



ΕΘΝΙΚΟ ΜΕΤΣΟΒΙΟ ΠΟΛΥΤΕΧΝΕΙΟ

ΣΧΟΛΗ ΗΛΕΚΤΡΟΛΟΓΩΝ ΜΗΧΑΝΙΚΩΝ ΚΑΙ ΜΗΧΑΝΙΚΩΝ ΥΠΟΛΟΓΙΣΤΩΝ

ΤΟΜΕΑΣ ΗΛΕΚΤΡΟΜΑΓΝΗΤΙΚΩΝ ΕΦΑΡΜΟΓΩΝ, ΗΛΕΚΤΡΟΟΠΤΙΚΗΣ ΚΑΙ ΗΛΕΚΤΡΟΝΙΚΩΝ ΥΛΙΚΩΝ

ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΒΙΟΪΑΤΡΙΚΗΣ ΟΠΤΙΚΗΣ ΚΑΙ ΕΦΑΡΜΟΣΜΕΝΗΣ ΒΙΟΦΥΣΙΚΗΣ

**ΑΠΕΙΚΟΝΙΣΗ ΜΙΚΡΟΣΚΟΠΙΑΣ ΑΤΟΜΙΚΗΣ
ΔΥΝΑΜΗΣ ΒΙΟΛΟΓΙΚΩΝ ΜΑΚΡΟΜΟΡΙΩΝ**

ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ

της **ΣΑΜΠΑΝΗ ΚΥΡΙΑΚΗΣ**

MSc Φυσικού

ΙΟΥΛΙΟΣ 2024

ΑΘΗΝΑ

«Η παρούσα έρευνα έχει χρηματοδοτηθεί από το Μορφωτικό Ίδρυμα Ηθικής και Κοινωνικής Διαπαιδαγώγησης και το Ερευνητικό Πανεπιστημιακό Ινστιτούτο Συστημάτων Επικοινωνιών & Υπολογιστών.»

.....

Σαμπάνη Κυριακή

Πτυχιούχος Φυσικός, Σχολής Θετικών Και Τεχνολογικών Επιστημών, Πανεπιστημίου Κρήτης με Ειδίκευση «Ατομική – Μοριακή Φυσική και Laser» (2008)

Διπλωματούχος Μεταπτυχιακού Προγράμματος Ειδίκευσης «Οπτοηλεκτρονική και Μικροηλεκτρονική», Τμήματος Φυσικής, Σχολής Θετικών Και Τεχνολογικών Επιστημών, Πανεπιστημίου Κρήτης (2012)

Copyright © Σαμπάνη Κυριακή 2024

Με επιφύλαξη παντός δικαιώματος. All rights reserved.

Απαγορεύεται η αντιγραφή, αποθήκευση και διανομή της παρούσας εργασίας, εξ ολοκλήρου ή τμήματος αυτής, για εμπορικό σκοπό. Επιτρέπεται η ανατύπωση, αποθήκευση και διανομή για σκοπό μη κερδοσκοπικό, εκπαιδευτικής ή ερευνητικής φύσης, υπό την προϋπόθεση να αναφέρεται η πηγή προέλευσης και να διατηρείται το παρόν μήνυμα.

Ερωτήματα που αφορούν τη χρήση της εργασίας για κερδοσκοπικό σκοπό πρέπει να απευθύνονται προς τη συγγραφέα.

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



ΕΘΝΙΚΟ ΜΕΤΣΟΒΙΟ ΠΟΛΥΤΕΧΝΕΙΟ

ΣΧΟΛΗ ΗΛΕΚΤΡΟΛΟΓΩΝ ΜΗΧΑΝΙΚΩΝ ΚΑΙ ΜΗΧΑΝΙΚΩΝ ΥΠΟΛΟΓΙΣΤΩΝ

ΤΟΜΕΑΣ ΗΛΕΚΤΡΟΜΑΓΝΗΤΙΚΩΝ ΕΦΑΡΜΟΓΩΝ, ΗΛΕΚΤΡΟΟΠΤΙΚΗΣ & ΗΛΕΚΤΡΟΝΙΚΩΝ ΥΛΙΚΩΝ

ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΒΙΟΪΑΤΡΙΚΗΣ ΟΠΤΙΚΗΣ ΚΑΙ ΕΦΑΡΜΟΣΜΕΝΗΣ ΒΙΟΦΥΣΙΚΗΣ

ΑΠΕΙΚΟΝΙΣΗ ΜΙΚΡΟΣΚΟΠΙΑΣ ΑΤΟΜΙΚΗΣ ΔΥΝΑΜΗΣ ΒΙΟΛΟΓΙΚΩΝ ΜΑΚΡΟΜΟΡΙΩΝ

ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ της ΣΑΜΠΙΑΝΗ ΚΥΡΙΑΚΗΣ

Πτυχιούχου Φυσικού και Διπλωματούχου Μεταπτυχιακού Προγράμματος
Ειδίκευσης «Οπτοηλεκτρονική και Μικροηλεκτρονική» Τμήματος Φυσικής, Σχολής
Θετικών και Τεχνολογικών Επιστημών, Πανεπιστημίου Κρήτης

Επταμελής Επιτροπή:

Διδώ Γιόβα, Ομότιμη Καθηγήτρια Σ.Η.Μ.Μ.Υ. Ε.Μ.Π. (Επιβλέπουσα)

Ευάγγελος Χριστοφόρου, Καθηγητής Σ.Η.Μ.Μ.Υ. Ε.Μ.Π.

Χρήστος Μανόπουλος, Επίκουρος Καθηγητής Σ.Μ.Μ. Ε.Μ.Π.

Κωνσταντίνος Πολιτόπουλος, Αναπληρωτής Καθηγητής, Σ.Η.Μ.Μ.Υ. Ε.Μ.Π.

Ανδρέας Στυλιανού, Επίκουρος Καθηγητής, Ευρωπαϊκό Πανεπιστήμιο Κύπρου

Αναστασία Δέτση, Καθηγήτρια, Σ.Χ.Μ. Ε.Μ.Π.

Εμμανουήλ Χουρδάκης, Επίκουρος Καθηγητής, Σ.Η.Μ.Μ.Υ. Ε.Μ.Π.

Αθήνα 2024

ΙΔΙΑΙΤΕΡΕΣ ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Η συγγραφή και ολοκλήρωση της διδακτορικής διατριβής ήταν ένας μεγάλος στόχος ζωής, αλλά δεν ήταν μια εύκολη διαδικασία. Συνέπεσε με τη δύσκολη περίοδο των καραντίνων λόγω covid και ακολούθησε ένα πολύ σοβαρό πρόβλημα υγείας δικού μου ανθρώπου, με άσχημη όμως κατάληξη.

Θα ήθελα, λοιπόν, να ευχαριστήσω από τα βάθη της καρδιάς μου, αυτούς που ήταν και είναι δίπλα μου, που με στηρίζαν ο καθένας με τον τρόπο του και που ένα μόνο ευχαριστώ, δεν είναι αρκετό για...

Τον συνοδοιπόρο μου στη ζωή, Νίκο, που έχουμε δημιουργήσει εδώ και επτά χρόνια μια όμορφη οικογένεια και που κάθε μέρα είναι ξεχωριστή, όσες δυσκολίες και αν έχουμε περάσει.

Τους γονείς μου, που μου έδωσαν τις αξίες για αυτό που είμαι σήμερα και τον αδελφό μου, που είναι το άλλο μου μισό σε αυτή τη ζωή.

Την οικογένεια του Νίκου, που με αγκάλιασαν σαν παιδί τους και κυρίως την Ελένη, που την είχα σαν δεύτερη μητέρα, για την άνιση μάχη που έδωσε.

Τις φίλες μου, για όλα αυτά τα χρόνια που είναι δίπλα μου, ακόμα και αν μας χωρίζουν κάποια χιλιόμετρα, αλλά και αυτούς που ομορφαίνουν την καθημερινότητά μου.

Όμως, το πιο θερμό μου ΕΥΧΑΡΙΣΤΩ... ανήκει στο γιο μου... Γιάννη, που είναι πλέον η μεγαλύτερη, απαιτητικότερη, αλλά ταυτόχρονα η πιο γλυκιά και υπέροχη πρόκληση της ζωής μου. Τον ευχαριστώ, γιατί εν αγνοία του με ωθεί στο να γίνομαι συνέχεια καλύτερος άνθρωπος!

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

ΙΔΙΑΙΤΕΡΕΣ ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ	6
ΠΡΟΛΟΓΟΣ	14
ΔΙΑΓΡΑΜΜΑ ΡΟΗΣ	16
ΠΕΡΙΛΗΨΗ	18
ABSTRACT	24
ΕΙΣΑΓΩΓΗ	30
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1. ΕΛΑΣΤΙΝΗ	34
1.1 Εισαγωγή.....	34
1.1.1 Πολυμερή –Βιοϋλικά.....	34
1.1.2 Βιολογικά μακρομόρια – Πρωτεΐνες.....	35
1.1.3 Ινώδεις πρωτεΐνες.....	36
1.2 Γενικά χαρακτηριστικά ελαστίνης	36
1.3 Βιοσύνθεση ελαστίνης	39
1.4 Αυτοδιαμόρφωση τροποελαστίνης	41
1.5 Εφαρμογές πολυπεπτιδίων	43
1.5.1 Εφαρμογές με ελεγχόμενη αποδέσμευση δραστικών ουσιών.....	43
1.5.2 Εφαρμογές στη μηχανική ιστών.....	45
1.6 Ο ρόλος της ελαστίνης	46
1.6.1 Διαταραχές λόγω έλλειψης ή απουσίας ελαστίνης.....	47
1.6.2 Βιολογικές και μηχανικές ιδιότητες της ελαστίνης.....	49
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2. ΚΟΛΛΑΓΟΝΟ	52
2.1 Εισαγωγή.....	52
2.2 Χημική σύσταση κολλαγόνου.....	54
2.3 Τα επίπεδα δομικής οργάνωσης του κολλαγόνου.....	56
2.3.1 Πρωτοταγής δομή.....	56
2.3.2 Δευτεροταγής δομή	56
2.3.3 Τριτοταγής δομή.....	56
2.3.4 Τεταρτοταγής δομή	57

2.4	Δημιουργία κολλαγόνου τύπου I.....	59
2.5	Ειδικά χαρακτηριστικά κολλαγόνου	61
2.5.1	Σταυροδεσμοί κολλαγόνου.....	61
2.5.2	Περιοδικότητα (D-band) κολλαγόνου	61
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3.....		64
ΜΙΚΡΟΣΚΟΠΙΟ ΑΤΟΜΙΚΗΣ ΔΥΝΑΜΗΣ		64
3.1	Εισαγωγή.....	64
3.2	Διάταξη Μικροσκοπίου Ατομικής Δύναμης	65
3.3	Αρχή λειτουργίας AFM.....	67
3.4	Τρόποι λειτουργίας μικροσκοπίου AFM.....	69
3.5	Μέθοδοι Απεικόνισης AFM.....	69
3.5.1	Μέθοδος Επαφής	71
3.5.2	Μέθοδος ενδιάμεσης επαφής.....	72
3.5.3	Μέθοδος μη επαφής	73
3.6	Σφάλματα μεθόδων απεικόνισης AFM	74
3.7	Μέτρηση Τραχύτητας.....	75
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 4.....		78
ΑΛΛΗΛΕΠΙΔΡΑΣΗ ΑΚΤΙΝΟΒΟΛΙΑΣ ΜΕ ΕΛΑΣΤΙΝΗ		78
4.1	Εισαγωγή.....	78
4.2	Υπεριώδης ακτινοβολία	80
4.2.1	UV-A ακτινοβολία	80
4.2.2	UV-B ακτινοβολία.....	81
4.2.3	UV-C ακτινοβολία.....	81
4.2.4	Επιδράσεις UV ακτινοβολίας στον άνθρωπο	81
4.3	Ερυθρή και εγγύς υπέρυθη ακτινοβολία	83
4.3.1	Θεραπεία χαμηλής ισχύος laser (Low Level Laser Therapy - LLLT) 85	
4.3.2	Επίδραση ερυθρής ακτινοβολίας στον άνθρωπο.....	86
4.4	Αλληλεπίδραση υπεριώδους ακτινοβολίας με ελαστίνη.....	86
4.5	Αλληλεπίδραση ερυθρής ακτινοβολίας χαμηλής ισχύος με ελαστίνη	88
4.6	Μελέτη αλληλεπίδρασης ακτινοβολίας με ελαστίνη με τη χρήση AFM.....	89
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 5. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ.....		92
5.1	Πρωτόκολλα προετοιμασίας δειγμάτων ελαστίνης.....	92

5.1.1	Δημιουργία μητρικών εναιωρημάτων ελαστίνης	92
5.1.2	Προετοιμασία δειγμάτων ελαστίνης.....	92
5.2	Μικροσκοπία Ατομικής Δύναμης	93
5.2.1	Μεθοδολογίες Απεικόνισης AFM.....	93
5.2.2	Μεθοδολογίες επεξεργασίας και ανάλυσης εικόνας AFM.....	97
5.2.3	Μεθοδολογία επαναλαμβανόμενου προσδιορισμού του ίδιου ινιδίου ελαστίνης.....	98
5.2.4	Μεθοδολογία για τη γεωμετρία της ακίδας.....	100
5.3	Πειραματικά Δεδομένα Ακτινοβόλησης με Υπεριώδη Ακτινοβολία	100
5.4	Πειραματικά Δεδομένα Ακτινοβόλησης με Laser Χαμηλής Ισχύος στην Περιοχή του Ερυθρού.....	101
5.5	Στατιστική σημαντικότητα αποτελεσμάτων	103
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 6.....		110
ΑΝΑΠΤΥΞΗ ΝΑΝΟΪΝΙΔΙΩΝ ΕΛΑΣΤΙΝΗΣ ΚΑΙ ΜΕΛΕΤΗ ΤΗΣ ΑΥΤΟΔΙΑΜΟΡΦΩΣΗΣ ΤΗΣ		110
6.1	Εισαγωγή.....	110
6.2	Εναιωρήματα ελαστίνης σε διαφορετικούς διαλύτες.....	112
6.3	Εναιωρήματα ελαστίνης σε διαφορετικές συγκεντρώσεις.....	113
6.4	Εναιωρήματα ελαστίνης σε διαφορετικές θερμοκρασίες.....	114
6.5	Εναιωρήματα ελαστίνης σε διαφορετικές χρονικές περιόδους.....	116
6.6	Γεωμετρικά χαρακτηριστικά νανοϊνιδίων ελαστίνης.....	118
6.7	Απεικόνιση αυτοδιαμόρφωσης ελαστίνης.....	123
6.8	Συζήτηση Αποτελεσμάτων.....	126
6.9	Συμπεράσματα.....	127
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 7.....		130
ΕΠΙΔΡΑΣΗ ΤΗΣ ΥΠΕΡΙΩΔΟΥΣ ΑΚΤΙΝΟΒΟΛΙΑΣ ΣΤΑ ΙΝΙΔΙΑ ΕΛΑΣΤΙΝΗΣ		130
7.1	Πειραματικά Πρωτόκολλα	130
7.1.1	Παραγωγή νανοϊνιδίων ελαστίνης.....	130
7.1.2	Ακτινοβόληση νανοϊνιδίων ελαστίνης	130
7.1.3	Απεικόνιση νανοϊνιδίων ελαστίνης με τη χρήση AFM.....	130
7.1.4	Προσδιορισμός του ίδιου νανοϊνιδίου ελαστίνης πριν και μετά από κάθε ακτινοβόληση	131
7.1.5	Στατιστική σημαντικότητα αποτελεσμάτων.....	131

7.2	Αποτελέσματα.....	131
7.2.1	Μελέτη της επίδρασης υπεριώδους ακτινοβολίας στην ελαστίνη ανάλογα με τις διαστάσεις των ινών.	131
7.2.2	Μελέτη της επίδρασης υπεριώδους ακτινοβολίας στα νανοϊνίδια ελαστίνης ανάλογα με τον χρόνο ακτινοβολήσης.	149
7.3	Συζήτηση αποτελεσμάτων.....	156
7.4	Συμπεράσματα.....	157
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 8.....		160
ΕΠΙΔΡΑΣΗ ΧΑΜΗΛΗΣ ΙΣΧΥΟΣ LASER ΣΤΗΝ ΠΕΡΙΟΧΗ ΤΟΥ ΕΡΥΘΡΟΥ ΣΤΑ ΙΝΙΔΙΑ ΕΛΑΣΤΙΝΗΣ.....		160
8.1	Πειραματικά Πρωτόκολλα.....	160
8.1.1	Παραγωγή νανοϊνιδίων ελαστίνης.....	160
8.1.2	Ακτινοβολήση νανοϊνιδίων ελαστίνης.....	160
8.1.3	Απεικόνιση νανοϊνιδίων ελαστίνης με τη χρήση AFM.....	161
8.1.4	Προσδιορισμός του ίδιου νανοϊνιδίου ελαστίνης πριν και μετά από κάθε ακτινοβολήση.....	161
8.1.5	Μέτρηση τραχύτητας.....	161
8.1.6	Στατιστική σημαντικότητα αποτελεσμάτων.....	161
8.2	Αποτελέσματα.....	161
8.2.1	Μελέτη της επίδρασης ερυθρής ακτινοβολίας χαμηλής ισχύος στην ελαστίνη ανάλογα με τις διαστάσεις των ινών.....	162
8.2.2	Μελέτη της επίδρασης ερυθρής ακτινοβολίας χαμηλής ισχύος στα ινίδια ελαστίνης ανάλογα με τον χρόνο ακτινοβολήσης.....	182
8.3	Συζήτηση αποτελεσμάτων.....	189
8.4	Συμπεράσματα.....	191
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 9.....		194
ΣΥΝΔΥΑΣΤΙΚΗ ΑΝΑΠΤΥΞΗ ΛΕΠΤΩΝ ΥΜΕΝΙΩΝ ΕΛΑΣΤΙΝΗΣ/ΚΟΛΛΑΓΟΝΟΥ.....		194
9.1	Πρωτόκολλα προετοιμασίας δειγμάτων ελαστίνης/κολλαγόνου.....	194
9.1.1	Δημιουργία μητρικού διαλύματος ελαστίνης.....	194
9.1.2	Δημιουργία μητρικού διαλύματος κολλαγόνου.....	194
9.1.3	Δημιουργία μητρικού διαλύματος ελαστίνης/κολλαγόνου.....	195
9.1.4	Προετοιμασία δειγμάτων ελαστίνης/κολλαγόνου.....	195
9.1.5	Απεικόνιση δειγμάτων ελαστίνης/κολλαγόνου με χρήση AFM.....	195

9.2	Αποτελέσματα	195
9.2.1	Δείγματα αναφοράς ινιδίων ελαστίνης και κολλαγόνου.	196
9.2.2	Ανάπτυξη λεπτών υμενίων ελαστίνης/κολλαγόνου αναλογίας 1:1..	199
9.2.3	Ανάπτυξη λεπτών υμενίων ελαστίνης/κολλαγόνου αναλογίας 1:2..	203
9.3	Συζήτηση Αποτελεσμάτων.....	205
9.4	Συμπεράσματα.....	207
ΣΥΝΟΨΗ ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΩΝ – ΠΡΟΟΠΤΙΚΕΣ –		210
ΚΑΙΝΟΤΟΜΙΑ ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗΣ ΔΙΑΤΡΙΒΗΣ		210
1 ^ο ΜΕΡΟΣ: ΑΝΑΠΤΥΞΗ ΝΑΝΟΪΝΙΔΙΩΝ ΕΛΑΣΤΙΝΗΣ ΚΑΙ ΜΕΛΕΤΗ ΤΗΣ ΑΥΤΟΔΙΑΜΟΡΦΩΣΗΣ ΤΗΣ		210
Σκοπός		210
Αποτελέσματα		210
Καινοτομία – Προοπτικές		210
2 ^ο ΜΕΡΟΣ: ΕΠΙΔΡΑΣΗ ΤΗΣ ΥΠΕΡΙΩΔΟΥΣ ΑΚΤΙΝΟΒΟΛΙΑΣ ΣΤΑ ΙΝΙΔΙΑ ΕΛΑΣΤΙΝΗΣ.....		211
Σκοπός		211
Αποτελέσματα		211
Καινοτομία – Προοπτικές		211
3 ^ο ΜΕΡΟΣ: ΕΠΙΔΡΑΣΗ ΧΑΜΗΛΗΣ ΙΣΧΥΟΣ LASER ΣΤΗΝ ΠΕΡΙΟΧΗ ΤΟΥ ΕΡΥΘΡΟΥ ΣΤΑ ΙΝΙΔΙΑ ΕΛΑΣΤΙΝΗΣ		212
Σκοπός		212
Αποτελέσματα		212
Καινοτομία – Προοπτικές		212
4 ^ο ΜΕΡΟΣ: ΣΥΝΔΥΑΣΤΙΚΗ ΑΝΑΠΤΥΞΗ ΛΕΠΤΩΝ ΥΜΕΝΙΩΝ ΕΛΑΣΤΙΝΗΣ/ΚΟΛΛΑΓΟΝΟΥ		213
Σκοπός		213
Αποτελέσματα		213
Καινοτομία – Προοπτικές		213
ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΤΕΧΝΙΚΩΝ ΟΡΩΝ		215
ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ		218

ΠΡΟΛΟΓΟΣ

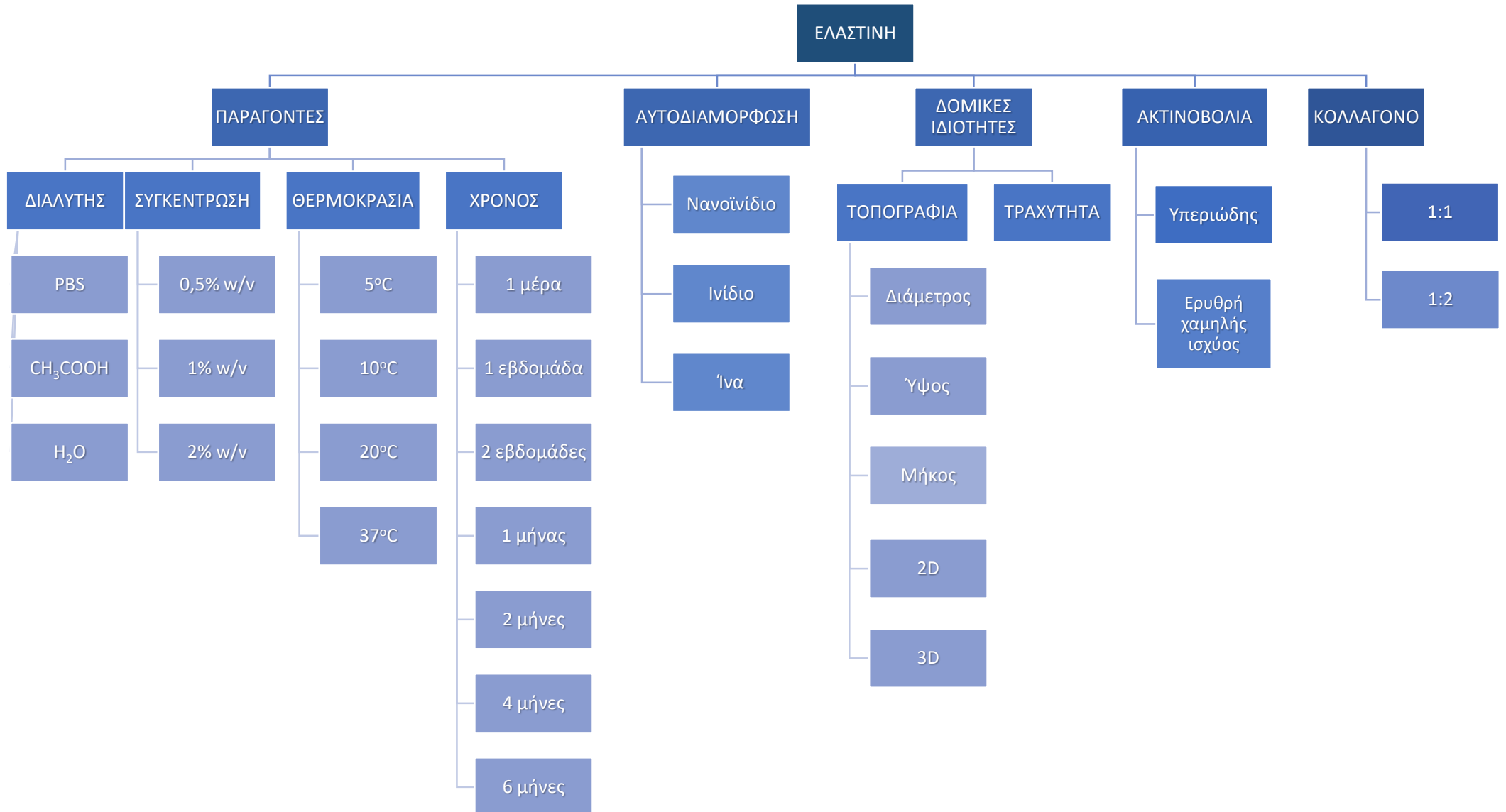
Η παρούσα διδακτορική διατριβή εκπονήθηκε στο Εργαστήριο Βιοϊατρικής Οπτικής και Εφαρμοσμένης Βιοφυσικής της Σχολής Ηλεκτρολόγων Μηχανικών και Μηχανικών Ηλεκτρονικών Υπολογιστών του Εθνικού Μετσόβιου Πολυτεχνείου, υπό την επίβλεψη της ομότιμης καθηγήτριας κα. Διδούς Γιόβα.

Αρχικά, θα ήθελα να ευχαριστήσω την ομότιμη καθηγήτρια και πρώην διευθύντρια του Εργαστηρίου Βιοϊατρικής Οπτικής και Εφαρμοσμένης Βιοφυσικής κα. Διδώ Γιόβα για την ευκαιρία που μου έδωσε αναθέτοντας μου το θέμα της Διδακτορικής Διατριβής, εντάσσοντας με στο δυναμικό του εργαστηρίου.

Θα ήθελα να ευχαριστήσω τον καθηγητή της Σχολής Ηλεκτρολόγων Μηχανικών και Μηχανικών Υπολογιστών του ΕΜΠ κ. Ευάγγελο Χριστοφόρου και τον επίκουρο καθηγητή της Σχολής Μηχανολόγων Μηχανικών του ΕΜΠ κ. Χρήστο Μανόπουλο, οι οποίοι δέχτηκαν να είναι μέλη της τριμελούς συμβουλευτικής επιτροπής. Επίσης, θα ήθελα να ευχαριστήσω ιδιαίτερα τον αναπληρωτή καθηγητή κ. Κώστα Πολιτόπουλο της ΣΗΜΜΥ του ΕΜΠ και τον επίκουρο καθηγητή Αντρέα Στυλιανού του Ευρωπαϊκού Πανεπιστημίου Κύπρου, που δέχθηκαν να είναι μέλη της πενταμελούς επιτροπής μου. Ακόμη, θα ήθελα να ευχαριστήσω την καθηγήτρια της Σχολής Χημικών Μηχανικών του ΕΜΠ κα Αναστασία Δέτση και τον επίκουρο καθηγητή της ΣΗΜΜΥ του ΕΜΠ κ. Εμμανουήλ Χουρδάκη, που δέχθηκαν να είναι μέλη της επταμελούς επιτροπής μου.

Επιπροσθέτως, θα ήθελα να ευχαριστήσω όλα τα μέλη του Εργαστηρίου Βιοϊατρικής Οπτικής και Εφαρμοσμένης Βιοφυσικής. Συγκεκριμένα, τη Δρ.Ελένη Αλεξανδράτου για τη συνεργασία της, τη Δρ.Κατερίνα Τρικουράκη για τη στήριξη της και τους Δρ.Τάσο Γεωργακόπουλο, Δρ.Γιώργο Μπαλογιάννη, Στέλιο Τσαβαλιά και Νίκο Τσουλίδη, για το χρόνο και το χώρο που μοιραστήκαμε. Τέλος, θα ήθελα να πω ένα μεγάλο ευχαριστώ στον Δρ. Κοντομάρη Στέλιο για την πολύτιμη βοήθειά του, τόσο επιστημονικά όσο και συμβουλευτικά.

ΔΙΑΓΡΑΜΜΑ ΡΟΗΣ



ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Αντικείμενα της Διδακτορικής Διατριβής αποτελούν αρχικά η παραγωγή μητρικού εναιωρήματος ελαστίνης και η μελέτη της αυτοδιαμόρφωσης των ινιδίων ελαστίνης στη νανοκλίμακα. Ελέγχθηκαν διαφορετικές παράμετροι που επηρεάζουν τη δημιουργία των ινιδίων, όπως ο διαλύτης που αναμίχθηκε με την ελαστίνη, η συγκέντρωσή της, η θερμοκρασία αποθήκευσης του μητρικού διαλύματος και ο χρόνος ινδιογένεσης. Ο έλεγχος και η απεικόνιση των ινιδίων έγινε με τη χρήση του Μικροσκοπίου Ατομικής Δύναμης (AFM), όπου μελετήθηκαν δομικά, μορφολογικά και τοπολογικά χαρακτηριστικά των νανοϊνιδίων ελαστίνης. Επίσης, αντικείμενο της έρευνας αποτελεί η μελέτη των ινιδίων ελαστίνης υπό την επίδραση υπεριώδους ακτινοβολίας και ακτινοβολίας laser στην περιοχή του ερυθρού. Τέλος, μελετήθηκε η παραγωγή μητρικού διαλύματος ελαστίνης-κολλαγόνου και απεικόνιση των μικτών ινιδίων που δημιουργήθηκαν με τη βοήθεια του AFM.

Επιμέρους αντικείμενα της έρευνας αποτέλεσαν:

- ✚ Η παραγωγή μητρικού εναιωρήματος ελαστίνης.
- ✚ Η ανάπτυξη βιο-επιφανειών με βάση την ελαστίνη.
- ✚ Η μελέτη της αυτοδιαμόρφωσης της ελαστίνης, από νανοϊνίδια, σε ινίδια και τελικά σε ίνες ελαστίνης.
- ✚ Ο έλεγχος διαφορετικών παραμέτρων που επηρεάζουν τη δημιουργία ινιδίων, όπως: ο διαλύτης που αναμίχθηκε με την ελαστίνη για να δημιουργηθεί το μητρικό εναιώρημα ελαστίνης, η συγκέντρωση της ελαστίνης για να δημιουργηθούν ινίδια ελαστίνης, η θερμοκρασία αποθήκευσης του μητρικού εναιωρήματος ελαστίνης και ο χρόνος ινδιογένεσης.
- ✚ Η ανάπτυξη τεχνικών χαρακτηρισμού και απεικόνισης ινιδίων ελαστίνης στη νανοκλίμακα με Απεικονιστική AFM.
- ✚ Η ποσοτικοποίηση των επιφανειακών μεταβολών στη διάμετρο, στο ύψος και στο μήκος των νανοϊνιδίων, οι οποίες συμβαίνουν λόγω αλλαγών στις φυσικές ή χημικές ιδιότητές της ελαστίνης.
- ✚ Ο έλεγχος της τοπογραφίας του δείγματος, ώστε να είναι δυνατή η επαναληψιμότητα της εύρεσης ακριβώς της ίδιας ίνας, για έγκυρη σύγκριση των νανο-χαρακτηριστικών της.
- ✚ Η μελέτη της επίδρασης υπεριώδους ακτινοβολίας (UV) στα μορφολογικά και τοπολογικά χαρακτηριστικά των νανοϊνιδίων ελαστίνης.
- ✚ Η μελέτη της επίδρασης ακτινοβολίας laser χαμηλής ισχύος (LLLT) στην περιοχή του ερυθρού στα μορφολογικά και τοπολογικά χαρακτηριστικά των νανοϊνιδίων ελαστίνης.
- ✚ Η παραγωγή μητρικού διαλύματος ελαστίνης/κολλαγόνου.
- ✚ Η ανάπτυξη βιο-επιφανειών με συνδυασμό ελαστίνης και κολλαγόνου και απεικόνιση των αντίστοιχων ινιδίων τους.

Η εξέλιξη της νανοτεχνολογίας και των βιοϋλικών αποτελεί σήμερα αιχμή της έρευνας σε ένα ευρύ φάσμα των επιστήμων. Η αξιοποίηση βιοϋλικών για να αναπτυχθούν εφαρμογές υψηλής αποδοτικότητας, τα οποία θα αξιοποιηθούν ως βιοαισθητήρες και λειτουργικές βιοεπιφάνειες, αλλά και να μελετηθεί η επίδραση της ηλεκτρομαγνητικής ακτινοβολίας σε βιολογικά δείγματα. Μεγάλο επιστημονικό ενδιαφέρον έχει η διερεύνηση αυτών των αλληλεπιδράσεων στη νανοκλίμακα. Η εκτεταμένη χρήση των βιολογικών μακρομορίων σε βιοϊατρικές εφαρμογές, αλλά και η αφθονία τους στον οργανισμό οδήγησε στην επιλογή της ελαστίνης για να μελετηθεί στην παρούσα διδακτορική διατριβή. Οι μελέτες για το βιολογικό μακρομόριο της ελαστίνης είναι ελάχιστες, καθώς πρόκειται για μια πολυσύνθετη πρωτεΐνη.

Η ελαστίνη είναι μια πρωτεΐνη εξωκυττάριας μήτρας, που παρέχει ελαστικότητα στα όργανα, όπως το δέρμα, τα αιμοφόρα αγγεία, οι πνεύμονες και οι ελαστικοί σύνδεσμοι. Παρουσιάζει την ικανότητα της αυτοδιαμόρφωσης για να σχηματιστούν οι ελαστικές ίνες. Η πρωτεΐνη της ελαστίνης ως συστατικό των ιών ελαστίνης, είναι μία από τις κύριες πρωτεΐνες που βρίσκονται στο συνδετικό ιστό και είναι υπεύθυνη για την ελαστικότητα των ιστών. Παρέχει ανθεκτικότητα στο ανθρώπινο σώμα και διαμορφώνεται ως ένα δίκτυο ιών που μπορεί να παραμορφώνεται επαναλαμβανόμενα και αναστρέψιμα. Είναι, πολύ σημαντικό να διερευνηθεί η ανάπτυξη νανοδομικής επιφάνειας βιοϋλικών με βάση την ελαστίνη, καθώς οι μελέτες αυτής της πολυσύνθετης πρωτεΐνης είναι ελάχιστες σε επίπεδο νανοκλίμακας.

Σκοπός, αρχικά, αυτής της διδακτορικής διατριβής ήταν η εύρεση κατάλληλου μητρικού εναιωρήματος ελαστίνης υπό διαφορετικές παραμέτρους και η μελέτη της αυτοδιαμόρφωσης της δομής της ελαστίνης, από νανοϊνίδια, σε ινίδια και τελικά σε ίνες ελαστίνης. Για ένα βέλτιστο και έγκυρο αποτέλεσμα χρησιμοποιήθηκαν διαφορετικές πειραματικές παράμετροι, όπως το μέσο εναιώρησης, η συγκέντρωση της ελαστίνης, η θερμοκρασία των εναιωρημάτων και το χρονικό διάστημα μετά την προετοιμασία των μητρικών εναιωρημάτων. Ερευνήθηκαν οι δομικές και τοπογραφικές ιδιότητες, όπως η διάμετρος, η υψομετρική διαφορά και το μήκος των νανοϊνιδίων, ινιδίων και ιών της ελαστίνης με απεικονιστική επεξεργασία μέσω AFM.

Το AFM εφαρμόστηκε για να διερευνηθεί πώς διαφορετικές πειραματικές παράμετροι επηρέασαν την ανάπτυξη και τη μορφολογία των ιών. Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι, με την αλλαγή ενός αριθμού πειραματικών παραμέτρων, ήταν δυνατό να επηρεαστεί η διαδικασία αυτοδιαμόρφωσης των ιών ελαστίνης από νανοϊνες και ο σχηματισμός δικτύου νανοδομημένης ελαστίνης που αποτελείται από φυσικές ίνες. Περαιτέρω αποσαφήνιση της συμβολής διαφορετικών παραμέτρων στο σχηματισμό ινιδίων θα επιτρέψει το σχεδιασμό και τον έλεγχο των νανοβιοϋλικών με βάση την ελαστίνη με προκαθορισμένα χαρακτηριστικά.

Στο δεύτερο μέρος της διδακτορικής διατριβής διερευνήθηκε η επίδραση της UV ακτινοβολίας στα ινίδια της ελαστίνης, καθώς και διασαφηνίστηκαν οι εμπλεκόμενοι μηχανισμοί. Η διερεύνηση της αλληλεπίδρασης του φωτός με το βιολογικό ιστό μπορεί να οδηγήσει στην αξιοποίηση της ελάχιστα επεμβατικής ακτινοβολίας του φωτός για διαγνωστικούς και θεραπευτικούς σκοπούς. Επιπλέον, η επίδραση της ακτινοβολίας με βιολογικό ιστό έχει συσχετιστεί με διάφορες παθολογικές καταστάσεις. Συγκεκριμένα, η επίδραση της υπεριώδους ακτινοβολίας στον οργανισμό συνδέεται

με το φαινόμενο της φωτογήρανσης, αλλά και με το καρκίνο του δέρματος. Σε πολλές περιπτώσεις η ακτινοβολία αυτή έχει χρησιμοποιηθεί για αποστείρωση εργαστηριακού εξοπλισμού και χώρου, αλλά και για βελτίωση των μηχανικών ιδιοτήτων βιοϋλικών. Παρόλο που οι αλληλεπιδράσεις της ακτινοβολίας με το βιολογικό ιστό έχουν διερευνηθεί εκτεταμένα, οι μηχανισμοί που τις διέπουν στη νανοκλίμακα δεν έχουν αποσαφηνιστεί πλήρως και ιδιαίτερα η επίδραση σε επιφανειακά νανοχαρακτηριστικά παραμένει αδιευκρίνιστη. Η επίδραση στη νανοτοπογραφία είναι καθοριστικής σημασίας, καθώς η πλειοψηφία των βιολογικών αλληλεπιδράσεων διαδραματίζεται σε διεπιφάνειες.

Στη συνέχεια της διδακτορικής διατριβής μελετήθηκε η επίδραση της ερυθρής ακτινοβολίας χαμηλής ισχύος (LLLT) από τις ίνες έως τα νανοϊνίδια της ελαστίνης με τη χρήση του AFM. Η LLLT εφαρμόζεται για την επούλωση πληγών, την αναδόμηση κατεστραμμένων ιστών και την αντιμετώπιση της φωτογήρανσης. Είναι μία ελεγχόμενη τεχνική που συμβάλει στη φυσική βιοσύνθεση της ελαστίνης και δεν επιφέρει ανεπιθύμητα θερμικά φαινόμενα στους ιστούς που εφαρμόζεται. Γενικά, η αλληλεπίδραση της ερυθρής ακτινοβολίας χαμηλής ισχύος με το βιολογικό ιστό έχει διερευνηθεί στη μακροκλίμακα. Η διαδικασία, όμως και οι μηχανισμοί που συμβαίνουν σε νανοεπίπεδο δεν έχουν επιστημονικά διευκρινιστεί. Η αλληλεπίδραση, λοιπόν, αυτής της ακτινοβολίας σε ινίδια ελαστίνης στη νανοκλίμακα παραμένει άγνωστη σε διεθνές επίπεδο. Είναι, λοιπόν, πολύ σημαντικό να γίνει αποσαφήνιση αυτών των πολύπλοκων διεργασιών.

Στο τελευταίο μέρος της διδακτορικής διατριβής ερευνήθηκε η δημιουργία ενός μητρικού διαλύματος ελαστίνης/κολλαγόνου σε συγκεκριμένη συγκέντρωση. Στη συνέχεια, αναπτύχθηκαν βιοεπιφάνειες από αυτό το μεικτό διάλυμα και απεικονίσθηκαν τα ινίδια της ελαστίνης και του κολλαγόνου σε μορφή πλέγματος στην νανοκλίμακα με τη βοήθεια του AFM. Η διερεύνηση του μεικτού αυτού δείγματος είναι μεγάλης σημασίας, καθώς οι περισσότεροι βιολογικοί ιστοί, όπως το δέρμα, οι πνεύμονες και οι αρτηρίες αποτελούνται από συνδυασμό αυτών των δύο πρωτεϊνών και δεν υπάρχουν αντίστοιχες μελέτες σε διεθνές επίπεδο που να απεικονίζουν νανοϊνίδια ελαστίνης και κολλαγόνου με τέτοια ακρίβεια.

Τέλος, για να πραγματοποιηθούν οι απεικονίσεις και ο νανοχαρακτηρισμός των ινιδίων ελαστίνης, αλλά και να επιτευχθεί η ποσοτικοποίηση των επιφανειακών χαρακτηριστικών, αναπτύχθηκαν τεχνικές υψηλής ανάλυσης απεικονιστικής AFM. Το AFM ως ισχυρό απεικονιστικό εργαλείο χρησιμοποιήθηκε για την ανάλυση συγκεκριμένων χαρακτηριστικών μόλις μερικών νανομέτρων στις επιφάνειες των ινιδίων ελαστίνης. Ταυτόχρονα, χρησιμοποιήθηκαν τεχνικές ανάλυσης και επεξεργασίας εικόνας για την απόκτηση ποιοτικών, αλλά και ποσοτικών δεδομένων από τις απεικονίσεις που λήφθηκαν μέσω AFM.

Τα αποτελέσματα που προέκυψαν από τα πειράματα παρουσιάζονται παρακάτω. Στην πρώτη σειρά πειραμάτων (6^ο κεφάλαιο), τα ευρήματα έδειξαν ότι οι βέλτιστες συνθήκες για την παρατήρηση της διαδικασίας αυτοδιαμόρφωσης και του σχηματισμού ινιδίων ελαστίνης στη νανοκλίμακα ήταν συγκέντρωση ελαστίνης 1% w/v σε δις απεσταγμένο νερό σε θερμοκρασία 20 °C, με ελάχιστη περίοδο επώασης

δύο εβδομάδων μετά από τη δημιουργία του μητρικού εναιωρήματος. Συγκεκριμένα η μελέτη της αυτοδιαμόρφωσης οδήγησε τόσο σε ποιοτικά όσο και σε ποσοτικά αποτελέσματα, όπου υπολογίστηκαν οι μέσες τιμές των διαμέτρων των ινών ($549,64 \pm 25,4$)nm, των ινιδίων ($321,3 \pm 21,0$)nm και των νανοϊνιδίων (121 ± 21)nm και των αντίστοιχων υψών τους ($88,8 \pm 5,7$)nm, ($27,7 \pm 3,3$)nm και ($4,5 \pm 0,7$)nm).

Στα επόμενα πειράματα (7^ο κεφάλαιο) εξετάστηκαν οι τοπογραφικές ιδιότητες των ινών/ινιδίων/νανοϊνιδίων ελαστίνης σε νανοκλίμακα, πριν και μετά την επίδραση της UV ακτινοβολίας με τη βοήθεια απεικονιστικών μεθόδων AFM. Τα αποτελέσματα υποδεικνύουν ότι η έκθεση στη UV ακτινοβολία προκαλεί σημαντική μείωση των τιμών του ύψους και τους μήκους των νανοϊνιδίων. Επίσης οδηγεί στη αύξηση της διαμέτρου τους, καθώς και στη μεγάλη αλλοίωση στην τραχύτητα της επιφάνειας των ινών, αλλά και ολόκληρου του δείγματος σε μεγάλους χρόνους ακτινοβολήσης. Συγκεκριμένα, σε μικρούς χρόνους UV ακτινοβολήσης των 10 με 15 min υπήρξε σημαντική μείωση του ύψους των νανοϊνιδίων κατά 20%, αλλά και ελάττωση της διαμέτρου των ινών κατά 11%. Συνεχής μείωση έχει το μήκος των ινών, ινιδίων και νανοϊνιδίων, τόσο σε μικρούς όσο και σε μεσαίους χρόνους (50min και 60min) κατά 11%, 19% και 13% αντίστοιχα. Σε μεγάλους χρόνους έκθεσης σε UV ακτινοβολία είτε είναι διακοπτόμενη (3φορές x 1h), είτε συνεχόμενη (4h), η συνολική αύξηση της διαμέτρου είναι 29% και 54%, ενώ η ολική μείωση του ύψους είναι 24% και 27% αντίστοιχα. Η αλλοίωση στην τραχύτητα της επιφάνειας των νανοϊνιδίων ελαστίνης αυξάνεται, καθώς μεγαλώνουν και οι χρόνοι έκθεσης στη UV ακτινοβολήσης.

Σε συνέχεια των πειραμάτων (8^ο κεφάλαιο) αρχικά ερευνήθηκαν οι δομικές ιδιότητες των ινών/ινιδίων/νανοϊνιδίων ελαστίνης για χρόνους (3,75min, 7,5min, 11,25min και 15min) ερυθρής ακτινοβολίας χαμηλής ισχύος. Διαπιστώνεται, η διαπλάτνση της διαμέτρου, καθώς μεγαλώνουν οι διαστάσεις από ένα σε ινίδιο και τελικά σε νανοϊνίδιο, αλλά και σε συνάρτηση με το πέρασμα του χρόνου ακτινοβολήσης. Η αύξηση του ύψους στις περιπτώσεις των ινών και ινιδίων είναι περίπου ίση με 27%. Αντίθετα, στο νανοϊνίδιο παρατηρείται μια τεράστια ελάττωση του ύψους του κατά 40% περίπου. Όσο αυξάνεται ο χρόνος έκθεσης, επιμηκύνονται τα ινίδια κατά 9%, ενώ οι ίνες κατά 14% περίπου. Η αντίστοιχη πτώση του ποσοστού στο μήκος του νανοϊνιδίου είναι 14,5%. Στο δεύτερο μέρος του ίδιου κεφαλαίου διαπιστώνεται ότι αναλόγως με τον χρόνο έκθεσης του ινιδίου στην ερυθρή ακτινοβολία άλλαζε ο τρόπος αύξησης της διαμέτρου του. Στους μικρούς χρόνους ακτινοβολήσης (0-15min) φαίνεται μια απότομη και μεγάλη αλλαγή στη διαπλάτνση του ινιδίου ελαστίνης που φτάνει το 20,81%. Αύξηση που αγγίζει τελικά το 15,34% παρατηρείται και στη διάμετρο του ινιδίου κατά την έκθεση του στην ακτινοβολία με χρόνους μεσαίας διάρκειας (0-45min). Στους μεγάλους χρόνους ακτινοβολήσης (0-3h) έχει πιο ομαλή αύξηση που φτάνει τελικά το ποσοστό των 20,18%. Επιπροσθέτως, το ύψος του ινιδίου έχει παραπλήσια μεταβολή με τη διάμετρο του στις περιπτώσεις με μικρούς και μεσαίους χρόνους ακτινοβολήσης. Από 0-15 min έχει μια πολύ μεγάλη και απότομη αύξηση κατά 27,48%. Από 0-45min έχει μια άνοδο της τάξης του 13%. Αντίθετα, από τα πειράματα με τη μεγάλη χρονική διάρκεια ακτινοβολήσης 3 ωρών, παρατηρείται μεγάλη μείωση του ύψους του, που αγγίζει το ποσοστό των 24,11%.

Συμπερασματικά, η αλλοίωση των δομικών και μορφολογικών ιδιοτήτων των νανοϊνιδίων μεγαλώνει, καθώς αυξάνεται ο χρόνος έκθεσης τους στο ερυθρό φως.

Τα τελικά πειράματα (9^ο κεφάλαιο) εστιάστηκαν αρχικά στην παραγωγή μητρικού διαλύματος ελαστίνης-κολλαγόνου και έπειτα στην ανάπτυξη λεπτών υμενίων από το συνδυασμό των δύο πρωτεϊνών. Στη νανοσκοπική απεικόνιση των ινιδίων ελαστίνης και κολλαγόνου με χρήση AFM, παρατηρήθηκαν πλέγματα ινιδίων και των δύο πρωτεϊνών με αναλογίες 1:1 και 1:2. Ο πρώτος συνδυασμός αναλογίας ελαστίνης/κολλαγόνου 1:1, είναι καινοτόμος διεθνώς, καθώς δεν είχαν απεικονιστεί σε επίπεδο νανοκλίμακας ταυτόχρονα ινίδια ελαστίνης και κολλαγόνου με τη βοήθεια του AFM. Στη δεύτερη αναλογία των προς μελέτη πρωτεϊνών παρατηρήθηκαν πλέγματα, αλλά κυρίως ινιδίων κολλαγόνου, καθώς η παρουσία της ελαστίνης δεν ήταν εμφανής. Ως εκ τούτου, η συγκεκριμένη αναλογία (1:2), χρήζει περαιτέρω επιστημονικής διερεύνησης, κυρίως στο πρωτόκολλο δημιουργίας του μητρικού διαλύματος ελαστίνης/κολλαγόνου.

Τα συμπεράσματα που προέκυψαν από τα παραπάνω αποτελέσματα παρουσιάζονται εν συντομία παρακάτω. Η κατανόηση της αυτοδιαμόρφωσης της ελαστίνης προσφέρει βιώσιμες λύσεις για κατασκευή νανοδομών από πρωτεΐνες, με συγκεκριμένες φυσικές και χημικές ιδιότητες, για εφαρμογές στη βιοτεχνολογία και στη μηχανική ιστών.

Η σημαντική μείωση του ύψους και του μήκους των ινών είναι πιθανό αποτέλεσμα της «θραύσης» των σταυροδεσμών στις αλληλουχίες των αμινοξέων εντός των ινών ελαστίνης, λόγω της UV ακτινοβολίας. Η αλλοίωση των ινών ελαστίνης, εξαιτίας της αύξησης της διαμέτρου τους από την έκθεση τους στο UV, μπορεί να συσχετιστεί με την αποδόμηση των πολυπεπτιδικών αλυσίδων μεταξύ των διασταυρώσεων, που επηρεάζει την απόσταση τους και οδηγεί στη μη ελαστικότητα των ινών. Η αποσαφήνιση, λοιπόν, των μηχανισμών αλληλεπίδρασης της ελαστίνης με την υπεριώδη ακτινοβολία παρουσιάζει ιδιαίτερο ενδιαφέρον, καθώς αποτελεί σημαντικό βήμα στην κατανόηση του φαινομένου της φωτογήρανσης του δέρματος.

Επίσης, είναι σαφής η μεγάλη επίδραση της ευθρής ακτινοβολίας στην ελαστίνη. Γεγονός που μπορεί να τεκμηριωθεί από τα φωτόνια που απορροφώνται από μιτοχονδριακά χρωμοφόρα στα κύτταρα του δέρματος. Εξαιτίας της ροής του αίματος που αυξάνεται, ενεργοποιούνται τα βλαστοκύτταρα από τα οποία επηρεάζεται και η ελαστίνη. Με συνέπεια την ελαστογένεσή της, για αυξημένη επισκευή και επούλωση των τραυματισμένων ιστών. Τα αποτελέσματα αυτά παρέχουν καινοτόμα στοιχεία για το μηχανισμό αλληλεπίδρασης της ελαστίνης με την ερυθρή ακτινοβολία στη νανοκλίμακα.

Τέλος, η συνδυαστική μελέτη ελαστίνης και κολλαγόνου χρησιμεύει ως μια βαθύτερη κατανόηση του τρόπου με τον οποίο διαφορετικές ποσότητες ελαστίνης επηρεάζουν τα λεπτά υμένα κολλαγόνου. Επιπλέον, η χρήση του AFM ως σημαντικό εργαλείο ποιοτικού ελέγχου είναι ικανή να καταγράψει με εξαιρετική λεπτομέρεια στη νανοκλίμακα τις δομικές ιδιότητες των ινιδίων των δύο πρωτεϊνών. Οι οποίες με τη σειρά τους θα επηρεάσουν τη συμπεριφορά και την ανάπτυξη των κυττάρων που θα αναπτυχθούν πάνω στα λεπτά υμένα. Είναι σημαντικός ο σωστός συνδυασμός

ελαστίνης και κολλαγόνου για δημιουργία κατάλληλων ικριωμάτων, για επούλωση πληγών, αντιμετώπιση της γήρανσης των ιστών και άλλων καρδιοαγγειακών παθήσεων. Αυτές οι γνώσεις θα αποδειχθούν χρήσιμες κατά την ανάπτυξη βιο-επιφανειών ελαστίνης/κολλαγόνου για εφαρμογές μηχανικής ιστών στην αναγεννητική ιατρική στο μέλλον.

ABSTRACT

The main aims of this PhD thesis were initially the production of elastin stock suspension and the study of the elastin self-assembly at the nanoscale. Different parameters affecting the formation of the fibers are controlled, such as the solvent mixed with the elastin, its concentration, the temperature of stock suspension, and the time of fibril formation. The control and imaging of the fibrils were carried out using Atomic Force Microscope (AFM), where structural, morphological and topological characteristics of the elastin nanofibrils were investigated. Moreover, aims of this research were the study of elastin fibers under the influence of ultraviolet irradiation and red low level laser irradiation. Finally, the production of elastin-collagen mother solution was studied and imaging of the mixed fibers created with AFM.

The research objectives of the current PhD thesis were:

- ✚ the production of elastin stock suspension.
- ✚ the development of elastin based bio-surfaces.
- ✚ the study of elastin self-assembly from nanofibrils, to fibrils and finally to elastin fibers.
- ✚ the control of different parameters that affect fibril formation, such as:
solvent mixed with elastin to create the elastin stock suspension, concentration of elastin to create fibrils, temperature of the stock suspension and time fibrillogenesis.
- ✚ the development of techniques for characterization and imaging of elastin fibrils at the nanoscale with Atomic Force Imaging Microscopy.
- ✚ the quantification of surface changes in diameter, height and length of nanofibrils, which occur due to changes in the physical or chemical properties of elastin.
- ✚ the control of sample topography, so that it is possible to repeatably find the exact same fiber, for a valid comparison of its nano-characteristics.
- ✚ the investigation of the effect of UV irradiation on the morphological and topological characteristics of elastin nanofibrils.
- ✚ the investigation of the effect of red low-power laser irradiation on the morphological and topological characteristics of elastin nanofibrils.
- ✚ the production of elastin/collagen stock solution.
- ✚ the development of bio-surfaces with a combination of elastin and collagen and imaging of their corresponding nanofibrils.

The development of nanotechnology and biomaterials is currently at the cutting edge of research in a wide range of sciences. The utilization of biomaterials to develop high efficiency applications, which will be utilized as biosensors and functional bio-surfaces, but also to study the effect of electromagnetic irradiation on biological samples. The investigation of these interactions at the nanoscale is of great scientific interest. The extensive use of biological macromolecules in biomedical applications, as well as their abundance in the body, led to the choice of elastin to be studied in this PhD thesis. Studies on the biological macromolecule of elastin are few, as it is a complex protein.

Elastin is an extracellular matrix protein, providing elasticity to the organs, such as skin, blood vessels, lungs and elastic ligaments, presenting self-assembling ability to form elastic fibers. The elastin protein, as a component of elastin fibers, is one of the major proteins found in connective tissue and is responsible for the elasticity of tissues. It provides resilience to the human body, assembled as a continuous mesh of fibers that require to be deformed repetitively and reversibly. Thus, it is of great importance to investigate the development of the nanostructural surface of elastin-based biomaterials, as few studies of this complex protein were in the nanoscale level.

Initially, the purpose of this research was to investigate the appropriate elastin stock suspension under different parameters and the self-assembly of the elastin structure, from nanofibrils, to fibrils and finally to elastin fibers. To obtain an optimal and valid result, different experimental parameters were used, such as suspension medium, elastin concentration, temperature of stock suspension and time interval after the preparation of the stock suspension. Structural and topographical properties such as diameter, height difference and length of elastin nanofibrils, fibrils and fibers were investigated by AFM imaging.

Atomic force microscopy was applied in order to investigate how different experimental parameters affected fiber development and morphology. The results demonstrated that through altering a number of experimental parameters, it was possible to affect the self-assembly procedure of elastin fibers from nanofibers and the formation of elastin nanostructured mesh consisting of naturally occurring fibers. Further clarification of the contribution of different parameters on fibril formation will enable the design and control of elastin-based nanobiomaterials with predetermined characteristics.

In the second part of this PhD thesis, the effect of UV irradiation on elastin fibrils was investigated, as well as the mechanisms involved were clarified. Investigating the interaction of light with biological tissue can lead to the utilization of minimally invasive light irradiation for diagnostic and therapeutic purposes. In addition, the effect of irradiation on biological tissue has been associated with various pathological conditions. Specifically, the effect of ultraviolet irradiation on the body is linked to the phenomenon of photoaging, but also to skin cancer. In many cases this irradiation has been used to sterilize laboratory equipment and space, but also to improve the mechanical properties of biomaterials. Although the interactions of irradiation with biological tissue have been extensively investigated, the mechanisms governing them at nanoscale have not been fully elucidated and especially the effect on surface nano-features remains unclear. The effect on nanotopography is crucial, as the majority of biological interactions take place at interfaces.

Subsequently on this research, the effect of low-power red irradiation on elastin fibers was studied using Atomic Force Microscopy. The effect of this irradiation with biological tissues was investigated by the method of low level laser therapy (LLLT). LLLT is applied to heal wounds, rebuild damaged tissues and treat photoaging. It is a controlled technique that contributes to the natural biosynthesis of elastin and does not cause unwanted thermal effects on the applied tissues. In general, the interaction of red low-power irradiation with biological tissue has been investigated at the macroscale.

However, the process and the mechanisms that occur at the nano-level have not been scientifically clarified. The interaction of this irradiation on elastin fibers in the nanoscale remains unknown on international level. Therefore, it is very important to clarify these complex processes.

In the last part of this PhD thesis, the creation of a stock solution of elastin/collagen at a specific concentration was investigated. Bio-surfaces were developed from this mixed solution, so elastin and collagen fibrils were imaged as a nanoscale mesh using AFM. Investigating this composite sample is of great importance, as most biological tissues such as skin, lungs and arteries are composed of a combination of these two proteins and there are no corresponding studies on international level that image elastin and collagen nanofibrils with such precision.

Finally, in order to perform the imaging and nano-characterization of elastin fibrils, as well as to achieve the quantification of the surface features, high-resolution imaging Atomic Force Microscopy techniques were developed. AFM has emerged as a powerful tool for imaging and characterizing specific features on nanoscale surfaces of elastin fibrils. Simultaneously, image analysis and processing techniques were used to obtain qualitative and quantitative data from the images taken through AFM.

The results obtained from the experiments are presented below. In the first experiments, the findings showed that optimal conditions for observing self-assembly process and formation of elastin fibrils in nanoscale were elastin concentration of 1% w/v in ultrapure water at a temperature of 20 °C, with a minimum incubation period of two weeks after creating the stock suspension. Specifically, the study of self-assembly led to both qualitative and quantitative results, where the average values of the diameters of fibers (549.64 ± 25.4) nm, fibrils (321.3 ± 21.0) nm and nanofibrils were calculated (121.0 ± 21.0) nm and their respective heights (88.8 ± 5.7) nm, (27.7 ± 3.3) nm and (4.5 ± 0.7) nm.

In the following experiments, the topographical properties of elastin fibers/fibrils/nanofibrils in nanoscale were examined, before and after the effect of UV irradiation with AFM imaging methods. The results indicate that exposure to UV irradiation causes a significant decrease in the height and length values of the nanofibrils. It leads to an increase of their diameter, a large change in roughness not only of the surface of the fibers, but also of the entire sample in long irradiation times. Specifically, in short UV irradiation times of 10 to 15 min there was a significant reduction at the height of the nanofibrils by 20% and a reduction in the diameter of the fibers by 11%. There is a continuous decrease in the length of fibers, fibrils and nanofibrils, both in short and medium times (50min and 60min) by 11%, 19% and 13% respectively. In long exposure times to UV irradiation, either intermittent (3 times x 1h), or continuous (4h), the total increase in diameter is 29% and 54%, while the total decrease in height is 24% and 27% respectively. The alteration in the surface roughness of the elastin nanofibrils increases as the UV exposure times increase.

Following the experiments, the structural properties of the elastin fibers/fibrils/nanofibrils were first investigated for times (3.75min, 7.5min, 11.25min and 15min) of low power red radiation. The widening of the diameter is observed, as

dimensions increase from fiber to fibril and finally to nanofibril, but also as a function of the irradiation time. The height increase in the case of fibers and fibrils is approximately equal to 27%. In contrast, the nanofibril shows a huge reduction in its height by about 40%. As the exposure time increases, the fibrils lengthen by 9%, while the fibers by approximately 14%. The corresponding percentage drop in nanofibril length is 14.5%. Then it is found that depending on the time of exposure of the fibril to the red radiation, the way of increasing its diameter changed. At short irradiation times (0-15min) a sharp and large change in the expansion of the elastin fibril can be seen, reaching 20.81%. An increase that finally reaches 15.34% is also observed in the diameter of the fibril during its exposure to radiation with medium duration times (0-45min). In the long irradiation times (0-3h) it has a smoother increase which finally reaches the rate of 20.18%. In addition, the fibril height has a similar variation with its diameter in the cases with short and medium irradiation times. From 0-15 min it has a very large and steep increase of 27.48%. From 0-45min it has an increase of 13%. On the contrary, from the experiments with the long duration of irradiation of 3 hours, a great reduction of its height is observed, which reaches the rate of 24.11%. In conclusion, the alteration of the structural and morphological properties of the nanofibrils increases, as the time of their exposure to red light increases. The final experiments focused first on the production of elastin-collagen stock solution and then on the growth of thin films from the combination of the two proteins. In nanoscopic imaging of elastin and collagen fibrils using AFM, fibril lattices of both proteins with ratios of 1:1 and 1:2 were observed. The first 1:1 elastin/collagen ratio combination is internationally innovative, as no elastin and collagen fibrils have been imaged simultaneously at the nanoscale level using AFM. In the second ratio of the proteins to be studied, meshes were observed, but mainly of collagen fibrils, as the presence of elastin was not evident. Therefore, the specific ratio (1:2) needs further scientific investigation, mainly in the protocol for creating the elastin/collagen mother solution.

Finally, the conclusions occurred from the above results are briefly presented below. Understanding the self-assembly of elastin offers viable solutions for the construction of protein nanostructures, with specific physical and chemical properties, for applications in biotechnology and tissue engineering. The significant reduction in fiber height and length is likely a result of the "breaking" of the cross-links in the amino acid sequences within the elastin fibers due to UV irradiation. The alteration of elastin fibers, due to the increase of their diameter from UV exposure, can be related to the degradation of the polypeptide chains between the cross-links, which affects their spacing and leads to non-elasticity of the fibers. Therefore, the clarification of elastin interaction mechanisms with ultraviolet irradiation is of particular interest, as it is an important step in understanding the phenomenon of photoaging of the skin.

Also, the great effect of direct radiation on elastin is clear. A fact that can be documented by photons absorbed by mitochondrial chromophores in skin cells. Due to the increased blood flow, the stem cells are activated which also affects the elastin. Consequently, its elastogenesis, for increased repair and healing of injured tissues. These results provide novel evidence for the mechanism of interaction of elastin with

red radiation at the nanoscale. Finally, the combined study of elastin and collagen serves as a deeper understanding of how different amounts of elastin affect collagen thin films. In addition, the use of AFM as an important quality control tool is capable of recording in excellent nanoscale detail the structural properties of the fibrils of the two proteins. Which in turn will affect the behavior and growth of the cells that will grow on the thin membranes. The correct combination of elastin and collagen is important for creating appropriate scaffolds, for wound healing, tissue aging and other cardiovascular diseases. These insights will prove useful when developing elastin/collagen bio-surfaces for tissue engineering applications in regenerative medicine in the future.

ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Η μηχανική ιστών είναι ένας συνεχόμενος αναπτυσσόμενος κλάδος στον τομέα των βιοϋλικών. Η εξωκυττάρια μήτρα που είναι συστατικό των ιστών, είναι μια σύνθετη δομή που περιβάλλει και υποστηρίζει τους ιστούς. Αποτελείται από βιολογικά μακρομόρια, όπως η ελαστίνη. Η εξωκυττάρια μήτρα αποτελεί πηγή έμπνευσης για το σχεδιασμό και την παραγωγή βιοϋλικών ως ικρίωματα στη μηχανική ιστών [1-4]. Η ελαστίνη είναι μια πρωτεΐνη υπεύθυνη για τις ελαστικές ιδιότητες των οργάνων και των ιστών. Κατά συνέπεια, η παραγωγή βιοϋλικών έχει μεγάλη σημασία στους τομείς της νανοτεχνολογίας και της βιοτεχνολογίας [5-8].

Η έρευνα των πολυπεπτιδίων ελαστίνης ELPs (Elastin-Like Peptides) είναι μεγάλης σημασίας καθώς ανήκουν στα πρωτεϊνικά πολυμερή που λαμβάνονται μέσω της γενετικής μηχανικής. Έχουν αναλυθεί επιλεγμένες εφαρμογές των ELPs στην ιατρική, τη θεραπευτική παράδοση πεπτιδίων, τη χορήγηση φαρμάκων και τη μηχανική ιστών [9-12]. Η δημιουργία ικρίωμάτων από ELPs σημαίνει ότι η μηχανική ιστών επιτυγχάνεται με διάφορες μεθόδους, όπως η δημιουργία συμπυκνωμάτων (coacervates) και σταυροδεσμών (cross-linking) [13-19].

Η ανάπτυξη προηγμένων βιοϋλικών εμπνέεται συχνά από τη βιολογική διαδικασία της αυτοδιαμόρφωσης, όπου απλά δομικά στοιχεία μπορούν να σχηματίσουν πολύπλοκα φυσικά συστήματα. Η ελαστίνη παράγει καλά καθορισμένα ινίδια και ίνες με συγκεκριμένες μηχανικές και υπερμοριακές ιδιότητες [20, 21]. Μεταξύ των πρωτεϊνών που μπορούν να αυτοδιαμορφωθούν, η ελαστίνη έχει χαρακτηριστικά με επαναλαμβανόμενες αλληλουχίες μικρού μεγέθους και πολυπλοκότητας υπεύθυνες για την αυτοδιαμόρφωση, καθώς και για τις ελαστικές ιδιότητες [22, 23].

Η διαδικασία της αυτοδιαμόρφωσης είναι γνωστή ως τη μέθοδο «από κάτω προς τα πάνω» και αποδίδεται σε ίνες με μικρές διαστάσεις και προσφέρει νέες ιδιότητες και λειτουργίες, οι οποίες δεν μπορούν να επιτευχθούν με μια συμβατική οργανική σύνθεση. Η αυτοδιαμόρφωση των ινών αναφέρεται στη συσσώρευση των ινών στην νανοκλίμακα από μικρότερα μόρια. Το κύριο μειονέκτημα της μεθόδου αυτής είναι ότι είναι μια εξαιρετικά πολύπλοκη και χρονοβόρα τεχνική. Έχει μελετηθεί ο μηχανισμός συσσωμάτωσης ELP, όπου το ινίδιο αρχικά είχε πλάτος στην κλίμακα των νανομέτρων και μετά τη συσσωμάτωση έφτασε στην κλίμακα των μικρομέτρων [24]. Η διαδικασία συμπύκνωσης γίνεται με τα πεπτιδία που προέρχονται από ελαστίνη, όπου η αυθόρμητη αυτοδιαμόρφωση των μονομερών προκαλείται από τη μεταβολή της θερμοκρασίας, ανάλογα με τη συγκέντρωση πρωτεΐνης [25-27]. Έχει ερευνηθεί με ηλεκτρονικό μικροσκόπιο διέλευσης (Transmission Electron Microscope-TEM) η αυτοδιαμόρφωση ενός πεπτιδίου σε ίνες τύπου ελαστίνης μέσα σε υδατικό διάλυμα σε θερμοκρασία δωματίου [28]. Η ανάλυση ινών με TEM αποκάλυψε δίκτυα γραμμικών ινών στην περιοχή νανομέτρων που αντικατοπτρίζουν την κοινή νηματώδη φύση των ελαστομερικών πρωτεϊνών [29].

Η πολυπλοκότητα των ελαστικών ινών, σε συνδυασμό με τις μοναδικές φυσικές ιδιότητες των πρωτεϊνικών συστατικών της, έχει καταστήσει την κατανόησή της διαδικασίας διαμόρφωσης ελαστικής ένα από τα πιο δύσκολα προβλήματα. Αν και η δομή της ελαστικής δεν έχει διερευνηθεί πλήρως, ο τρόπος που η δομή σχετίζεται με τις ιδιότητές της είναι ένας τομέας εντατικής έρευνας. Στα πλαίσια, λοιπόν, αυτής της διδακτορικής διατριβής, διερευνήθηκε η δημιουργία νανοϊνιδίων ελαστικής και η αυτοδιαμόρφωσή τους σε ίνες υπό διαφορετικές συνθήκες, όπως το μέσο εναιώρησης, η συγκέντρωση ελαστικής, η θερμοκρασία αποθήκευσης του εναιωρημάτος και το χρονικό διάστημα από τη δημιουργία του. Συνθήκες οι οποίες δεν είχαν αποσαφηνιστεί ποιοτικά, αλλά και ποσοτικά στην ερευνητική κοινότητα.

Το AFM είναι μια ισχυρή τεχνική απεικόνισης που επιτρέπει τον χαρακτηρισμό και την ανάλυση υλικών σε νανοκλίμακα [30-32]. Σε αντίθεση με τα παραδοσιακά οπτικά μικροσκόπια που χρησιμοποιούν φως για την παρατήρηση δειγμάτων, το AFM λειτουργεί με σάρωση μιας αιχμηρής ακίδας πάνω στην επιφάνεια ενός υλικού, για τη μέτρηση των αλληλεπιδράσεων τους [31-33]. Η λήψη εικόνων υψηλής ανάλυσης και οι ακριβείς μετρήσεις διαφόρων ιδιοτήτων, όπως η τοπογραφία [34, 35], η τραχύτητα [35], αλλά και μηχανικών ιδιοτήτων [36-39], πραγματοποιείται με AFM σε υπομοριακή ανάλυση. Το AFM έχει αποδειχθεί ότι είναι ένα ευέλικτο εργαλείο για τη μελέτη ενός ευρέος φάσματος υλικών, από βιολογικά μόρια [40-43] και κύτταρα [44, 45] έως προηγμένα υλικά και επιφάνειες [46, 47]. Το AFM έχει διαδραματίσει σημαντικό ρόλο στην προώθηση της έρευνας σε τομείς όπως η νανοτεχνολογία, η επιστήμη υλικών και η βιοφυσική.

Σε αυτήν τη διδακτορική διατριβή, διερευνήθηκε η επίδραση των διαφορετικών πειραματικών παραμέτρων στη δομή της ελαστικής, αλλά και η αυτοδιαμόρφωσή της από νανοϊνίδια, σε ινίδια και τελικά σε ίνες ελαστικής με τη βοήθεια του AFM. Πειραματικές διαδικασίες καινοτόμες σε διεθνές επίπεδο, καθώς δεν είχε απεικονιστεί στο παρελθόν η ελαστική σε διαστάσεις νανοκλίμακας, ούτε η αυτοδιαμόρφωσή της, ούτε και τα μεμονωμένα νανοϊνίδια της με ποιοτική και ποσοτική ανάλυση.

Όσον αφορά την επίδραση της ακτινοβολίας επιλέχθηκαν συγκεκριμένες περιοχές του φάσματος της ηλεκτρομαγνητικής ακτινοβολίας, γιατί παρουσιάζουν ιδιαίτερο ενδιαφέρον σε μια πληθώρα από βιοϊατρικές εφαρμογές. Συγκεκριμένα, αντικείμενο της έρευνας αποτέλεσε η ακτινοβόληση στην υπεριώδη περιοχή (UV-C, 254 nm) και στην ερυθρή περιοχή (με laser χαμηλής ισχύος, 651 nm). Η υπεριώδης ακτινοβολία παρουσιάζει ιδιαίτερο ενδιαφέρον, καθώς χρησιμοποιείται για αποστείρωση και επεξεργασία βιοϋλικών, ενώ παράλληλα αποτελεί έναν από τους κύριους παράγοντες φωτογήρανσης του δέρματος και πρόκλησης δερματικού καρκίνου [48-50]. Η χαμηλής ισχύος ακτινοβολία στην περιοχή του ερυθρού εφαρμόζεται για την ονομαζόμενη Low-Level Laser Therapy (LLLT), η οποία έχει ένα ευρύ φάσμα από εφαρμογές, μεταξύ των οποίων η επούλωση πληγών [51-53].

Στα πλαίσια αυτής της διδακτορικής διατριβής μελετήθηκαν, η επίδραση του υπεριώδους φωτός ανάλογα με το μέγεθος των ινών ελαστικής, δηλαδή αν έχει διαστάσεις ίνας, ινιδίου ή νανοϊνιδίου και ερευνήθηκε πώς επιδράνε οι διαφορετικοί χρόνοι έκθεσης της UV ακτινοβολίας στα νανοϊνίδια ελαστικής. Διερευνήθηκαν, λοιπόν, οι μηχανισμοί φωτογήρανσης των ινιδίων ελαστικής από τμήμα της ηλιακής

ακτινοβολίας στη νανοκλίμακα μέσω της AFM τοπογραφίας. Πειράματα καινοτόμα σε διεθνές επίπεδο, καθώς οι μόνες μελέτες που υπάρχουν σήμερα μεταξύ ελαστίνης και UV ήταν στη μακροκλίμακα.

Όσο αφορά τις επιδράσεις της ακτινοβολίας στην περιοχή του ερυθρού με την ελαστίνη ήταν επιτακτική η ανάγκη διερεύνησης τους, καθώς δεν υπάρχουν στην παγκόσμια βιβλιογραφία καθόλου αναφορές που να μελετάνε τη σχέση ελαστίνης-ερυθρής ακτινοβολίας σε νανοεπίπεδο με τη χρήση AFM. Επομένως, τα αποτελέσματα της συγκεκριμένης διδακτορικής διατριβής βοηθούν στην αποσαφήνιση των θετικών επιδράσεων της ερυθρής ακτινοβολίας στους ιστούς. Έρευνα καινοτόμα διεθνώς, καθώς θα ανοίξει νέα μονοπάτια στις έρευνες για την επούλωση πληγών.

Στο τελευταίο μέρος της διδακτορικής διατριβής ήταν αναγκαία η μελέτη της συνδυαστικής απεικόνισης ελαστίνης-κολλαγόνου στην νανοκλίμακα. Εκτός ότι δεν υπάρχουν παγκόσμια μελέτες με ταυτόχρονη AFM ναοσκοπική απεικόνιση αυτών των δύο πολύ σημαντικών πρωτεϊνών. Είναι πολύ σημαντική η επίτευξη αυτής της έρευνας και για περαιτέρω διερεύνηση, καθώς τα περισσότερα μέρη του ανθρώπινου σώματος, όπως το δέρμα, οι πνεύμονες, οι τένοντες, οι χόνδροι και οι αρτηρίες εμπεριέχουν ταυτόχρονα ελαστίνη και κολλαγόνο [54-57].

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1. ΕΛΑΣΤΙΝΗ

1.1 Εισαγωγή

Η ελαστίνη και το κολλαγόνο είναι κύριες πρωτεΐνες του εξωκυττάριου χώρου που προσδίδουν ελαστικότητα και ανθεκτικότητα στους ιστούς και τον οργανισμό. Παράγονται από τους ινοβλάστες και εκκρίνονται στην εξωκυττάρια μήτρα, όπου αυτοδιαμορφώνονται δημιουργώντας ένα δίκτυο ινών. Ωστόσο υπάρχει πλήρης αντίθεση στις δομές τους, οι οποίες θα αναλυθούν παρακάτω. Για να γίνει, λοιπόν, κατανοητή η σπουδαιότητα αυτών των πρωτεϊνών στον ανθρώπινο οργανισμό, θα γίνει λεπτομερής ανάλυση (σε αυτό το κεφάλαιο για την ελαστίνη και στο επόμενο για το κολλαγόνο) τόσο για τη βιοσύνθεσή τους, όσο για το σχηματισμό τους σε ίνες με τη διαδικασία της αυτοδιαμόρφωσης. Πρωτίστως, όμως θα γίνει αναφορά σε βασικές βιολογικές έννοιες για την καλύτερη κατανόησή τους.

1.1.1 Πολυμερή –Βιοϋλικά

Πολυμερή χαρακτηρίζονται τα υλικά που αποτελούνται από πολύ μεγάλα μόρια, αλυσίδες ατόμων άνθρακα, στα οποία συνδέονται διάφορα άτομα ή ρίζες. Γίνεται αντιληπτό ότι τα μακρομόρια αυτά αποτελούνται από ομάδες μονομερών, δηλαδή μικρότερες δομικές μονάδες, που επαναλαμβάνονται κατά μήκος της αλυσίδας, με αποτέλεσμα το μοριακό βάρος να είναι πολύ υψηλό, υπερβαίνοντας κάποιες φορές το ένα εκατομμύριο. Οι αλυσίδες δεν είναι πάντα γραμμικές, αλλά συχνά μπορούν να διακλαδώνονται, να διασταυρώνονται ή να δικτυώνονται σχηματίζοντας τρισδιάστατες δομές. Αυτές οι διαμορφώσεις επιφέρουν αλλαγές στα φυσικά χαρακτηριστικά και τη συμπεριφορά του υλικού [58].

Τα πολυμερή που χρησιμοποιούνται ως βιοϋλικά είναι είτε φυσικά είτε τεχνητά. Τα φυσικά πολυμερή, που ανήκουν στην κατηγορία των βιομοριακών υλικών, παράγονται μέσα από βιολογικές διεργασίες και απαντώνται, κατά κύριο λόγο, στο εξωκυττάριο υλικό των συνδετικών ιστών, όπως στους τένοντες, στο δέρμα, στα οστά, στα δόντια και στα αιμοφόρα αγγεία. Αντιπροσωπευτικά δείγματα είναι το κολλαγόνο, η ελαστίνη, το μετάξι, η κερατίνη και η μυοσίνη. Ο λειτουργικός τους ρόλος είναι η μηχανική στήριξη, η εξωτερική προστασία, η θερμική μόνωση, η συστολή και η κινητικότητα. Η δομή και οι ιδιότητές τους παρουσιάζουν ιδιαίτερο ενδιαφέρον και, ως εκ τούτου, αξιοποιούνται και στα τεχνητά εμφυτεύματα στην προσπάθεια μίμησης των φυσικών βιολογικών δομών [59].

Μια ιδιαίτερη κατηγορία βιοπολυμερών είναι τα ελαστομερικά πολυπεπτίδια. Χαρακτηρίζονται από υψηλή ελαστικότητα, αντοχή στον εφελκυσμό και αναστρέψιμη παραμόρφωση χωρίς την απώλεια ενέργειας. Η ελαστίνη είναι ένα ελαστομερικό πολυπεπτίδιο, που παρέχει δομική συνοχή μεταξύ ιστών και οργάνων [60].

Αρκετά εκτεταμένη, ωστόσο, είναι και η χρήση των τεχνητών πολυμερών ως βιοϋλικών, κυρίως χάρη στην ικανότητά τους να μορφοποιούνται εύκολα και να

αποκτούν διάφορες μορφές, όπως νήματα, ράβδοι, ιξώδη υγρά και υμένα. Παρά το γεγονός, όμως, ότι κατασκευάζονται και μορφοποιούνται αρκετά εύκολα, υστερούν σε σχέση με άλλα βιοϋλικά στη συμπεριφορά τους μακροπρόθεσμα.

Οι κυριότερες απαιτήσεις που τίθενται όσον αφορά στη χρήση των πολυμερών ως βιοϋλικών είναι η βιοσυμβατότητα (δηλαδή να μην προκαλεί καρκινογένεση, τοξικότητα και αλλεργική αντίδραση), οι φυσικές ιδιότητες (αντοχή, ελαστικότητα και σταθερότητα), η ικανότητα μορφοποίησης (σχηματισμός ινών), και η ικανότητα αποστείρωσης (με θερμή ξήρανση ή ακτινοβολία) [58].

1.1.2 Βιολογικά μακρομόρια – Πρωτεΐνες

Τα βιολογικά μακρομόρια, όπως είναι οι πολυσακχαρίτες, τα λιπίδια, τα νουκλεϊκά οξέα, αλλά και οι πρωτεΐνες είναι απαραίτητες για όλους τους ζωντανούς οργανισμούς και συμμετέχουν σε κάθε διαδικασία μέσα στα κύτταρα. Οι πρωτεΐνες αποτελούν τα πιο διαδεδομένα και πολυδιάστατα, τόσο στη μορφή όσο και στη λειτουργία τους, βιολογικά μακρομόρια. Ακόμη και στο πιο απλό κύτταρο εντοπίζονται εκατοντάδες διαφορετικές πρωτεΐνες με την καθεμία να έχει ιδιαίτερο ρόλο.

Οι πρωτεΐνες είναι ενώσεις που αποτελούνται από άνθρακα (C), υδρογόνο (H), οξυγόνο (O) και άζωτο (N). Διαφέρουν ως προς τη χημική τους σύσταση από τα λιπίδια και τους υδατάνθρακες, γιατί περιέχουν άζωτο περίπου το 16% του βάρους τους, καθώς και άλλα στοιχεία όπως το θείο (S), ο φωσφόρος (P) και ο σίδηρος (Fe). Οι βασικές δομικές μονάδες των πρωτεϊνών είναι τα αμινοξέα. Η ακολουθία αμινοξέων σε μια πρωτεΐνη καθορίζεται από ένα γονίδιο και κωδικοποιείται κατά τον γενετικό κώδικα DNA. Τα αμινοξέα τα διακρίνουμε στα πρωτεϊνικά αμινοξέα και στα μη πρωτεϊνικά αμινοξέα. Τα πρώτα συμμετέχουν στη σύνθεση πρωτεϊνών, ενώ τα δεύτερα τα συναντάμε μόνο σε ελεύθερες μορφές. Υπάρχουν τουλάχιστον οκτώ από τα είκοσι αμινοξέα που δεν μπορεί να συνθέσει μόνος του ο οργανισμός μας. Χημικά οι πρωτεΐνες διακρίνονται σε απλές, σύνθετες και πρωτεϊνικά παράγωγα. Ανάλογα με τη σύνθεση και την περιεκτικότητά τους στα βασικά αμινοξέα, διακρίνονται σε πλήρεις, ημιτελείς κι ατελείς [61].

Ο βιολογικός ρόλος των πρωτεϊνών, καθορίζεται κάθε φορά από την τρισδιάστατη δομή τους, που είναι συνέπεια της αλληλουχίας των αμινοξέων, η οποία και ξεκινά από την πρωτοταγή δομή. Οι πρωτεΐνες είναι βασικές ουσίες που χρειάζεται το σώμα για την ανάπτυξη και την αποκατάσταση των κατεστραμμένων κυττάρων. Δρουν ως ένζυμα που καταλύουν βιοχημικές αντιδράσεις, και είναι ζωτικής σημασίας στο μεταβολισμό. Επίσης, είναι σημαντικές στη δράση του ανοσοποιητικού συστήματος, καθώς βοηθούν στην παραγωγή αντισωμάτων που καταπολεμούν τις λοιμώξεις. Άλλες πρωτεΐνες έχουν δομικές ή μηχανικές λειτουργίες, όπως οι πρωτεΐνες του κυτταρικού σκελετού, οι οποίες συμβάλλουν στη διατήρηση της μορφής των κυττάρων. Οι πρωτεΐνες είναι βασικά συστατικά όλων των μυών και σχηματίζουν τα ένζυμα που είναι απαραίτητα για την απελευθέρωση ενέργειας και τη διατήρηση της ζωής, καθώς παίρνουν μέρος στη σύνθεση των ορμονών. Επιπρόσθετα, οι πρωτεΐνες

είναι απαραίτητα συστατικά στη διατροφή μας, δεδομένου ότι ο οργανισμός δεν μπορεί να συνθέσει όλα τα αμινοξέα, οπότε πρέπει να ληφθούν μέσω της τροφής.

Οι πρωτεΐνες χρησιμεύουν για την κατασκευή διαφόρων οργάνων του σώματος ξεκινώντας από τα κύτταρα και τις μεμβράνες του. Παραδείγματα πρωτεϊνών είναι το κολλαγόνο και η ελαστίνη που βρίσκονται στα οστά, τους τένοντες, το δέρμα και τα τοιχώματα μεγάλων αγγείων. Επίσης, η κερατίνη είναι μια πρωτεΐνη που βρίσκεται στις τρίχες και τα νύχια και η αιμοσφαιρίνη είναι υπεύθυνη για τη μεταφορά του οξυγόνου μέσα στον οργανισμό μας. Εκτελούν διάφορες λειτουργίες σημαντικές για τον οργανισμό και χρησιμεύουν σαν αντισώματα στις διάφορες ασθένειες. Ρυθμίζουν σε μικρές ποσότητες λειτουργίες του οργανισμού, όπως η ινσουλίνη το μεταβολισμό των σακχάρων. Βοηθούν την εκτέλεση μυϊκών εργασιών και έχουν αποθηκευτικό ρόλο, όπως η καζεΐνη του γάλακτος αποθηκεύει φωσφόρο και ασβέστιο) [62].

1.1.3 Ινώδεις πρωτεΐνες

Οι πρωτεΐνες όπως αναφέρθηκε είναι μεγάλα, σύνθετα βιομόρια, με μοριακό βάρος από 10.000 μέχρι πάνω από 1.000.000, αποτελούμενα από αμινοξέα, τα οποία ενώνονται μεταξύ τους με πεπτιδικούς δεσμούς σχηματίζοντας μια γραμμική αλυσίδα, τη λεγόμενη πολυπεπτιδική αλυσίδα.

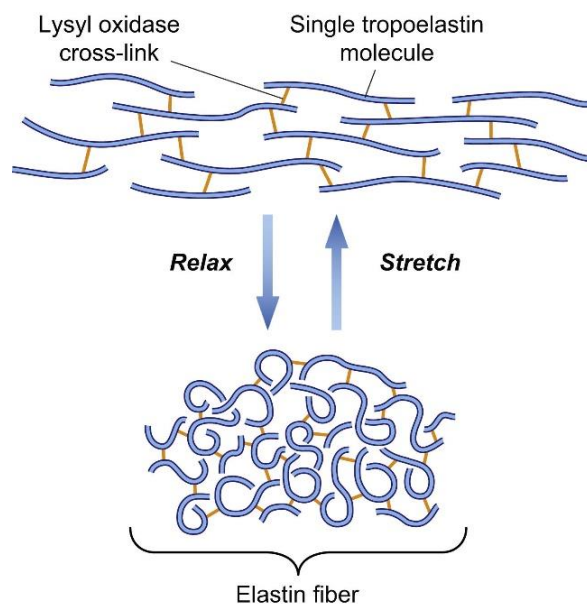
Οι περισσότερες πρωτεΐνες έχουν σφαιρικό συμπαγές σχήμα, ωστόσο σημαντικό ρόλο κατέχουν και οι ινώδεις πρωτεΐνες στη δόμηση των πρωτεϊνών. Χαρακτηριστικά, οι ινώδεις πρωτεΐνες αποτελούνται από πολυπεπτιδικές αλυσίδες που οργανώνονται παράλληλα κατά μήκος του ίδιου άξονα, δημιουργώντας μεγάλες γραμμικές αλυσίδες ή μεγάλες πτυχώσεις. Οι περισσότερες από αυτές είναι αδιάλυτες στο νερό και το μήκος των αλυσίδων που σχηματίζονται στις ινώδεις πρωτεΐνες μπορεί να είναι της τάξης εκατοντάδων νανομέτρων, ενώ η λειτουργία τους είναι περισσότερο δομική. Κατά κύριο λόγο σχηματίζουν μικροϊνίδια, ενισχύουν τις μεμβράνες και συντηρούν τη δομή των κυττάρων και των ιστών. Οι ινώδεις πρωτεΐνες έχουν την ιδιότητα να εμφανίζουν δομές: α-έλικας, β-στροφές, β-πτυχώσεις και τριπλής έλικας. Χαρακτηριστικά παραδείγματα τέτοιων πρωτεϊνών είναι το κολλαγόνο και η ελαστίνη [63, 64].

1.2 Γενικά χαρακτηριστικά ελαστίνης

Η ελαστίνη είναι μια ινώδης πρωτεΐνη, που παρέχει την ικανότητα στους ιστούς να επανέρχονται στην αρχική τους κατάσταση και η σημασία της είναι μεγάλη σε ότι αφορά την υποστήριξη και τη διατήρηση υγιών κυττάρων. Είναι μία αδιάλυτη πρωτεΐνη 750 αμινοξέων, χαρακτηρίζεται από την ύπαρξη πολλών σταυροδεσμών και είναι το θεμελιώδες συστατικό των ελαστικών ινών. Ως αποτέλεσμα, η ελαστίνη είναι περισσότερο άφθονη στα όργανα, όπου η ελαστικότητα είναι κύριας σημασίας, όπως στις αρτηρίες, στους ελαστικούς συνδέσμους, στους τένοντες, στο δέρμα και στους πνεύμονες [64-66]. Συγκεκριμένα, οι ιστοί που είναι πλούσιοι σε ελαστίνη είναι η

αορτή και τα αγγεία (50%), πνεύμονες (30%), σύνδεσμοι (70% ξηράς μάζας), τένοντες (4%) και το δέρμα (2%-4%) [62].

Στις ελαστικές ίνες, η ελαστίνη σχηματίζει τον εσωτερικό πυρήνα, ο οποίος διασπείρεται με μικροϊνες. Οι ελαστικές ίνες είναι περίπλοκες δομές που αποτελούνται από δύο συστατικά. Ένα άμορφο, αποτελούμενο από πρωτεΐνη ελαστίνης με σταυροδεσμούς (crosslinks) που αφορά το 90% της ίνας και από ένα ινώδες συστατικό, τα μικροϊνίδια, που είναι πλούσια σε γλυκοπρωτεΐνες και οργανώνονται σε ίνες των 8nm – 16nm. Διάφορα άλλα συστατικά που παρουσιάζονται στις ελαστικές ίνες είναι η οξειδάση της λυσίνης (LOX) ένα ένζυμο που εκκινεί τη δημιουργία σταυροδεσμών στην ελαστίνη, η EBP (Elastin Binding Protein) ή υποδοχέας και οι πρωτεογλυκάνες [61, 66].

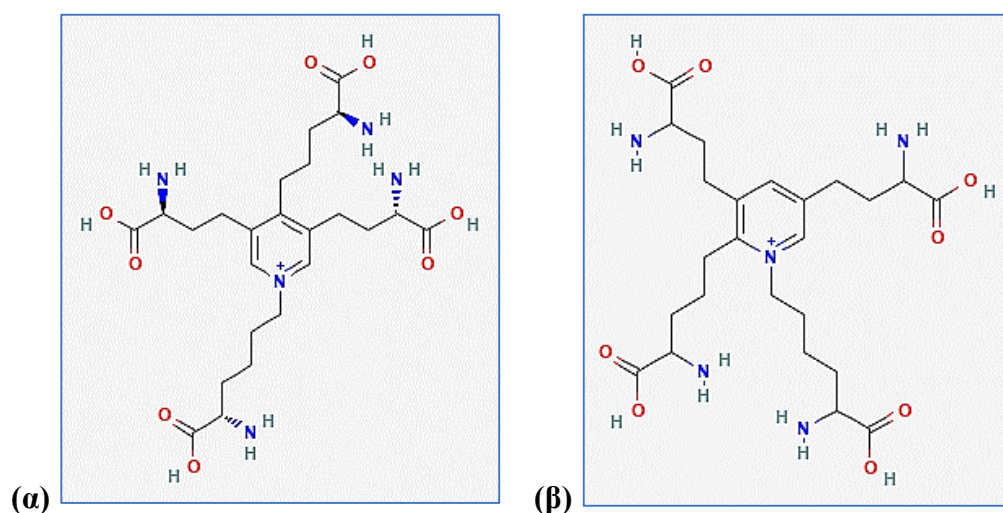


Εικόνα 1.1. Δίκτυο ελαστικών ινών σε επαναλαμβανόμενη διαδικασία επιμήκυνσης και συσπείρωσης [66].

Τα μόρια της ελαστίνης σχηματίζονται από χαλαρά συνδεδεμένες πολυπεπτιδικές αλυσίδες, χωρίς ιδιαίτερη δομική οργάνωση και οι οποίες συνδέονται με ομοιοπολικούς δεσμούς, για να σχηματίσουν ένα δίκτυο ελαστικών ινών. Κάθε μόριο ελαστίνης μπορεί να εκτείνεται και να ξανασυσπειρώνεται σε μια τυχαία διάταξη (**Εικόνα 1.1**). Αυτό έχει ως αποτέλεσμα το συνολικό ελαστικό πλέγμα να εκτείνεται και να συστρέφεται ως μια ελαστική ταινία [66].

Υπάρχουν είδη ελαστίνης που περιλαμβάνουν σχεδόν 30% γλυκίνη, ενώ το 70% της αλληλουχίας αποτελείται από τα υδρόφοβα αμινοξέα βαλίνη, αλανίνη, προλίνη. Η ελαστίνη, λοιπόν, αποτελείται από δυο τύπους μικρών τμημάτων αμινοξέων που εναλλάσσονται κατά μήκος της πολυπεπτιδικής αλυσίδας. Από υδρόφοβα τμήματα (βαλίνης-προλίνης-γλυκίνης) που είναι υπεύθυνα για τις ελαστικές ιδιότητες του μορίου και από τμήματα α-έλικας πλούσια σε αλανίνη και λυσίνη, τα οποία δημιουργούν τις συνδέσεις μεταξύ των γειτονικών κυττάρων. Αυτή η μοριακή αρχιτεκτονική είναι καθοριστική για τις ελαστικές ιδιότητες, την αδιαλυτότητα και την αντοχή της πρωτεΐνης.

Η ελαστίνη μπορεί να χαρακτηριστεί ως ένα ελαστομερές. Ένα τυπικό ελαστομερές αποτελείται από μακριές πολυμερικές αλυσίδες, οι οποίες είναι διασταυρωμένες ή μια με την άλλη και είναι ελεύθερες να κινούνται η μία ως προς την άλλη, εκτός από τα σημεία διασταυρώσεων. Ωστόσο αυτές οι διασταυρώσεις πρέπει να απέχουν αρκετά, ώστε να επιτρέπουν περαιτέρω ανάπτυξη των αλυσίδων χωρίς να σπάσουν οι ομοιοπολικοί δεσμοί, αλλά επίσης πρέπει να απέχουν τόσο όσο η ίνα να μπορεί να εκτείνεται. Επίσης, η ελαστίνη θεωρείται ως ένα άμορφο σύστημα πεπτιδικών αλυσίδων ομοιοπολικά διασταυρωμένες. Οι κυριότεροι σταυροδεσμοί στην ελαστίνη (**Εικόνα 1.2**) είναι δυο πολυλειτουργικά αμινοξέα η δεσμοσίνη (desmosine) και η ισοδεσμοσίνη (isodesmosine) [61-64].



Εικόνα 1.2. Σταυροδεσμοί ελαστίνης: (α) Δεσμοσίνη [67], (β) Ισοδεσμοσίνη [68].

Η κλασική μέθοδος ανάλυσης αλληλουχιών δεν μπορεί να περιγράψει πλήρως τις αλληλουχίες της ελαστίνης, λόγω του υψηλού βαθμού διασταυρώσεων, το οποίο οδηγεί στην αδιαλυτότητα της πρωτεΐνης σε μη-υδροφοβικούς διαλύτες. Οι λυσίνες οργανώνονται σε ζεύγη διαχωριζόμενα από αμινοξέα αλανίνης. Όταν δυο τέτοια ζεύγη ευθυγραμμίζονται, οδηγούν στο σχηματισμό δεσμοσίνης και ισοδεσμοσίνης. Οι αλληλουχίες γύρω από τις λυσίνες είναι τέτοιες, ώστε να σχηματίζουν α-έλικες και με τις λυσίνες να βρίσκονται στη ίδια πλευρά της έλικας. Σε αντίθεση με αλληλουχίες γύρω από άλλες λυσίνες που κοντά τους περιέχουν κατάλοιπα προλίνης. Τα κατάλοιπα προλίνης εμποδίζουν τη διαμόρφωση α-έλικας και κάνουν τον πεπτιδικό κορμό πιο άκαμπτο. Οι αλληλουχίες των αμινοξέων της ελαστίνης είναι περιοχές των διασταυρώσεων που είναι πλούσιες σε αλανίνη-λυσίνη και οι υδροφοβικές περιοχές πλούσιες σε γλυκίνη-βαλίνη-προλίνη. Οι διαφορές στις αλληλουχίες των αμινοξέων σε διαφορετικά είδη ελαστίνης που απαντώνται στους ζωντανούς οργανισμούς έχει επιπτώσεις στη δομή και τη λειτουργία της πρωτεΐνης. Οι περιοχές διασταυρώσεων θεωρούνται ότι είναι άκαμπτες δομές που δε συνεισφέρουν στις ελαστικές ιδιότητες της ελαστίνης. Αυτό συνεπάγεται ότι η δομή των πολυπεπτιδικών αλυσίδων μεταξύ των διασταυρώσεων είναι υπεύθυνη για τις ελαστικές ιδιότητες της ελαστίνης.

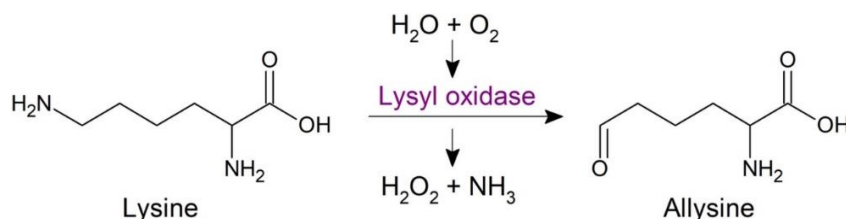
Επομένως, στο μοντέλο που αναπτύσσεται, οι πεπτιδικές αλυσίδες είναι άμορφες σχηματίζοντας μια δομή σπείρας, στο οποίο οι γλυκίνες κατέχουν εξωτερικές θέσεις εκτεθειμένες στο διαλύτη, ενώ υδρόφοβα κατάλοιπα προλίνης και βαλίνης βρίσκονται στο εσωτερικό της δομής [64-69].

1.3 Βιοσύνθεση ελαστίνης

Η ελαστίνη έχει ένα πρόδρομο μόριο την τροποελαστίνη, που αποτελείται από ένα γονίδιο ελαστίνης (ELN gene) στους ανθρώπους. Η τροποελαστίνη είναι μια πρωτεΐνη 72kDa που συντίθεται από μία πληθώρα κυττάρων. Τα μόρια αυτά απαρτίζονται κυρίως από υδρόφοβα αμινοξέα (75%) και από υδρόφιλες περιοχές από λυσίνη για το υπόλοιπο μέρος. Η υδρόφιλη λυσίνη έχει σημαντικό ρόλο στο σχηματισμό των σταυροδεσμών, μια διαδικασία που είναι ιδιαίτερα κρίσιμη για το εξωκυττάριο περιβάλλον [70].

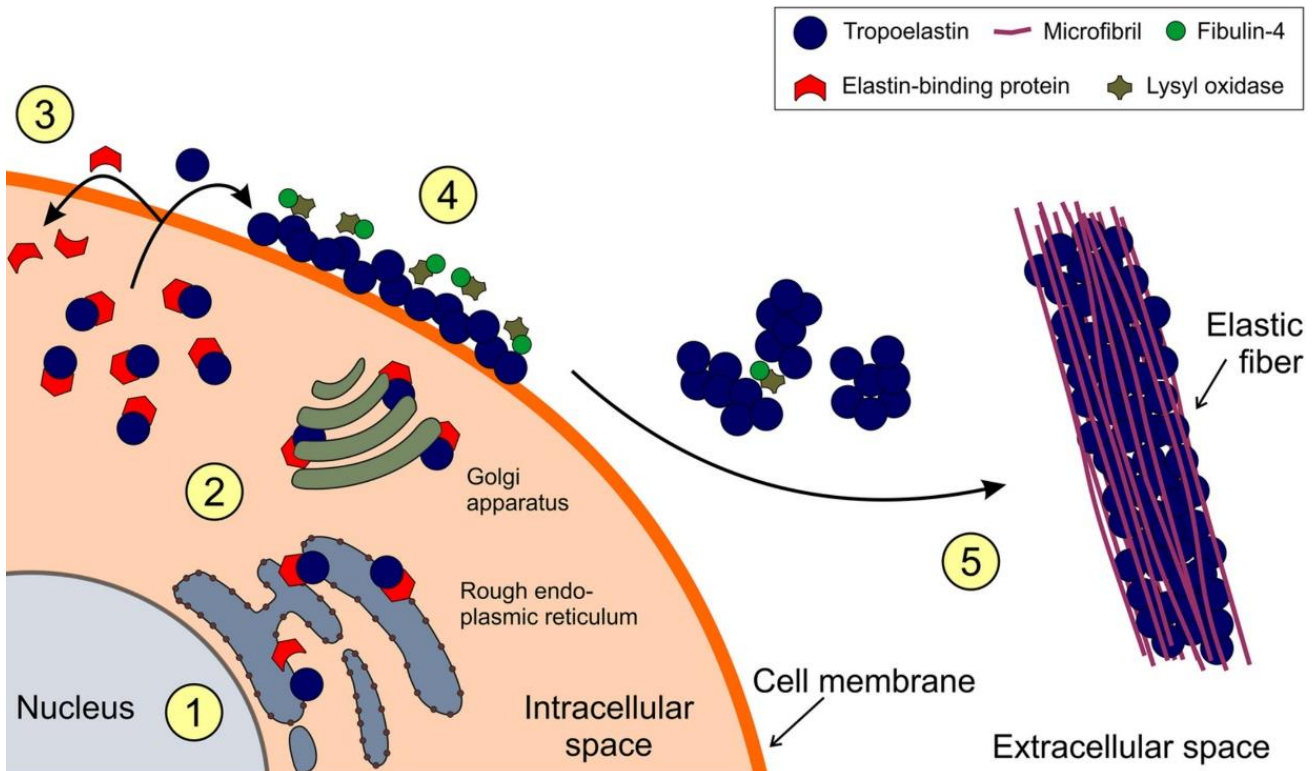
Η τροποελαστίνη πρέπει να σχηματίσει σταυροδεσμούς, ώστε να είναι δυνατή η ενσωμάτωσή της στην ελαστική ίνα. Τα μικροϊνίδια δρουν ως ικρίωματα όπου εναποτίθεται η τροποελαστίνη. Στις χαμηλές θερμοκρασίες, η τροποελαστίνη είναι διαλυτή σε υδατικά διαλύματα, με την αύξηση της θερμοκρασίας το διάλυμα γίνεται νεφελώδες λόγω της συσσωμάτωσης των μορίων της τροποελαστίνης. Μια διαδικασία που είναι θερμοδυναμικά ελεγχόμενη και πλήρως αντιστρέψιμη μέσω ψύξης. Η διαδικασία αυτή επηρεάζεται από τη συγκέντρωση της πρωτεΐνης, τη συγκέντρωση του άλατος και του pH [58].

Η ελαστογένεση είναι μια ιδιαίτερα πολύπλοκη διαδικασία, που αφορά τη διαδρομή της ελαστίνης από τη σύνθεση του πρόδρομου μορίου της μέχρι και την εναπόθεσή της στην ελαστική ίνα. Τα μόρια της τροποελαστίνης, δημιουργούν σταυροδεσμούς μέσω των κατάλοιπων της λυσίνης στις υδρόφοβες περιοχές, που μετατρέπονται σε αλδεϋδες από την επίδραση του ενζύμου LOX, μέσω (Εικόνα 1.3). Οι σταυροδεσμοί που σχηματίζονται στο εσωτερικό της αλυσίδας και ο υψηλός αριθμός των υδρόφοβων τμημάτων καθιστούν την ελαστίνη αδιάλυτη [60, 71]. Όταν τα μόρια της τροποελαστίνης ευθυγραμμίζονται και τροποποιούνται από το ένζυμο LOX, ενσωματώνονται στο ελαστικό δίκτυο υπό μη αντιστρέψιμο πολυμερισμό και η ελαστίνη αναπτύσσεται στο μικροϊνιδιακό ικρίωμα [72].



Εικόνα 1.3. Διαδικασία σχηματισμού σταυροδεσμών ελαστίνης. Μέσω του ενζύμου της LOX (οξειδάσης της λυσίνης), η λυσίνη μετατρέπεται σε αλλυσίνη [71].

Στην **Εικόνα 1.4.** παρουσιάζεται σχηματικά η αναπαράσταση των βασικών σταδίων της ελαστογένεσης. Συγκεκριμένα, στο 1^ο στάδιο, η τροποελαστίνη (TE-tropoelastin) συντίθεται στο RER (Rough endoplasmic reticulum), όπου ενώνεται με την πρωτεΐνη EBP. Στη συνέχεια (2^ο στάδιο), το σύμπλοκο των EBP-TE μεταφέρεται μέσω του μηχανισμού Golgi (Golgi apparatus) και εκκρίνεται στην κυτταρική μεμβράνη. Έπειτα (3^ο στάδιο), η TE αποδεσμεύεται από την EBP και δημιουργεί σφαιρίδια στην κυτταρική μεμβράνη, ενώ η EBP επανέρχεται μέσα στο κύτταρο. Ύστερα (4^ο στάδιο), η Fibulin-4 μεσολαβεί στην ευθυγράμμιση της αλυσίδας της TE, όπου αλληλοεπιδρά με ένζυμο LOX. Τέλος (5^ο στάδιο), μόλις τα συμπλέγματα των μορίων της TE αποκτήσουν ένα κρίσιμο μέγεθος, μετακινούνται από την πλασματική μεμβράνη (plasma membrane) μέσω της εξωκυττάριας μήτρας (ECM-extracellular matrix) και συσσωματώνονται σε ικρίωμα μικροϊνιδίων (microfibril) για να σχηματίσουν τελικά την ελαστική ίνα (elastic fiber) [71].

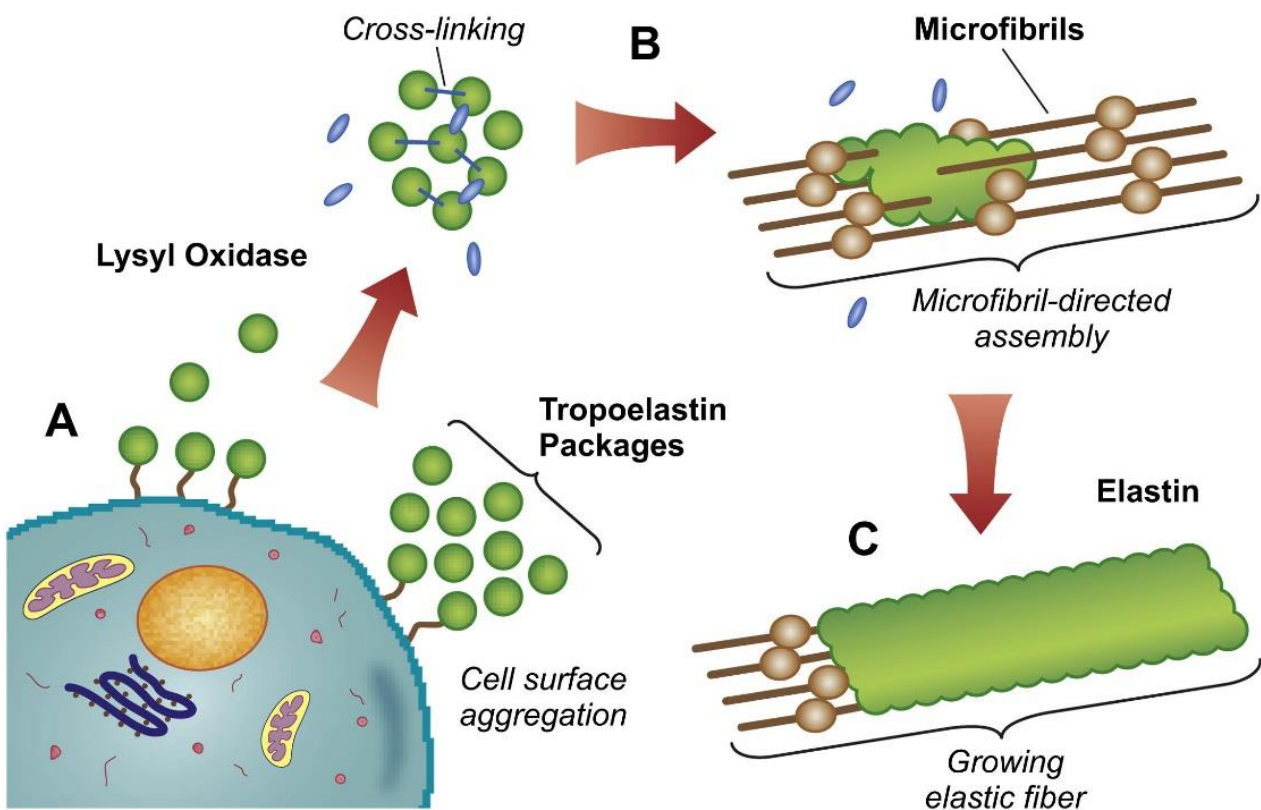


Εικόνα 1.4. Σχηματική αναπαράσταση βασικών σταδίων ελαστογένεσης: (1) Η τροποελαστίνη (TE) συντίθεται στο RER (Rough endoplasmic reticulum), όπου ενώνεται με την πρωτεΐνη EBP (Elastin-binding protein). (2) Το σύμπλοκο EBP-TE μεταφέρεται μέσω του μηχανισμού Golgi (Golgi apparatus) και εκκρίνεται στην κυτταρική μεμβράνη. (3) Η TE αποδεσμεύεται από τη EBP και δημιουργεί σφαιρίδια στην κυτταρική μεμβράνη, ενώ η EBP επανέρχεται μέσα στο κύτταρο. (4) Η Fibulin-4 μεσολαβεί στην ευθυγράμμιση της αλυσίδας της TE, όπου αλληλοεπιδρά με ένζυμο LOX (Lysyl oxidase). (5) Τα συμπλέγματα μορίων TE αποκτήσουν ένα κρίσιμο μέγεθος και μετακινούνται από την πλασματική μεμβράνη μέσω της εξωκυττάριας μήτρας και συσσωματώνονται σε ικρίωμα μικροϊνιδίων για να σχηματίσουν τελικά την ελαστική ίνα [71].

1.4 Αυτοδιαμόρφωση τροποελαστίνης

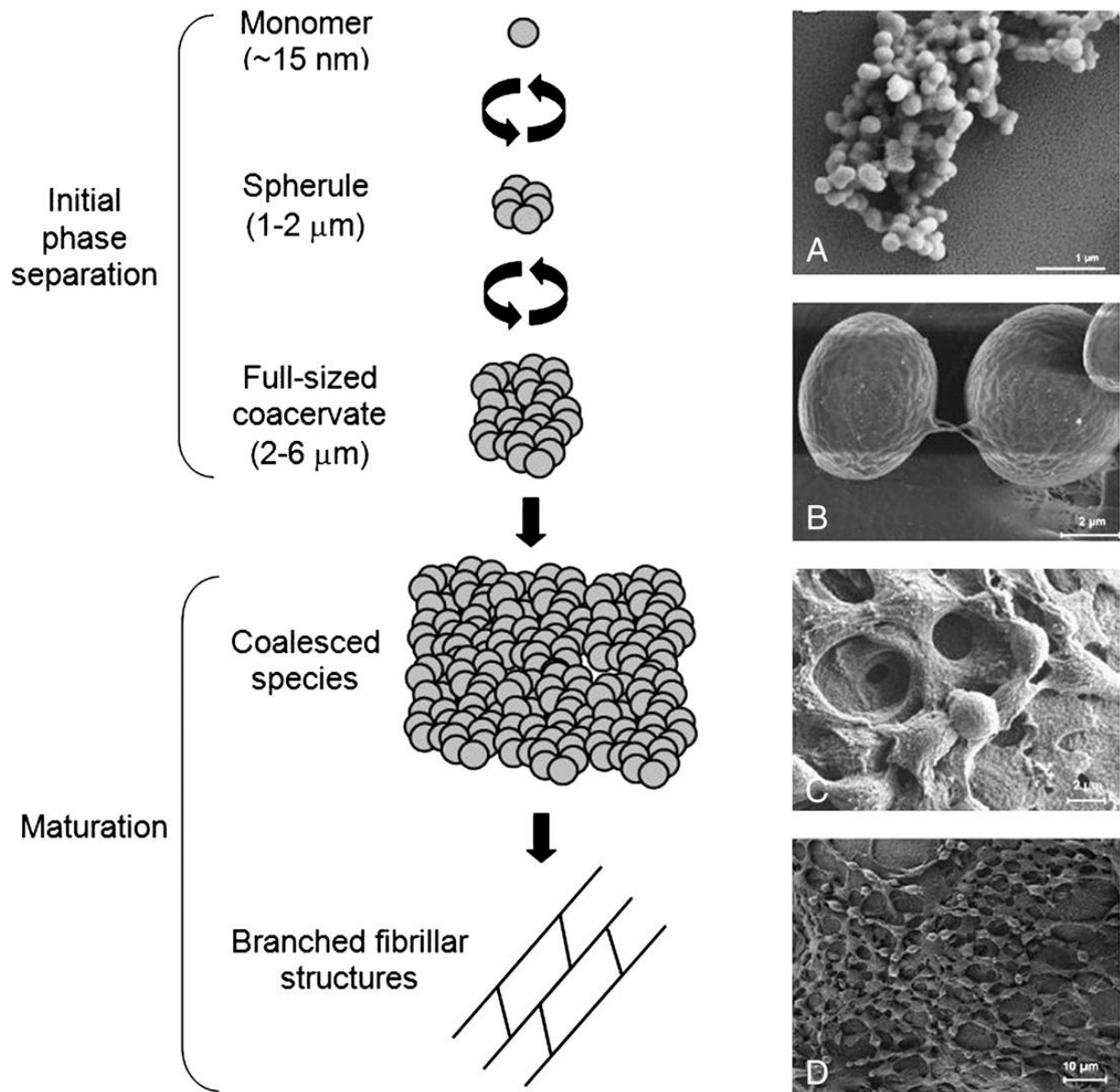
Σε διάφορες έρευνες η διαδικασία αυτοδιαμόρφωσης της τροποελαστίνης έχει πραγματοποιηθεί *in vitro* σε διάφορες έρευνες, αρχικά με μείγματα διαλυτοποιημένης ελαστίνης και έπειτα με συνθετικά πεπτίδια ελαστίνης. Τα δείγματα αποτελούνται από υδροφοβικές επαναλαμβανόμενες μονάδες, απομονωμένες υδροφοβικές περιοχές, τμήματα εναλλασσόμενων υδροφοβικών και διασυνδεδεμένων περιοχών ακόμα και ολόκληρου του μονομερούς [73].

Στην **Εικόνα 1.5**, παρουσιάζεται η σχηματική αναπαράσταση της διαδικασίας της αυτοδιαμόρφωσης της ελαστίνης. Στην πρώτη φάση (A), τα μόρια της τροποελαστίνης απελευθερώνονται στον εξωκυττάριο χώρο, όπου δημιουργούνται σταυροδεσμοί μέσω της οξείδωσης της λυσίνης. Στην επόμενη φάση (B), οι σταυροδεσμοί των μορίων της ελαστίνης συσσωματώνονται σε κριώματα μικροϊνιδίων, όπου και δημιουργείται η ίνα. Στην τελική φάση (C), η ελαστίνη μαζί με τα μικροϊνίδια δημιουργούν την ελαστική ίνα [66].



Εικόνα 1.5. Σχηματική αναπαράσταση αυτοδιαμόρφωσης ελαστίνης: **A.** Μόρια τροποελαστίνης απελευθερώνονται στον εξωκυττάριο χώρο όπου δημιουργούνται σταυροδεσμοί μέσω της οξείδωσης λυσίνης. **B.** Οι σταυροδεσμοί των μορίων της ελαστίνης συσσωματώνονται σε κριώματα μικροϊνιδίων, όπου δημιουργείται η ίνα. **Γ.** Η ελαστίνη μαζί με τα μικροϊνίδια δημιουργούν την ελαστική ίνα [9].

Συγκεκριμένα, η διαδικασία της αυτοδιαμόρφωσης της ελαστίνης χωρίζεται σε δύο βασικά στάδια. Το πρώτο στάδιο αφορά τη φάση του διαχωρισμού, η οποία περιλαμβάνει μια αναστρέψιμη διαδικασία μετάβασης ενός μονομερούς (διαστάσεων περίπου 15nm) σε πολυμερές, κατά την οποία σχηματίζονται σφαιροειδείς δομές των 1-2μm, που αναπτύσσονται και οργώνονται σε συσσωματώματα των 2-6μm (**Εικόνα 1.6.A,B**). Ενώ το δεύτερο στάδιο, αφορά τη φάση της ωρίμανσης, όπου η συσσωμάτωση αφορά και τη σύνδεση σε ινώδεις δομές και είναι μια μη αναστρέψιμη διαδικασία (**Εικόνα 1.6.C,D**) [73].



Εικόνα 1.6. Στάδια αυτοδιαμόρφωσης της τροποελαστίνης *in vitro* από ηλεκτρονικό μικροσκόπιο σάρωσης (SEM-Scanning electron microscope). **A, B:** Φάση διαχωρισμού, μια αναστρέψιμη διαδικασία μετάβασης ενός μονομερούς σε σφαιροειδή πολυμερή. **C, D:** Φάση ωρίμανσης, μια μη αναστρέψιμη διαδικασία ανάπτυξης και οργάνωσης από συσσωματώματα σε δομές ινιδίων [73].

Η συσσωμάτωση επηρεάζεται από τον αριθμό, την ακολουθία και τη συναφή διευθέτηση των υδρόφοβων περιοχών, όμως και οι υδρόφιλες ακολουθίες μπορούν να επηρεάσουν τη συμπεριφορά των υδρόφοβων περιοχών και έτσι να επηρεάσουν τη συσσωμάτωση. Επίσης εξωτερικοί παράγοντες, όπως οι ιοντικές δυνάμεις, το pH, και η θερμοκρασία, έχουν άμεση επίδραση στην ικανότητα της τροποελαστίνης να αυτοδιαμορφωθεί. Η συσσωμάτωση είναι μια ενδοθερμική διαδικασία που οδηγείται από αλληλεπιδράσεις των υδρόφοβων περιοχών με επακόλουθο την αποσταθεροποίηση του νερού που περιφράζει αυτές τις περιοχές.

Η δυσκολία της *in vitro* σύνθεσης της τροποελαστίνης έγκειται στην αδυναμία προσέγγισης του διαλυτού μονομερούς μιας και η ελαστίνη υπάρχει κυρίως ως ένα διασυνδεδεμένο υλικό, δηλαδή είναι ιδιαίτερα δυσδιάλυτη. Η ικανότητα της τροποελαστίνης και των πολυπεπτιδίων της ελαστίνης να συνδέονται σε δομές ινιδίων σε ακυτταρικό περιβάλλον αποτελεί ισχυρή υπόδειξη μιας εγγενής ικανότητας για αυτοδιαμόρφωση. Αν η θερμοκρασία βρεθεί κάτω από τη θερμοκρασία μετάβασης τότε η διαδικασία αντιστρέφεται και επιστρέφουμε στην υγρή μορφή. Αν όμως, το μείγμα μείνει πάνω από τη θερμοκρασία μετάβασης για ένα παρατεταμένο χρονικό διάστημα η διαδικασία δεν θα είναι αντιστρέψιμη. Σε χαμηλότερη θερμοκρασία από τη θερμοκρασία μετάβασης, τα μόρια της τροποελαστίνης υπάρχουν ως μονομερή. Με την αύξηση της θερμοκρασίας σε επίπεδα μεγαλύτερα της θερμοκρασίας μετάβασης, για εύρος αύξησης λιγότερο των 5 °C, παρουσιάζεται ραγδαία συγκρότηση των μονομερών σε πολυμερή χωρίς την ένδειξη κάποιων ενδιάμεσων σταδίων [73].

1.5 Εφαρμογές πολυπεπτιδίων

Η ανομοιογένεια και η διασυνδεδεμένη φύση των διαλυτών πεπτιδίων της ελαστίνης, παρέχουν μόνο περιορισμένο αριθμό αναπαραστάσεων της συσσωμάτωσης της τροποελαστίνης και δεν επιτρέπουν τη μηχανιστική εξερεύνηση της διαδικασίας. Ως εκ τούτου, οι μελέτες επικεντρώνονται στα συνθετικά πολυπεπτίδια που είναι βασισμένα σε επαναλαμβανόμενες μονάδες των υδροφοβικών περιοχών της τροποελαστίνης. Τα ELPs είναι συνθετικές αλληλουχίες πεπτιδίων που έχουν κεντρίσει το ερευνητικό ενδιαφέρον λόγω των ιδιοτήτων που παρουσιάζουν και της άμεσης απόκρισής τους [60, 74].

1.5.1 Εφαρμογές με ελεγχόμενη αποδέσμευση δραστικών ουσιών

Η ελεγχόμενη αποδέσμευση δραστικών ουσιών παρουσιάζει αρκετά πλεονεκτήματα σε σύγκριση με τις συμβατικές μεθόδους χορήγησης φαρμάκων. Τα κύρια πλεονεκτήματα της αφορούν τη συγκέντρωση του φαρμάκου σε θεραπευτικά επίπεδα χωρίς μεγάλες διακυμάνσεις στη συγκέντρωση, την απελευθέρωση του φαρμάκου σε στοχευμένη περιοχή, καθώς και τη χρήση φαρμάκων με μικρό χρόνο ημιζωής. Από την άλλη πλευρά το μεγάλο κόστος και η πιθανή τοξικότητα από μη αναμενόμενη απελευθέρωση της δραστικής ουσίας, είναι τα βασικά μειονεκτήματα της. Υπάρχουν δύο κύριες κατηγορίες συστημάτων μεταφοράς. Το ένα σύστημα αφορά τη

σύζευξη της δραστικής ουσίας σε μακρομόρια, όπως πολυμερή και πρωτεΐνες. Ενώ, το άλλο, τον εγκλεισμό της δραστικής ουσίας σε νανοφορείς, όπως τα λιποσώματα και τα μικύλλια [75].

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

Στα μακρομοριακά συστήματα στόχευσης, οι δραστικές ουσίες ενσωματώνονται σε πολυμερικά συστατικά, όπως τα συνθετικά πολυμερή, δενδριμερή και αντισώματα, με σκοπό την ενίσχυση της στοχευμένης θεραπείας του πάσχοντα ιστού και τη μείωση της τοξικότητας, ώστε να μην επηρεαστούν οι υγιείς ιστοί. Τα βασικά πλεονεκτήματα είναι η αύξηση του χρόνου ημιζωής της δραστικής ουσίας, δυνατότητα εισαγωγής τμημάτων για τη στόχευση, αλλά και όπως προαναφέρθηκε η μειωμένη τοξικότητα. Όσον αφορά τα ELPs, στα κύρια βασικά τους πλεονεκτήματα συγκαταλέγεται η θερμοκρασιακή απόκριση τους. Ως βιοπολυμερή είναι βιοσυμβατά και βιοδιασπώμενα. Μπορεί να γίνει γενετική επέμβαση και να ενωθούν σειρές πεπτιδίων για τη στόχευση του πάσχοντα ιστού. Τα ELPs που χαρακτηρίζονται από μια κρίσιμη θερμοκρασία μετάβασης χαμηλότερη της θερμοκρασίας σώματος χρησιμοποιούνται ως υδροφοβικά τμήματα, ενώ το υδροφιλικό μέρος μπορεί να είναι ELPs με θερμοκρασία μετάβασης υψηλότερη από αυτή του σώματος [60].

Οι Rodriguez-Cabello et al. ανέφεραν ένα τροποποιημένο ELP, στο οποίο η γλυκίνη, στην τρίτη θέση, στην επαναλαμβανόμενη ακολουθία, αντικαταστάθηκε από αλανίνη. Αυτά τα βιοπολυμερή χρησιμοποιούνται στον εγκλεισμό οστικών μορφογενετικών πρωτεϊνών. Οι οστικές μορφογενετικές πρωτεΐνες είναι σηματοδοτικές πρωτεΐνες που έχουν την ικανότητα να προωθήσουν την οστική ανάπτυξη [76].

Οι Dreher et al. παρουσίασαν μια εφαρμογή θερμοκρασιακής απόκρισης. Η προσέγγιση αυτή αφορά τη σύνθεση ενός συμπολυμερούς δυο ELP περιοχών, όπου το ένα πεπτίδιο έχει θερμοκρασία μετάβασης την υπερθερμική θερμοκρασία του όγκου, ενώ το άλλο δεν επηρεάζεται σε αυτή τη θερμοκρασία. Το άκρο του πεπτιδίου που δεν επηρεάζεται από τη θερμοκρασία της περιοχής, έχει τροποποιηθεί και έχει προστεθεί ένας σύνδεσμος που στοχεύει έναν συγκεκριμένο κυτταρικό αποδέκτη ή μια τροποποιημένη, από τα καρκινικά κύτταρα, μεμβρανική πρωτεΐνη. Με αυτόν τον τρόπο γίνεται η προσκόλληση του συμπολυμερούς στα καρκινικά κύτταρα. Στο άλλο άκρο, υπάρχει μια δραστική ουσία. Με αυτή τη στοχευμένη προσέγγιση αποφεύγετε τη συσσώρευση της δραστικής ουσίας στους υγιείς ιστούς και μεταφέρετε στα καρκινικά κύτταρα [77].

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

φέρουν μία δραστική ουσία και η χρήση τους ως σύστημα προκαθορισμένου ρυθμού αποδέσμευσης [60].

Η πρώτη μέθοδος χρησιμοποιήθηκε από τους Setton et al. για την εφαρμογή ενός ELP με συνεχή απελευθέρωση. Έγινε ενδοαρτηριακή χορήγηση σε αρουραίους και η διανομή των ELPs μελετήθηκε με τη χρήση ραδιοανιχνευτών. Για τη δεύτερη μέθοδο, χρησιμοποιήθηκαν ELPs με σταυροδεσμούς, πριν την εισαγωγή τους στον οργανισμό, για την ελεγχόμενη απελευθέρωση των αντιβιοτικών. Το ELP σχημάτισε σταυροδεσμούς στα κατάλοιπα της ελαστίνης, ώστε να είναι εφικτή δέσμευση μεγάλης ποσότητας της δραστικής ουσίας. Η λειτουργικότητα αυτής της προσέγγισης, αποδείχθηκε *in vitro* [78].

1.5.2 Εφαρμογές στη μηχανική ιστών

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

Η εφαρμογή των ELPs είναι σημαντική για αρκετούς λόγους. Αρχικά, τα ELPs βασίζονται στην ελαστίνη, ένα βιοπολυμερές, όπως προαναφέρθηκε. Συνεπώς τα υλικά αυτά, χαρακτηρίζονται από βιοσυμβατότητα, είναι βιοδιασπώμενα και δεν ενεργοποιούν το ανοσοποιητικό. Μπορούν να παραχθούν σε, σχετικά, μεγάλες ποσότητες σε κύτταρα ξενιστών, όπως τα βακτήρια. Αυτή η μέθοδος σύνθεσης δίνει τη δυνατότητα να ελέγχεται η αλληλουχία των αμινοξέων και το μήκος την πολυμερικής αλυσίδας με μεγάλη ακρίβεια. Γι' αυτό τον λόγο τα ELPs χρησιμοποιήθηκαν για την παρασκευή υδρογέλων, υμενίων, και σε διάφορες εφαρμογές μηχανικής ιστών, όπως για την ανάπλαση χόνδρων, αγγείων οφθαλμολογικών και ηπατικών ιστών [60].

Οι Setton et al. εφάρμοσαν τα ELPs ως μια τρισδιάστατη μήτρα για την παγίδευση χονδροκυττάρων [79]. Χρησιμοποίησαν ELP με θερμοκρασία μετάβασης στους 35 °C σε PBS. Χρησιμοποιήθηκε για σχηματισμό ικριωμάτων στα κύτταρα. Η *in vitro* μελέτη έδειξε ότι υποστήριξαν τη βιοδιαθεσιμότητα των χονδροκυττάρων και στη σύνθεση και συσσώρευση του εξωκυττάρου υλικού των χόνδρων. Κάτι που οδήγησε στην πιθανή χρήση των ELPs για αποκατάσταση χόνδρινων ιστών.

Σε μια άλλη έρευνα, οι Tirrell et al. σχεδίασαν μια τεχνητή εξωκυττάρια μήτρα (a-ECM) για αγγειακά μοσχεύματα μικρής διαμέτρου [80]. Για τα μοσχεύματα η μηχανική ακεραιότητα και οι βιολογικές αλληλεπιδράσεις με τον ιστό ξενιστή είναι σημαντικές ιδιότητες. Για αυτό οι πρωτεΐνες a-ECM αποτελούνται από εναλλαγές CS5 (περιοχές πρόσδεσης) και περιοχές ELPs. Οι περιοχές CS5 παρέχουν κατάλληλο περιβάλλον πρόσφυσης, ενώ τα ELPs παρέχουν στα υλικά ελαστικότητα και μηχανική

συνοχή. Η μελέτη έδειξε ότι τα α-ECM παρουσίασαν συμπεριφορά παρόμοια με αυτή της φυσικής ελαστίνης.

Τα τελευταία χρόνια, η μηχανική ιστών έχει βοηθήσει στη μείωση της παραμονής στο νοσοκομείο και των θανάτων που προκαλούνται από τραύματα στο δέρμα. Τα ικρίωματα είναι ένας από τους κύριους παράγοντες που επηρεάζουν την επιτυχία οποιουδήποτε μοσχεύματος ιστού. Το κολλαγόνο και η ελαστίνη είναι δύο από τα κύρια συστατικά της εξωκυτταρικής μήτρας και έχει υπάρξει μεγάλο ενδιαφέρον για νέες πηγές για εφαρμογή ως βιοϋλικό. Σε άλλη μελέτη αναπτύχθηκε ένα ικρίωμα μηχανικής ιστών χρησιμοποιώντας την τεχνική ηλεκτροϊνοποίηση (electrospinning). Το δέρμα (κοτόπουλου) χρησιμοποιήθηκε ως εναλλακτική πηγή για τη λήψη κολλαγόνου και ελαστίνης. Ο συνδυασμός αυτών των πρωτεϊνών έδειξε μια κατανομή διαμέτρων, μικρότερη από 100 nm [81]. Οι δοκιμές *in vitro* έδειξαν την προσκόλληση και τον πολλαπλασιασμό των κυττάρων, καθώς και την απουσία κυτταροτοξικότητας από μη διασταυρωμένα ικρίωματα και ικρίωματα. Η δομή και η σύνθεση του αναπτυγμένου ικριώματος παρέχουν ένα ευνοϊκό περιβάλλον για την ανάπτυξη των κυττάρων και τη δημιουργία ενός υποκατάστατου δέρματος.

Επιπροσθέτως, οι Stojic et al. ερεύνησαν τη μηχανική ιστών του δέρματος μέσω δερμο-επιδερμικών ισοδύναμων, που βασίζονται σε υδρογέλες υβριδικού πλάσματος. Παρατήρησαν ταχεία υποβάθμιση και συστολή με την πάροδο του χρόνου και χαμηλές μηχανικές ιδιότητες που περιορίζουν την αναπαραγωγικότητα και τη διάρκεια ζωής τους [82]. Προκειμένου να επιτύχουν καλύτερες μηχανικές ιδιότητες, ελαστικότητα και βιολογικές ιδιότητες, ενσωματώσαν ένα δίκτυο ανασυνδυασμένου τύπου ελαστίνης ELR (elastin-like recombinamer).

Οι εξαιρετικές ιδιότητες της ελαστίνης την καθιστούν ελκυστικό υποψήφιο για μια σειρά εφαρμογών μηχανικής ιστών. Γνωστά παραδείγματα που περιέχουν ελαστικές ίνες είναι τα μοσχεύματα του δέρματος για τραύματα εγκαυμάτων [83], των αιμοφόρων αγγείων για ανακατασκευή στεφανιαίου μοσχεύματος [84] και μοσχεύματα αορτικής καρδιακής βαλβίδας [85]. Οι μεθοδολογίες βιοκατασκευής παρέχουν πρόσβαση σε πολυάριθμες παραλλαγές από κυτταρικά ικρίωματα με βάση την ελαστίνη. Ως εκ τούτου, τα πολυμερή ελαστίνης-μιμητικών πρωτεϊνών αντιπροσωπεύουν κατάλληλους υποψήφιους για χρήση ως υλικά ικριώματος στη μηχανική ιστών, όπου κρίσιμες ιδιότητες όπως μηχανική απόκριση, αλληλεπιδράσεις κυττάρου-ικριώματος και βιοαποδομησιμότητα μπορούν να ελεγχθούν μέσω τροποποίησης των ιδιοτήτων του βιοϋλικού.

1.6 Ο ρόλος της ελαστίνης

Η ελαστίνη διαδραματίζει ένα δομικό ρόλο στους ελαστικούς ιστούς, όπως ήδη έχει αναφερθεί, στις αρτηρίες, στο δέρμα, στους συνδέσμους, στους χόνδρους και στους τένοντες. Ως το κυρίαρχο συστατικό της ελαστικής ίνας, η ελαστίνη προσδίδει ανθεκτικότητα και ελαστικότητα, χαρακτηριστικά απαραίτητα για τη λειτουργία αυτών των ιστών. Η διάταξη της ελαστίνης στην εξωκυττάρια μήτρα ποικίλει ανάμεσα σε διαφορετικούς ιστούς, που φανερώνει ένα μεγάλο εύρος δομών με αντίστοιχες

ελαστικές ιδιότητες. Για παράδειγμα, η ελαστίνη σε μορφή λεπτού ελάσματος στον αρτηριακό τοίχο είναι υπεύθυνη για τη δύναμη και την ελαστικότητα, στοιχεία απαραίτητα για τη διαστολή των αγγείων και τη ροή του αίματος. Στον πνεύμονα, η ελαστίνη είναι διατεταγμένη σε πλέγμα, το οποίο υποστηρίζει το άνοιγμα και το κλείσιμο των κυψελίδων. Το δέρμα είναι εμπλουτισμένο με ελαστικές ίνες οι οποίες προσφέρουν ευλυγισία και επεκτασιμότητα. Στους συνδέσμους παρουσιάζουν μικρά ινώδη δίκτυα, ενώ στους χόνδρους μεγάλες τρισδιάστατες δομές κυψελών [86-90].

Συγκεκριμένα, οι ελαστικές ίνες επιτρέπουν στο δέρμα και σε άλλους ιστούς να διατείνονται και κατόπιν να επανέρχονται στην αρχική τους κατάσταση χωρίς να υφίστανται ρήξη, ιδιότητα που οφείλεται στην ικανότητα των μορίων της ελαστίνης να αποσυσπειρώνονται αντιστρεπτά κατά τη διάταση. Στο δέρμα, η περισσότερη ελαστίνη βρίσκεται στο χόριο, το οποίο είναι το ελαστικό μεσαίο στρώμα [91]. Αυτός ο ελαστικός ιστός συναρμολογείται ως ένα συνεχές δίκτυο από ίνες. Η πυκνή μάζα των ελαστικών ινών στο δικτυωτό χόριο κυριαρχεί στην περιοχή και είναι ιδιαίτερα σημαντική για τη συνολική ελαστικότητα του δέρματος. Γενικά, οι πιο ώριμες και παχιές ίνες ελαστίνης βρίσκονται βαθιά στο χόριο, και εκεί λειτουργούν ως ένα διεισδυτικό δίκτυο ελαστίνης [92, 93].

Αρκετές έρευνες, έχουν αποκαλύψει ένα μεγάλο εύρος βιολογικών ιδιοτήτων της ελαστίνης και των πεπτιδίων που προέρχονται από αυτήν. Τα πεπτιδία αυτά, παράγονται φυσικά από την είσοδο τους στην κυκλοφορία του αίματος και μπορούν να έχουν επιδράσεις μεγάλης εμβέλειας, όπως η αγγειοδιαστολή [94]. Μελέτες της ελαστίνης σε ποντίκια έχουν αναδείξει το σημαντικό της ρόλο στην αρτηριακή μορφογένεση [95].

Το ερευνητικό ενδιαφέρον όσον αφορά στην ελαστίνη επικεντρώνεται στη χρήση της στη μηχανική ιστών και ειδικότερα στα τεχνητά αγγειακά μοσχεύματα στην προσπάθεια μίμησης των φυσικών και μηχανικών ιδιοτήτων τους, συμπεριλαμβανομένης της αντοχής και της ελαστικότητας. Ως εκ τούτου, δοκιμάζεται στο σχεδιασμό κριωμάτων αγγείων, με τη διαδικασία συνένωσης τμημάτων α-ελαστίνης, με ενθαρρυντικά αποτελέσματα όσον αφορά στις ιδιότητες [96].

1.6.1 Διαταραχές λόγω έλλειψης ή απουσίας ελαστίνης

Υπάρχει σημαντικός αριθμός επίκτητων και κληρονομικών ασθενειών, που είναι γνωστό ότι επηρεάζουν τη δομή, την κατανομή και την περίσσεια των ελαστικών ινών. Η μεγαλύτερη επίδραση υπάρχει στα όργανα που έχουν υψηλή συγκέντρωση σε ελαστίνη. Όμως, λόγω της πολυπλοκότητας της ελαστικής ίνας και της αλληλεπίδρασης ενός συνόλου μορίων στον σχηματισμό των ινών, οι περισσότερες από τις ασθένειες δεν συνεπάγονται την ελαστίνη ως το κύριο ελάττωμα, αν και οι περισσότερες επηρεάζουν την ακεραιότητα της ελαστικής ίνας [97, 98].

Σε μελέτη ανάλυσης του γονιδίου της ελαστίνης, ασθενών που πάσχουν από cutis laxa, έδειξε την ύπαρξη γενετικών ανωμαλιών της ελαστίνης που μπορούν εύκολα να συσχετιστούν με τις μορφολογικές τροποποιήσεις που παρουσίαζαν. Όπως και ότι μεταλλάξεις στην ελαστίνη προκαλούν εύθραυστα αιμοφόρα αγγεία [94].

Στον Πίνακα 1.1 καταγράφονται τα χαρακτηριστικά των ασθενειών που παρουσιάζονται στον ανθρώπινο οργανισμό, λόγω έλλειψης ή καταστροφής της ελαστίνης, καθώς και οι πιθανές αιτίες που προκαλούν αυτές τις διαταραχές.

Πίνακας 1.1 Ασθένειες/διαταραχές λόγω έλλειψης ή καταστροφής της ελαστίνης [97].

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

1.6.2 Βιολογικές και μηχανικές ιδιότητες της ελαστίνης

Η ελαστίνη διαδραματίζει σημαντικό βιολογικό ρόλο στη ρύθμιση των κυττάρων που βρίσκονται στους ελαστικούς ιστούς. Είναι μια εξαιρετικά ανθεκτική πρωτεΐνη με χρόνο ημιζωής περίπου τα 70 χρόνια [99, 100]. Αποτελείται κατά 90% από ελαστικές ίνες, οι οποίες της προσδίδουν τις ελαστικές και μηχανικές ιδιότητες. Το μέτρο ελαστικότητας (Young's modulus) με AFM για τις ελαστικές ίνες έχει εύρος 300-600kPa, αλλά μπορεί να μετρήσει έως και 100kPa για την αρτηριακή ελαστίνη, τονίζοντας την πολύπλευρη φύση αυτών των δομών μέσα στην εξωκυττάρια μήτρα [101-103]. Η ελαστικότητα αυτή οφείλεται στις έμφυτες ελαστικές ιδιότητες του μονομερούς [104].

Επομένως, το κοινό που έχουν όλες οι διαταραχές που οφείλονται στην ελαστίνη είναι η αδυναμία να αναγεννήσουν και να επισκευάσουν επαρκώς τις δυσλειτουργικές ελαστικές ίνες οδηγώντας σε μεταγενέστερη δυσλειτουργία των ιστών. Αυτή η ανικανότητα αποδίδεται στην αποκλειστική έκφραση της ελαστίνης κατά το στάδιο της πρώιμης ανάπτυξης, με αποτέλεσμα στην ανεπαρκή ανανέωση της ελαστίνης στους ενήλικους ιστούς [105]. Υλικά τα οποία θα μπορούσαν να αντικαταστήσουν την ελαστίνη στους ενήλικους ιστούς βρίσκονται υπό αναζήτηση. Αυτή η ανάγκη είναι πιο εμφανής στη μηχανική αγγειακών ιστών, καθώς οι καρδιοαγγειακές ασθένειες είναι η μεγαλύτερη αιτία θνησιμότητας στους ενήλικους παγκοσμίως [106].

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2. ΚΟΛΛΑΓΟΝΟ

2.1 Εισαγωγή

Το κολλαγόνο ετυμολογικά προέρχεται από τις ελληνικές λέξεις «κόλλα + γεννώ», επειδή συγκρατεί τα διάφορα μέρη του σώματος μεταξύ τους. Η βιολογική σημασία του κολλαγόνου είναι ότι ανήκει σε μια ομάδα πρωτεϊνών που βρίσκονται μόνο σε ζωικούς οργανισμούς. Συγκεκριμένα στα θηλαστικά αποτελεί το 25-35% όλων των πρωτεϊνών και το 6% του συνολικού βάρους του σώματός τους [107]. Για να γίνει, κατανοητή η σπουδαιότητα του κολλαγόνου στον ανθρώπινο οργανισμό, θα γίνει πλήρης αναφορά στο συγκεκριμένο κεφάλαιο στο σχηματισμό των ινών του, με λεπτομερή ανάλυση στην *in vivo* αυτοδιαμόρφωσή του.

Το κολλαγόνο, ανήκει σε ινώδεις εξωκυτταρικές πρωτεΐνες, όπου εμφανίζεται σε πολυκύτταρους οργανισμούς ως δομικό συστατικό. Έχει χρησιμοποιηθεί για θεραπείες εγκαυμάτων, αποκατάσταση οστών και για ορθοπεδικές, οδοντιατρικές και χειρουργικές επεμβάσεις. Η προέλευση του για ιατρικούς σκοπούς προέρχεται εκτός από τον άνθρωπο και από βοοειδή και χοίρους. Οι χρήσεις του κολλαγόνου, αλλά και της ζελατίνης που παράγεται από αυτό αν θερμανθεί, είναι κυρίως σε φαρμακευτικές και κοσμητικές βιομηχανίες [108].

Μέχρι σήμερα έχουν προσδιοριστεί περίπου 29 τύποι κολλαγόνου, οι οποίοι κωδικοποιούνται από 20 τουλάχιστον γονίδια. Το κολλαγόνο δημιουργεί σχηματισμούς σαν ιμάντες στους τένοντες και στους συνδέσμους, πυκνές επιφάνειες στο δέρμα και σκελετικά πλαίσια στα οστά και τα δόντια και πολλές άλλες δομές υποστήριξης σε όλο το σώμα [109].

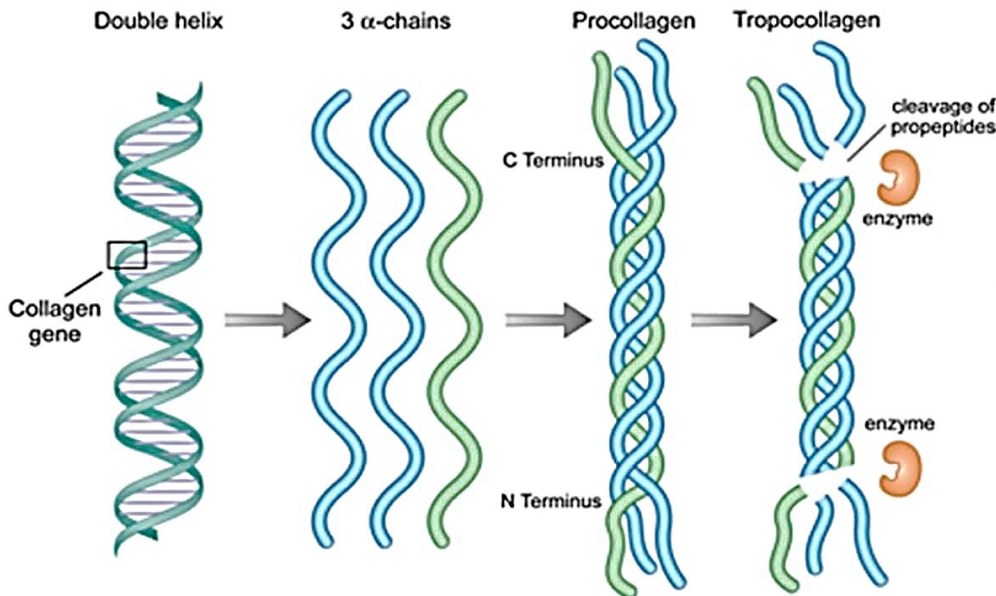
Οι διάφοροι τύποι διαφέρουν ως προς την επί μέρους σύσταση τους στις πολυπεπτιδικές αλυσίδες και στις αλληλεπιδράσεις τους με τα άλλα μόρια, καθώς και στις βιολογικές λειτουργίες τους. Μπορούν σχεδόν όλοι οι τύποι κολλαγόνου σύμφωνα με τα δομικά χαρακτηριστικά τους να διαχωριστούν σε κατηγορίες, δηλαδή σε: Μεγάλες ίνες (τύποι I, II, III, V, XI), Μικρο – ίνες (τύπος VI), Δίκτυα ινών (τύποι IV, VIII, X), Σταθερές ίνες (τύπος VII) [110].

Στον Πίνακα 2.1 φαίνονται μερικοί τύποι κολλαγόνου, οι ιστοί στους οποίους βρίσκονται και οι ασθένειες/διαταραχές που προκαλούν στον ανθρώπινο οργανισμό [111, 112].

Πίνακας 2.1 Διάφοροι τύποι κολλαγόνου [113, 114].

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

Το κολλαγόνο τύπου I είναι το πιο άφθονο στον ανθρώπινο οργανισμό και αποτελείται από 3 πολυπεπτιδικές αλυσίδες του ίδιου μήκους, δύο ίδιες $\alpha 1(I)$ και μια ομόλογη με αυτές $\alpha 2(I)$. Είναι υπεύθυνο για την επούλωση ιστών και βρίσκεται στους τένοντες, στις μυϊκές ίνες και στα οστά [113]. Αρκετά ανθρώπινα γονίδια είναι υπεύθυνα για την παραγωγή συστατικών που συνθέτουν το κολλαγόνο. Ένα από αυτά είναι το COL1A1 (collagen, type I, alpha 1), το οποίο παράγει ένα συστατικό του κολλαγόνου τύπου I, που ονομάζεται αλυσίδα $\alpha 1(I)$. Ο συνδυασμός δύο αλυσίδων $\alpha 1(I)$ και με μιας $\alpha 2(I)$ δημιουργούν το μόριο του προκολλαγόνου τύπου I. Η τριπλή αυτή δομή του μοριακού προκολλαγόνου υπόκειται σε εξωκυτταρική ενζυμική διεργασία, η οποία όταν ολοκληρωθεί, τα μόρια αυτο-διαμορφώνονται σε μακριά ινίδια μέσω σταυροδεσμών. Αυτοί οι σταυροδεσμοί είναι η αιτία για τη μεγάλη ανθεκτικότητα της ίνας κολλαγόνου που τελικά δημιουργείται (Εικόνα 2.1).



Εικόνα 2.1. Σχηματική αναπαράσταση της δομής του κολλαγόνου. Η μεταγραφή του γονιδίου (COL1A1) του κολλαγόνου παράγει τρεις α-αλυσίδες (δύο α1-αλυσίδες και μια α2-αλυσίδα). Οι τρεις α-αλυσίδες συναρμολογούνται ενδοκυτταρικά στο μόριο της τριπλής έλικας που ονομάζεται προκολλαγόνο. Το προκολλαγόνο μετατρέπεται σε τροποκολλαγόνο με την απομάκρυνση των N- και C-προπεπτιδίων στον εξωκυτταρικό χώρο μέσω ενζύμων [115].

Επιπροσθέτως, το γονίδιο COL1A1 που βρίσκεται στο χρωμοσόμο 17 σε περίπτωση ανωμαλίας ή μετάλλαξης του ευθύνεται για διάφορες διαταραχές στον ανθρώπινο οργανισμό. Στον **Πίνακα 2.1**, παρουσιάζονται μερικές από αυτές ασθένειες, όπως το σύνδρομο Ehlers-Danlos (EDS) κλασικός τύπος, το EDS Arthrochalasia και η Ατελής Οστεογένεση [116, 117]

2.2 Χημική σύσταση κολλαγόνου

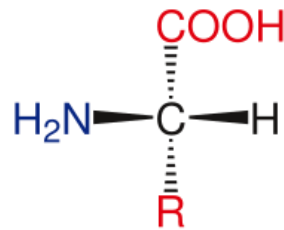
Οι πρωτεΐνες είναι βιοπολυμερή των μονομερών α-αμινοξέων. Οι πρωτεΐνες δομούνται από 20 φυσικά α-αμινοξέα, αλλά οι συνδυασμοί τους παρέχουν τεράστιο αριθμό πρωτεϊνικών μορίων. Κάθε πολυπεπτιδική αλυσίδα αποτελείται περίπου από 1000 αμινοξέα. Έτσι 20^{1000} διαφορετικά είδη πρωτεϊνικών μορίων μπορούν να δημιουργηθούν. Τα αμινοξέα είναι οργανικές ενώσεις και έχουν όλα την ίδια γενική δομή (**Εικόνα 2.2**). Ένα κεντρικό άτομο άνθρακα C συνδέεται με 4 διαφορετικά άτομα ή ομάδες ατόμων [118]:

1 άτομο υδρογόνου (- H),

1 καρβοξυλομάδα (- COOH),

1 αμινομάδα (- NH₂),

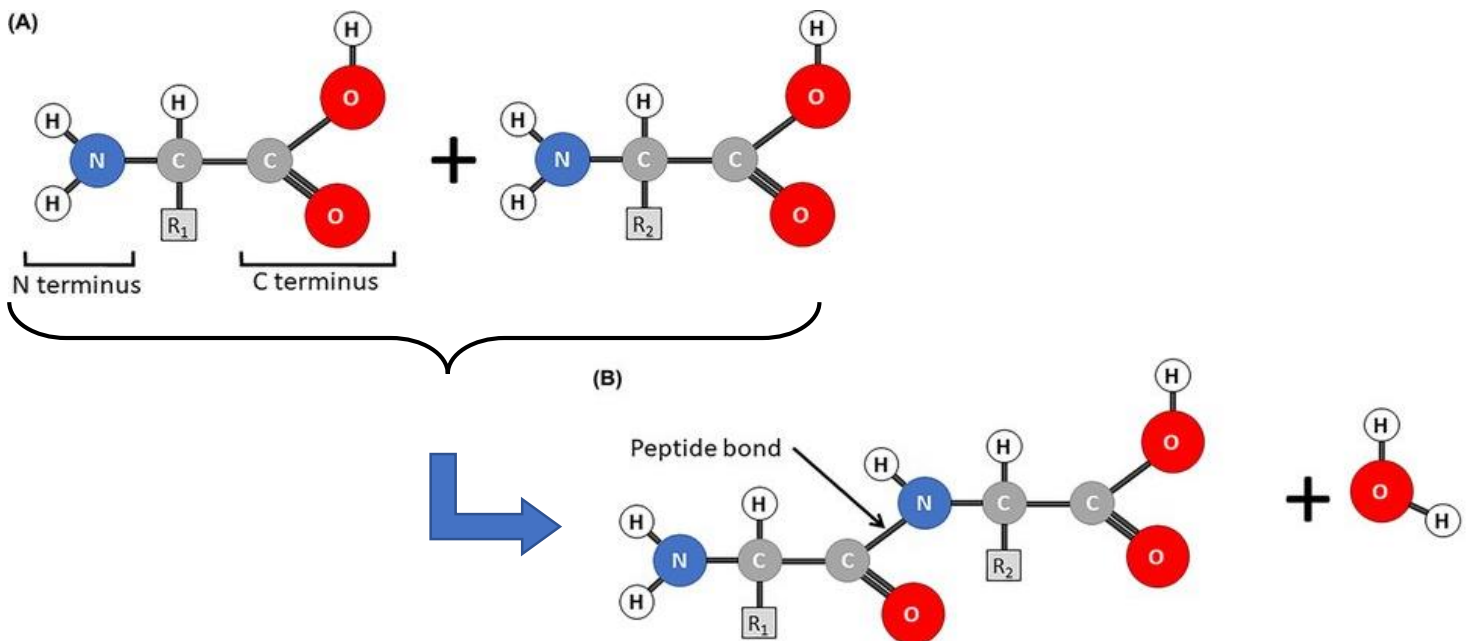
1 από τις 20 διαφορετικές πλευρικές αλυσίδες διαφόρων χημικών τύπων (- R).



Εικόνα 2.2. Γενικός συντακτικός τύπος δομής των αμινοξέων [119].

Τα αμινοξέα έχοντας ομάδες ατόμων δυο ειδών παρουσιάζουν, ιδιότητες και καρβοξυλικών οξέων και αμίνων. Ο δεσμός μεταξύ δυο αμινοξέων ονομάζεται πεπτιδικός ή αμιδικός δεσμός και δημιουργείται ύστερα από την αντίδραση της αμινομάδας ενός αμινοξέος με την καρβοξυλομάδα ενός άλλου. Η ομάδα $-C-COOH-NH_2-C-$ ονομάζεται πεπτιδική ομάδα (**Εικόνα 2.3**). Το μόριο που προκύπτει ονομάζεται διπεπτιδίο και τα μέρη του που δημιουργούνται από τα αρχικά αμινοξέα με τις χαρακτηριστικές τους πλευρικές αλυσίδες R_1 και R_2 ονομάζονται αμινοξικά κατάλοιπα. Με τον τρόπο αυτό σχηματίζονται οι πεπτιδικές αλυσίδες (πολυπεπτιδικές αλυσίδες) οι οποίες στη συνέχεια συνδέονται κατάλληλα προκειμένου να δημιουργήσουν τα πρωτεϊνικά μόρια [120].

Μια πολυπεπτιδική αλυσίδα έχει κατεύθυνση, αφού έχει διαφορετικά άκρα, δηλαδή, το αμινο-άκρο και το καρβοξυλο-άκρο και ως αρχή, μιας πολυπεπτιδικής αλυσίδας, κατά συνθήκη θεωρείται το αμινο-άκρο. Αποτελείται από ένα κανονικά επαναλαμβανόμενο μέρος, την κύρια αλυσίδα και ένα μεταβλητό μέρος, τις χαρακτηριστικές πλευρικές αλυσίδες ή ομάδες των αμινοξικών καταλοίπων. Οι πρωτεΐνες μπορούν να αποτελούνται από μια πολυπεπτιδική αλυσίδα ή από δύο ή περισσότερες αλυσίδες, που μπορεί να είναι ίδιες ή διαφορετικές μεταξύ τους.



Εικόνα 2.3. (A) Δύο αμινοξέα ενώνονται με αμιδικό δεσμό και (B) δημιουργούν το πεπτιδίο [120].

2.3 Τα επίπεδα δομικής οργάνωσης του κολλαγόνου

2.3.1 Πρωτοταγής δομή

Η γραμμική διάταξη αμινοξέων σε μια πολυπεπτιδική αλυσίδα και συνεπώς η αλληλουχία αμινοξέων στο κολλαγόνο, αποτελούν την πρωτοταγή δομή του. Στο κολλαγόνο το κάθε τρίτο αμινοξύ είναι γλυκίνη και συχνά εμφανίζεται η αλληλουχία [121]:

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

Δηλαδή η πρωτοταγής δομή είναι: ... – Γλυ – X – Y – Γλυ – X – Y – ...

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

2.3.2 Δευτεροταγής δομή

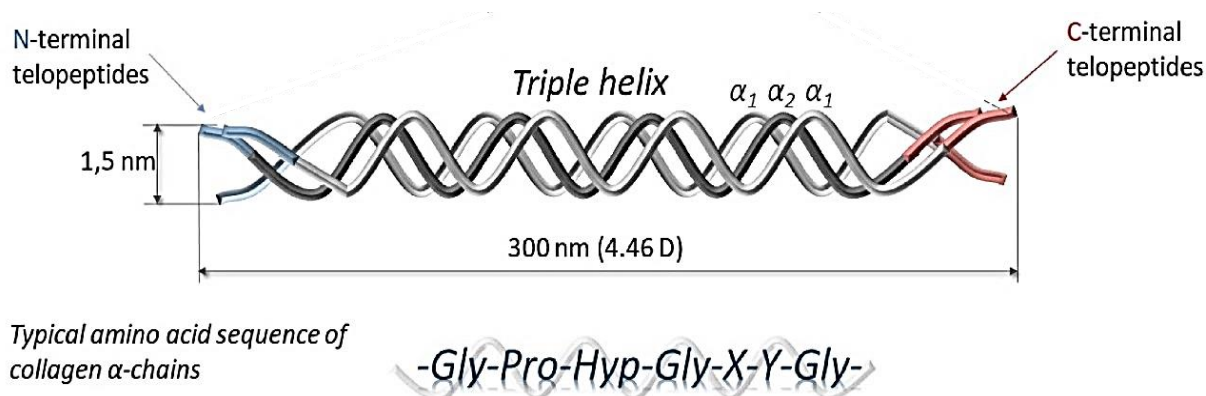
Η αναδίπλωση πεπτιδίων κολλαγόνου στο χώρο, για να σταθεροποιούνται οι αλληλεπιδράσεις μέσω της δημιουργίας πολυπεπτιδικής στερεοδομής αποτελεί τη δευτεροταγή δομή του. Για να συντηρείται η αναδίπλωση είναι απαραίτητη και η σύνδεση στο εσωτερικό της αλυσίδας με τη δημιουργία δεσμών υδρογόνου. Δότες υδρογόνου είναι οι ομάδες NH της γλυκίνης και δέκτες οι ομάδες C=O της προλίνης ή άλλου αμινοξέος.

2.3.3 Τριτοταγής δομή

Η πολυπεπτιδική αλυσίδα ως συμπαγές στερεό, που περιλαμβάνει τις δευτεροταγείς δομές σε 3D απεικόνιση των πολυπεπτιδικών αλυσίδων του κολλαγόνου, αποτελούν την τριτοταγή δομή του.

Η δομή αυτή χαρακτηρίζεται από την τριπλή έλικα των πολυπεπτιδικών αλυσίδων, που είναι διατεταγμένες, ώστε να δημιουργείται το μόριο του κολλαγόνου. Η βασική αυτή δομική μονάδα ονομάζεται τροποκολλαγόνο, που αποτελείται από τρεις πολυπεπτιδικές αλυσίδες ίδιου μεγέθους, των οποίων η σύνθεση εξαρτάται από τον τύπο του κολλαγόνου. Τα δύο άκρα του τροποκολλαγόνου είναι διαφορετικά μεταξύ τους. Δεν έχουν ελικοειδή διάταξη και παίζουν σημαντικό ρόλο στη δημιουργία των σταυροδεσμών μεταξύ των προκολλαγόνων. Οι τρεις ελικοειδείς πολυπεπτιδικές αλυσίδες τυλίγονται η μία γύρω από την άλλη σχηματίζοντας μια άκαμπτη υπερελικομένη δομή. Η τριπλή αυτή έλικα σταθεροποιείται με δεσμούς υδρογόνου, που αναπτύσσονται μεταξύ των τριών αλυσίδων (**Εικόνα 2.4**).

Επίσης, οι τρεις αλυσίδες της υπερέλικας συγκρατούνται και από δυνάμεις Van der Waals που αναπτύσσονται μεταξύ των υπόλοιπων ατόμων των αλυσίδων [122].



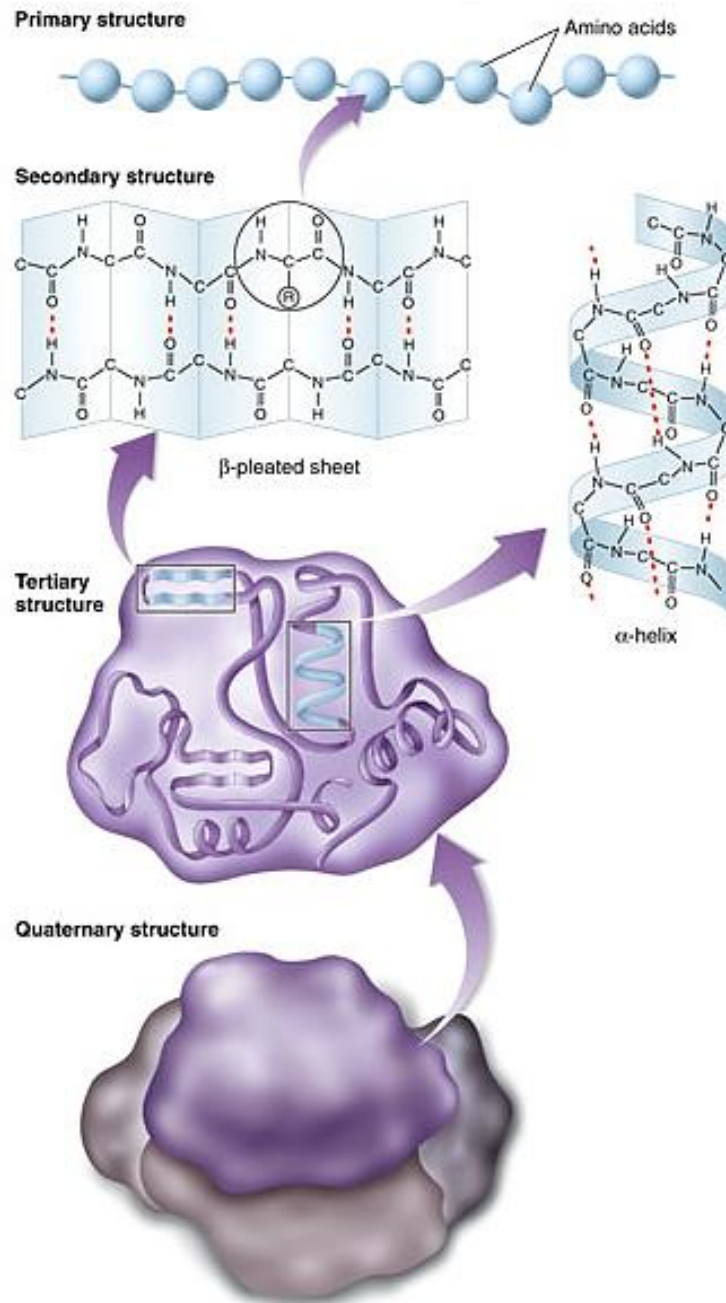
Εικόνα 2.4. Δομή τριπλής έλικας από 3 πολυπεπτιδικές αλυσίδες [136].

Η δημιουργία της τριπλής έλικας εξηγεί και την ύπαρξη της γλυκίνης ανά τρία αμινοξέα. Κάθε 3^ο αμινοξύ είναι γλυκίνη, καθώς στο εσωτερικό της έλικας δεν υπάρχει αρκετός χώρος για τις ογκώδεις δομές της προλίνης και της υδροξυπρολίνης. Η γλυκίνη είναι ένα σημαντικό αμινοξύ γιατί καταλαμβάνει μικρό χώρο, επιτρέποντας στις πολυπεπτιδικές αλυσίδες να πλησιάσουν τόσο κοντά η μία στην άλλη, δίνοντας έτσι στο κολλαγόνο την ιδιότητα της ανθεκτικότητας. Αξιοσημείωτο είναι ότι χρειάζεται φορτίο τουλάχιστον 10kg για να σπάσει μια ίνα κολλαγόνου διαμέτρου 1mm.

2.3.4 Τεταρτοταγής δομή

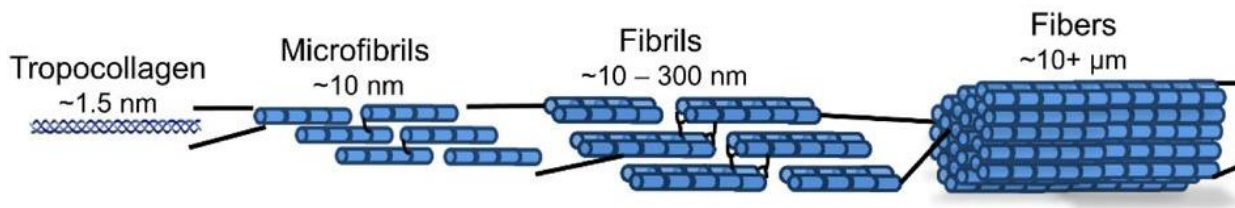
Η τακτοποίηση στο χώρο, πλήθους πολυπεπτιδικών αλυσίδων κολλαγόνου, δηλαδή δομών τροποκολλαγόνου, αποδεικνύουν την τεταρτοταγή δομή του. Οι σταυροδεσμοί μεταξύ των δομικών μονάδων τροποκολλαγόνου, χαρακτηρίζουν την τελική στερεοδομή, καθώς συγκρατούν μεταξύ τους τα μόρια σε μεγαλύτερες μονάδες.

Τα 4 επίπεδα δομικής οργάνωσης (πρωτοταγής, δευτεροταγής, τριτοταγής και τεταρτοταγής) του κολλαγόνου απεικονίζονται στην **Εικόνα 2.5**.



Εικόνα 2.5. Τα επίπεδα δομικής οργάνωσης (πρωτοταγής, δευτεροταγής, τριτοταγής και τεταρτοταγής) του κολλαγόνου [123].

Οι δομικές μονάδες τροποκολλαγόνου διατάσσονται ώστε να διαμορφώσουν μικροϊνίδια, ινίδια και τελικά ίνες κολλαγόνου. Συγκεκριμένα, 3 ελικοειδή πεπτίδια ενώνονται για να δημιουργήσουν τροποκολλαγόνο διαμέτρου περίπου 1,5nm. Έπειτα τα τροποκολλαγόνα δημιουργούν μικροϊνίδια με διάμετρο περίπου 10nm. Στη συνέχεια αυτοργανώνονται σε ινίδια τα οποία έχουν διάμετρο περίπου έως 300nm. Τέλος δημιουργούνται ίνες κολλαγόνου διαμέτρου περίπου 10 μ m (**Εικόνα 2.6**) [124].



Εικόνα 2.6. Τα μόρια κολλαγόνου αυτοδιαμορφώνονται για να δημιουργήσουν μικροϊνίδια, ινίδια και τελικά ίνες κολλαγόνου [124]

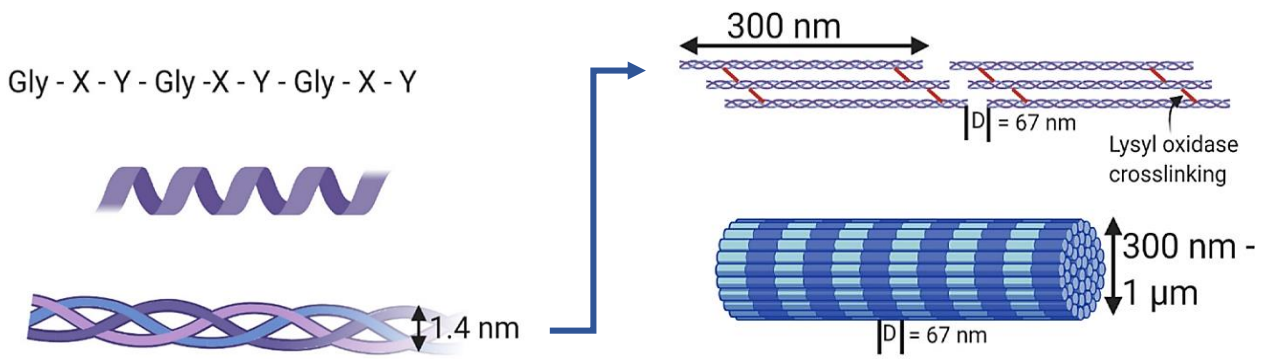
2.4 Δημιουργία κολλαγόνου τύπου I

Το κολλαγόνο συντίθεται σε ινοβλάστες συνδετικού ιστού σαν πεπτίδιο μεγαλύτερου μοριακού βάρους από το τροποκολλαγόνο, που λέγεται προκολλαγόνο. Εκτός από τις 3 αλυσίδες που δημιουργούν το τροποκολλαγόνο χρειάζονται και κάποια επιπλέον πεπτίδια, που λέγονται τελοπεπτίδια και βρίσκονται σε αλυσίδες που προϋπάρχουν των αλυσίδων του τροποκολλαγόνου. Αυτές οι προ-αλυσίδες ενώνονται και δημιουργήσουν το προκολλαγόνο, από το οποίο αναπτύσσονται τα προπεπτίδια για να δώσουν το τροποκολλαγόνο [125].

Αναλυτικά, στους ινοβλάστες η αλληλουχία των αμινοξέων δημιουργεί μια α-έλικα. Ακολουθεί υδροξυλίωση προλίνης ή λυσίνης για τη δημιουργία σταυροδεσμών και των τελικών ινιδίων. Η σταθερότητα του κολλαγόνου εξαρτάται από την περιεκτικότητα σε υδροξυπρολίνη. Συμβαίνει δηλαδή γλυκοζηλίωση μερικών υδροξυλυσινών παρουσία γλυκόζης και γαλακτόζης, που μπορεί να επηρεάσει το μέγεθος του ινιδίου.

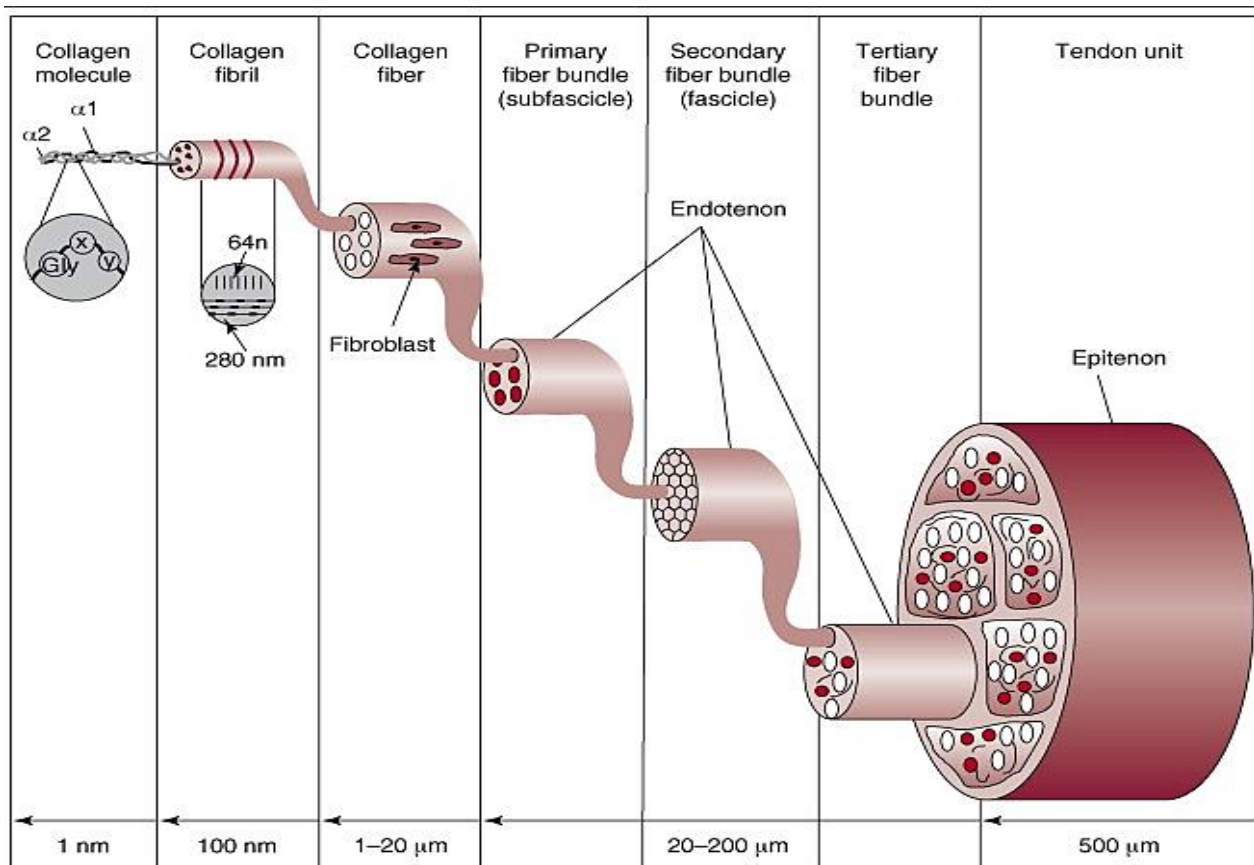
Δημιουργούνται, λοιπόν, τριπλές έλικες από πρόδρομες αλυσίδες και μόνο μια περιοχή στο N-άκρο και C-άκρο δε βρίσκεται σε μορφή έλικας. Οι δεσμοί αυτοί ονομάζονται πεπτίδια εγγραφής και είναι καθοριστικοί για τη δημιουργία του προκολλαγόνου. Ακολουθεί η έκκριση του προκολλαγόνου στο εξωκυτταρικό χώρο. Εκεί γίνεται αποχωρισμός των πεπτιδίων εγγραφής για δημιουργία μορίων τροποκολλαγόνου. Ακολουθεί η αυτοδιαμόρφωση μορίων τροποκολλαγόνου για τη δημιουργία ινιδίων κολλαγόνου. Οι σταυροδεσμοί που δημιουργούνται σταθεροποιούν τις ινώδεις κατασκευές. Οι τύποι των σταυροδεσμών εξαρτώνται από τον αριθμό των τροποκολλαγόνων [126]

Τα τροποκολλαγόνα της ίδιας σειράς απέχουν μεταξύ τους 40 nm, ενώ οι διαδοχικές σειρές μετακινούνται κατά 67 nm. Η δομή επαναλαμβάνεται κάθε 5 σειρές. Το κενό των 40 nm μεταξύ ενός τροποκολλαγόνου και του επόμενου είναι ο χώρος που χρειάζονται τα τελοπεπτίδια για την ανάπτυξη σταυροδεσμών [127]. Η απόσταση των 67 nm είναι η χαρακτηριστική περιοδικότητα (D – Band) του κολλαγόνου (Εικόνα 2.7).



Εικόνα 2.7. Αλληλουχία αμινοξέων δημιουργεί τη δευτεροταγή δομή της α-έλικας. Η τριπλή έλικα με τους σταυροδεσμούς δημιουργούν τα μικροϊνίδια με τη χαρακτηριστική περιοδικότητα 67 nm [127].

Η ιεραρχική δομή του κολλαγόνου συνεχίζεται έως να σχηματιστεί για παράδειγμα ένας τένοντας. Συγκεκριμένα οι ίνες κολλαγόνου που δημιουργήθηκαν σχηματίζουν δεσμίδες ινών, που περιβάλλονται από τον ενδοτένοντα (αραιός συνδετικός ιστός με νεύρα και αγγεία). Οι ενδοτένοντες περικλείονται από το επιτένοντα (περίβλημα χαλαρού συνδετικού ιστού) και σχηματίζουν τον τένοντα [128]. Οι τένοντες αποτελούνται από πυκνό ινώδη συνδετικό ιστό με μεγάλη ελαστικότητα και ανθεκτικότητα λόγω των σταυροδεσμών (**Εικόνα 2.8**).



Εικόνα 2.8. Σχηματική απεικόνιση της δομής του τένοντα: αποτελείται από μόρια κολλαγόνου, ινίδια, ίνες, συνδέσμους και μονάδες τενόντων [128].

2.5 Ειδικά χαρακτηριστικά κολλαγόνου

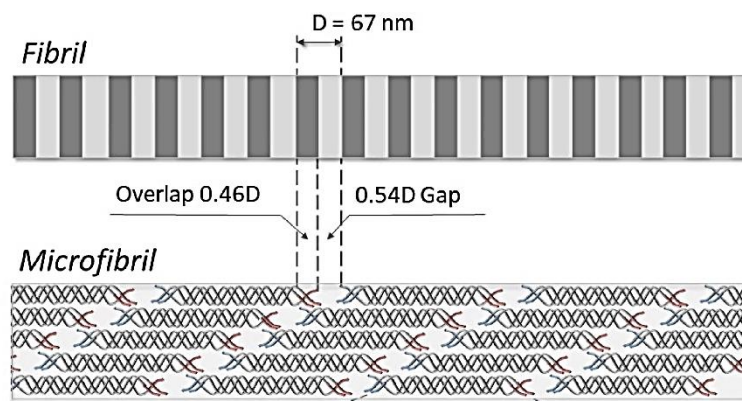
2.5.1 Σταυροδεσμοί κολλαγόνου

Τα τροποκολλαγόνα συνδέονται μέσω των σταυροδεσμών (cross-links). Το κολλαγόνο περιέχει δύο τύπους σταυροδεσμών, την ενζυματική και την έμμεση διαμόρφωση. Η έμμεση είναι γνωστή ως γλυκίωση και το μόνο ένζυμο που απαιτείται είναι η LOX [129-131].

Οι σταυροδεσμοί ενώνουν τις αλυσίδες μεταξύ τους και εμποδίζουν την κλειστή διαμόρφωσή τους. Η δύναμη των ινών κολλαγόνου εξαρτάται από τη διαμόρφωση σταυροδεσμών μεταξύ των τελοπεπτιδίων και των διπλανών τμημάτων των μορίων. Το κολλαγόνο τύπου I έχει 4 θέσεις σταυροδεσμών, μία σε κάθε τελοπεπτίδιο και δύο στην τριπλή έλικα [130]. Τυχόν ανωμαλία που εμποδίζει το σταυροδεσμό του κολλαγόνου, οδηγεί σε διάφορες ασθένειες, όπως το σύνδρομο Ehlers-Danlos και το σύνδρομο Marfan [132-134].

2.5.2 Περιοδικότητα (D-band) κολλαγόνου

Η μετατόπιση των μορίων τροποκολλαγόνου συνδέεται με την ύπαρξη της εναλλαγής των αμινοξέων κατά μήκος της τριπλής έλικας. Η περιοδικότητα αυτών των εναλλαγών είναι περίπου 67 nm. Για αυτό το λόγο, μόνο μέσω μετατοπίσεων των τροποκολλαγόνων κατά αποστάσεις των 67 nm εξασφαλίζονται οι απαραίτητες συνθήκες για το σχηματισμό ιοντικών δεσμών και δεσμών υδρογόνου μεταξύ των γειτονικών μορίων τροποκολλαγόνου. Η απόσταση μεταξύ δύο γειτονικών μορίων τροποκολλαγόνου κατά μήκος μίας γραμμής είναι 0.54D, όπου D ορίζεται η απόσταση των 67nm, που αποτελεί τη χαρακτηριστική D-περιοδικότητα [111, 135].



Εικόνα 2.9. Δομή μικροϊνιδίου κολλαγόνου με τη χαρακτηριστική D-band περιοδικότητα των 67 nm [136].

Η πολύπλοκη διάταξη και η χαρακτηριστική περιοδικότητα των 67 nm στο κολλαγόνο [137] επηρεάζεται δραματικά από ενδο-μικροϊνιδιακούς σταυροδεσμούς (intra- microfibrillar cross-links) μεταξύ των μορίων κολλαγόνου σε μια ίνα [122]. Επομένως, η διάταξη και η απόσταση μεταξύ των μορίων κολλαγόνου, εντός ενός ινιδίου κολλαγόνου, εξαρτάται από την ανάπτυξη των σταυροδεσμών.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3.

ΜΙΚΡΟΣΚΟΠΙΟ ΑΤΟΜΙΚΗΣ ΔΥΝΑΜΗΣ

3.1 Εισαγωγή

Η ιστορία της νανοτεχνολογίας αν και μετράει μερικές μόνο δεκαετίες, έχει σημαντικές ανακαλύψεις που διαδραμάτισαν καθοριστικό ρόλο στην εξέλιξη αυτού του ερευνητικού πεδίου. Συγκεκριμένα, το 1981, οι Gerd Binnig και Heinrich Rohrer ανακάλυψαν στα εργαστήρια της IBM (International Business Machines Corporation) της Ζυρίχης, το Μικροσκόπιο Σάρωσης με Φαινόμενο Σήραγγας (Scanning Tunneling Microscope – STM), για αυτό και τιμήθηκαν με το βραβείο Νόμπελ. Σε συνέχεια αυτής της επιτυχίας ήρθε η ανακάλυψη του Μικροσκοπίου Ατομικής Δύναμης (Atomic Force Microscope – AFM), το 1985 από τους Binnig, Quate και Gerber στα ίδια εργαστήρια [138].

Στη νανοτεχνολογία μελετώνται οι ιδιότητες αντικειμένων που έχουν μία τουλάχιστον διάσταση μικρότερη των 100nm. Στη νανοτεχνολογία, οι διαστάσεις των υλικών διαδραματίζουν καθοριστικό ρόλο για το χαρακτηρισμό των ιδιοτήτων τους. Σε τόσο μικρές διαστάσεις τα υλικά έχουν διαφορετικές φυσικές ιδιότητες ή διέπονται από διαφορετικά φυσικά φαινόμενα συγκριτικά με τη μακροκλίμακα (λόγω της αύξησης του πηλίκου επιφάνεια/όγκος) [139].

Οι νέες εφαρμογές της νανοτεχνολογίας στην ιατρική γίνονται μέσω της νανοϊατρικής [140]. Μέσω της οποίας, νανοτεχνολογία και ιατρική ενώνονται έτσι ώστε οι ιατρικές τεχνικές, οι θεραπείες και τα υλικά να μπορέσουν να βελτιωθούν [141]. Η μεγάλη πρόκληση της ιατρικής του σήμερα είναι η ανάπτυξή της με τη βοήθεια της νανοτεχνολογίας προς τους τομείς της διάγνωσης, της θεραπείας και της αναγεννητικής ιατρικής [142].

Το AFM είναι μια μη καταστρεπτική επιφανειακή τεχνική. Με τη μέθοδο αυτή μπορούμε να ανιχνεύσουμε την επιφάνεια ενός δείγματος με τη βοήθεια μιας οξείας ακίδας, μήκους λίγων μικρομέτρων και διαμέτρου μικρότερης από 10nm. Η ακίδα είναι τοποθετημένη στο ελεύθερο άκρο ειδικής βάσης που έχει μήκος 100 – 200μm. Οι δυνάμεις που αναπτύσσονται μεταξύ της επιφάνειας και της ακίδας προκαλούν στη βάση της ακίδας μια απόκλιση. Αυτές οι αποκλίσεις με τη χρήση ενός laser μπορούν να μετρηθούν από έναν ανιχνευτή και με ένα υπολογιστή να δημιουργήσουν ένα χάρτη της επιφάνειας. Η συγκεκριμένη τεχνική χρησιμοποιείται για τη μελέτη τοπογραφίας επιφανειών μεγάλου εύρους δειγμάτων όπως μονωτές, ημιαγωγοί, καθώς επίσης και ηλεκτρικά αγωγίμων υλικών, ενώ έχει γίνει και ένα πολύ ισχυρό όργανο για τη μελέτη βιολογικών δειγμάτων [113].

Οι βιολογικές εφαρμογές που στηρίζονται στο AFM περιλαμβάνουν μελέτες σε DNA, πρωτεΐνες, ιούς, κύτταρα, ιστούς και όργανα. Το AFM μπορεί να χρησιμοποιηθεί σαν ένας αισθητήρας δυνάμεων για να εκτιμηθεί η αντοχή των δεσμών μεταξύ διαφορετικών βιολογικών μορίων και να βοηθήσει στον προσδιορισμό μηχανικών ιδιοτήτων σε νανοκλίμακα [143].

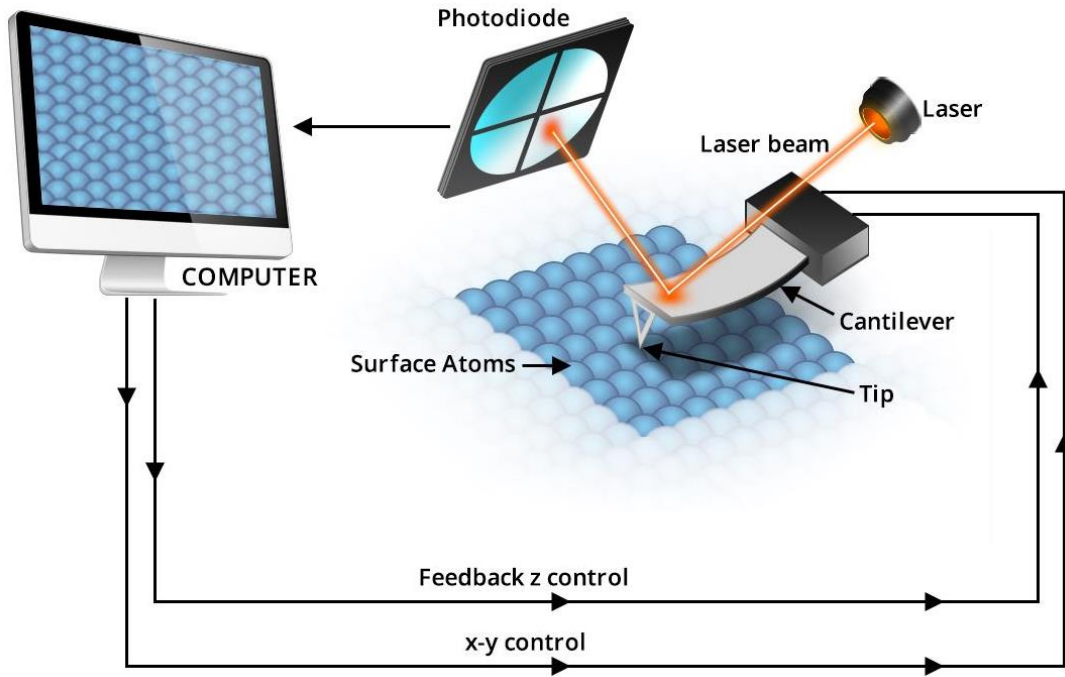
Το AFM παρέχει πληροφορίες για παρατήρηση βιολογικών δειγμάτων σε νανοκλίμακα για δομικές, δυναμικές και μηχανικές ιδιότητες. Μελλοντικές έρευνες λοιπόν, θα κινηθούν προς τον προσδιορισμό με υψηλή-ανάλυση της δομής, τη μελέτη μηχανικών ιδιοτήτων και τον προσδιορισμό της αλληλεπίδρασης δυνάμεων, αλλά και την παρακολούθηση βιολογικών διαδικασιών και δυναμικής. Ερευνητές έχουν εργαστεί σε υψηλή ανάλυση για τη δομή των πρωτεϊνών και του DNA [144-147].

Χρησιμοποιούνται μέθοδοι που περιλαμβάνουν τη χρήση cryo-AFM για να αυξήσουν την ακαμψία και τη σταθερότητα των δειγμάτων. Προσπαθούν να ερευνήσουν μόρια σε επιφάνεια για να μετρήσουν μηχανικές ιδιότητες μεμονωμένου μορίου. Ως εκ τούτου μπορεί να χρησιμοποιηθεί το AFM ως βιοαισθητήρας στην ιατρική για να προσδιοριστούν οι χημικοί ή βιολογικοί παράμετροι στα προς μελέτη δείγματα. Τέλος, η ικανότητα απεικόνισης δειγμάτων σε υδάτινο περιβάλλον, αξιοποιείται για να καταγραφούν βιολογικές διαδικασίες, δυναμικής και μακρομοριακής συγκέντρωσης που συμβαίνουν σε πραγματικό χρόνο [148-150].

3.2 Διάταξη Μικροσκοπίου Ατομικής Δύναμης

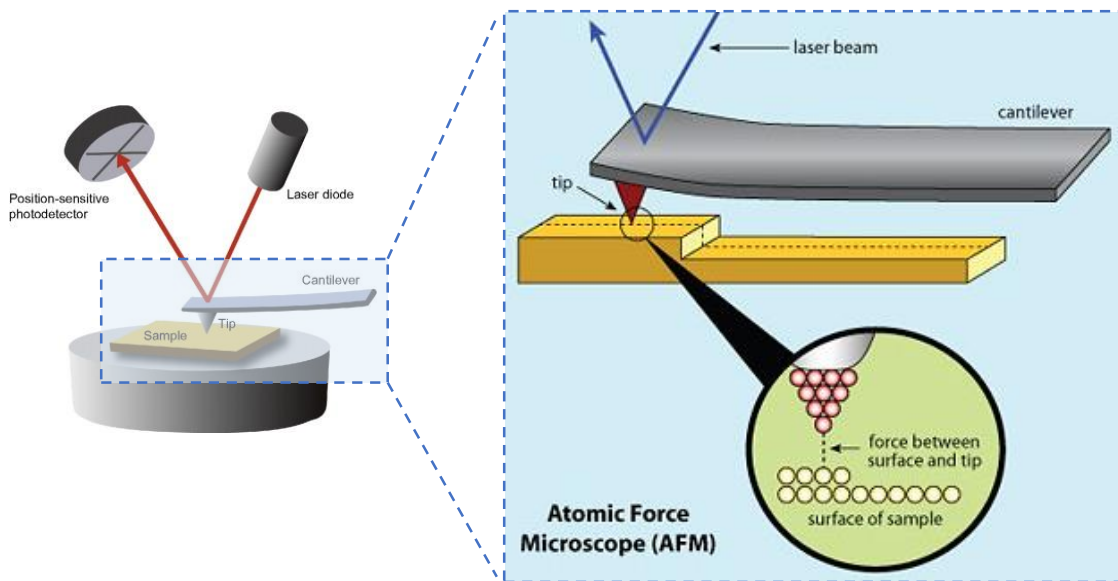
Το Μικροσκόπιο Ατομικής Δύναμης (AFM), είναι ένας τύπος μικροσκοπίου σάρωσης με χρήση ακίδας υψηλής ανάλυσης (SPM-Scanning Probe Microscopy), το οποίο παρέχει εικόνες επιφανειών χρησιμοποιώντας έναν προβολό με ακίδα, που σαρώνει την επιφάνεια και μας δίνει εικόνες ανάλυσης της τάξης των νανομέτρων, 1000 φορές καλύτερη από το οπτικό όριο ανάλυσης. Το AFM είναι ένα από σημαντικότερα εργαλεία για απεικόνιση υλικών στη νανοκλίμακα.

Το AFM στηρίζεται στη σάρωση που εκτελεί μια λεπτή κεραμική ή από ημιαγώγιμο υλικό ακίδα (tip), πάνω από μια επιφάνεια. Η αιχμή της ακίδας τοποθετείται στην άκρη ενός προβολού (cantilever) που μπορεί να ταλαντεύεται, ενώ είναι στερεωμένος στο άλλο άκρο. Καθώς η ακίδα έλκεται ή απωθείται από την επιφάνεια που σαρώνει, ο προβολός αυτός αποκλίνει. Το μέγεθος της απόκλισης καταγράφεται από μια δέσμη laser η οποία ανακλάται σε γωνία από το άκρο του προβολού που ταλαντώνεται [151]. Το γράφημα της απόκλισης της δέσμης laser σε σχέση με τη θέση της ακίδας πάνω στην επιφάνεια του δείγματος, δίνει την ανάλυση της μορφολογίας της επιφάνειας του (Εικόνα 3.1).



Εικόνα 3.1. Σχηματική απεικόνιση συστήματος AFM: Η ακίδα στην άκρη του προβόλου, σαρώνει την επιφάνεια του δείγματος και μία δέσμη laser ανακλάται στην ελεύθερη άκρη του προβόλου ακολουθώντας την κίνηση της ακίδας. Οι αποκλίσεις της ανακλώμενης δέσμης laser καταγράφονται από έναν φωτοανιχνευτή και προκύπτει η χαρτογράφηση της επιφάνειας του δείγματος [152].

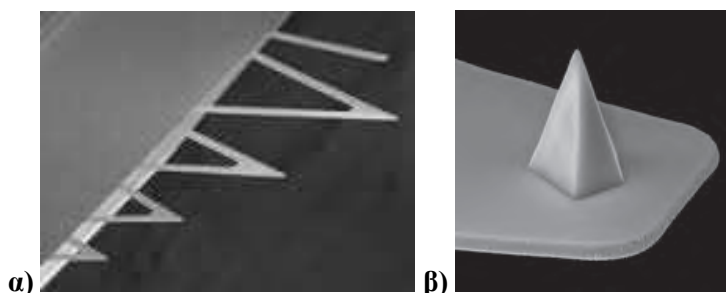
Με τις μεταβολές που καταγράφονται από το AFM παρατηρούνται η σκληρότητα της επιφάνειας αλλά και η τάση προσκόλλησης της ακίδας στην επιφάνεια. Πετυχαίνεται διακριτική ικανότητα επί της επιφάνειας από Angstroms μέχρι μερικά μικρά του μέτρου. Μεγέθυνση του προβολού και της ακίδας AFM απεικονίζεται στην **Εικόνα 3.2**.



Εικόνα 3.2. Μεγέθυνση προβολού και ακίδας AFM [153].

3.3 Αρχή λειτουργίας AFM

Στο AFM η ακίδα που σαρώνει το δείγμα είναι στερεωμένη στον πρόβολο, ο οποίος έχει καθορισμένη σταθερά ελατηρίου. Ο πρόβολος στηρίζεται σε μια ειδική βάση στήριξης και ανάλογα με το είδος του οργάνου, είτε το δείγμα, είτε ο προβολός διατηρείται σταθερός και το άλλο μετακινείται με τα πιεζοηλεκτρικά στοιχεία [154]. Η σταθερά ελατηρίου του προβολού, ανάλογα με την εφαρμογή και τη μέθοδο απεικόνισης, έχει τιμές από 0,01 N/m έως 100 N/m. Η επιλογή της κατάλληλης σταθεράς ελατηρίου επιτρέπει τον έλεγχο των δυνάμεων που ασκούνται στην επιφάνεια. Στις βιολογικές εφαρμογές χρησιμοποιούνται πρόβολοι με χαμηλές σταθερές ελατηρίου από 0,01 N/m έως 5 N/m. Οι περισσότεροι πρόβολοι είναι κατασκευασμένοι από νιτρίδιο του πυριτίου, που έχει σχετικά μικρή πυκνότητα και μεγάλη ακαμψία. Επίσης, χρησιμοποιούνται πρόβολοι τριγωνικού σχήματος (Εικόνα 3.3) για το περιορισμό της στρέψης του προβολού σε επιφάνειες δειγμάτων με υψηλή τραχύτητα [155].



Εικόνα 3.3. α) Απεικόνιση προβόλων τριγωνικού σχήματος με ηλεκτρονική μικροσκοπία σάρωσης (SEM). β) Απεικόνιση ακίδας με SEM [156].

Στο μικροσκόπιο AFM μπορούν να μετρηθούν οι δυνάμεις που αναπτύσσονται μεταξύ της ακίδας που βρίσκεται στο άκρο ελάσματος και της επιφάνειας του δείγματος. Αυτό επιτυγχάνεται από την εκτροπή του προβολού, ο οποίος για μικρές παραμορφώσεις συμπεριφέρεται ως ιδανικό ελατήριο. Από το νόμο του *Hooke* στα ιδανικά ελατήρια προσδιορίζεται η σχέση μεταξύ δύναμης (F) και παραμόρφωσης (Δx) ενός ελατηρίου. Επομένως, το μέτρο δύναμης δίνεται από τη σχέση :

$$F = k \cdot \Delta x \quad (1)$$

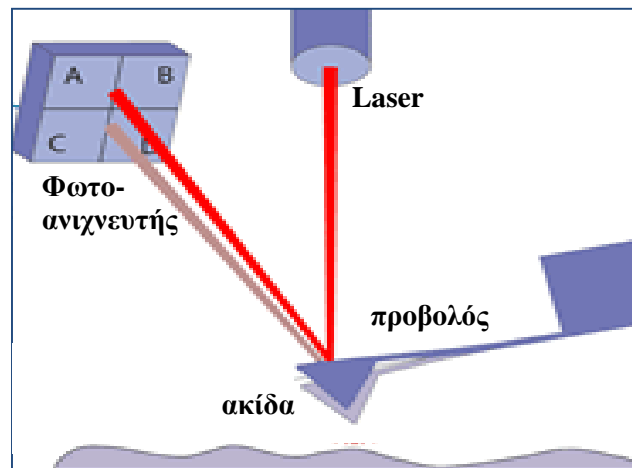
Οι δυνάμεις αυτές εμφανίζονται ανεξάρτητα με το αν η μελετώμενη επιφάνεια είναι αγωγή ή μη και οι τιμές τους κυμαίνονται από 10^{-11} N έως 10^{-6} N. Ιδιαίτερης σημασίας είναι η κατασκευή του προβολού για ικανοποιητική παραμόρφωση με δυνάμεις (της τάξης των pN) και σταθερά ελατηρίου με μικρές τιμές. Ταυτόχρονα, όμως θα πρέπει η συχνότητα συντονισμού (ω_0) να είναι μεγάλη, προς αποφυγή κραδασμών.

Γνωρίζοντας και τη σχέση:

$$\omega_o = \sqrt{\frac{k}{m}} \quad (2)$$

Παρατηρείται ότι χρειάζεται πολύ μικρή μάζα (m), άρα και πολύ μικρές γεωμετρικές διαστάσεις, όπως αυτές των δειγμάτων στο AFM [143].

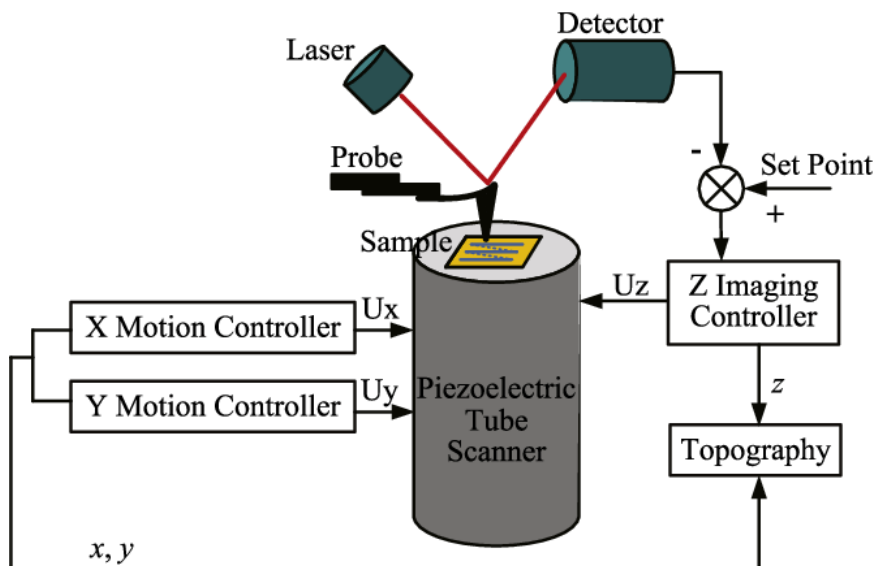
Κατά την κίνηση του προβόλου μια δέσμη laser ανακλάται στην πίσω επιφάνεια του και ανιχνεύεται από ένα φωτοανιχνευτή. Για διαφορετικές θέσεις του προβόλου το laser προσπίπτει και σε διαφορετικές περιοχές του φωτοανιχνευτή. Ο οποίος ανιχνεύει τις χωρικές μεταβολές της έντασης του προσπίπτοντος φωτός. Ο φωτοανιχνευτής χωρίζεται σε τεταρτημόρια και αποτελείται από δύο μέρη, το «πάνω» (τμήματα A και B) και το «κάτω» (τμήματα C και D) (Εικόνα 3.4). Καθώς το laser προσπίπτει σε αυτόν, η διαφορά ηλεκτρικής τάσης μεταξύ των δύο αυτών περιοχών αποτελεί μέτρο της παραμόρφωσης του ελάσματος κατά τον Z άξονα του [157].



Εικόνα 3.4. Η δέσμη laser έχει εστιαστεί στην ακίδα του προβολού για βέλτιστο σήμα στο φωτοανιχνευτή του AFM [157].

Επιπροσθέτως, σημαντικό τμήμα του AFM είναι τα πιεζοηλεκτρικά του στοιχεία, που επιτρέπουν την ακριβή κίνηση της ακίδας σε σχέση με την επιφάνεια. Τα πιεζοηλεκτρικά είναι κεραμικά υλικά, που μια από τις διαστάσεις τους αλλάζει όταν εφαρμοστεί ηλεκτρική τάση στα άκρα του.

Το δείγμα στηρίζεται πάνω σε ένα πιεζοηλεκτρικό στοιχείο, το οποίο είναι ικανό να κινηθεί στις τρεις διαστάσεις (X, Y, Z). Η σάρωση πραγματοποιείται από το πιεζοηλεκτρικό στοιχείο μέσω της X-Y κίνησης, ενώ η κίνηση στο Z άξονα γίνεται για να διατηρηθεί σταθερή η αλληλεπίδραση μεταξύ ακίδας και επιφάνειας δείγματος (Εικόνα 3.5) [158].



Εικόνα 3.5. Σάρωση AFM από το πιεζοηλεκτρικό μέσω της κίνησης στους άξονες X-Y-Z [159].

3.4 Τρόποι λειτουργίας μικροσκοπίου AFM

Το AFM έχει διάφορους τρόπους λειτουργίας. Με το μηχανισμό ανάδρασης διατηρείται σταθερή η δύναμη, αλλά και η παραμόρφωση του ελάσματος, καθώς η σχέση τους είναι γραμμική (εξίσωση 1). Ο μηχανισμός ανάδρασης εξυπηρετεί στο να διατηρεί την τάση που δίνεται από το φωτοανιχνευτή σταθερή με το να μετακινεί το δείγμα ή το έλασμα κατά τον κατακόρυφο άξονα με τη βοήθεια πιεζοηλεκτρικού κρυστάλλου. Καθώς η ακίδα μετακινείται στο παράλληλο της επιφάνειας επίπεδο, αυτή ακολουθεί την τοπογραφία της επιφάνειας. Ο τρόπος λειτουργίας αυτός ονομάζεται λειτουργία σταθερής ανάκλασης (Constant Cantilever Deflection Mode) ή αλλιώς λειτουργία σταθερής δύναμης (Constant Force Mode).

Άλλος τρόπος λειτουργίας είναι η διατήρηση μιας σταθερής απόστασης μεταξύ ακίδας και επιφάνειας. Οι αλλαγές υπόκεινται στη δύναμη (δηλαδή στην παραμόρφωση του ελάσματος) και ονομάζεται λειτουργία σταθερού ύψους (Constant Height Mode) [160].

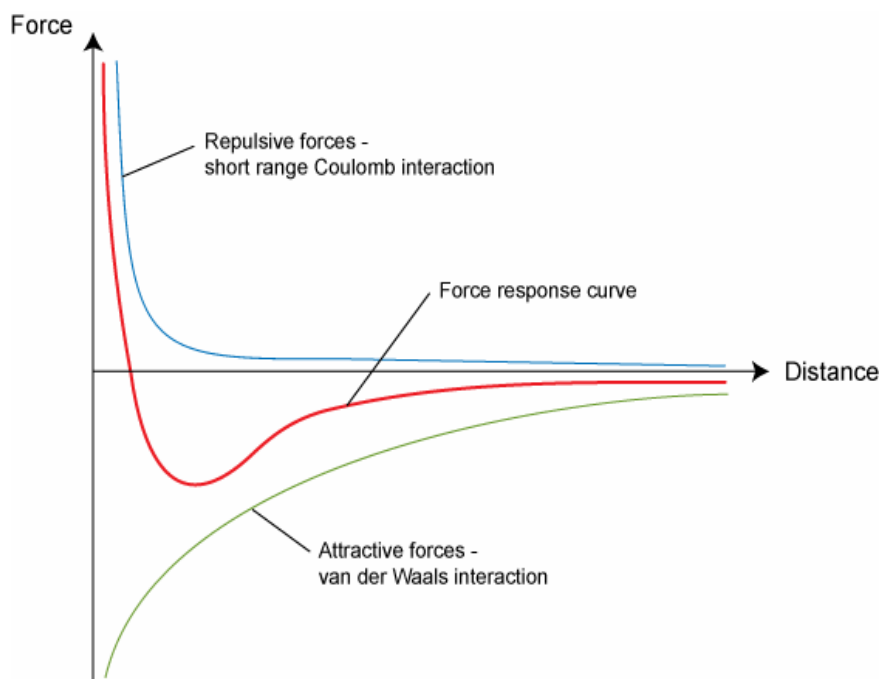
Ένας τρίτος τρόπος είναι να τεθεί η ακίδα σε ταλάντωση, καθώς αυτή σαρώνει την επιφάνεια. Κατά την κίνηση αυτή το πλάτος και η φάση της ταλάντωσης θα μεταβληθούν. Διατηρώντας σταθερό το πλάτος, μπορεί να παρατηρηθεί η χημική σύσταση του δείγματος, ενώ αλλαγές στη φάση δίνουν πληροφορίες για τα χημικά είδη από τα οποία αποτελείται η επιφάνεια.

3.5 Μέθοδοι Απεικόνισης AFM

Το AFM λειτουργεί με διαφορετικές μεθόδους (modes) ανάλογα με το αν χρησιμοποιούνται οι μικρής εμβέλειας απωστικές δυνάμεις, που αναπτύσσονται όταν η απόσταση ακίδας – δείγματος είναι <1 nm ή οι μεγάλης εμβέλειας ελκτικές δυνάμεις

van der Waals, που αναπτύσσονται όταν η απόσταση ακίδας δείγματος δεν υπερβαίνει τα 100 nm) [161].

Όταν η ακίδα και η επιφάνεια του δείγματος πλησιάζουν, αρχικά, για μεγάλες αποστάσεις θα υπάρξουν ελκτικές δυνάμεις, ενώ για μικρές αποστάσεις (<1nm) θα υπάρξουν απωστικές δυνάμεις από μικρής εμβέλειας. Καθώς η απόσταση μεταξύ τους μειώνεται, αρχίζουν να αναπτύσσονται ελκτικές δυνάμεις αλληλεπίδρασης (van der Waals). Καθώς η μεταξύ τους απόσταση συνεχίζει να μειώνεται, αρχίζουν να αναπτύσσονται απωστικές δυνάμεις Coulomb. Στο σημείο ελαχιστοποίησης της δυναμικής ενέργειας η συνισταμένη δύναμη αλληλεπίδρασης μηδενίζεται. Στη συνέχεια οι απωστικές δυνάμεις επικρατούν. Στην **Εικόνα 3.6.** παρουσιάζεται η γραφική παράσταση των δυνάμεων αλληλεπίδρασης της ακίδας σε συνάρτηση με την απόσταση της από την επιφάνεια του δείγματος [154].



Εικόνα 3.6. Διάγραμμα δύναμης αλληλεπίδρασης της ακίδας σε συνάρτηση με την απόσταση της από την επιφάνεια δείγματος: ελκτικές δυνάμεις αλληλεπίδρασης (van der Waals) [πράσινη γραμμή], απωστικές δυνάμεις Coulomb [μπλε γραμμή], η συνισταμένη δύναμη αλληλεπίδρασης [κόκκινη γραμμή] [162].

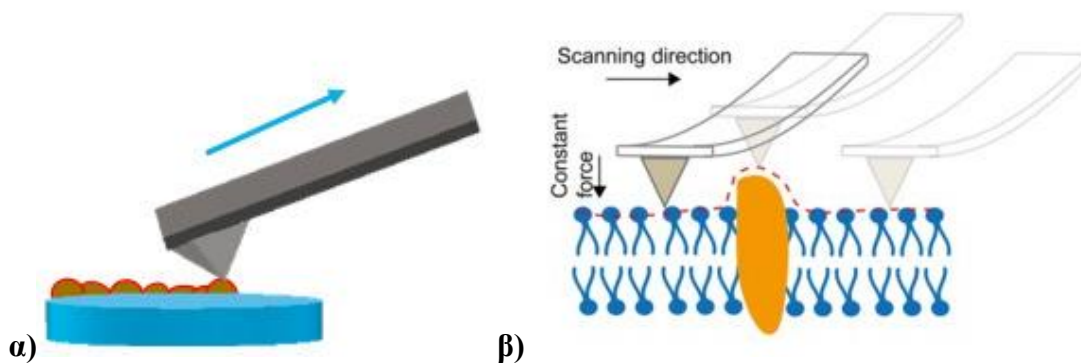
Οι πιο διαδεδομένες μέθοδοι λειτουργίας σε ένα μικροσκόπιο AFM είναι τρεις. Η μέθοδος με επαφή, δηλαδή με την ακίδα να έρχεται συνεχώς σε επαφή με το δείγμα κατά τη σάρωση. Η μέθοδος με ενδιάμεση επαφή, δηλαδή με την ακίδα να ταλαντώνεται και να ακουμπάει ελαφρώς την επιφάνεια. Και η μέθοδος μη επαφής (non-contact mode), ανήκει στις ονομαζόμενες δυναμικές μεθόδους, όπως και η λειτουργία ενδιάμεσης επαφής

3.5.1 Μέθοδος Επαφής

Η απεικονιστική μέθοδος συνεχούς επαφής (contact mode) ήταν το είδος της απεικόνισης που χρησιμοποιήθηκε πρώτο και είναι αυτό που χρησιμοποιείται πιο συχνά [144]. Σε αυτή τη λειτουργία επιτυγχάνεται φυσική επαφή μεταξύ της άκρης της ακίδας και της επιφάνειας του δείγματος (**Εικόνα 3.7**) και επικρατούν οι απωστικές δυνάμεις μικρής εμβέλειας [161]. Τα δεδομένα με αυτή τη μέθοδο μπορούν να συλλεχθούν με δύο τρόπους.

Με την λειτουργία σταθερής δύναμης, καθώς η ακίδα σαρώνει σε οριζόντιες γραμμές το δείγμα, ένας βρόχος ανάδρασης κρατά σταθερή την εκτροπή του προβόλου. Σε αυτή τη μέθοδο, η ακίδα προσεγγιστικά χαρτογραφεί την τοπογραφία του δείγματος και κρατά σταθερή τη δύναμη στο δείγμα. Κατά τη σάρωση, διατηρείται σταθερή η δύναμη και αυτό επιτυγχάνεται διατηρώντας σταθερό την κάμψη του πρόβολου. Αυξομειώσεις στην πίεση του δείγματος σημαίνουν ότι μια πραγματική ανακατασκευή της επιφανειακής τοπογραφίας με τη μέθοδο σταθερής δύναμης είναι αδύνατη.

Στη μέθοδο σταθερού ύψους, η ακίδα βρίσκεται συνεχώς στο ίδιο ύψος κατά τη διάρκεια της σάρωσης με απενεργοποιημένη την ανάδραση. Η τοπογραφία λαμβάνεται με απεικόνιση της εκτροπής του προβόλου. Η εκτροπή του αλλάζει ανάλογα με την τοπογραφία του δείγματος. Η πληροφορία της τοπογραφίας του δείγματος κωδικοποιείται στο φωτοανιχνευτή, που μετράει την κάμψη του προβόλου. Το πλεονέκτημα της μεθόδου είναι η ευαισθησία στον άξονα z και το μειονέκτημα ότι η δύναμη που εφαρμόζεται στο δείγμα αυξάνει με την αύξηση της εκτροπής του προβόλου και αυτό μπορεί να προκαλέσει ζημιά στην ακίδα και στο δείγμα. Η λειτουργία αυτή μπορεί να χρησιμοποιηθεί μόνο για πολύ επίπεδα και σκληρά δείγματα [160].



Εικόνα 3.7. Μέθοδος συνεχούς επαφής: (α)[163], (β) [164]. Η ακίδα βρίσκεται σε συνεχή επαφή με την επιφάνεια του δείγματος κατά τη διάρκεια της σάρωσης.

Στη λειτουργία επαφής, για απεικόνιση βιολογικών δειγμάτων, χρησιμοποιούνται πρόβολοι με μικρές σταθερές ελατηρίου ($k < 1\text{N/m}$). Η πλευρική κίνηση της ακίδας κατά τη σάρωση της επιφάνειας, δημιουργεί πλευρικές δυνάμεις πάνω στο δείγμα με καταστροφικά αποτελέσματα σε δείγματα. Μέσω της μεθόδου

επαφής είναι δυνατή η ταυτόχρονη λήψη εικόνων τοπογραφίας και εικόνων τριβής ή πλευρικής απεικόνισης [143].

Μπορεί να μελετηθεί η χημική σύσταση του δείγματος παρακολουθώντας την κίνηση της ακίδας, καθώς βρίσκεται σε συνεχή επαφή με την επιφάνεια. Το έλασμα παραμορφώνεται ανάλογα με τη δύναμη τριβής που αναπτύσσεται και είναι διαφορετική για κάθε χημικό είδος δεδομένου. Για αυτή τη λειτουργία, απαιτείται η επιφάνεια να είναι σχεδόν επίπεδη.

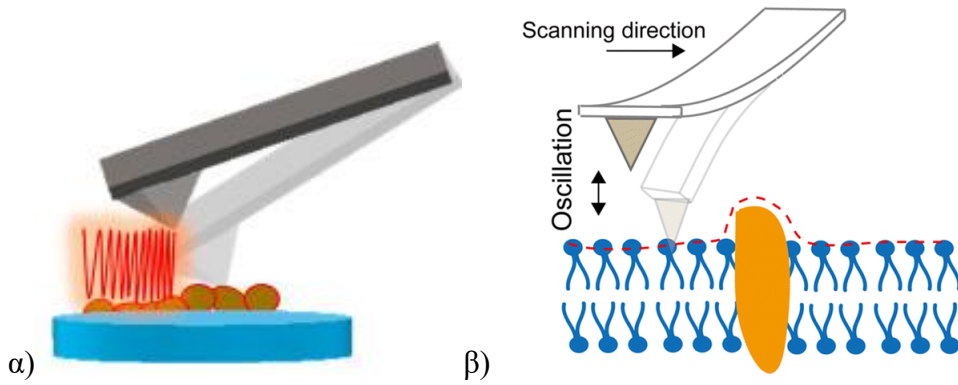
3.5.2 Μέθοδος ενδιάμεσης επαφής

Η απεικονιστική μέθοδος ενδιάμεσης επαφής (tapping mode) είναι μια από τις πιο διαδεδομένες μεθόδους απεικόνισης του AFM μικροσκοπίου σε βιολογικά δείγματα. Η λειτουργία βασίζεται στην επίδραση συγκεκριμένης δύναμης στον πρόβολο, όταν η αιχμή έρχεται εξαιρετικά κοντά στην επιφάνεια, δηλαδή μέσω δυνάμεων Van der Waals.

Η κεφαλή σάρωσης του AFM που είναι γνωστή ως πρόβολος, είναι γενικά ένας λεπτός ορθογώνιος μοχλός μήκους μερικών εκατοντάδων μικρομέτρων και μερικών μικρομέτρων πλάτους. Το ένα άκρο του προβόλου είναι στερεωμένο σε μία άκαμπτη βάση, η οποία συνήθως ονομάζεται «chip», συνδεδεμένη με τη βάση στήριξης της ακίδας. Στο άλλο άκρο ο πρόβολος είναι τελείως ελεύθερος. Στη μέθοδο ενδιάμεσης επαφής ο πρόβολος αφήνεται ελεύθερος να ταλαντωθεί (πάνω-κάτω) στη συχνότητα συντονισμού του. **(Εικόνα 3.8)**. Με τη μέθοδο αυτή παρέχεται μια εικόνα από την απεικόνιση της δύναμης της ταλαντευμένης αιχμής με την επιφάνεια του δείγματος.

Το πλάτος ταλάντωσης, η συχνότητα ταλάντωσης, η μετατόπιση της φάσης και η απόκλιση του προβόλου ευθύνονται για τις αλληλεπιδράσεις μεταξύ ακίδας και επιφάνειας. Μπορεί να χρησιμοποιηθούν σαν παράμετροι ανάδρασης ώστε να ανιχνευθεί η τοπογραφία της επιφάνειας [158]. Σε αυτή τη λειτουργία το πλάτος ταλάντωσης ρυθμίζεται ώστε η ακίδα να έρχεται σε επαφή με την επιφάνεια μόνο κατά το τέλος μιας πλήρους ταλάντωσης. Η ακίδα αυτή δέχεται ελκτικές και απωστικές δυνάμεις [154].

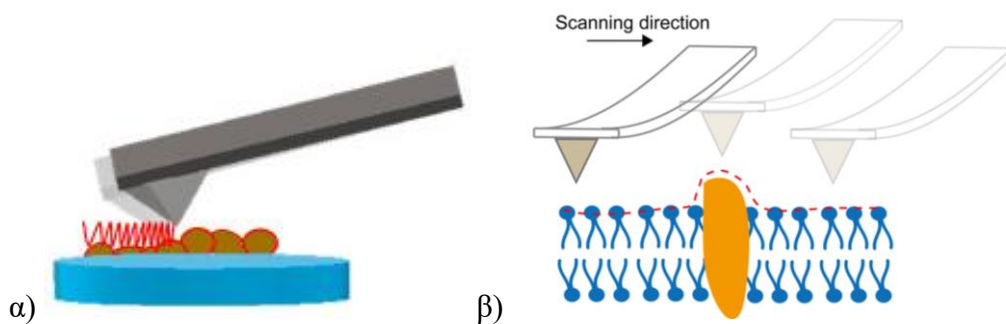
Τα κυριότερα πλεονεκτήματα αυτής της μεθόδου είναι η μείωση των πλευρικών δυνάμεων που μπορεί να κινήσουν ή να καταστρέψουν το δείγμα. Χρησιμοποιούνται σχετικά σκληροί πρόβολοι, με σταθερά ελατηρίου της τάξης των ~1-50 N/m. Ο πρόβολος πρέπει να έχει μεγάλη δυναμική ενέργεια για να υπερνικήσει τις δυνάμεις που ασκούνται λόγω τριχοειδών φαινομένων στην επιφάνεια. Αυτή η μέθοδος έχει προσαρμοστεί για απεικόνιση σε υγρά και είναι κατάλληλη για απεικόνιση βιολογικών δειγμάτων ασθενώς απορροφημένων από την επιφάνεια [160]. Ωστόσο η κάθετη δύναμη μπορεί να έχει μια απόλυτη τιμή συγκρίσιμη με αυτή στην contact mode, ειδικά στα υγρά, όπου η δύναμη προσκόλλησης απουσιάζει [165]. Εξαιτίας, λοιπόν, της μείωσης της πλευρικής δύναμης, αυτή η μέθοδος χρησιμοποιείται περισσότερο για απεικόνιση ευαίσθητων βιολογικών δειγμάτων στον αέρα και στα υγρά, καθώς επιτρέπει τη μη καταστρεπτική απεικόνισή τους.



Εικόνα 3.8. Μέθοδος ενδιάμεσης επαφής επαφής: (α)[163], (β) [164]. Η ακίδα ταλαντώνεται στη συχνότητα συντονισμού και ακουμπάει ελαφρά την επιφάνεια του δείγματος κατά τη διάρκεια της σάρωσης.

3.5.3 Μέθοδος μη επαφής

Η λειτουργία μη-επαφής (non-contact mode) όπου η ακίδα δέχεται μόνο ελκτικές δυνάμεις σε απόσταση 1nm-10nm πάνω από την επιφάνεια. Στη λειτουργία αυτή η ακίδα δε βρίσκεται σε επαφή με το δείγμα, αλλά μερικά νανόμετρα μακριά. Αρκετά μακριά από την επιφάνεια ο πρόβολος ταλαντώνεται στη συχνότητα συντονισμού του, μέσω της εφαρμογής εναλλασσόμενης τάσης στο Z-πιεζοηλεκτρικό. Η ακίδα πλησιάζει το δείγμα, οπότε το πλάτος ταλάντωσης μειώνεται και η ιδιοσυχνότητα του αλλάζει λόγω των δυνάμεων αλληλεπίδρασης μεταξύ ακίδας και επιφάνειας δείγματος (**Εικόνα 3.9**).

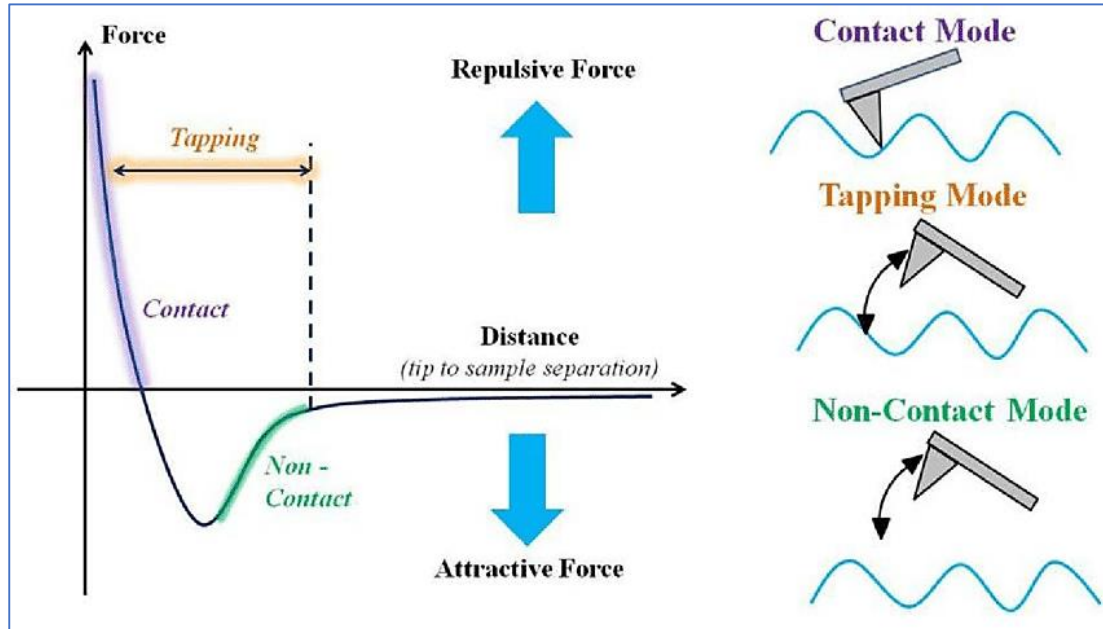


Εικόνα 3.9 Μέθοδος μη επαφής: (α)[163], (β) [164]. Ταλάντωση μακριά από την επιφάνεια του δείγματος, μείωση του πλάτους ταλάντωσης όταν η ακίδα έχει προσεγγίσει το δείγμα.

Οι δυνάμεις αλληλεπίδρασης μεταξύ ακίδας και επιφάνειας του δείγματος είναι μικρότερες σε σχέση με αυτές που ασκούνται στη λειτουργία επαφής και συνέπεια να μειώνεται η ανάλυση της εικόνας. Η λειτουργία αυτή χρησιμοποιείται σε μαλακά δείγματα, καθώς μειώνονται οι πλευρικές δυνάμεις και αποφεύγονται οι αλλοιώσεις του δείγματος. Έχει πολλές παραμέτρους που πρέπει να ρυθμιστούν για

είναι σταθερή η λειτουργία αυτή. Ως εκ τούτου χρησιμοποιείται κυρίως σε περιβάλλον υψηλού κενού και να έχει ελάχιστες εφαρμογές. [154]

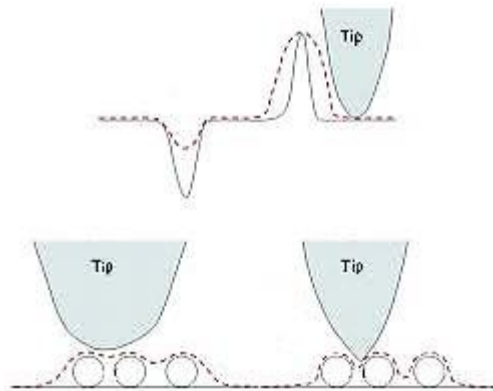
Υπάρχουν τρεις περιοχές αλληλεπίδρασης μεταξύ της ακίδας και της επιφάνειας του δείγματος. Αξιοποιούνται αναλόγως με τη μέθοδο λειτουργίας: Ελεύθερη περιοχή (non contact mode), Ελκτική περιοχή (tapping mode) και Απωστική περιοχή (contact mode) (Εικόνα 3.10).



Εικόνα 3.10. Διάγραμμα δυνάμεων αλληλεπίδρασης της ακίδας με την επιφάνεια δείγματος σε συνάρτηση με την απόστασή τους: λειτουργία μη επαφής (non contact mode) σε αρκετά μεγάλες αποστάσεις, λειτουργία ενδιάμεσης επαφής (tapping mode) σε ενδιάμεσες αποστάσεις, λειτουργία συνεχούς επαφής (contact mode) σε πολύ μικρές αποστάσεις [166].

3.6 Σφάλματα μεθόδων απεικόνισης AFM

Η ανάλυση της εικόνας από το AFM εξαρτάται από διάφορες παραμέτρους, όπως η γεωμετρία της ακίδας και η τοπογραφία του δείγματος (Εικόνα 3.11). Δηλαδή, το πόσο αιχμηρή είναι η ακίδα, το σχήμα της ακίδας και το είδος του δείγματος καθορίζουν την ανάλυση της εικόνας [154]. Αν η διάμετρος της αιχμής της ακίδας έχει συγκρίσιμο μέγεθος με τα επιφανειακά χαρακτηριστικά του δείγματος, τότε οι προεξοχές μπορεί να εμφανίζονται πεπλατυσμένες, ενώ οι ρωγμές της επιφάνειας να απεικονίζονται ως μικρότερες [167].



Εικόνα 3.11. Η τροχιά που διαγράφει η ακίδα AFM κατά τη σάρωση μιας επιφάνειας. Ανάλογα με το σχήμα της ακίδας, οι προεξοχές της επιφάνειας μπορεί να εμφανίζονται πεπλατυσμένες, ενώ οι ρωγμές μικρότερες [168].

Η ευαισθησία του AFM εξαρτάται από τη σταθερά ελατηρίου του προβόλου, καθώς και από θερμικούς, ηλεκτρικούς και οπτικούς θορύβους, που μπορεί να παρεμβάλλονται κατά τη διαδικασία λήψης εικόνας [169]. Επιπλέον, κατά την απεικόνιση σε αέρα, η επιφάνεια του δείγματος, αλλά και της ακίδας καλύπτονται από στρώματα υγρασίας, τα οποία μέσω δυνάμεων συνάφειας προκαλούν την προσκόλληση της ακίδας στην επιφάνεια. Το φαινόμενο αυτό παρουσιάζεται κυρίως κατά την απεικόνιση υδροφιλικών επιφανειών με σχετική υγρασία μεγαλύτερη του 30%. Καθώς η συμπύκνωση του νερού στο κενό χώρο μεταξύ της ακίδας και της επιφάνειας του δείγματος είναι ενεργειακά επιθυμητή, το στρώμα του νερού έχει ως αποτέλεσμα την προσθήκη μιας ελκτικής δύναμης στις δυνάμεις που επιδέχεται η ακίδα [167]. Αυτές οι δυνάμεις επηρεάζουν την ανάλυση της εικόνας, καθώς εμποδίζουν τη μείωση της προκαθορισμένης τιμής του setpoint (το setpoint είναι η επιθυμητή τιμή της σταθερής δύναμης ανάμεσα στην ακίδα του προβολού και στην επιφάνεια του δείγματος).

3.7 Μέτρηση Τραχύτητας

Η μέτρηση της τραχύτητας της επιφάνειας στο AFM γίνεται με τη Root Mean Square Roughness (R_{rms}), η οποία στην περίπτωση ευθείας τομής που αποτελείται από N σημεία ορίζεται ως:

$$R_{rms} = \sqrt{\frac{\sum_{n=1}^N (z_n - \bar{z})^2}{N-1}} \quad (3.4)$$

Όπου \bar{z} η μέση τιμή του ύψους.

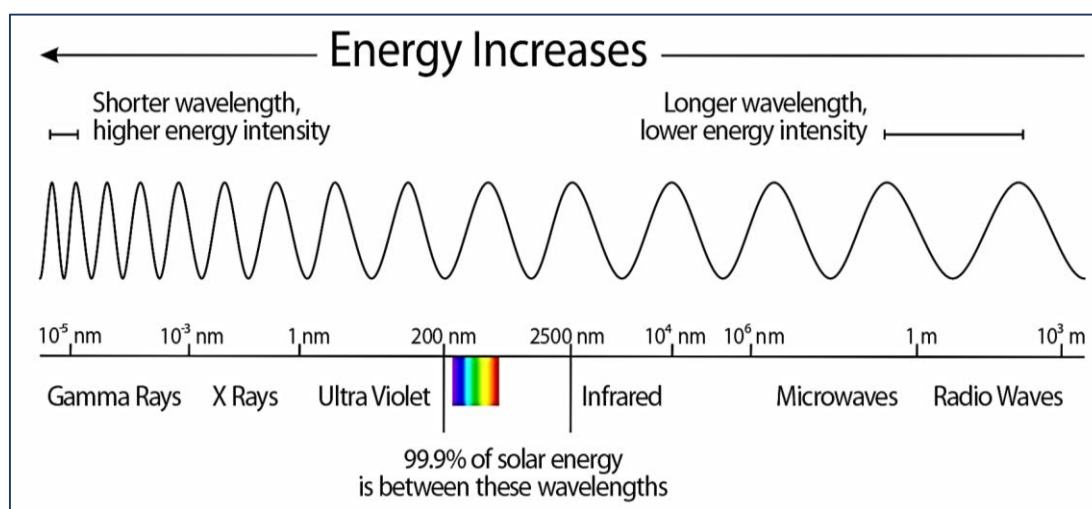
Τα λογισμικά που υπολογίζουν την τραχύτητα της επιφάνειας, όχι μόνο κατά μήκος μίας γραμμής, αλλά για οποιαδήποτε περιοχή ενδιαφέροντος, παρουσιάζονται στο **Κεφάλαιο 5**.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 4.

ΑΛΛΗΛΕΠΙΔΡΑΣΗ ΑΚΤΙΝΟΒΟΛΙΑΣ ΜΕ ΕΛΑΣΤΙΝΗ

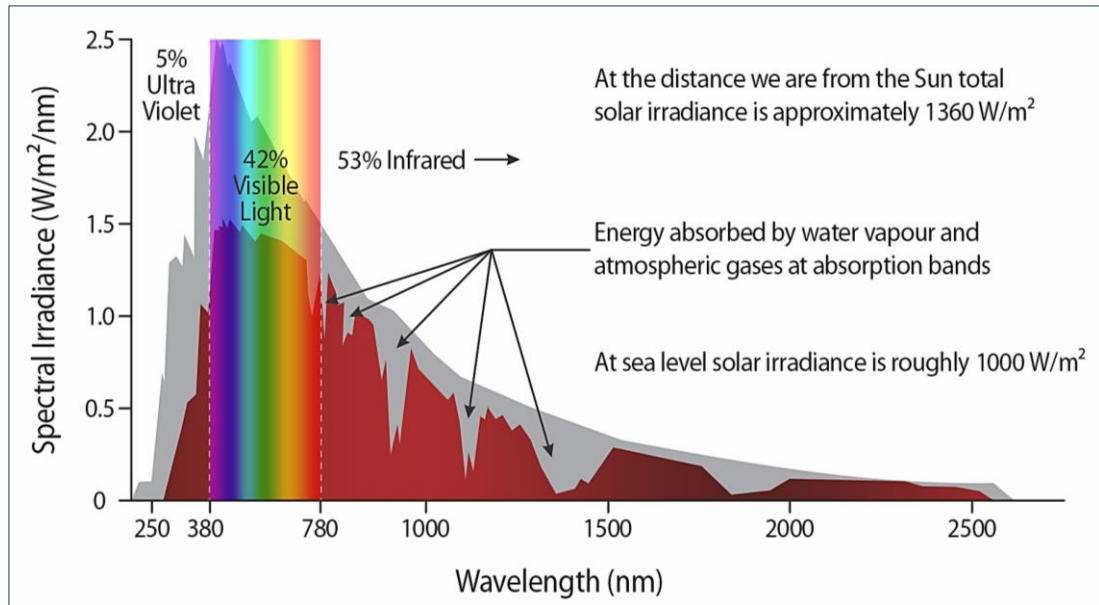
4.1 Εισαγωγή

Το φάσμα της ηλεκτρομαγνητικής ακτινοβολίας κυμαίνεται από τις ακτίνες γ (10^{-5} nm) έως τα ραδιοκύματα (10^3 m), ενώ η ηλιακή ακτινοβολία κυμαίνεται από 20nm έως 2.500nm (**Εικόνα 4.1**). Από την ηλεκτρομαγνητική ακτινοβολία του ήλιου, δεν φτάνουν όλα τα μήκη κύματος στην επιφάνεια της Γης, αφού κάποια απορροφώνται ή σκεδάζονται από την ατμόσφαιρα.



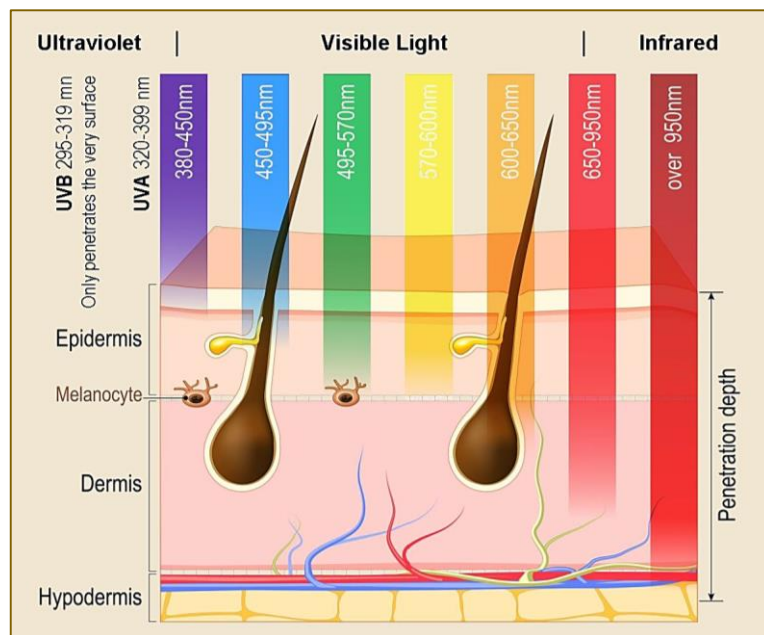
Εικόνα 4.1. Φάσμα ηλεκτρομαγνητικής ακτινοβολίας. Περίπου το 99% της ηλιακής ακτινοβολίας είναι μεταξύ 20-2.500nm. [170].

Συγκεκριμένα, η κοσμική ακτινοβολία, οι ακτίνες γ , οι ακτίνες X, αλλά και ένα μέρος της υπεριώδους ακτινοβολίας απορροφώνται από το όζον της στρατόσφαιρας, αλλά και από το οξυγόνο της ατμόσφαιρας, ενώ ένα σημαντικό ποσοστό της υπέρυθρης ακτινοβολίας απορροφάται από τους υδρατμούς της ατμόσφαιρας και το διοξείδιο του άνθρακα. Η ακτινοβολία που φτάνει στη Γη και επηρεάζει τον άνθρωπο είναι ένα μικρό τμήμα του ηλιακού φάσματος, που αρχίζει από τα 290nm και φτάνει έως τα 3.000nm, δηλαδή ένα μόνο τμήμα της υπεριώδους ακτινοβολίας, η ορατή και η υπέρυθρη. Η σύνθεση, λοιπόν, της ηλιακής ενέργειας είναι περίπου 5% υπεριώδες, 42% ορατό και 53% κοντά στην υπέρυθρη ακτινοβολία (**Εικόνα 4.2**) [171].



Εικόνα 4.2. Φάσμα ηλιακής ακτινοβολίας (περίπου 5% υπεριώδες, 42% ορατό και 53% υπέρυθρο) [170]

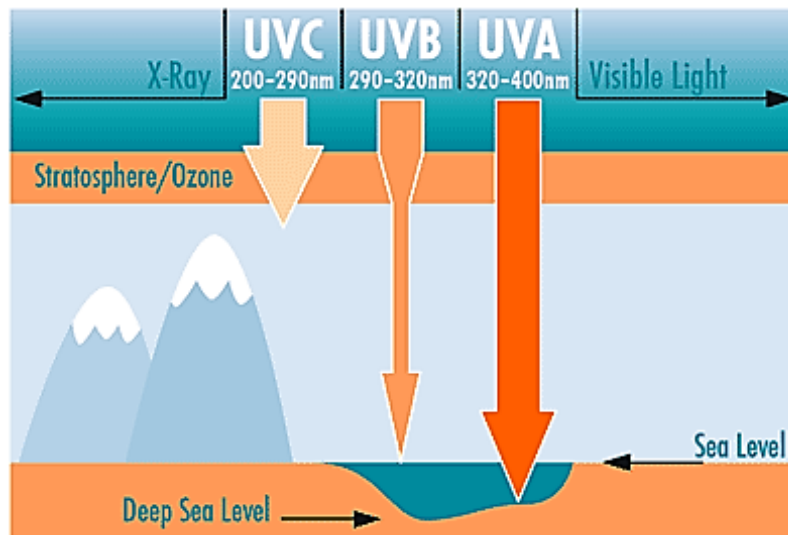
Ο χαρακτηρισμός του είδους της ακτινοβολίας και η επίδρασή της εξαρτάται άμεσα από το μήκος κύματος, δηλαδή από την ενέργεια της. Η υπεριώδης ακτινοβολία εκτείνεται από μήκος κύματος 200 έως 400 nm, το ορατό φάσμα από 400 έως 760 nm και η υπέρυθρη ακτινοβολία εκτείνεται από 760 έως 3000nm, περίπου. Ως εκ τούτου, διαφορετικά μήκη κύματος μπορούν να διεισδύσουν στο δέρμα σε διαφορετικά βάθη των ιστών του σώματος (**Εικόνα 4.3**).



Εικόνα 4.3. Βάθη διεισδυσης της ηλιακής ενέργειας στο δέρμα σε διάφορα μήκη κύματος [172].

4.2 Υπεριώδης ακτινοβολία

Το μήκος κύματος της υπεριώδους ακτινοβολίας κυμαίνεται από 200nm έως 400nm. Ειδικότερα, διαχωρίζεται σε τρεις φασματικές περιοχές, τις UV-A , UV-B , UV-C. Τα μήκη κύματος για κάθε μια από τις 3 αυτές κατηγορίες είναι UV-C (200-290nm), UV-B (290-320nm) και UV-A (320-400nm). [Εικόνα 4.4]



Εικόνα 4.4. Υπεριώδης Ακτινοβολία. UV-C:200-290nm, UV-B:290-320nm, UV-A: 320-400nm [173].

4.2.1 UV-A ακτινοβολία

Αποτελεί το 95% της UV ακτινοβολίας που φτάνει στην επιφάνεια της γης. Το φάσμα εκπομπής της UV-A κυμαίνεται μεταξύ 320-400nm περίπου και ονομάζεται μελαγχρωματικό. Λόγω του μήκους κύματος της, μπορεί να αποδεδεσμεύει μικρότερα ποσά ενέργειας, οπότε μπορεί και να διαπερνά το δέρμα, να επιδράει στα κύτταρα και να φτάνει ακόμα και μέχρι το υποδόριο λίπος. Χαμηλές δόσεις από UV-A ακτίνες προκαλούν την παραγωγή της μελανίνης που βρίσκεται στο δέρμα, δηλαδή στη χρωστική που μαυρίζει το δέρμα και το προστατεύει από περαιτέρω ζημιές. Η UV-A προκαλεί, λοιπόν, στο δέρμα μελάγχρωση χωρίς ερύθημα, είναι καταστροφική όμως για το δέρμα σε μακροχρόνια κλίμακα. Η παρατεταμένη έκθεση του δέρματος σε αυτήν την ακτινοβολία ευθύνεται για την πρόωγη γήρανση του δέρματος. Επίσης, η έκθεση σε UV-A έχει ως αποτέλεσμα την παραγωγή ελεύθερων ριζών οξυγόνου. Αυτά τα ενεργά μόρια ευθύνονται για βλάβες στα δερματικά κυτταρικά μακρομόρια, όπως είναι οι πρωτεΐνες, τα λιπίδια και το DNA.

4.2.2 UV-B ακτινοβολία

Το φάσμα εκπομπής της UV-B ακτινοβολίας κυμαίνεται περίπου μεταξύ 290-320nm. Η ακτινοβολία αυτή διαπερνά το σώμα μας σε όλη τη διάρκεια του χρόνου και αποδεδειγμένα μεγάλη ενέργεια στις επιφανειακές στιβάδες της επιδερμίδας. Μπορεί να διαπεράσει την κεράτινη (εξωτερική) στιβάδα της επιδερμίδας σε ποσοστό 40%. Μία από τις επιπτώσεις της UV-B ακτινοβολίας κατά την έκθεση στο δέρμα είναι το έγκαυμα. Οι ακτίνες αυτές θεωρούνται και υπεύθυνες για τη μελάγχρωση που προκαλούν στο δέρμα, η οποία οφείλεται στη διέγερση των μελανοκυττάρων του δέρματος για παραγωγή μελανίνης. Η μακροχρόνια και παρατεταμένη έκθεση στη UV-B ακτινοβολία έχει βρεθεί ότι προκαλεί μεταλλάξεις στα κύτταρα της επιδερμίδας και ανάπτυξη προκαρκινικών βλαβών. Άλλες επιπτώσεις της συγκεκριμένης ακτινοβολίας αποτελούν η πρόωγη γήρανση του δέρματος, το οξειδωτικό στρες και βλάβη του DNA [174].

4.2.3 UV-C ακτινοβολία

Η UV-C ακτινοβολία έχει φάσμα εκπομπής μεταξύ 200-290nm περίπου. Η UV-C είναι η πιο επικίνδυνη υπεριώδη ακτινοβολία, φιλτράρεται όμως από το στρώμα του όζοντος. Διαδραματίζει σημαντικό ρόλο στο ρυθμό θέρμανσης των ατμοσφαιρικών στρωμάτων από τα οποία απορροφάται. Δε φτάνει στην επιφάνεια της Γης, οπότε δεν επηρεάζει τον άνθρωπο άμεσα, παρά μόνο από την επανεκπομπή της από τη στρατόσφαιρα.

Επίσης, η επίδραση αυτής της ακτινοβολίας στους ανθρώπους γίνεται κυρίως μέσω των λαμπτήρων UV-C, οι οποίοι χρησιμοποιούνται σε μια πληθώρα εφαρμογών. Ενδεικτικά για την απολύμανση νερού και αέρα, καθώς η UV-C ακτινοβολία σκοτώνει τα βακτήρια και αδρανοποιεί τους ιούς. Ως εκ τούτου, ανεπιθύμητες ενέργειες στα μάτια και το δέρμα στον άνθρωπο αναφέρονται κυρίως από τυχαία έκθεση σε ακτινοβολία από λαμπτήρες UV-C [175]. Αν και το βάθος διείσδυσης είναι πολύ μικρό και η επίδραση της UV-C στον ανθρώπινο οργανισμό επιφανειακή, μπορεί να προκαλέσει τραυματισμούς. Οι πιο συνηθισμένοι είναι το ερύθημα (ηλιακό έγκαυμα) στο δέρμα και φωτοκερατίτιδα (φλεγμονή του κερατοειδούς) στα μάτια. Οι αλλοιώσεις αυτές μετά από εκτεταμένη ή μακροχρόνια έκθεση στη UV-C μπορεί να οδηγήσουν σε καρκίνο του δέρματος και σε καταρράκτη ματιών αντίστοιχα [176].

4.2.4 Επίδρασεις UV ακτινοβολίας στον άνθρωπο

Το UV έχει πολύπλοκες και μικτές επιδράσεις στον ανθρώπινο οργανισμό. Έχει ευεργετικά αποτελέσματα στην υγεία, καθώς διεγείρει τη φυσική παραγωγή της βιταμίνης D, η οποία εμπλέκεται στο μεταβολισμό των οστών και στη λειτουργία του ανοσοποιητικού συστήματος. Επίσης, διαμεσολαβεί στη σύνθεση των ενδορφινών στο δέρμα και χρησιμοποιείται για τη θεραπεία δερματικών παθήσεων, όπως η ψωρίαση και η λεύκη. Η ελεγχόμενη έκθεση στην υπεριώδη ακτινοβολία χαρακτηρίζει τη

φωτοθεραπεία, η οποία μπορεί να χρησιμοποιηθεί σε συνδυασμό με φάρμακα, που αυξάνουν την ευαισθησία στην ακτινοβολία, βελτιώνοντας τα συμπτώματα ορισμένων δερματικών παθήσεων [171, 177].

Η υπεριώδης ακτινοβολία, όμως μπορεί να δράσει πάνω στο ανθρώπινο δέρμα προκαλώντας ζημιές. Το ηλιακό φάσμα αποτελείται από ακτινοβολίες διαφόρων μηκών κύματος που έχουν συγκεκριμένες, καθώς και επικαλυπτόμενες επιδράσεις στο δέρμα. Όπως έχουμε προαναφέρει, η UV-A είναι ικανή να διαπεράσει κατά 320-400nm το δέρμα και να επηρεάσει τα κύτταρά του, δημιουργώντας οξειδωτικές αντιδράσεις, που επηρεάζουν το DNA, τις πρωτεΐνες, τα λιπίδια και είναι ανοσοκατασταλτικό. Η UV-B ακτινοβολία προκαλεί την πλειονότητα των βλαβών της άμεσης πρόσληψης ενέργειας, είναι κυρίως υπεύθυνη για το ηλιακό έγκαυμα, αλλά και το σχηματισμό διμερών DNA, που μπορεί να οδηγήσουν σε μετάλλαξη [178]. Οι επιδράσεις, λοιπόν, της UV ακτινοβολίας, που βλάπτουν τον ανθρώπινο οργανισμό, χωρίζονται σε δυο κατηγορίες, τις οξείες και τις χρόνιες επιδράσεις, ανάλογα με τον χρόνο που εμφανίζονται οι συνέπειές της (Πίνακα 4.1).

Πίνακας 4.1. Επιβλαβείς επιδράσεις UV ακτινοβολίας στον άνθρωπο [179].

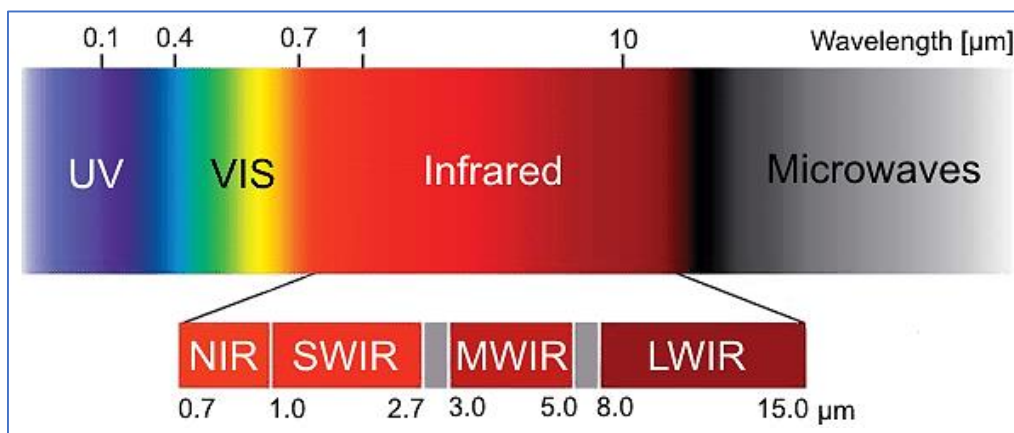
Οξείες επιδράσεις	Χρόνιες επιδράσεις
Ηλιακό ερύθημα	Ακτινικές υπερκερατώσεις
Μελάγχρωση (μαύρισμα)	Ελάστωση του δέρματος
Φωτοδερματοπάθειες	Φωτοκαρκινογένεση (βλάβη στο DNA)
Φωτοευαισθητοποίηση	Φωτοανοσοκαταστολή
Παροδικές βλάβες στα μάτια (φωτοεπιπεφυκίτιδα)	Οφθαλμικές παθήσεις (καταρράκτης)

Γενικά, η UV ταξινομείται ως καρκινογόνος ακτινοβολία, επειδή είναι τόσο μεταλλαξιογόνος, όσο και μη συγκεκριμένα επιβλαβής παράγοντας και ευθύνεται τόσο για την έναρξη ενός όγκου, όσο και για τη μετάστασή του. Σε περιβαλλοντική αφθονία, η υπεριώδης ακτινοβολία είναι ο πιο σημαντικός τροποποιήσιμος παράγοντας κινδύνου για καρκίνο του δέρματος και πολλές άλλες περιβαλλοντικά επηρεαζόμενες δερματικές διαταραχές. Η υπερβολική έκθεση στην υπεριώδη ακτινοβολία εγκυμονεί σοβαρούς κινδύνους για την υγεία, όπως ατροφία, χρωστικές αλλαγές, ρυτίδες και κακοήθεια. Το υπεριώδες συνδέεται επιδημιολογικά και μοριακά με τους τρεις πιο κοινούς τύπους καρκίνου του δέρματος, το βασικοκυτταρικό καρκίνωμα, το ακανθοκυτταρικό καρκίνωμα και το κακοήθη μελάνωμα, τα οποία μαζί επηρεάζουν παγκοσμίως περισσότερους από δύο εκατομμύρια ανθρώπους ετησίως [178, 180].

Επιπροσθέτως, ένας από τους μεγαλύτερους παράγοντες κινδύνου για την ανάπτυξη δερματικού μελανώματος είναι η ανοιχτόχρωμη επιδερμίδα, η οποία χαρακτηρίζεται από χαμηλά επίπεδα μιας σκούρας χρωστικής ουσίας, που αναστέλλει την υπεριώδη ακτινοβολία, που ονομάζεται ευμελανίνη στην επιδερμίδα. Τα άτομα με ελαφριά μελάγχρωση του δέρματος υφίστανται συγκριτικά μεγαλύτερη βλάβη από την υπεριώδη ακτινοβολία, επειδή είναι σχετικά εύκολο για τις ακτίνες UV να διεισδύσουν στην επιδερμίδα, για να βλάψουν, τόσο τα κερατινοκύτταρα, όσο και τα μελανοκύτταρα στα βαθύτερα στρώματα της επιδερμίδας. Τα άτομα με ανοιχτόχρωμη επιδερμίδα εκτίθενται σε υψηλότερες δόσεις υπεριώδους ακτινοβολίας στο δέρμα τους και οι μεταλλάξεις που προκαλούνται, συσσωρεύονται με την πάροδο του χρόνου και συμβάλλουν σε μελάνωμα. Πολλές παθολογίες που προκαλούνται από την UV ακτινοβολία, συμπεριλαμβανομένου του καρκίνου του δέρματος, μπορούν να αποφευχθούν, ελαχιστοποιώντας την έκθεση στην υπεριώδη ακτινοβολία [181, 182].

4.3 Ερυθρή και εγγύς υπέρυθρη ακτινοβολία

Η ερυθρή ακτινοβολία είναι τμήμα του ορατού φωτός με μήκη κύματος που κυμαίνονται από 620-750nm, ενώ ακολουθεί η εγγύς υπέρυθρη ακτινοβολία (Near InfraRed - NIR) από 760 έως 1200nm περίπου (Εικόνα 4.5).

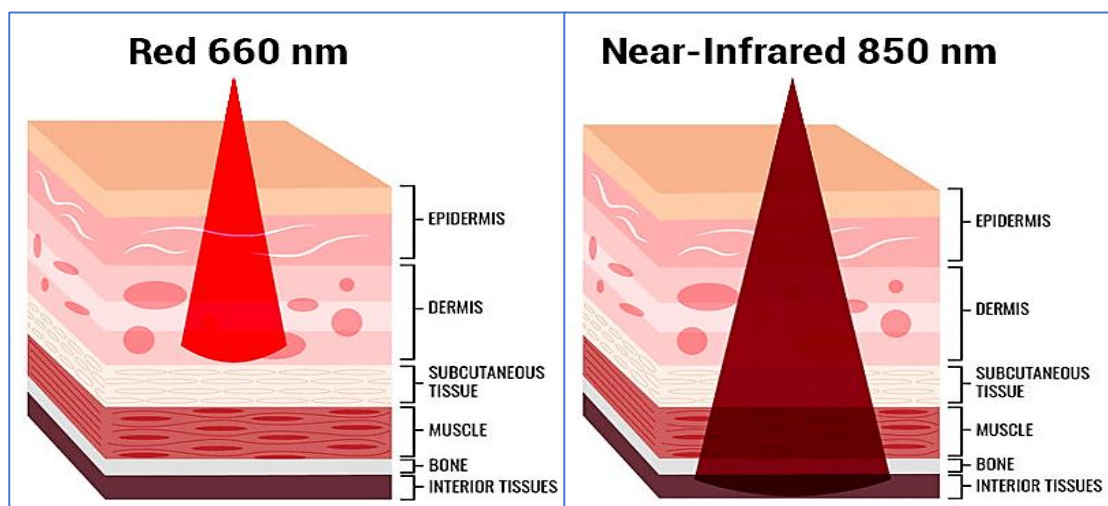


Εικόνα 4.5. Φάσμα υπέρυθρης ακτινοβολίας [183].

Η επίδραση της ερυθρής ακτινοβολίας χαμηλής ισχύος σε βιολογικούς ιστούς παρουσιάζει μεγάλο ενδιαφέρον, καθώς υπάρχουν πολλές ιατρικές εφαρμογές. Η χρήση laser ή άλλη πηγή φωτός με χαμηλή ισχύ σε εντάσεις που δεν προκαλούν θερμικά φαινόμενα είναι γνωστή ως θεραπεία χαμηλής ισχύος laser ή φωτός (Low Level Laser Therapy - LLLT), φωτοθεραπεία ή φωτοβιοδιέγερση (photobiomodulation) [184]. Αυτές οι μέθοδοι έχουν σκοπό τη διέγερση των κυτταρικών βιοχημικών αντιδράσεων, οπότε η ακτινοβολία συμβάλλει στην επούλωση πληγών, στην ανακούφιση από τον πόνο, στη θεραπεία της φλεγμονής και στην ανάπλαση των ιστών [185].

Η φωτοβιοδιέγερση είναι ένας όρος που χρησιμοποιείται για να περιγράψει τις φυσιολογικές επιδράσεις από την ακτινοβολία με μήκη κύματος κόκκινου ή κοντά στο υπέρυθρο. Αυτές οι ακτινοβολίες έχουν την ικανότητα να διεισδύουν μέσα στους ιστούς και στα κύτταρα του σώματος. Τα οφέλη είναι η βελτιωμένη λειτουργία των ιστών, τα αντιφλεγμονώδη αποτελέσματα και ο βελτιωμένος μεταβολισμός. Οι καταστάσεις που μπορεί να ωφεληθούν από τη φωτοβιοδιέγερση είναι οι αλλεργίες, ο υποθυρεοειδισμός, η κατάθλιψη, η άνοια, τα συμπτώματα που σχετίζονται με τον διαβήτη, η αποκατάσταση μυών, και οι καρδιαγγειακές παθήσεις [186]. Γενικά όμως ο μηχανισμός με τον οποίο συσχετίζεται η φωτοβιοδιέγερση, η οποία επιτελείται κατά τη φωτοθεραπεία χαμηλής ισχύος δεν έχει πλήρως αποσαφηνιστεί [184].

Η LLLT περιλαμβάνει την ακτινοβολία ιστών με φως σε μήκη κύματος στην περιοχή του κόκκινου και εγγύς υπέρυθρου, όπου οι ενέργειες τους είναι χαμηλές. Η φωτοθεραπεία χαμηλής ισχύος περιλαμβάνει κυρίως ακτινοβολία σε μήκη κύματος μεταξύ 500 και 1.100 nm, όπου τα βάθη διείσδυσής τους στον ανθρώπινο οργανισμό φτάνουν από την επιδερμίδα έως τα κόκκαλα και τους εσωτερικούς ιστούς αντίστοιχα (Εικόνα 4.6).



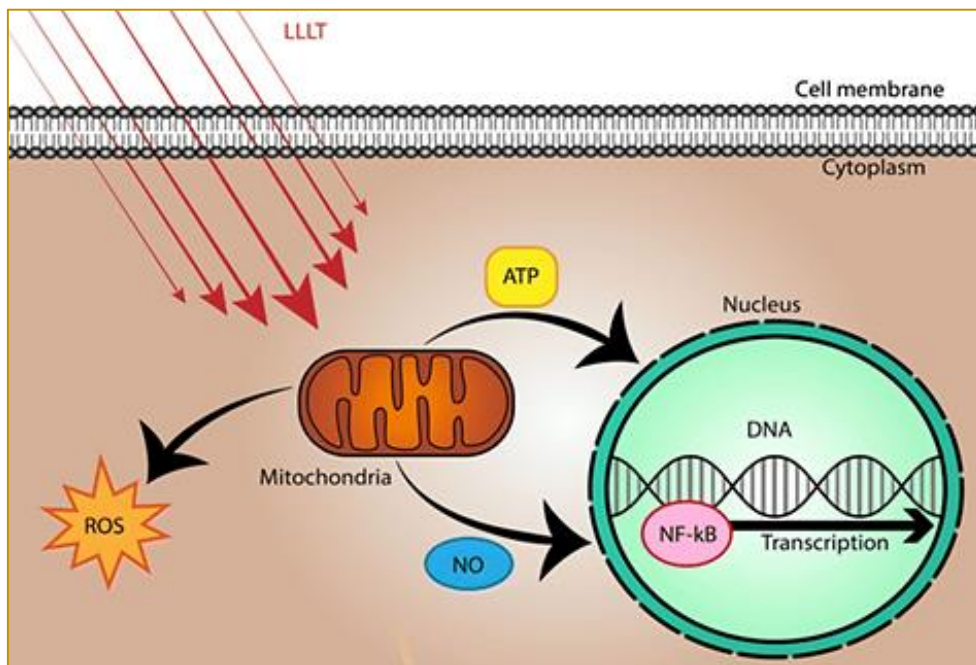
Εικόνα 4.6. Βάθη διείσδυσης ερυθρής (660nm) και εγγύς υπέρυθρης (850nm) ακτινοβολίας σε ιστό [187].

Στη δερματολογία, οι παραπάνω μέθοδοι και κυρίως η LLLT, έχει ευεργετικά αποτελέσματα κατά των ρυτίδων, ουλών ακμής, υπερτροφικών ουλών και επούλωση εγκαυμάτων. Η LLLT βοηθάει όχι μόνο στην επούλωση, αλλά και στην προφύλαξη, όσον αφορά τις ζημιές που προκαλεί η υπεριώδης ακτινοβολία. Η μέθοδος αυτή είναι πολλά υποσχόμενη μιας και η μη επεμβατική της φύση και σχεδόν πλήρης απουσία παρενεργειών ενθαρρύνει για περαιτέρω δοκιμές. Γενικά η μέθοδος περιλαμβάνει έκθεση ακτινοβολίας των κυττάρων. Τα βλαστικά κύτταρα μπορούν να ενεργοποιηθούν επιτρέποντας την επισκευή και επούλωση των ιστών. Οι πυκνότητες ενέργειας ή ισχύος που χρησιμοποιούνται είναι χαμηλού επιπέδου και είναι χαμηλές συγκριτικά με άλλες μορφές θεραπείας λέιζερ όπως είναι η αποδόμηση, η εκτομή, η κοπή και η θερμική θρόμβωση ιστού.

4.3.1 Θεραπεία χαμηλής ισχύος laser (Low Level Laser Therapy - LLLT)

Ο βιολογικός βασικός μηχανισμός της θεραπείας με χαμηλής ισχύος laser ή φωτός στηρίζεται στην απορρόφηση της ερυθρής και της NIR ακτινοβολίας από τα χρωμοφόρα των μιτοχονδρίων και συγκεκριμένα του κυτοχρώματος C οξειδάσης (Cytochrome C Oxidase - CCO) (Εικόνα 4.7). Επίσης, περιέχεται στην αναπνευστική αλυσίδα μέσα στα μιτοχόνδρια και στην πλασματική μεμβράνη των κυττάρων. Μετά την απορρόφηση, μία αλληλουχία γεγονότων παρατηρείται στα μιτοχόνδρια, οδηγώντας στη βιοδιέγερση ποικίλων διαδικασιών στα κύτταρα. Φάσματα απορρόφησης που λαμβάνονται από τη CCO σε διαφορετικά στάδια οξειδωσης, είναι παρόμοια με τα φάσματα που καταγράφηκαν μετά από τη LLLT [188].

Για την απορρόφηση της φωτεινής ενέργειας έχουν γίνει υποθέσεις ότι μπορεί να προκαλέσει φωτοδιάσπαση του ανασταλτικού νιτρικού οξειδίου από τη CCO, οδηγώντας σε αυξημένη δραστηριότητα ενζύμων [189], κατανάλωση οξυγόνου, μεγάλη μεταφορά ηλεκτρονίων [190], μιτοχονδριακή αναπνοή και παραγωγή τριφωσφορικής αδενοσίνης (ATP) [191]. Ως συνέπεια, η LLLT μεταβάλλει την κυτταρική κατάσταση οξειδοαναγωγής, η οποία ενεργοποιεί πολλές ενδοκυτταρικές διαδρομές σηματοδότησης και μεταβάλλει τους παράγοντες μεταγραφής, που σχετίζονται με τον πολλαπλασιασμό, τη μετανάστευση, την επιβίωση των κυττάρων, αλλά και με την ανάπλαση και την αναγέννηση ιστών [188].



Εικόνα 4.7. Σχηματική απεικόνιση της θεραπείας laser χαμηλής ισχύος (LLLT): Αρχικά απορρόφηση κόκκινου/εγγύς υπέρυθρου φωτός από μιτοχονδριακά χρωμοφόρα. Έπειτα, αύξηση παραγωγής ATP, δημιουργία δραστικών ειδών οξυγόνου (ROS) και απελευθέρωση μονοξειδίου αζώτου (NO). Τέλος, γονιδιακή μεταγραφή μέσω τροποποίησης παραγόντων (π.χ. NF-κB) [192].

4.3.2 Επίδραση ερυθρής ακτινοβολίας στον άνθρωπο

Το δέρμα δείχνει τα πρώτα σημάδια γήρανσης του περίπου στις αρχές της τρίτης δεκαετίας της ζωής του ανθρώπου και συνήθως παρουσιάζεται με την εμφάνιση ρυτίδων, δυσμελάγχρωση, ευρυαγγείες και την απώλεια ελαστικότητας. Κοινά χαρακτηριστικά σε ιστολογικό και μοριακό επίπεδο είναι η μείωση της ποσότητας του κολλαγόνου και της ελαστίνης, κατακερματισμό των ινών κολλαγόνου, εκφύλιση των ινών ελαστίνης, διεσταλμένα και ελικοειδή δερματικά αγγεία και ατροφία της επιδερμίδας. Οι χρονικές και οι περιβαλλοντικές επιρροές είναι υπεύθυνες για τη διαδικασία της γήρανσης του δέρματος. Ωστόσο, η φωτοκαταστροφή φαίνεται να είναι ένας από τους σημαντικότερους λόγους αυτής της αλλαγής.

Διάφορες εφαρμογές έχουν αναπτυχθεί για να αντιστρέψουν τα δερμικά και τα επιδερμικά σημάδια του φωτός και του χρόνου. Αυτές οι εφαρμογές έχουν σαν μέθοδο την αφαίρεση της επιδερμίδας με μια ελεγχόμενη μορφή τραυματισμού του δέρματος με σκοπό να προάγει τη βιοσύνθεση κολλαγόνου και τη ανακατασκευή δερματικών μητρών. Ωστόσο, αυτές οι διαδικασίες απαιτούν εκτενή μετα-θεραπευτική φροντίδα και παρατεταμένη περίοδο καταστολής. Η έκθεση σε ερυθρή ακτινοβολία και NIR είναι μια μη επεμβατική μέθοδος που αποσκοπεί να σταματήσει τη γήρανση του δέρματος δίχως να καταστρέφει την επιδερμίδα. Παθήσεις που αντιμετωπίζονται με αυτές τις ακτινοβολίες είναι ο ακανόνιστος χρωματισμός, η τηλαγγειεκτασία (μία πάθηση που χαρακτηρίζεται από τη διόγκωση των αιμοφόρων αγγείων, τα οποία συχνά θυμίζουν ιστό αράχνης εμφανισιακά, στην επιφάνεια ενός οργάνου), η μείωση των ρυτίδων και το σφίξιμο του δέρματος. Εκτός από laser έχουν γίνει πειράματα με LEDs και αυτό που παρατηρήθηκε στο 90% των περιπτώσεων ήταν ένα μαλάκωμα της υφής του δέρματος και η μείωση της τραχύτητας του.

Επίσης, η ερυθρή ακτινοβολία που προέρχεται από τον ήλιο «προετοιμάζει» μέσω φυσικών μηχανισμών το ανθρώπινο δέρμα. Η ακτινοβολία αυτή υπερισχύει τις πρωινές ώρες και δημιουργεί μία ισχυρή κυτταρική άμυνα κατά της UV ακτινοβολίας που υπερισχύει το μεσημέρι [193]. Μελέτες έδειξαν ότι έκθεση σε ερυθρό φως μέσω LED παρέχουν σημαντική προστασία κατά των ηλιακών ερυθρημάτων. Για την καταπολέμηση των εγκαυμάτων, παρατηρήθηκε ότι χάρη στην έκθεση μέσω LED στο ερυθρό φως, μειώθηκε κατά το ήμισυ ο χρόνος επούλωσης. Επίσης, δεν έχουν παρατηρηθεί σημαντικές διαφοροποιήσεις για την επούλωση ουλών [194].

4.4 Αλληλεπίδραση υπεριώδους ακτινοβολίας με ελαστίνη

Οι πρωτεΐνες τόσο οι συνθετικές, όσο και οι φυσικές, όταν εκτεθούν στην ηλεκτρομαγνητική ακτινοβολία και ειδικά την υπεριώδη, μπορεί να αλλοιωθούν λόγω φωτογήρανσης και φωτοαποδόμησης. Η αποδόμηση των βιολογικών υλικών και κυρίως των πρωτεϊνών, έχει ως αποτέλεσμα την αλλοίωση της φυσιολογικής δομής και λειτουργίας τους. Αξίζει να σημειωθεί ότι η ακτινοβολία με UV χρησιμοποιείται ως μια μέθοδος επεξεργασίας βιοϋλικών [195, 196].

Συγκεκριμένα, οι UV ακτίνες εφαρμόζονται για αποστείρωση βιολογικών υλικών [197, 198]. Είναι μια απλή και αποτελεσματική τεχνική, η οποία όμως πρέπει να ελεγχθεί, αν η ακτινοβολία αυτή προκαλεί αλλαγές που επηρεάζουν τις ιδιότητες των βιοϋλικών, όπως τη βιοσυμβατότητα τους [199, 200]. Η ακτινοβολία με υπεριώδες χρησιμοποιείται και σαν μια μέθοδος φωτο-διασύνδεσης (photo-crosslinking) σε βιοϋλικά, έτσι ώστε να βελτιωθούν οι μηχανικές τους ιδιότητες [201]. Επίσης, η επαναλαμβανόμενη έκθεση του δέρματος στην UV-B ακτινοβολία προκαλεί κυρίως ρυτίδες, ενώ η UV-A προκαλεί χαλάρωση [202]. Ως εκ τούτου, η χρήση εξωγενών αντιηλιακών, αλλά και ενδογενών, όπως η μελανίνη μειώνουν το βάθος διείσδυσης των UV ακτινοβολιών στο δέρμα [203]. Επομένως, προκύπτει το συμπέρασμα ότι λόγω της χρόνιας έκθεσης του ανθρώπινου δέρματος στην ηλιακή ακτινοβολία, η διασαφήνιση του μηχανισμού αλληλεπίδρασης υπεριώδους ακτινοβολίας–ελαστίνης είναι καθοριστικής σημασίας.

Επιπροσθέτως, μελέτες αναφέρονται στις αλλαγές των ελαστικών ινών ως αποτέλεσμα της έκθεσής τους σε ακτινοβολία UV-A. Μετρήσεις με TEM έδειξαν ότι η έκθεση στην UV-A έχει ως αποτέλεσμα ρωγμές της ελαστικής ίνας, που δείχνουν μακροσκοπικές αλλοιώσεις [204]. Οι φασματομετρικές μετρήσεις μάζας έδειξαν μείωση της περιεκτικότητας σε δεσμοσίνη σε δείγμα ακτινοβολημένο με UV-A. Αυτή η αλλαγή προκύπτει από διάλυση των σταυροδεσμών ελαστίνης. Οι ιστολογικές εικόνες έδειξαν ίνες που εμφανίζονται πιο κοντές και λεπτότερες μετά από έκθεση στην UV-A.

Η μέθοδος NMR (nuclear magnetic resonance) στερεάς κατάστασης εφαρμόστηκε για τη μελέτη πιθανών δευτερογενών δομικών αλλαγών της ελαστίνης. Οι μετρήσεις έδειξαν ότι η ποσότητα δεσμοσίνης στο δείγμα που ακτινοβολήθηκε με UV μειώθηκε σε σύγκριση με το μη ακτινοβολημένο δείγμα [204]. Αυτές οι μικροσκοπικές αλλαγές, σε συνδυασμό με τη διάλυση της ελαστικής ίνας, διαδραματίζουν σημαντικό ρόλο στην απώλεια ελαστικότητας σε γερασμένο δέρμα που εκτίθεται στην υπεριώδη ακτινοβολία.

Επομένως, είναι απαραίτητη η περαιτέρω έρευνα για την προστασία του δέρματος από τις βλαβερές συνέπειες του υπεριώδους φωτός, καθώς έτσι θα υπάρξει ορθολογική ανάπτυξη φαρμακολογικών στρατηγικών για τη μείωση της ευαισθησίας στην υπεριώδη ακτινοβολία, αλλά και του κινδύνου καρκίνου.

Η επίδραση του UV φωτός με την ελαστίνη δεν έχει ακόμα αποσαφηνιστεί και στη διεθνή βιβλιογραφία είναι οι λίγες οι δημοσιεύσεις και όσες αναφέρονται είναι κυρίως στην μακροκλίμακα. Επομένως, η διερεύνηση της έχει ιδιαίτερο ενδιαφέρον, καθώς οι αλληλεπιδράσεις ελαστίνης με την υπεριώδη ακτινοβολία στην νανοκλίμακα είναι κρίσιμες για διάφορους τομείς της σύγχρονης επιστήμης, όπως η ιατρική, η βιολογία και η μηχανική ιστών. Προκειμένου, να διερευνηθούν οι δομικές και τοπολογικές ιδιότητες της ελαστίνης στη νανοκλίμακα αξιοποιήθηκαν οι δυνατότητες του AFM.

4.5 Αλληλεπίδραση ερυθρής ακτινοβολίας χαμηλής ισχύος με ελαστίνη

Τα τελευταία χρόνια, μη επεμβατικές τεχνικές έχουν αρχίσει να εφαρμόζονται για την επούλωση πληγών, τη μείωση ρυτίδων και την αναδόμηση ιστών, τόσο σε ερευνητικό, όσο και σε κλινικό επίπεδο. Μια τέτοια τεχνική είναι η χρήση της ακτινοβολίας στην περιοχή του ερυθρού ή εγγύς υπέρυθρου φωτός. Συγκεκριμένα, η αλληλεπίδραση της ερυθρής ακτινοβολίας με ιστούς έχουν σκοπό τη θεραπεία ασθενειών και τη βελτίωση βιολογικών διεργασιών. Όπως έχει ήδη αναφερθεί, ως πηγή κόκκινου φωτός χρησιμοποιούνται τα laser χαμηλής ισχύος, τα οποία έχουν ένα μεγάλο εύρος επιδράσεων στους ιστούς σε επίπεδο νανοκλίμακας, αλλά και μακροκλίμακας. Επίσης, αυτή η ακτινοβολία έχει αντιφλεγμονώδη και αναλγητικά αποτελέσματα στο ανθρώπινο δέρμα, αλλά και στην αναγεννητική ιστών [185, 193, 205-211].

Διάφορες μελέτες παρουσιάσαν θετικά αποτελέσματα της LLLT, τόσο *in vitro* [212-214], όσο και *in vivo* [215-217], καθώς και σε κλινικές συνθήκες [218, 219]. Συγκεκριμένα η δράση της LLLT σε συστατικά της εξωκυττάριας μήτρας, βοήθησε στη παραγωγή κολλαγόνου και ελαστίνης στα πρώτα στάδια της επούλωσης ενός τραύματος [185]. Η επίδραση της LLLT στα οστά εμφάνισε πιο πυκνές και παράλληλα προσανατολισμένες ίνες [220]. Παρόμοια αποτελέσματα έχουν παρουσιαστεί και στην αναδόμηση των συνδέσμων [221].

Επίσης η LLLT θεωρείται μια ασφαλής και αποτελεσματική μέθοδος αναζωογόνησης του δέρματος (ρυτίδες και δυσχρωμίες του προσώπου), θεραπείας της κοινής ακμής και της αλωπεκίας, διαμόρφωσης του περιγράμματος σώματος, επούλωσης πληγών [222]. Η χρήση ερυθρής ή/και IR ακτινοβολίας LED διεγείρει την παραγωγή κολλαγόνου και ελαστίνης, οπότε παρέχει μια αποτελεσματική ευκαιρία θεραπείας για άτομα με φωτογερασμένο δέρμα [223].

Υπάρχουν ενδείξεις ότι το LLLT είναι ικανό να ρυθμίζει το ανοσοποιητικό σύστημα στο δέρμα και την άρθρωση και έχει αποδειχθεί ότι είναι αποτελεσματικό στον άνθρωπο επηρεάζοντας στον αποικισμό βακτηρίων, όπως στη χρόνια ρινοκολίτιδα. Ωστόσο, υπάρχει διακύμανση στις μεθόδους εφαρμογής laser, καθώς και έλλειψη στοιχείων για τον τύπο laser, τις μελέτες εμβέλειας δόσης και την επιλογή μήκους κύματος που δημιουργούν εμπόδια στην εφαρμογή του LLLT χωρίς περαιτέρω αυστηρότερη μελέτη. Η ετερογένεια καθιστά δύσκολη την εξαγωγή ισχυρών συμπερασμάτων σχετικά με την αποτελεσματικότητα του LLLT και τους μηχανισμούς του [192, 224].

Τέλος, βρέθηκε σε μελέτη, ότι αυξήθηκε η περιεκτικότητα σε κολλαγόνο και ελαστίνη που παράγεται από τους ινοβλάστες μετά την έκθεση τους σε υπέρυθη ακτινοβολία χαμηλής ισχύος και ότι αυτή η αύξηση ήταν ανάλογη με τη διάρκεια της έκθεσης στην ακτινοβολία. Η αντικειμενική ιατρική αξιολόγηση των ασθενών έδειξε ότι η τραχύτητα και η χαλαρότητα βελτιώθηκαν αρκετά, αλλά δεν υπήρξε σημαντική βελτίωση στις υπερμελάγχρωση [225].

Αν και έχει μελετηθεί γενικά η LLLT στο μακρόκοσμο, ελάχιστα είναι γνωστά σχετικά με την επίδραση της στην ελαστίνη. Σύμφωνα με τα παραπάνω, αλλά και λόγω του γεγονότος ότι τα περισσότερα μέρη του ανθρώπινου σώματος, όπως το δέρμα, τα κόκκαλα, οι χόνδροι, οι τένοντες, οι πνεύμονες και διάφοροι άλλοι ιστοί εμπεριέχουν ελαστίνη. Αποτελεί επιτακτική ανάγκη η έρευνα της αλληλεπίδρασης της ακτινοβολίας χαμηλής ενέργειας στην περιοχή του ερυθρού με την ελαστίνη στη νανοκλίμακα.

4.6 Μελέτη αλληλεπίδρασης ακτινοβολίας με ελαστίνη με τη χρήση AFM

Η έρευνα σε νανοκλίμακα για την επίδραση ελεγχόμενων εξωτερικών παραμέτρων με την ελαστίνη, μπορεί να πραγματοποιηθεί με το AFM. Το AFM μπορεί να χρησιμοποιηθεί σε έναν μεγάλο αριθμό ερευνητικών διαδικασιών σχετικά με ιστούς που εμπεριέχουν ελαστίνη. Για παράδειγμα, έχει αναφερθεί ότι το AFM αποτελεί ένα ιδιαίτερος χρήσιμο εργαλείο στους τομείς της ιστολογίας και κυτταρολογίας [226].

Επιπροσθέτως, το AFM χρησιμοποιείται με αυξανόμενο ρυθμό τα τελευταία χρόνια στη μελέτη της επίδρασης Η/Μ ακτινοβολιών (είτε από τη φύση, είτε από ιατρικές συσκευές) σε ιστούς που περιέχουν κολλαγόνο και ελαστίνη σε υψηλά ποσοστά. Συγκεκριμένα, οι Choi et al. μελέτησαν τις ποσοτικές επιδράσεις των *in vivo* ιατρικών διαδικασιών χρησιμοποιώντας ραδιοσυχνότητες σε ιστό από δέρμα λαγού [227]. Το μεγαλύτερο, ίσως, πλεονέκτημα της χρήσης του AFM, στη μελέτη PVA υδρογέλης (Polyvinyl alcohol hydrogel), είναι η δυνατότητα συνδυασμού απεικόνισης υψηλής ανάλυσης με ποσοτικές και ποιοτικές μετρήσεις ιδιοτήτων [228].

Η τεχνική AFM βρέθηκε να είναι ένα πολλά υποσχόμενο μέσο για τον προσδιορισμό των ελαστομηχανικών ιδιοτήτων των κυτταρικών τοιχωμάτων μεμονωμένων ζωντανών κυττάρων που εξήχθησαν από βιολογικά υλικά στη νανοκλίμακα. Επίσης, η αλλαγή του σχήματος της ακίδας οδήγησε σε αλλαγή στη συμπεριφορά του υλικού κατά τη διαδικασία διεύθυνσης της ακίδας στο δείγμα. Ως εκ τούτου, το AFM μπορεί να είναι εξαιρετικά κατάλληλο για την αξιολόγηση των ιδιοτήτων που σχετίζονται με τη δομή των βιολογικών υλικών σε κυτταρική και υποκυτταρική κλίμακα συνδυάζοντας τις ελαστομηχανικές ιδιότητες με την τοπογραφική απεικόνιση [229].

Επιπροσθέτως, το AFM έχει ποικίλες εφαρμογές στις βιολογικές επιστήμες των κυττάρων [230], όπως η κυτταρική μηχανική [231, 232], η μοριακή αναγνώριση [233], οι μετρήσεις δύναμης σε κύτταρα και ιστούς [234]. Επίσης, χρησιμοποιείται με διαφορετικούς τρόπους απεικόνισης για τους μηχανισμούς των μοριακών κυττάρων [235], για χειρισμό μεμονωμένων κυττάρων και μορίων με ελεγχόμενη δύναμη [236, 237]. Ακόμη, μπορεί το AFM να απεικονίσει διάφορες βιομοριακές διεργασίες [238], την επιφάνεια κυττάρου [239] στη νανοκλίμακα [240, 241, 242].

Επίσης, έρευνα με τη χρήση AFM έδειξε ότι η αναδιαμόρφωση της ECM σε φωτογηρασμένο δέρμα οφείλεται κυρίως σε ενζυμική διάσπαση. Η ακτινοβολία

απομονωμένων μορίων ECM με UV μπορεί επιλεκτικά να μετουσιώσει τις μοριακές και μακρομοριακές δομές των ειδών που είναι πλούσια σε χρωμοφόρο UV. Η θέση, η αρχιτεκτονική και η χημική σύνθεση των μικροϊνιδικών πρωτεϊνών ενισχύουν την ευαισθησία αυτών των δομών στην άμεση βλάβη από το UV, όπου μπορεί να είναι ένας σημαντικός μηχανισμός στη διαδικασία της φωτογήρανσης του δέρματος [243].

Φαίνεται από μελέτη με AFM, ότι η παρέμβαση με εγγύς υπέρυθρο laser είναι αποτελεσματική στην επούλωση τραύματος διαβητικού ατόμου, μέσω της αύξησης της ποσότητας κολλαγόνου και ελαστίνης, αλλά και στη βελτίωση των εμβιομηχανικών ιδιοτήτων [244].

Αξίζει να σημειωθεί, ότι ειδικά οι έρευνες που μελετάνε την αλληλεπίδραση ελαστίνης-ακτινοβολίας με τη χρήση AFM είναι ελάχιστες στη διεθνή βιβλιογραφία. Ως εκ τούτου, στη συγκεκριμένη διδακτορική διατριβή θα μελετηθούν στο 7^ο και 8^ο κεφάλαιο οι αλληλεπιδράσεις της υπεριώδους ακτινοβολίας και της ακτινοβολίας χαμηλής ισχύος στην περιοχή του ερυθρού με την ελαστίνη στη ναοκλίμακα με τη χρήση των τεχνικών του AFM.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 5. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

5.1 Πρωτόκολλα προετοιμασίας δειγμάτων ελαστίνης

Η μελέτη των ινών ελαστίνης, υπό την επίδραση εξωτερικών ελεγχόμενων παραμέτρων, πραγματοποιήθηκε με την παραγωγή ινιδίων ελαστίνης τα οποία παρασκευάστηκαν με συγκεκριμένα προεπιλεγμένα χαρακτηριστικά. Χρησιμοποιήθηκαν συγκεκριμένα πρωτόκολλα τα οποία επιτρέπουν την απεικόνιση και τον τοπογραφικό χαρακτηρισμό μεμονωμένων ινών ελαστίνης με χρήση AFM.

5.1.1 Δημιουργία μητρικών εναιωρημάτων ελαστίνης

Ελαστίνη από συνδετικό ιστό αυχένα βοοειδούς (E1625, Sigma-Aldrich, Merck KGaA, Darmstadt, Germany) σε μορφή υποκίτρινης σκόνης διαλύθηκε σε τρεις διαφορετικούς διαλύτες, φωσφορικό ρυθμιστικό διάλυμα (PBS – Dulbecco's Phosphate Buffered Saline - Sigma D8537 - Gibco 14190), οξικό οξύ (CH_3COOH 0,25 M) και δις απεσταγμένο νερό. Τα τρία μητρικά εναιωρήματα που δημιουργήθηκαν αποθηκεύτηκαν στους 4°C. Στη συνέχεια μελετήθηκαν σε τρεις διαφορετικές συγκεντρώσεις (0.5%, 1% και 2% w/v) και ύστερα σε τέσσερις διαφορετικές θερμοκρασίες αποθήκευσης τους (5, 10, 20 και 37°C). Έπειτα, ερευνήθηκαν σε διάφορους χρόνους από την πρώτη μέρα έως και έξι μήνες μετά τη δημιουργία του κάθε μητρικού εναιωρήματος. Όλα τα πειράματα πραγματοποιήθηκαν κατά την ίδια χρονική περίοδο συμπεριλαμβανομένων όλων των πιθανών συνδυασμών των παραπάνω παραμέτρων. Σε κάθε πείραμα άλλαζε κάθε φορά μόνο μία παράμετρος και οι άλλες τρεις παρέμεναν σταθερές.

5.1.2 Προετοιμασία δειγμάτων ελαστίνης

Από κάθε εναιώρημα ελαστίνης που δημιουργήθηκε, 10-20μL τοποθετήθηκαν πάνω σε υπόστρωμα που αποτελείται από λεπτό φύλλο μίκα (mica disc) διαμέτρου 9,9mm από την Ted Pella, Inc., Redding, CA, USA (Product No: 50, Pelco). Στη συνέχεια, πραγματοποιήθηκε ένα βήμα πλύσης με δις απεσταγμένο νερό στα δείγματα ελαστίνης που ετοιμάστηκαν. Στη συνέχεια ξηράνθηκαν στον αέρα και σε θερμοκρασία δωματίου. Έπειτα χρησιμοποιήθηκαν για απεικόνιση στο AFM. Η ίδια διαδικασία επαναλήφθηκε για κάθε πείραμα. (Εικόνα 5.1)

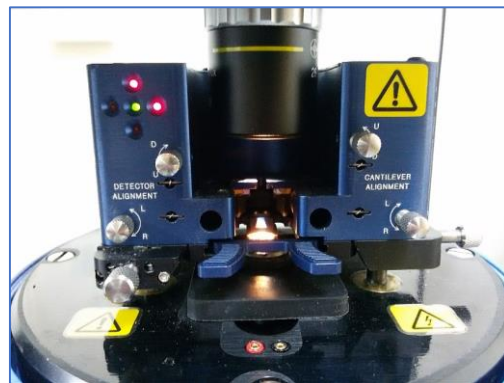
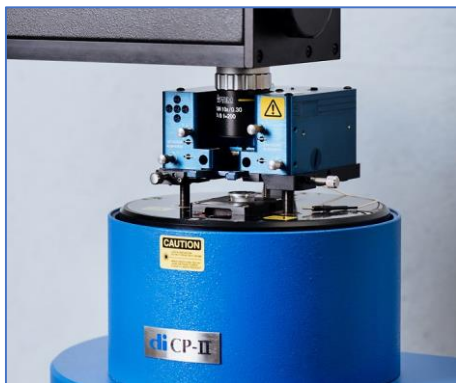
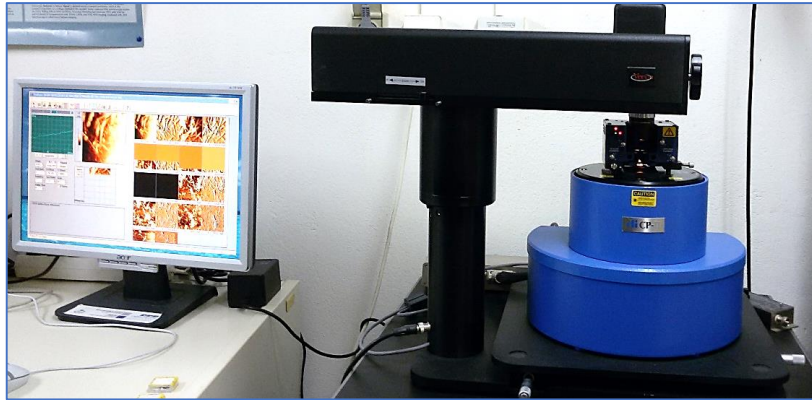
					
εναιώρημα ελαστίνης	λεπτό φύλλο mica	10-20μL ελαστίνης σε φύλλο mica	πλύση με δις απεσταγμένο νερό	ξηράνση στον αέρα και τοποθέτηση στο AFM	Απεικόνιση στο AFM

Εικόνα 5.1. Σχηματική πειραματική διαδικασία προετοιμασίας δείγματος ελαστίνης.

5.2 Μικροσκοπία Ατομικής Δύναμης

5.2.1 Μεθοδολογίες Απεικόνισης AFM

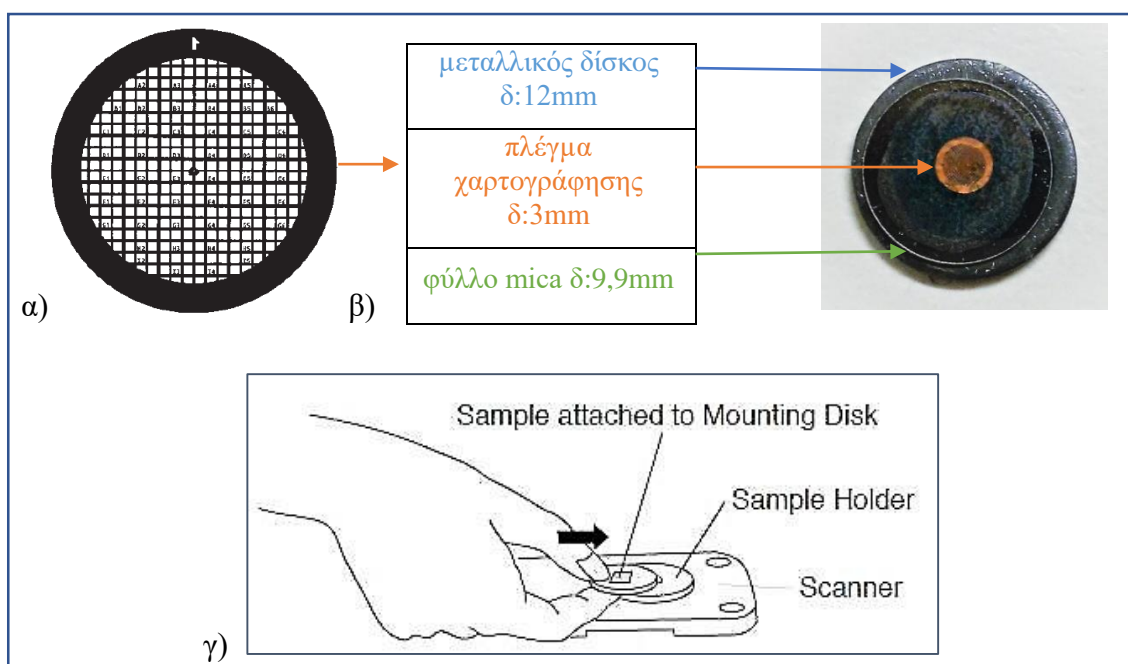
Το AFM που χρησιμοποιήθηκε για την απεικόνιση των ινιδίων σε νανοεπίπεδο είναι το CP II (Veeco Instruments, Santa Barbara, CA) (Εικόνα 5.2), με τις λειτουργίες επαφής (contact mode) και ενδιάμεσης επαφής (tapping mode).



Εικόνα 5.2. Φωτογραφίες AFM CPII.

Όλα τα πειράματα διεξήχθησαν στον αέρα σε συνθήκες περιβάλλοντος. Η διαδικασία απεικόνισης και οι ποσοτικές μετρήσεις, όπως οι μέσες τιμές των διαστάσεων των ινών (διάμετροι και ύψη) έγιναν με τη βοήθεια κατάλληλου λογισμικού ανάλυσης εικόνων (image analysis, DI-SPM Lab ver.60.2, Veeco). Ελήφθησαν πέντε με δέκα εικόνες από διάφορες περιοχές (ανάλυση σημείων 512 x 512 ανά εικόνα) του κάθε δείγματος και με διαφορετικά μεγέθη εικόνων (από 50 x 50 μm έως 200 x 200 nm). Οι τοπογραφικές εικόνες από το AFM παρουσιάζονται σε δυσδιάστατη (2D) και τρισδιάστατη (3D) έγχρωμη κλίματα.

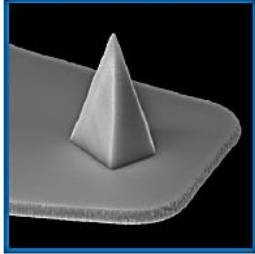
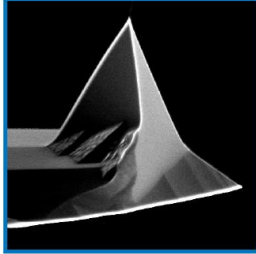
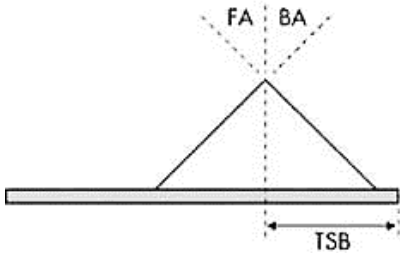
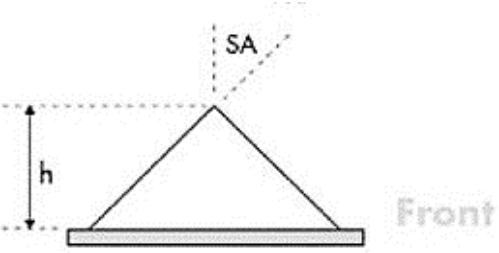
Τα ινίδια ελαστίνης που μελετήθηκαν αναπτύχθηκαν σε φύλλα mica όπως έχουμε προαναφέρει. Τα προς μελέτη δείγματα πριν την απεικόνισή τους σταθεροποιούνταν σε μεταλλικούς δίσκους (metal specimen disc) διαμέτρου 12mm (Product No.16208, Ted Pella, Inc. Redding, CA, USA) με ταινίες διπλής όψευς (double face adhesive carbon tabs) διαμέτρου 12mm (model: G3347N, Agar Scientific, Essex, United Kingdom). Ενδιάμεσα στα φύλλα mica και τους μεταλλικούς δίσκους χρησιμοποιήθηκαν πλέγματα χαρτογράφησης (copper finder grids, G2761C, 200 mesh, F1, Agar Scientific, Essex, United Kingdom), έτσι ώστε να είναι δυνατή η χαρτογράφηση του δείγματος και η επανάληψη της διαδικασίας της απεικόνισης στην ίδια περιοχή, κάτι που είναι απαραίτητο για την αξιοπιστία των αποτελεσμάτων. (Εικόνα 5.3) [245–248].



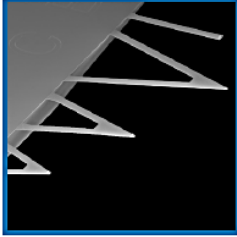
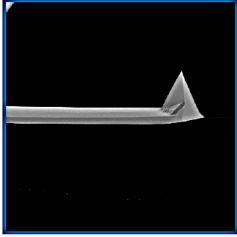

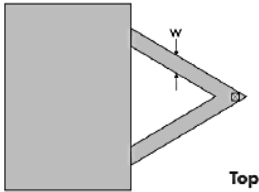
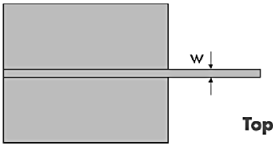
Εικόνα 5.3. α) πλέγμα χαρτογράφησης, β) υπόστρωμα δείγματος: μεταλλικός δίσκος διαμέτρου $\delta:12\text{mm}$, πλέγμα χαρτογράφησης $\delta:3\text{mm}$, φύλλο mica $\delta:9,9\text{mm}$, γ) τοποθέτηση δείγματος στην κατάλληλη βάση στήριξης του μικροσκοπίου.

Τα χαρακτηριστικά των ακίδων και των προβόλων που χρησιμοποιήθηκαν φαίνονται αναλυτικά στους Πίνακες 5.1 και 5.2 αντίστοιχα. Συγκεκριμένα, στην contact mode με συχνότητα σάρωσης 1Hz, χρησιμοποιήθηκε πυραμιδική ακίδα (MLCT, Bruker, Innova, Camarillo, CA, USA), με ακτίνα καμπυλότητας 20 nm σε προβολό σχήματος V και σταθερά ελατηρίου 0.6N/m. Ενώ, στην tapping mode με συχνότητα σάρωσης 1Hz, χρησιμοποιήθηκε η ανισοτροπική ακίδα AFM (MPP-11123-10, Bruker, Innova, Camarillo, CA, USA) με σταθερά ελατηρίου 40N/m, ακτίνα καμπυλότητας ακίδας 8nm και συχνότητα συντονισμού στα 300kHz.

Πίνακα 5.1. Χαρακτηριστικά ακίδων MLCT (contact mode) και MPP (tapping mode).

Ακίδα (Tip)	
MLCT	MPP
Tip Radius: 20nm	Tip Radius: 8nm
Front Angle: $15^\circ \pm 2^\circ$	Front Angle: $15^\circ \pm 2^\circ$
Back Angle: $25^\circ \pm 2^\circ$	Back Angle: $25^\circ \pm 2^\circ$
Tip Set Back: 4 μ m	Tip Set Back: 15 μ m
Tip Height: 6 μ m	Tip Height: 17,5 μ m
Side Angle: $17,5^\circ \pm 2^\circ$	Side Angle: $17,5^\circ \pm 2^\circ$
 <p style="text-align: center;">Εικόνα από SEM</p>	 <p style="text-align: center;">Εικόνα από SEM</p>
<p>Γεωμετρία ακίδας:</p> <div style="display: flex; justify-content: space-around; align-items: center;"> <div style="text-align: center;">  <p>Side</p> </div> <div style="text-align: center;">  <p>Front</p> </div> </div>	

Πίνακα 5.2. Χαρακτηριστικά προβόλων MLCT (contact) και MPP (tapping).

Πρόβολος (Cantilever)	
MLCT	MPP
Frequency: 125kHz	Frequency: 125kHz
k: 0,6N/m	k: 40N/m
Width: 18 μ m	Width: 35 μ m
Thickness: 0,55 μ m	Thickness: 3,75 μ m
Length: 85 μ m	Length: 125 μ m
	
Εικόνα από SEM	Εικόνα από SEM
<p>Γεωμετρία προβόλου:</p> 	
	

5.2.2 Μεθοδολογίες επεξεργασίας και ανάλυσης εικόνας AFM

Στην επεξεργασία των εικόνων γίνεται βελτίωση της ποιότητας με έμφαση στη χρήσιμη πληροφορία και η εξάλειψη της άχρηστης πληροφορίας από την εικόνα. Κατά τη λήψη της εικόνας είναι σημαντικό να υπάρξει η καλύτερη δυνατή ποιότητα στην απεικόνιση, με κατάλληλη προετοιμασία του δείγματος, με ρυθμίσεις των οργάνων και με κατάλληλη επιλογή του φωτισμού. Είναι προτιμότερο να βελτιωθεί η ποιότητα της εικόνας στο στάδιο της λήψης της αντί με επεξεργασία της μετά [249, 250].

Η ανάλυση της εικόνας, αναφέρεται στην εξαγωγή της χρήσιμης πληροφορίας από μία εικόνα, όπως και στην κατανόηση της. Χρησιμοποιεί τεχνικές επεξεργασίας εικόνων, αναγνώρισης προτύπων και τεχνικής νοημοσύνης. Οι βασικές τεχνικές ανάλυσης εικόνας είναι η ανίχνευση λεπτομερειών, η αναγνώριση σημείων και ο διαχωρισμός των περιοχών μιας εικόνας με βάση κάποιο χαρακτηριστικό τους, όπως οι διάφορες αποχρώσεις των χρωμάτων και η φωτεινότητα τους.

Για την επεξεργασία και ανάλυση των εικόνων που λήφθηκαν με AFM και τη μέτρηση συγκεκριμένων επιφανειακών χαρακτηριστικών αναπτύχθηκαν κατάλληλες τεχνικές μέσω της χρήσης των λογισμικών επεξεργασίας εικόνας DI SPM Lab ver.60.2, IP-image processing, Data analysis ver.2.1.15 (Veeco) και WSxM 5.0 dev. 9.1 (Nanotec) [251]. Οι τεχνικές αναλύονται παρακάτω με τις ποσοτικές AFM μετρήσεις να περιλαμβάνουν διάφορες παραμέτρους, όπως το προφίλ του ύψους, γραφικές τραχύτητας και μετρήσεις αποστάσεων.

5.2.2.1 Ανάπτυξη Τεχνικών Επεξεργασίας Εικόνας

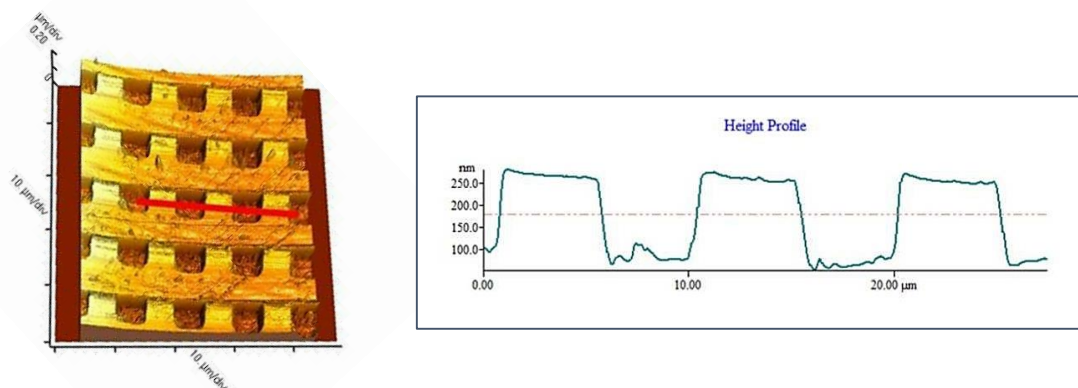
Η επεξεργασία των AFM εικόνων πραγματοποιήθηκε ώστε να βελτιωθούν οι ληφθείσες εικόνες και να κάνει πιο ευδιάκριτες πληροφορίες που υπήρχαν ήδη στην εικόνα. Οι τεχνικές που εφαρμόστηκαν ήταν ρυθμίσεις αντίθεσης και φωτεινότητας, τεχνικές σκίασης και ομαλοποίησης εικόνας. Συγκεκριμένα, οι τεχνικές σκίασης προσέφεραν σημαντική βελτίωση στη παρεχόμενη πληροφορία χωρίς να αλλοιώνονται τα στοιχεία της αρχικής εικόνας. Μετά από κάθε διαδικασία επεξεργασίας εικόνας, γινόταν διόρθωση της χρωματικής κλίμακας, ώστε η κλίμακα του ψευδοχρώματος να αποκρίνεται σε πραγματικές υψομετρικές διαφορές των χαρακτηριστικών των δειγμάτων.

5.2.2.2 Ανάλυση Εικόνας

Οι μεθοδολογίες ανάλυσης εικόνας και οι αλγόριθμοι που χρησιμοποιήθηκαν επέτρεψαν την ποσοτικοποίηση χαρακτηριστικών των ινιδίων, όπως οι υψομετρικές διαφορές, οι διάμετροι και το μήκος ινών, αλλά και η τραχύτητα της επιφάνειάς τους, για καλύτερο χαρακτηρισμό της τοπογραφίας των δειγμάτων.

5.2.2.3 Μέτρηση Αποστάσεων

Συγκεκριμένα, το προφίλ ύψους (height profile) παρουσιάζει τις τιμές κατά τον z-άξονα (τιμές ύψους) κατά μήκος μιας διατομής της εικόνας (**Εικόνα 5.4**). Επιτρέπει τη μέτρηση διάφορων χαρακτηριστικών όπως για παράδειγμα τη διάμετρο της ίνας ή του ύψους της (δηλαδή την υψομετρική διαφορά μεταξύ του υψηλότερου και του χαμηλότερου σημείου της ίνας).



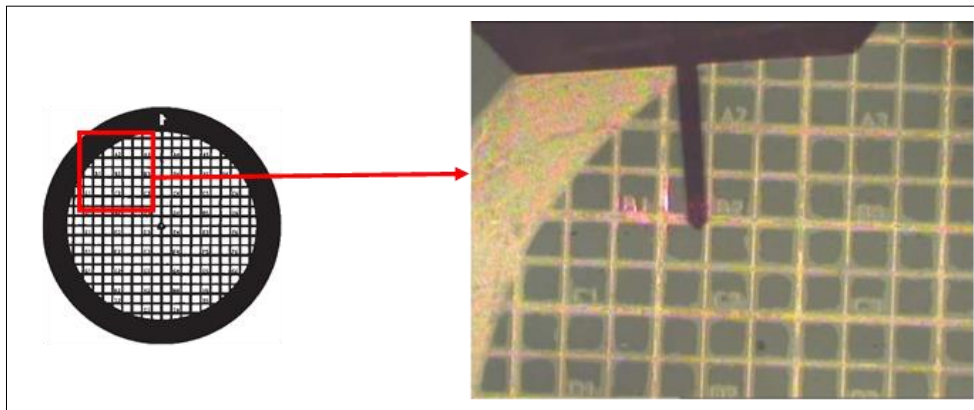
Εικόνα 5.4. Πλέγμα βαθμονόμησης AFM (αριστερά) [model:APCS-0099 (Veeco)] και το αντίστοιχο προφίλ ύψους της σχεδιασμένης κόκκινης γραμμής (δεξιά) [113].

5.2.3 Μεθοδολογία επαναλαμβανόμενου προσδιορισμού του ίδιου ινιδίου ελαστίνης

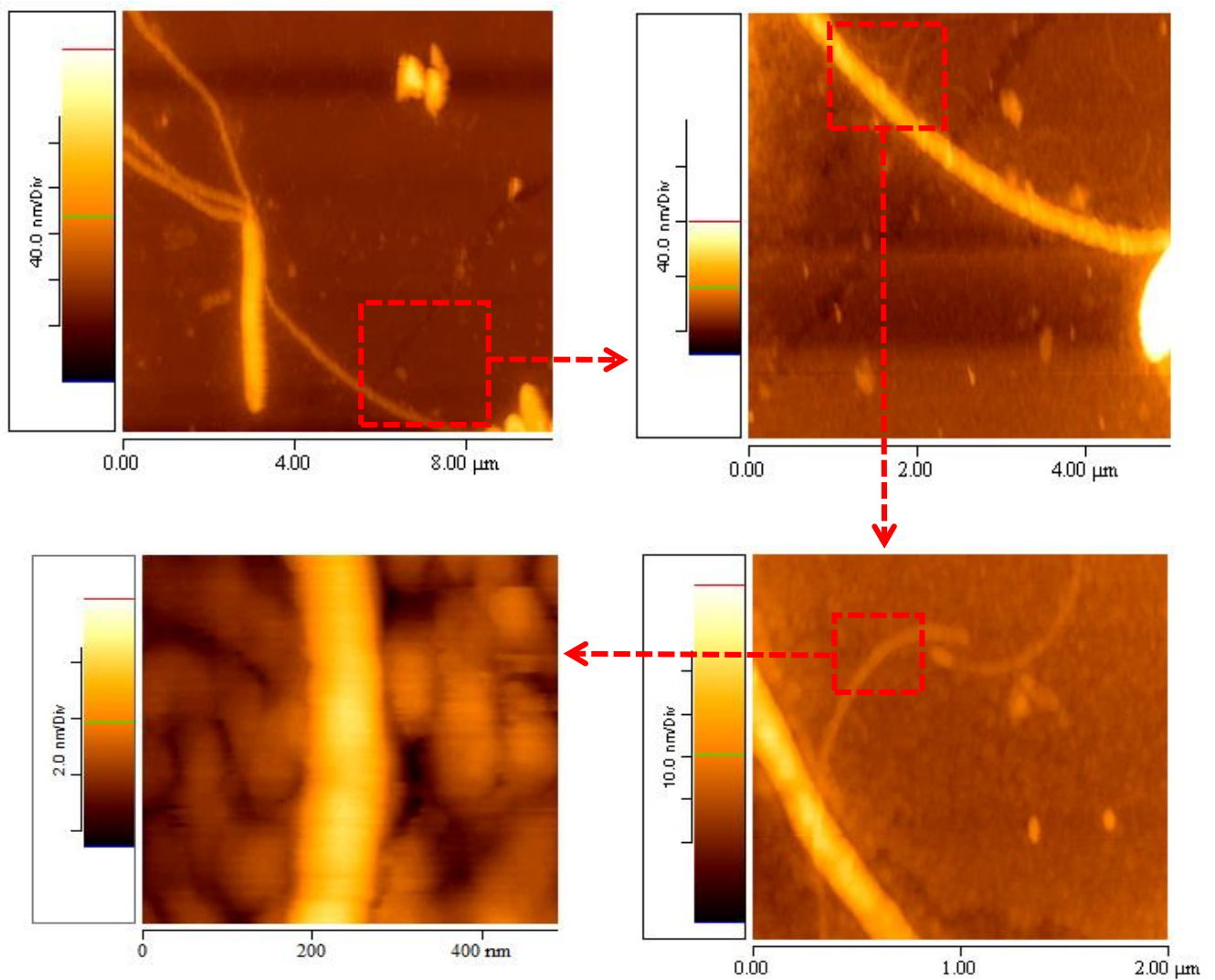
Για τον προσδιορισμό του ίδιου σημείου του δείγματος, κατά τη διάρκεια επαναλαμβανόμενων διεργασιών, χρησιμοποιήθηκαν πλέγματα ανίχνευσης (locator grids) για τη χαρτογράφηση της επιφάνειας του δείγματος. Τα πλέγματα ανίχνευσης παρέχουν συντεταγμένες των διαφόρων περιοχών του δείγματος (π.χ. A1, A2,.. B1, B2,.. κ.τ.λ., **Εικόνα 5.5α**). Αρχικά προσδιορίζεται μια περιοχή του δείγματος με χρήση πλέγματος ανίχνευσης. Στη συνέχεια αποκτάται μια εικόνα μεγάλων διαστάσεων με τη βοήθεια του AFM (100μm-100μm). Στη συνέχεια αποκτώνται εικόνες όλο και μικρότερων περιοχών μέχρι να απομονωθεί μια συγκεκριμένη περιοχή του δείγματος (π.χ. ένα τμήμα ενός ινιδίου ελαστίνης, **Εικόνα 5.5β**). Η συγκεκριμένη διαδικασία μπορεί να επαναλαμβάνεται συνεχώς με σκοπό τη μελέτη της επίδρασης εξωτερικών παραγόντων σε συγκεκριμένη περιοχή του δείγματος.

Αξίζει να σημειωθεί, ότι το μέγεθος της επιφάνειας που μπορεί να απομονωθεί με την παραπάνω διαδικασία είναι συγκρίσιμο με τη διάμετρο καμπυλότητας της κορυφής της χρησιμοποιούμενης ακίδας.

α)



β)



Εικόνα 5.5. α) Πλέγμα ανίχνευσης, β) Εικόνες AFM με σκοπό την εύρεση συγκεκριμένης περιοχής του δείγματος και τον εντοπισμό του ίδιου νανοϊνιδίου (διαδικασία που μπορεί να επαναληφθεί).

5.2.4 Μεθοδολογία για τη γεωμετρία της ακίδας

Οι εικόνες AFM επηρεάζονται σχεδόν πάντα από τεχνουργήματα που προκύπτουν από την επίδραση της ακίδας με το βιοϋλικό [252, 253]. Η προσέγγιση των Canet-Ferrer et al. χρησιμοποιήθηκε για να μειωθούν οι επιπτώσεις τέτοιων σφαλμάτων στην ποσοτική ανάλυση των αποτελεσμάτων. Τα σφάλματα που προκύπτουν μπορεί να είναι σημαντικά για την περίπτωση των νανοϊνιδίων. Για την περίπτωση, όπου η ακτίνα της ακίδας (r_{tip}) είναι μεγαλύτερη από το πραγματικό ύψος του δείγματος (h_{eff}), δηλαδή $r_{tip} > h_{eff}$, το μοντέλο των Canet-Ferrer et al. παρουσιάζεται παρακάτω [253]:

$$\frac{1}{2}w_{exp} = \Delta + \frac{1}{2}w_{eff}$$

και

$$\Delta = r_{tip} \cos[\arcsin((r_{tip} - h_{eff})/r_{tip})]$$

Στην εξίσωση (1), φαίνεται το αναμενόμενο (w_{exp}) και το πραγματικό (w_{eff}) πλάτος του δείγματος. Επιπλέον, αν $r_{tip} > h_{eff}$

$$\frac{1}{2}w_{exp} = r_{tip} + \Delta + \frac{1}{2}w_{eff} \quad (3)$$

και

$$\Delta = (h_{eff} - r_{tip}) \tan \gamma \quad (4)$$

Στην εξίσωση (4), γ είναι η γωνία πρόσωσης της ακίδας.

5.3 Πειραματικά Δεδομένα Ακτινοβολήσης με Υπεριώδη Ακτινοβολία

Τα δείγματα ελαστίνης ακτινοβολήθηκαν στον αέρα με λάμπα UV μήκους κύματος 254nm (GL4 Sankyo Denki Co. Ltd., Japan). Η απόσταση μεταξύ του δείγματος και της λάμπας UV ήταν στα 3 cm. Η ένταση της UV ακτινοβολίας μετρήθηκε με ψηφιακό φωτόμετρο (Goldilux™ radiometer-photometer, 70234-meter, 70239-probe, Oriel Instruments). Η ένταση αυτής της ακτινοβολίας για την απόσταση των 3cm ήταν 1.813 $\mu\text{W}/\text{cm}^2$, δηλαδή 0,11 $\text{J}/(\text{cm}^2 \cdot \text{min})$ και η δόση της προσπίπτουσας ακτινοβολίας σε διάρκεια 1h ήταν 6,6 J/cm^2 .

5.4 Πειραματικά Δεδομένα Ακτινοβολήσης με Laser Χαμηλής Ισχύος στην Περιοχή του Ερυθρού

Τα δείγματα ελαστίνης ακτινοβολήθηκαν στον αέρα με σύστημα διοδικού laser μήκους κύματος 661 nm (GCSLS-10-1500m, China Daheng Group, Inc.) με οπτική ίνα στην άκρη του, όπου διαχυτής δέσμης είχε επίπεδη κυκλική συμμετρία. Η απόσταση μεταξύ του δείγματος και του laser ήταν στα 4 cm. Η ένταση της ακτινοβολίας μετρήθηκε με θερμικό ψηφιακό φωτόμετρο με ανιχνευτή χαμηλής ισχύος (Nova display with 3A-FS-SH puck, Ophir Laser Measurement Group).

Η πυκνότητα ενέργειας της ακτινοβολίας για την απόσταση των 4cm σε χρονικό διάστημα 45sec ήταν 0.4 J/cm^2 (πειράματα διακοπτόμενης ακτινοβολήσης) και για τα 15min και 60min ήταν 8 J/cm^2 και 32 J/cm^2 αντίστοιχα (πειράματα συνεχούς ακτινοβολήσης). Η ακτινοβολήση των δειγμάτων έγινε επαναλαμβανόμενες φορές όποτε και αυξάνοταν συνεχώς η προσφερόμενη ενέργεια. Επίσης, στα πειράματα διακοπτόμενης ακτινοβολήσης μεταξύ της κάθε επανάληψης γινόταν παύση της ακτινοβολήσης για 60sec, ώστε να μην υπάρξουν θερμικά αποτελέσματα στα δείγματα και επηρεάσουν τις πειραματικές μετρήσεις. Στα πειράματα συνεχούς ακτινοβολήσης για 60 λεπτά, η αύξηση της θερμοκρασίας που προκάλεσε η ακτινοβολία στα δείγματα ήταν $0,9 \text{ }^\circ\text{C}$. Η αύξηση της θερμοκρασία μετρήθηκε με ψηφιακό θερμόμετρο.

Στη συνέχεια, ο **Πίνακας 5.3** παρουσιάζει συνοπτικά τα πειραματικά δεδομένα για την ακτινοβολήση με ερυθρό φως χαμηλής ισχύος. Οι παραμέτροι της ακτινοβολήσης που χρησιμοποιήθηκαν στην 1^η κατηγορία πειραμάτων με τη διακοπτόμενη ακτινοβολήση φαίνονται στον **Πίνακα 5.4**, ενώ για τη 2^η κατηγορία πειραμάτων με τη συνεχόμενη ακτινοβολήση στον **Πίνακα 5.5**.

Πίνακας 5.3. Πειραματικά δεδομένα για την ακτινοβολήση με ερυθρό φως χαμηλής ισχύος.

LASER GCSLS-10-1500M	
Μήκος κύματος	661nm
Ισχύς	7 mW
Εμβαδόν δέσμης	$0,785 \text{ cm}^2$
Συνολική Πυκνότητα Ενέργειας: 1 ^ο πείραμα	$8,0 \text{ J/cm}^2$
Συνολική Πυκνότητα Ενέργειας: 2 ^ο πείραμα	$32,0 \text{ J/cm}^2$

Πίνακας 5.4. Συνθήκες ακτινοβολήσης για την 1^η κατηγορία πειραμάτων (διακοπτόμενη ακτινοβολία).

	Πειράματα	Δόσεις	Χρόνος (min)	Πυκνότητα Ενέργειας (J/cm ²)
			0	0
1 ^η κατηγορία (διακοπτόμενη ακτινοβολία)	1ο	1	0,75	0,4
		Παύση ακτινοβολίας: 1 min		
		2	1,50	0,8
		Παύση		
		3	2,25	1,2
		Παύση		
		4	3,00	1,6
		Παύση		
		5	3,75	2,0
	2ο	6	4,50	2,4
		Παύση		
		7	5,25	2,8
		Παύση		
		8	6,00	3,2
		Παύση		
		9	6,75	3,6
		Παύση		
		10	7,50	4,0
	3ο	11	8,25	4,4
		Παύση		
12		9,00	4,8	
Παύση				
13		9,75	5,2	
Παύση				
14		10,50	5,6	
Παύση				
	15	11,25	6,0	
4ο	16	12,00	6,4	
	Παύση			
	17	12,75	6,8	
	Παύση			
	18	13,50	7,2	
	Παύση			
	19	14,25	7,6	
	Παύση			
	20	15,00	8,0	

Πίνακας 5.4. Συνθήκες ακτινοβολήσης για την 2^η κατηγορία πειραμάτων (συνεχόμενη ακτινοβολία).

2 ^η κατηγορία (συνεχόμενη ακτινοβολία 15 και 60 min)	
Time (min)	Ποκνότητα Ενέργειας (J cm ⁻²)
0	0
15	8
60	32

5.5 Στατιστική σημαντικότητα αποτελεσμάτων

Τα πειραματικά αποτελέσματα αυτής της διδακτορικής διατριβής έχουν στατιστική σημαντικότητα, δηλαδή προσδιορίζεται η πιθανότητα να οφείλονται σε τυχαίους παράγοντες. Το πρώτο στάδιο είναι η πραγματοποίηση μετρήσεων σε ένα δείγμα αναφοράς, το οποίο έχει θεωρητικά απολύτως ελεγχόμενα φυσικά χαρακτηριστικά (μετρήσεις διαστάσεων ινών ελαστίνης με ελεγχόμενη διαδικασία δημιουργίας). Στη συνέχεια πραγματοποιούνται πάλι μετρήσεις στα ίδια χαρακτηριστικά υπό την επίδραση εξωτερικών παραγόντων (ακτινοβολήση για διάφορους χρόνους) [143]. Οι τιμές καταγράφονται στον **Πίνακα 5.6**.

Πίνακας 5.6. Καταγραφή των μετρήσεων ενός δείγματος.

Δείγμα Αναφοράς (X)	Ακτινοβολήση για χρόνο Δt_1 (Y)	Ακτινοβολήση για χρόνο Δt_2 (Z)	...	Ακτινοβολήση για χρόνο Δt_i (Q)
X_1	Y_1	Z_1	...	Q_1
X_2	Y_2	Z_2	...	Q_2
...
X_N	Y_N	Z_N	...	Q_N

Στη συνέχεια τα στάδια που ακολουθούν είναι:

- Υπολογισμός μέσου όρου τιμών κάθε διαδικασίας

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

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

...

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

- Υπολογισμός μέσου όρου όλων των τιμών :

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

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

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

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

...

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

- Υπολογισμός βαθμών ελευθερίας:

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

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

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

- Υπολογισμός αθροίσματος τετραγώνων (SS_{treat} = "sum of squares between treatment groups"):

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

- Υπολογισμός ολικού αθροίσματος τετραγώνων (SS_{treat} = "Total sum of squares"):

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

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

Για τον υπολογισμό των ‘μέσων τετραγώνων’ MS (mean square) ισχύει: $MS = \frac{SS}{df}$

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

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

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

Ανάλογα με τους βαθμούς ελευθερίας του κάθε προβλήματος, υπολογίζεται η τιμή του F και από κατάλληλους πίνακες προσδιορίζεται η p – value. Οι αποδεκτές τιμές της p – value στη διεθνή βιβλιογραφία είναι $p < 0.05$, που σημαίνει ότι η πιθανότητα τα πειραματικά αποτελέσματα να έχουν προέλθει από τυχαίους παράγοντες είναι μικρότερη από 5%. Τα πιο συνήθη όρια στατιστικής σημαντικότητας είναι: $p < 0.05$, $p < 0.01$, $p < 0.001$, $p < 0.0001$. Ανάλογα με το όριο στατιστικής σημαντικότητας γίνεται και η αναζήτηση του εκάστοτε πίνακα. (όπως ο Πίνακας 5.7)

Συγκεκριμένα, σε πείραμα με μεταβολή των διαμέτρων των ινιδίων υπό την επίδραση της υπεριώδους ακτινοβολίας υπολογίστηκε η στατιστική σημαντικότητα των αποτελεσμάτων και παρατίθεται στον παρακάτω πίνακα. Όπου με X συμβολίζεται η διαδικασία μετρήσεων πριν την ακτινοβολία και με Y και Z μετά από 10 και 60 λεπτά UV ακτινοβολίας αντίστοιχα.

ΔΙΑΔΙΚΑΣΙΑ	ΜΕΤΡΗΣΕΙΣ ΔΙΑΜΕΤΡΩΝ ΙΝΙΔΙΩΝ (σε nm)		
X(0)	339	335	331
Y(10)	335	330	328
Z(60)	311	302	303

- Υπολογισμός μέσου όρου τιμών κάθε διαδικασίας

$$Mean(X) = \frac{X_1 + X_2 + X_3}{3} = \frac{339 + 335 + 331}{3} = 335.00$$

$$Mean(Y) = \frac{Y_1 + Y_2 + Y_3}{3} = \frac{335 + 330 + 328}{3} = 331.00$$

$$Mean(Z) = \frac{Z_1 + Z_2 + Z_3}{3} = \frac{311 + 302 + 303}{3} = 305.34$$

- Υπολογισμός μέσου όρου όλων των τιμών

$$\hat{\mu} = \frac{X_1 + X_2 + X_3 + Y_1 + Y_2 + Y_3 + Z_1 + Z_2 + Z_3}{9} \Rightarrow$$

$$\hat{\mu} = \frac{339 + 335 + 331 + 335 + 330 + 328 + 311 + 302 + 303}{9} \Rightarrow \hat{\mu} = 323.78$$

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

$$\hat{A}_1 = Mean_1 - \hat{\mu} \Rightarrow \hat{A}_1 = 335.00 - 323.78 \Rightarrow \hat{A}_1 = 11.22$$

$$\hat{A}_2 = Mean_2 - \hat{\mu} \Rightarrow \hat{A}_2 = 331.00 - 323.78 \Rightarrow \hat{A}_2 = 7.22$$

$$\hat{A}_3 = Mean_3 - \hat{\mu} \Rightarrow \hat{A}_3 = 305.34 - 323.78 \Rightarrow \hat{A}_3 = -18.55$$

ΔΙΑΔΙΚΑΣΙΑ	ΜΕΤΡΗΣΕΙΣ	MEAN	$\hat{A}_i = Mean_i - \hat{\mu}$
X(0)	339, 335, 331	335.00	11.22
Y(10)	335, 330, 328	331.00	7.22
Z(60)	311, 302, 303	305.34	-18.55

- Υπολογισμός βαθμών ελευθερίας

$$\text{Έχουμε 3 συνθήκες (X,Y,Z)} \Rightarrow df_{treat} = 3 - 1 = 2$$

$$\text{Έχουμε 9 μετρήσεις} \Rightarrow df_{tot} = 9 - 1 = 8$$

$$df_{treat} + df_{res} = df_{tot} \Rightarrow df_{res} = df_{tot} - df_{treat} \Rightarrow df_{res} = 6$$

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

$$SS_{treat} = (11.22)^2 \cdot 3 + (7.22)^2 \cdot 3 + (-18.55)^2 \cdot 3 = 1566.37$$

$$SS_{res} = (339 - 335)^2 + (335 - 335)^2 + (331 - 335)^2 + (335 - 331)^2 + (330 - 331)^2 + (328 - 331)^2 +$$

$$+ (311 - 305.34)^2 + (302 - 305.34)^2 + (303 - 305.34)^2 \Rightarrow$$

$$SS_{res} = 16 + 16 + 16 + 1 + 9 + 32.04 + 11.16 + 5.48 \Rightarrow$$

$$SS_{res} = 106.68$$

$$SS_{tot} = \sum_{i=1}^3 (X_i - \bar{\mu})^2 + \sum_{i=1}^3 (Y_i - \bar{\mu})^2 + \sum_{i=1}^3 (Z_i - \bar{\mu})^2$$

$$SS_{tot} = (339 - 323.78)^2 + (335 - 323.78)^2 + (331 - 323.78)^2 +$$

$$(335 - 323.78)^2 + (330 - 323.78)^2 + (328 - 323.78)^2 +$$

$$(311 - 323.78)^2 + (302 - 323.78)^2 + (303 - 323.78)^2 \Rightarrow$$

$$SS_{tot} = 231.65 + 125.89 + 52.13 + 125.89 + 38.69 + 17.81 + 163.33 + 474.37 + 431.81 \Rightarrow$$

$$SS_{tot} = 231,65 + 125,89 + 52,13 + 125,89 + 38,69 + 17,81 + 163,33 + 474,37 + 431,81 \Rightarrow$$

$$SS_{tot} = 1661,57$$

$$SS_{tot} = SS_{treat} + SS_{res} \Rightarrow 1661.57 \approx 1566.37 + 106.68$$

(λόγω προσέγγισης 2 μόνο δεκαδικών)

$$MS_{treat} = \frac{SS_{treat}}{df_{treat}} = \frac{1566.37}{2} = 783.20$$

$$MS_{res} = \frac{SS_{res}}{df_{res}} = \frac{106.68}{6} = 17.78$$

$$F = \frac{MS_{treat}}{MS_{res}} = \frac{783.2}{17.78} = 44.05$$

Στον Πίνακα 5.7. παρατηρείται ότι για βαθμούς ελευθερίας (2,6) δείχνει $F > 10.93$. Συνεπώς, η πιθανότητα το αποτέλεσμα να προήλθε από τυχαίους παράγοντες είναι $p < 0.01$.

Πίνακας 5.7. Τιμές των βαθμών ελευθερίας (F) για στατιστική σημαντικότητα μικρότερη του 0.01 [254]

<i>Critical values of F for the 0.01 significance level:</i>										
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
1	4052.19	4999.52	5403.34	5624.62	5763.65	5858.97	5928.33	5981.10	6022.50	6055.85
2	98.50	99.00	99.17	99.25	99.30	99.33	99.36	99.37	99.39	99.40
3	34.12	30.82	29.46	28.71	28.24	27.91	27.67	27.49	27.35	27.23
4	21.20	18.00	16.69	15.98	15.52	15.21	14.98	14.80	14.66	14.55
5	16.26	13.2	12.06	11.39	10.97	10.67	10.46	10.29	10.16	10.05
6	13.75	10.93	9.78	9.15	8.75	8.47	8.26	8.10	7.98	7.87
7	12.25	9.55	8.45	7.85	7.46	7.19	6.99	6.84	6.72	6.62
8	11.26	8.65	7.59	7.01	6.63	6.37	6.18	6.03	5.91	5.81
9	10.56	8.02	6.99	6.42	6.06	5.80	5.61	5.47	5.35	5.26
10	10.04	7.56	6.55	5.99	5.64	5.39	5.20	5.06	4.94	4.85
11	9.65	7.21	6.22	5.67	5.32	5.07	4.89	4.74	4.63	4.54
12	9.33	6.93	5.95	5.41	5.06	4.82	4.64	4.50	4.39	4.30
13	9.07	6.70	5.74	5.21	4.86	4.62	4.44	4.30	4.19	4.10
14	8.86	6.52	5.56	5.04	4.70	4.46	4.28	4.14	4.03	3.94
15	8.68	6.36	5.42	4.89	4.56	4.32	4.14	4.00	3.90	3.81
16	8.53	6.23	5.29	4.77	4.44	4.20	4.03	3.89	3.78	3.69
17	8.40	6.11	5.19	4.67	4.34	4.10	3.93	3.79	3.68	3.59
18	8.29	6.01	5.09	4.58	4.25	4.02	3.84	3.71	3.60	3.51
19	8.19	5.93	5.01	4.50	4.17	3.94	3.77	3.63	3.52	3.43
20	8.10	5.85	4.94	4.43	4.10	3.87	3.70	3.56	3.46	3.37

Ανάλογη διαδικασία ακολουθήθηκε και στην περίπτωση των πειραμάτων επίδρασης της ακτινοβολίας laser χαμηλής ισχύος στην περιοχή του ερυθρού στα νανοχαρακτηριστικά της ελαστίνης.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 6.

ΑΝΑΠΤΥΞΗ ΝΑΝΟΪΝΙΔΙΩΝ ΕΛΑΣΤΙΝΗΣ ΚΑΙ ΜΕΛΕΤΗ ΤΗΣ ΑΥΤΟΔΙΑΜΟΡΦΩΣΗΣ ΤΗΣ

6.1 Εισαγωγή

Η ελαστίνη, όπως έχει ήδη προαναφερθεί, είναι μια πρωτεΐνη που παρέχει ελαστικότητα και ανθεκτικότητα σε ιστούς του σώματος, όπως το δέρμα, τους πνεύμονες και τα αιμοφόρα αγγεία [255]. Ο έλεγχος των ιδιοτήτων της ελαστίνης είναι σημαντικός για διάφορες εφαρμογές στους τομείς της μηχανικής ιστών, της χορήγησης φαρμάκων και της ιατρικής [256, 257]. Για παράδειγμα, η ελαστίνη χρησιμοποιείται στη μηχανική ιστών για τη δημιουργία τεχνητών ιστών που έχουν παρόμοιες μηχανικές ιδιότητες με τους φυσικούς ιστούς [258]. Η ελαστίνη μπορεί να ενσωματωθεί σε υποκατάστατα δέρματος για τη βελτίωση της ελαστικότητας του τεχνητού δέρματος. Επιπλέον, τα πολυπεπτίδια που μοιάζουν με ελαστίνη (ELPs) είναι ένας τύπος συνθετικής ελαστίνης που μπορεί να χρησιμοποιηθεί ως φορέας φαρμάκων. Τα ELPs έχουν την ικανότητα να αυτοδιαμορφώνονται σε νανοσωματίδια, τα οποία μπορούν να ενσωματωθούν σε φάρμακα και να στοχεύσουν συγκεκριμένους ιστούς [259].

Θα πρέπει επίσης να σημειωθεί ότι η ελαστίνη είναι απαραίτητο συστατικό των αιμοφόρων αγγείων και, ως εκ τούτου, χρησιμοποιείται στην παραγωγή αγγειακών μοσχευμάτων. Αυτά τα μοσχεύματα χρησιμοποιούνται για την επιδιόρθωση ή την αντικατάσταση κατεστραμμένων αιμοφόρων αγγείων στο σώμα [260]. Επιπλέον, η ελαστίνη διαδραματίζει καθοριστικό ρόλο στη δομική ανάπτυξη των πνευμόνων. Έρευνα έχει αποδείξει ότι η διάσπαση της ελαστίνης είναι ένας κρίσιμος παράγοντας για την ανάπτυξη χρόνιας αποφρακτικής πνευμονοπάθειας. Επιπλέον, η αδυναμία των πνευμονικών κυττάρων να επιδιορθώσουν τις κατεστραμμένες ελαστικές ίνες επιδεινώνει τη διαδικασία της νόσου, με αποτέλεσμα μακροχρόνιες εκφυλιστικές ασθένειες και διαταραχή της πνευμονικής λειτουργίας [261].

Οι ελαστικές ίνες θεωρούνται μία από τις πιο απαιτητικές δομές για να αποκατασταθούν, λόγω της περίπλοκης μοριακής τους σύνθεσης, του μεγάλου μεγέθους και της εξάρτησής τους από αρκετές άλλες πρωτεΐνες για την κατάλληλη διαμόρφωσή τους. Όσον αφορά την επούλωση τραυμάτων, τα ELPs μπορούν να χρησιμοποιηθούν ως εξαιρετικά υλικά για την κατασκευή βιοσυμβατών ικριωμάτων και άλλων προϊόντων για τη διαχείριση του τραύματος [262]. Αυτά τα βιομόρια παρουσιάζουν διαλυτότητα κάτω από κρίσιμες θερμοκρασίες και υφίστανται συσσωμάτωση σε υψηλότερες θερμοκρασίες, καθιστώντας τα μια συναρπαστική πηγή για το σχεδιασμό διαφόρων νανοβιοϋλικών.

Η χρήση ινιδίων από πρωτεΐνες του εξωκυτταρικού χώρου, και ιδιαίτερα της ελαστίνης, που δημιουργήθηκαν με αυτοδιαμόρφωση των πρωτεϊνών σε μονές ή μικρού αριθμού στιβάδες, προκαλούν το ενδιαφέρον σε διάφορα ερευνητικά επίπεδα, όπως στο πεδίο μελέτης των αλληλεπιδράσεων κυττάρου-επιφάνειας, στη μηχανική των ιστών και στους βιοαισθητήρες. Τα ινίδια ελαστίνης αποδεικνύονται κατάλληλα

για τις εφαρμογές αυτές. Έχουν εξαιρετικές οπτικές ιδιότητες, καθιστούν δυνατή τη μελέτη των χαρακτηριστικών των ινών σε νανομετρική ανάλυση με AFM και δίνουν τη δυνατότητα για έλεγχο αυτών των χαρακτηριστικών. Η δομή των ινιδίων που προκύπτουν εξαρτάται από πολλούς παράγοντες, όπως τη σύσταση του ρυθμιστικού διαλύματος, τη συγκέντρωση του διαλύματος, τη θερμοκρασία αποθήκευσης του και το χρόνο από τη δημιουργία του μητρικού διαλύματος.

Με κατάλληλους συνδυασμούς των παραπάνω παραγόντων είναι δυνατή η παραγωγή πλήρως σχηματισμένων ινιδίων. Σημαντικό σε αυτή τη διαδικασία είναι η παρατήρηση των επιφανειακών διαφοροποιήσεων της ελαστίνης, σε επίπεδο μερικών νανομέτρων, σε σχέση με αλλαγές στις φυσικές και χημικές ιδιότητες της, ώστε να πραγματοποιηθεί ο έλεγχος της μορφολογίας των ινών. Ο έλεγχος των τοπογραφικών χαρακτηριστικών της επιφάνειας της ελαστίνης μπορεί να αποδειχτεί μια μέθοδος ελέγχου της κυτταρικής συμπεριφοράς, ενώ η δημιουργία πλεγμάτων ελαστίνης με ρυθμιζόμενα τα νανοσκοπικά χαρακτηριστικά τους για παραγωγή βιοσυμβατών υλικών και για προγραμματισμό των λειτουργιών τους ανοίγει νέες δυνατότητες για πολλές βιοκυτταρικές, βιοτεχνολογικές και ιατρικές εφαρμογές.

Η χημική φύση της διεπιφάνειας υλικού – πρωτεΐνης, μπορεί να έχει σημαντική επίδραση στα δομικά χαρακτηριστικά του προσροφημένου πρωτεϊνικού επιπέδου. Οι διαπρωτεϊνικές ηλεκτροστατικές και υδρόφοβες αλληλεπιδράσεις μεταξύ των γειτονικών πρωτεϊνών μπορεί να είναι αρκετά ισχυρές, ώστε να αλλάξουν σημαντικά την πυκνότητα, την προσαρμογή, τον προσανατολισμό και την κινητικότητα των πρωτεϊνών οι οποίες αποτελούν το προσροφημένο επίπεδο. Είναι σημαντικό να λαμβάνονται υπ' όψη αυτά τα φαινόμενα όταν προετοιμάζονται τέτοιες βιοεπιφάνειες.

Το AFM παρέχει τη δυνατότητα παρατήρησης και μελέτης της μορφολογίας των ινών, των ινιδίων και των νανοϊνιδίων της ελαστίνης. Έχουν μελετηθεί με τη βοήθεια του AFM διάφορες δομικές ιδιότητες των ινών ελαστίνης, όπως είναι το πάχος, η μέση τραχύτητα και το μέσο ύψος της επιφάνειας τους. Η απεικόνιση των ινών ελαστίνης μπορεί να πραγματοποιηθεί μέσω των δυο μεθόδων *contact* και *tapping*, ώστε να είναι δυνατή η σύγκριση των αποτελεσμάτων για πιο ακριβείς μετρήσεις. Το μικροσκόπιο ατομικής δύναμης μπορεί να αποτελέσει ισχυρό εργαλείο για ποιοτικές, αλλά και για ποσοτικές μετρήσεις, καθώς επιτρέπει την απεικόνιση τόσο μορίων όσο και ινών ελαστίνης.

Επιπρόσθετα, το AFM επιτρέπει τη μελέτη τοπογραφικών αλλοιώσεων που παρατηρούνται σε μεμονωμένες ίνες ελαστίνης και το συσχετισμό ποσοτικοποιημένων διαφοροποιήσεων με την αλλαγή της θερμοκρασίας. Η επίδραση της θερμοκρασίας μπορεί να αποτελέσει μια μεθοδολογία ελέγχου συγκεκριμένων επιφανειακών χαρακτηριστικών σε ινίδια ελαστίνης. Πιο συγκεκριμένα, έχει μελετηθεί η θερμική αποδιαμόρφωση ινών ελαστίνης επιστρωμένων σε επιφάνεια γυαλιού, αφού υπάρχει διαφοροποίηση μεταξύ της θερμικής σταθερότητας των ινών και των μορίων του ελαστίνης.

Η επιφανειακή τραχύτητα είναι ένα σημαντικό μέγεθος για την εκτίμηση της ποιότητας μιας επιφάνειας. Έχει αποδειχτεί ότι τα βιοενεργά υλικά παρουσιάζουν μεγαλύτερη τραχύτητα σε διαστάσεις νανομέτρων. Η μεγάλη τραχύτητα σε μικρές διαστάσεις οδηγεί στην αύξηση της επιφάνειας που είναι διαθέσιμη για κυτταρική

προσκόλληση. Επομένως, ο έλεγχος της επιφανειακής τραχύτητας μέσω της διαχείρισης με αλλαγή θερμοκρασίας, μπορεί μελλοντικά να επιτρέψει την καθοδήγηση της κυτταρικής συμπεριφοράς

Στο 6ο κεφάλαιο αυτής της διδακτορικής διατριβής έγινε μελέτη για την εύρεση του κατάλληλου μητρικού εναιωρήματος ελαστίνης υπό διαφορετικές παραμέτρους. Επίσης, μελετήθηκε η αυτοδιαμόρφωση των ιών ελαστίνης από μεμονωμένα νανοϊνίδια. Τέλος, ερευνήθηκαν οι δομικές και τοπογραφικές ιδιότητες, όπως η διάμετρος και η υψομετρική διαφορά των νανοϊνιδίων, ινιδίων και ιών της ελαστίνης. Πριν γίνει όμως η απεικονιστική τους επεξεργασία με το AFM, θα αναλυθεί το πρωτόκολλο που ακολουθήθηκε για την *in vitro* αυτοδιαμόρφωση της ελαστίνης.

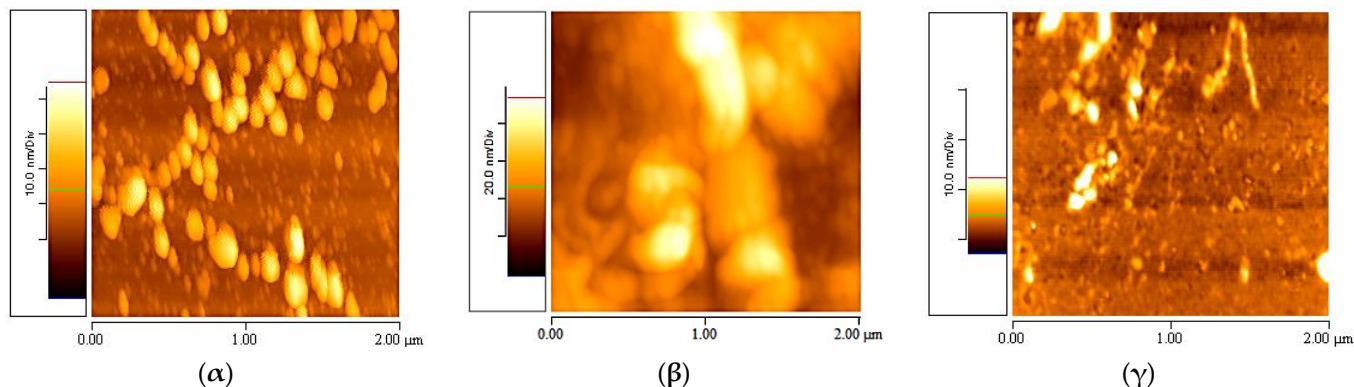
6.2 Εναιωρήματα ελαστίνης σε διαφορετικούς διαλύτες

Η ελαστίνη εναιωρήθηκε μέσα σε δις απεσταγμένο νερό σε συγκεντρώσεις 0,5%, 1,0% και 2,0% w/v. Τα μητρικά εναιωρήματα που δημιουργήθηκαν, αποθηκεύτηκαν σε θερμοκρασίες 5 °C, 10 °C, 20 °C και 37 °C. Μετά από μια χρονική περίοδο 1 ημέρας, 1 εβδομάδας, 2-3 εβδομάδων και 1 μήνα, 10-20μL από κάθε εναιώρημα ελαστίνης εναποτέθηκαν πάνω σε δίσκους υποστρώματος mica. Τα δείγματα στη συνέχεια ξηράνθηκαν στον αέρα και ήταν έτοιμα για απεικόνιση μέσω AFM. Για κάθε συγκέντρωση, θερμοκρασία και χρονικό διάστημα, ελήφθησαν πέντε με δέκα εικόνες. Όσον αφορά τη μέτρηση των διαμέτρων και των υψομετρικών διαφορών των ιών, των ινιδίων και των νανοϊνιδίων, πραγματοποιήθηκαν τουλάχιστον δέκα μετρήσεις για κάθε ίνα, ινίδιο ή νανοϊνίδιο. Η ίδια διαδικασία επαναλήφθηκε για το οξικό οξύ (0,25 M) και το φωσφορικό μέσο PBS. Οι συγκεκριμένοι διαλύτες επιλέχθηκαν, για να ερευνηθεί η καταλληλότητά τους στη δημιουργία ιών ελαστίνης, καθώς είναι ευρέως διαδεδομένοι στη διεθνή βιβλιογραφία κατά την επεξεργασία τους με πρωτεΐνες [79, 263].

Τα αρχικά πειράματα πραγματοποιήθηκαν μία μέρα αμέσως μετά τη δημιουργία του μητρικού εναιωρήματος και οι εικόνες AFM έδειξαν την παρουσία συσσωματωμάτων και για τους τρεις διαλύτες (PBS, οξικό οξύ, δις απεσταγμένο νερό). Συγκεκριμένα, ήταν σφαιρικά (κλίμακα στον z άξονα: 0-60nm) στο εναιώρημα ελαστίνης-PBS (**Εικόνα 6.1α**), μεγάλα και άμορφα (κλίμακα στον z άξονα : 0-100nm) στο ελαστίνη-οξικό οξύ (**Εικόνα 6.1β**) και γραμμικά σχηματισμένα (κλίμακα στον z άξονα: 0-15nm) στο εναιώρημα ελαστίνης-δις απεσταγμένο νερό (**Εικόνα 6.1γ**).

Επομένως, σε όλα τα πειράματα χρησιμοποιήθηκαν όλοι οι πιθανοί συνδυασμοί των διαφορετικών παραμέτρων. Συγκεκριμένα, για κάθε διαλύτη ερευνήθηκαν και οι τρεις συγκεντρώσεις ελαστίνης και στις τέσσερις διαφορετικές θερμοκρασίες και σε διάφορους χρόνους από 1 μέρα, 1 εβδομάδα, 2-3 εβδομάδες έως και 1 μήνα από τη δημιουργία του κάθε εναιωρήματος. Συνολικά, ο ελάχιστος αριθμός πειραμάτων που έγιναν στα πλαίσια του 6^{ου} κεφαλαίου ήταν 144, με τον αριθμό αυτό να μεγαλώνει, καθώς κάθε πείραμα επαναλήφθηκε το λιγότερο 2 φορές. Σε όλα τα πειράματα χρησιμοποιήθηκε το AFM με τη μέθοδο tapping. Λόγω του μεγάλου αριθμού εικόνων που ελήφθησαν, παρουσιάζονται μόνο οι πιο αντιπροσωπευτικές

εικόνες από κάθε σειρά πειραμάτων. Οπότε, σε αυτόν τον κύκλο πειραμάτων, για την εύρεση του κατάλληλου διαλύτη, παρουσιάζονται εικόνες από τα τρία εναιωρήματά ελαστίνης, μία μέρα μετά από τη δημιουργία τους με συγκέντρωση 1% w/v, σε θερμοκρασία 20°C. (Εικόνα 6.1)



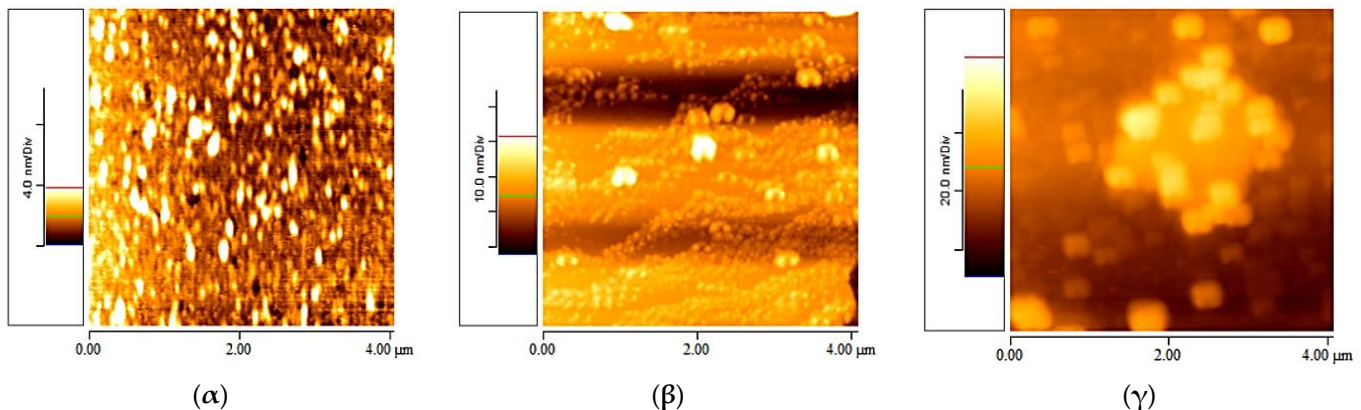
Εικόνα 6.1. Τοπογραφικές απεικονίσεις AFM ($2 \times 2 \mu\text{m}$) μία μέρα μετά από τη δημιουργία των μητρικών εναιωρημάτων ελαστίνης με συγκέντρωση 1% w/v, σε θερμοκρασία 20 °C σε τρεις διαφορετικούς διαλύτες: **α)** PBS, **(β)** Οξικό οξύ και **(γ)** Δις απεσταγμένο νερό.

Η **Εικόνα 6.1** παρουσιάζει τοπογραφικές εικόνες AFM $2 \times 2 \mu\text{m}$ που ελήφθησαν μία μέρα μετά από τη δημιουργία των μητρικών εναιωρημάτων ελαστίνης με συγκέντρωση 1% w/v σε θερμοκρασία 20 °C. Παρατηρήθηκε ότι το εναιώρημα ελαστίνης/δις απεσταγμένου νερού είχε λιγότερες συσσωματώσεις σε σύγκριση με τα εναιωρήματα σε PBS και οξικό οξύ. Όλα τα πειράματα διεξήχθησαν για καθένα από τα τρία εναιωρήματα και τα πιο υποσχόμενα αποτελέσματα για τη δημιουργία ινιδίων ελαστίνης παρατηρήθηκαν στο νερό. Επομένως, τα αποτελέσματα που θα παρουσιαστούν στη συνέχεια θα είναι για το εναιώρημα ελαστίνης-δις απεσταγμένου νερού.

6.3 Εναιωρήματα ελαστίνης σε διαφορετικές συγκεντρώσεις

Σε αυτή την ενότητα προσδιορίστηκε η βέλτιστη συγκέντρωση για την ελαστίνη στο εναιώρημα δις απεσταγμένου νερού. Συγκεκριμένα, εναιωρήματα με τρεις διαφορετικές συγκεντρώσεις ελαστίνης (0,5% w/v, 1% w/v, 2% w/v) σε νερό αποθηκεύτηκαν σε διάφορες θερμοκρασίες και παρατηρήθηκαν σε διαφορετικά χρονικά διαστήματα. Οι εικόνες AFM απεικονίζουν τα εναιωρήματα με διαφορετικές συγκεντρώσεις ελαστίνης/νερού στους 20 °C. Όπως παρατηρήθηκε από τις τρεις εικόνες AFM, τα νανοϊνίδια ελαστίνης δεν σχηματίστηκαν ούτε μία εβδομάδα μετά την παρασκευή των μητρικών εναιωρημάτων. Στα δείγματα με ελαστίνη/δις απεσταγμένο νερό 0,5% w/v (**Εικόνα 6.2α**), παρατηρήθηκαν μερικές συσσωματώσεις χαμηλού ύψους (κλίμακα στον z άξονα: 0–4nm). Το εναιώρημα ελαστίνης/δις απεσταγμένου νερού 1% w/v (**Εικόνα 6.2β**) εμφάνισε πολυάριθμες λεπτές και μακριές συσσωματώσεις (κλίμακα στον z άξονα: 0–20nm). Από την άλλη πλευρά, τα δείγματα

με ελαστίνη/δισ απεσταγμένο νερό 2% w/v (**Εικόνα 6.2γ**) εμφάνισαν πολύ μεγάλα συσσωματώματα (κλίμακα στον z άξονα: 0–80nm).



Εικόνα 6.2. Τοπογραφικές απεικονίσεις AFM ($4 \times 4 \mu\text{m}$) μία εβδομάδα μετά από τη δημιουργία των μητρικών εναιωρημάτων ελαστίνης/δισ απεσταγμένου νερού με συγκεντρώσεις: **(α)** 0.5% w/v, **(β)** 1% w/v και **(γ)** 2% w/v, σε θερμοκρασία 20 °C.

Η **Εικόνα 6.2.** παρουσιάζει τοπογραφικές εικόνες AFM ($4 \times 4 \mu\text{m}$), οι οποίες ελήφθησαν μία εβδομάδα μετά τη δημιουργία του μητρικού εναιωρήματος ελαστίνης/δισ απεσταγμένου νερού σε θερμοκρασία 20 °C. Παρατηρήθηκε ότι το εναιώρημα ελαστίνης/δισ απεσταγμένου νερού με συγκέντρωση 1% w/v εμφάνισε λεπτές και μακριές συσσωματώσεις. Σε αντίθεση με τα σφαιρικά συμπακνώματα, που παρατηρήθηκαν στις άλλες περιπτώσεις, δηλαδή στις συγκεντρώσεις 0,5% w/v και 2% w/v). Ως εκ τούτου, έδειξε κατάλληλο δυναμικό για τη δημιουργία νανοϊνιδίων ελαστίνης. Επομένως, μόνο οι εικόνες AFM που λαμβάνονται από το εναιώρημα ελαστίνης/δισ απεσταγμένου νερού με συγκέντρωση 1% w/v παρουσιάζονται στα ακόλουθα πειράματα.

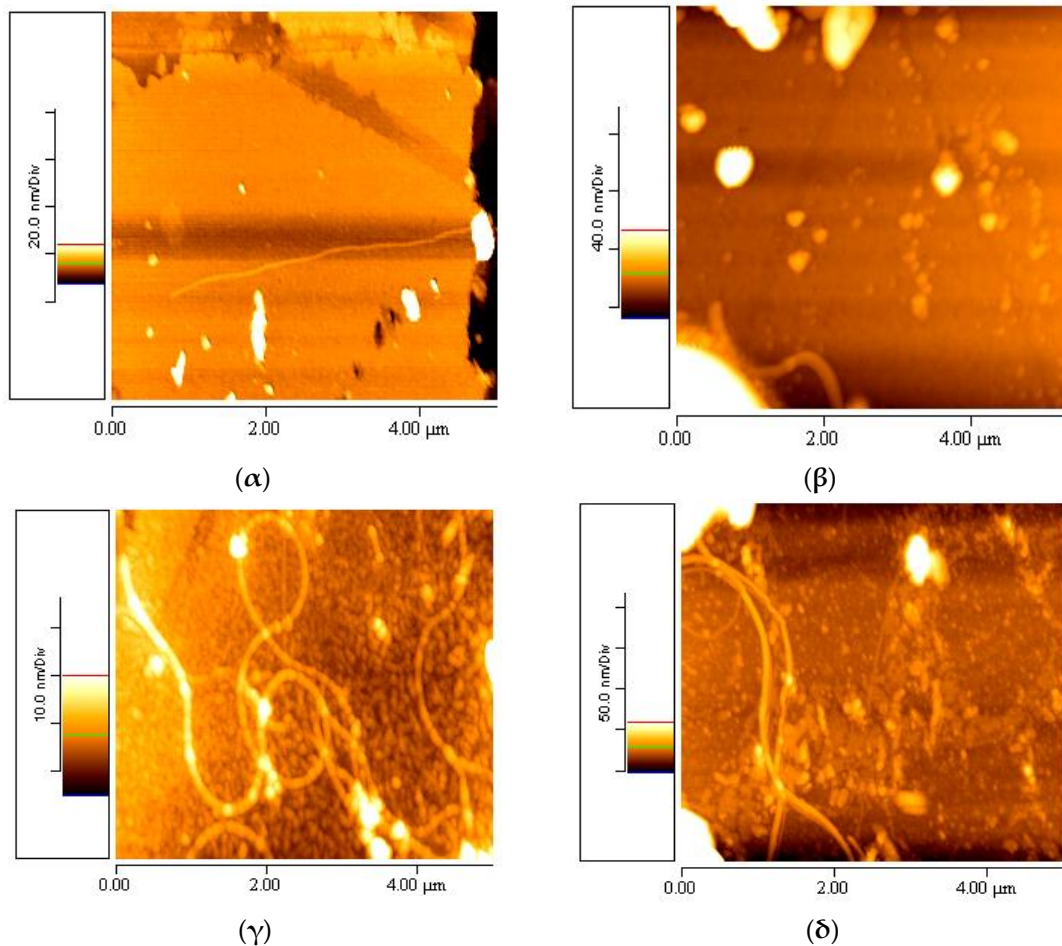
6.4 Εναιωρήματα ελαστίνης σε διαφορετικές θερμοκρασίες

Σε αυτή την ενότητα, διερευνάται η επίδραση της θερμοκρασίας στην αυτό-διαμόρφωση της ελαστίνης σε υδατικά εναιωρήματα 1% w/v. Τα πειράματα διεξήχθησαν σε διάφορους συνδυασμούς θερμοκρασίας και χρόνου. Συγκεκριμένα, τα προαναφερθέντα εναιωρήματα αποθηκεύτηκαν σε τέσσερις διαφορετικές θερμοκρασίες: 5 °C, 10 °C, 20 °C και 37 °C και παρατηρήθηκαν σε διάφορες χρονικές περιόδους. Οι τοπογραφικές εικόνες AFM αποκάλυψαν ότι στα δείγματα του 1 % w/v ελαστίνης/δισ απεσταγμένο νερό στους 5 °C (**Εικόνα 6.3α**), 10 °C (**Εικόνα 6.3β**) και 37 °C (**Εικόνα 6.3δ**), υπήρχαν μόνο λίγα συσσωματώματα και ένα ή δύο νανοϊνίδια. Ωστόσο, το πρώτο πλήρες πλέγμα ελαστίνης με πλήρως σχηματισμένα νανοϊνίδια παρατηρήθηκε στο υδατικό μητρικό εναιώρημα ελαστίνης 1% w/v, στους 20 °C (**Εικόνα 6.3γ**), με κλίμακα στον z άξονα: 0-25nm.

Η **Εικόνα 6.3** παρουσιάζει τοπογραφικές εικόνες AFM ($5 \times 5 \mu\text{m}$) από το μητρικό εναιώρημα ελαστίνης/δισ απεσταγμένου νερού με συγκέντρωση 1% w/v, που

ελήφθησαν ένα μήνα μετά από την παρασκευή του. Παρατηρήθηκε ότι το εναιώρημα ελαστίνης 1% w/v δις απεσταγμένου νερού στους 20 °C εμφάνισε νανοϊνίδια ελαστίνης με λίγες μόνο συσσωματώσεις. Αντίθετα, τα νανοϊνίδια δεν σχηματίστηκαν στους 5°C και στους 10 °C. Για την περίπτωση των 37 °C, ένα μήνα μετά τη δημιουργία του μητρικού διαλύματος, παρατηρήθηκαν δύο έως τέσσερα νανοϊνίδια. Ο ίδιος όμως αριθμός ινιδίων παρατηρήθηκε έως και 4 μήνες μετά τη δημιουργία του στοκ διαλύματος. Δεν καθορίστηκε περαιτέρω αύξηση του αριθμού των ιών για μεγαλύτερα χρονικά διαστήματα.

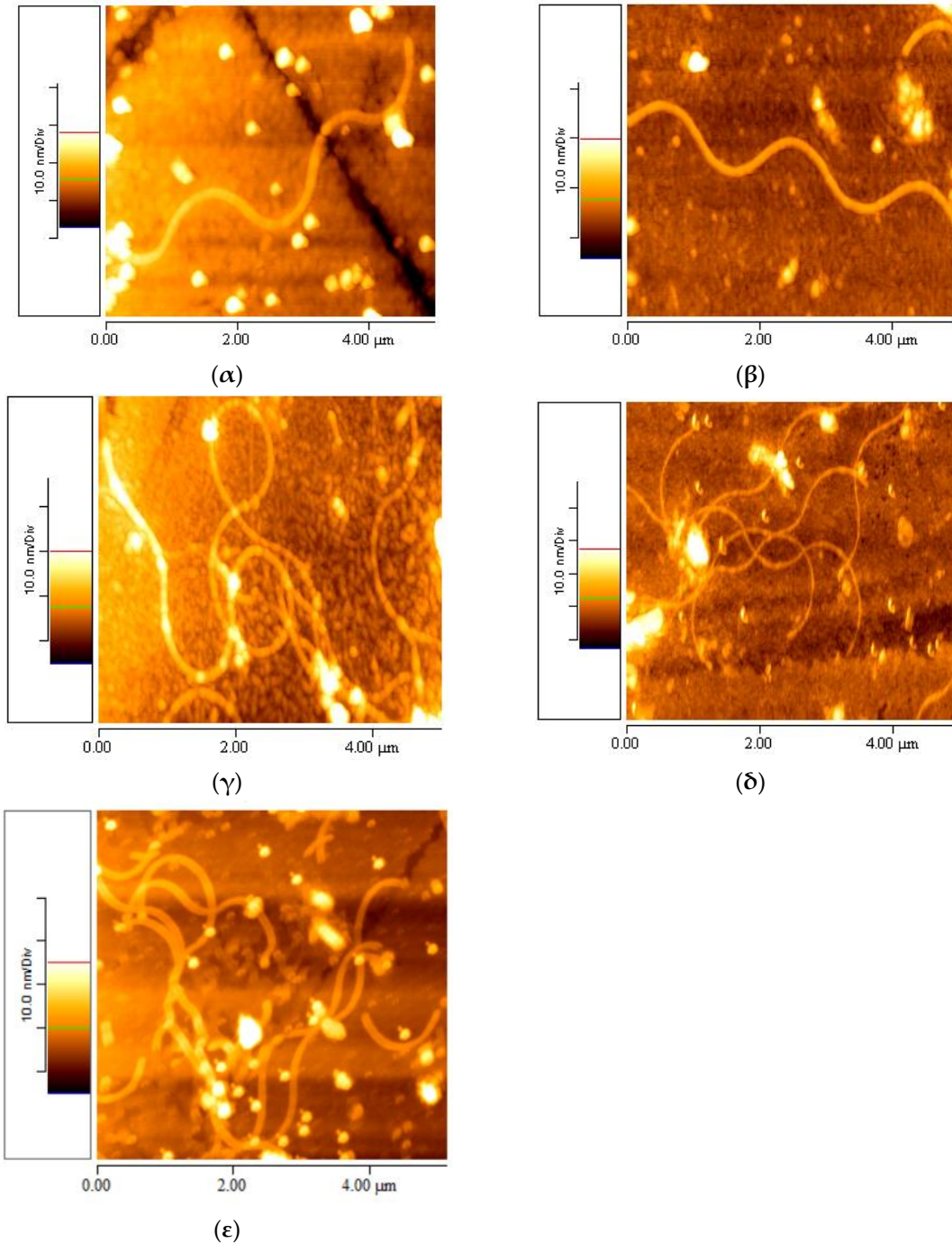
Αξιζει να σημειωθεί ότι η ελαστίνη αποτελείται από υδρόφοβες περιοχές συνδεδεμένες με σταυροδεσμούς. Σε συγκεκριμένες θερμοκρασίες, όπως είναι οι 5°C, 10°C και 37 °C, οι υδρόφοβες περιοχές της ελαστίνης αλληλεπιδρούν μεταξύ τους, με αποτέλεσμα τη συσσωμάτωση και τη συσώρευση πρωτεϊνών. Αυτές οι συσσωματώσεις απεικονίζονται στις **Εικόνες 6.3 α, β, δ**.



Εικόνα 6.3. Τοπογραφικές απεικονίσεις AFM ($5 \times 5 \mu\text{m}$) ένα μήνα μετά από τη δημιουργία των μητρικών εναιωρημάτων 1% w/v ελαστίνης/δις απεσταγμένου νερού σε θερμοκρασίες: **(α)** 5 °C, **(β)** 10 °C, **(γ)** 20 °C, **(δ)** 37 °C.

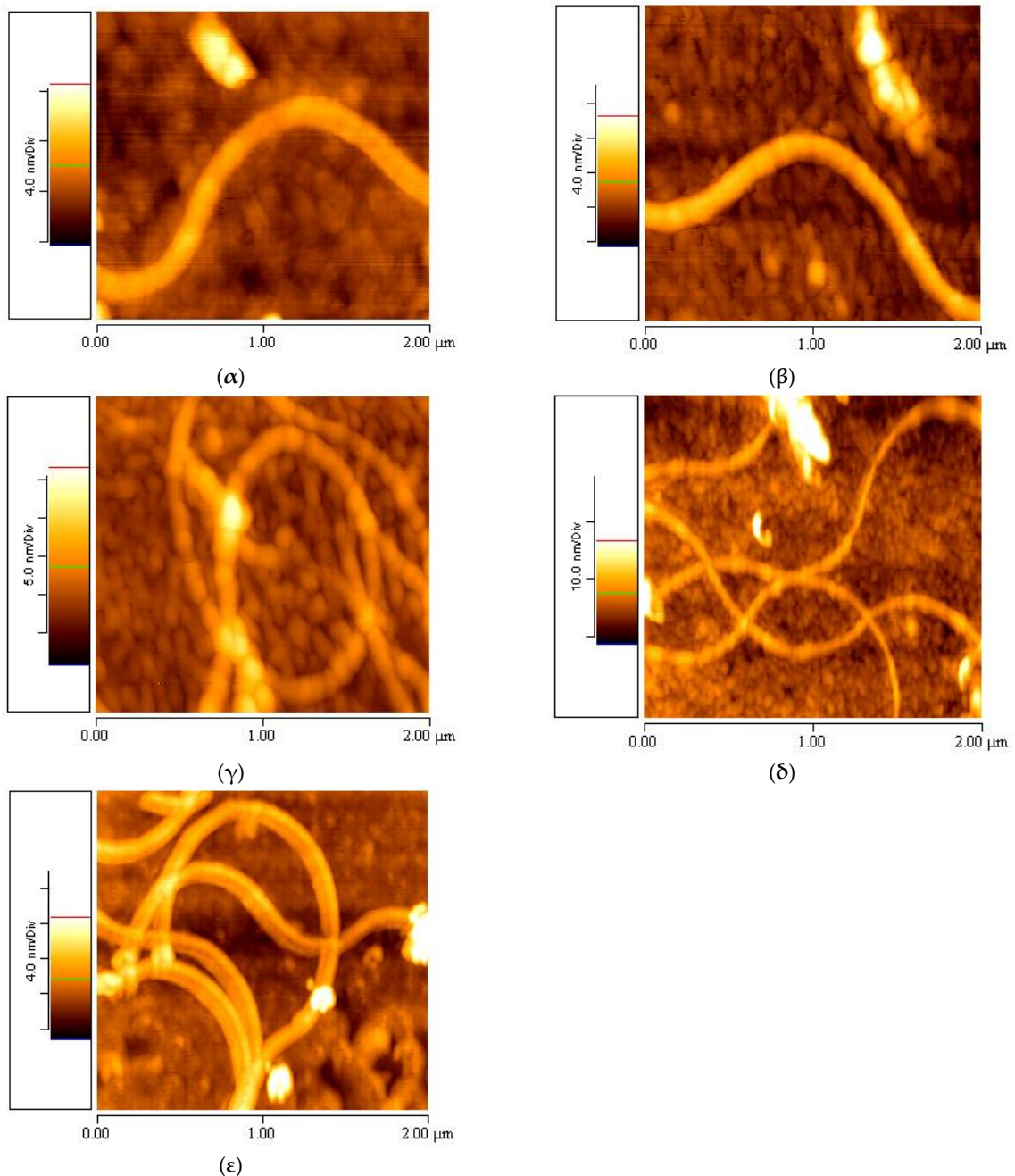
6.5 Εναιωρήματα ελαστίνης σε διαφορετικές χρονικές περιόδους

Το μητρικό υδατικό εναιώρημα ελαστίνης με συγκέντρωση 1% w/v αποθηκεύτηκε στους 20°C. Μελετήθηκε μέσω AFM σε διαφορετικά χρονικά διαστήματα από μία ημέρα έως έξι μήνες από τη δημιουργία του.



Εικόνα 6.4. Τοπογραφικές απεικονίσεις AFM ($5 \times 5 \mu\text{m}$) μετά από: (α) 2 εβδομάδες, (β) 3 εβδομάδες, (γ) 1 μήνα, (δ) 4 μήνες και (ε) 6 μήνες από τη δημιουργία του μητρικού εναιωρήματος ελαστίνης/δισ απεσταγμένου νερού σε συγκέντρωση 1% w/v και σε θερμοκρασία 20 °C.

Οι εικόνες AFM αποκαλύπτουν ότι μία εβδομάδα μετά την παρασκευή του μητρικού εναιωρήματος ελαστίνης 1% w/v με το δις απεσταγμένο νερό στους 20 °C, δεν παρατηρήθηκε σχηματισμός ινιδίων ελαστίνης, αλλά υπήρχαν πολυάριθμες συσσωματώσεις (Εικόνες 6.1γ και 6.2β). Τα πρώτα νανοϊνίδια ελαστίνης παρατηρήθηκαν δύο εβδομάδες μετά την παραγωγή του μητρικού εναιωρήματος (Εικόνες 6.4α και 6.5α) και καθώς προχωρούσε ο χρόνος, φτάνοντας στον ένα μήνα, παρατηρήθηκε το πρώτο πλήρως σχηματισμένο πλέγμα ελαστίνης από νανοϊνίδια (Εικόνες 6.4γ και 6.5γ). Αυτό το πυκνό πλέγμα ινιδίων συνέχισε να επεκτείνεται με την πάροδο του χρόνου, όπως παρατηρήθηκε στις εικόνες AFM που ελήφθησαν μέχρι και έξι μήνες αργότερα (Εικόνες 6.4δ,ε και 6.5δ,ε).



Εικόνα 6.5. Τοπογραφικές απεικονίσεις AFM ($2 \times 2 \mu\text{m}$) μετά από: (α) 2 εβδομάδες, (β) 3 εβδομάδες, (γ) 1 μήνα, (δ) 4 μήνες και (ε) 6 μήνες από τη δημιουργία του μητρικού εναιωρήματος ελαστίνης/δις απεσταγμένου νερού σε συγκέντρωση 1% w/v και σε θερμοκρασία 20 °C.

Μετά από έξι μήνες, παρατηρήθηκαν διαφορές στον αριθμό των ινιδίων. Ως αποτέλεσμα, ο αυξανόμενος σχηματισμός νανοϊνιδίων με την πάροδο του χρόνου αποδείχθηκε ποιοτικά σε αυτή την έρευνα.

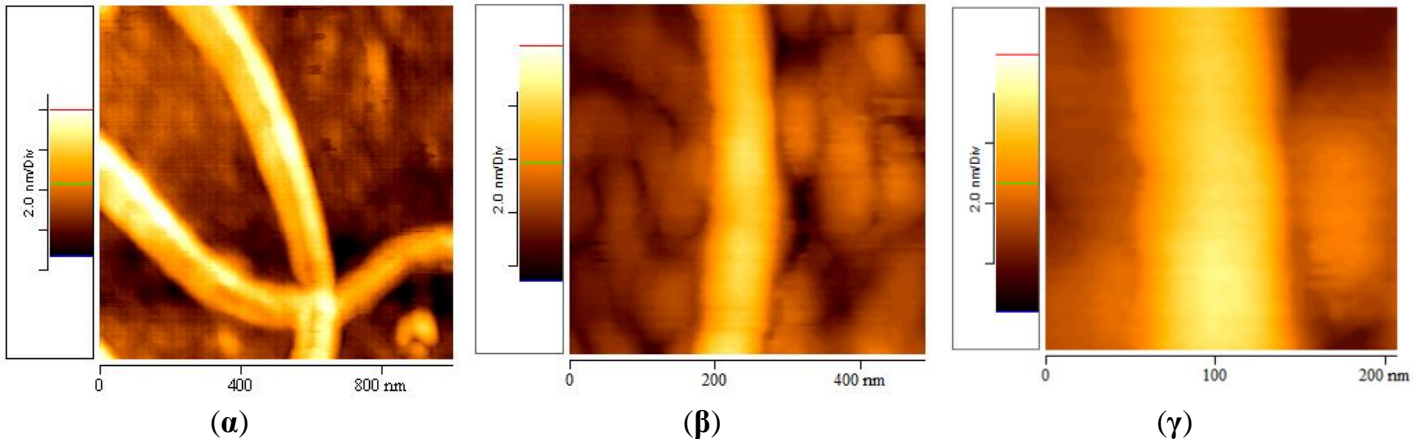
Διεξήχθη, επίσης, στατιστική μελέτη για τον προσδιορισμό της αύξησης του αριθμού των ινιδίων που σχηματίζονται κάτω από διαφορετικές συνθήκες. Συγκεκριμένα, εικόνες AFM με μέγεθος $5 \times 5 \mu\text{m}$, χρησιμοποιώντας το δείγμα με 1% w/v διάλυμα ελαστίνης-δισ απεσταγμένου νερού στους $20 \text{ }^\circ\text{C}$, δοκιμάστηκαν σε διάφορα χρονικά διαστήματα και ελήφθησαν τουλάχιστον πέντε εικόνες ανά χρονικό διάστημα. Μετά από δύο εβδομάδες, παρατηρήθηκαν ένα ή δύο μεμονωμένα νανοϊνίδια πεπερασμένου μήκους σε κάθε εικόνα. Ύστερα από ένα μήνα, καταγράφηκαν πέντε έως επτά πολύ μακριά νανοϊνίδια σε μορφή πλέγματος. Από τους δύο έως τους έξι μήνες, παρατηρήθηκαν ακόμα μεγαλύτερα πλέγματα, των δεκαπέντε περίπου νανοϊνιδίων. Επιπλέον, στους δύο μήνες, παρατηρήθηκε για πρώτη φορά και διερευνήθηκε διεξοδικά η αυτοδιαμόρφωση της ελαστίνης από νανοϊνίδιο σε ινίδιο και μετά σε ίνα.

Επιπροσθέτως, έγινε στατιστική μελέτη για τον ποσοτικό προσδιορισμό των νανοϊνιδίων χρησιμοποιώντας εικόνες AFM ($5 \mu\text{m} \times 5 \mu\text{m}$) μετά τη δημιουργία του διαλύματος ελαστίνης 1% w/v δισ απεσταγμένου νερού στους $37 \text{ }^\circ\text{C}$ με την πάροδο του χρόνου. Για κάθε χρονικό διάστημα αναλύθηκαν πέντε εικόνες. Ένα μήνα μετά από τη δημιουργία του μητρικού εναιωρήματος παρατηρήθηκαν δύο έως τέσσερα νανοϊνίδια. Ο ίδιος αριθμός ινιδίων παρατηρήθηκε έως και έξι μήνες μετά.

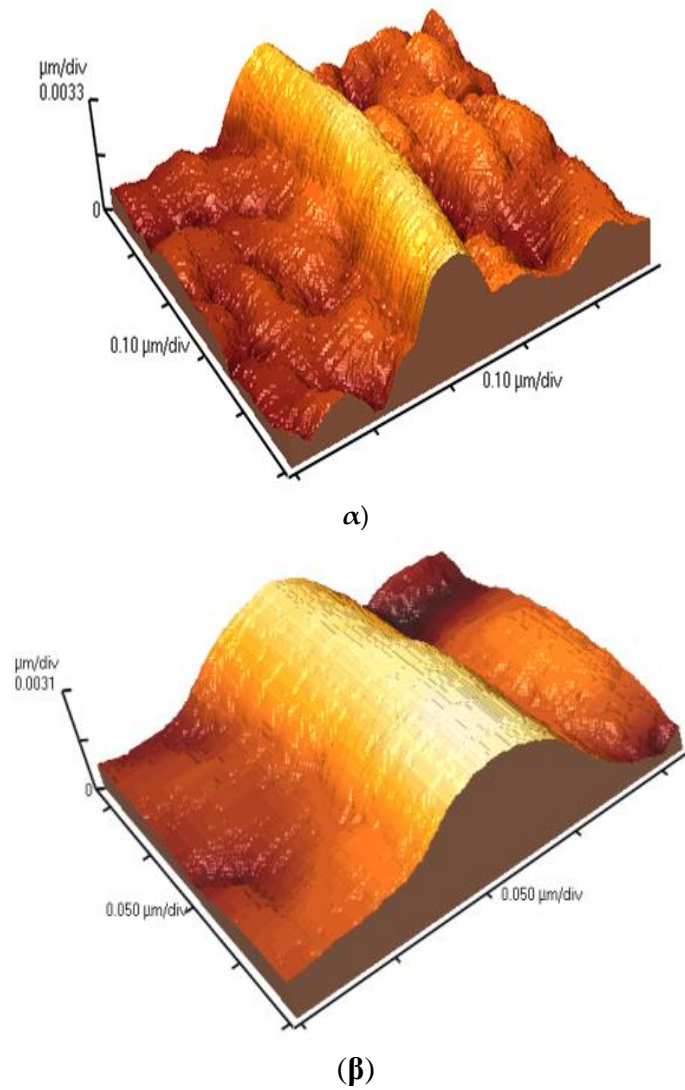
Διεξήχθησαν πρόσθετα πειράματα χρησιμοποιώντας το διάλυμα ελαστίνης 1% w/v δισ απεσταγμένου νερού στους $5 \text{ }^\circ\text{C}$ και $10 \text{ }^\circ\text{C}$, με διαφορετικούς διαλύτες (PBS, οξικό οξύ) και με συγκεντρώσεις ελαστίνης 0,5% w/v και 2% w/v. Αυτά τα πειράματα διεξήχθησαν για μια περίοδο έως και 3 μηνών από τη δημιουργία του αποθεματικού διαλύματος. Σε αυτές τις περιπτώσεις δεν παρατηρήθηκαν ινίδια. Αυτός ήταν ο λόγος που τα πειράματα επικεντρώθηκαν τόσο ποιοτικά όσο και ποσοτικά στο διάλυμα ελαστίνης-δισ απεσταγμένου νερού 1% w/v στους $20 \text{ }^\circ\text{C}$.

6.6 Γεωμετρικά χαρακτηριστικά νανοϊνιδίων ελαστίνης

Οι τοπογραφικές 2D εικόνες AFM (**Εικόνα 6.6**) και οι αντίστοιχες 3D εικόνες (**Εικόνα 6.7**) των δειγμάτων ελαστίνης σε δισ απεσταγμένο νερό με συγκέντρωση 1% w/v αποθηκευμένα στους $20 \text{ }^\circ\text{C}$ ελήφθησαν σε μεγαλύτερες μεγεθύνσεις, που κυμαίνονται από $2 \times 2 \mu\text{m}$ έως $0,5 \times 0,5 \mu\text{m}$. Αυτές οι εικόνες επιβεβαίωσαν περαιτέρω την παρουσία νανοϊνιδίων ελαστίνης, καθώς απεικονίστηκαν έξι μήνες μετά την προετοιμασία του αποθέματος εναιωρήματος.



Εικόνα 6.6. Τοπογραφικές απεικονίσεις AFM σε διαφορετικές αναλύσεις, μετά από 6 μήνες από τη δημιουργία του μητρικού εναιωρήματος ελαστίνης/δισ απεσταγμένου νερού σε συγκέντρωση 1% w/v και σε θερμοκρασία 20 °C: (α) 1 × 1 μm, (β) 500 × 500 nm, (γ) 200 × 200 nm.



Εικόνα 6.7. 3D Τοπογραφικές απεικονίσεις AFM σε διαφορετικές αναλύσεις, μετά από 6 μήνες από τη δημιουργία του μητρικού εναιωρήματος ελαστίνης/δισ απεσταγμένου νερού σε συγκέντρωση 1% w/v και σε θερμοκρασία 20 °C: (α) 500 × 500 × 6.6 nm, (β) 200 × 200 × 6.2 nm.

Τα γεωμετρικά χαρακτηριστικά των νανοϊνιδίων μετρήθηκαν χρησιμοποιώντας το πρόγραμμα λογισμικού IP-image processing για AFM. Οι μέσες τιμές των διαμέτρων και των υψομετρικών διαφορών των νανοϊνιδίων ελαστικής υπολογίστηκαν $(134,5 \pm 23,3)$ nm και $(4,5 \pm 0,7)$ nm, αντίστοιχα.

Ωστόσο, είναι σημαντικό να ληφθούν υπόψη τα σφάλματα που προκύπτουν από τη γεωμετρία της ακίδας. Η ακτίνα καμπυλότητας της ακίδας που χρησιμοποιήθηκε σε όλες τις περιπτώσεις ήταν περίπου 8nm. Υποθέτοντας ένα ρεαλιστικό ύψος 4nm για τα νανοϊνίδια, από τη **σελίδα 83** η **Εξίσωση (2)** αποδίδει $\Delta \approx 7$ nm. Οπότε, σύμφωνα με την **Εξίσωση (1)** προκύπτει:

$$w_{exp} - w_{eff} = 2\Delta \approx 14 \text{ nm}$$

Έτσι, η μείωση του σφάλματος είναι $1,75r_{tip}$, όπως αναμενόταν από το [253]. Οπότε, για την περίπτωση των νανοϊνιδίων, το σφάλμα είναι περίπου 10%. Επομένως, οι πραγματικές διαμέτροι των νανοϊνιδίων είναι μικρότερες και ίσες με (121 ± 21) nm.

Το σφάλμα για την περίπτωση των ινών και των ινιδίων είναι ακόμη μικρότερο. Ειδικότερα, εξετάζοντας κατά προσέγγιση $\gamma = 15^\circ$ και $h_{eff} \approx 25$ nm για την περίπτωση των ινιδίων, η **Εξίσωση (4)** αποδίδει $\Delta \approx 4.6$ nm. Οπότε, σύμφωνα με την **Εξίσωση (3)** προκύπτει:

$$w_{exp} - w_{eff} = 2(\Delta + r_{tip}) \approx 25.2 \text{ nm}$$

Επομένως, το σφάλμα είναι περίπου 7%.

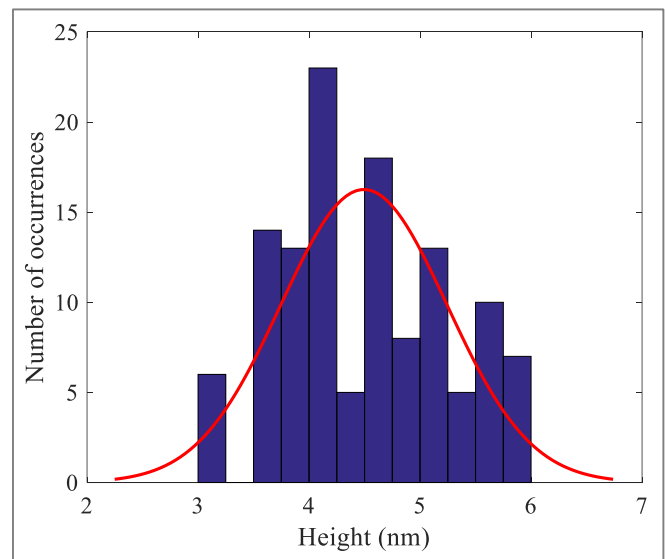
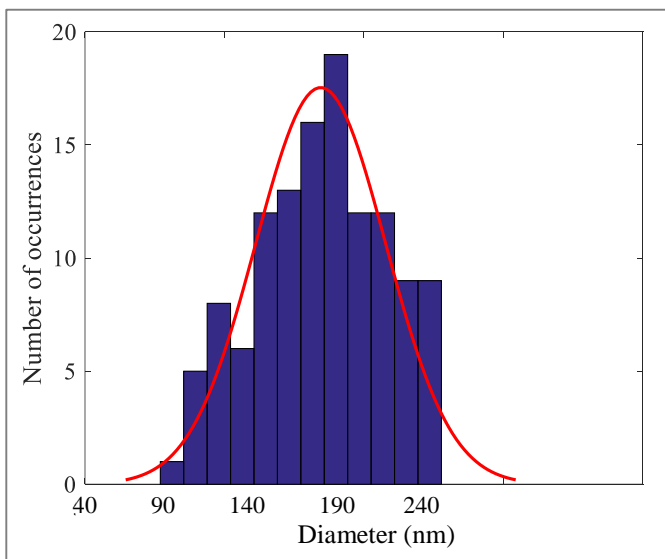
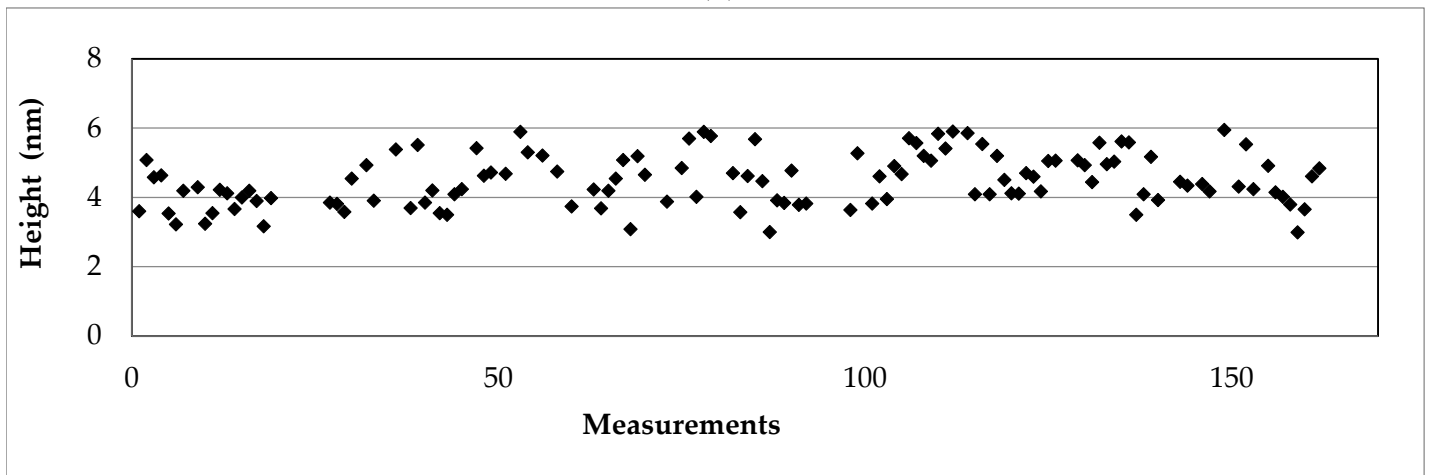
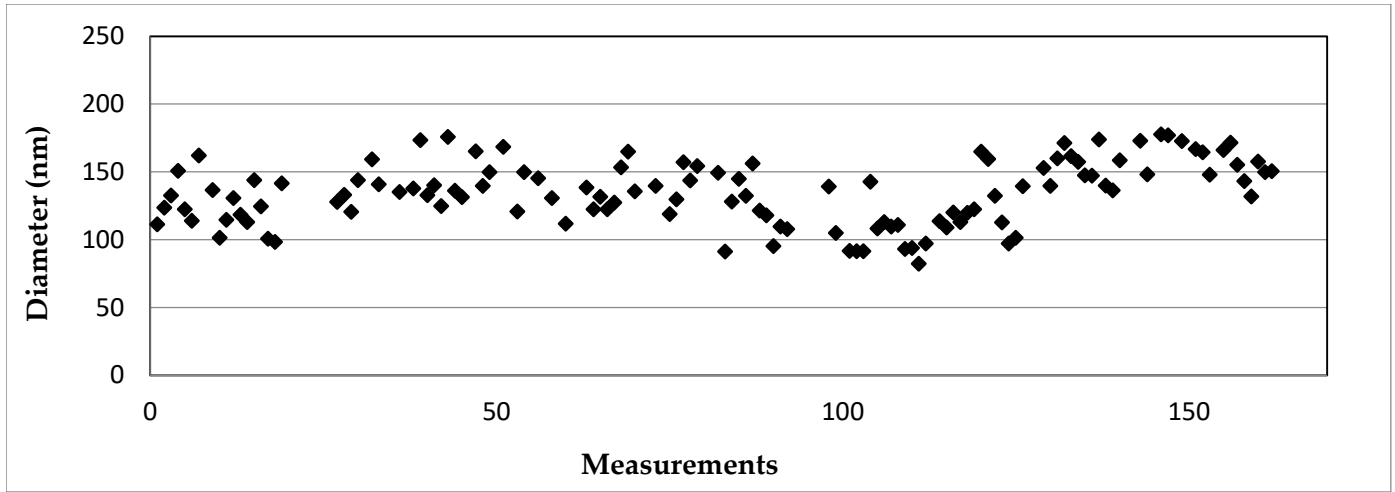
Για την περίπτωση των ινών, $h_{eff} = 80$ nm, οπότε $\Delta \approx 19.44$ nm και προκύπτει:

$$w_{exp} - w_{eff} = 2(\Delta + r_{tip}) \approx 54 \text{ nm}$$

Αυτό το σφάλμα είναι περίπου 9%.

Άρα, τα αποτελέσματα πρέπει να αναθεωρηθούν. Αφού ληφθούν υπόψη οι διορθώσεις της γεωμετρίας της ακίδας, οι διαμέτροι των ινιδίων είναι $(321,3 \pm 21,0)$ nm. Ομοίως, για τις ίνες, οι διορθωμένες διαμέτροι είναι $(549,64 \pm 25,4)$ nm.

Παρουσιάζονται αντιπροσωπευτικά γραφήματα με μετρήσεις διαμέτρων και υψών για 160 νανοϊνίδια (**Εικόνα 6.8α,β**). Είναι σημαντικό να σημειωθεί ότι η στατιστική ανάλυση του μεγέθους και του σχήματος της πρωτεΐνης πραγματοποιήθηκε με τη χρήση εικόνων όπως είναι οι **εικόνες 6.5** και **6.6**, οι οποίες έχουν διαστάσεις που κυμαίνονταν από $2 \times 2 \mu\text{m}$ έως $0,5 \times 0,5 \mu\text{m}$.



Εικόνα 6.8. Μετρήσεις των γεωμετρικών χαρακτηριστικών 160 νανοϊνιδίων ελαστίνης: (α) διάμετρος (nm), (β) ύψος (nm). Ιστόγραμμα για τις ίδιες μετρήσεις των τιμών των (γ) διαμέτρων και (δ) υψών. Η μέση τιμή \pm τυπική απόκλιση των διαμέτρων είναι 121 ± 21 nm και η αντίστοιχη των υψών είναι $4,5 \pm 0,7$ nm.

Στις **Εικόνες 6.8 γ, δ**, παρουσιάζονται ιστογράμματα των διαμέτρων και των υψών από τα 160 νανοϊνίδια που μελετήθηκαν. Τα δεδομένα προσαρμόστηκαν σε συναρτήσεις Gauss. Για την περίπτωση των διαμέτρων των νανοϊνιδίων:

$$f(d) = \frac{1}{21\sqrt{2\pi}} e^{-\frac{1}{2}\left(\frac{d-121}{21}\right)^2} \quad (5)$$

Επιπροσθέτως για τα ύψη των νανοϊνιδίων:

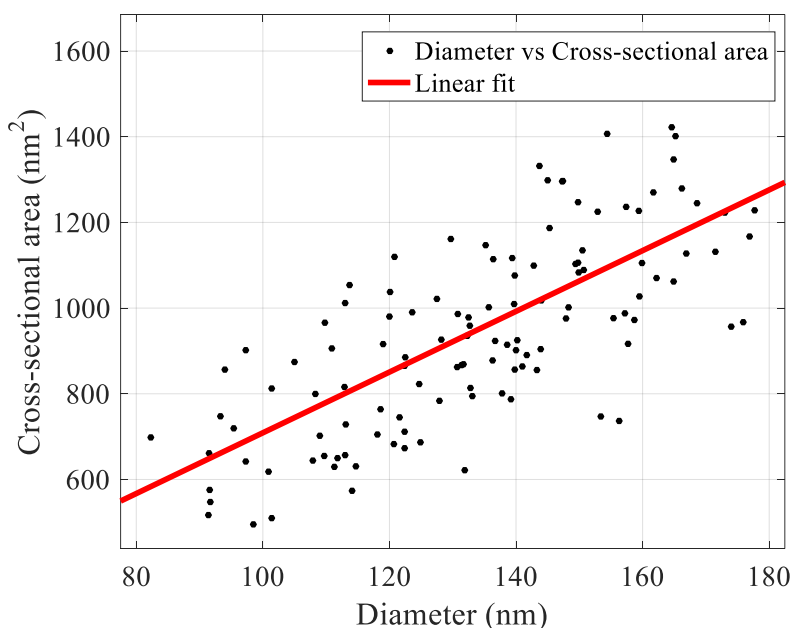
$$f(h) = \frac{1}{0.7\sqrt{2\pi}} e^{-\frac{1}{2}\left(\frac{h-4.5}{0.7}\right)^2} \quad (6)$$

Είναι ενδιαφέρον να διερευνηθεί εάν υπάρχει ένα μοτίβο που μπορεί να περιγράψει τα γεωμετρικά χαρακτηριστικά των ινιδίων που σχηματίζονται χρησιμοποιώντας το προαναφερθέν πρωτόκολλο. Υποθέτοντας ένα ελλειπτικό εμβαδόν διατομής του νανοϊνιδίου/ινιδίου/ίνας (όπου το εμβαδόν διατομής μπορεί να υπολογιστεί ως $A=\pi Rh$, όπου R είναι η ακτίνα και h το ύψος του ινιδίου), βρέθηκε ότι υπάρχει γραμμική σχέση μεταξύ του εμβαδού (A) και της διαμέτρου (d).

Για παράδειγμα, παρατηρήθηκε ότι στην περίπτωση των νανοϊνιδίων, βάση των 160 μετρήσεων που παρουσιάζονται στην **Εικόνα 6.8α**, μπορεί να εφαρμοστεί η ακόλουθη εξίσωση:

$$A = 7.088(\text{nm})d, \text{ όπου το } A \text{ υπολογίζεται σε } \text{nm}^2$$

Οπότε στην **Εικόνα 6.9** αποδεικνύεται η γραμμική σχέση του εμβαδού και της διαμέτρου του νανοϊνιδίου.



Εικόνα 6.9. Το εμβαδόν διατομής των νανοϊνιδίων σε συνάρτηση με τις διαμέτρους τους. Τα δεδομένα προσαρμόστηκαν σε μια γραμμική καμπύλη $A=7,088(\text{nm})d$.

Συμπερασματικά, σε αυτή την έρευνα αποδείχθηκαν ποιοτικά και ποσοτικά ο σχηματισμός νανοϊνιδίων σε διαφορετικές συνθήκες συμπεριλαμβανομένων του μέσου εναιωρήματος, της συγκέντρωσης ελαστίνης, της θερμοκρασίας αποθήκευσης και του χρονικού διαστήματος μετά την παρασκευή του μητρικού εναιωρήματος.

6.7 Απεικόνιση αυτοδιαμόρφωσης ελαστίνης

Παρατηρήθηκε, ακόμη και από τα αρχικά πειράματα, ότι η διαδικασία αυτοδιαμόρφωσης της ελαστίνης ξεκινούσε από τα νανοϊνίδια συνέχιζε στα ινίδια και κατέληγε στις ίνες.

Ο σχηματισμός των πρώτων νανοϊνιδίων απαιτούσε χρονικό διάστημα, τουλάχιστον δύο εβδομάδων, μετά την παρασκευή του μητρικού εναιωρήματος ελαστίνης σε 1% w/v δις απεσταγμένο νερό στους 20 °C (**Εικόνα 6.10e**).

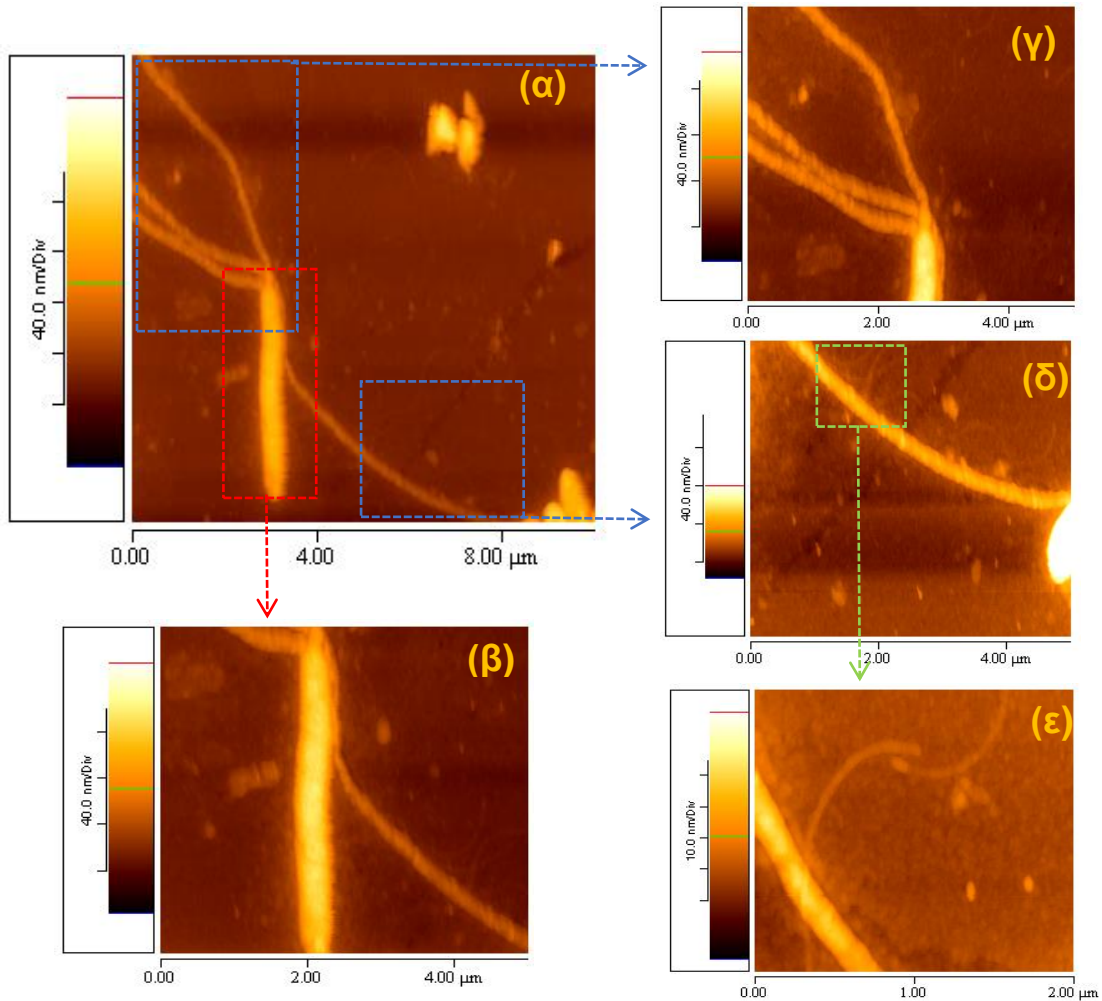
Μετά από σχεδόν δύο εβδομάδες, η αυτοδιαμόρφωση των νανοϊνιδίων οδήγησε στο σχηματισμό ινιδίων (**Εικόνα 6.10d**).

Τελικά, περίπου έξι εβδομάδες μετά την παρασκευή του μητρικού υδατικού εναιωρήματος, ίνες ελαστίνης παρήχθησαν από την αυτο-οργάνωση των ινιδίων (**Εικόνα 6.10b**).

Ως εκ τούτου, στο **Σχήμα 6.10a**, παρουσιάζεται μια τοπογραφική εικόνα AFM μεγέθους 10×10μm, όπου απεικονίζεται μια ίνα ελαστίνης και τεσσάρων ινιδίων (τρία ινίδια βρίσκονται πάνω-αριστερά και ένα ινίδιο στη δεξιά πλευρά της ίνας). Αν και υπήρχαν αρκετά αμυδρά νανοϊνίδια, η παρατήρησή τους ήταν μεγάλη επιστημονική πρόκληση, λόγω της σημαντικής διαφοράς ύψους μεταξύ των ινών ($88,8 \pm 5,7$) nm και των νανοϊνιδίων ($4,5 \pm 0,7$) nm.

Επίσης, η **Εικόνα 6.10b** παρουσιάζει μια τοπογραφική εικόνα AFM υψηλότερης μεγέθυνσης ($5 \times 5 \mu\text{m}$) της ίδιας ίνας ελαστίνης.

Στις **Εικόνες 6.10 c, d**, δύο τοπογραφικές εικόνες AFM των $5 \times 5 \mu\text{m}$, απεικονίζουν τα τέσσερα ινίδια (**c**: τρία από πάνω αριστερά και **d**: ένα στη δεξιά πλευρά της παρατηρούμενης ίνας), ενώ στην **Εικόνα 10e** παρουσιάζεται μία τοπογραφική AFM εικόνα ($2 \times 2 \mu\text{m}$) των νανοϊνιδίων. Γεγονός που υποστηρίζει την υπόθεση μιας διαδικασίας αυτοδιαμόρφωσης της ελαστίνης.

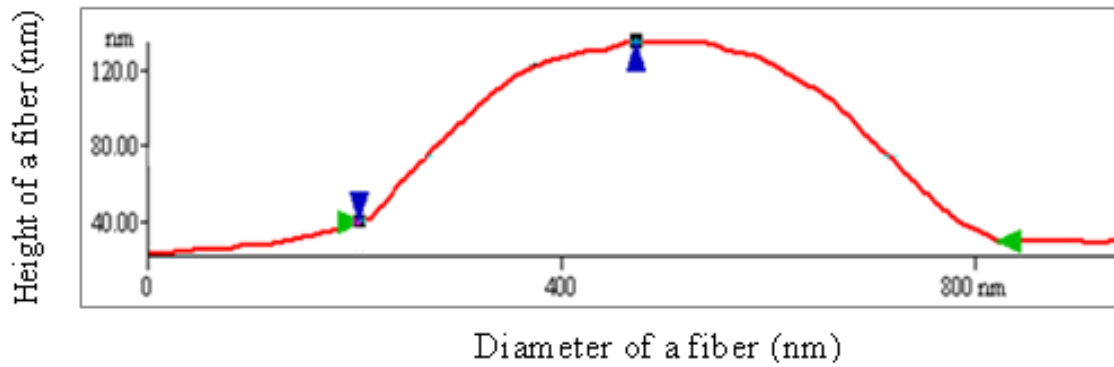


Εικόνα 6.10. Τοπογραφικές απεικονίσεις AFM της (α) αυτοδιαμόρφωσης της ελαστίνης από (β) ίνα σε (γ, δ) ινίδια και σε (ε) νανοϊνίδια.

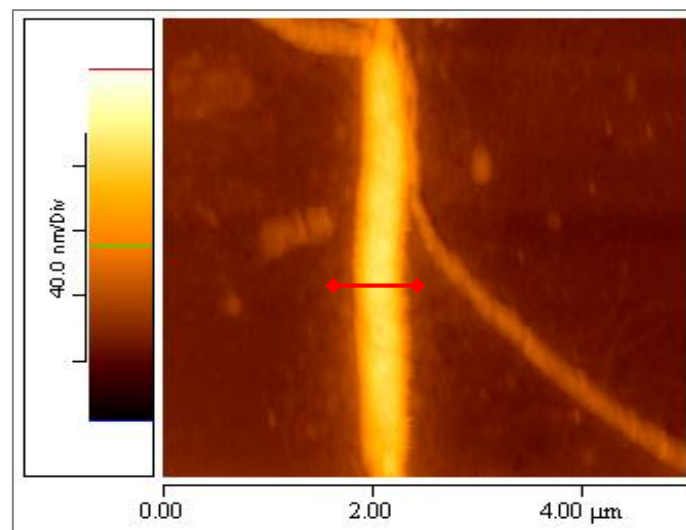
Στη συνέχεια, στην **Εικόνα 6.11α**, εμφανίζεται ένα ενδεικτικό διάγραμμα προφίλ ύψους και διαμέτρου μιας ίνας. Το ύψος μιας ίνας, ενός ινιδίου ή ενός νανοϊνιδίου προσδιορίστηκε με τη μέτρηση της κατακόρυφης απόστασης μεταξύ των μπλε δεικτών (μπλε τρίγωνα), ενώ η διάμετρος υπολογίστηκε με την οριζόντια απόσταση μεταξύ των πράσινων δεικτών (πράσινα τρίγωνα).

Επιπροσθέτως, έγιναν διορθώσεις λόγω της γεωμετρίας της ακίδας, όπως ήδη αναφέρθηκε στην παράγραφο 6.6. Στην **Εικόνα 6.11β**, μια κόκκινη γραμμή επισημαίνεται ως παράδειγμα μιας AFM μέτρησης κατά την επεξεργασία δεδομένων της προαναφερθείσας γραφικής παράστασης προφίλ ύψους και διαμέτρου μιας ίνας. Η κόκκινη γραμμή του διαγράμματος της **Εικόνας 6.11α** ταυτίζεται με την αντίστοιχη κόκκινη γραμμή της απεικόνισης της ίνας στην **Εικόνα 6.11β**.

Οι μέσες τιμές των διαμέτρων και των υψών για σημαντικό αριθμό νανοϊνιδίων, ινιδίων και ινών ελαστίνης παρουσιάζονται στον **Πίνακα 6.1**.



(α)



(β)

Εικόνα 6.11. Παράδειγμα AFM μέτρησης ίνας ελαστίνης κατά την επεξεργασία δεδομένων: **(α)** Ενδεικτικό προφίλ ύψους και διαμέτρου της ίνας [το ύψος μετρήθηκε με την κατακόρυφη απόσταση των μπλε δεικτών (μπλε τρίγωνα) και της διαμέτρου με την οριζόντια απόσταση των πράσινων δεικτών (πράσινα τρίγωνα)] **(β)** Η εικόνα 5x5μm της ίδιας ίνας όπως ελήφθηκε από το AFM. [Η κόκκινη γραμμή του **(α)** ταυτίζεται με την αντίστοιχη κόκκινη γραμμή του **(β)**].

Πίνακας 6.1. Μέσες τιμές διαμέτρων και υψών ινών, ινιδίων και νανοϊνιδίων.

	Διάμετρος (nm) (Μέση τιμή ± Τυπική απόκλιση)	Ύψος (nm) (Μέση τιμή ± Τυπική απόκλιση)
Ίνα	549,64 ± 25,4	88,8 ± 5,7
Ινίδιο	321,3 ± 21,0	27,7 ± 3,3
Νανοϊνίδιο	121,0 ± 21,0	4,5 ± 0,7

6.8 Συζήτηση Αποτελεσμάτων

Αρκετές τεχνικές έχουν περιγράψει τη λήψη ινών και ινωδών ικριωμάτων από βιοϋλικά με βάση την ελαστίνη, συμπεριλαμβανομένων των διαδικασιών αυτοδιαμόρφωσης και ηλεκτροστατικής ινοποίησης (electrospinning) [264]. Προς αυτή την κατεύθυνση, η παρούσα εργασία εστιάζει στη διερεύνηση της διαδικασίας αυτοδιαμόρφωσης δομών ινών ελαστίνης χρησιμοποιώντας απεικόνιση AFM. Οι διάφορες πειραματικές παράμετροι που μελετήθηκαν είναι το μέσο εναιώρησης, η συγκέντρωση ελαστίνης, η θερμοκρασία αποθήκευσης των μητρικών εναιωρημάτων και το χρονικό διάστημα από την παρασκευή τους. Η ελαστίνη είναι ένα πολλά υποσχόμενο βιοϋλικό λόγω της χαμηλής φλεγμονώδους απόκρισής της [265], και καθώς είναι μια κύρια πρωτεΐνη που βρίσκεται στον συνδετικό ιστό, αυτή η έρευνα δίνει προτεραιότητα στη διερεύνηση της διαδικασίας αυτοδιαμόρφωσης της σε νανοκλίμακα.

Σε μια μελέτη, οι Srokowski και Woodhouse [263] χρησιμοποίησαν 2D απεικόνιση AFM για να αναλύσουν την τοπογραφία επικαλυμμένων επιφανειών με ELP (Elastin-Like Peptides) σε ρυθμιστικό διάλυμα PBS. Δεν βρήκαν καμία διακριτή διαφορά στα χαρακτηριστικά της επιφάνειας μεταξύ μη επικαλυμμένων και επικαλυμμένων με ELP, υποδεικνύοντας ότι κάθε ένα από τα ELP προσκολλήθηκε στο υποκείμενο υπόστρωμα και σχημάτισε μια ομοιόμορφη επίστρωση. Επίσης, οι Pepe et al. [266] διεξήγαγαν μια έρευνα που επικεντρώθηκε στη διερεύνηση της μορφολογίας των σχηματισμένων συσσωματωμάτων, με δείγματα πεπτιδίου S4, για να παρουσιάσουν το σχηματισμό μακρών και εύκαμπτων ινών. Οι εικόνες AFM που ελήφθησαν από αυτά τα δείγματα έδειξαν μόνο υψηλά συσσωματωμένες σφαιρικές δομές, υποδεικνύοντας ότι ο διαλύτης είχε ανασταλτική επίδραση στον σχηματισμό του πεπτιδίου. Ωστόσο, στην παρούσα διδακτορική διατριβή παρασκευάστηκαν εναιωρήματα ελαστίνης με χρήση PBS και παρατηρήθηκαν σφαιρικές συσσωματώσεις. Όταν αντ' αυτού χρησιμοποιήθηκε δις απεσταγμένο νερό ως μέσο εναιώρησης, απεικονίστηκαν τρισδιάστατα ινίδια και ίνες ελαστίνης.

Σε μια άλλη έρευνα [267], διεξήγαγαν μια σύγκριση της θερμικής συμπεριφοράς του νερού σε διαλύματα που περιέχουν διαφορετικά πεπτίδια από την ελαστίνη, τα οποία είτε συσσωρεύονται είτε σχηματίζουν δομές, προκειμένου να κατανοηθεί καλύτερα ο ρόλος του νερού στο μηχανισμό της συσσωμάτωσης. Επιπλέον, οι Koga et al. [268] δημιούργησαν επιστρώσεις ELP πάνω σε υδρόφοβη γυάλινη επιφάνεια, οι οποίες στη συνέχεια εμβάπτιστηκαν σε υδατικό διάλυμα στους 37 °C, αλλά δεν παρατηρήθηκε σχηματισμός ινών ελαστίνης. Επίσης, οι Cao et al. απέδειξαν ότι μια αύξηση θερμοκρασίας από τους 20°C στους 80 °C επηρεάζει την αυτοδιαμόρφωση των ELP [269]. Οι Tarakanova et al. χρησιμοποίησαν μια ανάλυση των βασικών συστατικών των δομών, για να εξετάσουν την τροποελαστίνη στους 37°C, θερμοκρασία στην οποία αυτοδιαμορφώνεται φυσικά σε συσσωματωμένα συμπυκνώματα [270]. Ομοίως, στην παρούσα διδακτορική μελέτη, πραγματοποιήθηκαν πειράματα σε θερμοκρασίες 5 °C, 10 °C και 37 °C, όπου δεν εμφανίστηκαν ίνες ελαστίνης. Ως αποτέλεσμα, διεξήχθησαν περαιτέρω έρευνες χρησιμοποιώντας το μητρικό εναιώρημα ελαστίνης/δις απεσταγμένου νερού σε θερμοκρασία 20 °C, όπου οι ίνες ελαστίνης 3D απεικονίστηκαν με επιτυχία.

Σε μια άλλη μελέτη [271], τα συνθετικά ινίδια πεπτιδίων χαρακτηρίστηκαν δομικά μέσω της διαδικασίας της αυτοδιαμόρφωσης. Για να δημιουργηθούν αυτά τα ινίδια, το πεπτίδιο εναιωρήθηκε σε νερό και επώαστηκε σε ένα σωλήνα φιαλιδίου για μια χρονική περίοδο αρκετών εβδομάδων, τυπικά κυμαινόμενη από 3 έως 5 εβδομάδες, για να επιτραπεί ο σχηματισμός ώριμων ινιδίων. Οι Bochicchio et al. [272] παρατήρησαν τα πρώτα αποτελέσματα σε πεπτίδια που σχετίζονται με την ελαστίνη σε χρονικό διάστημα περίπου 15ημερών, όπως δηλαδή και στην παρούσα διατριβή, όπου το εναιώρημα ελαστίνης αποθηκεύτηκε για δύο εβδομάδες προτού μπορέσουν να απεικονιστούν τρισδιάστατα ινίδια ελαστίνης. Η μελέτη των βασικών ιδιοτήτων της ελαστίνης και της τροποελαστίνης για την κατανόηση των κρίσιμων πτυχών της διαδικασίας της αυτοδιαμόρφωσης είναι μία πρόκληση [103]. *Ωστόσο, το παρόν διδακτορικό παρουσιάζει νέες και λεπτομερείς γνώσεις σχετικά με τα δομικά και γεωμετρικά χαρακτηριστικά ινών, ινιδίων και νανοϊνιδίων ελαστίνης. Επομένως, οι ποιοτικές και ποσοτικές μετρήσεις που παρουσιάζονται σε αυτή τη διδακτορική μελέτη χρησιμεύουν ως στοιχεία για τη διαδικασία αυτοδιαμόρφωσης της ελαστίνης.*

Επιπλέον, οι Bracalello et al. επικεντρώθηκαν στην παρασκευή και το δομικό χαρακτηρισμό νανοϊνών από ένα πολυπεπτίδιο που περιέχει ρεζιλίνη (resilin) και ελαστίνη [273]. Ο σκοπός της έρευνάς τους ήταν να ενισχύσουν την ικανότητα δέσμευσης των κυττάρων μέσω της εισαγωγής μιας συγκεκριμένης αλληλουχίας Arg-Gly-Asp (RGD). Σε άλλη πρόσφατη εργασία, ερεύνησαν την αυτοδιαμόρφωση πολυπεπτιδίων (ELP) σε επιφάνειες πυριτίου και νανοσωματίδια [274]. *Επομένως, η τρέχουσα μελέτη θεωρείται ως έρευνα τελευταίας τεχνολογίας στο συγκεκριμένο τομέα, καθώς διερευνά τη διαδικασία αυτοδιαμόρφωσης 3D ινιδίων ελαστίνης από νανοϊνίδια έως και ίνες, χρησιμοποιώντας απεικόνιση AFM.*

6.9 Συμπεράσματα

Τα πειράματα που πραγματοποιήθηκαν στο 6^ο κεφάλαιο με τη χρήση του μικροσκοπίου ατομικής δύναμης, λόγω της υψηλής ανάλυσης του στη νανοκλίμακα, έδειξαν ότι οι βέλτιστες συνθήκες για το σχηματισμό μεμονωμένων νανοϊνιδίων ελαστίνης ήταν μια συγκέντρωση ελαστίνης 1% w/v σε δις απεσταγμένο νερό, σε θερμοκρασία 20 °C, με ελάχιστη περίοδο επώασης δύο εβδομάδων μετά από τη δημιουργία του μητρικού εναιωρήματος. Τα νανοϊνώδη πλέγματα ελαστίνης που δημιουργήθηκαν μπορούν να συμβάλουν σημαντικά στις βιοϊατρικές εφαρμογές. Ιδιαίτερα στη μηχανική ιστών, που σχεδιάζονται βιοϋλικά και θα πρέπει να παρουσιάζουν παρόμοια συμπεριφορά με αυτή που βρίσκεται στο σώμα, επιτρέποντας στους ιστούς να επιτύχουν την επούλωση.

Είναι σημαντικό να σημειωθεί ότι έγιναν κατάλληλες διορθώσεις για να ληφθούν υπόψη τα αποτελέσματα της γεωμετρίας της ακίδας. Το σφάλμα που προέκυψε από τη γεωμετρία της ήταν της τάξης του 7-10%, με το μεγαλύτερο σφάλμα να παρατηρείται στην περίπτωση των νανοϊνιδίων. Διορθώσεις οι οποίες βοήθησαν στις έγκυρες

μετρήσεις των 2D και 3D τοπογραφικών απεικονίσεων των νανοϊνιδίων/ινιδίων/ινών της ελαστίνης.

Επίσης, διερευνήθηκε η διαδικασία αυτοδιαμόρφωσης της ελαστίνης από νανοϊνίδια σε ινίδια και μετά σε ίνες κάτω από τις προαναφερθέντες πειραματικές παραμέτρους. Τα δομικά χαρακτηριστικά διαδραματίζουν κρίσιμο ρόλο για τα περισσότερα κύτταρα, οπότε η επιλογή του κατάλληλου βιοϋλικού για το σχεδιασμό του ικρίωματος έχει τεράστια σημασία. Τα αποτελέσματα αυτής της μελέτης αναμένονται να προσφέρουν βιώσιμες λύσεις για την κατασκευή νανοδομών από πρωτεΐνες με βάση την ελαστίνη, που διαθέτουν συγκεκριμένες φυσικές και χημικές ιδιότητες, καλύπτοντας τις ανάγκες διάφορων εφαρμογών στη βιοτεχνολογία.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 7.

ΕΠΙΔΡΑΣΗ ΤΗΣ ΥΠΕΡΙΩΔΟΥΣ ΑΚΤΙΝΟΒΟΛΙΑΣ ΣΤΑ ΙΝΙΔΙΑ ΕΛΑΣΤΙΝΗΣ

Ο σκοπός του 7^{ου} κεφαλαίου ήταν η μελέτη της επίδρασης της υπεριώδους ακτινοβολίας από τις ίνες έως τα νανοϊνίδια της ελαστίνης χρησιμοποιώντας απεικονιστικές μεθόδους AFM. Μελετήθηκαν οι διαφοροποιήσεις στις διαμέτρους, στα ύψη, στα μήκη των ινών και στην τραχύτητα της επιφάνειας των δειγμάτων. Επίσης, καταγράφηκε η ποσοστιαία μεταβολή αυτών των διαφορών κάτω από την επίδραση διαφορετικών χρονικών διαστημάτων ακτινοβολίας με UV. Τα αποτελέσματα παρουσιάζονται με τοπογραφικές απεικονίσεις 2D και 3D, με συγκριτικούς πίνακες και γραφικές παραστάσεις, με διαγράμματα προφίλ ύψους και τραχύτητας, αλλά και με ιστογράμματα. Αποδεικνύεται, ότι όλες οι διαστάσεις ινών διαφοροποιούνται σημαντικά υπό την επίδραση της υπεριώδους ακτινοβολίας.

7.1 Πειραματικά Πρωτόκολλα

7.1.1 Παραγωγή νανοϊνιδίων ελαστίνης

Η μελέτη νανοϊνιδίων ελαστίνης πραγματοποιήθηκε δημιουργώντας εναιωρήματα 1% w/v ελαστίνης / δις απεσταγμένου νερού. Για την παρασκευή τους, χρησιμοποιήθηκαν τα πρωτόκολλα που παρουσιάστηκαν στις **παραγράφους 5.2.1 και 5.2.2 (Κεφάλαιο 5)**.

7.1.2 Ακτινοβολήση νανοϊνιδίων ελαστίνης

Για την ακτινοβολήση των νανοϊνιδίων ελαστίνης χρησιμοποιήθηκε η διάταξη που παρουσιάστηκε στην **παράγραφο 5.4 (Κεφάλαιο 5)**. Οι χρόνοι έκθεσης στο UV κυμάνθηκαν από 10min έως 4h, είτε με διακοπόμενη, είτε με συνεχόμενη ακτινοβολήση.

7.1.3 Απεικόνιση νανοϊνιδίων ελαστίνης με τη χρήση AFM

Η απεικόνιση των ινιδίων ελαστίνης πραγματοποιήθηκε με το AFM (CP II) με τη μέθοδο contact mode. Η μέθοδος αυτή χρησιμοποιείται ευρέως για την απεικόνιση βιολογικών δειγμάτων με προβόλους με μικρές σταθερές ελατηρίου ($k < 1\text{N/m}$). Συγκεκριμένα, χρησιμοποιήθηκαν οι πυραμιδικές ακίδες (MLCT) που παρουσιάστηκαν στην **παράγραφο 5.2.1 (Πίνακας 5.1)**, με ακτίνα καμπυλότητας 20nm σε προβόλους σχήματος V και σταθερά ελατηρίου 0.6N/m. Η επιλογή προβόλου με μικρή σταθερά ελατηρίου ήταν σκόπιμη, διότι πρόβολοι με υψηλή σταθερά ελατηρίου μπορούν να προκαλέσουν μόνιμη «ζημιά» στο δείγμα (να το χαράξουν ή να το μετακινήσουν). Όλα τα πειράματα πραγματοποιήθηκαν σε περιβάλλον αέρα σε

θερμοκρασία $20 \pm 2^\circ\text{C}$ και σχετική υγρασία $40 \pm 3\%$. Η επεξεργασία των εικόνων πραγματοποιήθηκε όπως παρουσιάστηκε στην **παράγραφο 5.2.2 (Κεφάλαιο 5)**. Όλα τα πειράματα πριν και μετά το κάθε στάδιο ακτινοβολήσης πραγματοποιήθηκαν στο ίδιο νανοϊνίδιο ελαστίνης για την εξαγωγή έγκυρων συμπερασμάτων.

7.1.4 Προσδιορισμός του ίδιου νανοϊνιδίου ελαστίνης πριν και μετά από κάθε ακτινοβολήση

Καθοριστική σημασία για την αξιοπιστία των αποτελεσμάτων έχει ο προσδιορισμός και η μελέτη του ίδιου ινιδίου πριν και μετά από κάθε ακτινοβολήση. Για τον προσδιορισμό του ίδιου ινιδίου χρησιμοποιήθηκε το πρωτόκολλο που παρουσιάστηκε στην **παράγραφο 5.2.3 (Κεφάλαιο 5)**.

7.1.5 Στατιστική σημαντικότητα αποτελεσμάτων

Οι τιμές των μετρήσεων εκφράστηκαν υπό τη μορφή: Μέση τιμή \pm Τυπική απόκλιση. Για τον προσδιορισμό της στατιστικής σημαντικότητας των αποτελεσμάτων χρησιμοποιήθηκε το ANOVA τεστ, που παρουσιάστηκε στην **παράγραφο 5.6 (Κεφάλαιο 5)**. Οι τιμές $p < 0,05$ θεωρήθηκαν στατιστικά σημαντικές.

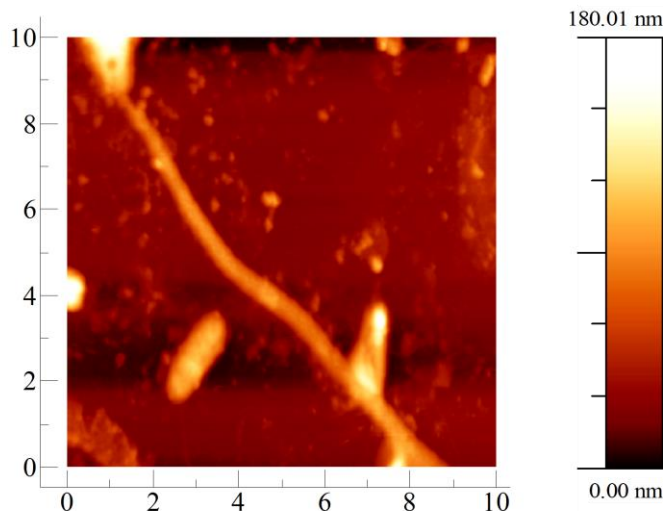
7.2 Αποτελέσματα

Τα πειράματα με UV χωρίστηκαν σε 2 μεγάλες κατηγορίες, ανάλογα με τις διαστάσεις των ινών και με το χρόνο ακτινοβολήσης τους. Στην πρώτη κατηγορία μελετήθηκε η επίδραση του υπεριώδους φωτός ανάλογα με το μέγεθος των ινών, δηλαδή αν έχει διαστάσεις ίνας, ινιδίου ή νανοϊνιδίου, σύμφωνα με τον **Πίνακα 6.1 (Κεφάλαιο 6)**. Στη δεύτερη κατηγορία ερευνήθηκε πως επιδρούν οι διαφορετικοί χρόνοι έκθεσης της UV ακτινοβολίας στα νανοϊνίδια ελαστίνης.

7.2.1 Μελέτη της επίδρασης υπεριώδους ακτινοβολίας στην ελαστίνη ανάλογα με τις διαστάσεις των ινών.

7.2.1.1 Μελέτη της επίδρασης της υπεριώδους ακτινοβολίας σε ίνα ελαστίνης.

Αρχικά στην 1^η κατηγορία πειραμάτων, μελετήθηκαν ίνες ελαστίνης διαφόρων διαστάσεων υπό την επίδραση υπεριώδους ακτινοβολίας. Ενδεικτικά παρουσιάζονται τα αποτελέσματα μιας ίνας με μέσες τιμές διαμέτρου ($517,61 \pm 20,42$) nm και ύψους ($64,58 \pm 2,23$) nm (**Πίνακας 7.1**). Το αρχικό βήμα ήταν η απεικόνιση της ίνας με το AFM χωρίς UV ακτινοβολήση (**Εικόνα 7.1**), για να γίνεται σωστή σύγκριση με τα ακτινοβολημένα δείγματα.



Εικόνα 7.1. Τοπογραφική 2D απεικόνιση AFM ($10 \times 10 \mu\text{m}$) ίνας ελαστίνης χωρίς ακτινοβολήση.

Στη συνέχεια το ίδιο δείγμα ακτινοβολήθηκε για 10min με υπεριώδες φως μήκους κύματος 254nm και έπειτα απεικονίστηκε με το AFM τόσο σε 2D όσο και σε 3D τοπογραφικές εικόνες. Η ίδια ακριβώς διαδικασία επαναλήφθηκε άλλες 2 φορές, έτσι ώστε να μελετηθούν οι πιθανές δομικές αλλαγές στην ίνα για συνολικούς χρόνους ακτινοβολήσης 60 και 120 λεπτών. Οι τιμές των διαμέτρων και των υψών της ίνας ελαστίνης υπολογίστηκαν με τη διαδικασία που παρουσιάστηκε στην **παράγραφο 6.7 (εικόνα 6.11)**. Οι μέσες τιμές και τυπικές αποκλίσεις τους παρουσιάζονται στον **Πίνακα 7.1**, ενώ οι ποσοστιαίες μεταβολές τους στον **Πίνακα 7.2**.

Πίνακας 7.1. Μέσες τιμές και τυπικές αποκλίσεις διαμέτρων (Δ) και υψών (Υ) ίνας ελαστίνης κατά την ακτινοβολήση με UV.

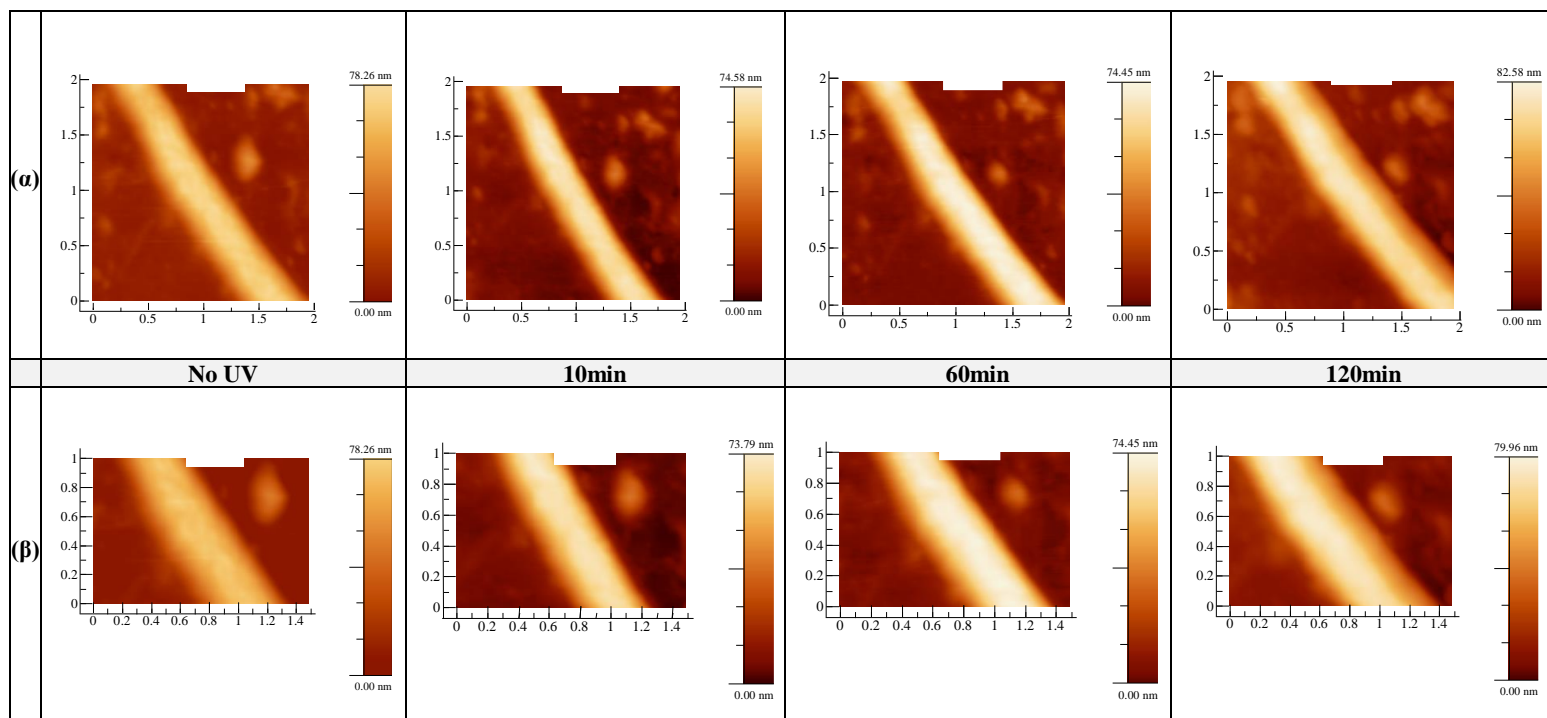
	no UV		10min UV		60min UV		120min UV	
	$\Delta(\text{nm})$	$\Upsilon(\text{nm})$	$\Delta(\text{nm})$	$\Upsilon(\text{nm})$	$\Delta(\text{nm})$	$\Upsilon(\text{nm})$	$\Delta(\text{nm})$	$\Upsilon(\text{nm})$
Μέση τιμή	517,61	64,58	458,85	63,80	486,51	62,73	549,43	61,48
Τυπική απόκλιση	20,42	2,23	19,11	2,14	20,65	2,38	20,81	2,19

Πίνακας 7.2. Ποσοστιαίες μεταβολές στις διαστάσεις της ίνας ελαστίνης.

	Δ	Υ
0-10min	-11,35%	-1,21%
10-60min	6,03%	-1,68%
60-120min	12,93%	-1,99%
ΣΥΝΟΛΙΚΑ: 0-120min	6,15%	-4,80%

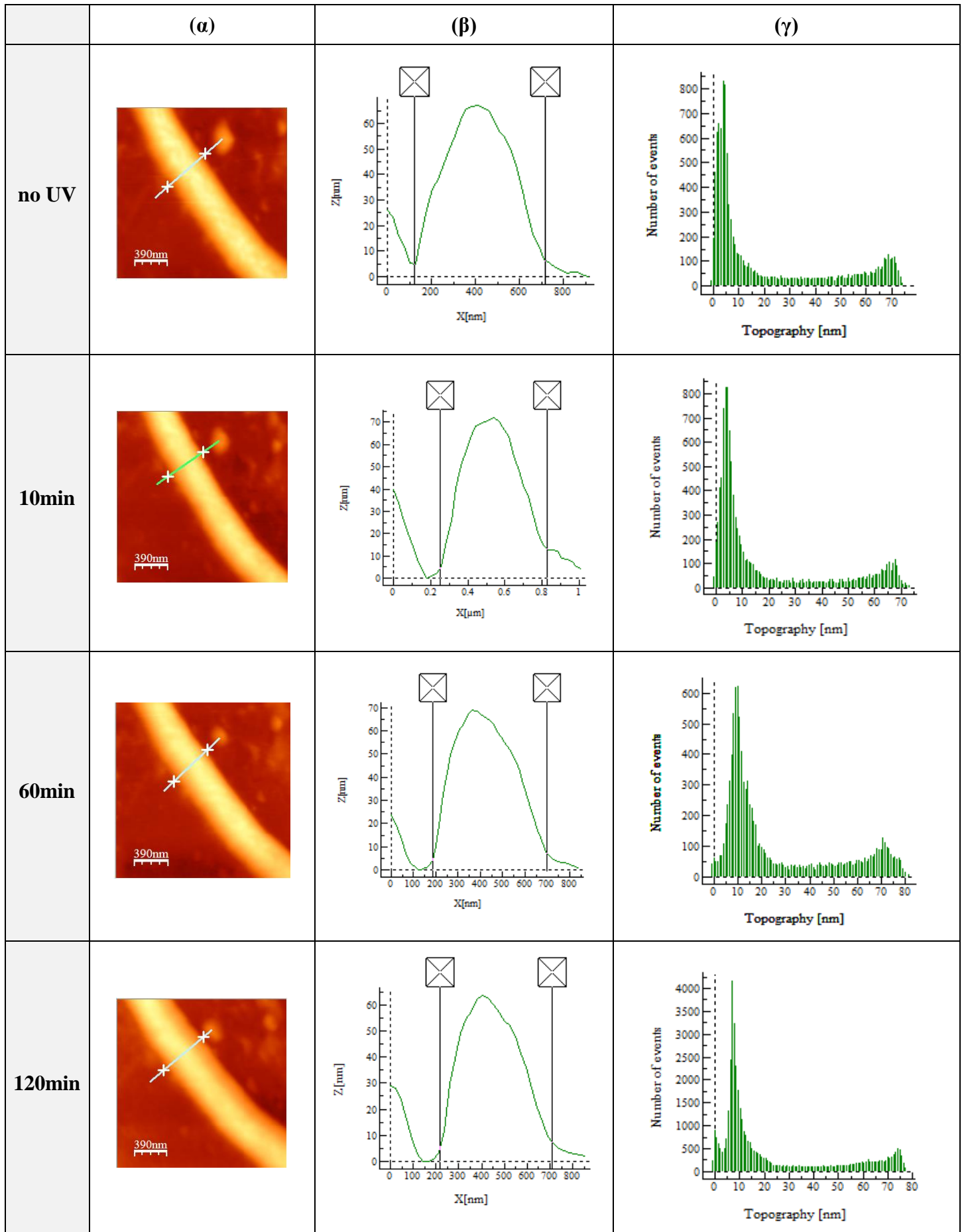
Μελετώντας τα αποτελέσματα, παρατηρήθηκε στα πρώτα 10min μια μείωση της διαμέτρου της ίνας κατά 11,4%, στα αμέσως επόμενα 50min μια μικρή αύξηση 6% και στα τελευταία 60min υπήρξε και άλλη άνοδος του ποσοστού κατά 12,9%. Συνολικά, δηλαδή για χρόνο ακτινοβόλησης 2h με UV ακτινοβολία διαπιστώθηκε μια αύξηση στη διάμετρο κατά 6,2%. Όσο αφορά το ύψος της ίνας ελαστίνης και για όλους τους χρόνους ακτινοβόλησης 10min, 60min και 120min, οι ποσοστιαίες μεταβολές κυμάνθηκαν περίπου από -1,2 έως -2%. Στο σύνολο του το ύψος της ίνας μειώθηκε κατά 4,8%. Επομένως, η υπερϊώδης ακτινοβολία επηρέασε τόσο τη διάμετρο, όσο και το ύψος της.

Επιπροσθέτως, μελετήθηκαν ενδελεχώς και οι τοπογραφικές εικόνες που πάρθηκαν από το AFM για να ελεγχθεί η ορθότητα των μετρήσεων. Στην **Εικόνα 7.2** απεικονίζεται τμήμα της ίνας ελαστίνης που μετρήθηκε κατά τη διάρκεια του πειράματος σε χρόνους ακτινοβόλησης 0, 10min, 60min και 120min και σε μεγεθύνσεις 2x2 μ m (**Εικόνα 7.2.α**) και 1x1,5 μ m (**Εικόνα 7.2.β**).



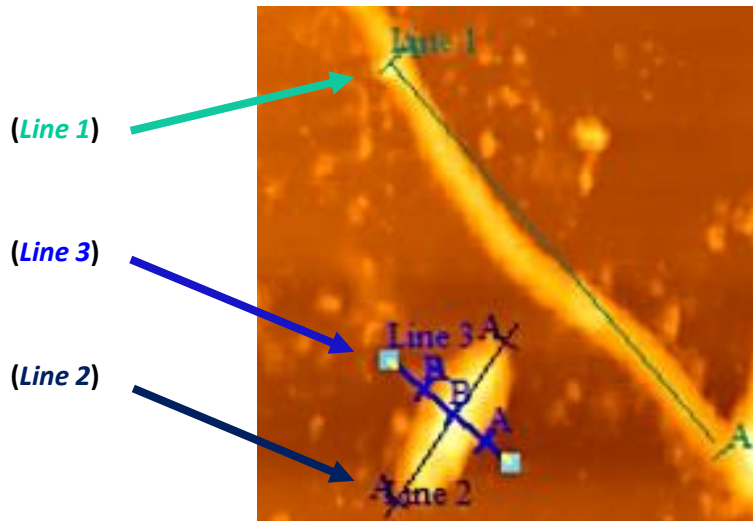
Εικόνα 7.2. Τοπογραφικές 2D απεικονίσεις AFM ίνας ελαστίνης: α) 2x2 μ m και β) 1x1,5 μ m. (από αριστερά προς τα δεξιά: χωρίς ακτινοβόληση, μετά από 10 min, 60min και 120min έκθεσης σε UV ακτινοβολία).

Επαληθεύτηκαν, τα αποτελέσματα των πειραματικών μετρήσεων, καθώς με απλή παρατήρηση των τοπογραφικών απεικονίσεων (**Εικόνα 7.2**), των διαγραμμάτων προφίλ ύψους και τραχύτητας επιφάνειας. (**Εικόνα 7.3**), δε φαίνονται σημαντικές δομικές αλλαγές στη διάμετρο και στο ύψος της ίνας ελαστίνης, ούτε όμως και έντονες αλλοιώσεις στην επιφάνειά της.



Εικόνα 7.3. α) Τοπογραφικές 2D απεικονίσεις AFM ίνας ελαστίνης: 2×2 μm, β) Διαγράμματα προφίλ ύψους, γ) Διαγράμματα τραχύτητας. (κατά τη διάρκεια της ακτινοβόλησης σε χρόνους έκθεσης UV: 0, 10, 60 και 120min)

Αξίζει, να αναφερθεί ότι μετά από ενδεδειγμένο έλεγχο των τοπογραφικών απεικονίσεων της αρχικής εικόνας διαστάσεων 10x10nm, διαπιστώθηκε ότι άλλαζαν οι διαστάσεις (μήκος, ύψος, διάμετρος) της ίνας. Επομένως, έγιναν κατάλληλες μετρήσεις για το μήκος της στους διαφορετικούς χρόνους ακτινοβολίας (0, 10min, 60min, 120min) με UV. Συγκεκριμένα μετρήθηκε το μήκος (*Line 1*) της ίνας ελαστίνης που ερευνάται, αλλά και οι διαστάσεις μιας άλλης ίνας ελαστίνης αρκετά μικρότερου μήκους (*Line 2*), άλλης διαμέτρου και άλλου ύψους (*Line 3*) [Εικόνα 7.4]. Οι αντίστοιχες μετρήσεις καταγράφονται στον Πίνακα 7.3.



Εικόνα 7.4. Τοπογραφική απεικόνιση AFM (6 × 6 μm) ίνας ελαστίνης χωρίς ακτινοβολία, όπου επισημαίνονται το μήκος της μεγάλης ίνας (*Line 1*), το μήκος (*Line 2*), η διάμετρος και το ύψος (*Line 3*) της μικρής ίνας.

Πίνακα 7.3. Διαστάσεις ινών κατά τη διάρκεια της ακτινοβολίας με UV ακτινοβολία.

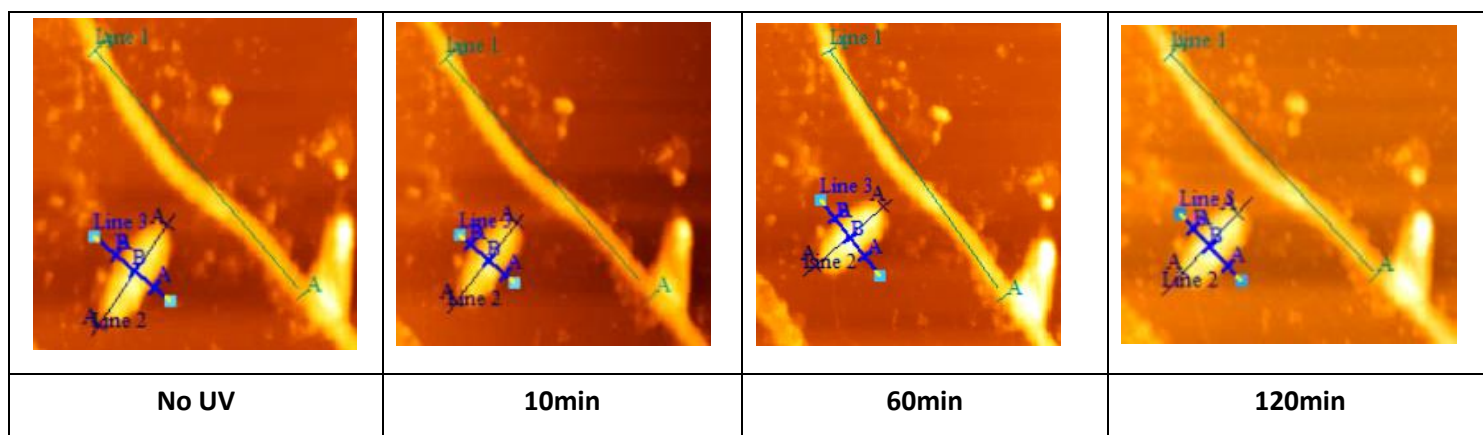
	No UV	10min	60min	120min
Μήκος μεγάλης ίνας (nm) (<i>Line 1</i>)	6487	6174	5967	5791
Μήκος μικρής ίνας (nm) (<i>Line 2</i>)	2482	2086	1798	1601
διάμετρος μικρής ίνας (nm) (<i>Line 3</i>)	1013	981,8	999,4	1038
ύψος μικρής ίνας (nm) (<i>Line 3</i>)	91,96	88,87	87,09	85,44

Πίνακα 7.4. Συνολικές ποσοστιαίες μεταβολές των μελετώμενων ινών κατά τη διάρκεια της UV ακτινοβολήσης.

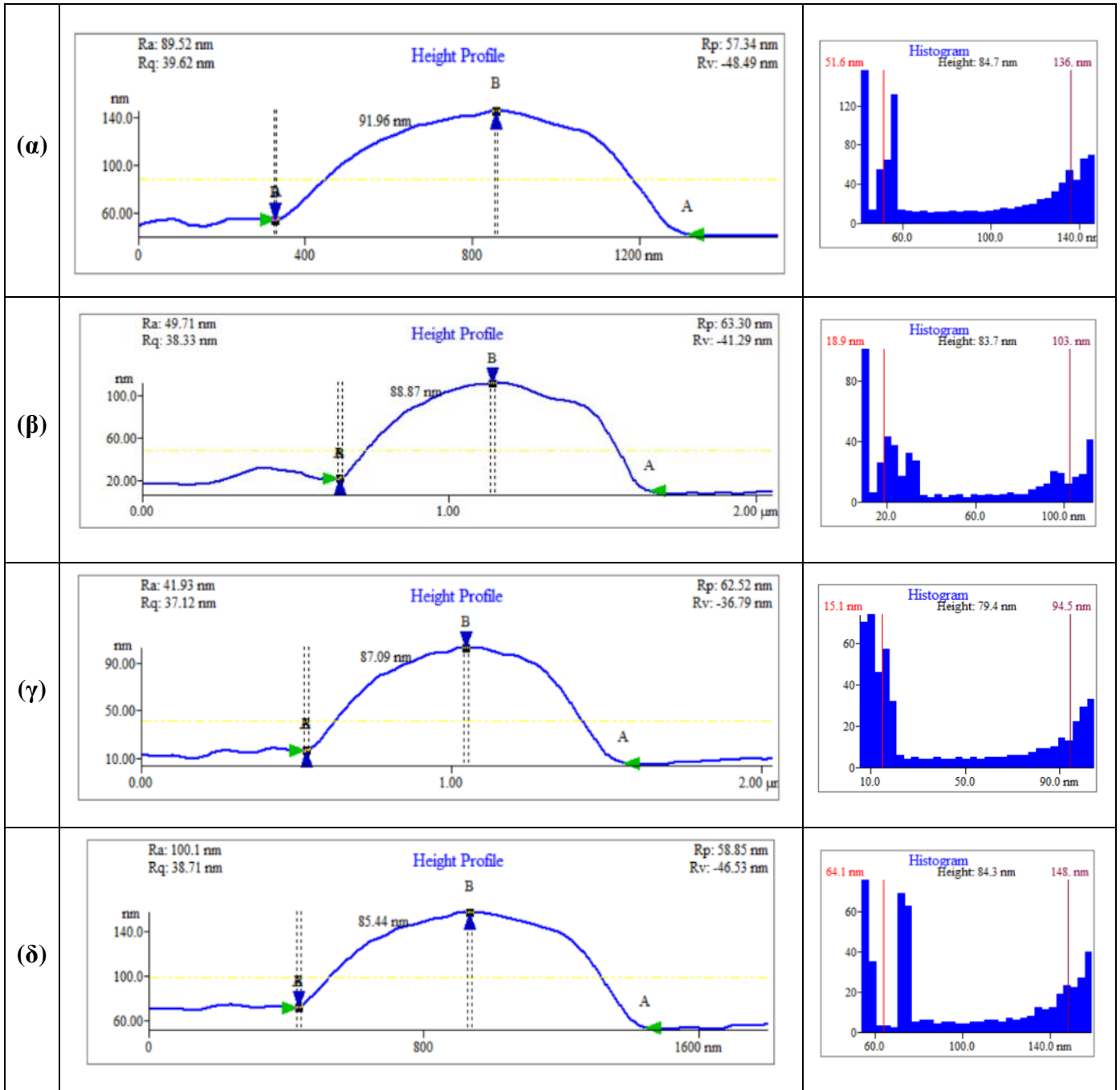
	Μεγάλη ίνα			Μικρή ίνα		
	Διάμετρος(nm)	Ύψος(nm)	Μήκος(nm)	Διάμετρος(nm)	Ύψος(nm)	Μήκος(nm)
0-10min	-11,35%	-1,21%	-4,83%	-3,10%	-3,36%	-15,95 %
10-60min	6,03%	-1,68%	-3,35%	1,81%	-2,00%	-13,81%
60-120min	12,93%	-1,99%	-2,95%	3,86%	-1,89%	-10,96%
0-120min (ΣΥΝΟΛΙΚΑ)	6,15%	-4,80%	-10,73%	2,47%	-7,09%	-35,50%

Παρατηρώντας προσεχτικά τον **Πίνακα 7.3** και υπολογίζοντας αναλυτικά τις συνολικές ποσοστιαίες τους μεταβολές [**Πίνακα 7.4**] διαπιστώνεται η ελάττωση του μήκους της μεγάλης ίνας κατά 10,7% μετά από UV ακτινοβολήση 120min. Συνολικά το μήκος της μικρής ίνας μειώνεται σημαντικά κατά 35,5% μετά την 2h έκθεση στη UV ακτινοβολία, ενώ η διάμετρος και το ύψος της έχουν μεταβληθεί κατά +2.5% και -7,1% αντίστοιχα.

Οι πειραματικές μετρήσεις από την επεξεργασία των τοπογραφικών απεικονίσεων των ινών (**Εικόνα 7.5**), αλλά και των διαγραμμάτων προφίλ ύψους και ιστογραμμάτων της διαμέτρου της μικρής ίνας (**Εικόνα 7.6**) επαληθεύουν με ακρίβεια τη πολύ σημαντική συρρίκνωση κατά μήκος των ινών ελαστίνης και τις μικρές μεταβολές του ύψους και της διαμέτρου τους. Η επίτευξη των λεπτομερών αυτών μετρήσεων έγινε με την πολύτιμη βοήθεια του AFM και των λογισμικών του προγραμμάτων DI SPM Lab ver.60.2, IP-image processing, Data analysis ver.2.1.15 (Veeco) και WSxM 5.0 dev. 9.1 (Nanotec) [**194**], όπως έχουμε προαναφέρει στην **παράγραφο 5.3.2** (κεφάλαιο 5).



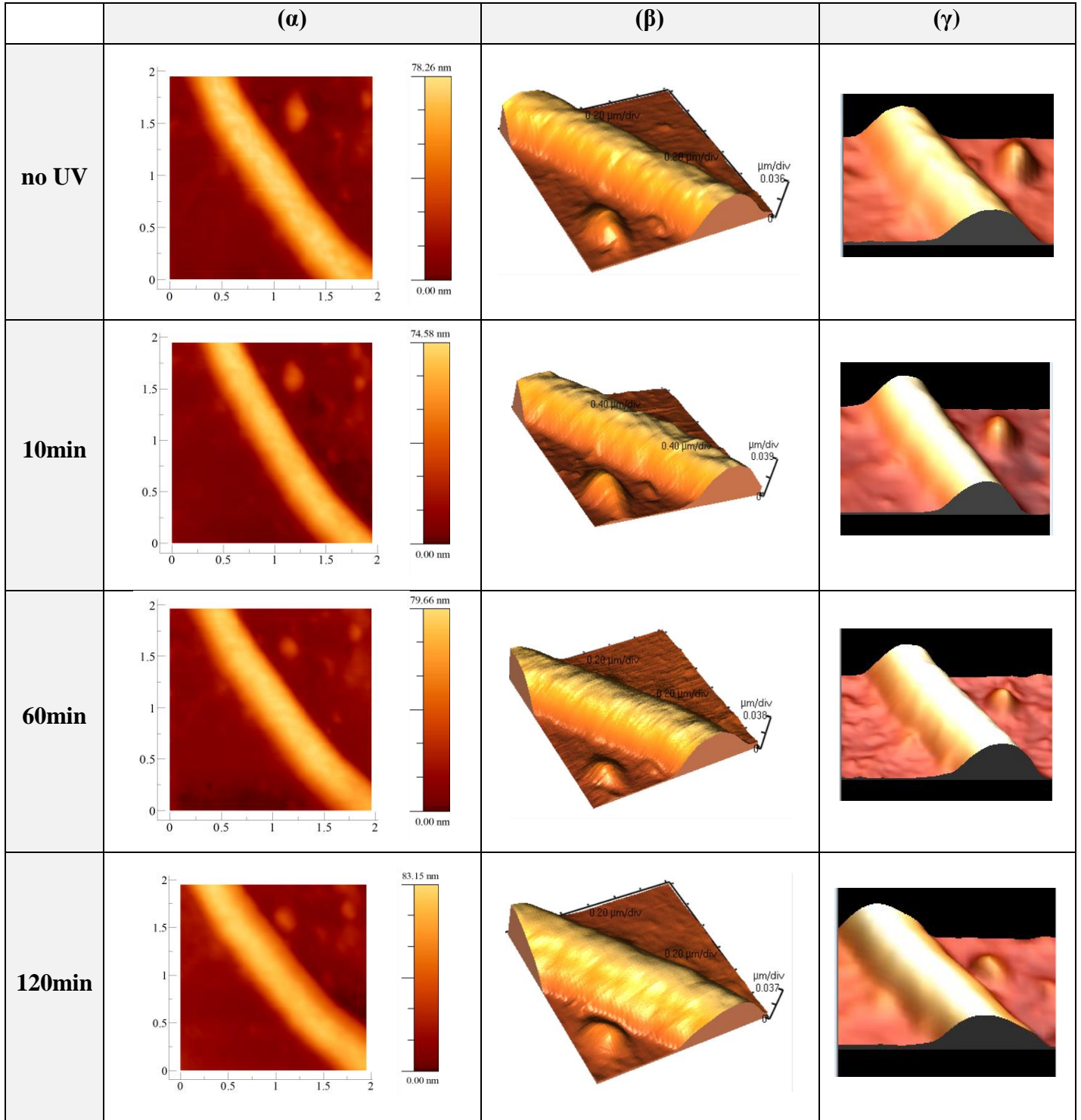
Εικόνα 7.5. Τοπογραφικές απεικονίσεις AFM (7×7μm) μεγάλης και μικρής ίνας ελαστίνης κατά την ακτινοβολήση με UV σε χρόνους 0, 10min, 60min, 120min, όπου επισημαίνονται η σημαντική μείωση των μηκών τους και οι σχετικά μικρές μεταβολές; στις διαμέτρους και τα ύψη τους.



Εικόνα 7.6. Διαγράμματα προφίλ ύψους και ιστογράμματα της μικρής ίνας ελαστίνης κατά την ακτινοβολή με UV σε χρόνους α) 0, β) 10min, γ) 60min και δ) 120min.

Ολοκληρώνοντας, λοιπόν, το 1^ο μέρος της 1^{ης} κατηγορίας πειραμάτων, παρατίθενται οι δισδιάστατες τοπογραφικές απεικονίσεις AFM της μεγάλης ίνας ελαστίνης σε μεγεθύνσεις 2x2μm (**Εικόνα 7.7α**) και οι τρισδιάστατες τοπογραφικές απεικονίσεις 1,2x1,2μm (**Εικόνα 7.7β**) και 1x1,5μm (**Εικόνα 7.7γ**), με επεξεργασία εικόνας από διαφορετικά λογισμικά AFM (IP και WSxM) και απεικόνιση από διαφορετικές γωνίες. Με πολλές λεπτομέρειες επαληθεύονται μέχρι και η συνολική

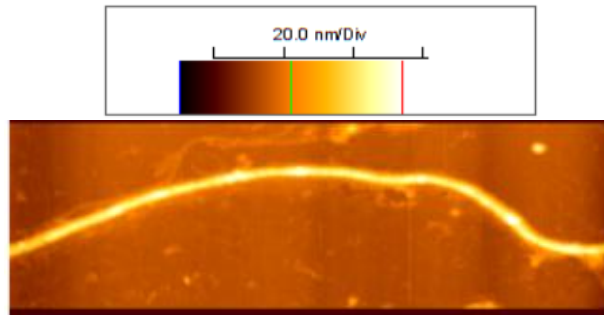
μικρή αύξηση στη διάμετρό της ίνας ελαστίνης, αλλά και η συνολική μείωση στο ύψος της. Είναι εμφανείς και οι αλλαγές στη μορφολογία της επιφάνειας της ίνας ελαστίνης κατά την ακτινοβολία της με υπεριώδη ακτινοβολία σε χρόνους 10min, 60min, 120min, αλλά και η εν μέρει αρχή της καταστροφής της μετά από μια ώρα έκθεσής της στο UV.



Εικόνα 7.7. Τοπογραφικές απεικονίσεις AFM της μεγάλης ίνας ελαστίνης: α) $2 \times 2 \mu\text{m}$ (2D) και β) $1,2 \times 1,2 \mu\text{m}$ (3D), γ) $1 \times 1,5 \mu\text{m}$ (3D) κατά την ακτινοβολία με UV σε χρόνους 0, 10min, 60min, 120min. (λογισμικά επεξεργασίας εικόνας AFM: α) WSxM, β) IP και γ) WSxM).

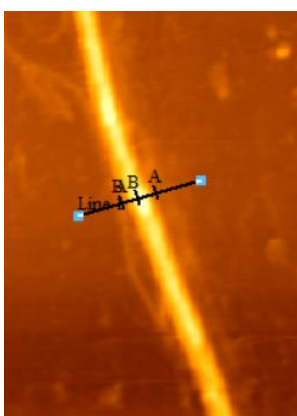
7.2.1.2 Μελέτη της επίδρασης της υπεριώδους ακτινοβολίας σε ινίδιο ελαστίνης

Στο 2^ο μέρος της 1^{ης} κατηγορίας πειραμάτων ερευνήθηκε η επίδραση της UV ακτινοβολίας σε ινίδια ελαστίνης διαφόρων διαστάσεων. Ενδεικτικά παρουσιάζονται τα αποτελέσματα ενός ινιδίου με αρχική μέση τιμή διαμέτρου $288,91 \pm 15,78$ και ύψους $30,37 \pm 1,50$ (Πίνακας 7.5). Το αρχικό βήμα ήταν η απεικόνιση του ινιδίου με το AFM χωρίς ακτινοβολία (Εικόνα 7.8), για να γίνεται σωστή σύγκριση με τα επόμενα δείγματα που θα εκτεθούν σε UV ακτινοβολία.

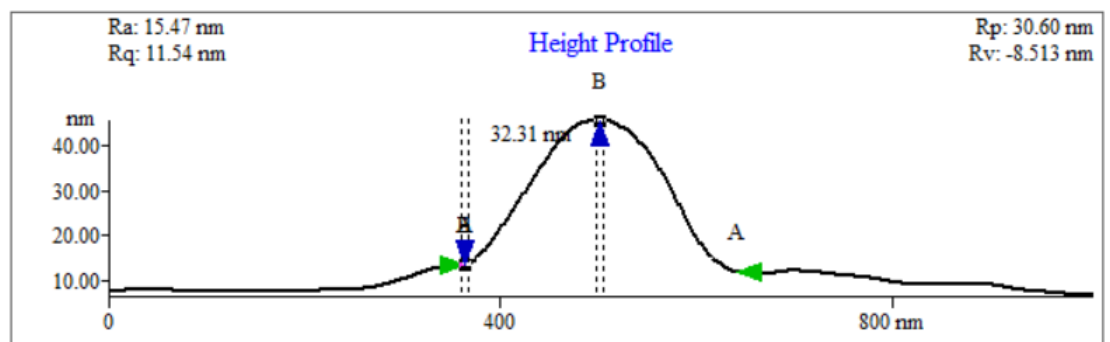


Εικόνα 7.8. Τοπογραφική απεικόνιση AFM ($12 \times 3 \mu\text{m}$) ινιδίου ελαστίνης χωρίς ακτινοβολία.

Στη συνέχεια το ίδιο δείγμα ακτινοβολήθηκε για 10min με υπεριώδες φως μήκους κύματος 254nm και έπειτα απεικονίστηκε με το AFM, για να μελετηθούν οι πιθανές τοπογραφικές αλλαγές στο ινίδιο ελαστίνης. Η ίδια διαδικασία επαναλήφθηκε για συνολικούς χρόνους ακτινοβολίας 1 και 2 ωρών. Ως εκ τούτου, στην **Εικόνα 7.9** παρουσιάζεται η τοπογραφική ($7 \times 4 \mu\text{m}$) απεικόνιση τμήματος του ινιδίου ελαστίνης που μελετάται (**Εικόνα 7.9α**) και ένα ενδεικτικό διάγραμμα προφίλ ύψους συγκεκριμένης διαμέτρου και του αντίστοιχου ύψους της (**Εικόνα 7.9β**), πριν την ακτινοβολία με UV.



(α)



(β)

Εικόνα 7.9. α) Τοπογραφική απεικόνιση AFM ($7 \times 4 \mu\text{m}$) ινιδίου ελαστίνης χωρίς ακτινοβολία (μαύρη γραμμή: ενδεικτική μέτρηση διαστάσεων ινιδίου), **β)** Ενδεικτικό διάγραμμα προφίλ ύψους συγκεκριμένης διαμέτρου και του αντίστοιχου ύψους της.

Οι μέσες τιμές και τυπικές αποκλίσεις των πειραματικών μετρήσεων της διαμέτρου και του ύψους του ινιδίου της ελαστίνης κατά την ακτινοβόληση με UV σε χρόνους 0, 10min, 1h και 2h παρουσιάζονται στον **Πίνακα 7.5**, ενώ οι ποσοστιαίες μεταβολές τους στον **Πίνακα 7.6**.

Πίνακας 7.5. Μέσες τιμές και τυπικές αποκλίσεις διαμέτρων (Δ) και υψών (Y) ινιδίου ελαστίνης κατά την ακτινοβόληση με UV.

	no UV		10min		1h		2h	
	Δ (nm)	Y (nm)	Δ (nm)	Y (nm)	Δ (nm)	Y (nm)	Δ (nm)	Y (nm)
Μέση τιμή	288,91	30,37	267,74	29,45	285,19	28,31	319,12	27,63
Τυπική απόκλιση	15,78	1,50	16,21	1,52	13,64	1,49	14,31	1,53

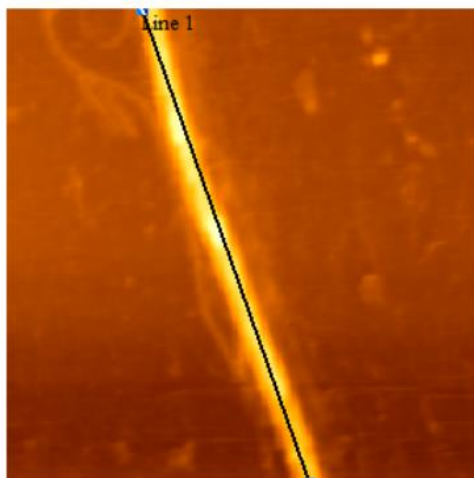
Πίνακας 7.6. Ποσοστιαίες μεταβολές διαμέτρων και υψών ινιδίου ελαστίνης κατά την ακτινοβόληση με UV

Χρόνοι ακτινοβόλησης UV	Ποσοστιαίες μεταβολές	
	Διαμέτρου	Ύψους
0-10min	-7,30%	-3,03%
10min-1h	6,52%	-3,87%
1h-2h	11,90%	-2,44%
ΣΥΝΟΛΙΚΑ:		
0-2h	10,46%	-9,05%

Παρατηρήθηκε από τα πειραματικά δεδομένα μια μείωση της διαμέτρου του ινιδίου κατά 7,3% στα πρώτα 10min, στα επόμενα 50min μια αύξηση 6,5% και στην τελευταία 1 ώρα υπήρξε άνοδος του ποσοστού κατά 11,9%. Συνολικά, δηλαδή για χρόνο ακτινοβόλησης 2h με UV ακτινοβολία διαπιστώθηκε μια αύξηση στη διάμετρο κατά 10,5%. Όσο αφορά το ύψος του ινιδίου ελαστίνης είχε συνεχή μείωση περίπου κατά 3% σε κάθε κύκλο ακτινοβόλησης των 10min, 50min και 60min, με το ολικό ποσοστό ελάττωσης του να είναι 9,1%. Επομένως, η υπερϊώδης ακτινοβολία επηρέασε τόσο τη διάμετρο του ινιδίου ελαστίνης, όσο και το ύψος του.

Επιπροσθέτως, μελετήθηκαν ενδελεχώς και οι τοπογραφικές απεικονίσεις από το AFM για να ελεγχθεί η ορθότητα των μετρήσεων. Αξίζει, λοιπόν, να αναφερθεί ότι μετά από κάθε ακτινοβόληση με UV, άλλαζε και το μήκος του ινιδίου. Επομένως, με κατάλληλες μετρήσεις για τους διαφορετικούς χρόνους ακτινοβόλησης των 0, 10min, 1h και 2h επαληθεύτηκε η κατά μήκος συρρίκνωση του. Στην **Εικόνα 7.10** απεικονίζεται τοπογραφικά με AFM, το ινίδιο ελαστίνης σε εικόνα μεγέθυνσης $7 \times 7 \mu\text{m}$, πριν την ακτινοβόληση με UV, όπου επισημαίνεται και η μέτρηση του μήκους του

(*Line 1*). Στον **Πίνακα 7.7**, καταγράφονται οι αντίστοιχες μετρήσεις του, αλλά και οι ποσοστιαίες μεταβολές του.



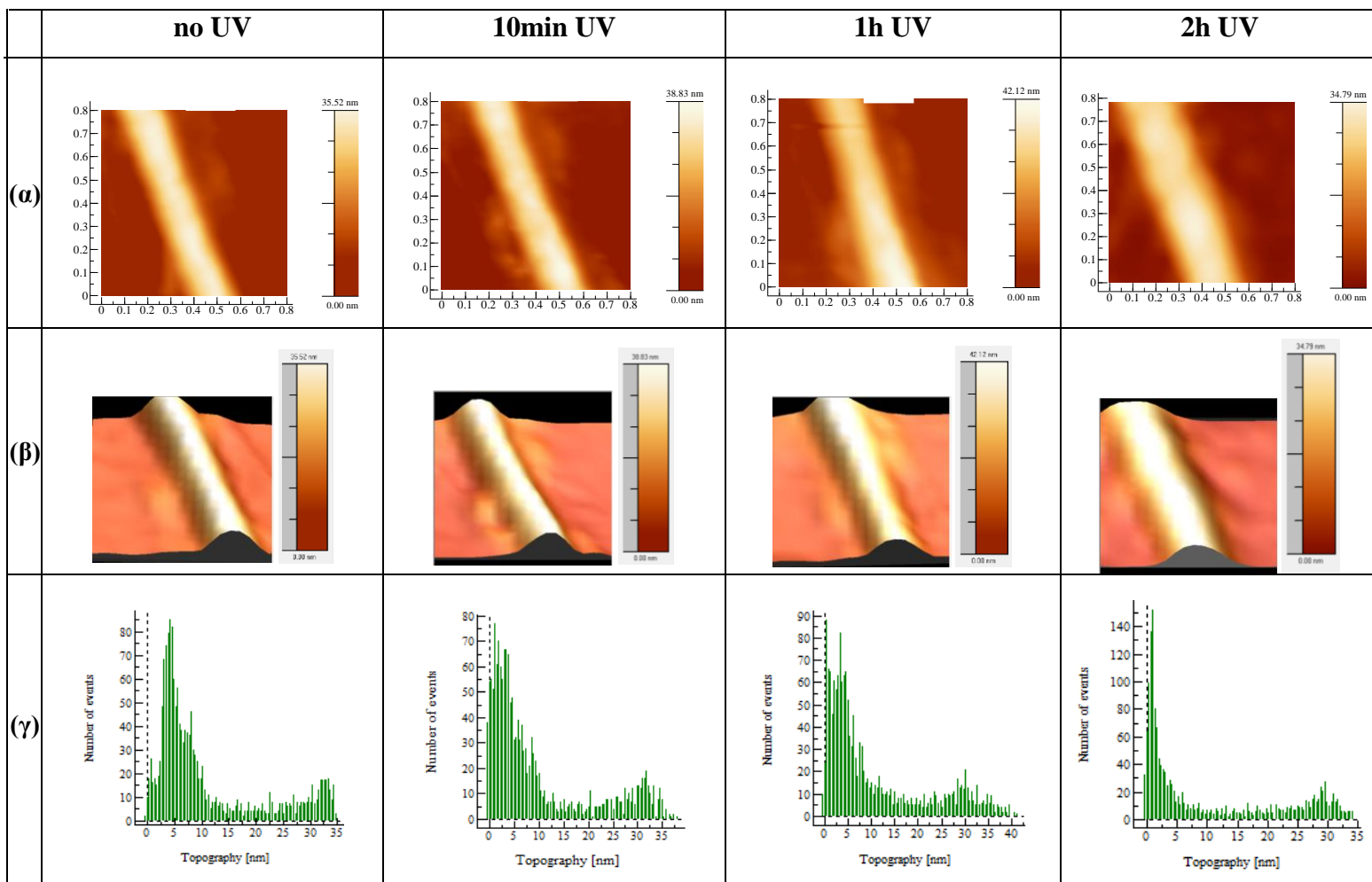
Εικόνα 7.10. Τοπογραφική απεικόνιση AFM ($7 \times 7 \mu\text{m}$) ινιδίου ελαστίνης χωρίς ακτινοβολήση, όπου επισημαίνεται το μήκος του (*Line 1*)

Πίνακα 7.7. Μετρήσεις μηκών ινιδίου και οι ποσοστιαίες μεταβολές τους κατά τη διάρκεια της ακτινοβόλησης με UV

	0	0-10min	10min	10min-1h	1h	1h-2h	2h
Μήκος ινιδίου	7793		7589		7313		6352
Ποσοστιαία μεταβολή		-2,61%		-3,64 %		-13,14%	
ΣΥΝΟΛΙΚΑ (0-2h)	-18,49%						

Παρατηρώντας τον **Πίνακα 7.7** διαπιστώνεται η συνεχόμενη ελάττωση του μήκους του ινιδίου ελαστίνης μετά από κάθε κύκλο ακτινοβόλησης με UV. Τα πρώτα 10min, αλλά και τα αμέσως επόμενα 50min υπήρξε μείωση της τάξης του 3% με 4% αντίστοιχα. Από την 1h έως την 2h συνεχόμενης ακτινοβόλησης παρατηρήθηκε το μεγαλύτερο ποσοστό μείωσης του μήκους του περίπου κατά 13%. Σημαντική είναι και η συνολική μείωση του μήκους του ινιδίου ελαστίνης κατά 18,5%.

Ολοκληρώνοντας, το 2^ο μέρος της 1^{ης} κατηγορίας πειραμάτων, παρατίθενται οι τοπογραφικές 2D και 3D απεικονίσεις AFM του ινιδίου ελαστίνης και τα αντίστοιχα διαγράμματα τραχύτητας της επιφάνειας του (**Εικόνας 7.11**) πριν και μετά τις ακτινοβολήσεις με UV. Η μεγάλη διαπλάτνση της διαμέτρου και η αλλαγή στη τραχύτητα της επιφάνειας του δείγματος κάνουν εμφανή την αλλοίωση του ινιδίου ελαστίνης μετά από 2 ώρες ακτινοβόληση με υπεριώδη ακτινοβολία.

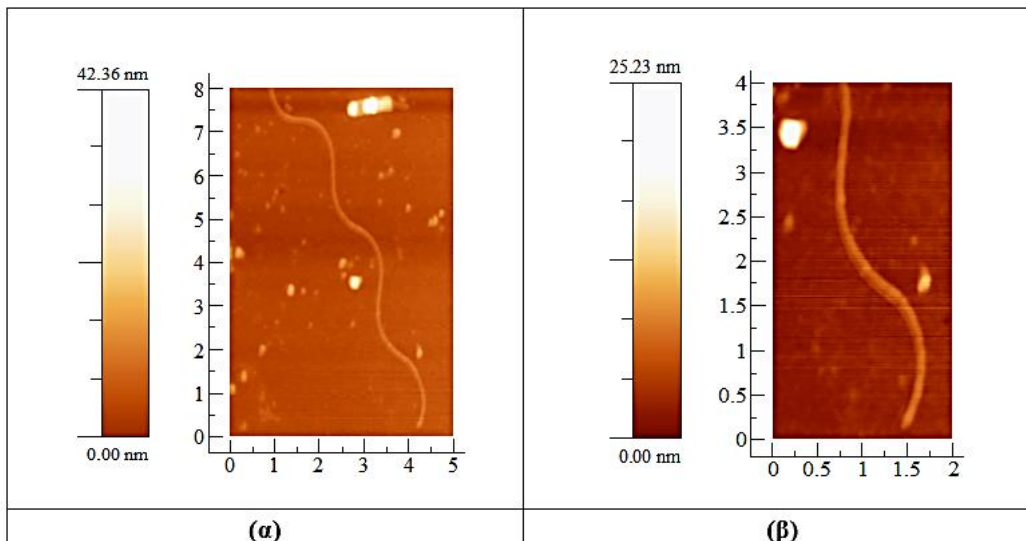


Εικόνα 7.11. Τοπογραφικές απεικονίσεις AFM ινιδίου ελαστίνης: **α)** 800×800nm (2D), **β)** 600x600nm (3D) και **γ)** Διαγράμματα τραχύτητας της επιφάνειας του ινιδίου, κατά τη διάρκεια της UV ακτινοβολήσης σε χρόνους 0, 10 min, 60min και 120min).

Συμπερασματικά, η διάμετρος, το ύψος και το μήκος του ινιδίου ελαστίνης επηρεάζονται σημαντικά από την έκθεση του σε υπεριώδη ακτινοβολία. Συγκεκριμένα, οι συνολικές ποσοστιαίες μεταβολές τους στο χρονικό διάστημα των 2 ωρών που διήρκεσε η UV ακτινοβολήση είναι +10,5%, -9% και -18,5% αντίστοιχα.

7.2.1.3 Μελέτη της επίδρασης της υπεριώδους ακτινοβολίας σε νανοϊνίδιο ελαστίνης

Στο 3^ο μέρος της 1^{ης} κατηγορίας πειραμάτων μελετήθηκε η επίδραση της UV ακτινοβολίας σε νανοϊνίδια ελαστίνης. Ενδεικτικά παρουσιάζονται τα αποτελέσματα ενός νανοϊνιδίου με αρχική μέση τιμή διαμέτρου 151,67±4,64nm και ύψους 4,17±0,51nm (**Πίνακας 7.8**). Το αρχικό βήμα ήταν η απεικόνιση του νανοϊνιδίου με το AFM χωρίς ακτινοβολήση (**Εικόνα 7.12**), για να γίνεται σωστή σύγκριση με τα επόμενα δείγματα που θα εκτεθούν σε UV ακτινοβολία.



Εικόνα 7.12. Τοπογραφικές 2D απεικονίσεις AFM νανοϊνιδίου ελαστίνης χωρίς ακτινοβολήση με μεγέθυνση: α) 8×5μm και β) 4×2μm.

Έπειτα, το ίδιο δείγμα ακτινοβολήθηκε για 10min με υπεριώδες φως μήκους κύματος 254nm και μετά απεικονίστηκε με το AFM τόσο σε 2D όσο και σε 3D τοπογραφικές εικόνες. Η ίδια ακριβώς διαδικασία επαναλήφθηκε άλλες 2 φορές, έτσι ώστε να μελετηθούν οι πιθανές δομικές αλλαγές στο νανοϊνίδιο για συνολικούς χρόνους ακτινοβολήσης 60 και 120 λεπτών. Οι μέσες τιμές και τυπικές αποκλίσεις των πειραματικών μετρήσεων της διαμέτρου και του ύψους του νανοϊνιδίου ελαστίνης παρουσιάζονται στον **Πίνακα 7.8**, ενώ οι ποσοστιαίες μεταβολές τους στον **Πίνακα 7.9**.

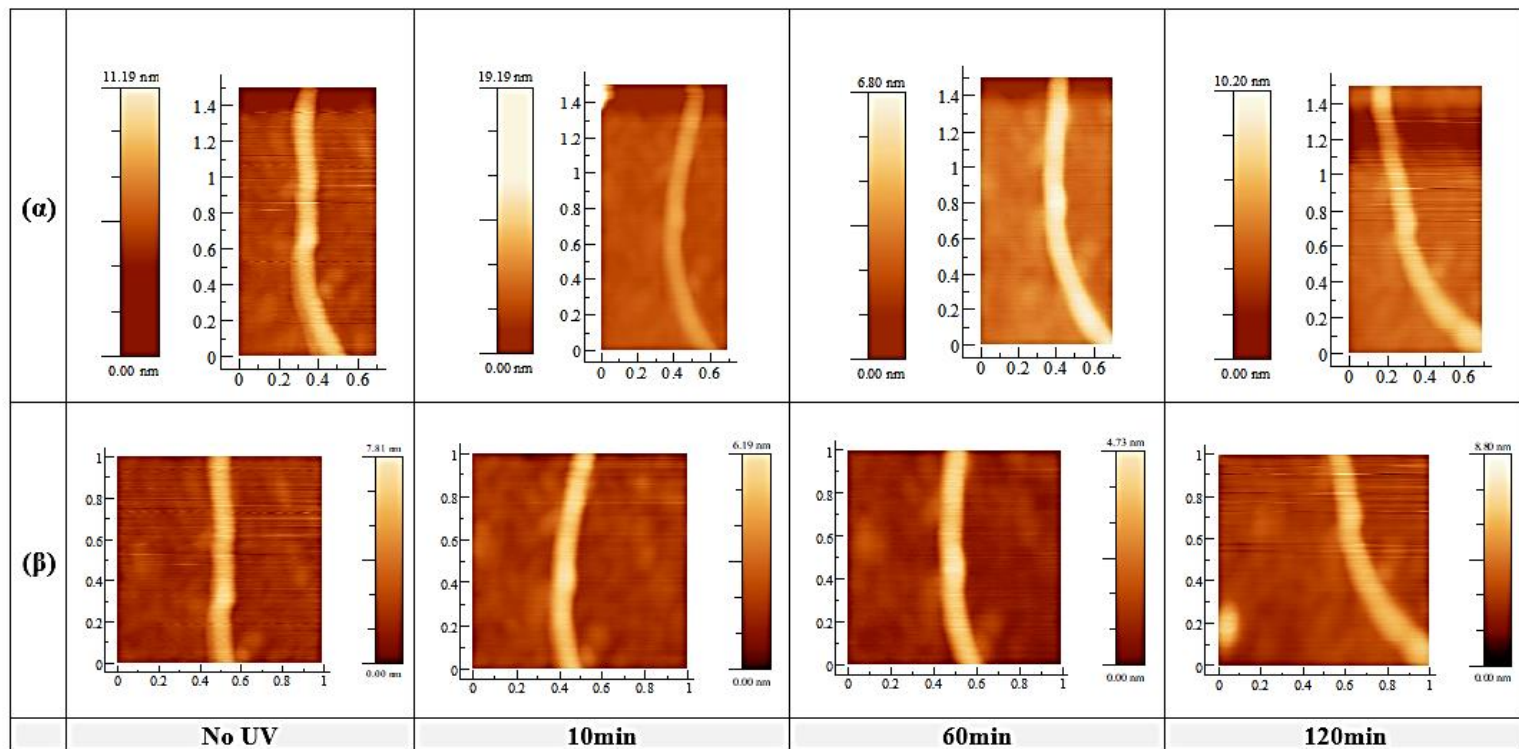
Πίνακας 7.8. Μέσες τιμές και τυπικές αποκλίσεις διαμέτρων (Δ) και υψών (Y) νανοϊνιδίου ελαστίνης κατά την ακτινοβολήση με UV.

	no UV		10min UV		60 min UV		120 min UV	
	Δ (nm)	Y (nm)	Δ (nm)	Y (nm)	Δ (nm)	Y (nm)	Δ (nm)	Y (nm)
Μέση τιμή	151,67	4,17	149,20	3,37	157,06	3,25	173,33	3,20
Τυπική απόκλιση	4,64	0,51	4,92	0,50	6,01	0,19	9,65	0,26

Πίνακας 7.9. Ποσοστιαίες μεταβολές διαμέτρων και υψών νανοϊνιδίου ελαστίνης κατά την UV ακτινοβολήση.

Χρόνοι ακτινοβολήσης UV	Ποσοστιαίες μεταβολές	
	Διαμέτρου	Ύψους
0-10min	-1,63%	-19,20%
10-60min	5,27%	-3,34%
60-120min	10,36%	-1,51%
ΣΥΝΟΛΙΚΑ (0-2h):	14,29%	-23,08%

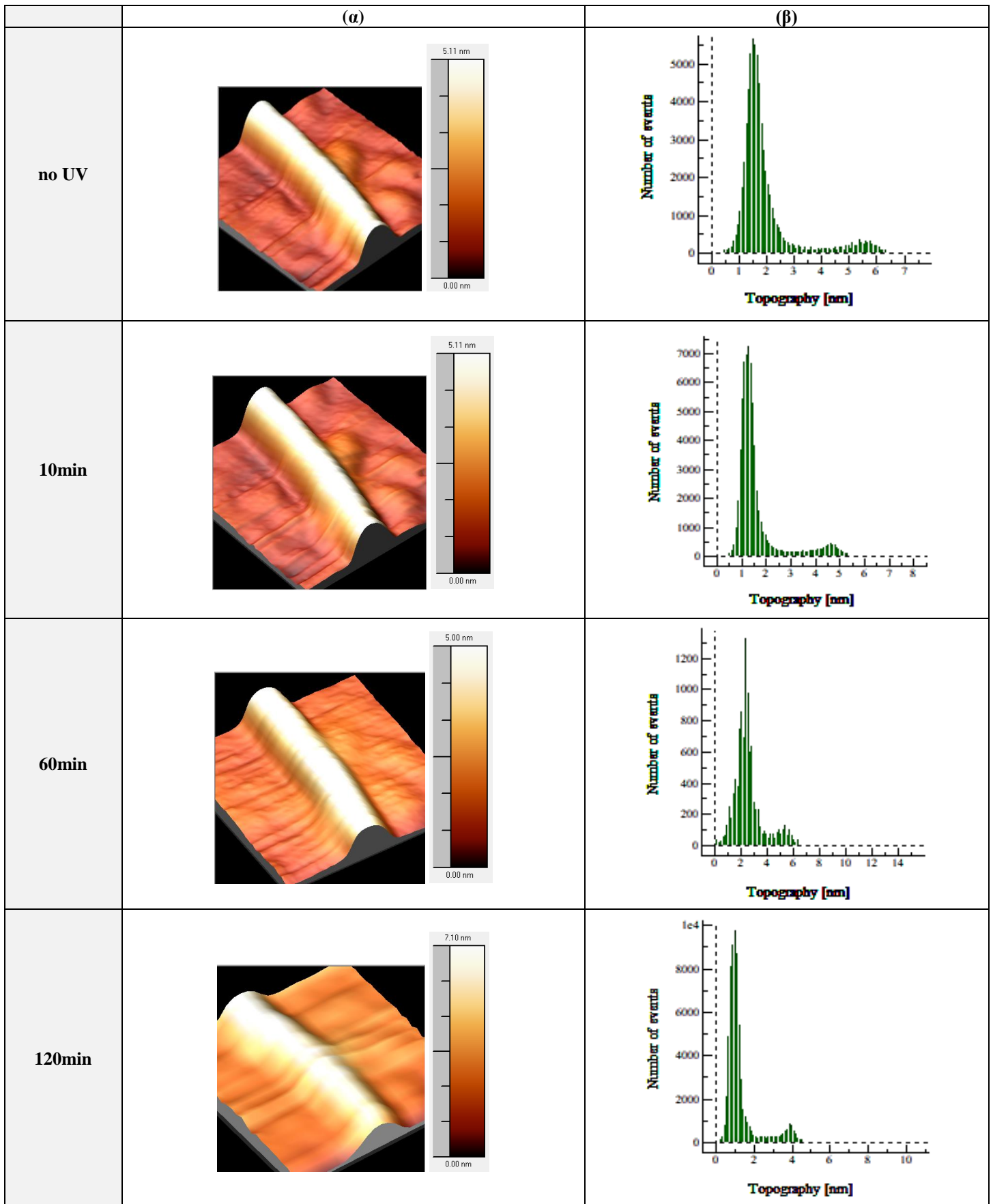
Επιπροσθέτως, μελετήθηκαν οι τοπογραφικές εικόνες από το AFM, για να ελεγχθεί η ορθότητα των μετρήσεων. Στην **Εικόνα 7.13** απεικονίζεται το νανοϊνίδιο ελαστίνης σε χρόνους ακτινοβολήσης 0, 10min, 60min και 120min και σε μεγεθύνσεις 1,5x0,7 μ m (**Εικόνα 7.13.α**) και 1x1 μ m (**Εικόνα 7.13.β**).



Εικόνα 7.13. Τοπογραφικές 2D απεικονίσεις AFM νανοϊνιδίου ελαστίνης: α) 1,5x0,7 μ m και β) 1x1 μ m. (από αριστερά προς τα δεξιά: χωρίς ακτινοβολήση, μετά από 10 min, 60min και 120min έκθεσης σε UV ακτινοβολία).

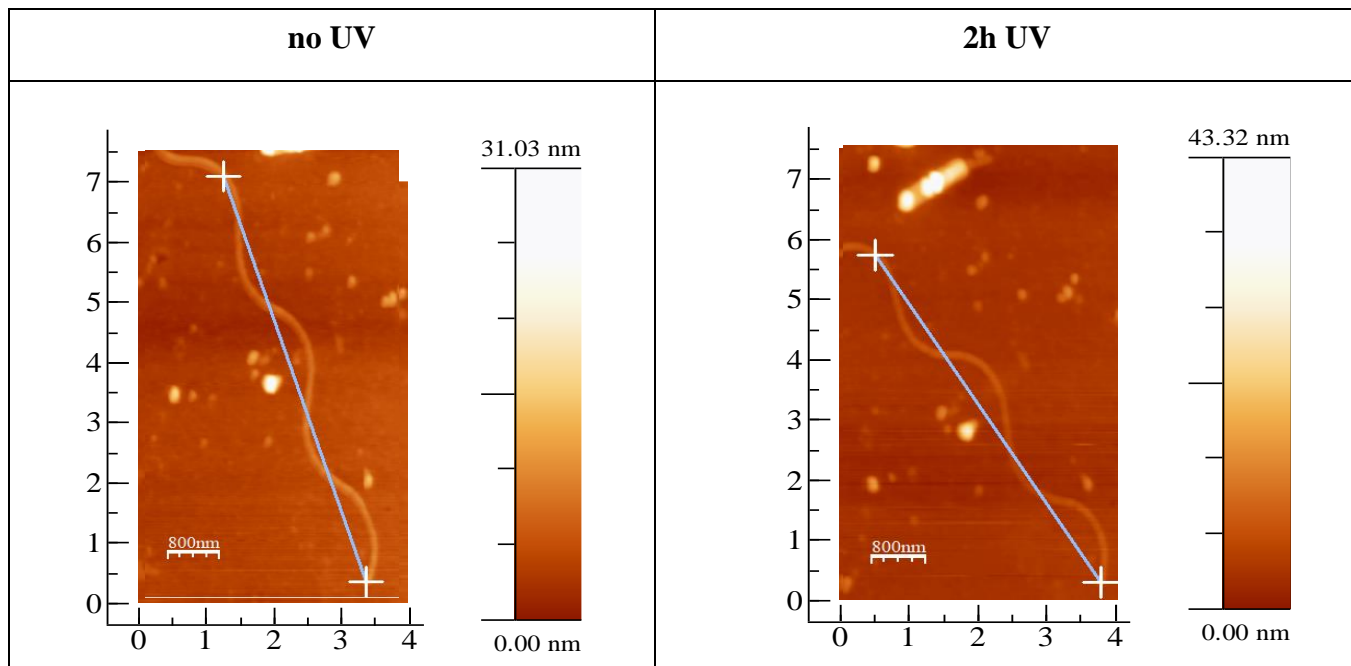
Παρατηρήθηκε από τα πειραματικά δεδομένα μια απειροελάχιστη μείωση της διαμέτρου του νανοϊνιδίου κατά 2,5nm στα πρώτα 10min, στα αμέσως επόμενα 50min μια μικρή αύξηση περίπου 5% και στην τελευταία 1 ώρα υπήρξε άνοδος του ποσοστού κατά 10,4%. Συνολικά, δηλαδή για χρόνο ακτινοβολήσης 2h με UV ακτινοβολία διαπιστώθηκε μια αύξηση στη διάμετρο κατά 14,3%. Όσο αφορά το ύψος του νανοϊνιδίου ελαστίνης είχε μεγάλη μείωση κατά 19,2% από 0 έως 10min, αλλά και για τους άλλους χρόνους ακτινοβολήσης των 60min και 120min, οι ποσοστιαίες μεταβολές ήταν αρνητικές και ίσες με 3,3% και 1,5% αντίστοιχα. Επομένως, η υπερϊώδης ακτινοβολία επηρέασε αρκετά τη διάμετρο του νανοϊνιδίου ελαστίνης, αλλά πολύ περισσότερο το ύψος του.

Τα αποτελέσματα των πειραματικών μετρήσεων επαληθεύτηκαν, καθώς με προσεχτική παρατήρηση των 3D τοπογραφικών απεικονίσεων (**Εικόνα 7.14.α**) και των διαγραμμάτων τραχύτητας επιφάνειας (**Εικόνα 7.14.β**), φαίνονται οι σημαντικές δομικές αλλαγές στη διάμετρο και στο ύψος του νανοϊνιδίου ελαστίνης. Παρατηρείται με ευκρίνεια η διαπλάτωση της διαμέτρου και η ελάττωση του ύψους του. Η αλλοίωση του νανοϊνιδίου, αλλά και γενικά της επιφάνειας του δείγματος είναι εμφανείς μετά από 2 ώρες έκθεση σε UV ακτινοβολία.



Εικόνα 7.14. α) Τοπογραφικές 3D απεικονίσεις AFM νανοϊνιδίου ελαστίνης: 500×500nm, β) Διαγράμματα τραχύτητας επιφάνειας κατά τη διάρκεια της ακτινοβολήσης σε χρόνους έκθεσης UV: 0, 10, 60 και 120min.

Στη συνέχεια, αξίζει να αναφερθεί ότι μετά από παρατήρηση πολλών απεικονίσεων από κάθε κύκλο ακτινοβολήση με UV, άλλαζε και το μήκος του νανοϊνιδίου ελαστίνης. Με κατάλληλες μετρήσεις για τους διαφορετικούς χρόνους ακτινοβολήσης των 0, 10min, 1h και 2h επαληθεύτηκε η κατά μήκος συρρίκνωσή του, όπως έγινε με την ίνα και το ινίδιο. Στην **Εικόνα 7.15** απεικονίζεται τοπογραφικά με AFM, το νανοϊνίδιο ελαστίνης σε εικόνα μεγέθυνσης $7,5 \times 4 \mu\text{m}$, πριν την ακτινοβολήση με UV και μετά από 2 ώρες, όπου επισημαίνεται η μέτρηση του μήκους του (**μπλε γραμμή**). Στον **Πίνακα 7.10**, καταγράφονται οι αντίστοιχες μετρήσεις του, αλλά και οι ποσοστιαίες μεταβολές του.



Εικόνα 7.15. Τοπογραφική απεικόνιση AFM ($7,5 \times 4 \mu\text{m}$) νανοϊνιδίου ελαστίνης χωρίς ακτινοβολήση (αριστερά) και μετά από 2h με UV (δεξιά), όπου επισημαίνεται η αλλαγή στο μήκος του (**μπλε γραμμή**).

Πίνακα 7.10. Μετρήσεις μηκών νανοϊνιδίου ελαστίνης και οι ποσοστιαίες μεταβολές τους κατά τη διάρκεια της ακτινοβολήσης με UV.

	0	0-10min	10min	10min-1h	1h	1h-2h	2h
Μήκος νανοϊνιδίου	7177		7048		6873		6214
Ποσοστιαία μεταβολή		-1,80%		-2,48%		-9,59%	
ΣΥΝΟΛΙΚΑ (0-5h)		-13,42%					

Παρατηρώντας τον **Πίνακα 7.10** διαπιστώνεται η συνεχόμενη ελάττωση του μήκους του νανοϊνιδίου ελαστίνης μετά από κάθε κύκλο ακτινοβολήσης με UV. Τα πρώτα 10min, αλλά και τα αμέσως επόμενα 50min υπήρξε μείωση της τάξης του 2% και 2,5% αντίστοιχα. Από την 1h έως την 2h συνεχόμενης ακτινοβολήσης

παρατηρήθηκε ένα αξιοσημείωτο ποσοστό μείωσης του μήκους του κατά 9,6%. Σημαντική είναι, λοιπόν, η συνολική μείωση του μήκος του νανοϊνιδίου κατά 963nm.

Συμπερασματικά, στο 3^ο μέρος της 1^{ης} κατηγορίας πειραμάτων, ερευνήθηκε ότι η διάμετρος, το ύψος και το μήκος του νανοϊνιδίου ελαστίνης επηρεάζονται σημαντικά από την έκθεση του σε υπεριώδη ακτινοβολία. Συγκεκριμένα, οι συνολικές ποσοστιαίες μεταβολές τους στο χρονικό διάστημα των 2 ωρών που διήρκεσε η UV ακτινοβολία είναι 14,3%, -23,1% και -13,4% αντίστοιχα.

7.2.1.4 Σύνοψη αποτελεσμάτων της επίδρασης της υπεριώδους ακτινοβολίας στην ελαστίνη ανάλογα με το μέγεθος της

Ολοκληρώνοντας την 1^η κατηγορία πειραμάτων, διαπιστώθηκε η σημαντική επίδραση της UV ακτινοβολίας στα μορφολογικά χαρακτηριστικά των ίνων, ινιδίων και νανοϊνιδίων για χρόνους ακτινοβολίας 10 min, 1h και 2h. Συγκεντρωτικά παρατίθενται παρακάτω όλα τα πειραματικά αποτελέσματα, όπου στον **Πίνακα 7.11α** παρουσιάζονται συνολικά οι ποσοστιαίες μεταβολές των διαμέτρων, υψών και μηκών των ίνων, ινιδίων και νανοϊνιδίων. Ενώ, στον **Πίνακα 7.11β** φαίνονται οι συνολικές μετρήσεις των αντίστοιχων μέσων τιμών τους. Επίσης, απεικονίζονται σε κατάλληλα διαγράμματα οι μεταβολές των δομικών χαρακτηριστικών τους σε συνάρτηση με τον χρόνο έκθεσης στην υπεριώδη ακτινοβολία (**Εικόνα 7.16**). Διαπιστώνεται, λοιπόν, η διαπλάτυνση της διαμέτρου, η ελάττωση του ύψους και η συρρίκνωση του μήκους, όσο αυξάνεται ο χρόνος έκθεσης σε UV ακτινοβολία, είτε έχει διαστάσεις ίνας, ινιδίου ή νανοϊνιδίου.

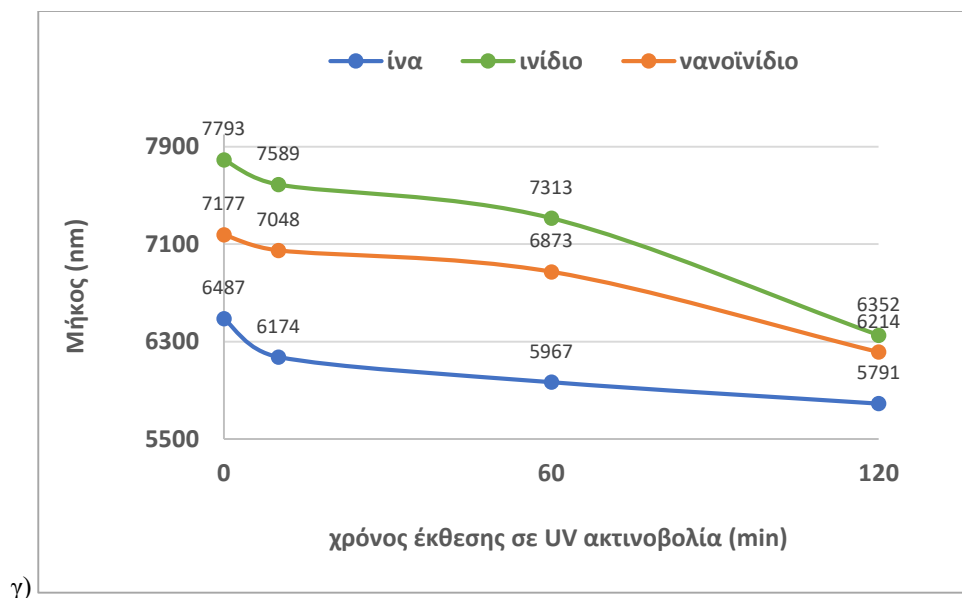
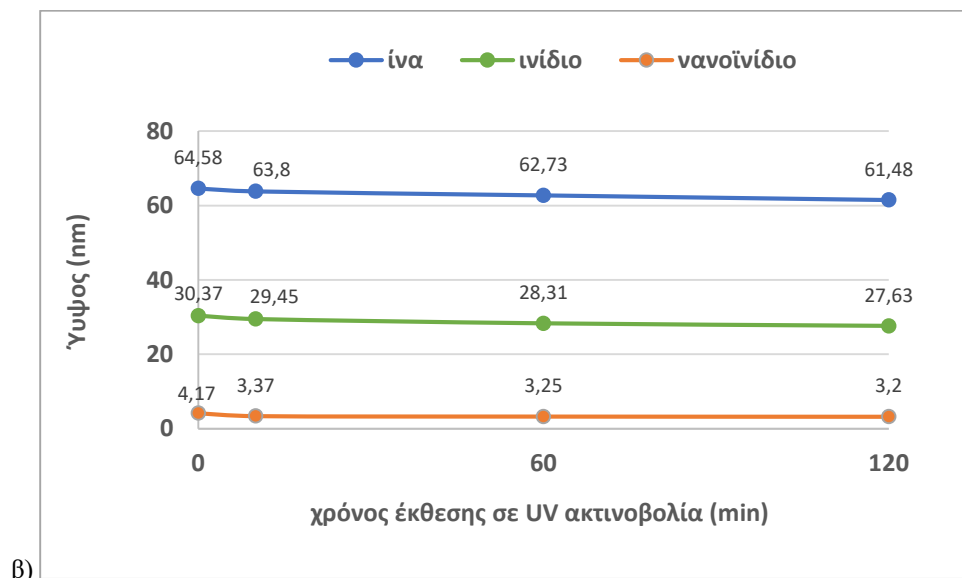
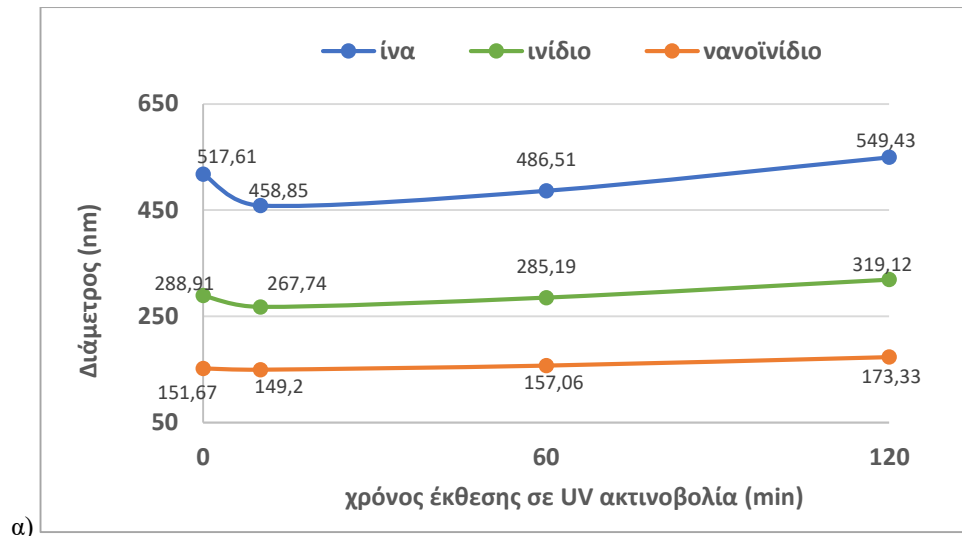
Πίνακας 7.11. Συνολικά αποτελέσματα.

(α) Συνολικές ποσοστιαίες μεταβολές διαμέτρων (Δ), υψών (Υ), μηκών (Μ) ίνας/ινιδίου/νανοϊνιδίου ελαστίνης κατά την UV ακτινοβολία.

%	ίνα			ινίδιο			Νανοϊνίδιο		
	Δ	Υ	Μ	Δ	Υ	Μ	Δ	Υ	Μ
0-10min	-11,35	-1,21	-4,83	-7,30	-3,03	-2,61	-1,63	-19,20	-1,80
10-60min	6,03	-1,68	-3,35	6,52	-3,87	-3,64	5,27	-3,34	-2,48
60-120min	12,93	-1,99	-2,95	11,90	-2,44	-13,14	10,36	-1,51	-9,59
(ΣΥΝΟΛΙΚΑ) 0-2h	6,15	-4,80	-10,73	10,46	-9,05	-18,49	14,29	-23,08	-13,42

(β) Συνολικές μετρήσεις διαμέτρων, υψών, μηκών ίνας/ινιδίου/νανοϊνιδίου ελαστίνης κατά την UV ακτινοβολία.

χρόνος	Διάμετρος (nm)			Ύψος (nm)			Μήκος (nm)		
	ίνα	ινίδιο	νανοϊνίδιο	ίνα	ινίδιο	νανοϊνίδιο	ίνα	ινίδιο	νανοϊνίδιο
0	517,61	288	151,67	64,58	30,37	4,17	6487	7793	7177
10	458,85	267,74	149,2	63,8	29,45	3,37	6174	7589	7048
60	486,51	285,19	157,06	62,73	28,31	3,25	5967	7313	6873
120	549,43	319,12	173,33	61,48	27,63	3,2	5791	6352	6214



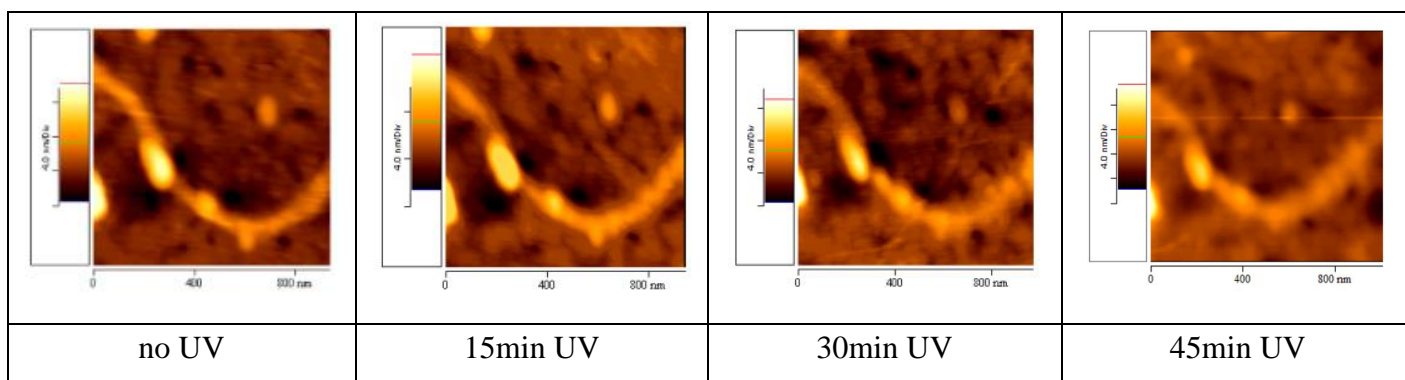
Εικόνα 7.16. Διαγράμματα: α) Διαμέτρου, β) Ύψους, γ) Μήκους σε συνάρτηση με τους χρόνους έκθεσης σε UV ακτινοβολία για ίνα/ινίδιο/νανοϊνίδιο.

7.2.2 Μελέτη της επίδρασης υπεριώδους ακτινοβολίας στα νανοϊνίδια ελαστίνης ανάλογα με τον χρόνο ακτινοβολήσης.

Στη συνέχεια έχουμε την 2^η κατηγορία πειραμάτων, όπου μελετήθηκαν νανοϊνίδια ελαστίνης υπό την επίδραση υπεριώδους ακτινοβολίας με διαφορετικούς χρόνους ακτινοβολήσης. Το πρωτόκολλο που εκτελέστηκε ήταν ακριβώς το ίδιο που παρουσιάστηκε και στην 1^η κατηγορία πειραμάτων. Αρχικά, ήταν η απεικόνιση του νανοϊνιδίου με το AFM χωρίς ακτινοβολία και στη συνέχεια μετά από κάθε κύκλο UV ακτινοβολήσης γινόταν απεικόνιση του ίδιου νανοϊνιδίου ελαστίνης για να είναι έγκυρη η σύγκριση των δομικών και τοπογραφικών χαρακτηριστικών του.

7.2.2.1 Μελέτη της επίδρασης υπεριώδους ακτινοβολίας στα νανοϊνίδια ελαστίνης σε μικρούς χρόνους ακτινοβολήσης.

Στο 1^ο μέρος της 2^{ης} κατηγορίας πειραμάτων, μελετήθηκαν νανοϊνίδια ελαστίνης υπό την επίδραση UV ακτινοβολίας με μικρή χρονική διάρκεια. Συγκεκριμένα, ο κάθε κύκλος ακτινοβολήσης ήταν 15 λεπτά και συνολικά υπήρξαν 3 κύκλοι. Ενδεικτικά, παρουσιάζεται ένα νανοϊνίδιο ελαστίνης διαμέτρου $142,93 \pm 4,70 \text{ nm}$ και ύψους $4,58 \pm 0,61 \text{ nm}$ (Εικόνα 7.17). Οι ποσοστιαίες μεταβολές των μέσων τιμών διαμέτρων και υψών του παρουσιάζονται στον Πίνακα 7.12.

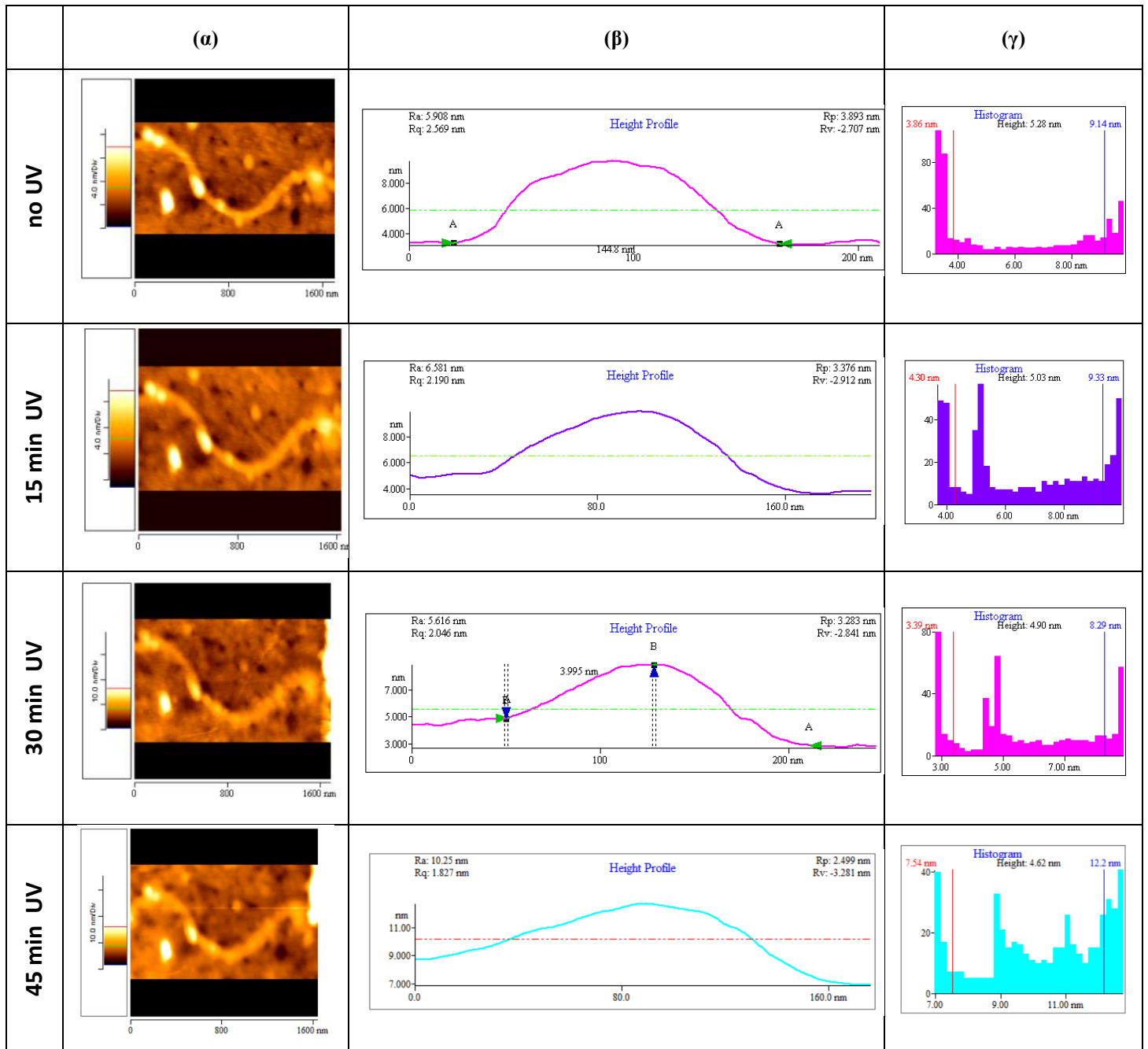


Εικόνα 7.17. Τοπογραφική απεικόνιση AFM ($1 \times 1 \mu\text{m}$) νανοϊνιδίου ελαστίνης κατά την έκθεση σε UV σε χρόνους ακτινοβολήσης 0, 15min, 30min και 45min .

Πίνακας 7.12. Ποσοστιαίες μεταβολές μέσω τιμών διαμέτρων και υψών νανοϊνιδίου ελαστίνης

Ποσοστιαίες μεταβολές	Διάμετρος	Ύψος
0-15min	1,50%	-16,06%
15-30min	2,53%	-2,40%
30-45 min	2,78%	-1,85%
Συνολικά (0-45min)	6,95%	-19,8%

Παρατηρείται από τις πειραματικές μετρήσεις, η συνεχής αύξηση της διαμέτρου σε κάθε κύκλο ακτινοβολήσης των 15 λεπτών, με συνολικό ανοδικό ποσοστό περίπου 7%. Αντίθετα, για τη μεταβολή του ύψους έχουμε μεγάλη μείωση κατά 16% τα πρώτα 15 min και στη συνέχεια ελάττωση, αλλά με μικρότερα ποσοστά. Συνολικά το ύψος μειώθηκε περίπου κατά 20%. Αξίζει να σημειωθεί ότι οι μεταβολές τόσο της διαμέτρου όσο και του ύψους τεκμηριώνονται και με τα διαγράμματα προφίλ ύψους και τα αντίστοιχα ιστογράμματα τους που παρουσιάζονται στην **Εικόνα 7.18**. Στην οποία είναι εμφανής και η αρχή της αλλοίωσης του νανοϊνιδίου, αλλά και της γενικότερης επιφάνειας του δείγματος, κατά την έκθεση του με τη UV ακτινοβολία.



Εικόνα 7.18. α) Τοπογραφική απεικόνιση AFM (1×1,6μm) νανοϊνιδίου ελαστίνης, β) διάγραμμα προφίλ ύψους και γ) το αντίστοιχο ιστόγραμμα.

7.2.2.2 Μελέτη της επίδρασης υπεριώδους ακτινοβολίας στα νανοϊνίδια ελαστίνης σε μεσαίους χρόνους ακτινοβόλησης.

Στο 2^ο μέρος της 2^{ης} κατηγορίας πειραμάτων, μελετήθηκε η επίδραση της UV ακτινοβολίας με μεσαία χρονική διάρκεια σε νανοϊνίδια. Το συγκεκριμένο μέρος του πειράματος έχει ήδη αναφερθεί στην **παράγραφο 7.3.1.3** με νανοϊνίδιο διαμέτρου $151,67 \pm 4,64 \text{ nm}$ και ύψους $4,17 \pm 0,51 \text{ nm}$ να ακτινοβολείται για χρόνους 10min, 50min και 60 min. Ως εκ τούτου, οι μέσες τιμές και τυπικές αποκλίσεις των πειραματικών μετρήσεων της διαμέτρου και του ύψους του νανοϊνιδίου ελαστίνης έχουν παρουσιαστεί στον **Πίνακα 7.8** και οι ποσοστιαίες μεταβολές τους στον **Πίνακα 7.9**.

7.2.2.3 Μελέτη της επίδρασης υπεριώδους ακτινοβολίας στα νανοϊνίδια ελαστίνης σε μεγάλους χρόνους ακτινοβόλησης.

Στο 3^ο μέρος της 2^{ης} κατηγορίας πειραμάτων, ερευνήθηκε πως επιδρούν οι μεγάλοι χρόνοι έκθεσης της UV ακτινοβολίας στα νανοϊνίδια ελαστίνης. Ενδεικτικά, παρουσιάζεται ένα νανοϊνίδιο διαμέτρου $118,20 \pm 5,02 \text{ nm}$ και ύψους $5,47 \pm 0,49 \text{ nm}$ (**νανοϊνίδιο Α**), όπου ακτινοβολήθηκε διακοπτόμενα για 1h σε 3 κύκλους ακτινοβόλησης και ένα άλλο με διάμετρο $115,13 \pm 4,86 \text{ nm}$ και ύψος $4,71 \pm 0,37 \text{ nm}$ (**νανοϊνίδιο Β**), όπου ακτινοβολήθηκε συνεχόμενα για 4h. Οι ποσοστιαίες μεταβολές διαμέτρων και υψών των νανοϊνιδίων (Α,Β) ελαστίνης παρουσιάζονται στον **Πίνακα 7.13**.

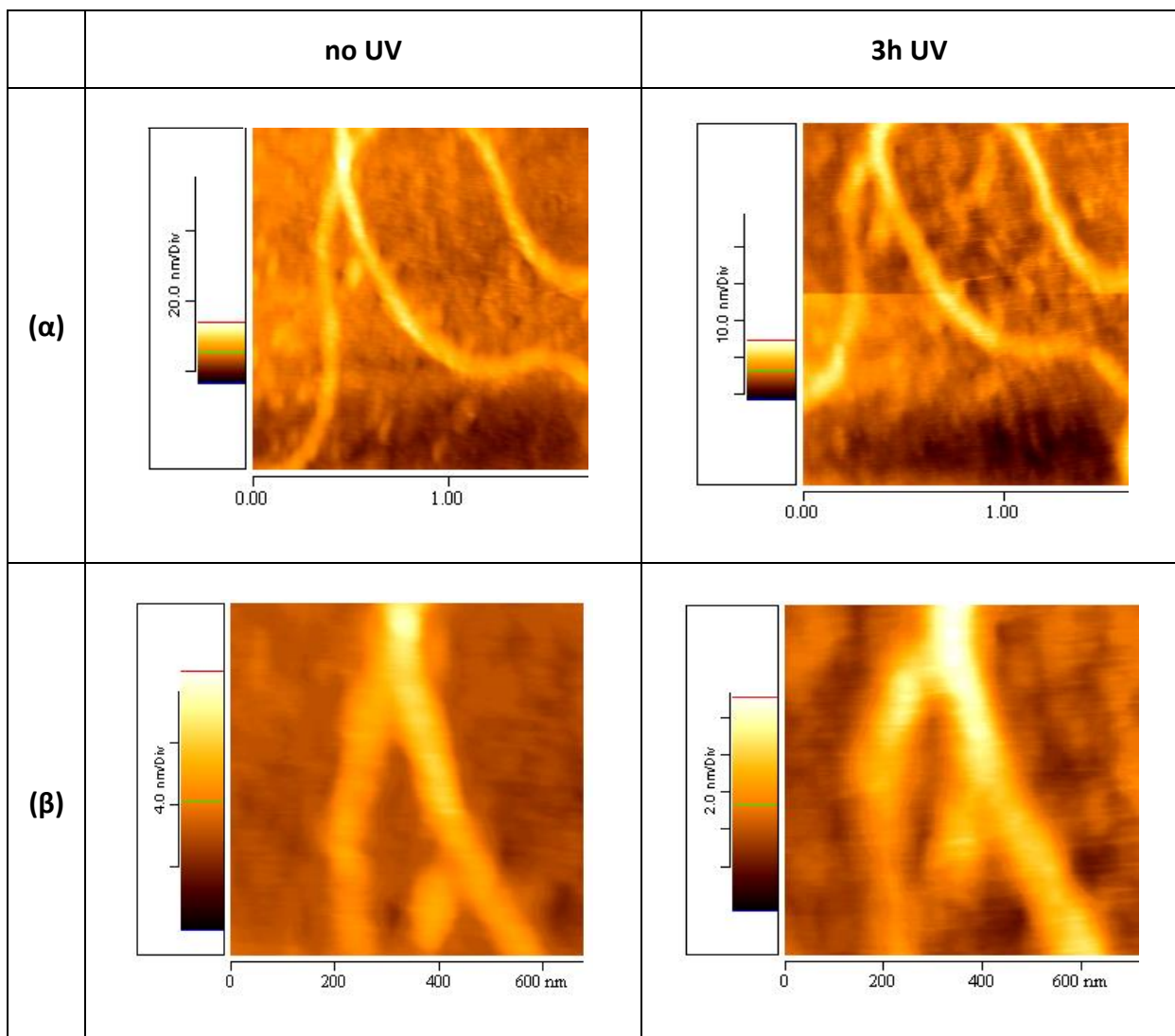
Πίνακας 7.13. Ποσοστιαίες μεταβολές διαμέτρων και υψών των νανοϊνιδίων (Α,Β) ελαστίνης.

	Χρόνοι ακτινοβόλησης	Διάμετρος	Ύψος
νανοϊνίδιο Α (διακοπτόμενη ακτινοβόληση)	0-1h	5,71%	-17,19%
	1h-2h	9,67%	-5,53%
	2h-3h	11,08%	-2,97%
	Συνολικά (0-3h)	28,77%	-24,31%
νανοϊνίδιο Β (συνεχόμενη ακτινοβόληση)	0-4h	54,24%	-26,90%

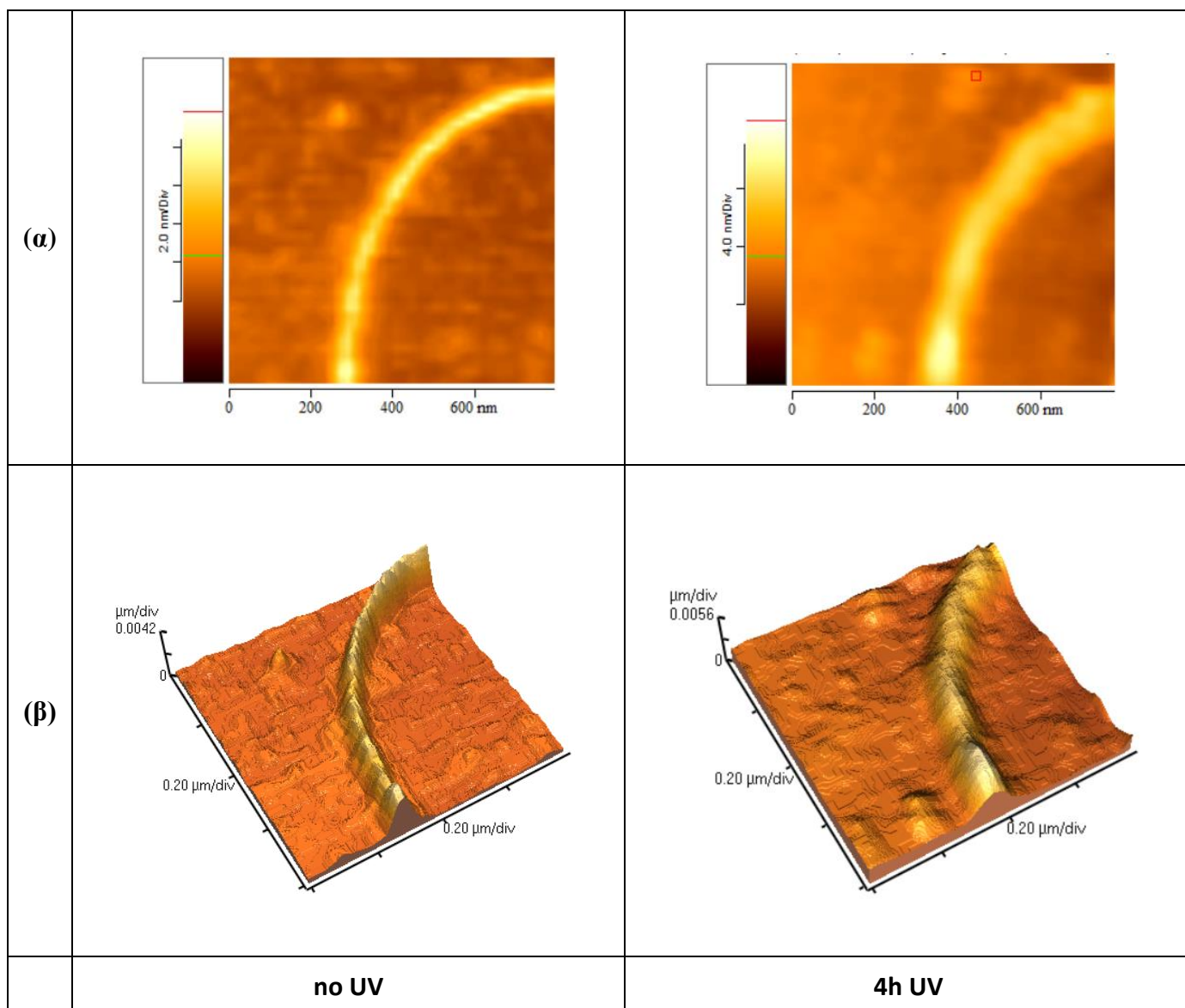
Παρατηρείται, λοιπόν, η μεγάλη επίδραση της υπεριώδους ακτινοβολίας στις δομικές ιδιότητες και των δύο νανοϊνιδίων (Α και Β). Όταν ο συνολικός χρόνος που έχει εκτεθεί το δείγμα στο UV υπερβαίνει τις 2 ώρες, είτε η ακτινοβόληση είναι διακοπτόμενη είτε συνεχόμενη, το νανοϊνίδιο αλλοιώνεται σε τέτοιο βαθμό που οι ακριβείς μετρήσεις των διαμέτρων και των υψών δεν είναι τόσο δυσδιάκριτες. Σε μια

πληθώρα όμως επαναλαμβανόμενων πειραμάτων έγινε μια αξιολόγηση ποσοτικοποίηση αυτών των μεταβολών.

Συγκεκριμένα, το νανοϊνίδιο Α με τη διακοπόμενη UV ακτινοβολία των 3ωρών, είχε τη μεγάλη αύξηση του 28,77% στη διάμετρο του και την αντίστοιχη μεγάλη μείωση στο ύψος του κατά 24,31%. Επιπροσθέτως, το νανοϊνίδιο Β με τη συνεχόμενη UV ακτινοβολία των 4 ωρών, είχε τεράστια αύξηση στη διάμετρο του κατά 54,24% και αρκετά μεγάλη ελάττωση στο ύψος του κατά 26,90%. Είναι λοιπόν, εμφανής και στις δύο περιπτώσεις η πολύ μεγάλη αλλοίωση των νανοϊνιδίων μετά από τις τόσο πολλές ώρες έκθεσης στην υπεριώδη ακτινοβολία. Επίσης, τεκμηριώνονται με σαφήνεια τα παραπάνω και από τις τοπογραφικές τους 2D και 3D απεικονίσεις με το AFM πριν και μετά την ακτινοβολία στις **Εικόνες 7.19, 7.20** αντίστοιχα.



Εικόνα 7.19. Τοπογραφικές 2D απεικονίσεις AFM νανοϊνιδίου ελαστίνης (νανοϊνίδιο Α) χωρίς ακτινοβολία (αριστερά) και μετά από 3h με UV (δεξιά): α) (2×2μm), β) (0,7×0,7μm).



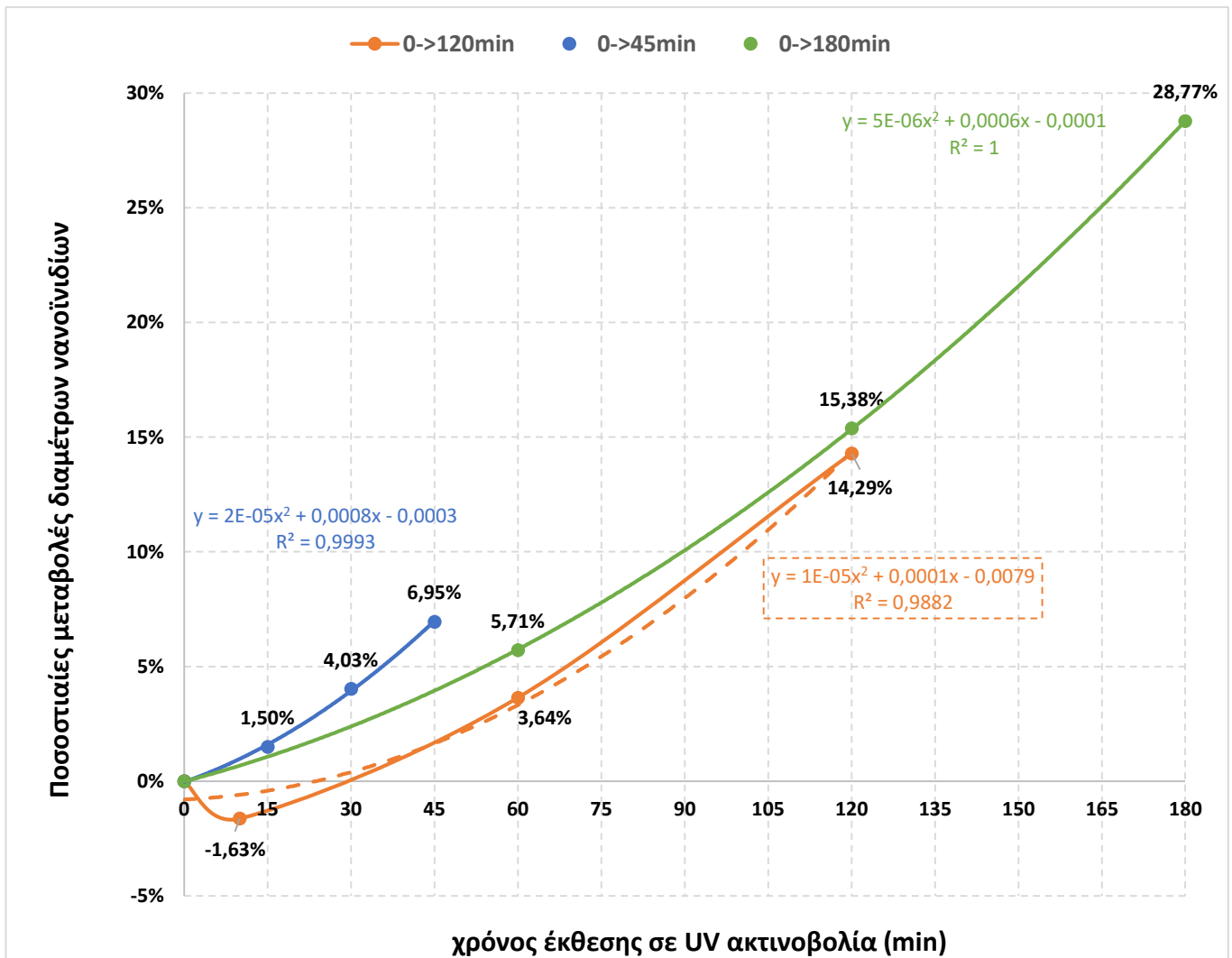
Εικόνα 7.20. Τοπογραφικές απεικονίσεις AFM ($0,8 \times 0,8 \mu\text{m}$) νανοϊνιδίου ελαστίνης (νανοϊνίδιο B) χωρίς ακτινοβολία (αριστερά) και μετά από 4h με UV (δεξιά): α) 2D, β) 3D, όπου είναι εμφανής η πολύ μεγάλη αλλοίωση μετά από 4 ώρες συνεχόμενης ακτινοβολίας.

7.2.2.4 Σύνοψη αποτελεσμάτων της επίδραση της υπεριώδους ακτινοβολίας στην ελαστίνη ανάλογα με το χρόνο έκθεσής της στο UV.

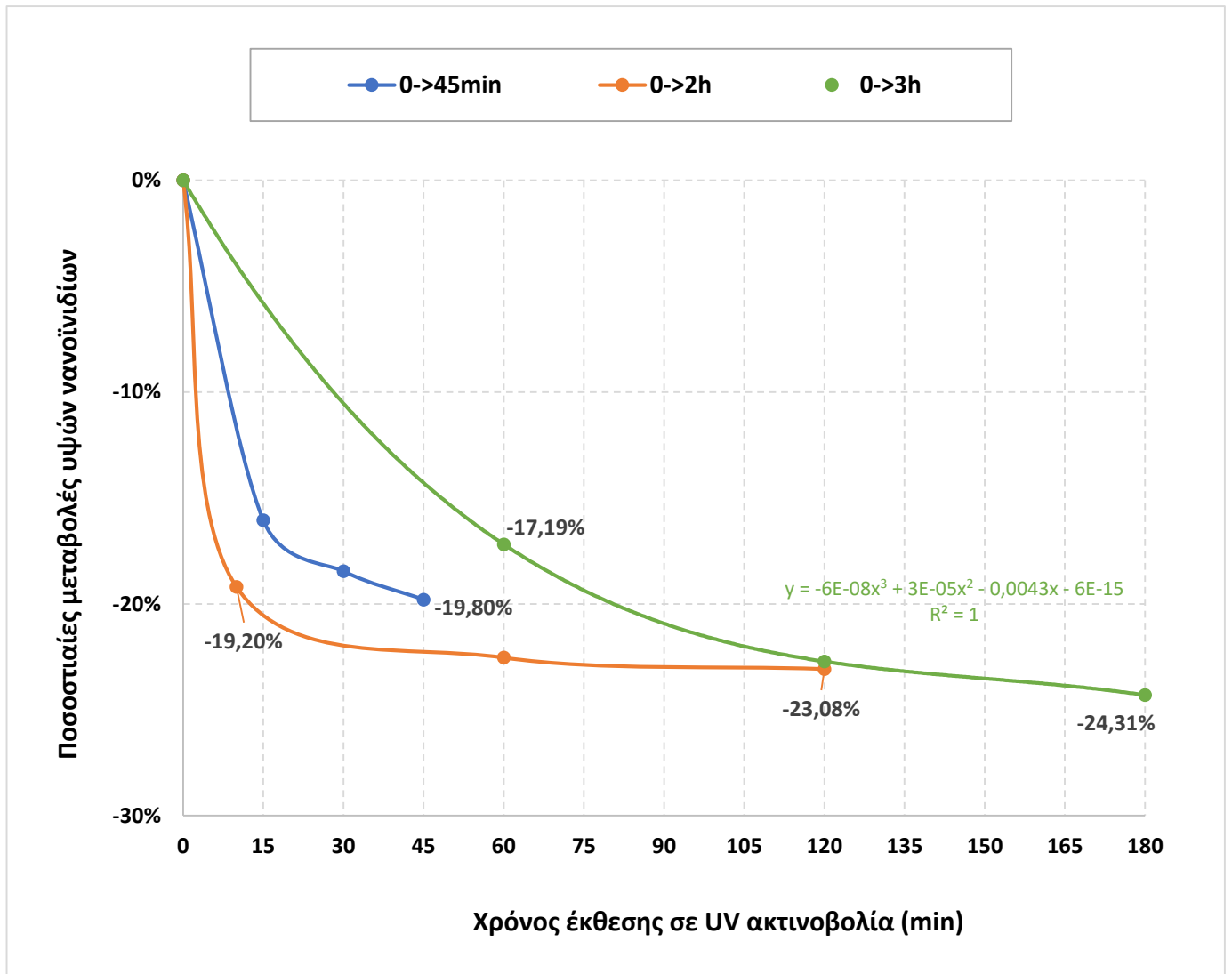
Ολοκληρώνοντας την 2^η κατηγορία πειραμάτων, διαπιστώθηκε η μεγάλη επίδραση της UV ακτινοβολίας στα νανοϊνίδια για χρόνους ακτινοβολίας μικρής, μεσαίας και μεγάλης διάρκειας. Συγκεντρωτικά παρατίθενται όλα τα πειραματικά αποτελέσματα, όπου παρουσιάζονται στον **Πίνακα 7.14** συνολικά οι ποσοστιαίες μεταβολές των διαμέτρων και υψών των νανοϊνιδίων ελαστίνης. Τέλος, οι μεταβολές (σε ποσοστό) των δομικών χαρακτηριστικών (διάμετροι και ύψη) των νανοϊνιδίων σε συνάρτηση με τον χρόνο έκθεσης τους στην υπεριώδη ακτινοβολία απεικονίζονται με κατάλληλα διαγράμματα στις **Εικόνες 7.21** και **7.22** αντίστοιχα.

Πίνακας 7.14. Συνολικές ποσοστιαίες μεταβολές διαμέτρων (Δ), υψών (Υ) νανοϊνιδίου ελαστίνης για μικρούς/μεσαίους/μεγάλους χρόνους έκθεσης UV ακτινοβολίας.

Χρόνοι έκθεσης σε UV	Διάρκειας	Δ	Υ
0->45min	Μικρής (διακοπτόμενης) (3φορές x 15min)	6,95%	-19,80%
0->2h	Μεσαίας (διακοπτόμενης) (10min,50min, 60min)	14,29%	-23,08%
0->3h	Μεγάλης (διακοπτόμενης) (3φορές x 1h)	28,77%	-24,31%
0->4h	Μεγάλης (συνεχόμενης)	54,24%	-26,90%



Εικόνα 7.21. Διάγραμμα ποσοστιαίων μεταβολών διαμέτρων νανοϊνιδίων σε συνάρτηση με τους χρόνους έκθεσης κατά τη UV ακτινοβολήση.



Εικόνα 7.22. Διάγραμμα ποσοστιαίων μεταβολών υψών νανοϊνιδίων σε συνάρτηση με τους χρόνους έκθεσης κατά τη UV ακτινοβολία.

Διαπιστώνεται, η συνεχής διαπλάτυνση της διαμέτρου του νανοϊνιδίου όσο αυξάνεται ο χρόνος έκθεσης του στην υπεριώδη ακτινοβολία από 7% για μικρούς χρόνους έως 54,2% για πολύ μεγάλους. Αντίθετα, η ελάττωση του ύψους του είναι αρκετά απότομη σε μικρούς χρόνους (10 και 15min) και στη συνέχεια για μεγαλύτερα χρονικά διαστήματα (1 και 2h) είναι πιο ομαλή η μείωση του, η οποία κυμαίνεται από 20% έως 27%. Επίσης, παρατηρείται από το πείραμα με τη χρονική διάρκεια των 3 ωρών, ότι τόσο η αύξηση της διαμέτρου, όσο και η μείωση του ύψους είναι πολυωνυμικής μορφής 2^{ου} βαθμού, το οποίο τεκμηριώνεται από τις εξισώσεις που παρουσιάζονται στα διαγράμματα των **Εικόνων 7.21** και **7.22**. Συμπερασματικά, η αλλοίωση των δομικών και μορφολογικών ιδιοτήτων των νανοϊνιδίων μεγαλώνει, καθώς αυξάνεται ο χρόνος έκθεσης τους στο υπεριώδες φως.

7.3 Συζήτηση αποτελεσμάτων

Το 7^ο κεφάλαιο της διδακτορικής διατριβής επικεντρώθηκε στη μελέτη της επίδρασης της υπεριώδους ακτινοβολίας στις ίνες, στα ινίδια και στα νανοϊνίδια της ελαστίνης. Τα αποτελέσματα υποδεικνύουν ότι το UV προκαλεί σημαντικές μεταβολές στις τοπογραφικές ιδιότητες της ελαστίνης, ανάλογα με τις διαστάσεις της, δηλαδή αν είναι ίνα, ινίδιο ή νανοϊνίδιο και ανάλογα με τους χρόνους έκθεσης της στο υπεριώδες φως.

Η εξήγηση των παραπάνω μεταβολών δίνεται από τη μελέτη του μηχανισμού αλληλεπίδρασης της UV ακτινοβολίας με την ίνα ελαστίνης στη νανοκλίμακα. Συγκεκριμένα, οι ίνες ελαστίνης χαρακτηρίζονται από αντοχή λόγω των αμινοξέων της α-έλικας, που είναι πλούσια σε αλανίνη και λυσίνη, τα οποία δημιουργούν τις συνδέσεις μεταξύ των γειτονικών μορίων. Επιπροσθέτως, η ελαστικότητα της οφείλεται στο υδρόφοβο τμήμα των αμινοξέων βαλίνης-προλίνης-γλυκίνης. Επομένως, η επίδραση της υπεριώδους ακτινοβολίας στις βασικές ιδιότητες και αλληλεπιδράσεις μεταξύ των μορίων του ελαστίνης οδηγεί σε δομική και μηχανική αποδιαμόρφωση. Συγκεκριμένα, η μείωση του ύψους και του μήκους των ινών είναι πιθανό αποτέλεσμα της ‘θραύσης’ των σημείων διασταυρώσεων εντός των ινών, λόγω της ακτινοβόλησης. Η αλλοίωση των ινών ελαστίνης, εξαιτίας της αύξησης της διαμέτρου τους, μπορεί να συσχετιστεί με την καταστροφή των ομοιοπολικών δεσμών, που επηρεάζει την απόσταση μεταξύ των πολυμερικών αλυσίδων.

Οι περισσότερες έρευνες που μελετούν την επίδραση του υπεριώδους φωτός στην ελαστίνη είναι στη μακροκλίμακα. Ωστόσο ελάχιστες είναι οι μελέτες σε νανοεπίπεδο. Συγκεκριμένα, οι Dhital et al. αναφέρονται σε μια *in vitro* μελέτη για τις αλλοιώσεις σε ελαστικές ίνες αυχενικού συνδέσμου βοοειδούς, που προκύπτουν από τη συνεχή έκθεση στην UV-A, με τη χρήση TEM, ιστολογίας, φασματομετρίας μάζας και NMR στερεάς κατάστασης. Από το TEM παρατηρήθηκαν διακριτές ρωγμές στις ελαστικές ίνες, οι οποίες φαίνονται πιο κοντές, κατακερματισμένες και πιο λεπτές μετά την έκθεση σε ακτινοβολία UV-A. Εφαρμόστηκε NMR για τη διερεύνηση πιθανών δευτερογενών δομικών αλλαγών στα ακτινοβολημένα δείγματα, όπου δε φάνηκαν διαφορές μεταξύ δειγμάτων που έχουν ακτινοβοληθεί με UV-A και μη ακτινοβολημένα [204]. Τέλος, η φασματομετρία μάζας έδειξε ότι η συγκέντρωση της δεσμοσίνης, η οποία σχηματίζει σταυροδεσμούς στην ελαστίνη, παρατηρείται να μειώνεται κατά 11 % μετά από 9 ημέρες συνεχούς ακτινοβολίας UV-A, σε σύγκριση με μη ακτινοβολημένα δείγματα. Αυτές οι αλλαγές παίζουν σημαντικό ρόλο στην απώλεια ελαστικότητας, που παρατηρείται στο δέρμα που εκτίθεται στην υπεριώδη ακτινοβολία.

Επίσης, τα φασματοσκοπικά αποτελέσματα των Sionkowska et al. [275] υποδεικνύουν ότι τα υδρολύματα ελαστίνης αλλάζουν τις ιδιότητές τους και σχηματίζονται φωτοπροϊόντα μετά από έκθεση σε ακτινοβολία UV. Οι Larroque-Cardoso et al. [174] απέδειξαν ότι οι αλδεϋδες (4-HNE, ακρολεΐνη), που δημιουργούνται στο δέρμα από την ακτινοβολία UV-A, συμβάλλουν στη φωτογήρανση του δέρματος, καθώς τροποποιούν την ελαστίνη. Το γεγονός ότι

χρησιμοποιώντας καρνοσίνη (διπεπτίδιο αλανίνης/ιστιδίνης) εμπόδισαν την τροποποίηση της ελαστίνης από την αλδεϋδη 4-HNE, αλλά και τα σημάδια φωτογήρανσης, υποστήριξαν έτσι οι αλδεϋδες που παράγονται από την υπεροξειδωση των λιπιδίων είναι ένας επιβαρυντικός μηχανισμός στη φωτογήρανση.

Επιπροσθέτως, έχει αποδειχθεί στο παρελθόν ότι μικροί χρόνοι ακτινοβολίας με υπεριώδη ακτινοβολία σε πρωτεΐνη που βρίσκεται σε υγρό περιβάλλον αυξάνει τη σταθερότητά της [276] και βρίσκεται σε μία κατάσταση στην οποία μεταξύ των μορίων σχηματίζονται σταυροδεσμοί, ενώ ταυτόχρονα οι πολυπεπτιδικές αλυσίδες έχουν υποστεί μερική θραύση [277]. Αντίθετα, σε συνθήκες περιβάλλοντος και για εκτενείς χρόνους ακτινοβολίας, επηρεάζεται η σταθερότητα της πρωτεΐνης [278]. Συγκεκριμένα, ο υψηλός χρόνος υπό την επίδραση της UV ακτινοβολίας προκαλεί εκτενή μοριακή αποδιαμόρφωση με αποτέλεσμα τη σημαντική μείωση της σταθερότητας των ινών.

Επομένως, σύμφωνα με την παραπάνω ανάλυση, προκύπτει το συμπέρασμα ότι το σπάσιμο των σταυροδεσμών στις αλληλουχίες των αμινοξέων σε ίνες ελαστίνης, λόγω της υπεριώδους ακτινοβολίας, οδήγησε στη σημαντική μείωση των τιμών του ύψους και του μήκους. Ενώ, η αποδόμηση των πολυπεπτιδικών αλυσίδων μεταξύ των διασταυρώσεων οδήγησε στη μη ελαστικότητα της ίνας, εξαιτίας της αύξησης της διαμέτρου της. Οι σημαντικές αυτές αλλοιώσεις στα ινίδια ελαστίνης, έχουν σοβαρές επιπτώσεις στη δομή και τη λειτουργία της πρωτεΐνης.

7.4 Συμπεράσματα

Στη συγκεκριμένη μελέτη εξετάστηκαν οι τοπογραφικές ιδιότητες των ινών/ινιδίων/νανοϊνιδίων ελαστίνης σε νανοκλίμακα, πριν και μετά την επίδραση της UV ακτινοβολίας με τη βοήθεια απεικονιστικών μεθόδων AFM. Συγκεκριμένα, πραγματοποιήθηκε μια ποιοτική και ποσοτική έρευνα των επιδράσεων της ακτινοβολίας στις δομικές και μορφολογικές ιδιότητες των ινών ελαστίνης ανάλογα με το μέγεθος τους και ανάλογα με τη χρονική διάρκεια έκθεσης τους στο υπεριώδες φως. Τα αποτελέσματα υποδεικνύουν ότι η έκθεση στη UV ακτινοβολία προκαλεί σημαντική μείωση των τιμών του ύψους και τους μήκους των νανοϊνιδίων. Επίσης οδηγεί στη αύξηση της διαμέτρου τους, καθώς και στη μεγάλη αλλοίωση στην τραχύτητα της επιφάνειας των ινών, αλλά και ολόκληρου του δείγματος σε μεγάλους χρόνους ακτινοβολίας.

Τα παραπάνω αποτελέσματα συνεισφέρουν στην εξακρίβωση του μηχανισμού αλληλεπίδρασης υπεριώδους ακτινοβολίας και ελαστίνης σε νανοκλίμακα. Είναι σημαντικά για την ερμηνεία βλαβών, που προκαλούνται λόγω της χρόνιας έκθεσης του ανθρώπινου δέρματος στην ηλιακή ακτινοβολία. Πολλοί εξωγενείς παράγοντες, που σχετίζονται με το περιβάλλον και τον τρόπο ζωής, επηρεάζουν την εμφάνιση του δέρματος, επιταχύνοντας τη γήρανση. Ακόμα και οι γενετικοί παράγοντες επηρεάζουν, τον κίνδυνο δερματικής νόσου που προκαλείται από το υπεριώδες φως και συσχετίζονται με την απαλότητα του δέρματος, την ευαισθησία στην συγκεκριμένη

ακτινοβολία και τον αυξημένο κίνδυνο καρκίνου. Επομένως, επιτακτική ήταν η ανάγκη για νέες γνώσεις σχετικά με τους τρόπους με τους οποίους τα νανοϊνίδια ελαστίνης λειτουργούν και επηρεάζονται από τις βλαβερές επιπτώσεις του υπεριώδους φωτός. Η σειρά, λοιπόν, πειραμάτων που έγινε ήταν ιδιαίτερης σημασίας, καθώς η ελαστίνη δεν έχει μελετηθεί στο παρελθόν σε διαστάσεις νανοκλίμακας υπό την επίδραση του υπεριώδους φωτός. Μια μελέτη, η οποία μπορεί να επιτρέψει την επακόλουθη χρήση μεθόδων μικροσκοπίας, που βελτιώνουν την κατανόηση των διαδικασιών γήρανσης, για να υπάρξουν εφαρμογές στη δερματολογική και ιατρική έρευνα.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 8.

ΕΠΙΔΡΑΣΗ ΧΑΜΗΛΗΣ ΙΣΧΥΟΣ LASER ΣΤΗΝ ΠΕΡΙΟΧΗ ΤΟΥ ΕΡΥΘΡΟΥ ΣΤΑ ΙΝΙΔΙΑ ΕΛΑΣΤΙΝΗΣ

Ο σκοπός του 8^{ου} κεφαλαίου ήταν η μελέτη της επίδρασης της ακτινοβολίας laser χαμηλής ισχύος στην περιοχή του ερυθρού από τις ίνες έως τα νανοϊνίδια της ελαστίνης χρησιμοποιώντας απεικονιστικές μεθόδους AFM. Μελετήθηκαν οι διαφοροποιήσεις στις διαμέτρους, στα ύψη, στα μήκη των ινών και στην τραχύτητα της επιφάνειας των δειγμάτων. Επίσης, καταγράφηκε η ποσοστιαία μεταβολή αυτών των διαφορών κάτω από την επίδραση διαφορετικών χρονικών διαστημάτων ακτινοβολίας με UV. Τα αποτελέσματα παρουσιάζονται με τοπογραφικές απεικονίσεις 2D και 3D, με συγκριτικούς πίνακες και γραφικές παραστάσεις, με διαγράμματα προφίλ ύψους και τραχύτητας, αλλά και με ιστογράμματα. Αποδεικνύεται, ότι όλες οι διαστάσεις ινών διαφοροποιούνται σημαντικά υπό την επίδραση της ερυθρής ακτινοβολίας.

8.1 Πειραματικά Πρωτόκολλα

8.1.1 Παραγωγή νανοϊνιδίων ελαστίνης

Η μελέτη νανοϊνιδίων ελαστίνης πραγματοποιήθηκε δημιουργώντας εναιωρήματα 1% w/v ελαστίνης / δις απεσταγμένου νερού. Για την παρασκευή τους, χρησιμοποιήθηκαν τα πρωτόκολλα που παρουσιάστηκαν στις **παραγράφους 5.2.1 και 5.2.2 (Κεφάλαιο 5)**.

8.1.2 Ακτινοβολήση νανοϊνιδίων ελαστίνης

Για την ακτινοβολήση των νανοϊνιδίων ελαστίνης χρησιμοποιήθηκε η διάταξη που παρουσιάστηκε στην **παράγραφο 5.5 (Κεφάλαιο 5)**. Οι χρόνοι έκθεσης στην ερυθρή ακτινοβολία κυμάνθηκαν από 45sec έως 3h, είτε με διακοπτόμενη, είτε με συνεχόμενη ακτινοβολήση.

Πραγματοποιήθηκαν τρεις κατηγορίες πειραμάτων ακτινοβολήσης. Στην 1^η κατηγορία εφαρμόστηκαν μικροί χρόνοι διακοπτόμενης ακτινοβολήσης, διάρκειας 45sec επί 5 φορές, με παύση 60sec μεταξύ δύο διαδοχικών ακτινοβολήσεων, όπου επαναλήφθηκε 4 φορές. Στη 2^η κατηγορία, εφαρμόστηκαν μεσαίοι χρόνοι συνεχούς ακτινοβολήσης, διάρκειας 15min, όπου επαναλήφθηκε 3 φορές. Στην 3^η κατηγορία, εφαρμόστηκαν μεγάλοι χρόνοι συνεχούς ακτινοβολήσης, διάρκειας 1h, όπου επαναλήφθηκε 3 φορές.

8.1.3 Απεικόνιση νανοϊνιδίων ελαστίνης με τη χρήση AFM

Η απεικόνιση των ινιδίων ελαστίνης πραγματοποιήθηκε με το AFM (CP II) με τη μέθοδο contact mode. Χρησιμοποιήθηκαν οι πυραμιδικές ακίδες (MLCT) που παρουσιάστηκαν στην **παράγραφο 5.2.1 (Πίνακας 5.1)**, με ακτίνα καμπυλότητας 20 nm σε προβολούς σχήματος V και σταθερά ελατηρίου 0.6N/m. Η επιλογή προβόλου με μικρή σταθερά ελατηρίου ήταν σκόπιμη, διότι η απεικόνιση πραγματοποιήθηκε με τη μέθοδο contact mode και πρόβολοι με υψηλή σταθερά ελατηρίου μπορούν να προκαλέσουν μόνιμη «ζημιά» στο δείγμα (να το χαράξουν ή να το μετακινήσουν). Όλα τα πειράματα πραγματοποιήθηκαν σε περιβάλλον αέρα σε θερμοκρασία $20 \pm 2^\circ C$ και σχετική υγρασία $40 \pm 3\%$. Η επεξεργασία των εικόνων πραγματοποιήθηκε, όπως παρουσιάστηκε στην **παράγραφο 5.2.2 (Κεφάλαιο 5)**. Όλα τα πειράματα πριν και μετά το κάθε στάδιο ακτινοβολήσης πραγματοποιήθηκαν στο ίδιο νανοϊνίδιο ελαστίνης για την εξαγωγή έγκυρων συμπερασμάτων.

8.1.4 Προσδιορισμός του ίδιου νανοϊνιδίου ελαστίνης πριν και μετά από κάθε ακτινοβολήση

Καθοριστική σημασία για την αξιοπιστία των αποτελεσμάτων έχει ο προσδιορισμός και η μελέτη του ίδιου ινιδίου πριν και μετά από κάθε ακτινοβολήση. Για τον προσδιορισμό του ίδιου ινιδίου χρησιμοποιήθηκε το πρωτόκολλο που παρουσιάστηκε στην **παράγραφο 5.2.3 (Κεφάλαιο 5)**.

8.1.5 Μέτρηση τραχύτητας

Οι μετρήσεις τραχύτητας πραγματοποιήθηκαν με χρήση του λογισμικού WSxM 5.0 dev. 9.1 (Nanotec) [251] με βάση τη μαθηματική σχέση που παρουσιάστηκε στην **παράγραφο 3.7 (Κεφάλαιο 3)**.

8.1.6 Στατιστική σημαντικότητα αποτελεσμάτων

Οι τιμές των πειραματικών μετρήσεων εκφράστηκαν υπό τη μορφή: Μέση τιμή \pm Τυπική απόκλιση. Για τον προσδιορισμό της στατιστικής σημαντικότητας των αποτελεσμάτων χρησιμοποιήθηκε το ANOVA τεστ, που παρουσιάστηκε στην **παράγραφο 5.6 (Κεφάλαιο 5)**. Οι τιμές $p < 0.05$ θεωρήθηκαν στατιστικά σημαντικές.

8.2 Αποτελέσματα

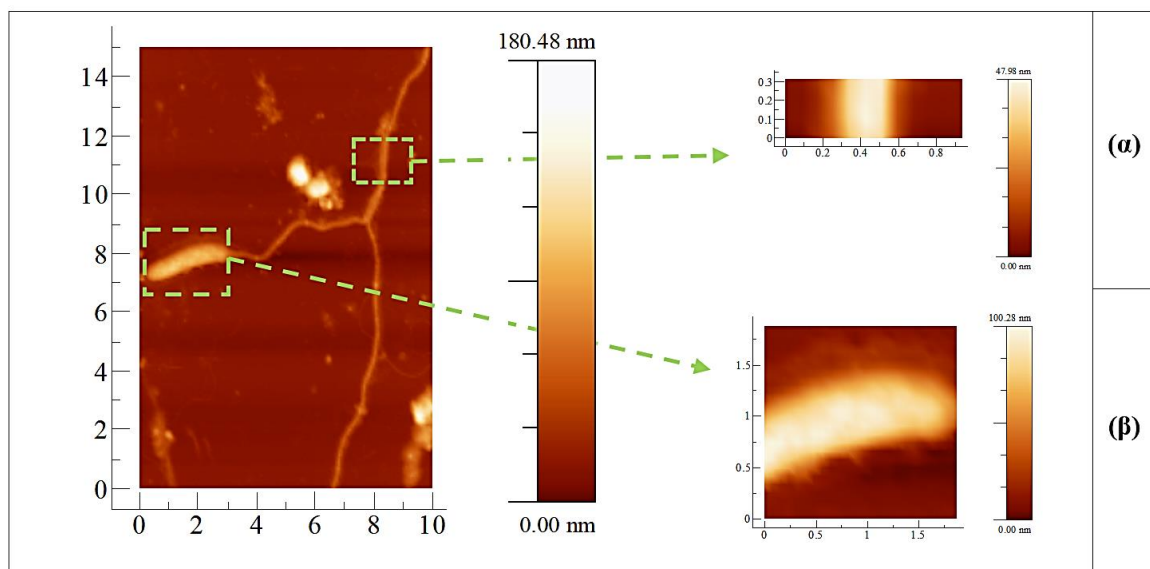
Τα πειράματα με ερυθρή ακτινοβολία χαμηλής ισχύος χωρίστηκαν σε 2 μεγάλες κατηγορίες, ανάλογα με τις διαστάσεις των ινών και με το χρόνο ακτινοβολήσής τους. Στην πρώτη κατηγορία μελετήθηκε η επίδραση του ερυθρού φωτός ανάλογα με το μέγεθος των ινών, δηλαδή αν έχει διαστάσεις ίνας, ινιδίου ή νανοϊνιδίου, σύμφωνα με

τον Πίνακα 6.1 (Κεφάλαιο 6). Στη δεύτερη κατηγορία ερευνήθηκε πως επιδράνε οι διαφορετικοί χρόνοι έκθεσης της ερυθρής ακτινοβολίας στα ινίδια ελαστίνης.

8.2.1 Μελέτη της επίδρασης ερυθρής ακτινοβολίας χαμηλής ισχύος στην ελαστίνη ανάλογα με τις διαστάσεις των ινών.

8.2.1.1 Μελέτη της επίδρασης της ερυθρής ακτινοβολίας χαμηλής ισχύος σε ίνα ελαστίνης.

Αρχικά στην 1^η κατηγορία πειραμάτων, μελετήθηκαν ίνες ελαστίνης διαφόρων διαστάσεων υπό την επίδραση ερυθρής ακτινοβολίας χαμηλής ισχύος. Ενδεικτικά παρουσιάζονται τα αποτελέσματα δύο ινών, μία ίνα με μέσες τιμές διαμέτρου ($546,87 \pm 20,37$) nm και ύψους ($43,69 \pm 3,28$) nm και μία άλλη μεγαλύτερη ίνα με μέσες τιμές διαμέτρου ($743,36 \pm 21,45$) nm και ύψους ($79,49 \pm 4,61$) nm (Πίνακας 8.2). Το αρχικό βήμα ήταν η απεικόνιση των ινών με το AFM χωρίς ακτινοβολία (Εικόνα 8.1) για να γίνεται σωστή σύγκριση με τα ακτινοβολημένα δείγματα.



Εικόνα 8.1. Τοπογραφική 2D απεικόνιση AFM ($10 \times 15 \mu\text{m}$) ίνας ελαστίνης χωρίς ακτινοβολία, με μεγεθύνσεις τα πράσινα διακεκομμένα τμήματα, όπου εντοπίζονται οι προς μελέτη ίνες: **α)** ίνα A ($0,3 \times 0,9 \mu\text{m}$), **β)** ίνα B ($1,8 \times 1,8 \mu\text{m}$).

Στη συνέχεια το ίδιο δείγμα ακτινοβολήθηκε με ερυθρή ακτινοβολία μήκους κύματος 661nm με το πρωτόκολλο που παρουσιάστηκε στην παράγραφο 5.4 στον πίνακα 5.4 του 5^{ου} κεφαλαίου. Συγκεκριμένα, στην 1^η σειρά ακτινοβολήσεων το δείγμα δέχτηκε 5 δόσεις ερυθρού φωτός χαμηλής ισχύος για 45sec, με παύση της ακτινοβολίας για 60 sec μεταξύ των δόσεων (Πίνακας 8.1). Έπειτα, έγινε η πρώτη απεικόνιση του δείγματος με το AFM τόσο σε 2D όσο και σε 3D τοπογραφικές εικόνες. Έπειτα, διεξήχθησαν η 2^η, η 3^η και η 4^η σειρά ακτινοβολήσεων, όπου επαναλήφθηκε η ίδια ακριβώς πειραματική διαδικασία. Μελετήθηκαν οι δομικές αλλαγές στην ίνα υπό

την επίδραση της ερυθρής διακοπτόμενης ακτινοβολίας, που διήρκησε συνολικά 15min. Οι τιμές των διαμέτρων και των υψών της ίνας ελαστικής υπολογίστηκαν με τα βήματα που παρουσιάστηκαν στην **παράγραφο 6.7 (εικόνα 6.11)**. Οι μέσες τιμές και τυπικές αποκλίσεις τους παρουσιάζονται στον **Πίνακα 8.2**, ενώ οι ποσοστιαίες μεταβολές τους στον **Πίνακα 8.3**.

Πίνακας 8.1. 1^η σειρά ακτινοβολήσεων: το δείγμα δέχτηκε 5 δόσεις ερυθρού φωτός χαμηλής ισχύος για 45sec, με παύση της ακτινοβολήσης για 60 sec μεταξύ των δόσεων.

	Δόσεις	Χρόνος (sec)	Πυκνότητα Ενέργειας (J·cm ⁻²)
	0	0	0
1 ^η σειρά Ακτινοβολήσεων (συνολικής διάρκειας 3,75min)	1 ^η	45	0,4
	Παύση ακτινοβολίας: 60 sec		
	2 ^η	90	0,8
	Παύση ακτινοβολίας: 60 sec		
	3 ^η	135	1,2
	Παύση ακτινοβολίας: 60 sec		
	4 ^η	180	1,6
	Παύση ακτινοβολίας: 60 sec		
	5 ^η	225	2,0
	1 ^η απεικόνιση του δείγματος με AFM		

Πίνακας 8.2. Μέσες τιμές και τυπικές αποκλίσεις διαμέτρων (Δ) και υψών (Υ) ίνας ελαστικής κατά την ακτινοβολήση με ερυθρή ακτινοβολία.

Σειρά ακτινοβολήσεων (χρόνος ακτινοβολήσης)		0		1 ^η (3,75min)		2 ^η (7,5min)		3 ^η (11,25min)		4 ^η (15min)	
		Δ(nm)	Υ (nm)	Δ(nm)	Υ(nm)	Δ(nm)	Υ (nm)	Δ(nm)	Υ (nm)	Δ(nm)	Υ (nm)
Ίνα Α	Μέση τιμή	546,87	43,69	566,13	45,34	582,92	48,73	598,44	51,89	620,95	55,77
	Τυπική απόκλιση	20,37	3,28	20,78	3,41	20,12	3,62	20,91	3,77	20,63	3,82
Ίνα Β	Μέση τιμή	743,36	79,49	782,68	81,98	818,14	84,64	845,51	86,19	872,72	88,73
	Τυπική απόκλιση	21,45	4,61	21,28	4,48	21,84	4,36	21,73	4,52	21,97	4,74

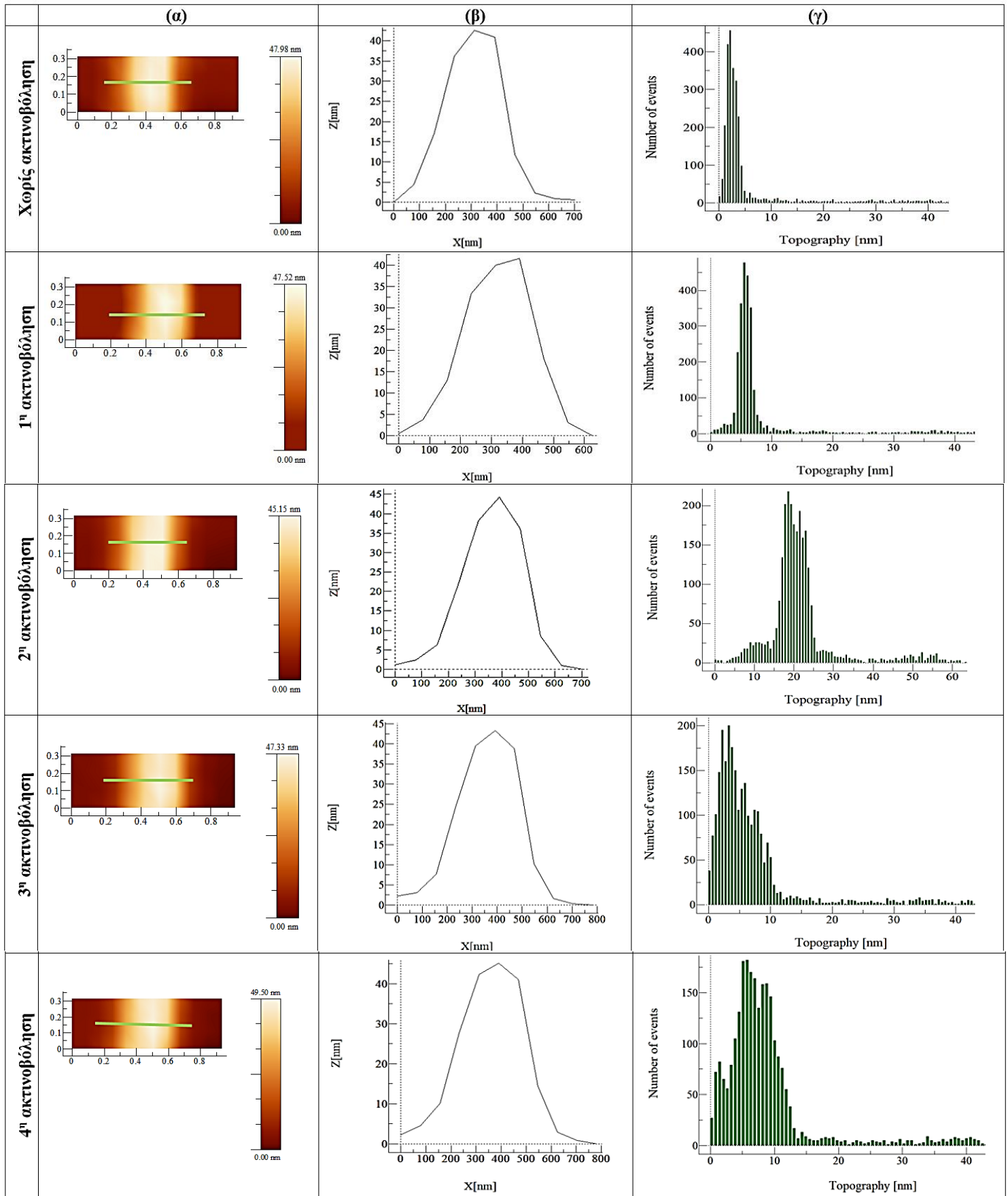
Πίνακας 8.3. Ποσοστιαίες μεταβολές στις διαστάσεις της ίνας ελαστίνης

Σειρά Ακτινοβολήσεων	Ίνα Α		Ίνα Β	
	Δ	Υ	Δ	Υ
0-1 ^η	3,52%	3,79%	5,29%	3,13%
1 ^η -2 ^η	2,96%	7,46%	4,53%	3,24%
2 ^η -3 ^η	2,67%	6,48%	3,35%	1,83%
3 ^η -4 ^η	3,78%	7,47%	3,22%	2,94%
ΣΥΝΟΛΙΚΑ: 0-4^η	13,55%	27,65%	17,40%	11,62%

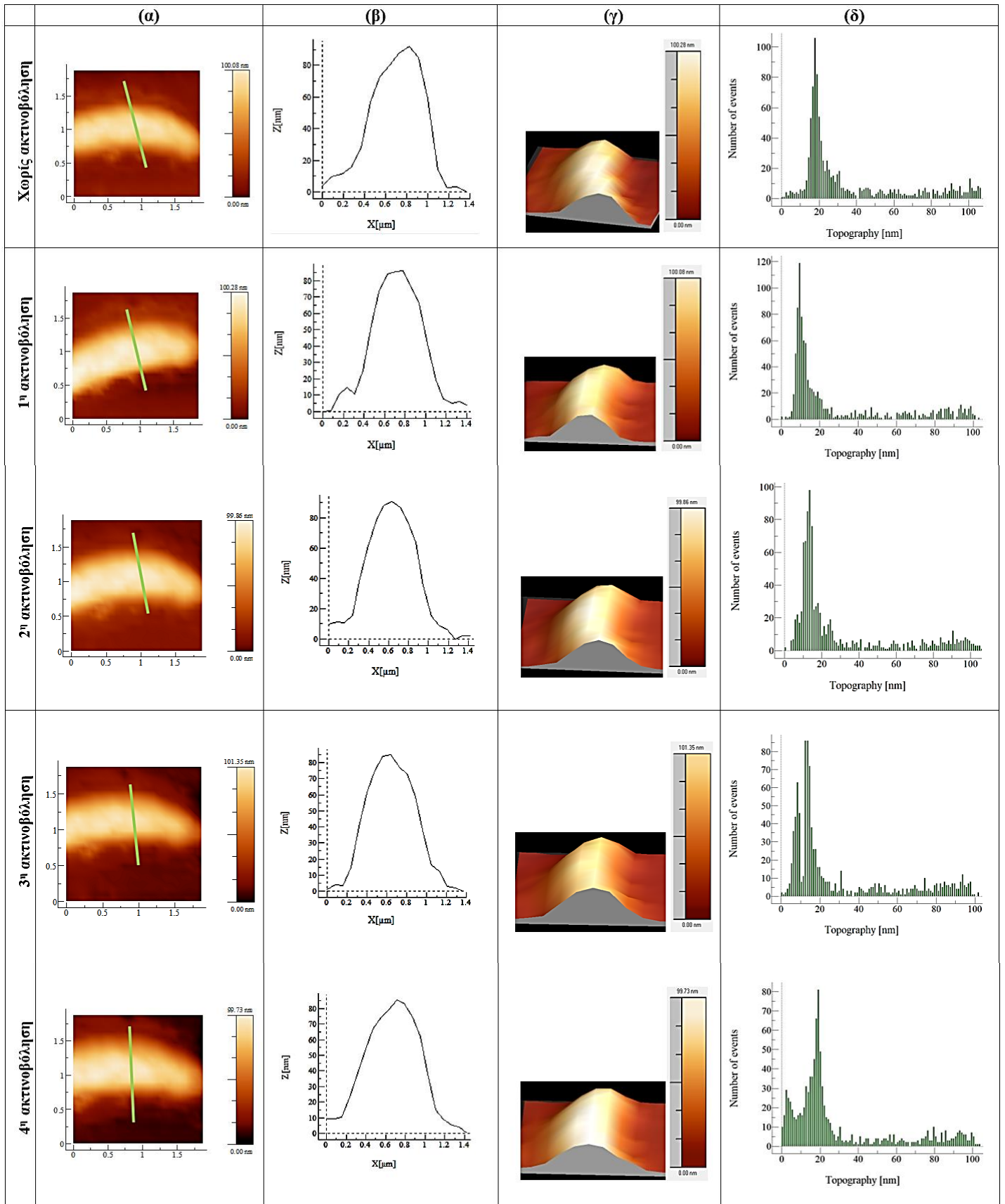
Μελετώντας τα αποτελέσματα της ίνας Α, παρατηρήθηκε στη 1^η σειρά ακτινοβολήσης (δηλαδή στα πρώτα 3,75sec) μια αύξηση της διαμέτρου της ίνας κατά 3,52%. Ομοίως στις επόμενες σειρές ακτινοβολήσης (2^η, 3^η, και 4^η) υπήρξε αύξηση κατά 2,96%, 2,67% και 3,78% αντίστοιχα. Συνολικά, δηλαδή για χρόνο 15min με ακτινοβολία laser χαμηλής ισχύος στην περιοχή του ερυθρού διαπιστώθηκε μια αύξηση στη διάμετρο κατά 13,55%. Όσο αφορά το ύψος της ίνας ελαστίνης και για όλες τις σειρές ακτινοβολήσης, δηλαδή για 3,75min, 7,5min, 11,25min και 15min, οι ποσοστιαίες μεταβολές είχαν ανοδική τάση με τιμές 3,79%, 7,46%, 6,4% και 7,47% αντίστοιχα. Στο σύνολο του το ύψος της ίνας αυξήθηκαν αρκετά κατά 27,65%.

Αντίστοιχα ήταν και τα αποτελέσματα της ίνας Β, όπου παρατηρήθηκε αύξηση της διαμέτρου της ίνας κατά 5,29%, 4,53%, 3,35% και 3,22%, αλλά και του ύψους της κατά 3,13%, 3,24%, 1,83% και 2,94% στις αντίστοιχες σειρές ακτινοβολήσης (1^η, 2^η, 3^η και 4^η). Συνολικά, δηλαδή για χρόνο 15min με ερυθρή ακτινοβολία διαπιστώθηκε άνοδος τόσο στη διάμετρο κατά 17,40%, όσο και στο ύψος της ίνας κατά 11,62%. Επομένως, η ακτινοβολία laser χαμηλής ισχύος στην περιοχή του ερυθρού επηρέασε αρκετά τόσο τη διάμετρο, όσο και το ύψος της ίνας ελαστίνης.

Επιπροσθέτως, μελετήθηκαν ενδελεχώς και οι τοπογραφικές εικόνες που ελήφθησαν από το AFM για να ελεγχθεί η ορθότητα των μετρήσεων. Στην **Εικόνα 8.2** απεικονίζεται η **ίνα Α** που μετρήθηκε κατά τη διάρκεια του πειράματος σε μικρούς χρόνους διακοπτόμενης ακτινοβολήσης από 0 έως 15min, σε μεγένθυση 900×300nm, με τα καταλληλα διαγράμματα προφίλ ύψους και τραχύτητας. Οι αντίστοιχες τοπογραφικές απεικονίσεις και διαγράμματα για την **ίνα Β** απεικονίζονται στην **Εικόνα 8.3**.



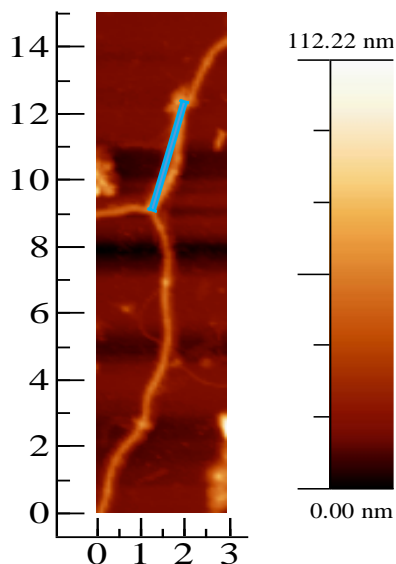
Εικόνα 8.2. Τοπογραφικές 2D απεικονίσεις AFM ίνας A ελαστικής τραχύτητας (κατά τη διάρκεια των 4 κύκλων της ερυθρής ακτινοβόλησης χαμηλής ισχύος): **α)** 900×300nm, **β)** Διαγράμματα προφίλ ύψους, **γ)** Διαγράμματα τραχύτητας.



Εικόνα 8.3. Τοπογραφικές 2D απεικονίσεις AFM ίνας Β ελαστίνης (κατά τη διάρκεια των 4 κύκλων της ερυθρής ακτινοβόλησης χαμηλής ισχύος: α) 1,8×1,8 μm, β) Διαγράμματα προφίλ ύψους, γ) Τοπογραφικές 3D απεικονίσεις AFM δ) Διαγράμματα τραχύτητας.

Επαληθεύτηκαν, τα αποτελέσματα των πειραματικών μετρήσεων, καθώς με παρατήρηση των 2D και 3D τοπογραφικών απεικονίσεων, των διαγραμμάτων προφίλ ύψους και τραχύτητας επιφάνειας (**Εικόνες 8.2 και 8.3**), φαίνονται οι σημαντικές δομικές αλλαγές στη διάμετρο και στο ύψος της ίνας ελαστίνης, χωρίς όμως να υπάρχουν αλλοιώσεις στην επιφάνειά της.

Αξίζει, να αναφερθεί ότι μετά από ενδεδειγμένο έλεγχο των τοπογραφικών απεικονίσεων της αρχικής εικόνας διαστάσεων 10x15μm (**Εικόνα 8.1**) και τη συγκρισή της με τις αντίστοιχες απεικονίσεις και για τις 4 σειρές ακτινοβολήσεων με laser ερυθρής ακτινοβολίας φως χαμηλής ισχύος, διαπιστώθηκε ότι άλλαζαν οι διαστάσεις κατά μήκος της ίνας. Επομένως, έγιναν κατάλληλες μετρήσεις για το μήκος της στους διαφορετικούς χρόνους ακτινοβολήσης. Συγκεκριμένα μετρήθηκε το μήκος της ίνας ελαστίνης που ερευνάται [**Εικόνα 8.4 (μπλε γραμμή)**]. Οι αντίστοιχες μετρήσεις του καταγράφονται στον **Πίνακα 8.4**.



Εικόνα 8.4. Τοπογραφική απεικόνιση AFM ($3 \times 15 \mu\text{m}$) ίνας ελαστίνης χωρίς ακτινοβολήση, όπου επισημαίνεται το μήκος της ίνας (**μπλε γραμμή**),

Πίνακα 8.4. Μήκος και ποσοστιαίες μεταβολές ίνας ελαστίνης κατά τη διάρκεια της ακτινοβολήσης με ερυθρό φως χαμηλής ισχύος

Σειρά ακτινοβολήσεων	0	1 ^η	2 ^η	3 ^η	4 ^η
Μήκος ίνας A (μm) (μπλε γραμμή)	3203	3321	3448	3552	3664
Συνολική ποσοστιαία μεταβολή	Σειρά ακτινοβολήσεων : 1 ^η - 4 ^η (χρόνος 0-15min) ⇒ 14,39%				

Ως εκ τούτου διαπιστώνεται η αύξηση του μήκους της ίνας από 3203nm σε 3664nm, μετά από 15min ακτινοβολήσης. Στη συνέχεια στον **Πίνακα 8.4** συνοψίζονται οι συνολικές ποσοστιαίες μεταβολές της μελετώμενης ίνας A κατά τη διάρκεια της ακτινοβολήσης ερυθρού φωτός χαμηλής ισχύος. Συνολικά το μήκος της ίνας αυξάνεται κατά 14,39% μετά από έκθεση στην ερυθρή ακτινοβολία για 15 min, ενώ η διάμετρος και το ύψος της έχουν εξίσου άνοδο κατά 13,55% και 27,65% αντίστοιχα.

Πίνακα 8.5. Συνολικές ποσοστιαίες μεταβολές της μελετώμενης ίνας A κατά τη διάρκεια της ακτινοβολήσης ερυθρού φωτός χαμηλής ισχύος

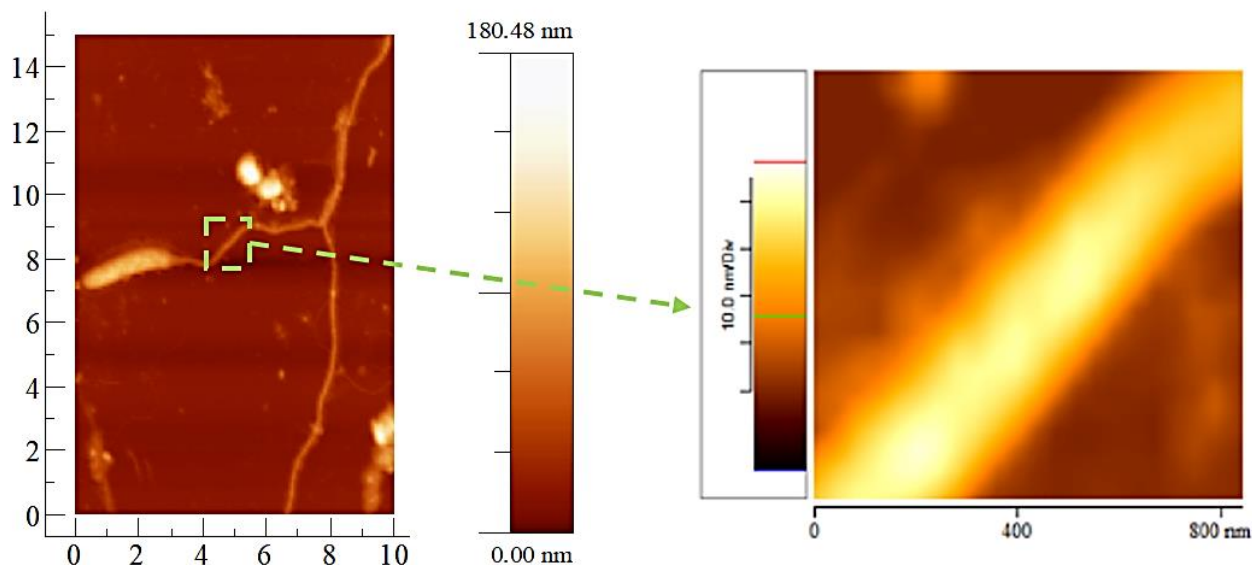
	Ίνα A		
Σειρά Ακτινοβολήσεων	Διάμετρος (nm)	Ύψος (nm)	Μήκος (nm)
0-1 ^η	3,52%	3,79%	3,68%
1 ^η -2 ^η	2,96%	7,46%	3,82%
2 ^η -3 ^η	2,67%	6,48%	3,01%
3 ^η -4 ^η	3,78%	7,47%	3,15%
0-15min (ΣΥΝΟΛΙΚΑ)	13,55%	27,65%	14,39%

Οι πειραματικές μετρήσεις από την επεξεργασία των τοπογραφικών απεικονίσεων των ινών, αλλά και των διαγραμμάτων προφίλ ύψους και ιστογραμμάτων της διαμέτρου της ίνας επαληθεύουν με ακρίβεια τις σημαντικές αυξήσεις στα δομικά χαρακτηριστικά (διάμετρος, ύψος, μήκος) των ινών ελαστίνης. Επίσης, από τα γραφήματα της τραχύτητας είναι εμφανής η διατήρηση της αρχικής μορφολογίας στην επιφάνεια της ίνας ελαστίνης, για τους μικρούς χρόνους ακτινοβολήσης με laser χαμηλής ισχύος στην περιοχή του ερυθρού.

Η επίτευξη των λεπτομερών αυτών μετρήσεων έγινε με την πολύτιμη βοήθεια του AFM και των λογισμικών του προγραμμάτων DI SPM Lab ver.60.2, IP-image processing, Data analysis ver.2.1.15 (Veeco) και WSxM 5.0 dev. 9.1 (Nanotec) [251], όπως έχουμε προαναφέρει στην **παράγραφο 5.3.2 (κεφάλαιο 5)**.

8.2.1.2 Μελέτη της επίδρασης της ερυθρής ακτινοβολίας χαμηλής ισχύος σε ινίδιο ελαστίνης.

Στο 2^ο μέρος της 1^{ης} κατηγορίας πειραμάτων ερευνήθηκε η επίδραση της ερυθρής ακτινοβολίας χαμηλής ισχύος σε ινίδια ελαστίνης διαφόρων διαστάσεων. Ενδεικτικά παρουσιάζονται τα αποτελέσματα ενός ινιδίου με μέση τιμή διαμέτρου $276,14 \pm 16,48$ και ύψους $25,87 \pm 2,03$ (Πίνακας 8.6). Το αρχικό βήμα ήταν η απεικόνιση του ινιδίου με το AFM χωρίς ακτινοβολία (Εικόνα 8.5), για να γίνεται σωστή σύγκριση με τα επόμενα δείγματα που θα εκτεθούν σε ερυθρή ακτινοβολία.



Εικόνα 8.5. Τοπογραφική 2D απεικόνιση AFM ίνας ελαστίνης ($10 \times 15 \mu\text{m}$) χωρίς ακτινοβολία με μεγέθυνση στο **πράσινο διακεκομμένο τμήμα**, όπου εντοπίζεται το προς μελέτη ινίδιο ($800 \times 800 \text{nm}$).

Στη συνέχεια το ίδιο δείγμα ακτινοβολήθηκε με ερυθρή ακτινοβολία μήκους κύματος 661nm με το πρωτόκολλο που παρουσιάστηκε στην **παράγραφο 5.4** στον **πίνακα 5.3** του **5^{ου} κεφαλαίου**. Συγκεκριμένα, στην 1^η σειρά ακτινοβολήσεων το δείγμα δέχτηκε 5 δόσεις ερυθρού φωτός χαμηλής ισχύος για 45sec, με παύση της ακτινοβολήσεως για 60 sec μεταξύ των δόσεων (**Πίνακας 8.1**). Έπειτα, έγινε η πρώτη απεικόνιση του δείγματος με το AFM τόσο σε 2D όσο και σε 3D τοπογραφικές εικόνες. Στη συνέχεια υπήρξαν η 2^η, η 3^η και η 4^η σειρά ακτινοβολήσεων, όπου επαναλήφθηκε η ίδια ακριβώς πειραματική διαδικασία. Μελετήθηκαν οι δομικές αλλαγές στο ινίδιο υπό την επίδραση της ερυθρής διακοπόμενης ακτινοβολίας που διήρκεσε συνολικά 15min.

Οι τιμές των διαμέτρων και των υψών του ινιδίου ελαστίνης υπολογίστηκαν με τα βήματα που παρουσιάστηκαν στην **παράγραφο 6.7** (**εικόνα 6.11**). Οι μέσες τιμές και τυπικές αποκλίσεις τους παρουσιάζονται στον **Πίνακα 8.6**, ενώ οι ποσοστιαίες μεταβολές τους στον **Πίνακα 8.7**.

Πίνακας 8.6. Μέσες τιμές και τυπικές αποκλίσεις διαμέτρων (Δ) και υψών (Y) ινιδίου ελαστίνης κατά την ακτινοβολήση με ερυθρό φως χαμηλής ισχύος.

Σειρά ακτινοβολήσεων	0		1 ^η		2 ^η		3 ^η		4 ^η	
	Δ	Y	Δ	Y	Δ	Y	Δ	Y	Δ	Y
Μέση τιμή (nm)	276,14	25,87	283,25	27,43	291,81	28,93	317,42	30,37	333,61	32,98
Τυπική απόκλιση (nm)	16,48	2,03	15,93	1,72	16,34	1,96	16,02	1,88	16,61	2,15

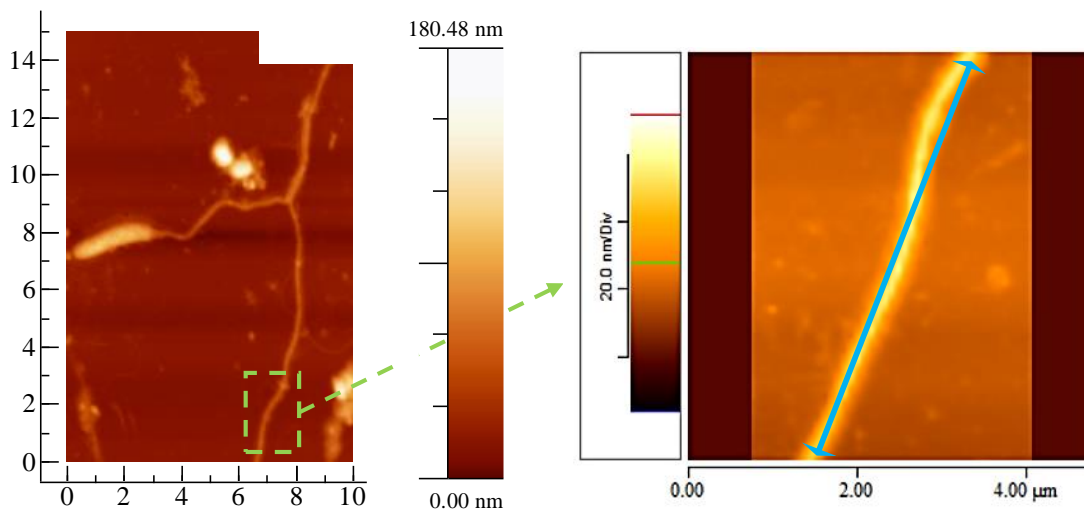
Πίνακας 8.7. Ποσοστιαίες μεταβολές διαμέτρων και υψών ινιδίου ελαστίνης κατά την ακτινοβολήση με ερυθρό φως χαμηλής ισχύος.

Σειρά Ακτινοβολήσεων	Ποσοστιαίες μεταβολές	
	Διαμέτρου	Ύψους
0-1 ^η	2,57%	6,03%
1 ^η -2 ^η	3,02%	5,36%
2 ^η -3 ^η	8,78%	4,84%
3 ^η -4 ^η	5,10%	8,84%
ΣΥΝΟΛΙΚΑ: 0-4^η	20,81%	27,48%

Παρατηρήθηκε από τα πειραματικά δεδομένα μια μικρή αύξηση της διαμέτρου του ινιδίου κατά 2,57% στα πρώτα 3,75min, συνεχίστηκε η άνοδος του ποσοστού κατά 3,02%, 8,78% και 5,10% για τους επόμενους μικρούς χρόνους ακτινοβολήσης. Συνολικά, δηλαδή για χρόνο ακτινοβολήσης 15min διαπιστώθηκε αρκετή αύξηση στη διάμετρο κατά 20,81%. Όσο αφορά το ύψος του ινιδίου ελαστίνης είχε και αυτό αντίστοιχη ανοδική πορεία με το ολικό ποσοστό αύξησης του να φτάνει το 27,48%. Επομένως, η laser ακτινοβολία χαμηλής ισχύος στην περιοχή του ερυθρού επηρέασε αρκετά τόσο τη διάμετρο του ινιδίου ελαστίνης, όσο και το ύψος του.

Επιπροσθέτως, μελετήθηκαν ενδελεχώς και οι τοπογραφικές απεικονίσεις από το AFM για να ελεγχθεί η ορθότητα των μετρήσεων. Αξίζει, λοιπόν, να αναφερθεί ότι μετά από κάθε ακτινοβολήση, άλλαζε και το μήκος του ινιδίου. Επομένως, με κατάλληλες μετρήσεις για τους διαφορετικούς μικρούς χρόνους ακτινοβολήσης επαληθεύτηκε και η κατά μήκος αύξησή του. Στην **Εικόνα 8.6** απεικονίζεται τοπογραφικά με AFM, το ινίδιο ελαστίνης σε εικόνα μεγέθυνσης $10 \times 15 \mu\text{m}$, πριν την ακτινοβολήση με UV, όπου επισημαίνεται και η μέτρηση του μήκους του (*μπλε γραμμή*).

Στον **Πίνακα 8.8.** καταγράφονται οι αντίστοιχες μετρήσεις του, αλλά και οι ποσοστιαίες μεταβολές του.



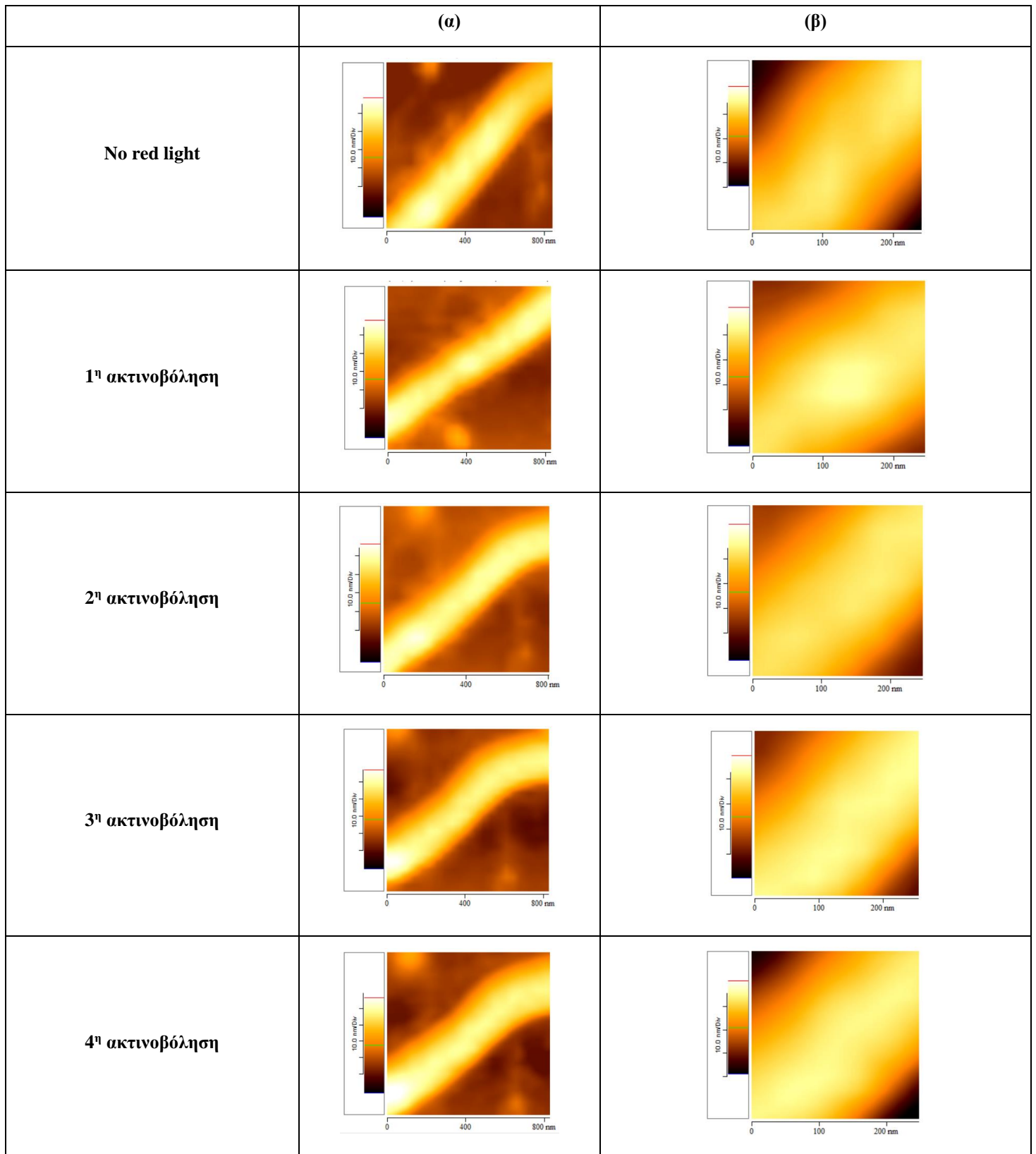
Εικόνα 8.6. Τοπογραφική απεικόνιση AFM ($10 \times 15 \mu\text{m}$) ινιδίου ελαστίνης χωρίς ακτινοβόληση με μεγέθυνση στο **πράσινο διακεκομμένο τμήμα**, όπου επισημαίνεται το μήκος του ινιδίου (**μπλε γραμμή**).

Πίνακα 8.8. Μετρήσεις μηκών ινιδίου και οι ποσοστιαίες μεταβολές τους κατά τη διάρκεια της ακτινοβόλησης με ερυθρό φως.

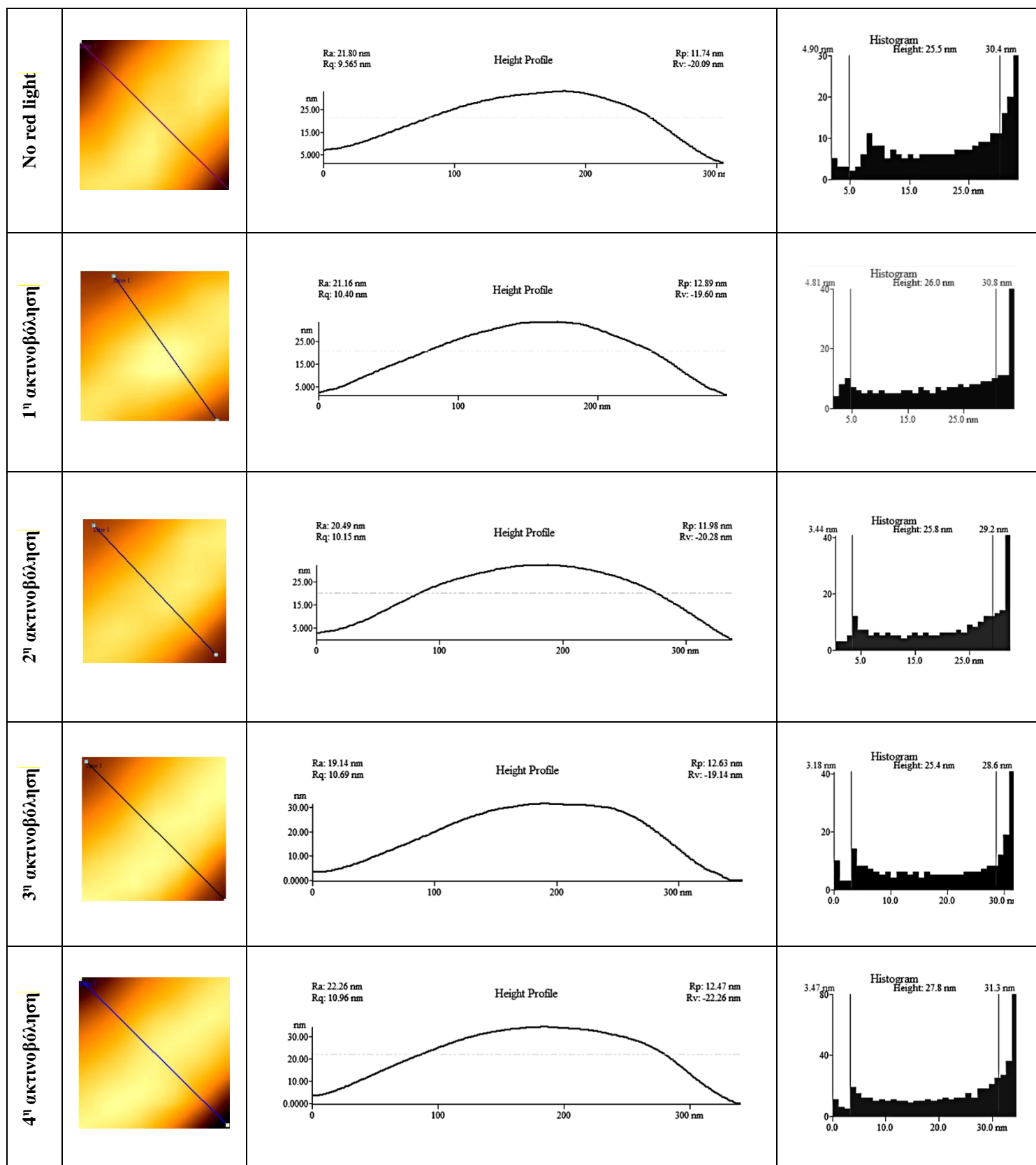
Σειρά ακτινοβολήσεων	0	1η	2η	3η	4η
Μήκος ινιδίου (μm)	5080	5186	5291	5413	5531
		0-1η	1η-2η	2η-3η	3η-4η
Ποσοστιαία μεταβολή		2,09%	2,03%	2,31%	2,18%
ΣΥΝΟΛΙΚΑ (0-4^η ακτινοβόληση)	8,88%				

Παρατηρώντας τον **Πίνακα 8.8** διαπιστώνεται η συνεχόμενη αύξηση του μήκους του ινιδίου ελαστίνης μετά από κάθε κύκλο ακτινοβόλησης. Σε συνολικό επίπεδο η άνοδος του ποσοστού φτάνει περίπου στα 9%.

Ολοκληρώνοντας, το 2^ο μέρος της 1^{ης} κατηγορίας πειραμάτων, παρουσιάζονται οι τοπογραφικές 2D απεικονίσεις AFM τμήματος του ινιδίου ελαστίνης που μελετάται, μεγεθύνσεων $800 \times 800 \text{ nm}$ (**Εικόνα 8.7α**) και $250 \times 250 \text{ nm}$ (**Εικόνα 8.7β**). Επίσης, στην **Εικόνα 8.8** παρατίθενται ενδεικτικά διαγράμματα προφίλ ύψους συγκεκριμένης διαμέτρου με το αντίστοιχο ιστόγραμμα, για όλες τις σειρές ακτινοβολήσεων (0-4^η) με την ερυθρή ακτινοβολία χαμηλής ισχύος.



Εικόνα 8.7. Τοπογραφικές 2D απεικονίσεις AFM ινιδίου ελαστίνης: **α)** 800×800 nm, **β)** 250×250nm, για όλες τις σειρές ακτινοβολήσεων (0-4^η) με την ερυθρή ακτινοβολία χαμηλής ισχύος.

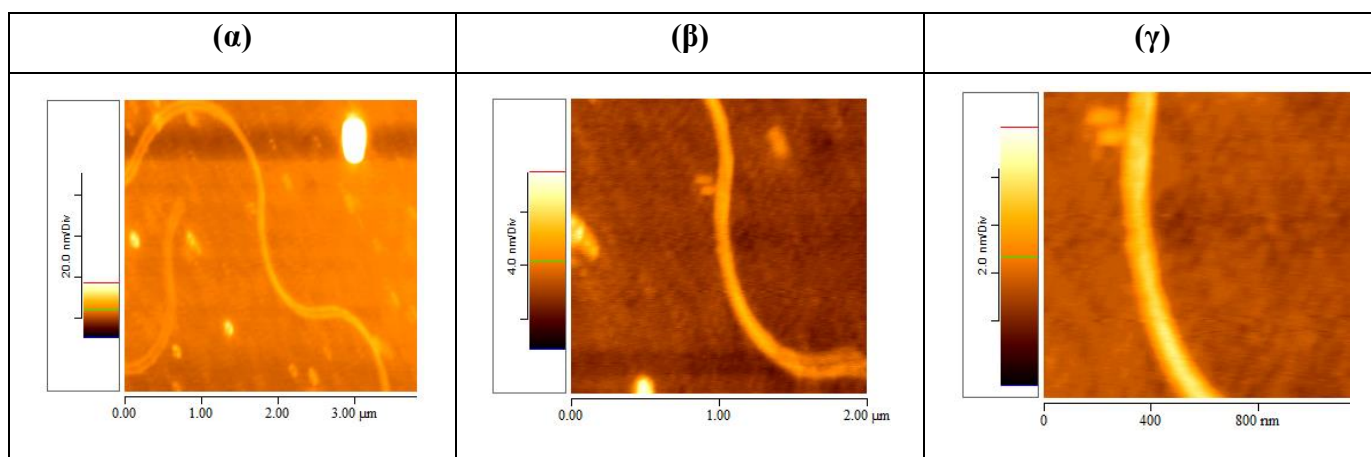


Εικόνα 8.8. Διαγράμματα προφίλ ύψους συγκεκριμένης διαμέτρου με το αντίστοιχο ιστόγραμμα για όλες τις σειρές ακτινοβολήσεων (0-4^η) με την ερυθρή ακτινοβολία χαμηλής ισχύος.

Συμπερασματικά, η διάμετρος, το ύψος και το μήκος του ινιδίου ελαστίνης επηρεάζονται σημαντικά από την έκθεση σε laser ακτινοβολία χαμηλής ισχύος στην περιοχή του ερυθρού. Συγκεκριμένα, οι συνολικές ποσοστιαίες μεταβολές τους στο χρονικό διάστημα των 15min που διήρκεσε η ακτινοβολήση είναι 20,81%, 27,48% και 8,88% αντίστοιχα. Δεν παρατηρείται αλλαγή στη τραχύτητα της επιφάνειας του δείγματος, καθώς διακρίνεται και μια μικρή μείωση της μετά από 15min διακοπτόμενης ακτινοβολίας.

8.2.1.3 Μελέτη της επίδρασης της ερυθρής ακτινοβολίας χαμηλής ισχύος σε νανοϊνίδιο ελαστίνης

Στο 3^ο μέρος της 1^{ης} κατηγορίας πειραμάτων ερευνήθηκε η επίδραση της ερυθρής ακτινοβολίας χαμηλής ισχύος σε νανοϊνίδια ελαστίνης διαφόρων διαστάσεων. Ενδεικτικά παρουσιάζονται τα αποτελέσματα ενός νανοϊνιδίου με μέση τιμή διαμέτρου $147,61 \pm 5,31$ και ύψους $3,82 \pm 0,36$ (Πίνακας 8.9). Το αρχικό βήμα ήταν η απεικόνιση του νανοϊνιδίου με το AFM χωρίς ακτινοβολήση (Εικόνα 8.8), για να γίνεται σωστή σύγκριση με τα επόμενα δείγματα που θα εκτεθούν σε ερυθρή ακτινοβολία.



Εικόνα 8.8. Τοπογραφικές 2D απεικονίσεις AFM νανοϊνιδίου ελαστίνης χωρίς ακτινοβολήση με μεγέθυνση: **α)** $4 \times 4 \mu\text{m}$, **β)** $2 \times 2 \mu\text{m}$ και **γ)** $1,2 \times 1,2 \mu\text{m}$.

Έπειτα, το ίδιο δείγμα ακτινοβολήθηκε με ερυθρή ακτινοβολία χαμηλής ισχύος μήκους κύματος με το πρωτόκολλο που ήδη έχει αναφερθεί για τον 1^ο κύκλο ακτινοβολήσης. Μετά απεικονίστηκε με το AFM τόσο σε 2D όσο και σε 3D τοπογραφικές εικόνες. Στη συνέχεια υπήρξαν η 2^η, η 3^η και η 4^η σειρά ακτινοβολήσεων, όπου επαναλήφθηκε η ίδια ακριβώς πειραματική διαδικασία. Μελετήθηκαν οι δομικές αλλαγές στο νανοϊνίδιο υπό την επίδραση της ερυθρής διακοπτόμενης ακτινοβολίας που διήρκεσε συνολικά 15min. Οι μέσες τιμές και τυπικές αποκλίσεις των πειραματικών μετρήσεων της διαμέτρου και του ύψους του νανοϊνιδίου ελαστίνης παρουσιάζονται στον Πίνακα 8.9, ενώ οι ποσοστιαίες μεταβολές τους στον Πίνακα 8.10.

Πίνακας 8.9. Μέσες τιμές και τυπικές αποκλίσεις διαμέτρων (Δ) και υψών (Υ) νανοϊνιδίου ελαστίνης κατά την ερυθρή ακτινοβολή χαμηλής ισχύος.

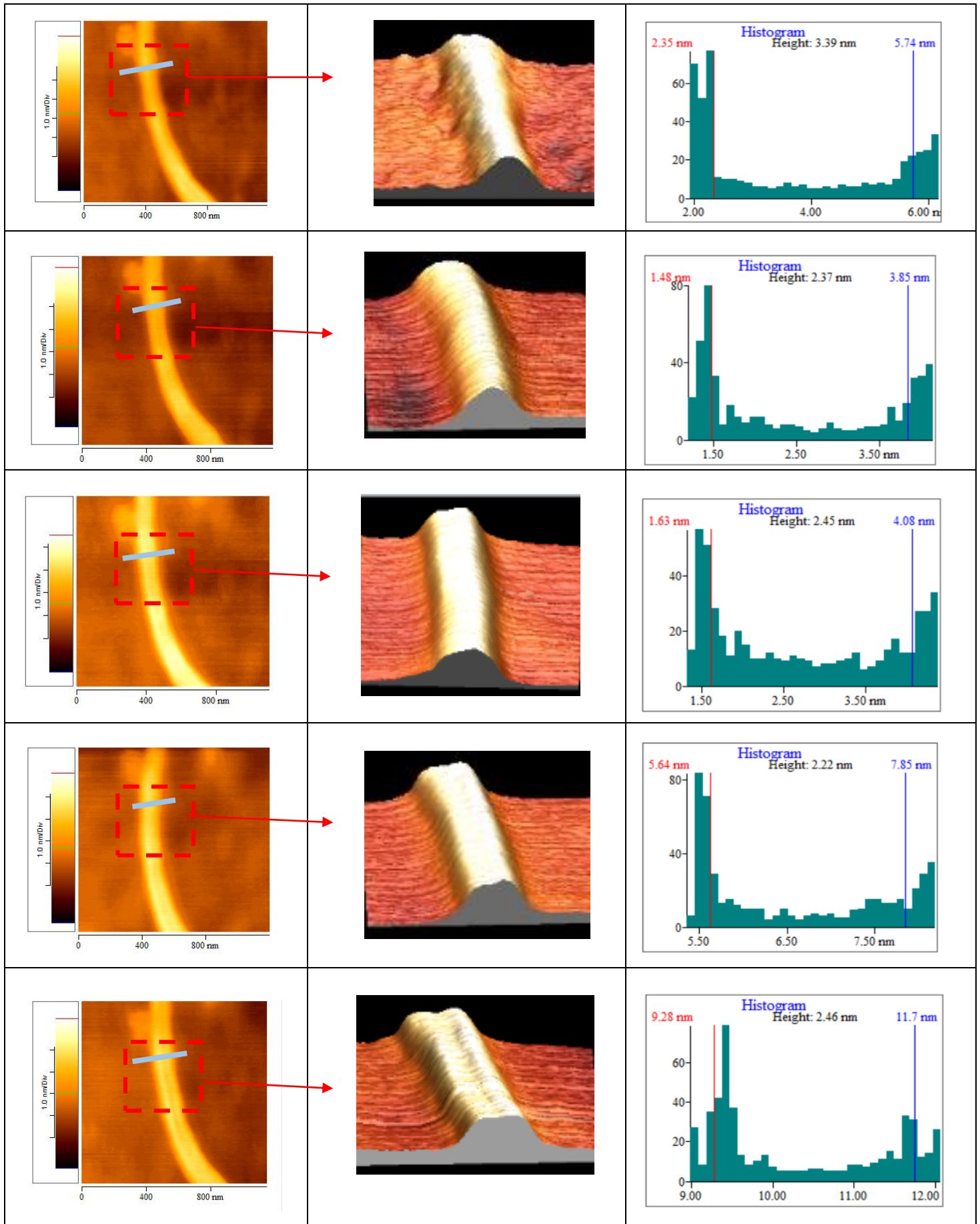
Σειρά ακτινοβολήσεων	0		1 ^η		2 ^η		3 ^η		4 ^η	
	Δ	Υ	Δ	Υ	Δ	Υ	Δ	Υ	Δ	Υ
Μέση τιμή (nm)	147,61	3,82	161,23	3,23	175,30	2,76	191,42	2,45	209,78	2,29
Τυπική απόκλιση (nm)	5,31	0,36	5,74	0,18	5,13	0,39	5,82	0,27	6,05	0,42

Πίνακας 8.10. Ποσοστιαίες μεταβολές διαμέτρων και υψών νανοϊνιδίου ελαστίνης κατά την ερυθρή ακτινοβολή χαμηλής ισχύος.

Σειρά Ακτινοβολήσεων	Ποσοστιαίες μεταβολές	
	Διαμέτρου	Ύψους
0-1 ^η	9,23%	-15,45%
1 ^η -2 ^η	8,73%	-14,55%
2 ^η -3 ^η	9,20%	-11,23%
3 ^η -4 ^η	9,59%	-6,53%
ΣΥΝΟΛΙΚΑ: 0-4^η	42,12%	-40,05%

Παρατηρήθηκε από τα πειραματικά δεδομένα μια αύξηση της διαμέτρου του νανοϊνιδίου κατά 13,62nm στην πρώτη σειρά ακτινοβολήσεων των 3,75min. Σε όλες τις επόμενες σειρές ακτινοβολήσης υπήρξε συνεχής μεγέθυνση της διαμέτρου μέχρι τα 209,78nm. Συνολικά, δηλαδή για χρόνο ακτινοβολήσης 15min διαπιστώθηκε μια μεγάλη αύξηση στη διάμετρο κατά 42,12%. Όσο αφορά το ύψος του νανοϊνιδίου ελαστίνης είχε τελείως διαφορετική μεταβολή από τη διάμετρο. Στα πρώτα 3,75min ερυθρής ακτινοβολήσης παρατηρήθηκε μείωση του ύψους περίπου κατά 0,6nm. Στη συνέχεια, για τους επόμενους μικρούς χρόνους ακτινοβολήσης των 7,5min, 11,25min και 15min, οι ποσοστιαίες μεταβολές είχαν συνεχή μείωση μέχρι που έφτασε τελικά το 40,05%. Επομένως, η ερυθρή ακτινοβολία επηρέασε πάρα πολύ τόσο τη διάμετρο του νανοϊνιδίου ελαστίνης, όσο και ύψος του.

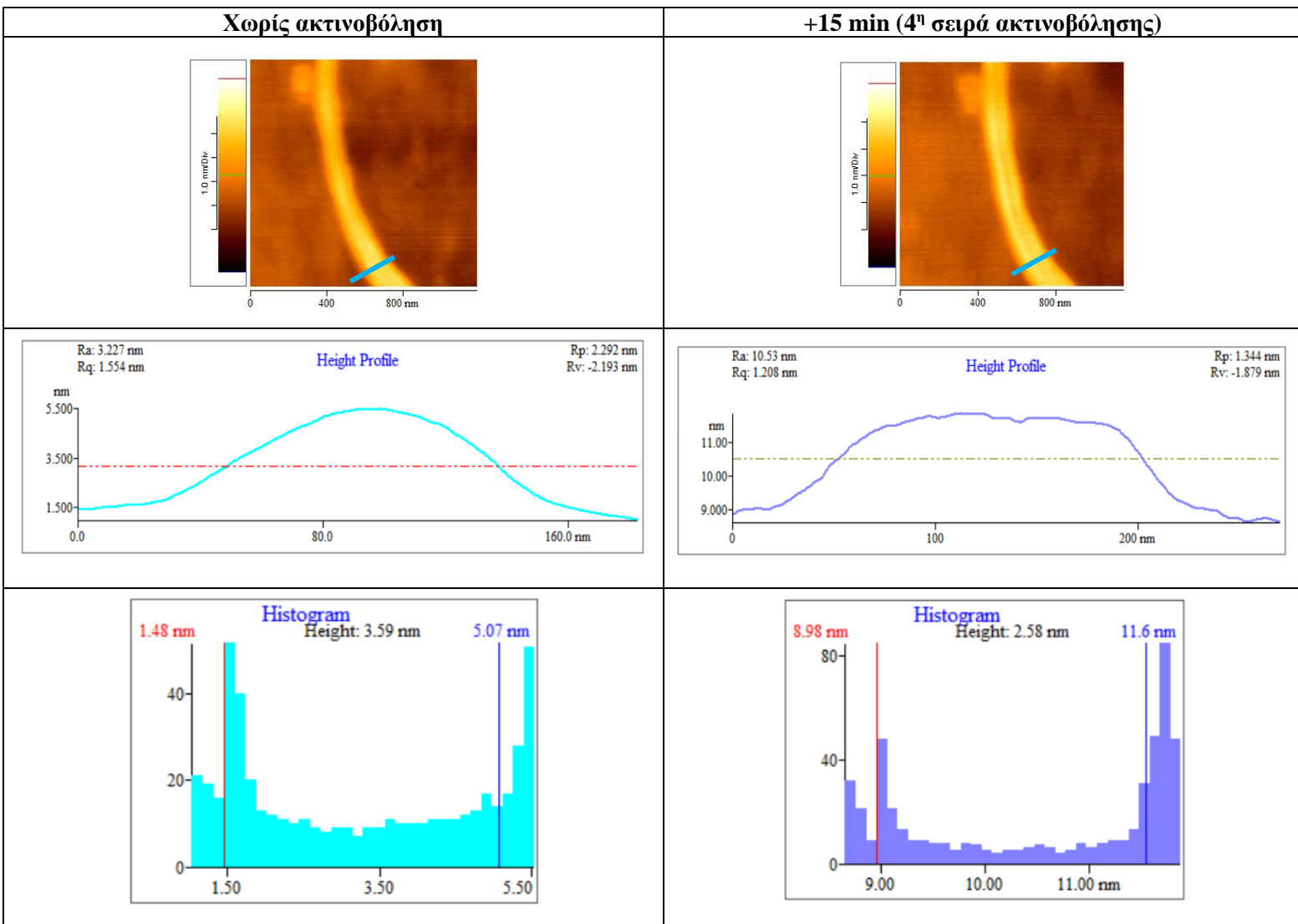
Επιπροσθέτως, μελετήθηκαν οι 2D και 3D τοπογραφικές εικόνες από το AFM, για να ελεγχθεί η ορθότητα των μετρήσεων. Στην **Εικόνα 8.9** απεικονίζεται το νανοϊνίδιο ελαστίνης για όλες τις σειρές ακτινοβολήσης (1^η, 2^η, 3^η και 4^η) με laser ερυθρού φωτός στους αντίστοιχους χρόνους των 3,75min, 7,5min, 11,25min και 15min. Παρουσιάζονται, επίσης, τα ιστογράμματα από το ίδιο σημείο κάθε φορά πάνω στο νανοϊνίδιο για να ελεγχθεί η τραχύτητα της επιφάνειάς του.



Εικόνα 8.9. Τοπογραφικές απεικονίσεις AFM νανοϊνιδίου ελαστίνης για όλες τις σειρές ακτινοβολήσεων (0-4^η) με την ερυθρή ακτινοβολία χαμηλής ισχύος: **α)** 2D (1200×1200nm), **β)** 3D (σε μεγέθυνση 500×500nm), **γ)** Ιστογράμματα της μπλε γραμμής στην επιφάνεια του νανοϊνιδίου.

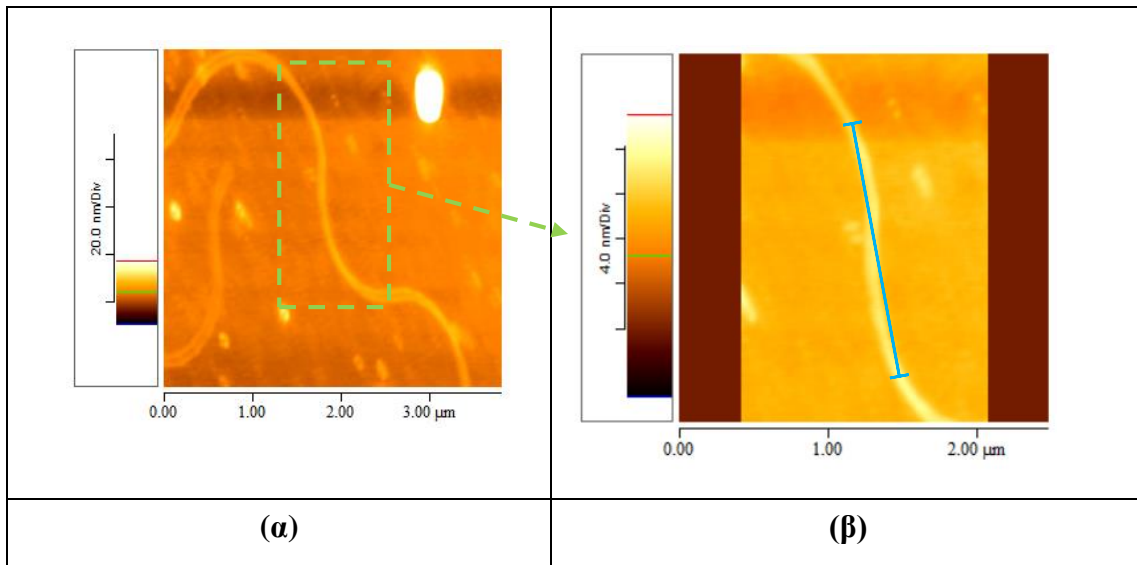
Τα αποτελέσματα των πειραματικών μετρήσεων επαληθεύτηκαν, καθώς με προσεχτική παρατήρηση των 3D τοπογραφικών απεικονίσεων (Εικόνα 8.9.β), φαίνονται οι σημαντικές δομικές αλλαγές στη διάμετρο και στο ύψος του νανοϊνιδίου ελαστίνης. Συγκεκριμένα παρατηρείται με ευκρίνεια η διαπλάτυνση της διαμέτρου και η ελάττωση του ύψους του.

Πολύ σημαντική παρατήρηση στην τελευταία 3D απεικόνιση είναι η *in vitro* ινιδιογένεση 2 νανοϊνιδίων από το αρχικά ένα μελετούμενο νανοϊνίδιο. Από τα ιστογραμμάτα συγκεκριμένου τμήματος της επιφάνειας του νανοϊνιδίου της ελαστίνης (Εικόνα 8.9.γ), είναι ευδιάκριτο ότι δεν έχει υποστεί καμία αλλοίωση το νανοϊνίδιο, αλλά είναι εμφανής και η σμίλευση της επιφάνειας του δείγματος μετά από 15 λεπτά έκθεση σε laser ακτινοβολία χαμηλής ισχύος στην π[εριοχή του ερυθρού. Ως εκ τούτου, παρατίθενται στην Εικόνα 8.10 μια συγκριτική επεξεργασία του μελετούμενο νανοϊνιδίου πριν ακτινοβόληται και μετά από 15 min (4^η ακτινοβόληση) με ερυθρό φως.



Εικόνα 8.10. Συγκριτική απεικόνιση του νανοϊνιδίου χωρίς την ακτινοβόληση (αριστερά) και μετά από 15 min με τη 4^η σειρά ακτινοβόλησης με ερυθρό laser χαμηλής ισχύος: α) Διάγραμμα προφίλ ύψους, β) Ιστογράμματα της μπλε γραμμής στην επιφάνεια του νανοϊνιδίου.

Στη συνέχεια, αξίζει να αναφερθεί ότι μελετήθηκε και το μήκος του νανοϊνιδίου ελαστίνης. Με μετρήσεις για τους διαφορετικούς μικρούς χρόνους ακτινοβολήσης των 3,75min, 7,5min, 11,25min και 15min επαληθεύτηκε η κατά μήκος μείωσή του. Στην **Εικόνα 8.12** απεικονίζεται τοπογραφικά με AFM, το νανοϊνίδιο ελαστίνης σε εικόνα μεγέθυνσης 4×4μm, πριν την ακτινοβολήση με ερυθρό, όπου επισημαίνεται η μέτρηση του μήκους του (*μπλε γραμμή*). Στον **Πίνακα 8.11**, καταγράφονται οι αντίστοιχες μετρήσεις του, αλλά και οι ποσοστιαίες μεταβολές του.



Εικόνα 8.12. Τοπογραφική απεικόνιση AFM νανοϊνιδίου ελαστίνης χωρίς ακτινοβολήση: (α) 4×4μm με μεγέθυνση στο *πράσινο διακεκομένο τμήμα*, όπου (β): επισημαίνεται το μήκος του νανοϊνιδίου (*μπλε γραμμή*).

Πίνακα 8.11. Μετρήσεις μηκών νανοϊνιδίου ελαστίνης και οι ποσοστιαίες μεταβολές τους κατά τη διάρκεια της ακτινοβολήσης με ερυθρή ακτινοβολία.

Σειρά ακτινοβολήσεων	0	1 ^η	2 ^η	3 ^η	4 ^η
Μήκος A νανοϊνιδίου (μm)	2310	2217	2136	2063	1975
	0-1 ^η	1-2 ^η	2-3 ^η	3-4 ^η	
Ποσοστιαία μεταβολή		4,03%	3,65%	3,42%	4,27%
ΣΥΝΟΛΙΚΑ (0-15min)	-14,50%				

Παρατηρώντας τον **Πίνακα 8.11** διαπιστώνεται η συνεχόμενη ελάττωση του μήκους του νανοϊνιδίου ελαστίνης μετά από κάθε κύκλο ακτινοβολήσης. Τα ποσοστά μείωσης κυμάνθηκαν περίπου μεταξύ 3-4% σε κάθε σειρά ακτινοβολήσης με συνολική ελάττωση του μήκους του νανοϊνιδίου κατά 335nm.

Συμπερασματικά, στο 3^ο μέρος της 1^{ης} κατηγορίας πειραμάτων, ερευνήθηκε ότι η διάμετρος, το ύψος και το μήκος του νανοϊνιδίου ελαστίνης επηρεάζονται σημαντικά από την έκθεση του σε ερυθρή ακτινοβολία. Συγκεκριμένα, οι συνολικές ποσοστιαίες μεταβολές τους στο χρονικό διάστημα των 15min που διήρκεσε η UV ακτινοβολήση είναι 42,12%, -40,05% και -14,50% αντίστοιχα.

8.2.1.4 Σύνοψη αποτελεσμάτων της επίδρασης της ερυθρής ακτινοβολίας χαμηλής ισχύος στην ελαστίνη ανάλογα με το μέγεθος της

Ολοκληρώνοντας την 1^η κατηγορία πειραμάτων, διαπιστώθηκε η σημαντική επίδραση της laser ακτινοβολίας χαμηλής ισχύος στην περιοχή του ερυθρού στα μορφολογικά χαρακτηριστικά των ινών, ινιδίων και νανοϊνιδίων για για 4 σειρές ακτινοβολήσης (1^η, 2^η, 3^η, 4^η) με μικρούς χρόνους ακτινοβολήσης 3,75min, 7,5min, 11,25min και 15min αντίστοιχα.

Συγκεντρωτικά παρατίθενται παρακάτω όλα τα πειραματικά αποτελέσματα, όπου στον **Πίνακα 8.12a** παρουσιάζονται συνολικά οι ποσοστιαίες μεταβολές των διαμέτρων, υψών και μηκών των ινών, ινιδίων και νανοϊνιδίων. Στον **Πίνακα 8.12β** φαίνονται οι συνολικές μετρήσεις των αντίστοιχων μέσων τιμών τους.

Επιπροσθέτως, απεικονίζονται σε κατάλληλα διαγράμματα οι μεταβολές των δομικών χαρακτηριστικών τους σε συνάρτηση με τον χρόνο έκθεσης στη laser ακτινοβολία χαμηλής ισχύος στην περιοχή του ερυθρού (**Εικόνα 8.13**). Διαπιστώνεται, η διαπλάτυνση της διαμέτρου, καθώς μεγαλώνουν οι διαστάσεις από ένα σε ινίδιο και τελικά σε νανοϊνίδιο, αλλά και σε συνάρτηση με το πέρασμα του χρόνου ακτινοβολήσης.

Η αύξηση του ύψους στις περιπτώσεις των ινών και των ινιδίων είναι σχεδόν ίδια και περίπου ίση με 27%. Αντίθετα, στο νανοϊνίδιο παρατηρείται μια τεράστια ελάττωση του ύψους του κατά 40% περίπου.

Επίσης, οι μεταβολές του μήκους ποικίλουν. Όσο αυξάνεται ο χρόνος έκθεσης στην ερυθρή ακτινοβολία, επιμηκύνονται λίγο τα ινίδια κατά 9% περίπου, ενώ οι ίνες περισσότερο κατά 14% περίπου. Αξιοσημείωτη είναι η αντίστοιχη πτώση του ποσοστού στο μήκος του νανοϊνιδίου κατά 14,5%.

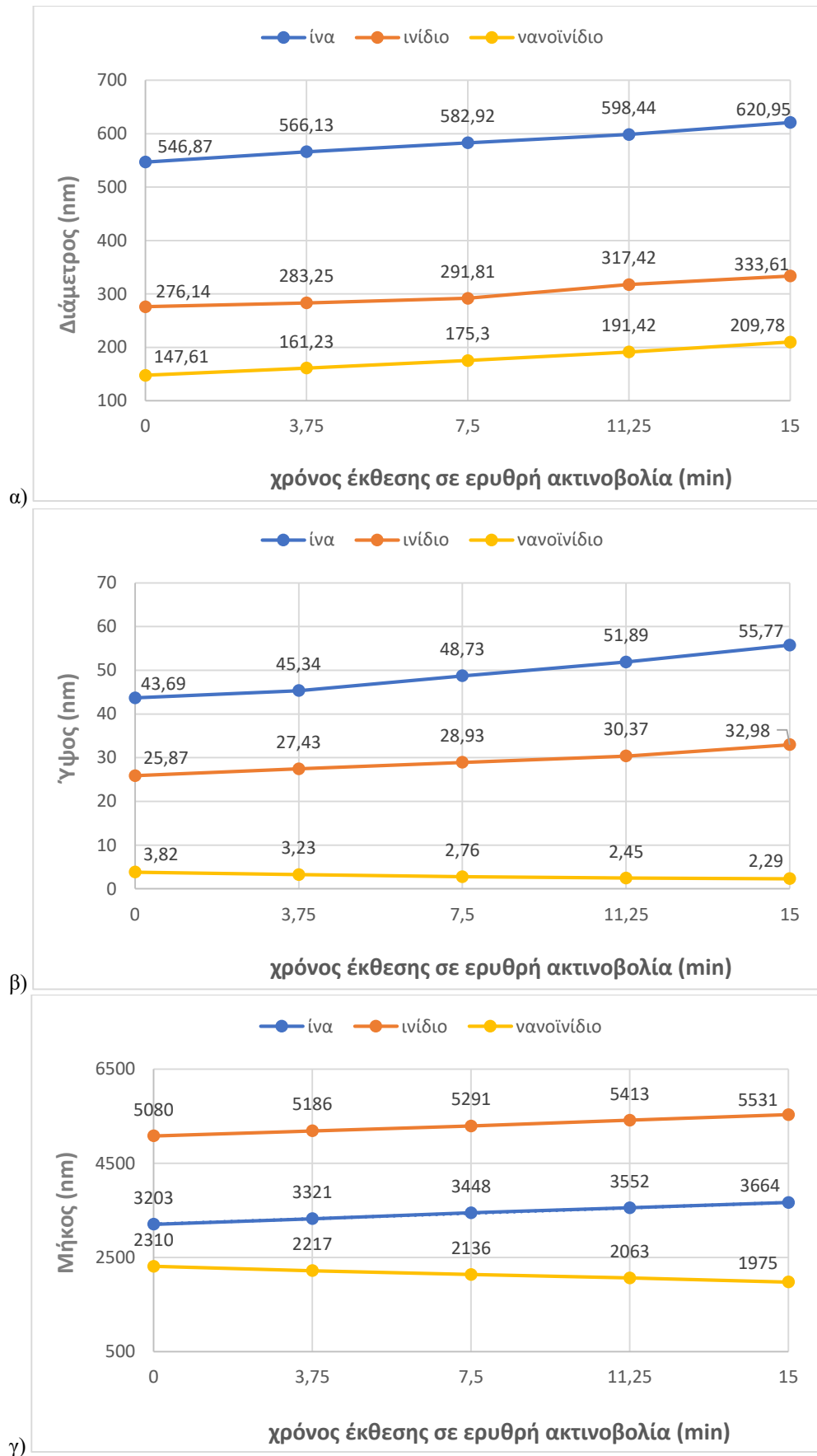
Πίνακας 8.12. Συνολικά αποτελέσματα.

(α) Συνολικές ποσοστιαίες μεταβολές διαμέτρων (Δ), υψών (Υ), μηκών (Μ) ίνας/ινιδίου/ναοϊνιδίου ελαστίνης κατά την laser ακτινοβολήση χαμηλής ισχύος με ερυθρό φως

%	ίνα			ινίδιο			Νανοϊνίδιο		
	Δ	Υ	Μ	Δ	Υ	Μ	Δ	Υ	Μ
0-1 ^η	3,52	3,79	3,68	2,57	6,03	2,09	9,23	-15,45	-4,03
1-2 ^η	2,96	7,46	3,82	3,02	5,36	2,03	8,73	-14,55	-3,65
2-3 ^η	2,67	6,48	3,01	8,78	4,84	2,31	9,20	-11,23	-3,42
3-4 ^η	3,78	7,47	3,15	5,10	8,84	2,18	9,59	-6,53	-4,27
(ΣΥΝΟΛΙΚΑ) 0-15min	13,55	27,65	14,33	20,81	27,48	8,88	42,12	-40,05	-14,50

(β) Συνολικές μετρήσεις διαμέτρων, υψών, μηκών ίνας/ινιδίου/ναοϊνιδίου ελαστίνης κατά την laser ακτινοβολήση χαμηλής ισχύος με ερυθρό φως

χρόνος	Διάμετρος (nm)			Ύψος (nm)			Μήκος (nm)		
	ίνα	ινίδιο	ναοϊνίδιο	ίνα	ινίδιο	ναοϊνίδιο	ίνα	ινίδιο	ναοϊνίδιο
0	546,87	276,14	147,61	43,69	25,87	3,82	3203	5080	2310
1 ^η	566,13	283,25	161,23	45,34	27,43	3,23	3321	5186	2217
2 ^η	582,92	291,81	175,30	48,73	28,93	2,76	3448	5291	2136
3 ^η	598,44	317,42	191,42	51,89	30,37	2,45	3552	5413	2063
4 ^η	620,95	333,61	209,78	55,77	32,98	2,29	3664	5531	1975



Εικόνα 8.13. Διαγράμματα: α) Διαμέτρου, β) Ύψους, γ) Μήκους σε συνάρτηση με τους μικρούς χρόνους έκθεσης σε ερυθρή ακτινοβολία για ίνα/ινίδιο/νανοϊνίδιο.

8.2.2 Μελέτη της επίδρασης ερυθρής ακτινοβολίας χαμηλής ισχύος στα ινίδια ελαστίνης ανάλογα με τον χρόνο ακτινοβολήσης.

Στη συνέχεια έχουμε την 2^η κατηγορία πειραμάτων, όπου μελετήθηκαν ινίδια ελαστίνης υπό την επίδραση ερυθρής ακτινοβολίας χαμηλής ισχύος με διαφορετικούς χρόνους ακτινοβολήσης. Το πρωτόκολλο που εκτελέστηκε ήταν ακριβώς το ίδιο που παρουσιάστηκε και στην 1^η κατηγορία πειραμάτων. Αρχικά, ήταν η απεικόνιση του ινιδίου με το AFM χωρίς ακτινοβολία και στη συνέχεια μετά από κάθε κύκλο ερυθρής ακτινοβολήσης γινόταν απεικόνιση του ίδιου ινιδίου ελαστίνης για να είναι έγκυρη η σύγκριση των δομικών και τοπογραφικών χαρακτηριστικών του.

8.2.2.1 Μελέτη της επίδρασης ερυθρής ακτινοβολίας χαμηλής ισχύος στα ινίδια ελαστίνης σε μικρούς χρόνους ακτινοβολήσης.

Στο 1^ο μέρος της 2^{ης} κατηγορίας πειραμάτων, μελετήθηκε η επίδραση της ερυθρής ακτινοβολίας χαμηλής ισχύος με μικρή χρονική διάρκεια σε ινίδια. Το συγκεκριμένο μέρος του πειράματος έχει ήδη αναφερθεί στην **παράγραφο 8.2.1.2** με ινίδιο διαμέτρου $276,14 \pm 16,48$ και ύψους $25,87 \pm 2,03$ να ακτινοβολείται για χρόνους 3,75min, 7,5min, 11,25min και 15min. Ως εκ τούτου, οι μέσες τιμές και τυπικές αποκλίσεις των πειραματικών μετρήσεων της διαμέτρου και του ύψους του ινιδίου ελαστίνης έχουν παρουσιαστεί στον **Πίνακα 8.6** και οι ποσοστιαίες μεταβολές τους στον **Πίνακα 8.7**

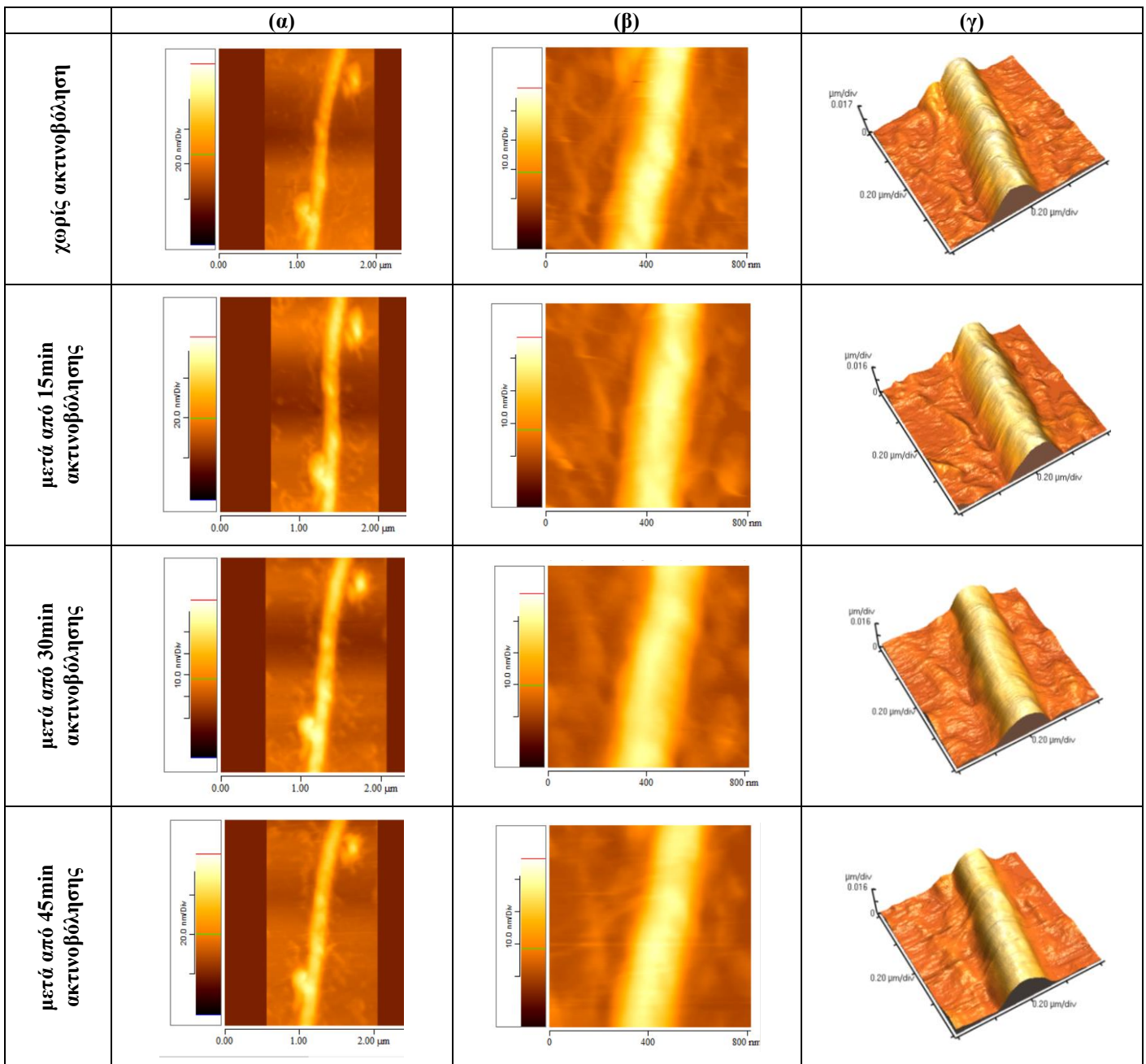
8.2.2.2 Μελέτη της επίδρασης ερυθρής ακτινοβολίας χαμηλής ισχύος στα ινίδια ελαστίνης σε μεσαίους χρόνους ακτινοβολήσης.

Στο 2^ο μέρος της 2^{ης} κατηγορίας πειραμάτων, μελετήθηκαν ινίδια ελαστίνης της ερυθρής ακτινοβολίας χαμηλής ισχύος με μεσαία χρονική διάρκεια. Συγκεκριμένα, ο κάθε κύκλος ακτινοβολήσης ήταν 15 λεπτά και συνολικά υπήρξαν 3 κύκλοι. Ενδεικτικά, παρουσιάζεται ένα ινίδιο ελαστίνης διαμέτρου $261,00 \pm 15,32$ nm και ύψους $23,67 \pm 3,19$ nm (**Εικόνα 8.14**). Οι ποσοστιαίες μεταβολές των μέσων τιμών διαμέτρων και υψών του παρουσιάζονται στον **Πίνακα 8.13**.

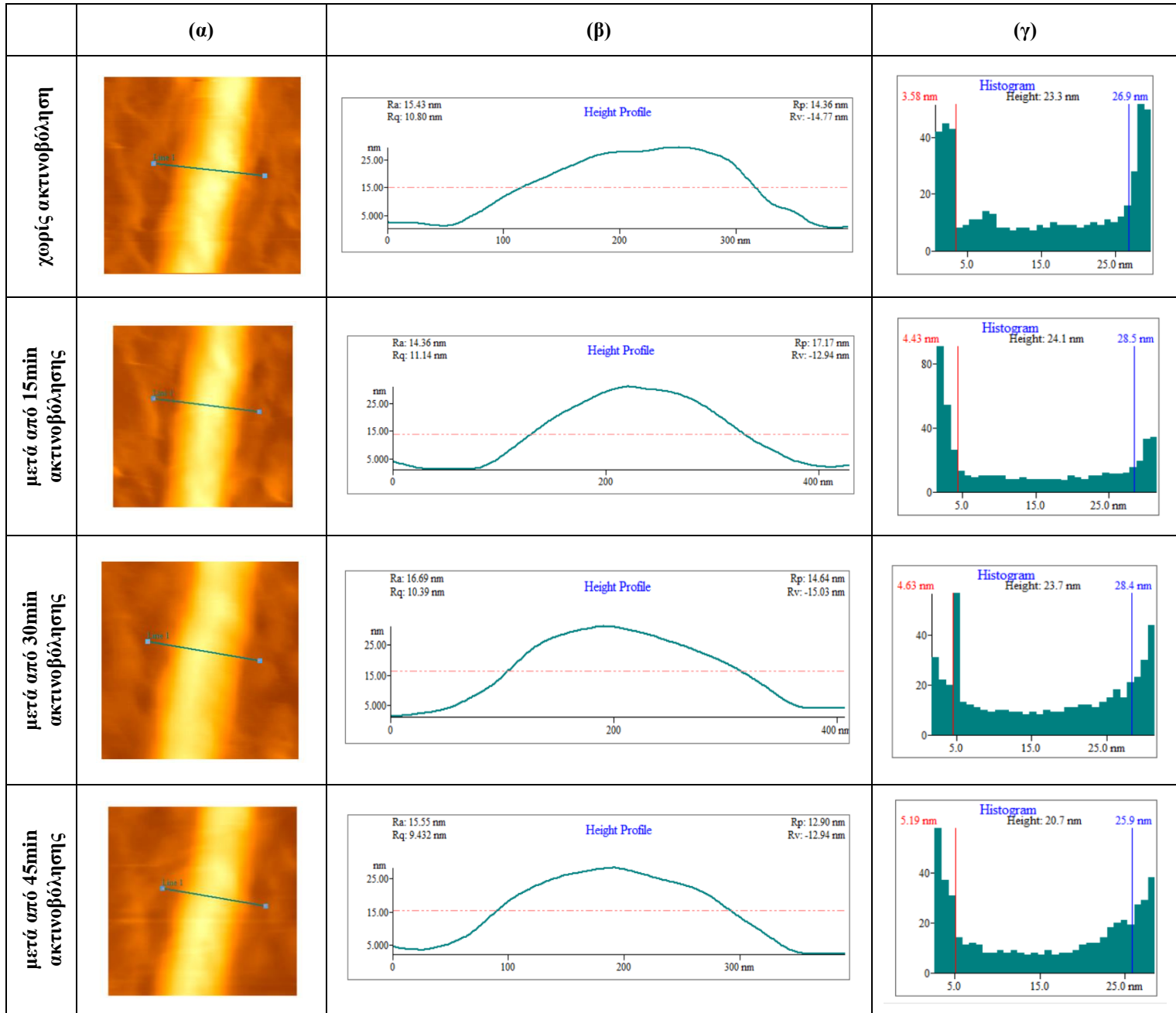
Πίνακας 8.13. Ποσοστιαίες μεταβολές μέσων τιμών διαμέτρων και υψών ινιδίου ελαστίνης σε μεσαίους χρόνους ακτινοβολήσης.

Ποσοστιαίες μεταβολές	Διάμετρος	Ύψος
0-15min	11,09%	3,53%
15-30min	1,82%	2,07%
30-45 min	1,98%	6,78%
Συνολικά (0-45min)	15,34%	12,84%

Παρατηρείται από τις πειραματικές μετρήσεις, η αύξηση της διαμέτρου κατά 11% περίπου στα πρώτα συνεχόμενα 15 λεπτά ακτινοβολήσης, ενώ στους επόμενους 2 κύκλους ακτινοβολήσης των 30 και 45 min υπήρξε ένα μικρό ποσοστό αύξησης κατά 2% περίπου σε κάθε κύκλο. Επίσης, για τη μεταβολή του ύψους έχουμε συνολική άνοδο κατά 12,8%, με τα επιμέρους ποσοστά να μοιράζονται σε 3,5%, 2,1% και 6,8% σε κάθε σειρά ακτινοβολήσης των 15min. Αξίζει να σημειωθεί ότι οι μεταβολές τόσο της διαμέτρου όσο και του ύψους του ινιδίου ελαστίνης τεκμηριώνονται με τις τοπογραφικές 2D και 3D απεικονίσεις τους σε διαφορετικές μεγεθύνσεις (Εικόνα 8.14), αλλά και με τα διαγράμματα προφίλ ύψους και τα αντίστοιχα ιστογράμματα τους (Εικόνα 8.15).



Εικόνα 8.14. Τοπογραφική 2D απεικόνιση AFM ινιδίου ελαστίνης κατά την έκθεση σε ερυθρό φως χαμηλής ισχύος σε χρόνους ακτινοβολήσης 0, 15, 30 και 45 min με μεγεθύνσεις: (α) 1,5×3μm, (β) 0,8×0,8μm και (γ) 3D απεικόνιση του ίδιου ινιδίου.



Εικόνα 8.15. α) Τοπογραφική απεικόνιση AFM ($0,8 \times 0,8 \mu\text{m}$) ινιδίου ελαστίνης κατά την έκθεση σε ερυθρό φως χαμηλής ισχύος σε χρόνους ακτινοβολήσης 0, 15min, 30min και 45min, με τα αντίστοιχα: (β) διάγραμμα προφίλ ύψους και γ) ιστόγραμμα.

Διαπιστώνεται από τις 2D και 3D απεικονίσεις του ινιδίου, αλλά και από τα διαγράμματα προφίλ ύψους με τα αντίστοιχα ιστογράμματα ότι δεν έχουμε κάποια αλλοίωση στην επιφάνεια του δείγματος μετά από τους συγκεκριμένους κύκλους ακτινοβολήσης με τους μεσαίους χρόνους έκθεσης στο ερυθρό φως. Αντίθετα, φαίνεται και μια εξομάλυνση σε τυχόν ατέλειες του ινιδίου στο πέρασμα του χρόνου, αλλά και μείωση της τραχύτητας της επιφάνειας του.

8.2.2.3 Μελέτη της επίδρασης ερυθρής ακτινοβολίας χαμηλής ισχύος στα ινίδια ελαστίνης σε μεγάλους χρόνους ακτινοβολήσης.

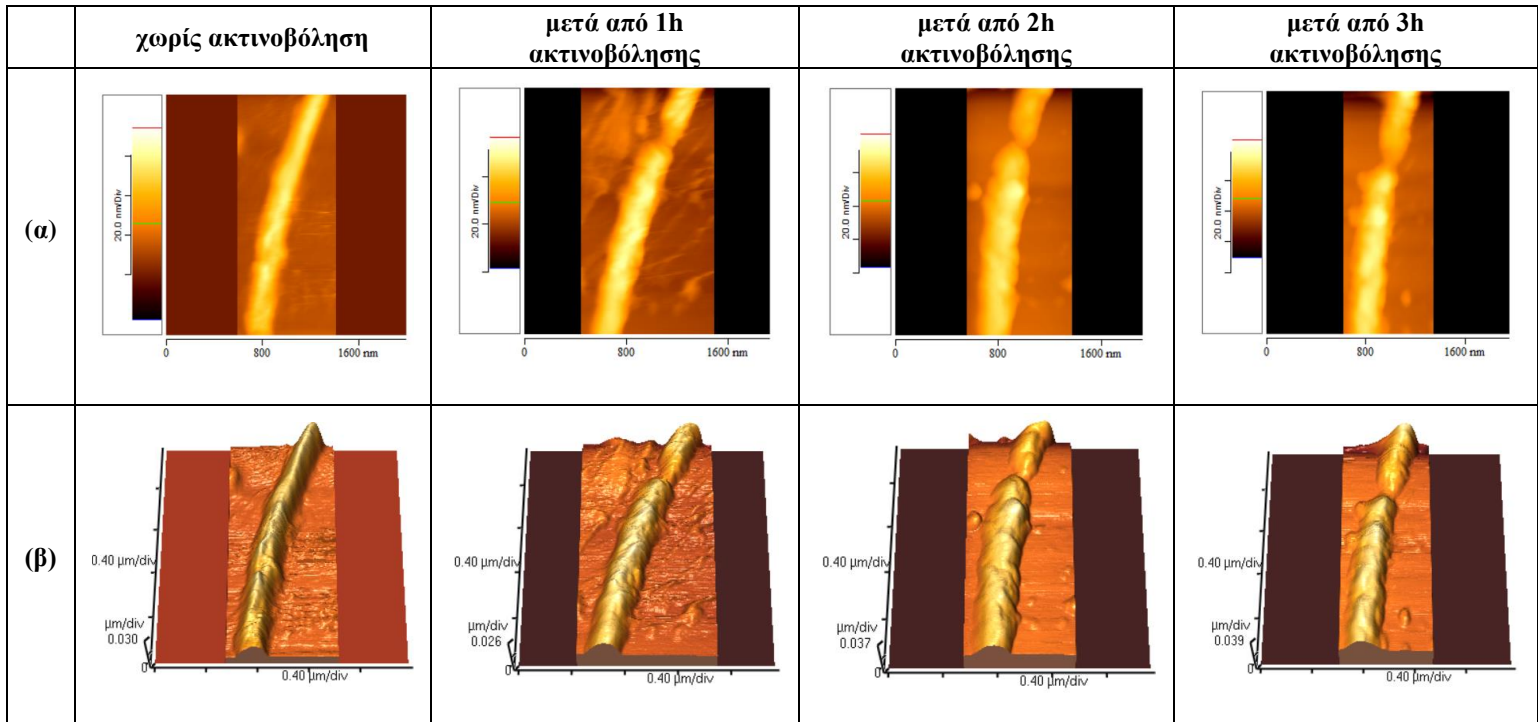
Στο 3^ο μέρος της 2^{ης} κατηγορίας πειραμάτων, ερευνήθηκε πως επιδρούν οι μεγάλοι χρόνοι έκθεσης της ερυθρής ακτινοβολίας χαμηλής ισχύος στα ινίδια ελαστίνης. Ενδεικτικά, παρουσιάζεται ένα ινίδιο διαμέτρου $267,31 \pm 16,65 \text{ nm}$ και ύψους $40,22 \pm 3,24 \text{ nm}$, όπου ακτινοβολήθηκε διακοπτόμενα για 1h σε 3 κύκλους ακτινοβολήσης. Οι ποσοστιαίες μεταβολές διαμέτρων και υψών του ινιδίου ελαστίνης παρουσιάζονται στον **Πίνακα 8.14**.

Πίνακας 8.14. Ποσοστιαίες μεταβολές διαμέτρων και υψών του ινιδίου ελαστίνης σε μεγάλους χρόνους ακτινοβολήσης (1h, 2h, 3h).

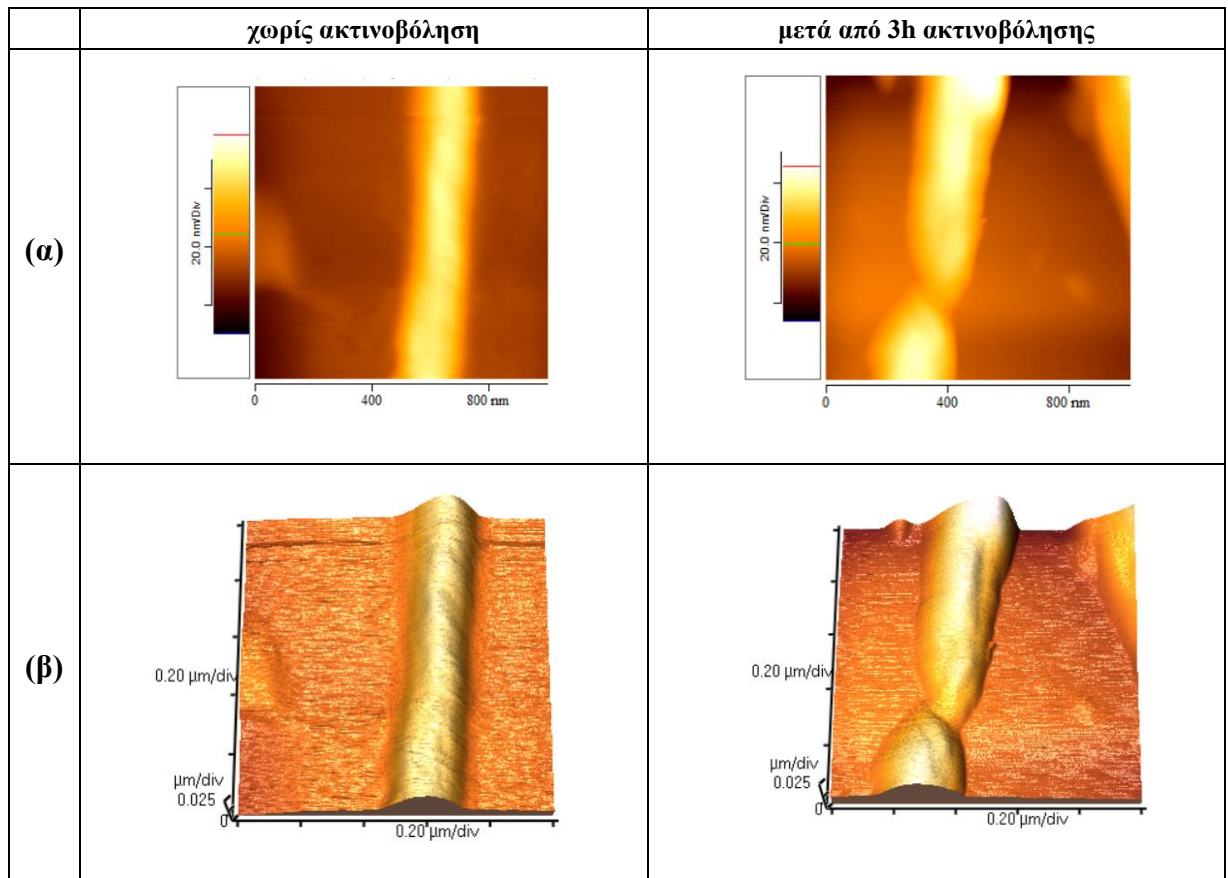
Χρόνοι ακτινοβολήσης	Διάμετρος	Ύψος
0-1h	5,32%	-10,14%
1h-2h	7,54%	-8,26%
2h-3h	6,11%	-7,94%
Συνολικά (0-3h)	20,18%	-24,11%

Παρατηρείται, λοιπόν, η μεγάλη επίδραση της ερυθρής ακτινοβολίας στις δομικές ιδιότητες του ινιδίου. Από την πρώτη κιόλας ώρα συνεχόμενης ακτινοβολήσης με laser χαμηλής ισχύος στην περιοχή του ερυθρού είναι εμφανής η μεγάλη μείωση στο ύψος του ινιδίου. Όταν οι χρόνοι έκθεσης στην ακτινοβολία αυξάνονται σε 2h και 3 ώρες, το ινίδιο αλλοιώνεται σε τέτοιο βαθμό, που οι ακριβείς μετρήσεις των διαμέτρων και των υψών δεν είναι τόσο δυσδιάκριτες. Σε μια πληθώρα όμως επαναλαμβανόμενων πειραμάτων έγινε μια αξιόλογη ποσοτικοποίηση αυτών των μεταβολών.

Συγκεκριμένα, το ινίδιο με τη ακτινοβολήση των 3ωρών, είχε την αρκετά μεγάλη αύξηση του 20,18% στη διάμετρο του και την αντίστοιχη πολύ μεγάλη μείωση στο ύψος του κατά 24,11%. Επίσης, τεκμηριώνονται με σαφήνεια τα παραπάνω και από τις τοπογραφικές τους 2D και 3D απεικονίσεις με το AFM πριν και μετά την ακτινοβολήση στις **Εικόνες 8.16, 8.17** αντίστοιχα. Στις οποίες είναι εμφανής η πολύ μεγάλη αλλοίωση τόσο στην επιφάνεια των νανοϊνιδίων, όσο και στην ευρύτερη επιφάνεια του δείγματος, μετά από τις τόσο πολλές ώρες έκθεσης στην ερυθρή ακτινοβολία.



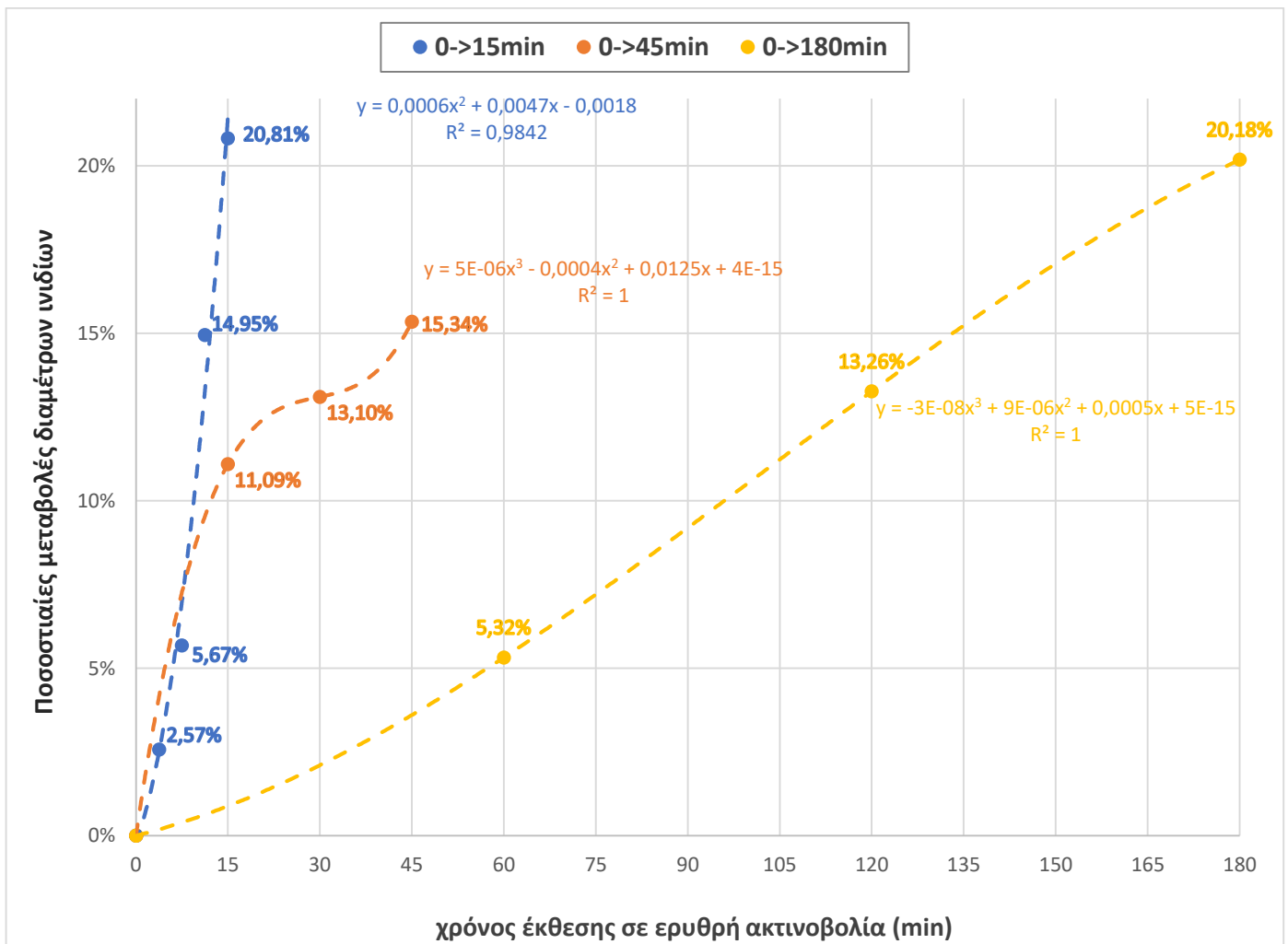
Εικόνα 8.16. Τοπογραφικές (α) 2D και (β) 3D απεικονίσεις AFM ινιδίου ελαστίνης χωρίς ακτινοβολία και μετά από 1h, 2h και 3h με ερυθρή ακτινοβολία χαμηλής ισχύος.



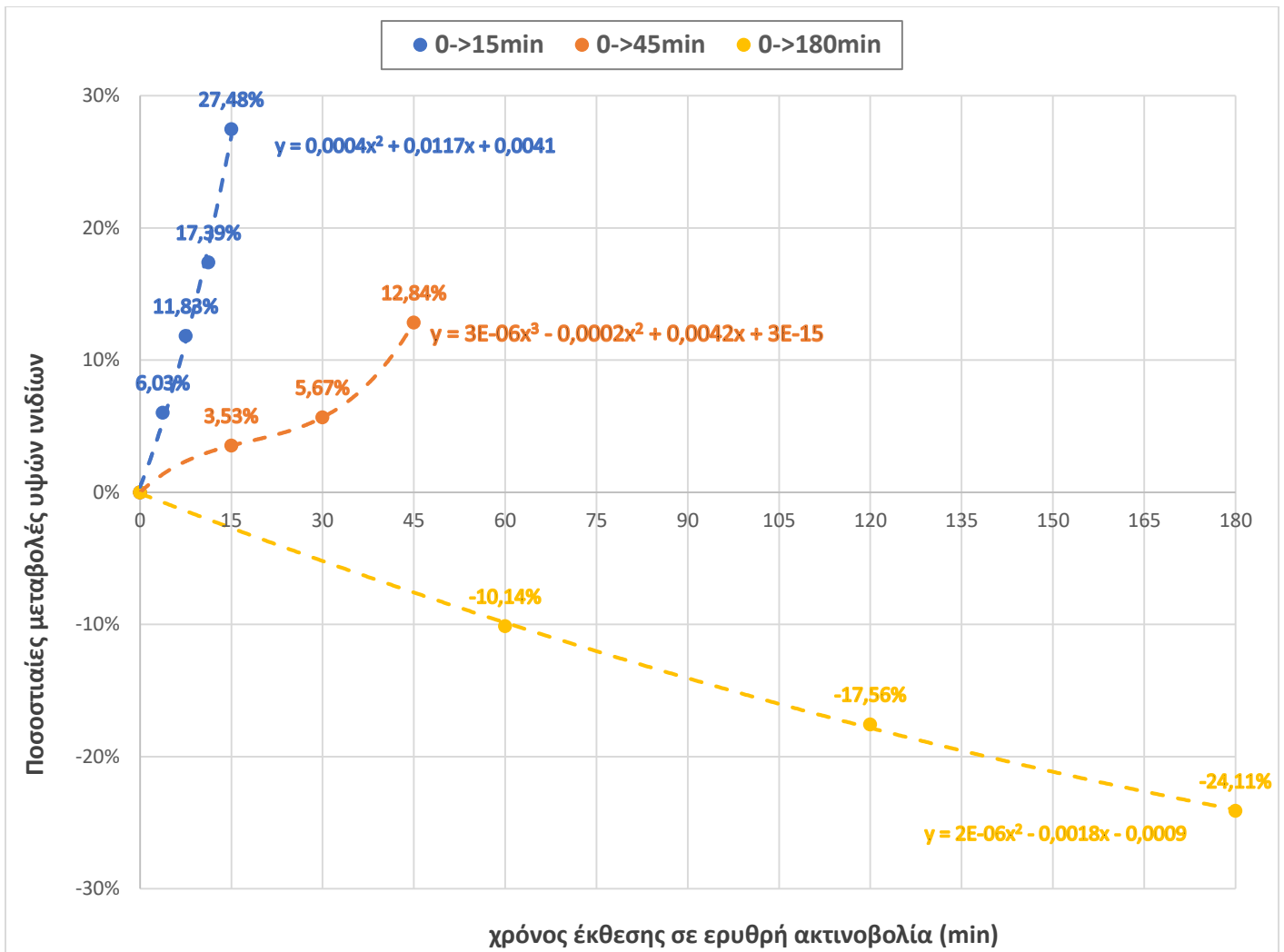
Εικόνα 8.17. Συγκριτική απεικόνιση του ινιδίου χωρίς ακτινοβολία και μετά από 3h ακτινοβολίας με ερυθρό laser χαμηλής ισχύος: (α) Τοπογραφικές 2D απεικονίσεις (1x1)μm, (β) Τοπογραφικές 3D απεικονίσεις του ινιδίου.

8.2.2.4 Σύνοψη αποτελεσμάτων της επίδρασης της ερυθρής ακτινοβολίας χαμηλής ισχύος στην ελαστίνη ανάλογα με το χρόνο έκθεσης της.

Ολοκληρώνοντας την 2^η κατηγορία πειραμάτων, διαπιστώθηκε η μεγάλη επίδραση της ακτινοβολίας laser χαμηλής ισχύος στην περιοχή του ερυθρού στα ινίδια για χρόνους ακτινοβολίας μικρής, μεσαίας και μεγάλης διάρκειας. Συγκεντρωτικά, οι μεταβολές (σε ποσοστό) των δομικών χαρακτηριστικών (διάμετροι και ύψη) των ινιδίων σε συνάρτηση με το χρόνο έκθεσής τους στην ερυθρή ακτινοβολία απεικονίζονται με κατάλληλα διαγράμματα στις **Εικόνες 8.18** και **8.19** αντίστοιχα. Τέλος, παρατίθενται όλα τα πειραματικά αποτελέσματα, όπου παρουσιάζονται στον **Πίνακα 8.15** συνολικά οι ποσοστιαίες μεταβολές των διαμέτρων και υψών των ινιδίων ελαστίνης.



Εικόνα 8.18. Διάγραμμα ποσοστιαίων μεταβολών διαμέτρων ινιδίων σε συνάρτηση με τους χρόνους έκθεσης στην ερυθρή ακτινοβολία.



Εικόνα 8.19. Διάγραμμα ποσοστιαίων μεταβολών υψών ινιδίων σε συνάρτηση με τους χρόνους έκθεσης κατά την ερυθρή ακτινοβολία.

Πίνακας 8.15. Συνολικές ποσοστιαίες μεταβολές διαμέτρων (Δ), υψών (Υ) ινιδίου ελαστίνης για μικρούς/μεσαίους/μεγάλους χρόνους έκθεσης ερυθρής ακτινοβολίας.

Χρόνοι έκθεσης σε UV	Διάρκειας	Δ	Υ
0->15 min	Μικρής (4 φορές x 3,75 min)	20,81%	27,48%
0->45 min	Μεσαίας (3 φορές x 15 min)	15,34%	12,84%
0->3 h	Μεγάλης (3 φορές x 1h)	20,18%	-24,11%

Διαπιστώνεται ότι αναλόγως με τον χρόνο έκθεσης του ινιδίου στην ακτινοβολία laser χαμηλής ισχύος στην περιοχή του ερυθρού άλλαξε ο τρόπος αύξησης της διαμέτρου του. Στους μικρούς χρόνους ακτινοβολήσης φαίνεται μια απότομη και μεγάλη αλλαγή στη διαπλάτυνση του ινιδίου ελαστίνης που φτάνει το 20,81% με παραβολική προσέγγιση. Αύξηση που αγγίζει τελικά το 15,34% παρατηρείται και στη διάμετρο του ινιδίου κατά την έκθεση του στην ακτινοβολία με τους χρόνους μεσαίας διάρκειας, με μια προσέγγιση που έχει μορφή τριτοβάθμιας εξίσωσης. Στην τελευταία σειρά πειραμάτων με τους μεγάλους χρόνους ακτινοβολήσης παρατηρείται μια τελείως διαφορετική άνοδος της διαμέτρου του ινιδίου ελαστίνης. Η οποία έχει μια πιο ομαλή αύξηση κατά την αντίστοιχη χρονική διάρκεια που φτάνει τελικά το ποσοστό των 20,18%, όπου και αυτή η εξίσωση είναι 3^{ου} βαθμού με κατάλληλη προσέγγιση από τη γραμμή τάσης. Όλες οι εξισώσεις με τις αντίστοιχες γραμμές τάσης αποτυπώνονται στη γραφική της **Εικόνας 8.18**.

Επιπροσθέτως, το ύψος του ινιδίου ελαστίνης έχει παραπλήσια μεταβολή με τη διάμετρο του στις περιπτώσεις με μικρούς και μεσαίους χρόνους ακτινοβολήσης. Από 0 έως 15 min έχει μια πολύ μεγάλη και απότομη αύξηση κατά 27,48% με τις επιμέρους τιμές της να έχουν μια παραβολική προσέγγιση. Από 0 έως 45min έχει μια άνοδο της τάξης του 13%, αλλά με πολυωνυμική προσέγγιση που αντιστοιχεί σε εξίσωση 3^{ου} βαθμού. Αντίθετα, από τα πειράματα με τη μεγάλη χρονική διάρκεια ακτινοβολήσης των 3 ωρών, παρατηρείται μεγάλη μείωση του ύψους του ινιδίου ελαστίνης, που αγγίζει τελικά το ποσοστό των 24,11%. Τα παραπάνω τεκμηριώνονται από τις εξισώσεις που παρουσιάζονται στο διάγραμμα της **Εικόνας 8.19**. Συμπερασματικά, η αλλοίωση των δομικών και μορφολογικών ιδιοτήτων των νανοϊνιδίων μεγαλώνει, καθώς αυξάνεται ο χρόνος έκθεσης τους στο ερυθρό φως.

8.3 Συζήτηση αποτελεσμάτων

Το 8^ο κεφάλαιο της διδακτορικής διατριβής επικεντρώθηκε στη μελέτη της επίδρασης της ακτινοβολίας laser χαμηλής ισχύος στην περιοχή του ερυθρού στις ίνες, στα ινίδια και στα νανοϊνίδια της ελαστίνης. Τα αποτελέσματα υποδεικνύουν ότι το ερυθρό φως προκαλεί σημαντικές μεταβολές στις τοπογραφικές ιδιότητες της ελαστίνης, ανάλογα με τις διαστάσεις της, δηλαδή αν είναι ίνα, ινίδιο ή νανοϊνίδιο, αλλά και ανάλογα με τους χρόνους έκθεσής της στο ερυθρό φως.

Τα laser χαμηλής ισχύος έχουν ποικίλες εφαρμογές στην ιατρική με κύρια χρήση την επούλωση των πληγών. Η συγκεκριμένη ακτινοβολία δρα στους ιστούς αναπλαστικά, αναλγητικά και με μεγάλη αντιφλεγμονώδη ικανότητα. Η χρήση αυτών των laser σε κλινικό επίπεδο παρουσιάζει ανοδική τάση, έτσι ώστε για να επιτευχθεί μείωση του χρόνου επούλωσης σε ιστούς που είναι κατεστραμμένοι ή σε πληγές που είναι ανοιχτές για μεγάλα χρονικά διαστήματα [278, 279].

Η θεραπεία που χρησιμοποιείται αυτή η ακτινοβολία, η LLLT, είναι μια ταχέως αναπτυσσόμενη τεχνολογία, που χρησιμοποιείται για τη θεραπεία πολλών καταστάσεων που απαιτούν διέγερση της επούλωσης, ανακούφιση από τον πόνο και

τη φλεγμονή και την αποκατάσταση της εύρυθμης λειτουργίας των ιστών σε μακροσκοπική κλίμακα [280, 281]. Συγκεκριμένα, η LLLT έχει ευεργετικά αποτελέσματα στις ρυτίδες, τις ουλές ακμής, τις υπερτροφικές ουλές και την επούλωση εγκαυμάτων. Μπορεί να μειώσει τη βλάβη από την υπεριώδη ακτινοβολία τόσο ως θεραπεία όσο και ως προφύλαξη. Η μη επεμβατική φύση και η σχεδόν πλήρης απουσία παρενεργειών ενθαρρύνει περαιτέρω δερματολογικές δοκιμές [192, 193, 223].

Η LLLT θεραπεία, όμως δεν είναι πλήρως αποσαφηνισμένη στον τρόπο επίδρασης του φωτός σε μοριακό επίπεδο και είναι ακόμα υπό διερεύνηση [185, 188, 189, 282, 283]. Έχει μελετηθεί ότι για την επούλωση πληγών η κατάλληλη πυκνότητα ενέργειας είναι περίπου μεταξύ 1 έως 4 J/cm² [284]. Στα πλαίσια αυτής της Διδακτορικής Διατριβής οι δόσεις που χρησιμοποιήθηκαν ήταν της τάξης των δόσεων που έχουν χρησιμοποιηθεί σε προηγούμενες μελέτες με θετικά αποτελέσματα στην επούλωση πληγών [184, 285]. Επίσης, προηγούμενες έρευνες έχουν παρουσιάσει ότι το χρησιμοποιούμενο μήκος κύματος ή κοντινά σε αυτό είναι κατάλληλα για θετικά αποτελέσματα [286]. Έχει μελετηθεί ότι η ακτινοβολία στη περιοχή του ερυθρού επιταχύνει και βελτιώνει τη λειτουργία των τραυματισμένων τενόντων αν εφαρμοστεί στην αρχή της επούλωσης μιας πληγής [211]. Η LLLT λειτουργεί θεραπευτικά σε ανθρώπους με νόσο Crohn, αλλά και σε ογκολογικούς ασθενείς που λόγω των χημειοθεραπειών, εμφανίζουν έλκη κυρίως στην στοματική περιοχή [287, 288].

Πιο συγκεκριμένα, στην 1^η κατηγορία πειραμάτων μελετήθηκε η επίδραση της ακτινοβολίας laser χαμηλής ισχύος στην περιοχή του ερυθρού στις δομικές ιδιότητες της ελαστίνης ανάλογα με το μέγεθος της σε ίνα, ινίδιο και νανοϊνίδιο, αλλά για συγκεκριμένους χρόνους ακτινοβολήσης μικρής διάρκειας. Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι η ακτινοβολία επηρέαζε τη διάμετρο με αυξητική τάση, καθώς οι διαστάσεις της ίνας μίκραιναν, ενώ μεγάλη άνοδος είχαν και οι τιμές των υψών των ινών και των ινιδίων. Τα συγκεκριμένα αποτελέσματα έχουν πολύ μεγάλη σημασία, καθώς διαπιστώνεται πλέον και πειραματικά σε νανοεπίπεδο ότι η ακτινοβολία laser στην περιοχή του ερυθρού μπορεί να οδηγήσει σε ανάπλαση ινών. Η πολύ σημαντική πειραματική ανακάλυψη έρχεται στο τέλος της 1^{ης} κατηγορίας πειραμάτων, όπου παρατηρήθηκε η *in vitro* δημιουργία 2 νανοϊνιδίων από αρχικά 1 νανοϊνίδιο μετά από διακοπόμενη ακτινοβολήση 15min.

Στη 2^η κατηγορία πειραμάτων μελετήθηκε η επίδραση της ακτινοβολίας laser χαμηλής ισχύος στην περιοχή του ερυθρού στις δομικές ιδιότητες ινιδίων ελαστίνης ανάλογα με τους χρόνους ακτινοβολήσης από λεπτά έως ώρες. Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι η έκθεση σε μικρούς χρόνους ακτινοβολήσης που έφταναν έως τα 15min, επηρέζαν άμεσα και θετικά τις διαστάσεις στου ινιδίου, καθώς υπήρχε σημαντική αύξηση τόσο στη διάμετρο, όσο και στο ύψος του. Επίσης, αξιωσημείωτο είναι η μη αλλοίωση της επιφάνειας του ινιδίου στους ίδιους χρόνους. Το σημαντικό αυτό αποτέλεσμα, δείχνει ότι η LLLT μπορεί να χρησιμοποιηθεί ως τρόπος για ελεγχόμενες αλλαγές σε ινίδια από ελαστίνη που βρίσκονται σε πληθώρα ιστών.

Και στις δύο μεγάλες κατηγορίες στις οποίες χωρίστηκε το 8^ο κεφάλαιο αυτής της διδακτορικής διατριβής είναι σαφές η μεγάλη επίδραση της ευθρής ακτινοβολίας στην ελαστίνη. Γεγονός που μπορεί να τεκμηριωθεί από τα φωτόνια που απορροφώνται από μιτοχονδριακά χρωμοφόρα στα κύτταρα του δέρματος. Έπειτα η ροή του αίματος

αυξάνεται και ενεργοποιούνται τα βλαστοκύτταρα από τα οποία επηρεάζεται και η ελαστίνη, όπου επιτρέπεται η ελαστογέννεση της, οπότε και υπάρχει αυξημένη επισκευή και επούλωση των ιστών.

Αξιοσημείωτο είναι ότι οι μεταβολές στα ινίδια ελαστίνης δεν οφείλονται σε θερμικά φαινόμενα, καθώς η αύξηση της θερμοκρασίας κατά τη διάρκεια των ακτινοβόλησεων ήταν περίπου 0,9°C. Τα αποτελέσματα της παρούσας μελέτης παρέχουν καινοτόμα στοιχεία για το μηχανισμό αλληλεπίδρασης της ελαστίνης με την ερυθρή ακτινοβολία.

8.4 Συμπεράσματα

Η ακτινοβολία laser χαμηλής ισχύος στην περιοχή του ερυθρού χρησιμοποιείται τα τελευταία χρόνια ως μια τεχνική αποκατάστασης φθαρμένων ιστών. Στη παρούσα διδακτορική διατριβή, αποδεικνύεται ότι αυτή η ακτινοβολία μεταβάλλει σημαντικά τις δομικές ιδιότητες της ελαστίνης σε επίπεδο νανοκλίμακα. Συγκεκριμένα, τα χαρακτηριστικά των ινιδίων βελτιώθηκαν στους μικρούς χρόνους ακτινοβόλησης, ενώ προκλήθηκαν σημαντικές αλλαγές στις διαστάσεις των ινιδίων λόγω της αυξανόμενης δόσης της ερυθρής ακτινοβολίας. Ως εκ τούτου, η ακτινοβολία αυτή μπορεί να χρησιμοποιηθεί σαν τεχνική (μη επεμβατική) για αποκατάσταση τραυματισμένων ή γηρασμένων ιστών, αλλά και ως επιστημονικό πρωτόκολλο ελεγχόμενης μεταβολής των ιδιοτήτων των ινιδίων των ιστών. Συμπερασματικά, η συγκεκριμένη Διδακτορική Διατριβή, στην οποία μελετήθηκε η επίδραση της ακτινοβολίας laser χαμηλής ισχύος στην περιοχή του ερυθρού σε δείγματα ελαστίνης, τόσο ανάλογα με το μέγεθος της ίνας ελαστίνης, όσο και το χρόνο ακτινοβόλησής της, αποτελεί ένα ακόμα σημαντικό βήμα για την καλύτερη κατανόηση των μηχανισμών της αλληλεπίδρασης της ερυθρής ακτινοβολίας με τους ιστούς σε νανοκλίμακα.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 9.

ΣΥΝΔΥΑΣΤΙΚΗ ΑΝΑΠΤΥΞΗ ΛΕΠΤΩΝ ΥΜΕΝΙΩΝ ΕΛΑΣΤΙΝΗΣ/ΚΟΛΛΑΓΟΝΟΥ

Οι πρωτεΐνες ελαστίνης και κολλαγόνου είναι κύρια συστατικά της εξωκυττάριας μήτρας πολλών οργάνων. Η παρουσία δικτύων ελαστίνης και κολλαγόνου και οι σχετικές ιδιότητές τους σε διαφορετικούς ιστούς, είναι μερικοί από τους λόγους για να μελετηθούν σύνθετα υλικά κολλαγόνου και ελαστίνης για χρήση στη μηχανική ιστών. Στο τελευταίο κεφάλαιο της διδακτορικής διατριβής έγινε μελέτη για την εύρεση της κατάλληλης αναλογίας μεταξύ της ελαστίνης και κολλαγόνου για την σύνθεση κατάλληλου μητρικού διαλύματος για ανάπτυξη λεπτών υμενίων από ινίδια ελαστίνης και κολλαγόνου χρησιμοποιώντας απεικονιστικές μεθόδους AFM. Μελετήθηκαν οι διαφοροποιήσεις στα μεγέθη των ινιδίων, τόσο δομικά όσο και μορφολογικά, αλλά και η τραχύτητα της επιφάνειάς τους. Τα αποτελέσματα παρουσιάζονται με τοπογραφικές απεικονίσεις, με διαγράμματα προφίλ ύψους και τραχύτητας, αλλά και με ιστογράμματα. Αποδεικνύεται η παρουσία τόσο της ελαστίνης όσο και του κολλαγόνου σε μορφή ινιδίων στα λεπτά υμένια που δημιουργήθηκαν.

9.1 Πρωτόκολλα προετοιμασίας δειγμάτων ελαστίνης/κολλαγόνου

Χρησιμοποιήθηκαν συγκεκριμένα πρωτόκολλα τα οποία επιτρέπουν την απεικόνιση και τον τοπογραφικό χαρακτηρισμό λεπτών υμενίων από ινίδια ελαστίνης και κολλαγόνου με χρήση AFM.

9.1.1 Δημιουργία μητρικού διαλύματος ελαστίνης

Ελαστίνη από συνδετικό ιστό αυχένα βοοειδούς (E1625, Sigma-Aldrich) αναμίχθηκε με δις απεσταγμένο νερό. Το μητρικό εναιώρημα ελαστίνης που δημιουργήθηκε είχε συγκέντρωση 1% w/v (δηλαδή 10mg/ml). Για την παρασκευή του συγκεκριμένα χρησιμοποιήθηκαν τα πρωτόκολλα που παρουσιάστηκαν στην παράγραφο 5.1.

9.1.2 Δημιουργία μητρικού διαλύματος κολλαγόνου

Κολλαγόνο Τύπου I από αγίλλειο τένοντα βοοειδούς (Fluka 27662) αναμίχθηκε με οξικό οξύ (CH_3COOH 0,5M). Το μητρικό διάλυμα κολλαγόνου που δημιουργήθηκε είχε συγκέντρωση 0,8% w/v (δηλαδή 8mg/ml). Επιλέχθηκε το συγκεκριμένο πρωτόκολλο, καθώς είναι επιστημονικά αποδεκτή αυτή η τιμή συγκέντρωσης για ινιδιογένεση κολλαγόνου [35, 143, 246-248].

9.1.3 Δημιουργία μητρικού διαλύματος ελαστίνης/κολλαγόνου

Τα μητρικά διαλύματα ελαστίνης και κολλαγόνου αναμίχθηκαν με αναλογίες 1:1 και 1:2. Το κάθε μητρικό διάλυμα ελαστίνης/κολλαγόνου που προέκυψε, ομογενοποιήθηκε στις 24.000rpm (Homogenizer IKAT18 Basic) και αποθηκεύτηκε στους 20°C για 14 ημέρες. Επιλέχθηκε το συγκεκριμένο πρωτόκολλο, καθώς ο χρόνος των 14 ημερών είναι ο ελάχιστος για να υπάρξει πλήρη ινιδιογένεση, τόσο από τη μεριά της ελαστίνης, όσο και από του κολλαγόνου [34, 35, 143]. Μελετήθηκαν οι αναλογίες ελαστίνης/κολλαγόνου ως 1:1 και 1:2 αντίστοιχα, λόγω της συχνότερης εμφάνισης αυτών των αναλογιών σε αρκετούς ιστούς [54, 289-291].

9.1.4 Προετοιμασία δειγμάτων ελαστίνης/κολλαγόνου

Από το κάθε μητρικό διάλυμα ελαστίνης/κολλαγόνου (αναλογίας 1:1 και 1:2) που δημιουργήθηκε, 10μL τοποθετήθηκαν πάνω σε λεπτό φύλλο μίκα (διαμέτρου 9,9mm, Ted Pella, Product No:50, Pelco). Στη συνέχεια, πραγματοποιήθηκε φυγοκέντριση 40sec στις 6000 rpm (WS-400B-6NPP/LITE Laurel Tecnologiew spin coater). Έπειτα ξηράθηκαν στον αέρα, σε θερμοκρασία δωματίου και μετά χρησιμοποιήθηκαν για απεικόνιση στο AFM.

9.1.5 Απεικόνιση δειγμάτων ελαστίνης/κολλαγόνου με χρήση AFM

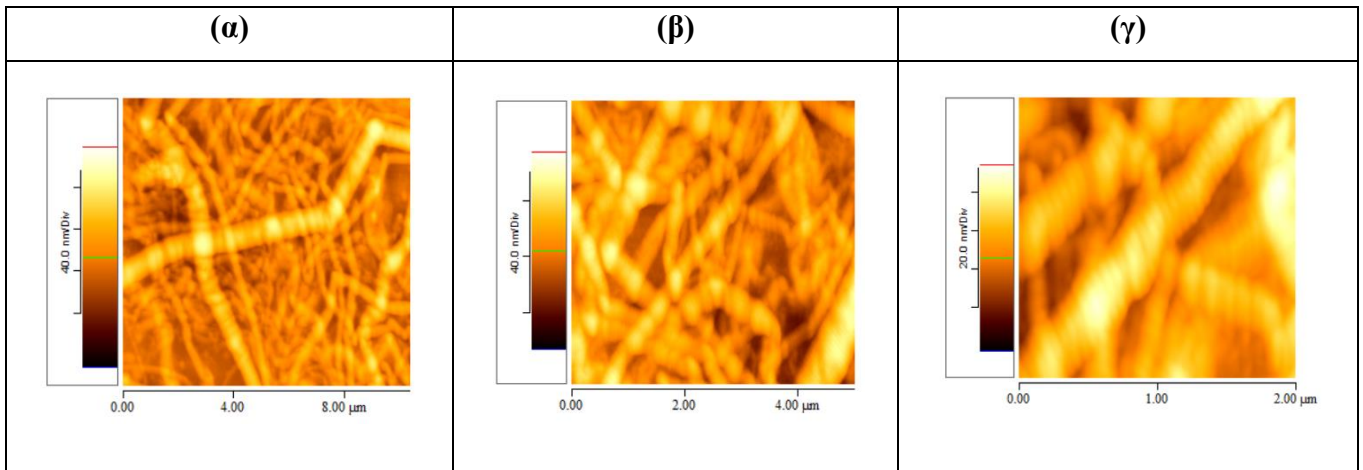
Η ταυτόχρονη απεικόνιση σε νανοεπίπεδο των ινιδίων ελαστίνης/κολλαγόνου πραγματοποιήθηκε με το AFM (CP II) με τη μέθοδο contact mode. Η μέθοδος αυτή χρησιμοποιείται ευρέως για την απεικόνιση βιολογικών δειγμάτων με προβόλους με μικρές σταθερές ελατηρίου ($k < 1\text{N/m}$). Συγκεκριμένα, χρησιμοποιήθηκαν οι πυραμιδικές ακίδες (MLCT) που παρουσιάστηκαν στην **παράγραφο 5.2.1 (Πίνακας 5.1)**, με ακτίνα καμπυλότητας 20 nm σε προβόλους σχήματος V και σταθερά ελατηρίου 0.6N/m. Η επιλογή προβόλου με μικρή σταθερά ελατηρίου ήταν σκόπιμη, διότι πρόβoλοι με υψηλή σταθερά ελατηρίου μπορούν να προκαλέσουν μόνιμη «ζημιά» στο δείγμα (να το χαράξουν ή να το μετακινήσουν). Όλα τα πειράματα πραγματοποιήθηκαν σε περιβάλλον αέρα σε θερμοκρασία $20 \pm 2^\circ\text{C}$ και σχετική υγρασία $40 \pm 3\%$. Η επεξεργασία των εικόνων πραγματοποιήθηκε όπως παρουσιάστηκε στην **παράγραφο 5.2.2 (Κεφάλαιο 5)**.

9.2 Αποτελέσματα

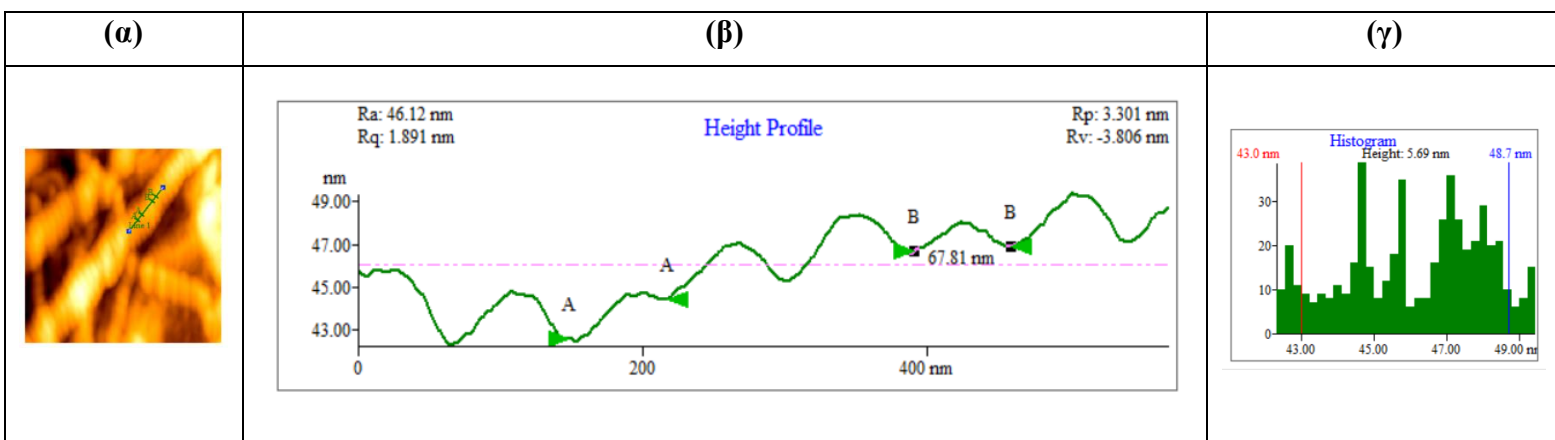
Μελετήθηκαν διάφορα σημεία της επιφάνειας του δείγματος ελαστίνης/κολλαγόνου με αναλογίες 1:1 και 1:2, για να βρεθεί η βέλτιστη περιοχή προς διερεύνηση. Ελήφθησαν αρκετές τοπογραφικές απεικονίσεις AFM για τη μελέτη της ανάπτυξης λεπτών υμενίων ελαστίνης/κολλαγόνου και παρατίθενται οι πιο αντιπροσωπευτικές.

9.2.1 Δείγματα αναφοράς ινιδίων ελαστίνης και κολλαγόνου.

Αρχικά, με το πρωτόκολλο που παρουσιάστηκε παραπάνω για τη σύνθεση του διαλύματος κολλαγόνου αναπτύχθηκαν λεπτά υμένα με βάση το κολλαγόνο. Παρατίθενται οι τοπογραφικές απεικονίσεις ινιδίων κολλαγόνου ως εικόνες αναφοράς, για περαιτέρω σύγκρισή τους με τις αντίστοιχες απεικονίσεις με τα λεπτά υμένα του μικτού διαλύματος ελαστίνης/κολλαγόνου. Στην **Εικόνα 9.1** παρουσιάζονται οι τοπογραφικές απεικονίσεις AFM μεγεθύνσεων 10x10, 5x5 και 2x2μm. Στην τελευταία είναι εμφανής η χαρακτηριστική D-band περιοδικότητα των 67nm στα πλήρως σχηματισμένα ινίδια κολλαγόνου. Στην **Εικόνα 9.2** αποδεικνύεται αυτή η τιμή στα 67,81nm με το διάγραμμα προφίλ ύψους που έχει επισημανθεί με πράσινο σε συγκεκριμένο τμήμα του ινιδίου του κολλαγόνου.

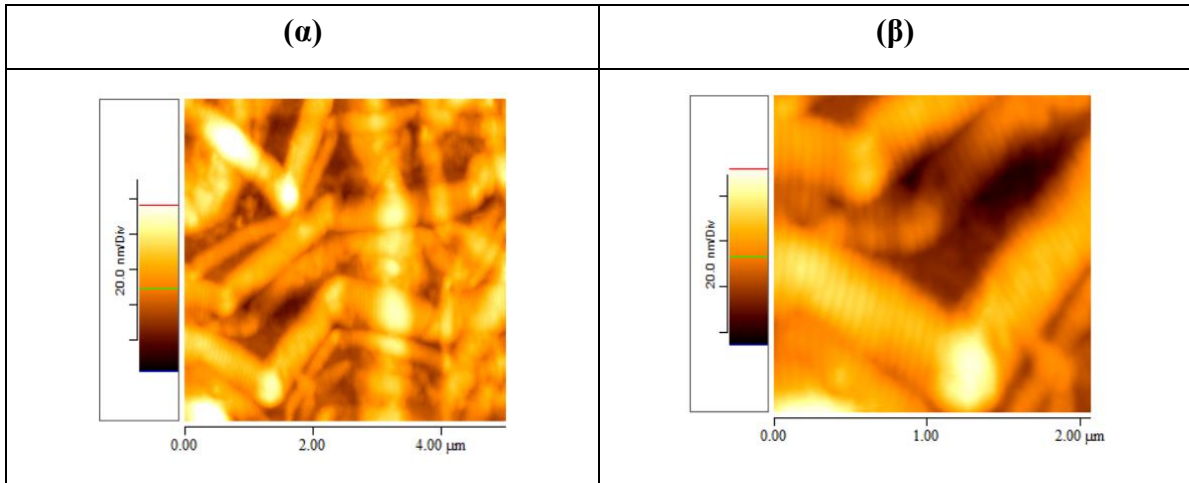


Εικόνα 9.1. Τοπογραφικές απεικονίσεις AFM ινιδίων κολλαγόνου με μεγεθύνσεις: (α) 10x10μm, (β) 5x5μm και (γ) 2x2μm.

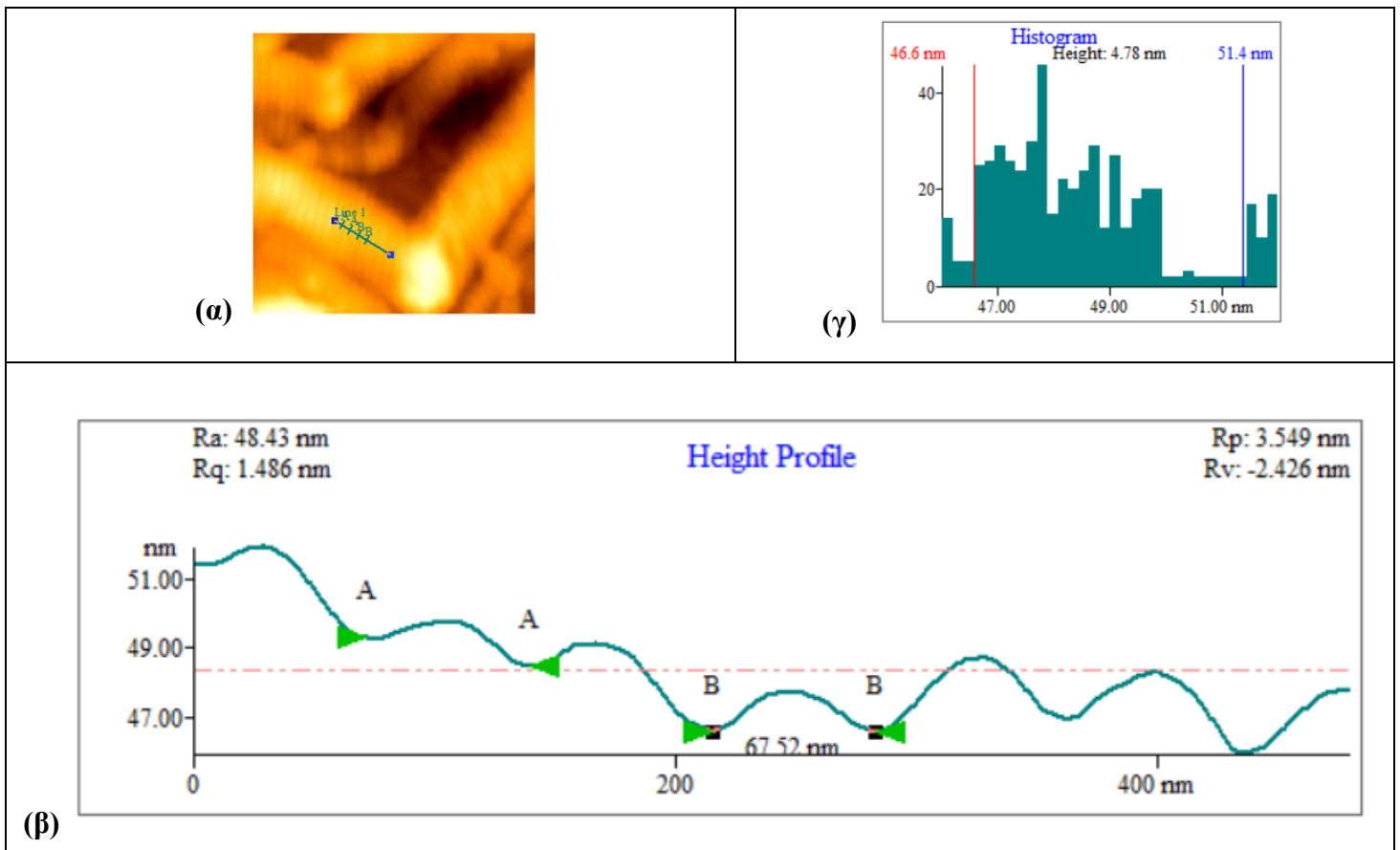


Εικόνα 9.2. (α) Τοπογραφική απεικόνιση AFM ινιδίων κολλαγόνου με μεγέθυνση 2x2μm, (β) προφίλ ύψους επιλεγμένου τμήματος (πράσινης γραμμής), όπου φαίνεται η χαρακτηριστική D-band περιοδικότητα των 67nm, (γ) το αντίστοιχο ιστόγραμμα.

Στα πλαίσια της επαναληψιμότητας του πειράματος στις **Εικόνες 9.3** και **9.4** παρατηρούνται άλλα ινίδια κολλαγόνου με τη χαρακτηριστική D-band περιοδικότητα τους και το αντίστοιχο προφίλ ύψους τους, από άλλο δείγμα που παράχθηκε με το ίδιο ακριβώς πρωτόκολλο.

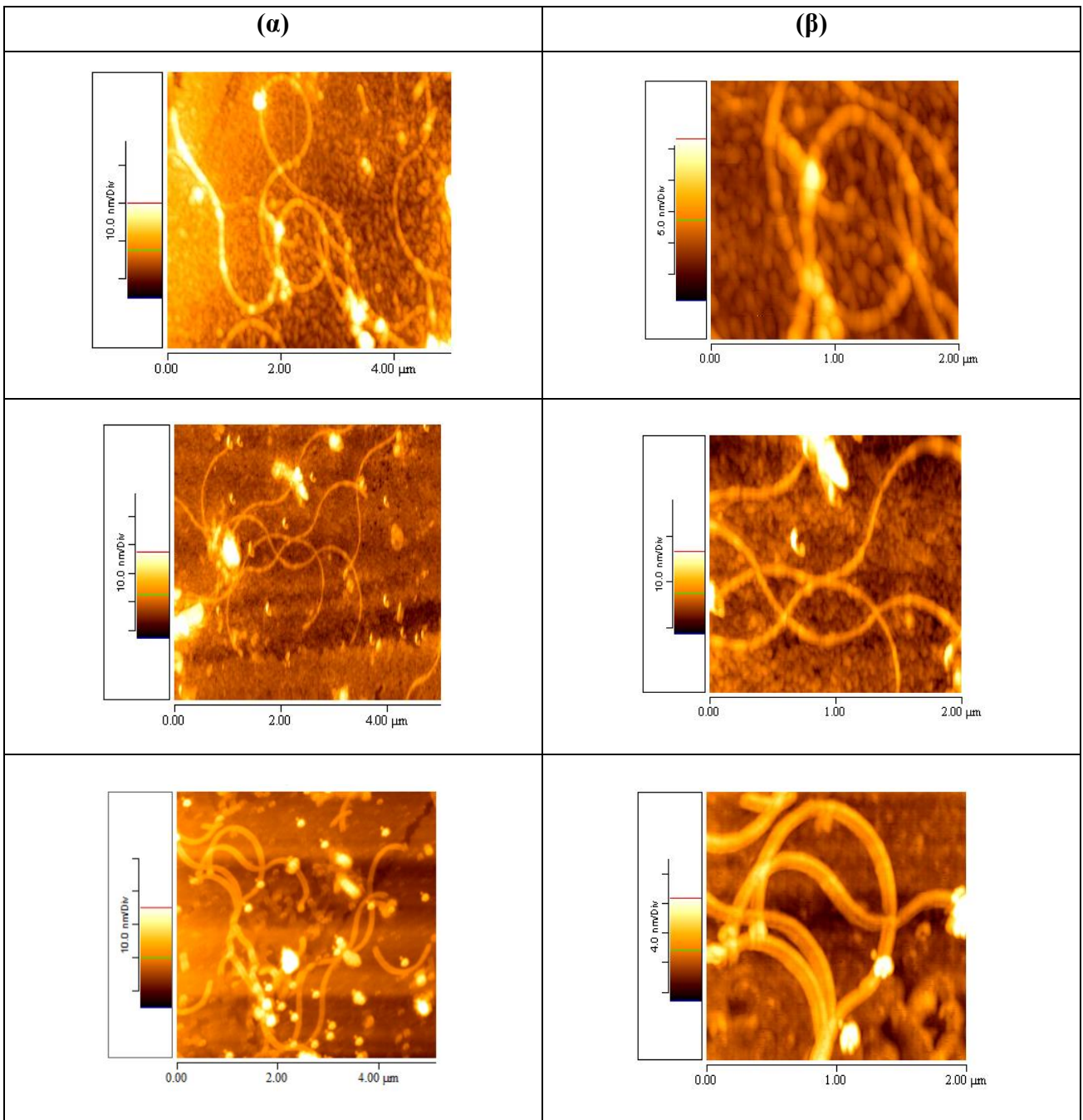


Εικόνα 9.3. Τοπογραφικές απεικονίσεις AFM ινιδίων κολλαγόνου με μεγεθύνσεις: (α) 5x5μm, (β) 2x2μm.



Εικόνα 9.4. (α) Τοπογραφική απεικόνιση AFM ινιδίων κολλαγόνου με μεγέθυνση 2x2μm, (β) προφίλ ύψους επιλεγμένου τμήματος (μπλε γραμμής), όπου φαίνεται η χαρακτηριστική D-band περιοδικότητα των 67nm, (γ) το αντίστοιχο ιστόγραμμα.

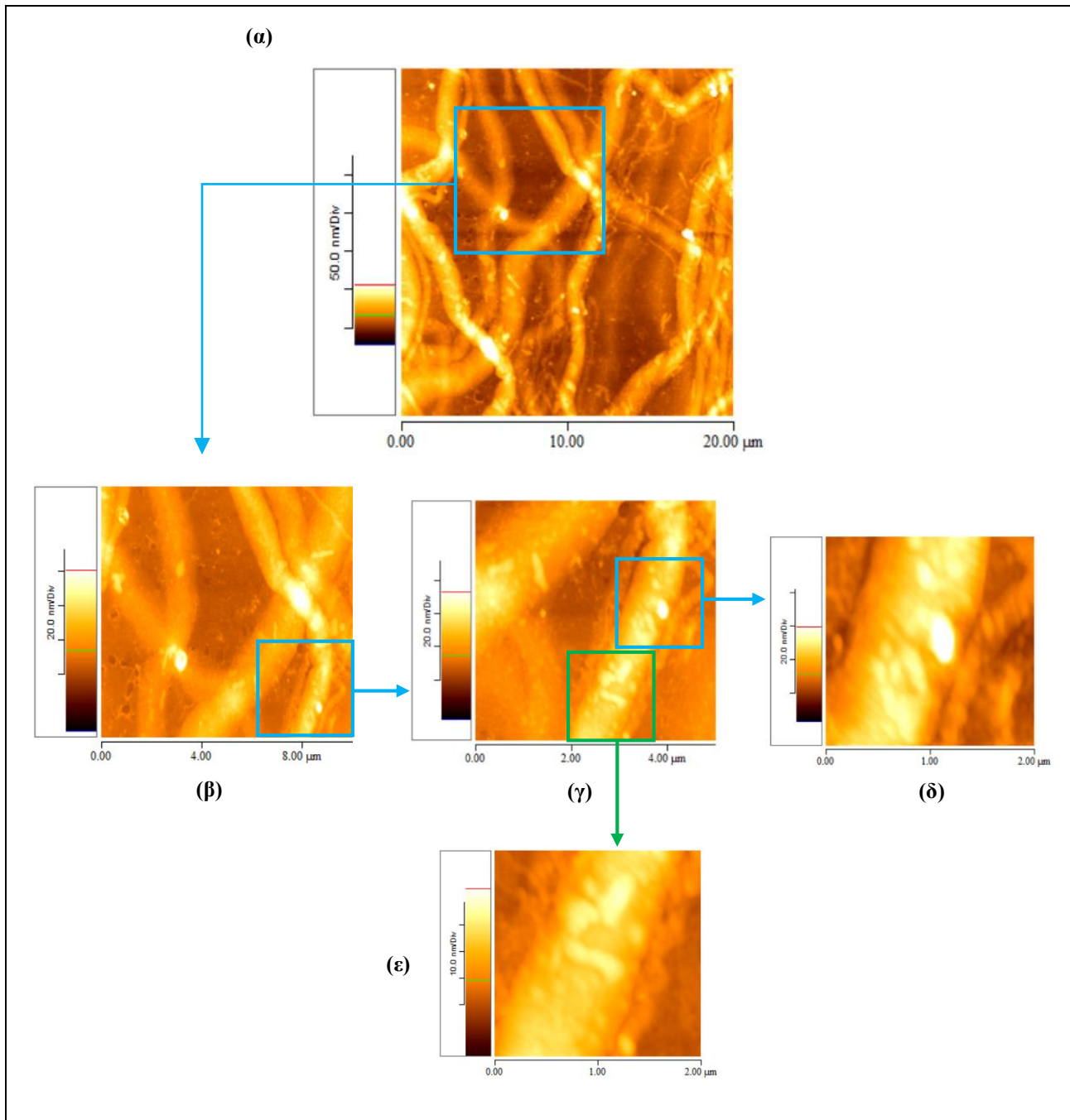
Στη συνέχεια, παρατίθενται στην **εικόνα 9.5**, οι τοπογραφικές απεικονίσεις AFM από την **παράγραφο 6.5** του **κεφαλαίου 6** της παρούσας διδακτορικής διατριβής που δείχνουν τα ινίδια ελαστίνης, τα οποία αναπτύχθηκαν με το πρωτόκολλο της **παράγραφου 5.1**. Αυτές οι απεικονίσεις θα αναφέρονται ως εικόνες αναφοράς, για περαιτέρω σύγκρισή τους με τις αντίστοιχες των ινιδίων του μικτού διαλύματος ελαστίνης/κολλαγόνου.



Εικόνα 9.5. Τοπογραφικές απεικονίσεις AFM ινιδίων ελαστίνης με μεγεθύνσεις: (α) 5x5μm, (β) 2x2μm σε διαφορετικά δείγματα, αλλά με το ίδιο πρωτόκολλο παραγωγής.

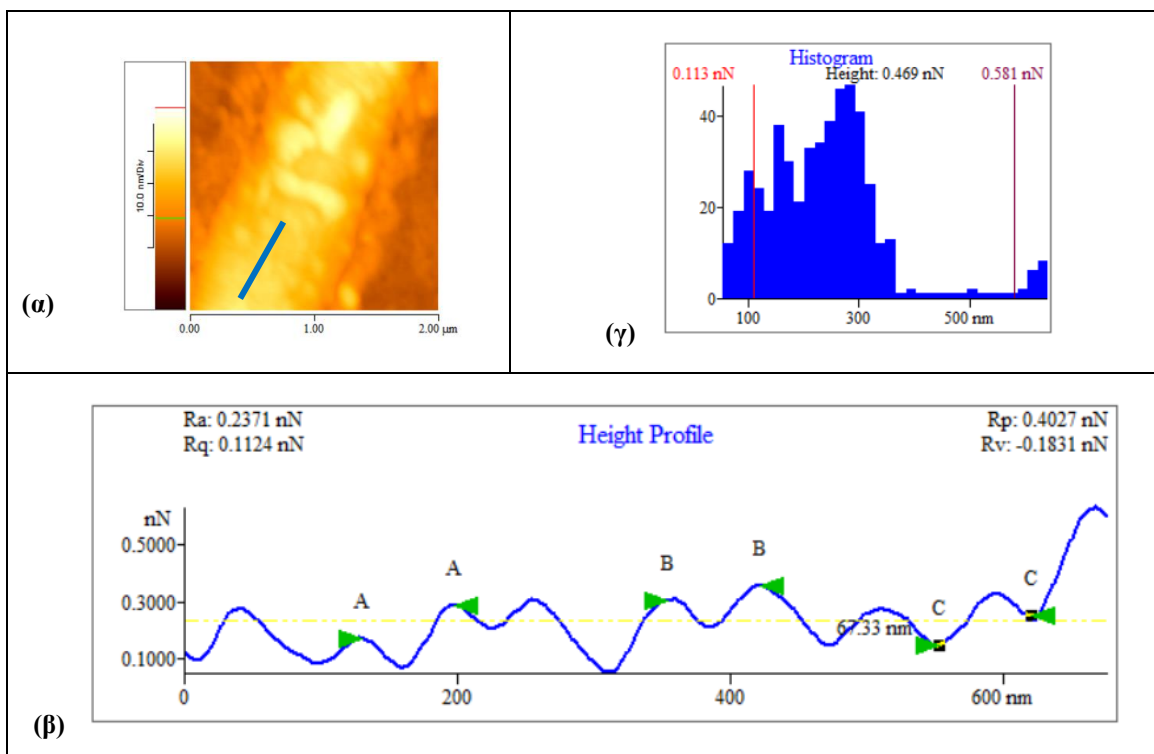
9.2.2 Ανάπτυξη λεπτών υμενίων ελαστίνης/κολλαγόνου αναλογίας 1:1

Σε αυτό το μέρος μελετήθηκε η τοπογραφία του δείγματος, όπου η αναλογία μεταξύ ελαστίνης και κολλαγόνου ήταν 1:1. Αρχικά, παρατηρήθηκαν τα ινίδια κολλαγόνου σε διαφορετικές απεικονίσεις και μεγεθύνσεις. Παρουσιάζονται ενδεικτικά κάποιες από αυτές στην **Εικόνα 9.6**.



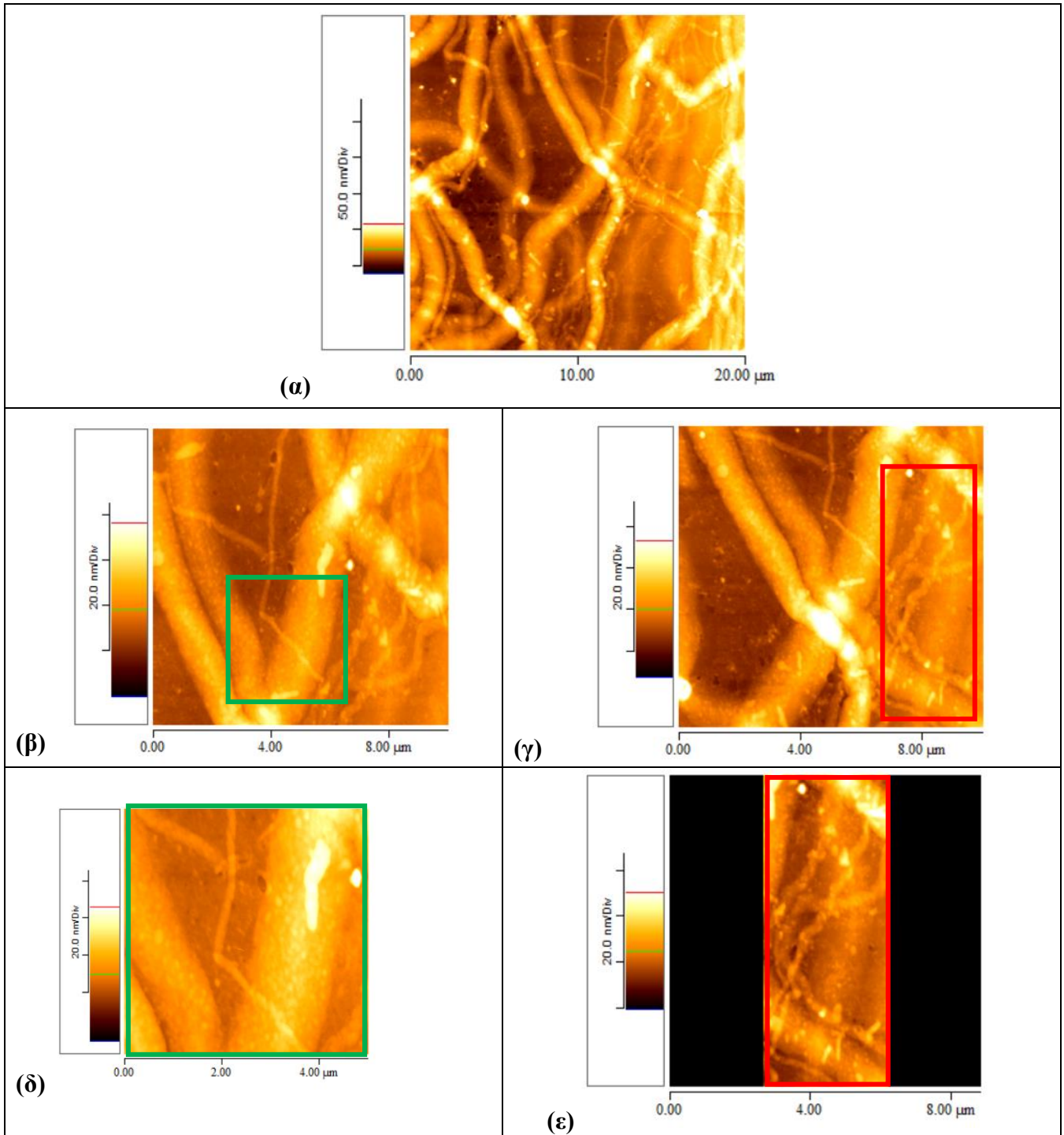
Εικόνα 9.6. Τοπογραφικές απεικονίσεις AFM ινιδίων κολλαγόνου με μεγεθύνσεις: (α) 20x20μm, (β) 10x10μm, (γ) 5x5μm, (δ,ε) 2x2μm στο μεικτό διάλυμα ελαστίνης/ κολλαγόνου αναλογίας 1:1.

Διαπιστώνεται ότι τα ινίδια κολλαγόνου είναι πιο αραιά και διασκορπισμένα από τις **Εικόνες 9.1** και **9.3** (εικόνες αναφοράς κολλαγόνου). Επίσης, δεν είναι ευδιάκριτη η χαρακτηριστική D-band περιοδικότητα. Η εμφάνιση της, όμως αποδεικνύεται με την τοπογραφική απεικόνιση AFM μεγέθυνσης $2 \times 2 \mu\text{m}$, αλλά και με το διάγραμμα προφίλ ύψους συγκεκριμένου τμήματος (μπλε γραμμής) πάνω στο ινίδιο, που υπολογίζεται η τιμή της στα $67,33 \text{nm}$ (**Εικόνα 9.7**). Ακόμη, παρατηρήθηκαν πάνω στην επιφάνεια των ινιδίων κολλαγόνου, πολύ μικρότερα τμήματα ινιδίων που θεωρούνται ότι ήταν κάποια συσσωματώματα ελαστίνης.



Εικόνα 9.7. (α) Τοπογραφική απεικόνιση AFM ινιδίου κολλαγόνου με μεγέθυνση $2 \times 2 \mu\text{m}$, από το 1:1 διάλυμα ελαστίνης/κολλαγόνου, (β) προφίλ ύψους επιλεγμένου τμήματος (μπλε γραμμής), όπου φαίνεται η χαρακτηριστική D-band περιοδικότητα των 67nm , (γ) το αντίστοιχο ιστόγραμμα.

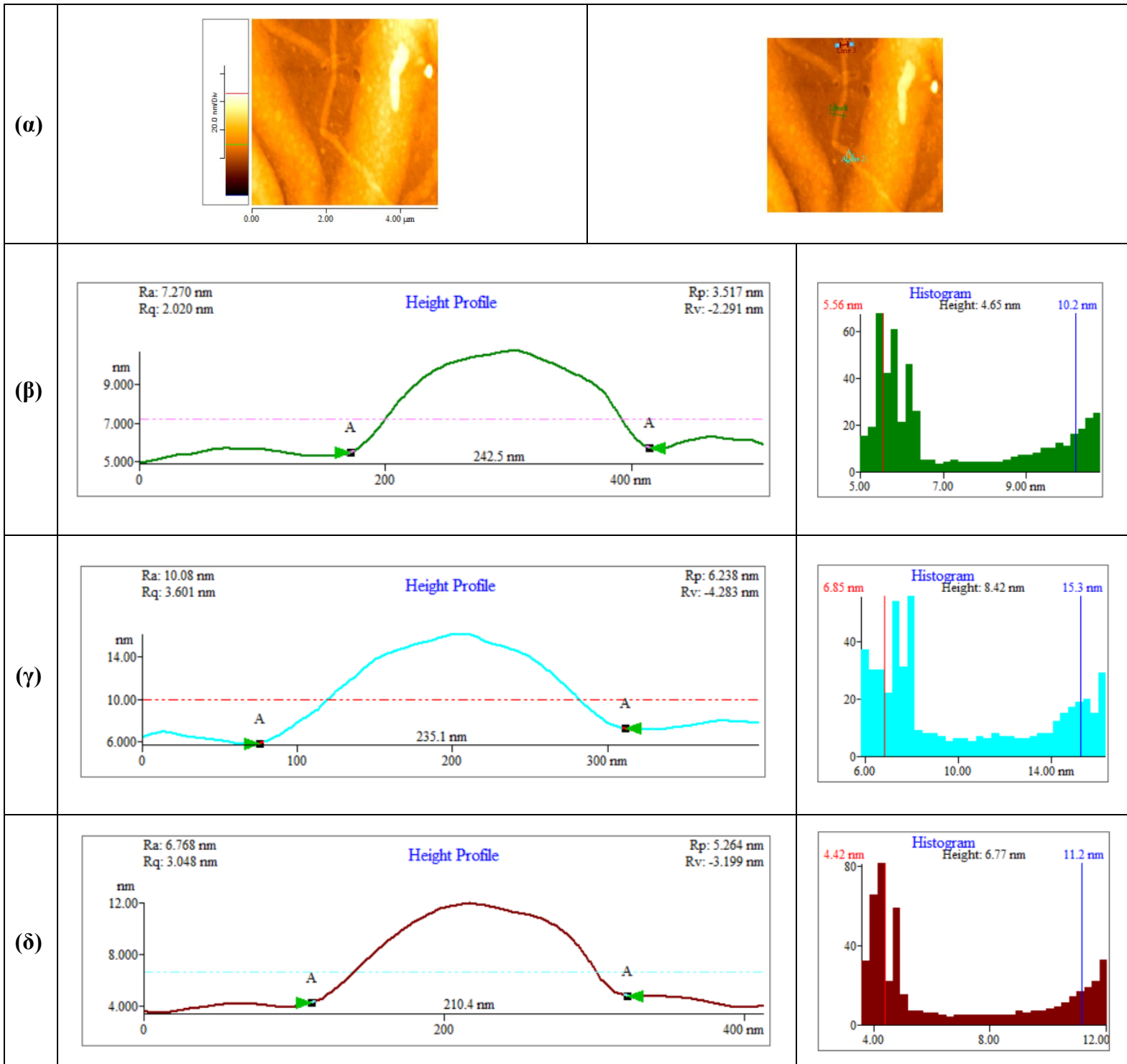
Σε συνέχεια της μελέτης του ίδιου δείγματος ελαστίνης/κολλαγόνου με αναλογία 1:1, γίνεται μια μικρή μετακίνηση της ακίδας του AFM σε μια περιοχή λίγο πιο πάνω. Το συγκεκριμένο μέρος της διατριβής εστιάζει στα ινίδια ελαστίνης, που εμφανίζονται τμηματικά μπλεγμένα με τα ινίδια κολλαγόνου. Μερικά από αυτά παρουσιάζονται με τις τοπογραφικές απεικονίσεις AFM σε μεγεθύνσεις των 20×20 , $10 \times 10 \mu\text{m}$ και $5 \times 5 \mu\text{m}$ στην **Εικόνα 9.8(α,β,γ,δ)**. Επίσης, στην **Εικόνα 9.8(ε)** διακρίνονται κάποια ινίδια που πιστεύεται ότι είναι από ελαστίνη, καθώς δεν εμφανίζουν τη χαρακτηριστική D-band περιοδικότητα του κολλαγόνου.



Εικόνα 9.8. Τοπογραφικές απεικονίσεις AFM ινιδίων ελαστίνης με μεγεθύνσεις: (α) 20x20μm, (β, γ) 10x10μm, (δ) 5x5μm, (ε) 3,6x9μm στο μεικτό διάλυμα ελαστίνης/ κολλαγόνου αναλογίας 1:1.

Διαπιστώνεται ότι τα ινίδια ελαστίνης είναι πιο διάσπαρτα και χωρίς κάποιον ενιαίο σχηματισμό σε σχέση με την **Εικόνα 9.5** (εικόνα αναφοράς ελαστίνης). Επίσης, αποδεικνύονται ότι είναι ινίδια ελαστίνης και όχι μικρά ινίδια κολλαγόνου, με την τοπογραφική απεικόνιση AFM μεγέθυνσης 5x5μm της **Εικόνας 9.9.α**, στην οποία δεν

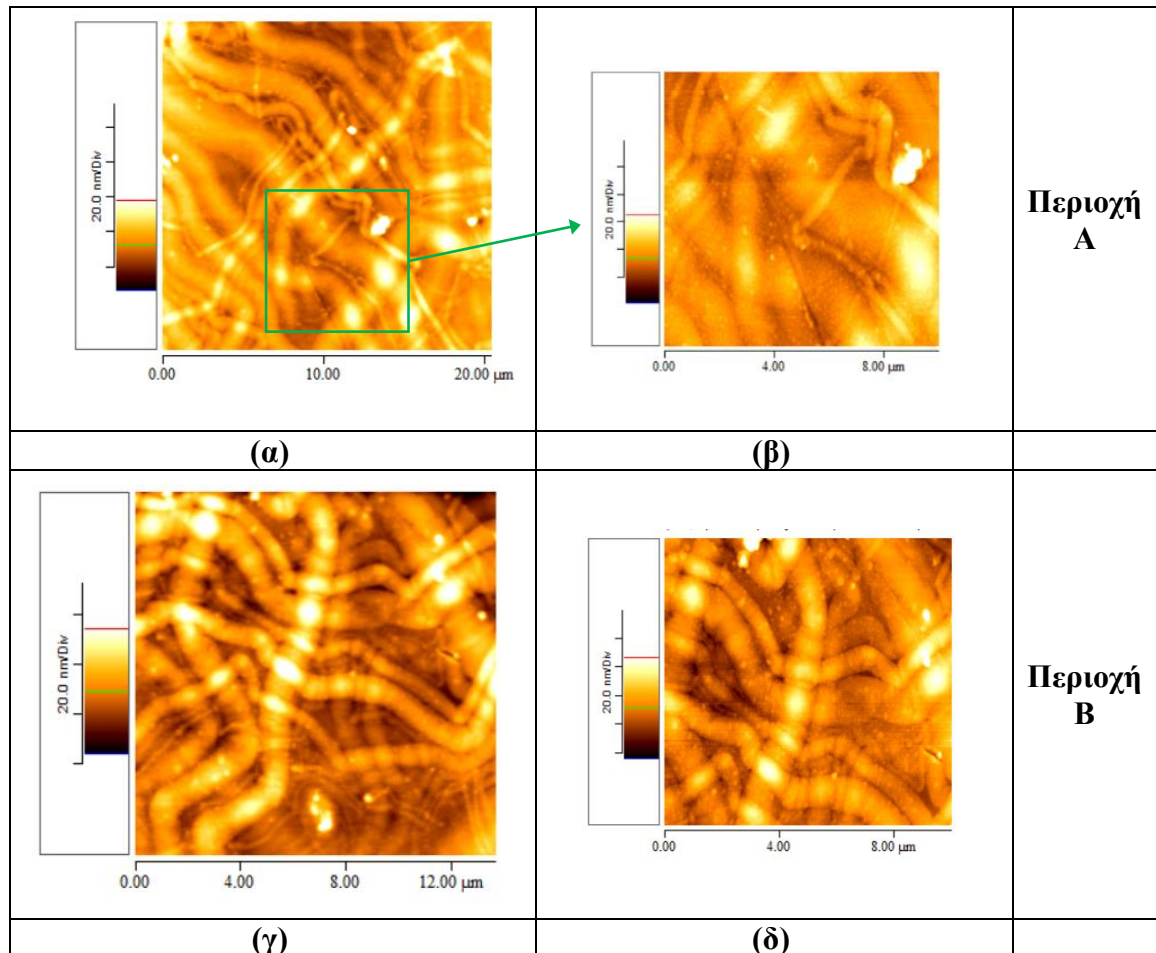
παρατηρείται η χαρακτηριστική περιοδικότητα D-band. Ακόμα με τα διαγράμματα προφίλ ύψους συγκεκριμένων τμημάτων πάνω στο ίδιο ελαστίνη (Εικόνα 9.9.β,γ,δ), υπολογίζεται η μέση τιμή της διαμέτρου στα 230nm περίπου. Τιμή που αποδεικνύει ότι πρόκειται για μικρό ινίδιο ελαστίνης σύμφωνα με τον Πίνακα 6.1 της παραγράφου 6.7.



Εικόνα 9.9. (α): Τοπογραφική απεικόνιση AFM ινιδίου ελαστίνης με μεγέθυνση 5x5μm, από το 1:1 διάλυμα ελαστίνης/κολλαγόνου, (β), (γ), (δ): προφίλ ύψους επιλεγμένων τμημάτων, όπου διαπιστώνεται το μέγεθος του από τη μέτρηση της διαμέτρου του, με τα αντίστοιχα ιστογράμματα τους.

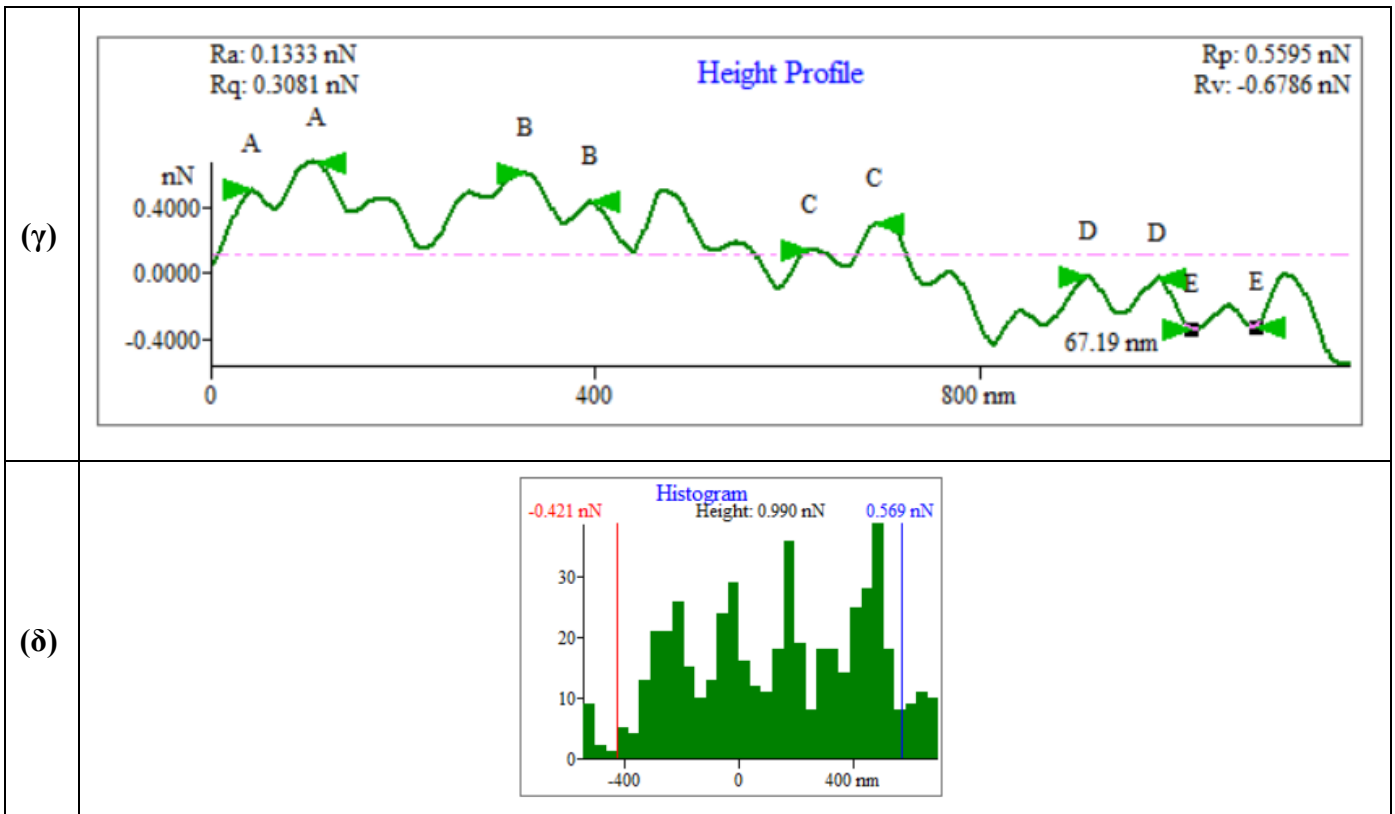
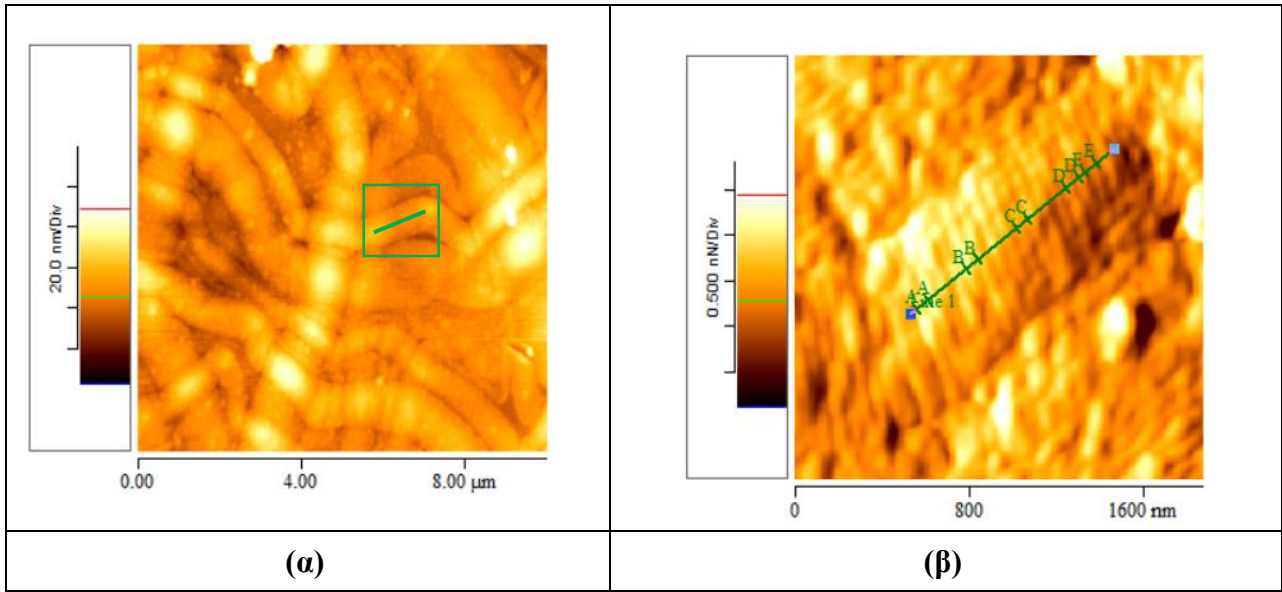
9.2.3 Ανάπτυξη λεπτών υμενίων ελαστίνης/κολλαγόνου αναλογίας 1:2

Στο τελευταίο μέρος της διδακτορικής διατριβής μελετήθηκε η τοπογραφία του λεπτού υμενίου, όπου η αναλογία μεταξύ ελαστίνης και κολλαγόνου ήταν 1:2. Μετά από ενδελεχή παρατήρηση σε πληθώρα τοπογραφικών απεικονίσεων AFM με ποικίλες μεγεθύνσεις, επιλέχθηκαν για να παρουσιαστούν ενδεικτικά δύο διαφορετικές περιοχές (Α και Β) του ίδιου δείγματος (**Εικόνα 9.10.**).



Εικόνα 9.10. Τοπογραφικές απεικονίσεις AFM λεπτού υμενίου από το διάλυμα ελαστίνης/κολλαγόνου αναλογίας 1:2 σε δύο διαφορετικές περιοχές (Α και Β) του ίδιου δείγματος, με μεγεθύνσεις (α) 20x20μm, (β), 10x10μm, (γ) 13x13μm, (δ) 10x10μm

Αξιοσημείωτο είναι ότι δεν παρατηρήθηκαν ινίδια ελαστίνης, αλλά μόνο κολλαγόνου. Τα οποία διερευνήθηκαν περαιτέρω με ακόμα μεγαλύτερες μεγεθύνσεις στις τοπογραφικές απεικονίσεις AFM τους, καθώς και με διαγράμματα προφίλ ύψους. Ενδεικτικά φαίνονται στην **Εικόνα 9.11.**



Εικόνα 9.11. Τοπογραφικές απεικονίσεις AFM ινιδίου κολλαγόνου από το 1:2 διάλυμα ελαστίνης/κολλαγόνου με μεγεθύνσεις: (α) 10x10μm, (β) 1,8x1,8μm, (γ) προφίλ ύψους επιλεγμένου τμήματος (πράσινης γραμμής), όπου φαίνεται η χαρακτηριστική D-band περιοδικότητα των 67nm, (γ) το αντίστοιχο ιστόγραμμα.

Επομένως, τεκμηριώθηκε η παρουσία ινιδίων κολλαγόνου με την ακριβή μέτρηση της D-band περιοδικότητας στα 67,19nm. Αντίθετα, η μη εμφανής παρουσία ινιδίων ελαστίνης οδηγεί στο συμπέρασμα της περαιτέρω διερεύνησης σε μελλοντικές μελέτες.

9.3 Συζήτηση Αποτελεσμάτων

Το τελευταίο κεφάλαιο της διδακτορικής διατριβής επικεντρώθηκε στη δημιουργία κατάλληλων μητρικών διαλυμάτων ελαστίνης/κολλαγόνου, για την ανάπτυξη λεπτών υμενίων. Τα αποτελέσματα υποδεικνύουν ότι είναι ιδιαίτερης σημασίας το πρωτόκολλο παραγωγής των μητρικών διαλυμάτων, όπως και η σωστή αναλογία ελαστίνης/ κολλαγόνου για την επιτυχή ανάπτυξη λεπτών υμενίων από αυτές τις δύο πρωτεΐνες.

Συγκεκριμένα με κατάλληλο πρωτόκολλο για να υπάρξει ινιδιογέννεση και από τις δύο πρωτεΐνες [34, 35, 143], δημιουργήθηκαν δύο μητρικά διαλύματα ελαστίνης/κολλαγόνου με αναλογίες 1:1 και 1:2. Μελετήθηκαν αυτές οι αναλογίες λόγω της συχνότερης εμφάνισης τους σε αρκετούς ιστούς και όργανα [54, 289, 290].

Στα δείγματα ελαστίνης/κολλαγόνου 1:1 παρατηρήθηκαν ινίδια και από της δύο πρωτεΐνες. Η ποσότητα στα ινίδια ελαστίνης έναντι του κολλαγόνου ήταν εμφανώς πιο μικρή. Οι διαστάσεις στις διαμέτρους τους ξεχώρισε τα διαφορετικά ινίδια, καθώς οι μεγαλύτερες τιμές αναφέρονταν στο κολλαγόνο. Ήταν τόσο έντονη η διαφορά τους που φαινόταν άμεσα παρατηρώντας τις τοπογραφικές απεικονίσεις AFM. Τεκμηριώθηκε όμως πλήρως η δημιουργία των ινιδίων κολλαγόνου από τις ακριβείς πειραματικές μετρήσεις της χαρακτηριστικής D-band περιοδικότητας του, που υπολογίζεται η τιμή της στα 67,33nm. Η παρουσία των ινιδίων ελαστίνης αποδείχτηκε υπολογίζοντας τη μέση τιμή των διαμέτρων της στα 230nm περίπου. Τιμή που αποδεικνύει ότι πρόκειται για μικρό ινίδιο ελαστίνης σύμφωνα με τον Πίνακα 6.1.

Αντίστοιχοι υπολογισμοί έγιναν και με τα λεπτά υμένια ελαστίνης/κολλαγόνου 1:2. Αξιοσημείωτο είναι ότι δεν μπόρεσαν να παρατηρηθούν ινίδια ελαστίνης, αλλά μόνο κολλαγόνου. Η παρουσία των τελευταίων τεκμηριώθηκε με την ακριβή μέτρηση της D-band περιοδικότητας στα 67,19nm.

Έχει αναφερθεί σε προηγούμενα κεφάλαια ότι το κολλαγόνο και η ελαστίνη είναι οι πιο άφθονες δομικές πρωτεΐνες της εξωκυττάριας μήτρας (ECM). Η ελαστίνη είναι υπεύθυνη για τον καθορισμό της ελαστικότητας και της ανθεκτικότητας των ιστών. Αντίθετα, το κολλαγόνο συμβάλλει στη μηχανική αντοχή των οργάνων. Ο συνδυασμός τους λειτουργεί ως φυσικό υπόστρωμα για κυτταρικό πολλαπλασιασμό. Οι ίνες ελαστίνης και κολλαγόνου κατά τις φάσεις της επούλωσης πληγών είναι απαραίτητες όχι μόνο για την αναδιαμόρφωση των ιστών, αλλά και για την ακεραιότητα και τη λειτουργία τους. Αντίθετα, η ανεπιτυχής επούλωση οδηγεί σε ουλές, οι οποίες τείνουν να είναι άκαμπτες και ανελαστικές σε σύγκριση με το κανονικό ελαστικό ιστό, ή σε έλκη, τα οποία είναι ανοιχτές πληγές επίφοβες για μολύνσεις.

Ως εκ τούτου, οι Gardeazabal et al., ανέλυσαν διάφορες αναλογίες μεταξύ ελαστίνης και κολλαγόνου, σχετικά με τη διαδικασία σχηματισμού νέων ινών κολλαγόνου και ελαστίνης κατά την επούλωση τραύματος. Υποστήριξαν ότι η μη επούλωση πληγής οφείλεται στην απουσία σχηματισμού ώριμων ινών και έλλειψη σταυροδεσμών τόσο στην ελαστίνη όσο και στο κολλαγόνο. Προτείνουν ερευνητικές

κατευθύνσεις που μπορεί να βοηθήσουν στη βελτίωση της κλινικής διαχείρισης ανοιχτών πληγών και ουλών [291].

Οι Wittig et al. διευκρίνισαν ότι οι αναλογίες κολλαγόνου-I και ελαστίνης, που είναι οι κύριες καρδιαγγειακές πρωτεΐνες της ECM, μεταβάλλονται στις καρδιαγγειακές παθήσεις και στη γήρανση. Διαπιστώσαν ότι η σχετική συγκέντρωση κολλαγόνου-I αυξάνεται ή παραμένει η ίδια στην καρδιαγγειακή νόσο, με αποτέλεσμα την μειωμένη αναλογία ελαστίνης/κολλαγόνου [289]. Ενώ, από τους Kumar et al. αξιολογήθηκε η ασύμμετρη κατανομή του δερματικού κολλαγόνου και των ελαστικών ινών σε διαφορετικές κατευθύνσεις. Η ανάλυση της αναλογίας τους παρέχει κατευθυντήριες γραμμές για την αισθητική χειρουργική [290].

Επίσης, η προσθήκη ελαστίνης συνδέσμου λαιμού βοοειδών σε διαλύματα κολλαγόνου τύπου I επιτάχυνε τον ρυθμό πολυμερισμού. Δεν μπόρεσαν να παρατηρηθούν σημαντικές δομικές αλλαγές στις υδρογέλες (gels) που προέκυψαν, σύμφωνα με τους Wilharm et al. [292]. Έδειξαν, όμως την τάση της ελαστίνης να συνδέεται με άλλα βιοπολυμερή.

Σε μια άλλη μελέτη οι Vazquez-Portalatin et al. χαρακτήρισαν gels που αποτελούνται από μείγματα κολλαγόνου και ελαστίνης για να διασαφηνίσουν τις μοναδικές ιδιότητές τους. Έδειξαν ότι η προσθήκη ποικίλων ποσοτήτων ελαστίνης στο κολλαγόνο επηρεάζει την απορρόφηση του gel κατά τη μελέτη της ινιδιογένεσης του, αλλά δεν επηρεάζει τη διάμετρο των ινιδίων του. Παρατήρησαν σημαντική μείωση στο μήκος της χαρακτηριστικής D-band περιοδικότητας του, αλλά η ακριβής μέτρησή του δεν αποσαφηνίστηκε πλήρως [54].

Σε άλλη έρευνα με την τεχνική electrospinning, οι Jiménez Vázquez et al. συνέθεσαν μια δομή ικριώματος από ινίδια κολλαγόνου και ελαστίνης από δέρμα όρνιθας, το οποίο ήταν ένα ευνοϊκό περιβάλλον για την προσκόλληση και τον πολλαπλασιασμό των κυττάρων που ακολούθησε. Οι σταυροδεσμοί πιθανό να επηρέασαν την ανάπτυξη των κυττάρων εντός των ικριωμάτων. Τα οποία αναπτύχθηκαν ως μια επιλογή για εφαρμογές στη μηχανική ιστών και την ανάπτυξη υποκατάστατων ανθρώπινου δέρματος [81].

Συμπερασματικά, η μελέτη που αναλύθηκε στο 9^ο κεφάλαιο της διδακτορικής διατριβής χρησιμεύει ως μια βαθύτερη κατανόηση του τρόπου με τον οποίο διαφορετικές ποσότητες ελαστίνης επηρεάζουν τα λεπτά υμένα κολλαγόνου. Επιπλέον, ενθαρρύνει τη χρήση του AFM ως εργαλείου ποιοτικού ελέγχου ικανό να καταγράψει τις δομικές και μηχανικές ιδιότητες του λεπτού υμενίου. Οι οποίες θα είναι σημαντικές για να επηρεάσουν τη συμπεριφορά και την ανάπτυξη των κυττάρων. Αυτή η γνώση θα αποδειχθεί χρήσιμη κατά την ανάπτυξη ικριωμάτων ελαστίνης/κολλαγόνου για εφαρμογές μηχανικής ιστών στην αναγεννητική ιατρική στο μέλλον.

9.4 Συμπεράσματα

Το κολλαγόνο και η ελαστίνη είναι δομικές πρωτεΐνες που διατηρούν τόσο την ελαστικότητα όσο και την ανθεκτικότητα. Μαζί, συνθέτουν δομές που ενισχύουν τον πολλαπλασιασμό και τη μετανάστευση κυττάρων, με τις δομικές και μηχανικές ιδιότητές τους. Ο συνδυασμός τους για δημιουργία ικριωμάτων, που θα είναι κατάλληλα για πληθώρα εφαρμογών, όπως είναι η επούλωση πληγών, η αντιμετώπιση της γήρανσης των ιστών, αλλά και αρκετές καρδιαγγειακές παθήσεις είναι μερικοί λόγοι που οδήγησαν στα πειράματα του 9^{ου} κεφαλαίου. Στα οποία έγινε συνδυαστική νανοσκοπική απεικόνιση ινιδίων ελαστίνης και κολλαγόνου με χρήση AFM. Παρατηρήθηκαν πλέγματα ινιδίων και των δύο πρωτεϊνών με αναλογίες 1:1 και 1:2.

Ο πρώτος συνδυασμός αναλογίας ελαστίνης/κολλαγόνου 1:1, είναι καινοτόμος διεθνώς, καθώς δεν είχαν απεικονιστεί σε επίπεδο νανοκλίμακας ταυτόχρονα ινίδια ελαστίνης και κολλαγόνου με τη βοήθεια του AFM. Στη δεύτερη αναλογία των προς μελέτη πρωτεϊνών παρατηρήθηκαν πλέγματα, αλλά κυρίως ινιδίων κολλαγόνου, καθώς η παρουσία της ελαστίνης δεν ήταν εμφανής. Ως εκ τούτου, η συγκεκριμένη αναλογία (1:2), χρήζει περαιτέρω επιστημονικής διερεύνησης, κυρίως στο πρωτόκολλο δημιουργίας του μητρικού διαλύματος ελαστίνης/κολλαγόνου.

ΣΥΝΟΨΗ ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΩΝ – ΠΡΟΟΠΤΙΚΕΣ – ΚΑΙΝΟΤΟΜΙΑ ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗΣ ΔΙΑΤΡΙΒΗΣ

1^ο ΜΕΡΟΣ: ΑΝΑΠΤΥΞΗ ΝΑΝΟΪΝΙΔΙΩΝ ΕΛΑΣΤΙΝΗΣ ΚΑΙ ΜΕΛΕΤΗ ΤΗΣ ΑΥΤΟΔΙΑΜΟΡΦΩΣΗΣ ΤΗΣ

Σκοπός

Μελετήθηκε η εύρεση κατάλληλου μητρικού εναιωρήματος ελαστίνης υπό διαφορετικές παραμέτρους, καθώς και η μελέτη της αυτοδιαμόρφωσης της δομής της ελαστίνης, από νανοϊνίδια, σε ινίδια και τελικά σε ίνες ελαστίνης. Χρησιμοποιήθηκαν διαφορετικές πειραματικές παράμετροι, όπως το μέσο εναιώρησης, η συγκέντρωση της ελαστίνης, η θερμοκρασία των εναιωρημάτων και το χρονικό διάστημα μετά την προετοιμασία των μητρικών εναιωρημάτων. Ερευνήθηκαν οι δομικές και τοπογραφικές ιδιότητες, όπως η διάμετρος και η υψομετρική διαφορά των νανοϊνιδίων, ινιδίων και ινών της ελαστίνης με απεικονιστική επεξεργασία μέσω AFM.

Αποτελέσματα

Οι βέλτιστες συνθήκες για την παρατήρηση της διαδικασίας αυτοδιαμόρφωσης και του σχηματισμού ινιδίων ελαστίνης στη νανοκλίμακα ήταν συγκέντρωση ελαστίνης 1% w/v σε δις απεσταγμένο νερό σε θερμοκρασία 20 °C, με ελάχιστη περίοδο επώασης δύο εβδομάδων μετά από τη δημιουργία του μητρικού εναιωρήματος. Η μελέτη της αυτοδιαμόρφωσης οδήγησε τόσο σε ποιοτικά όσο και σε ποσοτικά αποτελέσματα, όπου υπολογίστηκαν οι μέσες τιμές των διαμέτρων των ινών (549,64±25,4)nm, των ινιδίων (321,3±21,0)nm και των νανοϊνιδίων (121±21)nm και των αντίστοιχων υψών τους (88,8±5,7)nm, (27,7±3,3)nm και (4,5±0,7)nm.

Καινοτομία – Προοπτικές

Παρουσιάζονται νέες και λεπτομερείς γνώσεις σχετικά με τα ακριβή δομικά και γεωμετρικά χαρακτηριστικά ινών, ινιδίων και νανοϊνιδίων ελαστίνης, όπως είναι η διάμετρος και το ύψος. Η τρέχουσα μελέτη θεωρείται ως έρευνα τελευταίας τεχνολογίας στο συγκεκριμένο τομέα, καθώς διερευνά ποιοτικά και ποσοτικά τη διαδικασία αυτοδιαμόρφωσης 3D ινιδίων ελαστίνης από νανοϊνίδια έως και ίνες, χρησιμοποιώντας απεικόνιση AFM. Τα δομικά χαρακτηριστικά διαδραματίζουν κρίσιμο ρόλο για τα περισσότερα κύτταρα, οπότε η επιλογή του κατάλληλου βιοϋλικού για το σχεδιασμό του ικριώματος έχει τεράστια σημασία. Η κατανόηση της αυτοδιαμόρφωσης της ελαστίνης προσφέρει βιώσιμες λύσεις για κατασκευή νανοδομών από πρωτεΐνες με βάση την ελαστίνη, οι οποίες έχουν συγκεκριμένες φυσικές και χημικές ιδιότητες, για εφαρμογές στη βιοτεχνολογία και στη μηχανική ιστών.

2^ο ΜΕΡΟΣ: ΕΠΙΔΡΑΣΗ ΤΗΣ ΥΠΕΡΙΩΔΟΥΣ ΑΚΤΙΝΟΒΟΛΙΑΣ ΣΤΑ ΙΝΙΔΙΑ ΕΛΑΣΤΙΝΗΣ

Σκοπός

Διερευνήθηκε η επίδραση της UV ακτινοβολίας στην ελαστίνη. Εξετάστηκαν οι τοπογραφικές ιδιότητες των ινών, ινιδίων και νανοϊνιδίων ελαστίνης σε νανοκλίμακα, πριν και μετά την επίδραση της UV ακτινοβολίας με τη βοήθεια απεικονιστικών μεθόδων AFM. Συγκεκριμένα, πραγματοποιήθηκε ποιοτική και ποσοτική έρευνα των επιδράσεων της ακτινοβολίας στις δομικές και μορφολογικές ιδιότητες των ινών ελαστίνης ανάλογα με το μέγεθος τους και ανάλογα με τη χρονική διάρκεια έκθεσης τους στο υπεριώδες φως.

Αποτελέσματα

Τα αποτελέσματα υποδεικνύουν ότι η έκθεση στη UV ακτινοβολία προκαλεί σημαντική μείωση των τιμών ύψους και μήκους των νανοϊνιδίων και οδηγεί στη αύξηση της διαμέτρου τους. Συγκεκριμένα, κατά την ακτινοβολία με UV για μικρά χρονικά διαστήματα 10 με 15 min, υπήρξε σημαντική μείωση του ύψους των νανοϊνιδίων κατά 20%, αλλά και ελάττωση της διαμέτρου των ινών κατά 11%. Συνεχής μείωση παρατηρείται στο μήκος των ινών, ινιδίων και νανοϊνιδίων, τόσο σε μικρούς όσο και σε μεσαίους χρόνους (50min και 60min) κατά 11%, 19% και 13% αντίστοιχα. Σε μεγάλους χρόνους έκθεσης σε UV ακτινοβολία είτε είναι διακοπτόμενη (3φορές x 1h), είτε συνεχόμενη (4h), η συνολική αύξηση της διαμέτρου είναι 29% και 54%, ενώ η ολική μείωση του ύψους είναι 24% και 27% αντίστοιχα. Η αλλοίωση στην τραχύτητα της επιφάνειας των νανοϊνιδίων ελαστίνης, αλλά και ολόκληρου του δείγματος αυξάνεται, καθώς μεγαλώνουν και οι χρόνοι έκθεσης στη UV ακτινοβολία.

Καινοτομία – Προοπτικές

Τα παραπάνω αποτελέσματα συνεισφέρουν στην εξακρίβωση του μηχανισμού αλληλεπίδρασης υπεριώδους ακτινοβολίας και ελαστίνης σε νανοκλίμακα. Είναι σημαντικά για την ερμηνεία βλαβών, που προκαλούνται λόγω της χρόνιας έκθεσης του ανθρώπινου δέρματος στην ηλιακή ακτινοβολία. Πολλοί εξωγενείς παράγοντες, που σχετίζονται με το περιβάλλον και τον τρόπο ζωής, επηρεάζουν την εμφάνιση του δέρματος, επιταχύνοντας τη γήρανση. Επίσης, οι γενετικοί παράγοντες επηρεάζουν, τον κίνδυνο δερματικής νόσου που προκαλείται από το υπεριώδες φως και συσχετίζονται με την απαλότητα του δέρματος, την ευαισθησία στην συγκεκριμένη ακτινοβολία και τον αυξημένο κίνδυνο εμφάνισης νεοπλασματικής νόσου. Η μελέτη που έγινε ήταν ιδιαίτερης σημασίας, καθώς η ελαστίνη δεν έχει μελετηθεί στο παρελθόν σε διαστάσεις νανοκλίμακας υπό την επίδραση της υπεριώδους ακτινοβολίας. Μια μελέτη, η οποία μπορεί να επιτρέψει την επακόλουθη χρήση μεθόδων μικροσκοπίας, που βελτιώνουν την κατανόηση των διαδικασιών γήρανσης, για να υπάρξουν εφαρμογές στη δερματολογική και ιατρική έρευνα.

3^ο ΜΕΡΟΣ: ΕΠΙΔΡΑΣΗ ΧΑΜΗΛΗΣ ΙΣΧΥΟΣ LASER ΣΤΗΝ ΠΕΡΙΟΧΗ ΤΟΥ ΕΡΥΘΡΟΥ ΣΤΑ ΙΝΙΔΙΑ ΕΛΑΣΤΙΝΗΣ

Σκοπός

Μελετήθηκε η επίδραση της ακτινοβολίας laser χαμηλής ισχύος στην περιοχή του ερυθρού (LLLT) σε δείγματα ελαστίνης, τόσο ανάλογα με το μέγεθος της ίνας ελαστίνης, όσο και με το χρόνο ακτινοβολήσής της. Εξετάστηκαν οι τοπογραφικές ιδιότητες (διάμετρος, ύψος, μήκος, τραχύτητα) των ινών/ινιδίων/ναοϊνιδίων ελαστίνης σε νανοκλίμακα, πριν και μετά την επίδραση της ερυθρής ακτινοβολίας με τη βοήθεια απεικονιστικών μεθόδων AFM.

Αποτελέσματα

Ερευνήθηκαν οι δομικές ιδιότητες των ινών/ινιδίων/ναοϊνιδίων ελαστίνης σε χρονικά διαστήματα (3,75 min, 7,5 min, 11,25 min και 15min) ερυθρής ακτινοβολίας χαμηλής ισχύος. Διαπιστώνεται, η διαπλάτυνση της διαμέτρου σε συνάρτηση με το πέρασμα του χρόνου ακτινοβολήσής. Η αύξηση του ύψους ινών και ινιδίων είναι 27%. Αντίθετα, στο ναοϊνίδιο παρατηρείται τεράστια ελάττωση του ύψους κατά 40%. Όσο αυξάνεται ο χρόνος έκθεσης, επιμηκύνονται τα ινίδια κατά 9%, ενώ οι ίνες κατά 14%. Η αντίστοιχη πτώση του ποσοστού στο μήκος του ναοϊνιδίου είναι 14,5%. Επίσης, διαπιστώνεται ότι αναλόγως με τον χρόνο έκθεσης του ινιδίου στην ερυθρή ακτινοβολία άλλαζε ο τρόπος αύξησης της διαμέτρου του. Στους μικρούς χρόνους ακτινοβολήσής (0-15min) φαίνεται απότομη και μεγάλη αλλαγή στη διαπλάτυνση του ινιδίου ελαστίνης που φτάνει το 20,81%. Αύξηση που αγγίζει το 15,34% παρατηρείται και στους χρόνους μεσαίας διάρκειας (0-45min). Στους μεγάλους χρόνους ακτινοβολήσής (0-3h) έχει πιο ομαλή άνοδο που φτάνει το 20,18%. Επιπροσθέτως, το ύψος του ινιδίου από 0-15 min έχει μια πολύ μεγάλη και απότομη αύξηση κατά 27,48%, ενώ από 0-45min ανεβαίνει κατά 13%. Αντίθετα, στα πειράματα των 3 ωρών, υπήρξε μεγάλη μείωση του ύψους, έως 24,11%. Συμπερασματικά, η αλλοίωση των δομικών και μορφολογικών ιδιοτήτων των ναοϊνιδίων μεγαλώνει, καθώς αυξάνεται ο χρόνος έκθεσης τους στο ερυθρό φως.

Καινοτομία – Προοπτικές

Η LLLT εφαρμόζεται για την επούλωση πληγών, την αναδόμηση κατεστραμμένων ιστών και την αντιμετώπιση της φωτογήρανσης. Είναι μία ελεγχόμενη τεχνική που συμβάλει στη φυσική βιοσύνθεση της ελαστίνης και δεν επιφέρει ανεπιθύμητα θερμικά αποτελέσματα στους ιστούς που εφαρμόζεται. Στη παρούσα διατριβή, αποδεικνύεται διεθνώς ότι αυτή η LLLT μεταβάλλει σημαντικά τις δομικές ιδιότητες της ελαστίνης σε επίπεδο νανοκλίμακας. Η συγκεκριμένη μελέτη παρέχει καινοτόμα στοιχεία για την καλύτερη κατανόηση των μηχανισμών αλληλεπίδρασης της ερυθρής ακτινοβολίας με τους ιστούς σε νανοκλίμακα. Ως εκ τούτου, μπορεί να χρησιμοποιηθεί σαν μη επεμβατική τεχνική για επούλωση τραυματισμένων ή αποκατάσταση γηρασμένων ιστών, αλλά και ως επιστημονικό πρωτόκολλο ελεγχόμενης μεταβολής των ιδιοτήτων των ινιδίων της ελαστίνης.

4^ο ΜΕΡΟΣ: ΣΥΝΔΥΑΣΤΙΚΗ ΑΝΑΠΤΥΞΗ ΛΕΠΤΩΝ ΥΜΕΝΙΩΝ ΕΛΑΣΤΙΝΗΣ/ΚΟΛΛΑΓΟΝΟΥ

Σκοπός

Μελετήθηκε η εύρεση της κατάλληλης αναλογίας μεταξύ της ελαστίνης και κολλαγόνου για τη σύνθεση μητρικού διαλύματος, ώστε να αναπτυχθούν λεπτά υμένια από ινίδια ελαστίνης και κολλαγόνου χρησιμοποιώντας απεικονιστικές μεθόδους AFM. Μελετήθηκαν διάφορα σημεία της επιφάνειας του δείγματος ελαστίνης/κολλαγόνου, ώστε να βρεθεί η βέλτιστη περιοχή προς διερεύνηση.

Αποτελέσματα

Τα πειράματα εστιάστηκαν στην παραγωγή μητρικού διαλύματος ελαστίνης/κολλαγόνου και στην ανάπτυξη λεπτών υμενίων από το συνδυασμό των δύο πρωτεϊνών. Στη νανοσκοπική απεικόνιση των ινιδίων ελαστίνης και κολλαγόνου με χρήση AFM, παρατηρήθηκαν πλέγματα ινιδίων των δύο πρωτεϊνών με αναλογίες 1:1 και 1:2. Στον πρώτο συνδυασμό αναλογίας ελαστίνης/κολλαγόνου 1:1, αποδεικνύεται η παρουσία τους από μετρήσεις στα δομικά χαρακτηριστικά τους, όπως είναι η διάμετρος και το ύψος για την ελαστίνη και της D-Band περιοδικότητας των 67nm για το κολλαγόνο. Στη δεύτερη αναλογία (1:2) των προς μελέτη πρωτεϊνών παρατηρήθηκαν πλέγματα, αλλά κυρίως ινιδίων κολλαγόνου, καθώς η παρουσία της ελαστίνης δεν ήταν εμφανής.

Καινοτομία – Προοπτικές

Το κολλαγόνο και η ελαστίνη είναι πρωτεΐνες που διατηρούν την ελαστικότητα και την ανθεκτικότητα των ιστών αντίστοιχα. Μαζί, συνθέτουν δομές που ενισχύουν τον πολλαπλασιασμό και τη μετανάστευση κυττάρων, με τις δομικές και μηχανικές ιδιότητές τους. Η συνδυαστική μελέτη ελαστίνης και κολλαγόνου χρησιμεύει ως μια βαθύτερη κατανόηση του τρόπου με τον οποίο διαφορετικές ποσότητες ελαστίνης επηρεάζουν τα λεπτά υμένια κολλαγόνου. Επιπλέον, η χρήση του AFM ως σημαντικό εργαλείο ποιοτικού ελέγχου είναι ικανή να καταγράψει με εξαιρετική λεπτομέρεια στη νανοκλίμακα αυτές τις ιδιότητες ινιδίων των δύο πρωτεϊνών, οι οποίες θα επηρεάσουν τη συμπεριφορά και την ανάπτυξη των κυττάρων που θα αναπτυχθούν πάνω στα λεπτά υμένια. Επίσης, οι περισσότεροι βιολογικοί ιστοί, όπως το δέρμα, οι πνεύμονες και οι αρτηρίες αποτελούνται από συνδυασμό ελαστίνης και κολλαγόνου. Ο σωστός συνδυασμός τους ήταν καίριας σημασίας για δημιουργία κατάλληλων ικριωμάτων, για επούλωση πληγών, αντιμετώπιση της γήρανσης των ιστών και καρδιοαγγειακών παθήσεων. Επομένως, διευκρινίστηκε επιστημονικά ότι η αναλογία 1:1 είναι καινοτόμος διεθνώς, καθώς δεν είχαν απεικονιστεί σε επίπεδο νανοκλίμακας ταυτόχρονα ινίδια ελαστίνης και κολλαγόνου με τη βοήθεια του AFM. Αντίθετα η αναλογία 1:2, χρήζει περαιτέρω επιστημονικής διερεύνησης, κυρίως στο πρωτόκολλο δημιουργίας του μεικτού μητρικού διαλύματος. Αυτές οι γνώσεις θα αποδειχθούν χρήσιμες κατά την ανάπτυξη βιο-επιφανειών ελαστίνης/κολλαγόνου για εφαρμογές μηχανικής ιστών στην αναγεννητική ιατρική στο μέλλον.

ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΤΕΧΝΙΚΩΝ ΟΡΩΝ

ATOMIC FORCE MICROSCOPY	ΜΙΚΡΟΣΚΟΠΙΟ ΑΤΟΜΙΚΗΣ ΔΥΝΑΜΗΣ
CANTILEVER	ΠΡΟΒΟΛΟΣ
CANTILEVER'S SPRING CONSTANT CALIBRATION	ΒΑΘΜΟΝΟΜΗΣΗ ΣΤΑΘΕΡΑΣ ΕΛΑΤΗΡΙΟΥ ΤΟΥ ΠΡΟΒΟΛΟΥ
CONTACT HEIGHT MODE	ΛΕΙΤΟΥΡΓΙΑ ΣΤΑΘΕΡΗΣ ΑΠΟΣΤΑΣΗΣ
CONTACT MODE	ΛΕΙΤΟΥΡΓΙΑ ΕΠΑΦΗΣ
CONTACT FORCE MODE	ΛΕΙΤΟΥΡΓΙΑ ΣΤΑΘΕΡΗΣ ΔΥΝΑΜΗΣ
COVALENT BOND	ΟΜΟΙΟΠΟΛΙΚΟΣ ΔΕΣΜΟΣ
CROSS-LINKS	ΣΤΑΥΡΟΔΕΣΜΟΙ
D-BAND PERIODICITY	ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΤΙΚΗ D - ΠΕΡΙΟΔΙΚΟΤΗΤΑ
DIFFUSER	ΔΙΑΧΥΤΗΣ ΔΕΣΜΗΣ
DOUBLE FACE ADHESIVE TAPES	ΤΑΙΝΙΕΣ ΔΙΠΛΗΣ ΟΨΕΩΣ
ENERGY DENSITY	ΠΥΚΝΟΤΗΤΑ ΕΝΕΡΓΕΙΑΣ
ERROR SIGNAL	ΣΗΜΑ ΣΦΑΛΜΑΤΟΣ
EXTRACELLULAR MATRIX	ΕΞΩΚΥΤΤΑΡΙΟΣ ΧΩΡΟΣ
FEEDBACK SIGNAL	ΣΗΜΑ ΑΝΑΤΡΟΦΟΔΟΤΗΣΗΣ
FORCE-EXTENSION CURVES	ΚΑΜΠΥΛΕΣ ΔΥΝΑΜΗΣ-ΕΠΙΜΗΚΥΝΣΗΣ
FORCE SCANNING	ΣΑΡΩΣΗ ΜΕ ΕΛΕΓΧΟΜΕΝΗ ΔΥΝΑΜΗ
GLYCINE	ΓΛΥΚΙΝΗ
HEIGHT LEVEL DIFFERENCE	ΥΨΟΜΕΤΡΙΚΗ ΔΙΑΦΟΡΑ
HOMOGENIZER	ΟΜΟΓΕΝΟΠΟΙΗΤΗΣ
LATERAL IMAGES	ΕΙΚΟΝΕΣ ΠΛΕΥΡΙΚΗΣ ΑΠΕΙΚΟΝΙΣΗΣ
LOCATOR GRID	ΠΛΕΓΜΑ ΧΑΡΤΟΓΡΑΦΗΣΗΣ
LYSYL OXIDASE	ΟΞΕΙΔΑΣΗ ΛΥΣΙΝΗΣ

NON-CONTACT MODE	ΛΕΙΤΟΥΡΓΙΑ ΜΗ ΕΠΑΦΗΣ
OVERLAP	ΟΡΟΣ
PHASE IMAGES	ΕΙΚΟΝΕΣ ΑΠΕΙΚΟΝΙΣΗΣ ΦΑΣΗΣ
PHOSPHATE BUFFERED SALINE (PBS)	ΦΩΣΦΟΡΙΚΟ ΡΥΘΜΙΣΤΙΚΟ ΔΙΑΛΥΜΑ
PHOTO-DEGRADATION	ΦΩΤΟ-ΑΠΟΔΟΜΗΣΗ
POLYPEPTIDE CHAIN SCISSION	ΘΡΑΥΣΗ ΠΟΛΥΠΕΠΤΙΔΙΚΗΣ ΑΛΥΣΙΔΑΣ
POSITION SENSITIVE DETECTOR (PSD)	ΑΝΙΧΝΕΥΤΗΣ ΕΥΑΙΣΘΗΤΟΣ ΣΤΗ ΘΕΣΗ
SCANNING PROBE MICROSCOPY (SPM)	ΜΙΚΡΟΣΚΟΠΙΟ ΣΑΡΩΣΗΣ ΑΚΙΔΑΣ
SCANNING TUNNELING MICROSCOPE (STM)	ΜΙΚΡΟΣΚΟΠΙΟ ΣΑΡΩΣΗΣ ΜΕ ΦΑΙΝΟΜΕΝΟ ΣΗΡΑΓΓΑΣ
SCANNING ELECTRON MICROSCOPY	ΗΛΕΚΤΡΟΝΙΚΗ ΜΙΚΡΟΣΚΟΠΙΑ ΣΑΡΩΣΗΣ
SETPOINT FORCE	ΠΡΟΚΑΘΟΡΙΣΜΕΝΗ ΤΙΜΗ ΔΥΝΑΜΗΣ ΣΑΡΩΣΗΣ
SPIN COATING	ΦΥΓΟΚΕΝΤΡΙΚΗ ΕΠΙΣΤΡΩΣΗ
SPRING CONSTANT	ΣΤΑΘΕΡΑ ΕΛΑΤΗΡΙΟΥ
STIFNESS	ΑΚΑΜΨΙΑ
STOCK COLLAGEN	ΜΗΤΡΙΚΟ ΔΙΑΛΥΜΑ
SUPERCOIL	ΥΠΕΡΕΛΙΚΑ
SUPRAMOLECULAR ASSEMBLY	ΥΠΕΡΜΟΡΙΑΚΗ ΟΡΓΑΝΩΣΗ
TAPPING MODE	ΛΕΙΤΟΥΡΓΙΑ ΕΝΔΙΑΜΕΣΗΣ ΕΠΑΦΗΣ
TIP	ΑΚΙΔΑ
TIP RADIUS	ΑΚΤΙΝΑ ΚΑΜΠΥΛΟΤΗΤΑΣ ΚΟΡΥΦΗΣ ΑΚΙΔΑΣ

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

ΕΙΣΑΓΩΓΗ

- [1] Yeo G. C., Mithieux S. M., Weiss A. S. The elastin matrix in tissue engineering and regeneration. *Current Opinion in Biomedical Engineering*. 2018. <https://doi.org/10.1016/J.COBE.2018.02.007>.
- [2] Hinderer S., Shena N., Ringuette L. J., Hansmann J., Reinhardt D. P., Brucker S. Y. In vitro elastogenesis: instructing human vascular smooth muscle cells to generate an elastic fiber-containing extracellular matrix scaffold. *Biomed. Mater.* 2015, 10, 034102. doi: 10.1088/1748-6041/10/3/034102.
- [3] Rodriguez-Cabello J.C., Martin L., Girotti A., Garca-Arévalo C., Arias F.J., Alonso M. Emerging applications of multifunctional elastin-like recombinamers. *Nanomedicine*. 2011, 6, 111–122. <https://doi.org/10.2217/nmm.10.141>.
- [4] Nettles D.L., Chilkoti A., Setton L.A. Applications of elastin-like polypeptides in tissue engineering. *Adv. Drug Deliv. Rev.* 2010, 62, 1479–1485. <https://doi.org/10.1016/j.addr.2010.04.002>.
- [5] Konugolu Venkata Sekar S., Beh J.S., Farina A., Dalla Mora A., Pifferi A., Taroni P. Broadband diffuse optical characterization of elastin for biomedical applications. *Biophys Chem.* 2017, 229, 130-134. doi:10.1016/j.bpc.2017.07.004. PMID: 28733103.
- [6] Sharma A., Sharma P. and Roy S. Elastin-inspired supramolecular hydrogels: a multifaceted extracellular matrix protein in biomedical engineering. *Soft Matter*. 2021, 17, 3266-3290. <https://doi.org/10.1039/D0SM02202K>.
- [7] Wen Q., Mithieux S. M., Weiss A. S. Elastin Biomaterials in Dermal Repair. Review. *Trends in biotechnology*. 2019, 38, 3, 280-291. <https://doi.org/10.1016/j.tibtech.2019.08.005>.
- [8] Pepe A., Bochicchio B. An Elastin-Derived Self-Assembling Polypeptide. *J. Soft Matter*. 2013, 732157. <https://doi.org/10.1155/2013/732157>.
- [9] Varanko A., Su J. C., Chilkoti A. Elastin-Like Polypeptides for Biomedical Applications. *Annual Review of Biomedical Engineering*. 2020, 22, 1, 343-369. <https://doi.org/10.1146/annurev-bioeng-092419-061127>.
- [10] Mecham R. P., Elastin in lung development and disease pathogenesis. *Matrix Biology*. 2018, 73, 6-20. <https://doi.org/10.1016/j.matbio.2018.01.005>.
- [11] Del Prado Audelo M.L., Mendoza-Muñoz N., Escutia-Guadarrama L., Giraldo-Gomez D., González-Torres M., Florán B., Cortés H., Leyva-Gomez G. Recent Advances in Elastin-Based Biomaterial. *J Pharm Pharm Sci.* 2020, 23, 314-332. doi:10.18433/jpps31254. PMID: 33751927.

- [12] Kowalczyk T., Hnatuszko-Konka K., Gerszberg A., Kononowicz A.K. Elastin-like polypeptides as a promising family of genetically-engineered protein based polymers. *World J. Microbiol. Biotechnol.* 2014, 30, 2141–2152. <https://doi.org/10.1007/s11274-014-1649-5>.
- [13] Navon, Y., & Bitton, R. Elastin-Like Peptides (ELPs) – Building Blocks for Stimuli-Responsive Self-Assembled Materials. *Israel Journal of Chemistry.* 2016, 56, 581-589. doi:10.1002/IJCH.201500016.
- [14] Schrader, C. U., Heinz, A., Majovsky, P., Karaman Mayack, B., Brinckmann, J., Sippl, W. Elastin is heterogeneously cross-linked. *J. Biol. Chem.* 2018, 293, 15107–15119. doi: 10.1074/jbc.RA118.004322.
- [15] Lockhart-Cairns, M. P., Newandee, H., Thomson, J., Weiss, A. S., Baldock, C., and Tarakanova, A. Transglutaminase-mediated cross-linking of tropoelastin to fibrillin stabilises the elastin precursor prior to elastic fibre assembly. *J. Mol. Biol.* 2020, 432, 5736–5751. doi: 10.1016/j.jmb.2020.08.023.
- [16] Hedtke, T., Schröder, C.U., Heinz, A., Hoehenwarter, W., Brinckmann, J., Groth, T. and Schmelzer, C.E.H. A comprehensive map of human elastin cross-linking during elastogenesis. *FEBS J.* 2019, 286, 3594-3610. <https://doi.org/10.1111/febs.14929>
- [17] Asai D., Xu D., Liu W., Garcia Quiroz F., Callahan D.J., Zalutsky M.R., Craig S.L.; Chilkoti A. Protein polymer hydrogels by in situ, rapid and reversible self-gelation. *Biomaterials.* 2012, 33, 5451–5458. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2012.03.083>.
- [18] Wu X., Sallach R., Haller C.A., Caves J.A., Nagapudi K., Conticello V.P., Levenston M.E., Chaikof E.L. Alterations in physical crosslinking modulate mechanical properties of two-phase protein polymer networks. *Biomacromolecules* 2005, 6, 3037–3044. <https://doi.org/10.1021/bm0503468>.
- [19] Lim D.W., Nettles D.L., Setton L.A., Chilkoti A. Rapid crosslinking of elastin-like polypeptides with (hydroxymethyl)phosphines in aqueous solution. *Biomacromolecules.* 2007, 8, 1463–1470. <https://doi.org/10.1021/bm061059m>.
- [20] Reichheld S. E., Muiznieks L. D., Lu R., Sharpe S., Keeley F. W. Sequence variants of human tropoelastin affecting assembly, structural characteristics and functional properties of polymeric elastin in health and disease. *Matrix Biol.* 2019, 84, 68–80. doi: 10.1016/j.matbio.2019.06.010.
- [21] Wagenseil J.E.; Mecham R.P. New insights into elastic fiber assembly. *Birth Defects Res. (Part C)-Embryo Today: Rev.* 2007, 81, 229–240. <https://doi.org/10.1002/bdrc.20111>.
- [22] Yeo G. C., Baldock C., Wise S. G., Weiss A. S. Targeted modulation of tropoelastin structure and assembly. *ACS Biomater. Sci. Eng.* 2017, 3, 2832–2844. doi:10.1021/acsbiomaterials.6b00564.

- [23] Almine J.F., Bax D.V., Mithieux S.M. Elastin-based materials. *Chem. Soc. Rev.* 2010, 39, 3371–3379. <https://doi.org/10.1039/B919452P>.
- [24] Rodriguez-Cabello J.C., Prieto S., Reguera J., Arias F.J., Ribeiro A. Biofunctional design of elastin-like polymers for advanced applications in nanobiotechnology. *J. Biomater. Sci. Polym. Ed.* 2007, 18, 269–286. <https://doi.org/10.1163/156856207779996904>.
- [25] Baul U., Bley M., Dzubiella J. Thermal compaction of disordered and elastin-like polypeptides: a temperature-dependent, sequence-specific coarse-grained simulation model. *Biomacromolecules.* 2020, 21, 3523–3538. doi:10.1021/acs.biomac.0c00546
- [26] Tarakanova A., Ozsvar J., Weiss A. S., Buehler M. J. Coarse-grained model of tropoelastin self-assembly into nascent fibrils. *Mater. Today Biol.* 2019a, 3, 100016. doi: 10.1016/j.mtbio.2019.100016
- [27] Maeda I., Fukumoto Y., Nose T., Shimohigashi Y., Nezu T., Terada Y., Kodama H., Kaibara K., Okamoto K. Structural requirements essential for elastin coacervation: Favorable spatial arrangements of valine ridges on the three-dimensional structure of elastin-derived polypeptide (VPGVG)_n. *J. Pept. Sci.* 2011, 17, 735–743. <https://doi.org/10.1002/psc.1394>.
- [28] Bochicchio B., Armenante M.R., Crudele M.A., Pepe A. Molecular Determinants for the Self-Assembly of Elastin Peptides. *Conf. Pap. Sci.* 2014, 2014, 214235. <https://doi.org/10.1155/2014/214235>.
- [29] Beckmann A., Xiao S., Müller J.P., Mercadante D., Nüchter T., Kröger N., Langhojer F., Petrich W., Holstein T.W., Benoit M. A fast recoiling silk-like elastomer facilitates nanosecond nematocyst discharge. *BMC Biol.* 2015, 13, 1–16. <https://doi.org/10.1186/s12915-014-0113-1>.
- [30] Kontomaris S.V. and Stylianou A. Atomic force microscopy for university students: applications in biomaterials. *Eur. J. Phys.*, 2017, 38, 033003. doi:10.1088/1361-6404/aa5cd6.
- [31] Stylianou A., Kontomaris S.V., Grant C., Alexandratou E. Atomic Force Microscopy on Biological Materials Related to Pathological Conditions. *Scanning* 2019, 8452851. <https://doi.org/10.1155/2019/8452851>.
- [32] Kontomaris S.V. The Hertz Model in AFM Nanoindentation Experiments: Applications in Biological Samples and Biomaterials. *Micro Nanosyst.* 2018, 10, 11–22. <http://doi.org/10.2174/1876402910666180426114700>.
- [33] Krieg M., Fläschner G., Alsteens D., Gaub B.M., Roos W.H., Wuite G.J.L., Gaub H.E., Gerber C., Dufrêne Y.F., Müller D.J. Atomic force microscopy-based mechanobiology. *Nat. Rev. Phys.* 2019, 1, 41–57. [Google Scholar]
- [34] Sambani K., Kontomaris S.V., Yova D. Atomic Force Microscopy Imaging of Elastin Nanofibers Self-Assembly. *Materials.* 2023, 16, 12, 4313. doi:10.3390/ma16124313. PMID: 37374496; PMCID: PMC10300809.

- [35] Stylianou A., Yova D., Alexandratou E. Investigation of the influence of UV irradiation on collagen thin films by AFM imaging. *Materials Science and Engineering:C*. 2014, 45, 455-468. <https://doi.org/10.1016/j.msec.2014.09.006>.
- [36] Kontomaris S.V., Stylianou A., Georgakopoulos A., Malamou A. 3D AFM Nanomechanical Characterization of Biological Materials. *Nanomaterials*. 2023, 13, 3, 395. <https://doi.org/10.3390/nano13030395>.
- [37] Stylianou A., Lekka M., Stylianopoulos T. AFM assessing of nanomechanical fingerprints for cancer early diagnosis and classification: From single cell to tissue level. *Nanoscale*. 2018, 10, 20930–20945.
- [38] Wenger M.P.E., Bozec L., Horton M.A., Mesquidaz P. Mechanical properties of collagen fibrils. *Biophys. J.* 2007, 93, 1255–1263. <https://doi.org/10.1529%2Fbiophysj.106.103192>.
- [39] Lekka M. Atomic force microscopy: A tip for diagnosing cancer. *Nat. Nanotechnol.* 2012, 7, 691–692. <https://doi.org/10.1038/nnano.2012.196>.
- [40] Li N., Jang H., Yuan M., Li W., Yun X., Lee J., Du Q., Nussinov R., Hou J., Lal R. Graphite-templated amyloid nanostructures formed by a potential pentapeptide inhibitor for Alzheimer’s disease: A combined study of real-time atomic force microscopy and molecular dynamics simulations. *Langmuir*. 2017, 33, 6647–6656. [Google Scholar] [CrossRef].
- [41] Ramalho R., Rankovic S., Zhou J., Aiken C., Rousso I. Analysis of the mechanical properties of wild type and hyperstable mutants of the HIV-1 capsid. *Retrovirology* 2016, 13, 1–7. <https://doi.org/10.1186/s12977-016-0250-4>.
- [42] Ganser B.K., Li S., Klishko V.Y., Finch J.T., Sundquist W.I. Assembly and analysis of conical models for the HIV-1 core. *Science*. 1999, 283, 80–83. <https://doi.org/10.1126/science.283.5398.80>.
- [43] Sundquist W.I., Kräusslich H.G. HIV-1 assembly, budding, and maturation. *Cold Spring Harb. Perspect. Med.* 2012, 2, 7. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a006924>.
- [44] Lekka M. Discrimination Between Normal and Cancerous Cells Using AFM. *BioNanoScience*. 2016, 6, 65–80. <https://doi.org/10.1007/s12668-016-0191-3>.
- [45] Kontomaris S.V., Stylianou A., Chliveros G., Malamou A. Determining Spatial Variability of Elastic Properties for Biological Samples Using AFM. *Micromachines*. 2023, 14, 182. <https://doi.org/10.3390/mi14010182>.
- [46] Hasirci V., Vrana E., Zorlutuna P., Ndreu A., Yilgor P., Basmanav F.B., Aydin E. Nanobiomaterials: A review of the existing science and technology, and new approaches. *J. Biomater. Sci. Polym. Ed.* 2006, 17, 1241–1268. <https://doi.org/10.1163/156856206778667442>.

- [47] Stylianou A., Atomic Force Microscopy for Collagen-Based Nanobiomaterials, *Journal of Nanomaterials*. 2017, Article ID 9234627, 14. <https://doi.org/10.1155/2017/9234627>
- [48] Kontomaris S.V., Yova D., Stylianou A. and Balogiannis G. The effects of UV irradiation on collagen D-band revealed by atomic force microscopy. *Scanning*. 2015, 37, 101-111. <https://doi.org/10.1002/sca.21185>
- [49] Le Page A., Khalil A., Vermette P., Frost E. H., Larbi A., Witkowski J. M., Fulop T., The role of elastin-derived peptides in human physiology and diseases, *Matrix Biology*. 2019, 84, 81-96, <https://doi.org/10.1016/j.matbio.2019.07.004>.
- [50] Heinz A. Elastases and elastokines: elastin degradation and its significance in health and disease, *Critical Reviews in Biochemistry and Molecular Biology*. 2020, 55, 3, 252-273, doi:10.1080/10409238.2020.1768208
- [51] Parihar A.S., Pathak R. Effect of low level laser therapy (LLLT) on post extraction wound healing. *Journal of Advanced Medical and Dental Sciences Research*. 2018, 6, 10. doi: 10.21276/jamdsr.
- [52] Ghaemi M. Comparison and Evaluation of the Low-Level Laser and the Red and Blue LED Effects on Wound Healing in Rabbit. *Journal of lasers in medical sciences*. 2019, 10, 3, 189-193.
- [53] Almine J.F. Elastin signaling in wound repair. *Birth defects research. Part C, Embryo today: reviews*. 2012, 96, 3, 248-57.
- [54] Vazquez-Portalatin N., Alfonso-Garcia A., Liu J.C. Marcu L., Panitch A. Physical, Biomechanical, and Optical Characterization of Collagen and Elastin Blend Hydrogels. *Ann Biomed Eng*. 2020, 48, 2924–2935. <https://doi.org/10.1007/s10439-020-02605-x>.
- [55] Chow M., Turcotte R., Lin C.P., Zhang Y. Arterial extracellular matrix: a mechanobiological study of the contributions and interactions of elastin and collagen. *Biophysical journal*. 2014, 106 12, 2684-92.
- [56] Vidal B.D. Fluorescence, aggregation properties and FT-IR microspectroscopy of elastin and collagen fibers. *Acta histochemical*. 2014, 116 8, 1359-66.
- [57] Prhashanna A., Taylor P. A., Qin J., Kiick K. L., Jayaraman, A. Effect of peptide sequence on the LCST-like transition of elastin-like peptides and elastin-like peptide–collagen-like peptide conjugates: simulations and experiments. *Biomacromolecules*. 2019, 20, 1178–1189. doi: 10.1021/acs.biomac.8b01503.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1

- [58] Callister Jr. W. D., Rethwisch D.G. Materials Science and Engineering: An Introduction, 9th Edition. 2014, Wiley Binder Version ISBN: 978-1-118-47770-0.
- [59] Jeronimidis G. Chapter 1. Structure-Property Relationships in Biological Materials. Pergamon Materials Series 4. 2000, 3-16, [http://dx.doi.org/10.1016/S1470-1804\(00\)80005-X](http://dx.doi.org/10.1016/S1470-1804(00)80005-X).
- [60] van Eldijk M.B., McGann C.L., Kiick K.L., van Hest J.C.M. Elastomeric Polypeptides. In: Deming, T. (eds) Peptide-Based Materials. Topics in Current Chemistry. 2012, 310, 71-116, https://doi.org/10.1007/128_2011_205.
- [61] Vindin H., S. M. Mithieux S. M., Weiss A. S., Elastin architecture, Matrix Biology. 2019, 84, 4-16, ISSN 0945-053X, <https://doi.org/10.1016/j.matbio.2019.07.005>.
- [62] Daamen W.F., Veerkamp J.H., van Hest J.C., van Kuppevelt T.H. Elastin as a biomaterial for tissue engineering. Biomaterials. 2007, 28, 30, 4378-98. doi:10.1016/j.biomaterials.2007.06.025. PMID: 17631957.
- [63] Berg J. M., Tymoczko J. L., Gatto G. J., Stryer L., Βιοχημεία, 9η έκδοση, ISBN: 978-960-524-636-5, 2021.
- [64] Bailey A.J. Collagen and elastin fibres. J Clin Pathol Suppl (R Coll Pathol). 1978, 12, 49-58. PMID: 365893; PMCID: PMC1347123.
- [65] Partridge S.M. Elastin, Advances in Protein Chemistry. 1963, 17, 227-302, ISSN 0065-3233, ISBN 9780120342174, [https://doi.org/10.1016/S0065-3233\(08\)60055-8](https://doi.org/10.1016/S0065-3233(08)60055-8).
- [66] Moore J., Thibeault S., Insights Into the Role of Elastin in Vocal Fold Health and Disease, Journal of Voice. 2012, 26, 3, 269-275, ISSN 0892-1997, <https://doi.org/10.1016/j.jvoice.2011.05.003>.
- [67] National Center for Biotechnology Information, 2023. PubChem Compound Summary, <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Desmosine>.
- [68] National Center for Biotechnology Information, 2023. PubChem Compound Summary Ισοδεσμοσίνη, <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Isodesmosine>.
- [69] Li L., Charatiand M. B., Kiick K. L., Elastomeric polypeptide-based biomaterials, Polymer Chemistry. 2010, 1, 1160–1170, <https://doi.org/10.1039/B9PY00346K>.
- [70] Sivaraman B., Bashur C. A., Ramamurthi A., Advances in biomimetic regeneration of elastic matrix structures, Drug Deliv Transl Res. 2012, 2, 5, 323–350, <https://doi.org/10.1007%2Fs13346-012-0070-6>.
- [71] Schmelzer CEH, Hedtke T., Heinz A. Unique molecular networks: Formation and role of elastin cross-links. IUBMB Life. 2020, 72, 842–854. doi.org/10.1002/iub.2213.

[72] DeBelle L., Tamburo A.M. Elastin: molecular description and function, *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*. 1999, 31, 2, 261-272, ISSN 1357-2725, [https://doi.org/10.1016/S1357-2725\(98\)00098-3](https://doi.org/10.1016/S1357-2725(98)00098-3).

[73] Yeo G. C., Keeley F. W., Weiss A. S., Coacervation of tropoelastin, *Advances in Colloid and Interface Science*. 2011, 167, 1–2, 94-103, ISSN 0001-8686, <https://doi.org/10.1016/j.cis.2010.10.003>.

[74] MacEwan SR, Chilkoti A. Elastin-like polypeptides: biomedical applications of tunable biopolymers, *Biopolymers*, 2010, 94, 1, 60-77, doi: 10.1002/bip.21327. PMID: 20091871.

[75] Gary E. Wnek, Gary L. Bowlin *Encyclopedia of Biomaterials and Biomedical Engineering*, informa health care Second Edition, 2008, 1, 133-140,1826-1827,2275-2281.

[76] Reguera J., Lagaron J.M., Alonso M., Reboto V., Calvo B., Rodriguez-Cabello J.C. Thermal Behavior and Kinetic Analysis of the Chain Unfolding and Refolding and of the Concomitant Nonpolar Solvation and Desolvation of Two Elastin-like Polymers. *Macromolecules*. 2003, 36, 22, 8470–8476. <https://doi.org/10.1021/ma034572q>.

[77] Dreher M.R., Simnick A.J., Fischer K., Smith R.J., Patel A., Schmidt M., Chilkoti A. Temperature triggered self-assembly of polypeptides into multivalent spherical micelles. *J Am Chem Soc*. 2008, 130, 2, 687-94. doi: 10.1021/ja0764862.

[78] Betre H., Liu W., Zalutsky M.R., Chilkoti A., Kraus V.B., Setton L.A. A thermally responsive biopolymer for intra-articular drug delivery. *J Control Release*. 2006, 115, 2, 175-82. doi: 10.1016/j.jconrel.2006.07.022.

[79] Betre H., Setton L.A., Meyer D.E., Chilkoti A. Characterization of a Genetically Engineered Elastin-like Polypeptide for Cartilaginous Tissue Repair. *Biomacromolecules*. 2002, 3, 5, 910–916. <https://doi.org/10.1021/bm0255037>.

[80] Di Zio K., Tirrell D.A. Mechanical Properties of Artificial Protein Matrices Engineered for Control of Cell and Tissue Behavior. *Macromolecules*. 2003, 36, 5, 1553–1558. <https://doi.org/10.1021/ma0256587>

[81] Jiménez Vázquez J., San Martín Martínez E. Collagen and elastin scaffold by electrospinning for skin tissue engineering applications. *Journal of Materials Research*, 2019, 34, 2819–2827. <https://doi.org/10.1557/jmr.2019.233>.

[82] Stojic M., Ródenas-Rochina J., López-Donaire M.L., González de Torre I., González Pérez M., Rodríguez-Cabello J.C., Vojtová L., Jorcano J.L., Velasco D. Elastin-Plasma Hybrid Hydrogels for Skin Tissue Engineering. *Polymers*. 2021, 13, 13, 2114. <https://doi.org/10.3390/polym13132114>.

[83] Wen Q, Mithieux SM, Weiss AS. Elastin Biomaterials in Dermal Repair. *Trends Biotechnol*. 2020, 38, 280–91. <https://doi.org/10.1016/j.tibtech.2019.08.005>.

[84] Fang S, Riber SS, Hussein K, Ahlmann AH, Harvald EB, Khan F, et al. Decellularized human umbilical artery: Biocompatibility and in vivo functionality in sheep carotid bypass model. *Mater. Sci Eng. C.* 2020, 112, 110955. <https://doi.org/10.1016/j.msec.2020.110955>.

[85] Manji R.A., Lee W., Cooper D.K.C. Xenograft bioprosthetic heart valves: Past, present and future. *Int. J. Surg.* 2015, 23, 280–4. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.ijvs.2015.07.009>.

[86] Sandberg L.B., Soskel N.T., Leslie J.G. Elastin structure, biosynthesis, and relation to disease states. *N Engl. J. Med.* 1981, 304, 10, 566-79. doi:10.1056/NEJM198103053041004.

[87] Glagov S., Vito R., Giddens D.P., Zarins C.K. Micro-architecture and composition of artery walls: relationship to location, diameter and the distribution of mechanical stress. *J Hypertens Suppl.* 1992, 10, 6, S101-4.

[88] Starcher B. A ninhydrin-based assay to quantitate the total protein content of tissue samples. *Anal Biochem.* 2001, 292, 1, 125-9. doi: 10.1006/abio.2001.5050.

[89] Roten S.V., Bhat S., Bhawan J. Elastic fibers in scar tissue. *J Cutan Pathol.* 1996, 23, 1, 37-42. doi: 10.1111/j.1600-0560.1996.tb00775.x.

[90] Pasquali-Ronchetti I., Baccarani-Contri M. Elastic fiber during development and aging. *Microsc Res Tech.* 1997, 38, 4, 428-35. doi: 10.1002/(SICI)1097-0029(19970815)38:4<428::AID-JEMT10>3.0.CO;2-L.

[91] Rosenbloom J., Abrams W.R. and Mecham, R. Extracellular matrix 4: The elastic fiber. *The FASEB Journal.* 1993, 7, 1208-1218. <https://doi.org/10.1096/fasebj.7.13.8405806>.

[92] Kielty C.M., Sherratt M.J., & Shuttleworth C.A. Elastic fibres. *Journal of cell science*, 2002, 115 Pt 14, 2817-28.

[93] Ushiki T. Collagen Fibers, Reticular Fibers and Elastic Fibers. A Comprehensive Understanding from a Morphological Viewpoint. *Archives of Histology and Cytology*, 2002, 65, 109-126.

[94] Robert L., Jacob M.P., Fülöp T. Elastin in blood vessels. *Ciba Found Symp.* 1995, 192, 286-99; discussion 299-303. doi: 10.1002/9780470514771.ch15.

[95] Li D.Y., Brooke B., Davis EC, Mecham RP, Sorensen LK, Boak BB, Eichwald E, Keating MT. Elastin is an essential determinant of arterial morphogenesis. *Nature.* 1998, 393, 6682, 276-80. doi: 10.1038/30522.

[96] Leach J.B., Wolinsky J.B., Stone P.J., Wong J.Y. Crosslinked alpha-elastin biomaterials: towards a processable elastin mimetic scaffold. *Acta Biomater.* 2005, 1, 2, 155-64. doi: 10.1016/j.actbio.2004.12.001.

[97] Vrhovski B., Weiss A.S. Biochemistry of tropoelastin. *Eur J Biochem.* 1998, 258, 1, 1-18. doi: 10.1046/j.1432-1327.1998.2580001.x.

[98] Davis E.C., Quiney B., *EXTRACELLULAR MATRIX: Elastin and Microfibrils*, 2006, 162-168, ISBN 9780123708793, <https://doi.org/10.1016/B0-12-370879-6/00144-7>.

[99] Shapiro S.D., Endicott S.K., Province M.A., Pierce J.A., Campbell E.J. Marked longevity of human lung parenchymal elastic fibers deduced from prevalence of D-aspartate and nuclear weapons-related radiocarbon. *J Clin Invest.* 1991, 87, 5, 1828-34. doi: 10.1172/JCI115204.

[100] Wang K., Meng X. and Guo Z. Elastin Structure, Synthesis, Regulatory Mechanism and Relationship With Cardiovascular Diseases. *Front. Cell Dev. Biol.* 2021, 9, 596702. doi: 10.3389/fcell.2021.596702.

[101] Mithieux S.M., Wise S.G., Raftery M.J., Starcher B., Weiss A.S. A model two-component system for studying the architecture of elastin assembly in vitro. *J Struct Biol.* 2005, 149, 3, 282-9. doi: 10.1016/j.jsb.2004.11.005.

[102] Zou H. and Zhang H.H. On the Adaptive Elastic-Net with a Diverging Number of Parameters. *Annals of Statistics.* 2009, 37, 1733. <https://doi.org/10.1214/08-AOS625>.

[103] Ozsvar J., Yang C., Cain S.A., Baldock C., Tarakanova A. and Weiss A.S. Tropoelastin and Elastin Assembly. *Front. Bioeng. Biotechnol.* 2021, 9, 643110. doi: 10.3389/fbioe.2021.643110

[104] Holst J., Watson S., Lord M.S., Eamegdool S.S., Bax D.V., Nivison-Smith L.B., Kondyurin A., Ma L., Oberhauser A.F., Weiss A.S., Rasko J.E. Substrate elasticity provides mechanical signals for the expansion of hemopoietic stem and progenitor cells. *Nat Biotechnol.* 2010, 28, 10, 1123-8. doi: 10.1038/nbt.1687.

[105] Baldock C., Oberhauser A.F., Ma L., Lammie D., Siegler V., Mithieux S.M., Tu Y., Chow J.Y., Suleman F., Malfois M., Rogers S., Guo L., Irving T.C., Wess T.J., Weiss A.S. Shape of tropoelastin, the highly extensible protein that controls human tissue elasticity. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2011, 108, 11, 4322-7. doi: 10.1073/pnas.1014280108.

[106] Lloyd-Jones D, Adams RJ, Brown TM, Carnethon M, Dai S, De Simone G, Ferguson TB, Ford E, Furie K, Gillespie C, Go A, Greenlund K, Haase N, Hailpern S, Ho PM, Howard V, Kissela B, Kittner S, Lackland D, Lisabeth L, Marelli A, McDermott MM, Meigs J, Mozaffarian D, Mussolino M, Nichol G, Roger VL, Rosamond W, Sacco R, Sorlie P, Roger VL, Thom T, Wasserthiel-Smoller S, Wong ND, Wylie-Rosett J; American Heart Association Statistics Committee and Stroke Statistics Subcommittee. Heart disease and stroke statistics. Erratum in: *Circulation.* 2011, 124, 16, e425. PMID: 20019324.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2

[107] Zhao C., Xiao Y., Ling S., Pei Y., Ren J. Structure of Collagen. In: Ling, S. (eds) *Fibrous Proteins. Methods in Molecular Biology*. 2021, 2347, 17-25. https://doi.org/10.1007/978-1-0716-1574-4_2. PMID: 34472051.

[108] Chen J., Ahn T.W., Colón-Bernal I.D., Kim J. & Banaszak Holl M.M. “The Relationship of Collagen Structural and Compositional Heterogeneity to Tissue Mechanical Properties: A Chemical Perspective.” *ACS nano*. 2017, 11, 11, 10665-10671.

[109] Owczarzy A, Kurasiński R, Kulig K, Rogóż W, Szkudlarek A, Maciążek-Jurczyk M. Collagen - structure, properties and application. *Engineering of Biomaterials*. 2020, 156, 17-23. doi:10.34821/eng.biomat.156.2020.17-23.

[110] Xinhua Liu, Chi Zheng, Xiaomin Luo, Xuechuan Wang, Huie Jiang, Recent advances of collagen-based biomaterials: Multi-hierarchical structure, modification and biomedical applications. *Materials science & engineering C, Materials for biological applications*. 2019, 99, 1509-1522. <https://doi.org/10.1016/j.msec.2019.02.070>.

[111] Ivanova V. P. and Krivchenko A. I., A current viewpoint on structure and evolution of collagens. I. Fibrillar collagens, *Journal of Evolutionary Biochemistry and Physiology*. 2012, 48, 127-139.

[112] Sandhu S., Gupta S., Bansal H. and Singla K., Collagen in Health and Disease, *Journal of Orofacial Research*. 2012, 2, 153-159.

[113] Στυλιανού Α. Κ., Επίδραση οπτικής ακτινοβολίας στην τοπολογία κολλαγόνου με χρήση απεικονιστικής μικροσκοπίας ατομικής δύναμης και σάρωσης ηλεκτρονίων, *Διαδακτορική Διατριβή*, 2014, <http://dx.doi.org/10.12681/eadd/39392>.

[114] Στεριώτης Γ., Μελέτη Ινών Κολλαγόνου Σε Νανοκλίμακα Υπό Την Επίδραση Laser Χαμηλής Ισχύος Στην Περιοχή Του Ερυθρού, Πτυχιακή εργασία, 2016, <http://artemis.cslab.ece.ntua.gr:8080/jspui/handle/123456789/13099>.

[115] Sharon S. Tang, Vidisha Mohad, Madhu Gowda, Susan L. Thibeault, Insights Into the Role of Collagen in Vocal Fold Health and Disease, *Journal of Voice*. 2017, 31, 5, 520-527, ISSN 0892-1997, <https://doi.org/10.1016/j.jvoice.2017.01.008>.

[116] Hachim G., Laarej A., Mahi J. E., Abilkassem R., Hassani A. & Agadr A. A Case Report on Ehlers Danlos Syndrome. *Asian Journal of Pediatric Research*, 2022, 9, 4, 1-5, DOI: 10.9734/ajpr/2022/v9i330270.

[117] Miller Erin B. and Grosel J. M. A review of Ehlers-Danlos syndrome. *Journal of the American Academy of Physician Assistants*. 2020, 33, 4, 23-28. DOI: 10.1097/01.JAA.0000657160.48246.91.

[118] http://ebooks.edu.gr/ebooks/v/html/8547/2670/Chimeia_B-Lykeiou_html-empl/index5_3.html

- [119] <https://el.wikipedia.org/wiki/%CE%92%CE%B9%CE%BF%CF%83%CF%8D%CE%BD%CE%B8%CE%B5%CF%83%CE%B7>
- [120] Minchin S. & Lodge J. Understanding biochemistry: structure and function of nucleic acids. Essays in biochemistry. 2019, 63, 433-456. 10.1042/EBC20180038.
- [121] Kadler K. E., Baldock C., Bella J. and Boot-Handford R. P., Collagens at a glance, J Cell Sci. 2007, 120, 1955-1958.
- [122] Engel J. and Bächinger H. P., Structure, stability and folding of the collagen triple helix, Top Curr Chem. 2005, 247, 7-33.
- [123] <http://www.zo.utexas.edu/faculty/sjasper/bio3011/chemistry.html> (figure 4.7), copyright The McGraw-Hill Companies, Inc.
- [124] Puetzer J. L., Tianchi Ma, Sallent I., Gelmi A., Stevens M. M. Driving Hierarchical Collagen Fiber Formation for Functional Tendon, Ligament, and Meniscus Replacement, Biomaterials. 2021, 269, 120527, ISSN 0142-9612, <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2020.120527>.
- [125] Koide T. and Nagata K., Collagen biosynthesis, Topics in Current Chemistry. 2005, 247, 85-114.
- [126] Exposito J. Y., Valcourt U., Cluzel C. and Lethias C., The fibrillar collagen family, International Journal of Molecular Sciences. 2010, 11, 407-426.
- [127] Walimbe T, Panitch A. Best of Both Hydrogel Worlds: Harnessing Bioactivity and Tunability by Incorporating Glycosaminoglycans in Collagen Hydrogels. Bioengineering. 2020, 7, 4, 156. <https://doi.org/10.3390/bioengineering7040156>.
- [128] DeFoor M.T., Cognetti D.J., Yuan T.T., Sheean A.J. Treatment of Tendon Injuries in the Servicemember Population across the Spectrum of Pathology: From Exosomes to Bioinductive Scaffolds. Bioengineering. 2024, 11, 2, 158. <https://doi.org/10.3390/bioengineering11020158>.
- [129] Aronoff, M.R., Hiebert, P., Hentzen, N.B. et al. Imaging and targeting LOX-mediated tissue remodeling with a reactive collagen peptide. Nat Chem Biol, 2021, 17, 865–871. <https://doi.org/10.1038/s41589-021-00830-6>.
- [130] Mitsuo Yamauchi, Yuki Taga, Shunji Hattori, Masashi Shiiba, Masahiko Terajima. Chapter 6 -Analysis of collagen and elastin cross-links. Methods in cell biology. 2018, 143, 115-132. DOI:10.1016/bs.mcb.2017.08.006.
- [131] Sallent, I., Capella-Monsonís, H., Zeugolis, D.I. Production and Characterization of Chemically Cross-Linked Collagen Scaffolds. In: Sagi, I., Afratis, N. (eds) Collagen. Methods in Molecular Biology. 2019, 1944. Humana Press, New York, NY. https://doi.org/10.1007/978-1-4939-9095-5_3.

[132] Slowinska, K. Cross-Linked Collagen Gels Using Gold Nanoparticles. In: Udit, A. (eds) Protein Scaffolds. Methods in Molecular Biology. 2018, 1798. https://doi.org/10.1007/978-1-4939-7893-9_16.

[133] damiak, Katarzyna and Alina Sionkowska. Current methods of collagen cross-linking: Review. International journal of biological macromolecules. 2020, 161, 550-560. DOI:10.1016/j.ijbiomac.2020.06.075.

[134] Delgado, Luis M et al. * Collagen Cross-Linking: Biophysical, Biochemical, and Biological Response Analysis. Tissue engineering, Part A. 2017, 23, 19-20, 1064-1077. DOI:10.1089/ten.TEA.2016.0415.

[135] Shiu, Y.J., Liao, K., Chang, J., Shih, O., Wang, C., Hsu, T., Lan, T., Lin, Y., Lin, C. & Jeng, U. Aggregation forms of Type I collagen studied by simultaneous small- and wide-angle X-ray scattering. Acta Crystallographica Section A Foundations and Advances. 2021, A77, C789. DOI:10.1107/s010876732108908x.

[136] Darvish D. M., Collagen fibril formation in vitro: From origin to opportunities, Materials Today Bio, Volume 15, 2022, 100322, ISSN 2590-0064, <https://doi.org/10.1016/j.mtbio.2022.100322>.

[137] Stylianou A. Assessing Collagen D-Band Periodicity with Atomic Force Microscopy. Materials (Basel). 2022, 15, 4, 1608. doi: 10.3390/ma15041608. PMID: 35208148; PMCID: PMC8877100.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3

- [138] Binnig G., Quate C. F. and Gerber C. Atomic force microscope, *Physical Review Letters*. 1986, 56, 930-933.
- [139] C. Dupas, P. Houdy, and M. Lahmani, *Nanoscience: Nanotechnology and nanophysics*. Berlin: Springer, 2004.
- [140] B. Roszek and R. E. de Jong Geertsma, *Nanotechnology in medical applications: State-of-the-art in materials and devices*, RIVM report. 2005, 265001001.
- [141] H. Boulaiz, P. J. Alvarez, A. Ramirez, J. A. Marchal, J. Prados, F. Rodríguez-Serrano, M. Perán, C. Melguizo, and A. Aranega, *Nanomedicine: Application areas and development prospects*. *International Journal of Molecular Sciences*. 2011, 12, 3303-3321.
- [142] Jordá E. G. *Fantastic voyage*, *Clinical and Translational Oncology*. 2009, 11, 561-563.
- [143] Κοντομάρης Σ.Β., Μελέτη Βιοϋλικών Με Απεικονιστική Μικροσκοπία Ατομικής Δύναμης, Διδακτορική Διατριβή, 2016.
<https://dspace.lib.ntua.gr/xmlui/handle/123456789/42196>.
- [144] Kasas S., Thomson N.H., Smith B.L., Hansma P.K., Miklossy J., Hansma H.G. *Biological Applications of the AFM: From Single Molecules to Organs*. *Int J Imag Syst Tech*. 1997, 8, 151–161.
- [145] Samori B., Nigro C., Armentano V., Cimieri S., Zuccheri G. and Quagliariello C. DNA supercoiling imaged in 3 dimensions by scanning force microscopy. *Angew Chem Int Edit*. 1993, 32, 1461–1463.
- [146] Hansma H.G., Laney D.E., Bezanilla M., Sinsheimer R.L. and Hansma P.K. Applications for atomic force microscopy of DNA. *Biophys. J*. 1995, 68, 1672–1677.
- [147] Thomson N.H., Kasas S., Smith B., Hansma H.G. and Hanasemsma P.K. Reversible binding of DNA to mica for AFM imaging. *Langmuir*. 1996, 12, 5905–5908.
- [148] Karrasch S., Dolder M., Schabert F., Ramsden J. and Engel A. Covalent binding of biological samples to solid supports for scanning probe microscopy in buffer solution. *Biophys. J*. 1993, 65, 2437–2446.
- [149] Karrasch S., Hegerl R., Hoh J.H., Baumeister W. and Engel A. Atomic force microscopy produces faithful high-resolution images of protein surfaces in an aqueous environment. *Proc Nat Acad Sci USA*. 1994, 91, 836–838.
- [150] Han W.H., Mou J.X., Sheng J., Yang J. and Shao Z.F. Cryoatomic force microscopy—a new approach for biological imaging at high resolution. *Biochemistry*. 1995, 34, 8215–8220.

- [151] Liu S., Wang Y., Chapter 6 - A Review of the Application of Atomic Force Microscopy (AFM) in Food Science and Technology, *Advances in Food and Nutrition Research*. 2011, 62, 201-240. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-385989-1.00006-5>.
- [152] https://myscope.training/images/SPM-module/figure_01.jpg
- [153] https://www.nisenet.org/sites/default/files/catalog/uploads/12670/atomic_force_microscope.pdf
- [154] Majid M. J. *Scanning Probe Microscopy of Biomaterials and Nanoscale Biomechanics*, Dissertation, University of Illinois at Urbana-Champaign, 2010.
- [155] Albrecht T. R. and Quate C. F. Atomic resolution imaging of a nonconductor by atomic force microscopy. *Journal of Applied Physics*. 1987, 62, 2599-2602.
- [156] <https://www.brukerafmprobes.com/p-3444-mlct.aspx>
- [157] Drolle E., Hane F., Lee B. & Leonenko Z. Atomic force microscopy to study molecular mechanisms of amyloid fibril formation and toxicity in Alzheimer's disease. *Drug metabolism reviews*. 2014, 46. doi:10.3109/03602532.2014.882354.
- [158] Cisneros D. A. *Molecular Assemblies Observed by Atomic Force Microscopy*, Dissertation/Thesis, 2007.
- [159] Lu H., Fang Y., Re, X. & Zhan, X. Improved direct inverse tracking control of a piezoelectric tube scanner for high-speed AFM imaging☆. *Mechatronics*. 2015, 31, 189-195, doi:10.1016/J.MECHATRONICS.2015.08.006.
- [160] Hansma P. K., Cleveland J. P., Radmacher M., Walters D. A., Hillner P. E., Bezanilla M., Fritz M., Vie D., Hansma H. G., Prater C. B., Massie J., Fukunaga L., Gurley J. and Elings V. Tapping mode atomic force microscopy in liquids, *Applied Physics Letters*. 1994, 64, 1738-1740.
- [161] García R. and Pérez R. Dynamic atomic force microscopy methods. *Surface Science Reports*. 2002, 47, 197-301.
- [162] Cambridge, U. o. *Atomic Force Microscopy/Tip Surface Interaction*, https://www.doitpoms.ac.uk/tlplib/afm/tip_surface_interaction.php.
- [163] Shiva Kumar Arumugasamy, Gayathri Chellasamy, Saravanan Govindaraju, Kyusik Yun, Chapter 30 - Recent developments in using atomic force microscopy in microbiology research: An update, *Academic Press*, 2021, 317-323, ISBN 9780128214060, <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-821406-0.00030-8>.
- [164] Deng Xiangying, Xiong Fang, Li Xiayu, Xiang Bo, Li Zheng, Wu Xu, Guo Can, li Xiaoling, Li Yong, Li Guiyuan, Xiong Wei & Zeng Zhaoyang. Application of atomic force microscopy in cancer research. *Journal of Nanobiotechnology*. 2018,16 doi: 10.1186/s12951-018-0428-0.

[165] Wong T. M. H. and Descouts P. Atomic force microscopy under liquid: A comparative study of three different AC mode operations. *Journal of Microscopy*. 1995, 178, 7-13.

[166] Narchi P. Investigation of crystalline silicon solar cells at the nano-scale using scanning probe microscopy techniques. 2016.

[167] Strasser S. Nanotechnological Characterisation of Biomaterials-Structural and Biophysical Investigations, Dissertation/Thesis, der Fakultat für Geowissenschaften, der Ludwig-Maximilians-Universität München, München, 2007.

[168] Marinello F., Carmignato S., Voltan A., Savio E. and De Chiffre L. Error Sources in Atomic Force Microscopy for Dimensional Measurements: Taxonomy and Modeling. *ASME. J. Manuf. Sci. Eng.* 2010, 132, 3, 030903. <https://doi.org/10.1115/1.4001242>.

[169] Alessandrini A. and Facci P. AFM: A versatile tool in biophysics, *Measurement Science and Technology*. 2005, 16, R65-R92.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 4

[170] <https://sunwindsolar.com/blog/solar-radiation-spectrum/>

[171] Romanhole R. C., Ataide J. A., Moriel P., Mazzola P. G. Update on ultraviolet A and B radiation generated by the sun and artificial lamps and their effects on skin, *Int. J. of Cosmetic Sci.*, 2015.

[172] <https://www.grassrootshealth.net/blog/forms-energy-sunshine-may-affect-health/>

[173] <https://www.comelanoma.org/uv-radiation>

[174] Larroque-Cardoso P., Camare C., Nadal-Wollbold F., Grazide M.H., Pucelle M., Garoby-Salom S., Bogdanowicz P., Josse G., Schmitt A.M., Uchida K., Zarkovic K., Salvayre R., Negre-Salvare A. Elastin modification by 4-hydroxynonenal in hairless mice exposed to UV-A. Role in photoaging and actinic elastosis, *Journal of Investigative Dermatology*, 2015.

[175] SCHEER (Scientific Committee on Health, Environmental and Emerging Risks), Opinion on Biological effects of UV-C radiation relevant to health with particular reference to UV-C lamps, 2 February 2017.

[176] Buonanno M, Ponnaiya B, Welch D, Stanislauskas M, Randers-Pehrson G, Smilenov L, Lowy FD, Owens DM, Brenner DJ. Germicidal Efficacy and Mammalian Skin Safety of 222-nm UV Light. *Radiat Res.* 2017 Apr;187(4):483-491. doi: 10.1667/RR0010CC.1].

[177] González, S., Fernandez-Lorente, M. and Calzada, Y. The latest on skin photoprotection. *Clin. Dermatol.* 2008, 26, 614– 626.

[178] D'Orazio J, Jarrett S, Amaro-Ortiz A, Scott T. UV Radiation and the Skin. *International Journal of Molecular Sciences.* 2013, 14, 6, 12222-12248. <https://doi.org/10.3390/ijms140612222>.

[179] <http://ebooks.edu.gr/ebooks/d/8547/4464/24-0417-02>

[180] <https://cancerhellas.org/encyclopedia/%CE%B4%CE%AD%CF%81%CE%BC%CE%B1%CF%84%CE%BF%CF%82/>

[181] Meyer T., Stockfleth E. Light and Skin. *Current problems in dermatology.* 2021, 55, 53-61. doi: 10.1159/000517592.

[182] Firyal K. Sadeq, Shahab A. Shakir, Ahmed Khalid Abdullah. Photodamage Effect of UV Rays on Skin on outdoor workers. *Diyala Journal of Medicine.* 2022, 22, 1, 41-50. doi:10.26505/djm.22016170822.

[183] Hyll Kari. Image-based quantitative infrared analysis and microparticle characterisation for pulp and paper applications, 2016. 10.13140/RG.2.1.2595.6884.

- [184] Gupta A., Dai T. and Hamblin M. R. Effect of red and near-infrared wavelengths on low-level laser (light) therapy-induced healing of partial-thickness dermal abrasion in mice, *Lasers in Medical Science*. 2013, 1-9.
- [185] Pugliese L. S., Medrado A. P., Reis S. R. and Andrade Z. A. The influence of low-level laser therapy on biomodulation of collagen and elastic fibers. *Pesquisa odontologica brasileira = Brazilian oral research*. 2003, 17, 307-313.
- [186] <https://www.grassrootshealth.net/blog/forms-energy-sunshine-may-affect-health/>
- [187] <https://youlumi.com/red-light-therapy-uses-benefits/>
- [188] Karu T. I. and Kolyakov S. F. Exact action spectra for cellular responses relevant to phototherapy. *Photomedicine and Laser Surgery*. 2005, 23, 355-361.
- [189] Wong-Riley M. T. T., Liang H. L., Eells J. T., Chance B., Henry M. M., Buchmann E., Kane M. and Whelan H. T. Photobiomodulation directly benefits primary neurons functionally inactivated by toxins: Role of cytochrome c oxidase. *Journal of Biological Chemistry*. 2005, 280, 4761-4771.
- [190] Pastore D., Greco M., Petragallo V. A. and Passarella S. Increase in $\leftarrow\text{H}^+/\text{e}^-$ ratio of the cytochrome c oxidase reaction in mitochondria irradiated with Helium-Neon laser. *International Journal of Biochemistry and Molecular Biology*. 1994, 34, 817-826.
- [191] Karu T. Primary and secondary mechanisms of action of visible to near-IR radiation on cells. 1999, 49, 1-17.
- [192] Wickenheisser V.A., Zywoit E.M., Rabjohns E.M., Lee H., Lawrence D., KathleenTarrant T. Laser Light Therapy in Inflammatory, Musculoskeletal, and Autoimmune Disease. *Curr Allergy Asthma Rep*. 2019, 19, 37. <https://doi.org/10.1007/s11882-019-0869-z>
- [193] Avci P., Gupta A., Sadasivam M., Vecchio D. Z. Pam Z., Hamblin M.R. Low-level laser (light) therapy (LLLT) in skin: stimulating, healing, restoring, *Semin cutan med and surg*. 2013, 32, 41-52.
- [194] Barolet D., Boucher A. LED photoprevention: Reduced MED response following multiple LED exposures. *Lasers Surg Med*. 2008, 40, 106-112.
- [195] Yousif E., Haddad R. Photodegradation and photostabilization of polymers, especially polystyrene: Review, *Springer Plus*. 2013, 2, 398.
- [196] Daglen B. C. and Tyler D. R., The effect of morphology changes on polymer photodegradation efficiencies: A study of time-dependent morphology and stress-induced crystallinity. *Journal of Inorganic and Organometallic Polymers and Materials*. 2009, 19, 91-97.

- [197] Pashkuleva I., Marques A. P., Vaz F. and Reis R. L. Surface modification of starch based biomaterials by oxygen plasma or UV-irradiation. *Journal of Materials Science: Materials in Medicine*. 2010, 21, 21-32.
- [198] de Moraes M. A., Weska R. F. and Beppu M. M. Effects of sterilization methods on the physical, chemical, and biological properties of silk fibroin membranes. *Journal of Biomedical Materials Research - Part B Applied Biomaterials*. 2013.
- [199] Evans N. D., Minelli C., Gentleman E., LaPointe V., Patankar S. N., Kallivretaki M., Chen X., Roberts C. J. and Stevens M. M. Substrate stiffness affects early differentiation events in embryonic stem cells. *European Cells and Materials*. 2009, 18, 1-13.
- [200] Zhao L., Mei S., Wang W., Chu P. K., Wu Z. and Zhang Y. The role of sterilization in the cytocompatibility of titania nanotubes. *Biomaterials*. 2010, 31, 2055-2063.
- [201] Rowland C. R., Lennon D. P., Caplan A. I. and Guilak F. The effects of crosslinking of scaffolds engineered from cartilage ECM on the chondrogenic differentiation of MSCs. *Biomaterials*. 2013, 34, 5802-5812.
- [202] Imokawa G., Ishida K. Biological Mechanisms Underlying the Ultraviolet Radiation-Induced Formation of Skin Wrinkling and Sagging I: Reduced Skin Elasticity, Highly Associated with Enhanced Dermal Elastase Activity, Triggers Wrinkling and Sagging, *Int. J. Mol. Sci*. 2015.
- [203] Hibbert S. A., Watson R. E.B., Gibbs N. K., Costello P., Baldock C., Weiss A. S., Griffiths C. E. M., Sherratt M. J. A potential role for endogenous proteins as sacrificial sun screens and antioxidants in human tissues. *Redox Biology*. 2015, 5 101-113, Elsevier.
- [204] Dhital B, Durlík P., Rathod P., Gul-E-Noor F., Wang Z., Sun C., Chang E. J., Itin B., Boutis G S. Ultraviolet radiation reduces desmosine cross-links in elastin, *Biochemistry and Biophysics Reports*. 2017, 10, 172-177, <https://doi.org/10.1016/j.bbrep.2017.04.002>.
- [205] Chung H., Dai T., Sharma S.K., Huang Y.Y., Carroll J.D., Hamblin M.R. The nuts and bolts of low-level laser (Light) therapy. *Ann Biomed Eng*. 2012, 40, 516-533.
- [206] Gupta A., Avci P., Sadasivam M., Chandran R., Parizotto N., Vecchio D., de Melo W.C.M.A, Dai T., Chiang L.Y., Hamblin M.R. Shining light on nanotechnology to help repair and regeneration. *Biotech Adv*. 2013, 31, 607-631.
- [207] Seaton E.D., Mouser P.E., Charakida A., Alam S., Seldon P.E., Chu A.C. Investigation of the mechanism of action of nonablative pulsed-dye laser therapy in photorejuvenation and inflammatory acne vulgaris. *Brit J Dermatol*. 2006, 155, 748-755.

[208] Bossini P.S., Rennó A.C.M., Ribeiro D.A., Fangel R., Ribeiro A.C., Lahoz M.D.A., Parizotto N.A. Low level laser therapy (830nm) improves bone repair in osteoporotic rats: Similar outcomes at two different dosages. *Exp Gerontol.* 2012, 47, 136-142.

[209] De Jesus J.F., Spadacci-Morena D.D., dos Anjos Rabelo N.D., Pinfildi C.E., Fukuda T.Y., Plapler H. Low-level laser therapy in IL-1 β , COX-2, and PGE2 modulation in partially injured Achilles tendon. *Laser Med Sci.* 2014, 30, 153-158.

[210] Fillipin L.I., Mauriz J.L., Vedovelli K., Moreira A.J., Zettler C.G., Lech O., Marroni N.P., González-Gallego J. Low-level laser therapy (LLLT) prevents oxidative stress and reduces fibrosis in rat traumatized Achilles tendon. *Lasers Surg Med.* 2005, 37, 293-300.

[211] Guerra F.D.R., Vieira C.P., Dos Santos De Almeida M., Oliveira L.P., Claro A.C.F., Simões G.F., De Oliveira A.L.R., Pimentel E.R. Pulsed LLLT improves tendon healing in rats: A biochemical, organizational, and functional evaluation. *Laser Med Sci.* 2014, 29, 805-811.

[212] Hawkins D. H. and Abrahamse H. The role of laser fluence in cell viability, proliferation, and membrane integrity of wounded human skin fibroblasts following Helium-Neon laser irradiation. *Lasers in Surgery and Medicine.* 2006, 38, 74-83.

[213] Chen C. H., Hung H. S. and Hsu S. H. Low-energy laser irradiation increases endothelial cell proliferation, migration, and enos gene expression possibly via PI3K signal pathway. *Lasers in Surgery and Medicine.* 2008, 40, 46-54.

[214] Fushimi T., Inui S., Nakajima T., Ogasawara M., Hosokawa K. and Itami S. Green light emitting diodes accelerate wound healing: Characterization of the effect and its molecular basis in vitro and in vivo. *Wound Repair and Regeneration.* 2012, 20, 226-235.

[215] Demidova-Rice T. N., Salomatina E. V., Yaroslavsky A. N., Herman I. M. and Hamblin M. R. Low-level light stimulates excisional wound healing in mice. *Lasers in Surgery and Medicine.* 2007, 39, 706-715.

[216] Peplow P. V., Chung T. Y. and Baxter G. D. Laser photostimulation (660nm) of wound healing in diabetic mice is not brought about by ameliorating diabetes. *Lasers in Surgery and Medicine.* 2012, 44, 26-29.

[217] Wu Q., Xuan W., Ando T., Xu T., Huang L., Huang Y. Y., Dai T., Dhital S., Sharma S. K., Whalen M. J. and Hamblin M. R. Low-level laser therapy for closed-head traumatic brain injury in mice: Effect of different wavelengths. *Lasers in Surgery and Medicine.* 2012, 44, 218-226.

[218] Christie A., Jamtvedt G., Dahm K. T., Moe R. H., Haavardsholm E. A. and Hagen K. B. Effectiveness of nonpharmacological and nonsurgical interventions for patients with rheumatoid arthritis: An overview of systematic reviews. *Physical Therapy.* 2007, 87, 1697-1715.

- [219] Chow R. T., Johnson M. I., Lopes-Martins R. A. and Bjordal J. M. Efficacy of low-level laser therapy in the management of neck pain: a systematic review and meta-analysis of randomised placebo or active-treatment controlled trials. *The Lancet*. 2009, 374, 1897-1908.
- [220] Garavello-Freitas I., Baranauskas V., Joazeiro P. P., Padovani C. R., Dal Pai-Silva M. and da Cruz-Höfling M. A. Low-power laser irradiation improves histomorphometrical parameters and bone matrix organization during tibia wound healing in rats. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*. 2003, 70, 81-89.
- [221] Fung D. T. C., Ng G. Y. F., Leung M. C. P. and Tay D. K. C. Effects of a therapeutic laser on the ultrastructural morphology of repairing medial collateral ligament in a rat model. *Lasers in Surgery and Medicine*. 2003, 32, 286-293.
- [222] Glass G. E. FRCS (Plast). Photobiomodulation: The Clinical Applications of Low-Level Light Therapy. *Aesthetic Surgery Journal*. 2021, 41, 6, 723–738, <https://doi.org/10.1093/asj/sjab025>.
- [223] Li W.H., Seo I., Kim B., Fassih A., Southall M.D., Parsa R. Low-level red plus near infrared lights combination induces expressions of collagen and elastin in human skin in vitro. *Int J Cosmet Sci*. 2021, 43, 311-320. <https://doi.org/10.1111/ics.12698>.
- [224] Kui A.I., Tisler C.E., Ciumaşu A., Almăşan O., Condor D.F., Buduru S. Effect of Low Level Laser Therapy (LLLT) on muscle pain in temporomandibular disorders – an update of literature. 2020. <https://doi.org/10.12680/balneo.2020.309>.
- [225] Lee JH, Roh MR, Lee KH. Effects of infrared radiation on skin photo-aging and pigmentation. *Yonsei Med J*. 2006, 47, 4, 485-90. doi: 10.3349/ymj.2006.47.4.485.
- [226] Ushiki T., Hitomi J., Ogura S., Umemoto T., Shigeno M. Atomic force microscopy in histology and cytology. *Arc Histol Cytol*. 1996, 59, 421–431.
- [227] Choi S., Cheong Y., Shin J.H., Lee H.J., G.J. Lee, Choi S.K., Jin K.H., Park H.K. Short term nanostructural effects of high radiofrequency treatment of the skin tissues of rabbits. *Laser Med Sci*. 2012, 27, 923–933.
- [228] Pramanick A.K., Gupta S., Mishra T., Sinha A., Topographical heterogeneity in transparent PVA hydrogels studied by AFM. *Mater Sci Eng C*. 2012, 32, 222–227.
- [229] Khodabakhshian R., Naeemi A., Bayati MR. Determination of texture properties of banana fruit cells with an atomic force microscope: A case study on elastic modulus and stiffness. *J Texture Stud*. 2021; 52: 389–399. <https://doi.org/10.1111/jtxs.12594>.
- [230] Braet F, Taatjes DJ. Foreword to the special issue on applications of atomic force microscopy in cell biology. *Semin Cell Dev Biol*. 2018, 73, 1-3. doi:10.1016/j.semcdb.2017.06.025.
- [231] Monachino E., Spenkellink L.M., van Oijen A.M. Watching cellular machinery in action, one molecule at a time. *J. Cell Biol*. 2017, 216, 1, 41–51.

- [232] Gavara N. A beginner's guide to atomic force microscopy probing for cellmechanics. *Microsc. Res. Tech.* 2017, 80, 1, 75–84.
- [233] Senapati S., Lindsay S. Recent progress in molecular recognition imaging using atomic force microscopy. *Acc. Chem. Res.* 2016, 49, 3, 503–510.
- [234] Gautier H.O., Thompson A.J., Achouri S., Koser D.E., Holtzmann K., Moeendarbary E., Franze K. Atomic force microscopy-based force measurements on animal cells and tissues. *Methods Cell Biol.* 2015, 125, 211–235.
- [235] Dufrière Y.F., Ando T., Garcia R., Alsteens D., Martinez-Martin D., Engel A., Gerber C., Müller D.J. Imaging modes of atomic force microscopy for application in molecular and cell biology. *Nat. Nanotechnol.* 2017, 14, 4, 295–307.
- [236] Guillaume-Gentil O., Potthoff E., Ossola D., Franz C.M., Zambelli T., Vorholt J.A. Force-controlled manipulation of single cells: from AFM to FluidFM. *Trends Biotechnol.* 2014, 32, 7, 381–388.
- [237] Henderson R.M. Structural dynamics of single molecules studied with high-speed atomic force microscopy. *Expert. Opin. Drug Discov.* 2015, 10, 3, 221–229.
- [238] Ando T., Uchihashi T., Scheuring S. Filming biomolecular processes by high-speed atomic force microscopy. *Chem. Rev.* 2014, 114, 6, 3120–3188. <http://dx.doi.org/10.1021/cr4003837>.
- [239] Müller D.J., Dufrière Y.F. Atomic force microscopy: a nanoscopic window on the cell surface. *Trends Cell Biol.* 2011, 21, 8, 461–469.
- [240] Xiao J., Dufrière Y.F. Optical and force nanoscopy in microbiology. *Nat. Microbiol.* 2016, 1, 11, 16186.
- [241] Janel S., Werkmeister E., Bongiovanni A., Lafont F., Barois N. CLAFEM: correlative light atomic force electron microscopy. *Methods Cell Biol.* 2017, 140, 165–185.
- [242] Winkel A.K., Barner J., Henze T., Neumann T., Körnig A., Kumpfe F., Haschke H. The wide-open door: atomic force microscopy 30 years on. *Microscopy Today.* 2016, 24, 6, 12–17.
- [243] Sherratt, M.J., Bayley, C.P., Reilly, S.M., Gibbs, N.K., Griffiths, C.E. and Watson, R.E. (2010), Low-dose ultraviolet radiation selectively degrades chromophore-rich extracellular matrix components. *J. Pathol.*, 222: 32-40. <https://doi.org/10.1002/path.2730>.
- [244] Ebrahiminia A., Khanaki K., Ezzati K. et al. The combination effect of ultrasound and laser therapy on wound healing in diabetic rat model: histological and biomechanical evaluations. *Int J Diabetes Dev Ctries* (2023). <https://doi.org/10.1007/s13410-023-01174-8>.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 5

[245] Markeiwicz P., Coh M.C. Identifying location on a substrate for the repeated positioning of AFM samples. *Ultramicroscopy*. 1997, 68, 215–221. [https://doi.org/10.1016/S0304-3991\(97\)00035-1](https://doi.org/10.1016/S0304-3991(97)00035-1).

[246] Stylianou A. and Yova D. Surface Nanoscale Imaging of Collagen Thin by Atomic Force Microscopy. *Mater. Sci. Eng. C*. 2013, 33, 2947–2957. <https://doi.org/10.1016/j.msec.2013.03.029>.

[247] Stylianou A., Kontomaris S.V., Yova D. Assessing Collagen Nanoscale Thin Films Heterogeneity by AFM Multi-mode Imaging and Nanoindentation for NanoBioMedical Applications, *Micro Nanosyst.* 2014, 6, 95–102. <http://doi.org/10.2174/187640290602141127114448>.

[248] Kontomaris S.V., Yova D., Sambani K., Stylianou A. XIV Mediterranean Conference on Medical and Biological Engineering and Computing, AFM Investigation of the Influence of Red Light Irradiation on Collagen 2016, IFMBE Proceedings; Springer: Berlin, Germany. 2016, 57, 269–274. https://doi.org/10.1007/978-3-319-32703-7_54.

[249] Baldock R., Graham J. *Image Processing and Analysis, A Practical Approach*, Oxford: Oxford University Press, 2000.

[250] Erickson B. W., Coquoz S., Adams J. D., Burns D. J. and Fantner G. E. Large-scale analysis of high-speed atomic force microscopy data sets using adaptive image processing. *Beilstein Journal of Nanotechnology*. 2012, 3, 747-758.

[251] Horcas I., Fernández R., Gómez-Rodríguez J.M., Colchero J., Gómez-Herrero J., Baro A.M. Review of Scientific Instruments, WSxM: A software for scanning probe microscopy and a tool for nanotechnology. *Rev. Sci. Instrum.* 2007, 78, 013705. <https://doi.org/10.1063/1.2432410>.

[252] Bellotti R., Picotto G.B., Ribotta, L. AFM Measurements and Tip Characterization of Nanoparticles with Different Shapes. *Nanomanufacturing Metrol.* 2022, 5, 127–138. <https://doi.org/10.1007/s41871-022-00125-x>.

[253] Canet-Ferrer J., Coronado E., Forment-Aliaga A., Pinilla-Cienfuegos E. Correction of the tip convolution effects in the imaging of nanostructures studied through scanning force microscopy. *Nanotechnology* 2014, 25, 395703. <https://doi.org/10.1088/0957-4484/25/39/395703>.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 6

[255] Lima L.F., Sousa M.G.DC., Rodrigues G.R., de Oliveira K.B.S., Pereira A.M., da Costa A., Machado R., Franco O.L., Dias S.C. Elastin-like Polypeptides in Development of Nanomaterials for Application in the Medical Field. *Front. Nanotechnol.* 2022, 4, 874790. <https://doi.org/10.3389/fnano.2022.874790>.

[256] Juanes-Gusano D., Santos M., Reboto V., Alonso M., Rodríguez-Cabello J.C. Self-assembling systems comprising intrinsically disordered protein polymers like elastin-like recombinamers. *J. Pept. Sci.* 2022, 28, e3362. <https://doi.org/10.1002/psc.3362>.

[257] Coenen A.M.J., Bernaerts K.V., Harings J.A.W., Jockenhoevel S., Ghazanfari S. Elastic materials for tissue engineering applications: Natural, synthetic, and hybrid polymers, *Acta Biomater.* 2018, 79, 60–82. <https://doi.org/10.1016/j.actbio.2018.08.027>.

[258] MacEwan S.R., Chilkoti A. Applications of elastin-like polypeptides in drug delivery. *J. Control. Release.* 2014, 190, 314–330. <https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2014.06.028>.

[259] Wang R., de Kort B.J., Smits A.I.P.M., Weiss A.S. Elastin in Vascular Grafts. In: Walpoth B., Bergmeister H., Bowlin G., Kong D., Rotmans J., Zilla P. (eds) *Tissue-Engineered Vascular Grafts. Reference Series in Biomedical Engineering.* Springer, Cham. 2019, https://doi.org/10.1007/978-3-319-71530-8_13-1.

[260] Shifren A., Mecham R.P. The stumbling block in lung repair of emphysema: Elastic fiber assembly. *Proc. Am. Thorac. Soc.* 2006, 3, 428–433. <https://doi.org/10.1513/pats.200601-009AW>.

[261] Sarangthem V., Singh T.D., Dinda A.K. Emerging Role of Elastin-Like Polypeptides in Regenerative Medicine. *Adv. Wound Care.* 2021, 10, 257–269. <https://doi.org/10.1089/wound.2019.1085>.

[262] Srokowski E.M., Woodhouse K.A. Surface and adsorption characteristics of three elastin-like polypeptide coatings with varying sequence lengths. *J. Mater. Sci. Mater. Med.* 2013, 24, 71–84. <https://doi.org/10.1007/s10856-012-4772-6>.

[263] Rodríguez-Cabello J.C., Gonzalez De Torre I., González-Pérez M., González-Pérez F., Montequi I. Fibrous Scaffolds From Elastin-Based Materials. *Front. Bioeng. Biotechnol.* 2021, 9, 652384. <https://doi.org/10.3389/fbioe.2021.652384>.

[264] Waterhouse A., Wise S.G., Ng M.K.C., Weiss A.S. Elastin as a nonthrombogenic biomaterial. *Tissue Eng. Part B: Rev.* 2011, 17, 93–99. <https://doi.org/10.1089/ten.teb.2010.0432>.

[265] Pepe A., Delaunay F., Bracalello A., Bochicchio B. The Inhibitory Effect of Resveratrol on Elastin Amyloidogenesis. *Conf. Pap. Sci.* 2014, 2014, 410545. <http://doi.org/10.1155/2014/410545>.

- [266] Dandurand J., Samouillan V., Lacabanne C., Pepe A., Bochicchio B. Water structure and elastin-like peptide aggregation. *J. Therm. Anal. Calorim.* 2014, 120, 419–426. <https://doi.org/10.1007/s10973-014-4254-9>.
- [267] Koga T., Nakamoto K., Odawara K., Matsuoka T., Higashi N. Fabrication of Thermo-Responsive Molecular Layers from Self-Assembling Elastin-Like Oligopeptides Containing Cell-Binding Domain for Tissue Engineering. *Polymers* 2015, 7, 134–146. <https://doi.org/10.3390/polym7010134>.
- [268] Cao M., Shen Y., Wang Y., Wang X., Li D. Self-Assembly of Short Elastin-like Amphiphilic Peptides: Effects of Temperature, Molecular Hydrophobicity and Charge Distribution. *Molecules.* 2019, 24, 202. <https://doi.org/10.3390/molecules24010202>.
- [269] Tarakanova A., Yeo G.C., Baldock C., Weiss A.S., Buehler M.J. Tropoelastin is a Flexible Molecule that Retains its Canonical Shape. *Macromol. Biosci.* 2019b, 19, 1800250. <https://doi.org/10.1002/mabi.201800250>.
- [270] del Mercato L.L., Maruccio G., Pompa P.P., Bochicchio B., Tamburro A.M., Cingolani R., Rinaldi R. Amyloid-like Fibrils in Elastin-Related Polypeptides: Structural Characterization and Elastic Properties. *Biomacromolecules.* 2008, 9, 796–803. <https://doi.org/10.1021/bm7010104>.
- [271] Bochicchio B., Pepe A., Delaunay F., Lorusso M., Baud S., Dauchez M. Amyloidogenesis of proteolytic fragments of human elastin. *RSC Adv.* 2013, 3, 13273–13285. <https://doi.org/10.1039/C3RA41893F>.
- [272] Bracalello A., Secchi V., Mastrantonio R., Pepe A., Persichini T., Iucci G., Bochicchio B., Battocchio C. Fibrillar Self-Assembly of a Chimeric Elastin-Resilin Inspired Engineered Polypeptide. *Nanomaterials.* 2019, 9, 1613. <https://doi.org/10.3390/nano9111613>.
- [273] Alvisi N., Gutiérrez-Mejía F.A., Lokker M., Lin Y.-T., de Jong A.M., van Delft F., de Vries R. Self-Assembly of Elastin-like Polypeptide Brushes on Silica Surfaces and Nanoparticles. *Biomacromolecules.* 2021, 22, 1966–1979. <https://doi.org/10.1021/acs.biomac.1c00067>.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 7

[274] Skopińska-Wisniewska J., Grabska-Zielińska S. J. Kaczmarek-Szczepańska, Stachowiak N. & Sionkowska A. Spectroscopic studies of UV-irradiated poly(vinyl alcohol)/elastin blends, *International Journal of Polymer Analysis and Characterization*, 2021, 26, 1, 84-96, doi:10.1080/1023666X.2020.1854002.

[275] Weihermann A.C., Lorencini M., Brohem C.A., de Carvalho C.M. Elastin structure and its involvement in skin photoageing. *Int J Cosmet Sci*. 2017, 39, 3, 241-247. doi:10.1111/ics.12372.

[276] Chen Z., Shin M.H., Moon Y.J., Lee S.R., Kim Y.K., Seo J.E., Kim J.E., Kim K.H., Chung J.H. Modulation of elastin exon 26A mRNA and protein expression in human skin in vivo. *Exp Dermatol*. 2009, 18, 4, 378-86. doi: 10.1111/j.1600-0625.2008.00799.x.

[277] Yonei Y., Takabe W., Yagi M. Photoaging and Glycation of Elastin: Effect on Skin. *Anti-Aging Medical Research Center/Glycation Stress Research Center, Graduate School of Life and Medical Sciences, Doshisha University, Kyoto, Japan*. 2015, 2, 4, 182-190.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 8

- [278] Aayushi Gaur, Manu Dhillon, Nidhi Puri, Upasana Sethi, Shivangi Singh, Seema Ahuja. Efficacy of Diode Laser Ablation and Low Level Laser Therapy on Healing and Bacterial Load Reduction at Intraoral Biopsy Site. *J Dent Shiraz Univ Med Sci.* 2022, 23, 2, 121-128.
- [279] Chami V. D. O., Maracci L. M., Tomazoni F., Centeno A. C. T., Porporatti A. L., Ferrazzo V. A., Marquezan M. Rapid LLLT protocol for myofascial pain and mouth opening limitation treatment in the clinical practice: An RCT. *CRANIO®*, 2020, 40, 4, 334–340. <https://doi.org/10.1080/08869634.2020.1773660>.
- [280] Lamba D. Role of Low Level Laser Therapy (LLLT) on Myofascial Trigger Point in and around Neck – A Review. *Acta Scientific Orthopaedics.* 2020.
- [281] Rosero K. A. V. Is Low-Level Laser Therapy (LLLT) Effective in Relieving the Symptoms of Temporomandibular Disorders (TMDS)? A Systematic Review. *Revista Facultad De Odontología.* 2019.
- [282] Musstaf R. A., Jenkins D. F. L., Jha A. N. Assessing the impact of low level laser therapy (LLLT) on biological systems: a review. *International Journal of Radiation Biology.* 2019, 95, 2, 120–143. <https://doi.org/10.1080/09553002.2019.1524944>.
- [283] Karu T. I. Cellular and molecular mechanisms of photobiomodulation (low-power laser therapy). *IEEE Journal on Selected Topics in Quantum Electronics.* 2014, 20, 6603355.
- [284] Karim M., Husein, A., Qamruddin, I., Liszen, T., & Alam, M. K. To evaluate the effects of Low-level laser therapy (LLLT) on wound healing of extraction socket: A systematic review. *Bangladesh Journal of Medical Science*, 2023, 22, 3, 585–597. <https://doi.org/10.3329/BJMS.V22I3.65328>.
- [285] Hyun Seok Ryu, Celine Abueva, Phil-Sang Chung 1,3 Seung Hoon Woo. Decade Long Survey of Low-level Laser Therapy/ Photobiomodulation (LLLT/PBM) Therapy for Oral Mucositis Treatment. *Med Laser.* 2021, 10, 3, 138-145. <https://doi.org/10.25289/ML.2021.10.3.138>.
- [286] Buduru S. Effect of Low Level Laser Therapy (LLLT) on muscle pain in temporomandibular disorders – an update of literature. *Balneo Research Journal.* 2020.
- [287] Radwa R. Khalaf, Wafaa H. Borhan, Nesrin A. Abed El Rashid. A Systematic Review of Low Level Laser (LLLT) Therapy on Pain Following Orofacial Surgeries. *Med. J. Cairo Univ.* 2021, 89, 1, 221-228.
- [288] Araújo C. S. A. Crohn's disease: Low-Level Laser Therapy (LLLT) as an adjuvant treatment of oral lesions. *Journal of Oral Diagnosis.* 2019, <https://doi.org/10.5935/2525-5711.20180026>.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 9

[289] Wittig C., Szulcek R. Extracellular Matrix Protein Ratios in the Human Heart and Vessels: How to Distinguish Pathological From Physiological Changes? *Frontiers in Physiology*. 2021, 21. DOI=10.3389/fphys.2021.708656. ISSN=1664-042X.

[290] Kumar N, Kumar P, Nayak B S, Aithal P A, Guru A. Ratio Analysis Evaluation of Dermal Collagen and Elastic Fiber Contents: A Comparison of the Horizontal and Vertical Directions of Skin Tissues. *J Clin Aesthet Dermatol*. 2019, 12:12:21-24. PMID: 32038760; PMCID: PMC7002046.

[291] Gardeazabal L., Izeta A. Elastin and collagen fibres in cutaneous wound healing. *Exp Dermatol*. 2024, 33, 3, e15052. doi: 10.1111/exd.15052.

[292] Wilharm N., Fischer T, Hayn A., Mayr S.G. Structural Breakdown of Collagen Type I Elastin Blend Polymerization. *Polymers*. 2022, 14, 4434. <https://doi.org/10.3390/polym14204434>.