

ΕΘΝΙΚΟ ΜΕΤΣΟΒΙΟ ΠΟΛΥΤΕΧΝΕΙΟ ΣΧΟΛΗ ΕΦΑΡΜΟΣΜΕΝΩΝ ΜΑΘΗΜΑΤΙΚΩΝ ΚΑΙ ΦΥΣΙΚΩΝ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ

ΔΙΑΤΜΗΜΑΤΙΚΟ ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΩΝ ΣΠΟΥΔΩΝ «ΜΙΚΡΟΣΥΣΤΗΜΑΤΑ ΚΑΙ ΝΑΝΟΔΙΑΤΑΞΕΙΣ»

ΧΡΗΣΗ ΤΗΣ ΜΙΚΡΟΣΚΟΠΙΑΣ ΑΤΟΜΙΚΗΣ ΔΥΝΑΜΗΣ ΓΙΑ ΜΕΛΕΤΗ ΤΗΣ ΕΠΙΔΡΑΣΗΣ ΕΡΥΘΡΗΣ ΑΚΤΙΝΟΒΟΛΙΑΣ ΣΕ ΙΝΕΣ ΒΙΟΫΛΙΚΩΝ

ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ

του Τσαβαλιά Στυλιανού

Επιβλέπων: Κ. Πολιτόπουλος

Αθήνα 2016



ΕΘΝΙΚΟ ΜΕΤΣΟΒΙΟ ΠΟΛΥΤΕΧΝΕΙΟ ΣΧΟΛΗ ΕΦΑΡΜΟΣΜΕΝΩΝ ΜΑΘΗΜΑΤΙΚΩΝ ΚΑΙ ΦΥΣΙΚΩΝ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ

ΔΙΑΤΜΗΜΑΤΙΚΟ ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΩΝ ΣΠΟΥΔΩΝ «ΜΙΚΡΟΣΥΣΤΗΜΑΤΑ ΚΑΙ ΝΑΝΟΔΙΑΤΑΞΕΙΣ»

ΧΡΗΣΗ ΤΗΣ ΜΙΚΡΟΣΚΟΠΙΑΣ ΑΤΟΜΙΚΗΣ ΔΥΝΑΜΗΣ ΓΙΑ ΜΕΛΕΤΗ ΤΗΣ ΕΠΙΔΡΑΣΗΣ ΕΡΥΘΡΗΣ ΑΚΤΙΝΟΒΟΛΙΑΣ ΣΕ ΙΝΕΣ ΒΙΟΫΛΙΚΩΝ

ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ

του Τσαβαλιά Στυλιανού

Επιβλέπων: Κ. Πολιτόπουλος

Εγκρίθηκε από την τριμελή εξεταστική επιτροπή την

.....

Κ. Πολιτόπουλος	Ε.Β. Χριστοφόρου	Γ. Ματσόπουλος		
Αν. Καθηγητής	Καθηγητής	Αν. Καθηγητής		

Αθήνα 2016 Στυλιανός Τσαβαλιάς

© (2016) Εθνικό Μετσόβιο Πολυτεχνείο. All rights Reserved. Απαγορεύεται η αντιγραφή, αποθήκευση και διανομή της παρούσας εργασίας, εξ ολοκλήρου ή τμήματος αυτής, για εμπορικό σκοπό. Επιτρέπεται η ανατύπωση, αποθήκευση και διανομή για σκοπό μη κερδοσκοπικό, εκπαιδευτικής ή ερευνητικής φύσης, υπό την προϋπόθεση να αναφέρεται η πηγή προέλευσης και να διατηρείται το παρόν μήνυμα. Ερωτήματα που αφορούν τη χρήση της εργασίας για κερδοσκοπικό σκοπό πρέπει να απευθύνονται προς το συγγραφέα. Οι απόψεις και τα συμπεράσματα που περιέχονται σ' αυτό το έγγραφο εκφράζουν το συγγραφέα και δεν πρέπει να ερμηνευτεί ότι αντιπροσωπεύουν τις επίσημες θέσεις του Εθνικού Μετσόβιου Πολυτεχνείου.

Ευχαριστίες

Η παρούσα διπλωματική εργασία που εκπονήθηκε στο τμήμα Βιοϊατρικής Οπτικής και Εφαρμοσμένης Βιοφυσικής της σχολής Ηλεκτρολόγων Μηχανικών και Μηχανικών Υπολογιστών του Εθνικού Μετσόβιου Πολυτεχνείου για την εκπλήρωση των σπουδών μου στο Διατμηματικό Πρόγραμμα Μεταπτυχιακών Σπουδών: «Μικροσυστήματα και Νανοδιατάξεις» κλείνει ένα σημαντικό κύκλο της ζωής μου. Γι' αυτό, θα ήθελα να εκφράσω τις ευχαριστίες μου σε όποιον με στήριξε.

Πρωτίστως, θα ήθελα να ευχαριστήσω τον επιβλέποντα Αν. Καθηγητή κύριο Κ. Πολιτόπουλο για τις υποδείξεις και τις συμβουλές που μου παρείχε καθώς και για το ότι με δέχθηκε στο εργαστήριο του, αναθέτοντας μου ένα ιδιαίτερο θέμα που συμβάδιζε απολύτως με τα ενδιαφέροντα μου.

Έπειτα, θα ήθελα να καταθέσω τις εγκάρδιες ευχαριστίες στην υποψήφια διδάκτορα Κυριακή Σαμπάνη για τη βοήθεια που μου παρείχε στη θεμελίωση των γνώσεων μου για το αντικείμενο αυτης της εργασίας, για τη συνεχή υποστήριξή της στις δυσκολίες που πρόεκυπταν αλλα και για την ψυχολογική ενθάρρυνση που μου παρείχε όλο αυτό το διάστημα.

Επίσης, θα ήθελα να ευχαριστήσω τον συνάδελφο και φίλο Νίκο για τη συμπαράσταση του. Τους φίλους μου, Γιάννη, Γιώργο, Δημήτρη, Έλενα, Νίκη, που ήταν και θα είναι δίπλα μου.

Τέλος, δε θα γινόταν να μην ευχαριστήσω την οικογένεια μου, για την ολοκληρωτική υποστήριξη που μου παρέχει όλα αυτά τα χρόνια.

Περίληψη	
Κεφάλαιο 1: Ελαστίνη (Βιοσύνθεση, δομή, αυτο-οργάνωση in vitro, ELPs)	
1.1 Ελαστομερικά πολυπεπτίδια - Εισαγωγή	
1.1.1 Ασθένειες και ελαστικές ίνες	
1.2 Βιοσύνθεση ελαστίνης	14
1.3 Συσσωμάτωση της τροποελαστίνης in vitro	
1.3.1 In vitro παρασκευή της τροποελαστίνης	
1.4 Εφαρμογές πολυπεπτιδίων βασισμένα στην ελαστίνη (ELP)	
1.4.1 Εφαρμογές ελαστομερικών πολυπεπτιδίων για ελεγχόμενη αποδέσμευση ουσιών	δραστικών 20
1.4.1.1 Μακρομοριακοί φορείς	
1.4.1.2 Νανοφορείς	
1.4.2 Εφαρμογές ελαστομερικών πολυπεπτιδίων στην ιστική μηχανική	
Κεφάλαιο 2: Κολλαγόνο	
2.1 Δομή του κολλαγόνου	
2.1.1 Ιεραρχική δομή του κολλαγόνου	
2.2 Βιοσύνθεση Κολλαγόνου	
2.3 Σύνθετα βιοϋλικά ελαστίνης-κολλαγόνου	30
Κεφάλαιο 3: Ακτινοβολία laser χαμηλής ισχύος στην περιοχή του ερυθρ λειτουργίας, Εφαρμογές σε παθήσεις)	ού (Αρχή 31
3.1 Αρχή λειτουργίας της φωτοθεραπείας με ακτινοβολία χαμηλής ισχύος	
3.2 Εφαρμογές της φωτοθεραπείας με ακτινοβολία χαμηλής ισχύος	
3.2.1 Δερματική ανανέωση	
3.2.2 Αντιμετώπιση της ακμής	
3.2.3 Φωτοπροστασία	
3.2.4 Η φωτοθεραπεία στις δερματικές βλάβες του έρπη	36
3.2.5 Η φωτοθεραπεία για την καταπολέμηση της λεύκης	37
Κεφάλαιο 4: Μικροσκόπιο Ατομικής Δύναμης	
4.1 Νανοεπιστήμη - Νανοτεχνολογία - Νανοϋλικά	
4.2 Μικροσκόπιο ατομικής δύναμης: Εισαγωγή-ιστορική αναδρομή	40
4.3 Αρχή λειτουργίας	40
4.4 Δομικά στοιχεία του οργάνου και ο ρόλος τους	
4.5 Τεχνικές AFM	
4.5.1 Λειτουργία συνεχούς επαφής	44
4.5.2 Λειτουργία ενδιάμεσης επαφής	45

Περιεχόμενα

εφαλαίο 5 επίδρασι ελέτη ελα	· - Τη νικτο αυτουργανωση ελαστινής - Αλεικονιση σύμων ελαστινής με ΑΓΝ της ερυθρής ακτινοβολίας χαμηλής ισχύος στην ελαστίνη-Συνδυαστι ττίνης/κολλανόνου
5.1 Προετ	οιμασία stock εναιωρημάτων ελαστίνης-διαλυτών
5.1.1 П	οοετοιμασία stock εναιωρημάτων ελαστίνης σε υπερκάθαρο νερό
5.1.2 П	οοετοιμασία stock εναιωρημάτων ελαστίνης σε PBS
5.1.3 П	οοετοιμασία stock εναιωρημάτων ελαστίνης σε TBS
5.2 Προετ	οιμασία δειγμάτων
5.3 Μεθοδ	ολογία απεικόνισης με μικροσκοπία ατομικής δύναμης (AFM)
5.4 Γεωμε	τρικά Χαρακτηριστικά ινών ελαστίνης
5.5 Ακτιν	οβόληση με ερυθρή ακτινοβολία χαμηλής ισχύος
5.5.1 П	οωτόκολλο ακτινοβόλησης με ερυθρή ακτινοβολία χαμηλής ισχύος
5.5.2 ∆i	άταζη ακτινοβόλησης
5.6 Χαρα w/v) με μι	ςτηρισμός της τοπογραφίας του δείγματος ελαστίνης- υπερκάθαρου νερού (1 κροσκοπία ατομικής δύναμης – Πρώτη κατηγορία ακτινοβόλησης
5.6.1 A: vɛpoú (τοτελέσματα 1ης κατηγορίας ακτινοβόλησης του δείγματος ελαστίνης- υπερκάθαρ 1% w/v)
5.7 Χαρα νερού (1%	κτηρισμός της τοπογραφίας μικροϊνιδίου (δείγματος ελαστίνης- υπερκάθαρ 6 w/v)) με μικροσκοπία ατομικής δύναμης
5.7.1 Α: υπερκά	τοτελέσματα 1 ^{ης} κατηγορίας ακτινοβόλησης μικροϊνιδίου, του δείγματος ελαστίνη Θαρου νερού (1% w/v)
5.8 Χαραι w/v) με μι	κτηρισμός της τοπογραφίας του δείγματος ελαστίνης- υπερκάθαρου νερού (1 κροσκοπία ατομικής δύναμης – Δεύτερη κατηγορία ακτινοβόλησης΄
5.8.1 Α: νερού (τοτελέσματα 2 ^{ης} κατηγορίας ακτινοβόλησης του δείγματος ελαστίνης- υπερκάθαρ 1% w/v)
5.9 Χαραι w/v) με μι	κτηρισμός της τοπογραφίας του δείγματος ελαστίνης- υπερκάθαρου νερού (1 κροσκοπία ατομικής δύναμης –Τρίτη κατηγορία ακτινοβόλησης
5.9.1 Α: νερού (τοτελέσματα 3 ^{ης} κατηγορίας ακτινοβόλησης του δείγματος ελαστίνης- υπερκάθαρ 1% w/v)
5.10 Χαρ μικροσκο	ακτηρισμός της τοπογραφίας του διαλύματος ελαστίνης (1% w/v) σε PBS τία ατομικής δύναμης
5.11 Χαρ μικροσκο:	ακτηρισμός της τοπογραφίας του διαλύματος ελαστίνης (1% w/v) σε TBS τία ατομικής δύναμης
5.12 In vit	ro μελέτη Κολλαγόνο – Ελαστίνη10
5.12.1	Ταρασκευή stock διαλύματος κολλαγόνου10
5.12.2	Ταρασκευή stock διαλύματος ελαστίνης- κολλαγόνου10
5.12.3	Τροετοιμασία δείγματος10
5.12.4 µікробі	Χαρακτηρισμός της τοπογραφίας του δείγματος ελαστίνης- κολλαγόνου (1:1) εοπία ατομικής δύναμης1
5 1 2 5	ώνουμα και αυζήτηση αποτελεσμάτων

5.14	Συμπεράσματα και σχόλια	106
Βιβλιογ	ραφία	107

Περίληψη

Η παρούσα μεταπτυχιακή εργασία αφορά στη σύνθεση και στη μελέτη δομών ελαστίνης υπό την επίδραση της ερυθρής ακτινοβολίας laser χαμηλής ισχύος στη νανοκλίμακα καθώς και στη συνδυαστική σύνθεση, απεικόνιση και μελέτη ικριωμάτων ελαστίνηςκολλαγόνου με τη χρήση μικροσκοπίου ατομικής δύναμης.

Η ελαστίνη είναι μια ελαστομερική πρωτεΐνη και ένα από τα κύρια συστατικά της εξωκυττάριας μήτρας, η οποία προσδίδει δομική συνοχή μεταξύ ιστών και οργάνων. Οι ελαστικές ίνες παρέχουν την ελαστικότητα των ιστών των πνευμόνων, του δέρματος και των αρτηριών. Το κολλαγόνο είναι μια ινώδης πρωτεΐνη που υπάρχει σε αφθονία στην εξωκυττάρια μήτρα και έχει ιδιαίτερο ρόλο στη σύσταση των ιστών στα οστά, στους τένοντες και στο δέρμα. Συνεπώς, και τα δυο συστατικά έχουν ένα ιδιαίτερα σημαντικό δομικό και λειτουργικό ρόλο στην εξωκυττάρια μήτρα.

Η ακτινοβολία laser χαμηλής ισχύος στην περιοχή του ερυθρού είναι μια ταχέως αναπτυσσόμενη τεχνική φωτοθεραπείας που εφαρμόζεται σε πλήθος ιατρικών εφαρμογών. Η ερυθρή ακτινοβολία δείχνει να έχει ευρεία επιρροή στους ιστούς από τη μακροκλίμακα έως και τη νανοκλίμακα. Έχει αναφερθεί ότι, εκτός από την αντιφλεγμονώδη και την αναλγητική δράση της, η ερυθρή ακτινοβολία ενισχύει και την ικανότητα για ανάπλαση των ιστών. Επίσης, έχει αναφερθεί η συνεισφορά της στην επούλωση των διαταραχών στους τένοντες.

Για τη μελέτη όλων των παραπάνω δημιουργήθηκαν stock εναιωρήματα ελαστίνηςυπερκάθαρου νερού (1% w/v), ελαστίνης-PBS (1% w/v) και ελαστίνης-TBS (1% w/v). Τα εναιωρήματα ελαστίνης- υπερκάθαρου νερού ήταν αυτά που εμφάνισαν δομές ινών ελαστίνης, ενώ τα ελαστίνης-PBS και ελαστίνης-TBS παρουσίασαν πολλά συσσωματώματα. Τα εναιωρήματα μετά τη δημιουργία τους αφέθηκαν για 14 μέρες σε ηρεμία, ώστε να ξεκινήσει η διαδικασία αυτοοργάνωσης των ινών. Έπειτα, γινόταν η προετοιμασία του δείγματος κατά την οποία τοποθετούνταν σε κάθε δείγμα ένα πλέγμα χαρτογράφησης. Το πλέγμα χαρτογράφησης ήταν απαραίτητο, ώστε να είναι εφικτό να προσδιοριστεί η ίδια νανοπεριοχή μετά από κάθε ακτινοβόληση του δείγματος, αφού ο στόχος ήταν η μελέτη της ίδιας ίνας πριν και μετά το πέρας των ακτινοβολήσεων.

Η επίδραση της ερυθρής ακτινοβολίας μελετήθηκε σε τρεις κατηγορίες στη νανοκλίμακα με τη χρήση ατομικού μικροσκοπίου δύναμης. Στην πρώτη κατηγορία, πραγματοποιήθηκαν 20 κύκλοι ακτινοβόλησης για 45 δευτερόλεπτα με 60 δευτερόλεπτα ηρεμίας μεταξύ των διαδοχικών δόσεων, όπου παρατηρήθηκε αύξηση των γεωμετρικών χαρακτηριστικών, όπως αυτή της διαμέτρου κατά 51%. Στη δεύτερη και στην τρίτη κατηγορία πραγματοποιήθηκε συνεχής ακτινοβόληση 15 λεπτών για 3 κύκλους ακτινοβόλησης και 60 λεπτών για 3 κύκλους ακτινοβόλησης αντίστοιχα. Στην πρώτη ακτινοβόληση της δεύτερης κατηγορίας παρατηρήθηκε παρόμοια συμπεριφορά με την πρώτη κατηγορία, ενώ στις επόμενες ακτινοβολήσεις της δευτερης κατηγορίας υπήρξε μείωση των γεωμετρικών χαρακτηριστικών. Τα παραπάνω αποτελέσματα παρουσίασαν ομοιόμορφες διακυμάνσεις των γεωμετρικών χαρακτηριστικών. Σε αντίθεση με αυτά της τρίτης κατηγορίας, όπου υπήρξαν ανομοιόμορφες διακυμάνσεις.

Στη συνέχεια, παρασκευάσθηκαν stock εναιωρήματα ελαστίνης- κολλαγόννου αναλογίας (1:1), για τη συνδυαστική μελέτη στη νανοκλίμακα κολλαγόνου-ελαστίνης με τη χρήση ατομικής μικροσκοπίας δύναμης όπου παρατηρήθηκε πλέγμα δομών κολλαγόνου και ελαστίνης.

Λέξεις Κλειδιά

Ελαστίνη, Ερυθρή ακτινοβολία χαμηλής ισχύος για φωτοθεραπεία, Κολλαγόνο, Μικροσκόπιο Ατομικής Δύναμης

Abstract

The present thesis concerns the synthesis, characterization and study of elastin's structures in nanoscale under the influence of low level red laser irradiation as well as the study of elastin-collagen composites scaffolds with Atomic Force Microscopy (AFM).

Elastin is an elastomeric protein, and one of the main components of the extracellular matrix, which provides structural integrity to the tissues and organs of the body. It is the essential element of elastic fibers, which induces elasticity to the tissue of lung, skin, and arteries. Collagen is a fibrous protein that exists in abundance in the extracellular matrix and has an important role in the formation of fibers in bones, tendons and skin. So, both of them have an important structural and functional role in the extracellular matrix.

Low-level red laser therapy (LLLT) is a fast growing technology used to treat a multitude of conditions. Red light irradiation appears to have a wide range of effects on tissues from macroscale to nanoscale. It has been reported that red light not only presents anti-inflammatory and analgesic effects on human skin but also helps the regenerative capacity of the tissues. Furthermore, there have been reports that red laser phototherapy contributes to tendon healing.

To study all the aforementioned, stock suspensions of elastin with ultrapure water (1% w/v), elastin with PBS (1% w/v) and elastin with TBS (1% w/v) have been made. Only the suspensions of elastin with ultrapure water provided fibers while the suspensions of elastin with PBS and elastin with TBS seem to only have aggregations. The suspensions were left for 14 days to rest, in order to start the self-assembly phase of the elastin fibers. Then, followed the preparation of the sample, in which a grid was added. The grid was essential in order to defined the same nanoarea for every round of irradiation since the main purpose of this thesis was to study the same fiber before and after irradiation.

The impact of the red light irradiation was investigated in nanoscale using Atomic Force Microscopy (AFM) in three categories of investigation. In the first category of experiments, each elastin's sample was irradiated 5 times with each irradiation lasting of 45 seconds and a rest period of 60 seconds. The above irradiation procedure was repeated 4 times, thus the irradiation doses were 20. The results indicated that the average width of the fibrils diameter increased of 51% due to red radiation. In the second and third category of experiments each elastin sample was irradiated continuously for 15 and 60 minutes accordingly for three times both of them. The results of the first irradiation of the second category were almost the same as the once in the first category. However, in the next irradiation of the second category, there was a decrease of geometric characteristics. The results showed uniform variations of the geometrical characteristics. Unlike the ones in the third category which show non-uniform variation ones.

Subsequently, stock suspensions of elastin-collagen composites scaffolds (1:1) were made for the combined study of collagen-elastin at the nanoscale by using atomic force microscopy.

Keywords

Elastin, Low-level red laser therapy (LLLT), Collagen, Atomic Force Microscopy

Κεφάλαιο 1: Ελαστίνη (Βιοσύνθεση, δομή, αυτο-οργάνωση in vitro, ELPs)

1.1 Ελαστομερικά πολυπεπτίδια - Εισαγωγή

Τα ελαστομερικά πολυπεπτίδια είναι μια κατηγορία ιδιαίτερων βιοπολυμερών. Χαρακτηρίζονται από υψηλή ελαστικότητα, αντοχή στον εφελκυσμό και αναστρέψιμη παραμόρφωση χωρίς την απώλεια ενέργειας (Εικόνα 1.1).



Εικόνα 1.1 Απεικόνιση ελαστομερικών πρωτεϊνών [1]

Η ελαστίνη είναι μια ελαστομερική πρωτεΐνη και ένα από τα κύρια συστατικά της εξωκυττάριας μήτρας, η οποία παρέχει δομική συνοχή μεταξύ ιστών και οργάνων. Χαρακτηρίζεται από την ύπαρξη πολλών σταυροδεσμών, είναι μια αδιάλυτη πρωτεΐνη και αποτελεί το θεμελιώδες συστατικό των ελαστικών ινών. Οι ελαστικές ίνες, παρέχουν την ελαστικότητα των ιστών των πνευμόνων, του δέρματος και των αρτηριών. Σε αυτές τις ίνες, η ελαστίνη σχηματίζει τον εσωτερικό πυρήνα, ο οποίος διασπείρεται με μικροΐνες.[1,2]

Αρκετές έρευνες, έχουν αποκαλύψει ένα μεγάλο εύρος βιολογικών ιδιοτήτων της ελαστίνης και των πεπτιδίων που προέρχονται από αυτήν. Τα πεπτίδια αυτά, παράγονται φυσικά από την είσοδο της ελαστάσης στην κυκλοφορία του αίματος και μπορούν να έχουν επιδράσεις μεγάλης εμβέλειας, όπως η αγγειοδιαστολή. Η ελαστίνη, επίσης παρουσιάζει διαφορετική συναρμογή όταν προέρχεται από διαφορετικές πηγές.[3]

Η ανάλυση του γονιδίου της ελαστίνης, ασθενών που πάσχουν από cutis laxa, έδειξε την ύπαρξη γενετικών ανωμαλιών της ελαστίνης που μπορούν εύκολα να συσχετιστούν με τις μορφολογικές τροποποιήσεις που παρουσίαζαν. Συνεπώς, η ελαστίνη δεν πρέπει να θεωρείται απλά ως ένα άμορφο πολυμερές, όπως συνηθιζόταν, αφού η παρουσία της στον εξωκυττάριο χώρο έχει σημαντική συνεισφορά στην συνοχή κυττάρων και ιστών. Οι ίνες παρουσιάζουν διάφορες μορφολογίες ανάλογα με τους ιστούς στους οποίους βρίσκονται. Στους πνεύμονες, στο δέρμα και στους συνδέσμους παρουσιάζουν μικρά ινώδη δίκτυα, στα αγγεία έχουμε μορφολογία λεπτών ομόκεντρων φύλλων, ενώ στους χόνδρους μεγάλες τρισδιάστες δομές κυψελών.[3] Οι ελαστικές ίνες είναι περίπλοκες δομές που αποτελούνται από δύο συστατικά: ένα άμορφο, αποτελούμενο από πρωτεΐνη ελαστίνης με σταυροδεσμούς που αφορά το 90% της ίνας, και από ένα ινώδες συστατικό, τα μικροϊνίδια, που είναι πλούσια σε γλυκοπρωτεΐνες και οργανώνονται σε ίνες των 8 -16 nm. Οι μικροΐνες συνθέτονται από τουλάχιστον πέντε πρωτεΐνες, όπου συμπεριλαμβάνονται οι ινώδεις γλυκοπρωτεΐνες: 350kDa, MAGP-1 και MAGP-2. Διάφορα άλλα συστατικά παρουσιάζονται στις ελαστικές ίνες, όπως η λυσοξειδάση, ένα ένζυμο που εκκινεί τη δημιουργία σταυροδεσμών στην ελαστίνη, την EBP (elastin binding protein) ή τον υποδοχέα, τις πρωτεογλυκάνες κ.α.[1]

Όπως προαναφέρθηκε, η ελαστίνη είναι μια αδιάλυτη πρωτεΐνη λόγω της παρουσίας των σταυροδεσμών. Η δημιουργία της ξεκινά από το ένζυμο λυσοξειδάση (LOX), για την παραγωγή της άλφα-αμινοαδιπικής (δέλτα)-ημιαλδεΰδης. Υπάρχουν είδη ελαστίνης που προέρχονται από ανώτερα σπονδυλωτά, συμπεριλαμβανομένου και του ανθρώπου, που περιλαμβάνουν σχεδόν 30% Gly (γλυκίνη) ενώ το 70% της αλληλουχίας αποτελείται από υδροφοβικά αμινοξέα (Val, Ala, Pro). Οι ιστοί που είναι πλούσιοι σε ελαστίνη είναι η αορτή και τα αγγεία (28-32% ξηράς μάζας), πνεύμονες (3-7%) σύνδεσμοι (50%), τένοντες (4%) και το δέρμα (2-3%).[1]

1.1.1 Ασθένειες και ελαστικές ίνες

Υπάρχει σημαντικός αριθμός επίκτητων και κληρονομικών ασθενειών, που είναι γνωστό ότι επηρεάζουν τη δομή, την κατανομή και την περίσσεια των ελαστικών ινών (πίνακας 1.1). Η μεγαλύτερη επίδραση υπάρχει στα όργανα που έχουν υψηλή συγκέντρωση σε ελαστίνη. Όμως, λόγω της πολυπλοκότητας της ελαστικής ίνας και της αλληλεπίδρασης ενός συνόλου μορίων στον σχηματισμό των ινών, οι περισσότερες από τις ασθένειες δεν συνεπάγουν την ελαστίνη ως το κύριο ελάττωμα αν και οι περισσότερες επηρεάζουν την ακεραιότητα της ελαστικής ίνας.[4]

Πίνακας 1.1 Ασθένειες ελαστικών ινών[4]

Ασθένειες	Χαρακτηριστικά	Αιτιολογία
	Θρυμματισμός της ελαστίνης, αυξημένη δυσκαμψία των	
Αθηροσκλήρυνση	αρτηριών, αυξημένη συσσώρευση ασβεστίου και	Δεν υπάρχει βεβαιότητα.
	λιπιδίων στις ελαστικές ίνες	
Σύνδρομο	Παχιές ελαστικές ίνες , λίγα μικροϊνίδια, δερματικές	Άγνωστη, αλλά γενετική
Buschke-Ollendorf	βλάβες, οστική δυσπλασία	
		Δεν υπάρχει βεβαιότητα,
Cutis laxa (dermatolysis,	Φυλοσύνδετη και αυτόσωμη κληρονομική ασθένεια,	πιθανόν στη σταθερότητα
dermatochalasia)	χαλάρωση δέρματος, θρυμματισμός ελαστικών ινών,	του mRNA
(κληρονομική)	μειωμένη δράση του ενζύμου λυσοξειδάση.	τροποελαστίνης, ή στη
		μεταφορά χαλκού
		Ίσως, στη μη
Εμφύσημα	Έλλειψη ελαστίνης στους πνεύμονες	ισορροπημένη αναλογία
		πρωτεάσης/αντιπρωτεάσης
Σύνδρομο Marfan	Σκελετικές, οφθαλμικές και καρδιαγγειακές ανωμαλίες,	Μετάλλαξη στο γονίδιο
(κληρονομική)	χαλάρωση του δέρματος, θρυμματισμός ελαστίνης	των ινών
	Φυλοσύνδετη, εύθραυστα μαλλιά, ελικοειδή αγγεία,	Ανωμαλία στη μεταφορά
Σύνδρομο Menkes	θρυμματισμός ελαστικών ινών, νευρολογικές ανωμαλίες	χαλκού γονίδιο ATPase
		Mc-1
Ελαστικό	Ανελαστικό δέρμα, καρδιαγγειακά νοσήματα, αύξηση	Άγνωστο, αποκλείατε η
ψευδοξάνθωμα	γλυκοζαμινογλυκάνων κ.α.	γονιδιακή μετάλλαξη
		ελαστίνης
Υπερβαλβιδική αορτική	Στένωση αρτηριών, έλλειψη ελαστίνης	Μετάλλαξη γονίδιου
στένωση		ελαστίνης
Σύνδρομο Williams	Νοητική υστέρηση, πρόωρη γήρανση του δέρματος, χαλαρές αρθρώσεις	Διαγραφή μέρους του χρωμοσώματος Νο. 7, και ειδικότερα του μέρους που φτιάχνει την πρωτεΐνη ελαστίνη

1.2 Βιοσύνθεση ελαστίνης

Η ελαστίνη έχει ένα πρόδρομο μόριο την τροποελαστίνη, που αποτελείται από ένα μονόκλωνο γονίδιο ELN (στους ανθρώπους). Η τροποελαστίνη είναι μια πρωτεΐνη 72kDa που συντίθεται από μία πληθώρα κυττάρων (π.χ. ινοβλάστες). Ο σχηματισμός διαφορετικών ισόμορφων της τροποελαστίνης επιτυγχάνεται με τη διαφορετική συναρμογή κατά τη μεταγραφή. Τα μόρια αυτά απαρτίζονται κυρίως από υδροφοβικά αμινοξέα (75%) και από υδροφιλικές περιοχές από λυσίνη και αλανίνη για το υπόλοιπο μέρος. Η υδρόφιλη λυσίνη έχει σημαντικό ρόλο στο σχηματισμό των σταυροδεσμών, μια διαδικασία που είναι ιδιαίτερα κρίσιμη για το εξωκυττάριο περιβάλλον.^[5] Στην τροποελαστίνη τα υδροφοβικά και υδρόφιλα μέρη κωδικοποιούνται από διάφορα εξώνια. Τα εξώνια εναλλάσσονται από περιοχές με εσώνια, τα οποία όμως δε μεταγράφονται (Εικόνα 1.2). [1]

signal peptide hydrophobic domain hydrophilic domain									
100 LVPGGVADAJ	90 AFPAVTFPGA	80	70 RPLRPVP00L	60 LOOGALGPGG	50 VFYPGAGLGA	40 GAIPGGVPGG	30	20 PGVLLLLSI	10 MAGLTAAAPR
200 GVGPFGGPOT	190 OVGGAFAGIS	180 TGAGVKPKAP	170 PGVGVLPGVP	160 POGVLPOARF	150 VPOVOLPOVY	140 OPGAGVKPGK	130	120 0200VEGV00	110
300	290 GVPGVPGAIP	280	270	260 GPQAAAAAAA	250 KAGYPTOT	240 SPGOVAGAAG	230	220	210 GVPLGYPIKA
400 VGGIFTYGV	390	38 <u>0</u> EAAAKAAAKA	370	360	350 VPGVGVPGAG	340 PGVVGVPGAG	330 GLVPGGPGFG	320	31 <u>0</u> Радалалаа
500 AKAAAKAAQI	490 GVGTPAAAA	480 VPOVPOTOOV	470	460	450	440 GVPGVGISPE	430 PSVGGVPGVG	420	410 AGGFPGFGVG
600	590 DLOVOVOVPO	580	570	560 GGVAAAAKSA	S50	540	530	520 GVGVAPOVOV	510
700 AAKAAAKAAC	690	680	670	660	650	640	630	620	610 OVGAGVPGPG
	CGRERE	780	770	760	750	740	730	720	710

Εικόνα 1.2 Παρουσιάζεται η πρώιμη δομή του ισόμορφου 3. Οι επισημασμένες με πράσινο χρώμα είναι περιοχές που αφορούν το σηματοδοτικό πεπτίδιο, οι κόκκινες τις υδροφοβικές περιοχές και οι κίτρινες τις υδρόφιλες. [1]

Μετά τη συναρμογή του mRNA, σε μια πληθώρα κυττάρων όπως: μυϊκά κύτταρα μαλακών ιστών, ενδοθηλιακά μικροαγγειακά κύτταρα, κύτταρα του χονδρικού ιστού, το mRNA της τροποελαστίνης μεταφράζεται στην επιφάνεια του αδρού ενδοπλασματικού δικτύου (A.E.Δ, RER). Η πρόδρομη πρωτεΐνη (70kDa) συντίθεται με ένα σηματοδοτικό πεπτίδιο (N-terminal 26-amino-acid signal peptide). Η νεήλατη πολυπεπτιδική αλυσίδα μεταφέρεται στην κοιλότητα του ΑΕΔ, όπου το σηματοδοτικό πεπτίδιο αφαιρείται. Μετά την σύνθεση της, η τροποελαστίνη δεσμεύεται από την EBP (elastin-binding protein). Αυτή η διαδικασία, πιστεύεται, ότι προφυλάσσει την τροποελαστίνη από την ενδοκυτταρική συσσωμάτωση αλλά και από την πρωτεϊνών και είναι μέρος του υποδοχέα της τροποελαστίνης. Οι άλλες δυο υπομονάδες του υποδοχέα είναι διαμεμβρανικές πρωτεΐνες (61kDa και 55kDa). Η EBP έχει σημείο δέσμευσης για β-γαλακτοσακχαρίτες, η αλλοστερική δέσμευση τους οδηγεί σε μειωμένη συνάφεια της τροποελαστίνης, κάτι που έχει ως αποτέλεσμα την αποσύνθεση μέρους της EBP. Αφού δημιουργηθούν σύμπλοκα με την EBP, η ελαστίνη μεταφέρεται από το ΑΕΔ στην κυτταρική μεμβράνη μέσω του συστήματος Golgi. Τμήματα γαλακτοσακχαρίτων στα μικροϊνίδια της επιφάνεια του κυττάρου δεσμεύονται από την EBP, κάτι που απελευθερώνει την τροποελαστίνη.[1]



Εικόνα 1.3 Δέσμευση και απελευθέρωση της τροποελαστίνης. Ο υποδοχέας ελαστίνης αποτελείται από την πρωτεΐνη 67kDa και δύο διαμεμβρανικές πρωτεΐνες 61 και 55kDa. Η 67kDa δεσμεύει την τροποελαστίνη και τους γαλακτοσακχαρίτες σε δύο διαφορετικά σημεία. α) Η τροποελαστίνη δεσμεύεται στο σύμπλοκο της EBP. β) Κατά τη δέσμευση του γαλακτοσακχαρίτη, η EBP χάνει τη συνάφεια με την τροποελαστίνη, κάτι που οδηγεί στην απελευθέρωση (της τροποελαστίνης)[1]

Τα μικροϊνίδια δρουν ως ικριώματα όπου εναποτίθεται η τροποελαστίνη. Η τροποελαστίνη πρέπει να σχηματίσει σταυροδεσμούς, ώστε να είναι δυνατή η ενσωμάτωση της στην ελαστική ίνα. Για τη διευκόλυνση του σχηματισμού σταυροδεσμών, οι πρόδρομες ουσίες πρέπει να ευθυγραμμιστούν, μια διαδικασία που πιθανόν να συμβεί κατά τη διάρκεια της συσσωμάτωσης και μέσω μιας αντίστροφης θερμοκρασιακής μετάβασης, επάγεται η συσσωμάτωση της τροποελαστίνης. Στις χαμηλές θερμοκρασίες, η τροποελαστίνη είναι διαλυματα, με την αύξηση της θερμοκρασίας το διάλυμα γίνεται νεφελώδες λόγω της συσσωμάτωσης των μορίων της τροποελαστίνης και διατάσσονται υπό τις αλληλεπιδράσεις των υδρόφοβων περιοχών. Μια διαδικασία που είναι θερμοδυναμικά ελεγχόμενη και πλήρως αντιστρέψιμη μέσω ψύξης. Η διαδικασία αυτή επηρεάζεται από την συγκέντρωση της πρωτεΐνης, τη συγκέντρωση του άλατος και του pH.[1]

Μετά τη διαδικασία αυτο-οργάνωσης, τα μόρια της τροποελαστίνης, ενζυματικά δημιουργούν σταυροδεσμούς μέσω των κατάλοιπων της λυσίνης στις υδροφοβικές περιοχές. Σε αυτό, το τελευταίο στάδιο της ελαστογένεσης, οι αμίνες, κατάλοιπα της λυσίνης, μετατρέπονται ενζυματικά σε αλδεΰδες (αλλυσίνη) από την επίδραση του ενζύμου λυσοξειδάση (LOX), μέσω οξειδωτικής από-αμινοποίησης (Εικόνα 1.4). Το ένζυμο LOX είναι μια χαλκοεξαρτόμενη αμινοοξειδάση. Οι σταυροδεσμοί που σχηματίζονται στο εσωτερικό της αλυσίδας και ο υψηλός αριθμός των υδροφοβικών τμημάτων καθιστούν την ελαστίνη αδιάλυτη.[1]



Εικόνα 1.4 Διαδικασία σχηματισμού σταυροδεσμών στην ελαστίνη. Αρχικά, μέσω της λυσοζειδάσης, η λυσίνη μετατρέπεται σε αλλυσίνη και ακολουθούν δευτερεύουσες αυθόρμητες συμπυκνώσεις [1]

Συνοψίζοντας, η ελαστογένεση είναι μια ιδιαίτερα πολύπλοκη διαδικασία που αφορά τη διαδρομή της ελαστίνης από τη σύνθεση του πρόδρομου μορίου της, την τροποελαστίνη, μέχρι και την εναπόθεση της στην ελαστική ίνα. Μετά τη σύνθεση της τροποελαστίνης, η πρωτεΐνη 67kDa γαλακτολεκτίνη δρα ως υποδοχέας της και μαζί δημιουργούν ένα σύμπλοκο που λειτουργεί ως ενεργή χαπερόνη κάτι που αποτρέπει την πρώιμη αποσύνδεση της ελαστίνης εντός του κυττάρου. Όταν το σύμπλοκο βρεθεί στον εξωκυττάριο χώρο, τοποθετείται στην επιφάνεια του κυττάρου, όπου όταν έρθει σε επαφή με μία νεήλατη ελαστική ίνα, η χαπερόνη αλληλοεπιδρά με τους γαλακτοσακχαρίτες των μικροϊνιδίων οδηγεί στην απελευθέρωση της τροποελαστίνης. Καθώς η χαπερόνη ανακυκλώνεται, τα μόρια της τροποελαστίνης ευθυγραμμίζονται και τροποποιούνται από το ένζυμο LOX. Τέλος, ενσωματώνεται στο μικροϊνιδιακό ικρίωμα.[7]



Εικόνα 1.5 Σχηματική περιγραφή εναπόθεσης της ελαστίνης. Αμέσως μετά τη μετάφραση, το μόριο της τροποελαστίνης δεσμεύεται από τη χαπερόνη στο ΑΕΔ. Στον εξωκυττάριο χώρο τοποθετείται στην επιφάνεια του κυττάρου, όπου όταν έρθει σε επαφή με μία νεήλατη ελαστική ίνα, η χαπερόνη αλληλεπιδρά με τους γαλακτοσακχαρίτες των μικροϊνιδίων οδηγεί στην απελευθέρωση της τροποελαστίνης. Καθώς η χαπερόνη ανακυκλώνεται, τα μόρια της τροποελαστίνης ευθυγραμμίζονται και τροποποιούνται από την λυσοζειδάση. Τέλος, ενσωματώνεται στο ελαστικό δίκτυο υπό μη αντιστρέψιμο πολυμερισμό και η ελαστίνη αναπτύσσεται στο μικροϊνιδιακό ικρίωμα. [7]

1.3 Συσσωμάτωση της τροποελαστίνης in vitro

Η διαδικασία έχει πραγματοποιηθεί in vitro σε πολλές έρευνες, αρχικά με μίγματα διαλυτοποιημένης ελαστίνης και μετέπειτα με συνθετικά πεπτίδια ελαστίνης που αποτελούνται από υδροφοβικές επαναλαμβανόμενες μονάδες, απομονωμένες υδροφοβικές περιοχές, τμήματα εναλλασσόμενων υδροφοβικών και διασυνδεμένων περιοχών ακόμα και ολόκληρου του μονομερούς. [9]

Η διαδικασία συσσωμάτωσης χωρίζεται σε δύο στάδια. Το πρώτο αφορά τη φάση του διαχωρισμού, η οποία περιλαμβάνει μια αναστρέψιμη θερμοκρασία μετάβασης ενός μονομερούς σε πολυμερές (Εικόνα 1.6). Ενώ το δεύτερο, τη φάση της ωρίμανσης, όπου η συσσωμάτωση αφορά και τη σύνδεση σε ινώδεις δομές και είναι μια μη αναστρέψιμη διαδικασία. (Εικόνα 1.6)[9]

Η συσσωμάτωση κυρίως επηρεάζεται από τον αριθμό, την ακολουθία και τη συναφή διευθέτηση των υδροφοβικών περιοχών, όμως και οι υδροφιλικές ακολουθίες μπορούν επίσης να επηρεάσουν τη συμπεριφορά των υδροφοβικών περιοχών και έτσι να επηρεάσουν τη συσσωμάτωση. Επίσης εξωτερικοί παράγοντες, όπως *οι ιοντικές δυνάμεις, το pH*, και η θερμοκρασία, έχουν άμεση επίδραση στην ικανότητα της τροποελαστίνης να αυτοσυγκροτηθεί. Η συσσωμάτωση είναι μια ενδοθερμική, όσον αφορά την εντροπία, διαδικασία που οδηγείται από συνεργατικές αλληλεπιδράσεις των υδροφοβικών περιοχών με επακόλουθο την αποσταθεροποίηση του νερού (ένωση εγκλεισμού) που περιφράζει αυτές τις περιοχές.[9]

1.3.1 In vitro παρασκευή της τροποελαστίνης

Η δυσκολία της in vitro σύνθεσης της τροποελαστίνης έγκειται στην αδυναμία προσέγγισης του διαλυτού μονομερούς μιας και η ελαστίνη υπάρχει κυρίως ως ένα διασυνδεδεμένο υλικό, δηλαδή είναι ιδιαίτερα δυσδιάλυτη.[9]

Η ικανότητα της τροποελαστίνης και των πολυπεπτιδίων μιμητικών της ελαστίνης να συνδέονται σε ινιδικές δομές σε ακυτταρικό περιβάλλον αποτελεί ισχυρή υπόδειξη μιας εγγενής ικανότητας για αυτοσυγκρότηση.[9]

Εάν η θερμοκρασία πέσει πάλι κάτω από τη θερμοκρασία μετάβασης τότε η διαδικασία αντιστρέφεται και επιστρέφουμε στην υγρή μορφή. Αν όμως, το μείγμα μείνει πάνω από τη θερμοκρασία μετάβασης για ένα παρατεταμένο χρονικό διάστημα η διαδικασία δεν θα είναι αντιστρέψιμη. Σε χαμηλότερη θερμοκρασία από τη θερμοκρασία μετάβασης, τα μόρια της τροποελαστίνης υπάρχουν ως μονομερή. Με την αύξηση της θερμοκρασίας σε επίπεδα μεγαλύτερα της θερμοκρασίας μετάβασης, για εύρος αύξησης λιγότερο των 5 °C, παρουσιάζεται ραγδαία συγκρότηση των μονομερών σε πολυμερή χωρίς την ένδειξη κάποιων ενδιάμεσων σταδίων [9]



Εικόνα 1.6 Απεικονίζονται τα στάδια αυτοργάνωσης της τροποελαστίνης in vitro. Το αρχικό στάδιο είναι μία αναστρέψιμη διαδικασία κατά την οποία σχηματίζονται σφαιροειδείς δομές των 1-2 μm που αναπτύσσονται και οργώνονται σε συσσωματώματα των 6μm. Στη δεύτερη φάση, αυτή της ωρίμανσης, η διαδικασία γίνεται μη αναστρέψιμη. Αφορά την ένωση των οργανομένων συσσωμάτων της αρχικής φάσης σε ακόμα μεγαλύτερες δομές και πολλές φορές ακόμα και το σχηματισμό ινωδών δομών. Επίσης παρουσιάζονται μικρογραφίες από ηλεκτρονικό μικροσκόπιο σάρωσης (Scanning electron microscope, SEM) για την πρώτη φάση (A,B) και για τη φάση της ωρίμανσης (C,D) [9]

1.4 Εφαρμογές πολυπεπτιδίων βασισμένα στην ελαστίνη (ELP)

Η ανομοιογένεια και η διασυνδεδεμένη φύση των διαλυτών πεπτιδίων της ελαστίνης, παρέχουν μόνο περιορισμένο αριθμό αναπαραστάσεων της συσσωμάτωσης της τροποελαστίνης και δεν επιτρέπουν τη μηχανιστική εξερεύνηση της διαδικασίας. Ως εκ τούτου, η έρευνα επικεντρώθηκε στα συνθετικά πολυπεπτίδια βασισμένα σε επαναλαμβανόμενες μονάδες των υδροφοβικών περιοχών της τροποελαστίνης. Τα ELP (elastin-like peptides) είναι συνθετικές αλληλουχίες πεπτιδίων που έχουν κεντρίσει το ερευνητικό ενδιαφέρον λόγω των ιδιοτήτων που παρουσιάζουν και της άμεσης απόκρισης τους.[1,6]

1.4.1 Εφαρμογές ελαστομερικών πολυπεπτιδίων για ελεγχόμενη αποδέσμευση δραστικών ουσιών

Η ελεγχόμενη αποδέσμευση δραστικών ουσιών παρουσιάζει αρκετά πλεονεκτήματα εν συγκρίσει με τις συμβατικές μεθόδους χορήγησης φαρμάκων.

Τα κύρια πλεονεκτήματα της αφορούν τη συγκέντρωση του φαρμάκου σε θεραπευτικά επίπεδα χωρίς μεγάλες διακυμάνσεις στη συγκέντρωση, την απελευθέρωση του φαρμάκου σε στοχευόμενη περιοχή καθώς και τη χρήση φαρμάκων με μικρό χρόνο ημιζωής. Από την άλλη πλευρά το μεγάλο κόστος και η πιθανή τοξικότητα από μη αναμενόμενη απελευθέρωση της δραστική ουσίας, είναι τα βασικά μειονεκτήματα της.[8]

Υπάρχουν δύο κύριες κατηγορίες συστημάτων μεταφοράς. Το ένα σύστημα αφορά τη σύζευξη της δραστικής ουσίας σε μακρομόρια , όπως πολυμερή και πρωτεΐνες. Ενώ το άλλο, τον εγκλεισμό της δραστικής ουσίας σε νανοφορείς, όπως τα λιποσώματα, τα μικύλλια κ.α.[8]

Τα ELPs με διαφορετική θερμοκρασία μετάβασης χρησιμοποιούνται στην στοχευμένη θεραπεία και μπορούν να διαχωριστούν σε τρείς κατηγορίες. Η πρώτη αφορά τα διαλυτά ELPs με κρίσιμη θερμοκρασία T_t , υψηλότερη από τη θερμοκρασία σώματος. Στη δεύτερη είναι τα συστήματα όπου η αποδέσμευση εξαρτάται από μηχανισμό ανάδρασης. Τέλος, στην τρίτη είναι τα αδιάλυτα ELPs με κρίσιμη θερμοκρασία T_t χαμηλότερη της θερμοκρασίας του σώματος. [1]

1.4.1.1 Μακρομοριακοί φορείς

Στα μακρομοριακά συστήματα στόχευσης, οι δραστικές ουσίες ενσωματώνονται σε πολυμερικά συστατικά, όπως τα συνθετικά πολυμερή, δενδριμερή και αντισώματα, με σκοπό την ενίσχυση της στοχευμένης θεραπείας του πάσχοντα ιστού και την μείωση της τοξικότητας ώστε να μην επηρεαστούν οι υγιείς ιστοί.[1]

Τα βασικά πλεονεκτήματα είναι η αύξηση του χρόνου ημιζωής της δραστικής ουσίας, δυνατότητα εισαγωγής τμημάτων για τη στόχευση αλλά και όπως προαναφέρθηκε η μειωμένη τοξικότητα.[1] Όσον αφορά τα ELPs, στα κύρια βασικά τους πλεονεκτήματα συγκαταλέγεται η θερμοκρασιακή απόκριση τους. Ως βιοπολυμερή είναι βιοσυμβατά και βιοδιασπώμενα. Ενώ μπορεί να γίνει γενετική επέμβαση και να συρραφτούν σειρές πεπτιδίων για την στόχευση του πάσχοντα ιστού. [1]

1.4.1.2 Νανοφορείς

Τα ELP που χαρακτηρίζονται από μια κρίσιμη θερμοκρασία μετάβασης χαμηλότερη της θερμοκρασίας σώματος χρησιμοποιούνται ως υδροφοβικά τμήματα, ενώ το υδροφιλικά μέρη μπορεί να είναι ELP με θερμοκρασία μετάβασης υψηλότερη από αυτή του σώματος.

Οι Rodriguez-Cabello et al ανέφεραν ένα τροποποιημένο ELP, στο οποίο η γλυκίνη, στην τρίτη θέση, στην επαναλαμβανόμενη ακολουθία, αντικαταστάθηκε από αλανίνη. Αυτά τα βιοπολυμερή χρησιμοποιούνται στον εγκλεισμό οστικών μορφογενετικών πρωτεϊνών. Οι οστικές μορφογενετικές πρωτεΐνες είναι σηματοδοτικές πρωτεΐνες που έχουν την ικανότητα να προωθήσουν την οστική ανάπτυξη. [1]

Στην εικόνα 1.7 παρουσιάζεται μια εφαρμογή θερμοκρασιακής απόκρισης. Η προσέγγιση αυτή αφορά τη σύνθεση ενός συμπολυμερούς δυο ELP περιοχών (ELP[VA8G7n]-ELP[V5-n]), όπου το ένα πεπτίδιο έχει θερμοκρασία μετάβασης την υπερθερμική θερμοκρασία του όγκου, ενώ το άλλο δεν επηρεάζεται σε αυτή τη θερμοκρασία. Το άκρο του πεπτιδίου που δεν επηρεάζεται από τη θερμοκρασία της περιοχής, έχει τροποποιηθεί και έχει προστεθεί ένας σύνδεσμος που στοχεύει έναν συγκεκριμένο κυτταρικό αποδέκτη ή μια τροποποιημένη, από τα καρκινικά κύτταρα, μεμβρανική πρωτεΐνη. Με αυτόν τον τρόπο γίνεται η προσκόλληση του συμπολυμερούς στα καρκινικά κύτταρα. Στο άλλο άκρο, υπάρχει μια δραστική ουσία. Με αυτή τη στοχευμένη προσέγγιση αποφεύγετε η συσσώρευση της δραστικής ουσίας στους υγιείς ιστούς και μεταφέρετε στα καρκινικά κύτταρα.[1]



Εικόνα 1.7 Παρουσιάζεται το συμπολυμερές, που απαρτίζεται από ένα υδρόφιλο ELP [VA8G7-n] και ένα υδρόφοβο ELP[V5-n]. Το άκρο του υδρόφιλου μέρους έχει τροποποιηθεί με έναν σύνδεσμο (πράσινο τρίγωνο) και στο άλλο άκρο του υδρόφοβου μέρους έχει προστεθεί μια δραστική ουσία (παρουσιάζεται με το σύμβολο του κεραυνού). [1]

Η χρήση των ELPs στη στοχευμένη θεραπεία, μπορεί να αναλυθεί με αρκετούς τρόπους. Αρχικά, τα διαλυτά ELPs εισάγονται στην κυκλοφορία και υπο την επίδραση της θερμοκρασίας του σώματος, ξεκινάει η συσσωμάτωσή τους. Η δραστική ουσία μπορεί να σχηματίσει ομοιοπολικούς δεσμούς με το ELP ή μπορεί να αναμιχθεί με αυτό. Μία άλλη προσέγγιση, είναι η σύνθεση φορέων ELP με σταυροδεσμούς που φέρουν μία δραστική ουσία και η χρήση τους ως σύστημα προκαθορισμένου ρυθμού αποδέσμευσης.

Η πρώτη μέθοδος χρησιμοποιήθηκε από τους Setton et al για την εφαρμογή ενός ELP με συνεχή απελευθέρωση. Έγινε ενδοαρτηριακή χορήγηση σε αρουραίους και η διανομή των ELPs μελετήθηκε με τη χρήση ραδιοανιχνευτών.

Για τη δεύτερη μέθοδο, χρησιμοποιήθηκαν ELPs με σταυροδεσμούς, πριν την εισαγωγή τους στον οργανισμό, για την ελεγχόμενη απελευθέρωση των αντιβιοτικών: κεφαζολίνης και βανκομυκίνης (χρησιμοποιήθηκε το ELP(KV16-102). Το ELP σχημάτισε σταυροδεσμούς μέσω των αμινών στα κατάλοιπα της ελαστίνης με τη χρήση προπριονικού οξέος β-[τρι-υδροξυμεθυλοφωσφίνης] (THPP), ώστε να είναι εφικτή δέσμευση μεγάλης ποσότητας της δραστικής ουσίας. Η λειτουργικότητα αυτής της προσέγγισης, αποδείχθηκε in vitro.[1]

1.4.2 Εφαρμογές ελαστομερικών πολυπεπτιδίων στην ιστική μηχανική

Η ιστική μηχανική είναι ένας διεπιστημονικός κλάδος, όπου συναντιούνται η μηχανική και οι βιολογικές επιστήμες και χρησιμοποιείται για την ανάπτυξη λειτουργικών υποκατάστατων για κατεστραμμένους ιστούς. Χρησιμοποιούνται βιοϋλικά για την αντικατάσταση, την αποκατάσταση και την ενίσχυση της λειτουργίας των οργάνων. Τα υλικά αυτά πρέπει να έχουν τέτοια χαρακτηριστικά που θα συμβαδίζουν με τους ιστούς που αντικαθιστούν, όπως το σχήμα, τις φυσικές ιδιότητες και να υποστηρίζουν τις κυτταρικές διαδικασίες.

Η εφαρμογή των ELPs είναι σημαντική για αρκετούς λόγους. Αρχικά, τα ELPs βασίζονται στην ελαστίνη, ένα βιοπολυμερές, όπως προαναφέρθηκε. Συνεπώς τα υλικά αυτά, χαρακτηρίζονται από βιοσυμβατότητα, είναι βιοδιασπώμενα και δεν ενεργοποιούν το ανοσοποιητικό. Μπορούν να παραχθούν σε, σχετικά, μεγάλες ποσότητες σε κύτταρα ξενιστών, όπως τα βακτήρια. Αυτή η μέθοδος σύνθεσης δίνει την δυνατότητα να ελέγχεται η αλληλουχία των αμινοξέων και το μήκος την πολυμερικής αλυσίδας με μεγάλη ακρίβεια. Γι' αυτό τον λόγο τα ELPs χρησιμοποιήθηκαν για την παρασκευή υδρογελών, υμενίων, και σε διάφορες εφαρμογές ιστικής μηχανικής, όπως για την ανάπλαση χόνδρων, αγγείων οφθαλμολογικών και ηπατικών ιστών.[1]

Οι Setton et al εφάρμοσαν τα ELPs ως μια τρισδιάστατη μήτρα για την παγίδευση χονδροκυττάρων. Χρησιμοποίησαν το ELP(V5G3A2-90) με θερμοκρασία μετάβασης στους 35 °C στα 50mg/mL σε PBS. Χρησιμοποιήθηκε για τον σχηματισμό ικριωμάτων στα κύτταρα. Η in vitro μελέτη έδειξε ότι υποστήριξαν την βιοδιαθεσιμότητα των χονδροκυττάρων και στη σύνθεση και συσσώρευση του εξωκυττάριου υλικού των χόνδρων. Κάτι που οδήγησε στην πιθανή χρήση των ELPs για αποκατάσταση χόνδρινων ιστών.

Σε μια άλλη έρευνα, οι Tirell et al σχεδίασαν μια τεχνητή εξωκυττάρια μήτρα (a-ECM) για αγγειακά μοσχεύματα μικρής διαμέτρου. Για τα μοσχεύματα η μηχανική ακεραιότητα και οι βιολογικές αλληλεπιδράσεις με τον ιστό ξενιστή είναι σημαντικές ιδιότητες. Γι' αυτό οι πρωτεΐνες a-ECM αποτελούνται από εναλλαγές CS5 (περιοχές πρόσδεσης) και περιοχές ELPs. Οι περιοχές φιμπρονεκτίνων CS5 παρέχουν κατάλληλο περιβάλλον πρόσφυσης, ενώ τα ELPs παρέχουν στα υλικά ελαστικότητα και μηχανική συνοχή. Η μελέτη έδειξε ότι τα aECM παρουσίασαν συμπεριφορά παρόμοια με αυτή της φυσικής ελαστίνης. [1]

Κεφάλαιο 2: Κολλαγόνο

Στους ζωικούς οργανισμούς η πιο άφθονη ινώδης πρωτεΐνη είναι το κολλαγόνο. Οι ινώδεις πρωτεΐνες αφθονούν ιδιαίτερα στον εξωκυττάριο χώρο (extracellular matrix). Το μόριο του κολλαγόνου αποτελείται από τρείς μακριές πολυπεπτιδικές αλυσίδες. Σε καθεμιά από τις αλυσίδες αυτές, ανα τρείς αμινοξικές θέσεις, υπάρχει ένα κατάλοιπο γλυκίνης. Αυτή η κανονική διάταξη επιτρέπει στις αλυσίδες να περιελίσσονται η μια γύρω από την άλλη και να δημιουργούν μια μακριά, κανονική τριπλή έλικα. Στη συνέχεια πολλά μόρια κολλαγόνου συνδέονται μεταξύ τους κατά σειρά και άκρο με άκρο και σχηματίζουν μακριές επικαλυπτόμενες διατάξεις.[9]

Το κολλαγόνο βρίσκεται σε όλους τους πολυκύτταρους ζωικούς οργανισμούς και υπάρχει σε διάφορους τύπους. Τα θηλαστικά έχουν περίπου 20 διαφορετικά γονίδια κολλαγόνου, τα οποία κωδικοποιούν τις ποικίλες μορφές του κολλαγόνου που είναι απαραίτητες για τους διάφορους ιστούς. Τα κολλαγόνα είναι οι κύριες πρωτεΐνες στα οστά, στους τένοντες και στο δέρμα και αντιπροσωπεύουν το 25% της συνολικής μάζας των πρωτεϊνών ενός θηλαστικό, περισσότερο από κάθε άλλο είδος πρωτεΐνης.[9] Έχουν πιστοποιηθεί 25 διαφορετικές αλυσίδες, που κωδικοποιούνται από ξεχωριστά γονίδια. Με βάση τον αριθμό των γονιδίων και τη βασική δομή του κολλαγόνου, θα έπρεπε να υπήρχαν πάνω από 1000 διαφορετικά μόρια. Εντούτοις έχουν διαπιστωθεί μόνο 15 διαφορετικά μόρια κολλαγόνου. Τα μόρια που έχουν μελετηθεί περισσότερο είναι οι τύποι Ι, ΙΙ, ΙΙΙ, ΙV. Οι τύποι Ι, ΙΙ και ΙΙΙ συνιστούν τα κύρια ινίδια του εξωκυτταρικού κολλαγόνου, ο τύπος Ι είναι το κύριο συστατικό των οστών, του δέρματος και των τενόντων και αποτελεί το 90% του συνόλου του κολλαγόνου. [10]

2.1 Δομή του κολλαγόνου

Το χαρακτηριστικό γνώρισμα ενός τυπικού μορίου κολλαγόνου είναι η μακριά, άκαμπτη, τρίκλωνη ελικοειδής δομή του, στην οποία τρείς πολυπεπτιδικές αλυσίδες κολλαγόνου περιελίσσονται η μια γύρω από την άλλη σε μια σχοινοειδή υπερέλικα (Εικόνα 2.1). Με την σειρά τους, τα μόρια αυτά συναρμολογούνται σε τακτικά πολυμερή γνωστά ως ινίδια κολλαγόνου (collagen fibrils), με διάμετρο 10-300 nm και μήκος πολλών μικρομέτρων. Τα ινίδια του κολλαγόνου συσκευάζονται μαζί σε ακόμα παχύτερες ίνες κολλαγόνου (collagen fibers) (Εικόνα 2.1). Άλλα μόρια κολλαγόνου υπάρχουν στην επιφάνεια των ινιδίων του κολλαγόνου και διασυνδέουν τα ινίδια τόσο το ένα με το άλλο όσο και με άλλα συστατικά του εξωκυττάριου στρώματος.[9]



Εικόνα 2.1 Στην ηλεκτρονιομικρογραφία φαίνονται ινίδια κολλαγόνου στον συνδετικό ιστό του δέρματος ενός εμβρύου όρνιθας. Τα ινίδια οργανώνονται σε δεμάτια, μερικά από τα οποία εκτείνονται στο επίπεδο της τομής ενώ άλλα περίπου σε ορθή γωνία προς αυτό το επίπεδο. Στο κύτταρο της εικόνας, απεικονίζεται ένας ινοβλάστης που εκκρίνει το κολλαγόνο, όπως και άλλα συστατικά του εξωκυττάριου χώρου. Τα σχεδιαγράμματα δείχνουν την μοριακή δομή των ινιδίων [9]

Η πολυπεπτιδική αλυσίδα απαρτίζεται από 1000 περίπου αμινοξέα, είναι πλούσια σε γλυκίνη και προλίνη και εμφανίζουν περιοδικότητα (κάθε τρίτο αμινοξύ και γλυκίνη). Το κολλαγόνο περιέχει επίσης τα αμινοξέα υδροξυπρολίνη και υδροξυλυσίνη, τα οποία σπανίως απαντούνται σε πρωτεΐνες. Η σπουδαιότητα της υδροξυπρολίνης καταδεικνύεται στην ασθένεια σκορβούτο, όπου υπάρχει έλλειψη ασκορβικού οξέος (βιταμίνη C). Το ασκορβικό οξύ είναι ένας αναγωγικός παράγοντας, υπεύθυνος για τη διατήρηση της ενεργότητας της υδροξυλάσης της προλίνης. Όταν ο οργανισμός δεν προσλαμβάνει επαρκείς ποσότητες ασκορβικού οξέος, το κολλαγόνο δεν μπορεί να σχηματίσει τη βασική δομή του (τριπλή έλικα), αφού δεν μπορούν να αναπτυχθούν οι κατάλληλοι δεσμοί. Η ανικανότητα σχηματισμού του κολλαγόνου εκφράζεται με τη μορφή διαφόρων διαταραχών, όπως αιμορραγίες, καταστροφή των ιστών υποστήριξης, δερματικές βλάβες κ.α. [10]

Οι πρωταρχικές μελέτες της τρισδιάστατης δομής της τριπλής έλικας έγιναν με περίθλαση σε κολλαγόνο από τένοντα.[11,12] Κάθε πολυπεπτιδική αλυσίδα, από τις τρείς, σχηματίζει μια αριστερόστροφη τριπλή έλικα (την έλικα προ- προλίνης τύπου ΙΙ). Η διάταξη των τριών ελίκων γίνεται με κοινό άξονα και σχηματίζουν μια δεξιόστροφη έλικα. [13]

Η πλευρική διευθέτηση των τριπλών ελίκων είναι πολύ σημαντική στο σχηματισμό των ινιδίων κολλαγόνου και οι αλληλεπιδράσεις τους, εξαρτώνται στην ακολουθία των τριών αλυσίδων και της συμμετρίας των υλικών [13]. Ο προσανατολισμός των πλευρικών αλυσίδων αποτελεί σημαντικό λειτουργικό χαρακτηριστικό της τριπλής έλικας του κολλαγόνου. Οι πλευρικές αλυσίδες έχουν κατεύθυνση προς το εξωτερικό μέρος της έλικας και είναι διαθέσιμες για αλληλεπιδράσεις. Κατά τον σχηματισμό των ινιδίων, οι διαμοριακές αλληλεπιδράσεις μεταξύ αντίθετα φορτισμένων καταλοίπων είναι ιδιαίτερα σημαντικές, ενώ ιδιαίτερο ρόλο έχουν οι υδρόφοβες αλληλεπιδράσεις μεταξύ των καταλοίπων των διαφορετικών αλυσίδων.[14,15]

2.1.1 Ιεραρχική δομή του κολλαγόνου

Σε όλες τις πρωτεΐνες υπάρχουν 4 επίπεδα οργάνωσης. Για το κολλαγόνο είναι τα εξής:

<u>Πρωτοταγής δομή</u>

Αφορά την αλληλουχία των αμινοξέων στο κολλαγόνο. Όπως προαναφέρθηκε, κάθε αλυσίδα αποτελείται από 1000 αμινοξέα. Στο κάθε τρίτο αμινοξύ υπάρχει η γλυκίνη και πολύ συχνά εμφανίζεται η αλληλουχία αμινοξέων: γλυκίνη – προλίνη / λυσίνη – υδροξυλυσίμη. Η λυσίνη αφορά το ένα τρίτο των αμινοξέων κάθε τύπου κολλαγόνου. Η πρωτοταγής δομή του κολλαγόνου είναι Gly – X - Y, όπου στην θέση X υπάρχει προλίνη ή λυσίνη και στην θέση Y υδροξυλυσίνη αντίστοιχα [16].

<u>Δευτεροταγής δομή</u>

Η δευτεροταγής δομή αφορά την χωρική αναδίπλωση των πεπτιδίων του κολλαγόνου με σκοπό να σταθεροποιούνται οι αλληλεπιδράσεις μέσω της δημιουργίας σπονδυλωτής πολυπεπτιδικής στερεοδομής. Χαρακτηρίζεται από τις γωνίες ενδίπλωσης μεταξύ των πεπτιδίων ενώ για να συντηρείται μια συγκεκριμένη αναδίπλωση είναι απαραίτητη και μια μη ομοιοπολική σύνδεση στο εσωτερικό της αλυσίδας. [16,17]

Τριτοταγής δομή

Αφορά την συμπαγή στερεοδιάταξη ολόκληρης της πολυπεπτιδικής της αλυσίδας, όπου υπάρχει η χωρική συσχέτιση μεταξύ δευτεροταγών δομών στην τρισδιάστατη μορφή των πολυπεπτιδικών αλυσίδων. Στο κολλαγόνο, η τριτοταγής δομή, υφίσταται στην τριπλή έλικα των πολυπεπτιδικών αλυσίδων που είναι διατεταγμένες με τέτοιο τρόπο ώστε να δημιουργείται το μόριο κολλαγόνου σχήματος ράβδου. Ο τρόπος κατασκευής της τριπλής έλικας εξηγεί την ύπαρξη της γλυκίνης ανά τρία αμινοξέα. Η γλυκίνη υπάρχει τόσο συχνά, διότι στο εσωτερικό της έλικας δεν υπάρχει αρκετός χώρος για τους ογκώδεις δακτυλίους της πολυπεπτιδικές αλυσίδως, η γλυκίνη δεσμεύει μικρό χώρο, αφήνοντας τις πολυπεπτιδικές αλυσίδες να πλησιάσουν πολύ κοντά η μία στην άλλη, κάτι που δημιουργεί την ανθεκτικότητα του κολλαγόνου. [16,17]

<u>Τεταρτοταγής δομή</u>

Η τεταρτοταγής δομή είναι η τελευταία δομή διάταξης των πρωτεϊνών και αφορά την τακτοποίηση των πολυπεπτιδικών αλυσίδων στον χώρο. Ένα μεγάλο ποσοστό πρωτεϊνών αποτελούνται από δύο ή περισσότερες διαφορετικές δομικές μονάδες των οποίων η σταθερότητα από τους μη ομοιοπολικούς δεσμούς που σταθεροποιούν και την τριτοταγή δομή τους. Οι διασυνδέσεις αυτές, μεταξύ των δομικών μονάδων, χαρακτηρίζουν την τελική δομή συγκρατώντας μαζί τα μόρια σε μεγαλύτερες δομές. Στην περίπτωση του κολλαγόνου, οι δομικές μονάδες που αφορά τα τροποκολλαγόνα, διατάσσονται έτσι ώστε να διαμορφώσουν μικρο-ινίδια, ινίδια και τελικά ίνες κολλαγόνου. Το κολλαγόνο σταθεροποιείται με τη δημιουργία διασυνδέσεων μέσα στο μόριο ή μεταξύ διαφορετικών μορίων του τροποκολλαγόνου. Οι διασυνδέσεις μέσα στο μόριο γίνονται μεταξύ καταλοίπων λυσίνης και υδροξυλισίνης. [16,17]

2.2 Βιοσύνθεση Κολλαγόνου

Τα κύτταρα του συνδετικού ιστού που βρίσκονται στο στρώμα και το παρασκευάζουν έχουν διάφορες ονομασίες ανάλογα με το είδος του ιστού, στο δέρμα, στους τένοντες και σε πολλούς άλλους συνδετικούς ιστούς αποκαλούνται ινοβλάστες, ενώ στα οστά οστεοβλάστες. Τα κύτταρα παράγουν το κολλαγόνο και τα άλλα οργανικά συστατικά του στρώματος. Τα μόρια αυτά, κατά κύριο λόγο, συντίθενται ενδοκυττάρια και κατόπιν απελευθερώνονται στον εξωκυττάριο χώρο με εξωκυττάρωση. Αν η συναρμολόγηση συνέβαινε πρόωρα, πριν από την έκκριση, το κύτταρο θα ασφυκτιούσε καταστροφικά από τα δικά του προϊόντα. Κάτι τέτοιο δε γίνεται να συμβεί με το κολλαγόνου αφού τα κύτταρα αποφεύγουν αυτό τον κίνδυνο, εκκρίνοντας τα μόρια του κολλαγόνου σε μια πρόδρομη μορφή. Πρόκειται για το προκολλαγόνο, το οποίο σε κάθε άκρο του διαθέτει επιπρόσθετα πεπτίδια που παρεμποδίζουν τη συναρμολόγηση σε ινίδια κολλαγόνου. Η κολλαγονάση, ένα εξωκυττάριο ένζυμο, αποκόπτει αυτές τις περιοχές. Συνεπώς, η συναρμολόγηση μπορεί να πραγματοποιηθεί μόνο μετά την εξαγωγή των μορίων στον εξωκυττάριο χώρο.[9]

Η βιοσύνθεση του κολλαγόνου γίνεται στο αδρό ενδοπλασματικό δίκτυο και η αυτοσυγκρότηση του στον εξωκυττάριο χώρο. Το κολλαγόνο βιοσυντίθενται σε ένα μαγαλύτερο μόριο, το προκολλαγόνο, αυτοσυγκροτείται σε τριπλή έλικα και υφίσταται διάφορες μετα-μεταφραστικές τροποποιήσεις κατά την μετακίνηση τους από το αδρό ενδοπλασματικό δίκτυο στο σύστημα Golgi, όπως υδροξυλίωση της προλίνης, γλυκοζυλίωση της υδροξυλοσίνης και οξείδωση των κυστεϊνικών ομάδων. Όταν ολοκληρωθούν οι μεταμεταφραστικές τροποποιήσεις τότε τα κολλαγόνα μετακινούνται προς την περιφέρεια του κυττάρου και απελευθερώνονται. Στον εξωκυττάριο γώρο αποσπώνται με πρωτεόλυση τα αμινοτελικά και καρβοξυτελικά άκρα. Τα ώριμα πλέον μόρια του κολλαγόνου δεσμεύονται μεταξύ τους σχηματίζονται ινίδια. Επίσης, μερικές από τις αμινομάδες της λυσίνης οξειδώνονται σε αλδεϋδικές ομάδες και με αντιδράσεις συμπύκνωσης σχηματίζονται ενδομοριακές και διαμοριακές συνδέσεις (ομοιοπολικοί δεσμοί). Έτσι, τα κολλαγόνα αποκτούν την τελική πολυμερική δομή τους που τους προσδίδει στερεότητα και ακαμψία στους ιστούς (μυς, δέρμα, τένοντες κλπ) [εικόνα 2.2]. Αν εμποδιστεί ο σχηματισμός των ομοιοπολικών δεσμών τότε οι ιστοί είναι εύθραυστοι και σχίζονται. Η χαρακτηριστική γραμμωτή εμφάνιση των ινιδίων οφείλεται στην διάταξη των μορίων του τροποκολλαγόνου. Πρέπει όμως ο αριθμός των κολλαγόνων στην εξωκυτταρική μήτρα, στον άνθρωπο και στα άλλα θηλαστικά, να κυμαίνεται σε ορισμένα όρια καθώς η αλλαγή στον ρυθμό σύνθεσης του κολλαγόνου προκαλεί διάφορες ασθένειες. Η αυξημένη σύνθεση του κολλαγόνου ενέχεται στις διάφορες ινώσεις, κατάσταση ιδιαίτερης σημασίας στις ασθένειες των πνευμόνων και του ήπατος. Η ίνωση μειώνει την ικανότητα των πνευμόνων να εκτείνονται και να παίρνουν αέρα. Η μειωμένη

σύνθεση του κολλαγόνου προκαλεί το σύνδρομο Ehles-Danlos, που επηρεάζει το δέρμα και τους τένοντες. Τέλος, μεταλλάξεις γονιδίων του κολλαγόνου ενέχονται σε κοινές ανωμαλίες του συνδετικού ιστού (οστεοαρθρίτιδα, οστεοπόρωση, ανευρύσματα αιμοφόρων αγγείων).[10]



Εικόνα 2.2 Βιοσύνθεση κολλαγόνου τύπου Ι. Α) Δύο πανομοιότυπες αλυσίδες a1(I) και a2(I) πεπτιδικές αυσίδες αυτόοργανώνονται για να διαμορφώσουν το προκολλαγόνο. Β), C) Η πεπτιδάση του προκολλαγόνου αφαιρεί τα άκρα για να σχηματιστεί το τροποκολλαγόνο αυτοδιαμορφώνεται για να σχηματίσουν ινίδια κολλαγόνου, E) Τα ινίδια κολλαγόνου αυτοοργανώνονται και σχηματίζουν ίνες κολλαγόνου, F) Ινα κολλαγόνου

Τα κύτταρα των ιστών εκτός από το να παράγουν στρώμα πρέπει επίσης να είναι ικανά να το αποδομούν. Αυτό είναι απαραίτητο για την αύξηση, επιδιόρθωση και ανανέωση των ιστών.[9]

Τα ινίδια κολλαγόνου, για να είναι λειτουργικά, πρέπει να έχουν σωστή διάταξη. Για παράδειγμα, στο δέρμα υφαίνονται σε ένα χαλαρό πλέγμα ή σε εναλλασσόμενες στιβάδες με διαφορετικό προσανατολισμό έτσι ώστε να μπορούν να ανθίστανται σε τάσεις που ασκούνται από διάφορες κατευθύνσεις. Ενώ στους τένοντες (οι οποίοι διασυνδέουν μυς με οστά), παρατάσσονται σε παράλληλες δέσμες κατά μήκος του κύριου άξονα της τάσης. Τα κύτταρα



προσανατολισμό και στη συνέχεια αναδιατάσσοντάς το. Η διάπλαση στρώματος κολλαγόνου από τα κύτταρα φαίνεται στην εικόνα 2.3. Όσο αναπτύσσεται ο ιστός, oι ινοβλάστες επεξεργάζονται το κολλαγόνο που έχουν εκκρίνει, έρποντας πάνω του και τραβώντας το. Με αυτό τον τρόπο, συμβάλλουν στη σύμπηξη του σε φύλλα ή στη λέπτυνση

ιστού

προσανατολισμό

εναποθέτοντάς

του

ελέγχουν

σε

του

το

τον

κολλαγόνου

ορισμένο

Εικόνα 2.3 Η μικρογραφία αυτή παρουσιάζει μια περιοχή ανάμεσα σε δυο κομμάτια της καρδιάς ενός εμβρύου όρνιθας (πλούσια σε ινοβλάστες και μυοκαρδιακά κύτταρα) τα οποία έχουν υποβληθεί σε καλλιέργεια για τέσσερις ημέρες πάνω σε πηκτή κολλαγόνου. Η δέσμη αυτή προέκυψε μάλλον από την επίδραση των ινοβλαστων στο κολλαγόνο.[9]

ινιδίων κολλαγόνου με τυχαίο προσανατολισμό που σχηματίζουν μια πηκτή μέσα σε ένα τρυβλίο καλλιέργειεας, οι ινοβλάστες έλκουν το πλέγμα και συγκεντρώνουν το κολλαγόνο από το περιβάλλον τους, το οποίο μετά συμπυκνώνουν. Αν πάνω σε μια πηκτή κολλαγόνου τοποθετηθούν δύο μικρά κομμάτια εμβρυικού ιστού που περιέχουν ινοβλάστες, το κολλαγόνο που βρίσκεται ανάμεσα τους θα οργανωθεί σε μια συμπαγή ζώνη ευθυγραμμισμένων ινών που θα συνδέουν τα δυο κομμάτια (Εικόνα 2.3). Συνεπώς, οι ινοβλάστες επηρεάζουν την διάταξη των ινών του κολλαγόνου.[9]

του σε ίνες. Ο μηγανικός ρόλος των ινοβλαστών φαίνεται αν τους αναμείξουμε με πλέγμα

2.3 Σύνθετα βιοϋλικά ελαστίνης-κολλαγόνου

Για τη καλύτερη κατανόηση των δομικών χαρακτηριστικών και των ιδιοτήτων της εξωκυττάριας μήτρας αλλά και για τον ποσοτικό προσδιορισμό των επιπέδων γήρανσης έχουν ερευνηθεί σύνθετα βιολογικά υλικά ελαστίνης-κολλαγόνου.[44-46,55]

Απο τη χρήση σύνθετων βιοϋλικών, ελαστίνης-κολλαγόνου, συνδυάζονται οι ιδιότητες των δύο πρωτεΐνων για την καλύτερη προσομοίωση των μηχανικών και βιολογικών λειτουργιών. Σε μία έρευνα των J.R.Kovacina et al, όταν η τροποελαστίνη ήταν το κύριο συστατικό του σύνθετου ικριώματος, παρουσιαζόταν ιδιαίτερη ελαστικότητα στη δομή. Ενώ, όταν προσθέταν κολλαγόνο η δομή αποκτούσε περισσότερη συνοχή, ήταν σταθερότερη και μπορούσε να τροποποιηθεί ευκολότερα, χωρίς να μειώνει το πορώδες του ικριώματος. Κατι ακρετά θετικό αφού μέσω του πορώδους μεταναστεύουν τα κύτταρα.[55]

Η ελαστίνη μπορεί να προστεθεί σε υδρογέλες κολλαγόνου και να μειώση δραστικά την ακαμψία του. Ο συνδυασμός τους, δημιουργεί ένα βιοϋλικό με εξαιρετικές μηχανικές ιδιότητες. Οι σύνθετες αυτές δομές μπορεί στο μέλλον να εφαρμόζονται στην ιστική μηχανική πνευμόνων, in vitro για δοκιμές φαρμάκων και άλλες εφαρμογές που λόγω των ιδιαίτερων χαρακτηριστικών τους μπορεί να προκύψουν στο μέλλον. [56]

Κεφάλαιο 3: Ακτινοβολία laser χαμηλής ισχύος στην περιοχή του ερυθρού (Αρχή λειτουργίας, Εφαρμογές σε παθήσεις)

Η Ακτινοβολία laser χαμηλής ισχύος (Low-level laser (light) therapy, LLLT) είναι μία ταχέως αναπτυσσόμενη τεχνολογία που εφαρμόζεται σε παθήσεις και διαταραχές των ιστών. Βασίζεται στην αλληλεπίδραση της ερυθρής ακτινοβολίας με ιστούς με σκοπό τη θεραπεία ασθενειών και τη βελτίωση βιολογικών διεργασιών. Η ακτινοβολία στο φάσμα του ερυθρού έχει μεγάλο εύρος επιδράσεων στους ιστούς ακόμα και σε επίπεδο νανοκλίμακας. [42,43]

Το δέρμα είναι το όργανο που εκτίθεται περισσότερο στην ακτινοβολία από κάθε άλλο. Παρουσιάζει ιδιαίτερη επίδραση κατά την έκθεση του σε ερυθρή και εγγύς υπέρυθρη ακτινοβολία. Στη δερματολογία, η LLLT έχει εφαρμοσθεί σε περιπτώσεις όπως: ουλές ακμής, ρυτίδες, υπερτροφικές ουλές ακόμα και σε περιπτώσεις εγκαυμάτων, όπου παρουσιάσθηκαν ωφέλιμα αποτελέσματα. Σε παθήσεις που επηρεάζουν το χρώμα του δέρματος, όπως η λεύκη, η LLLT μπορεί να αυξήσει τη μελάγχρωση, ενεργοποιώντας τον πολλαπλασιασμό των μελανοκυττάρων αλλά και μειώνοντας τον αποχρωματισμό περιορίζοντας την αυτοανοσία. Επιπλεόν οι ασθενείς που πάσχουν από φλεγμονώδεις παθήσεις όπως η ψωρίαση και η ακμή μπορούν να επωφεληθούν από αυτή τη μέθοδο. Επίσης, συνεισφέρει στη θεραπεία διαταραχών στους τένοντες. Η LLLT είναι μία μη επεμβατική τεχνική με ελάχιστες παρενέργειες. [21]

3.1 Αρχή λειτουργίας της φωτοθεραπείας με ακτινοβολία χαμηλής ισχύος

Η φωτοθεραπεία LLLT αφορά τη χρήση φωτονίων κατά ένα μη θερμικό φωτισμό για την τροποποίηση βιολογικών λειτουργιών. Όπου χρησιμοποιούνται είτε πηγές σύμφωνου φωτός (laser) ή μη σύμφωνου φωτός (LED), ή, σε ορισμένες περιπτώσεις, συνδυασμός αυτών. Οι κύριες ιατρικές εφαρμογές της είναι η ελάττωση του πόνου και ο έλεγχος των φλεγμονών, η ιστική επιδιόρθωση και η προώθηση της αναδόμηση ιστών και νεύρων. Τις τελευταίες δεκαετίες, η χρήση laser έχει αυξηθεί για την αισθητική θεραπεία των ρυτίδων, του φωτογηρασμένου δέρματος και των ουλών.

Στην LLLT κύτταρα ή ιστοί εκτίθενται σε ακτινοβολία χαμηλής ισχύος ερυθρού ή/και εγγύς υπέρυθρου φωτός. Η θεραπεία με τη χρήση της LLLT σε διάφορες εντάσεις ακτινοβολίας, έχει δείξει ότι μπορεί να ωθήσει ή να περιορίσει μια πληθώρα από κυτταρικές διεργασίες. [21]

Ο μηχανισμός που συσχετίζεται με την κυτταρική φωτο-βιοδιαμόρφωση που προκαλείται από την LLLT ακόμα δεν έχει εξηγηθεί. Απ' ότι έχει παρατηρηθεί η LLLT επιδρά σε όλα τα επίπεδα, από το μοριακό στο κυτταρικό ως και τους ιστούς. Ο κύριος μηχανισμός πιστεύεται ότι είναι αυτός της απορρόφησης του ερυθρού ή του εγγύς υπέρυθρου από τα μιτοχονδριακά χρωμοφόρα, πιο συγκεκριμένα από το αναπνευστικό συνένζυμο δηλαδή την οξειδάση του κυτοχρώματος-C (CCO) αλλά και από τους φωτοανιχνευτές που υπάρχουν στην κυτταρική μεμβράνη. Εν συνεχεία συμβαίνει μια σειρά διεργασιών που οδηγεί στη βιοδιέγερση διάφορων λειτουργιών (Εικόνα 3.1). Εικάζεται, ότι η ενέργεια από το φως προκαλεί τη φωτόλυση του αναστολέα νιτρικού οξειδίου από το -CCO κάτι που προωθεί την ενζυμική δραστηριότητα, τη μεταφορά ηλεκτρονίων, τη μιτοχονδριακή αναπνοή και την παραγωγή της τριφωσφορικής αδενοσίνης (Εικόνα 3.1). Έπειτα η LLLT τροποποιεί την κυτταρική αναπνοή και τη συγγένεια των παραγόντων μεταγραφής που αφορούν τον πολλαπλασιασμό των κυττάρων, την ανάπλαση και αναγέννηση των ιστών (Εικόνα 3.1). [21]



Εικόνα 3.1 Μηχανισμός δράσης της LLLT[21]

Παρότι η LLLT χρησιμοποιείται για τη θεραπεία διάφορων παθήσεων, παραμένει μια αμφιλεγόμενη μορφή θεραπείας κυρίως για την αβεβαιότητα που διέπει το μηχανισμό δράσης της. Αρκετές αναφορές περιλαμβάνουν αρνητικά αποτελέσματα, κάτι που πιθανόν οφείλεται σε άστοχη επιλογή της πηγής και των δόσεων ακτινοβολίας. Τα αποτελέσματα μπορεί να οφείλονται στην έλλειψη σωστής προετοιμασίας του δέρματος του ασθενούς (μη καθαρισμός καλλυντικών, παρουσία λιπαρότητας στο δέρμα) παράγοντες οι οποίοι μπορεί να επηρεάσουν την ακτινοβόληση. [21]

Η φωτοθεραπεία μπορεί να είναι είτε συνεχόμενη είτε σε παλμούς και αφορά ακτινοβολία με μήκη κύματος μεταξύ 390-1100nm. Σε συνηθισμένες περιστάσεις, εφαρμόζοντες χαμηλές ροές (0.04-50 J/cm²) και ενεργειακές πυκνότητες (<100 mW/cm²). Για επιφανειακές περιπτώσεις εφαρμόζονται μήκη κύματος μεταξύ 390-600nm και για περιπτώσεις που βρίσκονται βαθύτερα χρησιμοποιούνται μήκη κύματος 600-1100 nm, τα οποία διεισδύουν περισσότερα από τα προηγούμενα (Εικόνα 3.2). Μήκη κύματος μεταξύ 700-750 nm, παρουσιάζουν μικρή βιολογική αλληλεπίδραση, συνεπώς, δε χρησιμοποιούνται

συχνά. Στην LLLT χρησιμοποιούνται διάφορες πηγές φωτός όπως lasers αδρανών αερίων και laser ημιαγωγων, ηλιου-νέου (HeNe, 633 nm), ρουβιδίου (694 nm), αργού (488 και 514 nm), κρυπτού (521, 530, 568, 647 nm), αρσενιούχου γαλλίου (GaAs, >760 nm) και γαλλιουαλλουμινιου- αρσενικού (GaAlAs, 612-870 nm). Επίσης χρησιμοποιούνται πληθώρα LED ημιαγωγών που είναι διαθέσιμοι σε χαμηλότερα μήκη κύματος, που κυρίως αποτελούνται από Ινδιο, φωσφίδια και νιτρίδια. [21]



Εικόνα 3.2 Αναπαράσταση του βάθους διείσδυσης της ακτινοβολίας για διάφορα μήκη κύματος[21]

3.2 Εφαρμογές της φωτοθεραπείας με ακτινοβολία χαμηλής ισχύος 3.2.1 Δερματική ανανέωση

Το δέρμα εμφανίζει τα πρώτα σημάδια γήρανσης περί τα τέλη της δεύτερης και στην αρχή της τρίτης δεκαετίας κάθε ανθρώπου, όπου συνήθως εμφανίζονται ρυτίδες, απομελανόχρωση, τηλεαγγειεκτασία και ελάττωσης της ελαστικότητας.

Τα συνηθισμένα ιστολογικά χαρακτηριστικά είναι η μείωση του ποσοστού του κολλαγόνου, η αποδόμηση των ινών του κολλαγόνου, ο εκφυλισμός των ινών ελαστίνης, η διατάραξη των μεμβρανικών μεταλλοπρωτεϊνασων, ειδικά τις MMP-1 και MMP-2, οι οποίες διαστέλλουν και μπλέκουν τα δερματικά αγγεία και η ατροφία και ο αποπροσανατολισμός της επιδερμίδας. Το γήρας και οι περιβαντολλογικοί παράγοντες είναι υπεύθυνοι για τη γήρανση του δέρματος αλλά και η επίδραση του φωτός προκαλεί πολλές από τις προαναφερθείσες αλλαγές.[21]

3.2.2 Αντιμετώπιση της ακμής

Τα αίτια της εφηβικής ακμής δεν έχουν ακόμη εξακριβωθεί. Όμως έχουν διαπιστωθεί τέσσερις κύριες λειτουργίες που συσχετίζονται μαζί της, αυτές είναι: η θυλακοειδής υπερκερατινοποίηση (μετατροπή επιθήλιου σε πολύστιβο πλακώδες), η αύξηση της έκκρισης του σμήγματος που οφείλεται στην έκκριση των ανδρογενών ορμονών, η προπιονιβακτηριακή ακμή και η παρουσία φλεγμονών.

Η προπιονιβακτηριακή ακμή έχει έναν σημαντικό ρόλο στην όλη διαδικασία, αφού ενεργοποιεί τα τριγλυκερίδια και απελευθερώνονται οι κυτοκίνες κάτι που έχει ως αντίκτυπο την ύπαρξη φλεγμονωδών αντιδράσεων και την ενεργοποίηση της κερατινοποίησης. Οι υπάρχουσες προσεγγίσεις για τη θεραπεία της εφηβικής ακμής γίνονται με τη χρήση τοπικών αντιβιοτικών, τοπικών ρετινοϊδών, υπεροξείδιο του βενζολίου, άλφα-υδροξυοξέα, σαλικυλικό οξύ ή αζαλεϊκό οξύ και σε μερικές περιπτώσεις ακόμα και ορμόνες. Ο τρόπος δράσης αυτών των μεθόδων, αφορά την πρόληψη της δημιουργίας μικροφαγεσώρων, σμήγματος, της προπιονιβακτηριακή ακμής και των φλεγμονών. Όμως, παρά την πληθώρα επιλογών για θεραπεία της εφηβικής ακμής, υπάρχει ένα σημαντικό ποσοστό ασθενών που δεν ανταποκρίνεται στις θεραπείες ή εμφανίζει παρενέργειες. [21]

Η φωτοθεραπεία (phototherapy), έχει προταθεί ως εναλλακτική μέθοδο για τη θεραπεία της εφηβική ακμής, λόγω των λιγότερων παρενεργειών σε σχέση με τις άλλες μεθόδους. Η έκθεση στην ηλιακή ακτινοβολία, μειώνει τις ανδρογενείς ορμόνες στον σμηγματογενή αδένα και έχει αναφορές για την αποτελεσματική αντιμετώπιση της ακμής σε ποσοστά 70%. Όμως, λόγω των ανεπιθύμητων επιδράσεων της UVA και UVB ακτινοβολίας, η ηλιακή ακτινοβολία, δεν μπορεί εύκολα να εφαρμοστεί για τη θεραπεία της ακμής. Πρόσφατα, ξεκίνησε η εφαρμογή ορατού φωτός (μπλέ, ερυθρού και συνδυασμός αυτών) για τη θεραπεία της ακμής. Ένας μηχανισμός δράσης αυτής της θεραπείας, αφορά την απορρόφηση φωτός από τις πορφυρίνες που έχουν παραχθεί από τα προπιονιβακτήρια, ως μέλος της μεταβολικής διαδικασίας, και δρούν ως ενδογενή φωτοαισθητήρες. Αυτή η διαδικασία προκαλεί μια φωτοχημική αντίδραση και σχηματίζει ενεργές ελεύθερες ρίζες και μονήρη οξυγόνα που οδηγούν στην καταστροφή των βακτηρίων (Εικόνα 3.3). Το ερυθρό φως μπορεί να διεισδύσει βαθύτερα στους ιστούς από το μπλέ φως. Έχει αποδειχθεί ότι το ερυθρό φως μπορεί να επηρεάσει την έκκριση του σμήγματος από τους σμηγματογενείς αδένες και να αλλάξει τη συμπεριφορά των κερατινοκυττάρων. Είναι πιθανό, οι επιδράσεις του ερυθρού φωτός να οφείλονται στην διαμόρφωση των κυτοκινών από τα μακροφάγα και λοιπά κύτταρα, κάτι που οδηγεί στην μείωση των φλεγμονών. Πληθώρα ερευνών έχει αναφέρει ότι η LLLT στο φάσμα ερυθρό- εγγύς υπέρυθρο (630- 1000nm) και η μη θερμική ισχύς (λιγότερη από 200 mW) μόνη της ή συνεργατικά με άλλες λειτουργίες (μπλέ φως), ενδείκνυται για την θεραπεία της εφηβικής ακμής.[21]



Εικόνα 3.3 Αναπαράσταση θεραπείας της ακμής με ερυθρή και μπλε ακρινοβολία. Η ερυθρή ακτινοβολία και η μπλέ δρουν συνεργατικά στη θεραπεία της ακμής.Τα προπιονιβακτήρια συνθέτουν και αποθηκεύουν ένα μεγάλο ποσοστό πορφυρίνων. Όταν οι πορφυρίνες εκτεθούν στο ορατό φως γίνονται χημικά ενεργές και μεταβαίνουν στην διεγερμένη τους κατάσταση, έτσι σχηματίζονται ανενεργές ελεύθερες ρίζες και μονήρη οζυγόνα κάτι που έχει ως επακόλουθο την καταστροφή των μεμβράνων της ακμής. [21]

3.2.3 Φωτοπροστασία

Είναι ευρέως αποδεκτό ότι όλες οι αρνητικές συνέπειες της ηλιακής ακτινοβολίας, στο ανθρώπινο δέρμα, οφείλονται στο φάσμα της UV ακτινοβολίας (<400 nm). Ο πιθανότερος μηχανισμός δράσης της UV ακτινοβολίας στο ανθρώπινο δέρμα έγκειται στην καταστροφή των ινών του κολλαγόνου, τον σχηματισμό των ελεύθερων ριζών, στην παρεμπόδιση της επισκευής του DNA και του ανοσοποιητικού συστήματος. Οι υπάρχουσες λύσεις για προφύλαξη από την UV ακτινοβολία αφορά τη μη έκθεση στην ηλιακή ακτινοβολία σε αυτή ή τη χρήση αντιηλιακών. Η έκθεση στον ήλιο είναι κάτι που περιορίζεται αρκετά δύσκολα. Ενώ η χρήση αντιηλιακών έχει και αυτή της αρνητικά της χαρακτηριστικά όπως η εμφάνιση αλλεργιών. [21]

Τη λύση μπορεί να τη δίνει η έκθεση σε υπέρυθρη ακτινοβολία, καθώς όπως έχει αναφερθεί παρουσιάζει προστατευτική δράση έναντι της UV ακτινοβολίας. Στο φυσικό περιβάλλον, το ορατό φως και η υπέρυθρη ακτινοβολία κυριαρχούν στην ακτινοβολία του ήλιου τις πρωινές ώρες κάτι που προετοιμάζει το δέρμα των θηλαστικών να δεχθούν τις UVA και η UVB ακτινοβολίες που υπερισχύουν το μεσημέρι.[21]

3.2.4 Η φωτοθεραπεία στις δερματικές βλάβες του έρπη

Ο απλός ερπητοϊός (HSV), αφορά μια από τις πιο σύνηθες ιικές λοιμώξεις. Ο ιός ενεργοποιείται και μεταναστεύει από τα αισθητήρια νεύρα στο δέρμα και τους βλεννογόνους. Συγκεκριμένα, εντοπίζεται στα επιθηλιακά κύτταρα των χειλιών και στην περιστοματική περιοχή. Η ενεργοποίηση του συμβαίνει όταν ο ξενιστής εκτίθεται σε διάφορους παράγοντες φυσικούς, όπως ο πυρετός, η έκθεση στην υπεριώδη ακτινοβολία ή και σε ψυχολογικούς όπως το στρες.[21]

Έχουν χρησιμοποιηθεί για την αντιμετώπιση του HSV, αρκετά αντιικά φάρμακα όπως ακικλοβίρη και βαλακικλοβίρη, χωρίς ιδιαίτερη επιτυχία. Η LLLT έχει προταθεί ως εναλλακτική θεραπεία, για την ενεργοποίηση της ίασης, τη μείωση των συμπτωμάτων και της περιόδου της υποτροπής. Ερευνήθηκαν 50 ξενιστές του ιού, με συχνότητα κρούσματος εμφάνισης του ιού τουλάχιστον μία τον μήνα για πάνω από έξι μήνες. Όταν εφαρμόσθηκε LLLT (με παραμέτρους 690 nm, 80 mW/cm², 48 J/cm²) καθημερινά για διάστημα δύο εβδομάδων, υπήρξε καθυστέρηση της εμφάνισης του ερπητοϊού. Ενώ σε μία άλλη μελέτη οι ερευνητές με χρήση παραμέτρων (647 nm, 50mW/cm²,4.5 J/cm²), κατάφεραν να επιμηκύνουν την περίοδο εμφάνισης του ιού για 30-73 μέρες.

Ο μηχανισμός δράσης δεν έχει ακόμα προσδιοριστεί, φαίνεται όμως ότι υπήρχε μια έμμεση επίδραση της LLLT στα κύτταρα και τα χυμικά (humoral) συστατικά του ανοσοποιητικού συστήματος που δρουν για την αντιική λειτουργία. Κατά την ακτινοβόληση με LLLT, ερυθρής και εγγύς υπερύθρου ακτινοβολίας, έχει παρατηρηθεί η ενεργοποίηση και
ο πολλαπλασιασμός των λυμφοκυττάρων και μακροφάγων καθώς και η σύνθεση των κυτοκυνών.[21]

3.2.5 Η φωτοθεραπεία για την καταπολέμηση της λεύκης

Η λεύκη είναι μια επίκτητη χρωστική διαταραχή, που χαρακτηρίζεται από τον αποχρωματισμό του δέρματος και των τριχών. Το πως τα μελανοκύτταρα εξαφανίζονται είναι ακόμη υπό διερεύνηση. Φαίνεται όμως ότι για τις χρωστικές μεταβολές της λεύκης, πέρα από τον παθολογικό μηχανισμό, εμπλέκονται και κερατινοκύτταρα, ινοβλάστες, μελανοβλάστες και μελανοκύτταρα. Συνεπώς, η διέγερση αυτών των κυττάρων ίσως είναι μια πιθανή θεραπεία. Οι υπάρχουσες θεραπείες αφορά την χρήση τοπικών κορτικοστεροϊδών, φωτοθεραπείας και φωτοχημεοθεραπείας (PUVA). Το 1982, μια ομάδα ερευνητών βρήκε ότι η ακτινοβολία laser χαμηλής ισχύος επιδρά στην ελαττωματική βιοσύνθεση της κατεχολαμίνης σε συγκεκριμένες δερματολογικές διαταραχές, όπως η λεύκη. Αργότερα, δοκιμάσθηκε σε ασθενείς με λεύκη η LLLT HeNe με παραμέτρους (632 nm, 25 mW/cm²). Όπου το 64% εμφάνισε επαναχρωματισμό της ακτινοβολημένης περιοχής, όμως το 34% εμφάνισε μερικό επαναχρωματισμό. Έτσι, η LLLT καθιερώθηκε ως εναλλακτική ωφέλιμη θεραπεία για τη λεύκη.[18,19,20]

Η LLLT έχει μια ευρεία γκάμα εφαρμογών που αφορούν την ενεργοποίηση της ίασης, τη μείωση των φλεγμονών, στην μείωση του θανάτου των κυττάρων και την ανάπλαση του δέρματος. Η LLLT στο χρωματισμό έχει διττή δράση καθώς μπορεί να εφαρμοσθεί και για τον επαναχρωματισμό, σε διαταραχές όπως η λεύκη, αλλά και για τον αποχρωματισμό της περιοχής, αναλόγως με τις δοσομετρικές παραμέτρους. [21]

Κεφάλαιο 4: Μικροσκόπιο Ατομικής Δύναμης

Το κύριο χαρακτηριστικό της παρούσας διπλωματικής εργασίας είναι η μελέτη των βιολογικών υλικών (ελαστίνη και κολλαγόνο) στη νανοκλίμακα.

4.1 Νανοεπιστήμη - Νανοτεχνολογία - Νανοϋλικά

Η νανοτεχνολογία δεν είναι μια αυθύπαρκτη τεχνολογία, αλλά έγκειται στο συνδυασμό τεχνολογιών που υπάρχουν ήδη καθώς και στην αναπτυγμένη ικανότητα να παρατηρούμε και να επεξεργαζόμαστε δομές στη νανοκλίμακα [22]. Η νανοτεχνολογία αφορά το σχεδιασμό, την παραγωγή και την εφαρμογή δομών, συσκευών και συστημάτων με ελεγχόμενο σχήμα και μέγεθος στη νανοκλίμακα. Ενώ με τον όρο νανοεπιστήμη αναφερόμαστε στη μελέτη φαινομένων και στο χειρισμό υλικών στην ατομική, στη μοριακή και στη μακρομοριακή κλίμακα, όπου οι ιδιότητες των υλικών διαφέρουν σημαντικά από αυτές σε μεγαλύτερη κλίμακα. Η διαφορά των ιδιοτήτων των υλικών όταν αυτά βρεθούν στη νανοκλίμακα οφείλονται, κυρίως, στους εξής δύο λόγους:

Τα νανοϋλικά έχουν σχετικά μεγαλύτερη ενεργό επιφάνεια σε σχέση με τα ίδια υλικά μεγαλύτερης διάστασης. Κάτι που μπορεί να κάνει τα υλικά περισσότερο χημικά ενεργά, μερικά υλικά που είναι αδρανή γίνονται ενεργά στην νανοκλίμακα, και επιδρά στην αντοχή ή στις ηλεκτρικές ιδιότητες.

Λόγω του ότι τα κβαντικά φαινόμενα μπορεί να αρχίζουν να υπερέχουν της ύλης στη νανοκλίμακα επηρεάζονται οι οπτικές, ηλεκτρικές και οι μαγνητικές ιδιότητες των υλικών.

Τυπικά τα νανοϋλικά έχουν διαστάσεις από 1 - 100 nm, όπου ένα nm ισοδυναμεί με ένα δισεκατομμυριοστό του μέτρου (10^{-9} m). [23]

Οι ρίζες της χρήσης της νανοτεχνολογίας είναι ιδιαίτερα βαθιές. Αρχαιολογικά ευρήματα όπως χαλύβδινα ξίφη της Δαμασκού κατασκευασμένα μεταξύ 300 και 1700 μ.Χ. είναι γνωστά για την εντυπωσιακή τους αντοχή και τις εξαιρετικά κοφτερές αιχμές τους. Οι ατσάλινες λεπίδες τους περιέχουν ειδικές δομές σε νανοκλίμακα, που ενισχύουν τις ιδιότητες του υλικού από το οποίο έχουν κατασκευαστεί. [25]

Οι πρώτες ιδέες για την θεματολογία της νανοτεχνολογίας μπορούν να βρεθούν σε μια ομιλία του Dr Richard Feyman, το 1959, στο συνέδριο της Αμερικάνικης Φυσικής Κοινότητας [24]. Όπου ο Feyman διατύπωσε μια εικασία που αναφερόταν στην κατασκευή πολύπλοκων δομών από άτομα και μόρια.

Το 1974, ο Norio Taniguchi ερευνητής του πανεπιστήμιου του Tokyo, έδωσε το όνομα «νανοτεχνολογία». Επίσης έκανε το διαχωρισμό μεταξύ μηχανικής στη μικροκλίμακα (η βάση

της μοντέρνας μικροηλεκτρονικής) και του καινούργιου πεδίου της μηχανικής μικρότερης της μικροκλίμακας. [24]

Από το 1990 και έπειτα, έχει σημειωθεί ραγδαία πρόοδος στην κατασκευή υλικών, στην εξομοίωση στον ηλεκτρονικό υπολογιστή και στην ανάπτυξη εργαλείων ανάλυσης ατομικών, μοριακών και κρυσταλλογραφικών δομών. Η εφεύρεση και η ανάπτυξη του σαρωτικού μικροσκοπίου σήραγγος (Scanning Tunneling Microscope, STM), στη δεκαετία του 1980 και στη συνέχεια και άλλων μικροσκοπιών σάρωσης ακίδος (SPM), όπως το μικροσκόπιο AFM (το οποίο θα αναλυθεί στη συνέχεια), λειτουργούν ως προς το χαρακτηρισμό αλλά και το χειρισμό νανοδομών και νανοϋλικών. [22]

4.2 Μικροσκόπιο ατομικής δύναμης: Εισαγωγή-ιστορική αναδρομή

Η εφεύρεση του μικροσκοπίου ατομικής δύναμης (Atomic Force Microscopy, AFM) συνέβη το 1985 [26]. Η ονομασία του αφορά τη χρήση ενός αισθητήρα δύναμης για τη δημιουργία εικόνων [27,28]. Η πρώτη πραγματική ατομική ανάλυση επιτεύχθηκε το 1993 σε ένα δείγμα ασβεστίτη, όπου η ανάλυση πέτυχε λόγω της ακαμψίας και της επίπεδης επιφάνειας του δείγματος. [29]

Το AFM ανήκει στην κατηγορία Μικροσκοπίας Σάρωσης Ακίδας, αφού βασίζεται στην σάρωση της επιφάνειας με μία λεπτή ακίδα και δημιουργεί τρισδιάστατες τοπογραφικές εικόνες με ανάλυση μικρότερη από ένα νανόμετρο. Οι αλληλεπιδράσεις μεταξύ της ακίδας και της επιφάνειας του δείγματος διέπονται από το πεδίο δυνάμεων. Οι κύριες δυνάμεις που επικρατούν είναι οι Van Der Walls (μεγάλης εμβέλειας), οι απωστικές δυνάμεις (μικρής εμβέλειας), οι δυνάμεις συνάφειας καθώς και οι στερεοχημικές και μαγνητικές. Το AFM δεν είναι απλά μια απεικονιστική μέθοδος για το χαρακτηρισμό των υλικών, αλλά μπορεί και παρέχει διάφορες εφαρμογές, με ιδιαίτερες και μοναδικές δυνατότητες για το χαρακτηρισμό βιολογικών δειγμάτων στη νανοκλίμακα. [28, 30, 31]

Οι βιολογικές μελέτες αποτελούν ένα μεγάλο μέρος των εφαρμογών του AFM. Έρευνες στο DNA, σε πρωτεΐνες, σε ιούς, και σε κύτταρα, έχουν επιτευχθεί με την χρήση AFM.[32-41]. Επίσης, μπορεί να συνδράμει στη μελέτη μηχανικών ιδιοτήτων στη νανοκλίμακα και να χρησιμοποιηθεί ως αισθητήρας δυνάμεων για να προσδιοριστεί η αντοχή των δεσμών μεταξύ διαφορετικών βιολογικών μορίων. [39]

4.3 Αρχή λειτουργίας

Η αρχή λειτουργίας του Μικροσκοπίου Ατομικής Δύναμης, αφορά τη σάρωση μιας λεπτής κεραμικής ή ημιαγώγιμης ακίδας. Η αιχμή της βελόνας τοποθετείται στην άκρη ενός μοχλοβραχίονα, που μπορεί να ταλαντεύεται. Το άλλο άκρο του βραχίονα είναι στερεωμένο σε μία άκαμπτη βάση, που ονομάζεται chip. Όταν ο μοχλοβραχίονας έλκεται ή απωθείται από την επιφάνεια που σαρώνει, ο βραχίονας αποκλίνει από την αρχική του θέση. Το μέγεθος της απόκλισης καταγράφεται από μία δέσμη laser η οποία ανακλάται σε αμβλεία γωνία από το άκρο του μοχλοβραχίονα. Η ανάκλαση της δέσμης laser αναλογεί στην εκάστοτε εκτροπή του προβόλου. Συνεπώς, η απόκλιση της ανακλώμενης δέσμης laser, οδηγεί στην ανάλυση της επιφάνειας σε όρη και κοιλάδες. Τουτέστιν, προκύπτει και η τοπογραφία της επιφάνειας. (Εικόνα 4.1) Παρουσιάζεται διακριτική ικανότητα επί της επιφάνειας από μερικά δέκατα του νανομέτρου μέχρι και μερικά μικρά του μέτρου. Η ακτίνα καμπυλότητας της ακίδας συνήθως είναι 10 – 20 nm. Ενώ οι δυνάμεις που ασκούνται στην επιφάνεια του δείγματος από την ακίδα, κυμαίνονται από 10^{-11} N – 10^{-6} N, ανάλογα με την εφαρμογή.



Εικόνα 4.1. Σχηματική αναπαράσταση των δομικών στοιχείων του Ατομικού Μικροσκοπίου Δύναμης [15]

Η δυναμική ενέργεια ανάμεσα στην ακίδα του AFM και της επιφάνειας του δείγματος, μοντελοποιείται από το δυναμικό Lenard – Jones. Το οποίο έχει την εξής μαθηματική έκφραση:

$$U(r) = \varepsilon \left[(\frac{r_m}{r})^{12} - 2(\frac{r_m}{r})^6 \right]$$

Όταν δύο σώματα τα οποία πλησιάζουν το ένα στο άλλο, αρχικά και για όσο η απόσταση είναι σχετικά μεγάλη θα υπάρξουν ελκτικές δυνάμεις, ενώ για εξαιρετικά μικρές αποστάσεις (<1 nm) θα διέπονται από μικρής εμβέλειας απωστικές δυνάμεις. Όσο η απόσταση μεταξύ των δυο σωμάτων μειώνεται αναπτύσσονται ελκτικές δυνάμεις Van der Walls. Καθώς η απόσταση συνεχίζει να μειώνεται, αρχίζουν να αναπτύσσονται απωστικές δυνάμεις Coulomb. Στο σημείο ελαχιστοποίησης της δυναμικής ενέργειας η συνισταμένη δύναμη αλληλεπίδρασης μηδενίζεται. Έπειτα οι απωστικές δυνάμεις Coulomb επικρατούν πλήρως. (Εικόνα 4.2)



Εικόνα 4.2 Στην εικόνα παρουσιάζονται οι δυνάμεις αλληλεπίδρασης ακίδας και επιφάνειας δείγματος. Με πράσινο χρώμα παρουσιάζονται οι ελκτικές δυνάμεις Van der Walls. Με μπλε χρώμα παρουσιάζονται οι απωστικές δυνάμεις Coulomb. Ενώ με κόκκινο η συνισταμένη δύναμη αλληλεπίδρασης

4.4 Δομικά στοιχεία του οργάνου και ο ρόλος τους

Τα κύρια στοιχεία του AFM περιλαμβάνουν το μηχανισμό αίσθησης, το μηχανισμό σάρωσης και το μηχανισμό ανίχνευσης [30]. Ο μηχανισμός αίσθησης αφορά την ακίδα και τις δυνάμεις μεταξύ αυτής και της επιφάνειας του δείγματος. Ο μηχανισμός σάρωσης αναφέρεται στην χρήση της ακίδας, η οποία σαρώνει την επιφάνεια του δείγματος [40]. Η ακίδα βρίσκεται στον πρόβολο, ο οποίος έχει καθορισμένη σταθερά ελατηρίου. Ο πρόβολος στηρίζεται σε μια ειδική βάση στήριξης και ανάλογα με το είδος του οργάνου, είτε το δείγμα είτε ο πρόβολος μετακινείται με την χρήση των πιεζοηλεκτρικών στοιχείων. [30]

Καθώς η ακίδα σαρώνει την επιφάνεια, ο πρόβολος κάμπτεται ανάλογα με την τοπογραφία της επιφάνειας. Με βάση ποια μέθοδος λειτουργεί το AFM, μια παράμετρος διατηρείται σταθερή από το βρόγχο ανατροφοδότησης (feed- back loop) ο οποίος ελέγχει την απόσταση της ακίδας από το δείγμα. Οι μετακινήσεις του προβόλου ανιχνεύονται με τη χρήση ενός laser. Η δέσμη του laser εστιάζεται στον πρόβολο και ανακλάται σε έναν φωτοανιχνευτή. Ο φωτοανιχνευτής διαχωρίζεται σε τέσσερα τεταρτημόρια και μπορεί να ανιχνεύει τις χωρικές μεταβολές της έντασης του προσπίπτοντος φωτός, καθώς όταν η δέσμη του laser προσπίπτει στη φωτοδίοδο δημιουργείται διαφορά δυναμικού (ηλεκτρική τάσης). Όταν η δέσμη εκτρέπεται από τον πρόβολο η ένταση του φωτός που καταγράφεται στα τεταρτημόρια αλλάζει [26]. Οι κατακόρυφες κινήσεις και οι πλευρικές αποκλίσεις του προβόλου μετρούνται μέσω του υπολογισμού της διαφοράς του σήματος (της τάσης) μεταξύ των τεταρτημορίων. Οι διαφορές μεταξύ των πάνω και κάτω τερτατημορίων παρέχουν πληροφορία σχετικά με την εκτροπή του προβόλου κατά τον άξονα Ζ, ενώ οι διαφορές των τεταρτημορίων δεξιά – αριστερά αντιστοιχούν στην πλευρική στρέψη του προβόλου. Οι διαφορές του σήματος στη φωτοδίοδο χρησιμοποιούνται ως σήμα εισόδου στο βρόχο ανατροφοδότησης. [30]

Τα πιεζοηλεκτρικά στοιχεία είναι ένα ιδιαίτερης σημασίας όργανο του μικροσκοπίου καθώς επιτρέπει την ακριβή κίνηση της ακίδας σε σχέση με την επιφάνεια [30]. Πρόκειται για ένα κεραμικά υλικά που έχουν την ιδιότητα όταν ασκηθεί ηλεκτρική τάση η μια διάσταση τους να αλλάζει και αντιστρόφως, όταν αλλάξει μια διάσταση του εμφανίζεται διαφοράς τάσης στα άκρα τους. Αποτελούνται από τιτανικό άλας του ζιρκονίου (PZT). Ο πρόβολος κινείται μέσω του πιεζοηλεκτρικού στοιχείου Ζ σε κάθετες διευθύνσεις, η κίνηση σε αυτή τη διάσταση αφορά τη διατήρηση της αλληλεπίδρασης μεταξύ ακίδας και επιφάνειας του δείγματος σταθερή. Τα πιεζοηλεκτρικά στοιχεία θα χρησιμοποιούνται και για την κίνηση της ακίδας στους άξονες X-Y, ώστε να επιτευχθεί η σάρωση του δείγματος. Το δείγμα στηρίζεται πάνω σε ένα πιεζοηλεκτρικό στοιχείο, το οποίο μπορεί να κινείται στις τρείς διστάσεις. [28]

4.5 Τεχνικές AFM

Το μικροσκόπιο ατομικής δύναμης έχει τη δυνατότητα να λειτουργήσει με διαφορετικούς τρόπους λειτουργίας. Οι κύριοι τρόποι λειτουργίας είναι οι εξής:

<u>Λειτουργία συνεχούς επαφής</u>: Αφορά τη λειτουργία όπου η ακίδα είναι μόνιμα σε επαφή με το δείγμα κατά τη σάρωση ενώ καταγράφεται η εκτροπή του προβόλου από τη θέση ισορροπίας του.

<u>Λειτουργία ενδιάμεσης επαφής</u>: Σε αυτή τη λειτουργία η ακίδα ταλαντώνεται και έρχεται σε επαφή με το δείγμα ενώ καταγράφονται οι μεταβολές της συχνότητας της ταλάντωσης ή του πλάτους.

<u>Λειτουργία μη επαφής</u>: Αυτή η λειτουργία, όπως και η ενδιάμεσης επαφής, συγκαταλέγεται στις δυναμικές μεθόδους.

Δεν ενδείκνυνται όλες οι τεχνικές για τη μελέτη όλων των υλικών. Κάθε υλικό έχει τις ιδιότητες του με βάση τις οποίες επιλέγεται η κατάλληλη λειτουργία. Παραδείγματος χάριν, για τα μαλακά υλικά οι δυνάμεις που εφαρμόζονται πρέπει να μην είναι πολύ υψηλές και αλλοιώνουν το δείγμα, κάτι που σημαίνει ότι η λειτουργία συνεχούς επαφής καλό είναι να αποφευχθεί, ενώ θα πρέπει να προτιμηθεί η λειτουργία ενδιάμεσης επαφής. Η λειτουργία συνεχούς επαφής συνίσταται να χρησιμοποιηθεί σε δείγματα υψηλής σκληρότητας και ανθεκτικότητας.

4.5.1 Λειτουργία συνεχούς επαφής

Είναι η πρώτη σε χρήση λειτουργία και η πιο διαδεδομένη όπου επιτυγχάνεται μηχανική επαφή μεταξύ της κορυφής της ακίδας και της επιφάνειας του δείγματος και επικρατούν μικρής εμβέλειας απωστικές δυνάμεις.[32] (Εικόνα 4.3b). Υπάρχουν δύο υποκατηγοριοποιήσεις αυτής της λειτουργίας, οι εξής :

<u>Λειτουργία σταθερής δύναμης</u>

Στη λειτουργία σταθερής δύναμης το σήμα της φωτοδιόδου διατηρείται σταθερό από ένα βρόγχο ανάδρασης. Όσο η ακίδα σαρώνει σε οριζόντιες γραμμές το δείγμα, ο βρόγχος ανάδρασης κρατά την εκτροπή του προβόλου σταθερή. Ενώ η δύναμη διατηρείται και αυτή σταθερή, αφού η σχέση δύναμης παραμόρφωσης είναι γραμμική (F=Kx). Ως εκτούτου, διατηρείται σταθερή μια προκαθορισμένη τιμή (setpoint) της δύναμης. Κάτι που συμβαίνει επειδή διατηρείται σταθερός ο βαθμός κάμψης του προβόλου. Το Ζ πιεζοηλεκτρικό στοιχείο κινεί τον πρόβολο κατακόρυφα για κάθε ένα pixel. Συνεπώς και με βάση την Χ-Υ θέση του αναπαριστάται η τοπογραφία του δείγματος. [26]

Λειτουργία σταθερής απόστασης

Στη λειτουργία σταθερού ύψους, η ακίδα διατηρείται στο ίδιο ύψος κατά τη διάρκεια της σάρωσης με την ανάδραση απενεργοποιημένη. Η ακίδα είναι στερεωμένη στον πρόβολο, όπου από την εκτροπή του λαμβάνεται και η τοπογραφία του δείγματος. Η πληροφορία της τοπογραφίας του δείγματος κωδικοποιείται στο σήμα της φωτοδιόδου (σήμα σφάλματος, signal error), το οποίο υπολογίζεται από την κάμψη του προβόλου. Μπορεί να επιτευχθεί υψηλή ανάλυση λόγω των μεγάλων αλληλεπιδράσεων μεταξύ ακίδας και του προβόλου. Το σημαντικότερο πλεονέκτημα της μεθόδου, είναι η ευαισθησία στον άξονα Ζ. Όμως, η δύναμη που εφαρμόζεται στο δείγμα μεγαλώνει την εκτροπή του προβόλου, κάτι που μπορεί να προκαλέσει αλλοιώσεις στο δείγμα και την ακίδα. Η λειτουργία ενδείκνυται για δείγματα με επίπεδές επιφάνειες και υψηλής σκληρότητας. Για την απεικόνιση βιολογικών δειγμάτων, στη λειτουργία ασυνεχούς επαφής, χρησιμοποιούνται πρόβολοι με μικρές σταθερές ελατηρίου (k,1 N/m). [26]



Εικόνα 4.3 Σχηματική αναπαράσταση των δύο λειτουργιών του AFM. a) Παρουσιάζεται η λειτουργία ενδιάμεσης επαφής. b) Παρουσιάζεται η λειτουργία συνεχούς επαφής. Όπου η πρώτη δεν αλλοιώνει το δείγμα όπως φαίνεται και στην εικόνα [29]

4.5.2 Λειτουργία ενδιάμεσης επαφής

Η λειτουργία της ενδιάμεσης επαφής χρησιμοποιείται κατά κόρον στην έρευνα, ειδικά όταν πρόκειται για βιολογικά δείγματα. Στην τεχνική αυτή, ο πρόβολος ταλαντώνεται μέσω ενός ακουστικού κύματος στη συγνότητα συντονισμού του. Η αργή λειτουργίας του βασίζεται της δράσης συγκεκριμένης δύναμης στον πρόβολο όταν η αιγμή της ακίδας έρχεται κοντά στο δείγμα (δυνάμεις Van der Walls ή διπολικής – διπολικής αλληλεπίδρασης). Η εικόνα τοπογραφίας παρέχεται από την απεικόνιση της δύναμης της ταλαντευόμενης ακίδας με την επιφάνεια του δείγματος [Εικόνα 4.3(a)]. Οι αλληλεπιδράσεις ακίδας-επιφάνειας δείγματος, επηρεάζονται από μια σειρά παραμέτρων όπως το πλάτος ταλάντωσης, η συχνότητα ταλάντωσης, η μετατόπιση της φάσης και η απόκλιση του προβόλου. Οι προαναφερθείσες παράμετροι μπορούν να χρησιμοποιηθούν ως παράμετρος ανάδρασης για την απεικόνιση της τοπογραφίας της επιφάνειας.[28] Το πλάτος ταλάντωσης μπορεί να γρησιμοποιηθεί ως σήμα ανατροφοδότησης, το οποίο ρυθμίζεται έτσι ώστε η ακίδα να έρχεται σε επαφή με την επιφάνεια μόνο κατά το τέλος του κύκλου της ταλάντωσης. Η ακίδα δέχεται και απωστικές και ελκτικές δυνάμεις [26]. Σε αυτή τη λειτουργία οι πλευρικές δυνάμεις μειώνονται, κάτι που επιτρέπει την μη καταστρεπτική απεικόνιση ευαίσθητων δειγμάτων, μαλακών υλικών, όπως τα βιολογικά (π.χ. κύτταρα). Χρησιμοποιούνται σκληροί πρόβολοι, με σταθερά ελατηρίου της τάξης των 1-50 N/m, ώστε να έχει μεγάλη δυναμική ενέργεια με σκοπό να υπερβεί τις δυνάμεις που ασκούνται λόγω τριχοειδών φαινομένων στην επιφάνεια.[26]

Όταν η ακίδα έρχεται σε επαφή με την επιφάνεια, και ανάλογα με διάφορα επιφανειακά χαρακτηριστικά που συναντά κατά την κίνηση της, το πλάτος ταλάντωσης του προβόλου αποκλίνει σε σχέση με το setpoint. Η εικόνα πλάτους, δημιουργείται με βάση τη διαφορά μεταξύ της τιμής του setpoint και του πραγματικού πλάτους που έχει ο πρόβολος τη συγκεκριμένη χρονική στιγμή. [26]

4.5.3 Λειτουργία μη επαφής

Στη λειτουργία μη επαφής η ακίδα δε βρίσκεται σε επαφή με την επιφάνεια του δείγματος, η απόσταση που υπάρχει είναι μερικά νανόμετρα (1-10 nm) και ακίδα δέχεται μόνο ελκτικές δυνάμεις. Ο πρόβολος, όταν βρίσκεται μακριά από την επιφάνεια ταλαντώνεται κοντά στην συχνότητα συντονισμού του, λόγω της εφαρμογής μιας εναλλασσόμενης τάσης στο Ζπιεζοηλεκτρικό στοιχείο. Όταν η ακίδα προσεγγίζει το δείγμα το πλάτος ταλάντωσης θα μειωθεί και η ιδιοσυχνότητα του προβόλου αλλάζει εξαιτίας των δυνάμεων αλληλεπίδρασης μιαταξύ ακίδας και επιφάνειας. Οι δυνάμεις αλληλεπίδρασής σε αυτή τη λειτουργία είναι μικρότερες από τις δυνάμεις της λειτουργίας επαφής, κάτι που μειώνει την ανάλυση της εικόνας. Αυτή η λειτουργία χρησιμοποιείται σε μαλακά δείγματος. Πάραυτα, το εύρος ρύθμισης των παραμέτρων για σταθερή λειτουργία είναι ιδιαίτερα μικρό με αποτέλεσμα να χρησιμοποιείται κυρίως σε περιβάλλον υψηλού κενού και να έχει ελάχιστες εφαρμογές. [26]

Κεφάλαιο 5: In vitro αυτοοργάνωση ελαστίνης - Απεικόνιση δομών ελαστίνης με AFM- Η επίδραση της ερυθρής ακτινοβολίας χαμηλής ισχύος στην ελαστίνη-Συνδυαστική μελέτη ελαστίνης/κολλαγόνου

Για την in vitro παρατήρηση της αυτο-οργάνωσης της ελαστίνης πραγματοποιήθηκαν πολλαπλά πειράματα με τη χρήση διαλυτών που προτείνονται από τη βιβλιογραφία.[50] Οι διαλύτες που χρησιμοποιήθηκαν κατά την πειραματική διαδικασία ήταν το TBS (Trisbuffered saline), το PBS (Dullbecco's buffered saline) και το υπερκάθαρο νερό.

TBS (Tris-buffered saline)

Είναι ένα ισοτονικό, μη τοξικό διάλυμα, που χρησιμοποιείται για να διατηρήσει το pH σε ένα μικρό εύρος τιμών. Η συγκέντρωση του Tris κυμαίνεται από τα 10-100 mM και το pH του κυμαίνεται στα 7-9.2 και χρησιμοποιείται για να κάνει το pH ελαφρώς αλκαλικό. Το TBS χρησιμοποιείται για να προσομοιαστούν οι φυσιολογικές συνθήκες του ανθρώπινου σώματος. Η προσθήκη χλωριούχου νατρίου λειτουργεί είτε ως ισοτονικό είτε ως υπερτονικό. Διάφορες συγκεντρώσεις Tris- και χλωριούχου νατρίου χρησιμοποιούνται για την παρασκευή του διαλύματος TBS, ανάλογα με τις ιδιαιτερότητες του πειράματος. [47]

PBS (Dullbecco's buffered saline)

Το PBS (Phosphate buffered saline) είναι ένα διάλυμα αλάτων, που συνήθως χρησιμοποιείται σε βιολογικές έρευνες. Περιέχει χλωριούχο νάτριο, φωσφορικό νάτριο, ή σε μερικές άλλες εκδοχές, χλωριούχο κάλιο και φωσφορικό κάλιο. Χρησιμοποιείται για τη σταθεροποίηση του pH. Σημαντικό χαρακτηριστικό του είναι ότι η ωσμωμοριακότητα και η συγκέντρωση των ιόντων στο διάλυμα ταιριάζουν με τα ισοτονικά στοιχεία του ανθρώπινου σώματος. Το PBS είναι ισοτονικό και δεν παρουσιάζει τοξικότητα στα κύτταρα, κάτι που το κάνει κατάλληλο για πολλές βιολογικές χρήσεις. [48]

5.1 Προετοιμασία stock εναιωρημάτων ελαστίνης-διαλυτών

5.1.1 Προετοιμασία stock εναιωρημάτων ελαστίνης σε υπερκάθαρο νερό Ελαστίνη από αυχενικό σύνδεσμο βοδινού (E1625 της Sigma) διαλύθηκε σε υπερκάθαρο νερό στην επιθυμητή συγκέντρωση 1% w/v και αποθηκεύτηκε στους 20 °C. Το διάλυμα χρειάζεται να αποθηκευτεί για ένα διάστημα τουλάχιστον 14 ημερών, μετά την αρχική σύνθεση του αιωρήματος, ώστε να είναι εφικτή η παρατήρηση της αυτοργάνωσης των μικροϊνιδίων ελαστίνης στη νανοκλίμακα [51].

5.1.2 Προετοιμασία stock εναιωρημάτων ελαστίνης σε PBS

Ελαστίνη από αυχενικό σύνδεσμο βοδινού (E1625 της Sigma) διαλύθηκε σε Dullbecco's buffered saline (PBS, 14190 της Gibco) στη συγκέντρωση 1% w/v και αποθηκεύεται στους 20 °C.

5.1.3 Προετοιμασία stock εναιωρημάτων ελαστίνης σε TBS

Για την παρασκευή του διαλύματος TBS (0.05M Tris, 150mM, pH=7.6 στους 25°C) διαλύθηκαν 6.05 g Tris και 8.76 g NaCl σε 800 ml H2O. Ρυθμίστηκε το pH στο 7.6 με την προσθήκη HCl (το pH πρέπει να είναι ελαφρώς αλκαλικό, 7.4-8.0, ώστε να προσομοιαστεί το pH του οργανισμού). Έπειτα, προστέθηκαν 200 ml υπερκαθαρό νερό. Τέλος, το διάλυμα αποθηκεύτηκε στους 4 °C. [47]

Για το stock διάλυμα, διαλύθηκε ελαστίνη (E1625 της Sigma) σε Tris-buffered saline (TBS) στη συγκέντρωση 1% w/v και αποθηκεύεται στους 20 °C.

5.2 Προετοιμασία δειγμάτων

Για την παρασκευή του δείγματος τοποθετήθηκαν, με τη χρήση πιπέτας, 10-20 μl διαλύματος ελαστίνης- υπερκάθαρου νερού (1% w/v), πάνω σε δίσκους μίκας (Product No. 50, 9.9 mm diameter, TED PELLA, INC.). Η μίκα τοποθετήθηκε, πάνω σε carbon tabs (G3347N, με διάμετρο 12mm, Agar Scientific) για να επιτευχθεί η επιθυμητή σταθερότητα του δείγματος. Μεταξύ του carbon tab και της μίκας, τοποθετήθηκε ένα χάλκινο πλέγμα χαρτογράφησης (G2761C, Agar Scientific) ώστε να ήταν εφικτή η λήψη εικόνας στην ίδια ακριβώς περιοχής καθώς σκοπός της εργασίας ήταν η μελέτη μίας ίνας πριν και μετά την έκθεση της στην ερυθρή ακτινοβολία χαμηλής ισχύος. Το δείγμα τοποθετήθηκε σε συνθήκες περιβάλλοντος (σε θερμοκρασία 25-27 °C και υγρασία 45%) για την αποξήρανση του. Τέλος τοποθετήθηκε στο AFM.

5.3 Μεθοδολογία απεικόνισης με μικροσκοπία ατομικής δύναμης (AFM)

Το AFM που χρησιμοποιήθηκε στα πλαίσια αυτής της διπλωματικής είναι το CPII, Veeco (Εικόνα 5.1(a)) σε λειτουργία επαφής με τη χρήση ακίδας (MLCT) (Εικόνα 5.1(b)). Όλα τα πειράματα πραγματοποιήθηκαν στον αέρα σε θερμοκρασία δωματίου. Η επεξεργασία των εικόνων έγιναν με το software DI SPMLab BT ver.60.2 της Veeco. Ενώ οι ποσοτικές μετρήσεις έγιναν με το WSxM 5.0 Develop 8.1 (I. Horcas et al Rev. Sci. Instrum. 78, 013705 (2007)). Οι τοπογραφικές εικόνες είναι έγχρωμες δισδιάστατες (2D) και τρισδιάστατες (3D).



Εικόνα 5.1 α) Το AFM CPII, Veeco, b) Εικόνα SEM ακίδας MLCT

Τα πειράματα πραγματοποιήθηκαν σε θερμοκρασία 25-27 °C και 45 % υγρασία. Μελετήθηκαν πολλαπλά σημεία του δείγματος και λήφθηκε μεγάλος αριθμός εικόνων για τη μελέτη της αυτο-οργάνωσης της ελαστίνης και το σχηματισμό μικροϊνιδίων, ινιδίων και ινών. Οι ίδιες διαδικασίες προετοιμασίας δείγματος και της απεικόνισης ήταν ίδιες για όλα τα διαλύματα που μελετήθηκαν.

5.4 Γεωμετρικά Χαρακτηριστικά ινών ελαστίνης

Η κατηγοριοποίηση της ελαστίνης με βάση τα γεωμετρικά χαρακτηριστικά δίνεται στον παρακάτω πίνακα.[51]

	Διάμετρος (nm)	Υψομετρική διαφορά (nm)
Ίνα	604,0 ±27,9	88,8±5,7
Ινίδιο	345,6±22,6	27,7±3,3
Μικροϊνίδιο	134,5±23,3	4,5±0,7

Πίνακας 5.1. Κατηγοριοποίηση δομών ελαστίνης με βάση τα γεωμετρικά χαρακτηριστικά της

5.5 Ακτινοβόληση με ερυθρή ακτινοβολία χαμηλής ισχύος

Μελετήθηκε η επίδραση ερυθρής ακτινοβολίας χαμηλής ισχύος για να διαπιστωθεί η επίδραση της στις δομές της ελαστίνης. Για την αξιοπιστία των πειραματικών αποτελεσμάτων μελετήθηκε η ίδια ίνα πριν και μετά την ακτινοβόληση, με τη μέθοδο που περιεγράφηκε στην παράγραφο 5.3.

5.5.1 Πρωτόκολλο ακτινοβόλησης με ερυθρή ακτινοβολία χαμηλής ισχύος Η πειραματική διάταξη που χρησιμοποιήθηκε ήταν αυτή που περιγράφεται στη συνέχεια (παράγραφο 5.5.2). Πραγματοποιήθηκαν τρείς κατηγορίες πειραμάτων ακτινοβόλησης:

Στην πρώτη κατηγορία, ο χρόνος ακτινοβόλησης ήταν 45 δευτερόλεπτα επί 5 φορές, με 60 δευτερόλεπτα ηρεμίας μεταξύ δύο διαδοχικών ακτινοβολήσεων, για 4 κύκλους ακτινοβόλησης.

Στη δεύτερη κατηγορία, η ακτινοβόληση ήταν συνεχής για 15 λεπτά για 4 κύκλους ακτινοβόλησης

Στην τρίτη κατηγορία, και πάλι η ακτινοβόληση ήταν συνεχής για 60 λεπτά για 3 κύκλους ακτινοβόλησης.

5.5.2 Διάταξη ακτινοβόλησης

Το σύστημα διοδικού laser (GCSLS-10-1500M, China Daheng Group, Inc.) με μήκος κύματος στα 661nm, εμπεριείχε μια οπτική ίνα με διαχυτή δέσμης (diffuser) επίπεδής κυκλικής συμμετρίας. Η απόσταση του διαχυτή και του δείγματος ήταν στα 4cm. Επίσης χρησιμοποιήθηκε ψηφιακό θερμικό φωτόμετρο με ανιχνευτή χαμηλής ισχύος (Nova display 3A-FS-SH puck, Ophir Laser Measurement Group). Η πυκνότητα ενέργειας της ακτινοβολίας που μετρήθηκε για 45 δευτερόλεπτα ήταν 0.4 J/cm², για τα πειράματα διακοπτόμενης ακτινοβόλησης, για τα πειράματα των 15 λεπτών ακτινοβόλησης ήταν 8 J/cm² και για αυτά των 60 λεπτών ήταν 32 J/cm². Στα πειράματα διακοπτόμενης ακτινοβόλησης, μεταξύ κάθε δόσης ακτινοβόλησης το δείγμα αφηνόταν για 60 δευτερόλεπτα, ώστε να μην υπάρχουν θερμικές επιδράσεις από την ακτινοβολία laser, καθώς στην συνεχόμενη ακτινοβόληση παρατηρήθηκε αύξηση κατά 0,9 °C.

5.6 Χαρακτηρισμός της τοπογραφίας του δείγματος ελαστίνης- υπερκάθαρου νερού (1% w/v) με μικροσκοπία ατομικής δύναμης – Πρώτη κατηγορία ακτινοβόλησης

Η απεικόνιση της τοπογραφίας του δείγματος πραγματοποιήθηκε με το AFM CPII, Veeco, σε λειτουργία επαφής στον αέρα σε θερμοκρασία 25-27 °C και 45 % υγρασία. Μελετήθηκαν πολλαπλά σημεία του δείγματος και λήφθηκε μεγάλος αριθμός εικόνων για την μελέτη της αυτο-οργάνωσης της ελαστίνης και τον σχηματισμό μικροϊνιδίων, ινιδίων και ινών.

Παρουσιάζονται οι εικόνες (5.2 a, b, c, d) με μεγεθύνσεις από 20x20 μm έως 1.0x1.0 μm οι οποίες αφορούν την ίδια περιοχή και είναι οι πιο αντιπροσωπευτικές από το σύνολο των εικόνων που λήφθηκαν.





b)



e)



f)



Εικόνα 5.2 Τοπογραφικές εικόνες AFM με μεγεθύνσεις a) 20x20 μm, b) 10x10 μm, c) 2.00x2.00 μm, d)1.0x1.0 μm και e) 3D με μεγέθυνση 1.0x1.0 μm., στην ίδια τοποθεσία του δείγματος. Με τη χρήση του WSxM 5.0 Develop 8.1 στην εικόνα f) παρουσιάζεται το υψομετρικό προφίλ του ινιδίου.(I. Horcas et al Rev. Sci. Instrum. 78, 013705 (2007))

Γεωμετρικός χαρακτηρισμός του ινιδίου της ελαστίνης

Τα γεωμετρικά χαρακτηριστικά μελετήθηκαν με τη χρήση του λογισμικού WSxM 5.0 Develop 8.1 (το λογισμικό αυτό χρησιμοποιήθηκε για τις ποσοτικές μετρήσεις όλων των πειραμάτων) (Ι. Horcas et al Rev. Sci. Instrum. 78, 013705 (2007)). Οι μετρήσεις παρουσιάζονται στον Πίνακα 5.2 Η μέση τιμή που μετρήθηκε για τη διάμετρο ήταν τα 244,51±14,97 nm και για την υψομετρική διαφορά 31,48±3,92 nm

Μετρήση	Διάμετρος	Ύψος
	(nm)	(nm)
1	216,14	28,58
2	241,83	28,79
3	235,03	34,59
4	234,65	32,00
5	246,36	31,36
6	256,28	38,79
7	224,08	34,39
8	231,39	31,31
9	249,37	34,38
10	259,57	32,21
11	255,50	34,03
12	264,01	34,52
13	263,48	29,03
14	267,14	31,60
15	256,66	29,23
16	265,94	36,85
17	235,84	30,68
18	227,11	18,13
19	253,93	32,09
20	245,10	30,45
21	221,80	25,88
22	248,41	29,67
23	223,36	30,52
24	237,05	33,22
25	256,04	35,05
26	241,23	31,12
Average	244,51	31,48
St.Dev.	14,97	3,92

Πίνακας 5.2 Γεωμετρικά χαρακτηριστικά ινιδίου

Με βάση την κατηγοριοποίηση των γεωμετρικών χαρακτηριστικών που αναφέρθηκε, διαπιστώνεται ότι η διάταξη της ελαστίνης, που παρατηρήθηκε, αφορούσε *ινίδιο ελαστίνης*. [51]

Χρησιμοποιήθηκε το ίδιο δείγμα μου μελετήθηκε προηγουμένως με σκοπό τη μελέτη της επίδρασης της ερυθρής ακτινοβολίας χαμηλής ισχύος στο ίδιο ινίδιο, σύμφωνα με το πρωτόκολλο της πρώτης κατηγορίας. Για την αξιοπιστία των αποτελεσμάτων, όλα τα πειράματα πραγματοποιήθηκαν στο συντομότερο δυνατό διάστημα μέσα σε μία μέρα, για την αποφυγή πιθανών αλλοιώσεων του δείγματος από περιβαλλοντικούς παράγοντες.

1°ς κύκλος ακτινοβόλησης:

Μετά την πρώτη ακτινοβόληση το δείγμα τοποθετήθηκε στο AFM για τη μελέτη της τοπογραφίας του δείγματος. Με τη βοήθεια του πλέγματος βαθμονόμησης, ήταν εφικτή η χαρτογράφηση της τοπογραφίας του δείγματος με σκοπό την ανεύρεση του ίδιου ινιδίου.





a)



c)







Εικόνα 5.3. Τοπογραφικές εικόνες AFM, μετά από τον 1° κύκλο ακτινοβόλησης, με μεγεθύνσεις a) 20x20 μm, b) 10x10 μm, c) 2.00x2.00 μm, d)1.0x1.0 μm και e) 3D με μεγέθυνση 1.0x1.0 μm, στην ίδια τοποθεσία του δείγματος. Με την χρήση του WSxM 5.0 Develop 8.1 στην εικόνα f) παρουσιάζεται το υψομετρικό προφίλ του ινιδίου.(I. Horcas et al Rev. Sci. Instrum. 78, 013705 (2007))

Γεωμετρικός χαρακτηρισμός του ινιδίου της ελαστίνης μετά τον 1° κύκλο ακτινοβόλησης

Στον πίνακα 5.3, παρουσιάζονται οι διακυμάνσεις του υψομετρικού προφίλ και της διαμέτρου του ινιδίου της ελαστίνης. Η μέση τιμή που μετρήθηκε για τη διάμετρο ήταν τα **263,33±19,93**nm και για την υψομετρική διαφορά **33,14±2,71nm.**

Μέτρηση	Διάμετρος	Ύψος
	(nm)	(nm)
1	289,54	34,50
2	288,45	35,20
3	273,92	35,55
4	293,64	36,18
5	271,28	31,84
6	269,35	32,20
7	299,44	34,03
8	259,38	30,67
9	241,29	31,69
10	249,53	34,79
11	241,54	34,00
12	251,51	33,45
13	246,56	30,62
14	242,25	30,66
15	253,56	31,84
16	245,87	28,19
17	291,54	38,12
18	284,85	36,51
19	243,61	30,28
20	248,76	31,28
21	235,73	31,29
22	264,11	33,16
23	269,91	34,21
24	257,10	38,30
25	244,45	27,98
26	289,50	35,01
Average	263,33	33,14
St.Dev.	19,93	2,71

Πίνακας 5.3 Γεωμετρικά χαρακτηριστικά ινιδίου μετά τον 1° κύκλο ακτινοβόλησης

2°ς κύκλος ακτινοβόλησης

Μετά τη λήψη των εικόνων του 1^{ου} κύκλου, ακολούθησε η ακτινοβόληση του 2^{ου} κύκλου και η λήψη των εικόνων του ίδιου ινιδίου ελαστίνης όπως περιεγράφηκε προηγουμένως.















e)



Εικόνα 5.4 Τοπογραφικές εικόνες AFM, μετά από τον 2° κύκλο ακτινοβόλησης, με μεγεθύνσεις a) 20x20 μm, b) 10x10 μm, c) 2.00x2.00 μm, d)1.0x1.0 μm και e) 3D με μεγέθυνση 1.0x1.0 μm., στην ίδια τοποθεσία του δείγματος. Με την χρήση του WSxM 5.0 Develop 8.1 στην εικόνα f) παρουσιάζεται το υψομετρικό προφίλ του ινιδίου.(I. Horcas et al Rev. Sci. Instrum. 78, 013705 (2007))

Γεωμετρικός χαρακτηρισμός του ινιδίου της ελαστίνης μετά το 2° κύκλο ακτινοβόλησης

Ακολουθούν οι μετρήσεις της υψομετρικής διακύμανσης του ινιδίου της ελαστίνης μετά από το 2° κύκλο ακτινοβόλησης. Όπως παρουσιάζεται στον πίνακα 5.4, η μέση τιμή που μετρήθηκε για τη διάμετρο ήταν τα 273,61±15,57nm και για την υψομετρική διαφορά 32,90±2,23nm.

Μέτρηση	Διάμετρος	Υψος
	(nm)	(nm)
1	289,69	34,26
2	266,77	32,88
3	294,04	34,34
4	309,44	33,28
5	292,10	31,24
6	259,58	29,75
7	261,40	31,61
8	249,85	30,96
9	257,80	33,35
10	259,82	36,25
11	243,79	28,84
12	283,35	32,31
13	260,69	31,44
14	262,43	31,62
15	270,95	30,15
16	259,19	36,52
17	280,31	38,80
18	284,55	34,57
19	284,59	33,51
20	290,62	31,24
21	286,88	34,25
22	279,08	33,27
23	273,87	32,73
24	268,37	30,83
25	266,92	32,82
26	277,88	34,51
Average	273,61	32,90
St.Dev.	15,57	2,23

Πίνακας 5.4 Γεωμετρικά χαρακτηριστικά ινιδίου μετά τον 2° κύκλο ακτινοβόλησης

3°ς κύκλος ακτινοβόλησης

Μετά τη λήψη των εικόνων του 2^{ου} κύκλου, άμεσα, ακολούθησε η ακτινοβόληση του 3^{ου} κύκλου και η λήψη των εικόνων του ίδιου ινιδίου ελαστίνης όπως περιεγράφηκε προηγουμένως. Το δείγμα τοποθετήθηκε στο AFM και λήφθηκαν οι εικόνες 5.5(a,b,c,d,e). Επίσης στη εικόνα 5f παρουσιάζεται ένα αντιπροσωπευτικό υψομετρικό προφίλ όπου με πληθώρα τέτοιων προφίλ έγιναν οι μετρήσεις υψομετρικής διαφοράς και διαμέτρου.















Εικόνα 5.5 Τοπογραφικές εικόνες AFM, μετά από τον 3° κύκλο ακτινοβόλησης, με μεγεθύνσεις a) 20x20 μm, b) 10x10 μm, c) 2.00x2.00 μm, d)1.0x1.0 μm και e) 3D με μεγέθυνση 1.0x1.0 μm., στην ίδια τοποθεσία του δείγματος. Με την χρήση του WSxM 5.0 Develop 8.1 στην εικόνα f) παρουσιάζεται το υψομετρικό προφίλ του ινιδίου.(I. Horcas et al Rev. Sci. Instrum. 78, 013705 (2007))

Γεωμετρικός χαρακτηρισμός του ινιδίου της ελαστίνης μετά τον 3° κύκλο ακτινοβόλησης

Ακολουθήθηκε η ίδια διαδικασία για τον προσδιορισμό της μέσης τιμής της υψομετρικής διαφοράς και της διαμέτρου, όπως στις προηγούμενες ακτινοβολήσεις. Στον πίνακα 5.5 παρουσιάζεται η μέση τιμή που μετρήθηκε για τη διάμετρο ήταν τα 296,74±15,08nm και για την υψομετρική διαφορά 32,56±3,30nm.

Μέτρηση	Διάμετρος	Ύψος
	(nm)	(nm)
	286,79	30,02
2	277,52	27,85
3	287,92	29,68
4	271,38	35,39
5	291,55	37,51
6	306,56	36,80
7	275,35	37,84
8	295,86	29,44
9	278,58	27,54
10	288,59	32,44
11	297,96	34,89
12	293,83	34,14
13	305,71	29,42
14	298,58	31,83
15	308,10	30,02
16	278,57	30,82
17	318,03	34,19
18	308,54	33,75
19	274,40	32,02
20	309,36	30,02
21	312,46	35,23
22	293,49	28,10
23	311,06	31,20
24	313,98	33,64
25	304,53	39,87
26	326,61	33,04
Average	296,74	32,56
St.Dev.	15,08	3,30

Πίνακας 5.5 Γεωμετρικά χαρακτηριστικά ινιδίου μετά τον 3° κύκλο ακτινοβόλησης

4°ς κύκλος ακτινοβόλησης

Αμέσως μετά το τέλος του 3^{ου} κύκλου πειραμάτων, ξεκίνησε ο 4^{ος} και τελευταίος. Το δείγμα τοποθετήθηκε στο AFM και λήφθηκαν οι εικόνες 5.6(a,b,c,d,e). Επίσης στην εικόνα 5f παρουσιάζεται ένα αντιπροσωπευτικό υψομετρικό προφίλ όπου με πληθώρα τέτοιων προφίλ έγιναν οι μετρήσεις υψομετρικής διαφοράς και διαμέτρου.















Εικόνα 5.6 Τοπογραφικές εικόνες AFM, μετά από τον 4° κύκλο ακτινοβόλησης, με μεγεθύνσεις a) 20x20 μm, b) 10x10 μm, c) 2.00x2.00 μm, d)1.0x1.0 μm και e) 3D με μεγέθυνση 1.0x1.0 μm., στην ίδια τοποθεσία του δείγματος. Με την χρήση του WSxM 5.0 Develop 8.1 στην εικόνα f) παρουσιάζεται το υψομετρικό προφίλ του ινιδίου.(I. Horcas et al Rev. Sci. Instrum. 78, 013705 (2007))

Γεωμετρικός χαρακτηρισμός του ινιδίου της ελαστίνης μετά τον 4° κύκλο ακτινοβόλησης

Στον Πίνακα 5.6 παρουσιάζεται η μέση τιμή που μετρήθηκε για τη διάμετρο ήταν τα **369,19±14,10nm** και για την υψομετρική διαφορά **34,62±5,43nm**.

Μέτρηση	Διάμετρος	Ύψος
	(nm)	(nm)
1	384,84	39,23
2	350,21	27,02
3	380,18	28,84
4	359,96	34,31
5	377,86	30,63
6	351,37	43,28
7	392,29	27,72
8	342,82	40,37
9	385,70	30,00
10	363,00	37,98
11	385,26	32,24
12	376,65	32,28
13	386,86	32,20
14	385,64	41,55
15	366,42	27,75
16	357,66	35,66
17	371,65	42,67
18	372,38	32,77
19	351,66	40,56
20	351,99	31,15
21	378,45	43,17
22	361,43	32,97
23	359,83	36,88
24	356,97	41,15
25	360,99	29,96
26	386,97	27,77
Average	369,19	34,62
St.Dev	14,10	5,43

Πίνακας 5.6 Γεωμετρικά χαρακτηριστικά ινιδίου μετά τον 4° κύκλο ακτινοβόλησης

5.6.1 Αποτελέσματα 1ης κατηγορίας ακτινοβόλησης του δείγματος ελαστίνης- υπερκάθαρου νερού (1% w/v)

Στα παρακάτω σχήματα παρουσιάζεται η διακύμανση της διαμέτρου του ινιδίου της ελαστίνης κατά την 1^η κατηγορία ακτινοβόλησης και η μέση τιμή για κάθε κύκλο ακτινοβόλησης.





Σχήμα 5.1 Διάγραμμα διακύμανσης της διαμέτρου του ινιδίου της ελαστίνης κατά την 1^η κατηγορία ακτινοβόλησης

Σχήμα 5.2 Διάγραμμα μέσης τιμής της διαμέτρου του ινιδίου ελαστίνης για κάθε κύκλο ακτινοβόλησης

Παρατηρείται ότι για κάθε κύκλο ακτινοβόλησης, αυξάνεται η διάμετρος. Η μέγιστη αύξηση παρατηρείται κατά τον 4° κύκλο ακτινοβόλησης, όπου η διάμετρος κυμαίνεται στα 369 nm, ενώ πριν την ακτινοβόληση ήταν στα 244nm. Συνεπώς, παρουσιάζεται αύξηση της τάξης του

51% οπως παρουσιάζεται στον παρακάτω πίνακα ποσοστιαίων μεταβολών της διαμέτρου του ινιδίου.

Ακτινοβόληση	Μεταβολή
1η	7,69%
1η->2η	3,90%
2η->3η	8,45%
3η->4η	24,40%

Πίνακας 5.7 Ποσοστιαίες μεταβολές της διαμέτρου του ινιδίου της ελαστίνης.

Τα σχήματα που ακολουθούν παρουσιάζουν την υψομετρική διαφορά του ινιδίου για κάθε κύκλο ακτινοβόλησης της 1^{ης} κατηγορίας.



Σχήμα 5.3. Διάγραμμα διακύμανσης της υψομετρικής διαφοράς του ινιδίου της ελαστίνης κατά την 1^η κατηγορία ακτινοβόλησης



Σχήμα 5.4 Διάγραμμα μέσης τιμής της υψομετρικής διαφοράς του ινιδίου ελαστίνης για κάθε κύκλο ακτινοβόλησης

Από τη διακύμανση των μετρήσεων της μέσης τιμής για την υψομετρική διαφορά του ινιδίου κατά την ακτινοβόληση του, διαπιστώνεται ότι αρχικά υπάρχει μια μικρή αύξηση της τιμής της, για του ενδιάμεσους κύκλους ακτινοβόλησης (2°ς, 3°ς) η τιμή παρουσιάζει μικρές μεταβολές ενώ κατά τον 4° κύκλο ακτινοβολήσεων παρουσιάζεται η μέγιστη τιμή της, στα 34nm. Δίνεται πίνακας ποσοστιαίων μεταβολών για την υψομετρική διαφορά.

Πίνακας 5.8 Ποσοστιαίες μεταβολές της υψομετρικής διαφοράς του ινιδίου ελαστίνης.

Ακτινοβόληση	Μεταβολή
1η	5,12%
1η->2η	-0,01%
2η->3η	-0,01%
3η->4η	6,3%

5.7 Χαρακτηρισμός της τοπογραφίας μικροϊνιδίου (δείγματος ελαστίνηςυπερκάθαρου νερού (1% w/v)) με μικροσκοπία ατομικής δύναμης

Σε ένα άλλο δείγμα, βρέθηκε και μελετήθηκε μικροϊνίδιο ελαστίνης, όπως φαίνεται και στις εικόνες που ακολουθούν.



a)



b)



c)



d)

Εικόνα 5.7 Τοπογραφικές εικόνες AFM με μεγεθύνσεις a) 5.00x5.00 μm, b) 2.00x2.00 μm, c)1.0x1.0 μm και d) 3D με μεγέθυνση 1.0x1.0 μm., στην ίδια τοποθεσία του δείγματος..(I. Horcas et al Rev. Sci. Instrum. 78, 013705 (2007))

Γεωμετρικός χαρακτηρισμός του μικροϊνιδίου ελαστίνης

Η μέση τιμή της διαμέτρου ήταν **127,11±6,13nm** και η υψομετρική διαφορά **3,77±0,27nm**. Από αυτές τις τιμές διαπιστώθηκε ότι η υπό μελέτη δομή κατατάσσεται ως μικροϊνίδιο. Όλες οι μετρήσεις καταγράφονται στον παρακάτω πίνακα.

Μέτρηση	Διάμετρος (nm)	Ύψος (nm)
1	141,92	3,96
2	127,70	3,81
3	118,27	3,66
4	125,67	4,10
5	128,11	4,03
6	123,07	3,66
7	122,28	3,40
8	121,99	3,48
9	139,43	3,38
10	127,08	3,55
11	123,42	3,57
12	127,06	4,04
13	125,87	4,05
14	132,40	3,68
15	136,28	4,07
16	130,08	3,72
17	113,92	4,44
18	126,98	3,60
19	131,23	3,77
20	125,64	4,06
21	121,04	3,57
22	129,02	3,77
23	126,69	3,79
24	123,78	3,79
25	128,84	3,38
AVG	127,11	3,77
St.Dev.	6,13	0,27

Πίνακας 5.9 Γεωμετρικά χαρακτηριστικά μικροϊνιδίου

1°ς κύκλος ακτινοβόλησης :

Οι παρακάτω εικόνες λήφθηκαν αμέσως μετά την ακτινοβόληση του μικροϊνιδίου.





b)



c)

Εικόνα 5.8 Τοπογραφικές εικόνες AFM με μεγεθύνσεις a) 2.00x2.00 μm, b)1.0x1.0 μm και d) 3D με μεγέθυνση 2.0x2.0 μm., στην ίδια τοποθεσία του δείγματος..(I. Horcas et al Rev. Sci. Instrum. 78, 013705 (2007))

Γεωμετρικός χαρακτηρισμός του μικροϊνιδίου ελαστίνης μετά τον 1° κύκλο ακτινοβόλησης

Οι μέσες τιμές του μικροϊνιδίου ελαστίνης, μετά τον 1° κύκλο ακτινοβόλησης, για τη διάμετρο και για την υψομετρική διαφορά ήταν **155,56±16,57nm** και **2,67±0,38nm** Οι διακυμάνσεις της διαμέτρου και της υψομετρικής διαφοράς καταγράφονται στον παρακάτω πίνακα.

Μέτρηση	Διάμετρος	Ύψος
	(nm)	(nm)
1	149,77	2,64
2	145,74	3,25
3	147,49	2,52
4	149,33	2,57
5	145,63	2,19
6	138,21	2,44
7	149,99	2,15
8	137,79	2,32
9	140,21	2,27
10	143,09	2,38
11	146,79	2,25
12	146,02	2,35
13	166,75	2,61
14	149,66	2,46
15	158,73	2,65
16	141,18	2,55
17	142,38	2,63
18	146,25	2,93
19	162,72	2,74
20	170,49	3,07
21	161,38	3,03
22	182,15	2,59
23	187,02	3,34
24	193,79	3,57
25	186,38	3,14
AVG	155,56	2,67
St.Dev.	16,57	0,38

Πίνακας 5.10 Γεωμετρικά χαρακτηριστικά μικροϊνιδίου μετά τον 1° κύκλο ακτινοβόλησης

2°ς κύκλος ακτινοβόλησης :

Ακολουθούν οι εικόνες που λήφθηκαν αμέσως μετά την 2^η ακτινοβόληση του μικροϊνιδίου.







b)



Εικόνα 5.9 Τοπογραφικές εικόνες AFM με μεγεθύνσεις a) 2.00x2.00 μm, b)1.0x1.0 μm και d) 3D με μεγέθυνση 1.0x1.0 μm., στην ίδια τοποθεσία του δείγματος..(I. Horcas et al Rev. Sci. Instrum. 78, 013705 (2007))

Γεωμετρικός χαρακτηρισμός του μικροϊνιδίου ελαστίνης μετά τον 2° κύκλο ακτινοβόλησης

Η μέση τιμή της διαμέτρου ήταν **166,69±18,41nm** και της υψομετρικής διαφοράς **2,40±0,25**. Όλες οι τιμές καταγράφονται στον παρακάτω πίνακα.

Μέτρηση	Διάμετρος	Ύψος
	(nm)	(nm)
1	178,05	3,06
2	167,48	2,81
3	145,15	2,73
4	163,59	2,54
5	146,81	2,25
6	144,73	2,41
7	136,96	2,20
8	139,43	2,27
9	148,53	2,35
10	155,06	2,01
11	144,25	2,14
12	157,48	2,31
13	154,05	2,50
14	158,93	2,27
15	174,70	2,52
16	180,85	2,19
17	185,06	2,08
18	196,70	2,38
19	185,52	2,71
20	175,56	2,38
21	184,07	2,59
22	187,10	2,16
23	185,76	2,23
24	184,61	2,53
25	186,93	2,35
AVG	166,69	2,40
St.Dev.	18,41	0,25

Πίνακας 5.11 Γεωμετρικά χαρακτηριστικά ινιδίου μετά τον 2° κύκλο ακτινοβόλησης

3°ς κύκλος ακτινοβόλησης :

Ακολουθούν οι εικόνες που λήφθηκαν αμέσως μετά την 3^η ακτινοβόληση του μικροϊνιδίου.







Εικόνα 5.10 Τοπογραφικές εικόνες AFM με μεγεθύνσεις a) 2.00x2.00 μm, b)1.0x1.0 μm και d) 3D με μεγέθυνση 1.0x1.0 μm., στην ίδια τοποθεσία του δείγματος..(I. Horcas et al Rev. Sci. Instrum. 78, 013705 (2007))
Γεωμετρικός χαρακτηρισμός του μικροϊνιδίου ελαστίνης μετά τον 3° κύκλο ακτινοβόλησης

Η μέση τιμή της διαμέτρου ήταν **178,99±18,94nm** και της υψομετρικής διαφοράς **2,32±0,29**. Όλες οι τιμές καταγράφονται στον παρακάτω πίνακα.

Μέτρηση	Διάμετρος	Υψος
	(nm)	(nm)
1	158,16	1,77
2	161,59	1,94
3	162,45	2,25
4	150,71	2,01
5	150,48	2,29
6	158,75	2,42
7	153,16	2,20
8	165,52	2,40
9	157,02	2,27
10	180,18	2,58
11	165,92	2,17
12	184,73	2,30
13	180,86	2,26
14	193,83	2,75
15	193,12	2,28
16	181,40	2,93
17	190,63	2,18
18	193,52	2,13
19	193,04	2,16
20	207,44	2,31
21	184,37	2,72
22	198,54	2,75
23	210,54	2,38
24	196,71	2,71
25	202,17	1,87
AVG	178,99	2,32
St.Dev.	18,94	0,29

Πίνακας 5.12 Γεωμετρικά χαρακτηριστικά ινιδίου μετά τον 3° κύκλο ακτινοβόλησης

4^{ος} κύκλος ακτινοβόλησης :

Ακολουθούν οι εικόνες που λήφθηκαν αμέσως μετά την 4^η ακτινοβόληση του μικροϊνιδίου.





b)



c)

Εικόνα 5.11 Τοπογραφικές εικόνες AFM με μεγεθύνσεις a) 2.00x2.00 μm, b)1.0x1.0 μm και d) 3D με μεγέθυνση 1.0x1.0 μm., στην ίδια τοποθεσία του δείγματος..(I. Horcas et al Rev. Sci. Instrum. 78, 013705 (2007))

Γεωμετρικός χαρακτηρισμός του μικροϊνιδίου ελαστίνης μετά τον 4° κύκλο ακτινοβόλησης

Η μέση τιμή της διαμέτρου ήταν **182,76±17,48nm** και της υψομετρικής διαφοράς **2,45±0,25**. Όλες οι τιμές καταγράφονται στον παρακάτω πίνακα.

Μέτρηση	Διάμετρος	Ύψος
	(nm)	(nm)
1	170,93	2,02
2	164,73	1,99
3	190,55	2,33
4	159,20	2,42
5	160,72	2,56
6	152,29	2,33
7	161,26	2,09
8	168,32	2,03
9	178,06	2,73
10	172,07	2,90
11	167,59	2,81
12	177,61	2,75
13	175,62	2,61
14	185,78	2,59
15	191,14	2,46
16	190,36	2,59
17	199,83	2,40
18	190,09	2,51
19	192,23	2,54
20	188,26	2,08
21	193,96	2,34
22	206,98	2,68
23	204,40	2,56
24	208,94	2,43
25	218,21	2,62
AVG	182,76	2,45
St.Dev.	17,48	0,25

Πίνακας 5.13 Γεωμετρικά χαρακτηριστικά ινιδίου μετά τον 4° κύκλο ακτινοβόλησης

5.7.1 Αποτελέσματα $1^{\eta\varsigma}$ κατηγορίας ακτινοβόλησης μικροϊνιδίου, του δείγματος ελαστίνης- υπερκάθαρου νερού (1% w/v)

Στα παρακάτω σχήματα παρουσιάζεται η διακύμανση της διαμέτρου του μικροϊνιδίου ελαστίνης κατά την 1^η κατηγορία ακτινοβόλησης και η μέση τιμή για κάθε κύκλο ακτινοβόλησης.





Σχήμα 5.5 Διάγραμμα διακύμανσης της διαμέτρου του μικροϊνιδίου της ελαστίνης κατά την 1^η κατηγορία ακτινοβόλησης

Σχήμα 5.6 Διάγραμμα μέσης τιμής της διαμέτρου του μικροϊνιδίου ελαστίνης για κάθε κόκλο ακτινοβόλησης Με βάση τα παραπάνω σχήματα, η διάμετρος του μικροϊνιδίου ελαστίνης, αυξάνεται με κάθε κύκλο ακτινοβόλησης και παρουσιάζει τη μέγιστη τιμή στον 4° κύκλο ακτινοβόλησης, στα 183nm ενώ η διάμετρος πριν την ακτινοβόληση ήταν στα 127nm. Οι ποσοστιαίες μεταβολές για κάθε κύκλο ακτινοβόλησης, παρουσιάζονται στον παρακάτω πίνακα.

Ακτινοβόληση	Μεταβολή
1η	22,30%
1η->2η	7,10%
2η->3η	7,30%
3η->4η	2,10%

Πίνακας 5.14. Ποσοστιαίες μεταβολές της διαμέτρου του μικροϊνιδίου ελαστίνης.

Όσον αφορά την επίδραση των κύκλων ακτινοβόλησης στην υψομετρική διαφοράς του μικροινιδίου, δίνονται τα παρακάτω σχήματα.



Σχήμα 5.7 Διάγραμμα διακύμανσης της υψομετρικής διαφοράς του μικροϊνιδίου ελαστίνης κατά την 1^η κατηγορία ακτινοβόλησης





Κατά τον πρώτο κύκλο ακτινοβόλησης σημειώνεται η μεγαλύτερη ποσοστιαία μείωση του ύψους του μικροϊνιδίου, αφού υπήρξε μείωση κατά 29%. Όλες οι ποσοστιαίες μεταβολές καταγράφονται στον πίνακα που ακολουθεί.

Ακτινοβόληση	Μεταβολή
1η	-29,10%
1η->2η	-10,10%
2η->3η	3,33%
3η->4η	5,60%

Πίνακας 5.15 Ποσοστιαίες μεταβολές της υψομετρικής διαφοράς του ινιδίου ελαστίνης.

5.8 Χαρακτηρισμός της τοπογραφίας του δείγματος ελαστίνης- υπερκάθαρου νερού (1% w/v) με μικροσκοπία ατομικής δύναμης – Δεύτερη κατηγορία ακτινοβόλησης

Για τη μελέτη της δεύτερης κατηγορίας του πρωτοκόλλου, χρησιμοποιήθηκε ένα άλλο δείγμα όπου βρέθηκε πάλι ινίδιο ελαστίνης (πίνακας 5.16). Χρειάστηκε να βρεθεί ινίδιο με παρόμοιο μέγεθος για να είναι αξιόπιστα και συγκρίσιμα τα αποτελέσματα των κατηγοριών ακτινοβόλησης. Οι παρακάτω εικόνες (5.12a, b, c) μεγέθυνσης 5x5 μm έως 1.0 μm παρουσιάζουν την ίδια περιοχή και είναι οι πιο αντιπροσωπευτικές από το σύνολο των εικόνων που λήφθηκαν.





a)

b)





c)

d)

Εικόνα 5.12 Τοπογραφικές εικόνες AFM, με μεγεθύνσεις a) 5x5 μm, b) 2.00x2.00 μm, c)1.0x1.0 μm και d) 3D με μεγέθυνση 1.0x1.0 μm., στην ίδια τοποθεσία του δείγματος. I. Horcas et al Rev. Sci. Instrum. 78, 013705 (2007))

Γεωμετρικός χαρακτηρισμός του ινιδίου της ελαστίνης

Στον Πίνακα 5.16 παρουσιάζονται οι μετρήσεις των γεωμετρικών χαρακτηριστικών του ινιδίου. Η μέση τιμή που μετρήθηκε για τη διάμετρο ήταν τα **217,03±14,28nm** και για την υψομετρική διαφορά **24,35±2,59nm**. Αποτέλεσμα που δείχνει ότι η δομή που μελετήθηκε αφορούσε ινίδιο ελαστίνης.

Μέτρηση	Διάμετρος (nm)	Ύψος (nm)
1	218,80	20,53
2	210,52	20,82
3	205,58	25,62
4	210,13	25,68
5	200,73	23,29
6	214,15	24,85
7	237,44	27,84
8	195,20	22,44
9	238,67	27,94
10	215,68	25,73
11	220,59	24,54
12	201,52	24,60
13	220,96	22,39
14	200,02	22,02
15	243,59	24,82
16	237,63	30,60
17	207,11	23,04
18	203,56	22,87
19	218,14	24,00
20	230,55	23,98
21	198,25	21,12
22	228,44	19,74
23	216,72	22,23
24	214,44	28,28
25	207,27	23,47
26	214,67	25,02
27	205,37	23,96
28	238,33	26,33
29	239,83	28,27
Average	217,03	24,35
St.Dev.	14,28	2,59

Πίνακας 5.16 Γεωμετρικά χαρακτηριστικά ινιδίου

1°ς κύκλος ακτινοβόλησης :

Μετά την πρώτη ακτινοβόληση το δείγμα τοποθετήθηκε στο AFM για την μελέτη της τοπογραφίας του δείγματος. Με τη βοήθεια του πλέγματος βαθμονόμησης, ήταν εφικτή η χαρτογράφηση της τοπογραφίας του δείγματος με σκοπό την ανεύρεση του ίδιου ινιδίου.









c)

d)

Εικόνα 5.13 Τοπογραφικές εικόνες AFM, μετά τον 1° κύκλο ακτινοβόλησης με μεγεθύνσεις a) 5x5 μm, b) 2.00x2.00 μm, c)1.0x1.0 μm και d) 3D με μεγέθυνση 1.0x1.0 μm., στην ίδια τοποθεσία του δείγματος. I. Horcas et al Rev. Sci. Instrum. 78, 013705 (2007))

Γεωμετρικός χαρακτηρισμός του ινιδίου ελαστίνης μετά τον 1° κύκλο ακτινοβόλησης

Η μέση τιμή που μετρήθηκε, μετά τον 1° κύκλο ακτινοβόλησης, για τη διάμετρο ήταν τα **265,25±11,72nm** και για την υψομετρική διαφορά **27,29±3,51nm**, οι μετρήσεις δίνονται στον παρακάτω πίνακα.

Μέτρηση	Διάμετρος	Ύψος
	(nm)	(nm)
1	245,61	24,72
2	246,52	23,33
3	272,07	26,29
4	270,95	26,18
5	277,47	31,80
6	278,32	32,41
7	246,47	26,99
8	247,85	22,46
9	272,93	25,27
10	279,38	25,07
11	263,08	30,32
12	270,45	31,34
13	243,90	37,01
14	257,61	25,53
15	272,65	25,41
16	272,50	23,68
17	264,40	23,29
18	277,27	28,39
19	271,42	26,79
20	274,13	29,25
21	256,69	26,37
22	275,79	29,24
23	280,72	25,48
24	270,72	31,82
25	267,67	25,37
26	252,23	24,53
27	264,38	25,72
28	249,85	24,54
29	269,19	32,92
Average	265,25	27,29
St.Dev.	11,72	3,51

Πίνακας 5.17 Γεωμετρικά χαρακτηριστικά ινιδίου μετά τον 1°	κύκλο ακτινοβόλησης
anno 3 h Volt anno 11 h h	

2°ς κύκλος ακτινοβόλησης

Μετά τη λήψη των εικόνων του 1^{ου} κύκλου, ακολούθησε η ακτινοβόληση του 2^{ου} κύκλου και η λήψη των εικόνων του ινιδίου παρουσιάζονται παρακάτω.



c)

d)

Εικόνα 5.14 Τοπογραφικές εικόνες AFM, μετα τον 2° κύκλο ακτινοβόλησης με μεγεθύνσεις a) 5x5 μm, b) 2.00x2.00 μm, c)1.0x1.0 μm και d) 3D με μεγέθυνση 1.0x1.0 μm., στην ίδια τοποθεσία του δείγματος. I. Horcas et al Rev. Sci. Instrum. 78, 013705 (2007))

Γεωμετρικός χαρακτηρισμός του ινιδίου ελαστίνης μετά τον 2° κύκλο ακτινοβόλησης

Ακολουθούν οι μετρήσεις της υψομετρικής διακύμανσης του ινιδίου της ελαστίνης μετα από τον 2° κύκλο ακτινοβόλησης. Όπως παρουσιάζεται στον πίνακα 5.18, η μέση τιμή που μετρήθηκε για τη διάμετρο ήταν τα 264,27±13,51nm και για την υψομετρική διαφορά 24,83±2,21nm

Μέτρηση	Διάμετρος	Ύψος
	(nm)	(nm)
1	250,10	25,21
2	252,52	24,44
3	285,04	26,83
4	271,63	24,43
5	272,96	25,06
6	253,28	23,19
7	259,53	25,80
8	288,31	24,33
9	284,13	24,74
10	265,99	28,44
11	247,55	27,33
12	261,79	24,32
13	261,26	21,14
14	266,54	23,42
15	267,71	24,92
16	282,45	25,85
17	277,63	22,99
18	246,42	22,53
19	276,78	27,64
20	245,75	21,55
21	279,59	21,86
22	270,18	20,57
23	269,72	26,36
24	270,38	23,01
25	246,41	26,98
26	243,33	25,74
27	246,55	25,76
28	257,58	29,85
29	262,65	25,75
Average	264,27	24,83
St.Dev.	13,51	2,21

Πίνακας 5.18 Γεωμετρικά χαρακτηριστικά ινιδίου μετά τον 2° κύκλο ακτινοβόλησης

3°ς κύκλος ακτινοβόλησης

Μετά τη λήψη των εικόνων του 2^{ου} κύκλου, άμεσα, ακολούθησε η ακτινοβόληση του 3^{ου} κύκλου και η λήψη των εικόνων του ίδιου ινιδίου ελαστίνης όπως περιεγράφηκε προηγουμένως. Το δείγμα τοποθετήθηκε στο AFM και λήφθηκαν οι εικόνες 5.15 (a,b,c,d).





a)

b)



c)





Εικόνα 5.15 Τοπογραφικές εικόνες AFM, μετά τον 2° κύκλο ακτινοβόλησης με μεγεθύνσεις a) 5x5 μm, b) 2.00x2.00 μm, c)1.0x1.0 μm και d) 3D με μεγέθυνση 1.0x1.0 μm., στην ίδια τοποθεσία του δείγματος. I. Horcas et al Rev. Sci. Instrum. 78, 013705 (2007))

5.8.1 Αποτελέσματα $2^{\eta\varsigma}$ κατηγορίας ακτινοβόλησης του δείγματος ελαστίνης- υπερκάθαρου νερού (1% w/v)

Στα σχήματα που ακολουθούν, παρουσιάζεται η διακύμανση της διαμέτρου του ινιδίου της ελαστίνης κατά την 2^η κατηγορία ακτινοβόλησης και η μέση τιμή της για κάθε κύκλο ακτινοβόλησης.



Σχήμα 5.9. Διάγραμμα διακύμανσης της διαμέτρου του ινιδίου της ελαστίνης κατά την $2^{\eta\eta}$ κατηγορία ακτινοβόλησης



Σχήμα 5.10 Διάγραμμα μέσης τιμής της διαμέτρου του ινιδίου της ελαστίνης για κάθε κύκλο ακτινοβόλησης

Από τα παραπάνω διαγράμματα παρατηρείται η μεγάλη αύξηση της διαμέτρου του ινιδίου κατά 22%, όπου από την αρχική διάμετρο των 217nm μετά τον 1° κύκλο ακτινοβόλησης η διάμετρος φτάνει τα 265 nm. Για τους επόμενους κύκλους ακτινοβόλησης η τιμή παραμένει σχεδόν σταθερή.

Ακτινοβόληση	Μεταβολή
1η	22,20%
1η->2η	-0,30%
2η->3η	0,8%

Πίνακας 5.19 Ποσοστιαίες μεταβολές της διαμέτρου του ινιδίου της ελαστίνης.

Τα σχήματα που ακολουθούν παρουσιάζουν την υψομετρική διαφορά του ινιδίου για κάθε κύκλο ακτινοβόλησης της 2^{ης} κατηγορίας.



Σχήμα 5.11 Διάγραμμα διακύμανσης της υψομετρικής δοαφοράς του ινιδίου της ελαστίνης κατά την 1^η κατηγορία ακτινοβόλησης



Σχήμα 5.12 Διάγραμμα μέσης τιμής της υψομετρικής διαφοράς του ινιδίου ελαστίνης για κάθε κύκλο ακτινοβόλησης

Το ύψος αυξάνεται κατά τον πρώτο κύκλο ακτινοβόλησης, μειώνεται κατά τον 2° και παραμένει, σχεδόν σταθερό μετά την τελική ακτινοβόληση, όπως φαίνεται και στον πίνακα με τις ποσοστιαίες μεταβολές που ακολουθεί.

Ακτινοβόληση	Μεταβολή
1η	11,2%
1η->2η	-9,01%

2η->3η

Πίνακας 5.20 Ποσοστιαίες μεταβολές της διαμέτρου του ινιδίου της ελαστίνης.

1,4%

5.9 Χαρακτηρισμός της τοπογραφίας του δείγματος ελαστίνης- υπερκάθαρου νερού (1% w/v) με μικροσκοπία ατομικής δύναμης –Τρίτη κατηγορία ακτινοβόλησης

Πραγματοποιήθηκαν περαιτέρω πειράματα, με βάση το πρωτόκολλο της τρίτης κατηγορίας, όπου μελετήθηκε η επίδραση της ερυθρής ακτινοβολίας χαμηλής ισχύος για μεγάλα χρονικά διαστήματα συνεχούς ακτινοβόλησης. Όπως και στη δεύτερη κατηγορία και εδώ χρησιμοποιήθηκε δείγμα στο οποίο παρατηρήθηκε ινίδιο ελαστίνης με γεωμετρικά χαρακτηριστικά παραπλήσια των ινιδίων που μελετήθηκαν στις προηγούμενες κατηγορίες. Στις παρακάτω εικόνες παρουσιάζεται το ινίδιο που μελετήθηκε γι' αυτή την κατηγορία.





a)





c)

d)

Εικόνα 5.16 Τοπογραφικές εικόνες AFM, με μεγεθύνσεις a) 10x10 μm, b) 2.00x2.00 μm, c)1.0x1.0 μm και d) 3D με μεγέθυνση 1.0x1.0 μm., στην ίδια τοποθεσία του δείγματος. I. Horcas et al Rev. Sci. Instrum. 78, 013705 (2007))

Γεωμετρικός χαρακτηρισμός του ινιδίου της ελαστίνης

Οι μετρήσεις των γεωμετρικών χαρακτηριστικών για το ινίδιο της ελαστίνης, παρουσιάζονται στον παρακάτω Πίνακα. Η μέση τιμή που μετρήθηκε για τη διάμετρο ήταν τα 230,70±16,59nm και για την υψομετρική διαφορά 32,60±2,32nm. Αποτέλεσμα που δείχνει ότι η δομή που μελετήθηκε αφορούσε ινίδιο ελαστίνης.

Μέτρηση	Διάμετρος	Ύψος
	(nm)	(nm)
1	219,74	31,74
2	205,47	29,58
3	204,42	30,05
4	205,91	31,05
5	205,07	29,26
6	206,39	34,65
7	208,90	32,81
8	240,84	33,11
9	219,21	34,41
10	244,75	32,73
11	221,46	31,05
12	243,74	31,46
13	228,47	30,95
14	234,26	33,82
15	234,74	37,96
16	241,72	36,11
17	250,89	34,49
18	220,87	34,75
19	227,74	31,04
20	216,81	31,04
21	239,05	31,20
22	247,89	29,92
23	248,15	34,59
24	231,06	30,39
25	247,94	35,28
26	249,23	33,05
27	246,16	30,01
28	256,53	36,90
29	243,00	31,97
Average	230,70	32,60
St.Dev.	16,59	2,32

Πίνακας 5.21 Γεωμετρικά χαρακτηριστικά ινιδίου

1°ς κύκλος ακτινοβόλησης :

Μετά την ακτινοβόληση, το δείγμα τοποθετήθηκε στο AFM και μέσω του πλέγματος βαθμονόμησης βρέθηκε το ίδιο ινίδιο (η διαδικασία είναι ίδια και στις επόμενες ακτινοβολήσεις), και παρουσιάζεται στις παρακάτω εικόνες.





a)





c)

Εικόνα 5.17 Τοπογραφικές εικόνες AFM, μετά τον 1° κύκλο ακτινοβόλησης με μεγεθύνσεις a) 5x5 μm, b) 2.00x2.00 μm, c)3D με μεγέθυνση 1.0x1.0 μm. I. Horcas et al Rev. Sci. Instrum. 78, 013705 (2007))

Γεωμετρικός χαρακτηρισμός του ινιδίου ελαστίνης μετά τον 1° κύκλο ακτινοβόλησης

Η μέση τιμή που μετρήθηκε, μετά τον 1° κύκλο ακτινοβόλησης, για τη διάμετρο ήταν τα **270,79±15,69nm** και για την υψομετρική διαφορά **26,76±3,32nm**, οι μετρήσεις δίνονται στον παρακάτω πίνακα.

Μέτρηση	Διάμετρος	Υψος
	(nm)	(nm)
1	281,67	24,83
2	279,75	23,98
3	271,92	20,24
4	295,11	24,10
5	260,13	24,27
6	280,69	26,34
7	278,10	23,55
8	277,17	22,77
9	282,39	22,52
10	294,17	24,14
11	295,58	26,48
12	257,19	26,94
13	240,18	26,38
14	264,03	26,63
15	242,01	31,69
16	274,79	27,39
17	261,93	30,51
18	266,29	36,55
19	272,22	29,27
20	250,43	26,98
21	249,82	26,15
22	259,14	25,66
23	261,90	29,27
24	258,13	30,16
25	292,05	25,60
26	291,44	25,82
27	284,53	27,33
28	268,43	29,03
29	261,76	31,42
Average	270,79	26,76
St.Dev.	15,69	3,32

Πίνακας 5.22 Γεωμετρικά χαρακτηριστι	κά ινιδίου μετά τον 1 °	' κύκλο ακτινοβόλησης
--------------------------------------	--------------------------------	-----------------------

2°ς κύκλος ακτινοβόλησης

Μετά τη λήψη των εικόνων του $1^{\rm ou}$ κύκλου, ακολούθησε η ακτινοβόληση του $2^{\rm ou}$ κύκλου και η λήψη των εικόνων του ινιδίου παρουσιάζονται παρακάτω





a)

b)



c)

Εικόνα 5.18 Τοπογραφικές εικόνες AFM, μετα τον 1° κύκλο ακτινοβόλησης με μεγεθύνσεις a) 5x5 μm, b) 2.00x2.00 μm, c)3D με μεγέθυνση 1.0x1.0 μm. I. Horcas et al Rev. Sci. Instrum. 78, 013705 (2007))

Γεωμετρικός χαρακτηρισμός του ινιδίου ελαστίνης μετά το 2° κύκλο ακτινοβόλησης

Η διακύμανση της υψομετρικής διαφοράς και της διαμέτρου, του ινιδίου της ελαστίνης μετά το 2° κύκλο ακτινοβόλησης, παρουσιάζεται στον πίνακα 5.23. Η μέση τιμή που μετρήθηκε για τη διάμετρο ήταν τα **263,60±19,18**nm και για την υψομετρική διαφορά **23,64±2,74nm**

Μέτρηση	Διάμετρος	Ύψος
	(nm)	(nm)
1	295,51	17,39
2	256,15	22,39
3	293,55	22,43
4	272,08	26,36
5	266,86	24,84
6	293,52	22,12
7	289,91	22,64
8	273,86	19,96
9	274,44	22,84
10	246,78	21,07
11	235,19	21,00
12	261,35	23,90
13	235,87	29,89
14	271,46	26,91
15	234,96	22,35
16	264,40	22,63
17	253,68	25,95
18	241,19	22,72
19	274,21	23,33
20	286,09	22,11
21	260,71	22,32
22	278,64	20,85
23	259,51	28,41
24	248,16	23,90
25	231,33	25,95
26	239,44	24,86
27	279,03	23,20
28	271,12	24,43
29	255,50	28,91
Average	263,60	23,64
St.Dev.	19,18	2,74

Πίνακας 5.23 Γεωμετρικά χαρακτηριστικά ινιδίου μετά τον 2° κύκλο ακτινοβόλησης

3°ς κύκλος ακτινοβόλησης:

Ακολουθούν οι εικόνες μετά τον τρίτο και τελευταίο κύκλο ακτινοβόλησης.











c)

Εικόνα 5.19 Τοπογραφικές εικόνες AFM, μετά τον 1° κύκλο ακτινοβόλησης με μεγεθύνσεις a) 5x5 μm, b) 2.00x2.00 μm, c)3D με μεγέθυνση 1.0x1.0 μm. I. Horcas et al Rev. Sci. Instrum. 78, 013705 (2007))

5.9.1 Αποτελέσματα 3^{ης} κατηγορίας ακτινοβόλησης του δείγματος ελαστίνης- υπερκάθαρου νερού (1% w/v)

Στα σχήματα που ακολουθούν, παρουσιάζεται η διακύμανση της υψομετρικής διαφοράς και της διαμέτρου καθώς και οι μέσες τιμές αυτών για την 3^η κατηγορία ακτινοβόλησης.



Σχήμα 5.13 $Διάγραμμα διακύμανσης της διαμέτρου του ινιδίου της ελαστίνης κατά τη <math>3^{\eta}$ κατηγορία ακτινοβόλησης



Σχήμα 5.14 Διάγραμμα μέσης τιμής της διαμέτρου του ινιδίου της ελαστίνης για κάθε κύκλο ακτινοβόλησης

Κατά τον κύκλο ακτινοβόλησης υπάρχει αύξηση της τάξης του 17%, αφού από 230nm η διάμετρος αυξάνεται στα 270nm. Ακολουθεί μια μικρή μείωση, αφού η διάμετρος μειώνεται στα 264nm. Τέλος, στον τελευταίο κύκλο ακτινοβόλησης η διάμετρος παρουσιάζει την

μεγαλύτερη τιμή της στα 290nm. Οι ποσοστιαίες μεταβολές της διαμέτρους παρουσιάζονται στον παρακάτω πίνακα.

Ακτινοβόληση	Μεταβολή
1η	17,30%
1η->2η	-2,65%
2η->3η	10,00%

Πίνακας 5.24 Ποσοστιαίες μεταβολές της διαμέτρου του ινιδίου της ελαστίνης.

Τα σχήματα που ακολουθούν παρουσιάζουν την υψομετρική διαφορά του ινιδίου για κάθε κύκλο ακτινοβόλησης της 3^{ης} κατηγορίας.



Σχήμα 5.15 Διάγραμμα διακύμανσης της υψομετρικής δοαφοράς του ινιδίου της ελαστίνης κατά την 1^η κατηγορία ακτινοβόλησης



Σχήμα 5.16 Διάγραμμα μέσης τιμής της υψομετρικής διαφοράς του ινιδίου ελαστίνης για κάθε κύκλο ακτινοβόλησης Όσον αφορά την υψομετρική διαφορά κατά την 3^η κατηγορία ακτινοβόλησης, η τιμή της μειώνεται σταδιακά μέχρι τον 2° κύκλο ακτινοβόλησης και αυξάνεται κατά ένα μικρό ποσοστό στον 3° κύκλο ακτινοβόλησης, οι διακυμάνσεις αυτές παρουσιάζονται στον παρακάτω πίνακα ποσοστιαίων μεταβολών.

Ακτινοβόληση	Μεταβολή
1η	-17,90%
1η->2η	-11,60%
2η->3η	7,40%

Πίνακας 5.25 Ποσοστιαίες μεταβολές της διαμέτρου του ινιδίου της ελαστίνης.

5.10 Χαρακτηρισμός της τοπογραφίας του διαλύματος ελαστίνης (1% w/v) σε PBS με μικροσκοπία ατομικής δύναμης

Μελετήθηκαν πολλαπλά σημεία του δείγματος και λήφθηκε μεγάλος αριθμός εικόνων για τη μελέτη της αυτοργάνωσης της ελαστίνης και το σχηματισμό μικροϊνιδίων, ινιδίων και ινών. Όπως παρουσιάζεται και στις παρακάτω εικόνες, οι δομές της ελαστίνης στο διαλύτη PBS αφορούσε τη δημιουργία μεγάλου αριθμού συσσωμάτων σε όλη την επιφάνεια του δείγματος.



a)



b)

Εικόνα 5.20 Τοπογραφικές εικόνες AFM με μεγεθύνσεις a) 20.0x20.0 μm, b)10.0x10.0 μm.

5.11 Χαρακτηρισμός της τοπογραφίας του διαλύματος ελαστίνης (1% w/v) σε TBS με μικροσκοπία ατομικής δύναμης

Πραγματοποιήθηκε μεγάλος αριθμός πειραμάτων. Παρακάτω παρατίθενται οι πιο αντιπροσωπευτικές εικόνες που λήφθηκαν.



a)



b)

Εικόνα 5.21. Τοπογραφικές εικόνες AFM με μεγεθύνσεις a) $40.0x40.0 \mu m$, b) $20.0x20.0 \mu m$.

Όπως και στα πειράματα με το διαλύτη PBS, έτσι και με το διαλύτη TBS, η ελαστίνη οργανώθηκε σε συσσωματώματα, σε όλα τα πειράματα που μελετήθηκαν.

5.12 In vitro μελέτη Κολλαγόνο – Ελαστίνη

Μέρος αυτής της εργασίας ήταν και η ταυτόχρονη σύνθεση και απεικόνιση in vitro, ελαστίνηςκολλαγόνου.

5.12.1 Παρασκευή stock διαλύματος κολλαγόνου

Κολλαγόνο Τύπου Ι από αχίλλειο τένοντα βοδινού (Fluka 27662) διαλύθηκε σε οξικό οξύ (C= 0,5M) στην επιθυμητή συγκέντρωση 10 mg/ml και αποθηκεύτηκε στους 4° C για 24 ώρες. Έπειτα πραγματοποιήθηκε ομογενοποίηση στις 2400 rpm (Homogenizer IKAT18 Basic). Το διάλυμα αποθηκεύτηκε και πάλι στους 4°C.

5.12.2 Παρασκευή stock διαλύματος ελαστίνης- κολλαγόνου

Χρησιμοποιήθηκε ελαστίνη που αναφέρθηκε στα προηγούμενα πειράματα, σε συγκέντρωση 10mg/ml. Τα 2 αυτά διαλύματα αναμίχθηκαν και προέκυψε διάλυμα, ελαστίνης-κολλαγόνου, αναλογίας 1:1, αναλογία σύμφωνη και με τη βιβλιογραφία [49].Αποθηκεύτηκε για 14 μέρες, ώστε να είναι εφικτή η παρατήρηση της αυτοργάνωσης των ινών στη νανοκλίμακα.

5.12.3 Προετοιμασία δείγματος

Για την παρασκευή του δείγματος τοποθετήθηκαν, με τη χρήση πιπέτας, 10-20 μl διαλύματος ελαστίνης-κολλαγόνου (1:1), πάνω σε επίπεδο υπόστρωμα για φυγοκεντρική επίστρωση 40 δευτερολέπτων στις 1000-6000 rpm (WS-400B-6NPP/LITE Laurel Tecnologiew spin coater). Το δείγμα τοποθετήθηκε σε συνθήκες περιβάλλοντος (σε θερμοκρασία 25-27 °C και υγρασία 45%) για την αποξήρανση του. Ακολούθησε απεικόνιση με AFM.

5.12.4 Χαρακτηρισμός της τοπογραφίας του δείγματος ελαστίνηςκολλαγόνου (1:1) με μικροσκοπία ατομικής δύναμης

Η απεικόνιση της τοπογραφίας του δείγματος πραγματοποιήθηκε με το AFM CPII, Veeco, όπως περιγράφεται στην παράγραφο 5.3, σε λειτουργία επαφής (contact mode) στον αέρα σε θερμοκρασία 25-27 °C και 45 % υγρασία.

Μελετήθηκαν πολλαπλά σημεία του δείγματος και λήφθηκε μεγάλος αριθμός εικόνων για τη μελέτη της αυτοργάνωσης της ελαστίνης σε συνδυασμό με την ανάπτυξη των ινών του κολλαγόνου. Ακολουθούν οι πιο αντιπροσωπευτικές από το σύνολο των εικόνων που λήφθηκαν.



a)



b)

Εικόνα 5.22 Τοπογραφικές εικόνες AFM, ελαστίνης-κολλαγόνου, με μεγεθύνσεις a) 20x20 μm, b) 10x10 μm. (I. Horcas et al Rev. Sci. Instrum. 78, 013705 (2007))

5.13 Σύνοψη και συζήτηση αποτελεσμάτων

Η μελέτη που έγινε αφορούσε στην επίδραση της ερυθρής ακτινοβολίας χαμηλής ισχύος (661nm) στα γεωμετρικά χαρακτηριστικά ενός ινιδίου ελαστίνης, πριν και μετά την ακτινοβόληση. Από τα πειράματα της πρώτης κατηγορίας (διακοπτόμενη ακτινοβόληση) παρατηρήθηκε σταδιακή αύξηση της διαμέτρου (σχήμα 5.2) όπου η συνολική αύξηση ήταν 51%. Ως εκ τούτου, υπάρχει μια σημαντική μεταβολή της διαμέτρου του ινιδίου ελαστίνης, ενώ και το ύψος του παρουσιάζει αύξηση ~11% (σχήμα 5.4). Από αυτές τις μεταβολές, στη νανοκλίμακα της δομής της ελαστίνης, είναι ξεκάθαρη η αλληλεπίδραση της ερυθρής ακτινοβολίας χαμηλής ισχύος (LLLT, 661nm) με τη δομή της ελαστίνης. Αποτέλεσματα που παρέχουν στοιχεία για το ότι η ερυθρή ακτινοβολία ίσως μπορεί να συμβάλλει στην ανάπλαση των ιστών αφού υπήρξε ομοιόμορφη ανάπτυξη των γεωμετρικών χαρακτηριστικών του ινιδίου. Στη βιβλιογραφία έχει αναφερθεί ότι η επίδραση της ερυθρής ακτινοβολίας, στην περίπτωση ακτινοβόλησης ινών κολλαγόνου, προκαλεί ευθυγράμμιση των ινών (Frozanfar et al., 2013).[52] Επίσης, έχει αναφερθεί απο τους De Souza et all, ότι η βιοδιέγερση που προκαλείται.[53] Οι αναφορές αυτές μπορούν να αιτιολογούν την επίδραση της ερυθρή ακτινοβολίας στους ιστούς.

1^η Κατηγορία ακτινοβόλησης (διακοπτόμενη)



Χωρίς Ακτινοβόληση 1^{η} Ακτινοβόληση 2^{η} Ακτινοβόληση 3^{η} Ακτινοβόληση 4^{η} Ακτινοβόληση

Κατά τη 2^η κατηγορία ακτινοβόλησης (συνεχόμενη, 15 min.) υπήρξε μεγάλη αύξηση της διαμέτρου στην πρώτη ακτινοβόληση, κατά 22% (σχήμα 5.10), ενώ στη συνέχεια δεν υπήρχαν ιδιαίτερες διακυμάνσεις. Ανάλογη απόκριση είχε και η υψομετρική διαφορά, όπου υπήρξε αύξηση κατά 11% στην πρώτη ακτινοβόληση, στη δεύτερη παρουσιάστηκε μείωση κατά 9% και έπειτα σταθεροποιήθηκε (σχήμα 5.12). Η σημαντική αύξηση της διαμέτρου και της υψομετρικής διαφοράς, περιλαμβάνει το χρονικό διάστημα της 1^{ης} κατηγορίας που παρουσιάσθηκε ιδιαίτερη αύξηση των γεωμετρικών χαρακτηριστικών κάτι που μπορεί να υποδείξει ότι υπήρξε ιδιαίτερη επίδραση της ερυθρής ακτινοβολίας στη δομή των ινών. Ενώ στη συνέχεια των ακτινοβολήσεων (από την 2^η και έπειτα) παρατηρήθηκε μείωση των γεωμετρικών χαρακτηριστικών των ινών. Όπως και στην 1^η κατηγορία, έτσι και εδώ οι μεταβολές στα γεωμετρικά χαρακτηριστικά ήταν ομοιόμορφες, δηλαδή όταν αυξανόταν η διάμετρος αυξανόταν και η υψομετρική διαφορά των ινιδίων, το ίδιο συνέβαινε και όταν υπήρχε μείωση τους.

Παρότι η ακτινοβόληση αυτής της κατηγορίας προκαλεί μια θερμική επίδραση (αύξηση ~0.9 °C) δεν θεωρείται ότι οι μεταβολές στα γεωμετρικά χαρακτηριστικά των ινών οφείλονται σε αυτή. [54]

2η Κατηγορία ακτινοβόλησης (συνεχόμενη)



Χωρίς Ακτινοβόληση 1^{η} Ακτινοβόληση 2^{η} Ακτινοβόληση 3^{η} Ακτινοβόληση

Στην 3^η κατηγορία ακτινοβόλησης (συνεχόμενη, 60 min.), η μεγαλύτερη αύξηση που παρουσιάστηκε αφορούσε την μεταβολή της διαμέτρου κατά 17%. Ενώ ακολούθησε μείωση της διαμέτρου κατά την 2^η ώρα ακτινοβόλησης. Ενώ η υψομετρική διαφορά παρουσίασε σημαντική μείωση κατά τις πρώτες δύο ακτινοβολήσεις, 18% και 12% αντίστοιχα. Συνεπώς και σε αυτή την κατηγορία πειραμάτων η επίδραση της ερυθρής ακτινοβολίας κατά τη συνεχόμενη ακτινοβόληση είναι υπαρκτή και συμπίπει με τη βιβλιογραφία. Για παράδειγμα, οι Kontomaris et al, μελέτησαν την επίδραση της ερυθρής ακτινοβολίας, με τις ίδιες παραμέτρους που χρησιμοποιήθηκαν και στην παρούσα διπλωματική εργασία, για συνεχόμενη ακτινοβόληση 60 λεπτών σε ίνες κολλαγόνου και διαπίστωσαν την επίδραση της στην δομή των ινών. [54] Κατα τον 3° κύκλο ακτινοβόλησης (3 ώρες), παρατηρείται αύξηση κατα 10% στη διάμετρο και η συνολική μείωση της υψομετρικής διαφοράς προσεγγίζει το 22%. Συνεπώς, ίσως σε αυτό το επίπεδο οι θερμικές επιδράσεις να επιδρούν και να αλλοιώνουν τη δομή της ίνας αφού δεν υπάρχουν ομοιόμορφες μεταβολές των γεωμετρικών χαρακτηριστικών.

3η Κατηγορία ακτινοβόλησης (συνεχόμενη)



Χωρίς Ακτινοβόληση

1^η Ακτινοβόληση



2^η Ακτινοβόληση



Η μελέτη συνεχίστηκε σε μικροϊνίδιο ελαστίνης όπου λόγω των ιδιαίτερων διαστάσεων του (η μέση τιμή της διαμέτρου μετρήθηκε στα 127nm), ακολουθήθηκε το πρώτο πρωτόκολλο ακτινοβόλησης ως το πιό ασφαλές για ευαίσθητα υλικά. Παρατηρήθηκε συνολική αύξηση της διαμέτρου κατα ~39% όμως, όπως και στον 3° κύκλο ακτινοβόλησης της τρίτης κατηγορίας, σημειώθηκε μεγάλη μείωση της υψομετρικής διαφοράς κατά ~30%. Συνεπώς, δεν υπήρξαν ομοιόμορφες μεταβολές στα γεωμετρικά χαρακτηριστικά του μικροϊνιδίου. Τα αποτελέσματα αυτά μας οδηγούν στο συμπέρασμα, οτι ακόμα και η πιο ασφαλής μέθοδο ακτινοβόλησης προκαλεί ανομοιόμορφες μεταβολές στα γεωμετρικά χαρακτηριστικά των μικροϊνιδίων, κάτι που μπορεί να οφείλεται, στο ότι οι δομές αυτές δεν έχουν σχηματίσει ολοκληρωμένα δίκτυα ελαστίνης.

Για μια πληρέστερη προσομοίωση της εξωκυττάριας μήτρας, έγινε συνδυαστική απεικόνιση ελαστίνης κολλαγόνου με τη χρήση του μικροσκοπίου ατομικής δύναμης για την μελέτη των δομών στη νανοκλίμακα. Παρατηρήθηκε πλέγμα ινών κολλαγόνου και ελαστίνης όπως φαίνεται στις εικόνες 5.21 a,b. Οι μεγάλες ίνες αφορούσαν δομές κολλαγόνου και οι μικρότερες ινίδια ελαστίνης. Στη βιβλιογραφία δεν υπάρχουν παρόμοιες αναφορές, παρά μόνο παραπλήσιες συνδυαστικές μελέτες ελαστίνης κολλαγόνου και οι μικρότερες ινίδια ελαστίνης. Στη βιβλιογραφία δεν υπάρχουν παρόμοιες αναφορές, παρά μόνο παραπλήσιες συνδυαστικές μελέτες ελαστίνης κολλαγόνου, όπως η έρευνα των J.C. Pittet et al, που μελέτησαν την αναλογία κολλαγόνου ελαστίνης με τη χρήση πολυφωτονικής μικροσκοπίας σε 2 ηλικιακές κατηγορίες ανθρώπων (νέοι και μεσήλικες) και σε 2 διαφορετικές βαθμίδες της δομής του δέρματος (στη δερμίδα και στο κατώτατο χόριο), όπου βρήκαν, ότι η ελαστίνη μειώνεται σε μεγαλύτερο βαθμό απο το κολλαγόνου με το πέρας της ηλικίας. [44] Στα πλαίσια αυτης της έργασίας δεν ήταν εφικτό να γίνουν ποσοτικές συνδυαστικές μελέτες ελαστίνος να γύνουν ποσοτικές συνδυαστικές μελέτες δομές να μελετηθεί περαιτέρω. Εφόσον θεσπιστεί ένα δόκιμο πρωτόκολλο θα μπορούν οι συνδυαστικές δομές να μελετηθούν ποσοτικά, αλλά και να εξεταστεί η επίδραση της ερυθρής ακτινοβολίας.

5.14 Συμπεράσματα και σχόλια

Στην παρούσα εργασία μελετήθηκε η επίδραση της ερυθρής ακτινοβολίας χαμηλής ισχύος (LLLT) σε δείγματα ελαστίνης, στη νανοκλίμακα, με τη χρήση μικροσκοπίου ατομικής δύναμης (AFM). Η ερυθρή ακτινοβολία χρησιμοποιείται τα τελευταία χρόνια ως μια μη επεμβατική τεχνική για την αποκατάσταση των αλλοιωμένων ιστών που έχουν προκληθεί από τραυματισμούς, ασθένειες και απο το γήρας.

Συγκεκριμένα, δημιουργήθηκαν εναιωρήματα ελαστίνης – υπερκάθαρου νερού (1%w/v), στα οποία σχηματίστηκαν ινώδεις δομές ελαστίνης ώστε να δημιουργηθεί ένα ικρίωμα ινών που προσομοιάζει τη δομή της εξωκυττάριας μήτρας. Επίσης δημιουργήθηκαν εναιωρήματα ελαστίνης–PBS (1%w/v) και ελαστίνης–TBS (1%w/v) στα οποία παρατηρήθηκαν συσσωματώματα. Κατέστη εφικτή η μελέτη μιας ίνας, πριν και μετά, την ακτινοβόληση και μελετήθηκαν 3 κατηγορίες, συνεχόμενης και διακοπτόμενης ακτινοβόλησης. Διαπιστώθηκε ότι παρουσιάζονται δυο διαφορετικά αποτελέσματα ανάλογα με τον τρόπο ακτινοβόλησης. Στη διακοπτόμενη παρουσιάζεται ομοιόμορφη αύξηση των γεωμετρικών χαρακτηριστικών, ενώ στη συνεχόμενη ομοιόμορφη μείωση των γεωμετρικών χαρακτηριστικών. Αυτοί οι δυο μηχανισμοί μπορούν να χρησιμοποιηθούν ανάλογα με την ανάγκη που μπορεί να υπάρξει στην τροποποίηση μίας τεχνητής εξωκυττάριας μήτρας. Επίσης, με βάση τα προαναφερθέντα αποτελέσματα, η ακτινοβολία χαμηλής ισχύος στην περιοχή του ερυθρού μπορεί να χρησιμοποιηθεί για την αποκατάσταση αλλοιώσεων των ιστών.

Από τα αποτελέσματα της τρίτης κατηγορίας ακτινοβόλησης, παρατηρήθηκαν μη ομοιόμορφες μεταβολές των γεωμετρικών χαρακτηριστικών του ινιδίου αφου αυξήθηκε η διάμετρος ενω μειώθηκε η υψομετρική διαφορά. Σε αυτο το στάδιο, δηλαδή μετά απο 3 ώρες ακτινοβόλησης ίσως η επίδραση γίνεται καταστρεπτική. Επίσης στη μελέτη μικροϊνιδίου ελαστίνης με διακοπτόμενη ακτινοβόληση παρουσιάστηκε παρόμοια συμπεριφορά, κάτι που πιθανόν να οφείλεται στην ιδιαίτερα ευαίσθητη δομή του.

Ο συνδυασμός ελαστίνης-κολλαγόνου μπορεί να δημιουργήσει δομές με ιδιαίτερα χαρακτηριστικά λόγω των μηχανικών και βιολογικών ιδιοτήτων τους, αφού η ελαστίνη προσδίδει το χαρακτηριστικό της ελαστικότητας ενώ το κολλαγόνο αυτό της συνεκτικότητας. Στα πλαίσια αυτης της εργασίας, πραγματοποιήθηκε απεικονιστική μελέτη σύνθετων βιοϋλικών κολλαγόνου-ελαστίνης. Για περαιτέρω μελέτες (ποσοτική ανάλυση, ακτινοβόληση με ερυθρή ακτινοβολία) χρειάζεται να δημιουργηθούν νεα πρωτόκολλα σύνθεσης, κάτι που δε μελετήθηκε στη συγκεκριμένη εργασία, αλλα αποτελεί πρόταση για μελλοντικές έρευνες.

Εν κατακλείδι, η μελέτη της επίδρασης της ερυθρής ακτινοβολίας στις δομές της ελαστίνης που πραγματοποιήθηκε κατά την εκπόνηση αυτης της μεταπτυχιακής εργασίας, μπορεί να αναφερθεί ως μια αξιοσημείωτη μελέτη των αινιγματικών διεργασιών της αλληλεπίδρασης ιστών και ερυθρής ακτινοβολίας στη νανοκλίμακα.

Βιβλιογραφία

- [1] Mark B. van Eldijk, Christopher L. McGann, Kristi L. Kiick, Jan C.M. van Hest, "Elastomeric Polypeptides", Top Curr Chem., Vol. 310, pp 71–116, (2012)
- [2] Linqing Li, Manoj B. Charatiand Kristi L. Kiick, "Elastomeric polypeptide-based biomaterials" Polymer Chemistry, Vol. 1, pp. 1160–1170, (2010)
- [3] Robert L, Jacob MP, Fülöp T. "Elastin in blood vessels.", Ciba Found Symp., Vol. 192, pp. 286-303, (1995)
- [4] Bernadette Vrhovski and Anthony S. Weiss "Biochemistry of tropoelastin", Eur. J. Biochem., Vol. 258, pp. 1218, (1998)
- [5] Balakrishnan Sivaraman, Chris A. Bashur, Anand Ramamurthi, "Advances in biomimetic regeneration of elastic matrix structures", Drug Deliv Transl Res., pp. 323– 350, (2012)
- [6] MacEwan SR, Chilkoti A. "Elastin-like polypeptides: biomedical applications of tunable biopolymers", Biopolymers, Vol. 94, pp 60-77, (2010)
- [7] L. Debelle, A.M. Tamburo, "Elastin: molecular description and function", The International Journal of Biochemistry & Cell Biology 31, [261-272], 1999
- [8] Gary E. Wnek, Gary L. Bowlin "Encyclopedia of Biomaterials and Biomedical Engineering", informa health care Second Edition, Vol. 1, pp. 133-140,1826-1827,2275-2281, (2008)
- [9] Bruce alberts, Dennis Bray, Karen Hopkin, Alexander Johnson, Julian Lewis, Martin Raff, Keith Roberts, Peter Walter, « Βασικές αρχές κυτταρικής βιολογίας», Ιατρικές εκδόσεις Π.Χ. Πασχαλίδη, Τόμος Ι, ΙΙ, pp. 169, 875-878, (2006)
- [10] Β. Μαρμαράς, Μ.Λ. Μαρμαρά, « Βιολογία Κυττάτορου, Μορικακή προσέγγιση», Typorama, pp. 358,359, (2005)
- [11] A. Rich, F.H. Crick, "The molecular structure collagen", J Mol Biol, Vol. 3, pp 483-506, (1961)
- [12] G.N. Ramachandran, "Molecular Structure of collagen" Int rev connect tiss, Vol.1, pp. 127-182, (1963)
- [13] J. Engel, H.P. Bachinger, "Structure, stability and folding of thw collagen triple helix, Top Curr Chem, pp 7-33, (2005)
- [14] L. Vitagliano, R. Berisio, L. Mazzarella, A. Zagari, "Structural bases of collagen stabilization induced by proline hydroxylatiuon" Biopolymers, vol. 58, pp. 459-464, (2001)
- [15] K.A. Piez, B.L. Trus, "A new model for packing of type-I collagen molecules in the native fibril," Bioscience rep, vol.1, pp. 801-810, (1981)

- [16] K.E. Kadler, C. Baldock J. Bella, R.P. Boot-Hnadford, "Collagens at a glance", J Cell Sci, vol 120, pp. 1955-1958, (2007)
- [17] N.H. Thomson, S Kasas, B Smith, H.G. Hansa, P.K. Hansma, "Reversivle binding of DNA mica for AFM imaging" Langmuir, Vol. 12, pp. 5905-5906, (1996)
- [18] Yu HS, Wu CS, Yu CL, Kao YH, Chiou MH. "Helium-neon laser irradiation stimulates migration and proliferation in melanocytes and induces repigmentation in segmentaltype vitiligo" J Invest Dermatol. Vol. 120, pp. 56–64, (2003)
- [19] Lan CC, Wu CS, Chiou MH, Chiang TY, Yu HS "Low-energy helium-neon laser induces melanocyte proliferation via interaction with type IV collagen: visible light as a therapeutic option for vitiligo", Br J Dermatol, Vol. 161, pp. 273–280, (2009)
- [20] Lan CC, Wu CS, Chiou MH, Hsieh PC, Yu HS "Low-energy helium-neon laser induces locomotion of the immature melanoblasts and promotes melanogenesis of the more differentiated melanoblasts: recapitulation of vitiligo repigmentation in vitro" J Invest Dermatol., Vol. 126, pp. 2119–2126, (2006)
- [21] Pinar Avci, Asheesh Gupta, Magesh Sadasivam, Daniela Vecchio, Zeev Pam, Nadav Pam, and Michael R Hamblin "Low-level laser (light) therapy (LLLT) in skin: stimulating, healing, restoring" Semin Cutan Med Surg. Vol. 42, pp. 41–52, (2013)
- [22] Cao G., "Nanostructures & Nanomaterials: Synthesis, Properties & Applications", Imperial College Press, London (2004)
- [23] Bhattacharjee A.K., Pérez-Conde J., "Optical Properties of semiconductor nanocrystals: A symmetry-based tight-binding approach", Revista Mexicana de Física Vol. 49, pp. 168-171, (2003)
- [24] Lane R., Craig B., Babcock W., "Materials engineering with nature's building blocks", The AMPTIAC Newsletter, Vol 6, pp. 31-36, (2002)
- [25] Reibold, M. paugler, P Levin, A.a. Kochmann, W. Patzke, N. Meyer, "Materials: Carbon nanotubes in an ancient Damascus sabre", Nature, Vol. 444, pp 286, (2006)
- [26] G. Binning, C. F. Quate, C. Gerber, "Atomic Force Microscopy", Physical Review Letters, vol. 56, pp. 930-933, (1986)
- [27] D.A. Cisneros, J. Friedrichs, A. Taubenberger, C.M. Franz, D.J. Muller, "Creating ultrathin nanoscopic collagen matrices for biological and biotechnological applications", Small, vol. 3, pp. 956-963, (2007)
- [28] D.A. Cisneros, "Molecular Assemblies Observed by Atomic Force Microscopy", Dissertation/thesis, (2007)
- [29] F. Ohnesorge, G. Bining, "True atomic resolution by atomic microscopy through repulsive and attractive forces", Science, vol 260, pp. 1451-1455, (1993)
- [30] M.J. Majid, "Scanning Probe Microscopy of Biomaterials and Nanoscale Biomachanics", Dissertation, University of Illinois at Urbana-Champaign, (2010)
- [31] H. J. Butt, B. Capella, M. Kappl, "Force measurments with the atomic force microscope: Technique, interpretation and applications", Surface Science Reports, vol.59, pp. 1-152, (2005)
- [32] S. Kasas, N.H. Thomson, B.L. Smith, P.K. Hansma, J. Milkossy, H.G. Hansma "Biological Application of the AFM: From single molecules to organs", Int J Imag Syst Tech, vol. 8, pp. 151-161, (1997)
- [33] B. Samori, C. Nigro, V. Armentano, S. Cimieri, G. Zuccheri, C. Quagliariello, "DNA supercoiling imaged in 3 dimensions by scanning forxe microscopy", Angew Chem Int Edit, vol. 32, pp. 1461-1463, (1993)
- [34] H.G. Hansma, D. E. Laney, M. Bezanilla, R.L. Sinsheimer, P.K. Hansma, "Applications for atomic force microscopy of DNA", Biophys. J., vol 68, pp. 1672-1677, (1995)
- [35] N.H. Thomson, S. Kasas, B. Smith, H.G. Hansma, P.K. Hanassemsma. "Reversible binding of DNA to mica for AFM imaging" Langmuir, vol. 12, pp. 5905-5908, (1996)
- [36] S. Karrasch, M Dobler, F. Schabert, J. Ramsden, A. Engel, "Covalent binding of biological samples to solid supports for scanning probes microscopy in buffer solution" Biophys. J., vol 65, pp. 2437-2446, (1993)
- [37] W.H. Ham, J.X. Mou, J. Sheng, J. Yang, Z.F. Shao, "Cryatomic force microscopy-a new approach for biological imaging at high resolution" Biochemistry, vol. 34, pp. 8215-8220, (1995)
- [38] S. Kasas, N.H. Thomson, B.L. Smith, H.G. Hansma, X. Zhu, M. Guthold, C. Bustamante, E.T. Kool, M. Kashiev, P.K. Hansma, "Escherichia coli RNA polymerase activity observed using atomic force microscopy", Biochemistry, vol.26, pp. 461-468, (1997)
- [39] S. Choi, H. Lee, Y. Cheong, J. Shinn, K. Jinn, H. Park, "AFM study for morphological characteristics and biomechanical properties of human cataract anterior lens capsules" Scanning, Vol.34, pp. 247-256, (2012)
- [40] S. Strasser, "Nanotechnological Charactirisation of Biomaterials- Structural and Biophysical Investigations" Dissertation/ Thesis, der Fakultat fur Geowissenschaften, der Lundwig- Maxilians-Universitat Munchen, 2007
- [41] Nuno C. Santos, Miguel A.R.B. Castanho, "An overview of the biophysical applications of atomic force microscopy", Biophysical Chemistry, vol 107, pp. 133-149, 2004
- P.S. Bossini, A.C.M. Renno, D.A. Ribeiro, R. Fangel, A.C. Ribeiro, M.D.A. Lahoz, N.A. Parizotto, "Low level laser therapy (830nm) improves bone reapir on osteoporotic rats: Similar outcomes at two different dosages" Exp Gerontol, vol. 47, pp. 136-142, (2012)

- [43] L.S. Pugliese, A.P. Medrado, S.R. Reis, Z.A. Andrade, "The influence of low-level laser therapy on biodulation of collagen and elastic fibers", Bras oral res, vol17, pp. 307-313, (2003)
- [44] Jean-Christophe Pittet, Olga Freis, Marie-Danielle Vazquez-Duchêne, Gilles Périé, Gilles Pauly, "Evaluation of Elastin/Collagen Content in Human Dermis in-Vivo by Multiphoton Tomography—Variation with Depth and Correlation with Aging", Cosmetics, Vol. 1, pp. 211-221, (2014)
- [45] Koenig, K., Bückle, R. Weinigel, M. Köhler, J. Elsner, P. Kaatz, M. "In vivo multiphoton tomography in skin aging studies", Proc. SPIE, pp. 7161, (2009)
- [46] Puschmann S, Rahn CD, Wenck H, Gallinat S, Fischer F. "Approach to quantify human dermal skin aging using multiphoton laser scanning microscopy" J. Biomed. Opt., Vol. 17, (2012)
- [47] CSH protocols, Cold spring Harbor Laboratory Press, doi:10.1101/pdb.rec11830, (2009)
- [48] CSH protocols, Cold spring Harbor Laboratory Press doi:10.1101/pdb.rec8247 Cold Spring Harb Protoc (2006)
- [49] L. Buttafoco, N.G. Kolkman, P. Engbers-Buijtenhuijs, A.A. Poot, P.J. Dijkstra, I. Vermes, J. Feijen, "Electrospinning of collagen and elastin for tissue engineering applications", Biomaterials, Vol 27, pp. 724-734, (2006)
- [50] Ming Miao, Catherine M. Bellingham, Richard J. Stahl, Eva E. Sitarz, Christopher J. Lane, Fred W. Keeley "Sequence and Structure Determinants for the Self-aggregation of Recombinant Polypeptides Modeled after Human Elastin" The Journal of biological chemistry, Vol. 278, pp. 48553–48562, (2003)
- [51] Kyriaki Sambani, Dido Yova, "Nanoscale Structural Self- Assembling Imaging of Elastin Fibers by Atomic Force Microscopy" (to be published, 2016)
- [52] Frozanfar, A., Ramezani, M., Rahpeyma, A., Khajehahmadi, S., Arbab, H.R., "The effects of low level laser therapy on the expression of collagen type I gene and proliferation of human gingival fibroblasts (HGF3-PI 53): In vitro study" Iranian Journal of Basic Medical Sciences Vol.16, pp.1071-1074, (2013)
- [53] De Souza, T.O.F., Mesquita, D.A., Ferrari, R.A.M., Dos Santos Pinto Jr, D., Correa, L., Bussadori, S.K., Fernandes, K.P.S., Martins, M.D., "Phototherapy with lowlevel laser affects the remodeling of types i and III collagen in skeletal muscle repair." Lasers in Medical Science, Vol.26, pp. 803-814, (2011)
- [54] S.V. Kontomaris, D. Yova, K. Sambani, A. Stylianou, "AFM Investigation of the Influence of Red Light Irradiation on Collagen" IFMBE Proceedings Springer, Vol. 57, pp 269-274, (2016)

- [55] Jelena Rnjak-Kovacina, Steven G. Wise, Zhe Li, Peter K.M. Maitz, Cara J. Young, Yiwei Wang, Anthony S. Weiss "Electrospun synthetic human elastin:collagen composite scaffolds for dermal tissue engineering" Acta Biomaterialia, Vol 8, pp 3714–3722 (2012)
- [56] Siobhan E. Dunphyn, Jessica A.J. Bratt, Khondoker M. Akram, Nicholas R. Forsyth, Alicia J. El Haj, "Hydrogels for lung tissue engineering: Biomechanical properties of thin collagen–elastin constructs" Journal of the mechanical behavior of biomedical materials, vol.38, pp 251-259