



**ΕΘΝΙΚΟ ΜΕΤΣΟΒΙΟ ΠΟΛΥΤΕΧΝΕΙΟ**  
**ΣΧΟΛΗ ΕΦΑΡΜΟΣΜΕΝΩΝ ΜΑΘΗΜΑΤΙΚΩΝ ΚΑΙ ΦΥΣΙΚΩΝ**  
**ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ**  
**ΤΟΜΕΑΣ ΦΥΣΙΚΗΣ**

**Μελέτη των μορφολογικών χαρακτηριστικών**  
**ανθρώπινων ερυθροκυττάρων συναρτήσει της θερμοκρασίας**  
**με Μικροσκοπία Ατομικής Δύναμης**

**ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ**

**Μπάλτα Χριστιάνα**

Επιβλέποντες  
**Η. Ζουμπούλης**  
Αναπληρωτής Καθηγητής, Τομέας Φυσικής, Ε.Μ.Π.  
**Δ. Σταμόπουλος**  
Συνεργαζόμενος Ερευνητής, Ινστιτούτο Επιστήμης Υλικών, Ε.Κ.Ε.Φ.Ε. 'Δημόκριτος'

Αθήνα, Μάρτιος 2012





**ΕΘΝΙΚΟ ΜΕΤΣΟΒΙΟ ΠΟΛΥΤΕΧΝΕΙΟ**  
**ΣΧΟΛΗ ΕΦΑΡΜΟΣΜΕΝΩΝ ΜΑΘΗΜΑΤΙΚΩΝ ΚΑΙ ΦΥΣΙΚΩΝ**  
**ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ**  
**ΤΟΜΕΑΣ ΦΥΣΙΚΗΣ**

**Μελέτη των μορφολογικών χαρακτηριστικών**  
**ανθρώπινων ερυθροκυττάρων συναρτήσει της θερμοκρασίας**  
**με Μικροσκοπία Ατομικής Δύναμης**

**ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ**

**Μπάλτα Χριστιάνα**

Επιβλέποντες  
**Η. Ζουμπούλης**  
Αναπληρωτής Καθηγητής, Τομέας Φυσικής, Ε.Μ.Π.  
**Δ. Σταμόπουλος**  
Συνεργαζόμενος Ερευνητής, Ινστιτούτο Επιστήμης Υλικών, Ε.Κ.Ε.Φ.Ε. 'Δημόκριτος'

Εγκρίθηκε από την τριμελή Εξεταστική Επιτροπή και από τον Ερευνητικό Επιβλέποντα:

(Υπογραφή)

(Υπογραφή)

(Υπογραφή)

(Υπογραφή)

.....  
Η. Ζουμπούλης  
Αν. Καθηγητής Ε.Μ.Π.

.....  
Μ. Μακροπούλου  
Αν. Καθηγήτρια Ε.Μ.Π.

.....  
Α. Κυρίτσης  
Επικ. Καθηγητής Ε.Μ.Π.

.....  
Δ. Σταμόπουλος  
Συν. Ερευνητής  
Ι.Ε.Υ. 'Δημόκριτος'

Αθήνα, Μάρτιος 2012

(Υπογραφή)

.....

ΜΠΑΛΤΑ ΧΡΙΣΤΙΑΝΑ

Διπλωματούχος Σχολής Εφαρμοσμένων Μαθηματικών και Φυσικών Επιστημών Ε.Μ.Π.

## Περίληψη

Αντικείμενο της παρούσας διπλωματικής εργασίας είναι η μελέτη των μορφολογικών χαρακτηριστικών των ερυθρών αιμοσφαιρίων (ΕΑ) με την έκθεση αυτών σε διαφορετικές θερμοκρασίες φυσιολογικές (35 – 37 °C), ήπια μη φυσιολογικές (37 – 42 °C) και αφύσικα υψηλές (έως 510 °C) δεδομένου ότι επιδιώκουμε να εξετάσουμε σε *in vitro* συνθήκες την πιθανή τροποποίηση αυτών των χαρακτηριστικών σε εμπύρετη κατάσταση. Στο πείραμα χρησιμοποιήθηκε ως δείγμα, ολικό ανθρώπινο αίμα, το οποίο μπορούμε εύκολα να λάβουμε με μία προτυποποιημένη διαδικασία. Όγκος της τάξεως μερικών εκατοντάδων μl έως λίγα ml αίματος αρκεί για την εξέτασή του. Ειδικότερα, μελετήθηκαν τα ΕΑ, αφενός επειδή βρίσκονται σε πολύ μεγαλύτερη αναλογία στο αίμα σε σχέση με τα υπόλοιπα έμμορφα στοιχεία και αφετέρου επειδή επιτελούν σημαντικές βιοχημικές διεργασίες μία από τις οποίες είναι η μεταφορά ζωτικών αερίων, όπως οξυγόνου, στα όργανα του ανθρώπινου σώματος και η απομάκρυνση των τοξικών αερίων του μεταβολισμού, όπως διοξείδιο του άνθρακα.

Η μελέτη πραγματοποιήθηκε μέσω απεικονιστικών μεθόδων με Οπτικό Μικροσκόπιο (ΟΜ) και Μικροσκόπιο Ατομικής Δύναμης (ΜΑΔ). Η μεν τεχνική του ΟΜ είναι μια οικεία μέθοδος στον κλάδο των Επιστημών της Υγείας, εφόσον εφαρμόζεται για τη μελέτη βιοψικού υλικού. Η δε τεχνική ΜΑΔ, άρχισε τα τελευταία έτη να εφαρμόζεται σε ερευνητικό επίπεδο στη μελέτη κυττάρων και συγκεκριμένα των έμμορφων συστατικών του αίματος. Οι δύο τεχνικές Μικροσκοπίας λειτούργησαν συμπληρωματικά στην παρούσα μελέτη. Αρχικά, το ΟΜ έδωσε τη δυνατότητα να εξετάσουμε κύτταρα αίματος σε κλίμακα της τάξης των mm – μm. Στη συνέχεια, η ΜΑΔ εμβάθυνε την παρατήρηση στην κλίμακα των μm – nm. Ένα ακόμα πλεονέκτημα της τεχνικής ΜΑΔ σε σχέση με το ΟΜ, είναι η ποιοτική και ποσοτική αξιολόγηση της ψηφιακής πληροφορίας των αποτελεσμάτων μέσω κατάλληλου λογισμικού που παρέχει το όργανο.

Στο στάδιο της παρασκευής δειγμάτων κατάλληλων για μελέτη με το ΜΑΔ απαιτείται η ομοιόμορφη κατανομή των έμμορφων συστατικών του αίματος. Για

αυτό το σκοπό πραγματοποιήσαμε διαδικασία αραίωσης του (αρχικά φυσιολογικού αιματοκρίτη) αίματος κάθε δότη, με μια συγκεκριμένη ποσότητα από το αυτόλογο πλάσμα προκειμένου να ελαττωθεί ο αιματοκρίτης στην επιθυμητή τιμή. Στη συνέχεια, το αραιωμένο αίμα επιστρώνεται σε γυάλινα πλακίδια μικροσκοπίου με χρήση κατάλληλης πειραματικής διάταξης στη μορφή μονοστρωματικών υμενίων κυττάρων αίματος. Στην παρούσα μελέτη επιλέξαμε τη συγκεκριμένη μορφή δείγματος προκειμένου να προσομοιάσουμε τις ακριβείς συνθήκες στις οποίες οι αιματολόγοι και παθολογοανατόμοι μελετούν τα κύτταρα αίματος στην κλινική εργαστηριακή πράξη.

Για τη θέρμανση των υμενίων αίματος, κατασκευάστηκε αυτοσχέδια διάταξη θερμαινόμενου δειγματοφορέα που προσαρτήθηκε στη διάταξη του ΜΑΔ. Επάνω στο δειγματοφορέα αυτό, τοποθετείται το γυάλινο πλακίδιο με το υμένιο αίματος. Η διάταξη περιλαμβάνει: α) ειδικά σχεδιασμένη πλατφόρμα από Cu, β) περιτύλιξη με νήμα υψηλής αντίστασης από υλικό Constantan σε λειτουργία αντιστάτη για την αύξηση της θερμοκρασίας, γ) πηγή ρυθμιζόμενης τιμής ρεύματος, δ) ψηφιακό θερμόμετρο. Δίνοντας τις κατάλληλες τιμές στην ένταση του ρεύματος που διαρρέει τον αντιστάτη, επιτυγχάνονται οι επιθυμητές θερμοκρασίες στο δειγματοφορέα Cu, άρα και στο δείγμα. Με την παρέλευση χρονικού διαστήματος 5-7 min, η ένδειξη του ψηφιακού θερμομέτρου σταθεροποιούνται και ξεκινούσαμε τη σάρωση περιοχής του δείγματος με το ΜΑΔ.

Ένα σημαντικό θέμα που μας απασχόλησε ήταν η θερμική ομοιογένεια του περιβάλλοντος χώρου των ΕΑ δεδομένου ότι αυτά δεν βρίσκονται μέσα σε κλειστό θάλαμο ελεγχόμενης θερμοκρασίας αλλά η μια τους επιφάνεια είναι εκτεθειμένη σε θερμοκρασία δωματίου. Για να διερευνήσουμε την έκταση της θερμικής ομοιογένειας στον χώρο πάνω από την επιφάνεια του δειγματοφορέα Cu και την πιθανή επίδραση της στα ΕΑ, πραγματοποιήσαμε μια εισαγωγική θεωρητική μελέτη επιλύοντας την διαφορική εξίσωση διάδοσης θερμότητας χρησιμοποιώντας κατάλληλες οριακές συνθήκες. Καθ' όλη τη διάρκεια διεξαγωγής του πειράματος ο χώρος κλιματιζόταν, κάτι που επέτρεπε τον έλεγχο των οριακών συνθηκών του προβλήματος.

Η πειραματική διάταξη που περιγράφηκε προηγουμένως, χρησιμοποιήθηκε για θερμοκρασίες 20 – 90 °C. Εισαγωγικά *in vitro* πειράματα απέδειξαν ότι οι μεταβολές που υφίστανται τα ΕΑ τόσο σε *μικροσκοπικό* όσο και σε *νανοσκοπικό* επίπεδο στην συγκεκριμένη περιοχή θερμοκρασιών είναι πολύ μικρές. Σε *μικροσκοπικό* επίπεδο, στο δείγμα δύο υγιών δοτών, εξετάσαμε εύρος θερμοκρασιών

20 – 55 °C. Σημειώθηκε συνολική μεταβολή της τάξεως 2,24 – 3,81 % στη διάμετρο, 8,60 – 9,37 % στο ύψος και 5,41 – 6,79 % στο εμβαδόν. Σε νανοσκοπικό επίπεδο παρατηρήσαμε ότι συγκεκριμένες μορφολογικές δομές της μεμβράνης των ΕΑ διατηρούσαν αναλλοίωτα τα γεωμετρικά τους χαρακτηριστικά σε όλη την περιοχή αυτών των θερμοκρασιών.

Η απόλυτη μορφολογική σταθερότητα των ΕΑ και της μεμβράνης τους σε θερμοκρασίες έως 90 °C μας διέγειρε το ενδιαφέρον και επεκτείναμε τη μελέτη μας σε σημαντικά υψηλότερες θερμοκρασίες, έως τους 510 °C, ακολουθώντας μια διαφορετική πειραματική διαδικασία. Αρχικά, μετρήσαμε με το ΜΑΔ υμένα αίματος που βρίσκονταν σε θερμοκρασία δωματίου, χρησιμοποιώντας τα ως δείγματα αναφοράς. Εν συνεχεία, θερμάναμε τα δείγματα στους 250, 300 αλλά και στους 400 °C σε έναν εργαστηριακό φούρνο. Κατόπιν, μετρήσαμε πάλι τα δείγματα αυτά και αξιολογήσαμε τόσο ποιοτικά όσο και ποσοτικά τα αριθμητικά αποτελέσματα. Η διάμετρος, το ύψος και το εμβαδόν των ΕΑ σαφώς σημείωσαν ραγδαία μείωση και τείνουν να εκμηδενιστούν στην περιοχή υψηλών θερμοκρασιών, αποδεικνύοντας ότι τα ΕΑ σε αυτές τις ακραίες θερμοκρασίες εξαχνώνονται. Τέλος, για εποπτική μελέτη, λάβαμε εικόνες στο ΟΜ από δείγματα που είχαν θερμανθεί σε θερμοκρασίες 400 – 510 °C. Στη θερμοκρασία των 510 °C, τα ΕΑ είχαν εξαχνωθεί πλήρως και έμειναν μόνο ίχνη που μαρτυρούν την ύπαρξή τους.

Οι πειραματικές συνθήκες κάτω από τις οποίες διεξάχθηκε η παρούσα *in vitro* μελέτη είναι συγκεκριμένες και πρέπει να ληφθούν υπόψη για τη σωστή ερμηνεία των αποτελεσμάτων. Πρώτον, τα ΕΑ θερμάνθηκαν σε μορφή μονοστρωματικών υμενίων επιστρωμένων σε γυάλινα πλακίδια μικροσκοπίου, προκειμένου να προσομοιάσουμε τις ακριβείς συνθήκες στις οποίες τα μελετούν οι Ιατρικές ειδικότητες στην κλινική εργαστηριακή πράξη. Δεύτερον, τα ΕΑ θερμαίνονται, υπό μορφή υμενίων πάνω σε γυάλινα πλακίδια, *ex vivo* σε μη φυσιολογικό αέριο περιβάλλον ατμόσφαιρας και όχι στο φυσιολογικό υγρό περιβάλλον του πλάσματος.

Τέλος, εφόσον τα αποτελέσματα της παρούσας Διπλωματικής Εργασίας αφορούν αποκλειστικά τα ΕΑ του ανθρώπινου αίματος συγκεκριμένων δοτών, τονίζουμε ότι αυτά δεν μπορούν να γενικευτούν για άλλους δότες, άλλες συνθήκες μελέτης και άλλους έμβιους οργανισμούς.

## **Abstract**

The purpose of this thesis is to study the morphological characteristics of red blood cells (RBC) after exposure on different temperatures, physiological (35-37 °C), mildly abnormal (37 - 42 °C) and abnormally high (up to 510 °C) as we examine the in vitro conditions indicate possible modification of these characteristics. The experiment used as sample human whole blood, easy to be obtained by a standardized process. Volume of the order of a few hundred  $\mu$ l to a few ml of blood is enough to examine. In particular, we studied the RBC's, because both are much larger proportion in the blood compared with other cellular components and because they perform important biochemical processes one of which is the transfer of vital gases, such as oxygen, to the organs of the human body and the removal of toxic metabolic gases such as carbon dioxide.

The study was conducted by imaging methods such as Optical Microscope (OM) and Atomic Force Microscope (AFM). Whereas the technique of OM is a familiar method in the field of Health Sciences, as applied to the study of biopsy material, the AFM began to apply in research recently in studies of specific cells and cellular components of blood. We complementary used both techniques during this study. Initially, the OM has the ability to examine blood cells on a scale of the order of mm -  $\mu$ m. Then, the AFM intensified observation scale of  $\mu$ m - nm. Another technical advantage of the AFM compared to the OM, is qualitative and quantitative results of digital information using appropriate software provided by the institution.

Samples were suitable prepared for AFM study that requires uniform distribution of cellular components of blood. For this purpose, we performed the dilution process (initially normal hematocrit) of each donor's blood, with a certain volume of autologous plasma in order to reduce hematocrit to the desired value. Then, the diluted blood overlaid on microscope glass slides using appropriate experimental setup to form monolayer RBC films. In this study, we chose this sample form to simulate the exact conditions in which hematologists and pathologists study blood cells in clinical practice.



To heat the blood films, we constructed a homemade device of heating stage annexed to the configuration of the AFM. Above the heating stage, we placed the glass plate coated with blood. The device comprises: a) specially designed platform from Cu, b) wrapping by thread of high resistance. The selected material operated as resistor is Constantan and is used to increase the temperature of the stage, c) electric current source, d) digital thermometer. Giving appropriate values to the intensity of electrical current, we can achieve the desired temperatures in the stage, and therefore temperature of the sample. With the lapse of 5-7 min, the digital thermometer's indication got stabilized and then we began scanning a particulate area of the sample using the AFM.

An important matter confront us, was the thermal homogenization of the surrounding area. Since RBC's are not in a closed temperature-controlled chamber, but on a surface exposed to room temperature. To investigate the extent of thermal consistency of space above the surface of Cu stage, we held an introductory theoretical study by solving the heat diffusion differential equation using appropriate boundary conditions. Throughout the course of our experiments, the room was air-conditioned, which allows control of the boundary conditions of the problem.

We used the experimental set described above for in situ heating at temperatures 20 - 90 °C. Introductory in vitro experiments showed that changes undergone by both RBC's and on nanoscopic scale in this temperature range are very small. On microscopic scale, samples of two healthy donors examined at temperature range 20 - 55 °C. There was a total change of about 2.24 to 3.81 % in diameter, 8.60 to 9.37 % in height and 5.41 to 6.79 % in area. On nanoscopic scale, we observed that specific morphological structures of RBC membrane kept unchanged throughout the range of these temperatures.

The rigid morphological stability of RBC's and their membrane at temperatures up to 90 °C stimulated our interest and we extended our study to significantly higher temperatures, up to 510 °C, following a different experimental procedure. Initially, we measured the blood RBC films at room temperature, using as reference samples. Then, we heated the samples at 250, 300, 400 °C in a laboratory oven. Then, measured again these samples and assessed both qualitatively and quantitatively the numerical results. Diameter, height, and area of the RBC's showed rapid decline indicating that they volatilize at these extreme temperatures. Finally, during supervisory study, we took images of the

samples heated at temperatures 400 – 510 °C. At 510 °C, RBC's had completely sublimed, leaving tracks that indicate their existence.

The experimental conditions under of which in vitro this study conducted must be taken into account for proper interpretation of results. First, RBC's were heated in the form of monolayer films and coated on glassslides in order to simulate the exact conditions under of which they are examined in clinical laboratories. Second, RBC's were ex vivo heated, in atmospheric air, and not in their normal fluid environment (plasma).

Finally, since results of this thesis concern samples from specific human blood donors only, we emphasize that they are not to be generalized for other donors, or other conditions of study, or other living organisms either.

## Πρόλογος

Το πειραματικό μέρος της παρούσας Διπλωματικής Εργασίας πραγματοποιήθηκε στο Ινστιτούτο Επιστήμης Υλικών (Ι.Ε.Υ) του Ε.Κ.Ε.Φ.Ε. ‘Δημόκριτος’. Στην ολοκλήρωσή της, συνέβαλαν καθηγητές και φίλοι που αξίζουν τις θερμές ευχαριστίες μου.

Αρχικά οφείλω να ευχαριστήσω τον επιβλέποντα και ερευνητικό μου υπεύθυνο τον Συνεργαζόμενο Ερευνητή του Ι.Ε.Υ, Δρ. Δημοσθένη Σταμόπουλο που αρχικά μου έδωσε το εφελτήριο να ασχοληθώ με το θέμα αυτό και στη συνέχεια υπήρξε άριστος καθοδηγητής και συνεργάτης στην πραγματοποίηση των πειραμάτων. Οι γνώσεις και η ερευνητική του δραστηριότητα στάθηκαν αρωγοί στην εξέλιξη και συγγραφή της παρούσας εργασίας.

Αναμφισβήτητα, δε θα μπορούσα να παραλείψω να εκφράσω τις ευχαριστίες μου στον Αναπληρωτή Καθηγητή του τομέα Φυσικής και ακαδημαϊκό μου επιβλέποντα το Δρ. Ηλία Ζουμπούλη, που με προθυμία και ενδιαφέρον εξ’ αρχής υποστήριξε το θέμα μου, καθώς επίσης και για την ευκαιρία που μου έδωσε να συνεργαστώ με το Ι.Ε.Υ. του Ε.Κ.Ε.Φ.Ε. ‘Δημόκριτος’.

Επιπλέον θα ήθελα να ευχαριστήσω και τα υπόλοιπα δύο μέλη της τριμελούς επιτροπής: Αναπληρώτρια Καθηγήτρια Μυρσίνη Μακροπούλου και τον Επίκουρο Καθηγητή Απόστολο Κυρίτση, για την συμμετοχή τους στην τριμελή εξεταστική επιτροπή και για τις γνώσεις που μου μετέφεραν κατά τη διάρκεια φοίτησής μου στο Ε.Μ.Π.

Οφείλω να εκφράσω θερμές ευχαριστίες στην υποψήφια Διδάκτορα Β. Γκόγκολα, συνεργάτιδα του Δρ. Δ. Σταμόπουλου στο Ι.Ε.Υ. του ΕΚΕΦΕ ‘Δημόκριτος’, για την βοήθεια που μου προσέφερε στο πειραματικό μέρος της εργασίας και για τις πολύτιμες συμβουλές και υποδείξεις.

Τέλος, θα ήθελα να πω ένα μεγάλο ευχαριστώ στους ανθρώπους του οικογενειακού και φιλικού μου περιβάλλοντος για τη στήριξη, την ενθάρρυνση και την ανιδιοτελή προσφορά τους όλα αυτά τα χρόνια.



## **ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ**

1 .....	15
Εισαγωγή.....	15
1.1. Η Φυσική στην Ιατρική Διάγνωση.....	15
1.2. Το οπτικό μικροσκόπιο .....	18
1.3. Το ηλεκτρονικό μικροσκόπιο .....	19
1.4. Το Μικροσκόπιο Ατομικής Δύναμης και οι εφαρμογές του στην Ιατρική διάγνωση..	21
BIBΛΙΟΓΡΑΦΙΑ - ΑΝΑΦΟΡΕΣ .....	24
2 .....	27
Γνωστικό υπόβαθρο και ειδικά θέματα της διπλωματικής εργασίας .....	27
2.1. Το ανθρώπινο αίμα.....	28
2.2. Φυσιολογία ερυθροκυττάρου .....	29
2.2.1. Ο κύκλος ζωής του ερυθροκυττάρου .....	30
2.3. Γεωμετρικά χαρακτηριστικά ερυθροκυττάρου .....	32
2.3.1. Η ερυθροκυτταρική μεμβράνη .....	33
2.4. Ο ρόλος της θερμοκρασίας στη σταθερότητα των ΕΑ.....	36
2.4.1. In vitro μελέτες.....	36
2.4.2. In vivo μελέτες σε διάφορα είδη οργανισμών .....	38
2.5. Σκοπός, συνθήκες, αποτελέσματα και μελλοντικοί στόχοι της παρούσας διπλωματικής εργασίας.....	39
BIBΛΙΟΓΡΑΦΙΑ - ΑΝΑΦΟΡΕΣ .....	43
3 .....	46
Δείγματα και πειραματικές μέθοδοι .....	46
3.1. Αιμοληψία .....	46
3.2. Δημιουργία δειγμάτων με μειωμένο αιματοκρίτη .....	47
3.3. Προετοιμασία πειράματος.....	48
3.4. Πειραματικές μέθοδοι .....	49
3.3.1. Διάταξη δημιουργίας υμενίων αίματος .....	49
3.4.2. Οπτικό Μικροσκόπιο.....	50
3.4.3. Μικροσκόπιο Ατομικής Δύναμης.....	54
3.4.4. Ψηφιακό Θερμόμετρο .....	58

3.4.5. Θερμαινόμενος δειγματοφορέας .....	60
BIBΛΙΟΓΡΑΦΙΑ - ΑΝΑΦΟΡΕΣ .....	69
4 .....	70
Πειραματικά αποτελέσματα και συζήτηση .....	70
4.1. Μεταβολή των μικροσκοπικών γεωμετρικών χαρακτηριστικών των ΕΑ στην περιοχή θερμοκρασιών 20 – 90 °C .....	73
4.1.1. Εξάρτηση διαμέτρου από τη θερμοκρασία .....	74
4.1.2. Εξάρτηση ύψους από τη θερμοκρασία .....	76
4.1.3. Εξάρτηση επιφάνειας από τη θερμοκρασία .....	79
4.2. Μεταβολή των νανοσκοπικών χαρακτηριστικών της μεμβράνης των ΕΑ στην περιοχή θερμοκρασιών 20 – 90 °C .....	81
4.3. Μεταβολή των μικροσκοπικών γεωμετρικών χαρακτηριστικών των ΕΑ στην περιοχή θερμοκρασιών 20 – 510 °C .....	88
4.4. Συμπληρωματική μελέτη των ΕΑ με ΟΜ στην περιοχή θερμοκρασιών 20 – 510 °C .....	99
BIBΛΙΟΓΡΑΦΙΑ - ΑΝΑΦΟΡΕΣ .....	102
5 .....	103
Συμπεράσματα και μελλοντικοί στόχοι .....	103
5.1. Συμπεράσματα .....	104
5.2. Μελλοντικοί στόχοι .....	106
BIBΛΙΟΓΡΑΦΙΑ - ΑΝΑΦΟΡΕΣ .....	108
ΤΑΥΤΟΤΗΤΑ ΔΟΤΩΝ .....	109

# 1

## *Εισαγωγή*

### **1.1. Η Φυσική στην Ιατρική Διάγνωση**

Έως σήμερα, έχουν σημειωθεί ραγδαίες εξελίξεις στη Φυσική, κάποιες από τις οποίες έχουν βρει άμεση εφαρμογή στην Ιατρική. Ο ρόλος που διαδραματίζει η Φυσική στην ιατρική κοινότητα, κατέστησε αναγκαία την επινόηση νέων τεχνικών για διάγνωση και θεραπεία ποικίλων ασθενειών. Έτσι άρχισαν να συγκλίνουν οι δυο ανεξάρτητοι έως τότε τομείς και από το συγκερασμό τους δημιουργήθηκαν νέοι κλάδοι όπως η Ακτινοφυσική, Βιοφυσική, Βιοϊατρική, Πυρηνική Ιατρική και άλλοι. Και οι φυσικοί όλο και περισσότερο αφουγκράζονται τις απαιτήσεις του ιατρικού λειτουργήματος, όταν εκείνες καθορίζουν την κατεύθυνση της νέας τους έρευνας.

Το καλύτερο γνωστό παράδειγμα για τη σύνδεση μεταξύ της Φυσικής και της Ιατρικής, είναι η χρήση των ακτίνων-X για να βοηθήσει στον εντοπισμό και την θεραπεία μιας σειράς ασθενειών. Ο Wilhelm Rontgen ανακάλυψε τις ακτίνες-X το Νοέμβριο του 1895 στο Wurzburg της Γερμανίας. Σήμερα, οι ακτίνες-X χρησιμοποιούνται κλινικά στην εξέταση του ανθρώπινου σώματος. Τέτοιες

ακτινολογικές μέθοδοι είναι: η συμβατική ακτινογραφία και ως εξέλιξη αυτής, η αξονική τομογραφία που απεικονίζει σε κάθετες τομές ολόκληρο το σώμα [1].

Η βασική έρευνα της φυσικής συνετέλεσε στην ανάπτυξη επιπλέον απεικονιστικών μεθόδων. Η Πυρηνική Μαγνητική Τομογραφία (PMT) (Magnetic Resonance Imaging - MRI), βασίζεται στον Πυρηνικό Μαγνητικό Συντονισμό, κβαντικό φαινόμενο που καταδείχθηκε αρχικά από τον E. Purcell και τον F. Bloch προς το τέλος της δεκαετίας του '40. Τα συστήματα απεικόνισης που βασίζονται σε αυτό το φαινόμενο, αναπτύχθηκαν αρχικά στη δεκαετία του '70, και η PMT αποτελεί ένα ισχυρό κλινικό εργαλείο [2].

Μια άλλη κατηγορία διαγνωστικών μεθόδων βασίζεται στα χρήση ραδιοϊσοτόπων. Αυτά είναι ραδιενεργές ουσίες που χορηγούνται στον ασθενή με τη μορφή ραδιοφαρμάκων. Επειδή τα ραδιοϊσότοπα έχουν πολύ μικρό χρόνο ζωής, πρέπει να παράγονται κοντά στο νοσοκομείο όπου χρησιμοποιούνται. Η παραγωγή γίνεται με τη χρήση δεσμών πρωτονίων μεγάλης έντασης που προέρχονται από επιταχυντές. Καθώς αυτές οι ουσίες διασπώνται, εκπέμπουν σωματίδια που ανιχνεύονται και αναλύονται. Στον ασθενή χορηγείται κατάλληλη δόση ραδιοφάρμακου το οποίο έχει σχεδιαστεί να συγκεντρώνεται σε συγκεκριμένα σημεία στον οργανισμό όπου υπάρχουν καρκινικά κύτταρα ή παρατηρείται ασυνήθιστη μεταβολική διεργασία, καθιστώντας τα πηγή ακτινοβολίας  $\gamma$ . Το ραδιενεργό ισότοπο, κυκλοφορεί διαμέσου του κυκλοφορικού συστήματος με σκοπό να φτάσει το όργανο το οποίο επιθυμούμε να εξετάσουμε. Ακολουθεί η εξαύλωση του ποζιτρονίου, και μέσω της Τομογραφίας Εκπομπής Ποζιτρονίων (ΤΕΠ) (Positron Emission Tomography- PET) ανιχνεύεται το ακριβές σημείο που έλαβε χώρα η εξαύλωση όπως επίσης και την συγκέντρωση του ισοτόπου στο σημείο αυτό. Η ΤΕΠ Βασίζεται στο φαινόμενο της εξαύλωσης ενός ποζιτρονίου όταν συναντάει ένα ηλεκτρόνιο και της επακόλουθης εκπομπής δύο φωτονίων ακτινοβολίας -  $\gamma$  με γωνία εκπομπής 180 μοιρών που ανιχνεύονται από ειδικούς κρυστάλλους-ανιχνευτές. Χρησιμοποιείται τόσο στη διάγνωση και σταδιοποίηση της νόσου. Επίσης, υπάρχει και η  $\gamma$ -κάμερα που έχει την ικανότητα να αντιλαμβάνεται τις συντεταγμένες ( $x$ ,  $y$ ) ενός σημείου εκπομπής ενός φωτονίου καθώς αυτό αλληλεπιδρά με ένα ανιχνευτή μεγάλης επιφάνειας για να καταγραφεί η κατανομή του ραδιοφάρμακου στο όργανο ή ιστού. Η κάμερα έχει μία έως τρεις κεφαλές που περιστρέφονται εξωτερικά του ασθενούς και συλλαμβάνει τους σπινθηρισμούς της ραδιενεργού ουσίας [3]. Συνεπώς στις μεθόδους της Πυρηνικής Ιατρικής, οι ιστοί λειτουργούν ως «πομποί».



Όμως, κάθε ιστός του σώματος έχει μια ειδική συμπεριφορά και στους υπερήχους. Η Υπερηχοτομογραφία (ΥΤ) είναι μία ιατρική απεικονιστική μέθοδος που παράγει εικόνες μερών του ανθρώπινου σώματος χρησιμοποιώντας τους υπερήχους. Χρησιμοποιείται μία δέσμη από υπερήχους ορισμένης συχνότητας που εκπέμπεται από τον ηχοβολέα, το εξάρτημα του υπερηχογράφου που έρχεται σε επαφή με το ανθρώπινο σώμα. Ο ηχοβολέας στέλνει υπερήχους (ηχητικά κύματα σε υψηλότερες συχνότητες από τις ακουστές) προς το σώμα με κατεύθυνση που καθορίζει ο εξεταστής, και ταυτόχρονα δέχεται τις ανακλάσεις τους και τις περνά στον ηλεκτρονικό υπολογιστή. Ο εκάστοτε ιστός ανακλά, ή διαθλά διαφορετικό ποσό κυμάτων από αυτά που δέχεται. Έτσι ο υπολογιστής αφού δεχτεί τις ανακλάσεις και γνωρίζοντας το ποσό των κυμάτων που στάλθηκαν, αποδίδει ένα χρώμα ή μία απόχρωση του γκρι σε κάθε ιστό και τα εμφανίζει σε μία οθόνη σαν εικόνες. Εξέλιξη της ΥΤ αποτελεί η Ελαστογραφία που δίνει τη δυνατότητα στον Ακτινολόγο να διακρίνει την σκληρότητα και την ελαστικότητα των ιστών. Παρέχεται επομένως, τόσο μια αναίμακτη βιοψία όσο και μια εικονική ψηλάφηση, η οποία προσεγγίζει πολλές παθολογικές καταστάσεις [4].

Εκτός από το ηχητικό φάσμα, και το ηλεκτρομαγνητικό παρέχει μεθόδους απεικόνισης οι οποίες χρησιμοποιούνται από διάφορους ιατρικούς κλάδους. Η Οπτική Τομογραφία χρησιμοποιεί ηλεκτρομαγνητική ακτινοβολία στο κοντινό υπέρυθρο: 700 nm έως 900 nm. Βασίζεται στην εξέταση του φωτός που ανακλάται πίσω από τις εσωτερικές δομές του αντικειμένου που παρακολουθείται. Μέσω οπτικής ίνας που μεταφέρει ηλεκτρομαγνητική ακτινοβολία χαμηλής ενέργειας σε ένα μέρος της επιφάνειας του σώματος που εξετάζεται, μπορεί να μετρηθεί η διαδιδόμενη ή ανακλώμενη έντασης σε αποστάσεις μέχρι 10 cm [5]. Συμπερασματικά, όλες οι παραπάνω μέθοδοι αφορούν σε αντικείμενα που είναι ορατά με γυμνό μάτι δηλαδή μεγαλύτερα του 0,1 mm.

Όμως, η επιστημονική έρευνα επεκτείνεται και σε μικροσκοπικό επίπεδο, με τεχνικές απεικόνισης κυττάρων και γενικά μικροδομών, για διαγνωστικούς σκοπούς. Το πιο διαδεδομένο στην κλινική διάγνωση είδος μικροσκοπίου, είναι το οπτικό. Όμως, μελέτη βιοψικού υλικού όπως το αίμα, μπορεί να πραγματοποιηθεί και με ηλεκτρονικό μικροσκόπιο σάρωσης, αλλά και με μία νεότερη μέθοδο, τη Μικροσκοπία Ατομικής Δύναμης (ΜΑΔ) που χρησιμοποιήθηκε στην παρούσα διπλωματική εργασία.

## 1.2. Το οπτικό μικροσκόπιο

Για αντικείμενα μεγέθους μέχρι  $10^{-7}$  m (100 nm), μπορεί να χρησιμοποιηθεί το Οπτικό Μικροσκόπιο (ΟΜ). Η παρατήρηση μπορεί να γίνει είτε μέσω του ανακλώμενου, είτε μέσω του διερχόμενου από τα προς παρατήρηση αντικείμενα, φωτός [6], [7]. Έχει ευρεία χρήση στη Βιολογία, Χημεία, Μεταλλουργία, Επιστήμη των Υλικών κ.λ.π. Υπάρχουν διάφορα είδη οπτικού μικροσκοπίου. Ανάλογα με τη διάταξη των φακών και τον τρόπο παρατήρησης τα οπτικά μικροσκόπια διακρίνονται σε μικροσκόπια φωτεινού πεδίου, σκοτεινού πεδίου, αντίθεσης, αντίθεσης διαφορικής συμβολής, πολωτικό μικροσκόπιο κλπ.

- **Οπτικό μικροσκόπιο διέλευσης και ανάκλασης:** Χρησιμοποιείται για την παρατήρηση, υπό μεγέθυνση (μέχρι και 1000 x), αντικειμένων που βρίσκονται πολύ κοντά σε έναν συγκλίνοντα φακό (τον αντικειμενικό φακό), πολύ μικρής εστιακής απόστασης, ο οποίος σχηματίζει ένα πραγματικό είδωλο. Το είδωλο αυτό μεγεθύνεται από έναν άλλο συγκλίνοντα φακό (τον προσοφθάλμιο), ο οποίος σχηματίζει ένα φανταστικό είδωλο σε απόσταση από τον οφθαλμό του παρατηρητή στα όρια της ευκρινούς όρασης. Αυτό το είδωλο παρατηρεί ο οφθαλμός. Το μικροσκόπιο διέλευσης έχει διακριτική ικανότητα 200-300 nm [8].
- **Μικροσκόπιο φωτεινού πεδίου (Brightfield microscopy).** Δέσμη φωτός πέφτει στο παρασκεύασμα, διέρχεται από αυτό και μέσω της οπτικής οδού του μικροσκοπίου η εικόνα φτάνει στο όργανο παρατήρησης (μάτι, camera). Για δημιουργία αντίθεσης και παρατήρηση, απαιτείται σταθεροποίηση και χρώση των βιολογικών δειγμάτων (Ιστοχημική ή ανοσο-ιστοχημική).
- **Μικροσκόπιο σκοτεινού πεδίου (Dark-field microscope).** Μπορούν να μελετηθούν αντικείμενα με σημαντική σκέδαση φωτός. Με έναν αδιαφανή δίσκο, σκεπάζεται το κέντρο του φακού με αποτέλεσμα το παρασκεύασμα να φωτίζεται μόνο από πολύ πλάγιες ακτίνες που δεν εισέρχονται στον αντικειμενικό φακό παρά μόνο αν υποστούν διάθλαση μέσα στο δείγμα. Έτσι η εικόνα που παρατηρούμε είναι φωτεινό αντικείμενο (από διάθλαση των ακτινών μέσα στο δείγμα) σε σκοτεινό πεδίο [9]. Αυτό το είδος μικροσκοπίου συνιστάται για τη παρατήρηση μονοκύτταρων οργανισμών που θέλουμε να τους παρατηρήσουμε ζωντανούς και χωρίς προσθήκη χρωστικών ουσιών.

- **Μικροσκόπιο αντίθεσης διαφορικής συμβολής** (Differential interference contrast, Nomarski microscope). Το μικροσκόπιο αυτού του είδους εφαρμόζεται σε δείγματα που δε δίνουν ποιοτικές εικόνες στο φωτεινού πεδίου μικροσκόπιο [9]. Αποτελεί εξέλιξη του μικροσκοπίου συμβολής που η μόνη χρήση του ήταν η απεικόνιση του όγκου κυττάρων και κυτταρικών οργανιδίων.
- **Πολωτικό μικροσκόπιο** (Polarising microscope). Μέσω πολωτή, το δείγμα φωτίζεται από πολωμένο πλέον φως. Αν το δείγμα είναι ανισότροπο τότε προκαλεί στροφή του επιπέδου ταλάντωσης των φωτεινών ακτίνων η οποία γίνεται αντιληπτή με τη βοήθεια του αναλυτή. Στο μάτι του παρατηρητή η διαφορά αυτή εμφανίζεται ως μεταβολή στη φωτεινότητα του παρασκευάσματος [10]. Το δείγμα φαίνεται φωτεινό και το υπόβαθρο μαύρο. Τα μικροσκόπια αυτά είναι χρήσιμα για τη παρατήρηση παρασκευασμάτων με κρυσταλλική δομή.
- **Μικροσκόπιο φθορισμού** (Fluorescent microscope). Το δείγμα εκτίθεται σε σε μονοχρωματική ακτινοβολία και παρατηρείται ο φθορισμός του στο ορατό φάσμα μέσω αποδιέγερσης με εκπομπή ακτινοβολίας μήκους κύματος μεγαλύτερου από αυτό της διεγείρουσας ακτινοβολίας [9]. Κλασικές εφαρμογές μικροσκοπίας φθορισμού είναι: ο εντοπισμός μακρομορίων (πρωτεΐνες, DNA) στο κύτταρο, η μελέτη κυτταρικών λειτουργιών, ενώ χρησιμοποιείται και για διαγνωστικούς σκοπούς σε προστατικό υγρό, δείγματα από το γυναικείο γεννητικό σύστημα, δείγματα για μύκητες (τρίχες, νύχια, κ.α.).

### 1.3. Το ηλεκτρονικό μικροσκόπιο

Λεπτομέρειες διαστάσεων της τάξεως των 0,2 μm μπορούν να παρατηρηθούν με ένα καλό ερευνητικό ΟΜ. Για την παρατήρηση μικρότερων δομών, χρησιμοποιείται το Ηλεκτρονικό Μικροσκόπιο (ΗΜ) το οποίο έχει διακριτική ικανότητα στην κλίμακα των νανομέτρων (nm) δίνοντας τη δυνατότητα παρατήρησης νανοσκοπικών μορφολογικών χαρακτηριστικών ενός δείγματος. Το πρώτο ΗΜ κατασκευάστηκε το 1933 από το Γερμανό μηχανικό E. Ruska, ο οποίος τιμήθηκε με μισό βραβείο Νόμπελ Φυσικής του 1986. Το ΗΜ αντίθετα από ένα ΟΜ, χρησιμοποιεί δέσμη ηλεκτρονίων υψηλής ενέργειας αντί για φως στο ορατό φάσμα

της ηλεκτρομαγνητικής ακτινοβολίας. Η πηγή ηλεκτρονίων αποτελείται από ένα νήμα βολφραμίου (ή ακίδα  $\text{LaB}_6$ ) που όταν περάσει από αυτό ηλεκτρικό ρεύμα, θερμαίνεται μέσω φαινομένου Joule σε μια θερμοκρασία  $\sim 2800\text{ K}$  και εκπέμπει ηλεκτρόνια. Μεταξύ του νήματος, που αποτελεί την κάθοδο, και της ανόδου, εφαρμόζεται μια διαφορά δυναμικού (συνήθως της τάξης των 60-100 kV) η οποία επιταχύνει τα ηλεκτρόνια. Ενδεικτικά για μια τάση 100 kV, το μήκος κύματος των ηλεκτρονίων είναι 0,0037 nm. Η πορεία των ηλεκτρονίων, ρυθμίζεται από τους ηλεκτρομαγνητικούς φακούς προκειμένου να εστιάσουμε τη δέσμη των ηλεκτρονίων πάνω στο παρασκεύασμα.

Η δέσμη των ηλεκτρονίων σαρώνει την επιφάνεια του δείγματος με το οποίον αλληλεπιδρά. Στο Ηλεκτρονικό Μικροσκόπιο Διέλευσης (ΗΜΔ), τα ηλεκτρόνια υφίστανται ισχυρή σκέδαση ή απορρόφηση από τα άτομα του δείγματος. Σκουρόχρωμες περιοχές του δείγματος είναι αυτές όπου τα ηλεκτρόνια σκεδάζονται ισχυρότερα ως αποτέλεσμα πυκνότητας του δείγματος. Στο Ηλεκτρονικό Μικροσκόπιο Σάρωσης (ΗΜΣ), από τα άτομα των στοιχείων του δείγματος εκπέμπονται κυρίως δευτερογενή (secondary) και οπισθοσκεδαζόμενα (backscattered) ηλεκτρόνια. Από τα δευτερογενή ηλεκτρόνια που φθίνουν στο σύστημα ανίχνευσης, λαμβάνουμε πληροφορίες για το ανάγλυφο όπου οι φωτεινές περιοχές αντιστοιχούν σε προεξοχές ενώ οι σκοτεινές σε εσοχές της επιφάνειας. Τα στοιχεία με μεγάλο  $Z$  προκαλούν εντονότερη οπισθοσκέδαση και εμφανίζουν φωτεινότερες περιοχές στην εικόνα. Χρησιμοποιούνται για την απεικόνιση περιοχών του δείγματος με διαφορετική χημική σύσταση.

Τα σύγχρονα όργανα διαθέτουν κατάλληλους ανιχνευτές και εκμεταλλεύονται όλους τους μηχανισμούς αλληλεπίδρασης προσπίπτουσας δέσμης και δείγματος για εξαγωγή ποιοτικών και ποσοτικών συμπερασμάτων. Το ΗΜΣ χρησιμοποιείται για τη μελέτη μιας μεγάλης ποικιλίας υλικών όπως π.χ. βιολογικά, μεμβράνες, φίλτρα, ίνες, ρητίνες, κλπ.

Τα δείγματα για να αναλυθούν απαιτείται να έχουν σχετικά υψηλή αγωγιμότητα. Για την περίπτωση βιολογικών δειγμάτων και ειδικότερα κυττάρων, αυτά επιστρώνονται με μία υπέρλεπτη στρώση από ένα μέταλλο, συνήθως  $^{79}\text{Au}$ , με πάχος που δεν ξεπερνά τα 200 Å, ώστε να εξασφαλίζεται η ιδανική αγωγιμότητα χωρίς να επηρεάζεται η ευαισθησία του οργάνου [11].

## 1.4. Το Μικροσκόπιο Ατομικής Δύναμης και οι εφαρμογές του στην Ιατρική διάγνωση

Το Μικροσκόπιο Ατομικής Δύναμης (ΜΑΔ) είναι ένα μικροσκόπιο σάρωσης με υψηλή διακριτική ικανότητα της τάξεως της νανοκλίμακας, 1000 φορές καλύτερη εκείνης του ΟΜ. Αναπτύχθηκε από τους GerdBinnig και HeinrichRohrer στις αρχές του 1980 στην IBM-Zurich και απονεμήθηκε σε αυτούς βραβείο Nobel Φυσικής το 1986. Η ερευνητική δραστηριότητα των τελευταίων ετών έχει αναδείξει το ΜΑΔ ως ένα ισχυρό εργαλείο για βιοφυσική, εμβιομηχανική έρευνα, ειδικά σε ό,τι αφορά στην κυτταρική μηχανική [12], [13]. Συγκεντρώνει πολλά πλεονεκτήματα έναντι συμβατικών μικροσκοπικών τεχνικών. Το κυριότερο είναι ότι με ελάχιστη ποσότητα δείγματος είναι εφικτή η απεικόνιση εγγενών βιολογικών μορίων και κυττάρων. Με τη μέθοδο του ΜΑΔ, πετυχαίνουμε διακριτική ικανότητα από Angstroms ( $10^{-10}$  m) μέχρι μερικά μικρά του μέτρου ( $10^{-6}$  m). Προσφέρει τρισδιάστατη αναπαράσταση της επιφάνειας του δείγματος καθώς και ποσοτικά αποτελέσματα σχετικά με την τραχύτητα, τις διαστάσεις και άλλες ιδιότητες του δείγματος [14]. Επίσης, το ΜΑΔ μπορεί να παρέχει εικόνες από δείγματα σε υδατικό διάλυμα, γεγονός που προσφέρει παρατήρηση βιολογικών μορίων και κύτταρων μέσα στα φυσιολογικά τους περιβάλλοντα για μελέτη σημαντικών βιολογικά διεργασιών [15]. Εκτενέστερη περιγραφή της διάταξης ακολουθεί στο 3<sup>ο</sup> κεφάλαιο.

Από το έτος εφεύρεσής του, το ΜΑΔ, εφαρμόζεται μεταξύ άλλων και στη Βιολογική επιστήμη και συγκεκριμένα στην απεικόνιση ΕΑ [16]. Είναι δυνατό να μελετηθούν είτε ολόκληρα κύτταρα είτε ο κυτταροσκελετός και η εσωτερική επιφάνεια της μεμβράνης λυμένων κυττάρων [17]. Έκτοτε, το ΜΑΔ βρίσκει εφαρμογή και στην Ιατρική έρευνα, με τη μελέτη των έμμορφων συστατικών του αίματος και το συσχετισμό τους με διάφορες κλινικά παθολογικές περιπτώσεις. Αξίζει να αναφερθεί η μελέτη διαφόρων ειδών αναιμίας όπως:

α) Δρεπανοκυτταρική αναιμία. Πρόκειται για μία σοβαρή, κληρονομική πάθηση του αίματος κατά την οποία, τα ΕΑ παραμορφώνονται και αποκτούν δρεπανοειδές σχήμα. Τα κύτταρα αυτά περιέχουν έναν παθολογικό τύπο αιμοσφαιρίνης, γνωστό ως αιμοσφαιρίνη S. Σε συνθήκες έλλειψης οξυγόνου η αιμοσφαιρίνη κρυσταλλώνεται και παίρνουν χαρακτηριστικό δρεπανοειδές σχήμα. Τα δρεπανοκύτταρα εμποδίζουν τη φυσιολογική κυκλοφορία του αίματος στα τριχοειδή αγγεία, δημιουργώντας προβλήματα στους πνεύμονες και στο σπλήνα.

Επίσης, σε σχέση με τα φυσιολογικά ΕΑ, τα δρεπανοκύτταρα καταστρέφονται ταχύτερα με συνέπεια την εμφάνιση συμπτωμάτων αναιμίας.

β) Η αναιμία είναι συνήθης σε ασθενείς που πάσχουν από χρόνια νεφρική ανεπάρκεια ή βρίσκονται στο τελευταίο στάδιο νεφρικής νόσου. Η νεφρική ανεπάρκεια μπορεί να οδηγήσει σε μείωση της σύνθεσης της ερυθροποιητίνης (ορμόνη που εκκρίνεται από τους νεφρούς και ρυθμίζει την ταχύτητα παραγωγής ΕΑ), με αποτέλεσμα την πτώση του αιματοκρίτη. Διαταραχές ασβεστίου - φωσφόρου, οξέων-βάσεων, και ηλεκτρολυτικές διαταραχές οφείλονται επίσης στη μείωση της νεφρικής λειτουργίας. Πολλές από αυτές τις βιοχημικές μεταβολές ενδέχεται να έχουν επιπτώσεις στο σχήμα των κυττάρων και κατά συνέπεια στην επιβίωση του ασθενούς [18].

Σε ασθενείς με χρόνια νεφρική νόσο, οι τοξίνες συσσωρεύονται με ταχύτερο ρυθμό απ' ότι αποβάλλονται και απαιτείται θεραπεία υποκατάστασης μέσω αιμοκάθαρσης (ΑΚ). Κατά τη συνεδρία ΑΚ το αίμα διέρχεται από ένα τεχνητό νεφρό μέσω εξωσωματικής γραμμής κυκλοφορίας και υφίσταται φιλτράρισμα. Όμως δεν αφαιρούνται ικανοποιητικά τοξίνες μεσαίου και μεγάλου μοριακού βάρους, μερικές από τις οποίες είναι: η ομοκυστεΐνη (Hcy) που προκαλεί υπεροκυστεϊναιμία, η β2-μικροσφαιρίνη (β2-m) που προκαλεί αμυλοϊδωση κ.α.

Εκτός από τη συμβατική ΑΚ, τα τελευταία έτη έχει αναπτυχθεί η Μαγνητικά Υποβοηθούμενη Αιμοκάθαρση (ΜΥΑΚ). Στη ΜΥΑΚ χρησιμοποιούνται σιδηρομαγνητικά νανοσωματίδια των οξειδίων του σιδήρου,  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  ή  $\text{Fe}_2\text{O}_3$ , τα οποία έχουν μέγεθος αρκετά μικρό ώστε να κυκλοφορούν στο καρδιαγγειακό αλλά και αρκετά μεγάλο ώστε να έχουν υψηλή μαγνήτιση κόρου. Επίσης, πρέπει να έχουν τη μορφή συμπλόκων με κατάλληλες βιοσυμβατές ουσίες (μέσω επικάλυψης της επιφάνειάς τους) οι οποίες θα δεσμεύουν τις τοξίνες του αίματος [19], [20]. Στη συνέχεια, τα σύμπλοκα αυτά απομακρύνονται από τον οργανισμό του ασθενούς με τη χρήση ενός κατάλληλα σχεδιασμένου Μαγνητικού Φίλτρου [21-24].

Η ΜΥΑΚ επιτυγχάνει υψηλό ρυθμό απομάκρυνσης των τοξινών λόγω ταχύτερης κινητικής των μαγνητικών φαινομένων έναντι των φαινομένων διαχύσεως που συμβαίνουν στην ημιδιαπερατή μεμβράνη του συμβατικού φίλτρου του μηχανήματος ΑΚ. Μέσω των αποτελεσμάτων της τεχνικής της ΜΑΔ έχει αποδειχθεί πειραματικά ότι η ΜΥΑΚ είναι κατά 60 % πιο αποτελεσματική από την συμβατική μέθοδο ΑΚ.

Σε συνδυασμό με το κατάλληλο είδος ΟΜ, η ΜΑΔ συντελεί στην εξαγωγή χρήσιμων συμπερασμάτων για την δομή και σύσταση των κυττάρων, που οδηγούν και στη διάγνωση διαφόρων νόσων. Οι δυνατότητες της τεχνικής ΜΑΔ έχουν κατευθύνει ρηξικέλευθες μελέτες. Η εφαρμογή της ΜΑΔ σε ένα πολύ μικρό δείγμα αίματος μπορεί να φέρει χρήσιμα αποτελέσματα των ποσοτικών χαρακτηριστικών των ΕΚ, και τις διαφοροποιήσεις που αυτά υφίστανται εξ' αιτίας της μεταβολής φυσιολογικών παραμέτρων (όπως Ph πλάσματος, θερμοκρασία κ.α.). Στην παρούσα Διπλωματική Εργασία θα ασχοληθούμε με τον προσδιορισμό των μορφολογικών χαρακτηριστικών των ΕΑ και θα συσχετίσουμε τις διαφοροποιήσεις που αυτά εμφανίζουν ως προς τη μεταβολή των θερμοκρασιακών συνθηκών.

## ***ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ - ΑΝΑΦΟΡΕΣ***

- [1] Αλειφερόπουλος Δ, *Ακτινογραφική απεικόνιση*", Εκδόσεις Βήτα, 2000
- [2] Καρατόπης Α, Κανδαράκης Ι, *Απεικόνιση Μαγνητικού Συντονισμού*, Πανεπιστημιακές εκδόσεις Αράκυνθος, 2007.
- [3] Townsend D, "PET/CT Today and Tomorrow", *Journal of Nuclear Medicine*, 2004, 45-4S-14S.
- [4] Ophir J, Céspedes I, Ponnekanti H, Yazdi Y, Li X, *Elastography: A quantitative method for imaging the elasticity of biological tissues*, *Ultrasonic Imaging Volume* 13, 2, April 1991, 111-134.
- [5] Arridge S, *Optical tomography in medical imaging*, *Inverse Problems* 15 , 1999, R41–R93.
- [6] McGraw-Hill Encyclopedia of Science & Technology 12, *Optical Microscope*, 9<sup>th</sup> edition, McGraw-Hill companies, USA, 2002, 435-441.
- [7] Mansbach J, *Introduction to Optical Microscopy-Objectives*, *MicroscMicroanal* 12(Supp 2), 2006, 1754 CD-1755 CD.
- [8] Karadaglic D, *Image formation in conventional brightfield reflection microscopes with optical sectioning property via structured illumination*, *Micron*, 39, 2008,302–310.
- [9] White G, *Introduction to Microscopy*, Butterworths, London, 1966.
- [10] Massoumian F, *Quantitative polarized light microscopy*, *Journal of Microscopy*, Vol. 209, January 2003, pp. 13–22.



- [11] Στασινοπούλου Ε, *Ηλεκτρονικό Μικροσκόπιο*, Τόμος Δ', University Studio Press, Θεσσαλονίκη, 1985, 32-43.
- [12] Girish C, Binular N, *Atomic Force microscopic study of folate receptor sinlive cells with functionalized tips*, Applied Physics Letters, 95, 2009, 223703.
- [13] Tao W, *Atomic Force Microscope Imaging of human red blood cells and their mechanical properties*, National university of Singapore, 2003.
- [14] Bhushan B, *Springer Handbook of Nanotechnology 3<sup>rd</sup> edition*, Springer-Verlag Berlin Heidelberg, 2010, 578-779.
- [15] Girasole M, Cricenti A, Generosi R, Congiu-Castellano A, Boumis G, Amiconi G, *Artificially induced unusual shape of erythrocytes: an atomic force microscopy study*. J. Microsc, 204, 2001, 46–52.
- [16] Ji X, Ma Y, *Application of atomic force microscopy in blood research*, World J Gastroenterol , 11,10, 2005, 1709-1711.
- [17] Swihart A, Mikrut J, Ketterson J, Macdonald R, *Atomic force microscopy of the erythrocyte membrane skeleton*, Journal of Microscopy, 204, 3 , 2001, 212–225.
- [18] Christopher M, *Of human loss and erythrocyte survival: uremia and anemia in chrobic kidney diasease*, Israel journal of veterinary medicine, 63 , 2008, 1.
- [19] Γκόγκολα Β, *Μελέτη της Βιοσυμβατότητας σιδηρομαγνητικών νανοδομών Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>- αλβουμίνης με τα Έμμορφα στοιχεία του αίματος*, Μεταπτυχιακή Διατριβή, Επιβλέποντες: Παναγιωτόπουλος Ι. Αναπληρωτής Καθηγητής Τμήμα Μηχανικών Επιστήμης Υλικών Πανεπιστήμιο Ιωαννίνων, Σταμόπουλος Δ. Συνεργαζόμενος Ερευνητής Ινστιτούτο Επιστήμης Υλικών Ε.Κ.Ε.Φ.Ε 'Δημόκριτος', Αθήνα 2010.

- [20] Stamopoulos D, Manios E, Gogola V, Benaki D, Bouziotis P, Niarchos D, Pissas M, *Bare and protein-conjugated Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> ferromagnetic nanoparticles for utilization in magnetically assisted hemodialysis: biocompatibility with human blood cells*, Nanotechnology, 19, 505101, 2008.
- [21] Stamopoulos D, Benaki D, Bouziotis P, Ziropiannis P, *In vitro utilization of Ferromagnetic Nanoparticles in Hemodialysis Therapy*, Nanotechnology, 18, 495102, 2007.
- [22] Stamopoulos D, Bouziotis P, Benaki D, Kotsovasilis C, Ziropiannis P, *Utilization of Nanobiotechnology in Hemodialysis: Mock-Dialysis Experiments on Homocysteine*, Nephrology Dialysis and Transplantation, 23, 3234, 2008.
- [23] Stamopoulos D, Bouziotis P, Benaki D, Kotsovasilis C, Ziropiannis P, Belessi V, Dalamagas V, Papadopoulos K, *Nanobiotechnology for the Prevention of Dialysis-Related Amyloidosis*, Therapeutic Apheresis and Dialysis, 13, 1, 2009, 34-41.
- [24] Stamopoulos D, Benaki D, Bouziotis P, Kotsovasilis C, Ziropiannis P, *Magnetically Assisted Hemodialysis: A New Strategy for the Treatment of End Stage Renal Failure*, Nova Science Publishers, 2009.

# 2

## ***Γνωστικό υπόβαθρο και ειδικά θέματα της διπλωματικής εργασίας***

Κίνητρο για τη διεξαγωγή της παρούσας διπλωματικής εργασίας αποτέλεσε η επιθυμία για εκτενέστερη μελέτη των έμμορφων συστατικών του αίματος και πώς αυτά αντιδρούν στη θερμική καταπόνηση. Το ενδεχόμενο πιθανής αιμόλυσης των ΕΑ όταν αυτά εκτίθενται σε μη φυσιολογικές (για τον ανθρώπινο οργανισμό) θερμοκρασίες, έδωσε το έναυσμα για διεξαγωγή μελέτης σε ένα ευρύ φάσμα θερμοκρασιών. Δεδομένου ότι η φυσιολογική θερμοκρασία του ανθρώπινου σώματος είναι 36,12 έως 37,5 °C , τα ΕΑ της παρούσας μελέτης εκτίθενται σε θερμοκρασίες: σχεδόν φυσιολογικές (35-37 °C), ήπια μη φυσιολογικές (37-42 °C) και αφύσικα υψηλές θερμοκρασίες (έως 510 °C). Επιθυμούμε να εξετάσουμε σε *in vitro* συνθήκες την πιθανή τροποποίηση χαρακτηριστικών όπως η διάμετρος, η επιφάνεια και το ύψος των ΕΑ σε εμπύρετη κατάσταση. Η μελέτη των δομικών και μορφολογικών χαρακτηριστικών των ΕΑ σε επίπεδο νανοκλίμακας επιτυγχάνεται με τεχνικές Μικροσκοπίας. Μια σημαντική αύξηση του ποσού θερμότητας που δέχεται το αίμα, ενδεχομένως να επιφέρει συνέπειες στα μορφολογικά χαρακτηριστικά των ΕΑ που θα επηρεάσουν την επιβίωση του κυττάρου και θα συσχετίζονται με την αιμόλυσή τους.

## 2.1. Το ανθρώπινο αίμα

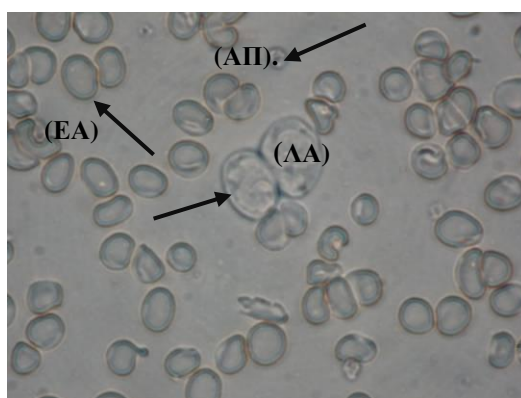
Από άποψη φυσικών ιδιοτήτων, το αίμα οπτικά εμφανίζεται ως κόκκινο υγρό ελαφρώς πυκνότερο από το νερό. Καθώς μεταφέρει διάφορες ουσίες, δρα ως μηχανισμός μεταφοράς μικρών ποσοτήτων ορμονών που ελέγχουν τις χημικές διεργασίες του οργανισμού και περιέχει ηλεκτρολύτες (ιόντα μετάλλων). Επιπλέον, συμβάλλει στην άμυνα του οργανισμού και ρυθμίζει τη θερμοκρασία του σώματος. Το αίμα ενός ενήλικα μέσου βάρους 80 Kg είναι περίπου 5 - 6 λίτρα και αποτελεί το 7 % της συνολικής σωματικής μάζας. Μαζί με τα αγγεία και την καρδιά, αποτελεί το καρδιαγγειακό σύστημα. Κατά την κυκλοφορία του διαμέσου της καρδιάς, των αρτηριών, των φλεβών και των τριχοειδών αγγείων επιτελεί διάφορες λειτουργίες όπως η μεταφορά θρεπτικών ουσιών, ορμονών, βιταμινών, θερμότητας και οξυγόνου στους ιστούς και την απομάκρυνση άχρηστων ουσιών που παράγονται κατά τον μεταβολισμό και του διοξειδίου του άνθρακα. Σε περίπτωση κάποιου τραυματισμού εκλύεται κυρίως φλεβικό αίμα δεδομένου ότι οι φλέβες βρίσκονται πλησιέστερα στο δέρμα. Το φλεβικό αίμα έχει σκούρο ερυθρό χρώμα λόγω μειωμένου οξυγόνου [1].

Το 55 % του αίματος αποτελεί το πλάσμα, ένα υποκίτρινο υγρό που έχει σαν κύριο συστατικό το νερό, όπου είναι διαλυμένα άλατα, υδατάνθρακες, πρωτεΐνες, λίπη, βιταμίνες, ορμόνες αλλά και τοξικές ουσίες. Όπως προκύπτει από την εξέταση του με διάφορες φυσικές τεχνικές, αποτελείται από έμμορφα συστατικά (κύτταρα) που αιωρούνται μέσα σε υγρό περιβάλλον. Τα κύτταρα αυτά είναι τα **ερυθρά αιμοσφαίρια (ΕΑ)**, τα **λευκά αιμοσφαίρια (ΛΑ)** και τα **αιμοπετάλια (ΑΠ)**.

Κύτταρα	Πληθυσμός /mm <sup>3</sup>	Διάρκεια ζωής (ημέρες)	Μέση διάμετρος (μm)	Χρώμα
ΕΑ	$4-6 \cdot 10^6$	120	7-8	ερυθρό
ΛΑ	$6-8 \cdot 10^3$	14	9-15	λευκό
ΑΠ	$3 \cdot 10^5$	3	1-4	άχρωμο

Τα κύτταρα του αίματος παράγονται στον ερυθρό μυελό των οστών και επιτελούν διάφορες λειτουργίες. Συγκεκριμένα: τα ΕΑ μεταφέρουν το οξυγόνο από τους πνεύμονες στα κύτταρα και το διοξείδιο του άνθρακα από τα κύτταρα στους πνεύμονες. Τα ΛΑ έχουν ακανόνιστο σχήμα, διαθέτουν πυρήνα και είναι υπεύθυνα

για την άμυνα του οργανισμού απέναντι στα παθογόνα μικρόβια και σε τοξικούς παράγοντες. Η αύξηση τους υποδηλώνει κάποια λοίμωξη στο σώμα ή ακόμα και λευχαιμία. Υπάρχουν διαφορετικοί τύποι λευκοκυττάρων και η καταγραφή τους γίνεται με μια εξέταση που λέγεται διαφορική μέτρηση. Τα ΑΠ δε διαθέτουν πυρήνα και σχετίζονται με τη θρομβωτική λειτουργία του αίματος και την αιμόσταση, δηλαδή στην αναστολή της αιμορραγίας ή της κυκλοφορίας μέσω έκκρισης του ενζύμου της θρομβοκινάσης [2].



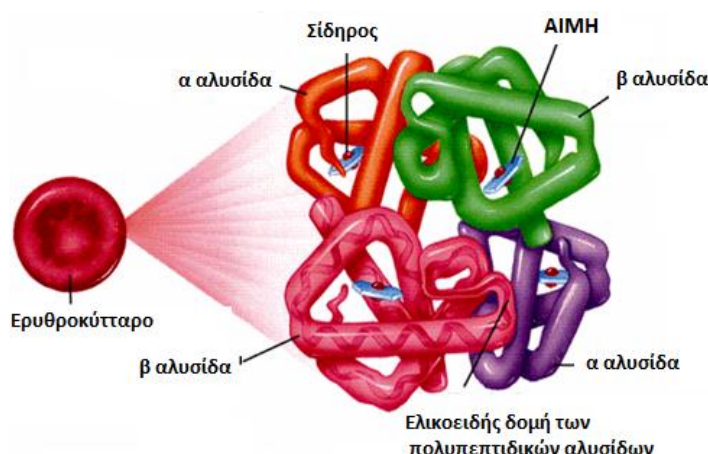
**Εικόνα 1:** Φωτογραφία ολικού αίματος από οπτικό μικροσκόπιο. Καταδεικνύονται ένα ΕΑ (RBC), ένα ΛΑ (WBC) και ένα ΑΠ (Plt).

## 2.2. Φυσιολογία ερυθροκυττάρου

Τα ΕΑ αποτελούν το 38 % με 48 % του πλήρους αίματος. Παρατηρήθηκαν για πρώτη φορά το 17<sup>ο</sup> αιώνα από τον Antony van Leeuwenhoek με οπτικό μικροσκόπιο, γεγονός που σηματοδότησε την ευρεία χρήση του οργάνου.

Το ώριμο ΕΑ ως κύτταρο δεν έχει πυρήνα επομένως ούτε RNA, δεν έχει ριβοσώματα δε συνθέτει πρωτεΐνες και δεν διαθέτει μιτοχόνδρια, δηλαδή έχει χάσει την ικανότητα παραγωγής ATP (τριφωσφορική αδενοσίνη). Η σύστασή του είναι 60 % νερό και 40 % πρωτεΐνες, από τις οποίες το 35 % είναι *αιμοσφαιρίνη* ή *αιμοκλοβίνη* (*Hb*), μια σύνθετη μεταλλοπρωτεΐνη. Η αιμοσφαιρίνη αποτελείται από μια πρωτεΐνη, τη σφαιρίνη και από την αίμη. Η αίμη ενώνεται με τη σφαιρίνη με την εξής αναλογία: 4 μόρια αίμης με 1 μόριο σφαιρίνης. Η σφαιρίνη αποτελείται από δυο ζεύγη πολυπεπτιδικών αλυσίδων. Συγκεκριμένα, το χρώμα του ΕΑ οφείλεται στη παρουσία της αίμης που αποτελείται από ένα πορφυρινικό δακτύλιο με ένα κεντρικό άτομο σιδήρου ( $\text{Fe}^{2+}$ ), το οποίο συνδέεται αντιστρεπτά με το Οξυγόνο μέσω της αναπνοής.

Συνεπώς, η αιμοσφαιρίνη, παραλαμβάνει από τους πνεύμονες το οξυγόνο, το οποίο μεταφέρει στους ιστούς για να χρησιμοποιηθεί στις καύσεις. Μεταφέρει επίσης το περιττό (23 %) ποσοστό του CO<sub>2</sub>, που παράγεται στους ιστούς και το απελευθερώνει στους πνεύμονες για να απομακρυνθεί στην ατμόσφαιρα μέσω της εκπνοής [3] [4]. Το μέσο ΕΑ περιέχει 350.000.000 μόρια αιμοσφαιρίνης, καθένα από τα οποία μπορεί να μεταφέρει 4 μόρια οξυγόνου. Τα ανθρώπινα ερυθρά αιμοσφαίρια αποθηκεύουν συνολικά γύρω στα 2.5 γραμμάρια σιδήρου, περίπου το 65% από τη συνολική ποσότητα που περιέχεται στο σώμα.

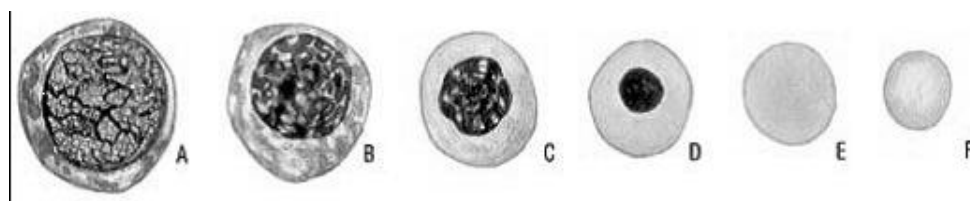


**Εικόνα 2:** Το ΕΑ περιέχει μόρια αιμοσφαιρίνης που το καθένα μεταφέρει 4 μόρια οξυγόνου.

### 2.2.1. Ο κύκλος ζωής του ερυθροκυττάρου

Σε έναν ενήλικα τα ΕΑ παράγονται στο μυελό των οστών μετά την επίδραση της ερυθροποιητίνης. Τα ΕΑ είναι το τελικό προϊόν ωρίμανσης της ερυθροποιητικής σειράς. Από το μυελό των οστών με τη διαφοροποίηση των αρχέγονων βλαστικών κύτταρων, προέρχεται το μητρικό κύτταρο της ερυθρής σειράς, η προερυθροβλάστη. Με αλληπάλληλες διαιρέσεις, η ώριμη ερυθροβλάστη, χάνει τον πυρήνα της λίγο πριν εισέλθει στο κυκλοφορικό. Η ερυθροποιητίνη είναι μια γλυκοπρωτεΐνη που παράγεται στους νεφρούς (90 %) και το ήπαρ (10 %). Ερέθισμα για την παραγωγή ερυθροποιητίνης αποτελεί η έλλειψη οξυγόνου από τους ιστούς (υποξία). Ο μυελός των οστών κάτω από την επίδραση της ερυθροποιητίνης και μόνο επί παρουσίας θρεπτικών ουσιών όπως σιδήρου, βιταμίνης B12, φυλλικού οξέως, παράγει τα ΕΑ τα οποία και απελευθερώνει στο αίμα. Η διάρκεια ζωής τους είναι περίπου 4 μήνες. Σε

αυτό το χρονικό διάστημα διασχίζει χιλιάδες φορές την κυκλοφορία, επιτελώντας την κύρια λειτουργία του που είναι η ανταλλαγή των αερίων της αναπνοής, καταπονείται από τα τριχοειδή της, και τις μεταβολές της θερμοκρασίας, του pH, και της πίεσης των αγγείων. Η καταστροφή τους γίνεται στο ενδοθηλιακό σύστημα του σπλήνα. Εκεί συμπίεζονται, ακινητοποιούνται, απορροφούν νερό και αιμολιώνται. Η αιμοσφαιρίνη χύνεται στην κυκλοφορία. Σε περιπτώσεις αφαίρεσης του σπλήνα, ο αριθμός των παθολογικών, γερασμένων κύτταρων που κυκλοφορούν στο αίμα αυξάνεται σημαντικά [5].



**Εικόνα 3:** Ωρίμαση των κυττάρων της ερυθροκυτταρικής σειράς (A=προερυθροβλάστη, B=βασεόφιλη ή άωρη ερυθροβλάστη, C=πολυχρωματόφιλη ή ενδιάμεση ερυθροβλάστη, D=οξύφιλη ή ώριμη ερυθροβλάστη, E=δικτυοερυθροκύτταρο, F=ερυθροκύτταρο).

Όταν σε ένα άτομο τα ΕΑ έχουν το φυσιολογικό μέγεθος και σχήμα αλλά είναι λιγότερα στον αριθμό, τότε το άτομο πάσχει από αναιμία και μπορεί να παρουσιάζει συμπτώματα κόπωσης και αδυναμίας. Έτσι για παράδειγμα η χρόνια νεφρική ανεπάρκεια προκαλεί μείωση της παραγωγής της ερυθροποιητίνης και αναιμία. Αναιμία μπορεί να οφείλεται σε χρόνια νοσήματα που προκαλούν βλάβη στο μυελό των οστών, όπως καρκινώματα, χρόνιες φλεγμονές, λευχαιμίες, νοσήματα που προκαλούν αιμόλυση και αυξημένη καταστροφή ερυθρών όπως κληρονομικές θαλασσαιμίες και δρεπανοκυτταρικά σύνδρομα. Αυτός είναι ο λόγος που η ασφαλής διερεύνηση ορισμένων περιπτώσεων αναιμίας μπορεί να απαιτεί εκτεταμένο εργαστηριακό έλεγχο σε κλινικό περιβάλλον. Η παρατήρηση ορισμένων μορφολογικά παθολογικών ΕΑ (σφαιροκύτταρα, ελλειπτοκύτταρα, δρεπανοκύτταρα, στοχοκύτταρα, ακανθοκύτταρα κλπ) βοηθά σημαντικά στην διαγνωστική προσέγγιση. Ενώ από την κλασσική γενική αίματος και τους ερυθροκυτταρικούς δείκτες (μέσος όγκος ερυθρών Mean Corpuscular Volume, MCV, εύρος κατανομής RDW = (Standard deviation of MCV ÷ mean MCV) × 100) η προσέγγιση θα ήταν μάλλον δύσκολη ή και αδύνατη δεδομένου ότι οι κλινικές μέθοδοι δίνουν πληροφορία στην κλίμακα των μικρομέτρων ( $10^{-6}\text{m}$ ).

Η εκατοστιαία αναλογία ΕΑ ανά μονάδα όγκου αίματος ονομάζεται *αιματοκρίτης (Hct)*. Φυσιολογικά ο αιματοκρίτης κυμαίνεται μεταξύ από 40 – 54 % στους άνδρες και 37-47 % στις γυναίκες.

### 2.3. Γεωμετρικά χαρακτηριστικά ερυθροκυττάρου

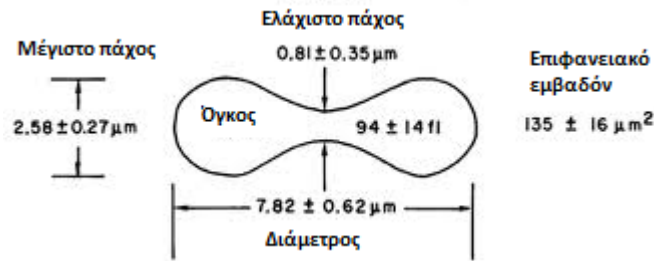
Τα φυσιολογικό ώριμο ΕΑ έχει δισκοειδές σχήμα, αλλά είναι λεπτότερο στο κέντρο, δηλαδή έχει σχήμα αμφίκοιλο. Το αμφίκοιλο σχήμα, μαζί με την ελαστικότητα που του προσδίδει η μεμβράνη, δίνει στα ΕΑ τη δυνατότητα να διέρχονται μέσα από τα τριχοειδή ή τις σχισμές των αγγείων του σπληνός. Η κυτταρική γεωμετρία, το ιξώδες του κυτοσολίου και οι μηχανικές ιδιότητες της μεμβράνης, εξασφαλίζουν στο ερυθροκύτταρο την απαραίτητη ικανότητα ελαστικής παραμόρφωσης, αντοχή, σταθερότητα και μεταβλητότητα που χρειάζεται για να μπορεί να ανταπεξέλθει στα μικροπεριβάλλοντα της κυκλοφορίας και των ιστών.

Στα ΕΑ η κυτταρική μεμβράνη είναι το μοναδικό δομικό συστατικό το οποίο είναι υπεύθυνο για όλες τις αντιγονικές, μεταφορικές και μηχανικές ιδιότητές τους. Το ΕΑ έχει σχήμα αμφίκοιλου δίσκου καθώς χαρακτηρίζεται από περίσσεια κυτταρικής επιφάνειας ( $150 \mu\text{m}^2$ ) σε σχέση με τον κυτταρικό όγκο (85-95 fL) [6]. Η μέση διάμετρός του είναι 7,5  $\mu\text{m}$  και το μέσο πλάτος 2  $\mu\text{m}$ . Έχει αποδειχτεί πειραματικά από τον Evans σε οπτικό μικροσκόπιο ότι το εγκάρσιο σχήμα των ΕΑ είναι συνάρτηση της ακτίνας τους και της τονικότητας των περιβαλλοντικών διαλυμάτων. Έτσι επομένως προσδιορίζονται και η διάμετρος των κυττάρων, μέγιστο και ελάχιστο πάχος, εμβαδόν επιφάνειας, όγκος.

$$z(x) = (1 - (x/R)^2)^{1/2} \cdot (C_0 + C_2(x/R)^2 + C_4(x/R)^4)$$

Όπου R η ακτίνα του κυττάρου, και  $C_0$ ,  $C_2$ ,  $C_4$  είναι σταθερές που εξαρτώνται από τις συνθήκες οσμωτικότητας του διαλύματος στο οποίο βρίσκονται τα ΕΑ. Στο αίμα, τα ΕΑ βρίσκονται σε οσμωτική ισορροπία με το πλάσμα, δηλαδή η οσμωτική πίεση στο ενδοκυττάριο περιβάλλον (Hb και ιόντα) είναι ίση με αυτήν του πλάσματος (ιόντα και διαλυτές πρωτεΐνες) [7].





Εικόνα 4: Τα γεωμετρικά χαρακτηριστικά του φυσιολογικού ΕΑ.

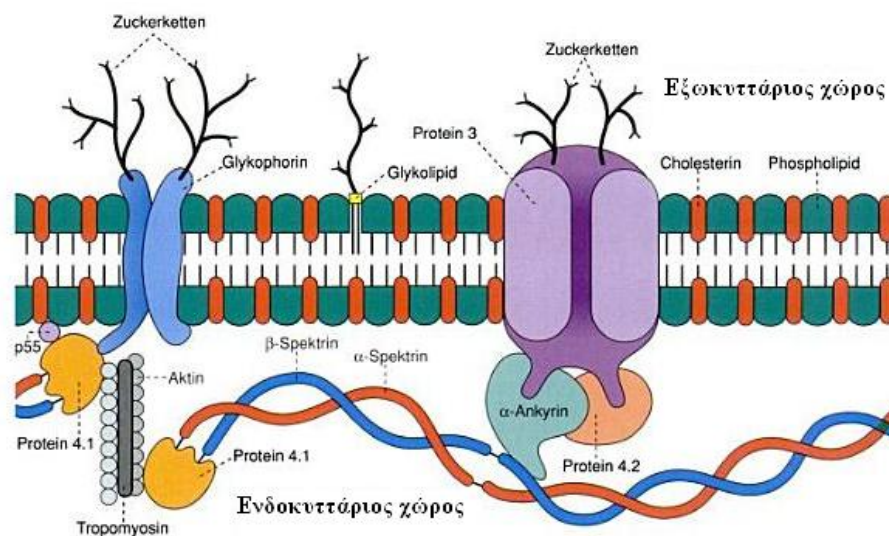
### 2.3.1. Η ερυθροκυτταρική μεμβράνη

Η *ερυθροκυτταρική μεμβράνη* έχει πάχος της τάξεως των 50-70 Å και είναι εξαιρετικά ευλύγιστη αλλά πρακτικά ασυμπίεστη. Αυτός ο μοναδικός συνδυασμός ελαστικών ιδιοτήτων επιτρέπει στο ΕΑ χιλιάδες km στο σώμα χωρίς να χάνει την υπόστασή του [7]. Επιπλέον, η ελαστικότητά της επιτρέπει μεγάλες αλλαγές στο σχήμα του ΕΑ όταν αυτό περνά μέσα από τριχοειδή αγγεία πολύ μικρότερης διατομής σε σχέση με το πάχος του. Ως μετακινούμενο κύτταρο, το ΕΑ είναι υποχρεωμένο να αντιμετωπίζει συνεχώς μεταβαλλόμενα και ενίοτε εχθρικά περιβάλλοντα, π.χ. να διασχίσει μικροτριχοειδή με διάμετρο μικρότερη της δικής του ή να υποστεί οσμωτικές πιέσεις μεγαλύτερες της δικής του διασχίζοντας τους νεφρούς. Η κυτταρική γεωμετρία, το ιξώδες του κυτοσολίου και οι μηχανικές ιδιότητες της μεμβράνης, εξασφαλίζουν στο ΕΑ την απαραίτητη ικανότητα ελαστικής παραμόρφωσης, αντοχή, σταθερότητα και μεταβλητότητα που χρειάζεται για να μπορεί να ανταπεξέλθει στα μικροπεριβάλλοντα της κυκλοφορίας και των ιστών. [8] [9]. Αποτελείται από υδατάνθρακες, λιπίδια και πρωτεΐνες.

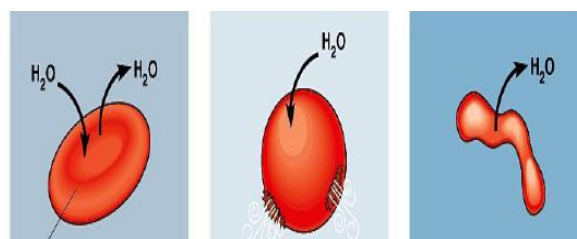
- Οι υδατάνθρακες της μεμβράνης (γλυκοκάλυκας) αποτελούνται από ουδέτερα σάκχαρα. Αποτελούν μέρος των γλυκοπρωτεϊνών και γλυκοσφιγγολιποειδών της μεμβράνης που περιέχουν τα αντιγόνα των ομάδων αίματος Α, Β, Ο.
- Η λιπιδική στιβάδα αποτελείται από φωσfolιποειδή, χοληστερόλη και γλυκοσφιγγολιποειδή. Τα υδρόφοβα τμήματα των μορίων διατάσσονται προς την εσωτερική και τα υδρόφιλα προς την εξωτερική επιφάνεια.
- Οι πρωτεΐνες της μεμβράνης διακρίνονται σε αυτές που διαπερνούν τη διπλοστιβάδα των φωσfolιπιδίων (διαμεμβρανικές ή ενδογενείς) και σε αυτές που δεν εισχωρούν στη λιπιδική στιβάδα (περιφερειακές ή δομικές πρωτεΐνες). Στις περιφερειακές ανήκουν η σπεκτρίνη, η ανκυρίνη, η ακτίνη

και οι πρωτεΐνες 4.1 και 4.2. Η σπεκτρίνη είναι το κύριο συστατικό του κυτταροσκελετού (55-70 %) και η λειτουργία της συνίσταται στη διατήρηση του σχήματος του κυττάρου και την παροχή δομικής υποστήριξης στη λιπιδική διπλοστιβάδα.

Οι κύριες δυνάμεις που προσδιορίζουν την οργάνωση της μεμβρανικής δομής είναι δυνάμεις ηλεκτροστατικής υφής (ανάμεσα σε ιόντα) και δυνάμεις Van der Waals υδρόφοβες/υδρόφιλες αλληλεπιδράσεις και δεσμοί υδρογόνου στο υδάτινο περιβάλλον της κυτταρικής μεμβράνης). Ο σχηματισμός των διπλοστοιβάδων λιπιδίων είναι μια διεργασία αυτοσυγκρότησης. Ο κυτταροσκελετός συνδέεται με τα λιπίδια και τις πρωτεΐνες της μεμβράνης μέσω μορίων όπως είναι η αγκυρίνη. Οι κάθετες αλληλεπιδράσεις ανάμεσα στις σκελετικές (περιφερειακές) πρωτεΐνες και στη μεμβράνη καθορίζουν σε σημαντικό βαθμό τη διατήρηση της κυτταρικής επιφάνειας. Οι οριζόντιες αλληλεπιδράσεις ανάμεσα στα σκελετικά συστατικά, καθορίζουν τη μηχανική σταθερότητα της μεμβράνης, την αποφυγή δηλαδή της κυτταρικής θραύσης. Και οι δύο κατηγορίες αλληλεπιδράσεων ρυθμίζουν το σχήμα, τη λειτουργικότητα και την ικανότητα επιβίωσης του ΕΑ.



**Εικόνα 5:** Απεικόνιση της μεμβράνης των ΕΑ

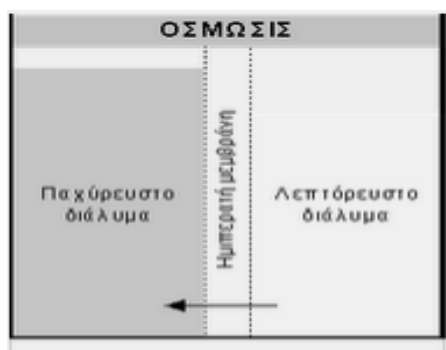


**Εικόνα 6:** Οσμωτικά φαινόμενα στα κύτταρα. Ισότονο περιβάλλον, υπότονο περιβάλλον, υπέρτονο περιβάλλον.

Όταν το ΕΑ βρεθεί σε υδατικό διάλυμα μεγαλύτερης ωσμωτικής πίεσης, δηλαδή υπέρτονο διάλυμα, το νερό θα βγαίνει από το κύτταρο με αποτέλεσμα τη συρρίκνωση του κυττάρου (αιμόλυση ΕΑ).

Η ώσμωση πραγματοποιείται με σκοπό να εξισωθούν οι συγκεντρώσεις των διαλυμάτων από τις δύο πλευρές της ημιπερατής μεμβράνης. Τα ΕΑ συρρικνώνονται εξ' αιτίας υπερτονικότητας του πλάσματος και το αποτέλεσμα είναι να υπάρξουν αλλοιώσεις στη μορφολογία των κύτταρων. Ωσμωτική πίεση διαλύματος, που διαχωρίζεται με ημιπερατή μεμβράνη από τον καθαρό διαλύτη, ονομάζεται η ελάχιστη πίεση που πρέπει να ασκηθεί εξωτερικά στο διάλυμα, για να διακοπεί η ώσμωση, χωρίς να μεταβληθεί ο όγκος του διαλύματος. Η ωσμωτική πίεση ( $\pi$ ) σε ορισμένη θερμοκρασία εξαρτάται από τον αριθμό γραμμομορίων ή μορίων του διαλυμένου σώματος σε ορισμένο όγκο διαλύματος και δίνεται από τη σχέση:

$$\pi = \rho \cdot g \cdot h.$$



**Εικόνα 5:** Ο διαλύτης ασκεί μια πίεση πάνω στο διάλυμα, η οποία εξισορροπείται από την υδροστατική πίεση της υπερκείμενης στήλης υγρού.

Η ωσμωτική πίεση ακολουθεί το νόμο του Van't Hoff, σύμφωνα με τον οποίο υπάρχει μια αναλογία μεταξύ της πίεσης των τελείων αερίων και της ωσμωτικής πίεσης. Έτσι, η ωσμωτική πίεση που ασκεί αραιό διάλυμα μη ηλεκτρολυτών, ισούται αριθμητικά με την πίεση που θα ασκούσε η διαλυμένη ουσία του διαλύματος, στην ίδια θερμοκρασία:

$$\pi \cdot V = \frac{m_s}{\mu} R \cdot T$$

όπου:  $\pi$  η ωσμωτική πίεση του διαλύματος,  $V$  ο όγκος του διαλύματος,  $m_s$  η μάζα της διαλυμένης ουσίας,  $\mu$  το μοριακό βάρος της διαλυμένης ουσίας,  $R$  η παγκόσμια σταθερά των αερίων και  $T$  η απόλυτη θερμοκρασία του διαλύματος. Όμως, ο νόμος του Van't Hoff δεν ισχύει σε όλες τις περιπτώσεις καθώς οι νόμοι που διέπουν την ώσμωση και την ωσμωτική πίεση είναι αρκετά περίπλοκοι και πολυπαραγοντικοί. Αυτό συμβαίνει σε θερμοκρασίες μεγαλύτερες από 40 °C, σε υψηλές συγκεντρώσεις της ουσίας, σε διαλύματα ηλεκτρολυτών ή μακρομοριακών ενώσεων και σε πολλές βιολογικές μεμβράνες.

Η ωσμωτική πίεση των βιολογικών υγρών (αίμα, εγκεφαλονωτιαίο υγρό, ούρα) οφείλεται κυρίως στα ιόντα ( $\text{Na}^+$ ,  $\text{Cl}^-$ ,  $\text{K}^+$ ,  $\text{Ca}^{2+}$  κ.λ.π.) και στα μικρομόρια με διαστάσεις κάτω από 10 Å. Το πλάσμα του αίματος είναι ένα υδατικό διάλυμα ιόντων, αδιάλυτων μικρομορίων (γλυκόζη, ουρία) και πρωτεϊνικών μακρομορίων (λιπίδια, αλβουμίνες, σφαιρίνες, ινωδογόνο). Η ωσμωτική πίεση του πλάσματος του αίματος,  $\pi_{\pi\lambda}$ , είναι το άθροισμα των ωσμωτικών πιέσεων που οφείλονται στους τρεις τύπους των συστατικών του:

$$\pi_{\pi\lambda} = \sum_{k=1}^N \pi_k^i + \sum_{k=1}^{N'} \pi_k^m + \sum_{k=1}^{N''} \pi_k^M$$

όπου τα σύμβολα  $i$ ,  $m$  και  $M$  στους εκθέτες δηλούν την ωσμωτική πίεση  $\pi_k$ , των ιόντων τύπου  $k$ , των μικρομορίων τύπου  $k$  και των μακρομορίων τύπου  $k$  αντίστοιχα.

Στο αίμα δημιουργείται επίσης υδροστατική πίεση,  $\pi_v$ , η οποία οφείλεται στην συστολή του καρδιακού μυός και στις μηχανικές τάσεις που ασκούν τα τοιχώματα των αιμοφόρων αγγείων. Η πίεση αυτή μεταβάλλεται από σημείο σε σημείο, στους διάφορους κλάδους του καρδιακού δικτύου. Π.χ., στο επίπεδο των αρτηριακών τριχοειδών αγγείων η υδροστατική πίεση του αίματος είναι  $\pi_{va} \approx 34$  mmHg, ενώ στα φλεβικά τριχοειδή αγγεία είναι  $\pi_{vf} \approx 12$  mm Hg [10].

## 2.4. Ο ρόλος της θερμοκρασίας στη σταθερότητα των ΕΑ

### 2.4.1. In vitro μελέτες

Μια άλλη σημαντική φυσική ιδιότητα της μεμβράνης είναι το ιξώδες της, το οποίο σχετίζεται με την κινητικότητα των διαφόρων μορίων διαμέσου της φωσφολιπιδικής διπλοστοιβάδας. Τα μόρια της χοληστερόλης που παρεμβάλλονται μεταξύ των μορίων των φωσφορολιπιδίων, παίζουν σημαντικό ρόλο στη διατήρηση της ρευστότητας της κυτταρικής μεμβράνης. Όταν η θερμοκρασία αυξάνεται, τα μόρια της χοληστερόλης ανακόπτουν την υπέρμετρη αύξηση της ρευστότητας της μεμβράνης, ενώ όταν η θερμοκρασία ελαττώνεται, εμποδίζουν τη συσσωμάτωση των φωσφορολιπιδίων και επομένως αποφεύγεται η στερεοποίησή της. Τα τελευταία χρόνια έχουν δημοσιευθεί έρευνες που δείχνουν ότι οι μεταβολές του ιξώδους της κυτταρικής μεμβράνης συσχετίζονται άμεσα με παθολογικές καταστάσεις, όπως η

αθηροσκλήρωση, ο καρκίνος, η υπερχοληστερολαιμία, ο διαβήτης κ.α. Οι χημικοί παράγοντες οι οποίοι επηρεάζουν τη ρευστότητα της λιπιδιακής διπλοστοιβάδας είναι το μήκος της αλειφατικής αλυσίδας, ο αριθμός των διπλών δεσμών, το ποσό της χοληστερόλης που υπάρχει στη διπλοστοιβάδα και το ποσό των μεμβρανικών πρωτεϊνών. Οι φυσικοί παράγοντες είναι η θερμοκρασία, η πίεση, το pH, και το μεμβρανικό δυναμικό και τα ιόντα ασβεστίου.

Έρευνες έδειξαν ότι τα ανθρώπινα ΕΑ υφίστανται μια ξαφνική αλλαγή στις μηχανικές τους ιδιότητες, όταν μεταβαίνουν στην κρίσιμη θερμοκρασία 36,4 °C. Οι υπολογισμοί του ιξώδους ή γλοιότητας έδειξαν ότι για το αποτέλεσμα αυτό, ευθύνονται οι μεταβολές στις μοριακές ιδιότητες της αιμοσφαιρίνης. Ο υπολογισμός των δομικών μεταβολών της αιμοσφαιρίνης έγινε με τη μέθοδο του κυκλικού διχρωισμού. Η δομική μεταβολή της αιμοσφαιρίνης σε διάλυμα ΕΑ δεν είναι γραμμική με την αύξηση της θερμοκρασίας. Μεταξύ 35 έως 39 °C σημειώνει ραγδαία αύξηση της γλοιότητας, με κρίσιμο σημείο τους  $T_c = 37.2 \pm 0.6$  °C, δηλαδή κοντά στη θερμοκρασία σώματος [11]. Άλλες έρευνες σε ζώα έδειξαν ότι η συσχέτιση της κρίσιμης θερμοκρασίας  $T_c$  της διαρθρωτικής μετάβασης, και η θερμοκρασία σώματος κάθε είδους, δεν είναι απλή σύμπτωση. Αντίθετα, είναι ένα ευρύ δομικό φαινόμενο που ενδεχομένως να περιλαμβάνει πολλές άλλες πρωτεΐνες [12]. Η θερμοκρασία σώματος κάθε είδους έχει αποδοθεί στη δομή της αιμοσφαιρίνης στα ΕΑ του. Οι δομικές αλλαγές της αιμοσφαιρίνης σε μοριακό επίπεδο μπορούν να επιφέρουν βιοφυσικές επιπτώσεις σε μακροσκοπικό επίπεδο [13]. Η μεταβατική θερμοκρασία σχετίζεται με τη θερμοκρασία σώματος των διαφόρων ειδών. Έρευνα της μετάβασης αυτής σε μοριακό επίπεδο, παρουσίασε μετρήσεις από σκέδαση νετρονίων και έδειξε την εξάρτηση της θερμοκρασίας της δυναμικής της αιμοσφαιρίνης σε ολόκληρο το ανθρώπινο ΕΑ *in vivo*. Αποκαλύφθηκε μια μεταβολή στη γεωμετρία της εσωτερικής πρωτεϊνικής δομής στους 36,9 °C, σε θερμοκρασία σώματος. Όταν ξεπεραστεί αυτή η θερμοκρασία, η αλυσίδα των αμινοξέων καλύπτει μεγαλύτερο όγκο από ότι συνήθιζε σε φυσιολογικές θερμοκρασίες. Αυτό καταδεικνύει τη μερική αναδίπλωση της πρωτεΐνης. Μετρήθηκε η καθολική διάχυση πρωτεϊνών και τα αποτελέσματα έδειξαν την σύνδεση του μακροσκοπικού φαινομένου σε ολόκληρα τα ΕΑ που συμβαίνει στη θερμοκρασία σώματος [14].

#### 2.4.2. In vivo μελέτες σε διάφορα είδη οργανισμών

Παρατηρήσεις έδειξαν ότι *in vivo* έκθεση των ΕΑ σε θερμοκρασίες στο εύρος της εμπύρετης κατάστασης επιδεινώνουν την αναιμία που οφείλεται σε μόλυνση του ασθενούς με ασταθή αιμοσφαιρίνη. Η επώαση ολικού αίματος στους 41°C, στάθηκε εργαλείο στην έρευνα για τον καθορισμό των παραμέτρων που μεταβάλουν την *in vivo* σταθερότητα της αιμοσφαιρίνης [15]. Όταν θερμαίνεται το αίμα των θηλαστικών πάνω από τα φυσιολογικά επίπεδα, ακολουθεί αιμόλυση των ΕΑ. Η θερμικά συσχετιζόμενη αιμόλυση, θεωρήθηκε ότι μπορεί να οφείλεται σε 3 παράγοντες α) στην αδρανοποίηση ζωτικών ενζύμων και μεταβολή της δομής πρωτεϊνών, β) στο σχηματισμό παραγόντων στο πλάσμα του αίματος, και γ) στην τήξη των λιπιδίων της μεμβράνης [16].

Πίνακας με φυσιολογικές θερμοκρασίες σώματος διαφόρων ειδών.

Είδος	Θερμοκρασία σώματος
<b>Bostaurus (cattle)</b>	38,0°C
<b>Canisfamiliaris (dog)</b>	39,0°C
<b>Equuscaballus (horse)</b>	38,3°C
<b>Melopsittacusundulatus (parakeet)</b>	40,0°C
<b>Mesocricetusauratus (Syrian hamster)</b>	36,6°C
<b>Oryctolagus cuniculus (rabbit)</b>	38,6°C
<b>Ovis aries (sheep)</b>	39,3°C

Πίνακας της επίδρασης της υψηλής θερμοκρασίας σώματος στον ανθρώπινο οργανισμό.

<b>37 °C</b>	Φυσιολογική θερμοκρασία σώματος (κυμαίνεται από 36,12 - 37,5 °C).
<b>38 °C</b>	Εφίδρωση, κακοδιαθεσία.
<b>39 °C</b>	Έντονη εφίδρωση, ερυθρότητα. Ταχυπαλμία και δύσπνοια. Μπορεί να συνοδεύεται από εξάντληση. Άτομα με επιληψία είναι πιθανό να έχουν σπασμούς.

<b>40 °C</b>	Λιποθυμία, αφυδάτωση, αδυναμία, εμετός, κεφαλαλγία, έντονη εφίδρωση. Ξεκινά να απειλείται η ζωή.
<b>41 °C</b>	Λιποθυμία, εμετός, έντονη κεφαλαλγία, ζάλη, σύγχυση, παραισθήσεις, παραλήρημα, υπνηλία. Πιθανό να σημειωθεί ταχυπαλμία και δύσπνοια. (Ιατρικό επείγον).
<b>42 °C</b>	Ωχρότητα, ή έντονη ερυθρότητα. Ο οργανισμός μπορεί να τεθεί σε κωματώδη κατάσταση ή σε έντονους σπασμούς. Η αρτηριακή πίεση μπορεί να είναι ακραία, και ο καρδιακός ρυθμός πολύ γρήγορος.
<b>43 °C</b>	Φυσιολογικός θάνατος ή σοβαρή εγκεφαλική βλάβη, συνεχείς σπασμοί και καταπληξία. Πιθανή κατάρρευση του καρδιο-αναπνευστικού.
<b>&gt; 44 °C</b>	Σχεδόν βέβαιος θάνατος.

Ωστόσο, έχουν σημειωθεί περιπτώσεις ασθενών που έχουν επιβιώσει ύστερα από εμπύρετη κατάσταση της τάξεως των 46,5 °C.

Είναι εμφανές ότι από οργανισμό σε οργανισμό, η φυσιολογική θερμοκρασία σώματος ποικίλει και κυμαίνεται από 36 – 40 °C.

## 2.5. Σκοπός, συνθήκες, αποτελέσματα και μελλοντικοί στόχοι της παρούσας διπλωματικής εργασίας

Με δεδομένη τη φυσιολογική θερμοκρασία του ανθρωπίνου σώματος  $T=35 - 37\text{ }^{\circ}\text{C}$  η εμπύρετη κατάσταση είναι σαφώς καθορισμένη  $T=37 - 42\text{ }^{\circ}\text{C}$ . Έτσι, διεξάγουμε την παρούσα μελέτη των ΕΑ υγιών δοτών προκειμένου να ερευνήσουμε το ενδεχόμενο μορφολογικής αλλοίωσης τους τόσο σε μικροσκοπικό ( $1\text{ }\mu\text{m}=10^{-6}\text{ m}$ ) όσο και σε νανοσκοπικό ( $1\text{ nm}=10^{-9}\text{ m}$ ) επίπεδο όταν αυτά υποβληθούν σε συνθήκες εμπύρετης κατάστασης.

Διαισθητικά αναμένουμε ότι η υποβολή των ΕΑ σε μη φυσιολογικές θερμοκρασίες είναι δυνατόν να επιφέρει μεταβολές τόσο σε μικροσκοπικό επίπεδο, πχ. να μεταβάλει γενικά τα γεωμετρικά τους χαρακτηριστικά, όσο και σε νανοσκοπικό επίπεδο, πχ. να αλλοιώσει τοπικά την μεμβράνη τους μέσω τροποποίησης της στερεοδιάταξης των συστατικών της (πρωτεϊνών, λιπιδίων και χοληστερόλης). Τόσο οι μικροσκοπικές όσο και οι νανοσκοπικές αλλοιώσεις που

πιθανόν να δημιουργηθούν μπορούν να καταγραφούν με τις τεχνικές μικροσκοπίας που χρησιμοποιούμε στην παρούσα Διπλωματική Εργασία. Το OM είναι ένα σημαντικό όργανο μικροσκοπίας το οποίο επιτρέπει την γρήγορη καταγραφή γενικών μικροσκοπικών μεταβολών, αλλά κυρίως το ΜΑΔ είναι ένα πανίσχυρο όργανο που μπορεί να απεικονίσει νανοσκοπικές μεταβολές ακόμα και στην αρχιτεκτονική της μεμβράνης των ΕΑ όταν υπάρξει ισχυρή χημική, μηχανική ή θερμική προσβολή της [17 – 19].

Οι συνθήκες κάτω από τις οποίες διεξάχθηκε η παρούσα *in vitro* μελέτη είναι συγκεκριμένες. Καταρχάς, τα ΕΑ θερμαίνονται αφού έχουν επιστρωθεί υπό μορφή υμενίων πάνω σε γυάλινα πλακίδια. Αυτή η *ex vivo* θέρμανση συμβαίνει σε μη φυσιολογικό για αυτά, αέριο περιβάλλον. Η απουσία του φυσιολογικού περιβάλλοντος δηλαδή του πλάσματος του αίματος, επιτρέπει τη μελέτη των ΕΑ αυτών καθ' αυτών αγνοώντας έτσι την αιμολυτική συνεισφορά συγκεκριμένων ανοσοχημικών πρωτεϊνικών παραγόντων που βρίσκονται στο πλάσμα. Επιπλέον, η παρούσα *in vitro* μελέτη πραγματοποιήθηκε με θέρμανση των ΕΑ όταν αυτά είναι σε μορφή μονοστρωματικών υμενίων επιστρωμένων σε γυάλινα πλακίδια μικροσκοπίου προκειμένου να προσομοιάσουμε τις ακριβείς συνθήκες στις οποίες τα μελετούν οι αιματολόγοι και παθολογοανατόμοι στην κλινική εργαστηριακή πράξη.

Αναφορικά με το εύρος των θερμοκρασιών που διερευνήσαμε στην παρούσα μελέτη τονίζουμε ότι είναι εξαιρετικά μεγάλο, 20 – 510 °C, αφού κατά παράδοξο τρόπο στην περιοχή μη φυσιολογικών θερμοκρασιών 37 – 90 °C τα ΕΑ αποδείχθηκαν απόλυτα σταθερά, ως μορφολογική δομή, παρουσιάζοντας μικρές ποσοστιαίες μεταβολές, πολλές φορές στα όρια του στατιστικού σφάλματος. Τονίζουμε ότι τα αποτελέσματα ΜΑΔ στην περιοχή μη φυσιολογικών, πλην όμως σχετικά χαμηλών θερμοκρασιών, 37 – 90 °C έδειξαν ότι η σταθερότητα των ΕΑ δεν περιορίζεται μόνο στα μικροσκοπικά γεωμετρικά τους χαρακτηριστικά (περίμετρος, διάμετρος, ύψος και επιφάνεια) αλλά επεκτείνεται και στα νανοσκοπικά μορφολογικά χαρακτηριστικά της μεμβράνης τους. Αυτό το αποτέλεσμα ήταν σχετικά αναπάντεχο πλην όμως πολύ ενδιαφέρον. Έτσι, για την καλύτερη κατανόηση του προβλήματος και τη μελέτη της ανθεκτικότητας των ΕΑ με τη θερμοκρασία διερευνήσαμε πολύ υψηλότερες θερμοκρασίες φτάνοντας έως τους 510 °C όπου πλέον παρατηρείται η πλήρης εξάχνωσή τους. Στις ακραίες αυτές θερμοκρασιακές συνθήκες, ήδη από τους 400 °C παρατηρήσαμε την έντονη χρωματική αλλοίωση των ΕΑ που οφείλεται στην έκθεσή τους σε αφύσικα υψηλό ποσό θερμότητας. Ειδικότερα, πέραν των 480 °C αρχίζουν να



εξαχνώνονται, και στην κρίσιμη θερμοκρασία των 500 °C, ο βαθμός εξάχνωσης γίνεται εντονότερος. Η οριστική πλέον εξάχνωση των ΕΑ σημειώνεται στη θερμοκρασία των 510 °C και είναι εμφανής και με το ΟΜ.

Η ποιοτική και ποσοτική ανάλυση που πραγματοποιήθηκε ενισχύει την άποψη για ανθεκτικότητα των ΕΑ σε υψηλές θερμοκρασίες. Τέλος, σχετικά με μελλοντικές προοπτικές έρευνας του παρόντος θέματος, τονίζουμε ότι τα αποτελέσματα της παρούσας Διπλωματικής Εργασίας αφορούν αποκλειστικά τα ΕΑ του ανθρώπινου αίματος συγκεκριμένων δοτών, τα οποία μελετήθηκαν σε ειδικές *in vitro* συνθήκες και δεν μπορούν να γενικευτούν για άλλους δότες, άλλες συνθήκες μελέτης και άλλους έμβιους οργανισμούς. Ειδικότερα:

- Επέκταση μελέτης σε περισσότερους δότες και έλεγχος επαναληψιμότητας: Όπως τονίσαμε πιο πάνω, τόσο οι μικροσκοπικές μεταβολές των γεωμετρικών χαρακτηριστικών (περίμετρος, διάμετρος, ύψος και επιφάνεια) των ΕΑ, όσο και οι νανοσκοπικές μεταβολές της μεμβράνης τους τις οποίες παρατηρήσαμε στην περιοχή σχετικά χαμηλών θερμοκρασιών 20 – 90 °C στην παρούσα μελέτη ήταν σχετικά μικρές και το σημαντικότερο διέφεραν μεταξύ των τριών δοτών που συμμετείχαν. Αυτό δεν αποκλείει την πιθανότητα αυτές οι μικρές πλην όμως καταγραφόμενες μεταβολές να είναι σχετιζόμενες με αληθινές βιολογικές/βιοχημικές διαδικασίες οι οποίες υποκινούνται από την αύξηση της θερμοκρασίας. Για να επιβεβαιωθούν αυτές οι παρατηρήσεις που καταγράψαμε στην παρούσα περιορισμένη μελέτη απαιτείται μια εκτεταμένη διερεύνηση σε μεγαλύτερο αριθμό δοτών με πραγματοποίηση πολλαπλών πειραμάτων σε κάθε δότη για τον έλεγχο της επαναληψιμότητας.
- Ειδικές συνθήκες μελέτης ανθρώπινων ΕΑ: Όπως τονίσαμε πιο πάνω στην παρούσα εργασία τα ανθρώπινα ΕΑ μελετήθηκαν στη μορφή μονοστρωματικών υμενίων σε αέριο περιβάλλον δηλαδή εκτός πλάσματος. Δεδομένου ότι συγκεκριμένοι ανοσοχημικοί πρωτεϊνικοί παράγοντες έχουν αιμολυτική δράση ακόμα και σε συγκριτικά χαμηλές θερμοκρασίες 55 – 65 °C αναμένουμε ότι αν η ίδια μελέτη πραγματοποιηθεί σε περιβάλλον αυτόλογου πλάσματος θα έχουμε πλήρη καταστροφή των ΕΑ σε αυτή την περιοχή θερμοκρασιών. Επιπλέον, ενδιαφέρον θα είχε η μελέτη ΕΑ σε περιβάλλον ετερόλογου πλάσματος δηλαδή ΕΑ από ένα δότη να μελετηθούν

σε πλάσμα διαφορετικού δότη όπου η δράση ανοσοχημικών παραγόντων αναμένεται να είναι δραματική.

- Μελέτη ΕΑ άλλων έμβιων οργανισμών: Σχετικά με τη μελέτη ΕΑ άλλων έμβιων οργανισμών τονίζουμε ότι πρέπει να ληφθούν πρόσθετοι παράγοντες (συγκεκριμένη πρωτεϊνική-λιπιδική σύσταση της μεμβράνης, κυτταροπλασματικό περιεχόμενο κτλ) για να οριστεί η φυσιολογική και μη φυσιολογική θερμοκρασία λειτουργίας. Για παράδειγμα, η φυσιολογική θερμοκρασία του σώματος σε μια γάτα (*Feliscatus*) είναι μεταξύ 38 – 39 °C. Για τη γάτα θεωρείται ότι έχει πυρετό αν η θερμοκρασία της ξεπεράσει τους 39,5 °C. Αν η θερμοκρασία της είναι μικρότερη από 37,5 °C, τότε η γάτα είναι υποθερμική. Συγκριτικά αναφέρουμε ότι η κανονική θερμοκρασία ενός ανθρώπου είναι γύρω στους 36,8 °C. Για μία γάτα σε ηρεμία, ο φυσιολογικός καρδιακός ρυθμός είναι μεταξύ 150 και 180 παλμών το λεπτό, διπλάσιος σχεδόν από εκείνον του ανθρώπου (μέσος όρος 80 καρδιακοί παλμοί το λεπτό). Σε ένα άλογο (*Equuscaballus*), η φυσιολογική θερμοκρασία είναι 37,2 – 42,7 °C. Οι φυσιολογικοί παλμοί του είναι 36 – 42 παλμοί ανά λεπτό. Συνεπώς, τα ΕΑ των άλλων ειδών δέχονται διαφορετικής ισχύος μηχανική καταπόνηση κατά την κυκλοφορία στο καρδιαγγειακό. Εφόσον υπάρχει σημαντική διαφορά στο περιβάλλον λειτουργίας των ΕΑ όπως στη συχνότητα των καρδιακών παλμών και στο θερμορυθμιστικό μηχανισμό, λογικό είναι να αναμένονται διαφοροποιήσεις στην ανθεκτικότητα των ΕΑ ανάλογα με τον έμβιο οργανισμό.

Η μελέτη αυτών των ενδιαφερόντων θεμάτων μπορεί να αποτελέσει αντικείμενο μελλοντικής έρευνας.

## ***ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ - ΑΝΑΦΟΡΕΣ***

- [1] Davidovits P, *Physics in Biology and Medicine*; Third Editioned., Elsevier, Amsterdam, 2008.
- [2] Cameron J, Skofronick J, Grant R, *Φυσική του ανθρώπινου σώματος*, εκδ. Παρισιάνου, Αθήνα , 2001.
- [3] Handin I, Lux S, Stossel T., *Blood: principles and practice of haematology*, Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia, USA, 2003.
- [4] Winslow R, *Blood Subtitudes*, Elsevier, Great Britain, 2006.
- [5] Daniel D., *Human Biology*, 7<sup>th</sup> Edition, Jones & Bartlett Publishers, USA, 2007.
- [6] Canham P, Burton A, *Distribution of size and shape in populations of normal human red cells*, Circul Res. Vol 22, 1968, 405–422.
- [7] Evans A, Fung Y, *Improved measurements of the erythrocyte geometry*. Microvasc. Res. 4, 4, 1972, 335-347 .
- [8] Evans A, *Structure and deformation properties of red blood cells: Concepts and quantitative methods*, Methods in Enzymology, 173, 1989, 3-35.
- [9] Quinn D, *Combined Simulation and Experimental Study of Large Deformation of Red Blood Cells in Microfluidic Systems*, Annals of Biomedical Engineering, Vol. 39, No. 3, 2011, 1041–1050.
- [10] Μακροπούλου Μ, Αν. Καθηγήτρια Ε.Μ.Π., Σημειώσεις Βιοφυσικής, Αθήνα, 2004.

- [11] Artman G, Burns L, *Circular dichroism spectra of human hemoglobin reveal a reversible structural transition at body temperature*, Eur. Biophys. J. 2004, 33, 490-496.
- [12] Digel I, Maggakis-Kelemen C, *Body Temperature-Related Structural Transitions of Monotremal and Human Hemoglobin*, Biophysical Journal, 91, 8, 2006, 3014-3021.
- [13] Zerlin K, *Structural transition temperature of hemoglobin correlates with species' body temperature*, Eur. Biophys. J, 2007, 37, 1-10.
- [14] Stadler A, Digel I, Artmann G, *Hemoglobin dynamics in red blood cells: correlation to body temperature*, Biophys J., 2008, 95, 11, 5449-61.
- [15] Zinkham W, Liljestrand J, Dixon S, Hutchison J, *Observation on the rate and mechanism of hemolysis in individuals with Hb Zurich: Thermal denaturation of hemoglobin as a cause of anemia during fever*, Johns Hopkins Med J., 1979, 144, 4, 109-16.
- [16] Gershfeld N, Murayama M, *Thermal instability of red blood cell membrane bilayers: Temperature dependence of hemolysis*, Journal of Membrane Biology, 1988, 101, 1, 67-72.
- [17] Takeuchi M, Miyamoto H, Sako Y, Komizu H, Kusumi A, *Structure of the Erythrocyte Membrane Skeleton as observed by Atomic Force Microscope*, Biophysical Journal, 74, 1998, 2171-2183.
- [18] Bhushan B, *Springer Handbook of Nanotechnology 3rd edition*, Springer-Verlag Berlin Heidelberg, 2010.

[19] Wu T, *Atomic Force Microscope Imaging of human Red Blood Cells and their Mechanical Properties*, Thesis submitted for the degree of Master of Engineering department of Mechanical Engineering, National University of Singapore, 2003.

# 3

## *Δείγματα και πειραματικές μέθοδοι*

### **3.1. Αιμοληψία**

Στην παρούσα διπλωματική εργασία αξιοποιήσαμε δείγματα αίματος από τρεις διαφορετικούς δότες που θα αναφέρονται από τούδε και στο εξής ως δότης Α, Β, Γ αντίστοιχα έκαστος. Αξίζει να σημειωθεί ότι και οι 3 είναι υγιείς, χωρίς να πάσχουν από καμία αιματολογική ή παθολογική νόσο και με φυσιολογικά επίπεδα χοληστερόλης στο αίμα τους. Η αιμοληψία πραγματοποιείται σε περιοχή του δέρματος που έχει αποστειρωθεί τοπικά με την συνηθισμένη διαδικασία. Εν συντομία, με λεπτές και ήρεμες κινήσεις εφαρμόζεται στο μέσον περίπου του βραχίονα του αιμοδότη πιεστική περιέδεση που αποσκοπεί στην απόφραξη της φλεβικής και όχι της αρτηριακής ροής του αίματος και επιλέγεται η κατάλληλη φλέβα. Κατόπιν, προβλέπεται μια αυστηρή και τυποποιημένη διαδικασία προετοιμασίας της περιοχής της φλεβικής παρακέντησης. Η βελόνα πρέπει να εισαχθεί στην αρχή της φλέβας (έσω επιφάνεια του αγκώνα) με την πρώτη προσπάθεια. Το άκρο της βελόνας που έχει λοξή επιφάνεια πρέπει να είναι προς τα επάνω. Κατά την διάρκεια της αιμοληψίας πρέπει να ελέγχεται ο βραχίονας του δότη για την καλή κατάσταση της περιχειρίδας και την θέση της βελόνας μέσα στην

φλέβα. Εν συνεχεία, με τη σύριγγα αναρροφούμε με αργό αλλά σταθερό ρυθμό το αίμα. Αφαιρούμε το λάστιχο της περίδεσης και τη βελόνα από το βραχίονα του δότη. Τοποθετούμε καθαρό τολύπιο βάμβακος πάνω στο σημείο της παρακέντησης. Τέλος, μεταφέρουμε το αίμα σε πρότυπους δοκιμαστικούς σωλήνες Vacutainer (BD, NJ, USA), οι οποίοι χρησιμοποιήθηκαν για τη προσωρινή φύλαξή του και περιέχουν αντιπηκτικό (EDTA- ethylenediaminetetraaceticacid).

Το EDTA που βρίσκεται στα τοιχώματα του σωλήνα ωφελεί στην αποφυγή θρομβώσεων στα έμμορφα συστατικά του ολικού αίματος. Σε συγκεκριμένη ποσότητα, το EDTA δρα με χημικό τρόπο αφαιρώντας τα κατιόντα ασβεστίου  $Ca^{2+}$  από το αίμα. Αλλά σε περίπτωση παραμονής του αίματος μέσα σε αντιπηκτικό για παραπάνω από 5 ώρες σε θερμοκρασία δωματίου, συχνά επέρχονται ανεπιθύμητα αποτελέσματα στα ΕΑ (εχينوκυττάρωση, σφαιροκυττάρωση). Επιπλέον, αν η συγκέντρωση του EDTA των σωλήνων είναι μεγαλύτερη της πρέπουσας, τότε αυξάνεται η ιοντική συγκέντρωση του πλάσματος, η ωσμωτική του πίεση αυξάνεται και το διάλυμα πλάσματος καθίσταται υπερτονικό.

### 3.2. Δημιουργία δειγμάτων με μειωμένο αιματοκρίτη

Τα πλακίδια με αίμα που χρειάστηκε να επιστρώσουμε, φέρουν αντί για ολικό, αίμα μειωμένου αιματοκρίτη. Με αυτό τον τρόπο αποφεύγουμε το να σχηματίζουν συσσωματώματα και να συγκολληθούν μεταξύ τους. Εφόσον, ενδιαφερόμαστε για τη μελέτη των μορφολογικών και γεωμετρικών χαρακτηριστικών των ΕΑ, επιδιώκουμε μια αραιή, ομοιόμορφη κατανομή αυτών πάνω στην αντικειμενοφόρο πλάκα. Αυτό επιτυγχάνεται με αραιώση του ολικού αίματος με το πλάσμα του ορού του ιδίου δότη.

Θεωρούμε αρχικά δείγμα ολικού αίματος με αιματοκρίτη Hct % που είναι η εκατοστιαία αναλογία όγκου ερυθρών αιμοσφαιρίων ανά μονάδα όγκου αίματος

- Τα 100 mL ολικού αίματος καταλαμβάνονται από **Hct** ml ΕΑ.
- Συλλέγουμε αίμα όγκου  $V$  και το τοποθετούμε σε ένα άλλο φιαλίδιο.
- Έστω σε  $V$  ml αίματος περιέχονται  $\kappa$  ml ΕΑ.. Ο νέος όγκος ΕΑ ισούται με:

$$\Rightarrow \kappa = \frac{Hct \cdot V}{100} \text{ ml}$$

Στο νέο φιαλίδιο, που περιέχει  $V$  ml αίματος, προσθέτουμε  $\rho$  ml επιπλέον πλάσματος από φυγοκεντρισμένο αίμα του ιδίου δότη. Το διάλυμα που προκύπτει θα έχει:

- Συνολικό όγκο ( $V+\rho$ ) ml
- Τον ίδιο όγκο κύτταρων  $\kappa$
- Αιματοκρίτη στα 100 ml διαλυμένου αίματος ίσο με  $Hct_{final} = \frac{\kappa \cdot 100}{V+\rho}$  .

Άρα τελικός αιματοκρίτης του αραιωμένου αίματος θα δίνεται από:

$$Hct_{final} = \frac{\kappa}{V+\rho} \%$$

(Σχέση 2)

### 3.3. Προετοιμασία πειράματος

Η συλλογή πλάσματος από το ολικό αίμα προκύπτει από το διαχωρισμό των διαφορετικού βάρους συστατικών του αίματος. Τοποθετήσαμε το αίμα σε γυάλινο δοκιμαστικό σωλήνα SST (Serum Separating Tube), που περιέχει θιξοτροπικό gel στο κάτω άκρο του. Ήτοι, τα βαρύτερα συστατικά (κύτταρα) κατακάθονται στον πυθμένα του σωλήνα, ενώ το πλάσμα ως ελαφρύτερο, αιωρείται στην άνω στάθμη. Τα δείγματα τοποθετηθήκαν στην ειδική συσκευή φυγοκέντρισης. Κατά τη διαδικασία αυτή, το θιξοτροπικό gel δρα ως διαχωριστικό υλικό και εκτοπίζεται ανοδικά από το δείγμα του αίματος μέχρι όπου φτάσει ένα σημείο ισορροπίας, το όποιο και εντοπίζεται ανάμεσα στο πλάσμα και στα έμμορφα συστατικά. [1]. Όταν η συσκευή πραγματοποιεί φυγοκέντρωση των δοκιμαστικών σωλήνων στις 3.000 στροφές και για χρόνο 10 min, τα έμμορφα συστατικά ιζηματοποιούνται, ενώ αποφεύγεται η αιμόλυση των ΕΑ λόγω της μηχανικής καταπόνησης. Καθώς το υπερκείμενο στρώμα του πλάσματος διαφαίνεται ξεκάθαρα, χρησιμοποιώντας μια ειδική πιπέτα, αναρροφούμε 1500 ml καθαρού πλάσματος και τα περιχύνουμε σε δοκιμαστικό φιαλίδιο που περιέχει 250 - 300 ml ολικού αίματος (όγκος που εξαρτάται από τον αρχικό αιματοκρίτη του δότη). Στο τέλος αναδεύουμε ήπια το διάλυμα αίματος – πλάσματος και προκύπτει το δείγμα με τον επιθυμητό αραιωμένο αιματοκρίτη. Αξίζει να σημειωθεί ότι τηρηθήκαν οι επιβεβλημένοι κανόνες ασφαλείας που συμπεριλαμβάνουν την αποφυγή άμεσης επαφής των δειγμάτων με ακάλυπτο δέρμα κοκ.

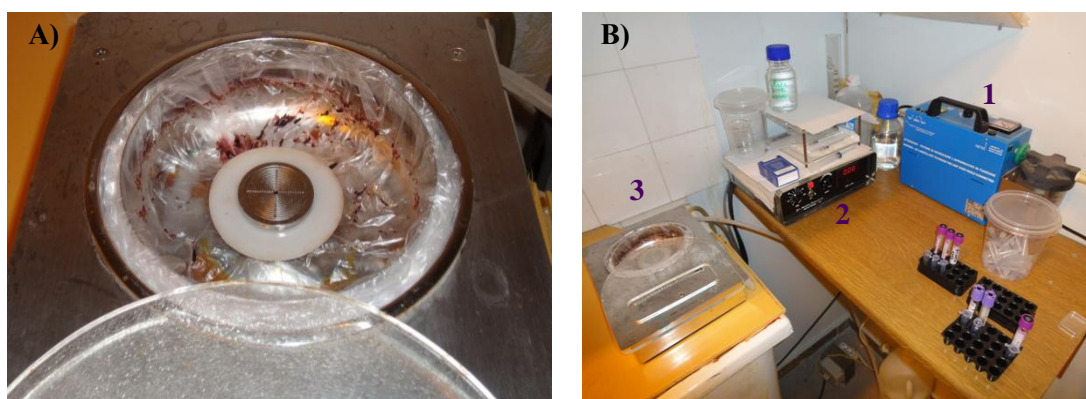


### 3.4. Πειραματικές μέθοδοι

Στην εκτέλεση των πειραμάτων συνέβαλε η χρήση ετοιμών ή αυτοσχέδιων διατάξεων και οργάνων. Η αναφορά σε αυτά γίνεται στο υποκεφάλαιο που ακολουθεί.

#### 3.3.1. Διάταξη δημιουργίας υμενίων αίματος

Η επίστρωση μονοστρωματικού υμενίου εμμόρφων συστατικών αλλά και η κατάλληλη επιφανειακή κάλυψη της αντικειμενοφόρου πλάκας είναι κρίσιμες παράμετροι για την παρατήρηση των δειγμάτων μέσω ΟΜ και ΜΑΔ. Χρησιμοποιώντας μια καινούργια πλαστική πιπέτα, αναρροφούμε 100  $\mu$ l από το διάλυμα, και ακολουθεί η τοποθέτησή του στην επιφάνεια των πρότυπων αντικειμενοφόρων πλακών. Η επίστρωση υπό μορφή υμενίων, πραγματοποιήθηκε με χρήση μιας ηλεκτρονικά ρυθμιζόμενης περιστρεφόμενης πλατφόρμας (Headway Research INC, Garland, TX, USA).



**Εικόνα 1:** Α) Περιστρεφόμενη πλατφόρμα. Β) Η διάταξη δημιουργίας υμένων αίματος. 1) η αντλία που δημιουργεί το κενό. 2) το τροφοδοτικό τάσης 3) η πλατφόρμα περιστροφής.

Για την επίτευξη μονοστρωματικότητας του δείγματος και κατ' επέκταση ομοιόμορφη κατανομή ΕΑ στην αντικειμενοφόρο πλάκα, ρυθμίσαμε τη συχνότητα (3000-3500 στροφές/min) αλλά και τη χρονική διάρκεια περιστροφής της πλατφόρμας (10-15 sec). Η ρύθμιση της συχνότητας και του χρόνου περιστροφής έχει επιλεγεί ώστε τα ΕΑ να μην καταστρέφονται ούτε να συγκολλούνται μεταξύ τους. Αυτό είναι ένα πλεονέκτημα σε σύγκριση με τις συμβατικές τεχνικές που χρησιμοποιούν οι αιματολόγοι για την επίστρωση υμενίων αίματος (σχετική ολίσθηση δύο αντικειμενοφόρων πλακών που εμπεριέχουν μικρή ποσότητα αίματος στη διεπιφάνεια), οι οποίες οδηγούν σε μηχανική καταπόνηση και θραύση της

κυτταρικής μεμβράνης των κυττάρων του αίματος. Στην εικόνα 1α) φαίνεται η πλατφόρμα πάνω στην οποία τοποθετείται η αντικειμενοφόρος πλάκα. Τα επιμέρους τμήματα του οργάνου παρουσιάζονται στην εικόνα 1β) και είναι:

- η αντλία που δημιουργεί το κενό ώστε η αντικειμενοφόρος πλάκα να μείνει προσκολλημένη στην πλατφόρμα καθώς αυτή περιστρέφεται
- το τροφοδοτικό τάσης, όπου ρυθμίζουμε την συχνότητα περιστροφής
- η πλατφόρμα περιστροφής

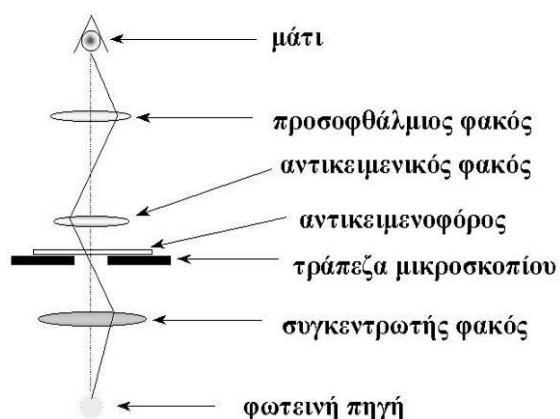
Το έναυσμα για την έναρξη της περιστροφικής κίνησης δίνει ο χρήστης μέσω ποδοκίνητου επιδαπέδιου μηχανισμού. Με τη σχετικά απότομη έναρξη περιστροφής, η περίσσεια δείγματος εκτινάσσεται στα τοιχώματα που περιβάλουν την πλατφόρμα, ενώ το υπόλοιπο δείγμα θα κατανεμηθεί ομοιόμορφα πάνω στην αντικειμενοφόρο πλάκα. Κατά τη διάρκεια της διαδικασίας, θα πρέπει να έχουμε φροντίσει να καλύψουμε την πλατφόρμα με πλαστικό κάλυπτρο το οποίο θα προφυλάσσει από πιθανή εκτίναξη της γυάλινης αντικειμενοφόρου πλάκας.

Συνεπώς, η τεχνική αυτή παρέχει αφ' ενός τη δυνατότητα εξέτασης της συνολικής μορφολογίας του δείγματος, και αφ' ετέρου και των επιμέρους χαρακτηριστικών των έμμορφων συστατικών του αίματος.

### **3.4.2. Οπτικό Μικροσκόπιο**

Προκειμένου να ελέγξουμε την πυκνότητα και την κατανομή των ΕΑ πάνω στα γυάλινα πλακίδια εργαστηρίου, χρησιμοποιήθηκε διάταξη οπτικού μικροσκοπίου (LEICA DMRXP). Το OM που χρησιμοποιήθηκε πρόκειται για ένα σύνθετο μικροσκόπιο το οποίο παρέχει μεγέθυνση του δείγματος έως 1000 φορές. Αποτελείται από τέσσερα βασικά στοιχεία: (α) μια πηγή φωτός, (β) έναν συγκεντρωτικό φακό, (γ) έναν αντικειμενικό φακό, και (δ) έναν προσοφθάλμιο φακό.

Το δείγμα τοποθετείται σε μικρή απόσταση από την εστία του αντικειμενικού φακού σχηματίζοντας είδωλο πραγματικό, ανεστραμμένο και με μέγεθος αντιστρόφως ανάλογο με την απόσταση ανάμεσα στο αντικείμενο και την εστία. Ο αντικειμενικός φακός σχηματίζει την πρωταρχική εικόνα της μικροδομής και είναι το πιο σημαντικό εξάρτημα του οπτικού μικροσκοπίου. Συλλέγει όσον το δυνατόν περισσότερο φως από το δοκίμιο και συνδυάζει αυτό το φως για να παράγει την εικόνα. Η περιστρεφόμενη κεφαλή με τους αντικειμενικούς φακούς, συνήθως έχει



**Εικόνα 2:** Διάγραμμα των φακών και της πορείας των φωτεινών ακτίνων στο οπτικό μικροσκόπιο φωτεινού πεδίου.

θέσεις για 3 – 6 φακούς. Σε ορισμένα ερευνητικά μικροσκόπια η περιστρεφόμενη κεφαλή μπορεί να αφαιρεθεί εύκολα και να αντικατασταθεί. Έτσι, σχετικά εύκολα το μικροσκόπιο μπορεί να μετατραπεί σε αντίθεσης φάσης, φθορισμού κλπ.

Ο προσοφθάλμιος φακός είναι τοποθετημένος στο πάνω μέρος του σωλήνα. Ο προσοφθάλμιος φακός, μέσω του οποίου γίνεται η

μικροσκοπική παρατήρηση, μεγεθύνει το παραπάνω είδωλο. Απλά προβλήματα όρασης όπως η μυωπία μπορούν να εξομαλυνθούν με τη χρήση της ρύθμισης λεπτής εστίασης. Προβλήματα όρασης όπως ο αστιγματισμός δεν μπορούν να διορθωθούν από το μικροσκόπιο και είναι απαραίτητη η χρήση γυαλιών.

Το μηχανικό σύστημα του μικροσκοπίου συγκροτείται από: α) τη βάση στήριξης του οργάνου, β) την τράπεζα, όπου τοποθετείται το δείγμα, γ) το βραχίονα με τους κοχλίες εστίασης και δ) τον οπτικό σωλήνα. Στον οπτικό σωλήνα προσαρμόζεται το σύστημα των φακών, οι προσοφθάλμιοι και οι αντικειμενικοί. Ο σωλήνας συνήθως μπορεί να αφαιρεθεί για να τοποθετηθεί σωλήνας άλλου τύπου π.χ. σωλήνας με υποδοχή για φωτογραφική μηχανή, videocamera κλπ ή να περιστραφεί για χρήση του μικροσκοπίου από εμπρός ή από πίσω. Η αντικειμενοφόρος πλάκα τοποθετείται στην τράπεζα. Η μετακίνηση του παρασκευάσματος εξασφαλίζεται με ένα σύστημα κοχλίων προς δύο κατευθύνσεις κάθετες μεταξύ τους. Μετακινώντας κατάλληλα τους παραπάνω κοχλίες το παρασκεύασμα οδηγείται πάνω από το κυκλικό άνοιγμα της τράπεζας. Για την εστίαση του αντικειμένου στην κατάλληλη απόσταση, μετακινείται κατακόρυφα είτε η τράπεζα είτε ο οπτικός σωλήνας. Προηγείται κίνηση με τον κοχλία μακρομετρικής μετακίνησης της τράπεζας, που εξασφαλίζει εστίαση σε συγκεκριμένη περιοχή και ακολουθεί η χρήση του μικρομετρικού κοχλία για ευκρινέστερη μεγέθυνση. Η μικρότερη απόσταση που πρέπει να έχουν δύο διαφορετικά σημεία του δείγματος ώστε να μπορεί ο παρατηρητής να τα διακρίνει καθαρά στο είδωλο σαν ξεχωριστές κηλίδες ονομάζεται διακριτικό όριο (δ) και καθορίζεται από τον τύπο του Abbè:

$$\delta = 0.61 \cdot \frac{\lambda}{n \cdot \sin \theta}$$

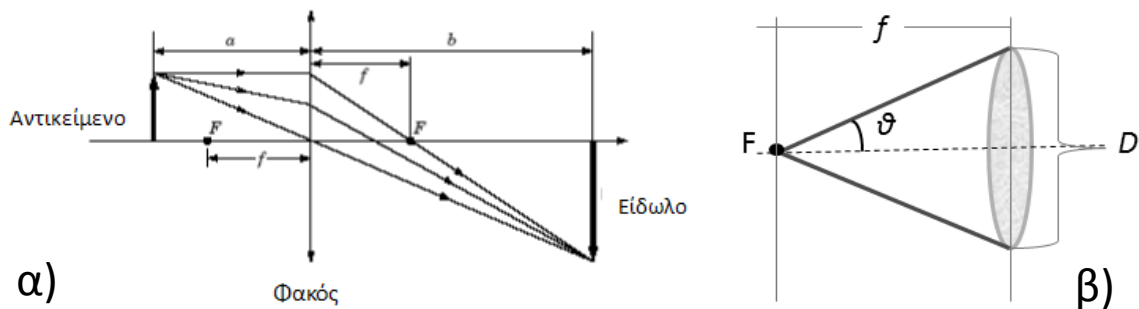
(Σχέση 1)

Το αριθμητικό άνοιγμα του φακού  $NA$ , ορίζεται:

$$NA = n \cdot \sin \theta$$

(Σχέση 2)

όπου  $\lambda$ = μήκος κύματος χρησιμοποιούμενου φωτός, 0.61 είναι σταθερός αριθμός,  $n$  είναι ο δείκτης διάθλασης του μέσου που παρεμβάλλεται μεταξύ αντικειμένου και αντικειμενικού φακού (για τον αέρα  $n \approx 1$ ), και  $\theta$  είναι το μισό γωνία κό άνοιγμα του αντικειμενικού φακού (η κλίση ως προς τον οπτικό άξονα των εξωτερικών ακτίνων που συμμετέχουν στο σχηματισμό εικόνας) [2].



**Εικόνα 3:** Διαγραμματική απεικόνιση της πορείας των φωτεινών ακτίνων. α) Ο σχηματισμός του ειδώλου, β) F το εστιακό κέντρο, D η διάμετρος του φακού και το μισό γωνιακό άνοιγμα, η γωνία  $\theta$ .

Έτσι σε λεπτό αμφίκυρτο φακό, το οπτικό κέντρο (κέντρο του φακού) βρίσκεται πάνω στον οπτικό άξονα. Το φως περνά μέσα από το φακό και διαθλάται. Στο σχήμα 3α) καταδεικνύονται τα εξής:

- Εστιακό κέντρο F, εμπρός και πίσω από το φακό
- Εστιακό μήκος  $f$  (απόσταση του F από τον φακό). Σε αμφίκυρτο φακό το εμπρόσθιο εστιακό μήκος ισούται με το οπίσθιο εστιακό μήκος
- Απόσταση αντικειμένου-φακού ( $a$ )
- Απόσταση ειδώλου-φακού ( $b$ )

Η μεγέθυνση  $M$  ορίζεται από:

$$M = \frac{b}{a}$$

(Σχέση 3)

$$\frac{1}{f} = \frac{1}{a} + \frac{1}{b}$$

(Σχέση 4)

$$M = \frac{f}{a - f}$$

(Σχέση 5)

Στην περίπτωση του οπτικού μικροσκοπίου, η *Μεγέθυνση του μικροσκοπίου* ορίζεται ως το γινόμενο: *Μεγέθυνση από τον αντικειμενικό φακό*  $\times$  *Μεγέθυνση από τον προσοφθάλμιο φακό*.

Μεγαλύτερη μεγέθυνση δεν σημαίνει απαραίτητα καλύτερη παρατήρηση των λεπτομερειών του παρασκευάσματος γι αυτό υπάρχει η έννοια του διακριτικού ορίου  $\delta$  [3], [4].

$$d = \frac{1}{\delta}$$

(Σχέση 6)

Όσο ελαττώνεται το διακριτικό όριο δτόσο αυξάνεται η διακριτική ικανότητα  $d$  του μικροσκοπίου. Το μικροσκόπιο διέλευσης έχει διακριτική ικανότητα 200 - 300 nm. Το ελάχιστο μήκος κύματος των ηλεκτρονίων συγκρινόμενο με τα 400 nm που εκμεταλλεύεται το OM, καθιστά εμφανή την υπεροχή HM σε διακριτική ικανότητα.



Εάν κρίνουμε τη συνολική εικόνα του OM με την κατανομή των ΕΑ του δείγματος ικανοποιητική τότε προχωρούμε το πείραμα στο ΜΑΔ για την εκτενέστερη παρατήρηση του, πλέον σε επίπεδο νανοκλίμακας.

**Εικόνα 4:** OM του Ε.Κ.Ε.Φ.Ε. ‘Δημόκριτος’.

ΜΙΚΡΟΣΚΟΠΙΟ	ΔΙΑΚΡΙΤΙΚΗ ΙΚΑΝΟΤΗΤΑ	ΜΕΓΕΘΥΝΣΗ
ΟΜ	$\pm 200 \text{ nm}$	$\pm 1.000\times$
ΜΑΔ	$\pm 0,2 \text{ nm}$	$\pm 500.000\times$
ΗΜΣ	$\pm 2 \text{ nm}$	$\pm 200.000\times$

**Εικόνα 5:** Πίνακας με συγκριτικές τιμές δυνατοτήτων των ειδών μικροσκοπίων

### 3.4.3. Μικροσκόπιο Ατομικής Δύναμης

Κύρια τεχνική στη μελέτη των μορφολογικών χαρακτηριστικών των ΕΑ στην παρούσα διπλωματική εργασία είναι το ΜΑΔ (NT-MDT Co, Moscow, Russia). Όπως περιγράφηκε και στο 1<sup>ο</sup> κεφάλαιο, η λειτουργία του στηρίζεται στη σάρωση περιοχών του υπό εξέταση δείγματος, και μέσω κατάλληλου λογισμικού ανακατασκευής εικόνας, τη δισδιάστατη ή τρισδιάστατη αναπαράσταση της επιφάνειας που σαρώθηκε. Το ΜΑΔ αποτελείται από δύο κύρια μέρη την **κεφαλή** και τη **βάση**.

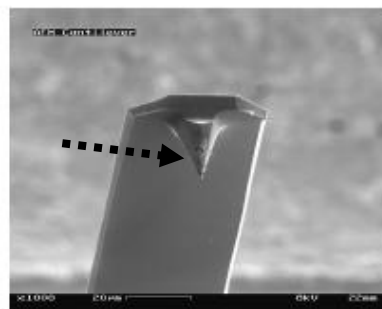
**Η κεφαλή:** Εδώ τοποθετείται ένα ορθογώνιο πλακίδιο πυριτίου (Si) μακροσκοπικών διαστάσεων (της τάξης των mm) το οποίο στο ένα του άκρο φέρει βραχίονα πυριτίου μικροσκοπικών διαστάσεων (της τάξης των  $\mu\text{m}$ ) ο οποίος καταλήγει σε μία αιχμηρή ακίδα νανοσκοπικών διαστάσεων (της τάξης των nm) που επιτελεί τη διαδικασία της σάρωσης. Ο *βραχίονας* έχει τις εξής τυπικές διαστάσεις:

- πλάτος 10 – 30  $\mu\text{m}$
- μήκος περίπου 200  $\mu\text{m}$
- πάχος: 4 – 8  $\mu\text{m}$

Στην εικόνα 6 μπορεί να δει κανείς και την απόληξη του βραχίονα, και την επισημασμένη με κίτρινο βέλος, αιχμηρή ακίδα σάρωσης. Η *ακίδα* έχει τα εξής γεωμετρικά χαρακτηριστικά:

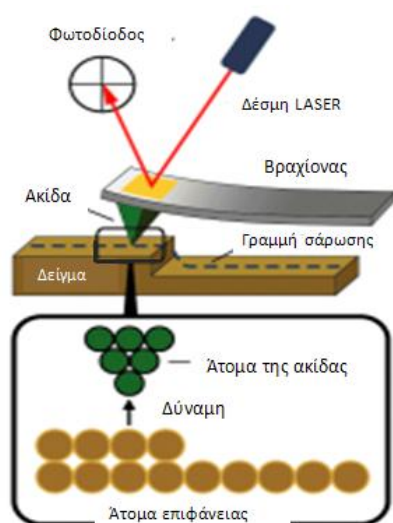
- ύψος 10 – 15  $\mu\text{m}$
- ακτίνα βάσης περίπου 10  $\mu\text{m}$
- αιχμηρή κορυφή ακτίνας έως 5 nm

Δεδομένων λοιπόν, των γεωμετρικών χαρακτηριστικών του βραχίονα και της ακίδας,



**Εικόνα 6:** Βραχίονας και Ακίδα ΜΑΔ επισημασμένη με το διακεκομμένο βέλος.

καταλαβαίνει κανείς πως το ΜΑΔ μπορεί να δώσει εικόνες με ακρίβεια νανομέτρου.



Εικόνα 7: Διάταξη ΜΑΔ.

Στην κεφαλή επίσης, βρίσκεται δίοδος ημιαγωγού η οποία παράγει τη **δέσμη Laser**. Η δέσμη αυτή, όπως δείχνει η εικόνα 7, πρέπει να προσπίπτει στη πίσω πλευρά του βραχίονα ο οποίος για να έχει υψηλή ανακλαστικότητα, φέρει επικάλυψη λεπτού μεταλλικού υμενίου (συνήθως χρυσού, Au). Επίσης, στην κεφαλή βρίσκεται και μια **δίοδος φώρασης**, επίσης από ημιαγωγό, η οποία καταγράφει την δέσμη Laser μετά την ανάκλασή της στην πίσω επιφάνεια του βραχίονα. Τόσο η δίοδος παραγωγής όσο και η δίοδος φώρασης της δέσμης Laser πρέπει να

είναι σωστά ευθυγραμμισμένες κάτι που επιτυγχάνεται με προσεκτική ρύθμιση της θέσης τους μέσω μικρομετρικών κοχλίων που βρίσκονται στην κεφαλή.

**Η βάση:** Είναι κατασκευασμένη από πιεζοηλεκτρικό υλικό και όταν εφαρμοστεί σε αυτήν κατάλληλη εναλλασσόμενη τάση εκτελεί περιοδική κίνηση στο  $x - y$  επίπεδο σε μοτίβο επάλληλων γραμμών με προεπιλεγμένη συχνότητα στην περιοχή τιμών 1 – 10 Hz. Στη βάση τοποθετείται το γυάλινο εργαστηριακό πλακίδιο που φέρει το υμένιο αίματος. Η κεφαλή τοποθετείται πολύ προσεκτικά πάνω από τη βάση και με αυτοματοποιημένο μηχανισμό ανάδρασης μπορούμε να ελέγξουμε την μεταξύ τους απόσταση με ακρίβεια νανομέτρου.

Η τεχνική της ΜΑΔ συμπεριλαμβάνει δυο βασικούς τρόπους λειτουργίας: λειτουργία *επαφής* (*contact mode*) και λειτουργία *ημιεπαφής* (*non contact mode*). Στην πρώτη περίπτωση, ο βραχίονας παραμένει άκαμptos και η ακίδα έρχεται σε επαφή με το δείγμα, ενώ στη δεύτερη ο βραχίονας ταλαντώνεται όντας σε μικρή απόσταση από το δείγμα της τάξης των λίγων νανομέτρων και η ακίδα είναι σε ημιεπαφή με αυτό. Και στους δύο τρόπους λειτουργίας ο βραχίονας σαρώνει το δείγμα σε μοτίβο επάλληλων γραμμών ενώ η ακίδα που φέρει στην άκρη του αλληλεπιδρά με αυτό.

Στην δική μας περίπτωση, εφόσον μελετούμε ΕΑ, η άμεση επαφή με μία τόσο αιχμηρή ακίδα θα μπορούσε αν όχι να τα καταστρέψει, να τα τραυματίσει, δίνοντας μη αξιόπιστες εικόνες. Βέβαια, με χρήση κατάλληλων ακίδων και ρύθμιση των παραμέτρων του ΜΑΔ, μπορεί να χρησιμοποιηθεί ακόμα και λειτουργία επαφής για

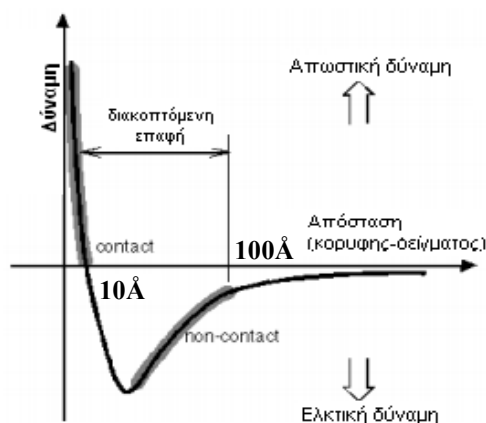
τη μελέτη δειγμάτων. Αλλά για να μειώσουμε τις πιθανότητες επερχόμενης καταστροφής τόσο του δείγματος, όσο και της ακίδας όταν πρόκειται γενικά για βιολογικά υλικά, επιλέγουμε το ΜΑΔ να βρίσκεται σε λειτουργία ημιεπαφής (*non contact mode*).

Κατά τη λειτουργία ημιεπαφής (*non contact mode*), μεταξύ ακίδας και επιφάνειας δείγματος αναπτύσσονται δυνάμεις (που μπορεί να είναι μηχανικής φύσης, δυνάμεις Van der Waals, ηλεκτροστατικές κ.τ.λ.) όταν ο βραχίονας πλησιάσει αρκετά κοντά στο δείγμα.

Όπως αναφέραμε και πιο πάνω, η βάση πάνω στην οποία τοποθετείται το δείγμα, είναι κατασκευασμένη από πιεζοηλεκτρικό υλικό και όταν εφαρμοστεί σε αυτήν κατάλληλη εναλλασσόμενη τάση εκτελεί περιοδική κίνηση στο  $x - y$  επίπεδο σε μοτίβο επάλληλων γραμμών με προεπιλεγμένη συχνότητα στην περιοχή τιμών 1 – 10 Hz. Το ορθογώνιο πλακίδιο πυριτίου βρίσκεται πάνω σε μια επίσης πιεζοηλεκτρική βάση. Βραχίονας και ακίδα εξαναγκάζονται σε ταλάντωση κατά τη διεύθυνση  $z$  σε κατάλληλη ιδιοσυχνότητα, που συνήθως είναι στην περιοχή 100 – 300 kHz. Το πλάτος της ταλάντωσης τυπικά είναι της τάξεως του νανομέτρου ( $< 100 \text{ \AA}$ ), πράγμα που σημαίνει ότι η κορυφή είναι αρκετά κοντά στο δείγμα, αλλά δεν το αγγίζει.

Αρχικά, βραχίονας και δείγμα απέχουν αρκετά και δεν επενεργούν μεταξύ τους δυνάμεις. Για τη βαθύτερη κατανόηση των δυνάμεων θα πρέπει να θεωρήσουμε ότι η ακίδα αποτελείται από μία ομάδα ατόμων και η επιφάνεια του δείγματος από μια άλλη ομάδα ατόμων. Καθώς μετακινήσουμε το δείγμα προς την ακίδα, τα άτομα της ακίδας αρχίζουν σταδιακά να πλησιάζουν τα άτομα του δείγματος, και αρχικά έλκονται μεταξύ τους ασθενώς. Αυτή η έλξη αυξάνεται

έως ότου τα άτομα βρεθούν τόσο κοντά ώστε τα ηλεκτρονιακά τους νέφη να αρχίσουν να απωθούν ηλεκτροστατικά το ένα το άλλο. Στην περίπτωση ημιεπαφής (*non-contact mode*), ο βραχίονας απέχει 10 – 100  $\text{\AA}$ , από την επιφάνεια του δείγματος, και η διατομική δύναμη μεταξύ αυτού και του δείγματος είναι ελκτική. Η



**Εικόνα 9:** Διάγραμμα : Οι Van der Waals δυνάμεις συναρτήσει της απόστασης.



ηλεκτρονιακής φύσης ηλεκτροστατική άπωση όμως, σταδιακά αποδυναμώνει την ελκτική δύναμη και η μεταξύ τους απόσταση συνεχίζει να ελαττώνεται. Αυτό αποτυπώνεται καθαρά στο διάγραμμα της εικόνας 9. Όπως φαίνεται στο αριστερό τμήμα της καμπύλης, όταν η απόσταση ελαχιστοποιηθεί και φτάσει γύρω στα  $10 \text{ \AA}$ , η συνολική δύναμη τείνει να μηδενιστεί και γίνεται της τάξεως των pN ( $10^{-12} \text{ N}$ ). Κατά τη διάρκεια σάρωσης, η δύναμη μεταξύ ακίδας και επιφάνειας διατηρείται σταθερή. Με σταθερή αυτή τη δύναμη, η απόσταση δε θα μεταβληθεί, συνεπώς οποιαδήποτε πλέον απόπειρα να φέρουμε το δείγμα πιο κοντά στην ακίδα, θα φέρει σαν αποτέλεσμα την αλλοίωση ή και καταστροφή του δείγματος ή της ακίδας [5].

Στην αρχή μιας αλληλουχίας μετρήσεων ο πιεζοηλεκτρικός σαρωτής μετακινεί το προς μελέτη δείγμα κάτω ακριβώς από την αιχμή της ακίδας της τάξης των  $10 \text{ nm}$  (διαδικασία που αποκαλείται *landing*). Μόλις η αιχμή της ακίδας συναντήσει μια ανωμαλία στην επιφάνεια του δείγματος, οι δυνάμεις ανάμεσα στην ακίδα και την επιφάνεια του δείγματος τείνουν να αλλάξουν το πλάτος και τη συχνότητα ταλάντωσης του βραχίονα. Από το νόμο του Hook έχουμε  $F = -k \cdot z$ , όπου  $F$  είναι η δύναμη,  $k$  η σταθερά ακαμψίας του βραχίονα και επιλέγεται ανάλογα με το υλικό που θέλουμε να μελετήσουμε, και  $z$  η κάθετη απόσταση του βραχίονα από το δείγμα. Οι συντεταγμένες κατά τους  $x - y$  άξονες είναι όμως γνωστές από τη θέση του πιεζοηλεκτρικού σαρωτή [6].

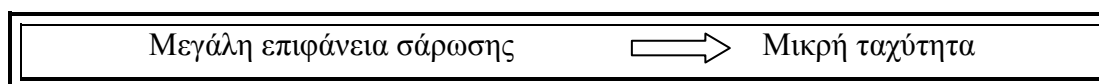
Όπως αναφέρθηκε πιο πάνω, μια δέσμη Laser προσπίπτει στην πίσω επιφάνεια του βραχίονα και ανακλάται υπό αμβλεία γωνία. Η ανακλώμενη δέσμη θα συλλεγθεί από έναν φωτο-ανιχνευτή που αποτελείται από μία τετραστοιχία ημιαγώγιμων διόδων και οι οποίες μετατρέπουν την ένταση του Laser σε ρεύμα. Καθώς πραγματοποιείται η σάρωση και αναπροσαρμόζεται η θέση του βραχίονα, την κίνηση αυτού ακολουθεί η ανακλώμενη δέσμη Laser. Κάποια από τις 4 διόδους θα δέχεται μεγαλύτερη ένταση από τις άλλες. Το σήμα εξόδου στη συνέχεια, συλλέγεται από έναν διαφορικό ενισχυτή ο οποίος μέσω ενός συστήματος ανάδρασης ελέγχει την θέση της πιεζοηλεκτρικής βάσης στον άξονα  $z$ .

*Έτσι, το σύστημα ανάδρασης, που συνδέεται με την πιεζοηλεκτρική βάση κάνει αναπροσαρμογή της απόστασης ακίδας – δείγματος στον  $z$  άξονα, ώστε η δύναμη μεταξύ τους να διατηρηθεί σταθερή, όπως και το πλάτος της ταλάντωσης του βραχίονα. Καταγράφοντας την εκάστοτε αναπροσαρμογή της απόστασης ακίδας – δείγματος κατασκευάζεται η τοπογραφική εικόνα του δείγματος.*

Συνεπώς, το γράφημα της απόκλισης της δέσμης λέιζερ σε σχέση με τη θέση της ακίδας πάνω από την επιφάνεια του δείγματος, μας δίνει τη μορφολογική αναπαράσταση της επιφάνειας.

Το σύστημα χειρισμού του ΜΑΔ δίνει στο χρήστη τη δυνατότητα επιλογής της διεύθυνση σάρωσης είτε κατά τον άξονα  $x$  ή κατά τον  $y$ . Η ταχύτητα σάρωσης παίρνει τιμές  $\leq 2$  Hz, και η επιφάνεια σάρωσης πρέπει να είναι  $<150 \times 150 \mu\text{m}^2$ . Αυξάνοντας όμως την επιφάνεια σάρωσης, θα πρέπει να μειώσουμε την ταχύτητα, γιατί αλλιώς η μηχανική καταπόνηση της ακίδας, μπορεί να οδηγήσει στην καταστροφή της.

Συνεπώς:



#### 3.4.4. Ψηφιακό Θερμόμετρο

Για τον προσδιορισμό της θερμοκρασίας των δειγμάτων αλλά και του περιβάλλοντος χρησιμοποιήσαμε ψηφιακό θερμόμετρο. Από τον κατασκευαστή του είχε κάποιο σφάλμα λόγω μη σωστής βαθμονόμησης. Προκειμένου να το προσδιορίσουμε, χρησιμοποιήσαμε 3 διαφορετικά υλικά: πάγο, μεθανόλη, ασετόν. Καταρχάς, θερμομετρήσαμε τον πάγο που έχει γνωστό σημείο τήξης. Επίσης θερμαίνοντας σε πυράντοχο δοχείο τη μεθανόλη και το ασετόν, τα φέραμε σε κατάσταση βρασμού. Καθώς, από τη βιβλιογραφία θεωρούνται γνωστά τα σημεία βρασμού των υλικών αυτών.

Υλικό	$T_{av}$ (°C)	$T_{\psi\theta}$ (°C)
Πάγος	0	0,2
Ασετόν	56,5	55,7
Μεθανόλη	65,0	64,7

**Εικόνα 10:** Πίνακας με τις τιμές που χρησιμοποιήθηκαν στην προτυποποίηση του θερμομέτρου.

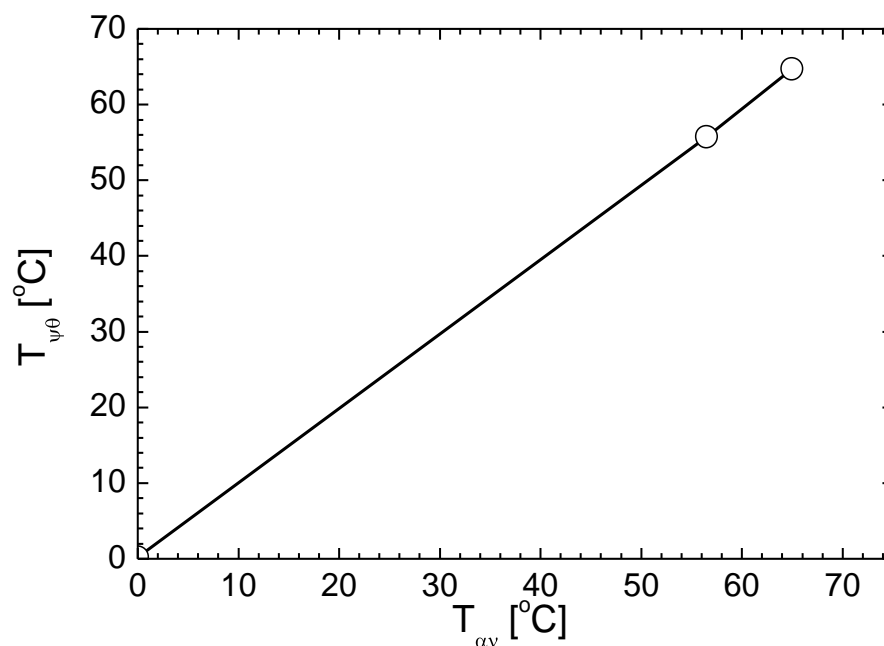
Για την ακριβέστερη εύρεση της ευθείας που αντιστοιχεί στα σημεία των πειραματικών δεδομένων, χρησιμοποιήθηκε η μέθοδος ελαχίστων τετραγώνων.

Με 3 πειραματικά σημεία υποθέτουμε ότι τα  $x$  αντιπροσωπεύουν τις πειραματικές που μετρήθηκαν στο ψηφιακό θερμόμετρο  $T_{\psi\theta}$ , τα  $y$  αντιπροσωπεύουν τις πρότυπες τιμές θερμοκρασίας  $T_{αν}$ , όπως αναμένονται από τη βιβλιογραφία. Η σχέση είναι της μορφής

$$y = \alpha + \beta x$$

Ζητούμε τον προσδιορισμό του σημείου  $(0, \alpha)$  στο οποίο η ευθεία τέμνει τον άξονα των  $y$  και της κλίσης  $\beta$  της ευθείας.

Με τη μέθοδο ελαχίστων τετραγώνων προκύπτει ότι:



Εικόνα 11: Διάγραμμα βέλτιστης ευθείας.

Παράμετρος τομής με τον άξονα $y$ :	$\alpha=0,158$
Παράμετρος κλίσης της ευθείας:	$\beta=0,989$
Σφάλμα: $\delta\alpha$	0,423
Σφάλμα: $\delta\beta$	0,009

Από τη μέθοδο ελαχίστων τετράγωνων προκύπτουν τα σφάλματα:

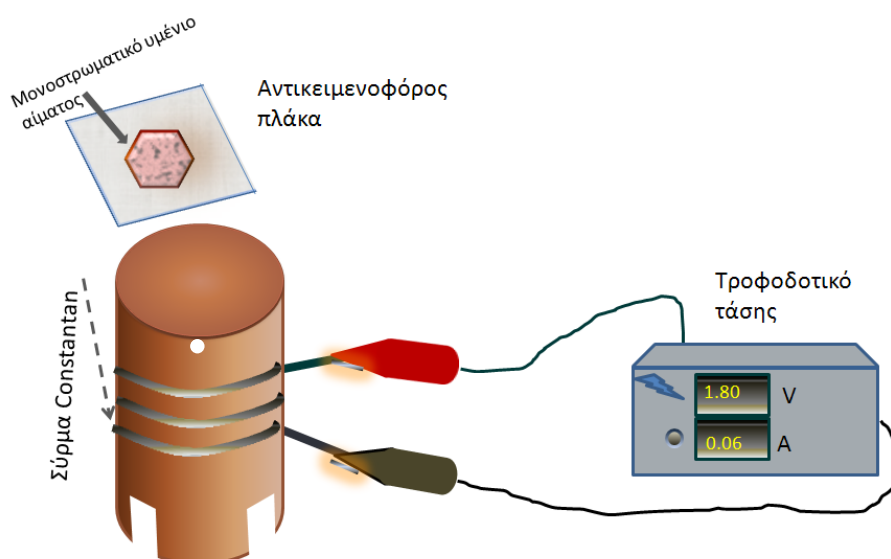
$$\alpha=0,158 \pm 0,423$$

$$\beta=0,989 \pm 0,009$$

### 3.4.5. Θερμαινόμενος δειγματοφορέας

Εφόσον επιθυμούμε να θερμάνουμε τα ΕΑ για να προσομοιώσουμε την εμπύρετη κατάσταση, χρειαστήκαμε μία ειδική διάταξη με δυνατότητα θέρμανσης. Περιλαμβάνει μια κυλινδρική πλατφόρμα από χαλκό Cu που χρησιμοποιείται ως δειγματοφορέας. Επάνω σε αυτόν τον κύλινδρο τοποθετούμε το γυάλινο πλακίδιο με το υμένιο αίματος. Μεταξύ του γυάλινου πλακιδίου και του δειγματοφορέα Cu, προκειμένου να μην παρεμβάλλεται αέρας, αλλά και για να έχουμε σταθερότητα και άμεση μεταφορά θερμότητας, τοποθετήσαμε μικροποσότητα ειδικής κόλλας (*silver paint*), η οποία έχει υψηλή θερμική αγωγιμότητα. Στο κάτω τμήμα της, η διάταξη έχει κοπή με διάκενα όπως φαίνεται σχηματικά στην εικόνα 12. Με αυτή τη σχεδίαση, αποφεύγεται η μετάδοση θερμότητας από το δειγματοφορέα στη βάση του ΜΑΔ και έτσι επιτυγχάνεται αποτελεσματικότερος έλεγχος της θερμοκρασίας. Η κεφαλή του ΜΑΔ τοποθετείται πάνω από τη βάση που φέρει το δείγμα, με ιδιαίτερη προσοχή προκειμένου να αποφευχθεί επαφή του δείγματος με την ακίδα.

Ο Cu συγκεντρώνει φυσικές ιδιότητες που τον καθιστούν κατάλληλο για την συγκεκριμένη εφαρμογή. Συγκεκριμένα, είναι αγωγίμο υλικό, έχει την χαμηλότερη ειδική αντίσταση  $\rho$  από όλα τα μέταλλα πλην των ευγενών μετάλλων και επιτρέπει ομοιόμορφη κατανομή της θερμοκρασίας στο εσωτερικό του. Ο Cu καθαρότητας 99,85 % χρησιμοποιείται ως υλικό αναφοράς με συμβατική αγωγιμότητα 100%.



Εικόνα 12: Σχηματική αναπαράσταση της διάταξης.

Ο χάλκινος κύλινδρος συμπεριλαμβάνει μια οπή στο άνωθεν τμήμα του, διαμέτρου 2 mm. Στην οπή αυτή συνδέουμε τον ακροδέκτη του ψηφιακού θερμομέτρου και με αυτόν τον τρόπο λαμβάνουμε την τιμή της θερμοκρασίας για το εσωτερικό του κυλίνδρου. Μεταξύ του Cu και του αντιστάτη από Constantan παρεμβάλλεται μονωτική ταινία για την αποφυγή βραχυκυκλώματος. Στη συνέχεια το νήμα Constantan τυλίχθηκε προσεκτικά στην παράπλευρη επιφάνεια του Cu κυλίνδρου σε σπείρες, προσέχοντας να μην έρχονται σε επαφή μεταξύ τους για την αποφυγή βραχυκυκλώματος. Και για επιπρόσθετη μόνωση τέλος, τοποθετήθηκε μονωτική ταινία και στο εξωτερικό του κυλίνδρου, καλύπτοντας τις συρμάτινες σπείρες Constantan.

Στο σημείο αυτό θα πρέπει να συμπεριλάβουμε την περιγραφή των φυσικών ιδιοτήτων του αντιστάτη που χρησιμοποιήθηκε στην εν λόγω διάταξη. Γενικά η σχέση που συνδέει την διαφορά δυναμικού στα άκρα ενός αγωγού με το ρεύμα που τον διαρρέει είναι:

$$V = I \cdot R$$

(Σχέση 7)

Η αντίσταση R είναι:

$$R = \rho \cdot \frac{l}{A}$$

(Σχέση 8)

σε μονάδες Ω, όπου l μήκος και A η διατομή του αγωγού. Η ρ είναι η ειδική αντίσταση σε μονάδες (Ω · m) η οποία συνδέεται με την ειδική αγωγιμότητα με τη σχέση:

$$\sigma = \frac{1}{\rho}$$

(Σχέση 9)

σε μονάδες (Ω · m)<sup>-1</sup>.

Ως γνωστόν σε ένα μέταλλο όταν αυξάνεται η θερμοκρασία αυξάνεται και η πιθανότητα συγκρούσεων των ηλεκτρονίων των ατόμων του υλικού, οπότε μειώνεται η μέση ελευθέρα διαδρομή τους, με συνέπεια να μειώνεται η αγωγιμότητα ή ισοδύναμα να αυξάνει η αντίσταση. Αυτό μπορεί να αποδοθεί σαν:

$$\sigma \propto \frac{1}{T}$$

(Σχέση 10)

Επίσης είναι γνωστό για ένα μέταλλο ότι η σχέση μεταξύ και θερμικής  $\sigma_\theta$  και ηλεκτρικής αγωγιμότητας  $\sigma$  δίνεται από τη σχέση:

$$\frac{\sigma_\theta}{\sigma} = L \cdot T$$

(Σχέση 11)

όπου  $T$  η απόλυτη θερμοκρασία (K) και  $L$  ο συντελεστής του Lorenz  $L = 2,45 \times 10^{-8} \text{ W}\Omega\text{K}^{-2}$ . Η σχέση 11 αποτελεί τον νόμο των Wiederman – Franz – Lorenz.

Υλικό	Ειδική αντίσταση $\rho$ $\times 10^{-8} (\Omega \cdot \text{m})$	Αγωγιμότητα $\sigma$ $\times 10^7 (\Omega \cdot \text{m})^{-1}$
Άργυρος	1,59	6,29
Χαλκός	1,68	5,95
Λευκόχρυσος	10,6	0,943
Constantan	49	0,20

Ως θερμαντικό στοιχείο, χρησιμοποιήσαμε αντίσταση από κράμα Cu–Ni (*Constantan*) με 60 % Cu και 40 % Ni. Επιθυμούμε αντιστάσεις που έχουν μεγάλη ειδική αντίσταση  $\rho$ , με τιμή που να μην μεταβάλλεται με τον χρόνο και τη θερμοκρασία. Το κράμα Cu–Ni έχει πρακτικά μηδενικό θερμικό συντελεστή ειδικής αντίστασης, έτσι η ειδική του αντίσταση παραμένει σταθερή στις μεταβολές της θερμοκρασίας. Έτσι, σε μεγάλη αντίσταση χρειάζεται μικρό ρεύμα για να προκληθεί *θερμικό φαινόμενο Joule*, σύμφωνα με το οποίο όταν ένας αγωγός διαρρέεται από ηλεκτρικό ρεύμα αυξάνεται η θερμοκρασία του. Η θερμότητα ( $Q$ ) που παράγεται από έναν αντιστάτη ( $R$ ), σε χρόνο ( $t$ ) όταν αυτός διαρρέεται από ηλεκτρικό ρεύμα σταθερής έντασης ( $I$ ), είναι ανάλογη του τετραγώνου της έντασης, ανάλογη της αντίστασης και ανάλογη του χρόνου.

$$Q = I^2 \cdot R \cdot t$$

(Σχέση 12)

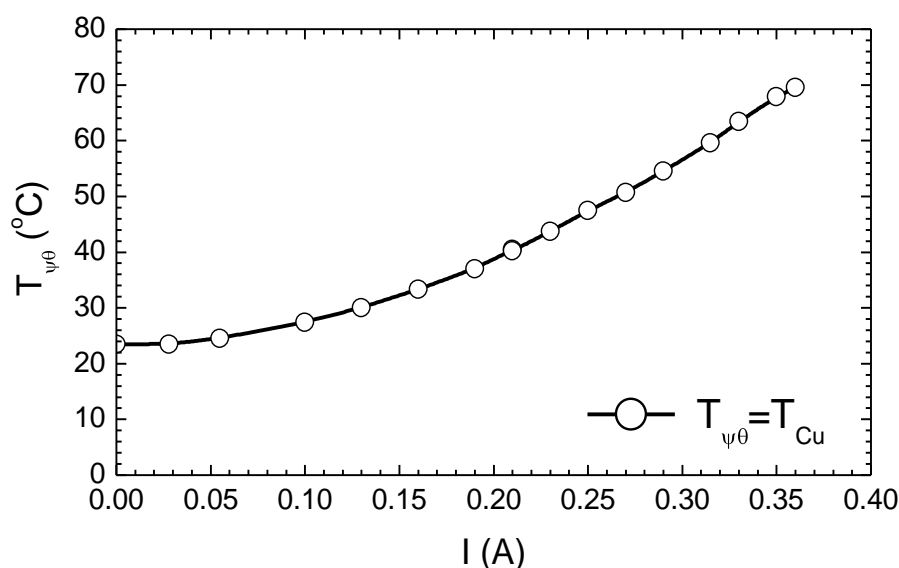
Η ερμηνεία του φαινομένου Joule και ο μηχανισμός σε ένα μεταλλικό σύρμα, η ενέργεια του ηλεκτρικού ρεύματος μετατρέπεται σε θερμική έχει ως εξής: Σε ένα μεταλλικό σύρμα, όσο μεγαλύτερη είναι η θερμοκρασία του, τόσο πιο έντονη είναι η άτακτη κίνηση των ιόντων και των ελεύθερων ηλεκτρονίων του. Εξαιτίας της διαφοράς δυναμικού τα ελεύθερα ηλεκτρόνια μετατοπίζονται κατά μήκος του αγωγού και έτσι αποκτούν πρόσθετη κινητική ενέργεια. Συγκρούονται τότε με τα ιόντα του πλέγματος και η άτακτη κίνηση (ταλάντωση) των ιόντων γίνεται

εντονότερη. Ταυτόχρονα τα ηλεκτρόνια επιταχύνονται εκ νέου από το ηλεκτρικό πεδίο και αναπληρώνουν τη χαμένη τους κινητική ενέργεια. Έτσι η συνολική χαοτική κίνηση των σωματιδίων του σύρματος γίνεται εντονότερη. Η θερμική ενέργεια και η θερμοκρασία του αυξάνονται [7], [8].

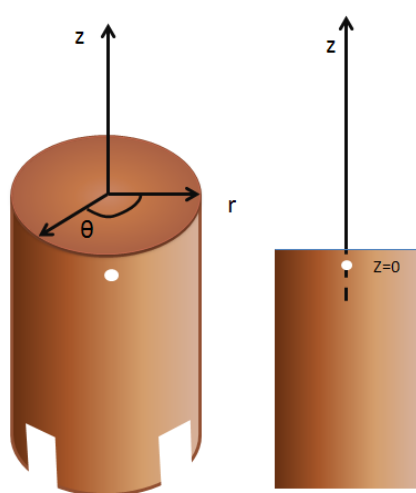
Στη μεταλλική πλατφόρμα του σχήματος 12, τυλίγουμε το σύρμα από Cu-Ni (Constantan), σε παράλληλες σπείρες, αποφεύγοντας τη μεταξύ τους επαφή για να μη βραχυκυκλώσουν. Όταν ολοκληρώσουμε την περιτύλιξη καλύπτουμε με ειδική μονωτική ταινία. Την αρχή και το πέρας του σύρματος έχουμε φροντίσει να παραμείνουν ακάλυπτα και τα συνδέουμε με μια πηγή ρεύματος. Με τον περιστρεφόμενο διακόπτη ρυθμίζουμε το ρεύμα καθορίζοντας έτσι τη θερμοκρασία του κυλινδρικού δειγματοφορέα Cu, βάσει της προτυποποιημένης κλίμακας ρεύματος  $I$  (A) – θερμοκρασίας  $T$  ( $^{\circ}\text{C}$ ) που καταγράψαμε και παραθέτουμε στον πιο κάτω πίνακα.

<b>I (A)</b>	<b>T (<math>^{\circ}\text{C}</math>)</b>
0	23,5
0,028	23,5
0,055	24,5
0,100	27,4
0,130	30,0
0,160	33,3
0,190	37,0
0,210	40,5
0,210	40,2
0,230	43,7
0,250	47,5
0,270	50,7
0,290	54,5
0,315	59,6
0,330	63,4
0,350	67,9
0,360	69,5

Τα δεδομένα του πιο πάνω πίνακα συνοψίζονται στη γραφική αναπαράσταση θερμοκρασίας  $T(^{\circ}\text{C})$  συναρτήσει του ρεύματος  $I$  (A) η οποία ακολουθεί:



**Εικόνα 13:** Γραφική παράσταση θερμοκρασίας  $T$  συναρτήσει του ρεύματος  $I$ .



Ένα σημαντικό θέμα που μας απασχολεί είναι η θερμική ομοιογένεια του περιβάλλοντος χώρου των ΕΑ δεδομένου ότι αυτά δεν βρίσκονται μέσα σε κλειστό θάλαμο ελεγχόμενης θερμοκρασίας αλλά η μία τους επιφάνεια είναι εκτεθειμένη σε θερμοκρασία δωματίου.

Για τη διερεύνηση του προβλήματος χρησιμοποιείται η εξίσωση διάχυσης θερμότητας σε μέσο με σταθερό συντελεστή

**Εικόνα 14:** Οι κυλινδρικές συντεταγμένες θερμικής αγωγιμότητας εκφρασμένη σε πάνω στο δειγματοφόρο.

κυλινδρικές συντεταγμένες:

$$\frac{\partial u}{\partial t} - k \left( \frac{\partial^2 u}{\partial x^2} + \frac{\partial^2 u}{\partial y^2} + \frac{\partial^2 u}{\partial z^2} \right) = 0$$

Θεωρούμε ο κύλινδρος έχει σε κάθε του πλευρά θερμοκρασία σταθερή. Ως αποτέλεσμα η θερμοκρασία του μεταβάλλεται μόνο σε διάσταση κάθετη στον κύλινδρο, οπότε το πρόβλημα είναι μονοδιάστατο. Αν θεωρηθεί μόνιμο



θερμοκρασιακό πεδίο (οπότε μηδενίζεται ο αντίστοιχος χρονικός όρος, η εξίσωση διάχυσης θερμότητας γίνεται:

$$\frac{d}{dz} \left( k \frac{dT}{dz} \right) = 0$$

(Σχέση 13)

Ο όρος εντός της παρενθέσεως στη (σχέση 13) είναι προφανώς η πυκνότητα θερμοροής κατά τη διεύθυνση  $z$  και η σχέση δηλώνει ότι αυτή δε μεταβάλλεται κατά την εν λόγω διεύθυνση. Υποθέτοντας σταθερή τιμή για το συντελεστή θερμικής αγωγιμότητας του Cu, η παραπάνω διαφορική εξίσωση ολοκληρώνεται με τη γενική της λύση να προκύπτει:

$$T(z) = C_1 z + C_2$$

(Σχέση 14)

Όπου  $C_1 = C/k$ .

Οι σταθερές  $C_1$  και  $C_2$  της σχέσης 14 προσδιορίζονται με τη βοήθεια των οριακών συνθηκών.

Για την περίπτωση που γνωρίζουμε τις θερμοκρασίες (περίπτωση οριακών συνθηκών τύπου Dirichlet), τότε οι δύο σταθερές προσδιορίζονται από την εφαρμογή της γενικής λύσης στις δύο οριακές συνθήκες για  $z=0$  και  $z=L$ , όπου το 0 αντιστοιχεί στην άνω επιφάνεια του κυλίνδρου, όπου και μετράμε τη θερμοκρασία  $T_1$ . Λόγω της πολύ μεγάλης θερμικής αγωγιμότητας του Cu, η θερμοκρασία  $T_1$  που μετράμε στο εσωτερικό του δειγματοφορέα με το ψηφιακό θερμόμετρο είναι ίση με αυτήν των εξωτερικών επιφανειών. Τέλος,  $L$  είναι η απόσταση (κατά τον άξονα  $z$ ) από την άνω επιφάνεια του κυλίνδρου όπου μετράμε τη θερμοκρασία δωματίου  $T_2$ . Τότε από τη σχέση 14 προκύπτει:

$$T(0) = T_1 \Rightarrow C_1 \cdot 0 + C_2 = T_1 \Rightarrow C_2 = T_1$$

$$T(L) = T_2 \Rightarrow C_1 L + C_2 = T_2 \Rightarrow C_1 L + T_1 = T_2 \Rightarrow C_1 = \frac{T_2 - T_1}{L}$$

Με αντικατάσταση των σταθερών στη γενική λύση (σχέση 14), προκύπτει:

$$T(z) = \frac{(T_2 - T_1)}{L} z + T_1$$

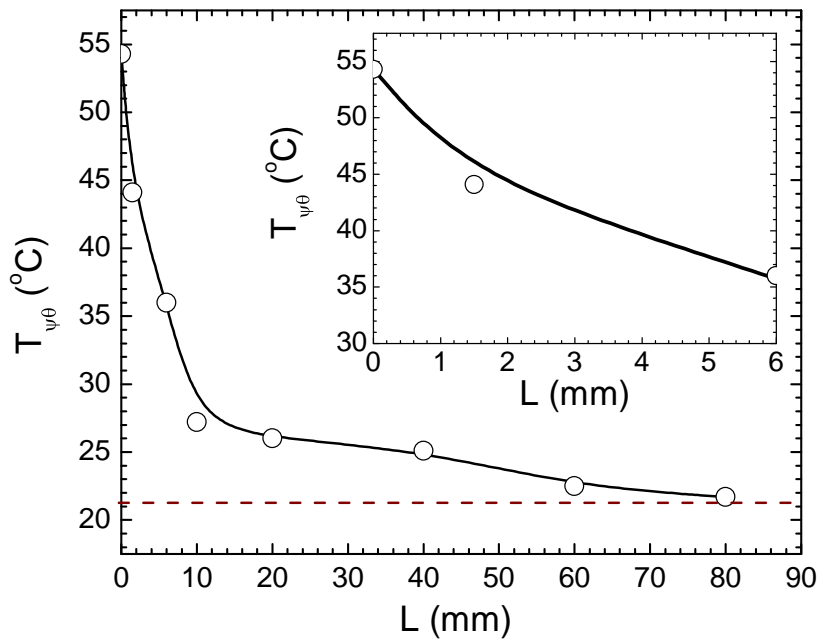
Όπως άλλωστε δείχνει η διακεκομμένη γραμμή του σχήματος της εικόνας 15, σε απόσταση  $z \geq 80$  mm από το κέντρο του κυλινδρικού δειγματοφορέα η θερμοκρασία εξισορροπείται με τη θερμοκρασία του περιβάλλοντος που είναι 23 °C.

- $L=0 \text{ mm}$ ,  $T_1=55 \text{ }^\circ\text{C}$
- $L=80 \text{ mm}$ ,  $T_2=23 \text{ }^\circ\text{C}$

Άρα από τη διαφορική εξίσωση διάδοσης θερμότητας προκύπτει:

$$C_2=55$$

$$C_1 = -22/80 = -0,275$$



**Εικόνα 15:** Η σχέση που συνδέει την απόσταση από το κέντρο της πάνω επιφάνειας του κυλινδρικού δειγματοφορέα, σε συνάρτηση με τη θερμοκρασία.

$$T(z) = -0,275 z + 55$$

Εν κατακλείδι, μεταβάλλοντας το ρεύμα που διαρρέει τον αντιστάτη Constantan μέσω της πηγής ρεύματος, μεταβάλλουμε τη θερμοκρασία του δειγματοφορέα Cu και επομένως και του δείγματος που βρίσκεται πάνω σε αυτόν. Με την ένδειξη του ψηφιακού θερμομέτρου έχουμε γνωστή τη θερμοκρασία. Για τη λήψη εικόνων ΜΑΔ από την επιφάνεια του δείγματος σε διάφορες θερμοκρασίες ακολουθείται το πιο κάτω πειραματικό πρωτόκολλο.

- 1) Απομακρύνουμε την ακίδα από το δείγμα
- 2) Αύξηση ρεύματος, επομένως και θερμοκρασίας
- 3) Αναμονή λίγων λεπτών (τουλάχιστον 5 min) για αποκατάσταση θερμικής ισορροπίας

4) Ο πιεζοηλεκτρικός σαρωτής μετακινεί την προς μελέτη επιφάνεια κάτω ακριβώς από την αιχμή της ακίδας

5) Σάρωση της ίδιας περιοχής του δείγματος (ίδιο ΕΑ ή ίδια περιοχή μεμβράνης ανάλογα με τι ερευνούμε).

Αυτό το πειραματικό πρωτόκολλο ακολουθείται γιατί όταν μεταβάλλουμε τη θερμοκρασία του κυλινδρικού δειγματοφορέα χωρίς να έχουμε απομακρύνει σε ασφαλή μακροσκοπική απόσταση (1mm) την ακίδα από το δείγμα, είναι πολύ πιθανό να καταστρέψουμε την ακίδα λόγω διαστολής του δειγματοφορέα κατά την διάσταση z από την αύξηση της θερμοκρασίας. Για την επιμέρους κατανόηση του σημαντικού αυτού ζητήματος της διαστολής ακολουθεί η πιο κάτω συζήτηση,

Από την αρχή μέχρι το περάς των πειραμάτων, εμπλέκεται η μεταβολή της θερμοκρασίας του κυλινδρικού δειγματοφορέα. Ο κύλινδρος θεωρείται ομογενής και ομοιόμορφης εγκάρσιας διατομής, η οποία στηρίζεται ελεύθερα. Αν η θερμοκρασία του κυλίνδρου αυξηθεί κατά  $\Delta T$ , ο κύλινδρος επιμηκύνεται κατά ένα ποσό  $\Delta L$ , το οποίο είναι ανάλογο τόσο της θερμοκρασίας  $\Delta T$  όσο και του μήκους  $L$  του κυλίνδρου. Έχουμε:

$$\Delta L = \alpha \cdot L \cdot (\Delta T)$$

(Σχέση 14)

Όπου  $\alpha$  μια χαρακτηριστική σταθερά του υλικού, η οποία καλείται συντελεστής θερμικής διαστολής. Εφόσον  $\Delta T$  και  $L$  εκφράζονται σε μονάδες μήκους, το  $\alpha$  παριστάνει μια ποσότητα ανά βαθμό  $^{\circ}\text{C}$  [9].

Για τον κυλινδρικό δειγματοφορέα Cu η σταθερά  $\alpha = \frac{17 \cdot 10^{-6}}{^{\circ}\text{C}}$ . Ο κύλινδρος έχει αρχικό μήκος  $L=2 \text{ cm}$ . Άρα όταν συμβαίνουν οι παρακάτω θερμοκρασιακές μεταβολές:

- $T=23^{\circ}\text{C} \rightarrow 23,5^{\circ}\text{C}$ , η επιμήκυνση λόγω θερμοκρασιακής τάσης είναι:

$$\Delta L_{Cu} = \frac{17 \cdot 10^{-6}}{^{\circ}\text{C}} \cdot 2 \text{ cm} \cdot (0,5^{\circ}\text{C})$$

$$\Rightarrow \Delta L_{Cu} = 0,17 \cdot 10^{-6} \text{ m} = 0,17 \mu\text{m}$$

- $T=23^{\circ}\text{C} \rightarrow 69^{\circ}\text{C}$ , η επιμήκυνση λόγω θερμοκρασιακής τάσης είναι:

$$\Delta L_{Cu}' = \frac{17 \cdot 10^{-6}}{^{\circ}\text{C}} \cdot 2 \text{ cm} \cdot (46^{\circ}\text{C})$$

$$\Rightarrow \Delta L_{Cu}' = 15,64 \mu\text{m}$$

Για το γυάλινο πλακίδιο  $\alpha = \frac{9 \cdot 10^{-6}}{^{\circ}\text{C}}$  και αρχικό πάχος 1 mm. Άρα όταν συμβαίνουν οι παρακάτω θερμοκρασιακές μεταβολές:

- $T=23^{\circ}\text{C} \rightarrow 23,5^{\circ}\text{C}$ , η επιμήκυνση λόγω θερμοκρασιακής τάσης είναι:

$$\Delta L_r = \frac{9 \cdot 10^{-6}}{^{\circ}\text{C}} \cdot 1 \text{ mm} \cdot (0,5^{\circ}\text{C})$$

$$\Rightarrow \Delta L_r = 0,009 \mu\text{m} = 9 \text{ nm}$$

- $T=23^{\circ}\text{C} \rightarrow 69^{\circ}\text{C}$ , η επιμήκυνση λόγω θερμοκρασιακής τάσης είναι:

$$\Delta L_r' = \frac{9 \cdot 10^{-6}}{^{\circ}\text{C}} \cdot 1 \text{ mm} \cdot (46^{\circ}\text{C})$$

$$\Rightarrow \Delta L_r' = 0,414 \mu\text{m} = 414 \text{ nm}$$

Οπότε, η συνολική παραμόρφωση του συστήματος κυλινδρικός δειγματοφορέας και γυάλινο πλακίδιο, φέρει τις εξής διακυμάνσεις:

- $T=23^{\circ}\text{C} \rightarrow 23,5^{\circ}\text{C}$ , η συνολική επιμήκυνση του συστήματος λόγω θερμοκρασιακής τάσης είναι:

$$\Delta L_{ολ} = \Delta L_{Cu} + \Delta L_r = (0,17 + 0,009) \mu\text{m} = \mathbf{0,179 \mu\text{m}}$$

- $T=23^{\circ}\text{C} \rightarrow 69^{\circ}\text{C}$ , η συνολική επιμήκυνση του συστήματος λόγω θερμοκρασιακής τάσης είναι:

- $\Delta L_{ολ}' = \Delta L_{Cu}' + \Delta L_r' = (15,64 + 0,414) \mu\text{m} = \mathbf{16,054 \mu\text{m}}$

Συνεπώς, η επιμήκυνση του συστήματος λόγω της αύξησης της θερμοκρασίας είναι της τάξεως των  $\mu\text{m}$  και ξεπερνά σε μήκος τα 10 nm που είναι η συνήθης απόσταση της ακίδας του ΜΑΔ από το δείγμα. Για λόγους ακεραιότητας της ακίδας δεν υπάρχουν περιθώρια για διαστολή του κυλινδρικού δειγματοφορέα κατά τον z άξονα, από την αύξηση της θερμοκρασίας της διάταξης.

Στο επόμενο κεφάλαιο παρουσιάζονται αναλυτικά τα πειραματικά αποτελέσματα και η ποσοτική επεξεργασία τους.

## **BIBΛΙΟΓΡΑΦΙΑ - ΑΝΑΦΟΡΕΣ**

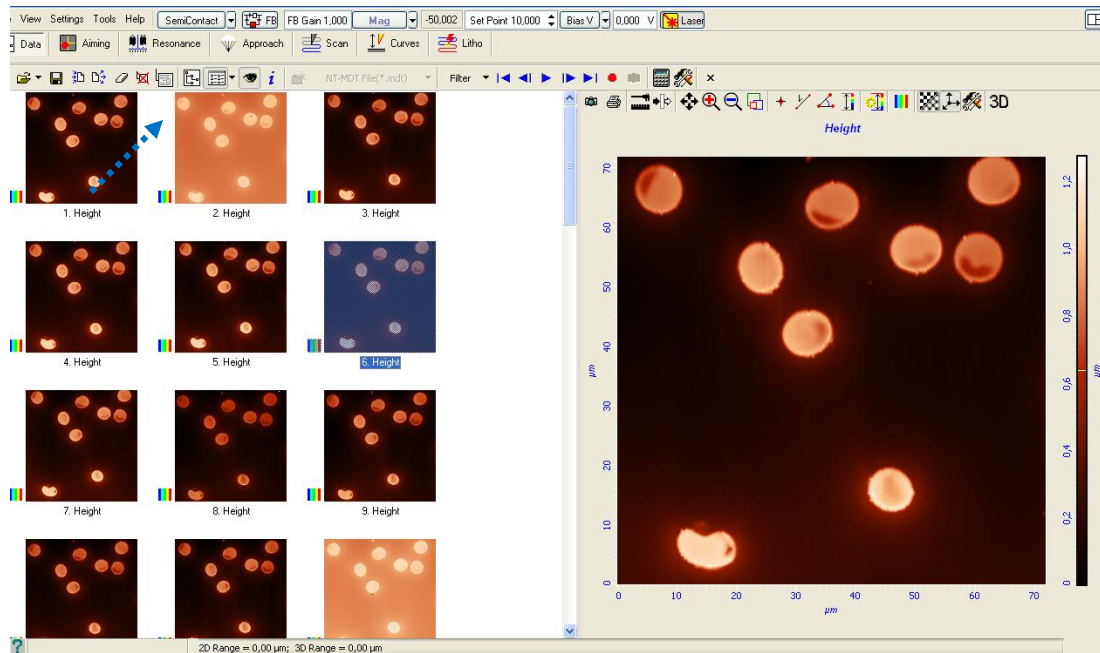
- [1] Fiehler W, *Blood serum separating tube*, U.S. Patent, 1999.
- [2] Ζευγώλης Δ, *Εφαρμοσμένη Οπτική*, Εκδ. Τζιόλα, Αθήνα, 2007, 491-510.
- [3] Lipson A, Lipson S, *Optical Physics 4th Edition*, Cambridge university press, USA, 2010.
- [4] Young M, *Οπτική και Λείζερ*, Πανεπιστημιακές Εκδόσεις ΕΜΠ, Αθήνα, 2008.
- [5] Bhushan B, *Springer Handbook of Nanotechnology 3<sup>rd</sup> edition*, Springer-Verlag Berlin Heidelberg, 2010.
- [6] Kubo N, Hirota R, Okada T, Ohara T, Kawano M, *Structural Analysis Using Atomic Force Microscopy of the Surface of Red Blood Cells to Detect Anti-Red Blood Cell Autoantibody*, Laboratory Hematology, 9, 2003, 47-49.
- [7] Purcell E, *Ηλεκτρισμός και Μαγνητισμός*, Πανεπιστημιακές Εκδόσεις Ε.Μ.Π., Αθήνα, 2004.
- [8] Χανιά Μ, *Σημειώσεις στην Τεχνολογία Υλικών και Εξαρτημάτων*, Γενικό Τμήμα Θετικών Επιστημών, Χαλκίδα, 2004.
- [9] Beer F, Johnston E, *Μηχανική των Υλικών Τόμος Α'*, Εκδ. Τζιόλα, Θεσσαλονίκη, 2003.

# 4

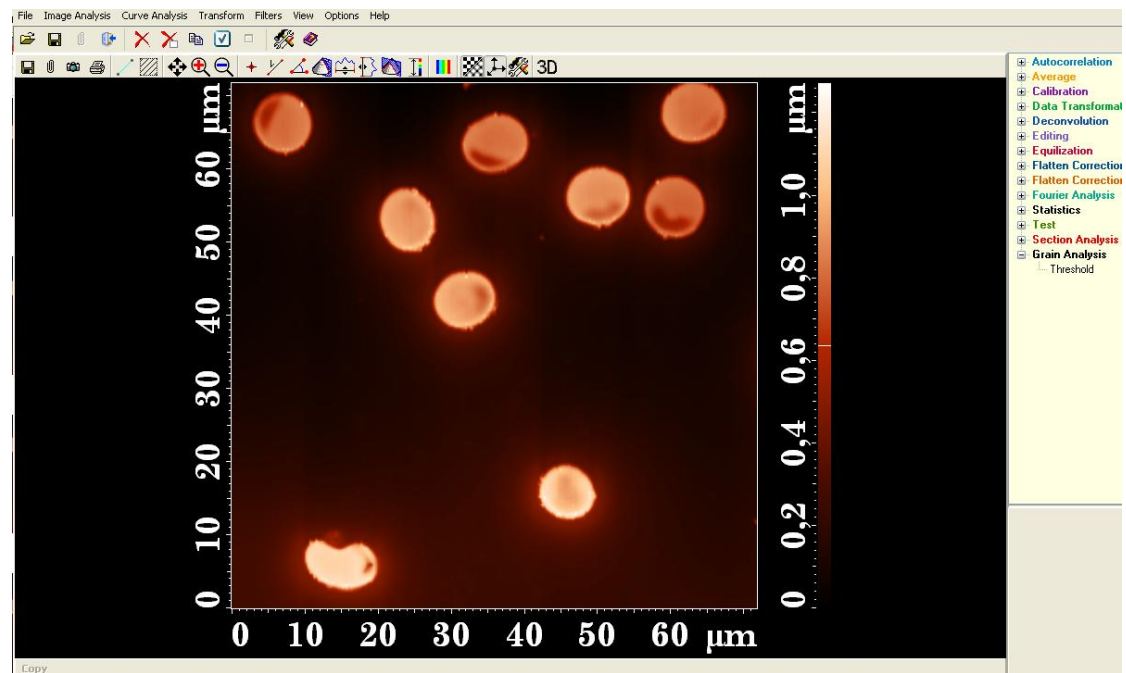
## *Πειραματικά αποτελέσματα και συζήτηση*

Το παρόν κεφάλαιο, περιέχει την επεξεργασία των πειραματικών δεδομένων. Έχοντας δείγμα από δύο διαφορετικούς δότες οι οποίοι είναι υγιείς (δότης Α, δότης Β), μελετούμε τη μεταβολή των διαφόρων μορφολογικών χαρακτηριστικών των ΕΑ συγκριτικά με κάποιο εύρος θερμοκρασίας. Το λογισμικό που χρησιμοποιήθηκε για απόκτηση των αριθμητικών δεδομένων είναι το NOVA και παρέχεται από το συγκεκριμένη έκδοση ΜΑΔ, με διαδικασία που περιγράφεται στη συνέχεια. Μέσω του λογισμικού αυτού δίνεται η δυνατότητα στο χρήστη να λάβει ακριβείς αριθμητικές τιμές διάφορων παραμέτρων που καθορίζουν ένα κύτταρο (ή μία συλλογή κυττάρων). Οι παράμετροι αυτοί είναι η επιφάνεια, το ύψος, η περίμετρος, ο όγκος και η διάμετρος και να επεξεργαστεί τις εικόνες για την καλύτερη οπτική διερεύνηση του δείγματος. Έτσι λοιπόν ο χρήστης μπορεί να παρατηρεί από οποιαδήποτε οπτική γωνιά το δείγμα ακόμα και σε τρισδιάστατη απεικόνιση και να κάνει ποιοτικές εκτιμήσεις.

Έχοντας αποθηκεύσει τις ψηφιακές εικόνες του ΜΑΔ ανοίγουμε τα αρχεία και προχωράμε στην ανάλυση. Εμφανίζονται αριστερά όλες οι αποθηκευμένες εικόνες. Επιλέγοντας μία προς μία, ακολουθούμε τη διαδικασία που περιγράφεται στη συνέχεια. Δουλεύουμε μία προς μία τις εικόνες με την επιλογή του κατάλληλου εικονιδίου.

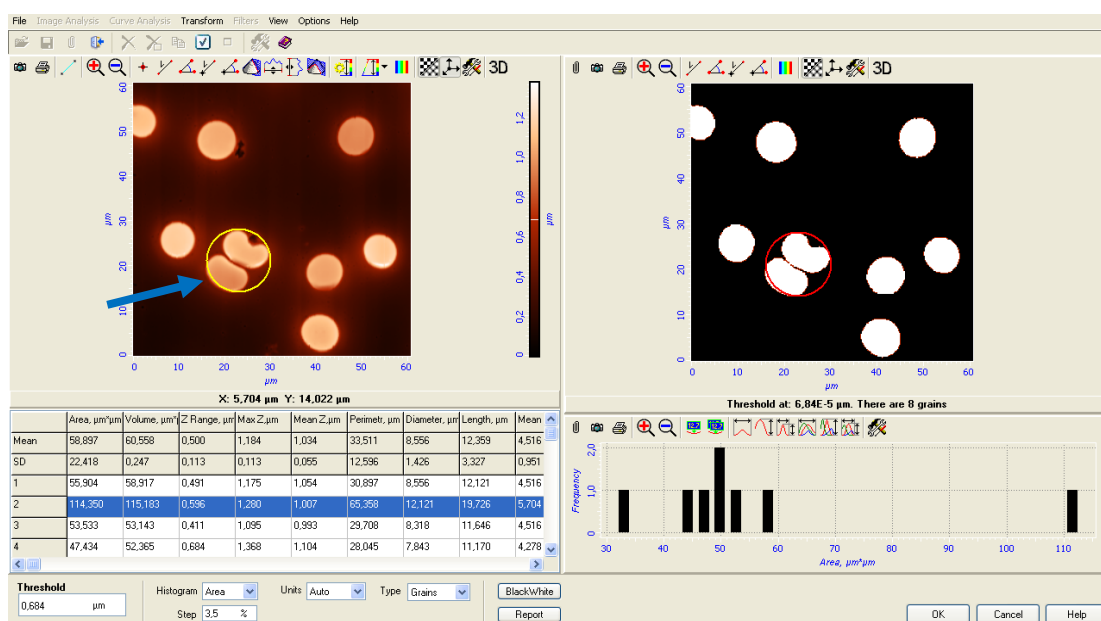


**Εικόνα 1:** Συλλογή ΕΑ στο λογισμικό NOVA.



**Εικόνα 2:** Εικόνα ομάδας ΕΑ στο λογισμικό NOVA και επιλογές επεξεργασίας

Πράγματι, καθώς το ΜΑΔ σαρώνει το δείγμα μπορεί να συναντήσει ένα ψήγμα που έχει μεγαλύτερο ύψος από το κύτταρο. Σε αυτή την περίπτωση το λογισμικό που κατασκευάζει την εικόνα αναπροσαρμόζει την αντίθεση της εικόνας όπως δείχνει το μπλε διακεκομμένο βέλος της εικόνας 1. Στο ήδη υπάρχον παράθυρο επιλέγουμε το εικονίδιο Grain Analysis και την ένδειξη Threshold. Όπως δείχνει και εικόνα 2. Το πρόγραμμα αναγνωρίζει ως κυκλικά (τύπου grain), τα έμμορφα συστατικά και τα εντοπίζει ένα προς ένα, ενώ συγχρόνως τα αριθμεί για να τα ξεχωρίζει ο χρήστης.



**Εικόνα 3:** Η επιλογή Grain analysis συνοπολογίζει και ένα συσσωμάτωμα ΕΑ, όπως δείχνει με το μπλε βέλος.

Στον υποπίνακα παρέχονται συγκεντρωτικά όλες τις πληροφορίες για κάθε ΕΑ ξεχωριστά. Ο χρήστης όμως καλείται να επιλέξει τόσο ανάμεσα στα χαρακτηριστικά των κυττάρων που θα συμπεριλάβει στη διεξαγωγή αποτελεσμάτων αλλά κυρίως ποια ΕΑ δύναται να προσδιορίζει το λογισμικό. Το λογισμικό, αναγνωρίζει σαν ένα, τα ΕΑ υπ' αριθμόν 2 που βρίσκονται πολύ κοντά μεταξύ τους. Το μπλε βέλος επισημαίνει αυτό το συσσωμάτωμα. Προφανώς, αυτά τα ΕΑ θα πρέπει να εξαιρεθούν από τα πειραματικά αποτελέσματα καθώς ενδιαφερόμαστε να λάβουμε δεδομένα για αυτοτελή κύτταρα.

Επίσης, ο χρήστης θα πρέπει να διακρίνει τυχόν αλλοιώσεις της εικόνας που το λογισμικό αναγνωρίζει ως κύτταρα και τα καταγράφει. Τέτοιες αλλοιώσεις μπορεί να είναι τυχόν ψήγματα, ή ακόμα και ΕΑ που δεν έχουν σαρωθεί ολόκληρα στο



συγκεκριμένο πλαίσιο σάρωσης. Στη συνέχεια, ακολουθεί η στατιστική ανάλυση και καταχώρηση των αριθμητικών δεδομένων στο πρόγραμμα ORIGIN. Κάθε εικόνα μπορεί να αναπαριστά περισσότερα από 1 ΕΑ (όπως εδώ που έχει 9). Από κάθε εικόνα λαμβάνουμε το μέσο όρο των διαφόρων μεγεθών (διάμετρος, ύψος, εμβαδόν) διαιρώντας δηλαδή με το πλήθος των επιθυμητών κυττάρων. Το σφάλμα της μέσης τιμής που δίνει η κάθε εικόνα αποτελεί δείκτη ανισοκυττάρωσης.

Στην παρούσα μελέτη η ανάλυση θα γίνει ανά δότη και ανά μορφολογικό χαρακτηριστικό. Έχουμε λάβει εικόνες σε πλαίσια περίπου  $70 \times 70 \mu\text{m}^2$ , που μπορεί να περιλαμβάνει ως και 9 ΕΑ. Επίσης, για την κάθε θερμοκρασία που βρίσκεται το δείγμα του κάθε δότη, λάβαμε παραπάνω από μία εικόνες για πιο αξιόπιστα αποτελέσματα. Συγκεκριμένα, το δείγμα του δότη Α έχουμε 2 εικόνες για ένα εύρος θερμοκρασιών  $23,5 - 82,5 \text{ }^\circ\text{C}$ , και στο δότη Β, 4 εικόνες για ένα εύρος θερμοκρασιών  $22,5 - 50,5 \text{ }^\circ\text{C}$ . Έχοντας τη μέση τιμή διαμέτρου, εμβαδόν και ύψους από τις 4 εικόνες κάθε θερμοκρασίας, ή από τις 2 εικόνες σχεδιάστηκαν τα αντίστοιχα διαγράμματα. Το σφάλμα στον άξονα y που υπεισέρχεται στα διαγράμματα, καθορίζεται από την τυπική απόκλιση των πολλαπλών μετρήσεων-σαρώσεων. Αυτό, αφορά στο σφάλμα που δίνει το σύνολο των κυττάρων και όχι κάθε ένα κύτταρο ξεχωριστά. Στη συνέχεια, ακολουθούν οι γραφικές παραστάσεις σε συνάρτηση με τη θερμοκρασία: 1) διάμετρος ΕΑ, 2) εμβαδόν ΕΑ, 3) ύψος ΕΑ για τον κάθε δότη ξεχωριστά.

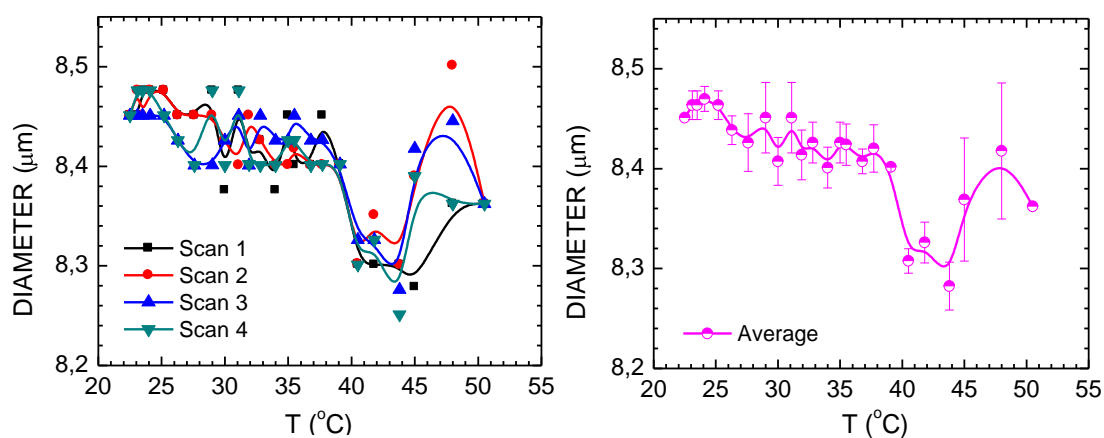
#### **4.1. Μεταβολή των μικροσκοπικών γεωμετρικών χαρακτηριστικών των ΕΑ στην περιοχή θερμοκρασιών $20 - 90 \text{ }^\circ\text{C}$**

Στο δείγμα ΕΑ του δότη Α πραγματοποιήθηκαν 4 διαδοχικές σαρώσεις για την κάθε θερμοκρασία, πάντα με την ίδια οριζόντια φορά σάρωσης. Το δείγμα ΕΑ του δότη Α, θερμαίνεται μέσω της θερμαινόμενης πλατφόρμας σε ένα θερμοκρασιακό εύρος  $20 - 55 \text{ }^\circ\text{C}$ . Προκειμένου όμως να επιτευχθεί καλύτερη ακρίβεια στις μετρήσεις και να μελετηθεί εκτενέστερα μια ευρύτερη περιοχή θερμοκρασιών, επαναλάβαμε το πείραμα σε δείγμα ΕΑ ενός δεύτερου δότη. Στο δότη Β πραγματοποιήθηκαν 2 διαδοχικές σαρώσεις σε θερμοκρασίες  $20 - 90 \text{ }^\circ\text{C}$ .

#### 4.1.1. Εξάρτηση διαμέτρου από τη θερμοκρασία

Οι σαρώσεις διεξάγονται με κάποια επαναληψιμότητα προκειμένου να έχουμε ακριβέστερη εικόνα των αποτελεσμάτων και να μειωθεί το σφάλμα της τυπικής απόκλισης. Από το συγκερασμό των σαρώσεων, προκύπτει η μέση τιμή της διαμέτρου για την κάθε θερμοκρασία. Ακολουθούν τα διαγράμματα για τον κάθε δότη:

- ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ ΓΙΑ ΤΟ ΔΟΤΗ Α



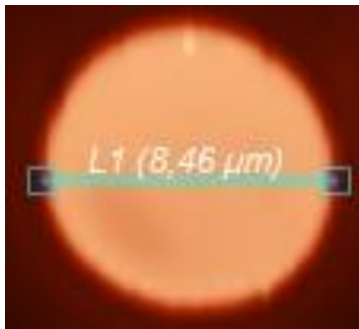
**Εικόνα 4:** Αριστερά: Απεικόνιση της μεταβολής της διαμέτρου των ΕΑ συναρτήσει της θερμοκρασίας, όπως προκύπτει από 4 σαρώσεις. Δεξιά: Απεικόνιση της μεταβολής της μέσης τιμής της διαμέτρου συναρτήσει της θερμοκρασίας.

Στο δότη Α διεξήχθησαν 4 σαρώσεις με το ΜΑΔ για την κάθε θερμοκρασία, οι οποίες γίνονταν κάθε φορά πάνω στην ίδια περιοχή του δείγματος και κατά την ίδια διεύθυνση σάρωσης. Ο συγκερασμός των σαρώσεων οδηγεί στην γραφική παράσταση της μέσης τιμής συναρτήσει της θερμοκρασίας. Παρατηρούμε ότι το σφάλμα εδώ κυμαίνεται από 0 % και στους 45 °C φτάνει το 7 %. Η καμπύλη που ακολουθεί το διάγραμμα στην εικόνα 4, παρουσιάζει μία μείωση της διαμέτρου για θερμοκρασίες **38 – 45 °C** της τάξεως του  $8,41-8,3/8,41=1,31$  %. Η διάμετρος των ΕΑ λαμβάνει:

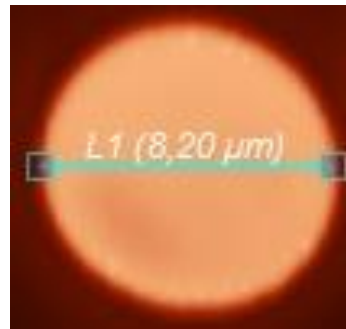
- Μεγίστη τιμή που είναι **8,47 μm** στους 24,1 °C.
- Η ελάχιστη τιμή **8,28 μm** στους 43,8 °C.

- Μεγίστη και ελάχιστη τιμή διαφέρουν κατά  $8,47-8,28=0,19 \mu\text{m}$ . Ποσοστιαία εκφράζεται ως **2,24 %**.

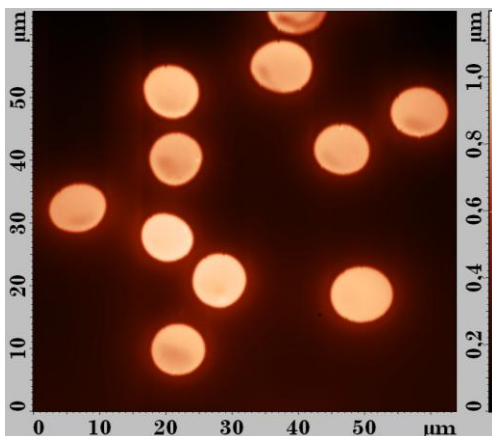
Στις εικόνες 7 και 8 όπου απεικονίζεται η ίδια περιοχή του δείγματος σε διαφορετικές θερμοκρασίες, δεν παρατηρείται κάποια μακροσκοπική μεταβολή στη διάμετρο των ΕΑ.



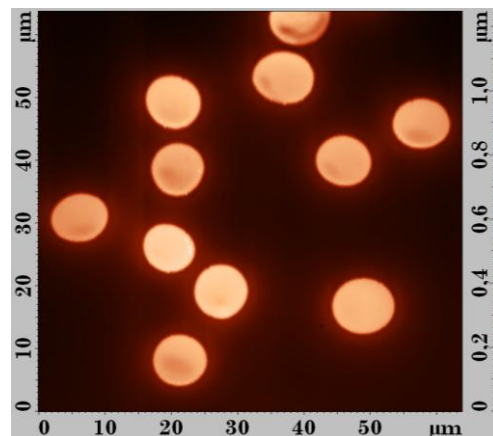
**Εικόνα 5:** Εστίαση σε ΕΑ σε θερμοκρασία  $T=43,8 \text{ }^{\circ}\text{C}$  όπου εμφανίζεται η μέγιστη διάμετρος.



**Εικόνα 6:** Εστίαση σε ΕΑ σε θερμοκρασία  $T=24,1 \text{ }^{\circ}\text{C}$  όπου εμφανίζεται η ελάχιστη διάμετρος.



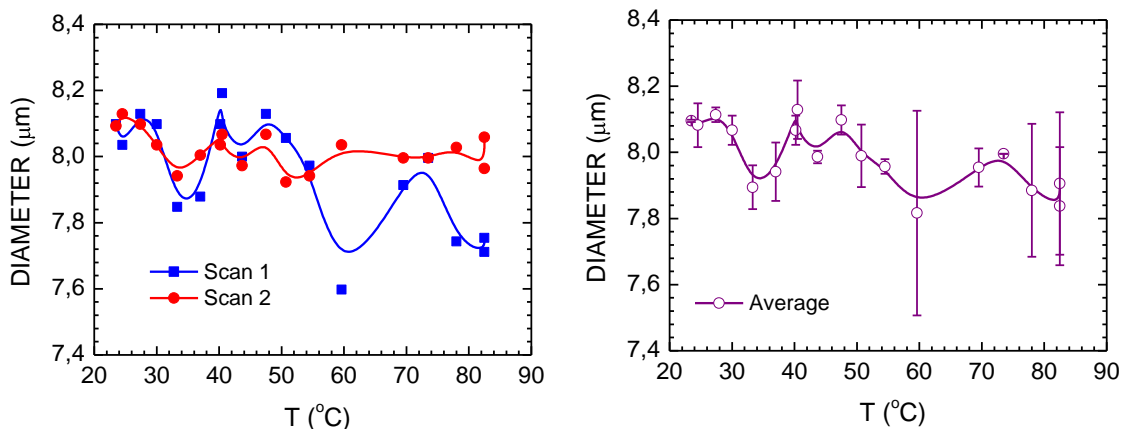
**Εικόνα 7:** Σύνολο ΕΑ σε θερμοκρασία  $24,1 \text{ }^{\circ}\text{C}$ .



**Εικόνα 8:** Σύνολο ΕΑ σε θερμοκρασία  $43,8 \text{ }^{\circ}\text{C}$ .

Με την μεταβολή της θερμοκρασίας, η διάμετρος των ΕΑ του δότη Α υφίσταται αμελητέες διαφοροποιήσεις που κυμαίνονται της τάξεως του 2,2 – 3,9 %. Σύμφωνα άλλωστε και με τη βιβλιογραφία, οι φυσιολογικές τιμές διαμέτρου των ΕΑ είναι 7 – 8  $\mu\text{m}$ . Επομένως, στην περιοχή θερμοκρασιών 20 – 55  $^{\circ}\text{C}$ , τα κύτταρα παραμένουν σε φυσιολογική διάμετρο. Αντιπαραβάλουμε συγκριτικά, αποτελέσματα για το δότη Β.

#### • ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ ΓΙΑ ΤΟ ΔΟΤΗ Β



**Εικόνα 9:** Αριστερά: Απεικόνιση της μεταβολής της διαμέτρου των ΕΑ συναρτήσει της θερμοκρασίας, όπως προκύπτει από 2 σαρώσεις. Δεξιά: Απεικόνιση της μεταβολής της μέσης τιμής της διαμέτρου συναρτήσει της θερμοκρασίας.

Η καμπύλη που ακολουθεί το διάγραμμα στην εικόνα 9, δείχνει μία μείωση της διαμέτρου για θερμοκρασίες 40 – 45 °C της τάξεως του  $(8,1-8,0)/8,1= 1,23 \%$ . Η μείωση στις συγκεκριμένες τιμές θερμοκρασίας συμφωνεί με τα αποτελέσματα του Δότη Α. Επιπλέον, στο δείγμα του Δότη Β, παρατηρούμε μείωση στους 30 – 35 °C της τάξεως του  $(8,1-7,9)/8,1=20 \%$  , και 50 – 70 °C της τάξεως του  $(8-7,85)/8=1,88 \%$ .

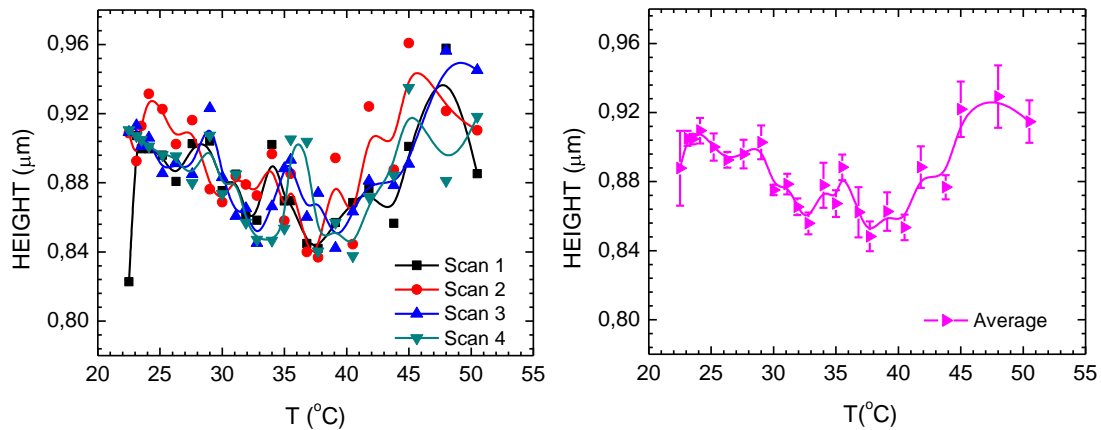
Παρατηρούμε ότι το στατιστικό σφάλμα που προκύπτει από τις δυο σαρώσεις αποκτά την ελάχιστη τιμή 0,001 % στη θερμοκρασία των 73,5 °C ενώ η μέγιστη τυπική απόκλιση παρατηρούμε ότι αντιστοιχεί στη θερμοκρασία των 59,6 °C και είναι 3,9 %. Η τιμή της διαμέτρου των ΕΑ είναι:

- Μέγιστη και ανέρχεται στα **8,13 μm** στους 40,5 °C.
- Ελάχιστη στα **7,82 μm** στους 59,6 °C.
- Διαφέρουν κατά  $8,13-7,82=0,31 \mu\text{m}$  που ποσοστιαία εκφράζεται ως **3,81 %**.

#### 4.1.2. Εξάρτηση ύψους από τη θερμοκρασία

Η τιμές του ύψους, για την κάθε τιμή θερμοκρασίας, προέρχονται από μια τετράδα σαρώσεων. Ακολουθούν τα διαγράμματα που έδωσε το σύνολο των πολλαπλών σαρώσεων στο δείγμα ΕΑ του κάθε δότη.

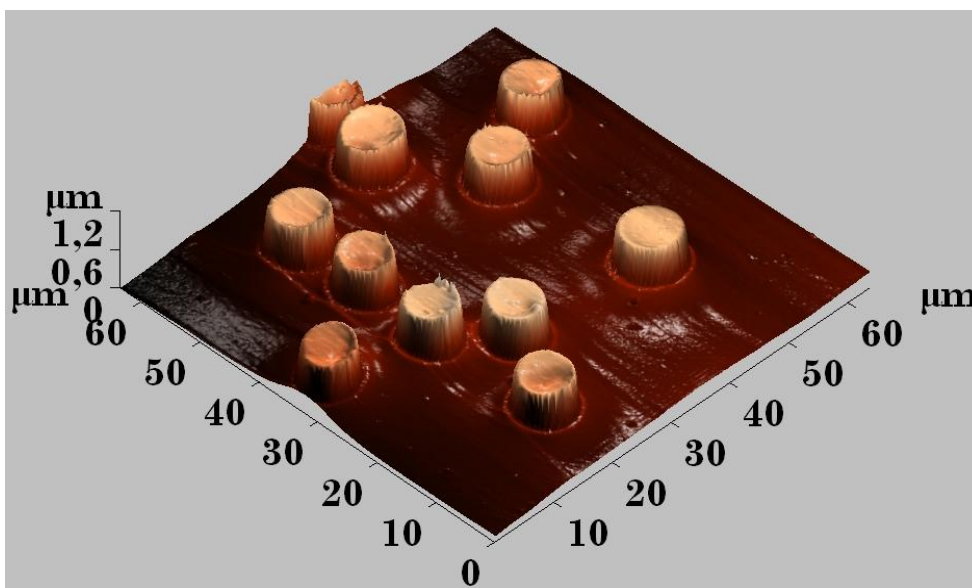
## • ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ ΓΙΑ ΤΟ ΔΟΤΗ Α



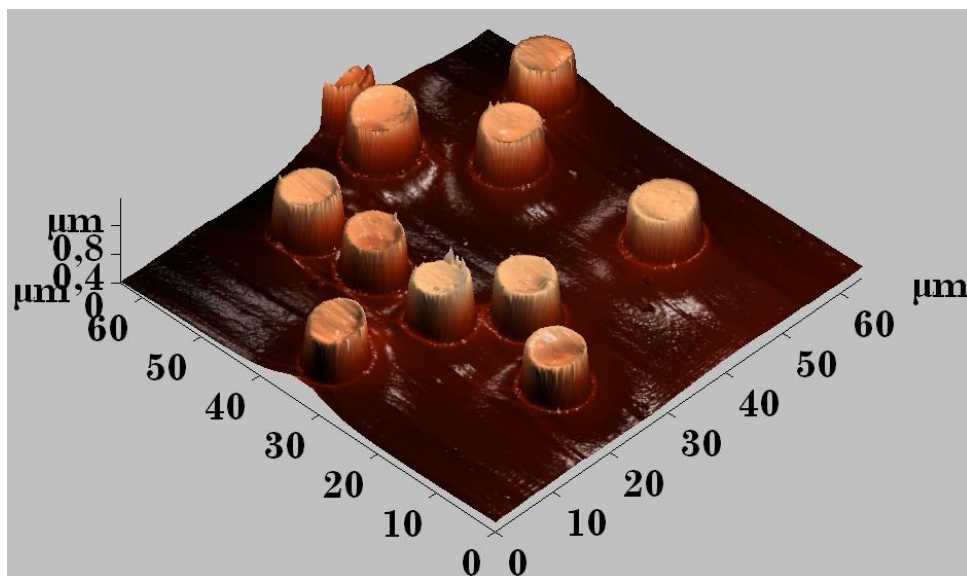
**Εικόνα 10:** Αριστερά: Απεικόνιση της μεταβολής του ύψους των ΕΑ συναρτήσει της θερμοκρασίας, όπως προκύπτει από 4 σαρώσεις. Δεξιά: Απεικόνιση της μεταβολής της μέσης τιμής του ύψους συναρτήσει της θερμοκρασίας.

Το σφάλμα προέρχεται από την τυπική απόκλιση των 4 επαναλήψεων. Οι τιμές αυτής της τυπικής απόκλισης κυμαίνονται από 0,6% στη θερμοκρασία 30 °C και φτάνουν έως το 4,8% στους 22,5 °C.

- Το μέγιστο ύψος που έχουν τα ΕΑ είναι **0,93 μm** στη θερμοκρασία των 48 °C.
- Το ελάχιστο ύψος είναι **0,85 μm** στην θερμοκρασία 37,7 °C.
- Η ελάχιστη από τη μέγιστη τιμή ύψους των ΕΑ, διαφέρουν μεταξύ τους κατά  $0,93-0,85=0,08 \mu\text{m}$ , της τάξεως του **8,60 %**.



**Εικόνα 11:** Τρισδιάστατη απεικόνιση του δείγματος του Δότη Α στο μέγιστο ύψος στους 48 °C.

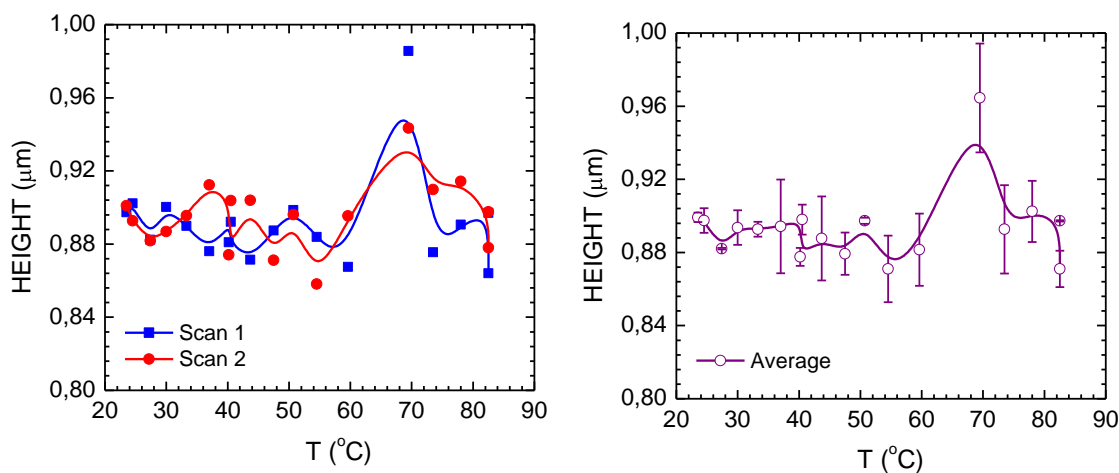


**Εικόνα 12:** Τρισδιάστατη απεικόνιση του δείγματος του Δότη Α στο ελάχιστο ύψος στους 37,7 °C.

Οι τιμές του μέγιστου και ελάχιστου ύψους των ΕΑ, αντικατοπτρίζονται στην κλίμακα του άξονα z όπως δείχνουν και οι εικόνες 11 και 12. Αντιπαραβάλλοντας τις πιο πάνω εικόνες είναι εμφανής η διαφορά ύψους που παρουσιάζουν τα ΕΑ, καθώς αυτή φτάνει στη μέγιστή της τιμή (0,93  $\mu\text{m}$ ), στη θερμοκρασία των 48 °C, και στην ελάχιστη τιμή (0,85  $\mu\text{m}$ ) στους 37,7 °C. Όμοια για το δεύτερο δότη:

#### • ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ ΓΙΑ ΤΟ ΔΟΤΗ Β

Κάθε δυάδα μετρήσεων αντιστοιχεί σε μια συγκεκριμένη τιμή θερμοκρασίας.



**Εικόνα 13:** Αριστερά: Απεικόνιση της μεταβολής του ύψους των ΕΑ συναρτήσει της θερμοκρασίας, όπως προκύπτει από 2 σαρώσεις. Δεξιά: Απεικόνιση της μεταβολής της μέσης τιμής του ύψους συναρτήσει της θερμοκρασίας.

Οι τιμές αυτής της τυπικής απόκλισης κυμαίνονται από 0,04% στη θερμοκρασία των 27,4 °C ενώ το μέγιστο σημειώνεται στους 69,5 °C με τυπική απόκλιση της τάξεως του 3 %. Το ύψος των ΕΑ λαμβάνει:

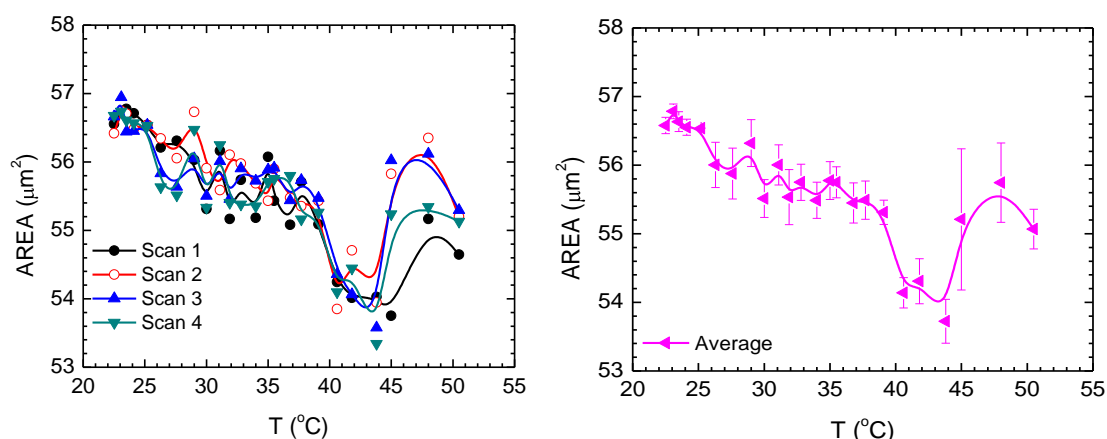
- Μέγιστη τιμή **0,96  $\mu\text{m}$**  στην θερμοκρασία των 69,5 °C.
- Ελάχιστη τιμή **0,87  $\mu\text{m}$**  στην θερμοκρασία των 54,5 °C.
- Το ελάχιστο ύψος διαφέρει από το μέγιστο κατά  $0,96-0,87=0,09 \mu\text{m}$ , της τάξεως του **9,37 %**.

#### 4.1.3. Εξάρτηση επιφάνειας από τη θερμοκρασία

##### • ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ ΓΙΑ ΤΟ ΔΟΤΗ Α

Στο δείγμα ΕΑ του δότη Α πραγματοποιήθηκαν 4 διαδοχικές σαρώσεις προκειμένου να επιτευχθεί καλύτερη ακρίβεια στα δεδομένα. Από αυτές τις 4 σαρώσεις εξήχθη η μέση τιμή της επιφάνειας και το αντίστοιχο διάγραμμα αυτής για τις διάφορες θερμοκρασίες. Η μέση τιμή της επιφάνειας λαμβάνει:

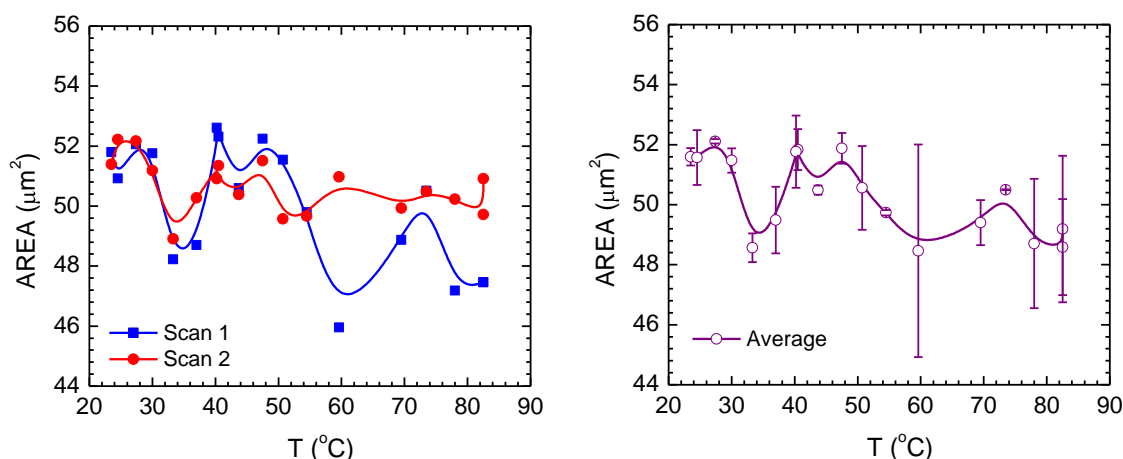
- Μέγιστη τιμή **56,79  $\mu\text{m}^2$**  στους 23,1 °C.
- Ελάχιστη τιμή **53,72  $\mu\text{m}^2$**  στους 43,8 °C.
- Η διάφορα ανέρχεται στα  $56,79-53,72=3,07 \mu\text{m}^2$  που σε ποσοστό εκφράζει το **5,41 %**.



**Εικόνα 14:** Αριστερά: Απεικόνιση της μεταβολής της επιφάνειας των ΕΑ συναρτήσει της θερμοκρασίας, όπως προκύπτει από 4 σαρώσεις. Δεξιά: Απεικόνιση της μεταβολής της μέσης τιμής της επιφάνειας συναρτήσει της θερμοκρασίας.

Το διάγραμμα της εικόνας 14 παρουσιάζει μια τυπική απόκλιση που κυμαίνεται από 0,009 % στους 25,2 °C και φτάνει το 1,8 % στην θερμοκρασία των 45 °C. Επίσης, παρατηρούμε μείωση της επιφάνειας των ΕΑ στην περιοχή θερμοκρασιών 38 – 45 °C, της τάξεως του  $(55,5-54)/55,5=2,70$  %.

#### • ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ ΓΙΑ ΤΟ ΔΟΤΗ Β



**Εικόνα 15:** Αριστερά: Απεικόνιση της μεταβολής της επιφάνειας των ΕΑ συναρτήσει της θερμοκρασίας, όπως προκύπτει από 2 σαρώσεις. Δεξιά: Απεικόνιση της μεταβολής της μέσης τιμής της επιφάνειας συναρτήσει της θερμοκρασίας.

Η τυπική απόκλιση της μέσης τιμής των πολλαπλών μετρήσεων στο διάγραμμα της εικόνας 15 κυμαίνεται από 0,3% στους 73,5 °C και φτάνει το 7% στην θερμοκρασία των 59,6 °C. Η μέση τιμή της επιφάνειας των ΕΑ λαμβάνει:

- Μέγιστη τιμή **52,11 μm<sup>2</sup>** και παρουσιάζεται στους 27,4 °C.
- Ελάχιστη τιμή **48,57 μm<sup>2</sup>** στους 33,3 °C.
- Η μέγιστη και η ελάχιστη τιμή διαφέρουν μόλις κατά  $52,11-48,57=3,54$  μm<sup>2</sup> σε ποσοστό **6,79 %**.

Η μελέτη των μορφολογικών χαρακτηριστικών σε ολόκληρα ΕΑ (σε επίπεδο μm), μας διεγείρει το ενδιαφέρον να μελετήσουμε εάν υπάρχουν μεταβολές και τυχόν αλλοιώσεις, στην κυτταρική τους μεμβράνη. Αυτό μπορεί να γίνει αντιληπτό αν εστιάσουμε σε κλίμακα νανομέτρου πάνω στην επιφάνεια των ΕΑ.



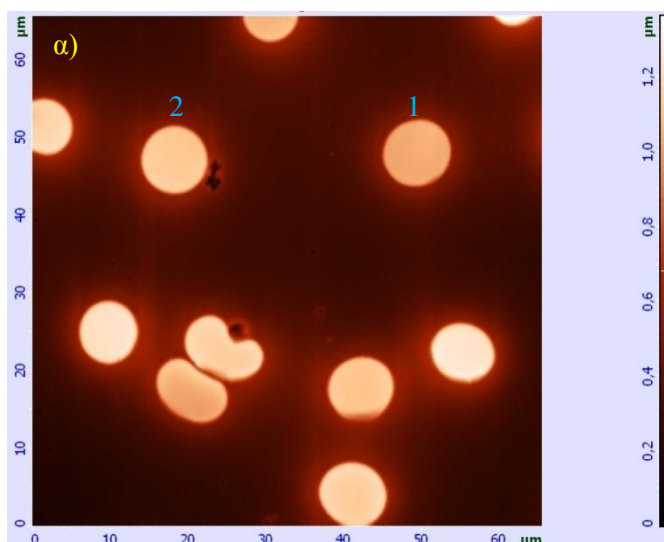
## 4.2. Μεταβολή των νανοσκοπικών χαρακτηριστικών της μεμβράνης των ΕΑ στην περιοχή θερμοκρασιών 20 – 90 °C

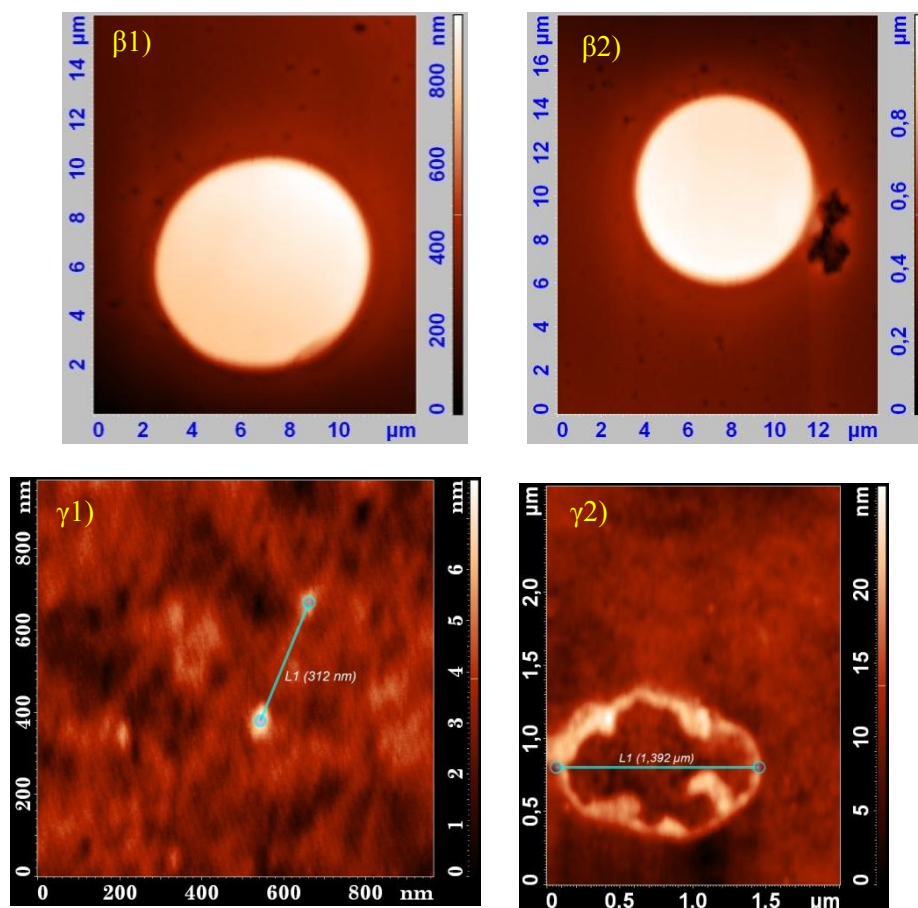
Εκτός από τα πιο πάνω μορφολογικά χαρακτηριστικά (διάμετρος, ύψος, επιφάνεια) που αφορούν στη μορφολογία ολόκληρων ΕΑ, το ΜΑΔ δύναται να απεικονίζει ξεκάθαρα και τη μορφολογία της μεμβράνης. Πάνω σε αυτήν, είναι διαμορφωμένο σύνολο ενδιαφερόντων σχηματισμών, διαφορετικής αρχιτεκτονικής σε διαστάσεις μερικών νανομέτρων. Η διεξοδική παρατήρηση τέτοιου είδους νανοσκοπικών σχηματισμών, αποτελούν μεγαλύτερη μεγέθυνση.

Σε δείγμα αίματος ενός τρίτου δότη, διεξάγουμε την νέα μελέτη και προβαίνουμε σε ακόμα μικρότερα πλαίσια σάρωσης από  $1000 \times 1000 \text{ nm}^2$  έως  $2 \times 2 \text{ }\mu\text{m}^2$ . Επιλέγουμε κάποιους ιδιαίτερους μορφολογικούς σχηματισμούς της μεμβράνης και μελετούμε πώς αυτοί επηρεάζονται από την αύξηση της θερμοκρασίας των ΕΑ. Τα χαρακτηριστικά που ερευνούμε είναι και πάλι η επιφάνεια, το ύψος, η διάμετρος των ΕΑ, αλλά και η μέση επιφανειακή τραχύτητα (nm) των μεμβρανών εστιασμένων κυττάρων. Πρέπει να τονιστεί ότι το λογισμικό NOVA μετρά την τραχύτητα της επιφάνειας των δειγμάτων όταν ο χρήστης έχει επιλέξει το αντίστοιχο πλαίσιο σάρωσης έχοντας εστιάσει δηλαδή πάνω στη μεμβράνη ενός ΕΑ. Ακολουθούν εικόνες και μετρήσεις για τις θερμοκρασίες: 22,2 °C, 42,2 °C και 50,0 °C.

### • ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ ΓΙΑ ΤΟ ΔΟΤΗ Γ

❖ T= 22,2 °C (σε θερμοκρασία περιβάλλοντος)





**Εικόνα 16:** α) Συλλογή EA σε θερμοκρασία περιβάλλοντος, β1) Εστίαση στο EA 1, β2) Εστίαση στο EA 2, γ1) Πλαίσιο 1000×1000 nm<sup>2</sup> πάνω στη μεμβράνη του EA 1, γ2) Πλαίσιο 3×3 μm<sup>2</sup> πάνω στη μεμβράνη του EA 2.

Ύστερα από επεξεργασία Grain analysis στα EA υπ' αριθμόν 1 και 2, προκύπτουν τα εξής αποτελέσματα για τη θερμοκρασία των 22,2 °C:

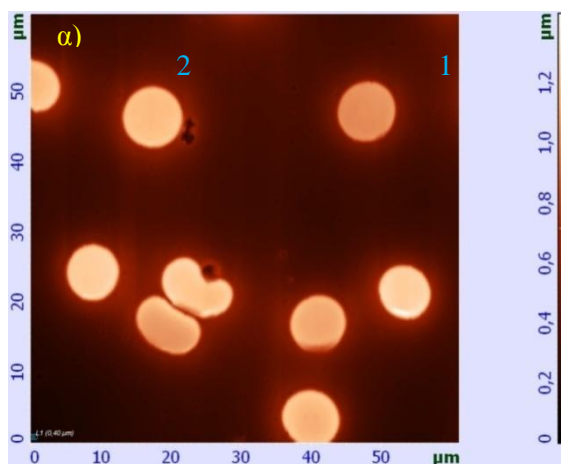
Κύτταρο	Επιφάνεια μm <sup>2</sup>	Ύψος μm	Περίμετρος μm	Διάμετρος μm	Μέση επιφανειακή τραχύτητα nm
1	62,229	0,830	32,825	8,892	2,967
2	56,617	1,011	31,286	8,467	10,753

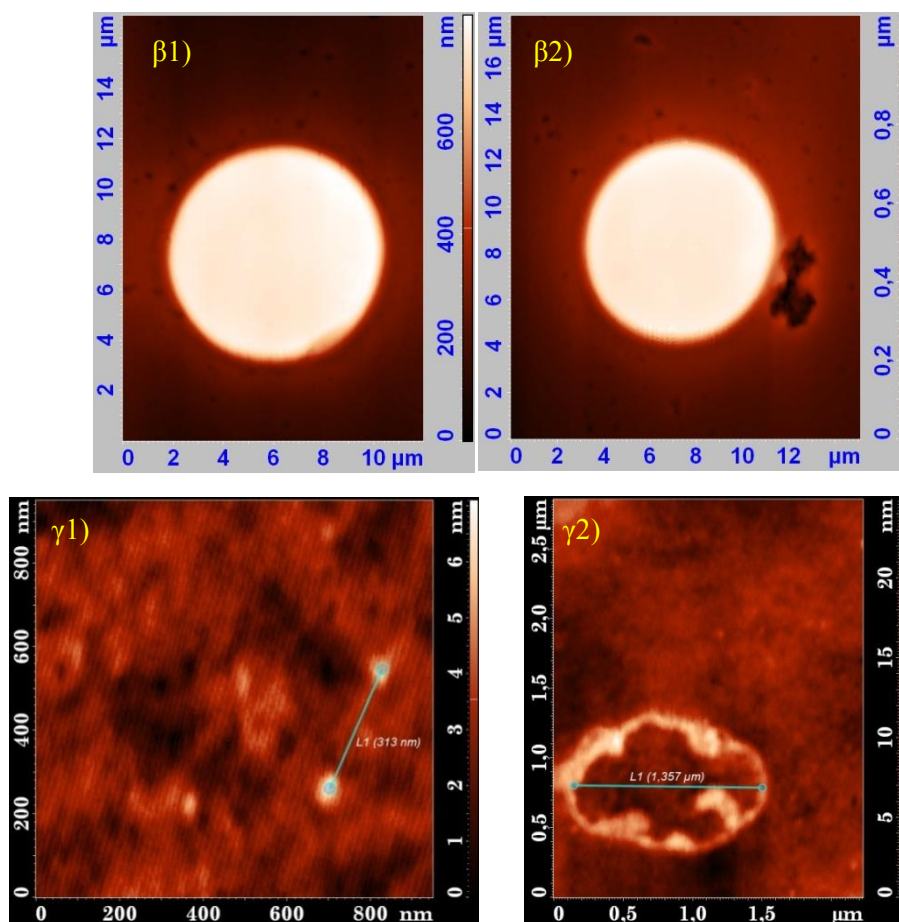
Σύμφωνα με την εικόνα 16, στην υποεικόνα γ1, καταδεικνύεται η απόσταση μεταξύ δύο κορυφών που σχηματίζονται στην επιφάνεια της μεμβράνης του EA. Στη συγκεκριμένη θερμοκρασία, η απόσταση αυτή ανέρχεται στα 312 nm. Ενώ στην υποεικόνα γ2, καταδεικνύεται ένας ενδιαφέρον σχηματισμός, η διάμετρος του οποίου είναι 1,392 μm.

Στη συνέχεια, απομακρύνουμε μέσω της ηλεκτρονικής διάταξης του ΜΑΔ, την ακίδα από το δείγμα (διαδικασία που λέγεται *remove*), αυξάνουμε το ρεύμα στην πηγή ρεύματος μέσω της προτυποποιημένης διαδικασίας, και φτανουμε στη θερμοκρασία των  $T=42,2\text{ }^{\circ}\text{C}$ . Τέλος, επιλέγουμε ο πιεζοηλεκτρικός σαρωτής να μετακινήσει το προς μελέτη δείγμα κάτω ακριβώς από την αιχμή της ακίδας (διαδικασία που αποκαλείται *landing*), και πραγματοποιείται μία νέα σάρωση στην ίδια περιοχή του δείγματος αφού αυτό δεν έχει μετακινηθεί στο  $x - y$  επίπεδο.

Οι διαδικασίες *remove* και *landing* γίνονται καθαρά για να προστατευτεί η ακίδα και ιδιαίτερα η κεφαλή του ΜΑΔ. Μία ενδεχόμενη μεταβολή της απόστασης του δείγματος από την ακίδα λόγω θερμικής διαστολής τόσο του ΕΑ, όσο και του μεταλλικού θερμαινόμενου δειγματοφορέα, μπορεί να επιφέρει πρόσκρουση ή ακόμα και την κατάρρευση του βραχίονα που φέρει την ακίδα. Καταρχάς, αν η ακίδα έρθει σε επαφή με το δείγμα, είναι πιθανό να προσκολληθεί βιολογικό υλικό της μεμβράνης του ΕΑ επάνω της με αποτέλεσμα να λαμβάνουμε εσφαλμένη ή και καθόλου εικόνα σάρωσης. Επίσης, ενδέχεται να μεταφερθεί μικροποσότητα βιολογικού υλικού από μία περιοχή του δείγματος πάνω σε κάποια άλλη και να επηρεάσει την τοπογραφική εικόνα της μορφολογίας του ΕΑ. Με τη ρήξη του βραχίονα όμως, η δέσμη laser παύει να ανακλάται και να σχηματίζει κροσσούς συμβολής, άρα αποτυγχάνει η ανίχνευση της ανακλώμενης δέσμης από τις φωτοδιόδους που θα οδηγούσε στο σχηματισμό εικόνας. Παρόλ' αυτά, χείριστο επακόλουθο είναι η καταστροφή της κεφαλής του ΜΑΔ, η οποία είναι συνδεδεμένη με το βραχίονα. Προφανώς, τέτοια ενδεχόμενα πρέπει να αποφευχθούν, καθώς θα ήταν εξαιρετικά επιζήμια για το όργανο αυτό. Κατά συνέπεια, όποτε αυξάνουμε τη θερμοκρασία στο δειγματοφορέα, διεξάγουμε απαραίτητως τις διαδικασίες *remove* και *landing*.

❖  $T=42,2\text{ }^{\circ}\text{C}$





**Εικόνα 17:** α) Συλλογή ΕΑ σε θερμοκρασία  $T=42,2\text{ }^{\circ}\text{C}$ , β1) Εστίαση στο ΕΑ 1, β2) Εστίαση στο ΕΑ 2, γ1) Πλαίσιο  $1000\times 1000\text{ nm}^2$  πάνω στη μεμβράνη του ΕΑ 1, γ2) Πλαίσιο  $2\times 2\text{ }\mu\text{m}^2$  πάνω στη μεμβράνη του ΕΑ 2.

Ύστερα από Grain analysis προκύπτουν τα εξής αποτελέσματα για τη θερμοκρασία των  $42,2\text{ }^{\circ}\text{C}$ :

Κύτταρο	Επιφάνεια $\mu\text{m}^2$	Ύψος $\mu\text{m}$	Περίμετρος $\mu\text{m}$	Διάμετρος $\mu\text{m}$	Μέση επιφανειακή τραχύτητα nm
1	60,401	0,748	32,699	8,773	2,580
2	57,927	0,984	32,984	8,543	9,546

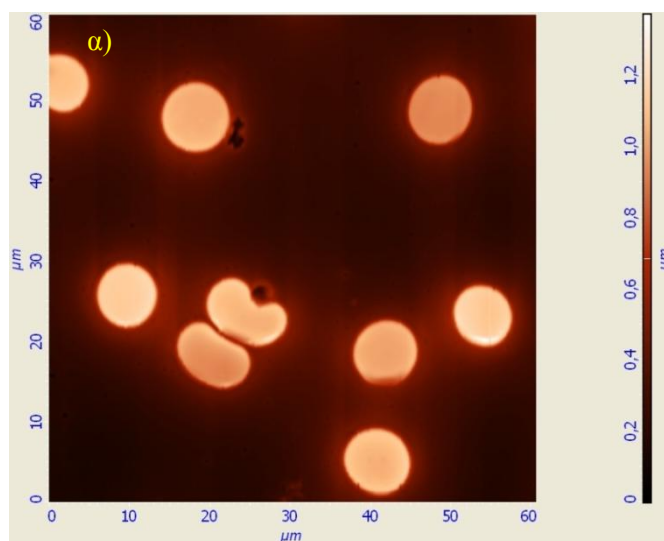
Συγκριτικά με την προηγούμενη θερμοκρασία:

Κύτταρο	Επιφάνεια	Ύψος	Περίμετρος	Διάμετρος	Μέση επιφανειακή τραχύτητα
1	Μείωση 2,94 %	Μείωση 9,89 %	Μείωση 0,38 %	Μείωση 1,34 %	Μείωση 13,04 %
2	Αύξηση 2,31 %	Μείωση 2,67 %	Αύξηση 5,43 %	Αύξηση 0,89 %	Μείωση 11,22 %

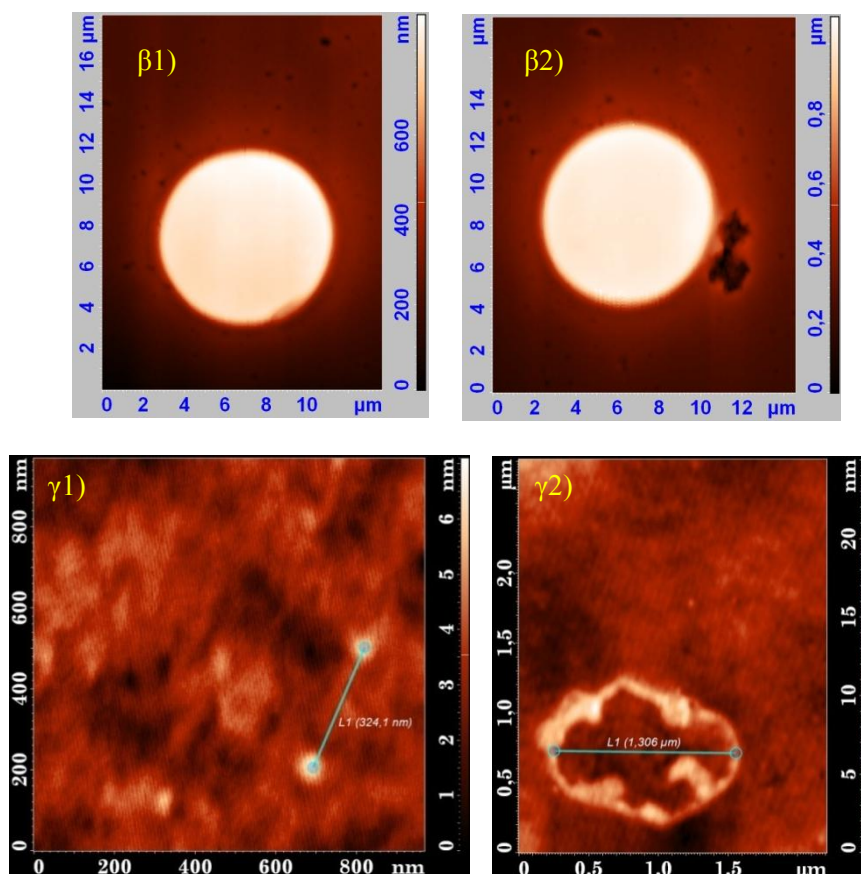
Σύμφωνα με τη συλλογή ΕΑ της εικόνας 17, στην υποεικόνα γ1, καταδεικνύεται η απόσταση μεταξύ των δύο κορυφών της επιφάνειας της μεμβράνης του ΕΑ. Στη θερμοκρασία των  $T=42,2\text{ }^{\circ}\text{C}$ , η απόσταση αυτή ανέρχεται στα 313 nm. Συγκριτικά με την απόσταση που είχαν στη θερμοκρασία των  $22,2\text{ }^{\circ}\text{C}$  υπάρχει μια μείωση  $313-312\text{ nm}=1\text{ nm}$  δηλαδή σε ποσοστό 0,32 %. Ενώ στην υποεικόνα γ2, ο ενδιαφέρον σχηματισμός, είναι διαμέτρου  $1,357\text{ }\mu\text{m}$ . Συγκριτικά με τη διάμετρο που είχε στη θερμοκρασία των  $22,2\text{ }^{\circ}\text{C}$  υπάρχει μια μείωση  $1,392-1,357\text{ }\mu\text{m}=0,035\text{ }\mu\text{m}$  δηλαδή σε ποσοστό 2,58 %.

Στη συνέχεια, επαναλαμβάνουμε τη διαδικασία *remove*, αυξάνουμε το ρεύμα στο τροφοδοτικό, συνεπώς αυξάνουμε και τη θερμοκρασία στους  $T=50,0\text{ }^{\circ}\text{C}$ . Επιλέγουμε εκ νέου τη διαδικασία *landing*, και πραγματοποιείται μία νέα σάρωση στην ίδια περιοχή του δείγματος αφού αυτό εξακολουθεί να μην έχει μετακινηθεί στο x – y επίπεδο.

❖  $T=50,0^{\circ}\text{C}$

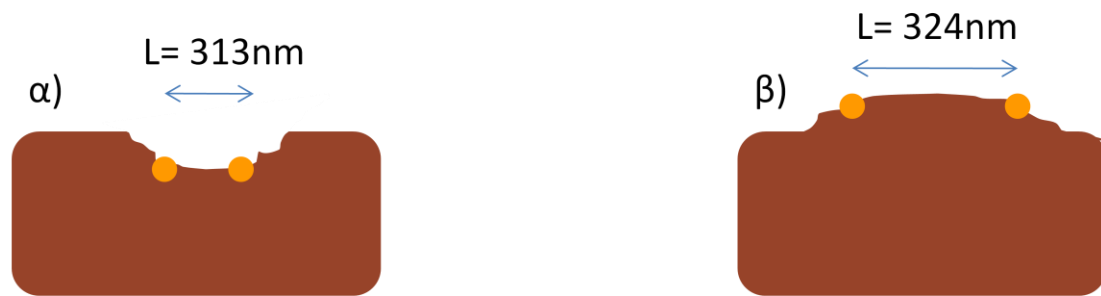






**Εικόνα 18:** α) Συλλογή EA σε θερμοκρασία  $T=50,0\text{ }^{\circ}\text{C}$ , β1) Εστίαση στο EA 1, β2) Εστίαση στο EA 2, γ1) Πλαίσιο  $1000\times 1000\text{ nm}^2$  πάνω στη μεμβράνη του EA 1, γ2) Πλαίσιο  $2\times 2\text{ }\mu\text{m}^2$  πάνω στη μεμβράνη του EA 2.

Σύμφωνα με τη συλλογή EA της εικόνας 18, η υποεικόνα γ1, απεικονίζει την καταμέτρηση της απόστασης μεταξύ δύο κορυφών της επιφάνειας της μεμβράνης του EA. Στη θερμοκρασία των  $T=50,0\text{ }^{\circ}\text{C}$ , η απόσταση αυτή ανέρχεται στα 324 nm. Συγκριτικά με την απόσταση που είχαν στη θερμοκρασία των  $42,2\text{ }^{\circ}\text{C}$  υπάρχει μια αύξηση  $324-313\text{ nm}=11\text{ nm}$ , δηλαδή σε ποσοστό 3,51 %. Επομένως, από τους  $42,2$  έως τους  $50,0\text{ }^{\circ}\text{C}$  η απόσταση των δύο κορυφών σημείωσε αύξηση. Το γεγονός αυτό σχετίζεται με την ενδεχόμενη διεύρυνση – διαστολή της μεμβράνης σε κάποια σημεία της επιφάνειάς της, όπως δείχνει και η εικόνα 19.



**Εικόνα 19:** Η απόσταση μεταξύ δυο σημείων στη μεμβράνη ενός ΕΑ. α) στη θερμοκρασία 42,2 °C και β) 50,0 °C.

Αντίθετα, σύμφωνα με την υποεικόνα γ2 της 18, ο ενδιαφέρον σχηματισμός, είναι διαμέτρου 1,306  $\mu\text{m}$ . Συγκριτικά με τη διάμετρο που είχε στη θερμοκρασία των 22,2 °C υπάρχει μια μείωση  $1,357 - 1,306 \mu\text{m} = 0,051 \mu\text{m}$  δηλαδή σε ποσοστό 3,91 %. Οπότε παρατηρείται πιστά, συνολική συρρίκνωση της διαμέτρου του σχηματισμού αυτού με την αύξηση της θερμοκρασίας.

Ύστερα από Grain analysis προκύπτουν τα εξής αποτελέσματα για τη θερμοκρασία των 50,0 °C:

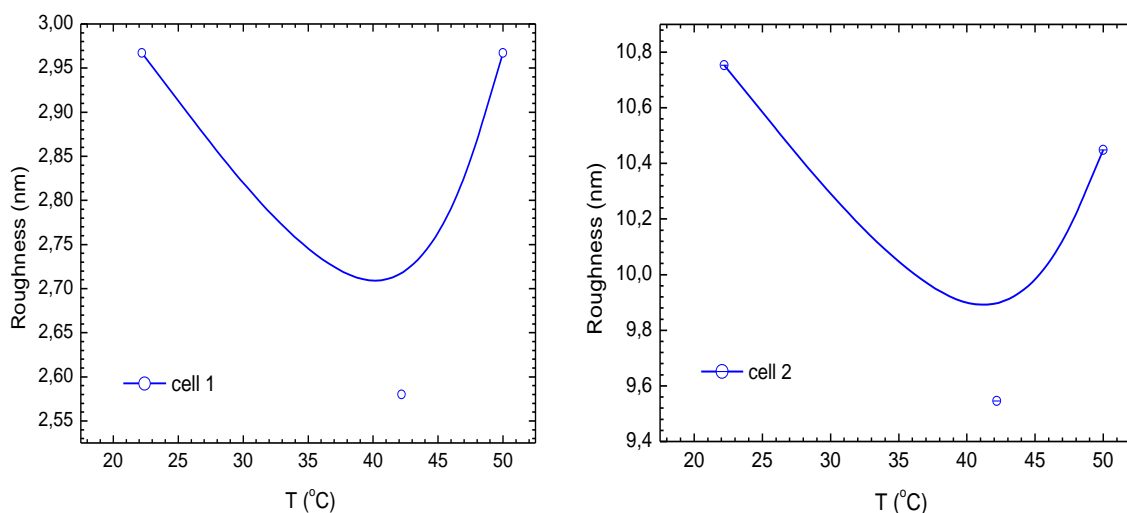
Κύτταρο	Επιφάνεια $\mu\text{m}^2$	Ύψος $\mu\text{m}$	Περίμετρος $\mu\text{m}$	Διάμετρος $\mu\text{m}$	Μέση επιφανειακή τραχύτητα nm
1	60,206	0,781	32,647	8,754	2,967
2	57,752	0,953	32,074	8,596	10,449

Συγκριτικά με την προηγούμενη θερμοκρασία:

Κύτταρο	Επιφάνεια	Ύψος	Περίμετρος	Διάμετρος	Μέση επιφανειακή τραχύτητα
1	Μείωση 0,32 %	Αύξηση 4,41 %	Μείωση 0,15 %	Μείωση 0,22 %	Αύξηση 15 %
2	Μείωση 0,30 %	Μείωση 0,32 %	Μείωση 2,76 %	Αύξηση 0,62 %	Αύξηση 9,46 %

Παρατηρώντας τις εικόνες που εστιάζουν σε τμήμα της μεμβράνης του ΕΑ, συνειδητοποιούμε ότι η μεμβράνη δεν είναι απολύτως λεία. Παρουσιάζει έντονο

μορφολογικό ανάγλυφο και περίπλοκους σχηματισμούς ποικίλων διαστάσεων. Οι κατώτατες περιοχές που σχηματίζουν πορώδη «βυθίσματα» βάθους 2 – 3 nm, σχετίζονται με τη γήρανση του κυττάρου ή με τους διάυλους μεταφοράς ιόντων Na/K. [1]



**Εικόνα 20:** Μεταβολή της τραχύτητας της επιφάνειας των EA σε συνάρτηση με τη θερμοκρασία.

Παρατηρούμε ότι η τραχύτητα της μεμβράνης των EA, μειώνεται στους 40 – 45 °C.

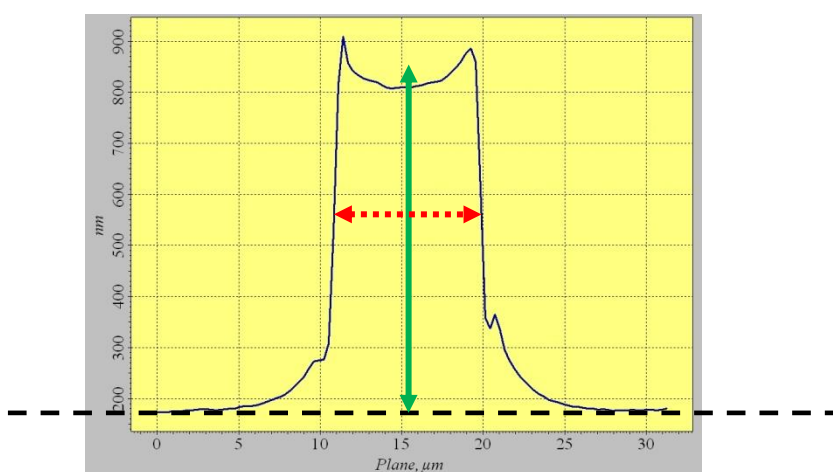
Έχοντας μελετήσει στα προαναφερθέντα εύρη θερμοκρασιών, παρατηρούμε ότι τα EA είναι πολύ ανθεκτικά σε θερμοκρασίες από 20 – 90 °C. Ενδεχομένως, σε μεγαλύτερες θερμοκρασίες να υφίστανται ευδιάκριτες μεταβολές όπως σχηματισμός οπών, ρωγμών, καθιζήσεις και οριστική εξάχνωση του κυττάρου.

### 4.3. Μεταβολή των μικροσκοπικών γεωμετρικών χαρακτηριστικών των EA στην περιοχή θερμοκρασιών 20 – 510 °C

Στη συνέχεια εκτελούμε το πείραμα σε πολύ υψηλότερες θερμοκρασίες. Επειδή όμως οι υψηλές θερμοκρασίες εγκυμονούν κινδύνους, δε θερμαίνουμε περαιτέρω τα κύτταρα με τη διάταξη της θερμαινόμενης πλατφόρμας. Ειδικότερα, η κεφαλή του ΜΑΔ είναι εξαιρετικά ευαίσθητη και ευπαθής σε οποιαδήποτε καταπόνηση. Η έκθεση αυτής σε τόσο υψηλές θερμοκρασίες μπορεί να προκαλέσει σημαντική βλάβη του οργάνου. Για τον αποκλεισμό τέτοιων ενδεχόμενων, θερμαίνουμε τα φιξαρισμένα κύτταρα σε αυτοσχέδιο φούρνο εργαστηρίου, ο οποίος



παρέχει δυνατότητα ηλεκτρονικής ρύθμισης της θερμοκρασίας και ακριβή έλεγχο σταθεροποίησης της τάξεως των 0,1 °C. Ο χρόνος έκθεσης των δειγμάτων σε κάθε θερμοκρασία είναι ίσος με 15 min. Εκτός από το Grain Analysis, το λογισμικό NOVA παρέχει και έναν άλλον τρόπο προσδιορισμού των μορφολογικών χαρακτηριστικών όπως το ύψος και η διάμετρος των ΕΑ. Ο τρόπος αυτός έγκειται στη δυνατότητα να απεικονίζει το ΕΑ σε κάθετες τομές. Διακρίνονται λοιπόν με σαφήνεια το μέγιστο και το ελάχιστο ύψος που φθάνει το ΕΑ, καθώς και τα διάφορα «όρη» και «κοιλιάδες» που συνιστούν τη μορφολογία του.



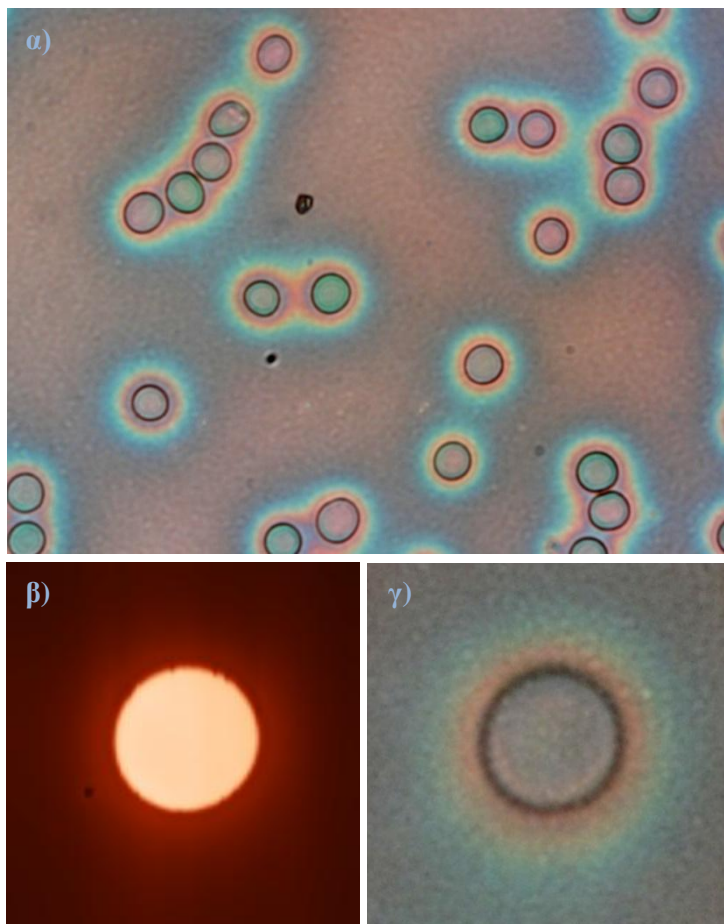
**Εικόνα 21:** Εκτίμηση της διαμέτρου ενός ΕΑ επισημασμένη με το κόκκινο διακεκομμένο βέλος και εκτίμηση του μέσου ύψους επισημασμένη με το πράσινο βέλος. Με οριζόντια μαύρη διακεκομμένη τονίζεται το υπόβαθρο.

Το λογισμικό της απεικόνισης, παρουσιάζει με το πιο σκούρο χρώμα το κατώτατο υψομετρικά σημείο στο δείγμα. Όμως, περιμετρικά του ΕΑ παρατηρείται μια φωτεινή στεφάνη η οποία στην πράξη είναι συσσωρευμένο πλάσμα ή βιολογικό υλικό. Αυτή η συσσώρευση υλικού δημιουργεί γύρω από το ΕΑ ένα υμένιο ύψους αρκετών δεκάδων έως και λίγων εκατοντάδων νανομέτρων. Η κατανομή του υλικού αυτού είναι μεγαλύτερη στα σημεία που αυτό εφάπτεται με το ΕΑ, ενώ καθώς απομακρύνεται από το κύτταρο, η κλίση του υμενίου ολοένα και μειώνεται τείνοντας να γίνει ευθεία παράλληλη με το γυάλινο πλακίδιο αποκτώντας σταθερό πάχος.

Για την πιο ορθή εκτίμηση του ύψους του ΕΑ μέσω του λογισμικού NOVA, φροντίζουμε με το ειδικό εργαλείο που μετρά αποστάσεις και κάνει τομές σε επιλεγμένα σημεία, να το επεκτείνουμε αρκετά από το ΕΑ και το υμένιο πλάσματος

που το περιβάλλει ώστε να συναντήσουμε το ευθύγραμμο υπόβαθρο το οποίο θα χρησιμοποιήσουμε ως επίπεδο μηδενικής αναφοράς.

Πράγματι το πλάσμα που συσσωρεύεται γύρω από το ΕΑ μπορεί να γίνει αντιληπτό από τις χαρακτηριστικές εικόνες 21 και 22.



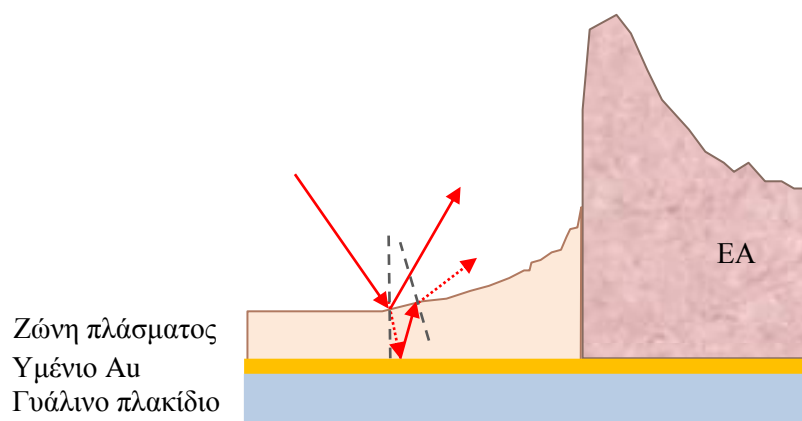
**Εικόνα 22:** α) ΕΑ πάνω σε υμένιο Au, σε μεγέθυνση  $10 \times 50$  σε ΟΜ, β) εστίαση πάνω σε ένα ΕΑ με ΜΑΔ, φαίνεται η φωτεινή στεφάνη του πλάσματος, γ) εστίαση πάνω σε ένα ΕΑ με ΟΜ, φαίνεται η περιμετρική κατανομή πλάσματος.

Με μια προτυποποιημένη διαδικασία θερμικής εξάχνωσης μπορούμε να εναποθέσουμε ένα λεπτό υμένιο Au πάχους λίγων δεκάδων νανομέτρων στην γυάλινη αντικειμενοφόρο πλάκα. Το γυάλινο πλακίδιο μικροσκοπίου, που φέρει πλέον την επικάλυψη αυτή, λειτουργεί σαν καθρέφτης. Η πολύ ενδιαφέρουσα εικόνα 22 έχει ληφθεί όταν πάνω στο επίχρισμα Au, επιστρωθούν τα ΕΑ υπό μορφή υμενίων και παρατηρηθούν με ΟΜ ανακλώμενης δέσμης.

Το φως που προσπίπτει στην πάνω επιφάνεια της μεμβράνης του κάθε ΕΑ, ανακλάται μερικώς από αυτή. Το φως που διαπερνά πλήρως τα ΕΑ ανακλάται ολικώς (αν το υμένιο Au είναι αρκετά παχύ) στην κάτω επιφάνεια στο επίπεδο του γυαλιού

που φέρει επίχρισμα Au, λόγω της υψηλής ανακλαστικότητας του υλικού. Η ανακλώμενη δέσμη όμως μόλις λίγα μm πιο πάνω συναντά το EA ή το πλάσμα και διαθλάται υπό κάποιες γωνίες εξαρτώμενες από το πάχος του βιολογικού υλικού που διασχίζουν. Έτσι, συμβαίνει συμβολή μεταξύ των διαθλώμενων και των ανακλώμενων κυμάτων που έχουν όμως διαφορετικά μήκη δρόμων, σε διάφορα μέρη, για διαφορετικά μήκη κύματος. Ο δείκτης διάθλασης του πλάσματος είναι 1,349. Τα δυο εξερχόμενα κύματα συναντώνται σε ένα σημείο πάνω στον αμφιβληστροειδή χιτώνα του ματιού και η συμβολή τους μπορεί να είναι ενισχυτική ή αναιρετική ανάλογα με τη σχέση των φάσεών τους.

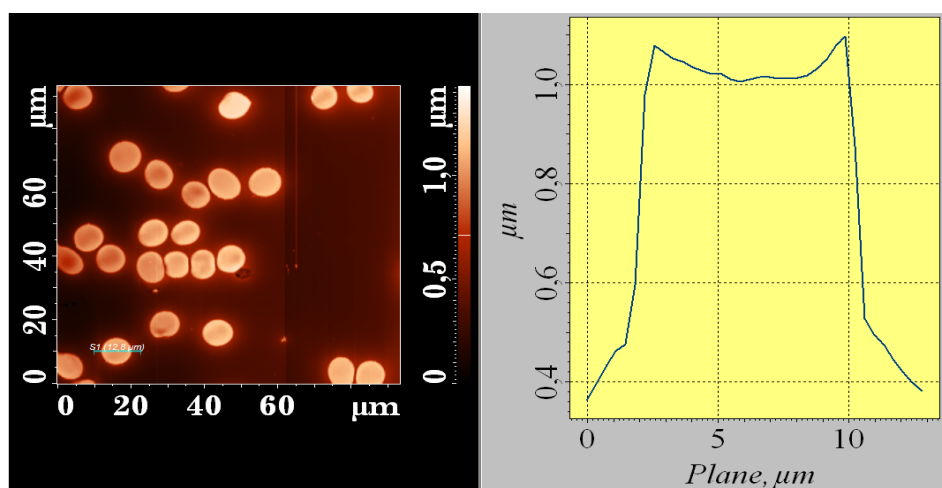
Τα διάφορα χρώματα αντιστοιχούν σε διαφορετικά μήκη κύματος ηλεκτρομαγνητικής ακτινοβολίας, αλλά η συμβολή μπορεί να είναι ενισχυτική για μερικά χρώματα και αναιρετική για άλλα. Αυτός είναι ο λόγος που βλέπουμε χρωματιστούς δακτυλίους ή κροσσούς. Όταν το προσπίπτον φως είναι μείγμα από διάφορα μήκη κύματος, όπως το λευκό φως, διαφορετικά μήκη κύματος συμβάλλουν ενισχυτικά από διάφορες περιοχές του δείγματος, αρκεί να έχουν το κατάλληλο πάχος. Οι προκύπτοντες κροσσοί συμβολής εμφανίζουν τους χρωματισμούς του ουράνιου τόξου. Όπως άλλωστε φαίνεται στην φωτογραφία της εικόνας 22 το δείγμα λειτουργεί ως πρίσμα από όπου διέρχεται μια φωτεινή δέσμη και μέσα σε αυτό παρατηρούνται τρία οπτικά φαινόμενα: ανάκλαση, διάθλαση και ανάλυση φωτός. Δύο είναι οι κύριοι παράγοντες για την φασματική ανάλυση μιας ακτίνας λευκού φωτός, η γωνία πρόσπτωσης και ο δείκτης διάθλασης. Το βιολογικό υλικό πλάσματος που είναι συσσωρευμένο περιμετρικά του EA έχει μεταβαλλόμενο πάχος και ως εκ τούτου καθορίζει τη γωνία πρόσπτωσης της ανακλώμενης από το υμένιο Au δέσμης στην διεπιφάνεια πλάσματος – αέρα. Επιπλέον, ο δείκτης διάθλασης του πλάσματος είναι διαφορετικός από του αέρα. Αποτέλεσμα είναι τα πλάσμα που έχει συσσωρευτεί περιμετρικά του EA να συμπεριφέρεται ως ένα ‘βιολογικό πρίσμα’, όπως φαίνεται σχηματικά στην εικόνα 23. Αυτή είναι μια απλή ερμηνεία που διακρίνουμε διαβαθμίσεις των χρωμάτων της ίριδας στην παλέτα του καφέ-κίτρινο-πράσινο-γαλάζιο που απεικονίζουν κλιμακωτά το πιο υψηλό ως το πιο χαμηλό σημείο στις εικόνες 22 α) – 22 γ). Τέλος, τονίζουμε ότι ακόμα και το EA απεικονίζεται με καφέ-μωβ αποχρώσεις με διαβαθμίσεις σε σημεία που οφείλονται στη τραχύτητα και στη μορφολογία της μεμβράνης του.



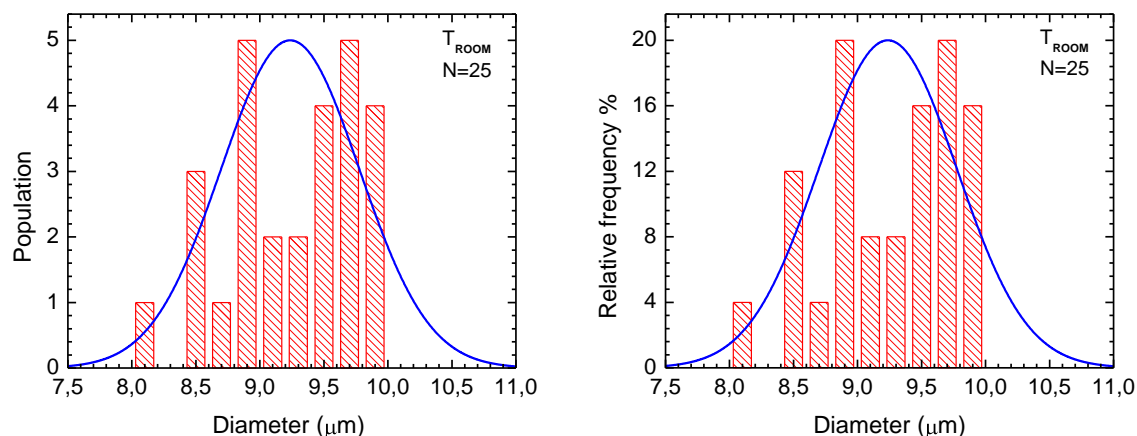
**Εικόνα 23:** Η πορεία ανακλάσεων και διαθλάσεων (διακεκομμένη κόκκινη γραμμή) των ακτίνων φωτός ανάμεσα από το EA και την οπτικά ενεργή ζώνη πλάσματος λόγω μεταβαλλόμενου πάχους.

Αξίζει να αναφερθεί ότι προφανώς το ύψος της άνωθεν επιφάνειας του EA δεν είναι ίσον σε όλη την επιφάνεια της μεμβράνης του. Εμείς εκτιμούμε το μέσο όρο των καθέτων αποστάσεων των ανωτάτων και κατωτάτων σημείων από το επίπεδο αναφοράς, δηλαδή το ευθύγραμμο υπόβαθρο. Όπως δείχνει και η εικόνα 21.

- **ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ ΓΙΑ ΤΟ ΔΟΤΗ Β**

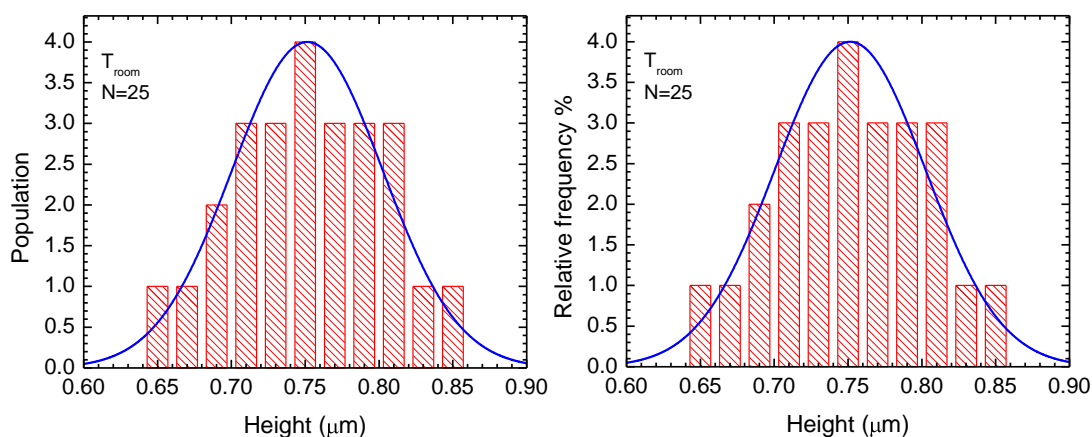


**Εικόνα 24:** Εκτίμηση της διαμέτρου και του ύψους ενός EA που δεν έχει θερμανθεί και βρίσκεται σε θερμοκρασία δωματίου.



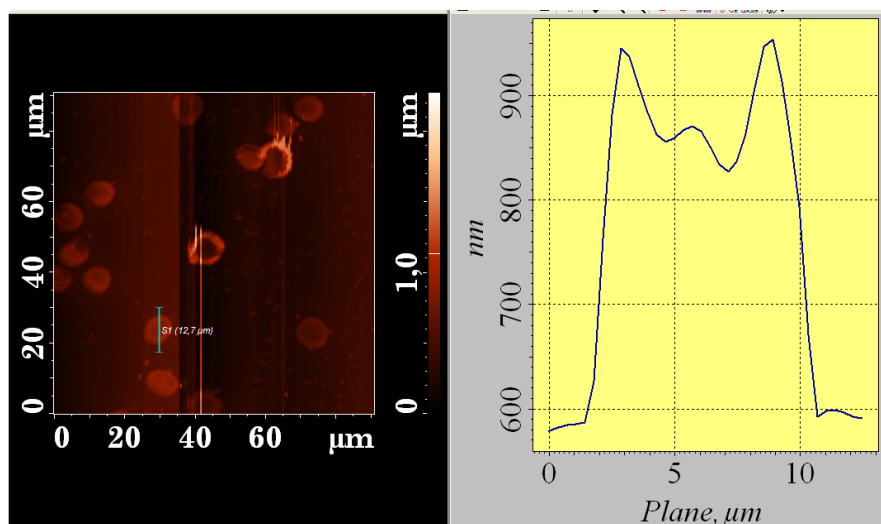
**Εικόνα 25:** Απεικόνιση της συχνότητας εμφάνισης της τιμής της διαμέτρου των ΕΑ για θερμοκρασία δωματίου. Αριστερά: Απόλυτη συχνότητα δείγματος 25 ΕΑ. Δεξιά: Σχετική συχνότητα %.

Στο αριστερό διάγραμμα της εικόνας 25, η μέση διάμετρος των ΕΑ είναι 9,21 μm. Η επί τοις εκατό σχετική συχνότητα εμφάνισης της μέσης τιμής διαμέτρου είναι 8 % όπως άλλωστε δείχνει και το δεξί διάγραμμα. Οι τιμές διαμέτρου που εμφανίζονται με τη μέγιστη συχνότητα της τάξεως του 20 % είναι στα 8,8 – 9,1 και 9,3 – 9,7 μm.

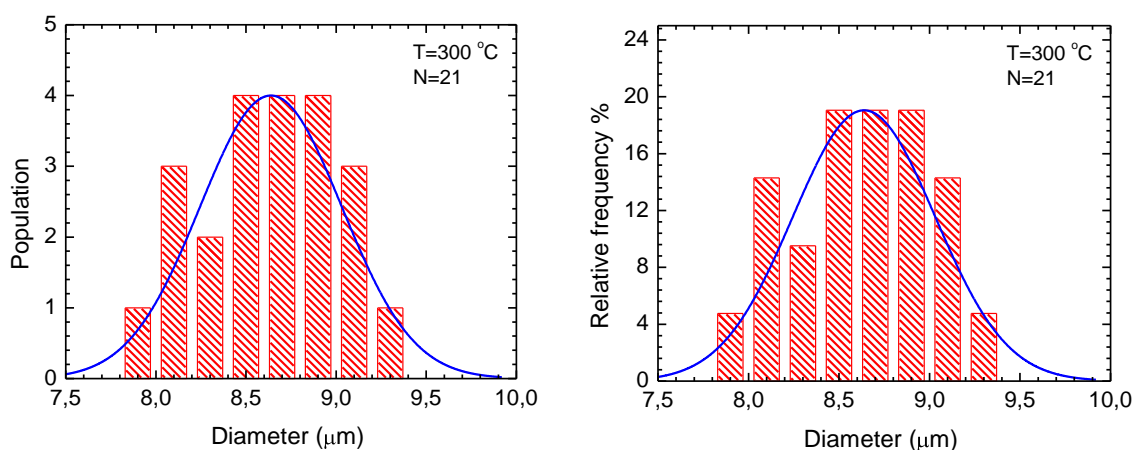


**Εικόνα 26:** Απεικόνιση της συχνότητας εμφάνισης τιμών ύψους των ΕΑ για θερμοκρασία δωματίου. Αριστερά: Απόλυτη συχνότητα δείγματος 25 ΕΑ. Δεξιά: Σχετική συχνότητα %.

Στην εικόνα 26, το μέσο ύψος των ΕΑ είναι 0,75 μm, όπως άλλωστε δείχνει το αριστερό διάγραμμα. Η επί τοις εκατό σχετική συχνότητα εμφάνισης της μέσης τιμής ύψους είναι 16 % όπως άλλωστε δείχνει και το δεξί διάγραμμα. Τα 0,75 μm εμφανίζονται και με τη μεγαλύτερη σχετική συχνότητα σύμφωνα με το δεξί διάγραμμα.

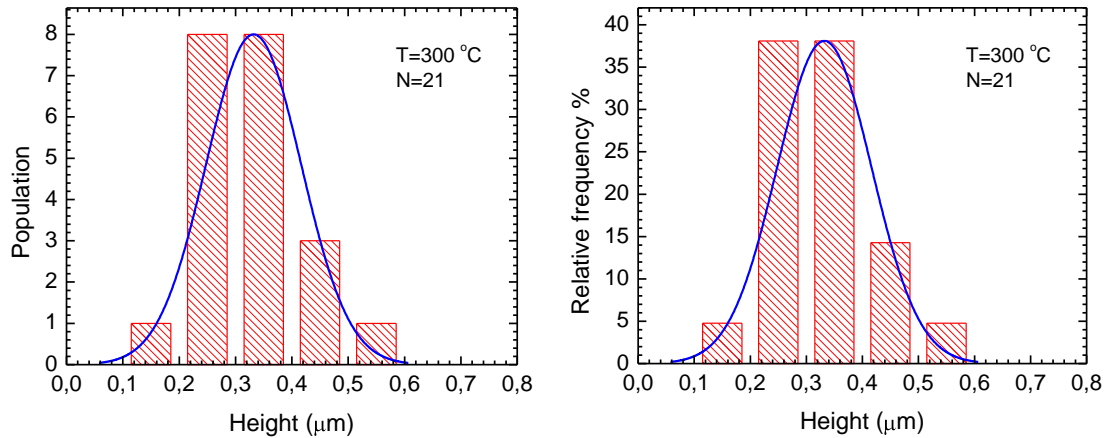


**Εικόνα 27:** Εκτίμηση της διαμέτρου και του ύψους ενός ΕΑ που έχει θερμανθεί στους 300 °C για 15 min.



**Εικόνα 28:** Απεικόνιση της συχνότητας εμφάνισης της τιμής της διαμέτρου των ΕΑ για θερμοκρασία  $T=300\text{ }^{\circ}\text{C}$ . Αριστερά: Απόλυτη συχνότητα δείγματος 21 ΕΑ. Δεξιά: Σχετική συχνότητα %.

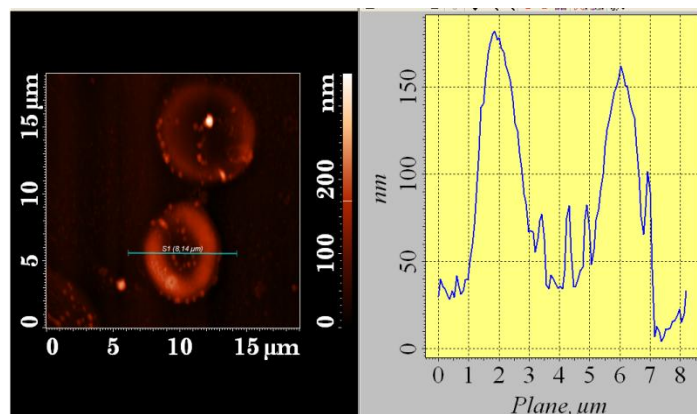
Στο αριστερό διάγραμμα της εικόνας 28, η μέση διάμετρος των ΕΑ που έχουν θερμανθεί στους 300 °C, είναι 8,64  $\mu\text{m}$ . Η επί τοις εκατό σχετική συχνότητα εμφάνισης της μέσης τιμής διαμέτρου είναι 19 % όπως άλλωστε δείχνει και το δεξί διάγραμμα. Η διάμετρος ΕΑ της τάξεως των 8,64  $\mu\text{m}$  εμφανίζεται και με τη μεγαλύτερη σχετική συχνότητα σύμφωνα με το δεξί διάγραμμα. Η μέση τιμή της διαμέτρου των ΕΑ που θερμάνθηκαν στους 300 °C παρουσιάζει μια μείωση της τάξεως του 6,6 % σε σχέση με τη μέση τιμή διαμέτρου σε θερμοκρασία δωματίου. Το γεγονός αυτό μας προϊδεάζει ότι σε μεγαλύτερες ακόμα θερμοκρασίες η διάμετρος θα μειωθεί επιπλέον.



**Εικόνα 29:** Απεικόνιση της συχνότητας εμφάνισης τιμών ύψους των ΕΑ για θερμοκρασία  $T=300$  Αριστερά: Απόλυτη συχνότητα δείγματος 21 ΕΑ. Δεξιά: Σχετική συχνότητα %.

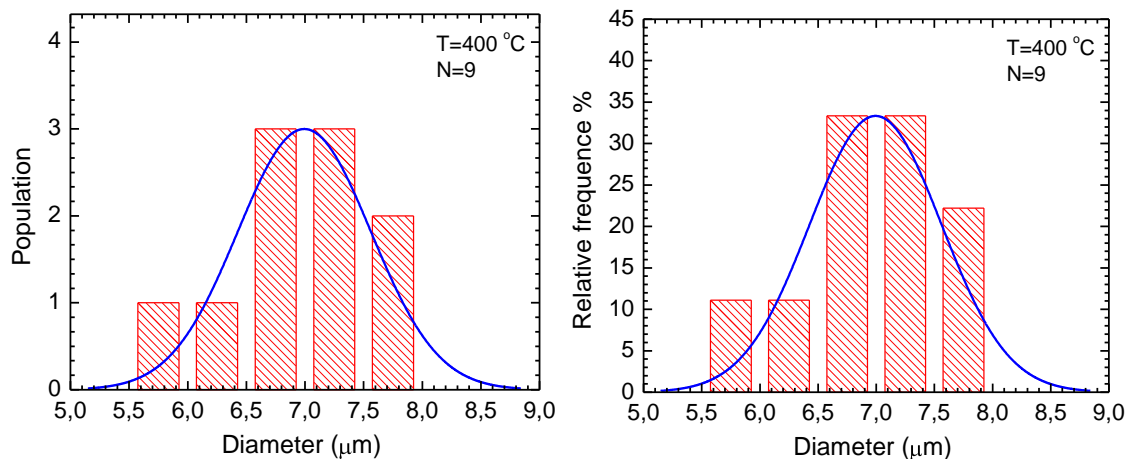
Παρατηρώντας την εικόνα 29, το μέσο ύψος των ΕΑ είναι  $0,36\text{ }\mu\text{m}$ , όπως άλλωστε δείχνει το αριστερό διάγραμμα. Η επί τοις εκατό σχετική συχνότητα εμφάνισης της μέσης τιμής ύψους είναι 38 % όπως άλλωστε δείχνει και το δεξί διάγραμμα. Οι τιμές ύψους που εμφανίζονται με τη μέγιστη συχνότητα της τάξεως του 38% είναι στα  $0,22 - 0,28\text{ }\mu\text{m}$  και  $0,32 - 0,38\text{ }\mu\text{m}$ .

Η μέση τιμή του ύψους των ΕΑ που θερμάνθηκαν στους  $300\text{ }^{\circ}\text{C}$  παρουσιάζει μια μείωση της τάξεως του 52 % σε σχέση με τη μέση τιμή ύψους ΕΑ σε θερμοκρασία δωματίου δηλαδή  $(0,75 - 0,36)\text{ }\mu\text{m} / 0,75\text{ }\mu\text{m} = 0,52$ . Το γεγονός αυτό μας προϊδεάζει ότι σε μεγαλύτερες ακόμα θερμοκρασίες και το ύψος των ΕΑ θα μειωθεί επιπλέον.



**Εικόνα 30:** Εκτίμηση της διαμέτρου και του ύψους ενός ΕΑ που έχει θερμανθεί στους  $400\text{ }^{\circ}\text{C}$  για 15 min



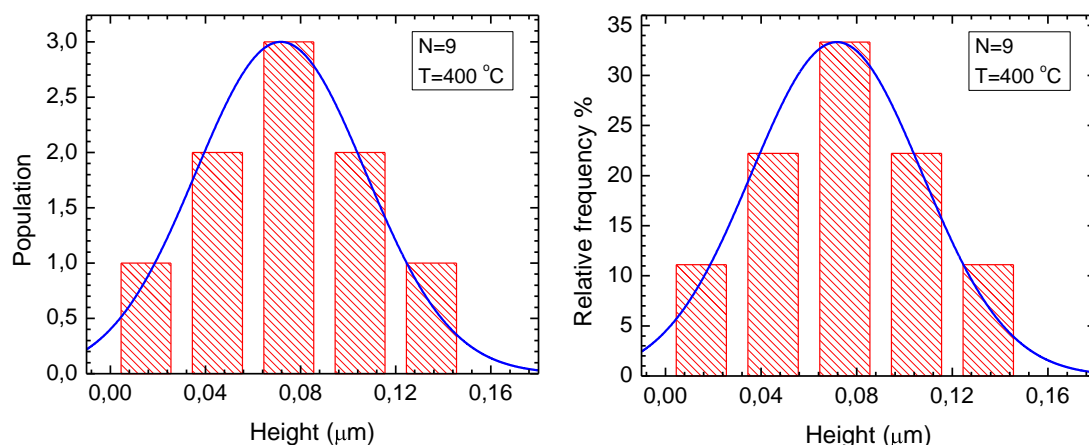


**Εικόνα 31:** Απεικόνιση της συχνότητας εμφάνισης της τιμής της διαμέτρου των ΕΑ για θερμοκρασία 400 °C. Αριστερά: Απόλυτη συχνότητα δείγματος 9 ΕΑ. Δεξιά: Σχετική συχνότητα %.

Στο αριστερό διάγραμμα της εικόνας 31, η μέση διάμετρος των ΕΑ που έχουν θερμανθεί στους 400 °C, είναι 6,99 μm. Η επί τοις εκατό σχετική συχνότητα εμφάνισης της μέσης τιμής διαμέτρου είναι 31 % όπως άλλωστε δείχνει και το δεξί διάγραμμα. Η διάμετρος ΕΑ της τάξεως των 6,99 μm εμφανίζεται και με τη μεγαλύτερη σχετική συχνότητα σύμφωνα με το δεξί διάγραμμα.

Η μέση τιμή της διαμέτρου των ΕΑ που θερμάνθηκαν στους 400 °C παρουσιάζει μια μείωση της τάξεως του 24 % σε σχέση με τη μέση τιμή διαμέτρου των ΕΑ που θερμάνθηκαν μέχρι τους 300 °C.

Ακολουθούν τα ιστογράμματα του ύψους των ΕΑ για θερμοκρασία 400 °C.



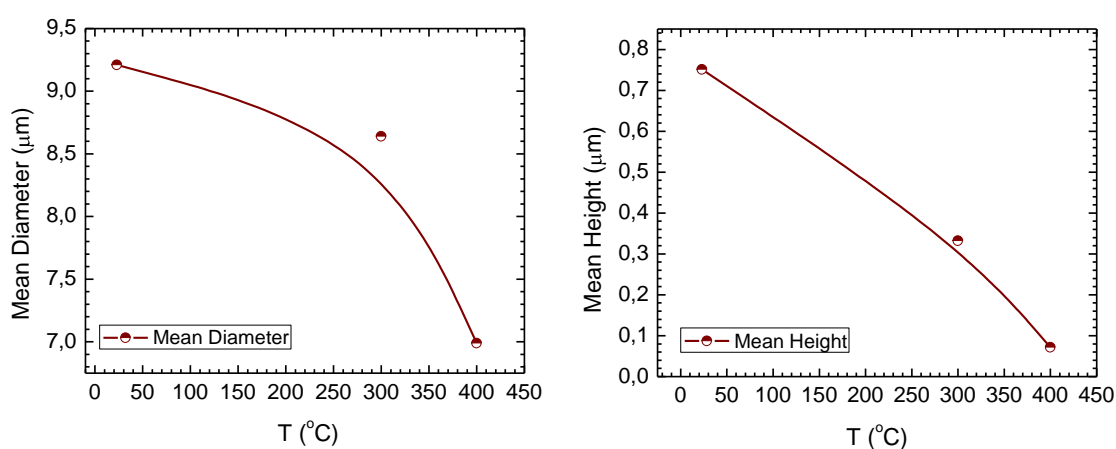
**Εικόνα 32:** Απεικόνιση της συχνότητας εμφάνισης τιμών ύψους των ΕΑ για θερμοκρασία T=400. Αριστερά: Απόλυτη συχνότητα δείγματος 9 ΕΑ. Δεξιά: Σχετική συχνότητα %.



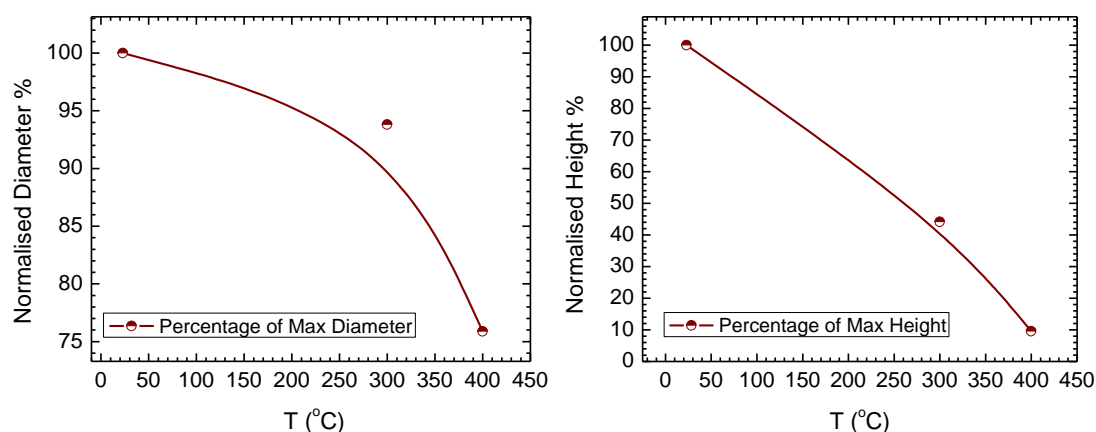
Η μέση τιμή του ύψους είναι 0,069  $\mu\text{m}$  όπως δείχνει το αριστερό διάγραμμα της εικόνας 32. Η σχετική συχνότητα εμφάνισης της μέσης τιμής είναι 33%.

Η μέση τιμή του ύψους των ΕΑ που θερμάνθηκαν στους 400  $^{\circ}\text{C}$ , παρουσιάζει μια μείωση της τάξεως του 80 % σε σχέση με τη μέση τιμή ύψους σε θερμοκρασία 300  $^{\circ}\text{C}$ .  $(0,36-0,069) \mu\text{m} / 0,36 \mu\text{m} = 0,80$ .

Καθώς τα ΕΑ εκθέτονται σε ακραίες θερμοκρασίες έως 400  $^{\circ}\text{C}$  παρατηρούμε ότι μειώνεται η διάμετρός τους κατά 32 % και το ύψος τους κατά 91 %, δηλαδή  $(0,75-0,069) \mu\text{m} / 0,75 \mu\text{m} = 0,908$ . Τα ΕΑ τείνουν να εξαχνωθούν. Παραθέτουμε τη φθίνουσα καμπύλη που αναπαριστά το φαινόμενο αυτό.



**Εικόνα 33:** Αριστερά: διαγραμματική απεικόνιση της διαμέτρου των ΕΑ συναρτήσει της θερμοκρασίας. Δεξιά: διαγραμματική απεικόνιση της μείωσης τους ύψους των ΕΑ συναρτήσει της θερμοκρασίας.

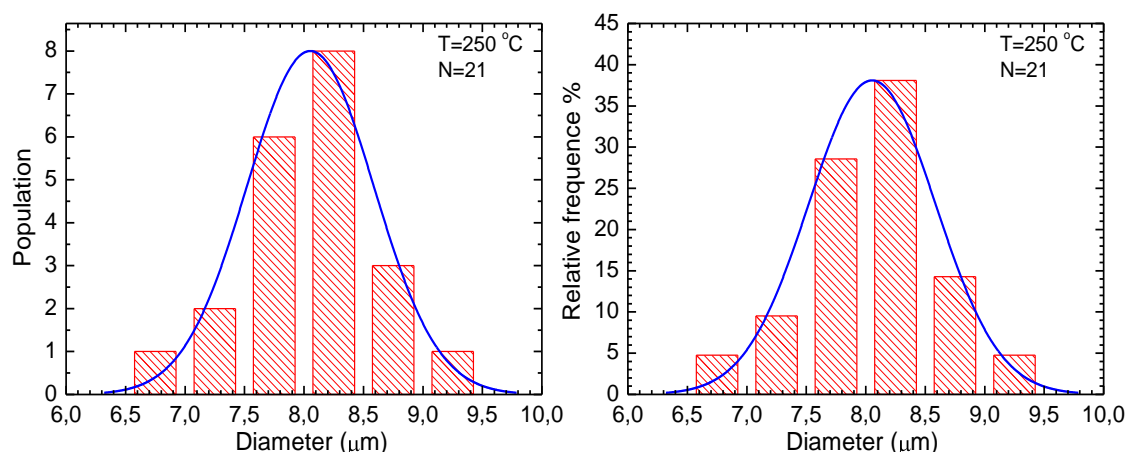


**Εικόνα 34:** Αριστερά: διαγραμματική απεικόνιση της ποσοστιαίας μείωσης της διαμέτρου των ΕΑ συναρτήσει της θερμοκρασίας. Δεξιά: διαγραμματική απεικόνιση της ποσοστιαίας μείωσης τους ύψους των ΕΑ συναρτήσει της θερμοκρασίας.

Ο κάθετος άξονας του αριστερού διαγράμματος της εικόνας 34 έχει προκύψει από κανονικοποίηση κάθε τιμής διαμέτρου προς τη μέγιστη τιμή διαμέτρου στη θερμοκρασία δωματίου που είναι 9,21  $\mu\text{m}$ . Συνεπώς, σε θερμοκρασία 23 °C το ΕΑ βρίσκεται στο 100 % της διαμέτρου του. Ενώ σε θερμοκρασία 300 °C έχει μειωθεί στο 90 – 95 % της αρχικής. Ενώ σε θερμοκρασία 400 °C το ΕΑ έχει συρρικνωθεί στο 75 %. Στο δεξί διάγραμμα της εικόνας 33 ο κάθετος άξονας έχει προκύψει από κανονικοποίηση κάθε τιμής ύψους προς τη μέγιστη τιμή που είχε το ύψος στη θερμοκρασία δωματίου και είναι 0,849  $\mu\text{m}$ . Συνεπώς, αν σε θερμοκρασία 23 °C το ΕΑ βρίσκεται στο 100 % του ύψους του, σε θερμοκρασία 300 °C έχει μειωθεί στο 40–50 % του αρχικού. Τέλος, σε θερμοκρασία 400 °C το ύψος του ΕΑ έχει συρρικνωθεί στο 10 % του αρχικού του ύψους.

#### • ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ ΓΙΑ ΤΟ ΔΟΤΗ Γ

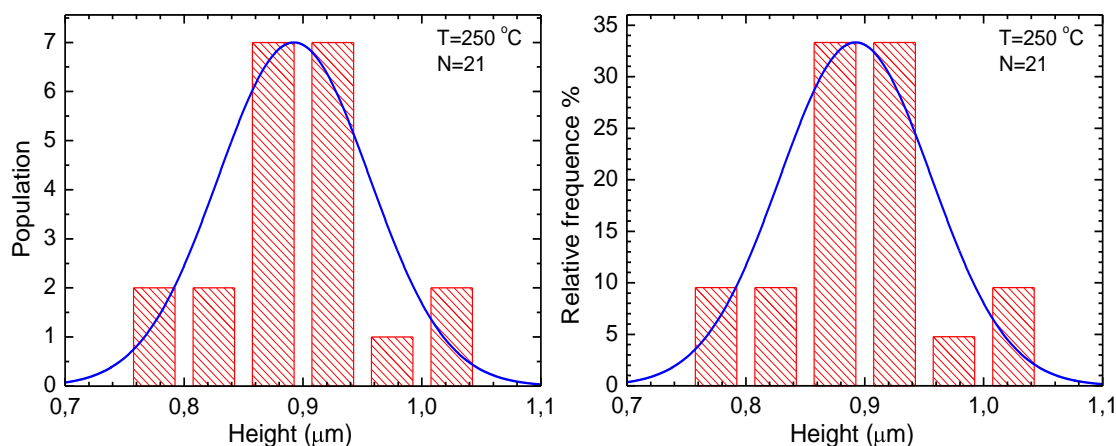
Για περαιτέρω διερεύνηση χρησιμοποιούμε δείγμα 3<sup>ου</sup> δότη το οποίο θερμαίνουμε αρχικά στους 250 °C. Σαρώνουμε το δείγμα με το ΜΑΔ, και από την επεξεργασία των δεδομένων προκύπτει:



**Εικόνα 35:** Απεικόνιση της συχνότητας εμφάνισης της τιμής της διαμέτρου των ΕΑ για θερμοκρασία 250 °C. Αριστερά: Απόλυτη συχνότητα δείγματος 21 ΕΑ. Δεξιά: Σχετική συχνότητα %.

Στο αριστερό διάγραμμα της εικόνας 35, η μέση διάμετρος των ΕΑ που έχουν θερμανθεί στους 250 °C, είναι 8,053  $\mu\text{m}$ . Αποτελέσματα γύρω από τη μέση τιμή της διαμέτρου, εμφανίζονται με σχετική συχνότητα 39 % όπως άλλωστε δείχνει και το

δεξί διάγραμμα. Και εμφανίζεται και με τη μεγαλύτερη σχετική συχνότητα σύμφωνα με το δεξί διάγραμμα. Όμοια για τα ραβδογράμματα του ύψους.



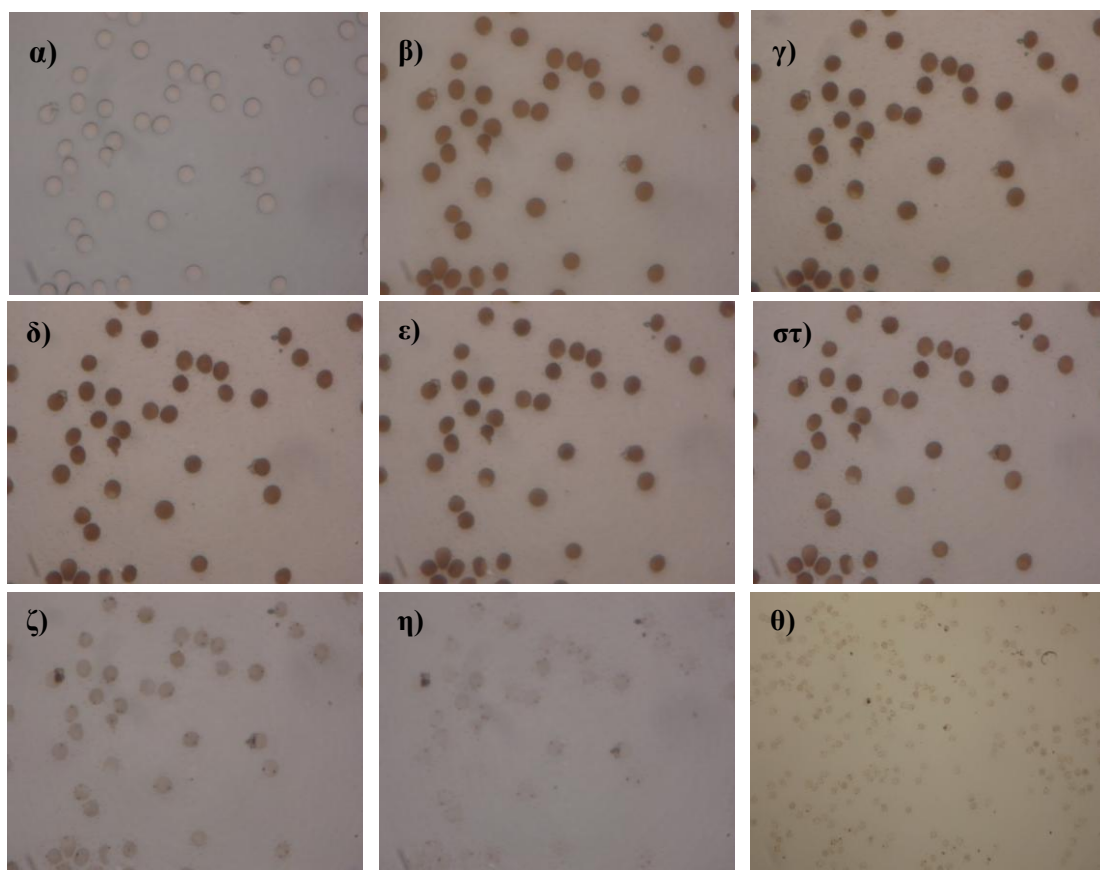
**Εικόνα 36:** Απεικόνιση της συχνότητας εμφάνισης τιμών ύψους των ΕΑ για θερμοκρασία  $T=250$  Αριστερά: Απόλυτη συχνότητα δείγματος 21 ΕΑ. Δεξιά: Σχετική συχνότητα %.

Η μέση τιμή του ύψους είναι  $0,892\text{ }\mu\text{m}$  όπως δείχνει το αριστερό διάγραμμα της εικόνας 35. Η σχετική συχνότητα εμφάνισης της μέσης τιμής είναι  $33\%$ . Οι τιμές ύψους που εμφανίζονται με τη μέγιστη σχετική συχνότητα της τάξεως του  $33\%$  είναι στα  $0,86 - 0,89\text{ }\mu\text{m}$  και  $9,1 - 9,5\text{ }\mu\text{m}$ .

#### 4.4. Συμπληρωματική μελέτη των ΕΑ με ΟΜ στην περιοχή θερμοκρασιών $20 - 510\text{ }^{\circ}\text{C}$

Η ανθεκτικότητα των ΕΑ σε αφύσικα υψηλές θερμοκρασίες στάθηκε αφορμή για περαιτέρω έρευνα. Έχοντας ήδη παρατηρήσει τη συμπεριφορά των ΕΑ στις υψηλές θερμοκρασίες του εργαστηριακού φούρνου, επιθυμούμε να οριοθετήσουμε την ανθεκτικότητά τους. Για το λόγο αυτό τοποθετούμε εκ νέου τα πλακίδια που φέρουν υμένα αίματος στον εργαστηριακό φούρνο και τα θερμαίνουμε σε θερμοκρασία  $400^{\circ}\text{C}$  για  $5\text{ min}$ . Λαμβάνουμε εικόνες από το ΟΜ για ποιοτική εκτίμηση των μεταβολών. Εν συνεχεία τα αναθερμαίνουμε στους  $420\text{ }^{\circ}\text{C}$  για  $5\text{ min}$ . Ακολουθούμε την ίδια διαδικασία με βήμα αύξησης της θερμοκρασίας  $20\text{ }^{\circ}\text{C}$ . Για εποπτικούς λόγους αντιπαραθέτουμε τη συλλογή εικόνων από το ΟΜ όπου φαίνονται τα στάδια και η τάση των ΕΑ να μεταβάλλονται έως την τελική εξάχνωσή τους στους  $510\text{ }^{\circ}\text{C}$ .

Αξίζει να σημειωθεί ότι αρχικά λάβαμε εικόνα από δείγμα που βρισκόταν σε θερμοκρασία δωματίου. Αυτό αποτελεί και το σημείο αναφοράς στη συγκριτική συζήτηση που ακολουθεί. Παρατηρούμε πάντα την ίδια περιοχή δείγματος για λόγους ομοιογένειας σε θερμοκρασίες 400, 420, 440, 460, 480, 500 και 510 °C.



**Εικόνα 37:** Εικόνες OM δειγμάτων ΕΑ με μεγέθυνση 300×. α) σε θερμοκρασία δωματίου, β) σε  $T=400$  °C, γ) σε  $T=420$  °C, δ)  $T=440$  °C, ε)  $T=460$  °C, στ)  $T=480$  °C, ζ)  $T=500$  °C, η)  $T=510$  °C, θ)  $T=510$  με μικρότερη μεγέθυνση 200×.

Στην εικόνα 35:

- από α) έως και ε) αντιλαμβανόμαστε οπτικά ότι τα ΕΑ παρουσιάζουν εμφανή χρωματική μεταβολή από ανοιχτό σε σκούρο ερυθρό.
- Από στ) έως ζ) παρατηρούμε αλλαγή στη φωτεινότητα των ΕΑ. Στο πέρασμα από τους 480 στους 500 °C, υφίστανται ραγδαία μεταβολή με έντονα σημάδια εξάχνωσης.
- Στη ζ) που αντιστοιχεί σε θερμοκρασία 500 °C, τα κύτταρα εμφανίζονται φανερά σε πολύ πιο αχνούς τόνους. Αυτό το γεγονός καταδεικνύει ότι ρυθμός

εξάχνωσής τους έχει αυξηθεί απότομα όταν αυτά εκτεθούν στη συγκεκριμένη θερμοκρασία.

- Στην η) με δυσκολία μπορεί πλέον κανείς να τα διακρίνει, εφόσον από τη θερμοκρασία των 500 °C έχουν αφυδατωθεί αρκετά μέχρι την οριστική τους εξάχνωση στους 510 °C.
- Η εικόνα θ) ανήκει όπως και η η) στη θερμοκρασία των 510 °C και απεικονίζει μια ευρύτερη περιοχή του δείγματος σε μικρότερη μεγέθυνση 200× για την πιο γενικευμένη παρατήρησή του. Είναι πλέον φανερό ότι τα ΕΑ έχουν εξαχνωθεί.

## **BIBΛΙΟΓΡΑΦΙΑ - ΑΝΑΦΟΡΕΣ**

- [1] Stamopoulos D, Manios E, Gourni E, Gogola V, Gjoka E, Benaki D, Pissas M, Bouziotis P, *Surveying the Response of Transport Channels of Intact RBC Membranes upon AgNO<sub>3</sub> Administration: an Atomic Force Microscopy Study*, Cell Physiology and Biochemistry, 24, 2009, 33-44.

# 5

## *Συμπεράσματα και μελλοντικοί στόχοι*

Και τα δύο όργανα παρατήρησης που χρησιμοποιήσαμε, το OM και το ΜΑΔ, παρέχουν πληροφορίες για μια ποιοτική ανάλυση των προς εξέταση δειγμάτων. Εντούτοις, η δυνατότητα ακριβούς ποσοτικής ανάλυσης τόσο σε *μικροσκοπική* όσο και σε *νανοσκοπική* κλίμακα περιορίζεται μόνο μέσω της τεχνικής του ΜΑΔ, όπως για παράδειγμα αριθμητικά αποτελέσματα για την διάμετρο, το ύψος το εμβαδόν των ΕΑ (*μικροσκοπικά χαρακτηριστικά*) καθώς και για την επιφάνεια και την τραχύτητα της κυτταρικής μεμβράνης τους (*νανοσκοπικά χαρακτηριστικά*). Η έκθεση των ΕΑ έγινε σε ένα ευρύ φάσμα θερμοκρασιών: φυσιολογικές (35 – 37 °C), ήπια μη φυσιολογικές (37 – 42 °C) και αφύσικα υψηλές (έως 510 °C).

Ενώ αρχικά στοχεύαμε στη μελέτη των μικροσκοπικών και νανοσκοπικών μορφολογικών χαρακτηριστικών των ΕΑ και της μεμβράνης τους σε φυσιολογικές ή εμπύρετες για τον ανθρώπινο οργανισμό συνθήκες, τελικά επεκτείναμε τη μελέτη μας και σε ακραίες θερμοκρασίες που οδηγούν στην οριστική εξάχνωση του ΕΑ λόγω των ενδιαφερόντων αποτελεσμάτων που παρατηρήσαμε.

## 5.1. Συμπεράσματα

Τα ποσοτικά αποτελέσματα που έδωσε η στατιστική ανάλυση μέσω των εικόνων του ΜΑΔ παρουσιάζουν τις μεταβολές των γεωμετρικών χαρακτηριστικών των ΕΑ λόγω αύξησης της θερμοκρασίας τις οποίες συνοψίζουμε πιο κάτω για τις περιοχές θερμοκρασιών 20 – 90 °C (*in situ* θέρμανση) και 20 – 510 °C (*ex situ* θέρμανση).

### In situ θέρμανση, 20-90 °C

#### *Μικροσκοπικά χαρακτηριστικά ΕΑ*

Α) Στο **δότη Α** θερμάναμε τα ΕΑ για θερμοκρασίες 20 – 55 °C και παρατηρήθηκε ότι:

- Η *διάμετρος* παρουσιάζει μείωση για θερμοκρασίες 40 – 47 °C. Η μέγιστη και η ελάχιστη τιμή διαφέρουν μεταξύ τους μόλις κατά 0,19 μm που ποσοστιαία εκφράζεται ως 2,24 %.
- Το *μέσο ύψος* των ΕΑ υποχωρεί στα 0,85 μm στην θερμοκρασία των 37,7 °C. Το ελάχιστο από το μέγιστο ύψος διαφέρουν κατά 0,08 μm, δηλαδή της τάξεως του 9,4 %.
- Η *επιφάνεια* του ΕΑ ελαχιστοποιείται στους 40 – 45 °C και φτάνει τα 45 μm. Η διαφορά της μέγιστης από την ελάχιστη τιμή, είναι της τάξεως του 5,41 %.

Συμπερασματικά, στους 20 – 55 °C οι διαφοροποιήσεις που παρατηρήθηκαν στα γεωμετρικά χαρακτηριστικά των ΕΑ είναι σχετικά μικρές, συμπεράνουμε ότι θα λάβουμε ακόμα πιο ενδιαφέροντα αποτελέσματα αν ελέγξουμε τα ίδια χαρακτηριστικά σε θερμοκρασίες υψηλότερες.

Β) Στο **δότη Β** θερμαίνουμε τα ΕΑ για θερμοκρασίες 20 – 90 °C και παρατηρήθηκε ότι:

- Η *διάμετρος* εμφανίζει μείωση στους 30 – 37 °C και 40 – 45 °C. Αλλά η μέγιστη και η ελάχιστη τιμή διαφέρουν μόλις κατά 3,9 %.
- Το *μέσο ύψος* των ΕΑ μεγιστοποιείται στην θερμοκρασία των 69,5 °C. Το ελάχιστο από το μέγιστο ύψος διαφέρουν κατά 10 %.
- Η *επιφάνεια* εμφανίζει όπως και η διάμετρος, μείωση στους 30 – 37 °C και στους 40 – 45 °C. Η μέγιστη και η ελάχιστη τιμή διαφέρουν κατά 6,7 %.



Το πόρισμα που απορρέει από τους δυο δότες είναι ότι η διάμετρος και το εμβαδόν των ΕΑ μειώνονται όταν αυτά θερμανθούν, γύρω από τους 40 – 45 °C. Αυτό συμβαίνει δηλαδή σε θερμοκρασίες όπου το ανθρώπινο σώμα βρίσκεται σε εμπύρετη κατάσταση. Η μεταβολή αυτή στην εμπύρετη κατάσταση, ποσοστιαία είναι κάτω από 4%. Συγκεντρωτικά όμως, για θερμοκρασίες έως και 90 °C, και στους δύο δότες παρατηρήσαμε κάποιες αυξομειώσεις στη διάμετρο, το ύψος και την επιφάνεια των ΕΑ οι οποίες δεν ξεπερνούν το 10 %. Συνεπώς, Τα ΕΑ είναι εξαιρετικά ανθεκτικά όταν βρίσκονται σε μορφή υμενίων αίματος και δεν έδειξαν να επιδέχονται ακραίες μεταβολές ούτε στην αρχιτεκτονική, ούτε στις διαστάσεις τους.

#### ***Νανοσκοπικά χαρακτηριστικά μεμβράνης ΕΑ***

Όπως τονίσαμε σε όλη την παρούσα Διπλωματική Εργασία το ΜΑΔ μπορεί να απεικονίσει τη μορφολογία της μεμβράνης του ΕΑ με ακρίβεια της τάξης του nm. Παρέχει ασφαλώς περισσότερες πληροφορίες από το ΟΜ, επίσης δίνει δυνατότητα παρατήρησης βιολογικών δειγμάτων χωρίς προεπικάλυψη όπως το ΗΜΣ [1].

Αυτά τα θέματα διερευνήθηκαν στον **δότη Γ** όπου παρατηρήσαμε ότι:

- Σε θερμοκρασία 42,2 °C:

Η *τραχύτητα* της μεμβράνης των ΕΑ παρουσιάζει μείωση 11,22 % με 13,04 % .

- Σε θερμοκρασία 50,0 °C:

Η *τραχύτητα* της μεμβράνης των ΕΑ παρουσιάζει αύξηση 9,46 % με 15.00 % σε σχέση με την προηγούμενη καταμέτρηση στους 42,2 °C.

#### **Ex situ θέρμανση, 20-510 °C**

Για να οδηγηθούμε σε ένα πιο ευρύ φάσμα συμπερασμάτων ως προς την ανθεκτικότητα των ΕΑ, τα θερμάναμε σε ακραίες θερμοκρασίες. Η ανάλυση των δεδομένων ΜΑΔ για θέρμανση σε εύρος θερμοκρασιών 23 – 400 °C οδηγεί στα πιο κάτω συμπεράσματα σχετικά με τα μικροσκοπικά γεωμετρικά χαρακτηριστικά των ΕΑ:

- Η *διάμετρος* στη θερμοκρασία των 300 °C έχει μειωθεί στο 90 – 95 % της αρχικής, ενώ σε θερμοκρασία 400 °C το ΕΑ έχει μειωθεί στο 75 %.
- Το *ύψος* σε θερμοκρασία 300 °C έχει υποχωρήσει στο 40 – 50 % του αρχικού, ενώ σε θερμοκρασία 400 °C έχει μειωθεί στο 10 %.

Θερμοκρασία (°C)	Ποσοστό αρχικού ύψους	Ποσοστό αρχικής διαμέτρου
23	100 %	100 %
300	40 – 50 %	90 – 95 %
400	10 %	40 – 50 %

Συμπεραίνουμε ότι το ύψος παρουσιάζει πιο ραγδαία μείωση από τη διάμετρο, όταν τα ΕΑ εκτίθενται σε υψηλές θερμοκρασίες. Συνεπώς, μέχρι και τους 400 °C έχουμε υπολείμματα κυττάρων. Η οριστική τους πλέον εξάχνωση σημειώνεται στη θερμοκρασία των 510 °C και είναι εμφανής και με το ΟΜ. Η ποιοτική και ποσοτική ανάλυση που πραγματοποιήθηκε ενισχύει την άποψη για ανθεκτικότητα των ΕΑ σε υψηλές θερμοκρασίες.

Τέλος, έχοντας μελετήσει διεξοδικά τη συμπεριφορά των ΕΑ συναρτήσει της θερμοκρασίας μέσω της τεχνικής της ΜΑΔ, πιστεύουμε ότι το όργανο αυτό μπορεί να αποτελέσει το μικροσκόπιο του μέλλοντος. Ειδικότερα, στον ιατρικό κλάδο σε ειδικότητες όπως του αιματολόγου και του ανατο/βιο-παθολόγου, το ΜΑΔ μπορεί να συνδράμει σε διαγνωστικό επίπεδο στη συσχέτιση των μικροσκοπικών και νανοσκοπικών μορφολογικών χαρακτηριστικών των ΕΑ και της μεμβράνης τους με διάφορες παθολογικές καταστάσεις. Αλλά και σε ερευνητικό επίπεδο μπορεί να συμβάλλει σε μελέτες για την βαθύτερη κατανόηση των βιολογικών μηχανισμών λειτουργίας διαφόρων οργανισμών σε κυτταρικό επίπεδο.

## 5.2. Μελλοντικοί στόχοι

- **Μελέτη ΕΑ με τη θερμοκρασία σε φυσιολογικό υγρό περιβάλλον (ολικό αίμα):** Εφόσον τα ΕΑ αποδείχθηκαν εξαιρετικά ανθεκτικά στις υψηλές θερμοκρασίες, η μελέτη μπορεί να επεκταθεί και στην παρατήρηση τους ύστερα από θέρμανση σε ολικό αίμα. Σε ολικό αίμα, λόγω παρουσίας πλάσματος και ωσμωτικής πίεσεως η θέρμανση μπορεί να επιφέρει διαφορετικά αποτελέσματα στα ΕΑ. Ενδεχομένως, να προσροφήσουν συστατικά του πλάσματος, να αυξηθεί ο όγκος τους ή και να αιμολυθούν.
- **Επέκταση σε μεγαλύτερο στατιστικό δείγμα:** Για την ασφαλέστερη εξαγωγή συμπερασμάτων σε τέτοιου είδους πειράματα είναι απαραίτητη η επαναληψιμότητα και ένας σχετικά μεγάλος αριθμός δοτών.

- **Επέκταση σε διάφορες παθολογικές καταστάσεις στον άνθρωπο:** Επίσης, η ανθεκτικότητα των ΕΑ ως προς την θερμοκρασία ίσως να ποικίλει ανάλογα με διάφορες αιματολογικές, παθολογικές καταστάσεις (καρδιαγγειακή νόσος, νεφρική ανεπάρκεια). Μπορεί η μελέτη να επεκταθεί σε ΕΑ ασθενών με υψηλή συγκέντρωση μεμβρανικών λιπιδίων όπως φωσφολιπίδια, γλυκολιπίδια, χοληστερόλη. Επιπροσθέτως, τα κύτταρα νεφροπαθών που υφίστανται αιμοκάθαρση καταπονούνται ιδιαίτερα, με πιθανή μεταβολή της συνήθους μορφολογίας αλλά κάτι την πιθανή απώλεια συστατικών του κυττάρου.
- **Χρήση συμπληρωματικών πειραματικών τεχνικών:** Επίσης, μπορεί να μελετηθεί και η μεταβολή της μάζας των ΕΑ ως συνάρτηση της θερμοκρασίας με τη χρήση διάταξης Θερμοστατικής Ανάλυσης (Thermogravimetric Analysis–TGA) [2], [3]. Η εξάχνωση που παρατηρήσαμε στις υψηλές θερμοκρασίες, συνεπάγεται και μεταβολή του βάρους.

Καταλήγοντας, η ανθεκτικότητα των μορφολογικών χαρακτηριστικών των ΕΑ μπορεί να συνεισφέρει και στον κλάδο της Νανοβιοτεχνολογίας, πραγματοποιούνται σύγχρονες μελέτες βιοσυμβατότητας νανοδομών με τα έμμορφα συστατικά του αίματος. Τα συσσωματώματα αυτά, όταν τοποθετηθούν χωρίς παρενέργειες *in vivo*, συνεισφέρουν στη διάγνωση αλλά και θεραπεία διαφόρων παθήσεων [4].

## **BIBΛΙΟΓΡΑΦΙΑ - ΑΝΑΦΟΡΕΣ**

- [1] Zhang P, Bai C, Huang Y, Zhao M, Fang H, WangY, Li Q, *Atomic force microscopy study of fine structures of the entire surface of red blood cells*, Scanning Microsc, 9, 1995, 981–989.
- [2] Broido A, *A simple, sensitive graphical method of treating thermogravimetric analysis data*, Journal of Polymer Science Part A-2: Polymer Physics, 7 ,1969, 1761–1773.
- [3] Mansfield E, Kar A, Quinn T, and Hooker S, *Quartz Crystal Microbalances for Microscale Thermogravimetric Analysis*, Analytical Chemistry 82, 24, 2010, 9977–9982.
- [4] Γκόγκολα Β, *Μελέτη της Βιοσυμβατότητας σιδηρομαγνητικών νανοδομών Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>-αλβουμίνης με τα Έμμορφα στοιχεία του αίματος*, Μεταπτυχιακή Διατριβή, Επιβλέποντες: Παναγιωτόπουλος Ι. Αναπληρωτής Καθηγητής Τμήμα Μηχανικών Επιστήμης Υλικών Πανεπιστήμιο Ιωαννίνων, Σταμόπουλος Δ. Συνεργαζόμενος Ερευνητής Ινστιτούτο Επιστήμης Υλικών Ε.Κ.Ε.Φ.Ε ‘Δημόκριτος’, Αθήνα 2010.

### ***ΤΑΥΤΟΤΗΤΑ ΔΟΤΩΝ***

Δότης Α	Μπάλτα Χριστιάνα
Δότης Β	Γκόγκολα Βασιλική
Δότης Γ	Σταμόπουλος Δημοσθένης