ΕΘΝΙΚΟ ΜΕΤΣΟΒΙΟ ΠΟΛΥΤΕΧΝΕΙΟ

ΣΧΟΛΗ ΗΛΕΚΤΡΟΛΟΓΩΝ ΜΗΧΑΝΙΚΩΝ ΚΑΙ
ΜΗΧΑΝΙΚΩΝ ΥΠΟΛΟΓΙΣΤΩΝ

ΤΟΜΕΑΣ ΗΛΕΚΤΡΟΜΑΓΝΗΤΙΚΩΝ ΕΦΑΡΜΟΓΩΝ
ΗΛΕΚΤΡΟΟΠΤΙΚΗΣ & ΗΛΕΚΤΡΟΝΙΚΩΝ ΥΛΙΚΩΝ

Μελέτη Επίδρασης Υπεριώδους Ακτινοβολίας σε Λεπτά Υμένια Κολλαγόνου

ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ

Αικατερίνη Π. Σιμάτου

Επιβλέπουσα: Διδώ Γιόβα

Καθηγήτρια Ε.Μ.Π.

Αθήνα, Ιανουάριος 2014

ΕΘΝΙΚΟ ΜΕΤΣΟΒΙΟ ΠΟΛΥΤΕΧΝΕΙΟ

ΣΧΟΛΗ ΗΛΕΚΤΡΟΛΟΓΩΝ ΜΗΧΑΝΙΚΩΝ ΚΑΙ ΜΗΧΑΝΙΚΩΝ ΥΠΟΛΟΓΙΣΤΩΝ

ΤΟΜΕΑΣ ΗΛΕΚΤΡΟΜΑΓΝΗΤΙΚΩΝ ΕΦΑΡΜΟΓΩΝ ΗΛΕΚΤΡΟΟΠΤΙΚΗΣ & ΗΛΕΚΤΡΟΝΙΚΩΝ ΥΛΙΚΩΝ

Μελέτη Επίδρασης Υπεριώδους Ακτινοβολίας σε Λεπτά Υμένια Κολλαγόνου

ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ

Αικατερίνη Π. Σιμάτου

Επιβλέπουσα: Διδώ Γιόβα

Καθηγήτρια Ε.Μ.Π.

Εγκρίθηκε από την τριμελή εξεταστική επιτροπή την 23η Ιανουαρίου 2014.

_____	_____	_____
Δ. Γιόβα	Κ. Πολιτόπουλος	Δ.Κουτσούρης
Καθηγήτρια Ε.Μ.Π.	Επ. Καθηγητής Ε.Μ.Π.	Καθηγητής Ε.Μ.Π.

Αθήνα, Ιανουάριος 2014

_____
Αικατερίνη Π. Σιμάτου

Διπλωματούχος Ηλεκτρολόγος Μηχανικών και Μηχανικών Υπολογιστών Ε.Μ.Π.

Copyright © Αικατερίνη Σιμάτου, 2014.

Με επιφύλαξη παντός δικαιώματος. All rights reserved.

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

Περίληψη

Σκοπό της Διπλωματικής Εργασίας αυτής αποτελεί η διερεύνηση της επίδρασης της υπεριώδους ακτινοβολίας σε λεπτά υμένια κολλαγόνου και η επακόλουθη διερεύνηση της επίδρασης σε ανάπτυξη καλλιέργειας ινοβλαστών. Προκειμένου να επιτευχθούν οι στόχοι αυτοί, υγρό διάλυμα κολλαγόνου ακτινοβολήθηκε με υπεριώδη ακτινοβολία σε μήκος κύματος 254 nm (UV-C). Το γεγονός αυτό αποτελεί πρωτοτυπία της Διπλωματικής Εργασίας, καθώς όπως φαίνεται και στη διεθνή βιβλιογραφία, η ακτινοβόληση πραγματοποιείται κυρίως σε κολλαγόνο το οποίο είναι στην τελική του μορφή και όχι ενόσω είναι ακόμα διάλυμα.

Η παρούσα Διπλωματική Εργασία αποτελείται από δύο μέρη, το θεωρητικό και το πειραματικό. Στο θεωρητικό μέρος της Διπλωματικής Εργασίας παρουσιάζονται βασικές πληροφορίες για το κολλαγόνο, καθώς και για την επίδραση της υπεριώδους ακτινοβολίας σε αυτό. Επιπλέον παρατίθενται πληροφορίες για τους ινοβλάστες, τα κύτταρα που καλλιεργήθηκαν και απεικονίστηκαν σε λεπτά υμένια κολλαγόνου. Παρουσιάζονται τα χρησιμοποιούμενα μικροσκόπια, το Μικροσκόπιο Ατομικής Δύναμης (Atomic Force Microscope ή AFM) και το μικροσκόπιο φθορισμού. Στο πειραματικό μέρος της Διπλωματικής Εργασίας περιγράφονται λεπτομερώς οι μέθοδοι και τεχνικές που αναπτύχθηκαν με σκοπό την ανάπτυξη, τη χρώση και τη σταθεροποίηση των δειγμάτων, καθώς και τα αποτελέσματα που ελήφθησαν κατόπιν απεικόνισης των δειγμάτων. Τα αποτελέσματα της Διπλωματικής Εργασίας τελικά συγκρίνονται με προηγούμενες μελέτες που αφορούν το UV-ακτινοβολημένο κολλαγόνο.

Λέξεις-κλειδιά

Κολλαγόνο, Ινοβλάστες, UV ακτινοβολία, AFM, Ατομική Μικροσκοπία, Μικροσκοπία Φθορισμού, Βιοϊατρική, Απεικόνιση, Κύτταρα, Καλλιέργεια

Abstract

The purpose of this Diploma Thesis is the investigation of the influence of UV-radiation on thin collagen films and the subsequent investigation of its effect on fibroblasts' culture. In order to achieve these goals, a liquid collagen solution was UV-irradiated at a wavelength of 254 nm (UV-C). This consists an innovation of this Diploma Thesis as, according to international citations, UV irradiation has been applied mainly on fully formed collagen and not on collagen solution.

This Diploma Thesis consists of two parts which relate to theory and experiment, respectively. In the theory part of this Diploma Thesis basic information about collagen is presented, as well as information about the effect of UV-irradiation on collagen. There is also information about fibroblasts, the type of cells that were cultured and imaged on thin collagen films. The microscopes used are described, namely the Atomic Force Microscope (AFM) and the fluorescence microscope. Methods and techniques that were developed for the making, staining and fixing of the samples are described in detail at the experiment part of this Diploma Thesis, as well as the results taken from the imaging of samples. The results of this Diploma Thesis are finally compared to previous studies concerning UV-irradiated collagen.

Keywords

Collagen, Fibroblasts, UV radiation, AFM, Atomic Force Microscopy, Fluorescence Microscopy, Biomedicine, Imaging, Cells, Culture

Ευχαριστίες

Με την παρούσα διπλωματική εργασία ολοκληρώνονται οι σπουδές μου στη Σχολή Ηλεκτρολόγων Μηχανικών και Μηχανικών Υπολογιστών του ΕΜΠ. Θα ήθελα να ευχαριστήσω θερμά όλους όσους συνέβαλαν στην περάτωσή της.

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

Ευχαριστώ θερμά τον υποψήφιο διδάκτορα κύριο Ανδρέα Στυλιανού, ο οποίος με καθοδήγησε σε κάθε σημείο της διαδρομής και με στήριξε ανελλιπώς καθ' όλη τη διάρκεια εκπόνησης της εργασίας.

Ευχαριστώ επίσης την διδάκτορα Ελένη Αλεξανδράτου για την πολύτιμη βοήθειά της στο μέρος της μικροσκοπίας φθορισμού και για την υποστήριξή της μέσα στο Εργαστήριο.

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

Ευχαριστώ ακόμη τον επίκουρο καθηγητή κύριο Κώστα Πολιτόπουλο και τον καθηγητή κύριο Δημήτρη Κουτσούρη για τη συμμετοχή τους στην τριμελή επιτροπή.

Θα ήθελα επίσης με την ολοκλήρωση των σπουδών μου να ευχαριστήσω όλους τους καθηγητές και τους βοηθούς που μου μετέδωσαν τις γνώσεις τους και με βοήθησαν να σκέφτομαι ως Μηχανικός.

Τέλος, θα ήθελα σε ένα πιο προσωπικό επίπεδο να ευχαριστήσω την οικογένειά μου και τους φίλους μου, οι οποίοι με την συνεχή τους υποστήριξη με βοήθησαν να αντεπεξέλθω και σε αυτό το εγχείρημα.

Πίνακας Περιεχομένων

Εισαγωγή 10
ΜΕΡΟΣ Α : ΘΕΩΡΗΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ 11
Κεφάλαιο 1 : ΚΟΛΛΑΓΟΝΟ 11
1.1 Γενικά 11
1.2 Δομική μονάδα 12
1.3 Ινίδια κολλαγόνου 13
1.4 Βιοσύνθεση κολλαγόνου 14
1.5 Οι διαφορετικές δομές του κολλαγόνου 15
1.6 Το κολλαγόνο ως ικρίωμα για ανάπτυξη κυτταρικής καλλιέργειας 16
1.7 Το UV - ακτινοβολημένο κολλαγόνο 17
Κεφάλαιο 2 : ΙΝΟΒΛΑΣΤΕΣ 19
2.1 Γενικά 19
2.2 Φαινότυποι ινοβλαστών 21
2.3 Βιολογικές λειτουργίες ινοβλαστών 23
2.4 Ινοβλάστες συσχετισμένοι με τον καρκίνο (CAFs) 24
Κεφάλαιο 3 : ΜΙΚΡΟΣΚΟΠΙΑ ΑΤΟΜΙΚΗΣ ΔΥΝΑΜΗΣ (AFM) 27
3.1 Γενικά 27
3.2 Λειτουργία του AFM 27
3.3 Τρόποι απεικόνισης (imaging modes) 29
3.4 Βιολογικές εφαρμογές AFM 32
Κεφάλαιο 4: ΜΙΚΡΟΣΚΟΠΙΑ ΦΘΟΡΙΣΜΟΥ 34
4.1 Γενικά 34
4.2 Λειτουργία μικροσκοπίου φθορισμού 34
4.3 Βιολογικές εφαρμογές μικροσκοπίας φθορισμού 36
ΜΕΡΟΣ Β : ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ 38
Κεφάλαιο 5 : ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ 38
5.1 Διάλυμα κολλαγόνου 38
5.2 Ακτινοβόληση κολλαγόνου 38
5.3 Φυγοκεντρική επίστρωση λεπτών υμενίων κολλαγόνου 38
5.4 Κυτταρική καλλιέργεια 39
5.5 Μικροσκοπία ατομικής δύναμης 42
5.6 Μικροσκοπία φθορισμού 46
Κεφάλαιο 6 : ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ 47
6.1 Εισαγωγή 47
6.2 Απεικόνιση λεπτών υμενίων κολλαγόνου με AFM 47
6.3 Ανάπτυξη καλλιέργειας ινοβλαστών σε λεπτά υμένια κολλαγόνου 55
Κεφάλαιο 7 : ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ ΚΑΙ ΣΥΖΗΤΗΣΗ 65
Βιβλιογραφία 68

Εισαγωγή

Η παρούσα διπλωματική εργασία εκπονήθηκε στο Εργαστήριο Βιοϊατρικής Οπτικής και Εφαρμοσμένης Βιοφυσικής στα πλαίσια των προπτυχιακών σπουδών στην Σχολή Ηλεκτρολόγων Μηχανικών και Μηχανικών Υπολογιστών του Εθνικού Μετσοβίου Πολυτεχνείου. Η επιβλέπουσα καθηγήτρια είναι η κυρία Διδώ Γιόβα, καθηγήτρια της σχολής Ηλεκτρολόγων Μηχανικών και Μηχανικών Υπολογιστών και διευθύντρια του εν λόγω εργαστηρίου.

Στο θεωρητικό μέρος της εργασίας παρουσιάζεται το βασικό υπόβαθρο γνώσεων προκειμένου να κατανοηθούν τα αποτελέσματα των πειραμάτων και να εξαχθούν συμπεράσματα. Στο πειραματικό μέρος παρουσιάζονται τα αποτελέσματα που προέκυψαν από τα δείγματα που προετοιμάστηκαν στα πλαίσια της εργασίας, τα οποία απεικονίσθηκαν με μικροσκόπιο AFM και με μικροσκόπιο φθορισμού.

Στο θεωρητικό μέρος αρχικά παρουσιάζονται βασικές πληροφορίες για το κολλαγόνο, όπως η δομή του, η βιοσύνθεσή του και η βιολογική του σημασία. Παρουσιάζεται επίσης και η επίδραση της υπεριώδους ακτινοβολίας σε αυτό, ώστε να κατανοηθούν τα αποτελέσματα των πειραμάτων, τα οποία διεξήχθησαν σε ακτινοβολημένο κολλαγόνο. Παρατίθενται επιπλέον πληροφορίες για τους ινοβλάστες, τα κύτταρα που καλλιεργήθηκαν και απεικονίστηκαν σε λεπτά υμένια κολλαγόνου.

Στη συνέχεια παρουσιάζονται τα χρησιμοποιούμενα μικροσκόπια, το Μικροσκόπιο Ατομικής Δύναμης (Atomic Force Microscope ή AFM) και το μικροσκόπιο φθορισμού. Η επεξήγηση του τρόπου λειτουργίας των μικροσκοπίων είναι απαραίτητη προκειμένου να κατανοηθεί η πληροφορία που εξάγεται από κάθε πειραματική εικόνα που λαμβάνεται.

Όσον αφορά το πειραματικό μέρος, σκοπό της εργασίας αυτής αποτελεί η διερεύνηση της επίδρασης της υπεριώδους ακτινοβολίας σε λεπτά υμένια κολλαγόνου και η επακόλουθη διερεύνηση της επίδρασης σε ανάπτυξη καλλιέργειας ινοβλαστών. Προκειμένου να επιτευχθούν οι στόχοι αυτοί, υγρό διάλυμα κολλαγόνου ακτινοβολήθηκε με υπεριώδη ακτινοβολία σε μήκος κύματος 254 nm (UV-C). Το γεγονός αυτό αποτελεί πρωτοτυπία της εργασίας, καθώς όπως φαίνεται και στη διεθνή βιβλιογραφία, η ακτινοβόληση πραγματοποιείται κυρίως σε κολλαγόνο το οποίο είναι στην τελική του μορφή και όχι ενόσω είναι ακόμα διάλυμα. Χρησιμοποιήθηκαν μέθοδοι και τεχνικές που αναπτύχθηκαν με σκοπό την ανάπτυξη, τη χρώση και τη σταθεροποίηση των δειγμάτων. Οι εν λόγω τεχνικές παρουσιάζονται αναλυτικά στο πειραματικό μέρος της εργασίας.

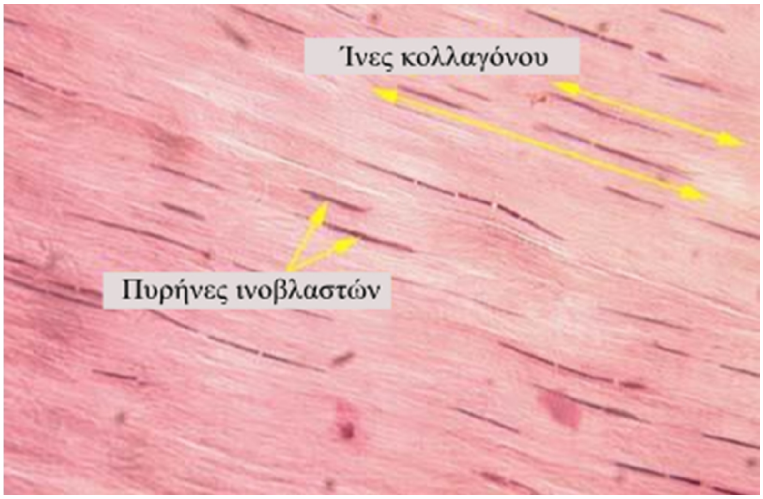
Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι η αύξηση του χρόνου ακτινοβόλησης του υποστρώματος κολλαγόνου προκαλεί αλλαγή στις ιδιότητές του μετά από κάποιο σημείο (30 min ακτινοβόλησης), ενώ σε πολύ μεγάλο χρόνο ακτινοβόλησης (120 min) το κολλαγόνο αλλάζει ιδιότητες σε βαθμό που προκαλείται αλλαγή στη συμπεριφορά των ινοβλαστών. Η επιφανειακή τραχύτητα (RMS) και η μέση τιμή του ύψους των υμενίων κολλαγόνου μειώνονταν έως τα 30 min ακτινοβόλησης, ενώ με την αύξηση του χρόνου ακτινοβόλησης αυξήθηκαν σε μεγάλο βαθμό. Για κάθε χρόνο ακτινοβόλησης παρατηρήθηκε αύξηση στη σφαιρικότητα του πυρήνα των ινοβλαστών, ενώ το σώμα των κυττάρων αυξανόταν μέχρι τα 60 min και στα 120 min εμφανιζόταν επίμηκες. Η διπλωματική εργασία αυτή επεκτείνει τις μελέτες που έχουν διεξαχθεί για τη διερεύνηση των ιδιοτήτων υμενίων κολλαγόνου ως υποστρώματα κυτταρικής καλλιέργειας.

ΜΕΡΟΣ Α : ΘΕΩΡΗΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

Κεφάλαιο 1 : ΚΟΛΛΑΓΟΝΟ

1.1 Γενικά

Το κολλαγόνο είναι ένα είδος πρωτεΐνης που υπάρχει σε αφθονία στην πανίδα και αποτελεί το 25% του συνόλου των πρωτεϊνών σε κάθε θηλαστικό. Παράγεται από τους ινοβλάστες, οι οποίοι είναι κύτταρα συνδετικού ιστού. Είναι η κυριότερη αδιάλυτη πρωτεΐνη στο εξωκυττάριο πλέγμα και στο συνδετικό ιστό. Το κολλαγόνο συμμετέχει σε μεγάλο φάσμα λειτουργιών, όπως η δόμηση των ιστών, η προσκόλληση των κυττάρων, η μετανάστευση των κυττάρων και η επούλωση των τραυμάτων [1]. Το κολλαγόνο εξυπηρετεί τον εφελκυσμό των σπονδυλωτών ιστών, όπως είναι οι τέντονες (***Εικόνα 1***), οι χόνδροι, τα οστά και το δέρμα. Όταν τα κύτταρα καλλιεργούνται πάνω σε κολλαγόνο, επηρεάζονται από την τοπολογία του πλέγματος κολλαγόνου[2] καθώς και τη δομή του[3]. Η μελέτη του κολλαγόνου παρουσιάζει επίσης ενδιαφέρον για την ταυτοποίηση διαμεμβρανικών κολλαγόνων που υπάρχουν στην επιφάνεια πολλών ειδών κυττάρων, καθώς και για τη μελέτη κολλαγόνων που είναι πρόδρομοι βιοενεργών πεπτιδίων με παρακρινή δράση (δράση των κυττάρων σε γειτονικούς ιστούς)[4].



Εικόνα 1

Εικόνα από τέντονα (είδος συνδετικού ιστού). Απεικονίζεται ο παραλληλισμός των ινών του κολλαγόνου κατά την κατεύθυνση της μηχανικής καταπόνησης[5].

Τα μόρια του κολλαγόνου πακετάρονται μαζί και σχηματίζουν λεπτά και μακριά ινίδια παρόμοιας δομής. Υπάρχουν διάφορα επιθηλιακά κύτταρα τα οποία παράγουν συγκεκριμένους τύπους κολλαγόνου. Υπάρχει κολλαγόνο διάφορων τύπων, και οι πιο κοινοί είναι οι I, II και III. Στον παρακάτω πίνακα (***Πίνακας 1***) παρουσιάζονται οι τύποι του κολλαγόνου καθώς και οι χαρακτηριστικοί ιστοί όπου συναντώνται.

Τύπος	Αλυσίδες	Μοριακή σύσταση	Μήκος τριπλής έλικας-Λεπτομέρειες δομής	Παρουσία στους ιστούς
Κολλαγόνα ινιδιακής δομής με ραβδώσεις επαναλαμβανόμενες κάθε 67 nm				
I	α1(I):α2(I)	$[\alpha1(I)]_2[\alpha2(I)]$	300 nm, μεγάλα ινίδια με ραβδώσεις	Δέρμα, όργανα, τένοντες, οστά, δόντια, κερατοειδής
II	α1(II)	$[\alpha1(II)]_3$	300 nm, μικρά ινίδια με ραβδώσεις	Χόνδρος, υαλώδες υγρό
III	α1(III)	$[\alpha1(III)]_3$	300 nm, ινίδια με ραβδώσεις	Δέρμα, μύες, αορτή, μήτρα, έντερο, απαντάται συχνά με το κολλαγόνο τύπου I
V	α1(V) α2(V) α3(V)	$[\alpha1(V)]_3$ $[\alpha1(V)]2[\alpha2(V)]$ $[\alpha1(V)][\alpha2(V)][\alpha3(V)]$	390 nm, N-τελική σφαιρική περιοχή, συχνά μαζί με το κολλαγόνο τύπου I	Κυτταρικές καλλιέργειες, εμβρυϊκοί ιστοί και μεμβράνες, δέρμα, οστά, αγγεία αίματος, πλακούντα, ενδιάμεσοι ιστοί
XI	α1(XI) α2(XI) α3(XI)	$[\alpha1(XI)][\alpha2(XI)][\alpha3(XI]$	300 nm, μικρά ινίδια, συχνά μαζί με το κολλαγόνο τύπου II	Χόνδροι, μεσοσπονδύλιοι δίσκοι
Ινιδιο-σχετιζόμενα κολλαγόνα με διακοπτόμενη τριπλή έλικα				
IX	α1(IX) α2(IX) α3(IX)	$[\alpha1(IX)][\alpha2(IX)]$ $[\alpha3(IX)]$	200 nm, N-τελική σφαιρική περιοχή, σύνδεση γλυκοζαμινογλυκανών, συσχέτιση με το κολλαγόνο τύπου II	Χόνδρος, υαλώδες υγρό, μεσοσπονδύλιοι δίσκοι
XII	α1(XII)	$[\alpha1(XII)]_3$	Εκτεταμένη N-τελική περιοχή, μόριο σταυροειδούς σχήματος, αλληλεπίδραση με το κολλαγόνο τύπου I	Εμβρυονικοί τένοντες και δέρμα
XIV	α1(XIV)	$[\alpha1(XIV)]_3$	Εκτεταμένη N-τελική περιοχή, μόριο σταυροειδούς σχήματος	Εμβρυϊκό δέρμα και τένοντες
Ινιδιο-σχετιζόμενο κολλαγόνο που σχηματίζει νημάτια σε μορφή κομπολογιού				
VI	α1(VI) α2(VI) α3(VI)	$[\alpha1(VI)][\alpha2(VI)]$ $[\alpha3(VI)]$	150 nm, N- και C-τελικές σφαιρικές περιοχές, μικροϊνιδιακή ζώνωση περιοδικότητας 100 nm, συσχέτιση με το κολλαγόνο τύπου I	Στους περισσότερους ενδιάμεσους ιστούς
Κολλαγόνα που σχηματίζουν επίπεδες επιφάνειες				
IV	α1(IV):α2(IV): α3(IV):α4(IV): α5(IV)	$[\alpha1(IV)]_2[\alpha2(IV)]$ άλλες μορφές	390 nm, δίκτυο δύο διαστάσεων με διασταυρούμενες συνδέσεις	Σε όλες τις βασικές λαμίνες (βασική μεμβράνη), σε μερικές μορφές καρκίνου
VIII	α1(VIII) α2(VIII)	Άγνωστη	Απλό τριγωνικό πλέγμα	Ενδοθηλιακά κύτταρα, μεμβράνη του Descement, που διαχωρίζει τα επιθηλιακά κύτταρα του κερατοειδή από το στρώμα
X	α1(X)	$[\alpha1(X)]$	150 nm, C-τελική σφαιρική περιοχή, εξαγωνικό πλέγμα	Υαλώδης χόνδρος
Κολλαγόνο που σχηματίζει ινίδια αγκυροβόλησης				
VII	α1(VII)	$[\alpha1(VII)]_3$	450 nm, διμερές, σφαιρικές περιοχές στα δύο άκρα	Επιθήλια, δέρμα, αμνιακή μεμβράνη, έντερο
Κολλαγόνα γνωστά από την cDNA κλωνοποίηση				
XIII	α1(XIII)	Άγνωστη	Άγνωστη	Ενδοθηλιακά κύτταρα, επιδερμίδα, πλακούντας, οστά, χόνδροι, γραμμωτοί μύες
XV	Άγνωστη	Άγνωστη	Άγνωστη	Πλακούντας, κύτταρα HeLa
XVI	Άγνωστη	Άγνωστη	Άγνωστη	Ινοβλάστες του δέρματος και του πνεύμονα, κερατινοκύτταρα, λείες μυϊκές ίνες των αρτηριών, άμνιο

Πίνακας 1

Ιδιότητες των διαφόρων τύπων κολλαγόνου[6].

1.2 Δομική μονάδα

Το ινώδες κολλαγόνο τύπου I ήταν το πρώτο που χαρακτηρίστηκε, λόγω της αφθονίας του σε ιστό πλούσιο σε τέντονες, όπως η ουρά του αρουραίου. Η δομική μονάδα του κολλαγόνου τύπου I είναι μία δεξιόστροφη τριπλή έλικα που αποτελείται από 2 αλυσίδες α1 και μία α2[i]. Κάθε αλυσίδα περιέχει 1050 αμινοξέα και έχει μοριακό βάρος περίπου 95 kDa. Οι χαρακτηριστικές ιδιότητες κάθε τύπου κολλαγόνου οφείλονται σε ομάδες που διακόπτουν την τριπλή έλικα και σχηματίζουν άλλες δομές στο χώρο.

i Η α-έλικα είναι δευτεροταγής δομή πρωτεΐνης.

Κάθε τριπλή έλικα αποτελείται από την επαναλαμβανόμενη δομή Γλυκίνη –X–Y, όπου στις θέσεις X, Y τοποθετούνται αμινοξέα, συνήθως προλίνη και υδροξυπρολίνη αντίστοιχα. Κάθε αμινοξύ επιτελεί μία συγκεκριμένη λειτουργία. Η γλυκίνη έχει ως πλευρική ομάδα ένα άτομο υδρογόνου, το οποίο είναι και το μοναδικό που χωράει στο κέντρο της σφιχτά πακεταρισμένης τριπλής έλικας. Η πεπτιδική ομάδα N–H μιας γλυκίνης ενώνεται με δεσμούς υδρογόνου με μία καρβονυλική (C=O) ομάδα ενός διπλανού πολυπεπτιδίου, και η ένωση αυτή συγκρατεί τις τρεις αλυσίδες μαζί. Η σταθερή γωνία της ομάδας C–N επιτρέπει σε κάθε πολυπεπτιδική αλυσίδα να διπλώσει σε έλικα, έτσι ώστε τρεις αλυσίδες να μπορούν να συστραφούν σε τριπλή έλικα. Οι ισχυροί δεσμοί προλίνης – πεπτιδίων εμποδίζουν το πακετάρισμα των αμινοξέων σε μια α-έλικα, αλλά παρόλα αυτά τελικά σταθεροποιούν την τριπλή έλικα του κολλαγόνου.

1.3 Ινίδια κολλαγόνου

Τα **ινίδια κολλαγόνου** σχηματίζονται από τις πλευρικές αλληλεπιδράσεις των τριπλών ελίκων των δομικών μονάδων. Πολλά μόρια κολλαγόνου τύπου Ι πακετάρονται μαζί δίπλα δίπλα, σχηματίζοντας ινίδια με διάμετρο 50–200 nm. Αυτό έχει ως αποτέλεσμα κατά μήκος των ινιδίων και των ινών κολλαγόνου να παρατηρείται η χαρακτηριστική **D–περιοδικότητα** των 67 nm (Εικόνα *2*). Η D–περιοδικότητα είναι το χαρακτηριστικό αξονικό μοτίβο που επαναλαμβάνεται κατά την οργάνωση των ινιδίων κολλαγόνου. Σημαντικό ρόλο στο σχηματισμό των ινιδίων κατέχουν μικρές πλευρικές ομάδες στα πλάγια των αλυσίδων, οι οποίες περιέχουν το αμινοξύ υδροξυλυσίνη. Ανάμεσα σε δύο λυσίνες ή υδροξυλυσίνες σχηματίζονται ομοιοπολικοί δεσμοί οι οποίοι σταθεροποιούν το πακετάρισμα των μορίων και κάνουν το ινίδιο ανθεκτικό.

Εικόνα 2

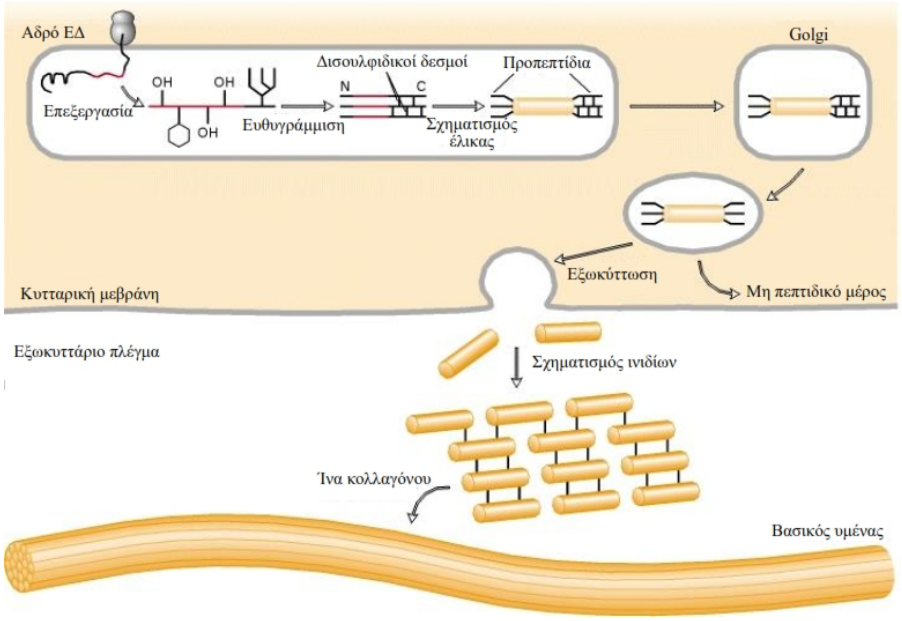
Εικόνα υμενίου κολλαγόνου από μικροσκόπιο AFM. Οι μικρές ρυτιδώσεις που παρατηρούνται σε όλο το δείγμα οφείλονται στην D-περιοδικότητα των ινιδίων κολλαγόνου.

Τα ινίδια κολλαγόνου τύπου Ι έχουν πολύ μεγάλη αντοχή στον εφελκυσμό. Αυτά τα ινίδια μπορούν να τεντώνονται χωρίς να σπάζουν. Τα ινίδια έχουν διάμετρο ίση με 50 nm και μήκος αρκετά μικρόμετρα. Πακετάρονται σφιχτά σε παράλληλα δεμάτια στους τέντονες, τις **ίνες κολλαγόνου**. Οι ίνες στους τέντονες συνδέουν μύες με οστά και είναι ανθεκτικές σε πολύ μεγάλες δυνάμεις.

1.4 Βιοσύνθεση κολλαγόνου

Η βιοσύνθεση και η συγκρότηση του κολλαγόνου γίνεται όπως μιας εκκρινόμενης πρωτεΐνης. Οι αλυσίδες του κολλαγόνου συντίθενται αρχικά ως μακρομόρια που λέγονται προκολλαγόνα. Οι δημιουργούμενες πολυπεπτιδικές αλυσίδες μεταφέρονται μέσω της μετάφρασης στον αυλό του αδρού ενδοπλασματικού δικτύου (ΑΕΔ). Στο ΑΕΔ η αλυσίδα προκολλαγόνου υφίσταται μια σειρά από αντιδράσεις. Αρχικά, όπως και με άλλες εκκρινόμενες πρωτεΐνες, η γλυκοζυλίωση του προκολλαγόνου γίνεται στο ΑΕΔ και στο σύμπλεγμα Golgi. Στα κατάλοιπα υδροξυλυσίνης προστίθενται κατάλοιπα γαλακτόζης και γλυκόζης. Μακριά ολιγοσακχαρίδια προστίθενται σε ορισμένα κατάλοιπα ασπαραγίνης στο C-τερματικό **προπεπτίδιο (**ή **προεξέχον πεπτίδιο)**[7]. Το προπεπτίδιο αυτό είναι μία ομάδα του C-τερματικού που δεν υπάρχει στο ώριμο κολλαγόνο. Επίσης, συγκεκριμένα κατάλοιπα προλίνης και λυσίνης στη μέση των αλυσίδων υδροξυλιώνονται με υδροξυλάσες της μεμβράνης. Τέλος, δισουλφιδικοί δεσμοί μεταξύ των αλυσίδων μεταξύ των N και C τερματικών αλληλουχιών πολυπεπτιδίων ευθυγραμμίζουν τις τρεις αλυσίδες πριν να σχηματιστεί η τριπλή έλικα στο ενδοπλασματικό δίκτυο. Τα κεντρικά κομμάτια των αλυσίδων ενώνονται από το C έως το N τερματικό για να σχηματίσουν την τριπλή έλικα.

Μετά την ολοκλήρωση της επεξεργασίας και της συγκρότησης του κολλαγόνου τύπου I, το κολλαγόνο εκλύεται στον εξωκυττάριο χώρο. Κατά τη διάρκεια της εξωκύττωσης ή μετά από αυτήν, τα N- και C- τερματικά προπεπτίδια αφαιρούνται από εξωκυττάρια ένζυμα, τις πεπτιδάσες του προκολλαγόνου. Η πρωτεΐνη που προκύπτει ονομάζεται **τροποκολλαγόνο (**ή μόριο του κολλαγόνου, μήκος ~300 nm και διάμετρος ~1,5 nm) και αποτελείται σχεδόν εξ ολοκλήρου από μία τριπλή έλικα. Η εκτομή των δύο προπεπτιδίων επιτρέπει στα μόρια του κολλαγόνου να πολυμερίζονται σε κανονικά ινίδια στον εξωκυττάριο χώρο. Τα ινίδια δεν πρέπει να συγκεντρώνονται μέσα στο κύτταρο. Αυτό εξασφαλίζεται αφενός από τα προπεπτίδια, αφού αυτά εμποδίζουν το σχηματισμό ινιδίων, και αφετέρου από τη δράση του ενζύμου οξειδάση της λυσίνης, το οποίο είναι εξωκυττάριο ένζυμο που καταλύει το σχηματισμό αντιδρώντων αλδεΰδων. Οι αλδεΰδες αυτές σχηματίζουν από μόνες τους συγκεκριμένους ομοιοπολικούς σταυροδεσμούς ανάμεσα σε δύο μόρια – τριπλές έλικες, σταθεροποιώντας την κλιμακωτή διάταξη των μορίων κολλαγόνου και συνεισφέροντας στην ανθεκτικότητα του ινιδίου (***Εικόνα 3***).



Εικόνα 3

Σχηματική αναπαράσταση της βιοσύνθεσης του κολλαγόνου[8].

Για το σχηματισμό ώριμων μορίων κολλαγόνου και για τη συγκέντρωσή τους σε ινίδια είναι κρίσιμη η μετατροπή τους μετά τη μετάφραση. Για παράδειγμα, για να λειτουργήσουν και οι δύο υδροξυλάσες της προλίνης απαιτείται ασκορβικό οξύ (βιταμίνη C). Σε κύτταρα που στερούνται αυτού του οξέος, όπως συμβαίνει στην ασθένεια σκορβούτο, οι αλυσίδες προκολλαγόνου δεν υδροξυλιώνονται επαρκώς ώστε να σχηματίσουν σταθερές τριπλές έλικες στη συνήθη θερμοκρασία σώματος, ούτε μπορούν να σχηματίσουν κανονικά ινίδια. Συνεπώς, μη υδροξυλιωμένες αλυσίδες προκολλαγόνου διασπώνται μέσα στο κύτταρο. Χωρίς τη δομική υποστήριξη του κολλαγόνου, τα αιμοφόρα αγγεία, οι τέντονες και το δέρμα γίνονται εύθραυστα.

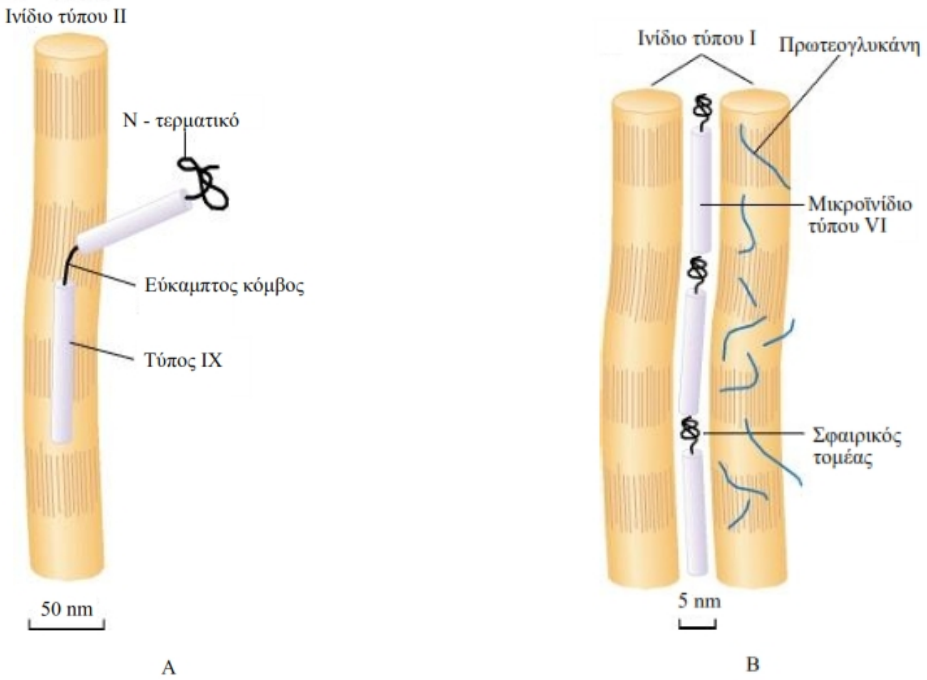
1.5 Οι διαφορετικές δομές του κολλαγόνου

Τα κολλαγόνα διαφέρουν στην ιδιότητά τους να σχηματίζουν ίνες και να οργανώνουν τις ίνες σε δίκτυα. Τα ινίδια τύπου Ι στον τέντονα έχουν μήκος έως 1 cm και διάμετρο έως περίπου 500 nm. Μία τριπλή έλικα στο κολλαγόνο τύπου Ι έχει διάμετρο μικρότερη από 2nm και μήκος περίπου 300 nm. Επομένως για να δημιουργηθούν οι δομές των φυσιολογικών ινιδίων κολλαγόνου απαιτείται μεγάλη παραγωγή ινιδίων. Το πιο χαρακτηριστικό γνώρισμα των ινιδίων κολλαγόνου είναι η D-περιοδικότητα (D = 67 nm)[9].

Το κολλαγόνο τύπου ΙΙ είναι το κυριότερο κολλαγόνο στο χόνδρο. Τα ινίδιά του έχουν μικρότερη διάμετρο από εκείνα του τύπου Ι και προσανατολίζονται τυχαία στο παχύρρευστο πλέγμα πρωτεογλυκάνης. Τέτοια άκαμπτα μακρομόρια προσδίδουν στο πλέγμα αντοχή και συμπιεστότητα και του επιτρέπουν να υφίσταται μεγάλες σχηματικές παραμορφώσεις. Αυτή η ιδιότητα του κολλαγόνου του επιτρέπει να απορροφά τους κραδασμούς.

Τα ινίδια τύπου ΙΙ συνδέονται μέσω σταυροδεσμών με τις πρωτεογλυκάνες τύπου ΙΧ στο πλέγμα, το οποίο είναι ένα κολλαγόνο διαφορετικής δομής. Το κολλαγόνο τύπου ΙΧ αποτελείται από δύο μακριές τριπλές έλικες συνδεδεμένες μέσω ενός εύκαμπτου κόμβου. Ο τομέας σφαιρικού Ν – τερματικού προεξέχει από τα σύνθετα ινίδια, όπως και ένα θειικό μόριο το οποίο είναι ένα υψηλά φορτισμένο πολυσακχαρίδιο που συνδέεται στην α_2 (ΙΧ) αλυσίδα στον εύκαμπτο κόμβο. Αυτοί οι προεξέχοντες μη ελικοειδείς τομείς συνδέουν το ινίδιο στις πρωτεογλυκάνες και σε άλλα συστατικά του πλέγματος. Η διακοπτόμενη δομή τριπλής έλικας του κολλαγόνου τύπου ΙΧ το εμποδίζει από το να συγκεντρώνεται σε ινίδια, αλλά αυτά τα τρία κολλαγόνα συσχετίζονται με ινίδια από άλλους τύπους κολλαγόνου και καλούνται κολλαγόνα συσχετιζόμενα με ινίδια (fibril-associated collagens). Στην ***Εικόνα 4****Α* απεικονίζεται αυτή η δομή.

Σε πολλούς συνδετικούς ιστούς στο πλάι των ινιδίων τύπου Ι συνδέεται κολλαγόνο τύπου VI και μπορεί να τα ενώσει για να σχηματίσει παχύτερες ίνες κολλαγόνου. Το κολλαγόνο τύπου VI είναι ασυνήθιστο γιατί το μόριό του αποτελείται από σχετικά σύντομες περιοχές τριπλές έλικες μήκους περίπου 60 nm που χωρίζονται από σφαιρικούς τομείς μήκους περίπου 40 nm.



Εικόνα 4

A : Συσχετισμός κολλαγόνου τύπου II και τύπου IX σε πλέγμα χόνδρου.
B : Οργάνωση των κυριότερων ινωδών συνιστωσών στο εξωκυττάριο πλέγμα των τεντόνων[10].

Σε ορισμένους ιστούς, αρκετές συνιστώσες του εξωκυττάριου πλέγματος οργανώνονται σε έναν βασικό υμένα (lamina), μία δομή λεπτού υμενίου. Το κολλαγόνο τύπου IV σχηματίζει το βασικό ινώδες δισδιάστατο δίκτυο όλων των βασικών λαμίνων. Τρεις αλυσίδες κολλαγόνου τύπου IV σχηματίζουν μία τριπλή έλικα μήκους 400 nm με μεγάλες σφαιρικές ομάδες στα C – τερματικά και μικρότερες άγνωστης δομής στα N – τερματικά. Το ελικοειδές κομμάτι είναι ασυνήθιστο γιατί οι ακολουθίες Γλυκίνη – X – Y διακόπτονται περίπου 24 φορές από κομμάτια που δε μπορούν να σχηματίσουν τριπλή έλικα. Αυτές οι μη ελικοειδείς περιοχές κάνουν το μόριο εύκαμπτο. Ο πλευρικός συσχετισμός των N – τερματικών περιοχών μορίων τύπου IV δημιουργεί μια χαρακτηριστική τετραμερική μονάδα που μπορεί να παρατηρηθεί στο ηλεκτρονικό μικροσκόπιο. Στη συνέχεια, περιοχές τριπλής έλικας από διάφορα μόρια συσχετίζονται πλευρικά για να σχηματίσουν διακλαδιζόμενα σκέλη λεπτών διαμέτρων. Αυτές οι αλληλεπιδράσεις μαζί με αυτές μεταξύ των C – τερματικών σφαιρικών ομάδων και τις τριπλές έλικες σε προσκολλημένα μόρια τύπου IV δημιουργούν ένα ακανόνιστο δισδιάστατο ινώδες δίκτυο (***Εικόνα 4****B*)[11].

1.6 Το κολλαγόνο ως ικρίωμα για ανάπτυξη κυτταρικής καλλιέργειας

Συχνά χρησιμοποιούνται ως ικριώματα κυτταρικής καλλιέργειας ουσίες όπως φυσικά πολυμερή υλικά[ii], συνθετικά πολυμερή, κεραμικά, βιοδιασπώμενα πολυμερή, πολυμερή με απορροφημένες πρωτεΐνες ή ακινητοποιημένες λειτουργικές ομάδες. Τα πλέγματα που προκύπτουν φυσιολογικά παρουσιάζουν πλεονεκτήματα λόγω των εξαιρετικών ιδιοτήτων βιοσυμβατότητας που διαθέτουν. Το εξωκυττάριο πλέγμα των συνδετικών ιστών περιέχει πολλά μόρια κολλαγόνου, υαλουρονικού οξέος και γλυκοζαμινογλυκάνες. Τα κολλαγόνα έχουν χρησιμοποιηθεί στην φυσική τους κατάσταση ή σαν

[ii] Φυσικά πολυμερή υλικά είναι υλικά όπως το βαμβάκι, το άμυλο και το καουτσούκ.

μετουσιωμένη[iii] ζελατίνη. Το κολλαγόνο τύπου Ι είναι το πιο δημοφιλές ικρίωμα για βιοκαλλιέργεια, λόγω της αφθονίας του και της βιοσυμβατότητάς του. Μπορεί να χρησιμοποιηθεί ολόκληρο ή μετά από πρωτεολυτική αφαίρεση των μικρών μη – ελικοειδών τελοπεπτιδίων (N και C - τερματικών περιοχών), η οποία μειώνει την πιθανότητα αντιγονικότητας[iv]. Επιπλέον, το κολλαγόνο στη φυσική του κατάσταση υπάρχει σε δύο δυνατές μορφές, είτε ως διογκωμένα υδροπηκτώματα είτε ως ίνες οργανωμένες σε ένα αραιό πλέγμα.

Οι ίνες μπορεί να συνδεθούν με σταυροδεσμούς με διάφορες μεθόδους. Μία από αυτές είναι η αφυδάτωση (dehydrative crosslinking) και συμβαίνει όταν το ποσοστό του νερού πέφτει κάτω από περίπου 1% και επιτρέπει το σχηματισμό πεπτιδικών δεσμών μεταξύ των αλυσίδων. Μία άλλη μέθοδος δημιουργίας σταυροδεσμών περιλαμβάνει γλουταραλδεΰδες (glutaraldehyde crosslinking). Αυτή η μέθοδος εφαρμόζεται συνήθως στα συμπολυμερή του κολλαγόνου τύπου Ι και στη θειϊκή χονδροϊτίνη 6- (η οποία ανήκει στις γλυκοζαμινογλυκάνες). Όσον αφορά τη μέθοδο με τις γλουταραλδεΰδες, έχουν διατυπωθεί επιφυλάξεις σχετικά με την κυτταροτοξικότητα και τη βιοσυμβατότητα. Η κυτταροτοξικότητα μπορεί να μειωθεί στο ελάχιστο με εξουδετέρωση, με μείωση της συγκέντρωσης της γλουταραλδεΰδης ή με αντικατάστασή της με άλλους χημικούς παράγοντες, όπως το διισοκυανικό εξαμεθυλένιο (hexamethylene diisocyanate). Τέλος, η υπεριώδης ακτινοβόληση του κολλαγόνου εκτιμάται ότι σταθεροποιεί την οργάνωσή του σε ίνες και ότι μειώνει την αποικοδόμησή του και την αντιγονικότητα[12].

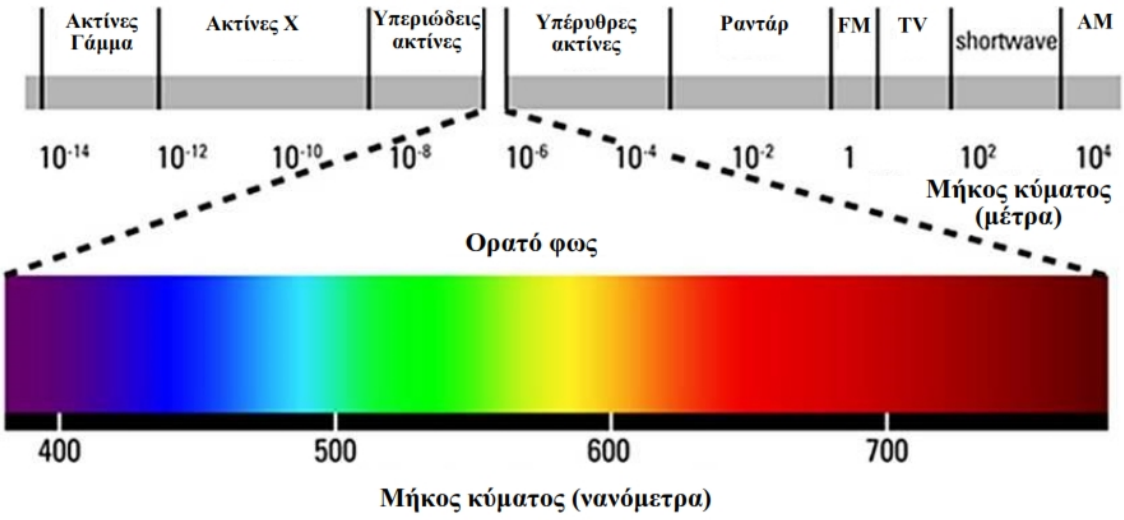
1.7 Το UV - ακτινοβολημένο κολλαγόνο

Προκειμένου να ληφθούν ικανοποιητικά αποτελέσματα από τη χρήση του κολλαγόνου ως βιοϋλικού, είναι απαραίτητη η βελτίωση των φυσικών, χημικών και βιολογικών ιδιοτήτων του για κάποια εφαρμογή. Η τροποποίηση των φυσικών ιδιοτήτων του κολλαγόνου είναι δυνατή μέσω υπεριώδους (UV) ακτινοβόλησης. Ο μετασχηματισμός των ιδιοτήτων των βιοπολυμερών επιφανειών μέσω UV ακτινοβόλησης χρησιμοποιείται όλο και περισσότερο σε συγκεκριμένες εφαρμογές, γιατί επιτρέπει την τροποποίηση των ιδιοτήτων της επιφάνειας χωρίς να αλλοιώνει τα χαρακτηριστικά του υλικού. Παρόλα αυτά, δεν είναι εύκολος ο έλεγχος της έκτασης της τροποποίησης του υλικού, γιατί λείπει ακόμα η απαραίτητη γνώση σχετικά με τις ακριβείς διεργασίες που λαμβάνουν χώρα κατά την υπεριώδη ακτινοβόληση. Η γνώση του τρόπου διαμόρφωσης του κολλαγόνου σε συνάρτηση με τη δόση υπεριώδους ακτινοβολίας που δέχεται είναι σημαντική για βιοϊατρικές εφαρμογές.

Το κολλαγόνο περιέχει διάφορα συστατικά που απορροφούν στην περιοχή μέσης υπεριώδους ακτινοβολίας (midultraviolet, 300±320 nm) και στην περιοχή κοντινής υπεριώδους (near-ultraviolet, 320±370 nm), καθώς επίσης και αρωματικά αμινοξέα (φαινυλαλανίνη και τυροσίνη) που απορροφούν στην περιοχή μακρινής υπεριώδους (far – ultraviolet, 250±280 nm). Στην Εικόνα *5* απεικονίζεται το φάσμα ηλεκτρομαγνητικής ακτινοβολίας.

[iii] Μετουσίωση στις πρωτεΐνες ή στα νουκλεϊκά οξέα συμβαίνει όταν αυτά χάνουν την τριτοταγή και τη δευτεροταγή δομή τους λόγω εξωτερικής δράσης όπως ισχυρό αλκαλικό ή όξινο περιβάλλον, παρουσία οργανικού διαλύτη ή υψηλή θερμοκρασία.

[iv] Αντιγονικότητα είναι η ικανότητα μιας ουσίας να δρα σαν αντιγόνο. Αντιγόνο είναι κάθε ουσία που μπορεί να προκαλέσει ανοσοποιητική αντίδραση στον οργανισμό.



Εικόνα 5

Το ηλεκτρομαγνητικό φάσμα [13].

Η τροποποίηση των φυσικών ιδιοτήτων του κολλαγόνου με UV ακτινοβολία έχει μελετηθεί ευρέως, αν και ο μηχανισμός δεν έχει πλήρως αποσαφηνιστεί. Η UV ακτινοβολία μειώνει τη θερμική σταθερότητα υμενίων κολλαγόνου και προκαλεί το σχηματισμό σχισμών και σπασιμάτων στην επιφάνειά τους[14]. Προηγούμενες μελέτες έχουν δείξει ότι η UV ακτινοβολία προκαλεί τη δημιουργία σταυροδεσμών στο κολλαγόνο, την καταστροφή υπολοίπων τυροσίνης[15] και φαινυλαλανίνης[16], και την υποβάθμιση των αλυσίδων που οδηγεί σε αλλαγές στη διαμόρφωση του κολλαγόνου[17]. Σε υμένια κολλαγόνου και υμένια κολλαγόνου με ελαστίνη η UV ακτινοβολία προκαλεί αύξηση στην πολικότητα[v] της επιφάνειάς του, επηρεάζει την τοπολογία και την τραχύτητά τους, ενώ σε μικρές δόσεις βελτιώνει τη βιοσυμβατότητα τέτοιου είδους υλικών[18]. Έχει δειχθεί ότι χαμηλές δόσεις UV ακτινοβολίας προκάλεσαν μείωση της επιφανειακής τραχύτητας υμενίων από κολλαγόνο και PVA (poly(vinyl alcohol))[19], καθώς και μείωση της τραχύτητας σε υμένια PVP-κολλαγόνου[20].

Αναφορικά με την καλλιέργεια κυττάρων σε υπόστρωμα κολλαγόνου, έχει δειχθεί ότι η UV ακτινοβόληση σε συνδυασμό με την προσθήκη γλυκόζης στο κολλαγόνο δεν επηρεάζουν αρνητικά την ανάπτυξη των κυττάρων, εάν η ακτινοβόληση πραγματοποιηθεί πριν την κυτταροκαλλιέργεια[21]. Έχει βρεθεί ότι ικριώματα για κυτταροκαλλιέργεια που σχημάτισαν σταυροδεσμούς στο κολλαγόνο με UV ακτινοβόληση παρουσίασαν μεγαλύτερη ανάπτυξη στους ινοβλάστες σε σχέση με ικριώματα που ανέπτυξαν σταυροδεσμούς με χρήση καρβοδιιμιδίου (EDC), αλλά είχαν χειρότερες μηχανικές ιδιότητες και αποδομήθηκαν γρηγορότερα[22].

[v] Αύξηση στην πολικότητα των υμενίων σημαίνει μεγαλύτερη μαγνητική έλξη μεταξύ του υποστρώματος του υμενίου και του ίδιου του υμενίου.

Κεφάλαιο 2 : ΙΝΟΒΛΑΣΤΕΣ

2.1 Γενικά

2.1.1 Κύτταρα

Τα κύτταρα είναι οι δομικές και λειτουργικές μονάδες όλων των ζωντανών οργανισμών. Κάποιοι οργανισμοί αποτελούνται από ένα κύτταρο, ενώ άλλοι, όπως ο άνθρωπος, αποτελούνται από τρισεκατομμύρια κύτταρα. Υπάρχουν δύο βασικές κατηγορίες κυττάρων, τα προκαρυωτικά και τα ευκαρυωτικά. Τα ευκαρυωτικά έχουν μεμβράνη γύρω από τον πυρήνα τους (πυρηνική μεμβράνη), ενώ τα προκαρυωτικά δεν έχουν. Στη συνέχεια θα αναφερθούν τα βασικά δομικά χαρακτηριστικά των ευκαρυωτικών ζωικών κυττάρων, επειδή οι ινοβλάστες (οι οποίοι θα χρησιμοποιηθούν στο πειραματικό μέρος αυτής της εργασίας) ανήκουν σε αυτήν την κατηγορία.

Τα ευκαρυωτικά κύτταρα περικλείονται από την **κυτταροπλασματική μεμβράνη**, η οποία διαχωρίζει το κύτταρο από το περιβάλλον του, το προστατεύει και είναι υπεύθυνη για την επικοινωνία του κυττάρου με το περιβάλλον του μέσω ανταλλαγής ουσιών. Αποτελείται κυρίως από ένα διπλό στρώμα από πρωτεΐνες και λιπίδια. Διαθέτει επίσης και πολλά άλλα μόρια που δρουν ως δίαυλοι και αντλίες, μετακινώντας διαφορετικά μόρια εντός και εκτός κυττάρου. Ο **κυτοσκελετός** είναι μια πολύπλοκη διάταξη που οργανώνει και διατηρεί το σχήμα του κυττάρου. Το εσωτερικό του κυττάρου αποτελείται κυρίως από ένα υγρό που ονομάζεται **κυτταρόπλασμα**. Στα ευκαρυωτικά κύτταρα το κυτταρόπλασμα περιέχει τον κυτοσκελετό και τα οργανίδια. Περιέχει διαλυμένα θρεπτικά συστατικά, βοηθά στην αποικοδόμηση των άχρηστων προϊόντων, και μετακινεί ύλη σε διάφορα σημεία του κυττάρου.

Τα **οργανίδια** υπάρχουν μόνο στα ευκαρυωτικά κύτταρα. Είναι μικρά όργανα που επιτελούν συγκεκριμένες λειτουργίες και περικλείονται από προστατευτική μεμβράνη. Ο **πυρήνας** είναι το πιο εμφανές οργανίδιο του κυττάρου και περιέχει το γενετικό υλικό του. Διαχωρίζεται από το κυτταρόπλασμα μέσω της πυρηνικής μεμβράνης. Τα **ριβοσώματα** είναι μεγάλα συμπλέγματα που αποτελούνται από πολλά μόρια και είναι υπεύθυνα για την πρωτεϊνοσύνθεση. Βρίσκονται ελεύθερα στο κυτταρόπλασμα ή συνδεδεμένα σε ένα άλλο οργανίδιο, το **ενδοπλασματικό δίκτυο**. Το ενδοπλασματικό δίκτυο είναι το δίκτυο μεταφοράς μορίων που προορίζονται για συγκεκριμένες τροποποιήσεις ή προορισμούς, σε αντίθεση με τα μόρια που βρίσκονται ελεύθερα στο κυτταρόπλασμα. Έχει δύο μορφές, το αδρό ΕΔ (ενδοπλασματικό δίκτυο) και το λείο ΕΔ. Το αδρό ΕΔ ονομάζεται έτσι επειδή έχει ριβοσώματα προσκολλημένα την εξωτερική του επιφάνεια, ενώ το λείο ΕΔ δεν έχει. Το λείο ΕΔ λειτουργεί ως αποδοχέας των πρωτεϊνών που συντίθενται στο αδρό ΕΔ. Οι πρωτεΐνες που συντίθενται μεταφέρονται στο σύμπλεγμα Golgi για επιπλέον επεξεργασία, πακετάρισμα και μεταφορά σε άλλες κυτταρικές τοποθεσίες. Τα **μιτοχόνδρια** παράγουν ενέργεια για το κύτταρο και έχουν δύο μεμβράνες, μία εσωτερική με αναδιπλώσεις και μία εξωτερική. Τα **λυσοσώματα** και **υπεροξυσώματα** συνιστούν το σύστημα αποβολής αχρήστων στοιχείων από το κύτταρο και περιέχουν ένζυμα, δηλαδή πρωτεΐνες που καταλύουν βιοχημικές διαδικασίες[23].

2.1.2 Μικροσκοπία και κύτταρα

Τα κύτταρα γενικά δεν είναι ορατά με γυμνό μάτι. Άρχισαν να παρατηρούνται μετά την εφεύρεση του οπτικού μικροσκοπίου[vi] (***Εικόνα 6***) το 17ο αιώνα. Το μικροσκόπιο φθορισμού μοιάζει με το οπτικό μικροσκόπιο, με τη διαφορά ότι το φως που χρησιμοποιείται για την απεικόνιση προέρχεται από το φθορισμό του δείγματος (βλ. κεφάλαιο 4). Αναφορικά με το οπτικό μικροσκόπιο, οι ιδιότητες του φωτός θέτουν περιορισμούς στις λεπτομέρειες του δείγματος που μπορεί να απεικονίσει. Αυτοί οι περιορισμοί ξεπεράσθηκαν με την εφεύρεση του ηλεκτρονικού μικροσκοπίου (***Εικόνα 7***) το 1926, το οποίο χρησιμοποιεί ως φωτεινή πηγή δέσμες ηλεκτρονίων αντί δέσμες φωτός. Έτσι επιτρέπουν την απεικόνιση σημαντικά μεγαλύτερης λεπτομέρειας στα δείγματα, ακόμα και σε επίπεδο μακρομορίων[vii]. Το ηλεκτρονικό μικροσκόπιο μπορεί να αποκαλύψει λεπτομέρειες μεγέθους λίγων νανομέτρων. Ακόμα πιο σύγχρονο είναι το Μικροσκόπιο Ατομικής Δύναμης, το οποίο έχει ανάλυση της τάξης των κλασμάτων του νανόμετρου[24].

Εικόνα 6

Οπτικό μικροσκόπιο[25].

Εικόνα 7

Ηλεκτρονικό μικροσκόπιο[26].

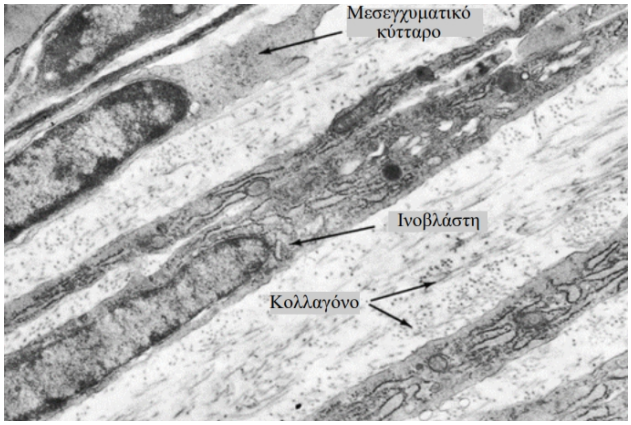
2.1.3 Ινοβλάστες

Οι ινοβλάστες είναι κύτταρα του ανθρώπινου σώματος που συνθέτουν το εξωκυττάριο πλέγμα του συνδετικού ιστού (***Εικόνα 8***). Συμβάλλουν σημαντικά στην επούλωση των πληγών και στη στιβαρότητα και την ελαστικότητα του δέρματος. Οι ινοβλάστες έχουν ατρακτοειδές ή αστεροειδές σχήμα (***Εικόνα 9***) και από αυτό προεκβάλλουν αποφυάδες (ή φιλοπόδια)[viii] μικρού μήκους, οι οποίες διακλαδίζονται, ενώ ο πυρήνας έχει ωοειδές σχήμα. Οι ινοβλάστες παράγουν διάφορες πρωτεΐνες και η κυριότερη από αυτές είναι το κολλαγόνο. Στο ανθρώπινο σώμα οι ινοβλάστες συναντώνται πάνω σε στρώμα κολλαγόνου[27].

[vi] Το φωτονικό ή οπτικό μικροσκόπιο χρησιμοποιεί φως στο ορατό φάσμα (380-760 nm).

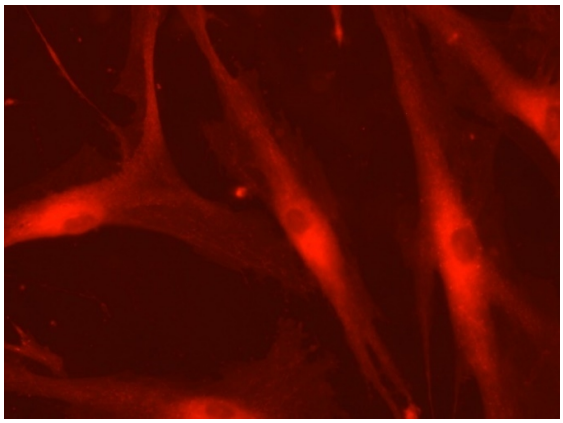
[vii] Τα βιολογικά μακρομόρια είναι σύνθετες οργανικές ενώσεις υψηλού μοριακού βάρους, όπως οι πρωτεΐνες, τα νουκλεϊκά οξέα, οι πολυσακχαρίτες και τα λιπίδια.

viii Αποφυάδα είναι παρακλάδι που φυτρώνει κοντά στη ρίζα.



Εικόνα 8

Παραγωγή συνδετικού ιστού από τους ινοβλάστες [28].



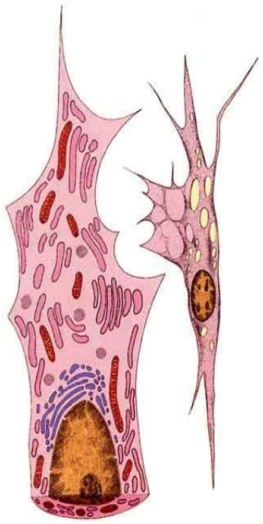
Εικόνα 9

Ινοβλάστες απεικονισμένοι με μικροσκόπιο φθορισμού.

2.2 Φαινότυποι ινοβλαστών

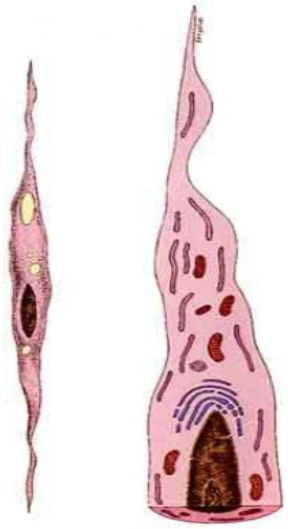
Οι ινοβλάστες και τα ινοκύτταρα είναι δύο φάσεις του ίδιου κυττάρου. Οι ινοβλάστες είναι τα ενεργοποιημένα κύτταρα, ενώ τα ινοκύτταρα είναι τα μη ενεργά.

- Οι **ενεργοποιημένοι ινοβλάστες** ανιχνεύονται κατά την επούλωση τραυμάτων. Ο πυρήνας τους είναι ευμεγέθης με υποστρόγγυλο σχήμα. Οι κυτταροπλασματικές αποφυάδες είναι μεγάλες και επιμήκεις (***Εικόνα 10***).
- Τα **ινοκύτταρα** έχουν μικρό μέγεθος, παρουσιάζουν χαμηλή συνθετική δραστηριότητα και συρρικνωμένο πυρήνα (***Εικόνα 11***). Παρατηρούνται στους τένοντες και στον κερατοειδή χιτώνα του οφθαλμού.



Εικόνα 10

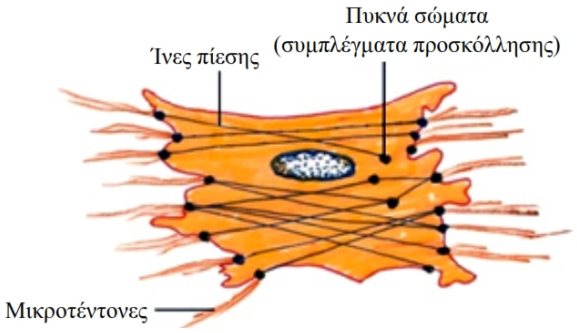
Ενεργοποιημένοι ινοβλάστες.



Εικόνα 11

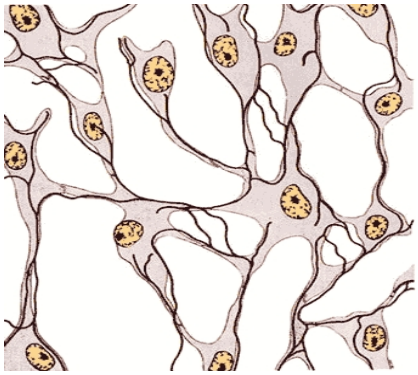
Ινοκύτταρα.

Οι **μυοϊνοβλάστες** έχουν συσταλτική δράση. Συμμετέχουν στη συστολή και στην ελάττωση της έκτασης του ουλώδους ιστού (***Εικόνα 12***).
Τα **δικτυωτά κύτταρα** έχουν αστεροειδές σχήμα με πολλές διακλαδώσεις και βρίσκονται στο λεμφικό ιστό και στο μυελό των οστών (***Εικόνα 13***).



Εικόνα 12

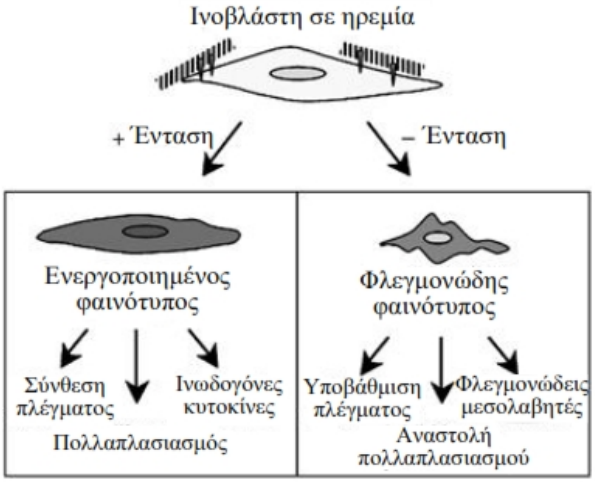
Μυοϊνοβλάστες[29].



Εικόνα 13

Δικτυωτά κύτταρα.

Οι ινοβλάστες αλληλεπιδρούν με γειτονικά ινίδια κολλαγόνου κυρίως μέσω υποδοχέων της β1 οικογένειας της ιντεγκρίνης [ix]. Όταν δεν υπάρχει μηχανικό φορτίο στο σύστημα ινοβλαστών – υποδοχέων, ο φαινότυπος των ινοβλαστών είναι ανενεργός (φλεγμονώδης). Αντίθετα, η παρουσία μηχανικού φορτίου επάγει φαινότυπο ενεργοποιημένων ινοβλαστών. Αυτή η διαδικασία απεικονίζεται σχηματικά στην
Εικόνα *14*.



Εικόνα 14

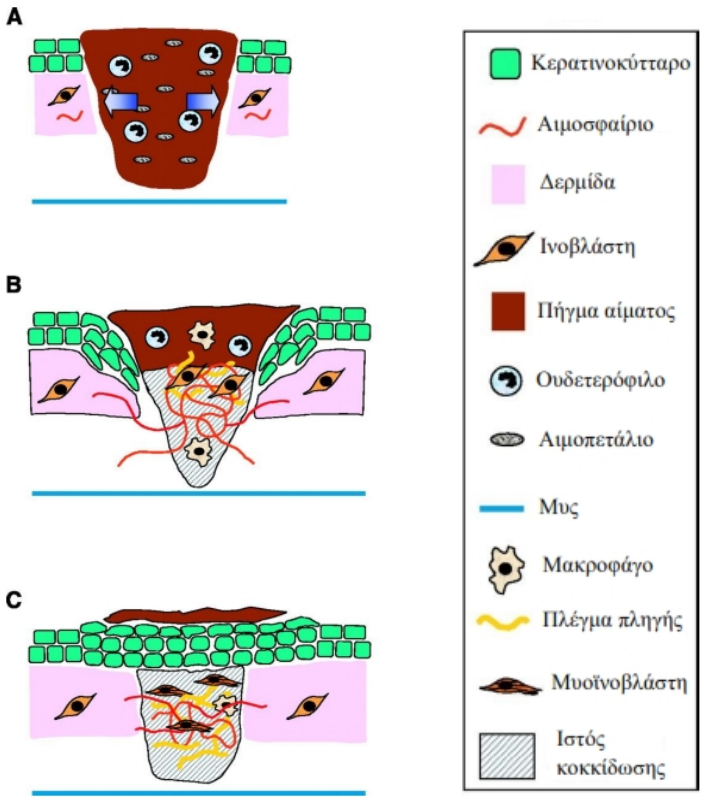
Σχηματική αναπαράσταση της επαγωγής ενεργοποιημένων και φλεγμονωδών ινοβλαστών[30].

ix Οι ιντεγκρίνες αποτελούν μία ομάδα προσκόλλησης των κυττάρων και αποτελούνται από δύο πρωτεϊνικές υπομονάδες.

2.3 Βιολογικές λειτουργίες ινοβλαστών

2.3.1 Ενεργοποίηση ινοβλαστών κατά την επούλωση τραυμάτων

Η λειτουργία που επιτελούν οι ινοβλάστες στην επούλωση των τραυμάτων δίνεται σχηματικά στην παρακάτω εικόνα. Όταν συμβαίνει ένας τραυματισμός στο δέρμα, τις πρώτες 12 έως 24 ώρες μετά το τραύμα η περιοχή είναι γεμάτη από πήγμα αίματος, το οποίο περιέχει ουδετερόφιλα λευκά αιμοσφαίρια *(A)*. Από 3 έως 7 ημέρες μετά τον τραυματισμό, τα περισσότερα ουδετερόφιλα έχουν υποστεί απόπτωση[x]. Σε αυτό το στάδιο έχουν φτάσει στον τραυματισμένο ιστό μακροφάγα λευκά αιμοσφαίρια, καθώς και ενδοθηλιακά κύτταρα. Τα τελευταία είναι υπεύθυνα για τον σχηματισμό καινούριων αιμοσφαιρίων. Στον ιστό μεταναστεύουν και ινοβλάστες, οι οποίοι πολλαπλασιάζονται και συνθέτουν το εξωκυττάριο πλέγμα. Ο νέος ιστός καλείται ιστός κοκκίδωσης. Στο εξωτερικό τμήμα της πληγής αναπτύσσονται κερατινοκύτταρα, τα οποία μεταναστεύουν στην τραυματισμένη δερμίδα και πάνω από το προσωρινό πλέγμα *(B)*. Σε μία έως δύο εβδομάδες μετά τον τραυματισμό η πληγή είναι εντελώς γεμάτη με ιστό κοκκίδωσης. Οι ινοβλάστες έχουν μετασχηματισθεί σε μυοϊνοβλάστες. Η πληγή συστέλλεται και οι μυοϊνοβλάστες εναποθέτουν κολλαγόνο. Η πληγή είναι εντελώς επικαλυμμένη με νεοεπιδερμίδα *(C)*.



Εικόνα 15

Διαδικασία επούλωσης των τραυμάτων από τους ινοβλάστες[31].

x Απόπτωση είναι ο θάνατος των κυττάρων.

2.3.2 Ενεργοποίηση ινοβλαστών κατά την ίνωση

Η ίνωση είναι ο σχηματισμός πλεονάζοντος ινώδους συνδετικού ιστού σε ένα όργανο ή ιστό από τους ινοβλάστες, ως μέρος διαδικασίας επούλωσης ή αντίδρασης. Νοείται σε αντίθεση με το σχηματισμό ινώδους ιστού ως φυσιολογική συνιστώσα ενός οργάνου ή ιστού. Η δημιουργία ουλών είναι ίνωση που εξαλείφει τοπικά την προϋπάρχουσα αρχιτεκτονική του οργάνου ή ιστού. Ο Πίνακας *2* αναφέρει ορισμένα είδη ίνωσης, τη συνήθη τοποθεσία τους στο ανθρώπινο σώμα, καθώς και την εμφάνιση του κολλαγόνου και των ινών στα είδη αυτά.

Τύπος	**Συνήθης τοποθεσία**	**Εμφάνιση κολλαγόνου**	**Ίνες ελαστίνης**
Ινομύωμα αυχενικού τύπου (nuchal-type fibroma)[32]	Αυχενική περιοχή	Δεμάτια ινών	Λιγοστές
Δεσμοπλαστικό μυελοβλάστωμα	Ώμος, άκρα	Ολιγοστό ή απόν	Άμορφες
Ινομύωμα του τένοντα	Περιφερικά άκρα, ιδίως τα χέρια	Άμορφο	Απούσες
Ουλή	Διαφέρει	Άμορφο	Λιγοστές έως απούσες
Ελαστοίνωμα	Θωρακικό τοίχωμα ωμοπλάτης	Άμορφο	Άφθονες και αφύσικες
Δεσμοειδής ινωμάτωση	Κοιλιακό τοίχωμα, ώμος	Άμορφο	Απούσες
Χηλοειδής ίνωση	Άνω τμήμα της πλάτης, δελτοειδής, στέρνο, λοβοί των αυτιών	Άμορφες παχιές δέσμες ηωσινόφιλων[xi]	Λιγοστές ή απούσες

Πίνακας 2

Είδη ίνωσης και ιδιότητές τους[33].

2.4 Ινοβλάστες συσχετισμένοι με τον καρκίνο (CAFs)

Οι καρκινικοί όγκοι μπορούν εκτός των άλλων να θεωρηθούν και ως πληγές που δεν επουλώνονται. Αυτό σημαίνει ότι τα κύτταρα που συμμετέχουν στην αγγειογένεση[xii] και στην απόκριση του οργανισμού στον τραυματισμό, όπως τα ενδοθηλιακά κύτταρα και οι ινοβλάστες, καθορίζουν σε μεγάλο βαθμό την εξέλιξη, την ανάπτυξη και την εξάπλωση των καρκίνων. Οι ινοβλάστες συσχετίζονται δομικά και λειτουργικά με τα καρκινικά κύτταρα σε όλα τα στάδια της εξέλιξης του καρκίνου. Τα προϊόντα που παράγουν (παράγοντες ανάπτυξης, χημειοκίνες[xiii] και εξωκυττάριο πλέγμα) διευκολύνουν την αγγειογενετική επιστράτευση ενδοθηλιακών κυττάρων[xiv] και

[xi] Τα ηωσινόφιλα είναι είδος λευκών αιμοσφαιρίων.

[xii] Αγγειογένεση είναι η διαδικασία κατά την οποία προκύπτουν νέα αιμοφόρα αγγεία από προϋπάρχοντα. Όταν συμβαίνει σε καλοήθη όγκο, συνιστά καθοριστικό βήμα για τη μετατροπή του σε κακοήθη.

[xiii] Οι χημειοκίνες είναι είδος πρωτεΐνης που όταν εκλύεται από ένα κύτταρο προκαλεί την κίνηση γύρω κυττάρων σύμφωνα με τη διαδικασία της χημειόταξης.

[xiv] Τα ενδοθηλιακά κύτταρα είναι πολυλειτουργικά, πεπλατυσμένα επιθηλιακά κύτταρα (βλ. υποσημείωση xviii) με

περικυττάρων[xv]. Επομένως επηρεάζουν πολύ την κακοήθη εξέλιξη του καρκίνου και αντιπροσωπεύουν έναν σημαντικό στόχο για καρκινικές θεραπείες[34].

2.4.1 Ενεργοποίηση των ινοβλαστών στο καρκινικό στρώμα

Οι ινοβλάστες που σχετίζονται με τον καρκίνο (cancer-associated fibroblasts, CAFs) είναι ο συνηθέστερος τύπος κυττάρου μέσα στο στρώμα[xvi] του όγκου πολλών ειδών καρκίνου. Σύγχρονες μελέτες έδειξαν ότι πολλοί υποπληθυσμοί στρωματικών ινοβλαστών μέσα σε διαφορετικούς όγκους έχουν κάποιες κοινές ιδιότητες, οι οποίες συλλογικά οδηγούν στην ενεργοποίηση αυτών των ινοβλαστών. Αυτές οι ιδιότητες συνιστούν κυρίως την υπερέκκριση ορισμένων πρωτεϊνών που ενεργοποιούν τους ινοβλάστες. Οι CAFs επηρεάζουν ποικιλοτρόπως την εξέλιξη του όγκου. Αρχικά δρουν ανασταλτικά στα πρώιμα στάδια του καρκίνου, κυρίως ενώνοντας τα κενά μεταξύ ενεργοποιημένων ινοβλαστών. Αντίθετα, αργότερα οι CAFs ενεργοποιούνται από διάφορους παράγοντες που εκκρίνουν οι όγκοι και προάγουν την ανάπτυξη και την εξέλιξη των όγκων αυτών.

2.4.2 Προέλευση των CAFs

Δεν έχει βρεθεί ακόμη η προέλευση των CAFs, επειδή διαφέρει σε όγκους που βρίσκονται σε διαφορετικούς ιστούς, αλλά ακόμη και σε διαφορετικές περιοχές του ίδιου όγκου. Παρόλα αυτά υπάρχουν κάποια στοιχεία για την προέλευση των CAFs. Οι CAFs μπορούν να κατηγοριοποιηθούν ανάλογα με την προέλευσή τους σε μόνιμες, προερχόμενες από μεσεγχυματικά βλαστικά κύτταρα[xvii] και προερχόμενες από μετάλλαξη. Οι μόνιμες CAFs προέρχονται κυρίως από την ενεργοποίηση τοπικών ινοβλαστών από κάποιο παράγοντα ανάπτυξης που προέρχεται από τον καρκίνο. Οι CAFs που προέρχονται από βλαστικά κύτταρα εκφράζουν χαρακτηριστικούς δείκτες που συσχετίζονται με επιθετικότητα. Όμως ο ρόλος των βλαστικών κυττάρων στον καρκινικό όγκο αμφισβητείται, καθώς έχουν συσχετιστεί και θετικά και αρνητικά με αυτών, ανάλογα με την πηγή των βλαστικών κυττάρων και το μοντέλο του όγκου που χρησιμοποιήθηκε. Οι CAFs που προέρχονται από μετάλλαξη πιθανώς προέρχονται από επιθηλιακά κύτταρα[xviii] που υπέστησαν επιθηλιακή-μεσεγχυματική μετάβαση (EMM), απέκτησαν μεσεγχυματικό χαρακτήρα και έγιναν ινοβλάστες. Επιπλέον, οι CAFs μπορούν να προκύψουν κατευθείαν από τα καρκινικά κύτταρα μέσω EMM.

2.4.3 Ο ρόλος των CAFs στην εξέλιξη του καρκίνου

Οι CAFs εκκρίνουν παράγοντες ανάπτυξης, κυτοκίνες και πρωτεάσες, οι οποίες οδηγούν στον πολλαπλασιασμό των καρκινικών κυττάρων. Πειραματικά και κλινικά δεδομένα υποστηρίζουν την υπόθεση ότι οι CAFs ρυθμίζουν την κινητικότητα των κυττάρων και την μεταστατική εξάπλωση προς δευτερεύοντα όργανα. Οι CAFs συνεισφέρουν καθοριστικά στην αλλοίωση της δομής του εξωκυττάριου πλέγματος στους όγκους επειδή παράγουν πρωτεΐνες, πρωτεάσες και άλλα ένζυμα που συμμετέχουν στην μετατροπή των πρωτεϊνών του πλέγματος μετά τη μετάφραση. Επίσης οι ινοβλάστες που κυκλοφορούν στο αίμα προστατεύουν τα μεταναστεύοντα καρκινικά κύτταρα από την απόπτωση, ευνοώντας έτσι τη μετάσταση του καρκίνου.

υψηλή εξειδίκευση, τα οποία έρχονται σε επαφή με το αίμα.

[xv] Τα περικύτταρα είναι αγγειακά μυϊκά κύτταρα που καλύπτουν την επιφάνεια των αγγείων.

[xvi] Το στρώμα είναι το (μη κακοήθες) εξωκυττάριο πλέγμα στο οποίο αναπτύσσεται ο όγκος.

[xvii] Τα βλαστικά κύτταρα μπορούν να διαφοροποιούνται σε κύτταρα των οστών, λίπους, χόνδρου και μυών σε πολλές φυσιολογικές και παθολογικές διαδικασίες.

[xviii] Επιθηλιακά κύτταρα ονομάζονται τα κύτταρα του τοιχώματος διαφόρων οργάνων του σώματος.

2.4.4 Συμμετοχή των CAFs στην θεραπεία του καρκίνου

Λόγω της ουσιαστικής συμβολής του στρώματος στην εξέλιξη του καρκίνου, πρόσφατα οι ινοβλάστες έχουν προταθεί ως στόχοι κατά την θεραπεία. Οι CAFs είναι γενετικά ευσταθείς σε σχέση με τα καρκινικά κύτταρα, επομένως είναι βέβαιο ότι θα παραμείνουν ευαίσθητοι στη φαρμακευτική θεραπεία. Επίσης, οι CAFs είναι τα κύτταρα που ευθύνονται κυρίως για τη δομή του εξωκυττάριου πλέγματος του όγκου που εμποδίζει την διάχυση αντικαρκινικών παραγόντων μέσα σε στερεούς όγκους. Επιπλέον, η αλληλεπίδραση μεταξύ των CAFs και των κυττάρων του όγκου προωθεί την επιβίωση, την εξάπλωση και την επιθετικότητα των καρκινικών κυττάρων. Δυστυχώς διαφορετικά είδη ιστών χρειάζονται διαφορετική θεραπεία τόσο επειδή οι CAFs επιτελούν διαφορετικές λειτουργίες σε άλλους ιστούς, όσο και για το λόγο ότι οι CAFs δεν προέρχονται όλες από τον ίδιο τύπο ιστού. Επομένως η αποτελεσματικότητα της θεραπείας θα ενισχυθεί από εκτενείς μελέτες αναφορικά με την ταξινόμηση των ινοβλαστών και την αποσαφήνιση της σχέσης μεταξύ CAFs και όγκων[35].

Κεφάλαιο 3 : ΜΙΚΡΟΣΚΟΠΙΑ ΑΤΟΜΙΚΗΣ ΔΥΝΑΜΗΣ (AFM)

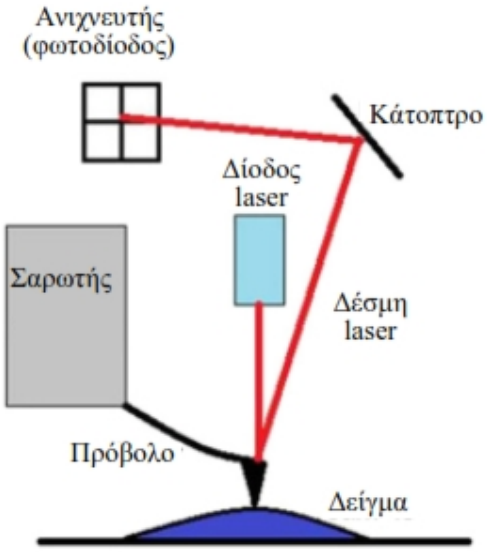
3.1 Γενικά

Τα αρχικά AFM σημαίνουν Μικροσκοπία Ατομικής Δύναμης (Atomic Force Microscopy). Η ονομασία αυτή προέρχεται από το γεγονός ότι η ακίδα του μικροσκοπίου καταλήγει να έχει ακτίνα ίση με 10 νανόμετρα, με αποτέλεσμα η επιφάνεια αλληλεπίδρασης μεταξύ της ακίδας και του δείγματος να αποτελείται από περιορισμένο αριθμό ατόμων. Το μικροσκόπιο AFM εφευρέθηκε το 1986[36] και είναι ένα όργανό που μετρά τις δυνάμεις αλληλεπίδρασης μεταξύ μιας αιχμηρής ακίδας και της επιφάνειας ενός δείγματος. Η ικανότητα του μικροσκοπίου να πετυχαίνει υψηλή ανάλυση σε υγρά και να μετρά τις μηχανικές ιδιότητες ενός δείγματος σε νανομετρική κλίμακα το κάνει ιδιαίτερα ενδιαφέρον για τη μελέτη βιολογικών δειγμάτων[37].

3.2 Λειτουργία του AFM

3.2.1 Συστατικά μέρη

Το AFM αποτελείται από τέσσερα κύρια μέρη: έναν πρόβολο[xix] με μια αιχμηρή ακίδα από κάτω του, η οποία συνήθως αποτελείται από πυρίτιο ή νιτρίδιο του πυριτίου, έναν σαρωτή που οδηγεί τον πρόβολο, μία δίοδο laser και έναν ευαίσθητο ανιχνευτή θέσης. Καθώς η ακίδα σαρώνει την επιφάνεια του δείγματος, οι αλληλεπιδράσεις μεταξύ της ακίδας του AFM και των χαρακτηριστικών της επιφάνειας προκαλούν μετατόπιση του προβόλου. Αυτή η μετατόπιση μετράται από τον ανιχνευτή (μια φωτοδίοδο), ο οποίος ανιχνεύει την εκτροπή μιας ασθενούς δέσμης laser, η οποία γεννάται από τη δίοδο laser και ανακλάται στο πίσω μέρος του προβόλου (***Εικόνα 16***).



Εικόνα 16

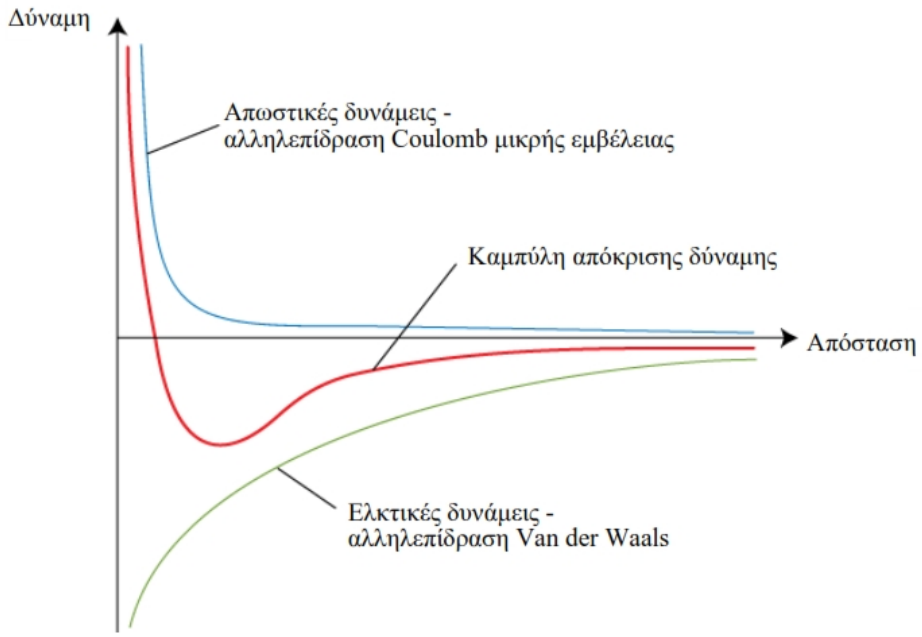
Σχηματική αναπαράσταση ενός τυπικού μικροσκοπίου AFM.

[xix] Ως «πρόβολος» έχει μεταφραστεί η αγγλική λέξη ‘cantilever’.

Το AFM δημιουργεί τοπογραφικές εικόνες της επιφάνειας σχεδιάζοντας την εκτροπή της δέσμης laser καθώς η ακίδα σαρώνει την επιφάνεια. Αυτή η σχεδίαση βελτίωσε κατά πολύ την ευαισθησία σχεδίασης του μικροσκοπίου, καθώς η εκτροπή του προβόλου μπορεί εύκολα να ενισχυθεί μέσω της διαδρομής του φωτός. Χάρη σε αυτήν τη σχεδίαση έχουν επιτευχθεί εικόνες ατομικής ανάλυσης μεγάλης ποικιλίας επιφανειών. Επίσης είναι δυνατή η απεικόνιση βιολογικών δειγμάτων στα φυσικά τους περιβάλλοντα[38].

3.2.2 Δυνάμεις αλληλεπίδρασης ακίδας - δείγματος

Η δύναμη που μετράται με το AFM μπορεί να κατηγοριοποιηθεί σε δυνάμεις μεγάλης εμβέλειας και μικρής εμβέλειας. Η πρώτη κατηγορία κυριαρχεί όταν η επιφάνεια σαρώνεται από σχετικά μεγάλες αποστάσεις και μπορεί να είναι δυνάμεις Van der Waals και τριχοειδείς δυνάμεις (οι οποίες οφείλονται στο στρώμα νερού που συχνά εμφανίζεται στο περιβάλλον του ατμοσφαιρικού αέρα). Όταν η σάρωση γίνεται σε επαφή με την επιφάνεια οι δυνάμεις μικρής εμβέλειας είναι πολύ σημαντικές, και ιδιαίτερα οι κβαντομηχανικές δυνάμεις (αλληλεπίδραση Coulomb). Η ***Εικόνα 17*** απεικονίζει τις δυνάμεις αυτές. Η μεσαία καμπύλη απόκρισης δύναμης κατασκευάζεται με την πρόσθεση των ελκτικών δυνάμεων μεγάλης εμβέλειας και των απωθητικών δυνάμεων μικρής εμβέλειας.



Εικόνα 17

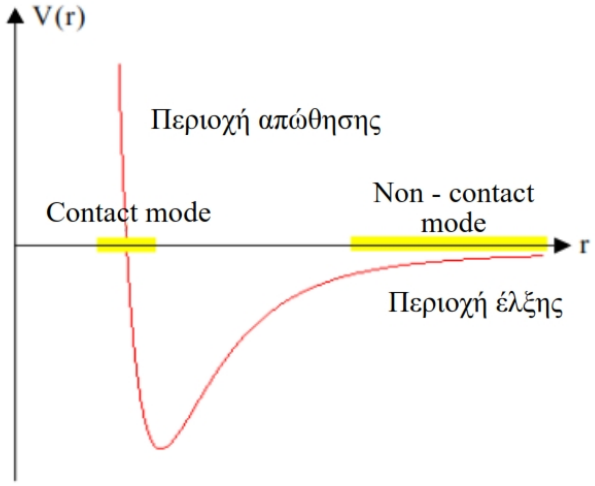
Καμπύλη δύναμης – απόστασης (μεσαία καμπύλη). Η καμπύλη προκύπτει από το άθροισμα των απωστικών δυνάμεων μικρής εμβέλειας (άνω καμπύλη) και των ελκτικών δυνάμεων μεγάλης εμβέλειας (κάτω καμπύλη).

Οι ελκτικές δυνάμεις κοντά στην επιφάνεια προκαλούνται από ένα νανοσκοπικό στρώμα μόλυνσης που υπάρχει σε όλες τις επιφάνειες μέσα στον ατμοσφαιρικό αέρα. Η έκταση της μόλυνσης εξαρτάται από το περιβάλλον λειτουργίας του μικροσκοπίου. Οι απωστικές δυνάμεις αυξάνονται καθώς η ακίδα αρχίζει να έρχεται σε επαφή με την επιφάνεια του δείγματος. Οι απωστικές δυνάμεις στο AFM τείνουν να προκαλούν κάμψη στον πρόβολο μακριά από το δείγμα[39].

3.3 Τρόποι απεικόνισης (imaging modes)

3.3.1 Γενικά

Υπάρχουν τρεις βασικοί τρόποι απεικόνισης: ο τρόπος απεικόνισης με επαφή της ακίδας και του δείγματος (contact mode) και χωρίς επαφή μεταξύ ακίδας και δείγματος (non-contact mode και tapping mode). Η διαφορά μεταξύ των τρόπων αυτών μπορεί να εξηγηθεί με τη βοήθεια ενός διαγράμματος δυναμικής ενέργειας ***(Εικόνα 18***). Ο αισθητήρας του AFM μετρά τη δύναμη που οφείλεται στην αλληλεπίδραση της ακίδας με την επιφάνεια του δείγματος. Το διάγραμμα δυναμικής ενέργειας απεικονίζει την εξάρτηση της δύναμης από την απόσταση μεταξύ της ακίδας και του δείγματος.



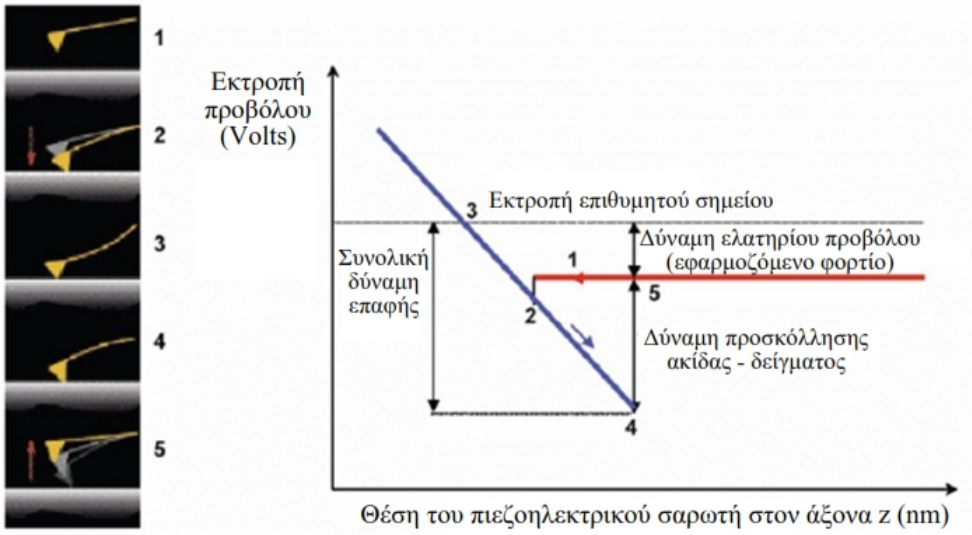
Εικόνα 18

Διάγραμμα δυναμικής ενέργειας ακίδας - δείγματος.

Στο contact mode, ο πρόβολος βρίσκεται σε απόσταση λιγότερη από μερικά angstroms από την επιφάνεια του δείγματος, και η διατομική δύναμη μεταξύ του προβόλου και του δείγματος είναι απωστική λόγω των αλληλεπιδράσεων Coulomb μικρής εμβέλειας. Στο non-contact mode, ο πρόβολος βρίσκεται σε απόσταση τάξης δεκάδες με εκατοντάδες angstroms από την επιφάνεια του δείγματος, και η διατομική δύναμη μεταξύ του προβόλου και του δείγματος είναι ελκτική, κυρίως ως αποτέλεσμα των αλληλεπιδράσεων Van der Waals μεγάλης κλίμακας.

3.3.2 Contact Mode

Η μέθοδος απεικόνισης contact mode εξηγείται μέσω της καμπύλης δύναμης – μετατόπισης (Εικόνα *19*). Επιλέγεται ένα σταθερό επιθυμητό σημείο και η ακίδα σαρώνει το δείγμα πλεγματικά, μετρώντας τη δύναμη προσκόλλησης ακίδας – δείγματος. Το μειονέκτημα είναι ότι μπορούν να ασκηθούν μεγάλες πλευρικές δυνάμεις στο δείγμα. Αυτό μπορεί να οδηγήσει σε φθορά του δείγματος. Μία λύση για αυτό το πρόβλημα ήταν η ταλάντωση του προβόλου κατά τη διάρκεια της απεικόνισης, η οποία οδήγησε στη δημιουργία της μεθόδου απεικόνισης tapping mode.



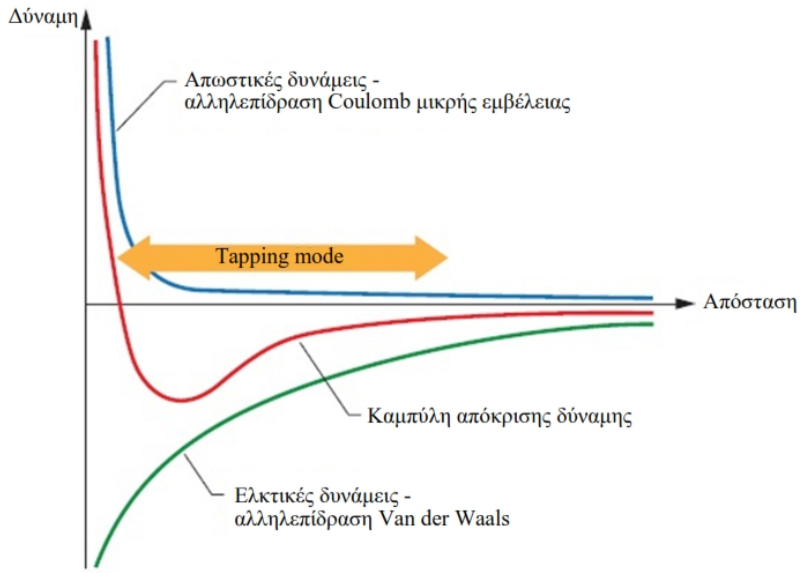
Εικόνα 19

Καμπύλη δύναμης – μετατόπισης. Η οριζόντια καμπύλη αντιστοιχεί στο πλησίασμα της ακίδας στο δείγμα και η διαγώνια στην απομάκρυνση. Η συνολική δύναμη επαφής εξαρτάται τόσο από την προσκόλληση όσο και από το εφαρμοζόμενο φορτίο[40].

3.3.3 Tapping Mode

Τα πλεονεκτήματα του tapping mode έγκεινται στην εξάλειψη μεγάλου μέρους των μόνιμων διατμητικών τάσεων[xx] και στην πρόκληση μικρότερης φθοράς στην επιφάνεια του δείγματος, ακόμα και με σκληρότερες ακίδες. Διαφορετικά συστατικά του δείγματος που διαθέτουν διαφορετικές κολλητικές και μηχανικές ιδιότητες θα εμφανίσουν αντίθεση φάσης και έτσι είναι δυνατή και η ανάλυση της σύστασης του δείγματος. Για μεγαλύτερη αντίθεση φάσης χρησιμοποιούνται μεγαλύτερες δυνάμεις ακίδας, ενώ η ελαχιστοποίηση αυτής της δύναμης μειώνει την επιφάνεια επαφής και επιτρέπει την απεικόνιση με μεγαλύτερη ανάλυση. Στην ***Εικόνα 20*** απεικονίζεται η περιοχή λειτουργίας του Tapping Mode στο διάγραμμα δύναμης – απόστασης που παρουσιάστηκε νωρίτερα (στην ***Εικόνα 17***).

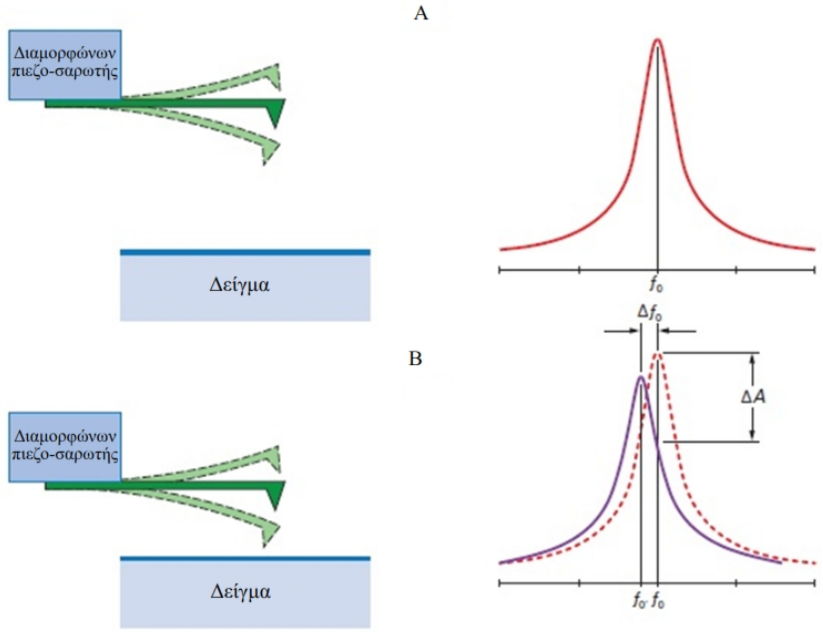
[xx] Διατμητική τάση είναι το πηλίκο της παράλληλης ή εφαπτομενικής δύναμης που εφαρμόζεται σε μια επιφάνεια ρευστού, προς το εμβαδόν της επιφάνειας αυτής.



Εικόνα 20

Καμπύλη δύναμης – απόστασης. Το διπλό βέλος απεικονίζει την κίνηση ενός ταλαντούμενου προβόλου.

Στο tapping mode ο πρόβολος ταλαντώνεται σε μια συχνότητα κοντά στη συχνότητα συντονισμού του. Ένας ηλεκτρονικός βρόχος ανάδρασης εξασφαλίζει ότι το πλάτος της ταλάντωσης παραμένει σταθερό, έτσι ώστε να διατηρείται η συνεχής αλληλεπίδραση ακίδας – δείγματος κατά τη διάρκεια της σάρωσης (***Εικόνα 21****A*). Η διαφορά μεταξύ του σημείου αναφοράς του βρόχου ανάδρασης στον Z-άξονα και της εκτροπής του προβόλου παράγει το λεγόμενο σήμα error. Οι δυνάμεις που δρουν ανάμεσα στο δείγμα και την ακίδα προκαλούν αλλαγή στο πλάτος της ταλάντωσης αλλά και στη συχνότητα συντονισμού και στη φάση ταλάντωσης του προβόλου (***Εικόνα 21****B*). Το πλάτος χρησιμοποιείται για την ανάδραση και οι κάθετες διορθώσεις του πιεζο – σαρωτή καταγράφονται ως εικόνα του ύψους. Ταυτόχρονα, οι αλλαγές στη φάση παρουσιάζονται στην εικόνα φάσης (phase image)[41].



Εικόνα 21

Καμπύλη συντονισμού ενός προβόλου tapping mode πάνω από (A) και κοντά στην επιφάνεια (B)[42].

3.4 Βιολογικές εφαρμογές AFM

3.4.1 Απεικόνιση μακρομορίων – κολλαγόνου με AFM

Το AFM έχει καταστήσει δυνατή την απεικόνιση μακρομορίων σε μεγάλη ανάλυση. Ένα τέτοιο μακρομόριο είναι το DNA. Το DNA αποθηκεύει τη γενετική πληροφορία του κυττάρου και οι μεταλλάξεις του μπορεί να οδηγήσουν σε σημαντικές δυσλειτουργίες του οργανισμού ή καρκίνο. Γι' αυτό αποτελεί ένα από μακρομόρια που έχουν μελετηθεί εκτενέστατα με το AFM από τη στιγμή της εφεύρεσής του. Έχει απεικονισθεί σε πολλές επιφάνειες στον αέρα, καθώς και σε πολλά διαλύματα. Η απεικόνιση του DNA σε νερό και σε υδατικά ρυθμιστικά διαλύματα είναι δύσκολη λόγω της προσρόφησης[xxi] του DNA στην επιφάνεια. Το πρόβλημα αυτό επιλύθηκε με την ανακάλυψη ότι δισθενή κατιόντα είναι πολύ σημαντικά για την προσκόλληση του DNA σε επιφάνειες μίκας, καθώς και με την ανάπτυξη του tapping mode σε υγρά περιβάλλοντα. Η μεγαλύτερη χωρική ανάλυση όμως ελήφθη με την τοποθέτηση DNA σε μία κατιονική διπλοστοιβάδα λιπιδίων και απεικόνιση με contact mode κάτω από υγρό. Αυτή η τεχνική επέτρεψε την ανάλυση της διπλής έλικας ενός μορίου DNA, κάτι το οποίο απαιτεί ανάλυση 2-3 nm. Πρόσφατα έχουν αναλυθεί δομικές αλλαγές που συμβαίνουν στο DNA ως απόκριση σε δέσμευση από πρωτεΐνες[43]. Επίσης έχει επιτευχθεί η παρατήρηση της μετακίνησης του DNA σε επιφάνειες μίκας μέσα σε διάλυμα καθώς και η πέψη του από ένζυμα. Πρόσφατα έχει παρατηρηθεί και η διαδικασία της μεταγραφής[xxii] σε πραγματικό χρόνο με τη χρήση tapping mode AFM. Η δομή του RNA είναι δύσκολο να μελετηθεί με το AFM, επειδή το RNA είναι συνήθως μονόκλωνο και δεν μπορεί να απεικονισθεί εύκολα πάνω σε μία επίπεδη επιφάνεια όπως είναι η μίκα.

Με το AFM έχουν επίσης απεικονισθεί διάφορες πρωτεΐνες. Η απεικόνιση των πρωτεϊνών είναι δύσκολη επειδή οι πρωτεΐνες παραμορφώνονται εύκολα από την ακίδα και σε πολλές περιπτώσεις είναι επίπονη η διαδικασία προσκόλλησης μορίων πάνω σε μία επίπεδη επιφάνεια, αρκετά σταθερά ώστε να μην αποκολληθούν από την μετακινούμενη ακίδα. Έχουν αναπτυχθεί πολλές μέθοδοι, όπως η δημιουργία σταυροδεσμών στην επιφάνεια, η ψύξη του δείγματος ή η τροποποίηση της πρωτεΐνης με την προσθήκη μίας συγκεκριμένης αλληλουχίας αμινοξέων στη δομή της, ώστε η πρωτεΐνη να μπορεί να σχηματίσει δεσμούς με ένα άλλο μόριο το οποίο είναι ήδη προσκολλημένο στην επιφάνεια.

Μία πρωτεΐνη που έχει μελετηθεί με τη χρήση του AFM είναι το κολλαγόνο. Έχει δειχθεί ότι λεπτά υμένια κολλαγόνου διατηρούν τις μη γραμμικές οπτικές τους ιδιότητες και ότι το AFM μπορεί να συμβάλλει σημαντικά στη διερεύνηση των οπτικών χαρακτηριστικών των υμενίων[44]. Επιπλέον, τα χαρακτηριστικά των υμενίων κολλαγόνου μπορούν να ρυθμιστούν με τη μεταβολή φυσικοχημικών παραγόντων και οι αλλαγές στην τοπολογία των δειγμάτων μπορούν να απεικονισθούν και να μετρηθούν με το AFM[45]. Με τη χρήση του AFM έχουν αναπτυχθεί μέθοδοι για την κατασκευή υμενίων κολλαγόνου με επιθυμητά χαρακτηριστικά επιφάνειας, όπως ο προσανατολισμός των ινών κολλαγόνου και η τραχύτητα[46]. Με χρήση tapping mode έχουν παρατηρηθεί ανακατασκευασμένες ίνες κολλαγόνου, οι οποίες βρέθηκε ότι παρουσιάζουν παρόμοια δομή με τις φυσιολογικές ίνες, ενώ επίσης παρατηρήθηκαν μικρά ινίδια διαμέτρου 20 nm διασκορπισμένα και σε φυσιολογικές και σε ανακατασκευασμένες ίνες κολλαγόνου[47].

[xxi] Προσρόφηση είναι η προσκόλληση ατόμων, ιόντων ή μορίων σε μια επιφάνεια.
[xxii] Μεταγραφή είναι η διαδικασία παραγωγής RNA από DNA.

3.4.2 Απεικόνιση κυττάρων με AFM

Αρχικά απεικονίσθηκαν μόνο σταθεροποιημένα (νεκρά πλέον) κύτταρα. Η σταθεροποίηση των κυττάρων γενικά σκληραίνει την επιφάνεια της μεμβράνης του κυττάρου δημιουργώντας σταυροδεσμούς μεταξύ των πρωτεϊνών της μεμβράνης. Η σταθεροποίηση συνήθως περιλαμβάνει βύθιση του δείγματος σε ασετόν, μεθανόλη, αιθανόλη, φορμαλίνη ή παραφορμαλδεΰδη για μικρό χρονικό διάστημα (έως 20 min, ανάλογα με τη χρησιμοποιούμενη ουσία)[48]. Μετά τη σταθεροποίηση, τα κύτταρα διατηρούν την κατάσταση στην οποία βρίσκονται και δεν μπορούν να υποστούν αλλαγές[49]. Η σκλήρυνση της επιφάνειας ευνοεί την απεικόνιση με AFM μικρών λεπτομερειών της επιφάνειας, όπως μικρολάχνες[50]. Σταθεροποιημένα κύτταρα που παρατηρήθηκαν με AFM παρουσίασαν ευκρινείς ακμές, ενώ η εσωτερική δομή των κυττάρων ήταν λιγότερο προφανής σε σχέση με τα ζωντανά κύτταρα. Η σκληρότητα των μεμβρανών και των δομών που έχουν σχηματίσει σταυροδεσμούς αποτρέπει την ακίδα από το να παραμορφώνει τη μεμβράνη αρκετά ώστε να αποκαλύψει λεπτομέρειες στον κυτοσκελετό[51].

Αργότερα απεικονίσθηκαν και ζωντανά κύτταρα και πολλά ενδιαφέροντα δυναμικά χαρακτηριστικά παρατηρήθηκαν στην επιφάνειά τους. Παρατηρήθηκε επιπλέον ότι αρκετά εσωτερικά χαρακτηριστικά μπορούν να παρατηρηθούν με το AFM, αν και ο ακριβής μηχανισμός που κάνει αυτήν την απεικόνιση δυνατή δεν είναι πολύ σαφής. Η παρατήρηση των ζωντανών κυττάρων με το AFM είναι αρκετά δύσκολη, επειδή η απαλότητα και η τραχύτητά τους περιορίζει σημαντικά την ανάλυση της εικόνας που μπορεί να ληφθεί. Επιπλέον, σε ορισμένες περιπτώσεις μπορεί να είναι δύσκολο να τοποθετηθούν σταθερά σε μία επίπεδη επιφάνεια. Ένας τρόπος για να ξεπερασθεί αυτό το πρόβλημα είναι η παγίδευση στρογγυλών κυττάρων στο στόμιο μίας μικροπιπέττας ή ενός φίλτρου Millipore και η απεικόνιση του κομματιού του κυττάρου που εξέχει από το στόμιο. Ένα επιπλέον πρόβλημα είναι η διατάραξη του κυττάρου που προκαλείται από την ακίδα του AFM. Φαίνεται ότι η ακίδα που σαρώνει το κύτταρο το ερεθίζει και μπορεί να προκαλέσει κάποιες παρατηρήσιμες αντιδράσεις. Η ανάλυση του AFM σε ολόκληρα κύτταρα βρίσκεται κάπου ανάμεσα στην ανάλυση του οπτικού και του ηλεκτρονικού μικροσκοπίου. Το πλεονέκτημα του AFM είναι ότι μπορεί ταυτόχρονα να καταγράφει κάποιες μηχανικές ιδιότητες των ζωντανών κυττάρων[52].

Κεφάλαιο 4: ΜΙΚΡΟΣΚΟΠΙΑ ΦΘΟΡΙΣΜΟΥ

4.1 Γενικά

Το μικροσκόπιο φθορισμού απεικονίζει τα δείγματα χρησιμοποιώντας το φαινόμενο του φθορισμού, το οποίο μπορεί να οφείλεται είτε σε φθορίζουσα ουσία που έχει προστεθεί στο δείγμα είτε στον αυτοφθορισμό. Είναι παρόμοιο με ένα συμβατικό οπτικό μικροσκόπιο αλλά έχει επιπλέον χαρακτηριστικά, τα οποία το κάνουν ένα ιδιαίτερα ισχυρό εργαλείο για τις βιολογικές επιστήμες. Ενώ το οπτικό μικροσκόπιο χρησιμοποιεί φως στο φάσμα του ορατού (400-700 nm) για να φωτίσει και να απεικονίσει ένα δείγμα σε μεγέθυνση (με τη βοήθεια των οπτικών φακών), το μικροσκόπιο φθορισμού χρησιμοποιεί μία πηγή φωτός πολύ μεγαλύτερης έντασης που διεγείρει το δείγμα. Το δείγμα εκπέμπει με τη σειρά του φως χαμηλότερης ενέργειας και μεγαλύτερου μήκους κύματος (δηλαδή φθορίζει). Αυτό το φως παράγει τη μεγεθυμένη εικόνα αντί για τη συμβατική φωτεινή πηγή του οπτικού μικροσκοπίου.

Η μικροσκοπία φθορισμού χρησιμοποιείται συχνά για να απεικονίσει κάποια χαρακτηριστικά μικρών δειγμάτων όπως τα μικρόβια. Επίσης χρησιμοποιείται για να ενισχύσει οπτικά τρισδιάστατα χαρακτηριστικά σε μικρές κλίμακες. Αυτό μπορεί να επιτευχθεί προσκολλώντας φθορίζοντες ιχνηθέτες σε αντισώματα που προσκολλώνται σε στοχευμένα χαρακτηριστικά, ή χρώζοντας με πιο ευρύ τρόπο το δείγμα. Όταν το ανακλώμενο φως και ο φθορισμός του υποβάθρου φιλτράρονται, μπορούν να απεικονιστούν συγκεκριμένα μέρη ενός δείγματος. Έτσι δίνεται η δυνατότητα απεικόνισης επιθυμητών οργανιδίων ή χαρακτηριστικών επιφανείας ενός δείγματος. Η συνεστιακή μικροσκοπία φθορισμού χρησιμοποιείται συχνά για να τονίσει την τρισδιάστατη υπόσταση των δειγμάτων. Αυτό επιτυγχάνεται με τη χρήση ισχυρών φωτεινών πηγών, όπως τα lasers, που μπορούν να εστιάσουν με μεγάλη ακρίβεια σε ένα σημείο. Αυτή η εστίαση γίνεται επανειλημμένα στα διάφορα επίπεδα του δείγματος. Συχνά είναι δυνατή η ψηφιακή τρισδιάστατη ανακατασκευή του δείγματος με προγράμματα ανακατασκευής εικόνας που αξιοποιούν τα δεδομένα του μικροσκοπίου από κάθε επίπεδο απεικόνισης[53].

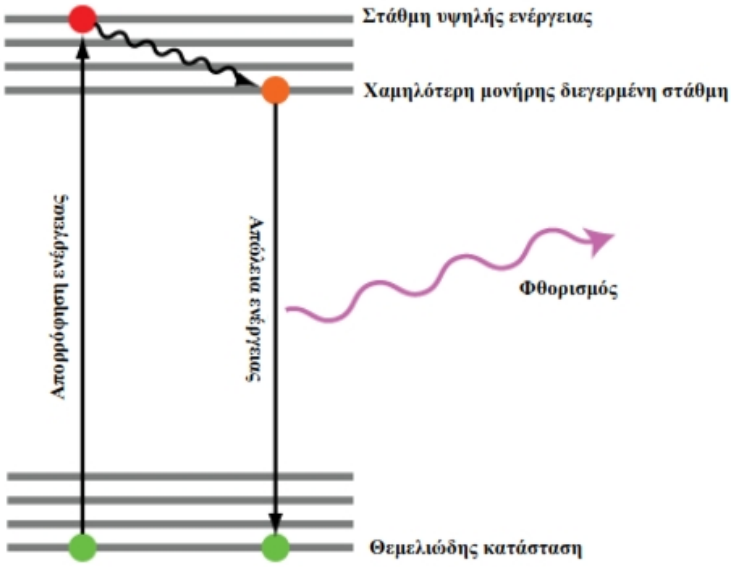
4.2 Λειτουργία μικροσκοπίου φθορισμού

4.2.1 Το φαινόμενο του φθορισμού

Ο φθορισμός ανήκει στα φαινόμενα της φωταύγειας. Κατά το φθορισμό ευαίσθητα μόρια εκπέμπουν φως από διεγερμένες στάθμες που δημιουργήθηκαν από κάποιον μηχανισμό, φυσικό (όπως η απορρόφηση φωτός), μηχανικό (τριβή) ή χημικό. Η φωταύγεια μέσω διέγερσης ενός μορίου με χρήση φωτονίων στο ορατό φάσμα ή στην περιοχή του υπεριώδους καλείται φωτοφωταύγεια. Η φωτοφωταύγεια διακρίνεται στο φθορισμό και το φωσφορισμό. Ο φθορισμός είναι η ιδιότητα κάποιων ατόμων και μορίων να απορροφούν φως ενός συγκεκριμένου μήκους κύματος και ακολούθως να εκπέμπουν φως μεγαλύτερου μήκους κύματος μετά από σύντομο χρονικό διάστημα, που καλείται διάρκεια ζωής του φθορισμού. Η διαδικασία του φωσφορισμού μοιάζει με εκείνη του φθορισμού, αλλά χαρακτηρίζεται από πολύ μεγαλύτερη διάρκεια ζωής διεγερμένης στάθμης (και επιπλέον η εκπομπή φωτονίου διαδραματίζεται κατά την διαδικασία ταλαντωτικής χαλάρωσης από την τριπλή διεγερμένη στάθμη προς την θεμελιώδης στάθμη).

Η διαδικασία του φθορισμού αποτελείται από τρία κύρια γεγονότα, τα οποία συμβαίνουν σε

διαφορετικές τάξεις μεγέθους χρονικών διαστημάτων. Αυτά απεικονίζονται στην ***Εικόνα 22***. Ένα ηλεκτρόνιο στη θεμελιώδη κατάσταση απορροφά ενέργεια και μεταβαίνει σε κάποια στάθμη υψηλής ενέργειας. Στη συνέχεια με ταλαντωτική χαλάρωση εκπίπτει στη χαμηλότερη μονήρη διεγερμένη στάθμη, και τέλος επιστρέφει στη θεμελιώδη με εκπομπή ενός φωτονίου, το οποίο είναι ορατό κατά το φθορισμό. Η διέγερση ενός ευαίσθητου μορίου από ένα εισερχόμενο φωτόνιο συμβαίνει σε femtoseconds (10^{-15} δευτερόλεπτα), ενώ η ταλαντωτική χαλάρωση ηλεκτρονίων διεγερμένης στάθμης στη θεμελιώδη κατάσταση είναι πολύ πιο αργή και μετράται σε picoseconds (10^{-12} δευτερόλεπτα). Η τελική διαδικασία είναι η εκπομπή ενός φωτονίου μεγαλύτερου μήκους κύματος και η επιστροφή του μορίου στη θεμελιώδη κατάσταση και διαρκεί nanoseconds (10^{-9} δευτερόλεπτα)[54].



Εικόνα 22

Διάγραμμα που απεικονίζει τη διαδικασία του φθορισμού[55].

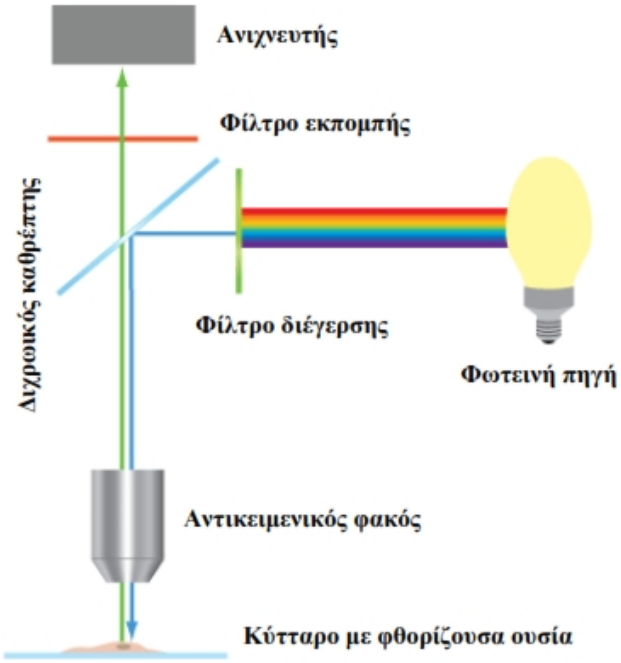
Επειδή ένα ποσοστό της ενέργειας του προσπίπτοντος φωτονίου χάνεται κατά την ταλαντωτική χαλάρωση από κάποια στάθμη υψηλής ενέργειας στη χαμηλότερη μονήρη διεγερμένη, το φάσμα εκπομπής ενός διεγερμένου φθορίζοντος μορίου μετατοπίζεται σε μεγαλύτερα μήκη κύματος σε σχέση με το φάσμα απορρόφησης ή διέγερσης. Αυτό το φαινόμενο είναι γνωστό ως μετατόπιση Stokes. Όσο αυξάνεται η μετατόπιση Stokes, τόσο πιο εύκολα διακρίνονται το φως διέγερσης από το φως εκπομπής μέσα από συνδυασμούς φίλτρων φθορισμού.

4.2.2 Λειτουργία του μικροσκοπίου

Τα φθορίζοντα μόρια απορροφούν μόνο σε συγκεκριμένα μήκη κύματος, γι'αυτό ένα μικροσκόπιο φθορισμού πρέπει να διαθέτει μία πηγή φωτός ικανή να παράγει μήκη κύματος που θα διεγείρουν το δείγμα. Αυτό συνήθως επιτυγχάνεται με τη χρήση μιας λυχνίας xenon[xxiii] ή μιας λυχνίας ατμών υδραργύρου, οι οποίες παράγουν λευκό φως και έτσι εκπέμπουν σε όλα τα μήκη κύματος του ορατού φάσματος. Για την απομόνωση ενός μήκους κύματος, χρησιμοποιείται ένα οπτικό φίλτρο που καλείται φίλτρο διέγερσης. Αυτό ρυθμίζεται ώστε να αφήνει στην έξοδό του μόνο το μήκος κύματος που χρησιμοποιείται για να διεγείρει τα φθορίζοντα μόρια. Μετά το φίλτρο διέγερσης ακολουθεί ο διχρωικός καθρέπτης, ο οποίος ανακλά ορισμένα μήκη κύματος ενώ αφήνει τα άλλα να τον

[xxiii] Οι λυχνίες xenon είναι λυχνίες εκκένωσης υψηλής έντασης και μέσα από το γυάλινο περίβλημά τους περιέχουν ως επί το πλείστον αέριο xenon.

διαπεράσουν. Όταν το μονοχρωματικό (κατά προσέγγιση) φως εξέρχεται από τη διάταξη αυτή, φθάνει στο δείγμα και διεγείρει το δείγμα που έχει χρωσθεί με φθορίζουσα ουσία. Έτσι τα φθορίζοντα μόρια απορροφούν φωτόνια και εκπέμπουν φωτόνια χαμηλότερης ενέργειας, άρα μεγαλύτερου μήκους κύματος. Τα εκπεμπόμενα φωτόνια που έχουν μικρότερο μήκος κύματος διαπερνούν τον διχρωικό καθρέπτη και στη συνέχεια φθάνουν στον ανιχνευτή του μικροσκοπίου. Η διαδικασία αυτή απεικονίζεται στην ***Εικόνα 23***.



Εικόνα 23

Σχηματική απεικόνιση της λειτουργίας του μικροσκοπίας φθορισμού[56].

4.3 Βιολογικές εφαρμογές μικροσκοπίας φθορισμού

4.3.1 Φαινόμενα μείωσης φθορισμού και βιολογικές εφαρμογές τους

Η ένταση της εκπομπής φθορισμού μπορεί να μειωθεί από συνθήκες που την επηρεάζουν. Ορισμένα φαινόμενα που οδηγούν σε μείωση της εκπομπής φθορισμού είναι η φωτολεύκανση (photobleaching), η απόσβεση (quenching), ο κορεσμός διέγερσης (excitation saturation), και η μεταφορά ενέργειας συντονισμού φθορισμού (fluorescence resonance energy transfer, FRET).
Η φωτολεύκανση είναι η μη αναστρέψιμη αποσύνθεση των φθορίζοντων μορίων στη διεγερμένη κατάσταση εξαιτίας της αλληλεπίδρασής τους με μοριακό οξυγόνο πριν από την εκπομπή φθορισμού. Το φαινόμενο της φωτολεύκανσης αξιοποιείται σε μία τεχνική που ονομάζεται *ανάκτηση φθορισμού μετά από φωτολεύκανση* (fluorescence recovery after photobleaching, FRAP), η οποία αποτελεί έναν πολύ χρήσιμο μηχανισμό για τη διερεύνηση της διάχυσης και της κίνησης των βιολογικών μακρομορίων. Η μέθοδος αυτή βασίζεται στη φωτολεύκανση μίας συγκεκριμένης περιοχής του δείγματος μέσω laser, ακολουθούμενη από την παρατήρηση της ανάκτησης φθορισμού στην περιοχή που υπέστη φωτολεύκανση. Μια σχετική τεχνική, γνωστή ως *απώλεια φθορισμού στη φωτολεύκανση* (fluorescence loss in photobleaching, FLIP), χρησιμοποιείται για την παρακολούθηση της μείωσης του φθορισμού κοντά σε μία περιοχή που έχει υποστεί φωτολεύκανση. Παρόμοια με τη FRAP, η

FLIP χρησιμοποιείται για την διερεύνηση την κινητικότητας των μορίων καθώς και της δυναμικής ζωντανών κυττάρων.
Η διαδικασία χαλάρωσης από τη διεγερμένη στάθμη κατά την απόσβεση οδηγεί σε μειωμένη ένταση φθορισμού μέσω μιας ποικιλίας μηχανισμών που περιλαμβάνουν απώλεια ενέργειας χωρίς εκπομπή. Συχνά προκύπτει σαν αποτέλεσμα οξειδωτικών παραγόντων ή από την παρουσία αλάτων, βαρέων μετάλλων ή ενώσεις αλογόνων.
Σε ορισμένες περιπτώσεις, η απόσβεση προκύπτει από τη μεταφορά ενέργειας σε ένα άλλο μόριο – δέκτη, το οποίο βρίσκεται κοντά στο διεγερμένο φθορίζον μόριο – δότη. Αυτό είναι το φαινόμενο *μεταφοράς ενέργειας συντονισμού φθορισμού* (fluorescence resonance energy transfer, FRET)[57]. Στο μηχανισμό αυτό έχει βασιστεί μία τεχνική που περιλαμβάνει τη μελέτη μοριακών αλληλεπιδράσεων και συσχετισμών σε πολύ μικρές αποστάσεις.

4.3.2. Μικροσκοπία φθορισμού ολικής ανάκλασης και ανίχνευση μορίων

Υπό ιδανικές συνθήκες, είναι συχνά δυνατό να ανιχνευθεί η εκπομπή φθορισμού από ένα και μόνο μόριο, εάν το οπτικό φόντο και ο θόρυβος του ανιχνευτή το επιτρέπουν. Με τη χρήση φωτοδιόδου διάσπασης χιονοστιβάδας[xxiv] ή φωτοπολλαπλασιαστών[xxv] για αυτά τα πειράματα, ερευνητές έχουν καταφέρει να παρακολουθήσουν τη συμπεριφορά μεμονωμένων μορίων για πολλά δευτερόλεπτα, ακόμα και λεπτά. Το κυριότερο πρόβλημα είναι η καταστολή του οπτικού θορύβου του φόντου[58]. Επειδή πολλά από τα υλικά που χρησιμοποιούνται για την κατασκευή φακών και φίλτρων μικροσκοπίου παρουσιάζουν αυτοφθορισμό σε κάποιο βαθμό, αρχικά έγινε προσπάθεια να κατασκευαστούν εξαρτήματα πολύ χαμηλού φθορισμού. Παρόλα αυτά, σύντομα έγινε εμφανές ότι οι τεχνικές μικροσκοπίας φθορισμού που χρησιμοποιούν ολική εσωτερική ανάκλαση (total internal reflection, TIR) προσφέρουν τον επιθυμητό συνδυασμό χαμηλού οπτικού θορύβου και υψηλής ροής φωτός διέγερσης.
Συχνά τεχνικές όπως η μεταφορά ενέργειας συντονισμού φθορισμού (FRET) και η ανάκτηση φθορισμού μετά από φωτολεύκανση (FRAP), καθώς και η φασματοσκοπία, συνδυάζονται με την ολική εσωτερική ανάκλαση (TIR) για τη λήψη περαιτέρω πληροφοριών σχετικά με το δείγμα. Έτσι προκύπτει ένα πολύ ισχυρό εργαλείο για τη μελέτη μεμονωμένων φθορίζοντων μορίων και μορίων που έχουν ιχνηθετηθεί με φθορίζουσες ουσίες. Τα πλεονεκτήματα που προκύπτουν από τη μελέτη των ιδιοτήτων μεμονωμένων μορίων έχουν μόλις αρχίσει να αποκαλύπτονται. Πλέον το εύρος της οπτικής μικροσκοπίας εκτείνεται από το μεμονωμένο μόριο έως ολόκληρο τον οργανισμό[59].

[xxiv] Οι φωτοδίοδοι διάσπασης χιονοστιβάδας χρησιμοποιούνται για τη μέτρηση ασθενών οπτικών σημάτων που δεν ανιχνεύονται με τις συμβατικές φωτοδιόδους.
[xxv] Οι φωτοπολλαπλασιαστές είναι ανιχνευτές φωτός για σήματα πολύ χαμηλής έντασης.

ΜΕΡΟΣ Β : ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

Κεφάλαιο 5 : ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

5.1 Διάλυμα κολλαγόνου

Στα πειράματα χρησιμοποιήθηκε λυοφιλοποιημένο[xxvi] κολλαγόνο τύπου Ι από βοδινό αχίλλειο τένοντα (Fluka 27662), διαλυμένο σε οξικό οξύ (CH_3COOH 0.5M) σε τελική συγκέντρωση 8 mg/ml, το οποίο αποθηκεύτηκε σε θερμοκρασία 4^oC για 24 ώρες. Το διάλυμα στη συνέχεια ομογενοποιήθηκε στις 24000 στροφές ανά λεπτό (Ομογενοποιητής IKA T18 Basic) και αποθηκεύτηκε στους 4^oC ως το μητρικό διάλυμα. Μέρος του μητρικού διαλύματος ακτινοβολήθηκε με UV ακτινοβολία. Ακτινοβολημένο και μη κολλαγόνο χρησιμοποιήθηκε για τη δημιουργία λεπτών υμενίων πάνω στα οποία καλλιεργήθηκαν ινοβλάστες.

5.2 Ακτινοβόληση κολλαγόνου

Το κολλαγόνο ακτινοβολήθηκε στον αέρα από έναν λαμπτήρα GL4 με μέγιστο στα 254 nm (UV254, Sankyo Denki Co., Ltd., Japan). Η ακτινοβόληση του κολλαγόνου πραγματοποιήθηκε σε κυβέττες από χαλαζία, ενώ το διάλυμα αναδευόταν συνεχώς με βυθιζόμενο μαγνητικό μικρο-αναδευτή (Model MS-7, TRI-R Instrument, Inc., Rockville Center N.Y.), με τη ράβδο ανάδευσης τοποθετημένη στο εσωτερικό της κυβέττας. Η ακτινοβόληση πραγματοποιήθηκε σε απόσταση 3 εκατοστών από της φωτεινή πηγή για διάφορα χρονικά διαστήματα ακτινοβόλησης. Η ένταση ακτινοβολίας ήταν 1813 $\mu W/cm^2$ (0.11 $J/(cm^2.min)$ και η δόση προσπίπτουσας ακτινοβολίας κατά τη διάρκεια μίας ώρας έκθεσης ήταν 6.6 $J.cm^{-2}$. Η μέτρηση της προσπίπτουσας ακτινοβολίας μετρήθηκε με τη βοήθεια ενός GoldiluxTM ακτινόμετρο – φωτόμετρο (Model 70234 – meter και 70239 – probe, Oriel Instruments). Όλες οι μετρήσεις πραγματοποιήθηκαν στην ίδια θερμοκρασία για να αποφευχθούν αλλοιώσεις στις φυσικοχημικές ιδιότητες του κολλαγόνου.

5.3 Φυγοκεντρική επίστρωση λεπτών υμενίων κολλαγόνου

Τα λεπτά υμένια κολλαγόνου σχηματίστηκαν με τη μέθοδο φυγοκεντρικής επίστρωσης (spin coating) και χρησιμοποιήθηκαν ακτινοβολημένα και μη διαλύματα κολλαγόνου. Μικρή ποσότητα κολλαγόνου (50 μl) τοποθετήθηκε σε δισκάκια μίκας που χρησιμοποιήθηκαν ως υπόστρωμα (V1, 9.5 diam., 71856-01 Electron Microscopy Science). Στη συνέχεια τα δείγματα αυτά τοποθετήθηκαν στη συσκευή του spin coating (WS-400B-6NPP/LIT Laurell Technologies spin coater), επί 40 δευτερόλεπτα στις 6000 στροφές ανά λεπτό .

[xxvi] Η λυοφιλοποίηση είναι μια διαδικασία ξήρανσης υλικών.

5.4 Κυτταρική καλλιέργεια

5.4.1 Υλικά

Στην παρούσα διπλωματική εργασία χρησιμοποιήθηκε πρωτογενής καλλιέργεια δερματικών ινοβλαστών από ενήλικους ανθρώπους (primary culture of skin adult fibroblast) η οποία παραχωρήθηκε από το 'Εργαστήριο Μελέτης Μηχανισμών Κυτταρικού Πολλαπλασιασμού και Γήρανσης', του Ινστιτούτου Βιολογίας του Εθνικού Κέντρου Έρευνας Φυσικών Επιστημών 'Δημόκριτος'.

Στον πίνακα 2 παρουσιάζονται τα υλικά που χρησιμοποιήθηκαν για την καλλιέργεια των κυττάρων, καθώς και η χρήση/λειτουργία τους.

Είδος υλικού	Υλικό	Χρήση/Λειτουργία
Φλάσκα	Φλάσκα των 25cm^2 (Corning)	Ειδικό δοχείο στο οποίο λαμβάνει χώρα ο πολλαπλασιασμός των κυττάρων.
Θρεπτικό μέσο	Dulbecco's Modified Eagle Medium, DMEM.W/GLUTAMAX-I PYR-IG/L-GLU (Invitrogen)	Θρεπτική ουσία για την ανάπτυξη των κυττάρων.
Εμβρυϊκός ορός βοδιού	Fetal Bovine Serum, FBS (Invitrogen)	Ευνοεί την καλλιέργεια των κυττάρων επειδή περιέχει αυξητικούς παράγοντες.
Αντιβιοτικό	Antibiotic-Antimitotic (Gibco)	Βοηθά την υγεία των κυττάρων.
Τρυψίνη	Tryspin – EDTA solution, Sigma	Ξεκολλά τα κύτταρα από τη φλάσκα.
Ρυθμιστικό Διάλυμα	Dulbecco's Phosphate Buffered Saline DPBS (Sigma)	Ρυθμίζει το pH.
Διμεθυλουσουλφοξείδιο	Dimethyl sulfoxide DMSO (Sigma D2650)	Μέσο για την αποθήκευση των κυττάρων σε υγρό άζωτο.
Φθορίζουσα Ουσία	Ροδαμίνη Β (Rhodamine B)	Ουσία που χρώζει το πλέγμα των μιτοχονδρίων στα κύτταρα και επιτρέπει την απεικόνισή τους σε μικροσκόπιο φθορισμού.
Φορμαλίνη	Formalin HT5011-1CS, Sigma	Επιτρέπει την σταθεροποίηση (fixing) των κυττάρων.

Πίνακας 3

Τα υλικά που χρησιμοποιήθηκαν και ο σκοπός που εξυπηρετούν.

5.4.2 Διαλύματα

Τα διαλύματα που χρησιμοποιήθηκαν είναι τα εξής:

Διάλυμα αναστολής τρυψίνης: Για 10 ml διαλύματος αναμιγνύονται 1 ml FBS, 9 ml PBS και 80 μl αντιβιοτικό. Το διάλυμα αυτό χρησιμοποιείται στο σπάσιμο της φλάσκας για αναστολή της δράσης της τρυψίνης.

Διάλυμα εξουδετέρωσης του DMSO: Ίδια σύσταση με διάλυμα αναστολής τρυψίνης.

Διάλυμα Πλήρους Θρεπτικού Μέσου (ΠΘΜ): Για 5 ml διαλύματος αναμιγνύονται 0.5 ml FBS, 4.5 ml DMEM και 40 μl αντιβιοτικό.

Διάλυμα για ξέπλυμα: Σε 10 ml PBS προστίθενται 80 μl αντιβιοτικό.

Διάλυμα χρώσης: Σε 5 ml ΠΘΜ αναδεύονται 3 μl ροδαμίνης.

5.4.3 Διαδικασίες

5.4.3.1 Μεθοδολογία ανακαλλιέργειας δερματικών ινοβλαστών

Η συνηθέστερη διαδικασία που ακολουθήθηκε κατά τη διάρκεια των πειραμάτων ήταν η ανακαλλιέργεια των ινοβλαστών. Πρόκειται για τις ενέργειες που πραγματοποιήθηκαν για να πολλαπλασιαστούν τα κύτταρα και να χρησιμοποιηθούν για επόμενα πειράματα ή να καταψυχθούν σε υγρό άζωτο για μεταγενέστερη χρήση. Στη συνέχεια περιγράφεται η διαδικασία μίας ανακαλλιέργειας με ρυθμό 1:2 (δηλαδή από μία φλάσκα των 5 ml σε δύο του ιδίου μεγέθους).

Αρχικά πρέπει να ετοιμασθούν 5 ml διαλύματος αναστολής τρυψίνης, 10 ml ΠΘΜ και 10 ml διάλυμα για ξέπλυμα. Το υγρό μέσο που βρίσκεται στη φλάσκα απορρίπτεται, καθώς οι ινοβλάστες έχουν αναπτυχθεί πάνω στην επιφάνεια της φλάσκας και είναι προσκολλημένοι σε αυτήν. Η φλάσκα ξεπλένεται με 1 ml διαλύματος για ξέπλυμα. Έπειτα τοποθετείται σ'αυτήν 1 ml τρυψίνης, το οποίο απορρίπτεται αμέσως. Η ενέργεια αυτή έχει ως σκοπό να βοηθήσει τους ινοβλάστες να ξεκολλήσουν γρηγορότερα. Κατόπιν τοποθετείται άλλο 1 ml τρυψίνης στη φλάσκα, και με ελαφριές κρούσεις της φλάσκας σε ελαστική επιφάνεια οι ινοβλάστες αποκολλώνται από τη φλάσκα. Με οπτικό μικροσκόπιο παρατηρείται το ποσοστό των κυττάρων που έχουν αποκολληθεί και όταν αυτό το ποσοστό γίνει περίπου ίσο με 90%, προστίθενται στη φλάσκα 3 ml διαλύματος αναστολής τρυψίνης. Το διάλυμα που παράγεται μοιράζεται σε 4 φιαλίδια φυγοκέντρισης. Στη συνέχεια τοποθετούνται ακόμη 2 ml διαλύματος αναστολής τρυψίνης στη φλάσκα, τα οποία επίσης μοιράζονται στα ίδια φιαλίδια φυγοκέντρισης. Ελέγχεται ότι ανά δύο τα φιαλίδια περιέχουν ίση ποσότητα διαλύματος με κύτταρα, και τοποθετούνται αντιδιαμετρικά στην φυγόκεντρο για 7 min στις 60 στροφές ανά λεπτό. Αφού φυγοκεντριστεί το διάλυμα, τα κύτταρα έχουν κατακαθίσει στα φιαλίδια ως ίζημα. Το υγρό αιώρημα απορρίπτεται με προσοχή ώστε τα κύτταρα να παραμείνουν στα φιαλίδια, και στη συνέχεια 1 ml ΠΘΜ τοποθετείται σε κάθε φιαλίδιο. Με την τεχνική του pipetting ανακατεύονται τα κύτταρα με το μέσο και διαχωρίζονται τα συσσωματώματα που έχουν σχηματιστεί από τη φυγοκέντριση. Τέλος, το διάλυμα με τα κύτταρα μοιράζεται εξίσου στις δύο φλάσκες, όπως και το απομένον ΠΘΜ. Μετά από αυτήν τη διαδικασία οι φλάσκες τοποθετούνται στον κλίβανο επώασης για μια εβδομάδα, σε περιβάλλον 37^{o} C και 5% CO_2.

5.4.3.2 Μεθοδολογία καλλιέργειας ινοβλαστών σε υπόστρωμα κολλαγόνου

Τα διαφορετικά υποστρώματα κολλαγόνου αναπτύχθηκαν σύμφωνα με τη μέθοδο φυγοκεντρικής επίστρωσης που περιγράφηκε προηγουμένως στην ενότητα 5.3. Μετά το σχηματισμό των υμενίων, τα υμένια τοποθετούνται σε τρυβλία και γίνεται δύο φορές ξέπλυμα με PBS και αντιβιοτικό. Ακολούθως προστίθεται 1.5 ml Πλήρες Θρεπτικό Μέσο (ΠΘΜ) και αφήνεται σε ηρεμία για 30 min. Στη συνέχεια, ακολουθείται το πρωτόκολλο ανακαλλιέργειας των κυττάρων με τη διαφορά ότι μετά τη φυγοκέντριση τα κύτταρα αντί να τοποθετηθούν σε φλάσκα, μοιράζονται (σε διαφορετικές συγκεντρώσεις ανάλογα με τις ανάγκες της κάθε πειραματικής διαδικασίας) στα τρυβλία με τα λεπτά υμένια κολλαγόνου. Τέλος, προστίθεται στο κάθε τρυβλίο 1 ml ΠΘΜ και τα τρυβλία τοποθετούνται στον κλίβανο επώασης και αφήνονται σε ηρεμία για 24h. Μετά τις 24h τα κύτταρα μπορούν να απεικονιστούν με οπτική μικροσκοπία και μικροσκοπία φθορισμού ανάλογα με τις ανάγκες της κάθε πειραματικής διαδικασίας.

5.4.3.3 Απόψυξη κυτταρικής καλλιέργειας αποθηκευμένης σε υγρό άζωτο

Ένα φιαλίδιο 3 ml κυτταρικής καλλιέργειας ινοβλαστών είχε αποθηκευτεί στους -270^{o}C σε δεξαμενή υγρού αζώτου μετά το 3^{ο} σπάσιμο της καλλιέργειας. Κατά την απόψυξη αρχικά τοποθετήσαμε το φιαλίδιο με τα κύτταρα σε νερό θερμοκρασίας 37^{o}C. Στη συνέχεια το περιεχόμενο του φιαλιδίου μεταφέρθηκε στο διάλυμα για εξουδετέρωση του DMSO. Στη συνέχεια το διάλυμα ομογενοποιήθηκε με pipetting και διαιρέθηκε σε 4 φιαλίδια φυγοκέντρισης. Τα φιαλίδια αυτά τοποθετήθηκαν στο φυγοκεντριστή που διαθέτει το εργαστήριο, και τέθηκαν για χρόνο 7 λεπτών και ταχύτητα ίση με 60 στροφές ανά λεπτό. Σκοπός της φυγοκέντρισης αφαιρέθηκαν από το φυγοκεντριστή και το αιώρημα απορρίφθηκε. Κατόπιν 4 ml ΠΘΜ μοιράστηκαν στα 4 φιαλίδια, και μετά από pipetting σε κάθε φιαλίδιο το διάλυμα με τα κύτταρα συγκεντρώθηκε σε ένα δοκιμαστικό σωλήνα. Στη συνέχεια το διάλυμα αυτό τοποθετήθηκε σε μία φλάσκα και ακολούθως στον κλίβανο για μία εβδομάδα.

5.4.3.4 Προετοιμασία δείγματος για παρατήρηση στο μικροσκόπιο φθορισμού

Δισκάκια μίκας και μίκας με κολλαγόνο έχουν τοποθετηθεί σε τρυβλία με διάλυμα ΠΘΜ και ινοβλάστες, με 20000 ινοβλάστες ανά τρυβλίο κατά προσέγγιση. Τα κύτταρα έχουν επωαστεί στον κλίβανο για 3 ημέρες. Για να παρατηρηθεί το δισκάκι μίκας στο μικροσκόπιο φθορισμού, ακολουθείται η εξής διαδικασία:

Αρχικά αφαιρείται το παλιό μέσο, αφού οι ινοβλάστες έχουν προσκολληθεί στο τρυβλίο και στο δισκάκι. Το τρυβλίο με το δείγμα ξεπλένονται 2 φορές με 1 ml PBS κάθε φορά. Στη συνέχεια 2 ml διαλύματος ροδαμίνης Β σε DMSO τοποθετούνται στο τρυβλίο, το οποίο αφήνεται σε σκοτεινό μέρος για 10 min. Έπειτα το δισκάκι ξεπλένεται με 1 ml PBS και το τοποθετείται σε γυαλί παρατήρησης με καλυπτρίδα από πάνω του. Το δείγμα είναι έτοιμο για παρατήρηση στο μικροσκόπιο φθορισμού.

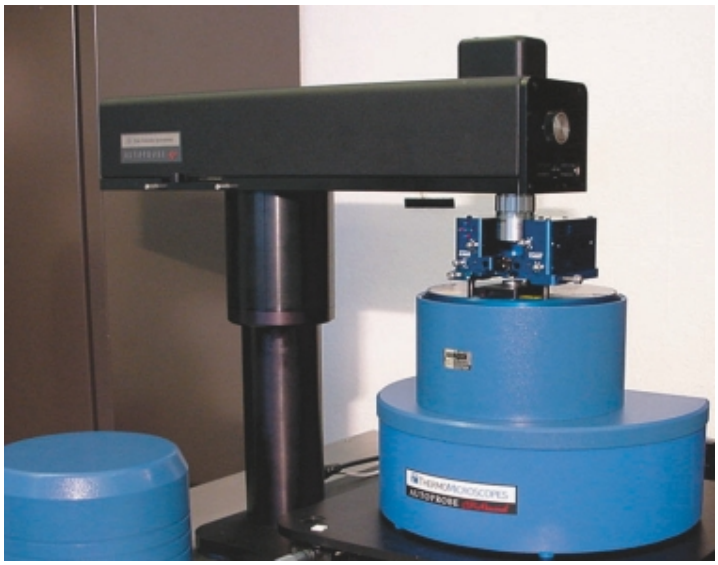
5.4.3.5 Προετοιμασία δείγματος για παρατήρηση στο μικροσκόπιο AFM

Αφού παρατηρηθεί στο μικροσκόπιο φθορισμού, το ίδιο δείγμα ξεπλένεται με 1 ml PBS και αφήνεται σε τρυβλίο με 2 ml φορμαλίνης για 10 min. Έπειτα ξεπλένεται με 1 ml PBS, 1 ml εξαιρετικά καθαρού νερού (ultra pure water) και αφήνεται να στεγνώσει στον αέρα. Μετά από 24 ώρες το δείγμα είναι έτοιμο για παρατήρηση στο μικροσκόπιο AFM.

5.5 Μικροσκοπία ατομικής δύναμης

5.5.1 Δομικές μονάδες μικροσκοπίου AFM

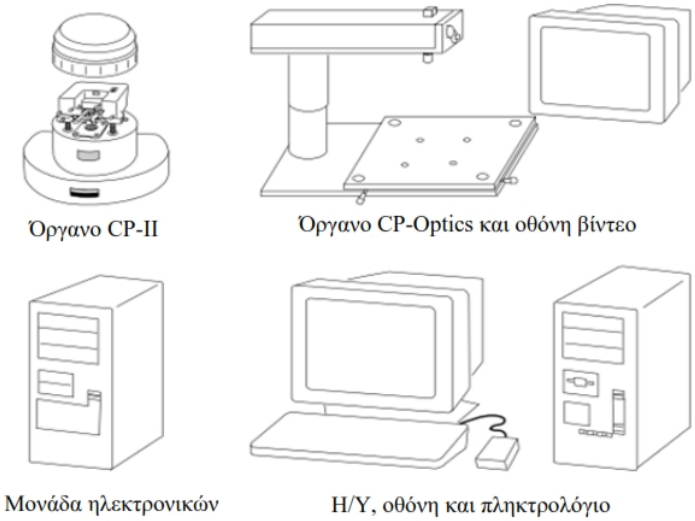
Σε αυτό το υποκεφάλαιο θα παρουσιαστούν τα κύρια συστατικά μέρη του μικροσκοπίου που χρησιμοποιήθηκε. Αυτό είναι το CPII Atomic Force Microscope της εταιρείας Veeco (***Εικόνα 24***).



Εικόνα 24

Το μικροσκόπιο AFM της εταιρίας Veeco.

Οι δομικές του μονάδες απεικονίζονται στο ακόλουθο διάγραμμα (***Εικόνα 25***):



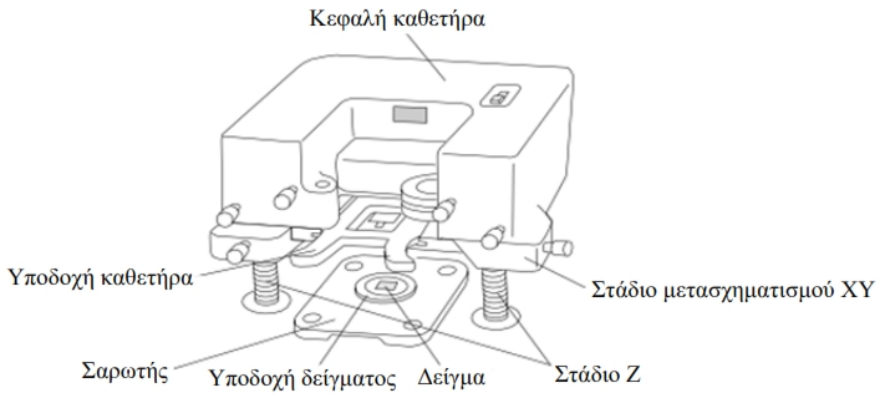
Εικόνα 25

Οι συστατικές μονάδες του Veeco AFM.

Οι μονάδες που συνιστούν το AFM είναι το όργανο CP-II, η οπτική διάταξη (CP-Optics) που περιλαμβάνει και απεικόνιση με βίντεο μέσω μιας κάμερας, και η μονάδα ηλεκτρονικών. Σε συνδυασμό με τις μονάδες αυτές χρησιμοποιούνται επιπλέον ένας ηλεκτρονικός υπολογιστής (κεντρική μονάδα) και δύο οθόνες. Η μία οθόνη χρησιμοποιείται σε συνδυασμό με το όργανο CP-Optics για τη ρύθμιση και την απεικόνιση των εικόνων AFM, ενώ η άλλη για απεικόνιση σε μεγαλύτερη κλίμακα με την κάμερα, καθώς και για τις υπόλοιπες απαραίτητες λειτουργίες όπως η αποθήκευση των εικόνων. Στη συνέχεια επεξηγούνται το όργανο CP-II και η οπτική διάταξη, καθώς απαιτείται ο χειρισμός τους κατά τη λειτουργία του AFM. Η μονάδα ηλεκτρονικών δεν προϋποθέτει αλληλεπίδραση με το χρήστη.

5.5.1.1 Το όργανο CP-II

Το όργανο CP-II απεικονίζεται στην ***Εικόνα 26***. Αποτελείται από την κεφαλή του καθετήρα[xxvii], την υποδοχή για τον καθετήρα, τον σαρωτή, την υποδοχή για το δείγμα, το ίδιο το δείγμα, το σύστημα μετακίνησης κατά τον z άξονα (στάδιο Z) και το σύστημα μετακίνησης του δείγματος στους άξονες x και y (στάδιο μετασχηματισμού XY).

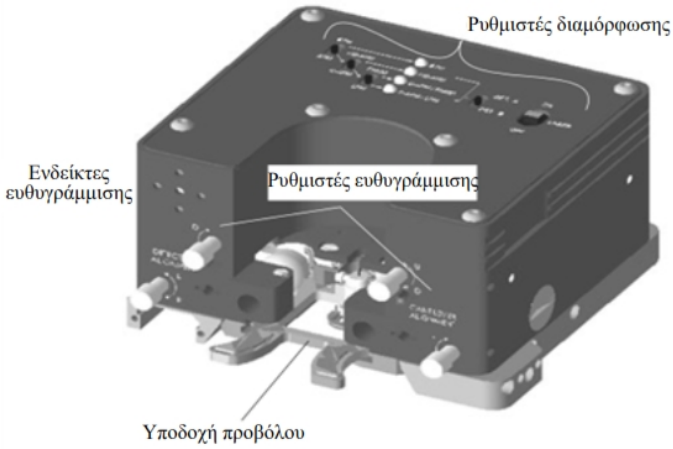


Εικόνα 26

Το όργανο CP-II.

Η κεφαλή του καθετήρα (***Εικόνα 27***) αποτελείται από τους ρυθμιστές διαμόρφωσης, τους ρυθμιστές ευθυγράμμισης και τους ενδείκτες ευθυγράμμισης. Οι ρυθμιστές διαμόρφωσης επιτρέπουν τη λειτουργία της κεφαλής του καθετήρα σε διαφορετικούς τρόπους (modes). Οι ρυθμιστές και οι ενδείκτες ευθυγράμμισης χρησιμοποιούνται για να ευθυγραμμίσουν τον αισθητήρα εκτροπής πριν τη λειτουργία της μονάδας CP-II σε κάποιον από τους AFM modes. Η υποδοχή για τον καθετήρα περιέχει μια αφαιρούμενη υποδοχή για τσιπ, στην οποία τοποθετείται ένα τσιπ με πρόβολο για την πραγματοποίηση της σάρωσης.

[xxvii] Ως ‘καθετήρας’ έχει μεταφραστεί η αγγλική λέξη ‘probe’.



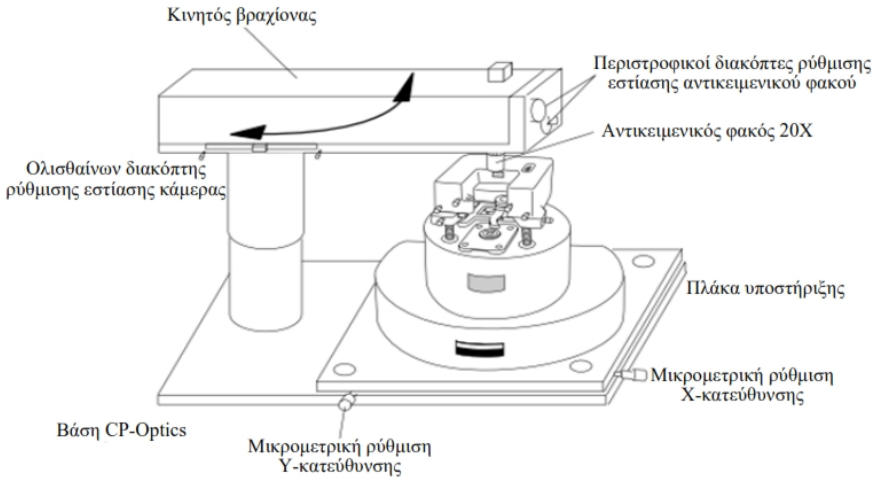
Εικόνα 27

Κεφαλή καθετήρα (probe head).

Υπάρχουν διαφορετικοί τύποι υποδοχής καθετήρα για την κεφαλή αυτή, μία για κάθε λειτουργία του AFM (για παράδειγμα υποδοχή για Contact AFM και υποδοχή για Non-Contact AFM). Ο σαρωτής είναι ένας σωλήνας πιεζοηλεκτρικού κεραμικού. Κάτω από την κεφαλή του καθετήρα και πάνω από τον σαρωτή τοποθετείται το δείγμα, πάνω στην υποδοχή δείγματος. Στη συνέχεια το δείγμα κινείται στους άξονες X και Y (σαρώνεται), και λαμβάνεται μία εικόνα της επιφάνειάς του. Η μετακίνηση στους άξονες X, Y και Z πραγματοποιείται από τα αντίστοιχα στάδια. Η ρύθμιση των συντεταγμένων X και Y που ορίζουν την επιθυμητή περιοχή λήψης εικόνας πραγματοποιείται μέσα από το λογισμικό ελέγχου του μικροσκοπίου, που είναι το πρόγραμμα ProScan Data Acquisition.

5.5.1.2 Το όργανο CP-Optics

Το όργανο CP-II εφαρμόζει στο CP-Optics στην πλάκα υποστήριξης, όπως φαίνεται στην ***Εικόνα 28***. Το CP-Optics επιτρέπει τη μικρομετρική ρύθμιση των X και Y κατευθύνσεων του CP-II έως και 5 χιλιοστά, μέσω των αντίστοιχων περιστροφικών διακοπτών. Πάνω από την κεφαλή του καθετήρα, στο τέλος του κινητού βραχίονα, βρίσκεται ένας αντικειμενικός φακός 20X, ο οποίος τίθεται μέσω των περιστροφικών διακοπτών στην άκρη του βραχίονα. Τέλος, ο ολισθαίνων διακόπτης στην άλλη πλευρά του βραχίονα επιτρέπει τη ρύθμιση της εστίασης της κάμερας, η οποία απεικονίζει το δείγμα σε μεγαλύτερη κλίμακα. Η κάμερα συνήθως ρυθμίζεται να δείχνει την κίνηση της ακίδας, ενώ χρησιμοποιείται και για τον εντοπισμό περιοχών του δείγματος προς απεικόνιση[60].



Εικόνα 28

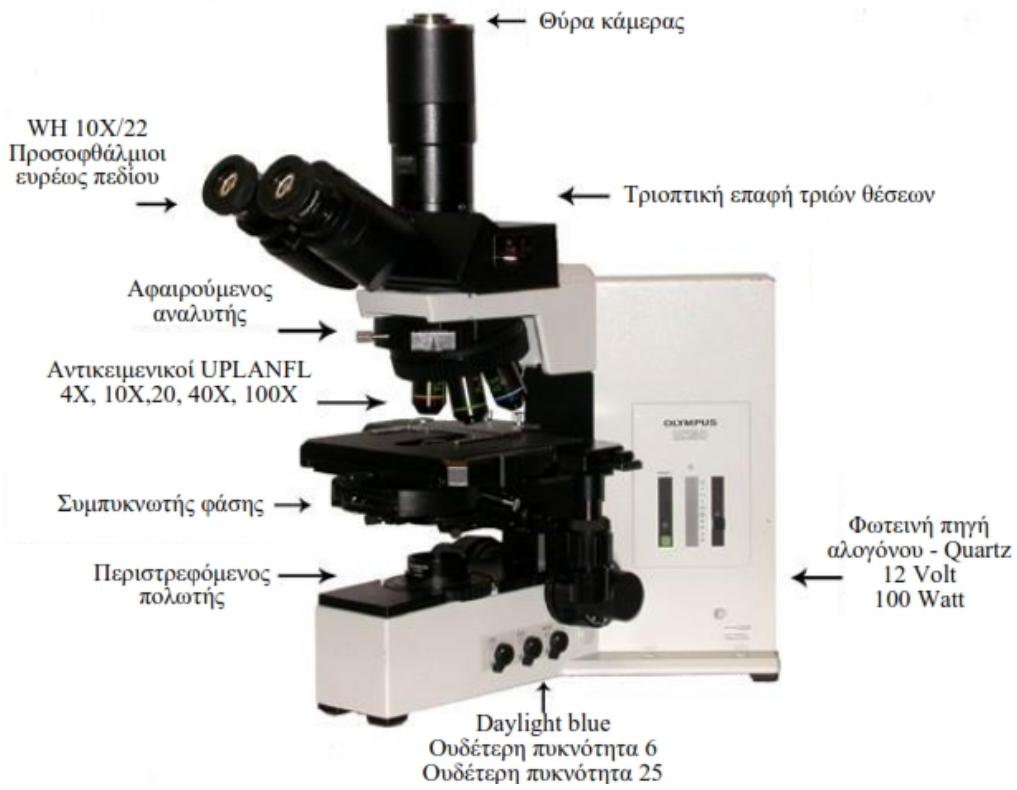
Το όργανο CP-Optics.

5.5.2 Λογισμικό ελέγχου του AFM

Μέρος των χειρισμών του AFM πραγματοποιείται με τη βοήθεια του λογισμικού ProScan Data Acquisition. Με το πρόγραμμα αυτό το μικροσκόπιο ρυθμίζεται να απεικονίζει τις επιθυμητές περιοχές του δείγματος. Πριν τη λήψη της εικόνας ρυθμίζεται η ακίδα μέσω του λογισμικού, καθώς και αντισταθμίζεται χειροκίνητα η κλίση του δείγματος. Το μέγιστο μέγεθος εικόνας που μπορεί να ληφθεί σε ικανοποιητική ποιότητα είναι 100μm x 100μm. Εφόσον τα κύτταρα έχουν μέγεθος περίπου 70 μm x 30 μm κατά μέσο όρο, οι ινοβλάστες απεικονίζονται τμηματικά στα δείγματα που τις περιέχουν, ενώ στην περίπτωση των υμενίων κολλαγόνου η απεικόνιση των ινών κολλαγόνου μπορούσε να πραγματοποιηθεί για διάφορες διαστάσεις (π.χ. 5x5 μm, 10x10 μm κ.ά.).

5.6 Μικροσκοπία φθορισμού

Για τις ανάγκες της διπλωματικής εργασίας χρησιμοποιήθηκε το μικροσκόπιο φθορισμού Olympus BX50 (***Εικόνα 29***) με φωτισμό πρόσπτωσης (epifluorescent microscope). Η συλλογή των εικόνων έγινε από μια έγχρωμη CCD κάμερα (XC30, Olympus) που είχε κατάλληλα προσαρμοστεί στο μικροσκόπιο. Η συλλογή των εικόνων φθορισμού πραγματοποιήθηκε με τη χρήση αντικειμενικού 20x UPlan, με αριθμητικό άνοιγμα NA = 0.50.



Εικόνα 29

Το μικροσκόπιο Olympus BX50[61].

Για τη διέγερση των δειγμάτων χρησιμοποιήθηκε λυχνία υδραργύρου 100 W και κατάλληλα σετ οπτικών φίλτρων-κύβων. Ο κύβος φθορισμού που χρησιμοποιήθηκε περιγράφεται στον πίνακα 3.

Κωδικός Κύβου	**Φίλτρο διέγερσης (ζωνοδιαβατό) (nm)**	**Διχρωϊκό κάτοπτρο (nm)**	**Φίλτρο εκπομπής (υψιπερατό) (nm)**
U-MWG	510-550	570	590

Πίνακας 4

Στοιχεία κύβου του μικροσκοπίου φθορισμού Olympus BX-50.

Οι συλλεγόμενες από τη CCD εικόνες φθορισμού επεξεργάστηκαν με τη χρήση του λογισμικού επεξεργασίας εικόνας ImageJ (NIH, Bethesda, Maryland, USA).

Κεφάλαιο 6 : ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

6.1 Εισαγωγή

Τα υμένια κολλαγόνου που παρασκευάστηκαν πάνω σε δισκάκια μίκας για τις ανάγκες τις εργασίας απεικονίστηκαν με μικροσκοπία AFM σε 30x30 μm και σε 10x10 μm για κάθε χρόνο ακτινοβόλησης (0, 10, 30, 60 και 120 min). Μετρήθηκαν οι τιμές τις RMS τραχύτητας των δειγμάτων καθώς και οι τιμές της μέσης τιμής του ύψους των δειγμάτων για κάθε χρόνο ακτινοβόλησης. Παρατηρήθηκε ότι οι τιμές αυτές μειώνονται μέχρι τα 30 min ακτινοβόλησης, ενώ στη συνέχεια αυξάνονται, ενώ στα 120 min ξεπερνούν τις τιμές που ελήφθησαν για 0 min ακτινοβόλησης.

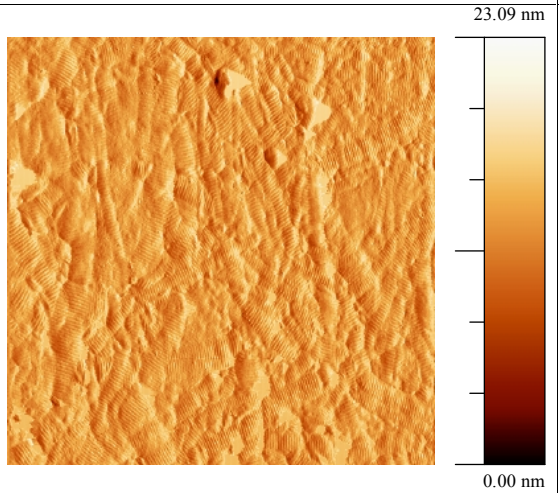
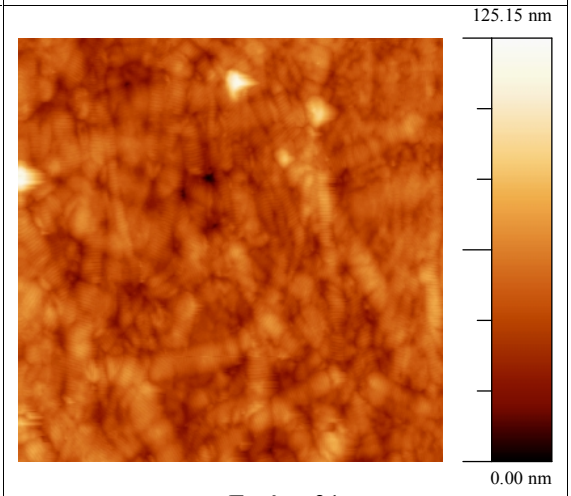
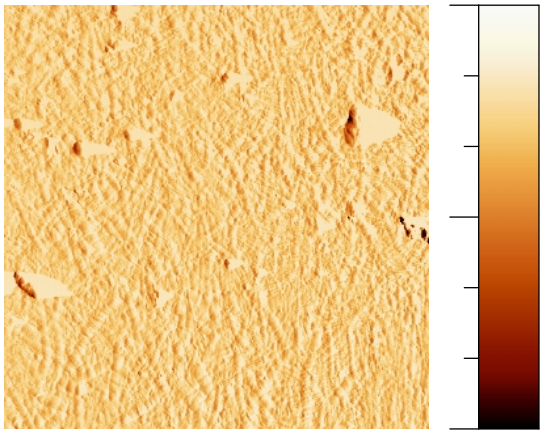
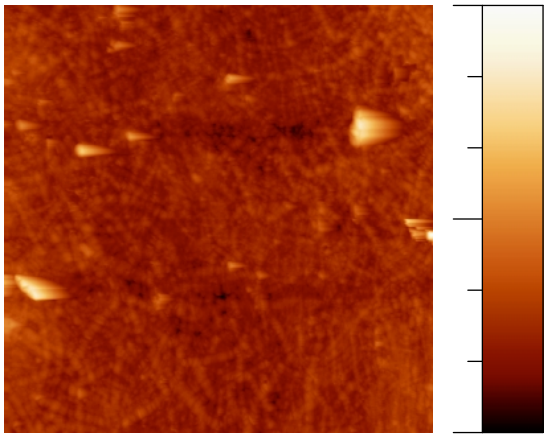
Τα υμένια πάνω στα οποία καλλιεργήθηκαν ινοβλάστες απεικονίστηκαν με μικροσκοπία φθορισμού και με μικροσκοπία AFM. Αναφορικά με τη μικροσκοπία φθορισμού, παρατηρήθηκε ότι οι ινοβλάστες γίνονται όλο και πιο σφαιρικοί μέχρι τα 60 min ακτινοβόλησης, ενώ για 120 min παρουσιάζονται επιμήκεις. Η συμπεριφορά αυτή μπορεί να αιτιολογηθεί από την αποδιαμόρφωση του κολλαγόνου στα 120 min που παρατηρήθηκε από τη μελέτη των υμενίων κολλαγόνου με μικροσκοπία AFM. Αναφορικά με τη μικροσκοπία AFM, οι ινοβλάστες δεν απεικονίστηκαν ολόκληροι, επειδή το βέλτιστο εύρος απεικόνισης με AFM κυμαίνεται από τα 10 μέχρι τα 50 τετραγωνικά μικρόμετρα, ενώ οι ινοβλάστες έχουν μέγεθος περίπου 70 μm x 30 μm. Είναι δυνατή η απεικόνιση από 5x5 μm έως και 100x100 μm, αλλά η ποιότητα της λαμβανόμενης εικόνας δεν είναι η βέλτιστη. Επομένως επιλέχθηκε η απεικόνιση τμημάτων ινοβλαστών.

Για κάθε περιοχή του δείγματος που επιλέχθηκε προς απεικόνιση με AFM, ελήφθησαν εικόνες tapping mode, καθώς και τα σήματα error και phase. Υπενθυμίζεται ότι το σήμα error προκύπτει από τη διαφορά μεταξύ του σημείου αναφοράς του βρόχου ανάδρασης στον Z-άξονα και της εκτροπής του προβόλου, ενώ το σήμα phase απεικονίζει τη φάση του ταλαντούμενου προβόλου. Επιπλέον, στη μικροσκοπία φθορισμού οι εικόνες που επιλέχθηκαν παρουσιάζονται πριν και μετά το φθορισμό, ώστε να είναι δυνατή η παρατήρηση του κολλαγόνου και των ινοβλαστών για κάθε δείγμα, αντίστοιχα.

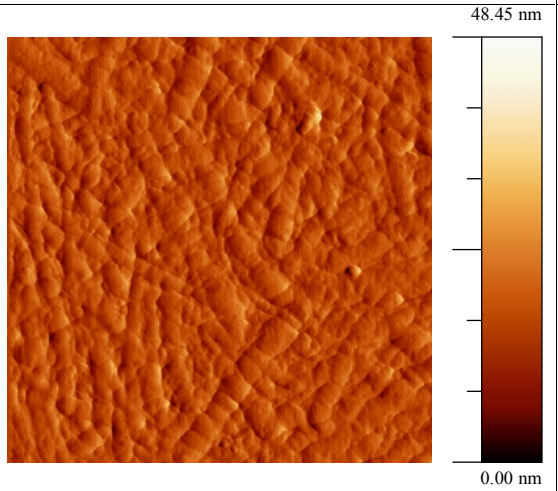
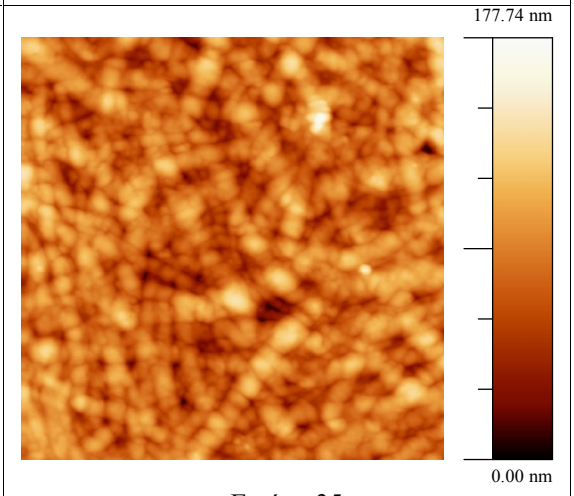
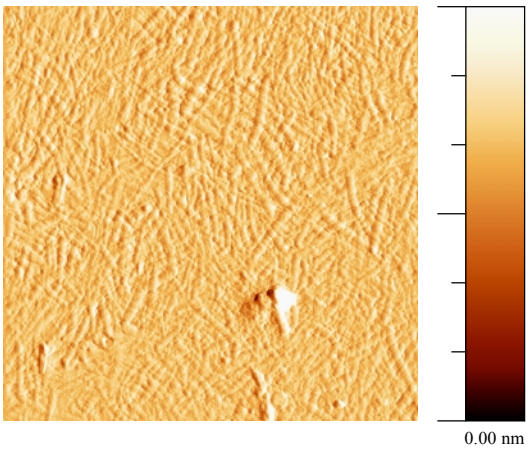
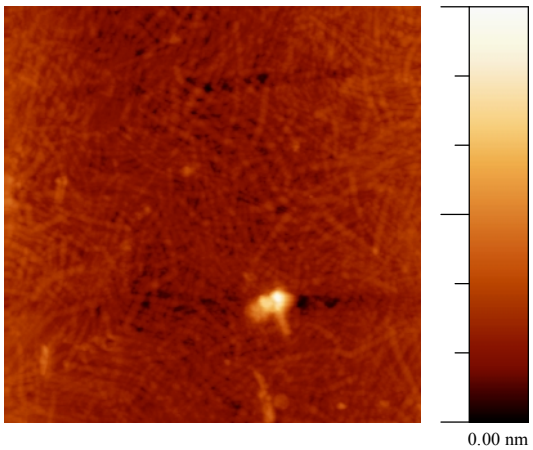
6.2 Απεικόνιση λεπτών υμενίων κολλαγόνου με AFM

Αρχικά προκειμένου να απεικονιστούν και να χαρακτηριστούν τα λεπτά υμένια κολλαγόνου, τα οποία αναπτύχθηκαν για τις ανάγκες της εργασίας αυτής, έγινε χρήση του AFM. Για κάθε δείγμα ελήφθη ένας μεγάλος αριθμός από εικόνες σε tapping mode του AFM προκειμένου να χαρακτηριστούν πλήρως τα δείγματα. Στη συνέχεια παρουσιάζονται οι πιο χαρακτηριστικές και αντιπροσωπευτικές εικόνες. Δίπλα σε κάθε εικόνα παρατίθεται η χρωματική κλίμακα[62], η οποία αντιστοιχεί στον άξονα Z και απεικονίζει το ύψος κάθε σημείου της εικόνας, ανάλογα με τη φωτεινότητα του χρώματος.

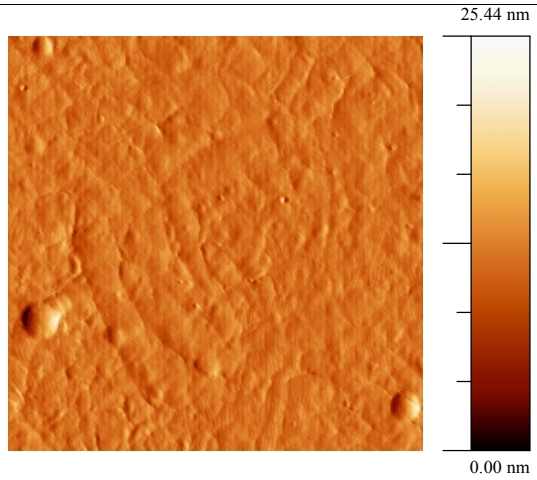
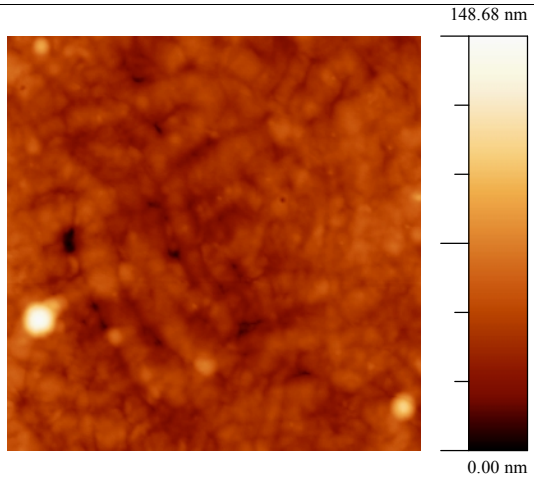
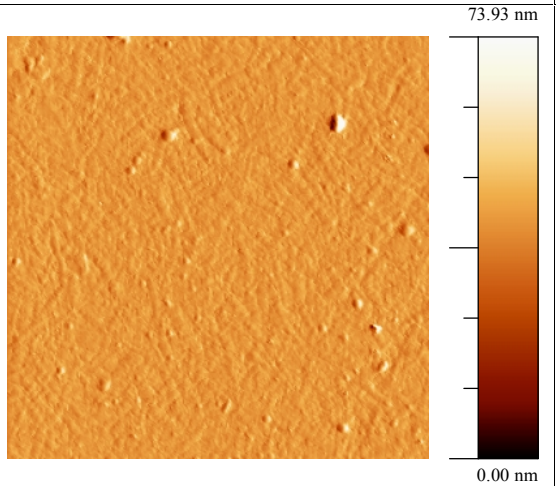
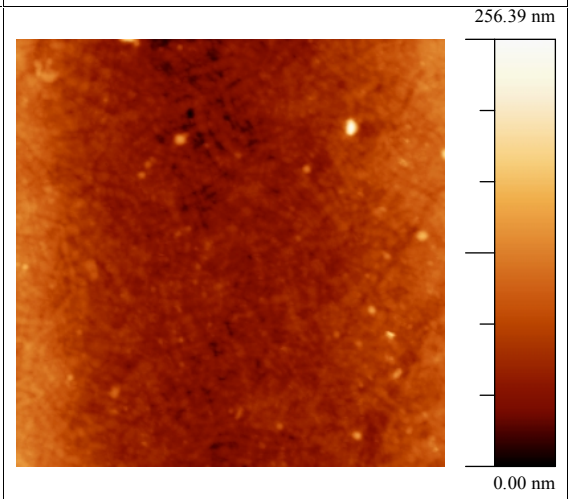
Όπως φαίνεται στις εικόνες (-) τα λεπτά υμένια κολλαγόνου τα οποία δεν είχαν ακτινοβοληθεί καθόλου αποτελούνταν από τυχαία προσανατολισμένες ίνες κολλαγόνου. Μάλιστα οι ίνες κολλαγόνου παρουσίαζαν τη χαρακτηριστική D – περιοδικότητα των 67 nm. Το γεγονός αυτό είναι ένδειξη ότι τα σχηματιζόμενα λεπτά υμένια αποτελούνταν από ίνες οι οποίες παρουσιάζουν φυσιολογικά χαρακτηριστικά όπως αυτά που απαντώνται στη φύση, στις in vivo σχηματιζόμενες ίνες.

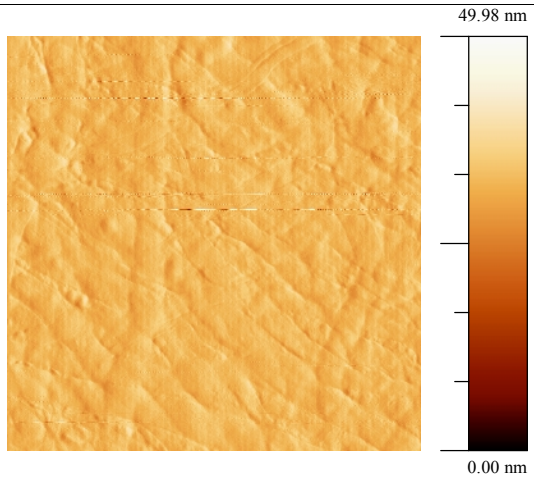
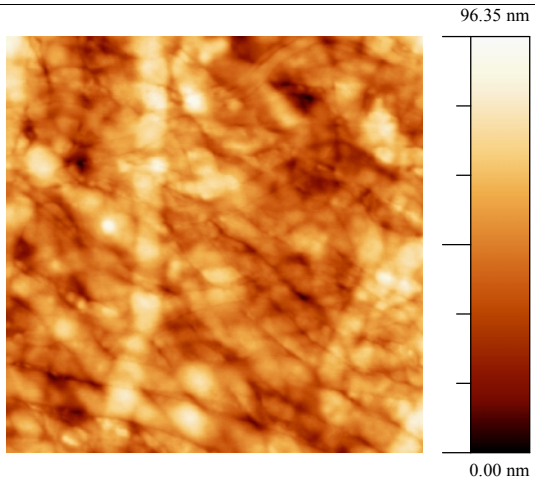
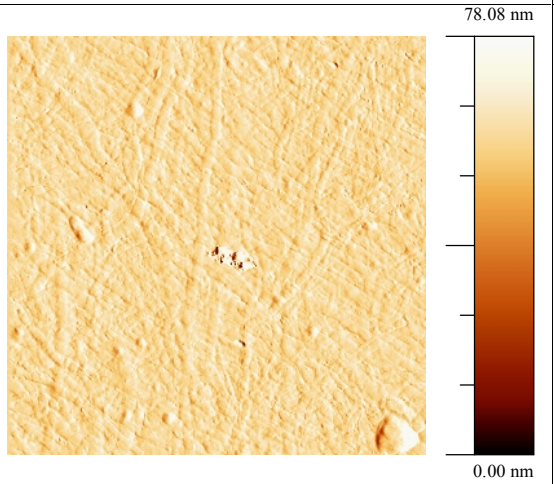
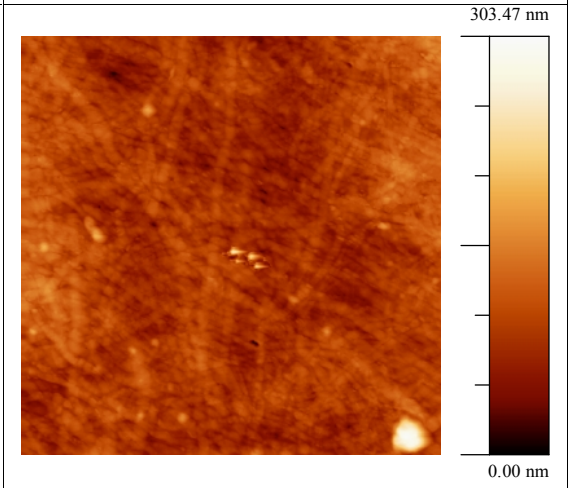
	0 min ακτινοβόληση	
μm²	**Μέθοδος απεικόνισης**	
	Error	**Phase**
10	 Εικόνα 30 *Λεπτό υμένιο μη ακτινοβολημένου κολλαγόνου απεικονισμένο με AFM σε ανάλυση 10x10 μm και error mode.*	 Εικόνα 31 *Λεπτό υμένιο μη ακτινοβολημένου κολλαγόνου απεικονισμένο με AFM σε ανάλυση 10x10 μm και tapping mode.*
30	 Εικόνα 32 *Λεπτό υμένιο μη ακτινοβολημένου κολλαγόνου απεικονισμένο με AFM σε ανάλυση 30x30 μm και error mode.*	 Εικόνα 33 *Λεπτό υμένιο μη ακτινοβολημένου κολλαγόνου απεικονισμένο με AFM σε ανάλυση 30x30 μm και tapping mode.*

Στη συνέχεια απεικονίστηκαν τα λεπτά υμένια κολλαγόνου τα οποία σχηματίστηκαν από διάλυμα κολλαγόνου το οποίο είχε ακτινοβοληθεί για διαφορετικούς χρόνους (10, 30, 60 και 120 min). Όπως φαίνεται στις εικόνες (-) για 10 min χρόνο ακτινοβόλησης δεν παρατηρήθηκαν έντονες αλλοιώσεις στα λεπτά υμένια.

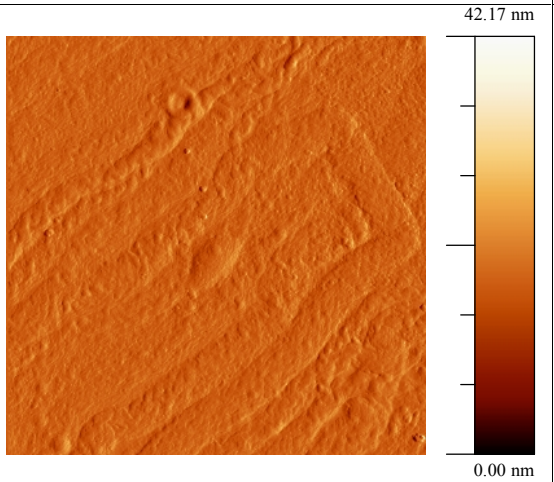
	10 min ακτινοβόληση	
μm²	**Μέθοδος απεικόνισης**	
	Error	**Phase**
10	 Εικόνα 34 *Λεπτό υμένιο κολλαγόνου, ακτινοβολημένο για 10 min, απεικονισμένο με AFM σε ανάλυση 10x10 μm και error mode.*	 Εικόνα 35 *Λεπτό υμένιο κολλαγόνου, ακτινοβολημένο για 10 min, απεικονισμένο με AFM σε ανάλυση 10x10 μm και tapping mode.*
30	 Εικόνα 36 *Λεπτό υμένιο κολλαγόνου, ακτινοβολημένο για 10 min, απεικονισμένο με AFM σε ανάλυση 30x30 μm και error mode.*	 Εικόνα 37 *Λεπτό υμένιο κολλαγόνου, ακτινοβολημένο για 10 min, απεικονισμένο με AFM σε ανάλυση 30x30 μm και tapping mode.*

Όπως φαίνεται στις εικόνες (-) όσο αυξανόταν ο χρόνος ακτινοβόλησης (για 30 και 60 min) οι ίνες άρχισαν να αποδιαμορφώνονται και να χάνουν την ινώδη μορφή τους.

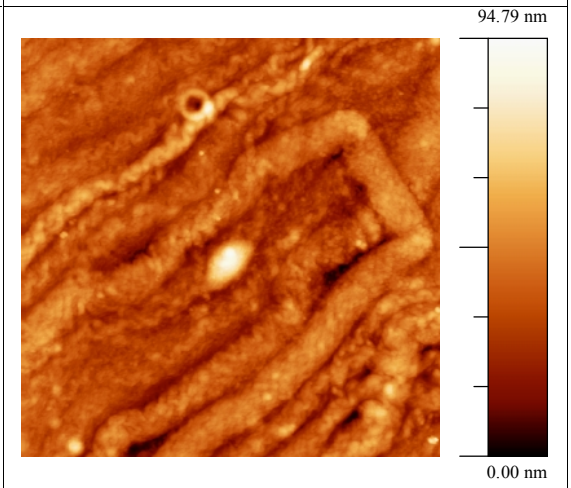
	30 min ακτινοβόληση	
μm^2	**Μέθοδος απεικόνισης**	
	Error	**Phase**
10	 Εικόνα 38 *Λεπτό υμένιο κολλαγόνου, ακτινοβολημένο για 30 min, απεικονισμένο με AFM σε ανάλυση 10x10 μm και error mode.*	 Εικόνα 39 *Λεπτό υμένιο κολλαγόνου, ακτινοβολημένο για 30 min, απεικονισμένο με AFM σε ανάλυση 10x10 μm και tapping mode.*
30	 Εικόνα 40 *Λεπτό υμένιο κολλαγόνου, ακτινοβολημένο για 30 min, απεικονισμένο με AFM σε ανάλυση 30x30 μm και error mode.*	 Εικόνα 41 *Λεπτό υμένιο κολλαγόνου, ακτινοβολημένο για 30 min, απεικονισμένο με AFM σε ανάλυση 30x30 μm και tapping mode.*

	60 min ακτινοβόληση	
μm²	**Μέθοδος απεικόνισης**	
	Error	**Phase**
10	 Εικόνα 42 *Λεπτό υμένιο κολλαγόνου, ακτινοβολημένο για 60 min, απεικονισμένο με AFM σε ανάλυση 10x10 μm και error mode.*	 Εικόνα 43 *Λεπτό υμένιο κολλαγόνου, ακτινοβολημένο για 60 min, απεικονισμένο με AFM σε ανάλυση 10x10 μm και tapping mode.*
30	 Εικόνα 44 *Λεπτό υμένιο κολλαγόνου, ακτινοβολημένο για 60 min, απεικονισμένο με AFM σε ανάλυση 30x30 μm και error mode.*	 Εικόνα 45 *Λεπτό υμένιο κολλαγόνου, ακτινοβολημένο για 60 min, απεικονισμένο με AFM σε ανάλυση 30x30 μm και tapping mode.*

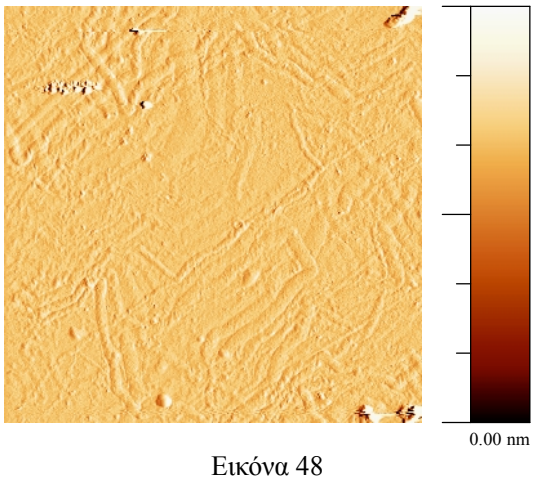
Όταν το διάλυμα ακτινοβολήθηκε για 120 min οι περισσότερες από τις ίνες κολλαγόνου είχαν σχεδόν πλήρως αποδιαμορφωθεί και σε πολλές περιοχές η ινώδης δομή του κολλαγόνου δεν ήταν δυνατό να εντοπιστεί στα δείγματα.

<table>
<tr><td></td><td colspan="2">120 min ακτινοβόληση</td></tr>
<tr><td>μm²</td><td colspan="2">Μέθοδος απεικόνισης</td></tr>
<tr><td></td><td>Error</td><td>Phase</td></tr>
<tr><td>10</td><td> 

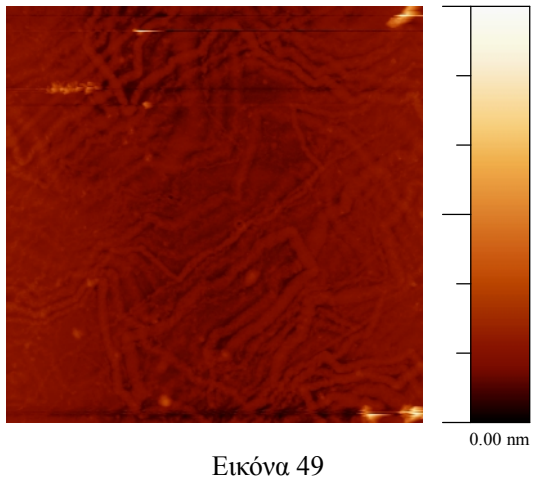
Εικόνα 46

Λεπτό υμένιο κολλαγόνου, ακτινοβολημένο για 120 min, απεικονισμένο με AFM σε ανάλυση 10x10 μm και error mode.</td><td> 

Εικόνα 47

Λεπτό υμένιο κολλαγόνου, ακτινοβολημένο για 120 min, απεικονισμένο με AFM σε ανάλυση 10x10 μm και tapping mode.</td></tr>
<tr><td>30</td><td> 

Εικόνα 48

Λεπτό υμένιο κολλαγόνου, ακτινοβολημένο για 120 min, απεικονισμένο με AFM σε ανάλυση 30x30 μm και error mode.</td><td> 

Εικόνα 49

Λεπτό υμένιο κολλαγόνου, ακτινοβολημένο για 120 min, απεικονισμένο με AFM σε ανάλυση 30x30 μm και tapping mode.</td></tr>
</table>

Εκτός από την απεικόνιση, οι εικόνες AFM μέσω των κατάλληλων λογισμικών εικόνας χρησιμοποιήθηκαν για τη μέτρηση της τραχύτητας (Root Mean Square Roughness) και του μέσου ύψους της επιφάνειας.

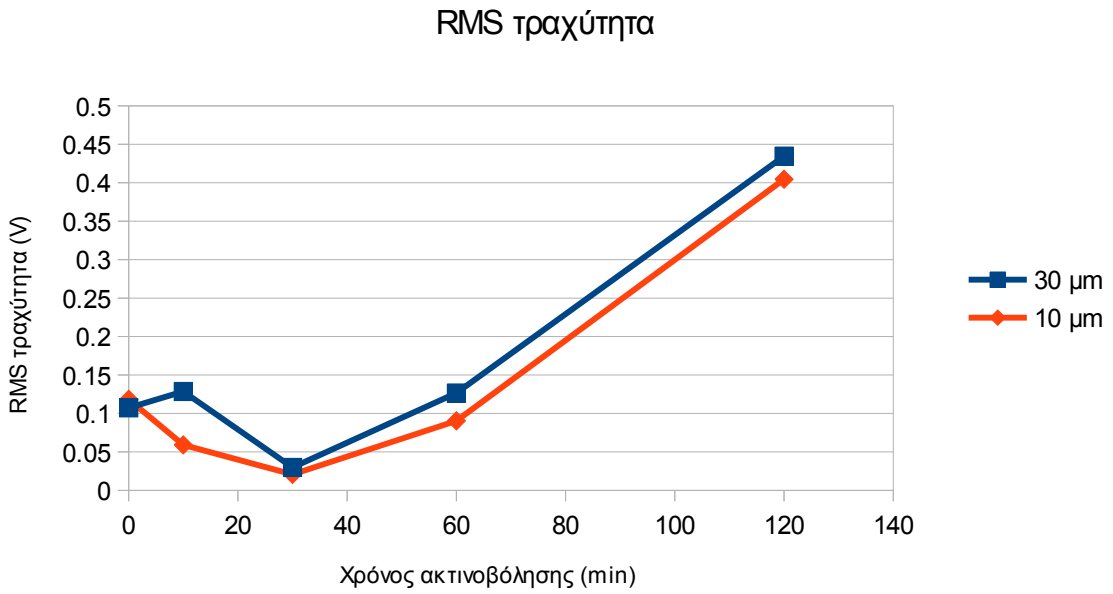
Ο Πίνακας *5* απεικονίζει τις RMS τιμές τις τραχύτητας των υμενίων κολλαγόνου που μετρήθηκαν για τους διαφορετικούς χρόνους ακτινοβόλησης του κολλαγόνου, τόσο στην ανάλυση των 30 μm όσο και σε αυτήν των 10 μm.

RMS Τραχύτητα (V)		
	30 μm	**10 μm**
0	0.1073	0.1183
10	0.1285	0.0591
30	0.0298	0.0207
60	0.1266	0.0904
120	0.4346	0.4045

Πίνακας 5

RMS τιμή της τραχύτητας των απεικονισμένων δειγμάτων κολλαγόνου, όπως ελήφθη από το Tapping Mode.

Το Γράφημα *1* απεικονίζει την RMS τραχύτητα των υμενίων κολλαγόνου σε σχέση με το χρόνο ακτινοβόλησης του κολλαγόνου, τόσο για τα 30 όσο και για τα 10 μm.



Γράφημα 1

RMS τιμή της τραχύτητας των δειγμάτων κολλαγόνου.

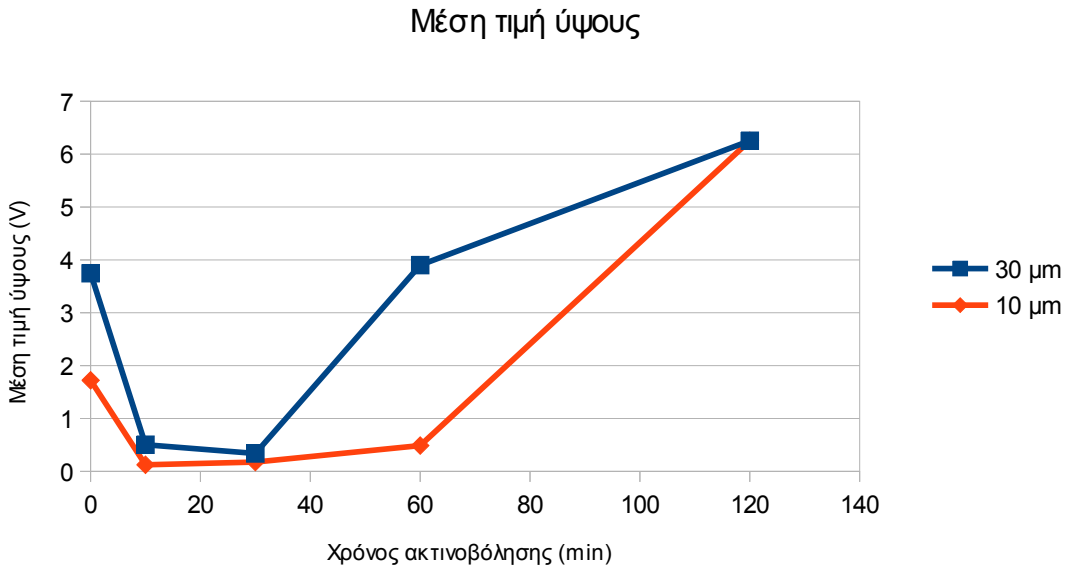
Από τις μετρήσεις που απεικονίζονται στο ***Γράφημα 1***, παρατηρείται ότι η τραχύτητα των υμενίων κολλαγόνου μειώνεται έως τα 30 min ακτινοβόλησης, αλλά για μεγαλύτερους χρόνους ακτινοβόλησης αυξάνεται σημαντικά. Στα 120 min η τραχύτητα του κολλαγόνου είναι περίπου 4 φορές μεγαλύτερη από την τιμή για 0 min ακτινοβόλησης, επομένως το κολλαγόνο έχει αλλοιωθεί λόγω του μεγάλου χρόνου ακτινοβόλησης. Η μελέτη των μεταβολών της τραχύτητας των υμενίων κολλαγόνου σε σχέση με το χρόνο ακτινοβόλησής του παρουσιάζει ενδιαφέρον επειδή τα υμένια προορίζονται για ανάπτυξη κυτταρικής καλλιέργειας, η οποία επηρεάζεται από το υπόστρωμά της.

Ο ***Πίνακας 6*** απεικονίζει τη μέση τιμή του ύψους των υμενίων κολλαγόνου που μετρήθηκαν για τους διαφορετικούς χρόνους ακτινοβόλησης του κολλαγόνου, τόσο στην ανάλυση των 30 μm όσο και σε αυτήν των 10 μm.

Μέση τιμή ύψους (V)		
	30 μm	**10 μm**
0	3.7480	1.7213
10	0.5030	0.1234
30	0.3374	0.1747
60	3.9010	0.4873
120	6.2539	6.2539

Πίνακας 6

Μέση τιμή του ύψους των απεικονισμένων δειγμάτων κολλαγόνου, όπως ελήφθη από το Tapping Mode.



Γράφημα 2

Μέση τιμή του ύψους των δειγμάτων κολλαγόνου.

Όπως φαίνεται στο ***Γράφημα 2***, το η μέση τιμή του ύψους των δειγμάτων μειώνεται μέχρι τα 30 min ακτινοβόλησης και στη συνέχεια αυξάνεται. Στα 120 min ακτινοβόλησης η μέση τιμή ύψους των υμενίων είναι περίπου 1,5 φορά μεγαλύτερη από τη μέση τιμή ύψους για 0 min ακτινοβόλησης.

Συνοψίζοντας τα αποτελέσματα για την RMS τραχύτητα και τη μέση τιμή του ύψους, οι τιμές αυτές μειώνονται μέχρι τα 30 min ακτινοβόλησης και στη συνέχεια αυξάνονται, ενώ για 120 min είναι αρκετά μεγαλύτερες από την τιμή για 0 min. Επομένως συμπεραίνεται ότι έως τα 30 min το υπόστρωμα γίνεται πιο επίπεδο και πιο λείο, ενώ από τα 60 min και μετά γίνεται όλο και πιο ανώμαλο, έως τα 120 min που παρουσιάζει σημαντικές αλλαγές.

6.3 Ανάπτυξη καλλιέργειας ινοβλαστών σε λεπτά υμένια κολλαγόνου

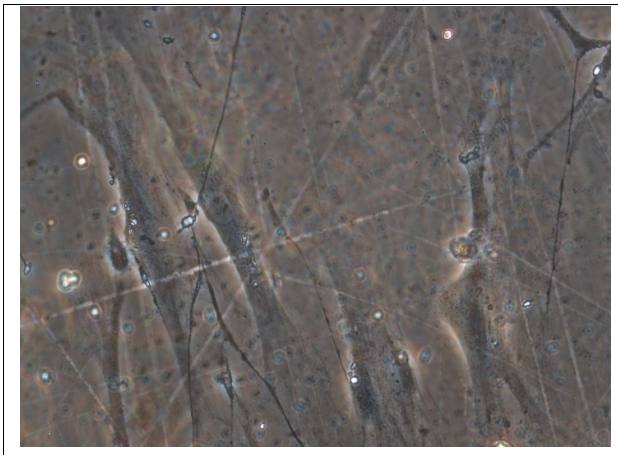
6.3.1 Απεικόνιση με μικροσκόπιο φθορισμού

Για την απεικόνιση και τον χαρακτηρισμό των υμενίων κολλαγόνου πάνω στα οποία αναπτύχθηκαν ινοβλάστες, αρχικά χρησιμοποιήθηκε μικροσκοπία φθορισμού και στη συνέχεια μικροσκοπία AFM. Σε αυτό το υποκεφάλαιο παρουσιάζονται τα αποτελέσματα που ελήφθησαν από τη μικροσκοπία φθορισμού. Για κάθε δείγμα ελήφθησαν περίπου 30 εικόνες σε χρονικό διάστημα περίπου 10 λεπτών, έως ότου το δείγμα δεν απεικονιζόταν πλέον ικανοποιητικά με φθορισμό, λόγω εξασθένησης του ιχνηθέτη φθορισμού που χρησιμοποιήθηκε. Στη συνέχεια παρουσιάζονται οι πιο χαρακτηριστικές και αντιπροσωπευτικές εικόνες.

Οι εικόνες στην αριστερή στήλη είναι οι εικόνες που ελήφθησαν με το οπτικό μικροσκόπιο πριν το φθορισμό και απεικονίζουν καθαρά το κολλαγόνο, ενώ στη δεξιά στήλη είναι οι αντίστοιχες εικόνες που ελήφθησαν με τη χρήση φθορισμού, οπότε απεικονίζονται ευκρινώς οι ινοβλάστες.

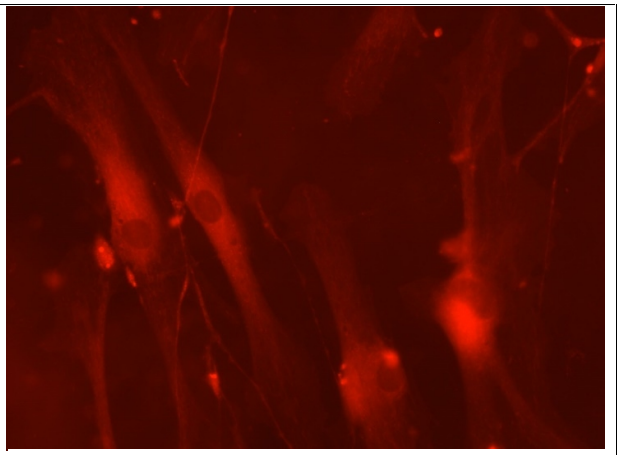
Όπως φαίνεται στις εικόνες (***Εικόνα 50*** - ***Εικόνα 53***), οι ινοβλάστες είναι τυχαία προσανατολισμένοι πάνω στη μίκα, εκτός από τους δύο αριστερότερους ινοβλάστες στην ***Εικόνα 51***, οι οποίοι βρίσκονται πολύ κοντά ο ένας στον άλλον και έχουν προσανατολιστεί παράλληλα.

Μίκα



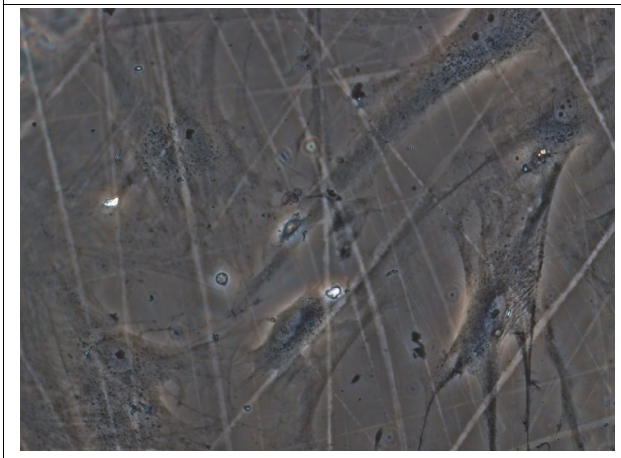
Εικόνα 50

Ινοβλάστες στη μίκα πριν την απεικόνιση με φθορισμό.



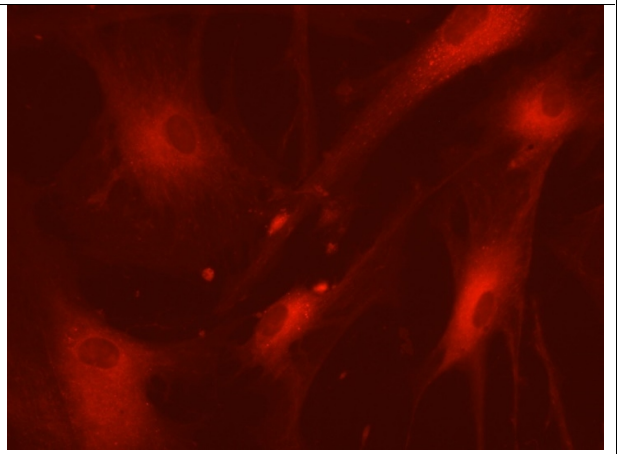
Εικόνα 51

Ινοβλάστες απεικονισμένοι με φθορισμό.



Εικόνα 52

Ινοβλάστες στη μίκα πριν την απεικόνιση με φθορισμό.

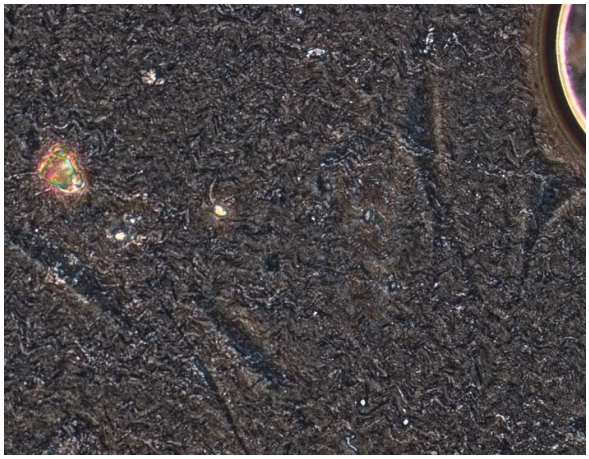


Εικόνα 53

Ινοβλάστες απεικονισμένοι με φθορισμό.

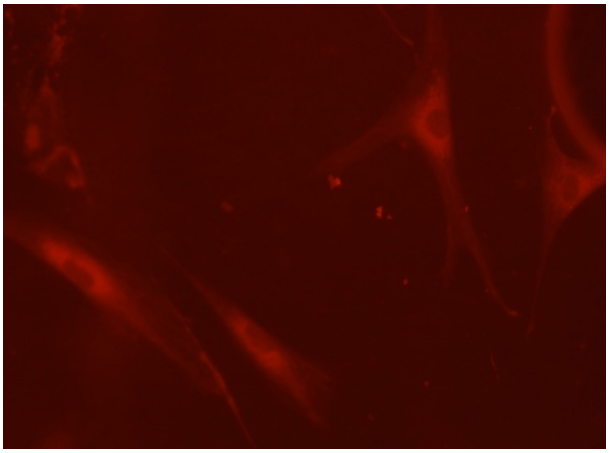
Στη συνέχεια απεικονίζονται ινοβλάστες πάνω σε υμένιο μη ακτινοβολημένου κολλαγόνου πάνω σε δίσκο μίκας. Παρατηρήθηκε ότι το κολλαγόνο είναι ομοιόμορφο και διακρίνονται οι ίνες που έχουν σχηματισθεί (***Εικόνα 54***, ***Εικόνα 56***). Οι ινοβλάστες προσανατολίζονται τυχαία όταν βρίσκονται μακριά ο ένας από τον άλλον (***Εικόνα 55***), όμως όταν βρίσκονται σε κοντινή απόσταση προσανατολίζονται παράλληλα (***Εικόνα 57***). Επίσης παρατηρείται ότι οι ινοβλάστες παρουσιάζουν σχετικά μεγάλη επιμήκυνση, καθώς και ατρακτοειδές και αστεροειδές σχήμα.

0 min χρόνος ακτινοβόλησης κολλαγόνου



Εικόνα 54

Ινοβλάστες στο υπόστρωμα κολλαγόνου πριν την απεικόνιση με φθορισμό.

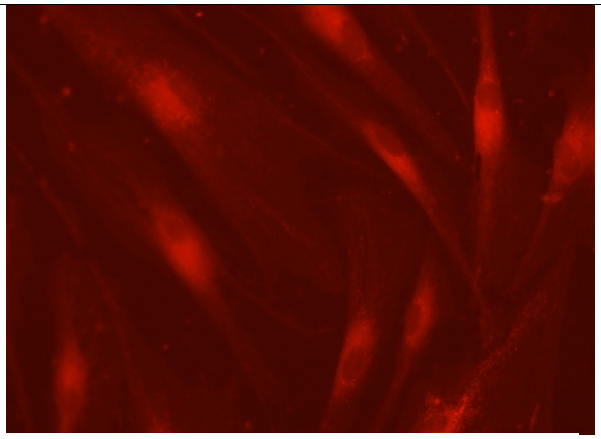


Εικόνα 55

Ινοβλάστες απεικονισμένοι με φθορισμό.

Εικόνα 56

Ινοβλάστες στο υπόστρωμα κολλαγόνου πριν την απεικόνιση με φθορισμό.



Εικόνα 57

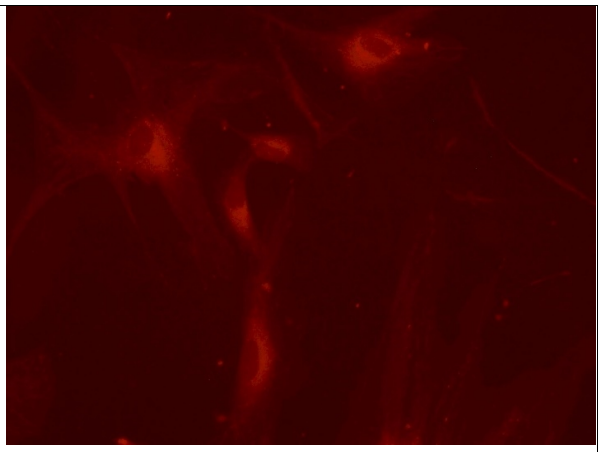
Ινοβλάστες απεικονισμένοι με φθορισμό.

Για χρόνο ακτινοβόλησης του κολλαγόνου ίσο με 10 min δεν παρατηρείται κάποια αλλοίωση στο κολλαγόνο ή στους ινοβλάστες (***Εικόνα 58*** - ***Εικόνα 61***). Στην ***Εικόνα 59*** παρατηρούνται διαφορετικά σχήματα των ινοβλαστών (αστεροειδές, ατρακτοειδές, σφαιρικό), ενώ στην ***Εικόνα 61*** παρατηρείται η τάση των ινοβλαστών να παραλληλίζονται όταν βρίσκονται σε μικρή απόσταση μεταξύ τους λόγω των αλληλεπιδράσεων κυττάρου–κυττάρου. Είναι επίσης εμφανές ότι οι ινοβλάστες παρουσιάζουν ελαφρά μικρότερη επιμήκυνση απ' ότι στο μη ακτινοβολημένο κολλαγόνο.

10 min χρόνος ακτινοβόλησης κολλαγόνου

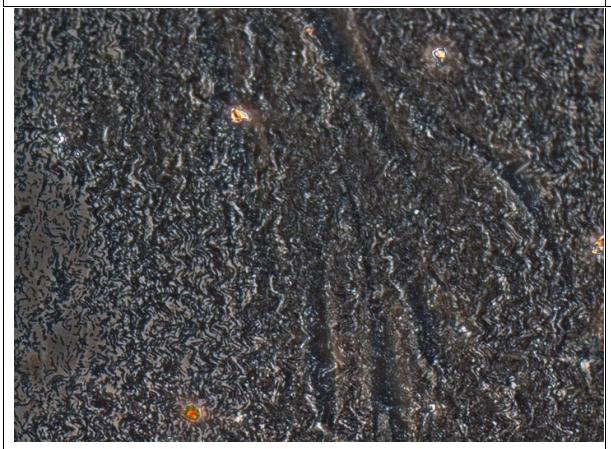
Εικόνα 58

Ινοβλάστες στο υπόστρωμα κολλαγόνου πριν την απεικόνιση με φθορισμό.



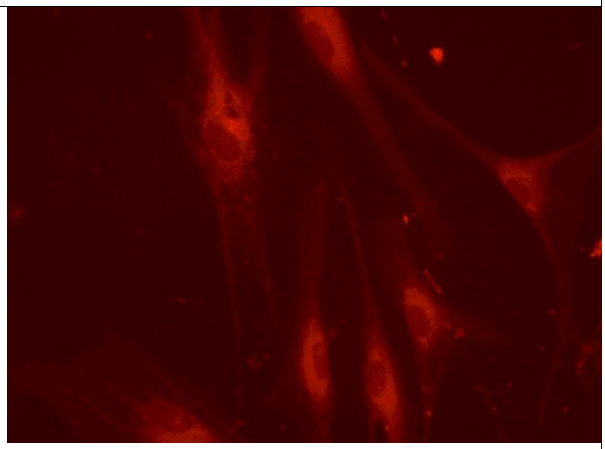
Εικόνα 59

Ινοβλάστες απεικονισμένοι με φθορισμό.



Εικόνα 60

Ινοβλάστες στο υπόστρωμα κολλαγόνου πριν την απεικόνιση με φθορισμό.

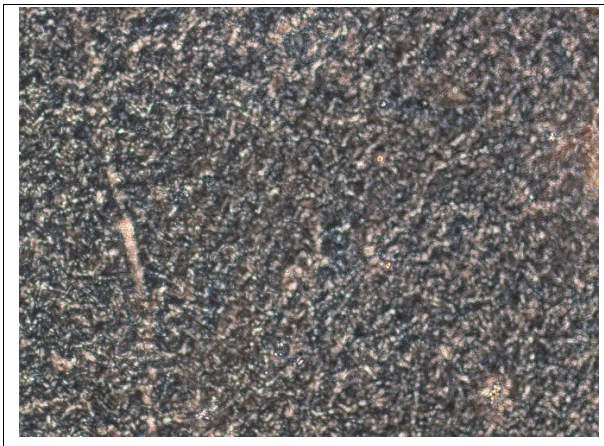


Εικόνα 61

Ινοβλάστες απεικονισμένοι με φθορισμό.

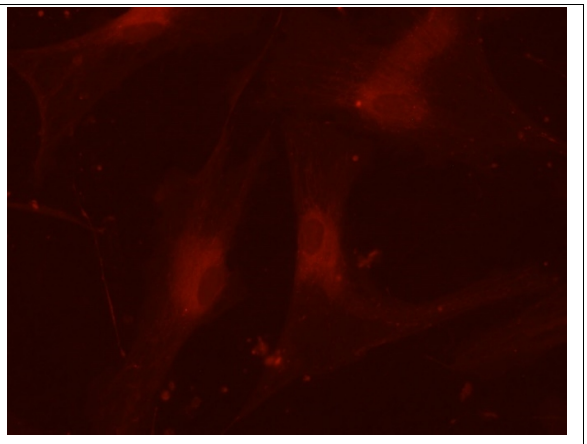
Στο δείγμα που είχε ακτινοβοληθεί για 30 min, παρατηρείται ότι το κολλαγόνο έχει αρχίσει να αποδιαμορφώνεται (***Εικόνα 62***). Το υμένιο κολλαγόνου εμφανίζεται πιο πυκνό σε κάποιες περιοχές του δίσκου μίκας, ενώ άλλες περιοχές του δίσκου μένουν ακάλυπτες από το κολλαγόνο (***Εικόνα 64***). Οι ινοβλάστες εμφανίζονται λιγότερο επιμήκεις (***Εικόνα 63***), παρόλα αυτά διατηρούν την τάση τους να παραλληλίζονται όταν βρίσκονται σε κοντινές αποστάσεις (***Εικόνα 65***).

30 min χρόνος ακτινοβόλησης κολλαγόνου



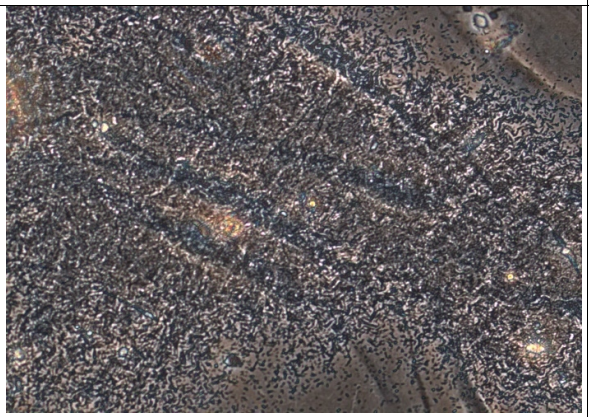
Εικόνα 62

Ινοβλάστες στο υπόστρωμα κολλαγόνου πριν την απεικόνιση με φθορισμό.



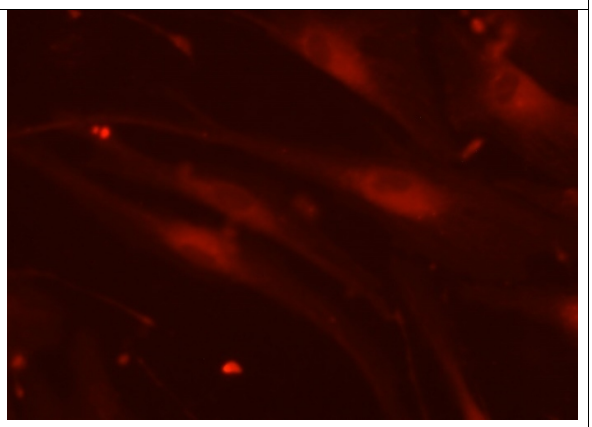
Εικόνα 63

Ινοβλάστες απεικονισμένοι με φθορισμό.



Εικόνα 64

Ινοβλάστες στο υπόστρωμα κολλαγόνου πριν την απεικόνιση με φθορισμό.

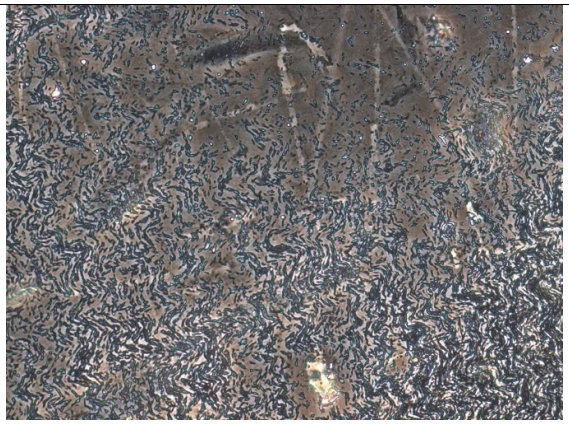


Εικόνα 65

Ινοβλάστες απεικονισμένοι με φθορισμό.

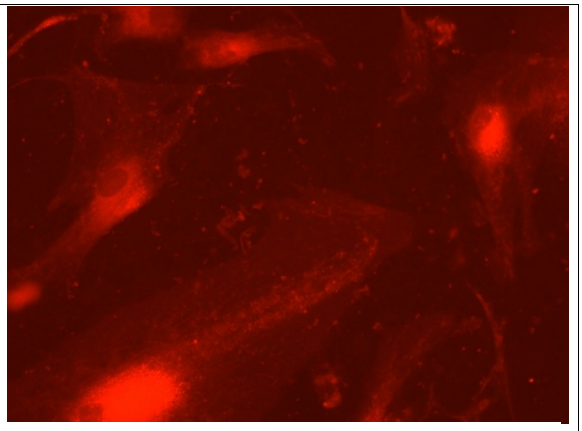
Στο κολλαγόνο που ακτινοβολήθηκε για 60 min παρατηρείται και πάλι η αποδιαμόρφωσή του (***Εικόνα 68***), καθώς και η ανομοιόμορφη κάλυψη του δίσκου μίκας (***Εικόνα 66***). Οι ινοβλάστες είναι ακόμη πιο σφαιρικοί μετά την επιπλέον ακτινοβόληση, και εμφανίζουν αρκετά πλατιές αποφυάδες (***Εικόνα 67***, ***Εικόνα 69***).

60 min χρόνος ακτινοβόλησης κολλαγόνου



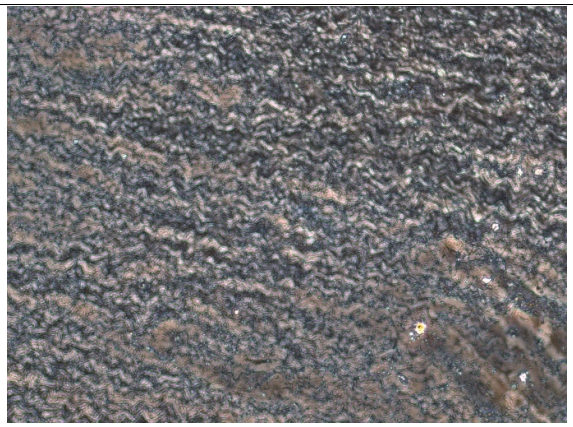
Εικόνα 66

Ινοβλάστες στο υπόστρωμα κολλαγόνου πριν την απεικόνιση με φθορισμό.



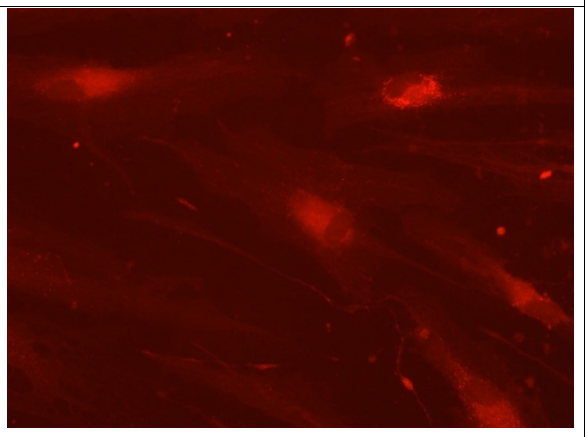
Εικόνα 67

Ινοβλάστες απεικονισμένοι με φθορισμό.



Εικόνα 68

Ινοβλάστες στο υπόστρωμα κολλαγόνου πριν την απεικόνιση με φθορισμό.

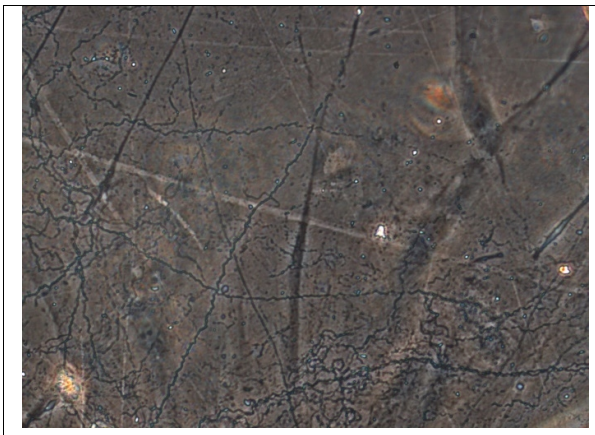


Εικόνα 69

Ινοβλάστες απεικονισμένοι με φθορισμό.

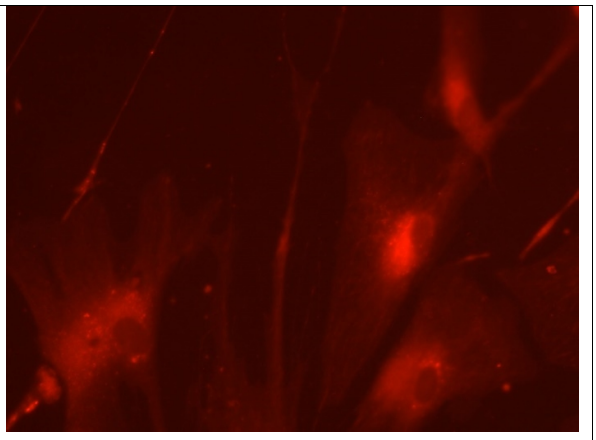
Στα 120 min ακτινοβόλησης του κολλαγόνου, παρατηρείται ότι η ινώδης μορφή του έχει πλέον χαθεί και δεν διακρίνονται ίνες στις εικόνες της αριστερής στήλης (***Εικόνα 70***, ***Εικόνα 72***), όπως στα προηγούμενα δείγματα. Οι ινοβλάστες παρουσιάζονται με πολύ πλατιές αποφυάδες και είναι πιο επιμήκεις σε σύγκριση με τους μικρότερους χρόνους ακτινοβόλησης (***Εικόνα 71***, ***Εικόνα 73***). Επίσης παρατηρείται ότι εξακολουθούν να παραλληλίζονται σε κοντινές αποστάσεις, όπως οι δεξιότεροι ινοβλάστες στην ***Εικόνα 73***.

120 min χρόνος ακτινοβόλησης κολλαγόνου



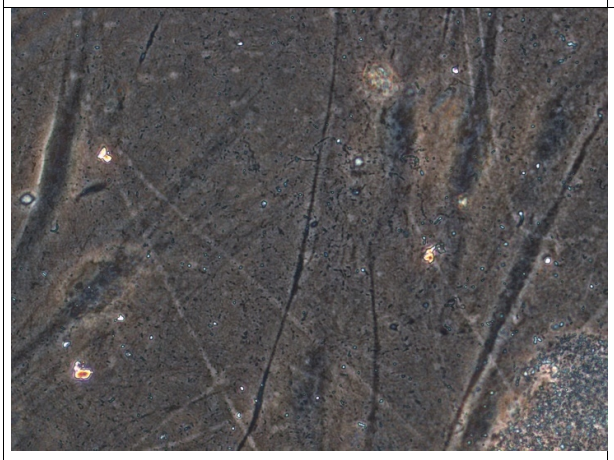
Εικόνα 70

Ινοβλάστες στο υπόστρωμα κολλαγόνου πριν την απεικόνιση με φθορισμό.



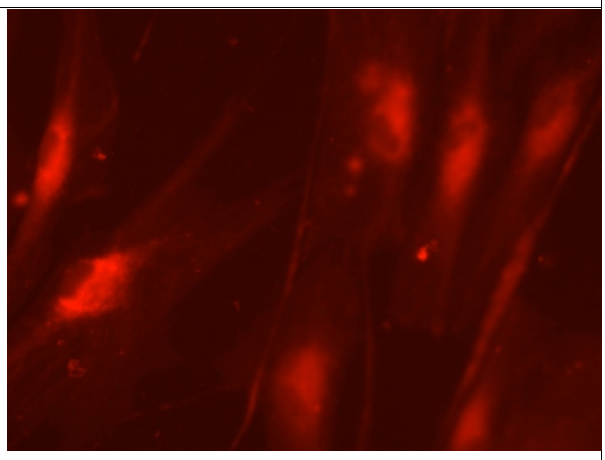
Εικόνα 71

Ινοβλάστες απεικονισμένοι με φθορισμό.



Εικόνα 72

Ινοβλάστες στο υπόστρωμα κολλαγόνου πριν την απεικόνιση με φθορισμό.



Εικόνα 73

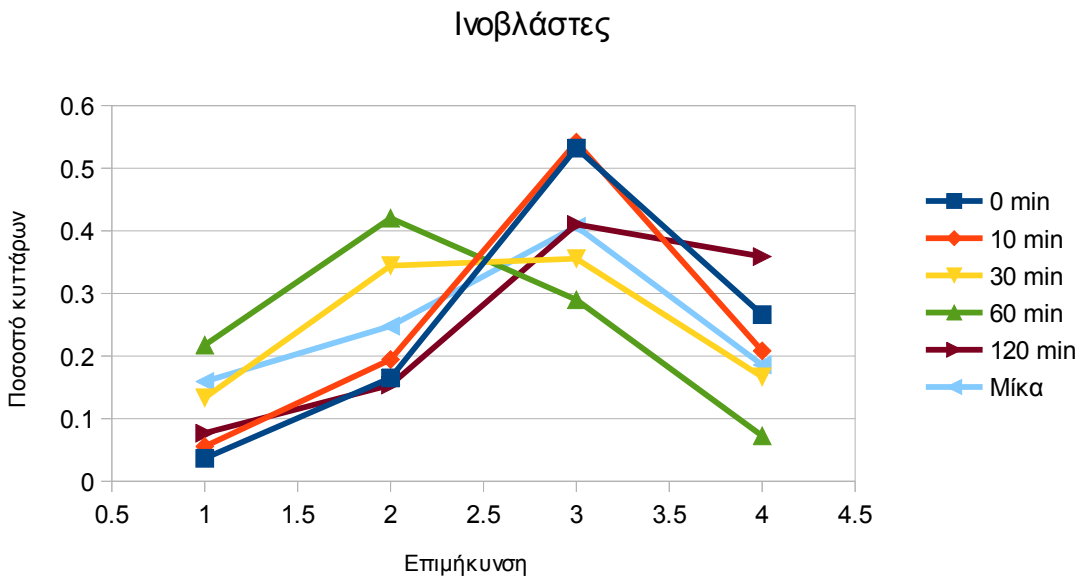
Ινοβλάστες απεικονισμένοι με φθορισμό.

Για όλους τους χρόνους ακτινοβόλησης παρατηρείται ότι οι ινοβλάστες προσανατολίζονται τυχαία πάνω στο υπόστρωμα κολλαγόνου, και προσανατολίζονται παράλληλα μόνο όταν βρίσκονται σε αρκετά κοντινή απόσταση μεταξύ τους, λόγω των αλληλεπιδράσεων κυττάρου–κυττάρου. Εκτός από την απεικόνιση, μετρήθηκαν οι διαστάσεις των κυττάρων και των πυρήνων τους και ελήφθησαν αποτελέσματα. Χρησιμοποιώντας το λογισμικό ImageJ, μετρήθηκαν για κάθε κύτταρο και τον πυρήνα του ο μικρός και ο μεγάλος άξονας. Στη συνέχεια υπολογίστηκε η επιμήκυνση για κάθε κύτταρο και τον πυρήνα του, και τέλος εξήχθησαν αποτελέσματα. Η επιμήκυνση μετράται ως (μικρός άξονας/μεγάλος άξονας -1). Ο
Πίνακας *7* και το ***Γράφημα 3*** που ακολουθεί περιγράφουν τα αποτελέσματα που ελήφθησαν από τη μέτρηση της επιμήκυνσης του σώματος των ινοβλαστών.

Επιμήκυνση ινοβλαστών	**0 min**	**10 min**	**30 min**	**60 min**	**120 min**	**Μίκα**
0-0.5	3.67%	5.56%	13.33%	21.74%	7.69%	15.93%
0.5-1	16.51%	19.44%	34.44%	42.03%	15.38%	24.78%
1-2	53.21%	54.17%	35.56%	28.99%	41.03%	40.71%
>2	26.61%	20.83%	16.67%	7.25%	35.90%	18.58%

Πίνακας 7

Επιμήκυνση στο σώμα των ινοβλαστών.



Γράφημα 3

Ποσοστό των κυττάρων που έχουν διαφορετικές τιμές επιμήκυνσης στο κυρίως σώμα τους.

Όπως απεικονίζεται στο ***Γράφημα 3***, οι ινοβλάστες γίνονται πιο σφαιρικοί έως τα 60 min ακτινοβόλησης, ενώ στα 120 min γίνονται και πάλι επιμήκεις. Η αλλαγή στη συμπεριφορά των

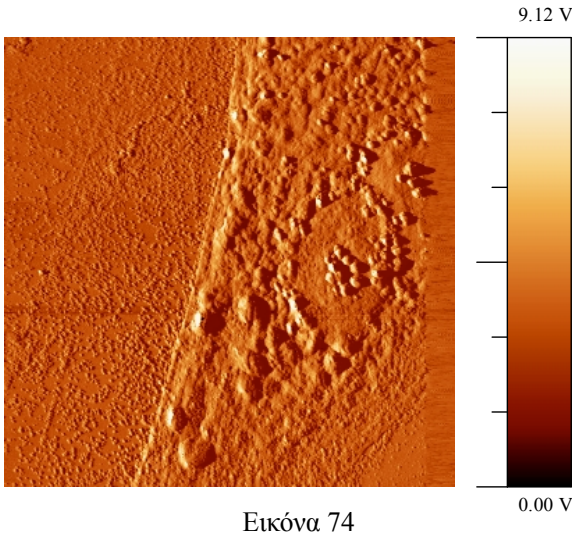
ινοβλαστών μπορεί να αιτιολογηθεί λαμβάνοντας υπόψη τα αποτελέσματα που ελήφθησαν από τις μετρήσεις της τραχύτητας και του ύψους των υποστρωμάτων κολλαγόνου με χρήση μικροσκοπίας AFM (βλ. κεφάλαιο 6.2). Στα 120 min το κολλαγόνο έχει αποδιαμορφωθεί σε μεγάλο βαθμό, εμφανίζει μεγάλες τιμές τραχύτητας και ύψους, και ως αποτέλεσμα οι ινοβλάστες γίνονται πιο επιμήκεις πάνω στο ανώμαλο υπόστρωμα. Οι ινοβλάστες πάνω στη μίκα εμφανίζουν μια ενδιάμεση τιμή επιμήκυνσης ανάμεσα στο μη ακτινοβολημένο κολλαγόνο και το κολλαγόνο που ακτινοβολήθηκε για 60 min.

Οι πυρήνες των κυττάρων εμφανίστηκαν επιμήκεις έως τα 30 min ακτινοβόλησης, ενώ για 60 και 120 min εμφανίστηκαν όλο και πιο σφαιρικοί. Τα αποτελέσματα αυτά συμφωνούν με τα αποτελέσματα του υποκεφαλαίου 6.2 όπου μετρήθηκε η επιφανειακή τραχύτητα (RMS) και το μέσο ύψος των υμενίων κολλαγόνου, όπου παρατηρήθηκε ότι οι τιμές αυτές παρουσίαζαν μείωση μέχρι τα 30 min ακτινοβόλησης, ενώ στα 60 και 120 min παρουσίασαν αύξηση. Επομένως η τραχύτητα και το ύψος των υμενίων κολλαγόνου επηρεάζει την κατάσταση των πυρήνων των ινοβλαστών.

6.3.2. Απεικόνιση με AFM

Παρουσιάζονται ενδεικτικά αντιπροσωπευτικές εικόνες που ελήφθησαν, οι οποίες περιείχαν και τμήμα ινοβλάστη. Για το χρόνο ακτινοβόλησης 120 min οι υψομετρικές διαφορές στις μικροδομές του δείγματος δεν επέτρεψαν τη λήψη αξιοποιήσιμης εικόνας. Υπενθυμίζεται ότι η χρωματική κλίμακα που παρατίθεται δίπλα σε κάθε εικόνα αντιστοιχεί στον άξονα Z και απεικονίζει το ύψος κάθε σημείου της εικόνας, ανάλογα με τη φωτεινότητα του χρώματος.

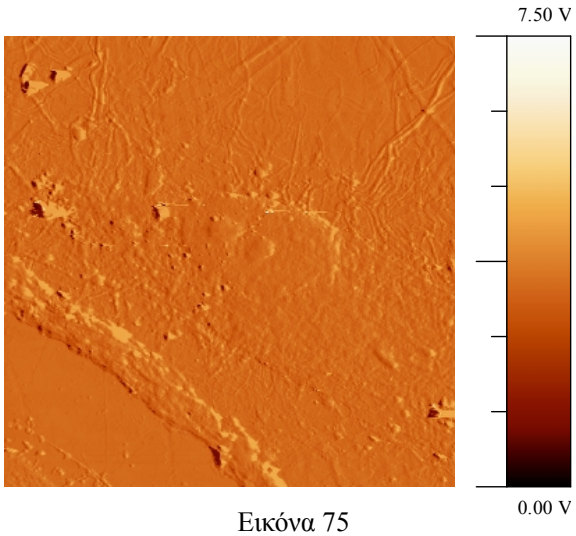
0 min



Εικόνα 74

Phase mode. Τμήμα ινοβλάστη. Στο κέντρο διακρίνεται και ο πυρήνας.

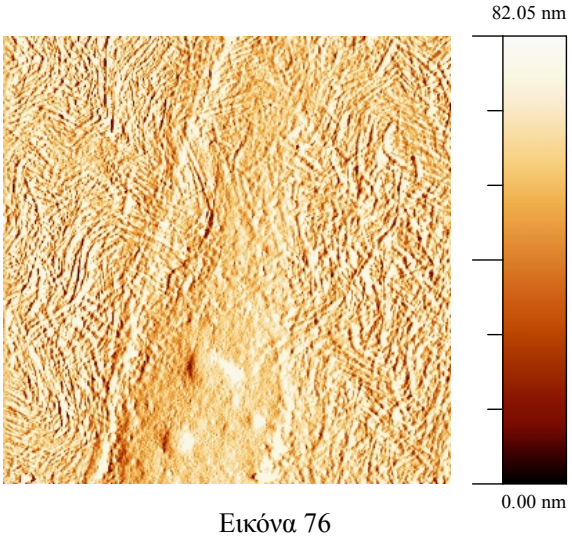
10 min



Εικόνα 75

Phase mode. Διακρίνεται τμήμα ενός ινοβλάστη.

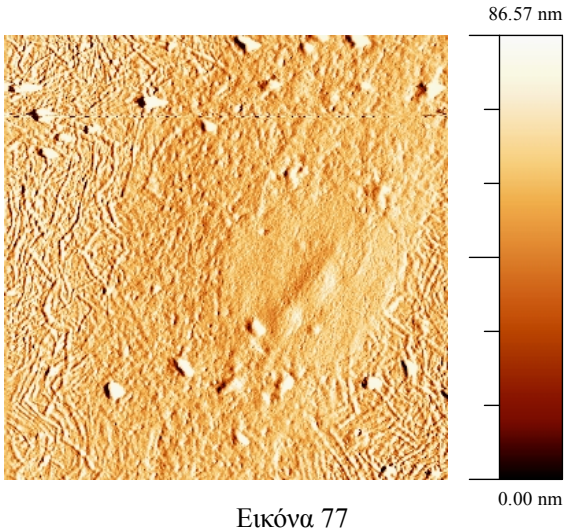
30 min



Εικόνα 76

Error mode. Διακρίνεται τμήμα ινοβλάστη.

60 min



Εικόνα 77

Error mode. Διακρίνεται το κύριο σώμα ενός ινοβλάστη με τον πυρήνα του.

Παρατηρούνται ευκρινείς ακμές στα κύτταρα, καθώς και η τοποθεσία του πυρήνα. Η απεικόνιση με AFM δεν αποκαλύπτει λεπτομέρειες σχετικά με τον κυτοσκελετό, όπως ήταν αναμενόμενο.

Κεφάλαιο 7 : ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ ΚΑΙ ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Το πρώτο μέρος της εργασίας αφορά τη μελέτη δειγμάτων που παρασκευάστηκαν από τη φυγοκέντριση σε δισκάκια μίκας 50 μl κολλαγόνου, ακτινοβολημένου για διαφορετικούς χρόνους με UV ακτινοβολία μήκους κύματος 254 nm. Τα δείγματα αυτά παρατηρήθηκαν με tapping mode AFM και μετρήθηκαν οι μεταβολές της επιφανειακής τραχύτητας (RMS) και του μέσου ύψους των δειγμάτων σε σχέση με το χρόνο ακτινοβόλησης του κολλαγόνου. Για 10 min χρόνο ακτινοβόλησης δεν παρατηρήθηκαν έντονες αλλοιώσεις στα λεπτά υμένια. Για 30 και 60 min οι ίνες άρχισαν να αποδιαμορφώνονται και να χάνουν την ινώδη μορφή τους. Όταν το διάλυμα ακτινοβολήθηκε για 120 min οι περισσότερες από τις ίνες κολλαγόνου είχαν σχεδόν πλήρως αποδιαμορφωθεί και σε πολλές περιοχές η ινώδης δομή του κολλαγόνου δεν ήταν δυνατό να εντοπιστεί στα δείγματα.

Σχετικά με την τραχύτητα των υμενίων κολλαγόνου, παρατηρείται ότι αυτή μειώνεται έως τα 30 min ακτινοβόλησης, αλλά στη συνέχεια αυξάνεται καθώς αυξάνεται ο χρόνος ακτινοβόλησης του κολλαγόνου. Επιπλέον αναφορικά με το ύψος των δειγμάτων, αυτό παρατηρείται ότι αρχικά είναι σε μία ενδιάμεση τιμή, για 30 min ακτινοβόλησης μειώνεται σχεδόν σε μηδενική τιμή, και για μεγαλύτερους χρόνους ακτινοβόλησης αυξάνεται όλο και περισσότερο. Επομένως τόσο η RMS τραχύτητα όσο και το μέσο ύψος των δειγμάτων παρουσιάζουν μείωση για χρόνο ακτινοβόλησης έως 30 min, ενώ για μεγαλύτερους χρόνους ακτινοβόλησης αυξάνονται σημαντικά. Η μελέτη των μεταβολών τόσο της τραχύτητας όσο και του μέσου ύψους των δειγμάτων έχει ιδιαίτερη σημασία επειδή τα υμένια κολλαγόνου προορίζονται για ανάπτυξη κυτταρικής καλλιέργειας, η οποία επηρεάζεται τόσο από την τραχύτητα όσο και από το ύψος του υποστρώματος καλλιέργειας.

Σε προηγούμενες μελέτες, δείχθηκε ότι με τη χρήση παρόμοιων δόσεων ακτινοβόλησης στο ίδιο μήκος κύματος, η UV ακτινοβολία προκάλεσε μείωση της επιφανειακής τραχύτητας υμενίων από κολλαγόνο και PVA (poly(vinyl alcohol))[63]. Η UV ακτινοβολία προκάλεσε επίσης μείωση της τραχύτητας σε υμένια PVP-κολλαγόνου[64]. Στην παρούσα εργασία για παρόμοιες δόσεις ακτινοβολίας παρατηρήθηκε επίσης μείωση της τραχύτητας. Η UV ακτινοβολία προκαλεί αύξηση στην πολικότητα της επιφάνειας του κολλαγόνου σε υμένια που ακτινοβολήθηκαν, γεγονός που υποδεικνύει ότι τα υμένια υπέστησαν φωτολεύκανση[65]. Έχει δειχθεί ότι η UV ακτινοβολία μείωσε τη θερμική σταθερότητα υμενίων κολλαγόνου και προκάλεσε το σχηματισμό σχισμών και σπασιμάτων στην επιφάνειά τους[66]. Η UV ακτινοβολία προκάλεσε τη δημιουργία σταυροδεσμών στο κολλαγόνο, την καταστροφή υπολοίπων τυροσίνης[67] και φαινυλαλανίνης[68], και την υποβάθμιση των αλυσίδων που οδήγησε σε αλλαγές στη διαμόρφωση του κολλαγόνου[69]. Τέτοιες αλλαγές παρατηρήθηκαν στο κεφάλαιο 6.3.1. της παρούσας εργασίας. Περαιτέρω μελέτες έδειξαν ότι φυσιολογικά εφικτές δόσεις UV ακτινοβολίας δεν είχαν ανιχνεύσιμη επίδραση σε μονομερή κολλαγόνου τύπου Ι[70]. Έχει επίσης συγκριθεί η επίδραση της UV ακτινοβολίας κατευθείαν σε υμένια κολλαγόνου σε σχέση με την ακτινοβόληση του κολλαγόνου το οποίο στη συνέχεια χρησιμοποιήθηκε για δημιουργία υμενίων. Στην εν λόγω μελέτη βρέθηκε ότι τα υμένια που πρώτα σχηματίσθηκαν και μετά ακτινοβολήθηκαν παρουσίασαν σταθερή τραχύτητα, ενώ τα υμένια που σχηματίσθηκαν από ακτινοβολημένο κολλαγόνο παρουσίασαν μεταβολή της τραχύτητας[71]. Τα αποτελέσματα της παρούσας εργασίας συμφωνούν με τα πορίσματα αυτά.

Το δεύτερο μέρος της εργασίας αφορά την καλλιέργεια ινοβλαστών πάνω σε υπόστρωμα κολλαγόνου, ακτινοβολημένου με UV ακτινοβολία για διάφορους χρόνους (0, 10, 30, 60 και 120 min). Τα αποτελέσματα από την παρατήρηση των δειγμάτων σε μικροσκόπιο φθορισμού έδειξαν ότι το μη ακτινοβολημένο κολλαγόνο σχημάτισε ομοιόμορφο υμένιο με ευδιάκριτα σχηματισμένες ίνες. Το κολλαγόνο δεν εμφάνισε αλλοιώσεις για 10 min UV ακτινοβόλησης. Για χρόνο ακτινοβόλησης ίσο με 30 min παρατηρήθηκε η μερική αποδιαμόρφωση των ινών του κολλαγόνου, καθώς και η ανομοιόμορφη κάλυψη του δίσκου μίκας. Στα 60 min ακτινοβόλησης η αποδιαμόρφωση του

υποστρώματος κολλαγόνου ήταν ακόμη εμφανέστερη, ενώ το κολλαγόνο και πάλι είχε καλύψει ανομοιόμορφα το δίσκο. Στα 120 min ακτινοβόλησης του κολλαγόνου, παρατηρήθηκε ότι η ινώδης μορφή του είχε πλέον χαθεί. Τα αποτελέσματα αυτά είναι σε συμφωνία με τις μετρήσεις της τραχύτητας και του ύψους των υποστρωμάτων κολλαγόνου που ελήφθησαν από μικροσκοπία AFM στο κεφάλαιο 6.2.

Αναφορικά με την επιμήκυνση των ινοβλαστών, στο μη ακτινοβολημένο κολλαγόνο οι ινοβλάστες παρουσίασαν μεγάλη επιμήκυνση. Από τα 10 έως και τα 60 min ακτινοβόλησης του υποστρώματος κολλαγόνου, οι ινοβλάστες παρουσίαζαν συνεχώς αύξηση στη σφαιρικότητά τους (μείωση στην επιμήκυνση). Για 120 min ακτινοβόλησης οι ινοβλάστες παρουσιάστηκαν επιμήκεις, αντίθετα με την προγενέστερη τάση για αύξηση της σφαιρικότητας που εμφάνιζαν για μικρότερους χρόνους ακτινοβόλησης του υποστρώματος. Η αλλαγή αυτή στη συμπεριφορά των κυττάρων μπορεί να αιτιολογηθεί λαμβάνοντας υπόψη τα αποτελέσματα που ελήφθησαν από τις μετρήσεις της τραχύτητας και του ύψους των υποστρωμάτων κολλαγόνου με το AFM που περιγράφονται στο κεφάλαιο 6.2. Στα 120 min το κολλαγόνο είχε αποδιαμορφωθεί σε μεγάλο βαθμό, εμφάνισε μεγάλες τιμές τραχύτητας και ύψους, και ως αποτέλεσμα οι ινοβλάστες έγιναν πιο επιμήκεις πάνω στο ανώμαλο υπόστρωμα. Στη μίκα οι ινοβλάστες παρουσίασαν μία ενδιάμεση τιμή στην επιμήκυνση. Παρατηρήθηκε επιπλέον ότι οι πυρήνες των ινοβλαστών ήταν επιμήκεις για χρόνους ακτινοβόλησης έως 30 min, ενώ για μεγαλύτερους χρόνους παρουσιάστηκαν πιο σφαιρικοί. Το γεγονός αυτό επιβεβαιώνει ότι το κολλαγόνο υφίσταται σημαντικές αλλοιώσεις για χρόνους ακτινοβόλησης 60 min και 120 min, οι οποίες οδηγούν σε σημαντική αύξηση της επιφανειακής του τραχύτητας και της μέσης τιμής του ύψους των δειγμάτων, όπως δείχθηκε και κατά την απεικόνιση με AFM.

Αναφορικά με τον προσανατολισμό των ινοβλαστών πάνω στο υπόστρωμα κολλαγόνου, για όλους τους χρόνους ακτινοβόλησης παρατηρείται ότι οι ινοβλάστες προσανατολίζονται τυχαία πάνω στο υπόστρωμα, ενώ προσανατολίζονται παράλληλα μόνο όταν βρίσκονται σε αρκετά κοντινή απόσταση μεταξύ τους, λόγω των αλληλεπιδράσεων κυττάρου–κυττάρου.

Προηγούμενες μελέτες έδειξαν ότι ακτινοβολημένα υποστρώματα κολλαγόνου μπορούν να υποστηρίξουν την ανάπτυξη των κυττάρων, αν και αυτή εξαρτάτο από τη δόση της ακτινοβολίας[72,73]. Σε άλλες περιπτώσεις, η UV ακτινοβόληση μειγμάτων με βάση το κολλαγόνο βρέθηκε ότι βελτιώνει τη βιωσιμότητα των κυττάρων[74]. Επιπλέον, η τάση των ινοβλαστών να γίνονται πιο σφαιρικοί σε UV-ακτινοβολημένα υποστρώματα gel κολλαγόνου έχει απεικονιστεί με SEM (ηλεκτρονικό μικροσκόπιο σάρωσης)[75].

Αναφορικά με τα δείγματα ινοβλαστών πάνω σε κολλαγόνο που απεικονίσθηκαν με AFM, παρατηρήθηκαν ευκρινείς ακμές στα κύτταρα, καθώς και η τοποθεσία του πυρήνα. Δεν ήταν δυνατό να παρατηρηθούν λεπτομέρειες στον κυτοσκελετό. Τα αποτελέσματα αυτά συμφωνούν με προηγούμενες μελέτες, όπου σταθεροποιημένα κύτταρα που παρατηρήθηκαν με AFM παρουσίασαν ευκρινείς ακμές, ενώ η εσωτερική δομή των κυττάρων ήταν λιγότερο προφανής σε σχέση με τα ζωντανά κύτταρα. Επίσης λόγω της σκληρότητας των μεμβρανών και των δομών που έχουν σχηματίσει σταυροδεσμούς η ακίδα δεν ήταν δυνατό να παραμορφώσει τη μεμβράνη αρκετά ώστε να αποκαλύψει λεπτομέρειες στον κυτοσκελετό[76].

Συνοψίζοντας, στην παρούσα διπλωματική εργασία παρασκευάσθηκαν δείγματα υμενίων κολλαγόνου πάνω σε δίσκους μίκας, τα οποία στη συνέχεια χρησιμοποιήθηκαν για καλλιέργεια ινοβλαστών. Χρησιμοποιήθηκε διάλυμα κολλαγόνου ακτινοβολημένου με UV ακτινοβολία για διάφορους χρόνους, το οποίο στη συνέχεια σχημάτισε υμένια πάνω σε δισκάκια μίκας με φυγοκέντριση. Παρατηρήθηκαν τόσο δείγματα από υμένια κολλαγόνου, όσο και από υμένια κολλαγόνου στα οποία καλλιεργήθηκαν ινοβλάστες. Τα δείγματα απεικονίστηκαν μέσω μικροσκοπίας φθορισμού και μικροσκοπίας AFM, και ελήφθησαν μετρήσεις για την τραχύτητα και το ύψος των υμενίων κολλαγόνου, καθώς και για την επιμήκυνση των ινοβλαστών και των πυρήνων

τους για τους διάφορους χρόνους ακτινοβόλησης. Συνολικά από τα αποτελέσματα που ελήφθησαν προκύπτει ότι το κολλαγόνο παρουσιάζει μείωση της τραχύτητας και του μέσου ύψους και αμελητέες αλλοιώσεις για μικρούς χρόνους ακτινοβόλησης, ενώ για μεγαλύτερους χρόνους ακτινοβόλησης εμφανίζει αύξηση της τραχύτητας και του μέσου ύψους, η οποία οδηγεί και σε αλλαγή της συμπεριφοράς των ινοβλαστών. Επίσης τα αποτελέσματα δείχνουν ότι οι ινοβλάστες τείνουν να γίνονται πιο σφαιρικοί με την αύξηση του χρόνου ακτινοβόλησης του υποστρώματος κολλαγόνου.

Η συμπεριφορά των ινοβλαστών στο υπόστρωμα κολλαγόνου, ακτινοβολημένου ή μη, έχει ιδιαίτερο ενδιαφέρον για βιολογικές εφαρμογές. Ανάλογα με την επιθυμητή βιολογική εφαρμογή μπορεί να επιλεχθεί φυσιολογικό κολλαγόνο ή ακτινοβολημένο για μικρό χρονικό διάστημα. Το φυσιολογικό κολλαγόνο παρέχει τις προϋποθέσεις για πιο επιμήκεις ινοβλάστες, αλλά έχει το μειονέκτημα ότι η επιφάνεια του υμενίου παρουσιάζει κάποια τραχύτητα. Το ακτινοβολημένο για μικρό χρόνο (έως 30 min) κολλαγόνο είναι αρκετά επίπεδο, αλλά έχει το μειονέκτημα ότι τα κύτταρα γίνονται πιο σφαιρικά. Η ακτινοβόληση για μεγάλο χρονικό διάστημα προκαλεί μεγάλες αλλοιώσεις στο κολλαγόνο, επομένως δε συνίσταται για βιολογικές εφαρμογές, όπου τα κύτταρα είναι επιθυμητό να βρίσκονται όσο το δυνατόν πιο κοντά στη φυσιολογική τους κατάσταση. Η παρούσα διπλωματική εργασία επεκτείνει τις μελέτες που ήδη έχουν διεξαχθεί με θέμα το κολλαγόνο ως ικρίωμα βιολογικής καλλιέργειας. Πιθανές βιολογικές εφαρμογές των αποτελεσμάτων της παρούσας εργασίας είναι η βελτίωση των μεθόδων αποστείρωσης με υπεριώδη ακτινοβολία ώστε να μην προκαλούνται επιβλαβείς επιπτώσεις στις κυτταρικές καλλιέργειες και η ανάπτυξη βελτιωμένων βιοσυμβατών βιοϋλικών για ιατρικές εφαρμογές όπως η κατασκευή ιστού.

Βιβλιογραφία

[1] Brightman, A.O., Rajwa, B.P., Sturgis, J.E., McCallister, M.E., Robinson, J.P., and Voytik-Harbin S.L., "Time-Lapse Confocal Reflection Microscopy of Collagen Fibrillogenesis and Extracellular Matrix Assembly In Vitro," Biopolym. 54(3), 222-234 (2000).

[2] Plant, A.L., Bhadriraju, K., Spurlin, T.A., and Elliot, J.T., "Cell response to matrix mechanics: Focus on collagen," Biochim. Biophys. Acta 1793(5), 839-902 (2009).

[3] Tsai, S.W., Cheng, Y.H., Chang Y., Liu, H.L., and Tsai, W.B., "Type I collagen structure modulates the behavior of osteoblast-like cells," J. Taiwan Inst. Chem. E. 41(3), 247-251 (2010).

[4] Kadler, K.E., Baldock, C., Bella, J., and Boot-Handford, R.P., "Collagens at a glance", JCS 120, 1955-1958 (2007).

[5] Wiechmann, A., "Connective Tissue", University of Oklahoma Health Sciences Center [Online]. Διαθέσιμο: http://www.ouhsc.edu/histology/text%20sections/connective%20tissue.html

[6] «Αυτοσυγκρότηση – υπερμοριακές δομές – ιοί – φάγοι – πρίον », Department of Cell Biology and Biophysics, Multimedia lab [Online]. Διαθέσιμο: http://multimedia.biol.uoa.gr/2010-2011/metaptyxiaka/kyttbiol/global%20new/mde%2014-4-11/11.pdf , p.14.

[7] «Αυτοσυγκρότηση – υπερμοριακές δομές – ιοί – φάγοι – πρίον », Department of Cell Biology and Biophysics, Multimedia lab [Online]. Διαθέσιμο: http://multimedia.biol.uoa.gr/2010-2011/metaptyxiaka/kyttbiol/global%20new/mde%2014-4-11/11.pdf , p.13.

[8] "Major events in the biosynthesis of fibrous collagens," NCBI [Online]. Διαθέσιμο: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK21582/figure/A6551/?report=objectonly

[9] Shoulders, M.D., Raines, R.T., "Collagen Structure and Stability," Annu. Rev. Biochem. 78, 929-958 (2009).

[10] "Interactions of fibrous and nonfibrous collagens," NCBI [Online]. Διαθέσιμο: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK21582/figure/A6555/?report=objectonly

[11] Lodish H, Berk A, Zipursky SL, et al, "Collagen: The Fibrous Proteins of the Matrix", απόσπασμα από το βιβλίο Molecular Cell Biology, 4th edition, New York: W.H. Freeman, 2000 [Online]. Διαθέσιμο: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK21582/

[12] Glowacki, J., and Mizuno, S., "Collagen scaffolds for tissue engineering", Biopolym. 89(5), 338-344 (2008).

[13] McCann, R., "Visible Light – What the Human Eye Sees", Photovoltaic Lighting Group [Online]. Διαθέσιμο: http://www.solarlightaustralia.com.au/2013/02/20/visible-light/

[14] Sionkowska,A., "Modification of collagen films by ultraviolet irradiation", Polym. Degrad. Stabil. 68(2), 147-151 (2000).

[15] Kato, Y., Uchida, K., and Kawakishi, S., "Aggregation of collagen exposed to UVA in the presence of riboflavin: a plausible role of tyrosine modification," Photochem. Photobiol. 59(3), 343-349 (1994).

[16] Kato, Y., Nishikawa, T., and Kawakishi, S., "Formation of protein-bound 3,4-dihydroxyphenylalanine in collagen types I and IV exposed to ultraviolet light," Photochem. Photobiol., 61(4), 367-372. (1995).

[17] Menter, J.M., Williamson, G.D., Carlyle, K., Moore, C.L., and Willis, I., "Photochemistry of type I acid-soluble calf skin collagen: dependence on excitation wavelength," Photochem Photobiol., 62(3), 402-408. (1995).

[18] Skopinska-Wisniewska, J., Sionkowska, A., Kaminska, A., Kaznica, A., Jachimiac, R., and Drewa, T., "Surface characterization of collagen/elastin based biomaterials for tissue regeneration," Appl. Surf. Sci., 255, 8286–8292 (2009).

[19] Sionkowska, A., Planecka, A., Kozlowska, J., and Skopinska-Wisniewska, J., "Surface properties of UV-irradiated poly(vinyl alcohol) films containing small amount of collagen," Appl. Surf. Sci. 255(7), 4135-4139 (2009).

[20] Sionkowska, A., Kozlowska, J., Planecka, A., and Skopinska-Wisniewska, J., "Collagen fibrils in UV irradiated poly(vinyl pyrrolidone) films," Appl. Surf. Sci. 255(5, Part1), 2030-2039 (2008).

[21] Rajan, N., Lagueux, J., Frederic, C., Pennock, W., and Mantovani, D., "Low Doses of Ultraviolet Radiation Stimulate Cell Activity in Collagen-based Scaffolds", Biotechnol. Prog., 24, 884-889 (2008).

[22] Caruso, A.B., and Dunn, M.G., "Changes in mechanical properties and cellularity during long-term culture of collagen fiber ACL reconstruction scaffolds," J Biomed Mater Res A., 73(4), 388-397 (2005).

[23] "What Is a Cell?," Genetics Home Reference [Online]. Διαθέσιμο: http://ghr.nlm.nih.gov/handbook/basics/cell

[24] Alberts,Bray, Hopkin et al., Βασικές Αρχές Κυτταρικής Βιολογίας, ιατρικές εκδόσεις Π.Χ.Πασχαλίδης, 2η έκδοση, σελ. 7-15

[25] "Motic® BA410 Biological Light Microscope," Ted Pella, Inc. [Online]. Διαθέσιμο: http://www.tedpella.com/mscope_html/BA410.htm

[26] "Microscopy UIC," MicroLabUIC [Online]. Διαθέσιμο: http://uic.igc.gulbenkian.pt/micro-em.htm

[27] Αγγελοπούλου, Ρ., «Συνδετικός Ιστός,» Ιστολογία – Εμβρυολογία Ι[Online]. Διαθέσιμο: http://emed.med.uoa.gr/application/syllabus_I/sindetikos_istos/didaktiko/03/03_03_inobl_inokut.htm

[28] Bloom, W and Fawcett, DW, A Textbook of Histology 10th ed., WB Saunders, Philadelphia, p. 173l (1975). Διαθέσιμο online: http://www.columbia.edu/itc/hs/medical/sbpm_histology_old/lab/lab05_micrograph.html

[29] "Schematic Drawing of the Ultrastructure of Fibroblasts and Myofibroblasts", Pathology Interactive Case Study [Online]. Διαθέσιμο: http://www.vetmed.vt.edu/education/Curriculum/VM8304/vet%20pathology/CASES/HEALING/PAGE1-17.htm

[30] Eckes, B., Zweers, M.C., Zhang, Z.,G., Hallinger, R., Mauch, C., Aumailley, M., and Krieg, T., "Mechanical

Tension and Integrin Alpha2 Beta1 Regulate Fibroblast Functions," J Invest. Derm. Symp P. 11(1), 66–72 (2006).

[31] Werner, S., Grose, R., "Regulation of Wound Healing by Growth Factors and Cytokines", Physiol. Rev. 83(3), 835-870 (2003).

[32] Diwan, A.H., and Horenstein, M.G., "Dermatofibrosarcoma protuberans association with nuchal-type fibroma", J Cutan Pathol. 31(1), 62-66 (2004).

[33] "Fibrosis – What Is Fibrosis?," News Medical [Online]. Διαθέσιμο: http://www.news-medical.net/health/Fibrosis-What-is-Fibrosis.aspx

[34] Kalluri, R., and Zeisberg, M., "Fibroblasts in Cancer", Nat. Rev. Cancer 6(5), 392–401 (2006).

[35] Cirri, P., and Chiarugi, P., "Cancer associated fibroblasts: the dark side of the coin", AM J Cancer Res. 1(4), 482-497 (2011).

[36] Binnig, G., Quate, C.F., and Gerber, C.H. "Atomic force microscope," Phys. Rev. Lett. 56(9), 930–933 (1986).

[37] Kasas, S., Thomson, N.H., Smith, B.L., Hansma, P.K., Miklossy, J., and Hansma, H.G., "Biological Applications of the AFM: From Single Molecules to Organs", Internat. J. Imaging Syst. Technol. 8(2), 151-161 (1997).

[38] Chang, K.C., Chiang, Y.W., Yang C.H., and Liou J.W., "Atomic force microscopy in biology and biomedicine," Tzu Chi Medical Journal 24(4), 162-169 (2012).

[39] Vilalta-Clemente, A., Gloystein, K., and Frangis, N., "Principles of Atomic Force Microscopy (AFM)," Mansic 3C [Online]. Διαθέσιμο: http://www.mansic.eu/documents/PAM1/Frangis.pdf

[40] "Fundamentals of Contact Mode and Tapping Mode Atomic Force Microscopy", Azonano [Online]. Διαθέσιμο: http://www.azonano.com/article.aspx?ArticleID=3010

[41] Vilalta-Clemente, A., Gloystein, K., and Frangis, N., "Principles of Atomic Force Microscopy (AFM)," Mansic 3C [Online]. Διαθέσιμο: http://www.mansic.eu/documents/PAM1/Frangis.pdf

[42] "Fundamentals of Contact Mode and Tapping Mode Atomic Force Microscopy", Azonano [Online]. Διαθέσιμο: http://www.azonano.com/article.aspx?ArticleID=3010

[43] Rees, W.A., Keller, R.W., Vesenka, J.P., Yang, G.L. and Bustamante, C., "Evidence of DNA bending in transcription complexes imaged by scanning force microscopy," Science 260, 1646–1649 (1993).

[44] Stylianou, A., Kyriazi, M., Politopoulos, K., and Yova, D., (2009). "Combined SHG Signal Information with AFM Imaging to Assess Conformational Changes in Collagen", 9th International Conference on Information Technology and Applications in Biomedicine, 4-7 November 2009 , Larnaca, Cyprus DOI 10.1109/ITAB.2009.5394311

[45] Stylianou, A., Kyriazi, M., and Yova, D (2009). "Study of the influence of physicochemical factors in the creation of thin collagen films with atomic force microscopy", 1st Meeting of Biomaterials Society & H.A.O.S.T , Athens Greece

[46] Stylianou, A., Kontomaris, S.B., Kyriazi, M., and Yova, D, "Surface Characterization of Collagen Films by Atomic Force Microscopy," XII Mediterranean Conference on Medical and Biological Engineering and Computing 2010. IFMBE Proceedings Volume 29, 2010, pp 612-615

[47] Revenko, I., Sommer, F., Minh, D.T., Garrone, R., Franc, J.M., "Atomic force microscopy study of the collagen fibre structure," Biol. Cell (80), 67-69 (1994).

[48] "Immunocytochemistry Methods, Techniques and Protocols," IHC World [Online]. Διαθέσιμο: http://www.ihcworld.com/_protocols/general_ICC/fixation.htm

[49] Owen, R., "Introduction to cell imaging using atomic force microscopy," JPK Instruments [Online]. Διαθέσιμο: http://www.jpk.com/jpk-app-intro-cell-imaging1.download.0a25c5164bd0bb83201bf75185b69993

[50] Hon, J.H and Schoenenberger, C.A., "Surface morphology and mechanical properties of MDCK monolayers by atomic force microscopy," J. Cell Sci. 107(5), 1105-1114 (1994).

[51] Bushell, G.R., Cahill, C., Clarke, F.M., Gibson, C.T., Myhra, S., and Watson, G.S. "Imaging and Force-Distance Analysis of Human, Fibroblasts In Vitro by Atomic Force Microscopy", Cytometry 36, 254–264 (1999).

[52] Kasas, S., Thomson, N.H., Smith, B.L., Hansma, P.K., Miklossy, J., and Hansma, H.G., "Biological Applications of the AFM: From Single Molecules to Organs", Internat. J. Imaging Syst. Technol. 8(2), 151-161 (1997).

[53] Rice, G., "Fluorescent Microscopy", SERC [Online]. Διαθέσιμο: http://serc.carleton.edu/microbelife/research_methods/microscopy/fluromic.html

[54] Herman, B., Frohlich, V. E. C., Lakowicz, J.R., Murphy, D.B., Spring, K.R., and Davidson, M.W, "Fluorescence Microscopy", Molecular Expressions: Images from the Microscope [Online]. Διαθέσιμο: http://micro.magnet.fsu.edu/primer/techniques/fluorescence/fluorescenceintro.html

[55] "Fluorescence Microscopy – a Brief Explanation," Bioimaging [Online]. Διαθέσιμο: http://www.scienceinyoureyes.com/index.php?id=79

[56] "Fluorescence Microscopy – a Brief Explanation," Bioimaging [Online]. Διαθέσιμο: http://www.scienceinyoureyes.com/index.php?id=79

[57] Pitris, C., "Fluorescence Spectroscopy," University of Cyprus [Online]. Διαθέσιμο: http://www.eng.ucy.ac.cy/cpitris/courses/ECE477/presentations/10.%20Fluorescence%20Spectroscopy.pdf

[58] Pitris, C., «Πηγές φωτός, ανιχνευτές και ακτινοβόληση,» University of Cyprus [Online]. Διαθέσιμο: http://www.eng.ucy.ac.cy/cpitris/courses/ECE477/presentations/04.%20Sources,%20Detctors,%20Safety.pdf

[59] Spring, K.R., Davidson, M.W., "Introduction to Fluorescence Microscopy," MicroscopyU [Online]. Διαθέσιμο: http://www.microscopyu.com/articles/fluorescence/fluorescenceintro.html

[60] Εγχειρίδιο χρήσης του Veeco AFM, pp. 38-41.

[61] "Olympus BX50 Microscope w/Tri Head, Phase, Pol, Darkfield," Spectra Services [Online]. Διαθέσιμο:

http://spectraservices2.com/Merchant2/merchant.mvc?Screen=PROD&Product_Code=SP-BX50-TRI-POL-PHASE-DF&Category_Code=UMICPOL&Product_Count=4

[62] Horcas, I., Fernández, R., Gómez-Rodríguez, J.M., Colchero, J., Gómez-Herrero J., and Baro A.M., "WSXM: A software for scanning probe microscopy and a tool for nanotechnology," Rev. Sci. Instrum. 78, 013705 (2007).

[63] Sionkowska, A., Planecka, A., Kozlowska, J., and Skopinska-Wisniewska, J., "Surface properties of UV-irradiated poly(vinyl alcohol) films containing small amount of collagen," Appl. Surf. Sci. 255(7), 4135-4139 (2009).

[64] Sionkowska, A., Kozlowska, J., Planecka, A., and Skopinska-Wisniewska, J., "Collagen fibrils in UV irradiated poly(vinyl pyrrolidone) films," Appl. Surf. Sci. 255(5, Part1), 2030-2039 (2008).

[65] Skopinska-Wisniewska, J., Sionkowska, A., Kaminska, A., Kaznica, A., Jachimiac, R., and Drewa, T., "Surface characterization of collagen/elastin based biomaterials for tissue regeneration," Appl. Surf. Sci., 255, 8286–8292 (2009).

[66] Sionkowska,A., "Modification of collagen films by ultraviolet irradiation", Polym. Degrad. Stabil. 68(2), 147-151 (2000).

[67] Kato, Y., Uchida, K., and Kawakishi, S., "Aggregation of collagen exposed to UVA in the presence of riboflavin: a plausible role of tyrosine modification," Photochem. Photobiol. 59(3), 343-349 (1994).

[68] Kato, Y., Nishikawa, T., and Kawakishi, S., "Formation of protein-bound 3,4-dihydroxyphenylalanine in collagen types I and IV exposed to ultraviolet light," Photochem. Photobiol., 61(4), 367-372. (1995).

[69] Menter, J.M., Williamson, G.D., Carlyle, K., Moore, C.L., and Willis, I., "Photochemistry of type I acid-soluble calf skin collagen: dependence on excitation wavelength," Photochem Photobiol., 62(3), 402-408. (1995).

[70] Sherratt, M.J., Bayley, C.P., Reilly, S.M., Gibbs, N.K., Griffiths, C.E.M., and Watson, R.E.B., "Low-dose ultraviolet radiation selectively degrades chromophore-rich extracellular matrix components," J.Pathil. 222(1), 32-40 (2010).

[71] Stylianou, A., Yova, D., Alexandratou, E., and Petri, A., "Atomic Force Imaging Microscopy Investigation of the Interaction of Ultraviolet Radiation with Collagen Thin Films," Proc. SPIE 8594, Nanoscale Imaging, Sensing, and Actuation for Biomedical Applications X, 85940E (February 19, 2013); doi:10.1117/12.2002460

[72] Achilli, M., Lagueux, J., and Mantovani, D., "On the effects of UV-C and pH on the mechanical behavior, molecular conformation and cell viability of collagen-based scaffold for vascular tissue engineering," Macromol. Biosci. 10(3), 307-316 (2010).

[73] Caruso, A.B., Dunn, M.G., "Changes in mechanical properties and cellularity during long-term culture of collagen fiber ACL reconstitution scaffolds," J. Biomed. Mater. Res. A. 73(4), 388-397 (2005).

[74] Skopinska-Wisniewska, J., Sionkowska, A., Kaminska, A., Kaznica, A., Jachimiac, R., and Drewa, T., "Surface characterization of collagen/elastin based biomaterials for tissue regeneration," Appl. Surf. Sci., 255, 8286–8292 (2009).

[75] Rajan, N., Lagueux, J., Frederic, C., Pennock, W., and Mantovani, D., "Low Doses of Ultraviolet Radiation Stimulate Cell Activity in Collagen-based Scaffolds", Biotechnol. Prog., 24, 884-889 (2008).

[76] Bushell, G.R., Cahill, C., Clarke, F.M., Gibson, C.T., Myhra, S., and Watson, G.S. "Imaging and Force-Distance Analysis of Human, Fibroblasts In Vitro by Atomic Force Microscopy", Cytometry 36, 254–264 (1999).