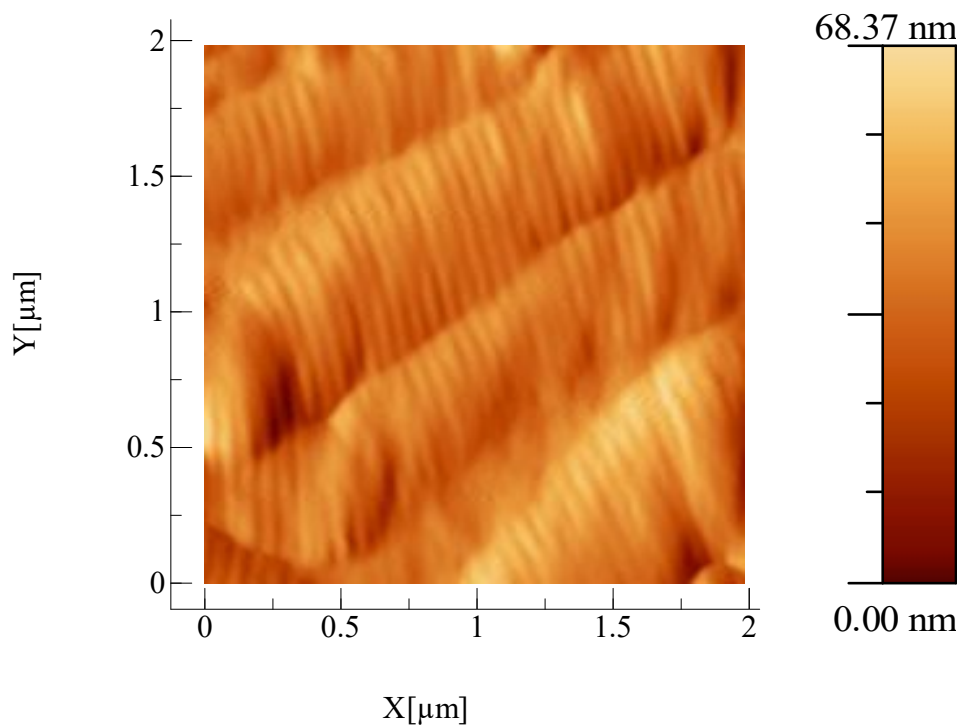


**Εικόνα 4.13** Τοπική μέτρηση πάχους της ίνας με το πρόγραμμα *IP AutoProbe image*

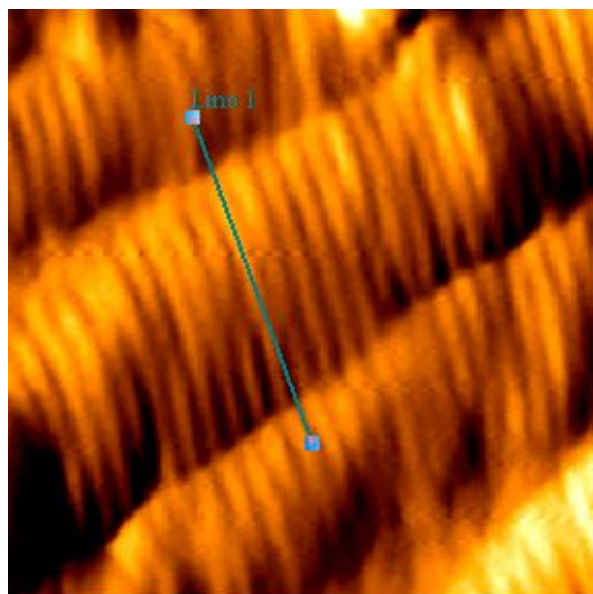
Δείγμα μετά τις δέκα πρώτες ακτινοβολήσεις των 45 sec ανά 1 min :

	Πάχος (nm)
Μέτρηση 1	557.0
Μέτρηση 2	551.0
Μέτρηση 3	600.0
Μέτρηση 4	551.0
Μέτρηση 5	542.0
Μέτρηση 6	558.0
Μέτρηση 7	539.0
Μέτρηση 8	525.0
Μέτρηση 9	495.0
Μέση τιμή	546.4
Τυπική Απόκλιση	28.1

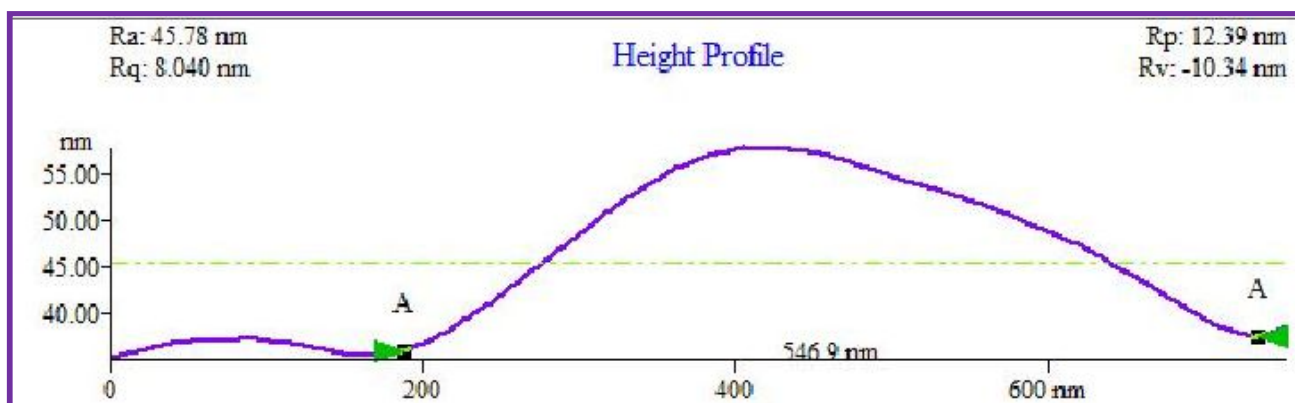
**Πίνακας 3.5** Μετρήσεις των παχών της ίνας μετά τις δέκα πρώτες ακτινοβολήσεις και υπολογισμός της μέσης τιμής και της τυπικής απόκλισης



**Εικόνα 4.14** Εικόνα 2μm x 2μm της ίνας με το πρόγραμμα WSxM 5.0 Develop 6.5



**Εικόνα 4.15** Εικόνα 2μm x 2 μm, μέτρηση της ίνας με το πρόγραμμα IP AutoProbe

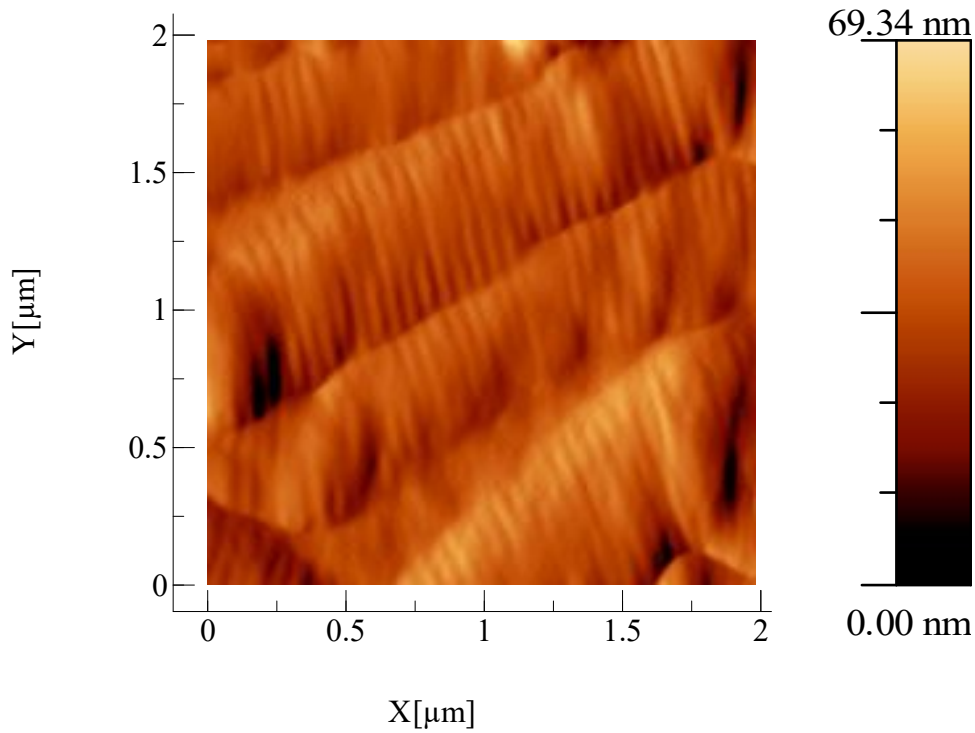


**Εικόνα 4.16** Τοπική μέτρηση πάχους της ίνας με το πρόγραμμα IP AutoProbe image

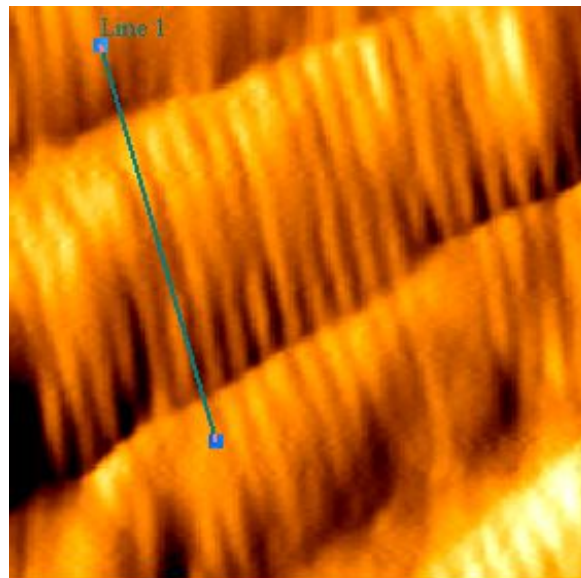
Δείγμα μετά τις δέκα πέντε πρώτες ακτινοβολήσεις των 45 sec ανά 1 min :

	Πάχος (nm)
Μέτρηση 1	572.0
Μέτρηση 2	556.0
Μέτρηση 3	588.0
Μέτρηση 4	455.0
Μέτρηση 5	415.0
Μέτρηση 6	496.0
Μέτρηση 7	483.0
Μέτρηση 8	422.0
Μέτρηση 9	475.0
Μέση τιμή	<b>495.8</b>
Τυπική Απόκλιση	<b>63.4</b>

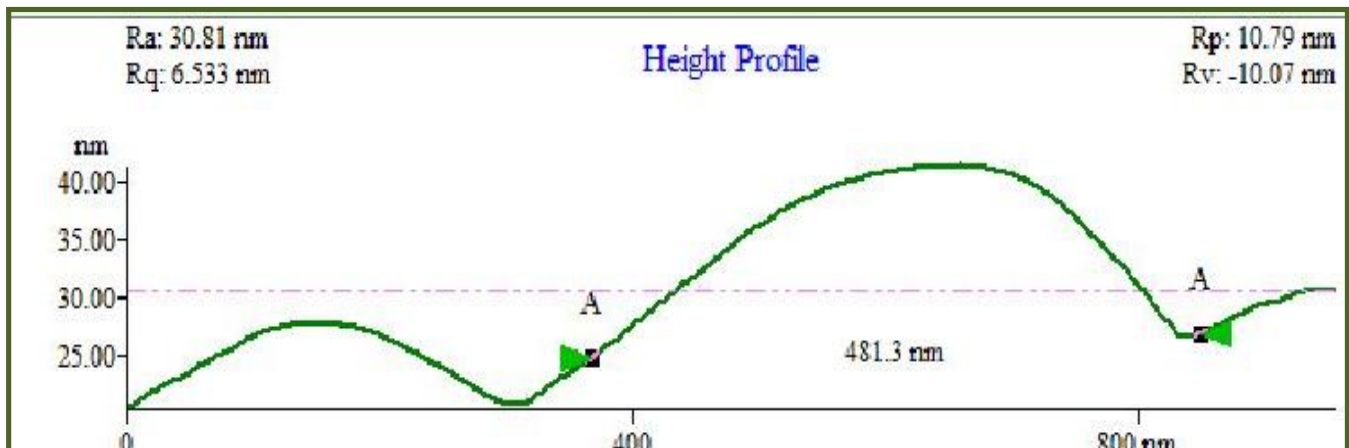
**Πίνακας 4.6** Μετρήσεις των παχών της ίνας μετά τις δέκα πέντε πρώτες ακτινοβολήσεις και υπολογισμός της μέσης τιμής και της τυπικής απόκλισης



**Εικόνα 4.17** Εικόνα 2  $\mu\text{m}$  x 2  $\mu\text{m}$  της ίνας με το πρόγραμμα *WSxM 5.0 Develop 6.5*



**Εικόνα 4.18** Εικόνα 2  $\mu\text{m}$  x 2  $\mu\text{m}$ , μέτρηση της ίνας με το πρόγραμμα *IP AutoProbe image*

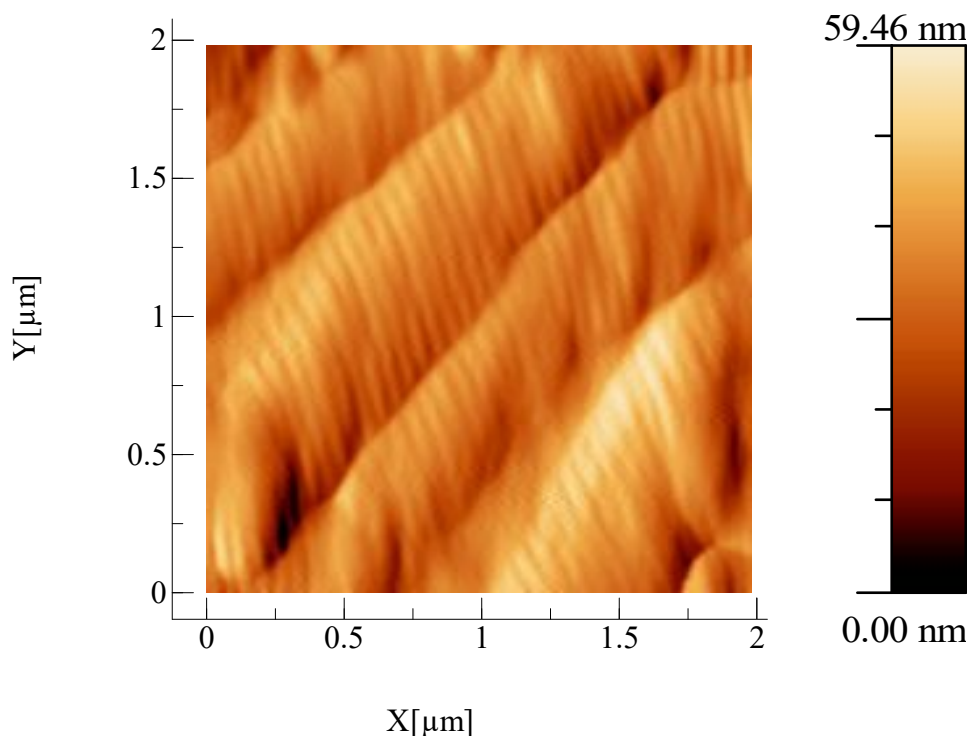


**Εικόνα 4.19** Τοπική μέτρηση πάχους της ίνας με το πρόγραμμα *IP AutoProbe image*

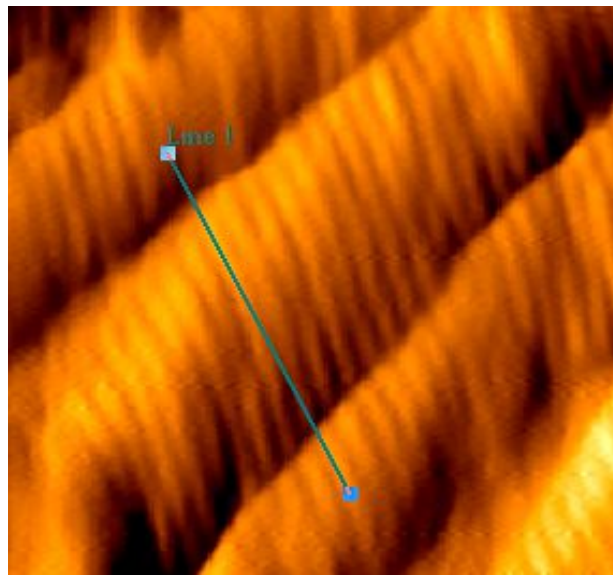
Δείγμα μετά τις είκοσι ακτινοβολήσεις των 45 sec ανά 1 min :

	Πάχος (nm)
Μέτρηση 1	529.0
Μέτρηση 2	558.0
Μέτρηση 3	442.0
Μέτρηση 4	412.0
Μέτρηση 5	422.0
Μέτρηση 6	431.0
Μέτρηση 7	415.0
Μέτρηση 8	419.0
Μέτρηση 9	442.0
Μέση τιμή	452.2
Τυπική Απόκλιση	53.3

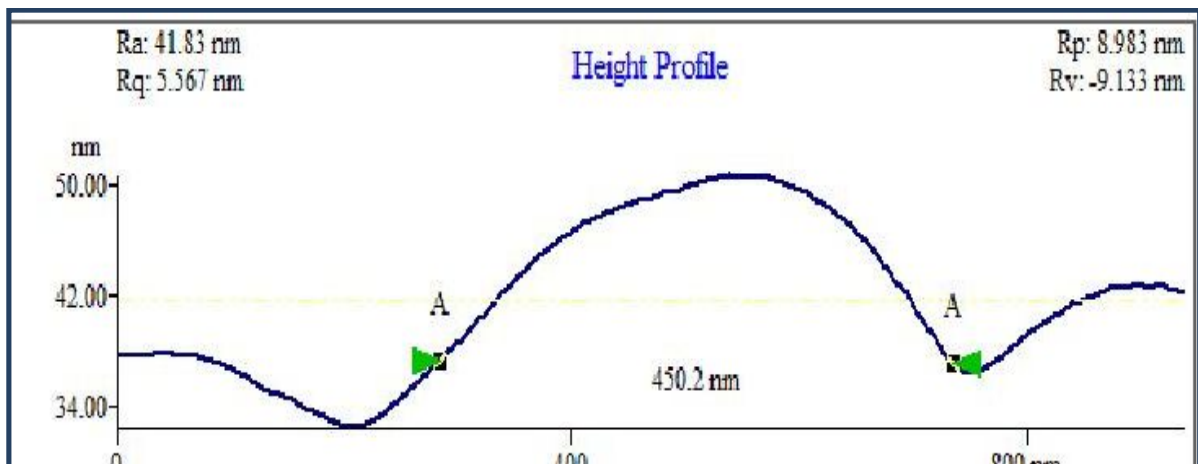
*Πίνακας 4.7 Μετρήσεις των παχών της ίνας μετά τις είκοσι ακτινοβολήσεις και υπολογισμός της μέσης τιμής και της τυπικής απόκλισης*



**Εικόνα 4.20** Εικόνα 2μm x 2μm της ίνας με το πρόγραμμα WSxM 5.0 Develop 6.5

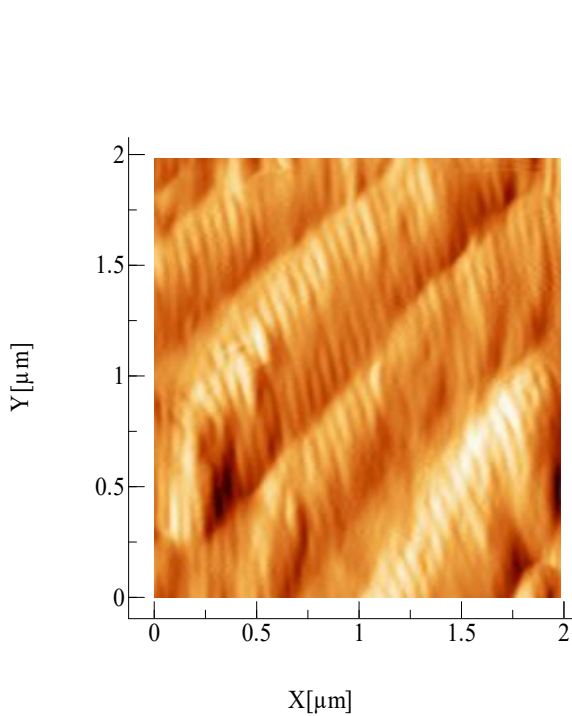


**Εικόνα 4.21** Εικόνα 2μm x 2μm, μέτρηση της ίνας με το πρόγραμμα IP AutoProbe

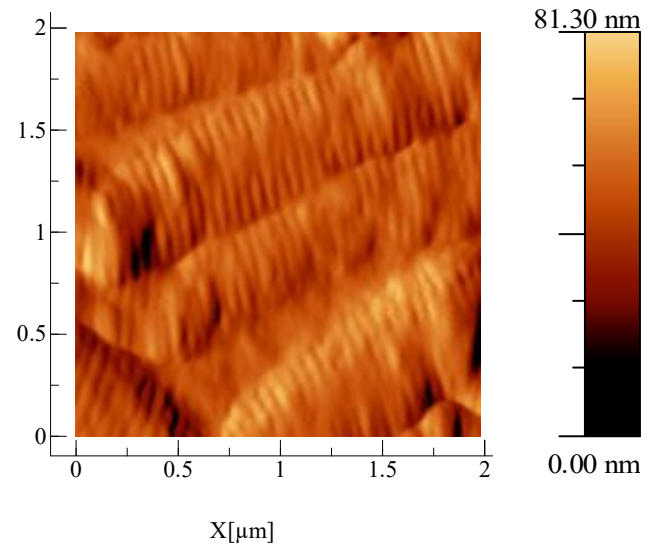


**Εικόνα 4.22** Τοπική μέτρηση πάχους της ίνας με το πρόγραμμα IP AutoProbe image

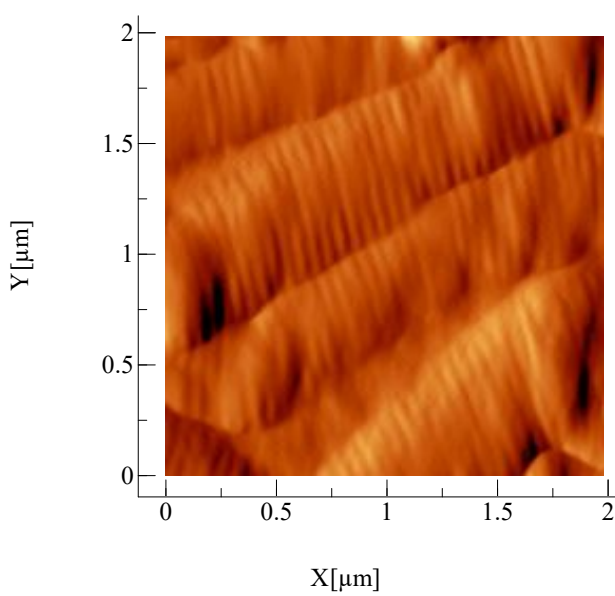




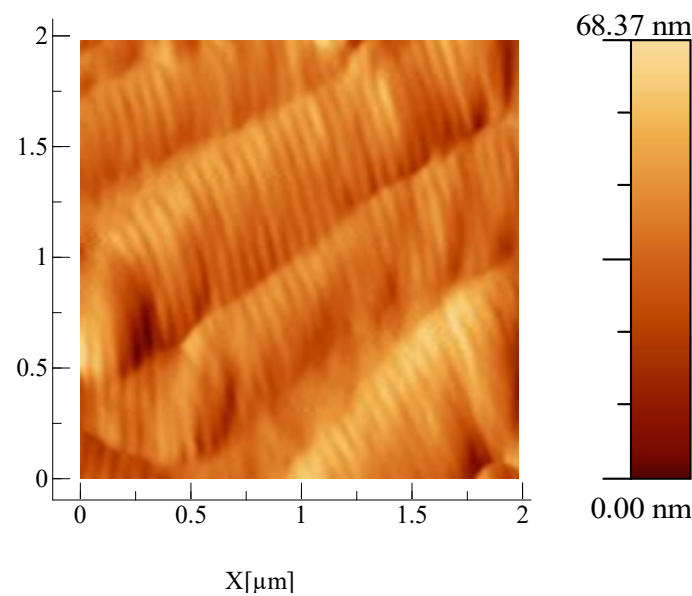
**Εικόνα 4.8** Χωρίς ακτινοβολήση



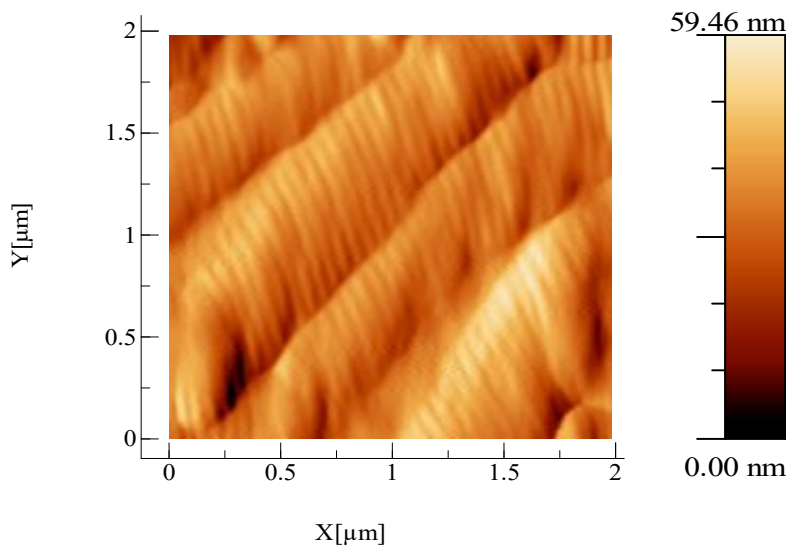
**Εικόνα 4.11** Πέντε ακτινοβολήσεις



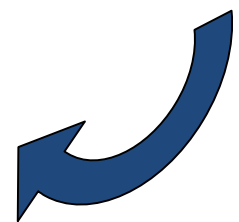
**Εικόνα 4.14** Δέκα ακτινοβολήσεις



**Εικόνα 4.17** Δέκα πέντε ακτινοβολήσεις



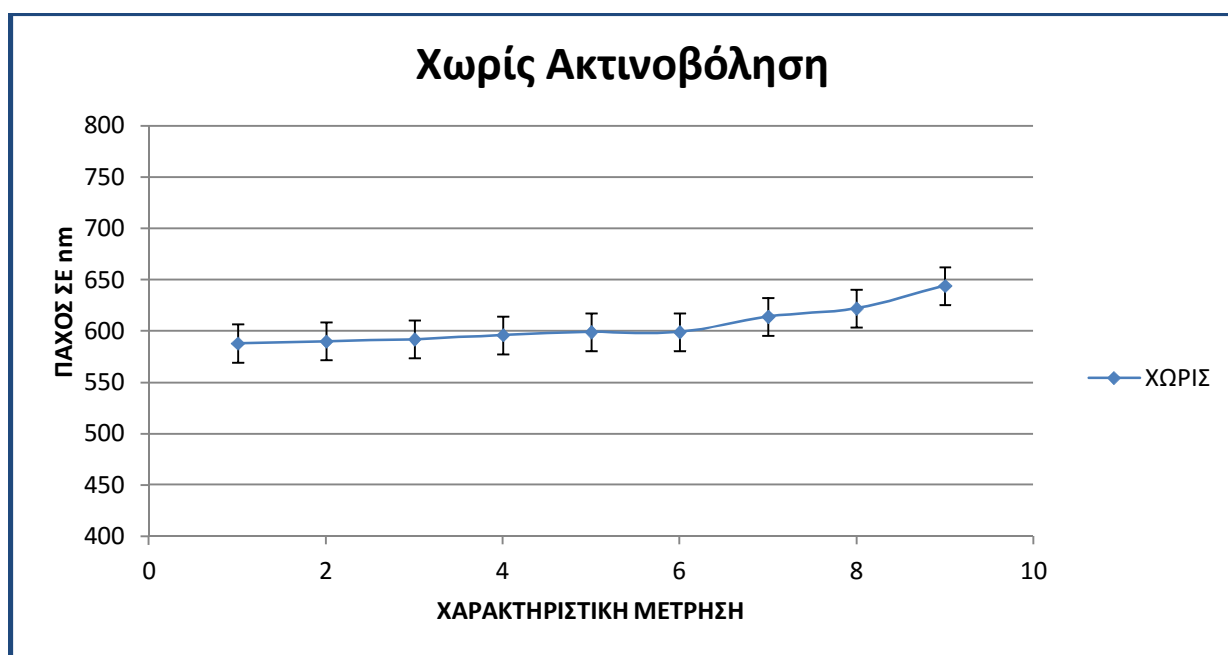
**Εικόνα 4.20** Είκοσι ακτινοβολήσεις





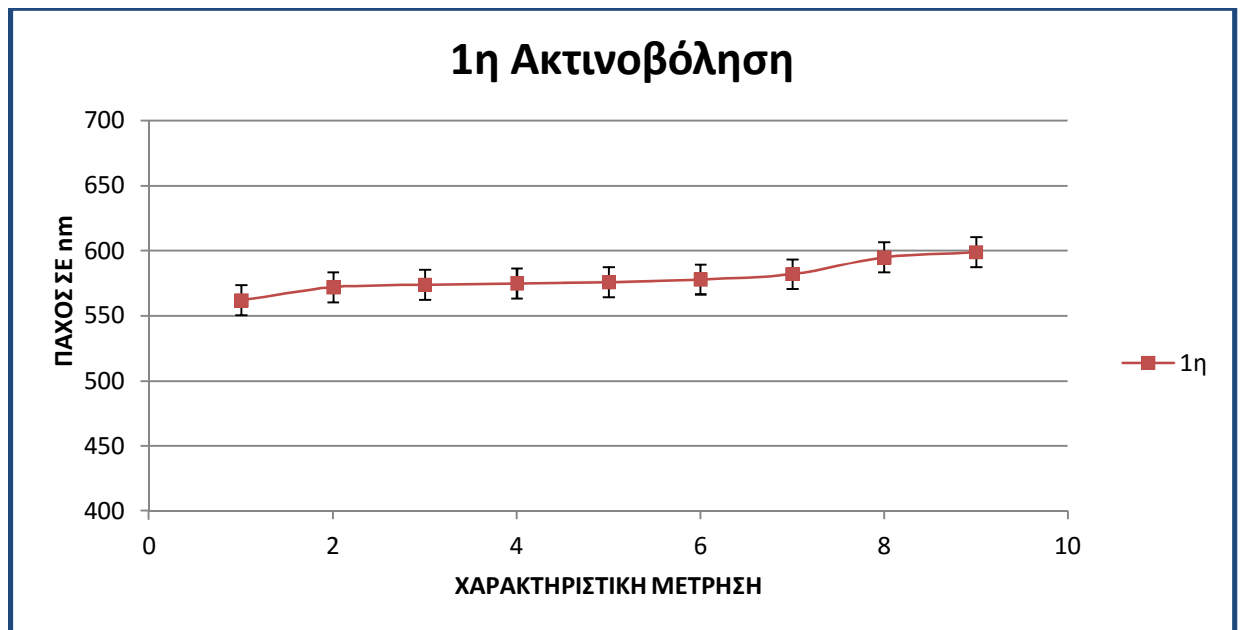
Στην συνέχεια παρουσιάζεται η γραφική απεικόνιση των μετρήσεων ξεχωριστά και συγκεντρωτικά καθώς και η απεικόνιση των μέσων όρων των παχών. Στις γραφικές παραστάσεις διακρίνεται και το σφάλμα της τυπικής απόκλισης. Οι πρώτες γραφικές παραστάσεις αφορούν την κάθε μέτρηση ξεχωριστά στα τέσσερα στάδια του πειράματος, ακολουθεί η συγκεντρωτική απεικόνιση των παχών και στην συνέχεια η απεικόνιση των μέσων όρων των εννιά μετρήσεων των σταδίων αυτών:

*Τα διάφορα πάχη της ίνας που μετρήθηκαν χωρίς ακτινοβολήση :*



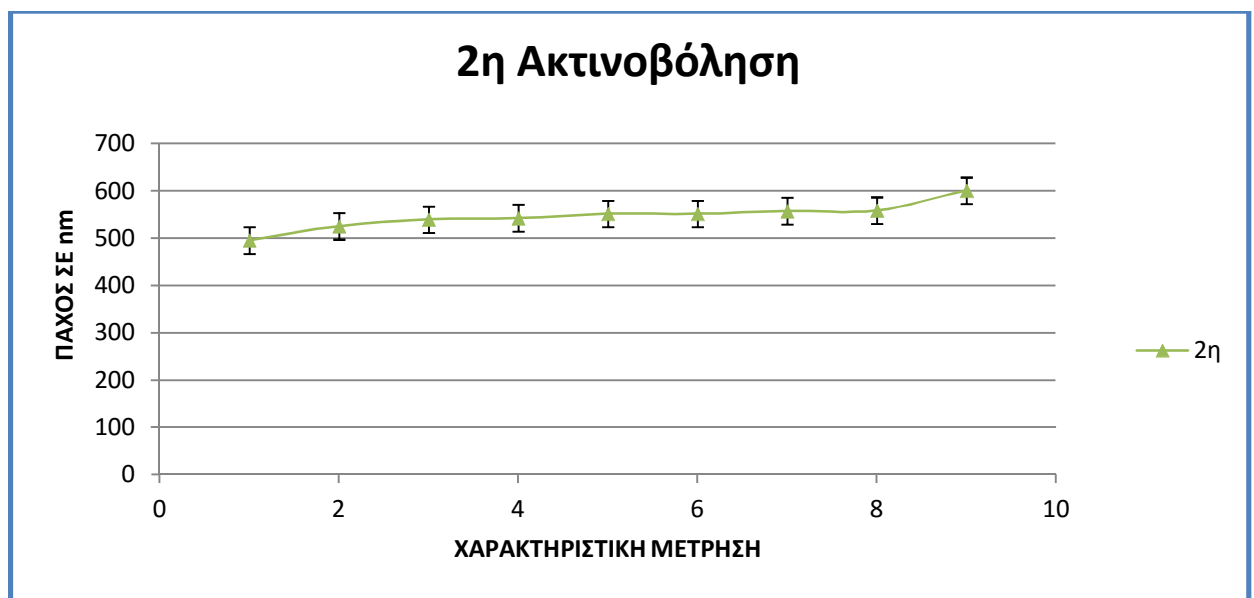
**Εικόνα 4.23** Γραφική απεικόνιση των μετρήσεων των παχών χωρίς ακτινοβόληση και η τυπική τους απόκλιση

Τα διάφορα πάχη της ίνας που μετρήθηκαν μετά τις 5 ακτινοβολήσεις :



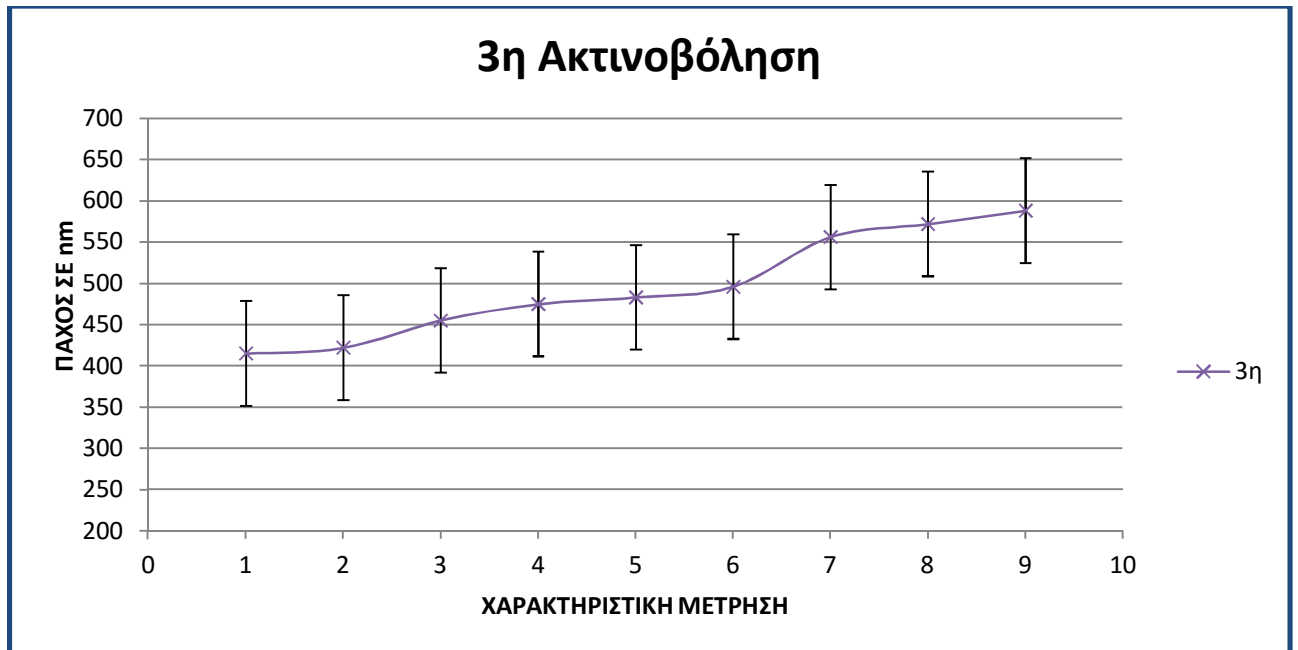
Εικόνα 4.24 Γραφική απεικόνιση των μετρήσεων των παχών μετά τις 5 ακτινοβολήσεις και η τυπική τους απόκλιση

Τα διάφορα πάχη της ίνας που μετρήθηκαν μετά τις 10 ακτινοβολήσεις :



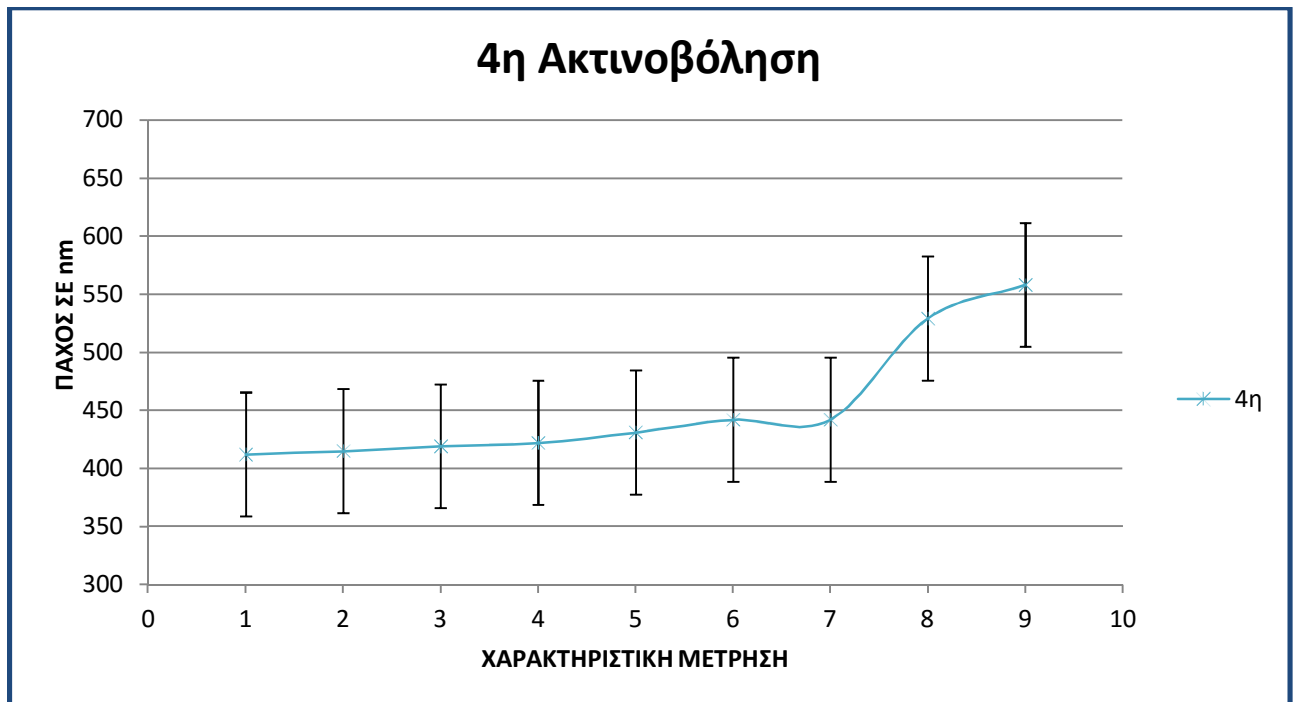
Εικόνα 4.25 Γραφική απεικόνιση των μετρήσεων των παχών μετά τις 10 ακτινοβολήσεις και η τυπική τους απόκλιση

Τα διάφορα πάχη της ίνας που μετρήθηκαν μετά τις 15 ακτινοβολήσεις :



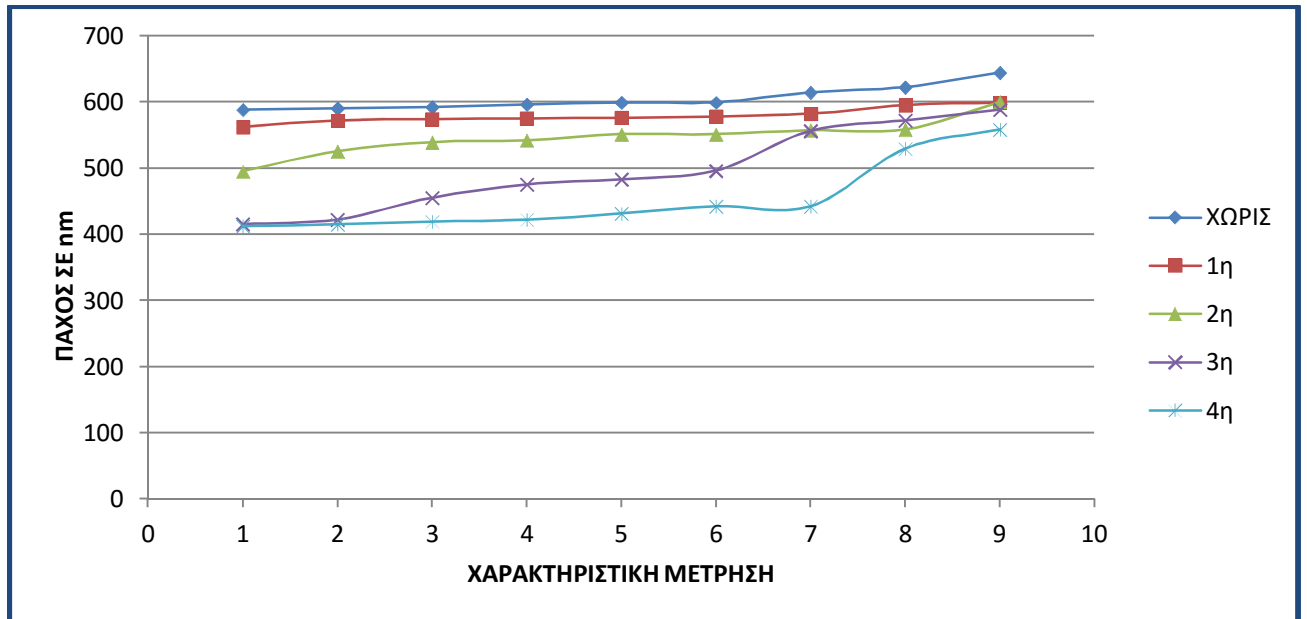
**Εικόνα 4.26** Γραφική απεικόνιση των μετρήσεων των παχών μετά τις 15 ακτινοβολήσεις και η τυπική τους απόκλιση

Τα διάφορα πάχη της ίνας που μετρήθηκαν μετά τις 15 ακτινοβολήσεις :



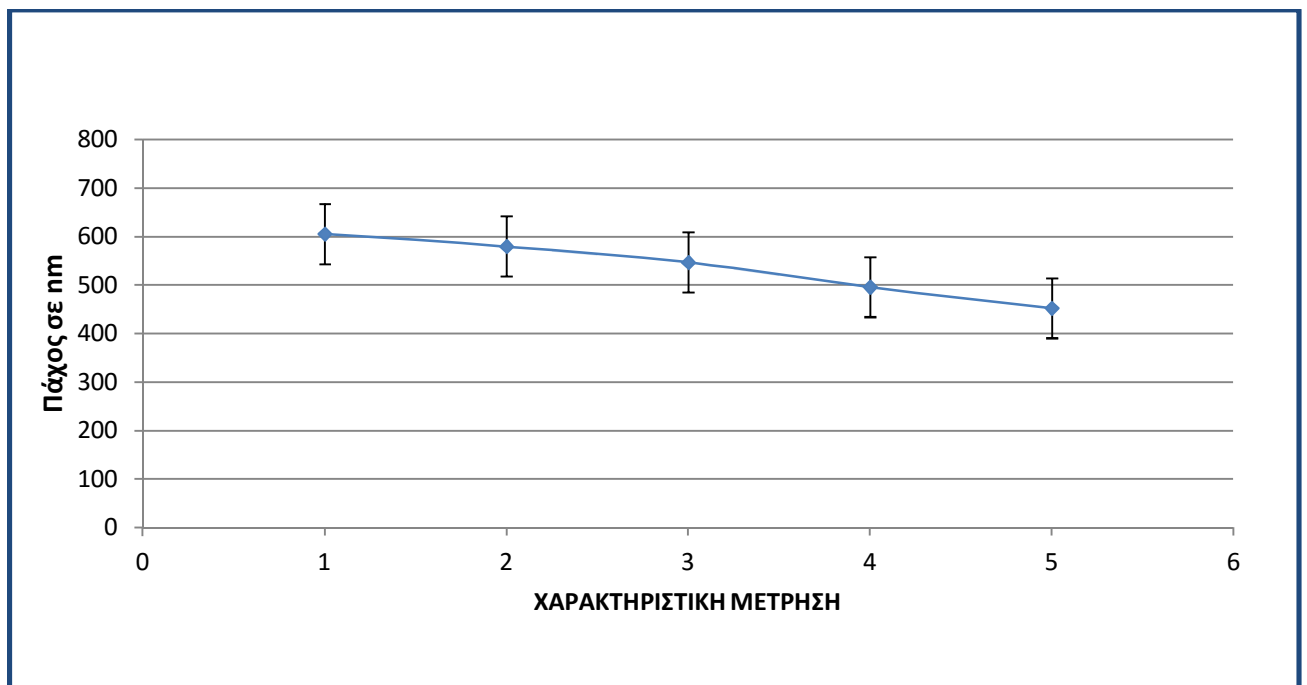
**Εικόνα 4.27** Γραφική απεικόνιση των μετρήσεων των παχών μετά τις 20 ακτινοβολήσεις και η τυπική τους απόκλιση

*Τα πάχη που μετρήθηκαν για κάθε στάδιο του πειράματος συγκεντρωτικά :*



**Εικόνα 4.28** Συγκεντρωτική γραφική απεικόνιση των μετρήσεων των παχών

*Μέσοι όροι των μετρήσεων για κάθε στάδιο του πειράματος :*



**Εικόνα 4.29** Γραφική απεικόνιση των μέσων όρων των παχών

## Στατιστική Σημαντικότητα

Η στατιστική σημαντικότητα ενός αποτελέσματος προκύπτει από την πιθανότητα να προήλθε η διαφοροποίηση της υπό εξέταση ιδιότητας ενός δείγματος από την ελεγχόμενη αλλαγή μιας μεταβλητής και όχι από τυχαίους παράγοντες. Στο συγκεκριμένο πείραμα για την επιβεβαίωση στατιστικής σημαντικότητας των αποτελεσμάτων χρειάστηκε να υπολογιστεί η μεταβλητή P-Value η οποία αντιπροσωπεύει τον δείκτη της αξιοπιστίας ενός αποτελέσματος. Όσο υψηλότερη είναι η P-Value τόσο μεγαλύτερη είναι και η πιθανότητα να οφείλεται σε τυχαίους παράγοντες η παρατηρούμενη διαφοροποίηση της υπό εξέταση ιδιότητας του δείγματος. Η τιμή  $P=0,05$  είναι συνήθως η διαχωριστική γραμμή ως αποδεκτό "επίπεδο λάθους" διεθνώς και σημαίνει ότι η πιθανότητα να προήλθε η αλλαγή της υπό εξέτασης ιδιότητας του δείγματος από τυχαίους παράγοντες είναι 5%.

Ανάλυση διακύμανσης κατά ένα παράγοντα						
ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑ						
Ομάδες	Πλήθος	Άθροισμα	Μέσος όρος	Διακύμανση		
Στήλη 1	9	5444	604.8	340.9		
Στήλη 2	9	5213	579.2	131.7		
Στήλη 3	9	4918	546.4	792.0		
Στήλη 4	9	4462	495.7	4020.9		
Στήλη 5	9	4070	452.2	2845.4		
ΑΝΑΛΥΣΗ ΔΙΑΚΥΜΑΝΣΗΣ						
Προέλευση διακύμανσης	SS	βαθμοί ελευθερίας	MS	F	τιμή-P	κριτήριο F
Μεταξύ ομάδων	138231.5	4	34557.8	21.3	<b>1.85E-09</b>	2.6
Μέσα στις ομάδες	65047.7	40	1626.1			
Σύνολο	203279.2	44				

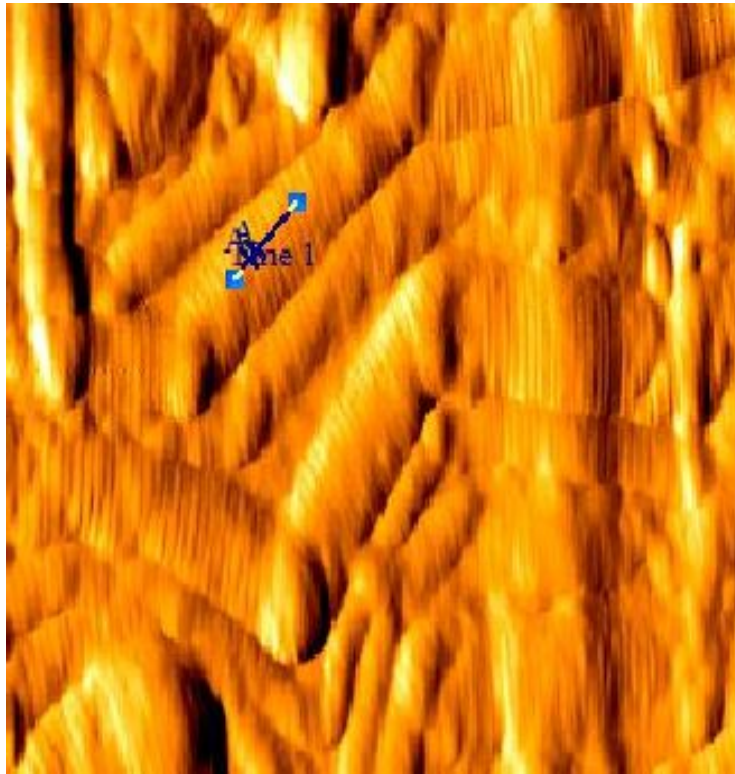
**Πίνακας 4.8** Εξετάζεται αν το δείγμα είναι στατιστικά σημαντικό με τη χρήση της μεταβλητής P-Value

- ✓ **Η P-Value παρατηρείται ότι είναι πολύ μικρότερη του 0,05 , άρα επιβεβαιώνεται η στατιστική σημαντικότητα των μετρήσεων που πραγματοποιήθηκαν.**

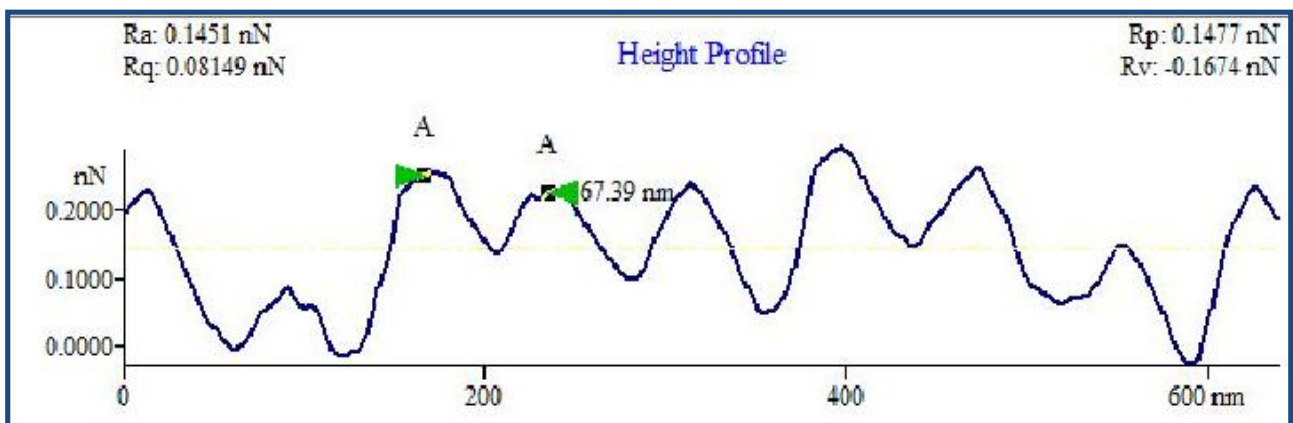
Όσον αφορά το D-Band της ίνας που ακτινοβολήθηκε, παρατηρείται ότι αρχικά, χωρίς την χρήση laser , είναι αδύνατον να μετρηθεί . Αντίθετα, μετά το τέλος του πειράματος μετρήθηκε με σχετική ευκολία και τα αποτελέσματα είναι ικανοποιητικά εφόσον επιβεβαιώθηκε η απόσταση των D-Band στα 67,3 nm όπως φαίνεται και στα παρακάτω σχήματα αλλά και στο πίνακα των εννιά μετρήσεων.

	<b>Υψομετρική διαφορά D-Band (nm)</b>
<b>Μέτρηση 1</b>	<b>67.3</b>
<b>Μέτρηση 2</b>	<b>67.1</b>
<b>Μέτρηση 3</b>	<b>67.2</b>
<b>Μέτρηση 4</b>	<b>67.3</b>
<b>Μέτρηση 5</b>	<b>67.5</b>
<b>Μέτρηση 6</b>	<b>67.4</b>
<b>Μέτρηση 7</b>	<b>67.3</b>
<b>Μέτρηση 8</b>	<b>67.2</b>
<b>Μέτρηση 9</b>	<b>67.3</b>
<b>Μέση τιμή</b>	<b>67.3</b>
<b>Τυπική Απόκλιση</b>	<b>0.1</b>

**Πίνακας 4.8** Μετρήσεις των παχών της ίνας μετά τις είκοσι ακτινοβολήσεις και υπολογισμός της μέσης τιμής και της τυπικής απόκλισης

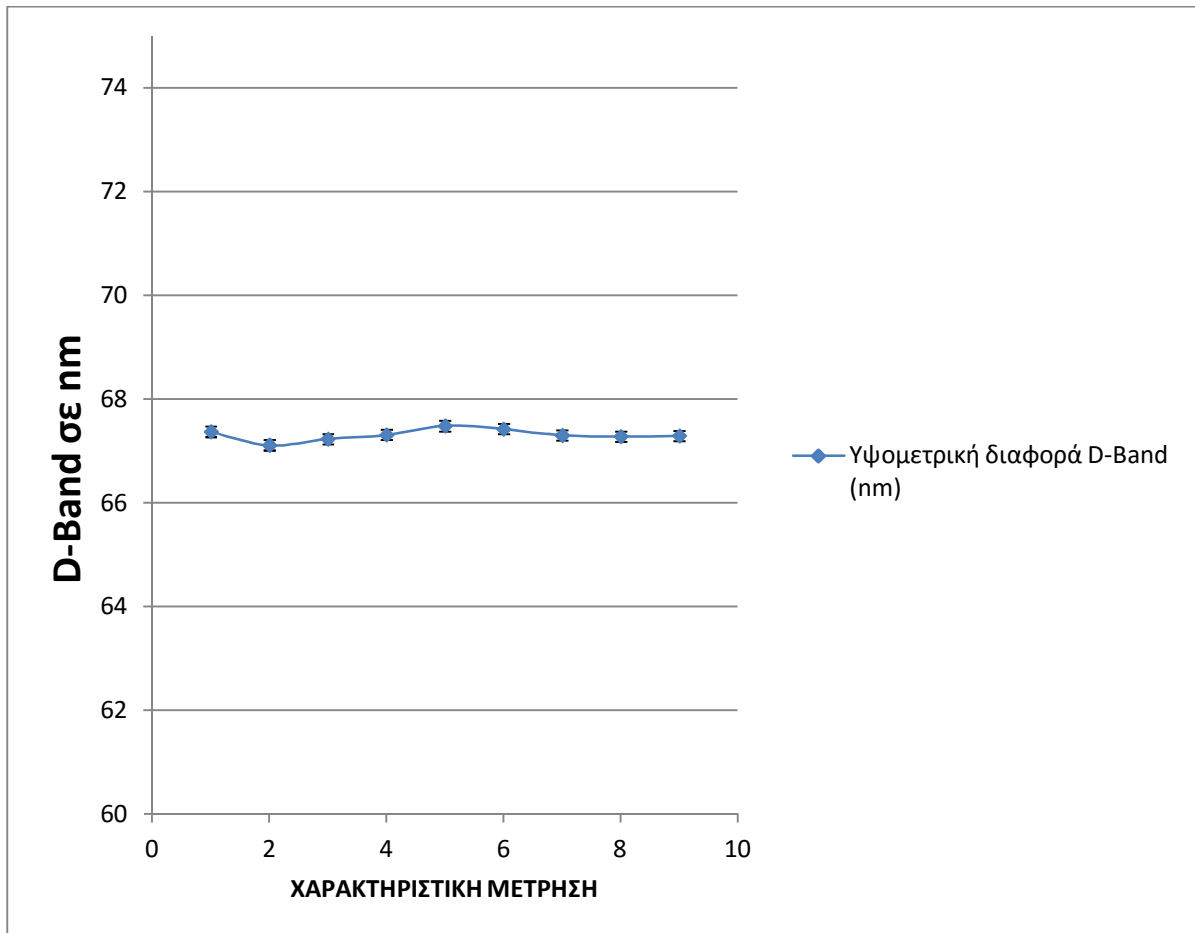


**Εικόνα 4.30** Εικόνα  $5\mu\text{m} \times 5\mu\text{m}$ , μέτρηση του D-Band με το πρόγραμμα *IP AutoProbe*



**Εικόνα 4.31** Τοπική μέτρηση πάχους της ίνας με το πρόγραμμα *IP AutoProbe image*

### Υψομετρική διαφορά D-Band (nm)

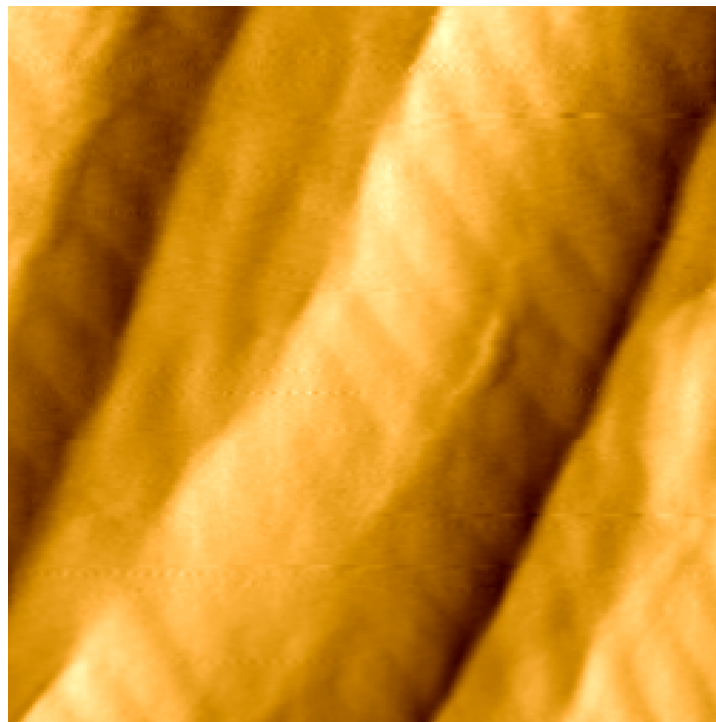


**Εικόνα 4.32** Γραφική απεικόνιση των *D-Band* των ιών και η τυπική απόκλιση

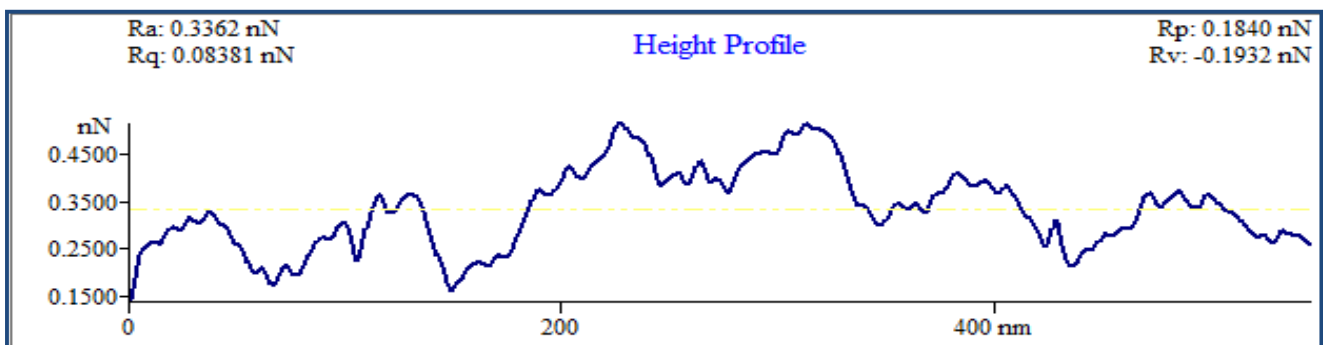


### 4.3 Πείραμα διακριτών δόσεων ακτινοβολήσης μεγάλης χρονικής διάρκειας

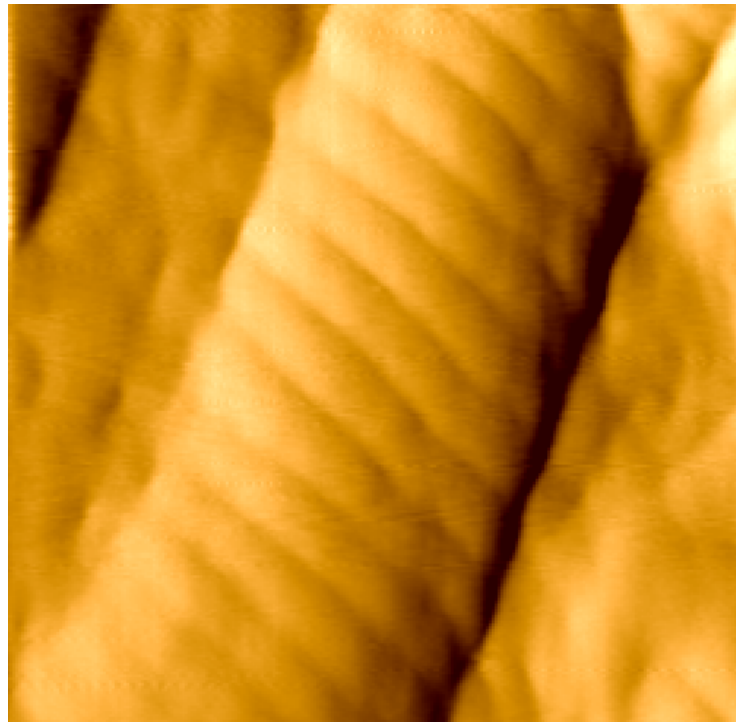
Στην περίπτωση αυτού του πειράματος το δείγμα ακτινοβολήθηκε για δεκαπέντε λεπτά. Η διαδικασία αυτή επαναλήφθηκε τρεις φορές. Μετά λοιπόν από σαράντα πέντε λεπτά (τρία δεκαπεντάλεπτα) συνολικής ακτινοβολήσης, σε σύγκριση με τις μετρήσεις του δείγματος πριν την ακτινοβολήση, καταγράφηκαν τα εξής αποτελέσματα :



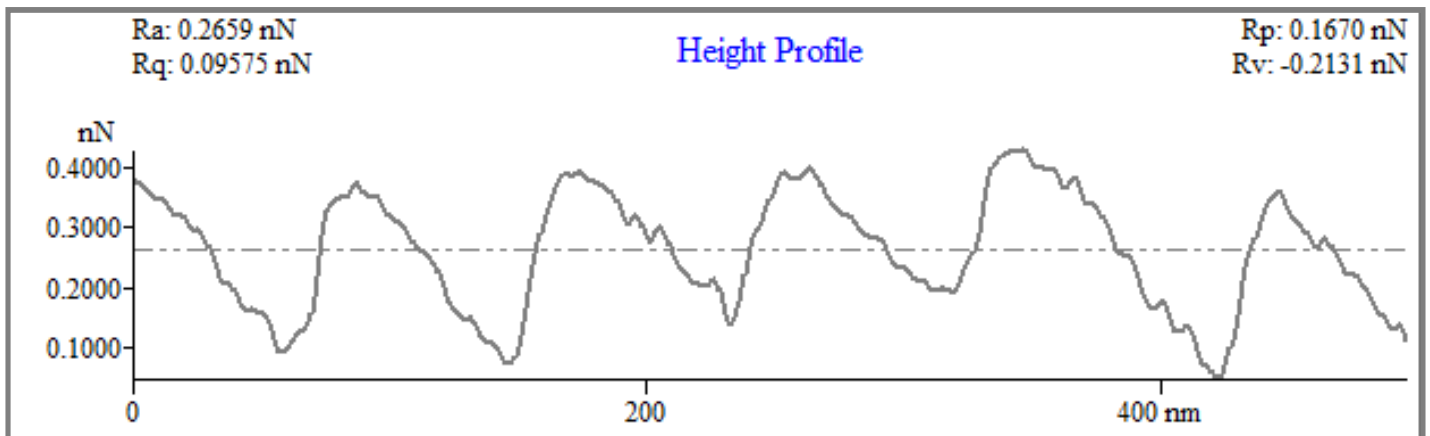
Εικόνα 4.33 Εικόνα 2μm x 2μm, πριν την ακτινοβολήση



Εικόνα 4.34 Αναπαράσταση της D-Band με το πρόγραμμα IP AutoProbe

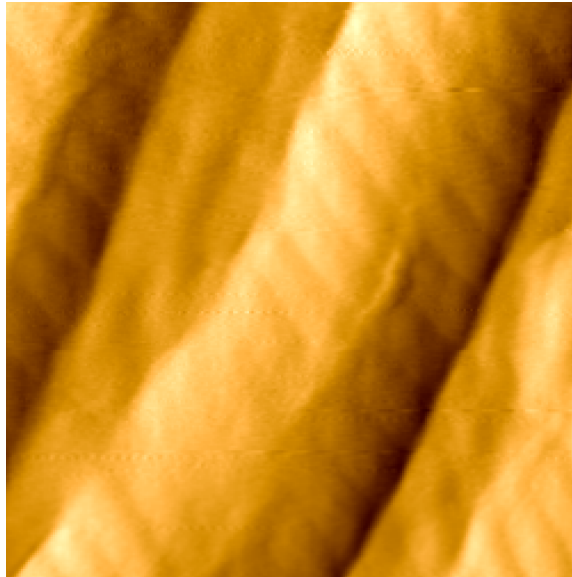


**Εικόνα 4.35** Εικόνα  $2\mu\text{m} \times 2\mu\text{m}$ , μετά τα 45 λεπτά ακτινοβολήσης



**Εικόνα 4.36** Αναπαράσταση της D-Band με το πρόγραμμα **IP AutoProbe**

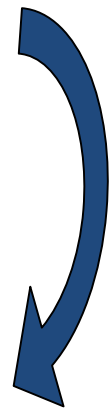
Επίσης σε αυτό το πείραμα εύκολα παρατηρείται ότι στην εικόνα του δείγματος πριν την ακτινοβολήση, η D-Band περιοδικότητα δεν έχει σχηματιστεί σε όλα τα σημεία της ίνας, δηλαδή η ίνα δεν έχει απολύτως φυσιολογικές ιδιότητες. Αυτό οφείλεται στο σύντομο χρονικό διάστημα που είχε περάσει από την παρασκευή του διαλύματος κολλαγόνου. Αντιθέτως στην εικόνα που δείχνει το δείγμα μετά από 45 λεπτά ακτινοβολήσης η D-Band περιοδικότητα είναι ευδιάκριτα σχηματισμένη και πλέον εύκολα μετρήσιμη. Οι μετρήσεις του D-Band φαίνεται στον πίνακα 4.9 :



**Εικόνα 4.33** *Εικόνα 2μm x 2μm, πριν την ακτινοβολήση*



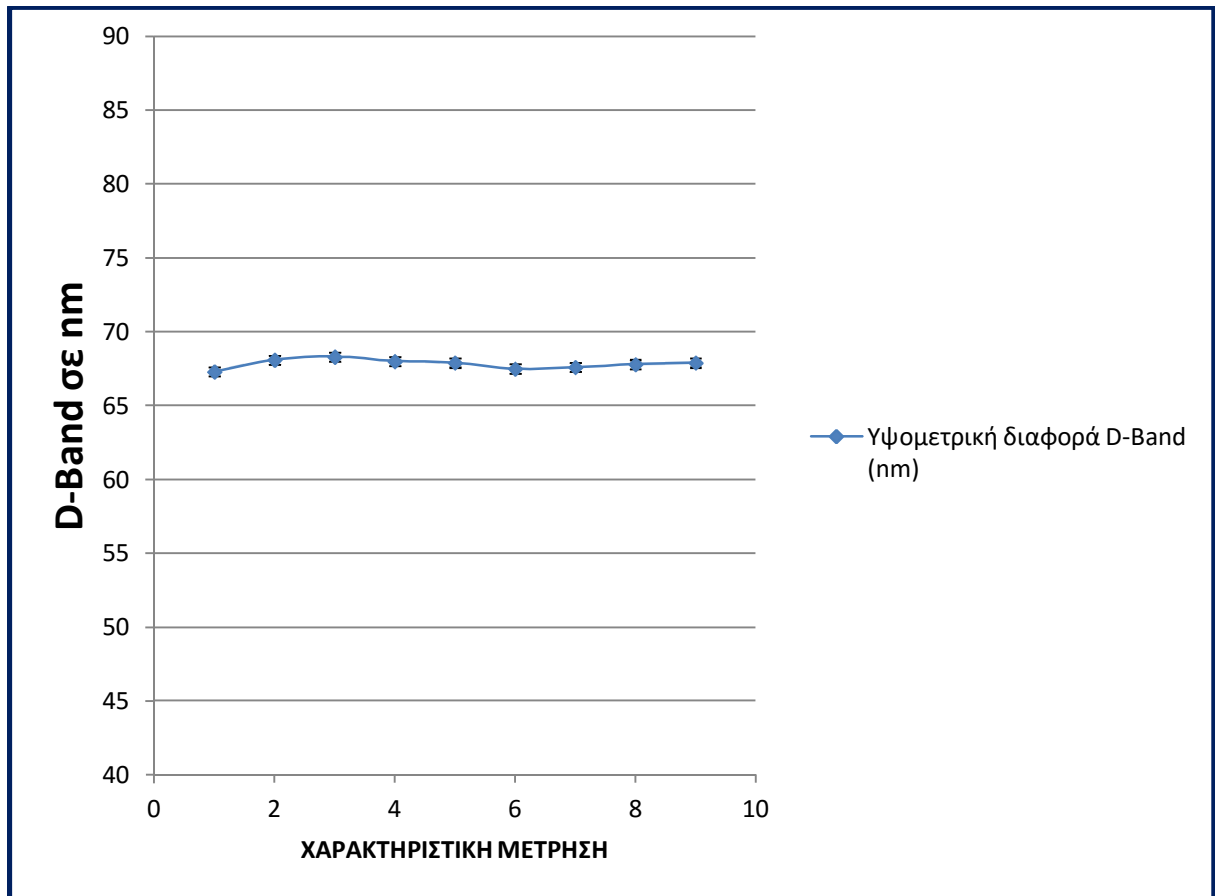
**Εικόνα 4.35** *Εικόνα 2μm x 2μm, μετά τα 45 λεπτά ακτινοβολήσης*



	Υψομετρική διαφορά D-Band (nm)
Μέτρηση 1	67.3
Μέτρηση 2	68.1
Μέτρηση 3	68.3
Μέτρηση 4	68.0
Μέτρηση 5	67.9
Μέτρηση 6	67.5
Μέτρηση 7	67.6
Μέτρηση 8	67.8
Μέτρηση 9	67.9
Μέση τιμή	<b>67.8</b>
Τυπική Απόκλιση	<b>0.3</b>

**Πίνακας 4.9** Μετρήσεις της D-Band της ίνας μετά τα 45 λεπτά ακτινοβόλησης και υπολογισμός της μέσης τιμής και της τυπικής απόκλισης

### Υψομετρική διαφορά D-Band (nm)



**Εικόνα 4.37** Γραφική απεικόνιση της D-Band της ίνας μετά τα 45 min ακτινοβολήσης και η τυπική απόκλιση των μετρήσεων

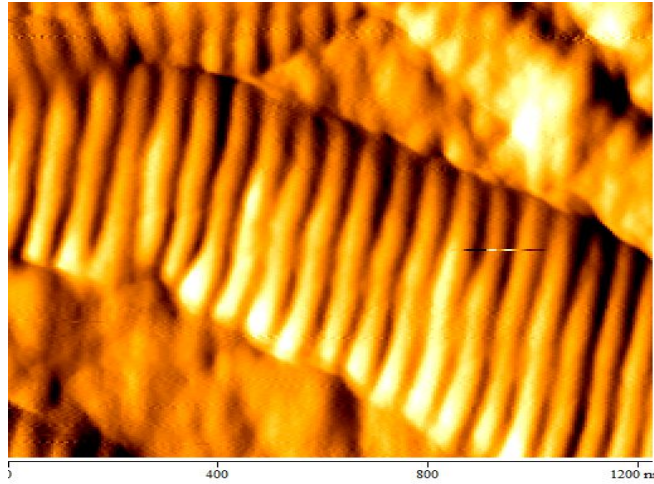
## 4.4 Πείραμα συνεχούς ακτινοβολήσης

Στην περίπτωση αυτού του πειράματος έγινε μόνο μία ακτινοβολήση που όμως είχε τη διάρκεια της μίας ώρας. Το δείγμα που ακτινοβολήθηκε στο συγκεκριμένο πείραμα είχε προετοιμαστεί κατάλληλα καθώς είχε περάσει το κατάλληλο χρονικό διάστημα από τη δημιουργία του ώστε να σχηματιστούν πλήρως οι ίνες. Έτσι μετρήθηκαν όλα τα γεωμετρικά χαρακτηριστικά της ίνας από την πρώτη κιάλας μέτρηση χωρίς ακτινοβολήση, κάτι που ήταν αδύνατο να γίνει στα προηγούμενα πειράματα. Οι μετρήσεις αυτού του πειράματος είναι οι εξής :

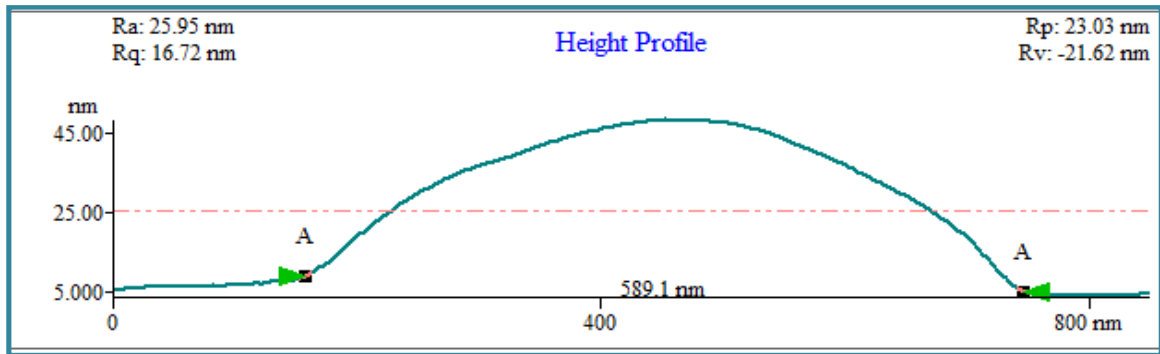
Δείγμα χωρίς ακτινοβολήση :

	Ύψος (nm)	Πάχος (nm)	D-Band (nm)	Υψομετρική διαφορά D-Band (nm)
Μέτρηση 1	44.8	633.5	59.3	4.8
Μέτρηση 2	45.3	668.1	74.5	0.6
Μέτρηση 3	41.6	650.4	67.8	2.8
Μέτρηση 4	35.4	617.8	66.0	4.0
Μέτρηση 5	30.9	623.7	61.0	2.7
Μέτρηση 6	35.4	586.7	72.8	4.1
Μέτρηση 7	31.9	567.4	69.4	1.5
Μέτρηση 8	25.7	607.2	69.4	1.7
Μέτρηση 9	20.0	583.7	69.4	2.4
Μέτρηση 10	35.6	607.5	66.1	1.7
Μέση τιμή	<b>34.6</b>	<b>614.6</b>	<b>67.6</b>	<b>2.6</b>
Τυπική Απόκλιση	<b>8.0</b>	<b>31.0</b>	<b>4.7</b>	<b>1.3</b>

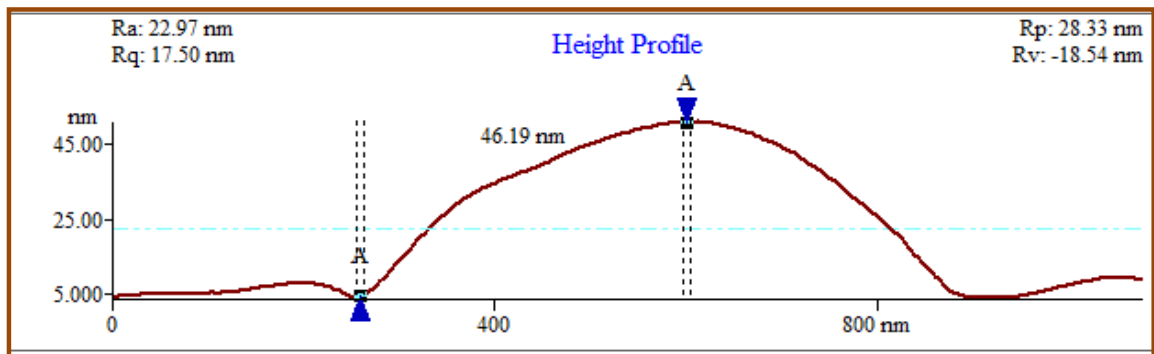
**Πίνακας 4.10** Μετρήσεις του ύψους, του πάχους και της D-Band της ίνας χωρίς ακτινοβολήση και υπολογισμός της μέσης τιμής και της τυπικής απόκλισης



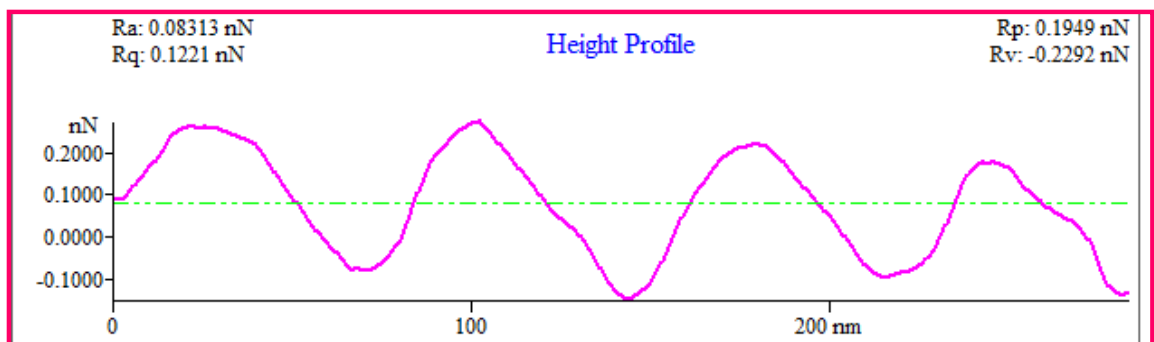
Εικόνα 4.38 Εικόνα 1,2μm x 1,2μm, πριν την ακτινοβόληση



Εικόνα 4.39 Χαρακτηριστική μέτρηση του πάχους με το πρόγραμμα IP



Εικόνα 4.40 Χαρακτηριστική μέτρηση του ύψους με το πρόγραμμα IP AutoProbe



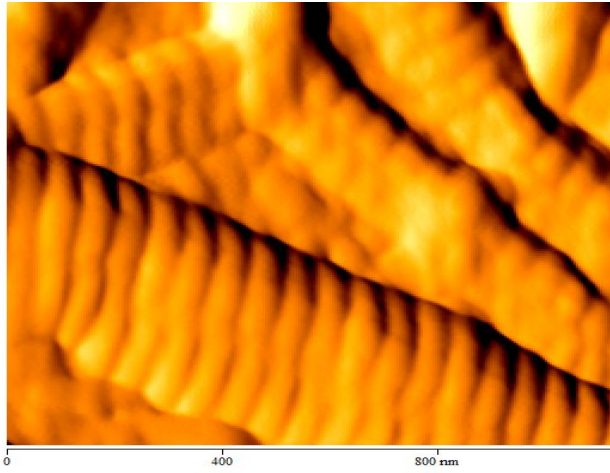
Εικόνα 4.41 Χαρακτηριστική μέτρηση της D-Band με το πρόγραμμα IP

Δείγμα μετά την ακτινοβολήση μιας ώρας :

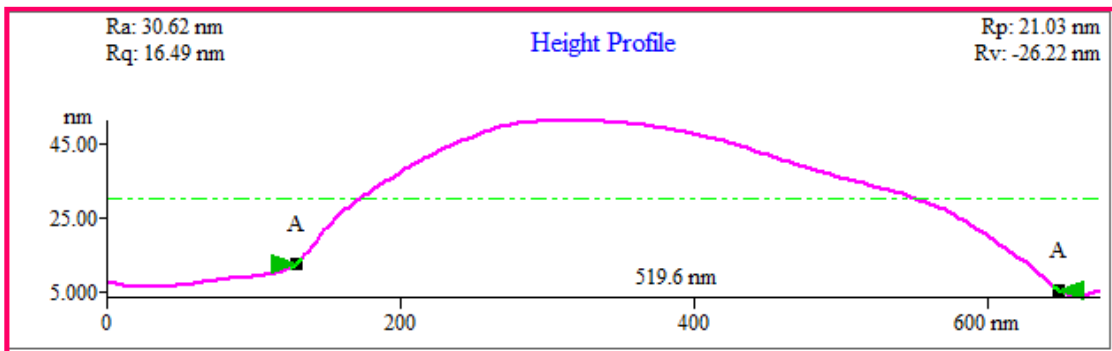
	Ύψος (nm)	Πάχος (nm)	D-Band (nm)	Υψομετρική διαφορά D-Band (nm)
Μέτρηση 1	47.8	500.6	64.1	3.1
Μέτρηση 2	49.4	493.4	75.9	0.5
Μέτρηση 3	45.8	507.3	62.4	1.6
Μέτρηση 4	41.5	509.5	55.7	2.3
Μέτρηση 5	36.7	504.5	62.4	1.1
Μέτρηση 6	40.0	507.7	75.9	3.2
Μέτρηση 7	35.9	468.1	70.9	1.0
Μέτρηση 8	30.9	501.3	67.5	1.3
Μέτρηση 9	25.0	503.3	62.4	2.1
Μέτρηση 10	41.4	515.3	67.5	5.0
Μέση τιμή	<b>39.5</b>	<b>501.1</b>	<b>66.5</b>	<b>2.1</b>
Τυπική Απόκλιση	<b>7.6</b>	<b>13.0</b>	<b>6.4</b>	<b>1.3</b>

**Πίνακας 4.11** Μετρήσεις του ύψους, του πάχους και της D-Band της ίνας μετά από 1 ώρα ακτινοβολήσης και υπολογισμός της μέσης τιμής και της τυπικής απόκλισης

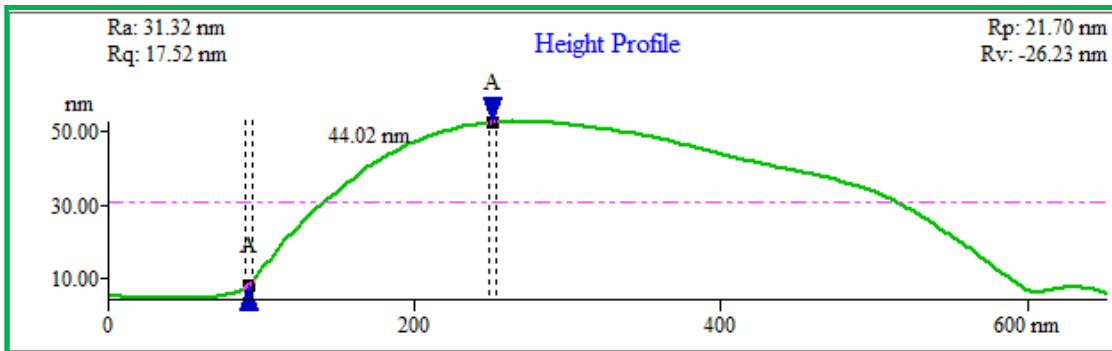




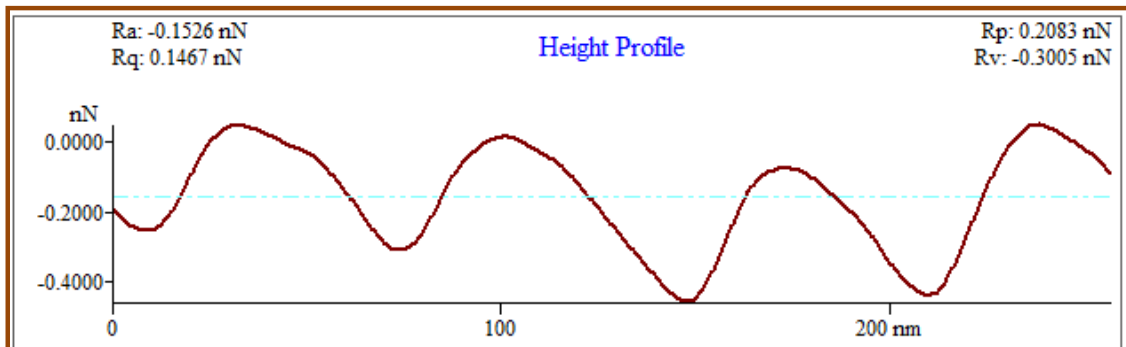
Εικόνα 4.42 Εικόνα 1,2μm x 1,2μm,μετά την μία ώρα ακτινοβόλησης



Εικόνα 4.43 Χαρακτηριστική μέτρηση του πάχους με το πρόγραμμα *IP AutoProbe*



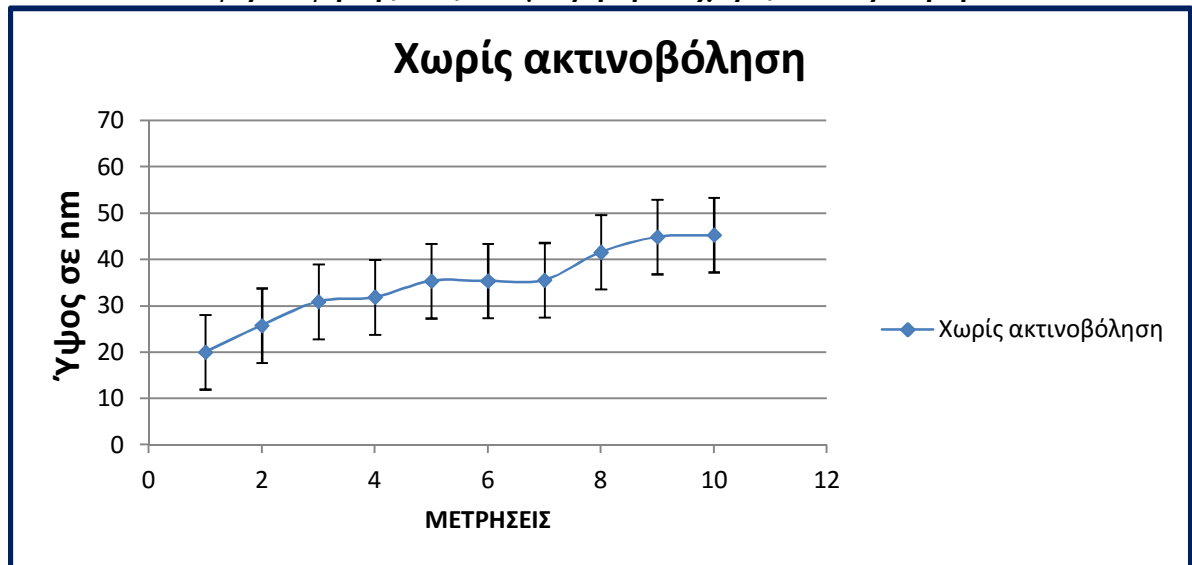
Εικόνα 4.44 Χαρακτηριστική μέτρηση του ύψους με το πρόγραμμα *IP AutoProbe*



Εικόνα 4.45 Χαρακτηριστική μέτρηση της *D-Band* με το πρόγραμμα *IP AutoProbe*

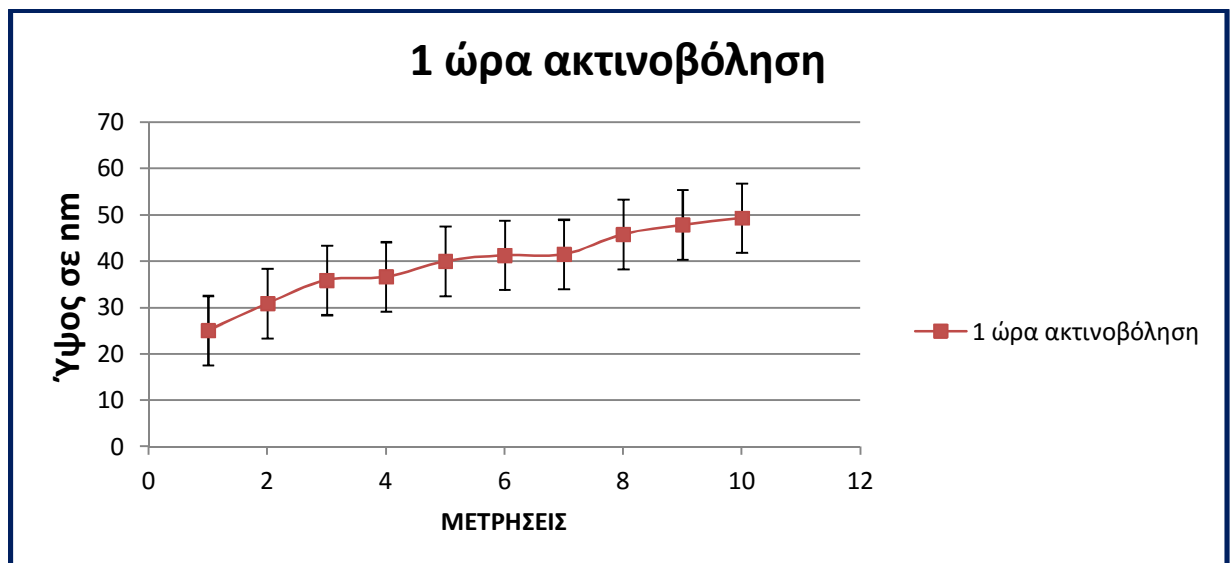
Όπως θα απεικονιστεί και στις γραφικές παραστάσεις, παρατηρείται και σε αυτή την περίπτωση ότι πάχος μειώνεται αρκετά μετά την ακτινοβολήση. Επίσης όμως παρατηρείται ότι το ύψος αυξάνεται μετά την δόση μιας ώρας laser. Οι γραφικές παραστάσεις που επιβεβαιώνουν το πόρισμα αυτό απεικονίζονται παρακάτω. Αρχικά παρουσιάζονται οι γραφικές παραστάσεις ξεχωριστά για κάθε στάδιο του πειράματος με την τυπική απόκλιση των μετρήσεων και στη συνέχεια συγκεντρωτικά:

*Τα διάφορα ύψη της ίνας που μετρήθηκαν χωρίς ακτινοβολήση :*



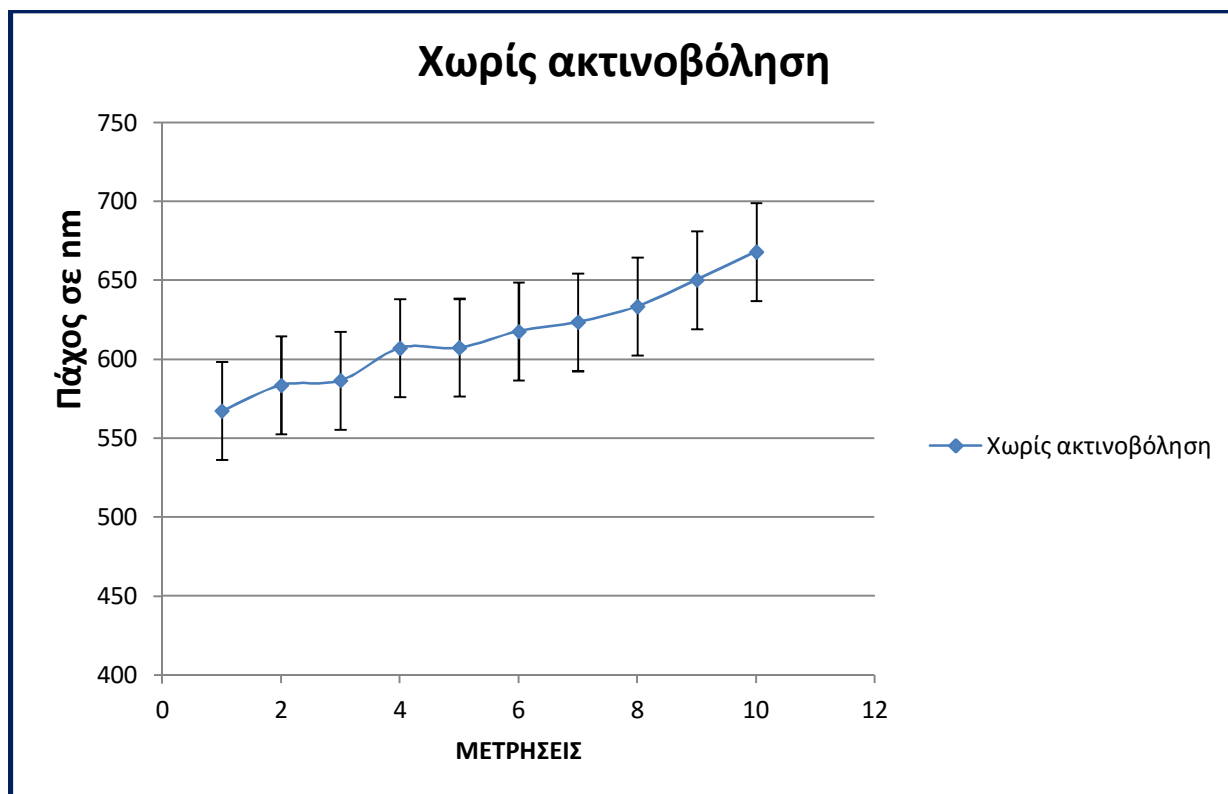
**Εικόνα 4.46** Γραφική απεικόνιση των μετρήσεων των υψών χωρίς ακτινοβολήση και η τυπική τους απόκλιση

*Τα διάφορα ύψη της ίνας που μετρήθηκαν μετά από 1 ώρα ακτινοβολήση :*



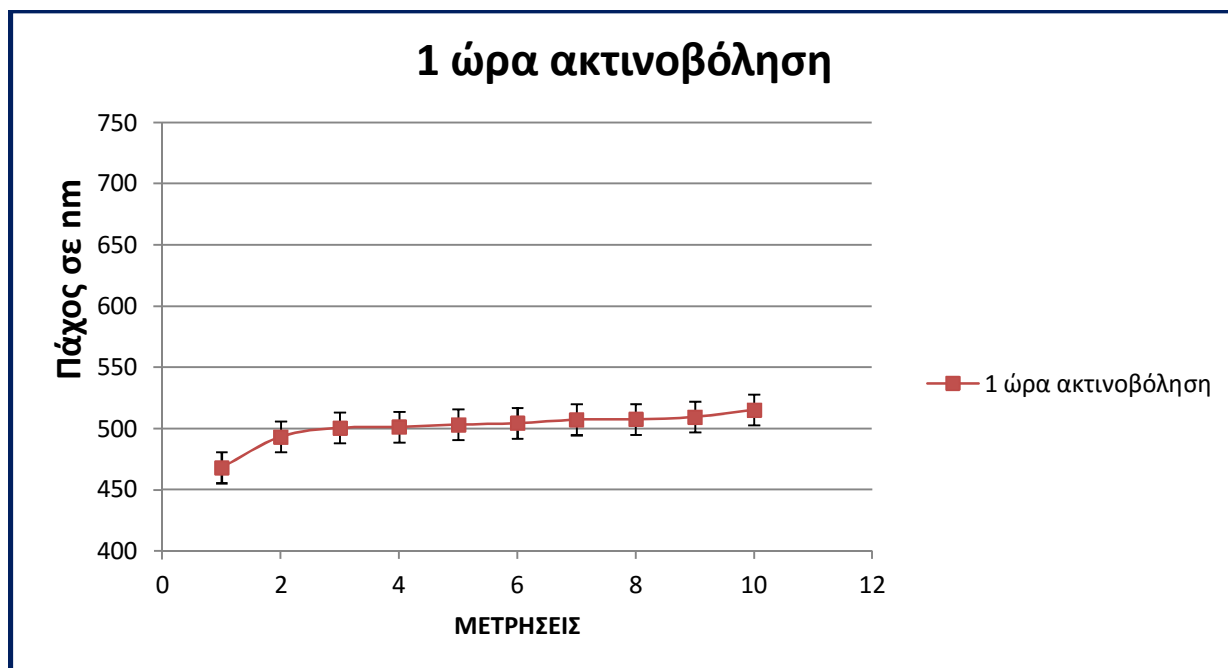
**Εικόνα 4.47** Γραφική απεικόνιση των μετρήσεων των υψών μετά τη 1 ώρα ακτινοβολήση και η τυπική τους απόκλιση

Τα διάφορα πάχη της ίνας που μετρήθηκαν χωρίς ακτινοβόληση :



Εικόνα 4.48 Γραφική απεικόνιση των μετρήσεων των παχών χωρίς ακτινοβόληση και η τυπική τους απόκλιση

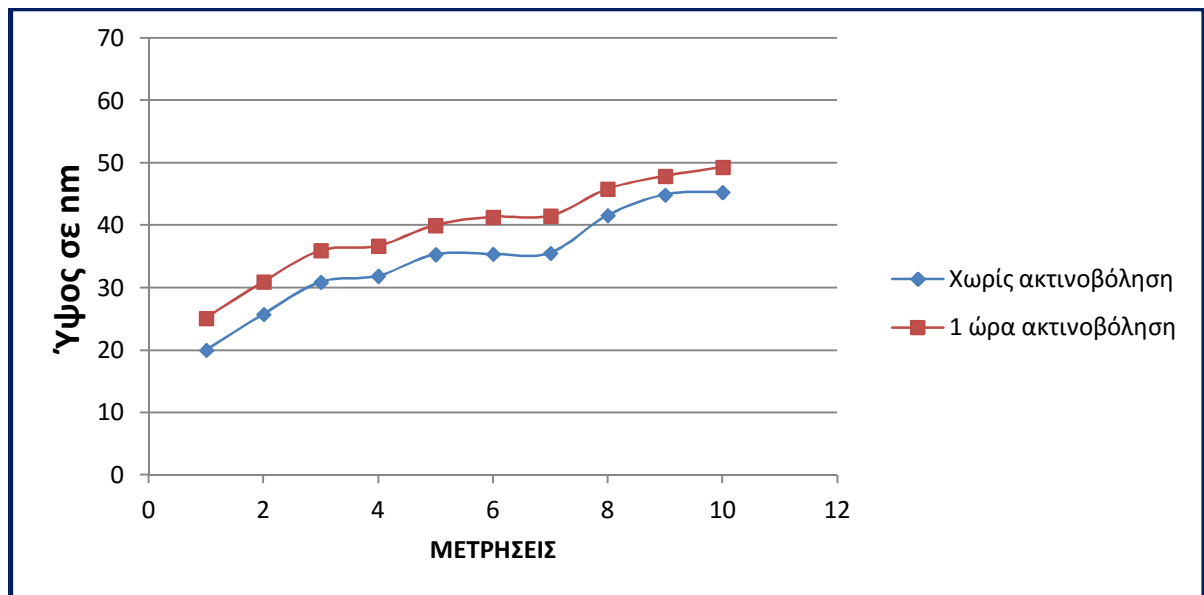
Τα διάφορα πάχη της ίνας που μετρήθηκαν μετά από 1 ώρα ακτινοβόληση :



Εικόνα 4.49 Γραφική απεικόνιση των μετρήσεων των παχών μετά τη 1 ώρα ακτινοβόληση και η τυπική τους απόκλιση

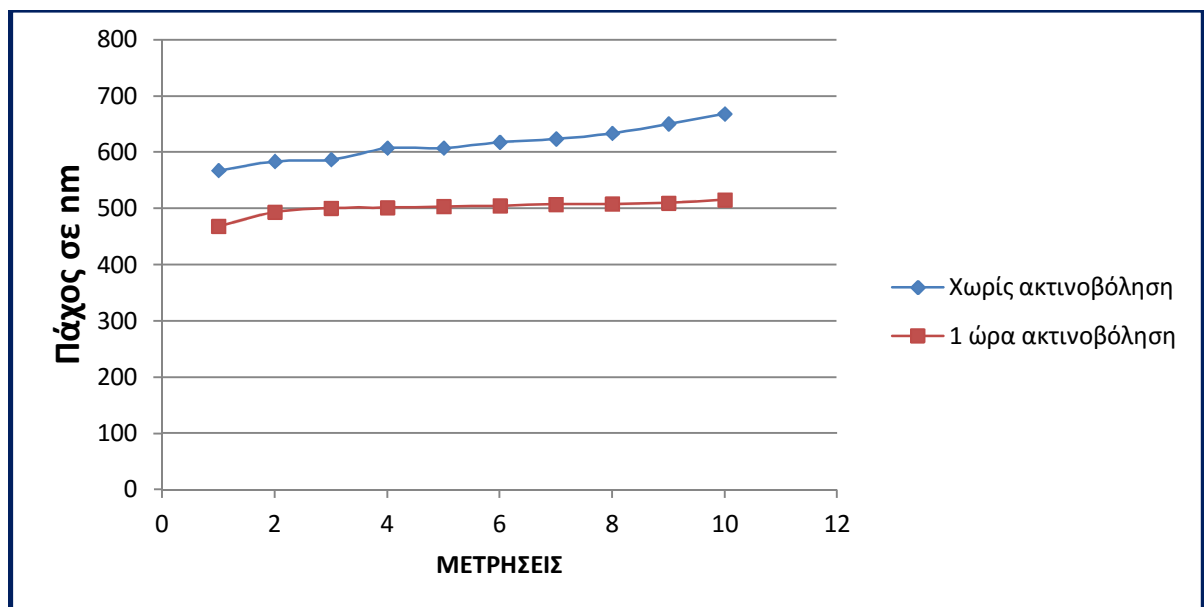
Συγκεντρωτικά οι μετρήσεις πριν και μετά την ακτινοβόληση:

**ΔΙΑΦΟΡΑ ΥΨΟΥΣ ΙΝΑΣ ΠΡΙΝ ΚΑΙ ΜΕΤΑ ΤΗΝ ΑΚΤΙΝΟΒΟΛΗΣΗ:**



**Εικόνα 4.50** Γραφική απεικόνιση της διαφοράς των μετρήσεων του ύψους της πριν και μετά την ακτινοβόληση

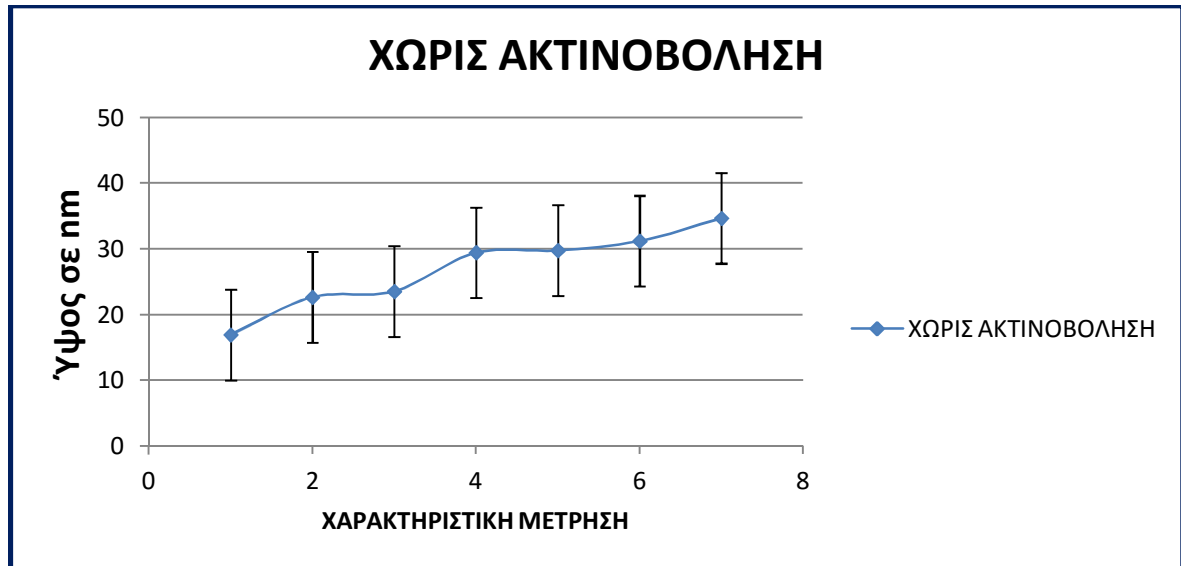
**ΔΙΑΦΟΡΑ ΠΑΧΟΥΣ ΙΝΑΣ ΠΡΙΝ ΚΑΙ ΜΕΤΑ ΤΗΝ ΑΚΤΙΝΟΒΟΛΗΣΗ:**



**Εικόνα 4.51** Γραφική απεικόνιση της διαφοράς των μετρήσεων του πάχους της πριν και μετά την ακτινοβόληση

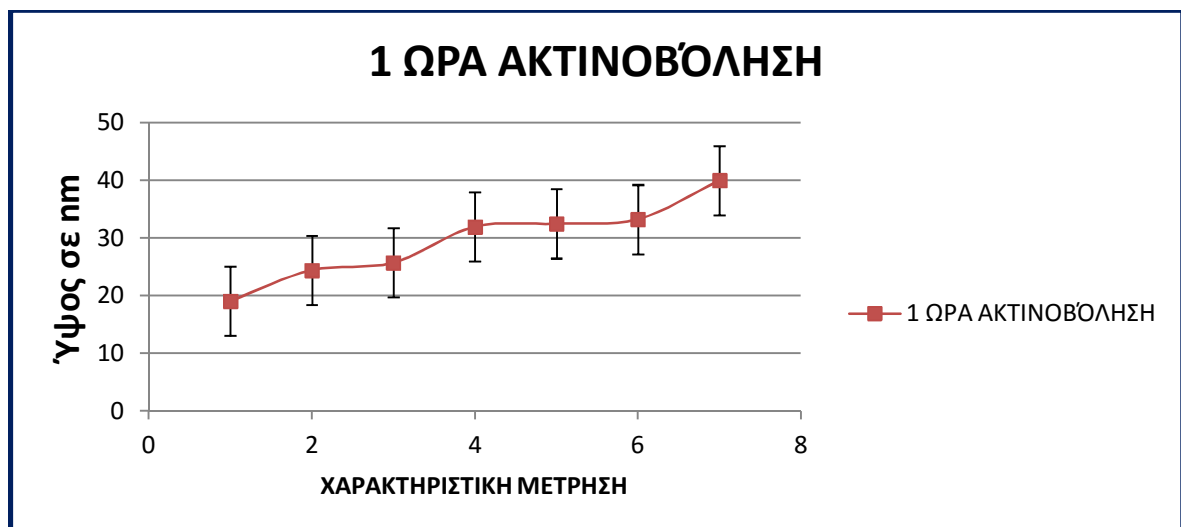
Επίσης για να επαληθευθεί το αποτέλεσμα και για να είναι αποφευχθούν τα στατιστικά σφάλματα, μετρήθηκαν δύο ακόμα ίνες που φαίνονται στην εικόνα που σαρώθηκε από το AFM αλλά και άλλες τέσσερις ίνες αργότερα και συγκρίθηκαν οι μέσοι όροι του ύψους και του πάχους της ίνας πριν και μετά την ακτινοβολήση οι γραφικές παραστάσεις των οποίων απεικονίζονται στη συνέχεια :

*Τα διάφορα ύψη της ίνας που μετρήθηκαν χωρίς ακτινοβολήση :*

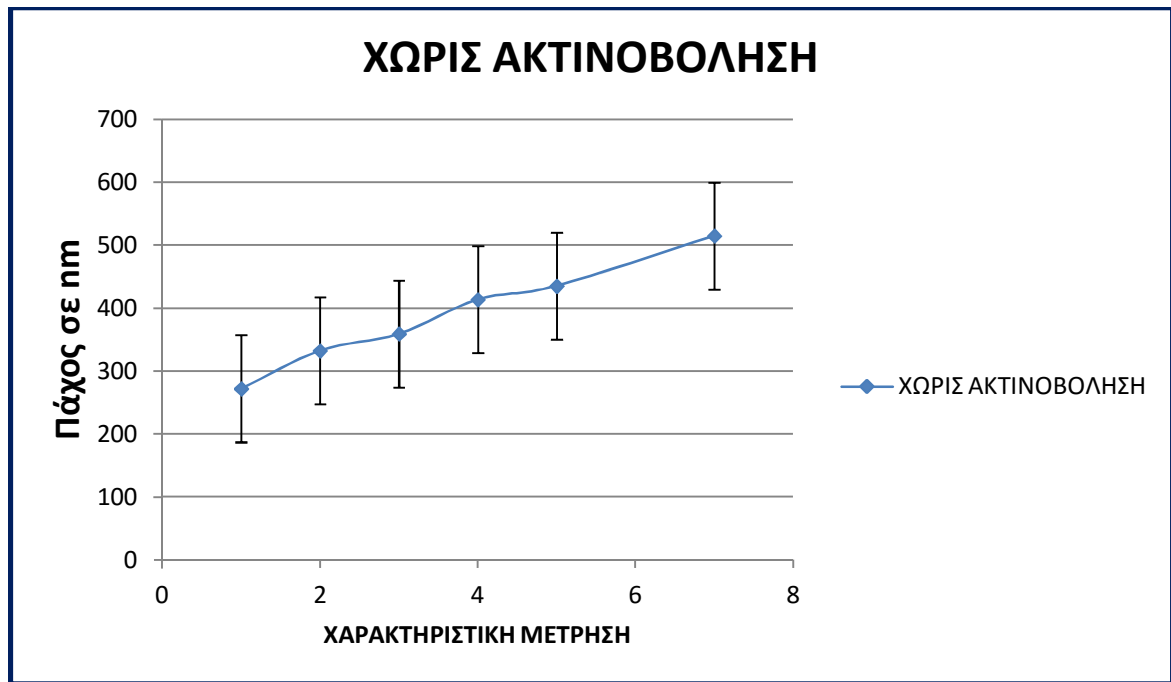


**Εικόνα 4.52** Γραφική απεικόνιση των μετρήσεων των υψών χωρίς ακτινοβολήση και η τυπική τους απόκλιση

*Τα διάφορα ύψη της ίνας που μετρήθηκαν μετά από 1 ώρα ακτινοβολήση*

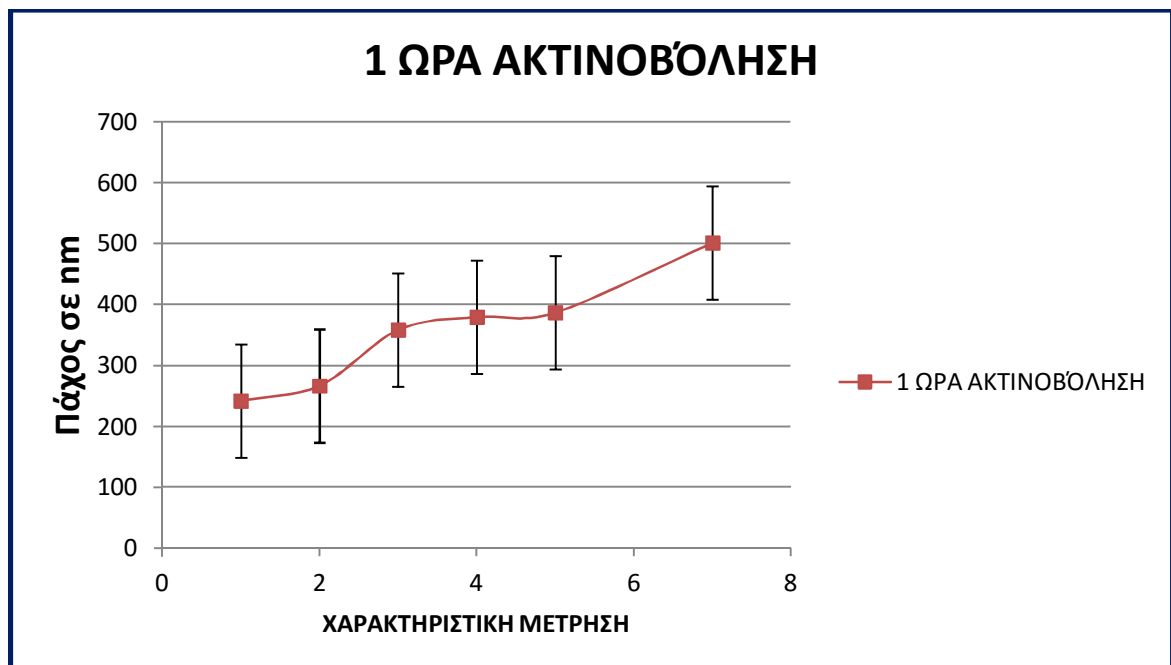


**Εικόνα 4.53** Γραφική απεικόνιση των μετρήσεων των υψών μετά τη 1 ώρα ακτινοβολήση και η τυπική τους απόκλιση  
*Τα διάφορα πάχη της ίνας που μετρήθηκαν χωρίς ακτινοβολήση :*



**Εικόνα 4.54** Γραφική απεικόνιση των μετρήσεων των παχών χωρίς ακτινοβολήση και η τυπική τους απόκλιση

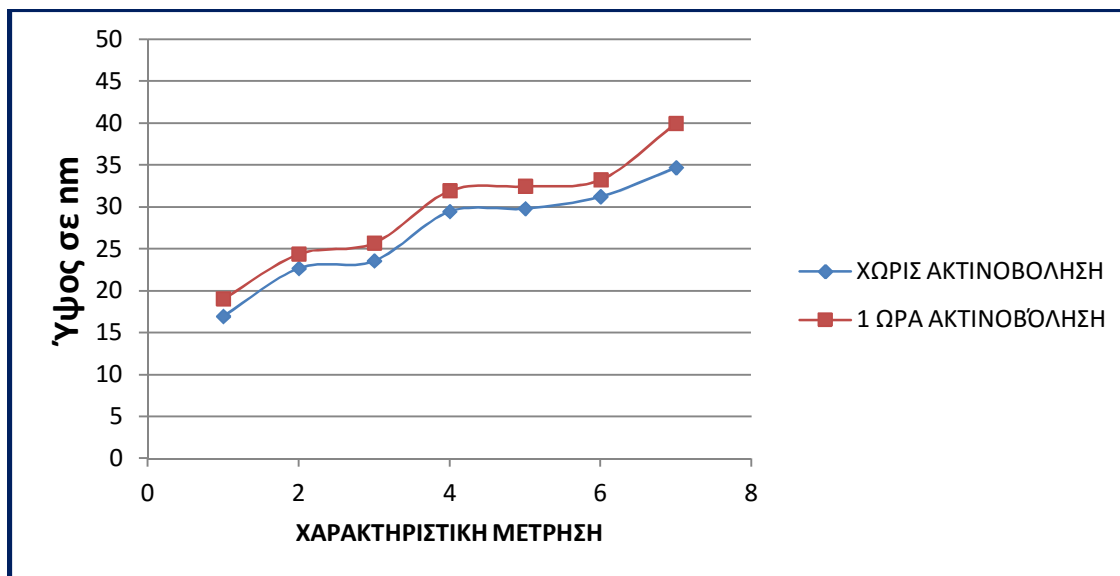
Τα διάφορα πάχη της ίνας που μετρήθηκαν μετά από 1 ώρα ακτινοβολήση :



**Εικόνα 4.55** Γραφική απεικόνιση των μετρήσεων των παχών μετά τη 1 ώρα ακτινοβολήση και η τυπική τους απόκλιση

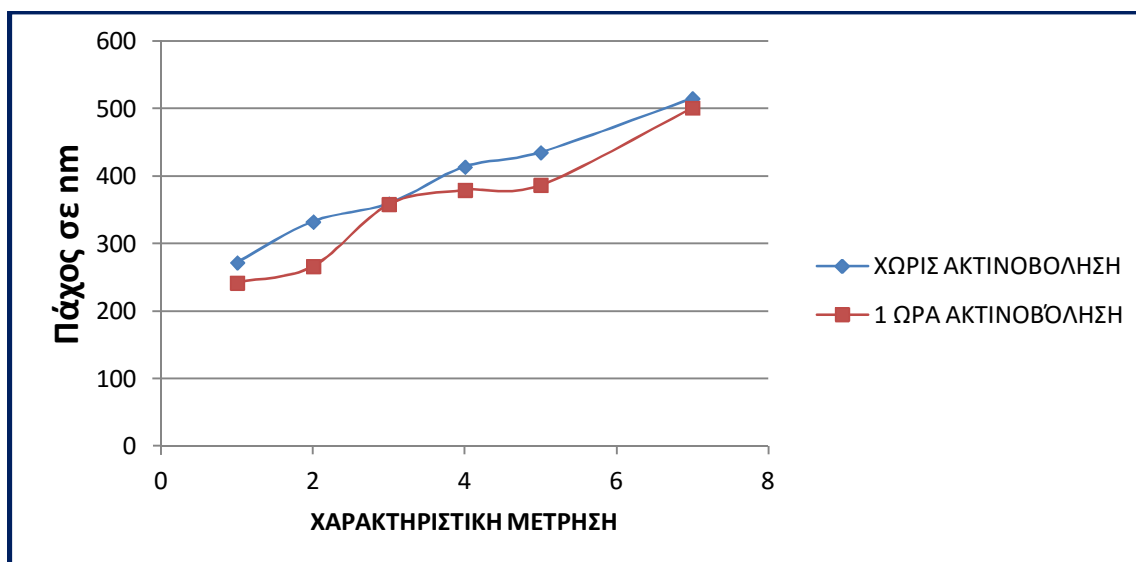
Συγκεντρωτικά οι μετρήσεις πριν και μετά την ακτινοβολήση:

**ΔΙΑΦΟΡΑ ΜΕΣΩΝ ΟΡΩΝ ΥΨΟΥΣ ΔΙΑΦΟΡΩΝ ΙΝΩΝ ΠΡΙΝ ΚΑΙ ΜΕΤΑ ΤΗΝ ΑΚΤΙΝΟΒΟΛΗΣΗ:**



**Εικόνα 4.56** Γραφική απεικόνιση της διαφοράς των μετρήσεων του ύψους της πριν και μετά την ακτινοβόληση

**ΔΙΑΦΟΡΑ ΜΕΣΩΝ ΟΡΩΝ ΠΑΧΟΥΣ ΔΙΑΦΟΡΩΝ ΙΝΩΝ ΠΡΙΝ ΚΑΙ ΜΕΤΑ ΤΗΝ ΑΚΤΙΝΟΒΟΛΗΣΗ:**



**Εικόνα 4.57** Γραφική απεικόνιση της διαφοράς των μετρήσεων του πάχους της πριν και μετά την ακτινοβόληση

## Στατιστική Σημαντικότητα

Για τις μετρήσεις του ύψους, του πάχους και του D-Band πριν και μετά την ακτινοβολή θα πρέπει και εδώ να υπολογιστεί η P-Value για την επιβεβαίωση της ορθότητας των αποτελεσμάτων.

### **ΜΕΤΡΗΣΕΙΣ ΥΨΟΥΣ**

Ανάλυση διακύμανσης κατά ένα παράγοντα						
<b>ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑ</b>						
<i>Ομάδες</i>	<i>Πλήθος</i>	<i>Άθροισμα</i>	<i>Μέσος όρος</i>	<i>Διακύμανση</i>		
Στήλη 1	10	169.1	33.8	5.0		
Στήλη 2	10	195.4	39.1	6.9		
<b>ΑΝΑΛΥΣΗ ΔΙΑΚΥΜΑΝΣΗΣ</b>						
<i>Προέλευση διακύμανσης</i>	<i>SS</i>	<i>βαθμοί ελευθερίας</i>	<i>MS</i>	<i>F</i>	<b>τιμή-P</b>	<i>κριτήριο F</i>
Μεταξύ ομάδων	69.4	1	69.4	11.7	<b>0.009</b>	5.3
Μέσα στις ομάδες	47.5	8	5.9			
Σύνολο	116.9	9				

**Πίνακας 4.14** Εξετάζεται αν το δείγμα είναι στατιστικά σημαντικό με τη χρήση της μεταβλητής P-Value

- ✓ Η P-Value παρατηρείται ότι είναι πολύ μικρότερη του 0,05 άρα επιβεβαιώνεται η στατιστική ορθότητα των μετρήσεων που πραγματοποιήθηκαν.



## ΜΕΤΡΗΣΕΙΣ ΠΑΧΟΥΣ

Ανάλυση διακύμανσης κατά ένα παράγοντα							
ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑ							
Ομάδες	Πλήθος	Άθροισμα	Μέσος όρος	Διακύμανση			
Στήλη 1	10	6146	614,6	962,3			
Στήλη 2	10	5011	501,1	168,8			
ΑΝΑΛΥΣΗ ΔΙΑΚΥΜΑΝΣΗΣ							
Προέλευση διακύμανσης	SS	βαθμοί ελευθερίας	MS	F	τιμή-P	κριτήριο F	
Μεταξύ ομάδων	64411,3	1	64411,3	113,9	<b>3,25E-09</b>	4,4	
Μέσα στις ομάδες	10179,6	18	565,5				
Σύνολο	74590,8	19					

**Πίνακας 4.13** Εξετάζεται αν το δείγμα είναι στατιστικά σημαντικό με την χρήση της μεταβλητής P-Value

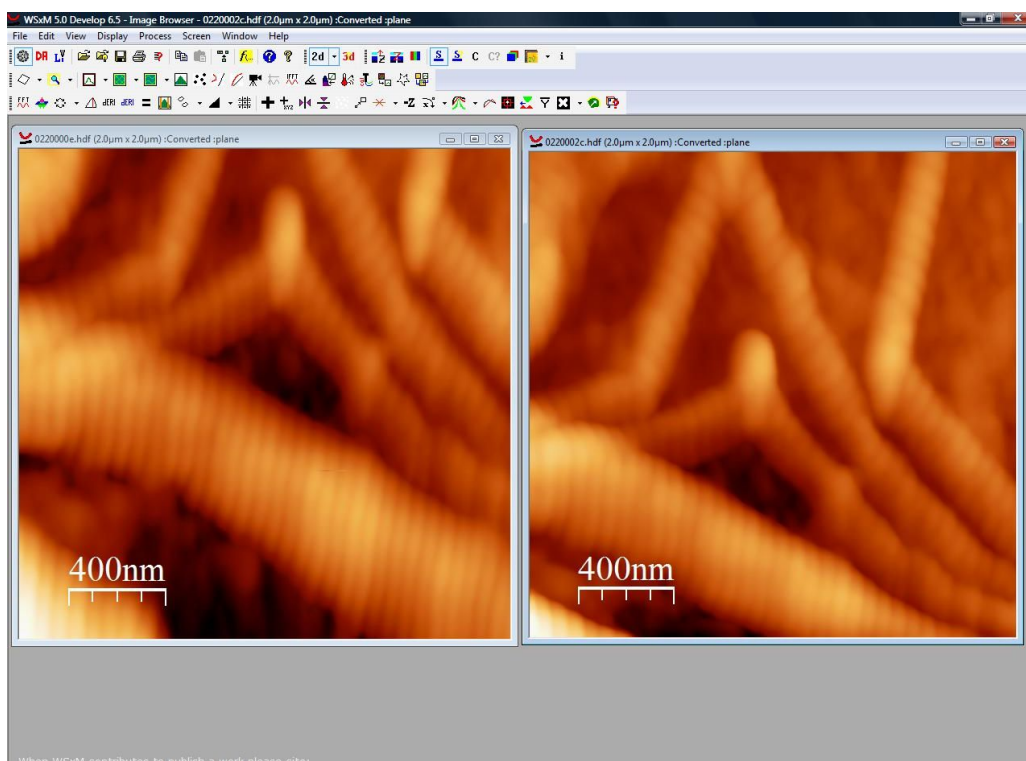
- ✓ Η P-Value παρατηρείται ότι είναι πολύ μικρότερη του 0,05 άρα επιβεβαιώνεται η στατιστική ορθότητα των μετρήσεων που πραγματοποιήθηκαν.

## 4.5 Διαδικασία μετρήσεων και χρήση λογισμικού

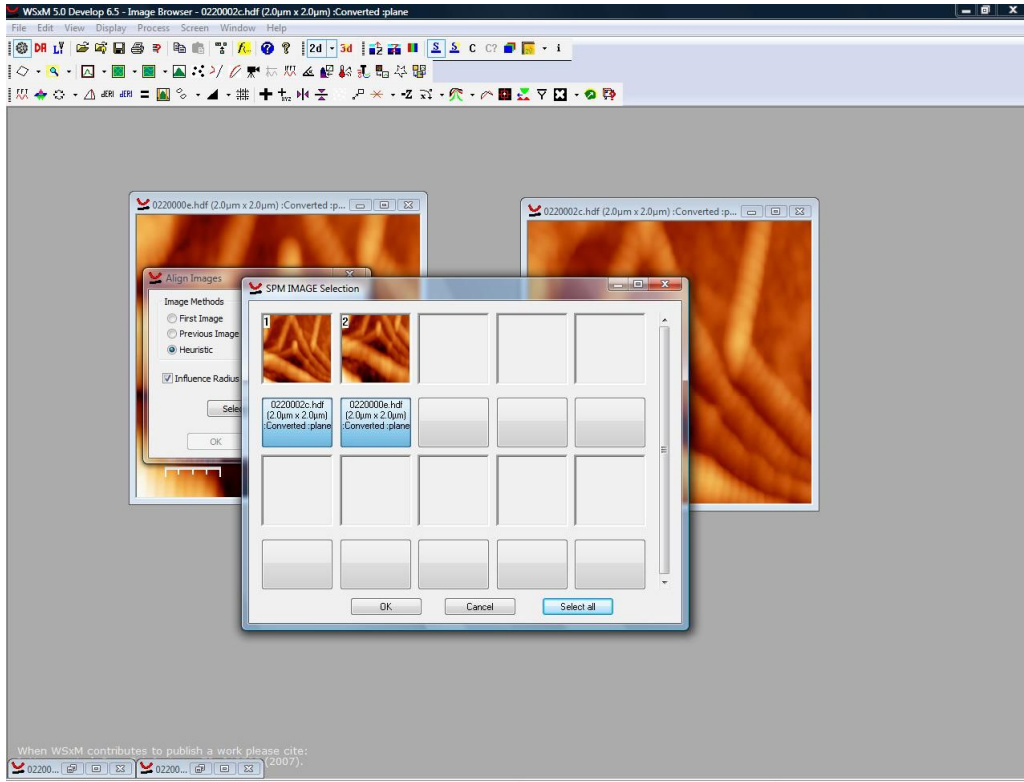
Στο πείραμα της συνεχούς ακτινοβολήσης καταγράφηκαν, εκτός των άλλων, η μέση τραχύτητα αλλά και η μέση υψομετρική διαφορά της κάθε περιοχής του κολλαγόνου (όχι μόνο της μετρηθείσας ίνας), με σκοπό την σύγκριση πριν και μετά την ακτινοβολή στην ευρύτερη περιοχή που σαρώθηκε η εικόνα. Για την διαδικασία αυτή χρησιμοποιήθηκε πρόγραμμα επεξεργασίας εικόνων **WSxM 5.0 Develop 6.5**.

Επειδή όμως οι δύο εικόνες που σαρώθηκαν πριν και μετά την ακτινοβολή, δεν απεικόνιζαν ακριβώς την ίδια περιοχή (καθώς κάτι τέτοιο είναι σχεδόν αδύνατο σε ναοκλίμακα), η σύγκριση της τραχύτητας προκύπτει λανθασμένη. Έτσι ήταν απαραίτητη η ευθυγράμμιση τους, η οποία έγινε με το πρόγραμμα **WSxM 5.0 Develop 6.5** ακολουθώντας την παρακάτω διαδικασία:

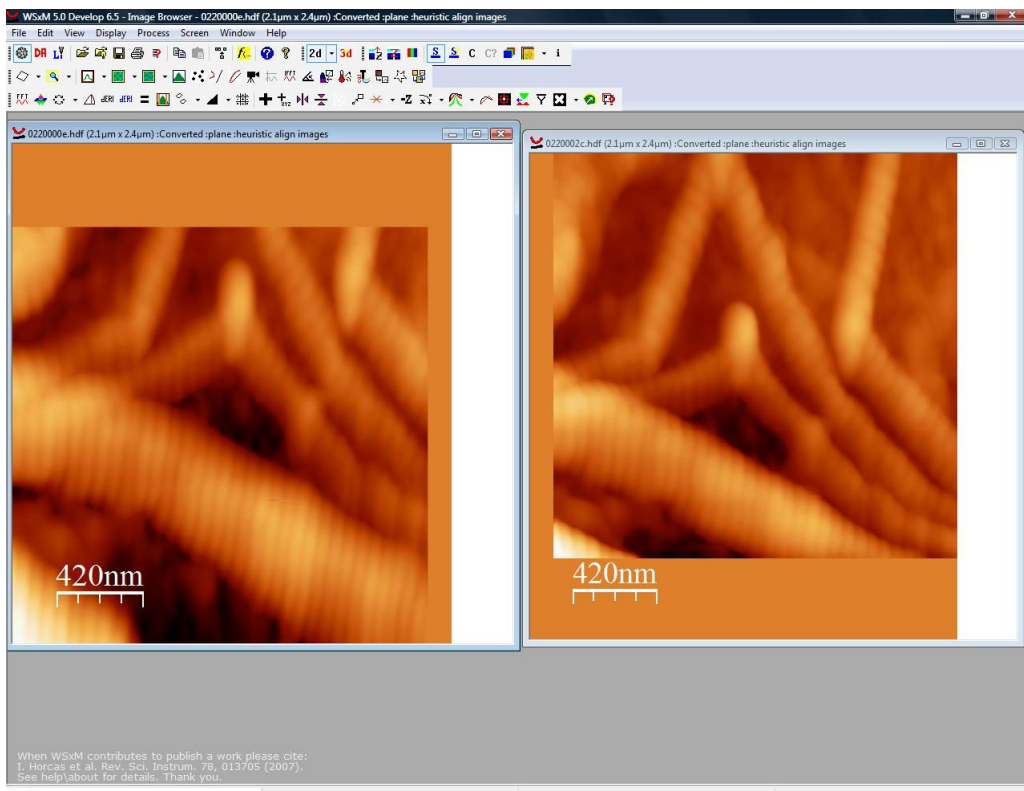
Αρχικά διορθώθηκε η διαφορά κλίσης που υπήρχε με την επιλογή **Align Images** του προγράμματος. **Process**  $\Rightarrow$  **Filter**  $\Rightarrow$  **Align Images**



**Εικόνα 4.58** Εικόνες ινών κολλαγόνου από AFM πριν την ευθυγράμμισή τους



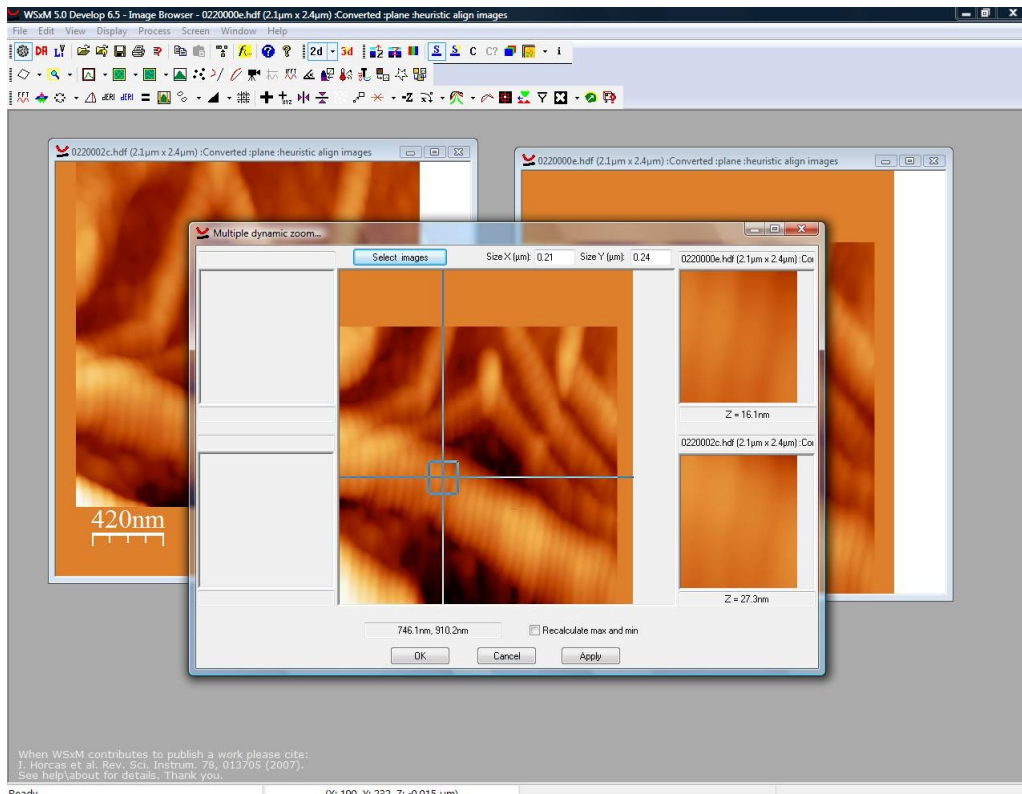
**Εικόνα 4.59** Διαδικασία ευθυγράμμισης με το πρόγραμμα *WSxM 5.0 Develop 6.5*



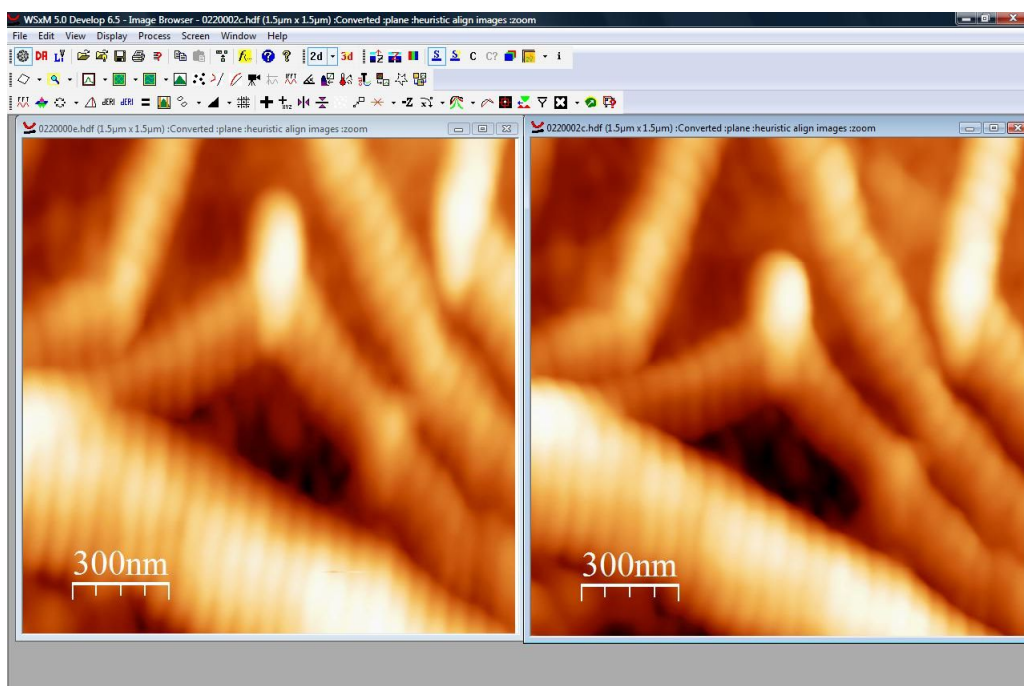
**Εικόνα 4.60** Εικόνες ινών κολλαγόνου από *AFM* μετά την ευθυγράμμισή τους

Παρότι οι εικόνες έχουν πλέον την ίδια κλίση πρέπει να μεγεθυνθούν και οι δύο κατάλληλα ώστε να εστιαστεί η περιοχή που θα μελετηθεί. Αυτό θα επιτευχθεί με την διαδικασία του κοψίματος(cropping).

Process  $\Rightarrow$  Multiple Dynamic Zoom



Εικόνα 4.61 Διαδικασία κοψίματος

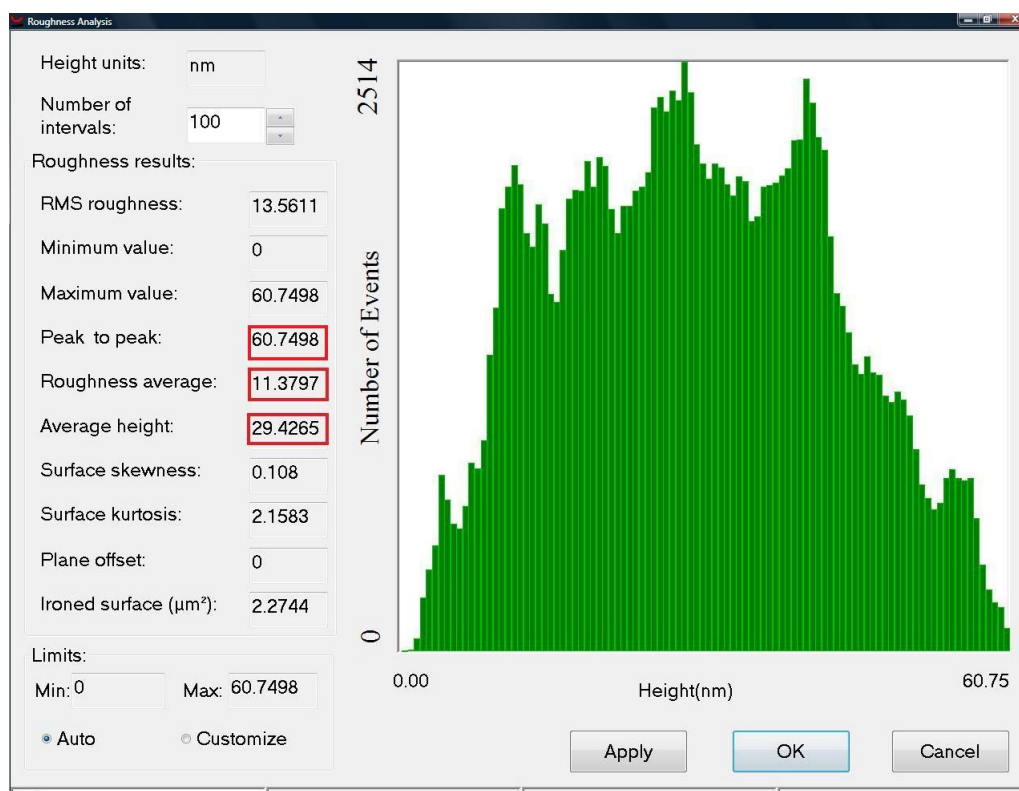


Εικόνα 4.62 Ευθυγραμμισμένες εικόνες έτοιμες για μελέτη

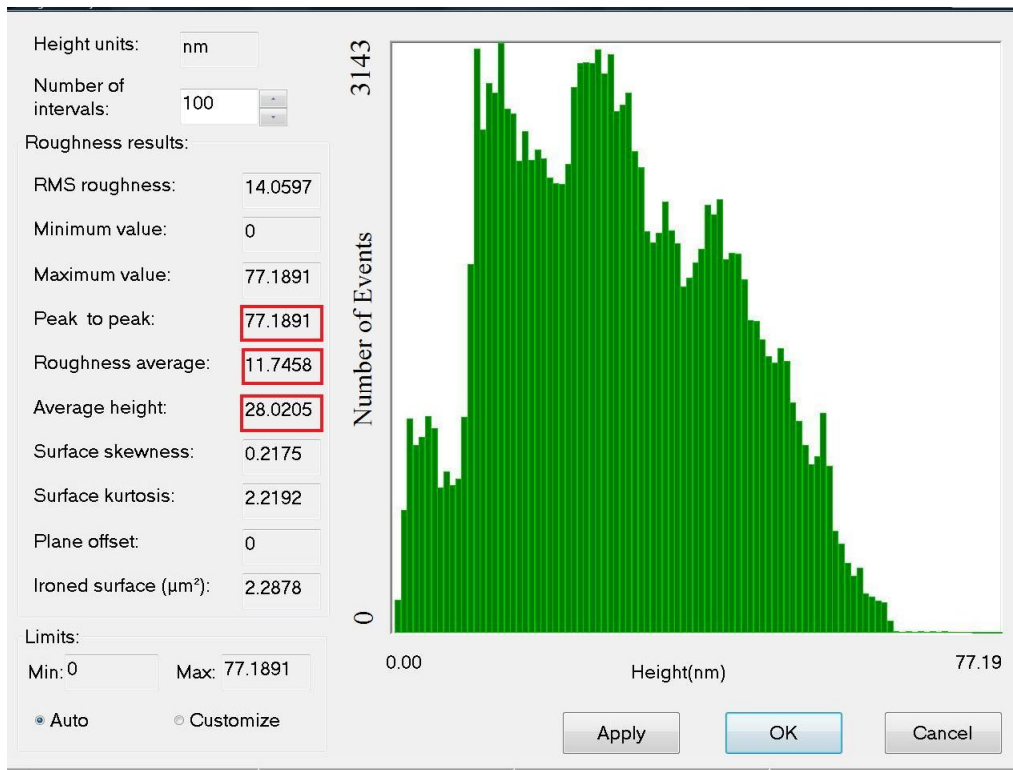
Οι δύο εικόνες είναι πλέον εστιασμένες σε ταυτόσημη περιοχή του δείγματος. Από τις εικόνες παρατηρούνται τα αποτελέσματα που αναφέρθηκαν παραπάνω όσον αφορά την σημαντική μείωση του πλάτους της ίνας μετά την ακτινοβολία. Η μέτρηση της μέσης τραχύτητας αλλά και της υψομετρικής διαφοράς μπορεί πλέον να πραγματοποιηθεί χωρίς κανένα πρόβλημα.

Οι μετρήσεις θα καταγραφούν, ξεχωριστά για την κάθε εικόνα, από την επιλογή **Roughness Analysis** του προγράμματος.

Process  $\Rightarrow$  Roughness Analysis



**Εικόνα 4.63** Δείγμα πριν την ακτινοβολία



**Εικόνα 4.64** Δείγμα μετά την ακτινοβόληση

	Πριν την ακτινοβόληση	Μετά την ακτινοβόληση
<b>Roughness Average</b>	<b>11,37</b>	<b>11,74</b>
<b>Average Height</b>	<b>29,42</b>	<b>28,02</b>

**Πίνακας 4.65** Μέση τραχύτητα και μέσο ύψος δείγματος πριν και μετά την ακτινοβόληση

*Η διαφορά που παρατηρείται στις τιμές της τραχύτητας δεν είναι στατιστικά σημαντική. Επομένως η υπόθεση ότι η τραχύτητα του δείγματος αλλάζει μετά την ακτινοβόληση απορρίπτεται. Κάτι το οποίο δε θα συνέβαινε αν δεν είχε πραγματοποιηθεί σωστά η ευθυγράμμιση καθώς και η κατάλληλη μεγέθυνση της εικόνας με τη διαδικασία που παρουσιάστηκε παραπάνω.*



## 4.6 Βιβλιογραφία

[1] Σ. Ψιλοδημητρακόπουλος, «Συνδυασμένη Απεικονιστική Μικροσκοπία Γέννησης Δεύτερης Αρμονικής και Διφωτονικά Διεγειρόμενου Φθορισμού Δομών Κολλαγόνου», Μεταπτυχιακή Εργασία, Εργαστήριο Βιοϊατρικής Οπτικής & Εφαρμοσμένης Βιοφυσικής Σ.Η.Μ.Μ.Υ. - Ε.Μ.Π., Αθήνα, 2005.

[2] Α. Στυλιανού, «Ανάπτυξη πειραματικής διαδικασίας μελέτης δεύτερης αρμονικής και δομής κολλαγόνου με μικροσκοπία ατομικής δύναμης», Μεταπτυχιακή Εργασία, Εργαστήριο Βιοϊατρικής Οπτικής & Εφαρμοσμένης Βιοφυσικής Σ.Η.Μ.Μ.Υ. - Ε.Μ.Π., Αθήνα, 2007.

[3] Σ. Κοντομαρής, «Μελέτη τροποποίησης επιφανειακών χαρακτηριστικών λεπτών υμενίων κολλαγόνου υπό την επίδραση μεταβολών φυσικών παραμέτρων με απεικονιστική μικροσκοπία ατομικής δύναμης», Μεταπτυχιακή Εργασία, Εργαστήριο Βιοϊατρικής Οπτικής & Εφαρμοσμένης Βιοφυσικής Σ.Η.Μ.Μ.Υ. - Ε.Μ.Π., Αθήνα,

[4] L. Bozec, G. van der Heijden, M. Horton, «Collagen Fibrils - Nanoscale Rope», *Biophysics Journal*, Vol. 92(1), p. 70 –75, 2007.  
2010.

[5] FH. Silver, JW. Freeman ,GP. Seehra , «Collagen self-assembly and the development of tendon mechanical properties», *Biomechanics Journal*, Vol. 36 (10), p. 1529 – 53, 2003.

[6] L.Yang ,KO. van der Werf, BF. Koopman, V. Subramaniam, ML. Bennink, PJ. Dijkstra, J. Feijen, «Micromechanical bending of single collagen fibrils using atomic force microscopy», *Journal Biomedical Materials Research A.*, Vol. 82(1), p. 160-8, 2007.

[7] DA. Cisneros, C. Hung, CM. Franz, DJ. Muller, «Observing growth steps of collagen self-assembly by time-lapse high-resolution atomic force microscopy», *Journal Structural Biology*, Vol. 154(3), p. 232 – 45, 2006

## 4.7 Συμπεράσματα

Πραγματοποιήθηκαν λοιπόν μια σειρά από πειράματα, τόσο διακριτών δόσεων ακτινοβολίας μικρής και μεγάλης χρονικής διάρκειας σε ίνες κολλαγόνου, όσο και πειράματα συνεχούς ακτινοβολίας με λέιζερ που εκπέμπει στα 661nm. Σε όλα τα πειράματα, ακόμα και στις πρώτες μετρήσεις, που οι ίνες κολλαγόνου δεν είχαν σχηματιστεί πλήρως, καθώς δεν είχαν πάρει ακόμα το τελικό γεωμετρικό τους σχήμα, παρατηρήθηκε αισθητή μείωση του πάχους μετά από κάθε ακτινοβολία. Επίσης στα πειράματα που η ίνα είχε πάρει την τελική κυλινδρική της μορφή και η καταγραφή των γεωμετρικών χαρακτηριστικών ήταν εφικτή, παρατηρήθηκε ότι το ύψος της ίνας αυξανόταν μετά την ακτινοβολία με το ερυθρό laser. Επιπλέον, αξιολογημένη είναι σε όλα τα πειράματα, η ταχύτερη διαμόρφωση της D-Band περιοδικότητας της ίνας σταδιακά μετά από τις ακτινοβολίες. Η χρήση laser ερυθρής ακτινοβολίας βοηθάει την ίνα ώστε να αναπτυχθεί ταχύτερα σχετικά με το χρόνο που θα χρειαζόταν να αναπτυχθεί από μόνη της.

Σύμφωνα με τα αποτελέσματα, μελέτης των ερευνητών A. Wunsch και K. Matuschka, η χρήση laser χαμηλής ισχύος συμβάλλει στη βελτιστοποίηση της αναδόμησης των ρυτίδων του δέρματος. Τα αποτελέσματα της διπλωματικής εργασίας ερμηνεύουν την ανωτέρω μελέτη, αν και εκείνη πραγματοποιήθηκε σε μακροσκοπικό επίπεδο, καθώς η βελτίωση των ιδιοτήτων του δέρματος που παρουσιάζεται πιθανόν να είναι αποτέλεσμα της αναδόμησης του κολλαγόνου που επιβεβαιώθηκε από τα αποτελέσματα των μετρήσεων των ποικίλων πειραμάτων της διπλωματικής.

Οι θεραπείες με laser χαμηλής ισχύος (Low-level laser therapy) έχουν ένα ευρύ φάσμα εφαρμογών στη δερματολογία, κυρίως στην ταχύτερη επούλωση πληγών, στη μείωση των φλεγμονών, στην ελάττωση των νεκρών κυττάρων, και στην αναζωογόνηση του δέρματος. Επίσης, η θεραπεία αυτή μπορεί να εφαρμοστεί για ασθένειες της επιδερμίδας που εκδηλώνονται με αποχρωματισμό του δέρματος. Συγκεκριμένα, είτε οι αλλοιώσεις είναι ανοιχτόχρωμες (λεύκη), είτε σκουρόχρωμες (πανάδες) χρησιμοποιείται η ίδια τεχνική, αλλά με διαφορετική δοσολογία. Άλλες εφαρμογές της θεραπείας με χαμηλή ένταση ακτινοβολίας είναι η αντιμετώπιση της ακμής, του ιού του έρπητα και της ψωρίασης. Αποτελεσματική είναι και η αναδόμηση του



δέρματος μετά από έγκαυμα, αλλά και η επούλωση ουλών. Χαρακτηριστικές εφαρμογές αποτελούν επίσης, η ενδυνάμωση του ανοσοποιητικού συστήματος, η βελτίωση της κυκλοφορίας του αίματος, η αντιϊκή προστασία που προσφέρει καθώς και η αύξηση των επιπέδων της σεροτονίνης. Αξίζει επίσης να αναφερθεί ότι η θεραπεία με ακτινοβολία χαμηλής ισχύος στην περιοχή του ερυθρού, μπορεί να είναι μια αποτελεσματική και ασφαλής μη επεμβατική μέθοδος στην αναδιαμόρφωση του δέρματος, και να χρησιμοποιηθεί ως υποστηρικτική μέθοδος για τη θεραπεία της φωτογήρανσης.

Επιπροσθέτως, η ερυθρή ακτινοβολία αποτελεί μία αποτελεσματική μέθοδο για την αντιμετώπιση του πόνου, η οποία έχει εφαρμοστεί τόσο σε ανθρώπους όσο και σε ζώα. Αποτελεί γεγονός ότι τα ερυθρά μήκη κύματος έχουν σχετικά μεγάλη διεισδυτικότητα στους ιστούς. Για το λόγο αυτό, η συγκεκριμένη θεραπεία, βρίσκει εφαρμογή στην καταπολέμηση των μυϊκών πόνων (προκαλεί μυοχαλάρωση) και των τραυματισμών των αρθρώσεων.

Η εφαρμογή της φωτοθεραπείας με χαμηλής ισχύος laser στην περιοχή του ερυθρού, παρουσίασε αρχικά τεχνικές δυσκολίες (μεγάλος όγκος συσκευής) και η εφαρμογή της ήταν δυνατή μόνο από επαγγελματίες ιατρούς (λόγω και του υψηλού κόστους των συσκευών). Τις τελευταίες δεκαετίες όμως, με τη βελτίωση της απόδοσης των μπαταριών των συσκευών, έγινε δυνατή η αύξηση της εφαρμοζόμενης τάσης με αποτέλεσμα τη μεγιστοποίηση της έντασης του laser σε μικρές, εύχρηστες, φορητές και χαμηλού κόστους συσκευές.

Το συμπέρασμα που προκύπτει από την παραπάνω ανάλυση είναι ότι μια πληθώρα ασθενειών μπορεί να αντιμετωπιστεί με χρήση της θεραπείας laser χαμηλής ισχύος στην περιοχή του ερυθρού. Το πλεονέκτημα της μη επεμβατικότητας την καθιστά ιδιαίτερα φιλική στον ασθενή, ενώ η αποτελεσματικότητά της είναι πλέον αναμφισβήτητη από την επιστημονική κοινότητα. Για το λόγο αυτό η ακριβής γνώση των διεργασιών που λαμβάνουν χώρα σε νανοκλίμακα έχουν καθοριστική σημασία στην προσπάθειά προώθησής της από το εργαστήριο στο νοσοκομείο.