



Εθνικό και Καποδιστριακό Πανεπιστήμιο Αθηνών

Σχολή Θετικών Επιστημών

Τμήμα Φυσικής

ΠΤΥΧΙΑΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ

**Επίδραση των παραγώγων καπνού στα έμμορφα στοιχεία του αίματος:
Απεικονιστική μελέτη με χρήση Μικροσκοπίου Ατομικής Δύναμης**

Δήμητρα Τσάκωνα

A.M.: 1110201200218

**Επιβλέπων: Δημοσθένης Σταμόπουλος, Αναπληρωτής Καθηγητής, Τομέας
Φυσικής Στερεάς Κατάστασης, Τμήμα Φυσικής**

ΑΘΗΝΑ

Αύγουστος-2017

Πρόλογος

Για τη διεκπεραίωση της παρούσας πτυχιακής εργασίας θα ήθελα, αρχικά, να ευχαριστήσω τον επιβλέποντα κ. Δημοσθένη Σταμόπουλο, Αναπληρωτή Καθηγητή στον τομέα Φυσικής Στερεάς Κατάστασης του τμήματος Φυσικής Αθηνών, για τη συνεργασία και την πολύτιμη συμβολή του στην ολοκλήρωσή της. Ένα μεγάλο ευχαριστώ για το χρόνο και τους εργαστηριακούς χώρους που διέθεσε για την πραγματοποίηση των πειραμάτων μου, καθώς και για τις γνώσεις που μου προσέφερε σε γενικότερο επίπεδο.

Ιδιαίτερες ευχαριστίες θα ήθελα να απευθύνω στην υποψήφια διδάκτωρ Μαρία Καραγεώργου, για την πολύτιμη βοήθειά της και το χρόνο που μου αφιέρωσε κατά την εκτέλεση του εργαστηριακού μέρους της εργασίας.

Θα ήθελα να ευχαριστήσω το τμήμα Φυσικής και το Ε.Κ.Ε.Φ.Ε. «Δημόκριτος», για την παραχώρηση του απαραίτητου, για τη διεκπεραίωση της εργασίας, εργαστηριακού χώρου και εξοπλισμού. Ιδιαίτερα, θέλω να αναφερθώ στον Διευθυντή Ερευνών E. Devlin, υπεύθυνο του Μικροσκοπίου Ατομικής Δύναμης που είναι εγκατεστημένο στο Ινστιτούτο Νανοεπιστήμης και Νανοτεχνολογίας του ΕΚΕΦΕ «Δημόκριτος», για την πρόσβαση που μου παρείχε σε αυτό.

Τέλος, ιδιαίτερες ευχαριστίες οφείλω και στην οικογένειά μου για την υποστήριξη και την εμπιστοσύνη τους καθ' όλη τη διάρκεια της ζωής μου.

Περίληψη εργασίας

Η παρούσα εργασία παρουσιάζει τα αποτελέσματα της *ex vivo* πειραματικής μελέτης της επίδρασης των παραγώγων του καπνού στα έμμορφα στοιχεία του αίματος, εστιάζοντας στα ερυθροκύτταρα και αιμοπετάλια. Το νέο χαρακτηριστικό της μελέτης είναι το γεγονός ότι πραγματοποιείται με τη βοήθεια Μικροσκοπίου Ατομικής Δύναμης-ΜΑΔ (Atomic Force Microscope-AFM), το οποίο δίνει τη δυνατότητα «χαρτογράφησης» της μεμβράνης κυττάρων στη νανοσκοπική κλίμακα ($1\text{nm}=10^{-9}\text{m}$). Δεδομένου του εισαγωγικού χαρακτήρα της παρούσας εργασίας, προτιμήσαμε να μελετήσουμε μόνο μία δότρια (Δ.Τ.), αλλά διεξοδικά. Μετά τη λήψη του δείγματος με φλεβοκέντηση, ακολούθησε άμεσα (εντός 2 ωρών) η επεξεργασία του στις κατηγορίες που αναφέρονται πιο κάτω.

Σε πειραματικό επίπεδο, αρχικά, παρασκευάζονται οι εξής κατηγορίες δειγμάτων: 1) δείγμα αναφοράς αιθανόλης (70% σε H_2O), 2) δείγμα αναφοράς παραγώγων καπνού σε αιθανόλη (70% σε H_2O), 3) δείγμα αναφοράς αυτόλογου πλάσματος, 4) δείγμα αναφοράς αυτόλογου πλάσματος σε αιθανόλη (70% σε H_2O), 5) δείγματα αναφοράς αυτόλογου πλάσματος με παράγωγα καπνού σε αιθανόλη (70% σε H_2O), 6) δείγμα αίματος σε αυτόλογο πλάσμα, 7) δείγματα αίματος σε αιθανόλη (70% σε H_2O), 8) δείγματα αίματος με παράγωγα καπνού διαλυμένα σε αιθανόλη (70% σε H_2O). Σημειώνεται ότι χρησιμοποιήσαμε ως διαλύτη για τα παράγωγα καπνού αιθανόλη, λόγω της καλής τους διαλυτότητας σε αυτήν. Τα δείγματα αίματος αφορούν δύο διακριτές κυτταρικές σειρές: α) ερυθροκύτταρα και β) αιμοπετάλια. Λεπτομέρειες για τις ακριβείς αναλογίες/συγκεντρώσεις δίνονται στον Πίνακα του Παραρτήματος στο τέλος της εργασίας.

Χρησιμοποιήθηκαν οι εξής πειραματικές τεχνικές: α) φυγοκέντρωση για την απομόνωση των ερυθροκυττάρων, αιμοπεταλίων και αυτόλογου πλάσματος, β) *ex vivo* ωρίμανση του εκάστοτε δείγματος με ήπια ανάδευση (20-30 στροφές το λεπτό) σε θερμοκρασία περιβάλλοντος, γ) κυτταρικός φυγοκεντρητής για τη δημιουργία μονοστρωματικών υμενίων ερυθροκυττάρων και αιμοπεταλίων, δ) Οπτικό Μικροσκόπιο (ΟΜ) για την εισαγωγική αξιολόγηση των μορφολογικών και γεωμετρικών χαρακτηριστικών των δειγμάτων στην κλίμακα των μικρομέτρων ($1\mu\text{m}=10^{-6}\text{m}$) και την εξακρίβωση της καταλληλότητάς τους για την περεταίρω μελέτη με το ΜΑΔ, στο οποίο θα αναφερθούμε αμέσως πιο κάτω. Ακόμα, χρησιμοποιήθηκε ε) φασματοφωτομετρία UV-visible για να διαπιστώσουμε την παρουσία αιθανόλης και παραγώγων καπνού σε αιθανόλη και να επιβεβαιώσουμε τη σχετική τους συγκέντρωση στα διάφορα δείγματα που μελετήσαμε.

Η πειραματική τεχνική ΜΑΔ είναι η βασική που χρησιμοποιήθηκε στην πτυχιακή μας εργασία δεδομένου ότι επιτρέπει την απεικόνιση των κυτταρικών μεμβρανών σε νανοσκοπική κλίμακα: μία αιχμηρή ακίδα πυριτίου διαμέτρου $<10\text{nm}$ υποβάλλεται σε εξαναγκασμένη ταλάντωση και ιχνηλατεί προοδευτικά την επιλεγμένη περιοχή με κατάλληλο βήμα (5-500nm), καταγράφοντας το σήμα της μορφολογίας σε ψηφιακή μορφή. Έτσι, με την τεχνική ΜΑΔ καταγράφεται ψηφιακή πληροφορία, μέσα από την οποία μπορούμε να μελετήσουμε όχι μόνο τα μικροσκοπικά αλλά κυρίως τα νανοσκοπικά χαρακτηριστικά των κυττάρων.

Στην παρούσα πτυχιακή εργασία εστιάζουμε κυρίως στη χρήση του ΜΑΔ και μελετάμε: α) στα ερυθροκύτταρα το ποσοστό αι) των εξελκώσεων (επιφανειακές αποδομήσεις των κυττάρων, που περιορίζονται κατά κανόνα στη μεμβράνη τους, με διάμετρο $>0,5\mu\text{m}$ και βάθος $<20\text{nm}$) και αιι) των κυστιδίων (μικρο/νανο-σκοπικά σωματίδια που προέρχονται από αποβολή κυτταροπλάσματος πιθανά συνοδευόμενου και από κυτταρική μεμβράνη, με διάμετρο $>0,5\mu\text{m}$), β) στα αιμοπετάλια το ποσοστό των ψευδοποδίων (νηματοειδείς σχηματισμοί, με μήκος $>2\mu\text{m}$). Ο πληθυσμός, N, των ερυθροκυττάρων ή αιμοπεταλίων που μελετάμε είναι κατά μέσο όρο 30. Στα πιο κάτω δεδομένα το σφάλμα ορίζεται ως ένα συμβάν προς το συνολικό πληθυσμό των κυττάρων, 1 συμβάν/N.

Από τη μελέτη των δειγμάτων των ερυθροκυττάρων, καταλήξαμε στο εν πρώτοις απροσδόκητο συμπέρασμα ότι η εμπλουτισμένη με παράγωγα καπνού αιθανόλη φαίνεται να δρα προστατευτικά στα κύτταρα συγκρινόμενη με την αιθανόλη (70% σε H_2O), αυτή καθ' αυτή. Συγκεκριμένα, παρατηρήσαμε ότι σε δείγμα αναφοράς άθικτου αίματος (χωρίς καμία επεξεργασία ή προσθήκη αντιδραστηρίου) έχουμε $0,44\pm0,02$ εξελκώσεις και $0,05\pm0,02$ κυστίδια/ερυθροκύτταρο, στο δείγμα του αίματος με την αιθανόλη έχουμε $1,18\pm0,03$ εξελκώσεις και $0,59\pm0,03$ κυστίδια/ερυθροκύτταρο, ενώ στο δείγμα του αίματος με την εμπλουτισμένη με παράγωγα καπνού αιθανόλη έχουμε $0,86\pm0,03$ εξελκώσεις και $0,62\pm0,03$ κυστίδια/ερυθροκύτταρο. Δηλαδή, είναι προφανής η επιβλαβής δράση της αιθανόλης και η σχετικά προστατευτική δράση των παραγώγων καπνού που βρίσκονται διαλυμένα σε αιθανόλη, σε σχέση με την αιθανόλη, αυτή καθ' αυτή.

Αντίθετα, στα δείγματα των αιμοπεταλίων, φαίνεται ότι τα παράγωγα καπνού διαλυμένα στην αιθανόλη εντείνουν ακόμα περισσότερο τη διαδικασία της ενεργοποίησής τους σε σχέση με την αιθανόλη αυτή καθ' αυτή. Αυτό προκύπτει από το γεγονός ότι το δείγμα αναφοράς των αιμοπεταλίων (χωρίς αντιδραστήριο αιθανόλης ή παραγώγων καπνού σε αιθανόλη) εμφάνιζε ελαφριά ενεργοποίησή τους (μικρή αύξηση του μεγέθους, χωρίς δημιουργία ψευδοποδίων), λόγω της μηχανικής καταπόνησης που υπέστησαν κατά τη φυγοκέντρωση. Αυτή η εικόνα άλλαξε με την προσθήκη αιθανόλης, όπου πλέον τα αιμοπετάλια είναι ενεργοποιημένα, δημιουργούν συσσωματώματα και παρουσιάζουν ψευδοπόδια, με στατιστική $0,27\pm0,02$ ψευδοπόδια/αιμοπετάλιο. Η εικόνα αυτή εντάθηκε περεταίρω στο δείγμα των αιμοπεταλίων όταν προσθέσαμε παράγωγα καπνού διαλυμένα σε αιθανόλη, αφού τα συσσωματώματα ήταν μεγαλύτερα και η ενεργοποίηση των κυττάρων αυξημένη με $0,57\pm0,03$ ψευδοπόδια/αιμοπετάλιο. Για διπλάσια συγκέντρωση παραγώγων καπνού διαλυμένων σε αιθανόλη, προέκυψε στατιστική με $0,58\pm0,02$ ψευδοπόδια/αιμοπετάλιο, δηλαδή φαίνεται να μην υπάρχουν ιδιαίτερες μεταβολές πέρα από μία κρίσιμη συγκέντρωση παραγώγων καπνού διαλυμένων σε αιθανόλη.

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

1.	Εισαγωγή - Θεωρητικό Μέρος	
1.1.	Παράγωγα καπνού.....	7
1.2.	Επικινδυνότητα στον άνθρωπο.....	7
1.3.	Ανταλλαγή αερίων στο αναπνευστικό σύστημα.....	9
1.4.	Έμμορφα στοιχεία περιφερικού αίματος.....	10
1.5.	Βασικές πρωτεΐνες του πλάσματος.....	12
1.6.	Επίδραση των παραγώγων καπνού στο αίμα.....	12
1.7.	Σκοπός εργασίας.....	14
2.	Πειραματικές τεχνικές	
2.1.	Οπτικό μικροσκόπιο (ΟΜ).....	15
2.2.	Μικροσκόπιο Ατομικής Δύναμης (ΜΑΔ).....	16
2.2.1.	Πλεονεκτήματα χρήσης ΜΑΔ.....	23
2.3.	Φασματοφωτομετρία απορρόφησης – UV Visible.....	23
3.	Πρωτόκολλο εργαστηριακής διαδικασίας	
3.1.	Προετοιμασία των δειγμάτων.....	25
3.2.	Εισαγωγική αξιολόγηση της καταλληλότητας των δειγμάτων.....	28
4.	Πειραματικές μετρήσεις – Συζήτηση των αποτελεσμάτων	
4.1.	Μετρήσεις φασματοφωμετρίας UV-vis.....	30
4.2.	Μετρήσεις ΟΜ.....	32
4.3.	Μετρήσεις ΜΑΔ.....	38
5.	Συμπεράσματα και μελλοντικοί στόχοι.....	51
6.	Βιβλιογραφία	54
7.	Παράρτημα	57

1. Εισαγωγή - Θεωρητικό Μέρος

1.1. Παράγωγα καπνού

Ο καπνός, κύριο συστατικό των εμπορεύσιμων τσιγάρων, αποτελείται από περίπου 4.000 χημικές ενώσεις και ουσίες, πολλές από τις οποίες είναι αποδεδειγμένα επιβλαβείς για την υγεία. Οι πιο βασικές από αυτές παρατίθενται παρακάτω [1.1.1], [1.1.2], [1.1.3], [1.1.4]:

- Νικοτίνη
- Πίσσα
- Μονοξείδιο του άνθρακα
- Φορμαλδεΐδη
- Αμμωνία
- Αρσενικό
- Ακετόνη
- Κάδμιο
- Βενζόλιο
- Βαρέα μέταλλα (κάδμιο, μόλυβδος)
- Κυανιούχες ενώσεις
- Μεθάνιο
- Νιτροζαμίνες
- DDT
- Τετραχλωράνθρακες
- Ραδιενεργό ραδόνιο και πολώνιο

1.2. Επικινδυνότητα στον άνθρωπο

Οι επιπτώσεις του παραγώγων καπνού, που εισέρχονται στον οργανισμό μέσω του τσιγάρου, είναι πολύ σοβαρές.

Η νικοτίνη είναι άκρως εθιστική [1.1.3] και δρα αυξάνοντας την αρτηριακή πίεση και τους καρδιακούς παλμούς του χρήστη όταν γίνεται κατάχρησή της. Η πίσσα, φράσσει τους πνεύμονες, καθώς περίπου το 70% εναποτίθεται στους ιστούς τους και αυξάνει τον κίνδυνο λοιμώξεων του αναπνευστικού συστήματος. Το μονοξείδιο του άνθρακα αποτελεί ένα άοσμο, δηλητηριώδες αέριο το οποίο συνδέεται στα ερυθρά αιμοσφαίρια, καταλαμβάνοντας τη θέση του οξυγόνου που κανονικά θα μεταφερόταν στους ιστούς. Περίπου το 15% του αίματος των καπνιστών δεσμεύεται για τη μεταφορά του μονοξειδίου, αντί του οξυγόνου, με αποτέλεσμα την καταπόνηση της καρδιάς. Η εισπνοή φορμαλδεΐδης και αμμωνίας μπορεί να οδηγήσει σε αναπνευστικά προβλήματα, όπως είναι το άσθμα. Ακόμα ένα πολύ επικίνδυνο συστατικό του καπνού είναι το αρσενικό, γνωστό ως ένα από τα πιο ισχυρά δηλητήρια και είναι υπεύθυνο για την εμφάνιση καρκίνου της ουροδόχου κύστης, των νεφρών, των πνευμόνων και του ήπατος. Ένας άλλος αποδεδειγμένα καρκινογόνος παράγοντας είναι το βενζόλιο, το οποίο κατά την

εισπνοή επικάθεται στα επιθήλια των πνευμόνων και στη συνέχεια κυκλοφορεί στο αίμα αλλοιώνοντάς το σταδιακά. Σύμφωνα με έρευνες, η χρόνια έκθεση σε χαμηλά επίπεδα καδμίου έχει αποδειχθεί ότι είναι νεφροτοξική και ενέχει κινδύνους καρκινογένεσης. Μάλιστα, τα επίπεδα του καδμίου που συγκεντρώνονται στο περίβλημα του ήπατος και των νεφρών αυξάνονται με την ηλικία, λόγω της έλλειψης μιας δραστικής βιοχημικής διαδικασίας για την εξάλλειψη της ουσίας σε συνδυασμό με νεφρική επαναπορρόφηση. Επίσης, υπάρχουν στοιχεία που συνδέουν την ουσία με νεφρικές δυσλειτουργίες αλλά και μείωση της οστικής πυκνότητας σε πληθυσμούς με χρόνια έκθεση ακόμα και σε χαμηλά επίπεδα αυτής, χωρίς να παρουσιάζουν σημάδια διατροφικής ανεπάρκειας (έλλειψη ασβεστίου, ψευδαργύρου)[1.1.1].

Η συχνότερη αιτία θανάτων από καρκίνο, ο καρκίνος των πνευμόνων, σχετίζεται άμεσα με τη χρήση προϊόντων καπνού, καθώς οι πνεύμονες είναι άμεσα εκτεθειμένοι στις καρκινογόνες ουσίες που περιέχονται σε αυτά. Επιπροσθέτως, παρατηρούνται χρόνιες πνευμονοπάθειες, όπως βρογχίτιδα, εμφύσημα, δύσπνοια και άσθμα, παθήσεις που ταλαιπωρούν ακόμα και τους παθητικούς καπνιστές. Αυτές προκαλούνται με την κατακάθιση της πίσσας στους πνεύμονες, καλύπτοντας τους βρόγχους και τις κυψελίδες.

Εκτός από τον καρκίνο των πνευμόνων, το κάπνισμα φαίνεται ως το κύριο αίτιο για τον καρκίνο του στόματος, του λάρυγγα, του οισοφάγου, του παγκρέατος, της ουροδόχου κύστης και του πεπτικού συστήματος εν γένει. Οι μορφές αυτές εμφανίζονται είτε σε θέσεις άμεσα εκτεθειμένες στον καπνό, είτε σε άλλες περιοχές όπου δρουν τα τοξικά παράγωγα μέσω της κυκλοφορίας τους στο αίμα. Αυτές οι τοξικές ουσίες έχουν την ιδιότητα να προκαλούν αλλαγές στο γενετικό υλικό κυττάρων και έτσι τα κύτταρα που έχουν υποστεί μεταβολή κάποια στιγμή χάνουν τον έλεγχο του πολλαπλασιασμού και της ανάπτυξής τους και καθίστανται καρκινικά.

Πολύ συνήθεις είναι και οι παθήσεις στεφανιαίων αγγείων της καρδιάς, του εγκεφάλου [1.2.1] και των άκρων του σώματος και αυτό γιατί τα παράγωγα καπνού στενεύουν τα τοιχώματα των αγγείων και δυσχεραίνεται η αιμάτωση των κυττάρων. Το συστηματικό κάπνισμα προκαλεί ελάττωση της καλής χοληστερόλης και οξειδωση της κακής, με αποτέλεσμα να γίνονται πιο βλαπτικά τα μόρια για τον οργανισμό. Επίσης, σημειώνεται καταπόνηση της καρδιάς η οποία υπερλειτουργεί ώστε να αντλείται ικανοποιητική ποσότητα οξυγόνου στο σώμα, καθώς η παροχή του μειώνεται περιφερειακά λόγω του τσιγάρου. Παρατηρείται ενίσχυση της θρομβογόνου δράσης, δυσλειτουργία του ενδοθηλίου, σπασμός στις στεφανιαίες αρτηρίες, παρακώλυση της κυκλοφορίας του αίματος στα άκρα και πολλά ακόμα, γι' αυτό και το κάπνισμα έχει συνδεθεί ευρέως με την πρόκληση εμφραγμάτων του μυοκαρδίου, εγκεφαλικών επεισοδίων και γάγγραινας των άκρων.

Πέρα από το γεγονός ότι η χρόνια χρήση προϊόντων καπνού εντείνει την εξέλιξη της οστεοπόρωσης κυρίως στις γυναίκες, προκαλεί και προβλήματα γονιμότητας και στα δύο φύλα, με αποτέλεσμα να είναι πολλές φορές δύσκολη η σύλληψη ή και να προκαλούνται αποβολές. Αξίζει να σημειωθεί ότι νεογνά από καπνίστριες μητέρες, γεννιούνται πρόωρα, με μικρότερο σωματικό βάρος, ενώ μπορεί να παρουσιάζουν αναπνευστικά προβλήματα, προβλήματα

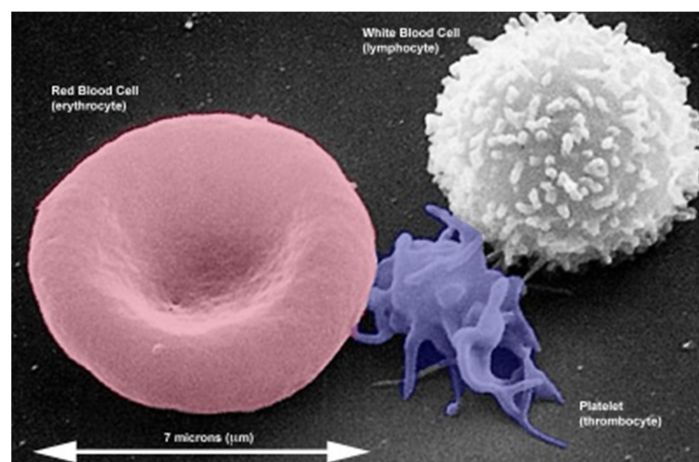
ανάπτυξης των νοητικών λειτουργιών και μεγαλύτερη περιγεννητική θνησιμότητα. [1.1.3],[1.1.4],[1.2.2]

1.3. Ανταλλαγή αερίων στο αναπνευστικό σύστημα

Το απαραίτητο για τη ζωή οξυγόνο τροφοδοτείται στον οργανισμό μέσω της διαδικασίας της αναπνοής. Η αναπνοή είναι η ανταλλαγή δύο βασικών αερίων, του οξυγόνου και του διοξειδίου του άνθρακα, που συντελείται στο αναπνευστικό σύστημα. Πιο συγκεκριμένα, με την εισπνοή εισέρχεται ο ατμοσφαιρικός αέρας στη ρινική ή τη στοματική κοιλότητα, και έπειτα στο φάρυγγα όπου θερμαίνεται και καθαρίζεται. Στη συνέχεια, κατευθύνεται στο λάρυγγα, στην τραχεία και τους βρόχους και καταλήγει στα κύρια όργανα του αναπνευστικού συστήματος, τους πνεύμονες. Σε αυτούς, οι βρόχοι διακλαδίζονται σε μικρότερες απολήξεις, τα αεροθυλάκια που φέρουν σταφυλοειδείς προεκβολές, τις αναπνευστικές κυψελίδες, οι οποίες συγκρατούν το διοξείδιο του άνθρακα. Οι κυψελίδες αποτελούνται από ένα λεπτό τοίχωμα που σχηματίζει την αναπνευστική μεμβράνη και γύρω από αυτές υπάρχει ένα δίκτυο τριχοειδών αιμοφόρων αγγείων, των πνευμονικών τριχοειδών, στα οποία κυκλοφορεί αίμα που επιστρέφει στους ιστούς. Το αέριο οξυγόνο έχει την ιδιότητα να προσκολλάται στα ερυθρά αιμοσφαίρια στο αίμα, ενώ το διοξείδιο του άνθρακα αποβάλλεται από αυτά και περνά στον αέρα των κυψελίδων. Με αυτόν τον τρόπο αλλάζει η σύσταση του αέρα: κατά την αναπνοή είναι πλούσιος σε οξυγόνο και φτωχός σε διοξείδιο του άνθρακα, ενώ κατά την εκπνοή είναι πλούσιος σε διοξείδιο και φτωχός σε οξυγόνο. Κατά την εκπνοή, ο αέρας αποβάλλεται μέσω της αεροφόρου οδού της μύτης ή του στόματος. Στη συνέχεια ακολουθεί νέα εισπνοή που ανανεώνει τον αέρα στις κυψελίδες κ.ο.κ. Έτσι, τα τριχοειδή αγγεία μεταφέρουν το οξυγόνο στους ιστούς και τα όργανα του σώματος για την επιτέλεση σημαντικών λειτουργιών του οργανισμού. [1.3.1]

Οι ρύποι της ατμόσφαιρας και ο καπνός του τσιγάρου δημιουργούν σοβαρά προβλήματα στη λειτουργία των πνευμόνων, γιατί επικάθονται στα λεπτά τοιχώματα των κυψελίδων, περιορίζοντας τη δυνατότητα ανταλλαγής αερίων. Όταν υπάρχουν ρύποι στην ατμόσφαιρα, κατά την εισπνοή εισέρχονται στον οργανισμό βλαβερές ουσίες, όπως μονοξείδιο και διοξείδιο του άνθρακα, οξείδια του θείου και του αζώτου. Πολλές από τις ουσίες αυτές περνούν με την αναπνοή στο αίμα. Έτσι λοιπόν, εκτός, όμως από το ενεργητικό κάπνισμα, μπορούν να προκληθούν σοβαρές παθήσεις στο αναπνευστικό σύστημα και από το παθητικό κάπνισμα. [1.2.2], [1.3.2]

1.4. Έμμορφα στοιχεία περιφερικού αίματος



Εικόνα 1.4.α: Φυσιολογικό ερυθροκύτταρο, αιμοπετάλιο και λευκό αιμοσφαίριο
(https://embryology.med.unsw.edu.au/embryology/index.php/ANAT2241_Blood)

Το αίμα αποτελείται από πλάσμα σε ποσοστό 55% και από έμμορφα στοιχεία σε ποσοστό 45%. Ουσιαστικά, δηλαδή, πρόκειται για ένα εναιώρημα κυττάρων στο υγρό πλάσμα. Το πλάσμα χωρίς τα κύτταρα και τους παράγοντες πήξεως ονομάζεται ορός και περιλαμβάνει μόνο ηλεκτρολύτες και σάκχαρα. [1.4.1]

Τα κύτταρα του αίματος μπορούν να απομονωθούν από το πλάσμα ή τον ορό με φυγοκέντρωση. Το πλάσμα είναι ένα ελαφρώς αλκαλικό υγρό με ένα τυπικό υποκίτρινο χρώμα. Αποτελείται κατά 90% από νερό και κατά 10% από άνυδρη ύλη. Εννέα μέρη αυτού είναι οργανικές ουσίες και ένα μέρος αποτελείται από μεταλλικά στοιχεία. Αυτές οι οργανικές ουσίες αποτελούνται από γλυκίδια (γλυκόζη), λιπίδια (χοληστερίνη, τριγλυκερίδια, φωσφολιπίδια, λεκιθίνη, λίπη), πρωτεΐνες (σφαιρίνες, αλβουμίνες, ινωδογόνο), γλυκοπρωτεΐνες, ορμόνες (ερυθροποιητίνη, θρομβοποιητίνη), αμινοξέα και βιταμίνες. Οι ανόργανες ουσίες διαλύονται σε ιοντική μορφή δίνοντας θετικά και αρνητικά ιόντα. [1.4.1], [1.4.2]

Τα κύτταρα του αίματος ταξινομούνται σε τρεις κατηγορίες [1.4.1], [1.4.3]: τα ερυθροκύτταρα, τα λευκοκύτταρα και τα αιμοπετάλια. Θα τα περιγράψουμε αναλυτικότερα στη συνέχεια.

Το αίμα εκτελεί πολλές σημαντικές λειτουργίες στον οργανισμό. Με τη βοήθεια της αιμοσφαιρίνης, που περιέχεται στα ερυθρά αιμοσφαίρια, μεταφέρει οξυγόνο στους ιστούς και συλλέγει το διοξείδιο του άνθρακα. Μεταφέρει, επίσης, θρεπτικές ουσίες (π.χ. αμινοξέα, σάκχαρα, ανόργανα άλατα), ορμόνες, ένζυμα και βιταμίνες ενώ συγκεντρώνει και απεκκρίνει οι οποίες τελικά εξαλείφονται από τους νεφρούς. Άλλη μία σημαντική λειτουργία του αίματος και συγκεκριμένα των λευκοκυττάρων, είναι στην άμυνα του οργανισμού, μέσω της φαγοκυττάρωσης. Αυτή επιτυγχάνεται με τη δράση των λεμφοκυττάρων με τη βακτηριοκτόνο ισχύ του ορού και την ανοσολογική απόκριση των λευκοκυττάρων.

Τα ερυθρά αιμοσφαίρια, ή αλλιώς ερυθροκύτταρα, είναι τα πιο πολυάριθμα κύτταρα του αίματος με πληθυσμό περίπου $4-6 \text{ εκατομμύρια}/\text{mm}^3$ και διάμετρο που κυμαίνεται μεταξύ 6

και 8 μm . Σε όλα τα θηλαστικά, τα ερυθροκύτταρα έχουν χάσει τον πυρήνα και τα περισσότερα κυτταρικά οργανίδια και έχουν σχήμα αμφίκοιλου δίσκου. Στο εσωτερικό τους, δομούνται από ένα πολύπλοκο τρισδιάστατο δίκτυο πρωτεϊνικών ινιδίων και μικροσωλινίσκων, που αποτελεί τον κυτταροσκελετό και βρίσκεται σε μία διαρκή δυναμική κατάσταση δόμησης και αποδόμησης, με κύριο ρόλο τη στήριξη και την κίνηση των κυττάρων[1.4.4]. Είναι πλούσια σε αιμοσφαιρίνη, μία πρωτεΐνη που περιέχει σίδηρο και είναι ικανή να συνδέεται με το οξυγόνο και ως εκ τούτου, τα κύτταρα αυτά είναι υπεύθυνα για την παροχή οξυγόνου στους ιστούς και εν μέρει για την αποβολή διοξειδίου του άνθρακα. Ωστόσο, το περισσότερο διοξείδιο μεταφέρεται στο πλάσμα με τη μορφή διαλυτών ανθρακικών αλάτων. Στην επιφάνειά τους, παρατηρούνται πολλές φορές αποδομήσεις της κυτταρικής τους μεμβράνης με βάθος περίπου της τάξης μεγέθους του πάχους της μεμβράνης (5-10nm), δηλαδή έως και 20nm, γνωστές και ως εξελκώσεις[1.4.8]. Αποδομήσεις μεγαλύτερης τάξης μεγέθους μπορούν να συμβούν κατά την αποβολή κυτταρικού υλικού, το οποίο, κατά πάσα πιθανότητα, αποτελείται από κυτταρόπλασμα και τμήματα κυτταρικής μεμβράνης. Η εξωκυττάρωση αυτή πραγματοποιείται μέσω κυστιδίων, μικρο/νανοσκοπικών οργανιδίων που μεταφέρουν ή αποθηκεύουν στο εσωτερικό τους κυτταρικό υλικό[1.4.7], και οδηγεί σε ογκική αποδόμηση του κυττάρου. Οι αποδομήσεις μπορεί να προέρχονται είτε από φυσιολογικές διαδικασίες κυτταρικού θανάτου είτε από εξωκυτταρικούς παράγοντες[1.4.5]. Πολλές φορές οφείλονται και στη μηχανική καταπόνηση κατά τη διάρκεια της πειραματικής επεξεργασίας των κυττάρων[1.4.6]. Κάθε δευτερόλεπτο παράγονται κατά μέσο όρο 2,4 εκατομμύρια νέα ερυθροκύτταρα από το μυελό των οστών που έχουν διάρκεια ζωής στην κυκλοφορία του αίματος περίπου 120 ημέρες προτού φαγοκυτταρωθούν στο σπλήνα από μακροφάγα.

Τα αιμοπετάλια, ή αλλιώς θρομβοκύτταρα, είναι μικρά, δισκοειδή, διάφανα κυτταρικά θραύσματα, δηλαδή απύρρηνα κύτταρα με διάμετρο 2-3 μm προερχόμενα από θραύσματα μεγακαρυοκυττάρων. Ο μέσος όρος διάρκειας ζωής τους στον οργανισμό είναι 5-9 ημέρες. Τα αιμοπετάλια συμμετέχουν στην αιμόσταση, οδηγώντας στο σχηματισμό θρόμβων αίματος και αποτελούν μια φυσική πηγή αυξητικών παραγόντων. Αν υπάρχει έλλειψη αιμοπεταλίων, μπορεί να προκληθεί σοβαρή αιμορραγία. Αντίθετα, αν ο αριθμός τους είναι πολύ υψηλός τότε σχηματίζονται ανεπιθύμητοι θρόμβοι με αποτέλεσμα περιστατικά όπως εγκεφαλικά, εμφράγματα, πνευμονικές εμβολές, αποφράξεις αιμοφόρων αγγείων. Κατά τη διάρκεια μιας αιμορραγίας, τα αιμοπετάλια συσσωματώνονται, ενεργοποιούνται και απελευθερώνουν παράγοντες που προάγουν την πήξη του αίματος (π.χ. σεροτονίνη).

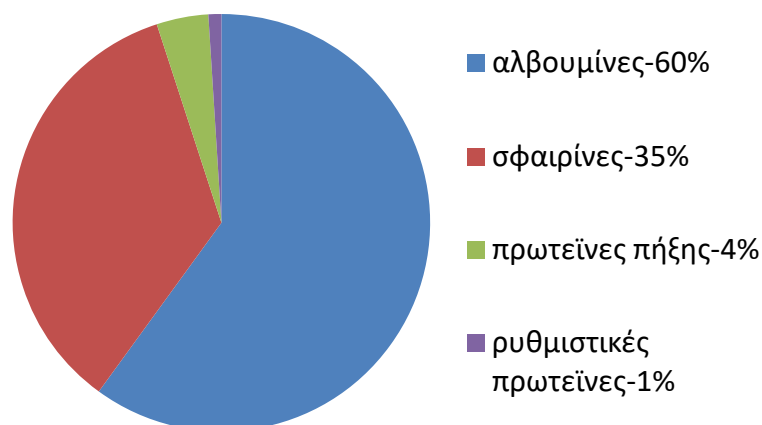
Τα λευκοκύτταρα, ή αλλιώς λευκά αιμοσφαίρια, είναι υπεύθυνα για την άμυνα του οργανισμού ενάντια στις λοιμώξεις αλλά και ενάντια σε ξένες πρωτεΐνες. Το μέγεθός τους είναι 7-21 μm σε διάμετρο, ο πληθυσμός τους είναι πολύ μικρότερος από αυτόν των ερυθρών αιμοσφαιρίων και η πυκνότητά τους υπολογίζεται στις 5-7 χιλιάδες/ mm^3 . Τα κύτταρα αυτά, σε αντίθεση με τα ερυθρά και τα αιμοπετάλια, έχουν πυρήνα και υποκυτταρικά οργανίδια. Η μέση διάρκεια ζωής τους κυμαίνεται μεταξύ 3 και 4 ημερών, παράγονται από το μυελό των οστών και διακρίνονται σε πέντε κύριους τύπους λευκών αιμοσφαιρίων:

-ουδετερόφιλα (50-70%)

- ηωσινόφιλα (2-4%)
- βασεόφιλα (0,5-1%)
- λεμφοκύτταρα (20-40%)
- μονοκύτταρα (3-8%)

Από αυτούς τους τύπους λευκοκυττάρων, οι τρεις πρώτοι συγκροτούν τα κοκκιοκύτταρα, ενώ οι τελευταίοι συγκροτούν τα λεμφοειδή κύτταρα. [1.4.1],[1.4.2],[1.4.3]

1.5. Βασικές πρωτεΐνες του πλάσματος



Όπως αναφέρθηκε και προηγουμένως, μετά τη φυγοκέντριση ενός δείγματος αίματος που είναι τοποθετημένο σε ειδικό σωλήνα που περιέχει αντιπηκτικό, παρατηρούμε να διαχωρίζονται τα συστατικά του. Το 55% του δείγματος είναι το υπερκείμενο υγρό, το πλάσμα και το υπόλοιπο 45%, τα έμμορφα στοιχεία του αίματος. Το πλάσμα αποτελείται κατά 92% από νερό, κατά 7% από πρωτεΐνες και το υπολειπόμενο 1% είναι ανόργανα ιόντα.

Οι περισσότερες πρωτεΐνες του πλάσματος παράγονται στο ήπαρ. Οι αλβουμίνες (λευκωματίνες) αποτελούν το 60% των πρωτεϊνών, συμβάλλουν στην οσμωτική πίεση, βοηθούν στον έλεγχο της ισορροπίας του νερού και εμπλέκονται στη μεταφορά των ουσιών στο αίμα, συμπεριλαμβανομένων και των φαρμάκων. Οι σφαιρίνες αποτελούν το 35% του συνόλου των πρωτεϊνών του πλάσματος με μερικές να περιλαμβάνουν αντισώματα, ενώ κάποιες άλλες να έχουν λειτουργίες μεταφοράς λιπιδίων. Οι σφαιρίνες είναι μικρότερες σε μέγεθος από ότι οι αλβουμίνες. Περίπου το 4% των πρωτεϊνών, όπως το ινωδογόνο, έχουν λειτουργίες πήξης και, τέλος, λιγότερο από 1% είναι ρυθμιστικές πρωτεΐνες, όπως είναι τα μεταβολικά ένζυμα. [1.5.1]

1.6. Επίδραση των παραγώγων καπνού στο αίμα

Είναι ευρέως γνωστό ότι το κάπνισμα επηρεάζει τη γενική υγεία του ατόμου. Τα ερυθρά αιμοσφαίρια και η αρχιτεκτονική τους είναι ιδιαίτερα ευάλωτα σε εισπνεόμενες τοξίνες που σχετίζονται με το κάπνισμα. Το κάπνισμα ευθύνεται για τους περισσότερους θανάτους σε όλο τον κόσμο, καθώς ένα άτομο που καπνίζει εκτίθεται σε υπερβολικές ποσότητες οξειδωτικών και των τοξινών που παράγουν μέχρι και 10^{18} ελεύθερες ρίζες στο ανθρώπινο σώμα. Πρόσφατα,

αναφέρθηκε ότι το κάπνισμα μειώνει την ελαστικότητα της ερυθροκυτταρικής μεμβράνης. Σύμφωνα με μελέτες με χρήση μικροσκοπίου ηλεκτρονικής σάρωσης, είναι ορατές ορισμένες μεταβολές στην τοπογραφία των μεμβρανών όπου εμφανίζεται σχηματισμός φυσαλίδων στο φωσφολιπιδικό στρώμα. Ακόμα παρατηρείται μια τάση για εχινοκυττάρωση με τα ερυθροκύτταρα να εμφανίζουν αρκετές αιχμηρές προεξοχές. [1.6.1] Από τη μελέτη των ερυθροκυττάρων σε ΜΑΔ, προκύπτει ότι η μέση επιφανειακή τραχύτητα στην ομάδα ελέγχου είναι $1,2 \pm 0,2$ nm, σε αντίθεση με την ομάδα των καπνιστών που είναι $5,5 \pm 3$ nm. Τέτοιες βλάβες επιτρέπουν στις τοξίνες (CO, υπεροξειδία, αλδεϋδες) να εισέλθουν στα κύτταρα όπου απορροφώνται έντονα από την αιμοσφαιρίνη οδηγώντας σε υψηλές τιμές αιμόλυσης, όπως φαίνεται από τα φασματικά χαρακτηριστικά των μεταβολιτών. Αυτό αποδεικνύει ότι η μέση διάρκεια ζωής των ερυθροκυττάρων ενός καπνιστή είναι σημαντικότερα μικρότερη από εκείνη της ομάδας ελέγχου.[1.6.2]

Το κάπνισμα, όπως και ορισμένες ασθένειες μπορούν να οδηγήσουν στο σχηματισμό αιμίνης. Η αιμίνη είναι το προϊόν της οξείδωσης της αιμοσφαιρίνης η συσσώρευση της οποίας προκαλεί καταστροφή των ερυθροκυτταρικών μεμβρανών. Σε κλίμακα νανομέτρου παρατηρούνται αυτές οι τοπολογικές ατέλειες στις μεμβράνες με το σχηματισμό δομών που μοιάζουν με κόκκους τυπικών μεγεθών 120-200 nm. Η διαδικασία σχηματισμού των κόκκων εξαρτάται από τη συγκέντρωση της αιμίνης και το χρόνο επώασης. Η αυξημένη συγκέντρωση αιμίνης ευθύνεται για την αλλαγή στο σχήμα των ερυθροκυττάρων, τα οποία από δισκοειδή εμφανίζουν εχινοκυττάρωση και σφαιροκυττάρωση.[1.6.3] Έρευνα έδειξε, επίσης, ότι ορισμένα παράγωγα του καπνού προκαλούν αιμόλυση, δηλαδή καταστροφή ερυθροκυττάρων και αποβολή της αιμοσφαιρίνης από αυτά[1.6.4]. Πιο συγκεκριμένα, οι καπνιστές εμφάνισαν αιμόλυση σε ποσοστό 21.6% περισσότερο από τους μη καπνιστές, που οφείλεται στη δράση της νικοτίνης και της κοτινίνης (χημική ουσία που παράγεται στον ανθρώπινο οργανισμό όταν αυτός εκτίθεται στη νικοτίνη)[1.6.5]. [1.6.6]

Ακόμα, με τη χρήση προηγμένων μικροσκοπίων, έγινε εμφανής η επίδραση των παραγώγων καπνού και στα αιμοπετάλια. Παρατηρήθηκε αύξηση της συγκολλητικότητάς τους, με αποτέλεσμα να αυξάνεται ο κίνδυνος εμφάνισης θρομβώσεων[1.6.7]. Οι έρευνες έδειξαν αλλαγές στη μεμβράνη των αιμοπεταλίων. Συγκεκριμένα, παρατηρήθηκαν μεταβολές στη λιπιδική διπλοστιβάδα με καταστροφή των πολυακόρεστων λιπαρών οξέων που περιέχονται σε αυτήν, που προκαλούν αιμόλυση και αποσταθεροποίηση της μεμβράνης, εξαιτίας του αυξημένου ποσοστού υπεροξειδίου στον οργανισμό των καπνιστών.

Άλλη μία σοβαρή επίπτωση του καπνίσματος στον άνθρωπο, η οποία σχετίζεται με τη δράση των αιμοπεταλίων, είναι ασθένειες όπως το θρομβοεμβολικό ισχαιμικό επεισόδιο, που παραμένει η δεύτερη πιο κοινή αιτία θανάτου παγκοσμίως. Ο λόγος είναι η αλλοίωση των αιμοπεταλίων στο αίμα, κυττάρων που διαδραματίζουν θεμελιώδη ρόλο στην πήξη του αίματος. Έπειτα από σύγκριση των αιμοπεταλίων μεταξύ καπνιστών, ασθενών και υγιών δοτών, τα αποτελέσματα έδειξαν ότι το μέτρο ελαστικότητας των αιμοπεταλίων των ασθενών μειώνεται έως και 40%, ενώ των καπνιστών που δε νοσούν έως και 20%. Δηλαδή, τόσο οι ασθενείς με

εγκεφαλικό επεισόδιο όσο και οι καπνιστές έχουν μεγαλύτερο ποσοστό ενεργοποιημένων αιμοπεταλίων σε σύγκριση με τον υγιή πληθυσμό και εμφανίζουν εξέχουσα αναδιάταξη του κυτταροσκελετού. Όλα αυτά επιβεβαιώνουν ότι το κάπνισμα είναι ένας σοβαρός παράγοντας κινδύνου για την πρόκληση παθήσεων που σχετίζονται με θρομβώσεις.[1.2.1]

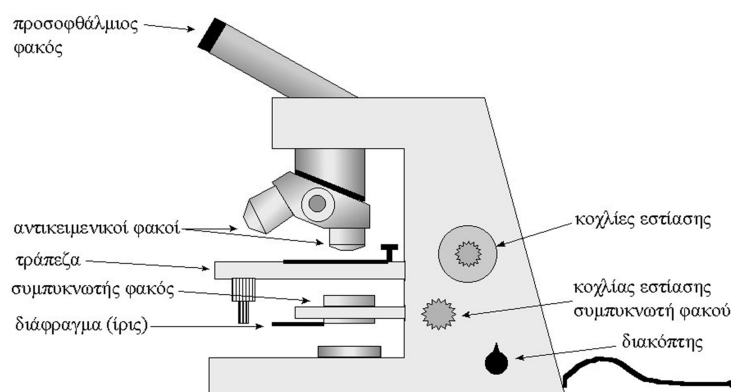
1.7. Σκοπός εργασίας

Τα τελευταία χρόνια πραγματοποιούνται πολλές έρευνες με σκοπό τη μελέτη των πιθανών προβλημάτων που προκαλεί η συνήθεια του καπνίσματος. Οι περισσότερες από αυτές επικεντρώνονται στις καρκινικές του επιπτώσεις, μιας και αυτές είναι πολύ διαδεδομένες σε μεγάλο ποσοστό του πληθυσμού και δείχνουν να εντείνονται με το πέρασμα των χρόνων. Επιπλέον, το τσιγάρο θεωρείται πως συντελεί πρωταγωνιστικά στις καρδιαγγειακές παθήσεις αλλά και στις παθήσεις του αναπνευστικού, που είναι δύο ακόμα τομείς που απασχολούν την επιστημονική κοινότητα, γύρω από τους οποίους έχουν πραγματοποιηθεί πολυάριθμες μελέτες. Στις μελέτες αυτές, κατά κανόνα, εξετάζεται βιολογικό υλικό (μακροσκοπικά τμήματα θρομβωμένων αγγείων, κύτταρα περιφερικού αίματος που συμμετέχουν στη δημιουργία θρόμβων όπως τα αιμοπετάλια αλλά και τα μικρο/νανο-κυστίδια, κ.ά.) στο οποίο γίνεται βιοψία με χρήση χρωστικών/φθοριζουσών ουσιών στο συμβατικό OM. Μελέτες που να χρησιμοποιούν απεικονιστικές τεχνικές σε κυτταρικό και υποκυτταρικό επίπεδο με διακριτική ικανότητα στην κλίμακα των νανομέτρων είναι περιορισμένες σε αριθμό.

Στην παρούσα εργασία, γίνεται μία προσπάθεια προσέγγισης των επιπτώσεων των παραγώγων καπνού στο αίμα με τη χρήση του ΜΑΔ, το οποίο παρέχει τη δυνατότητα λήψης εικόνων σε νανοσκοπικές διαστάσεις. Πιο συγκεκριμένα, γίνεται απεικονιστική μελέτη σε διαστάσεις της τάξης του 10^{-9} nm της επίπτωσης των παραγώγων καπνού στα έμμορφα στοιχεία του αίματος, πραγματοποιώντας *ex vivo* πειράματα. Αναζητούνται, δηλαδή, τυχόν αλλοιώσεις, γενικά στη μορφή των ερυθροκυττάρων αλλά και ειδικά στην επιφάνειά τους (εξελκώσεις) καθώς και φαινόμενα εξωκυττάρωσης (μικρο/νανο-κυστίδια). Όσον αφορά τα αιμοπετάλια, στόχος μας είναι η μελέτη της πιθανής ενεργοποίησής τους, η οποία γίνεται αντιληπτή μέσω της παρατήρησης των μηχανισμών ενεργοποίησης, όπως είναι η αύξηση του μεγέθους τους και ο χαρακτηριστικός σχηματισμός ψευδοποδίων με σκοπό τη θρομβοποίηση.

2. Πειραματικές τεχνικές

2.1. Οπτικό Μικροσκόπιο (ΟΜ)



Εικόνα 2.1.α: Αναπαράσταση οπτικού μικροσκοπίου
(<http://www.aua.gr/fasseas/optika%20mikroskopia.htm>)

Όπως δηλώνει και το όνομά τους, τα οπτικά είναι μικροσκόπια που χρησιμοποιούν το τμήμα του ηλεκτρομαγνητικού φάσματος στο οποίο ανήκει το ορατό, δηλαδή μήκη κύματος από 380 έως 760 nm, με σκοπό την παρατήρηση αντικειμένων υπό μεγέθυνση. Η λειτουργία τους στηρίζεται στη χρήση δέσμης διερχόμενου ή ανακλώμενου φωτός προς τα προς μελέτη αντικείμενα.

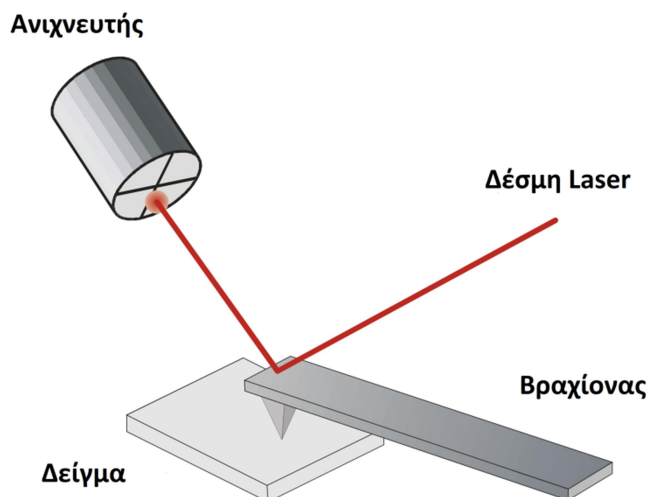
Το ΟΜ αποτελείται από τα εξής βασικά στοιχεία: μία πηγή φωτός, ένα συγκεντρωτικό φακό, έναν αντικειμενικό φακό και έναν προσοφθάλμιο φακό. Η τελική μεγέθυνση εξαρτάται από τους φακούς που χρησιμοποιούνται και φτάνει περίπου μέχρι και 2000×. Το προς μελέτη αντικείμενο τοποθετείται πολύ κοντά στο συγκλίνοντα αντικειμενικό φακό, μικρής εστιακής απόστασης, ο οποίος σχηματίζει ένα πραγματικό είδωλο αυτού. Στη συνέχεια, το είδωλο μεγεθύνεται από τον άλλο συγκλίνοντα φακό, τον προσοφθάλμιο, ο οποίος τώρα σχηματίζει ένα φανταστικό είδωλο του αντικειμένου, που είναι και η εικόνα που παρατηρούμε τελικά. Το φανταστικό είδωλο σχηματίζεται σε μία απόσταση από τον παρατηρητή που βρίσκεται μεταξύ της ελάχιστης και της μέγιστης απόστασης ευκρινούς οράσεως.

Η μέγιστη μεγεθυντική ισχύς (Magnifying Power-MP) του μικροσκοπίου είναι: $MP = M_T \cdot M_A$, όπου M_T : η εγκάρσια μεγέθυνση (Transverse Magnification) του αντικειμενικού φακού και M_A : η γωνιακή μεγέθυνση (Angular Magnification) του προσοφθάλμιου φακού. Άλλα χαρακτηριστικά μεγέθη στο ΟΜ, είναι το αριθμητικό άνοιγμα (Numerical Aperture- NA): $NA = n \cdot \sin\theta$, όπου n : ο δείκτης διάθλασης του μέσου που παρεμβάλλεται μεταξύ αντικειμένου και αντικειμενικού φακού και θ : το μισό γωνιακό άνοιγμα του αντικειμενικού φακού και η διακριτική ικανότητα (Resolution- R): $R = 0.61 \lambda / NA$, όπου λ : το μήκος κύματος του φωτός που χρησιμοποιείται για το φωτισμό του αντικειμένου. Για τον υπολογισμό της μέγιστης χρήσιμης μεγέθυνσης (M) του μικροσκοπίου, λαμβάνουμε υπόψη και τη διακριτική

ικανότητα του ματιού εκάστοτε παρατηρητή (R_e): $M = R_e/R_m$, όπου R_m : η διακριτική ικανότητα του αντικειμενικού φακού.

Για την εστίαση χρησιμοποιείται ένας κοχλίας ο οποίος μετακινεί όλο το οπτικό σύστημα ως προς το παρατηρούμενο αντικείμενο, μέχρι να επιτευχθεί η καλύτερη δυνατή ευκρίνεια. [2.1.1]

2.2. Μικροσκόπιο Ατομικής Δύναμης (ΜΑΔ)



Εικόνα 2.2.α: Αναπαράσταση λειτουργίας ΜΑΔ

(<http://www.ferroic.mat.ethz.ch/research/methods/atomic-force-microscope.html>)

Το ΜΑΔ είναι ένα μικροσκόπιο το οποίο παρέχει πολύ μεγάλη ακρίβεια στη μελέτη δειγμάτων, της τάξης των nm. Η λειτουργία του στηρίζεται στη μικροσκόπηση δειγμάτων με μηχανικό τρόπο, που κατ' επέκταση, σημαίνει ότι δεν απαιτείται να είναι αγωγίμα. Στο μικροσκόπιο αυτό, χρησιμοποιείται ένα τσιπ κατασκευασμένο από οξείδια ή νιτρίδια του πυριτίου που τοποθετείται στην κεφαλή του μικροσκοπίου. Το τσιπ αυτό καταλήγει σε ένα μακροσκοπικό, εύκαμπτο βραχίονα μήκους 100-300 μm , πλάτους 10-40 μm και πάχους 0,5-3 μm το οποίο φέρει στην άκρη του μία αιχμηρή ακίδα, η οποία λειτουργεί ως «όργανο αφής» πάνω στην επιφάνεια του προς μελέτη δείγματος. Οι συμβατικές ακίδες του εμπορίου έχουν πάχος περίπου 5-15 nm ενώ οι λεγόμενες υπεραιχμηρές ακίδες φτάνουν να έχουν διαστάσεις στο κατώτερο σημείο τους της τάξης του 1 nm. Ουσιαστικά, οι πολύ μικρές διαστάσεις της ακίδας παρέχουν την υψηλή διακριτική ικανότητα στην απεικόνιση των δειγμάτων.

Το ΜΑΔ γενικά, μπορεί να έχει τρεις διαφορετικές λειτουργίες, που σχετίζονται με την απόσταση μεταξύ της επιφάνειας του δείγματος και της ακίδας, ανάλογα με τη φύση του προς μελέτη δείγματος:

1. Λειτουργία επαφής (contact mode): Η ακίδα είναι σε επαφή με την επιφάνεια του δείγματος καθ' όλη τη διάρκεια της μέτρησης.
2. Λειτουργία ημι-επαφής (tapping mode): Η λήψη πληροφορίας στην επιφάνεια του δείγματος επιτυγχάνεται εφαρμόζοντας ελαφριά ταλάντωση στην ακίδα, κατά τη διάρκεια της μέτρησης. Η

μέθοδος αυτή χρησιμοποιείται κυρίως σε δείγματα με μαλακές επιφάνειες, γι' αυτό και βρίσκει εφαρμογή κυρίως σε βιολογικά υλικά.

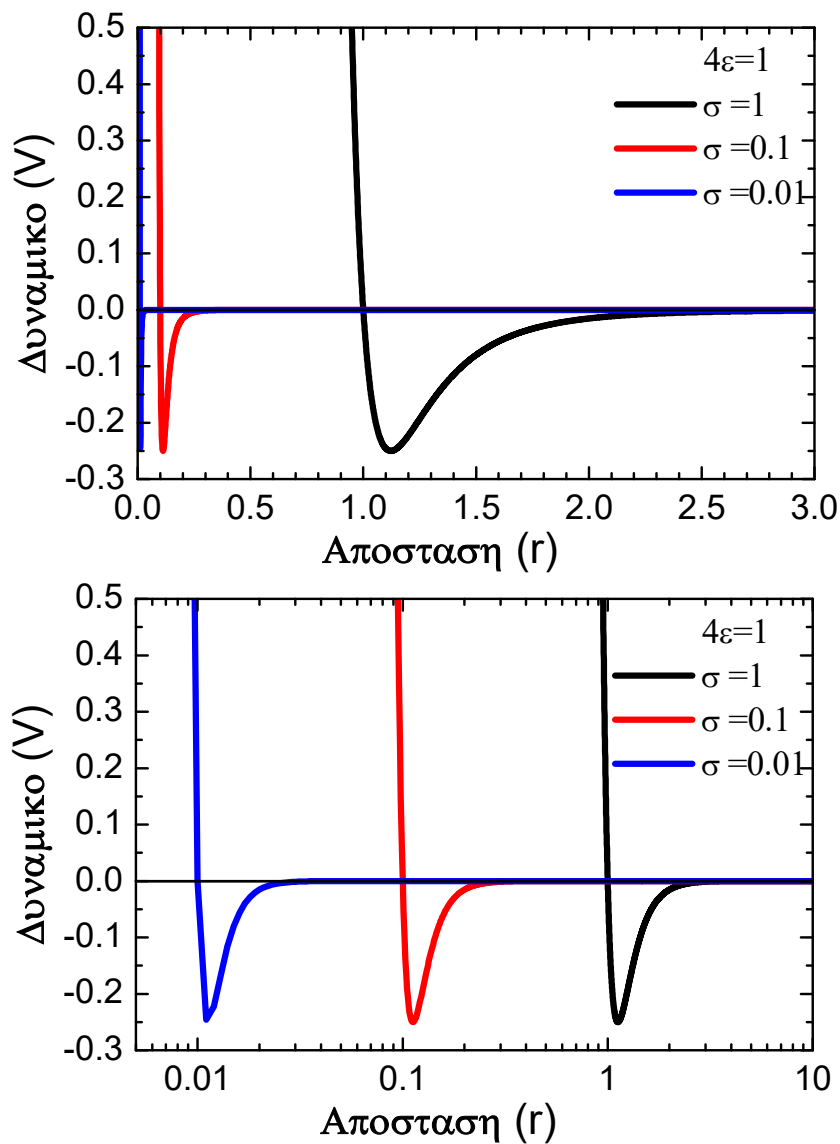
3. Λειτουργία μη επαφής (non-contact mode): Ανιχνεύονται οι ελκτικές δυνάμεις Van der Waals, που αναπτύσσονται μεταξύ ακίδας και επιφάνειας του δείγματος, χωρίς να έρχονται σε επαφή κατά τη διάρκεια της μέτρησης.

Για τη λήψη πληροφορίας σε βιολογικά υλικά με χρήση ΜΑΔ (tapping mode), αρχικά, στον ελεύθερο χώρο, θέτουμε το βραχίονα σε εξαναγκασμένη ταλάντωση, σταθερού πλάτους και συχνότητας, επιβάλλοντάς την μέσω της πιεζοηλεκτρικής βάσης που φέρει το τσιπ. Συγκεκριμένα, το δείγμα τοποθετείται πάνω σε μια πιεζοηλεκτρική βάση που έχει τη δυνατότητα να αναπροσαρμόζει το ύψος της θέσης της ώστε να διατηρείται σταθερό το πλάτος και η συχνότητα της ταλάντωσης. Εν συνεχεία, κατευθύνουμε το βραχίονα προς το δείγμα έτσι ώστε το αιχμηρό άκρο της ακίδας στο κατώτατο σημείο της ταλάντωσής της να ακουμπάει την επιφάνεια του δείγματος και ορίζουμε τις σταθερές παραμέτρους του πλάτους και της ιδιοσυχνότητας της ταλάντωσης. Ο βραχίονας εκτός από την ταλάντωση στην κάθετη διεύθυνση z, εκτελεί και άλλες δύο κινήσεις σαρώνοντας το επίπεδο xy και έτσι κινείται «ψηλαφώντας» την επιφάνεια του δείγματος. Η κίνηση αυτή εκτελείται αλλάζοντας τομή σάρωσης κατά ένα μικρό, σταθερό βήμα που ρυθμίζεται από τον εκάστοτε χειριστή και καθορίζει τη διακριτική ικανότητα της εικόνας που θα εμφανιστεί στην οθόνη. Όταν η ακίδα πλησιάζει το δείγμα, λόγω των ηλεκτροστατικών δυνάμεων Van der Waals που αναπτύσσονται μεταξύ τους, τείνει να μεταβληθεί τόσο το πλάτος όσο και η συχνότητα ταλάντωσης του βραχίονα. Σημειώνεται ότι οι ελκτικές δυνάμεις Van der Waals υπερσχύουν για αποστάσεις δείγματος-ακίδας μεγαλύτερες των 20nm [2.2.1], ενώ για μικρότερες αποστάσεις, σύμφωνα με την απαγορευτική αρχή του Pauli, οι αλληλεπιδράσεις είναι απωστικές. Οι δύο συνεισφορές των δυναμικών αλληλεπίδρασης συνοψίζονται στη σχέση των Lennard-Jones (διάγραμμα 2.2.β):

$$V(r) = 4\varepsilon \left[\left(\frac{\sigma}{r} \right)^{12} - \left(\frac{\sigma}{r} \right)^6 \right] \quad [2.2-1]$$

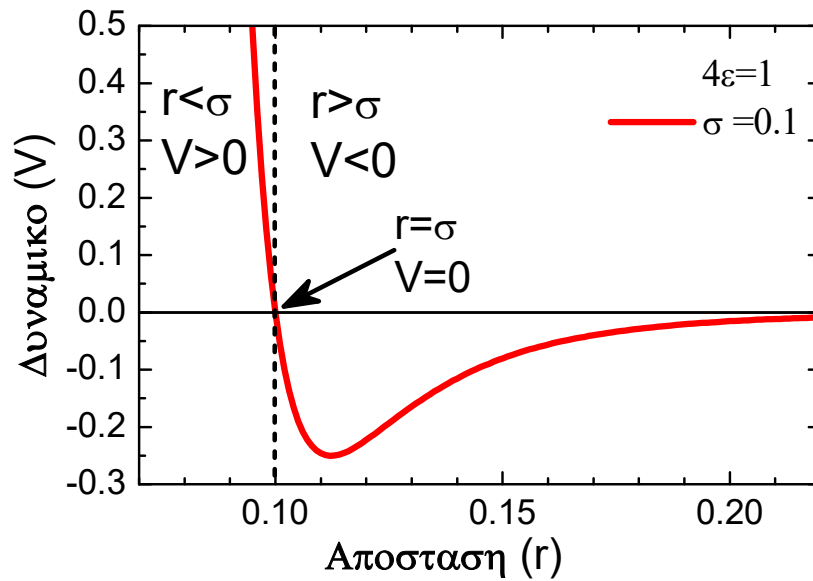
όπου V: δυναμικό αλληλεπίδρασης, r: απόσταση μεταξύ επιφάνειας δείγματος και ακίδας και σ, ε: σταθερές [2.2.2].

Από τη σχέση των Lennard-Jones, αντιλαμβανόμαστε ότι όταν η απόσταση μεταξύ ακίδας και δείγματος γίνει ίση με την παράμετρο σ, τότε το δυναμικό αλληλεπίδρασης μηδενίζεται. Οπότε, για διαφορετικές τιμές του σ, το δυναμικό θα μηδενίζεται στην αντίστοιχη απόσταση. Αυτό φαίνεται χαρακτηριστικά στα διαγράμματα 2.2.β και ειδικά στο κάτω διάγραμμα όπου παρουσιάζονται τρεις καμπύλες για τρεις διαφορετικές τιμές του σ σε ημιλογαριθμική κλίμακα. Η ημιλογαριθμική κλίμακα, όπως βλέπουμε, παρουσιάζει καλύτερα τις καμπύλες σε κοινό διάγραμμα συγκρινόμενη με τη γραμμική κλίμακα.



Διαγράμματα 2.2.β: Πάνω: Σχηματική αναπαράσταση του δυναμικού αλληλεπίδρασης μεταξύ ακίδας και επιφάνειας δείγματος συναρτήσει της μεταξύ τους απόστασης, για τρεις διαφορετικές τιμές του σ , σε γραμμική κλίμακα. Κάτω: Το ίδιο διάγραμμα σε ημιλογαριθμική κλίμακα.

Αν μεγεθύνουμε το διάγραμμα σε μία από τις τρεις αυτές καμπύλες (διάγραμμα 2.2.γ), παρατηρούμε ότι ο μηδενισμός του δυναμικού, όντως, συμβαίνει για $r = \sigma$. Για μικρότερες τιμές της απόστασης το δυναμικό αλληλεπίδρασης είναι θετικό, ενώ για μεγαλύτερες τιμές είναι αρνητικό.



Διάγραμμα 2.2.γ: Σχηματική αναπαράσταση του δυναμικού αλληλεπίδρασης μεταξύ ακίδας και επιφάνειας δείγματος συναρτήσει της μεταξύ τους απόστασης, για $\sigma=0.1$. Για $r=\sigma$ το δυναμικό αλληλεπίδρασης μηδενίζεται.

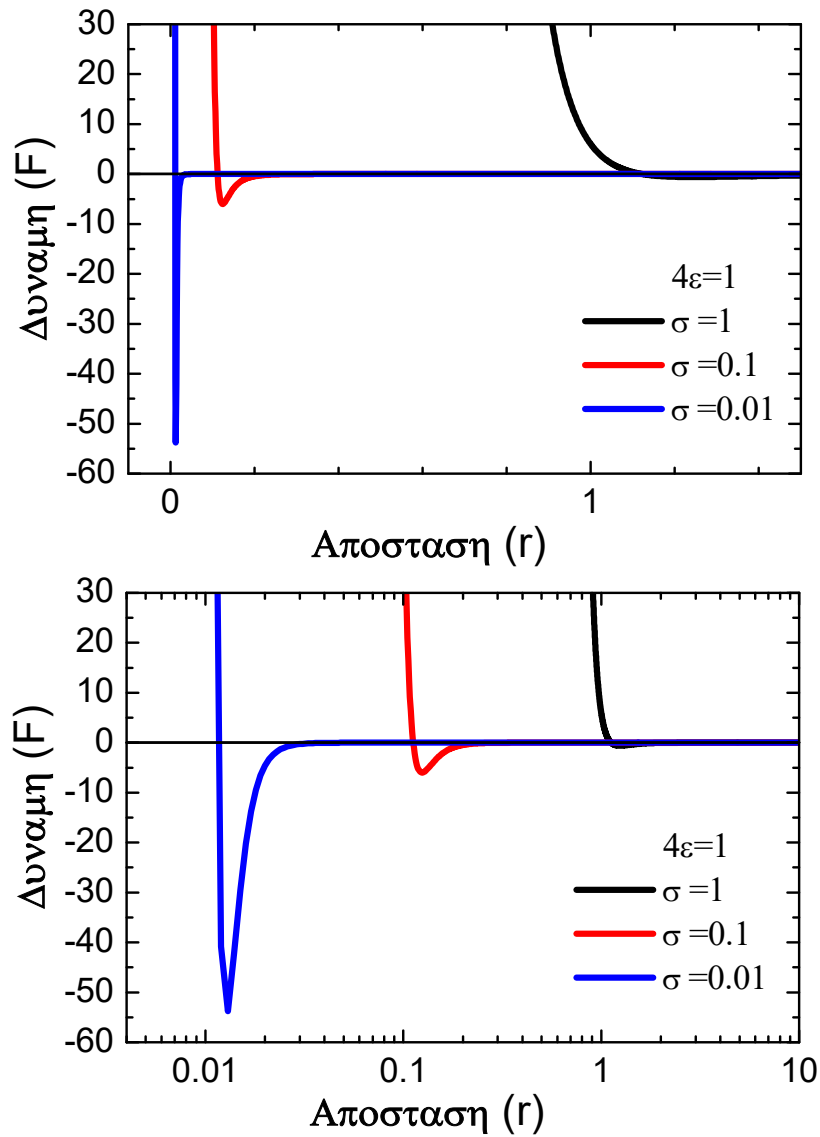
Γνωρίζοντας το δυναμικό μπορούμε να βρούμε τη δύναμη αλληλεπίδρασης μέσω της σχέσης:

$$F(r) = -\frac{dV(r)}{dr} = 4\varepsilon \left[\frac{12}{\sigma} \left(\frac{\sigma}{r} \right)^{13} - \frac{6}{\sigma} \left(\frac{\sigma}{r} \right)^7 \right] \quad [2.2-2]$$

όπου F : δύναμη αλληλεπίδρασης, r : απόσταση μεταξύ επιφάνειας δείγματος και ακίδας και σ , ε : σταθερές.

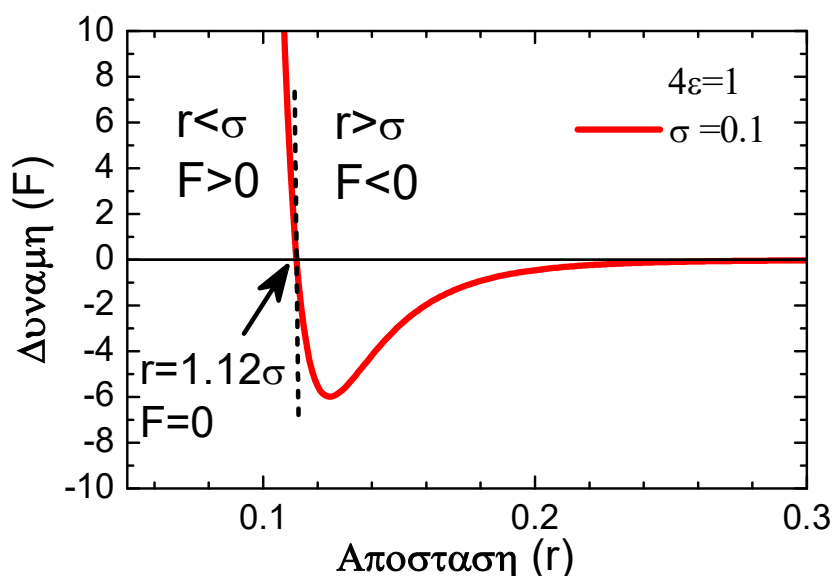
Από την παραπάνω σχέση, αντιλαμβανόμαστε ότι η δύναμη αλληλεπίδρασης μηδενίζεται όταν η απόσταση μεταξύ ακίδας και δείγματος γίνει ίση με την παράμετρο σ , πολλαπλασιασμένη επί ένα παράγοντα 1.12: $F = 0 \Rightarrow r = 2^{1/6}\sigma \Rightarrow r \approx 1.12\sigma$.

Οπότε, για διαφορετικές τιμές του σ , η δύναμη θα μηδενίζεται στην αντίστοιχη απόσταση. Αυτό φαίνεται χαρακτηριστικά στα διαγράμματα 2.2.δ και ειδικά στο κάτω διάγραμμα όπου παρουσιάζονται τρεις καμπύλες για τρεις διαφορετικές τιμές του σ σε ημιλογαριθμική κλίμακα. Η ημιλογαριθμική κλίμακα, όπως βλέπουμε, παρουσιάζει καλύτερα τις καμπύλες σε κοινό διάγραμμα συγκρινόμενη με τη γραμμική κλίμακα.



Διαγράμματα 2.2.δ: Πάνω: Σχηματική αναπαράσταση της δύναμης αλληλεπίδρασης μεταξύ ακίδας και επιφάνειας δείγματος συναρτήσει της μεταξύ τους απόστασης, για τρεις διαφορετικές τιμές του σ , σε γραμμική κλίμακα. Κάτω: Το ίδιο διάγραμμα σε ημιλογαριθμική κλίμακα.

Αν μεγεθύνουμε το διάγραμμα σε μία από τις τρεις αυτές καμπύλες (διάγραμμα 2.2.ε), παρατηρούμε ότι ο μηδενισμός της δύναμης όντως συμβαίνει για $r=1.12\sigma$. Για μικρότερες τιμές της απόστασης η δύναμη αλληλεπίδρασης είναι θετική και επομένως είναι απωστική (contact mode), ενώ για μεγαλύτερες τιμές είναι αρνητική και επομένως ελκτική (tapping και non-contact mode).

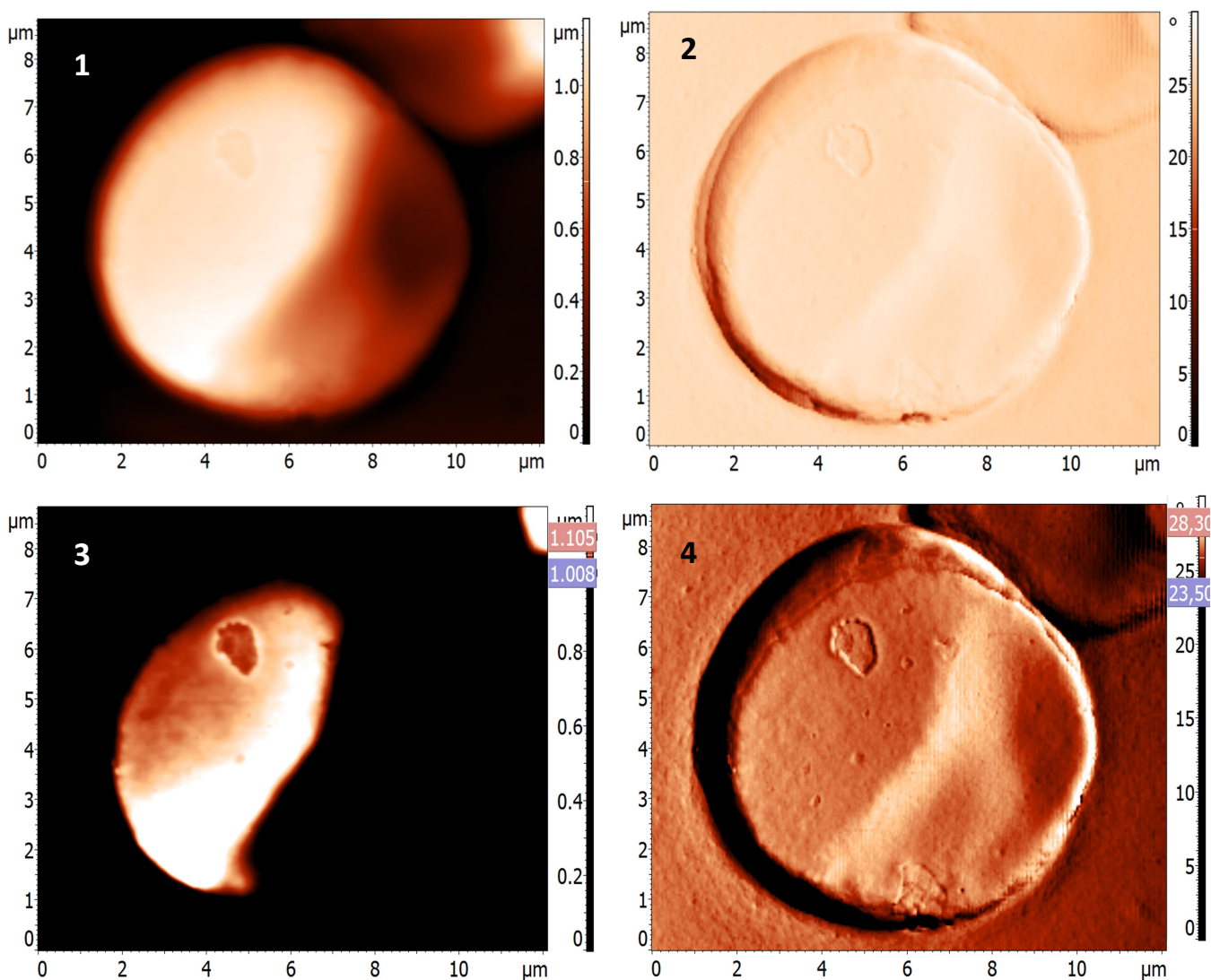


Διάγραμμα 2.2.ε: Σχηματική αναπαράσταση της δύναμης αλληλεπίδρασης μεταξύ ακίδας και επιφάνειας δείγματος συναρτήσει της μεταξύ τους απόστασης, για $\sigma=0.1$. Για $r=1.12\sigma$ η δύναμη αλληλεπίδρασης μηδενίζεται.

Στο σημείο αυτό, σημειώνεται ότι παρότι τα διαγράμματα του δυναμικού ($f=V(r)$) και της δύναμης ($f=F(r)$) αλληλεπίδρασης μοιάζουν μορφολογικά, δεν είναι πανομοιότυπα. Όπως παρατηρούμε και στις σχέσεις [2.2-1] και [2.2-2], οι εκθέτες στους οποίους είναι υψωμένη η απόσταση είναι διαφορετικοί. Επίσης, ο μηδενισμός της δύναμης συμβαίνει σε ελαφρώς μεγαλύτερη απόσταση σε σχέση με αυτήν του δυναμικού αλληλεπίδρασης.

Επιστρέφοντας στη συζήτηση για τη λειτουργία του ΜΑΔ, η πληροφορία ότι τείνουν να μεταβληθούν οι σταθερές παράμετροι της ταλάντωσης (πλάτος, συχνότητα), δίνεται από μια δέσμη laser και μια τετραστοιχία φωρατών που εντοπίζουν τις τοπογραφικές ανωμαλίες κατά τη σάρωση της επιφάνειας του δείγματος. Πιο αναλυτικά, η δέσμη laser ανακλάται στο πίσω μέρος του βραχίονα ακριβώς πάνω από το σημείο όπου βρίσκεται η ακίδα. Η τελευταία, μετά την ανάκλασή της, κατευθύνεται προς την τετραστοιχία των φωρατών, που είναι κατασκευασμένοι από ημιαγώγιμο υλικό. Οπότε, έχοντας αρχικά ρυθμίσει το ίχνος του laser να δείχνει μηδενική διαφορά στους φωρατές, όταν εμφανιστεί τοπογραφική ανωμαλία κατά τη σάρωση της επιφάνειας του δείγματος, το ύψος της πιεζοηλεκτρικής βάσης αναπροσαρμόζεται με σκοπό να παραμείνει μηδενική η διαφορά αυτή. Στη συνέχεια, το φωτεινό σήμα μετατρέπεται σε ηλεκτρικό και καταγράφεται σε ηλεκτρονικό υπολογιστή. Η τελική εικόνα που εμφανίζεται στην οθόνη δείχνει το ανάγλυφο της επιφάνειας του δείγματος με τη βοήθεια ενός χρωματικού κώδικα, ενώ παρέχεται και η δυνατότητα τρισδιάστατης απεικόνισής της. Το μέγιστο πεδίο σάρωσης που μπορούμε να λάβουμε είναι ένα πλαίσιο $150 \times 150 \mu\text{m}$ και η επεξεργασία των εικόνων γίνεται με τη βοήθεια του λογισμικού Nona. [2.2.4], [2.2.5], [2.2.6]

Το ΜΑΔ μπορεί να δώσει δύο διακριτά σήματα: την τοπογραφία και τη φάση της επιφάνειας του δείγματος [2.2.3]. Πολλές φορές οι εικόνες φάσης ΜΑΔ παρουσιάζουν με καλύτερη διακριτική ικανότητα τα χαρακτηριστικά που μελετάμε. Ακόμα, εκμεταλλευόμενοι μία λειτουργία του λογισμικού Nona του ΜΑΔ, μπορούμε να αναπροσαρμόσουμε τη χρωματική κλίμακα με την κλίμακα ύψους ώστε να αναδείξουμε ορισμένα χαρακτηριστικά του δείγματος. Αν παρατηρήσουμε, για παράδειγμα τις εικόνες 2.2.γ, είναι σαφές ότι οι επιφανειακές αποδομήσεις του κυττάρου είναι πιο ευκρινείς στις εικόνες 3 και 4, όπου έχει γίνει αναπροσαρμογή της χρωματικής κλίμακας, σε σχέση με τις εικόνες 1 και 2 αντίστοιχα, που δεν έχουν υποστεί αναπροσαρμογή. Ωστόσο, στην εικόνα 3, μπορεί να έχουμε αναδείξει την επιφανειακή εξέλκωση, έχουμε όμως χάσει την εικόνα του συνολικού κυττάρου, κάτι που δεν έχει συμβεί στην εικόνα 4. Η τελευταία λοιπόν, στην προκειμένη περίπτωση η εικόνα φάσης στην οποία έχει αναπροσαρμοστεί η χρωματική κλίμακα με την κλίμακα ύψους, αναδεικνύει καλύτερα τα χαρακτηριστικά του κυττάρου που θέλουμε να αναδείξουμε.



Εικόνες 2.2.γ2: 1: Εικόνα τοπογραφίας χωρίς αναπροσαρμογή χρωματικής κλίμακας. 2: Εικόνα φάσης χωρίς αναπροσαρμογή χρωματικής κλίμακας. 3: Εικόνα τοπογραφίας με αναπροσαρμογή χρωματικής κλίμακας. 4: Εικόνα φάσης με αναπροσαρμογή χρωματικής κλίμακας.

2.2.1. Πλεονεκτήματα χρήσης ΜΑΔ

Τα πλεονεκτήματα της χρήσης του ΜΑΔ παρατίθενται ακολούθως:

- Οι εικόνες έχουν υψηλή διακριτική ικανότητα (~nm)
- Τα δείγματα δε χρειάζονται προετοιμασία ώστε να γίνουν αγωγίμα (π.χ. επιχρύσωση)
- Καταγράφεται η πληροφορία σε ψηφιακή μορφή
- Δίνεται πληροφορία για τη z-διεύθυνση
- Μπορούν να μελετηθούν βιολογικά δείγματα
- Μπορούν να μελετηθούν και δείγματα σε υγρή μορφή

Κάποια πιο ειδικά πλεονεκτήματα που βρίσκουν εφαρμογή στο ΜΑΔ:

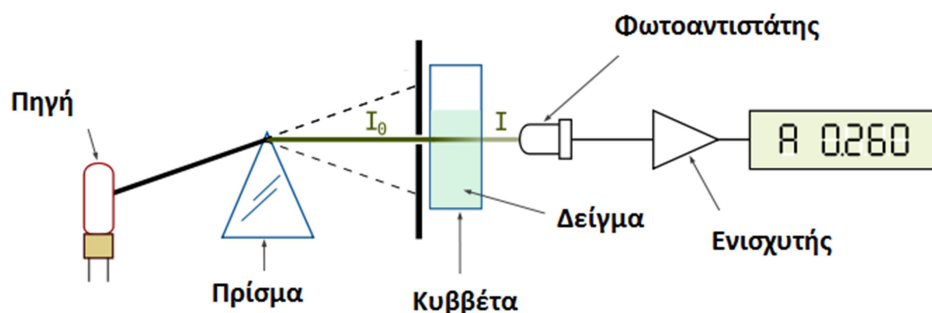
- Χρήση αδαμάντινων ακίδων σαν χαρακτηριστικά εργαλεία
- Δυνατότητα επιλογής και μεταφοράς βιολογικών μορίων (π.χ. μορίων DNA)
- Νανοέγχυση σε κύτταρα με χρήση ειδικών ακίδων μεγάλης ακριβείας

Ωστόσο, σε σχέση με άλλες μεθόδους μικροσκοπησης, το ΜΑΔ εμφανίζει ορισμένα μειονεκτήματα:

- Περιορισμένη έκταση μελέτης δείγματος
- Απαιτεί χρόνο (αργή ταχύτητα σάρωσης)
- Δε δείχνει στοιχειακή ανάλυση δείγματος
- Η τραχύτητα των δειγμάτων που μελετώνται δεν ξεπερνάει το 1,5 μm

2.3. Φασματοφωτομετρία απορρόφησης – UV Visible

Για τη λήψη πληροφοριών από το φάσμα απορρόφησης ενός υδατικού διαλύματος, χρησιμοποιούμε τη μέθοδο της φασματοφωτομετρίας UV-visible.



Εικόνα 2.3.α: Φασματοφωτόμετρο υπεριώδους ακτινοβολίας
(<https://en.wikipedia.org/wiki/Spectrophotometry>)

Το φασματοφωτόμετρο υπεριώδους αποτελείται από μία λυχνία δευτερίου ή ξένου η οποία παράγει υπεριώδη ακτινοβολία, από ένα πρίσμα χαλαζία που δρα ως σύστημα διαχωρισμού και από μία διάφανη κυψελίδα χαλαζία μέσα στην οποία τοποθετείται το προς εξέταση διάλυμα. Ακόμα, περιλαμβάνει και μια λυχνία πυρακτώσεως ώστε να είναι δυνατές και μετρήσεις στο ορατό φάσμα. Η ακτινοβολία που παράγεται από την πηγή κατευθύνεται στο πρίσμα όπου απομονώνεται η επιθυμητή μονοχρωματική ακτινοβολία και στη συνέχεια περνάει μέσα από την κυψελίδα. Το ποσό της ακτινοβολίας που δεν απορροφάται από το διάλυμα μετρείται από το φωτόμετρο του ηλεκτρονικού συστήματος.

Η επίδραση της ηλεκτρομαγνητικής ακτινοβολίας σε μία ουσία, που δεσμεύεται από τα άτομα ή τα μόρια αυτής, προκαλεί ηλεκτρονιακές διεγέρσεις και αλλαγές στην περιστροφή και τη δόνηση των μορίων. Τα άτομα και τα μόρια επιστρέφουν συνήθως στην αρχική τους κατάσταση, αφού αποβάλλουν το ποσό της ενέργειας που απορρόφησαν. Η καταγραφή της έντασης της απορρόφησης σε συνάρτηση με το μήκος κύματος αποτελεί το φάσμα απορρόφησης, που είναι γραμμικό στα άτομα και ταινίες στα μόρια. Για να πραγματοποιηθεί απορρόφηση ακτινοβολίας, τα φωτόνια που προσκρούουν στο δείγμα πρέπει να έχουν ενέργεια ίση με την ενέργεια φράγματος, ώστε να πραγματοποιηθεί ενεργειακή μεταβολή. Η ενέργεια των ηλεκτρονιακών μεταπτώσεων είναι της τάξης των eV και δίνεται από τον τύπο:

$$E = E_1 - E_2 = h\nu \quad [2.3-1]$$

όπου E: ενέργεια, h: σταθερά του Plank, ν: συχνότητα της ακτινοβολίας.

Οι ποσοτικές μετρήσεις της φασματοφωτομετρίας UV-VIS στηρίζονται στο γεγονός ότι η απορρόφηση της ακτινοβολίας εξαρτάται από την ποσότητα της ουσίας που απορροφά την ακτινοβολία και δίνεται από το νόμο των Beer-Lambert:

$$I = I_0 \exp [-\alpha CL] \quad [2.3-2]$$

όπου c: συγκέντρωση του διαλύματος, L: διαδρομή της ακτινοβολίας μέσα στο διάλυμα και α: συντελεστής απορρόφησης, ο οποίος εξαρτάται από τη φύση των μορίων και τη συχνότητα της ακτινοβολίας. [2.3.1.],[2.3.2]

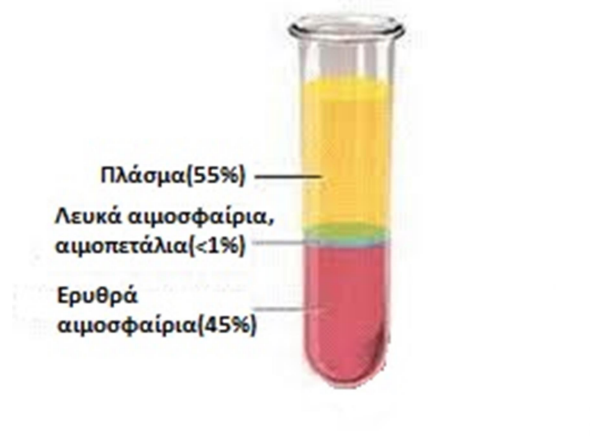
3. Πρωτόκολλο εργαστηριακής διαδικασίας

3.1. Προετοιμασία των δειγμάτων

Αρχικός σκοπός μας είναι η εύρεση κατάλληλου διαλύτη για τη διαλυτοποίηση των παραγώγων καπνού. Η ιδέα της χρήσης αυτόλογου πλάσματος ως διαλύτη, που είναι απόλυτα βιοσυμβατός με τα βιολογικά δείγματα, απορρίφθηκε εξ αρχής λόγω της μικρής ποσότητας που εν γένει μπορούμε να απομονώσουμε από το ολικό περιφερικό αίμα ενός δότη. Η επόμενη σκέψη ήταν η χρήση φυσιολογικού ορού (0,9% NaCl), που και αυτός θεωρείται βιοσυμβατός. Τέλος, σκεφτήκαμε να χρησιμοποιήσουμε έναν πιθανά πιο δραστικό διαλύτη, την αιθανόλη (70% σε H₂O). Δεδομένου ότι αυτή δεν είναι απόλυτα βιοσυμβατή, κατανοούμε ότι θα πρέπει να τη χρησιμοποιήσουμε σε μικρές ποσότητες. Εξετάζοντας τον πρώτο πιθανό διαλύτη, τον φυσιολογικό ορό, παρατηρήσαμε ότι τα παράγωγα καπνού έχουν περιορισμένη διαλυτότητα σε αυτόν. Έτσι, απορρίψαμε την ιδέα χρήσης αυτού του διαλύτη. Αντίθετα, σε διερευνητικά πειράματα μελέτης της καταλληλότητας της αιθανόλης ως πιθανό διαλύτη για τα παράγωγα καπνού, διαπιστώσαμε ότι έχουμε πολύ ικανοποιητικά αποτελέσματα. Έτσι, στη μελέτη μας θα χρησιμοποιηθεί μόνο ένας διαλύτης, η αιθανόλη (70% σε H₂O).

Συγκεκριμένα, για τη δημιουργία διαλύματος παραγώγων καπνού στην αιθανόλη κάνουμε τα εξής: Διαθέτουμε φίλτρο το οποίο έχει χρησιμοποιηθεί για το κάπνισμα 5 τσιγάρων, χαμηλών σε ποσοστό νικοτίνης και κατόπιν το εμβαπτίζουμε σε συγκεκριμένη ποσότητα του διαλύτη. Με τη βοήθεια περιδινιτή (vortex), αναδεύουμε αρκετά και αφαιρούμε το φίλτρο. Μετά την περιδίνηση και την αφαίρεση του φίλτρου, το διάλυμα που προκύπτει έχει υποκίτρινο χρώμα, είναι ομοιογενές και αποτελεί το διάλυμα των παραγώγων καπνού σε αιθανόλη (70% σε H₂O) που θα χρησιμοποιήσουμε για την παρασκευή των δειγμάτων μας.

Στη συνέχεια, δημιουργούμε τα δείγματα αίματος ακολουθώντας τις εξής διαδικασίες:



Εικόνα 3.1.α: Διαχωρισμός αίματος μετά τη φυγοκέντρηση

1. Δειγματοληψία: 2 tubes από 3ml αίματος στο καθένα

2. Φυγοκέντριση σε 1200g για 3min. Από το κάθε tube συλλέγουμε υπερκείμενο (αλλά και από τη διεπιφάνεια) με πιπέτα ακριβείας, ρυθμίζοντας στα 100ml, πραγματοποιώντας 10 διαδοχικές λήψεις ώστε να μη διαταραχθεί το σύστημα. (~1ml στο σύνολο/tube)
3. Έτσι, δημιουργούμε 2 νέα tubes με πλάσμα πλούσιο σε αιμοπετάλια (platelet rich plasma) και τα ονομάζουμε prp1, prp2.
4. Φυγοκεντρούμε τα 2 tubes prp1, prp2 με στόχο να ιζηματοποιήσουμε τα αιμοπετάλια με έντονη φυγοκέντριση στα 2400g για 5min. Παρατηρούμε ίζημα αιμοπεταλίων και λευκών αιμοσφαιρίων («λευκό χάπι»).
5. Από το υπερκείμενο των 2 αυτών tubes, μετά τη φυγοκέντριση, δημιουργούμε υμένιο για να ελέγξουμε αν είναι φτωχό σε αιμοπετάλια, δηλαδή αν η ιζηματοποίηση είναι πλήρης. Για τη δημιουργία του υμενίου φυγοκεντρούμε μικρή ποσότητα από το υπερκείμενο, με τη βοήθεια κυτταρικού φυγοκεντρητή (cyto-spinner), σε 1200g για 5s.
6. Αφαιρούμε το μεγαλύτερο ποσοστό του υπερκείμενου από τα prp1, prp2 αφήνοντας κατάλληλο όγκο πλάσματος έτσι ώστε όταν αναδιασπαρθούν τα αιμοπετάλια να έχουν κατάλληλη ογκική πυκνότητα. Αντίστοιχα, τα μονοστρωματικά υμένια που θα δημιουργήσουμε θα έχουν κατάλληλη επιφανειακή πυκνότητα προς αποτελεσματική μικροσκοπία. Θέλουμε αναλογία πλάσματος-ιζήματος στα prp ~1/3. Οπότε, αφαιρούμε ~1ml υπερκείμενου από το κάθε tube.
7. Το υπερκείμενο που αφαιρέσαμε από τα 2 tubes, που ουσιαστικά είναι πλάσμα φτωχό σε αιμοπετάλια (platelet poor plasma), το τοποθετούμε σε δύο νέα tubes που τα ονομάζουμε prp1 και prp2 αντίστοιχα.
8. Τα δείγματα που είχαμε ονομάσει prp, μετά την απομάκρυνση των prp τα μετονομάζουμε σε rcp1, rcp2, εφόσον είναι πλέον πλάσμα με συμπυκνωμένα αιμοπετάλια (platelet concentrated plasma).
9. Από το tube rcp1 δημιουργούμε μονοστρωματικό υμένιο rcp1α: 20μl σε πλακίδιο στα 1200g. Παρατηρούμε στο OM ότι είναι λίγο πιο συμπυκνωμένο από το επιθυμητό. Προσθέτουμε στο rcp1 50μl πλάσματος (αραίωση) και από 20 μl του αραιωμένου rcp1 δημιουργούμε υμένιο rcp1β, το οποίο έχει την επιθυμητή επιφανειακή πυκνότητα. Προσθέτουμε απ' ευθείας 50μl πλάσματος στο rcp2 και από αυτό δημιουργούμε το υμένιο rcp2α (αντίστοιχο του rcp1β).
10. Δημιουργούμε τα tubes αΕκ1 και αΕκ2, στο καθένα από τα οποία τοποθετούμε 100μl από το αρχικό αίμα και 400μl από το prp2. Από αυτά, φτιάχνουμε μονοστρωματικά υμένια αΕκ1α, αΕκ2α στα οποία παρατηρούμε καλή κατανομή των ερυθρών.
11. Δημιουργούμε τα tubes sp1, sp2, sp3 με τον εξής τρόπο:
 - sp1: 70μl rcp + 7μl σκέτης αιθανόλης

- sr2: 70μl pcr + 7μl αιθανόλης με παράγωγα καπνού
- sr3: 70μl pcr + 14μl αιθανόλης με παράγωγα καπνού

12. Ακολουθώντας, δημιουργούμε τα tubes sr1, sr2, sr3:

- sr1: 150μl αΕκ + 15μl σκέτης αιθανόλης
- sr2: 150μl αΕκ + 15μl αιθανόλης με παράγωγα καπνού
- sr3: 150μl αΕκ + 30μl αιθανόλης με παράγωγα καπνού

13. Έπειτα από χρόνο 30min: Από τα tubes sr1, sr2, sr3 και sr1, sr2, sr3 δημιουργούμε τα tubes sr1_30, sr2_30, sr3_30 και sr1_30, sr2_30, sr3_30 και τα αντίστοιχα υμένια τα οποία παρατηρούμε στο OM, έπειτα από *ex vivo* ωρίμανση του εκάστοτε δείγματος με ήπια ανάδευση (20-30 στροφές το λεπτό)

14. Στα δείγματα των 30 min παρατηρήσαμε στο OM επιφανειακές δομές μεγάλου μεγέθους (20-60μm) με πτυχώσεις που πιθανόν είχαν εγκλωβισμένα αιμοπετάλια. Για τη διερεύνηση της φύσης τους παρασευάζουμε τα δείγματα:

- srppr1: 150μl rpp + 15μl αιθανόλη
- srppr2: 150μl rpp + 15μl αιθανόλη με παράγωγα καπνού
- srppr3: 150μl rpp + 30μl αιθανόλη με παράγωγα καπνού

15. Από τα srppr1, srppr2, srppr3, μετά *ex vivo* ωρίμανση του εκάστοτε δείγματος με ήπια ανάδευση (20-30 στροφές το λεπτό) για 30min δημιουργούμε τα δείγματα srppr130, srppr230, srppr330,.

16. Από τα δείγματα sr1, sr2, sr3 και sr1, sr2, sr3, μετά από χρόνο 2 ωρών *ex vivo* ωρίμανσης, δημιουργούμε τα sr12h, sr22h, sr32h και sr12h, sr22h, sr32h και τα αντίστοιχα υμένια τα οποία παρατηρούμε στο OM.

17. Δημιουργούμε ένα υμένιο από μικρή ποσότητα σκέτης αιθανόλης (eth) και ένα ακόμα με μικρή ποσότητα του διαλύματος της αιθανόλης με τα παράγωγα καπνού (eth-nic).

18. Δημιουργούμε αντίστοιχα ένα υμένιο φυσιολογικού ορού (sal) και ένα φυσιολογικού ορού με παράγωγα καπνού (sal-nic).

19. Μέτρηση απορρόφησης UV-visible:

19.i. Διαλύτης αιθανόλης:

- Βάζουμε στην κυβέτα 3ml αιθανόλης (70% σε H₂O) και τη χρησιμοποιούμε ως διαλύτη για τις ουσίες, των οποίων το φάσμα θέλουμε να μελετήσουμε. Την τοποθετούμε στο μετρητικό σύστημα για να μετρήσουμε την απορρόφησή της, την οποία θα αφαιρέσουμε από όλες τις επόμενες μετρήσεις, ως απορρόφηση αναφοράς. Για τη μέτρηση της απορρόφησης των διαλυμάτων παραγώγων καπνού σε αιθανόλη (70% σε H₂O):

- Τοποθετούμε μικρή ποσότητα, 7μl, αιθανόλης (70% σε H₂O) με παράγωγα καπνού – διάλυμα το οποίο το ονομάζουμε EN7μl – και αναδεύουμε ήπια ώστε να ομογενοποιηθεί όσο το δυνατόν καλύτερα.
- Διπλασιάζουμε την ποσότητα της εμπλουτισμένης αιθανόλης, 14μl, αναμένοντας διπλάσια τιμή απορρόφησης στην καμπύλη – ονομάζουμε το διάλυμα EN14μl –
- Στη συνέχεια, μετράμε το φάσμα σε διαλύματα αιθανόλης (70% σε H₂O) εμπλουτισμένης με παράγωγα καπνού σε συγκεντρώσεις 15μl και 30μl – τα ονομάζουμε EN15μl και EN30μl, αντίστοιχα –
- Με τη βοήθεια του υπολογιστή, λαμβάνουμε το διάγραμμα της απορρόφησης των δειγμάτων συναρτήσει του μήκους κύματος.

19.ii. Διαλύτης φυσιολογικού ορού:

- Βάζουμε 3ml φυσιολογικού ορού στην κυβέτα και τον χρησιμοποιούμε ως διαλύτη για τις ουσίες που θα προσθέσουμε στη συνέχεια. Την τοποθετούμε στο μετρητικό σύστημα για να μετρήσουμε την απορρόφησης της, την οποία θα αφαιρέσουμε από όλες τις επόμενες μετρήσεις, ως απορρόφηση αναφοράς.
- Τοποθετούμε στην κυβέτα 7μl, αιθανόλης (70% σε H₂O) με παράγωγα καπνού – διάλυμα το οποίο το ονομάζουμε SN7μl – και αναδεύουμε ήπια.
- Λειτουργούμε με αντίστοιχο τρόπο και για τα δείγματα των υπόλοιπων συγκεντρώσεων, τοποθετώντας την ουσία της εκάστοτε συγκέντρωσης στην κυβέτα με το διαλύτη – ονομάζουμε τα δείγματα αντίστοιχα: SN14μl, SN15μl, SN30μl –
- Λαμβάνουμε στον υπολογιστή το διάγραμμα της απορρόφησης συναρτήσει του μήκους κύματος για τη σειρά δειγμάτων SN.

3.2. Εισαγωγική αξιολόγηση της καταλληλότητας των δειγμάτων

Κάθε υμένιο που παρασκευάζουμε, ελέγχεται στο OM, με σκοπό την επίτευξη κατάλληλης επιφανειακής κάλυψης κυττάρων για τη μετέπειτα μελέτη τους στο ΜΑΔ.

Η επιθυμητή επιφάνεια πρέπει να περιλαμβάνει αρκετό, αλλά όχι υπερβολικά μεγάλο, αριθμό κυττάρων έτσι ώστε να μην υπάρχουν αλληλεπικαλύψεις, καθώς στην περίπτωση αυτή όχι μόνο θα χάναμε πληροφορίες για τη μορφολογία των κυττάρων, αλλά θα είχαμε και πρόβλημα στην μικροσκοπήση με το AFM, λόγω του μεγάλου ύψους του δείγματος. Αντίστοιχα, για την οικονομία χρόνου στη λήψη μετρήσεων, το δείγμα μας δεν πρέπει να είναι και πολύ αραιό, αφού το οπτικό παράθυρο του ΜΑΔ, εκτός του ότι είναι μικρό, με δυνατότητα σάρωσης εικόνων μερικών μm², είναι και «τυφλό», δηλαδή δεν μπορούμε να περιηγηθούμε επιλεκτικά σε συγκεκριμένα σημεία του δείγματος.

Έτσι, αν κατά την αξιολόγηση των δειγμάτων στο OM διαπιστώσουμε ότι κάποιο από αυτά είναι πολύ πυκνό, τότε το αραιώνουμε χρησιμοποιώντας αυτόλογο πλάσμα. Στην αντίθετη περίπτωση, αν δηλαδή στο OM έχουμε εικόνα με πολύ λίγα κύτταρα σε μεγάλη απόσταση μεταξύ τους, σημαίνει ότι το δείγμα μας είναι πολύ αραιό και επαναλαμβάνουμε την

παρασκευή του μέχρι να επιτύχουμε κατάλληλη πυκνότητα. Όταν πλέον, έχουμε δείγματα κατάλληλης επιφανειακής κάλυψης, τότε μπορούμε να τα μελετήσουμε με τη βοήθεια του ΜΑΔ και να λάβουμε ποιοτικές εικόνες μέσα σε σχετικά μικρό χρονικό διάστημα.

4. Πειραματικές μετρήσεις- Συζήτηση των αποτελεσμάτων

4.1. Μετρήσεις φασματοφωτομετρίας UV-vis

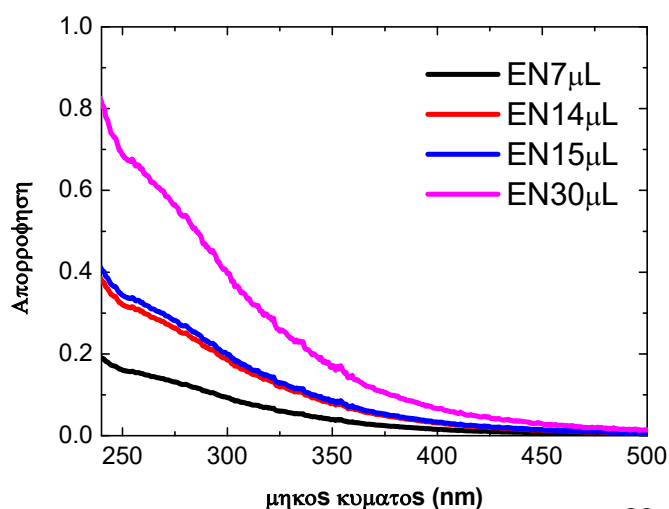
Χρησιμοποιούμε φασματοφωτομετρία UV-visible για να διαπιστώσουμε την παρουσία της αιθανόλης και των παραγώγων καπνού που βρίσκονται διαλυμένα σε αιθανόλη, αλλά και για να επιβεβαιώσουμε τη σχετική τους συγκέντρωση στα δείγματα που μελετάμε στη συνέχεια με χρήση του ΜΑΔ.

Για τη φασματοφωτομετρική μελέτη της πρώτης σειράς δειγμάτων, χρησιμοποιούμε διαλύτη αιθανόλης. Τοποθετούμε στην κυβέτα 3mL αιθανόλης (70% σε H₂O) και τη βάζουμε στο μετρητικό σύστημα, για να μετρήσουμε την απορρόφηση αναφοράς του συγκεκριμένου διαλύτη, την οποία θα αφαιρέσουμε από όλες τις επόμενες μετρήσεις. Στη συνέχεια, μελετάμε το φάσμα της διαλυμένης σε αυτήν ουσίας που στην προκειμένη περίπτωση είναι τα παράγωγα καπνού. Όπως έχουμε ήδη αναφέρει, για την απομόνωσή τους, τοποθετήθηκε φίλτρο έπειτα από κάπνισμα 5 τσιγάρων μέσα σε δοχείο με αιθανόλη (70% σε H₂O), ακολούθησε περιδίνηση και έπειτα αφαίρεση του φίλτρου. Από το δοχείο αυτό, επιλέγουμε την ουσία στις ποσότητες που αναγράφονται στην τελευταία στήλη του Πίνακα 4.1.1, δηλαδή: 7μl, 14μl, 15μl και 30μl, αντίστοιχα, την τοποθετούμε στην κυβέτα με το διαλύτη και αναδεύουμε ήπια για να ομογενοποιηθούν. Έτσι, με τη βοήθεια του μετρητικού συστήματος, λαμβάνουμε το φάσμα για τα δείγματα που φαίνονται στον Πίνακα 4.1.1:

Πίνακας 4.1.1

όνομα δείγματος	διαλύτης	ποσότητα διαλύτη	διαλυμένη ουσία	ποσότητα διαλύματος
EN7μL	αιθανόλη	3mL	παράγωγα καπνού	7μL
EN14μL	αιθανόλη	3mL	παράγωγα καπνού	14μL
EN15μL	αιθανόλη	3mL	παράγωγα καπνού	15μL
EN30μL	αιθανόλη	3mL	παράγωγα καπνού	30μL

Τα δεδομένα που καταγράψαμε φαίνονται στο πιο κάτω διάγραμμα:



Διάγραμμα 4.1.α: Καμπύλη απορρόφησης σε διαλύτη αιθανόλης. Η απορρόφηση αποδεικνύει την παρουσία των παραγώγων καπνού. Υπάρχει αναλογία μεταξύ των συγκεντρώσεων και της τιμής του σήματος απορρόφησης.

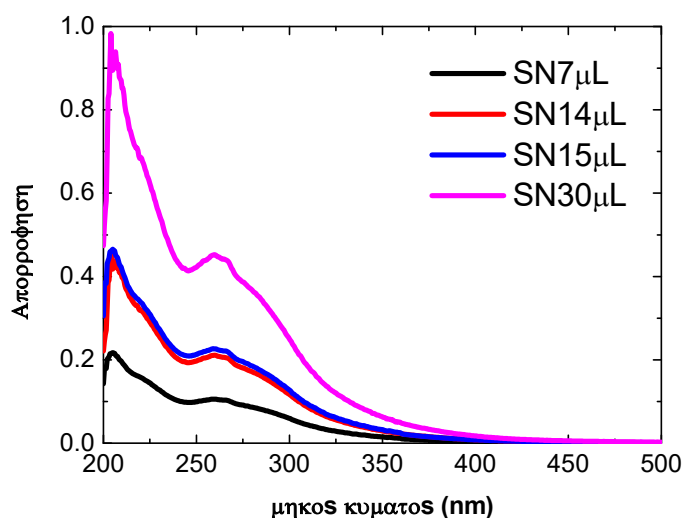
Στο διάγραμμα 4.1.α, παρατηρούμε ότι η τιμή του σήματος απορρόφησης της καμπύλης είναι πράγματι ανάλογη της συγκέντρωσης του αντίστοιχου διαλύματος. Για το δείγμα EN30μL με διπλάσια συγκέντρωση αιθανόλης-παραγώγων καπνού από το EN15μL, η τιμή απορρόφησης της καμπύλης είναι διπλάσια. Παράλληλα, για το δείγμα EN14μL, με διπλάσια συγκέντρωση αιθανόλης-παραγώγων καπνού από το EN7μL, η τιμή της απορρόφησης είναι διπλάσια. Αφού, λοιπόν, έχουμε ελέγξει και την επαναληψιμότητα στις φασματοφωτομετρικές μας μετρήσεις, συμπεραίνουμε ότι υπάρχει γραμμικότητα. Το γεγονός ότι υπάρχει απορρόφηση υποδεικνύει την παρουσία των παραγώγων καπνού στο διαλύτη αιθανόλης.

Για τις επόμενες μετρήσεις χρησιμοποιούμε ως διαλύτη φυσιολογικό ορό. Τοποθετούμε στην κυβέτα 3mL φυσιολογικού ορού και τη βάζουμε στο μετρητικό σύστημα, για να μετρήσουμε την απορρόφηση αναφοράς του συγκεκριμένου διαλύτη, την οποία θα αφαιρέσουμε από όλες τις επόμενες μετρήσεις. Στη συνέχεια, μετράμε δείγματα διαλύματος, όπως κάναμε και στην περίπτωση του διαλύτη αιθανόλης, επιλέγοντας τις συγκεκριμένες ποσότητες που αναγράφονται στην τελευταία στήλη του Πίνακα 4.1.2 από το δοχείο με τα παράγωγα καπνού σε αιθανόλη (70% σε H₂O) και αναδεύοντας ήπια με το διαλύτη. Δηλαδή, μετράμε τα δείγματα που παρουσιάζονται στον Πίνακα 4.1.2:

Πίνακας 4.1.2

όνομα δείγματος	διαλύτης	ποσότητα διαλύτη	διαλυμένη ουσία	ποσότητα διαλύματος
SN7μL	φυσιολογικός ορός	3mL	παράγωγα καπνού	7μL
SN14μL	φυσιολογικός ορός	3mL	παράγωγα καπνού	14μL
SN15μL	φυσιολογικός ορός	3mL	παράγωγα καπνού	15μL
SN30μL	φυσιολογικός ορός	3mL	παράγωγα καπνού	30μL

Τα δεδομένα που καταγράψαμε φαίνονται στο διάγραμμα 4.1.β:



Διάγραμμα 4.1.β: Καμπύλη απορρόφησης σε διαλύτη φυσιολογικού ορού. Η απορρόφηση αποδεικνύει την παρουσία αιθανόλης (70% σε H₂O) εμπλουτισμένης με παράγωγα καπνού. Υπάρχει αναλογία μεταξύ των συγκεντρώσεων και της τιμής του σήματος απορρόφησης.

Στο διάγραμμα 4.1.β, η απορρόφηση αποδεικνύει την ύπαρξη της εμπλουτισμένης με παράγωγα καπνού αιθανόλης στο διαλύτη του φυσιολογικού ορού. Συγκεκριμένα, εμφανίζεται μία κορυφή περίπου στα 260 nm και, η οποία δεν υπήρχε στις προηγούμενες μετρήσεις (διάγραμμα 4.1.α), όπου ο διαλύτης ήταν αιθανόλη. Έτσι, συμπεραίνουμε ότι αντιστοιχεί στην κορυφή απορρόφησης της αιθανόλης.

Η γραμμικότητα παρατηρούμε πως υπάρχει και εδώ, με τις ίδιες αναλογίες μεταξύ των συγκεντρώσεων και του πλάτους απορρόφησης.

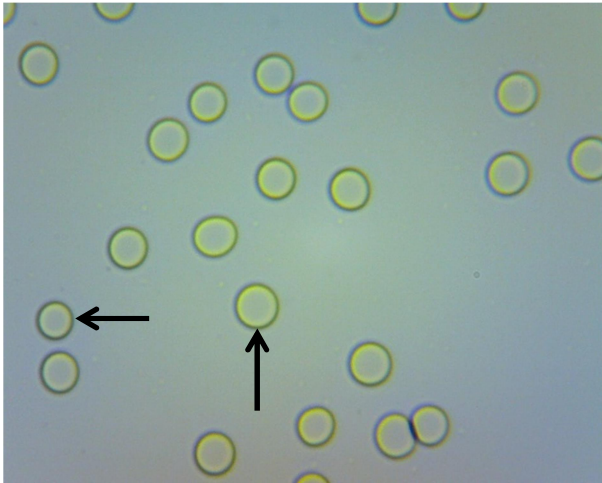
4.2. Μετρήσεις OM

Τα μονοστρωματικά υμένα που έχουμε παρασκευάσει παρατηρούνται σε OM για να ελέγξουμε, όπως προαναφέρθηκε, την καταλληλότητά τους για μικροσκόπηση στο ΜΑΔ. Το OM μας επιτρέπει να μετακινούμε το οπτικό μας πεδίο με μεγάλη ταχύτητα, ώστε να παρατηρούμε μεγάλες επιφάνειες του δείγματός μας και να αποθηκεύουμε οποιοδήποτε στιγμιότυπο εικόνας. Το διακριτικό φάσμα είναι της τάξης των 400-700nm, όσο περίπου και τα όρια του ορατού φάσματος [4.2.1]. Στη συγκεκριμένη εργασία, χρησιμοποιήσαμε φακό μεγέθυνσης 20x και λειτουργία διερχόμενης δέσμης, εφόσον πρόκειται για βιολογικό δείγμα. Γενικά, με το OM μελετάμε τα μορφολογικά και γεωμετρικά χαρακτηριστικά. Ειδικότερα, για τη μελέτη των γεωμετρικών χαρακτηριστικών των δειγμάτων μας θα μπορούσαμε να εισάγουμε μια μικρομετρική κλίμακα σε κάθε εικόνα, κάτι που όμως δεν κάναμε μιας και θα τα μελετήσουμε στη συνέχεια αναλυτικά με τη χρήση ΜΑΔ, όπου η ακρίβεια είναι μεγαλύτερη, της τάξης των nm. Επομένως, με τη χρήση του OM επικεντρωνόμαστε κυρίως στη μορφολογική μελέτη των δειγμάτων μας. Χαρακτηριστικά παραθέτουμε ορισμένες εικόνες αυτών, ξεκινώντας από τα δείγματα αναφοράς ερυθροκυττάρων και αιμοπεταλίων:

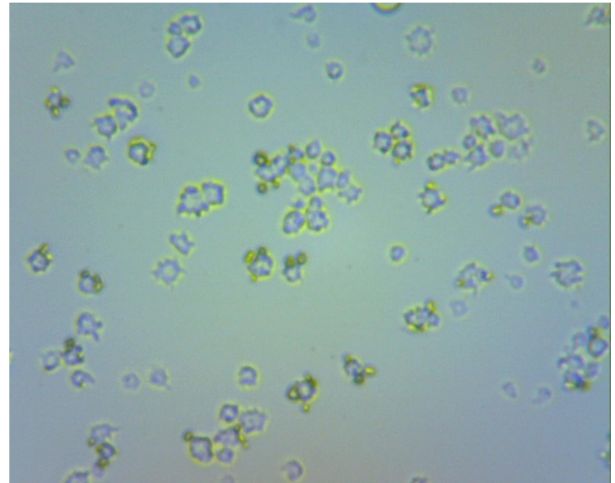
Στο δείγμα αναφοράς ερυθροκυττάρων, αΕκ1α (εικόνα 4.2.α), παρατηρούμε κύτταρα καλής μορφής αλλά τουλάχιστον ήπιας ανισοκυττάρωσης. Χαρακτηριστικά, σημειώνονται με βέλη δύο ερυθροκύτταρα που έχουν διαφορά διαμέτρων της τάξης του 20%. Η επιφανειακή κάλυψη είναι καλή, χωρίς επικαλύψεις ή υπερβολικά μικρό αριθμό κυττάρων στο οπτικό πεδίο, που το καθιστά κατάλληλο δείγμα για μετέπειτα μελέτη στο ΜΑΔ. Στις πιο παχιές περιοχές των κυττάρων υπάρχει μεγαλύτερη απορρόφηση φωτός με αποτέλεσμα να φαίνονται πιο σκοτεινές, ενώ στις περιοχές που έχουν πάχος περίπου ίσο με αυτό του υπαβάθρου πλάσματος, πάνω στο οποίο βρίσκονται τα κύτταρα, έχουν περίπου την ίδια απορρόφηση. Αντιλαμβανόμαστε, λοιπόν, ότι εφόσον κάθε ερυθροκύτταρο είναι πιο σκοτεινό περιμετρικά και στο κέντρο είναι περίπου διάφανο, έχει σχήμα αμφίκιουλου δίσκου.

Στο δείγμα αναφοράς PCP_1β (εικόνα 4.2.β), είναι εμφανή αιμοπετάλια διαφορετικών μεγεθών, έχουμε δηλαδή ξεκάθαρη ανισοκυττάρωση και φαίνεται ότι υπάρχει η τάση να σχηματίζουν συσσωματώματα. Τα περισσότερα από αυτά είναι ενεργοποιημένα, καθώς διακρίνονται αρκετά ψευδοπόδια. Η ενεργοποίηση αυτή, οφείλεται στη μηχανική καταπόνηση των αιμοπεταλίων κατά τη διαδικασία της φυγοκέντρισης, καθώς το δείγμα δεν έχει υποστεί κάποια άλλη

επεξεργασία και δεν περιλαμβάνει κάποια επιπρόσθετη ουσία με την οποία θα μπορούσε να αντιδράσει.

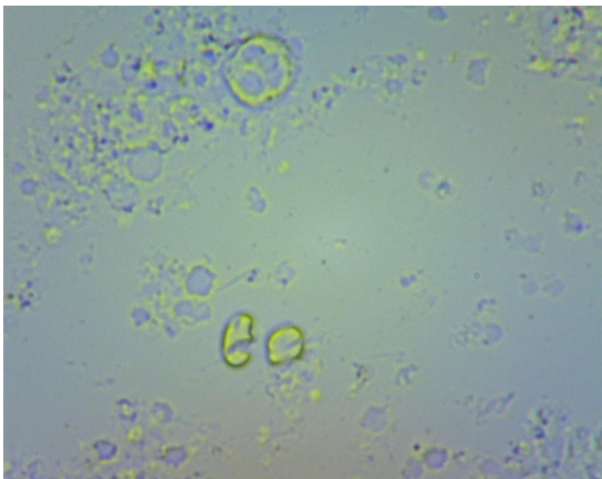


Εικόνα 4.2.α: αΕκ1α: Ερυθροκύτταρα χωρίς παραμόρφωση, αλλά με μία μέτρια ανισοκυττάρωση. Για παράδειγμα, τα δύο συγκεκριμένα ερυθροκύτταρα που δείχνουν τα βέλη, έχουν διαφορά διαμέτρου ~20%.

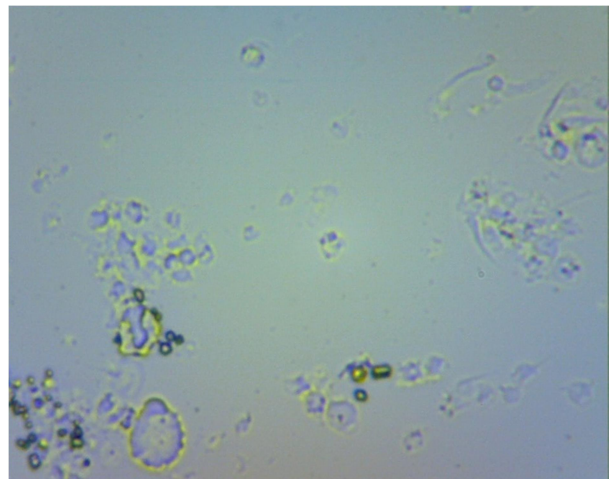


Εικόνα 4.2.β: PCP_1b: Ενεργοποιημένα αιμοπετάλια με τάση προς σχηματισμό συσσωματωμάτων.

Στη συνέχεια, παρατίθενται οι μετρήσεις των δειγμάτων αιμοπεταλίων, δηλαδή του SP1_2H (70μl PCP_1b + 7μl αιθανόλης), του SP2_2H (70μl PCP_1b + 7μl αιθανόλης με παράγωγα καπνού) και του SP3_2H (70μl PCP_1b + 14μl αιθανόλης με παράγωγα καπνού).



Εικόνα 4.1.γ: SP1_2H: Ενεργοποιημένα αιμοπετάλια με δημιουργία έντονων συσσωματωμάτων. Φαίνονται δύο παραμορφωμένα ερυθροκύτταρα και ένα εμπύρνηνο λευκοκύτταρο.



Εικόνα 4.1.δ: SP2_2H: Ενεργοποιημένα αιμοπετάλια με σχηματισμό συσσωματωμάτων και μεγάλων ψευδοποδίων. Φαίνεται και ένα λευκοκύτταρο.

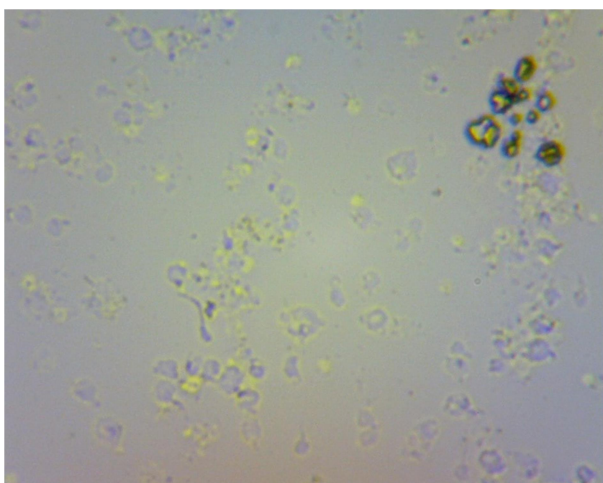
Στο δείγμα SP1_2H (εικόνα 4.1.γ), βλέπουμε ενεργοποιημένα αιμοπετάλια διαφόρων μεγεθών, τμήματα αιμοπεταλίων καθώς και αρκετά συσσωματώματα. Ακόμα, είναι εμφανή δύο

παραμορφωμένα ερυθροκύτταρα και ένα εμπύρηνιο λευκοκύτταρο. Τα αιμοπετάλια φαίνονται ενεργοποιημένα με μερικά από αυτά να εμφανίζουν ψευδοπόδια. Η εικόνα διαφέρει αρκετά από αυτήν του δείγματος αναφοράς αιμοπεταλίων, προφανώς λόγω της παρουσίας της αιθανόλης.

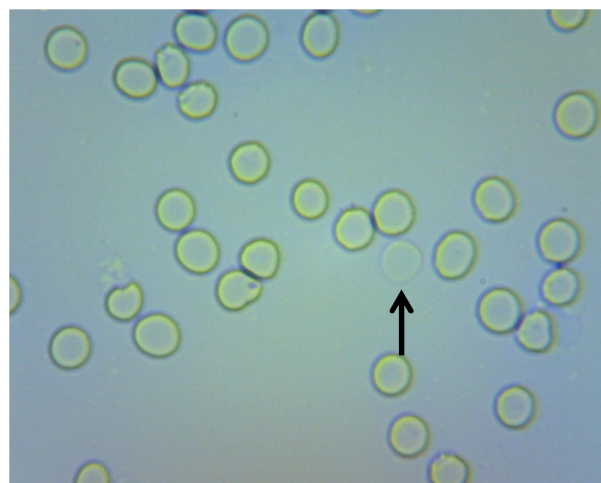
Τα αιμοπετάλια του δείγματος SP2_2H (εικόνα 4.1.δ), φαίνονται και αυτά ενεργοποιημένα, δημιουργούν συσσωματώματα και μερικά από αυτά φέρουν ψευδοπόδια. Τα ψευδοπόδια εδώ, συγκρινόμενα με αυτά του δείγματος SP1_2H, είναι μεγαλύτερα και πολυπληθέστερα, πιθανώς εξαιτίας της παρουσίας των διαλυμένων σε αιθανόλη παραγώγων καπνού.

Όσον αφορά το δείγμα SP3_2H (εικόνα 4.1.ε), παρατηρούμε πολυάριθμα αιμοπετάλια, με ακανόνιστο σχήμα. Τα κύτταρα αυτά είναι ενεργοποιημένα, σχηματίζουν ψευδοπόδια (εξίσου μεγάλα) και έντονα συσσωματώματα. Στο οπτικό πεδίο βλέπουμε και κάποιες μεγάλες δομές οι οποίες πιθανότατα οφείλονται σε επιμόλυνση του δείγματος από εξωτερικούς παράγοντες.

Πάλι, εδώ, φαίνεται να έχουμε μεγαλύτερη ενεργοποίηση των αιμοπεταλίων σε σχέση με το δείγμα SP1_2H, λόγω των μεγαλύτερων και πολυπληθέστερων ψευδοποδίων. Σε σχέση με το δείγμα SP2_2H, δε φαίνεται να υπάρχουν έντονες διαφορές.



Εικόνα 4.1.ε: SP3_2H: Έντονα συσσωματώματα αιμοπεταλίων και ενεργοποίηση αιμοπεταλίων με ψευδοπόδια.



Εικόνα 4.1.στ: SR1_2H: Εικόνα ερυθροκυττάρων, μερικά από τα οποία σχηματίζουν συσσωματώματα. Το βέλος δείχνει ένα ερυθροκύτταρο που έχει χάσει μέρος του κυτταροπλάσματός του.

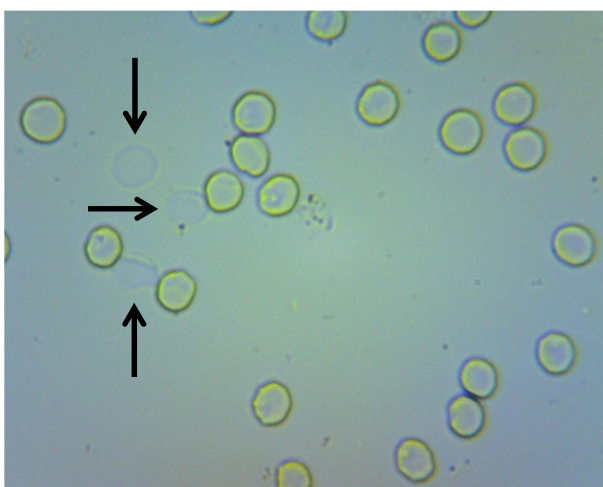
Ακολούθως, παρατίθενται οι μετρήσεις των δειγμάτων ερυθροκυττάρων, δηλαδή του SR1_2H (150μl αΕκ1α + 15μl αιθανόλης), του SR2_2H (150μl αΕκ1α + 15μl αιθανόλης με παράγωγα καπνού) και του SR3_2H (150μl αΕκ1α + 30μl αιθανόλης με παράγωγα καπνού).

Για το δείγμα SR1_2H (εικόνα 4.1.στ), έχουμε ερυθροκύτταρα, με ελαφριές παραμορφώσεις αυτών και διακρίνουμε την τάση τους να σχηματίζουν συσσωματώματα. Όπως και στο δείγμα αναφοράς, έχουμε μέτρια ανισοκυττάρωση. Στον ενδιάμεσο χώρο φαίνονται αμυδρά μικρά συσσωματώματα κοκκίων που δεν παρατηρήθηκαν στο δείγμα αναφοράς αΕκ1α αλλά και μερικά ερυθροκύτταρα που έχουν χάσει μέρος του κυτταροπλάσματός τους, τα λεγόμενα «φαντάσματα (ghosts)» και πιθανώς προκύπτουν από τη δράση των πρωτεϊνών πήξης του

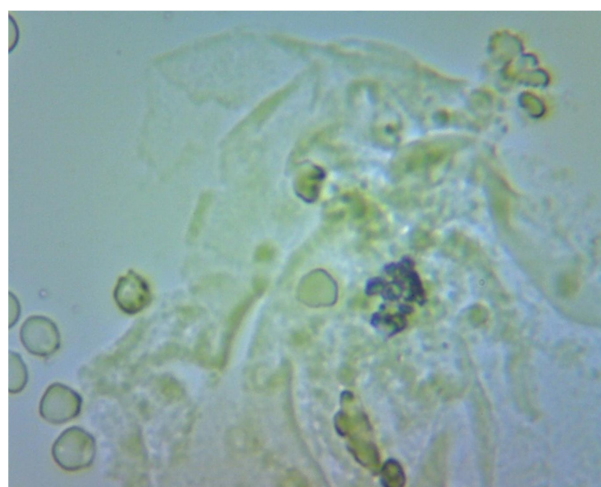
πλάσματος εξαιτίας της παρουσίας αιθανόλης. Από τη στατιστική μελέτη 418 κυττάρων στο δείγμα αυτό προέκυψε ότι υπάρχουν ερυθροκύτταρα «φαντάσματα» σε ποσοστό $6,22 \pm 0,24$ %. Ως σφάλμα έχει θεωρηθεί ένα συμβάν (1 κύτταρο-«φάντασμα») ανά τον πληθυσμό των μελετώμενων κυττάρων ($\frac{1}{418} \approx 0,0024$).

Στο δείγμα SR2_2H (εικόνες 4.1.ζ1 και 4.1.ζ2), διακρίνουμε πολυάριθμα ερυθροκύτταρα και δομές με πτυχώσεις μεγάλου μεγέθους. Αρκετά από τα ερυθροκύτταρα έχουν χάσει μεγάλο ποσοστό του κυτταροπλάσματος οπότε διακρίνονται (βλ. βέλη) πολύ αμυδρά σε σχέση με τα υπόλοιπα. Από τη στατιστική μελέτη 566 κυττάρων προέκυψε ότι τα «φαντάσματα» αποτελούν το $4,77 \pm 0,18$ % του συνολικού πληθυσμού, δηλαδή ποσοστό μικρότερο από αυτό που προέκυψε στο προηγούμενο δείγμα.

Στις εικόνες παρατηρούμε ακόμα, ότι υπάρχει μια μικρή τάση να έλκονται μεταξύ τους και να σχηματίζουν συσσωματώματα. Σε ορισμένα οπτικά πεδία παρατηρήσαμε συσσωματώματα κοκκίων, που έμοιαζαν με τις δομές που παρατηρήθηκαν στο προηγούμενο δείγμα, είναι όμως μεγαλύτερα, ίσως λόγω της παρουσίας των παραγώγων καπνού σε αιθανόλη. Οι δομές με πτυχώσεις μοιάζουν με έναν ιστό μέσα στον οποίο έχουν παγιδευτεί μερικά ερυθροκύτταρα και λιγοστά αιμοπετάλια. Πιθανότατα αποτελούν τμήματα ινώδους ιστού που προέρχονται από το συνδυασμό της εμπλουτισμένης με παράγωγα καπνού αιθανόλης, των πρωτεϊνών πήξης του πλάσματος και των πρωτεϊνών των αιμοπεταλίων.



Εικόνα 4.1.ζ1: SR2_2H: Εικόνα ερυθροκυττάρων, αρκετά εκ των οποίων έχουν χάσει μεγάλο ποσοστό κυτταροπλάσματος (βλ. βέλη). Τα κύτταρα αυτά είναι γνωστά ως «φαντάσματα» (ghosts).



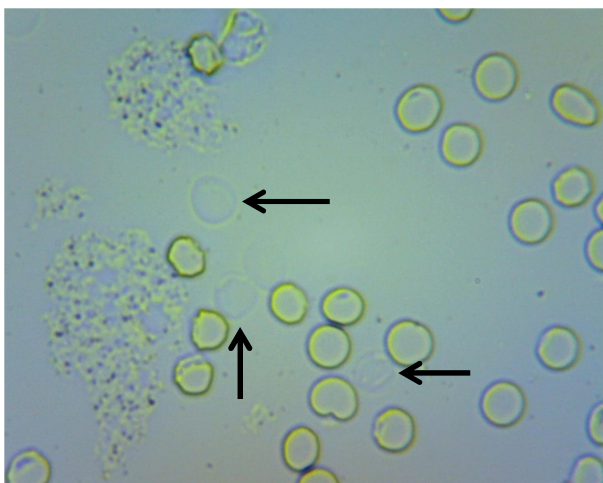
Εικόνα 4.1.ζ2: SR2_2H: Δομή με πτυχώσεις με «εγκλωβισμένα» ερυθροκύτταρα και αιμοπετάλια.

Η μορφολογική εικόνα του δείγματος SR3_2H (εικόνες 4.1.η1 και 4.1.η2), αποτελείται από ερυθροκύτταρα με μέτρια ανισοκυττάρωση, ελαφρώς παραμορφωμένα κύτταρα, συσσωματώματα κοκκίων και μεγάλες δομές. Όπως παρατηρήθηκε και στα δύο προηγούμενα δείγματα, υπάρχουν ερυθροκύτταρα που έχουν αποβάλει μεγάλο μέρος του κυτταροπλάσματος

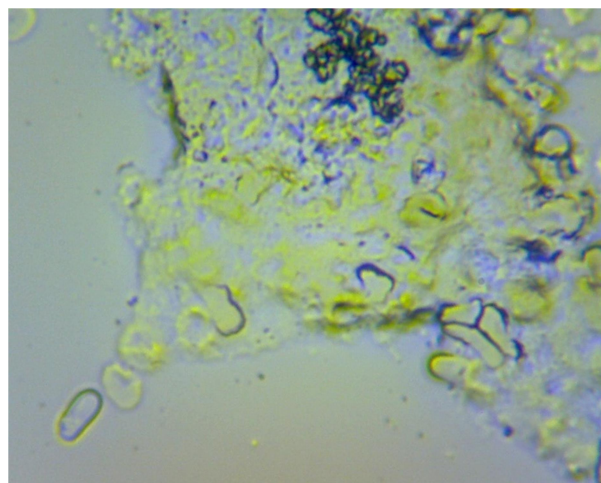
τους με αποτέλεσμα να είναι μόλις διακριτά στο οπτικό πεδίο. Εδώ, όμως, το ποσοστό αυτών είναι αρκετά μεγαλύτερο και συγκεκριμένα $14,33 \pm 0,11$ % έπειτα από μελέτη 907 κυττάρων.

Από τη συνολική στατιστική μελέτη στα τρία αυτά δείγματα ερυθροκυττάρων, συμπεραίνουμε ότι τα παράγωγα καπνού σε αιθανόλη δρουν σχετικά προστατευτικά στα ερυθροκύτταρα συγκρινόμενα με την αιθανόλη αυτή καθ' αυτή, αφού το ποσοστό των «φαντασμάτων» μειώνεται στο δείγμα με τα παράγωγα καπνού σε αιθανόλη. Αυτό, όμως, συμβαίνει μέχρι κάποια συγκέντρωση αυτών πέρα από την οποία εντείνουν ακόμη περισσότερο την αποβολή κυτταροπλάσματος σε σχέση με την αιθανόλη αυτή καθ' αυτή.

Όσον αφορά τα συσσωματώματα κοκκίων είναι αρκετά μεγάλου μεγέθους, σε σχέση με το μέγεθος των κυττάρων, αλλά περίπου ίδια με αυτά του δείγματος SR2_2H. Το γεγονός αυτό υποδεικνύει ότι η διπλάσια συγκέντρωση παραγώγων καπνού σε αιθανόλη δεν επιβαρύνει περαιτέρω την εικόνα. Επίσης, εμφανίζονται ορισμένες μεγάλες δομές, οι οποίες έχουν στο εσωτερικό τους παγιδευμένα ερυθροκύτταρα και αιμοπετάλια, που πιθανόν να οφείλονται στη δράση των πρωτεϊνών πήξης του πλάσματος και των πρωτεϊνών των αιμοπεταλίων παρουσία της εμπλουτισμένης με παράγωγα καπνού αιθανόλης, μιας και δεν παρατηρήθηκαν στο δείγμα αναφοράς ή στο δείγμα SR1_2H.



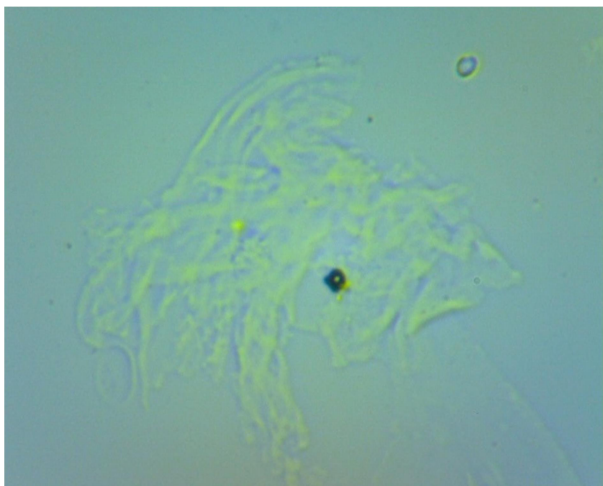
Εικόνα 4.1.η1: SR3_2H: Ελαφρώς παραμορφωμένα ερυθροκύτταρα, συσσωματώματα κοκκίων και ερυθροκύτταρα που έχουν χάσει μεγάλο ποσοστό του κυτταροπλάσματος (βλ. βέλη). Τα κύτταρα αυτά είναι γνωστά ως «φαντάσματα» (ghosts).



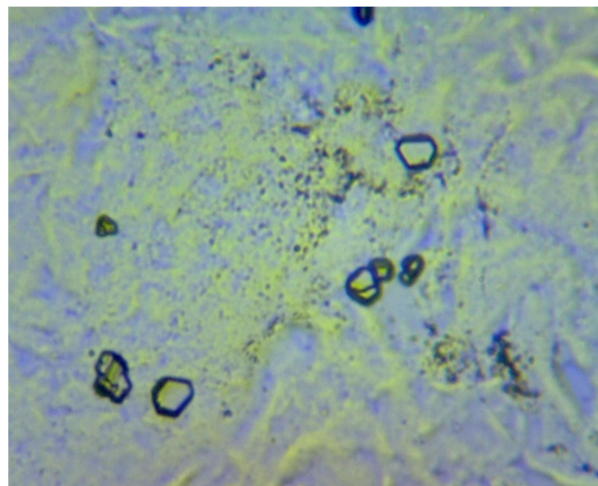
Εικόνα 4.1.η2: SR3_2H: Δομή μεγάλου μεγέθους μέσα στην οποία έχουν παγιδευτεί ερυθροκύτταρα και λιγοστά αιμοπετάλια.

Τέλος, παρατίθενται οι μετρήσεις OM των δειγμάτων πλάσματος (φτωχού σε αιμοπετάλια-ppp), δηλαδή του SPPP1_30 (150μl ppp + 15μl αιθανόλης), του SPPP2_30 (150μl ppp + 15μl αιθανόλης με παράγωγα καπνού) και του SPPP3_30 (150μl ppp + 30μl αιθανόλης με παράγωγα καπνού). Στο δείγμα SPPP1_30 (εικόνα 4.1.θ), παρατηρούμε ύπαρξη δομών με πτυχώσεις, που πιθανότατα πρόκειται για τμήματα ινώδους ιστού, που είναι αποτέλεσμα της δράσης των πρωτεϊνών πήξης του πλάσματος [4.2.2] και των πρωτεϊνών των αιμοπεταλίων [4.2.3] στο

περιβάλλον της αιθανόλης. Επίσης, υπάρχουν διασκορπισμένα και συσσωματώματα που αποτελούνται από αιμοπετάλια και τμήματα αυτών. Χαρακτηριστικά, η 4.1.θ απεικονίζει τμήμα ινώδους ιστού, όπως και η εικόνα 4.1.ι του δείγματος SPPP2_30. Στο τελευταίο, η γενική μορφολογική εικόνα είναι παρόμοια με το δείγμα SPPP1_30, που υποδηλώνει ότι τα παράγωγα καπνού ίσως να μην την επηρεάζουν περισσότερο απ' ό,τι κάνει η αιθανόλη αυτή καθ' αυτή.

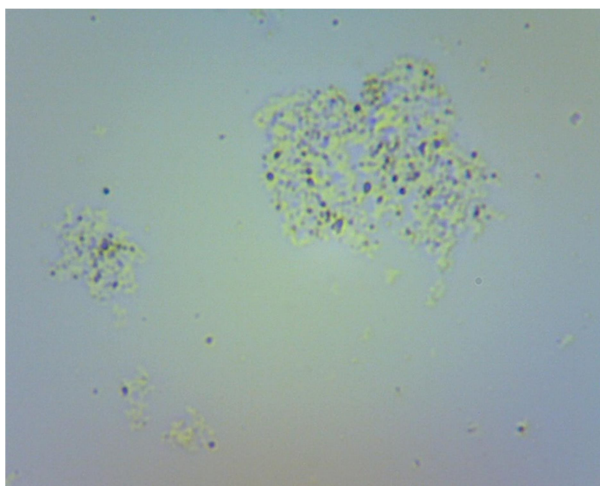


Εικόνα 4.1.θ: SPPP1_30: Ινώδης ιστός λόγω των πρωτεϊνών των αιμοπεταλίων και των πρωτεϊνών του πλάσματος.



Εικόνα 4.1.ι: SPPP2_30: Ινώδης ιστός μεγάλου μεγέθους με κοκκία.

Στο τελευταίο δείγμα, το SPPP3_30, πρωταγωνιστούν τα συσσωματώματα αιμοπεταλίων, ενώ στον ενδιάμεσο χώρο βρίσκονται διάσπαρτα και τμήματα ινώδους ιστού μικρότερου μεγέθους. Πάλι εδώ, παρότι η συγκέντρωση της αιθανόλης με τα παράγωγα καπνού είναι διπλάσια από αυτή του δείγματος SPPP2_30, παρατηρούμε παρόμοια εικόνα με τα προηγούμενα δείγματα πλάσματος.



Εικόνα 4.1.κ: SPPP3_30: Μεγάλα συσσωματώματα αιμοπεταλίων και τμημάτων αιμοπεταλίων.

Όπως προαναφέρθηκε στην προκειμένη περίπτωση, το OM δε μας δίνει πληροφορία για την κλίμακα στην οποία μελετάμε τα δείγματα, οπότε δεν μπορούμε να εξάγουμε συμπεράσματα

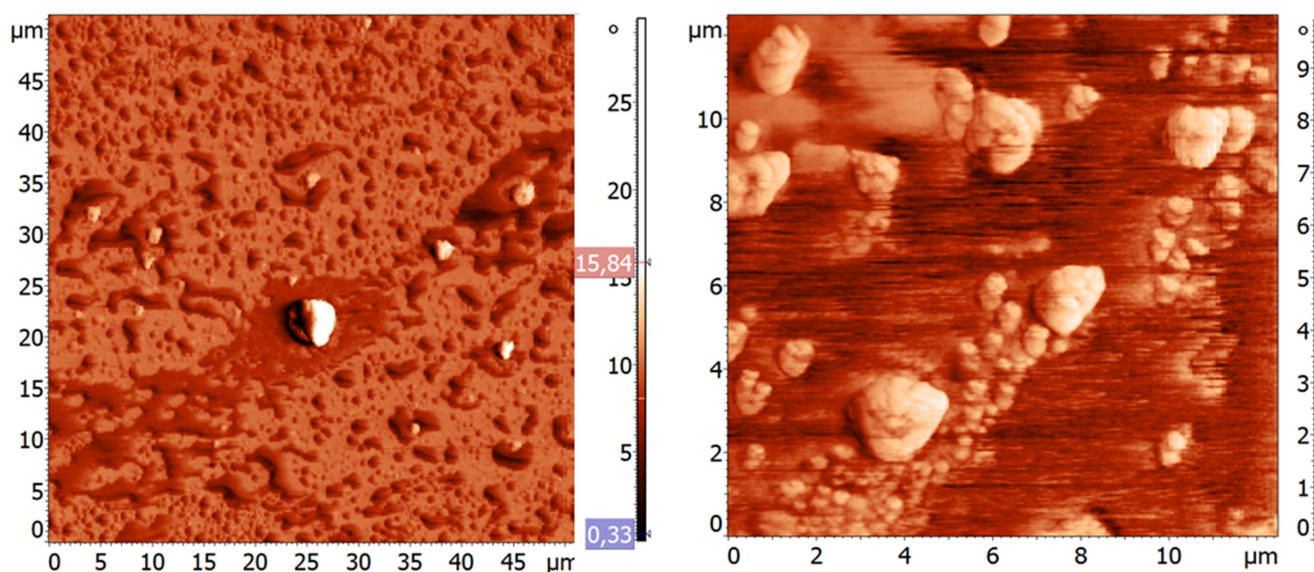
για μεγέθη κυττάρων, μήκος ψευδοποδίων κ.λπ. Ακόμη, δε δίνει τη δυνατότητα ευκρινούς παρατήρησης της επιφανείας ερυθροκυττάρων. Τις πληροφορίες αυτές τις λαμβάνουμε από το ΜΑΔ, όπου μπορούμε να μετρήσουμε με μεγάλη ακρίβεια διαστάσεις. Άλλα πλεονεκτήματα του ΜΑΔ έναντι του ΟΜ είναι ότι δεν απαιτεί εστίαση για την επίτευξη της καλύτερης διακριτικής ικανότητας και ότι η πληροφορία καταγράφεται σε ψηφιακή μορφή η οποία μπορεί να υποστεί επεξεργασία σε μετέπειτα χρόνο, μέσω του λογισμικού Nona.

4.3. Μετρήσεις ΜΑΔ

Αφού επιβεβαιώσαμε τη σχετική συγκέντρωση των δειγμάτων και την καταλληλότητά τους προς μικροσκόπηση στο ΜΑΔ, έπειτα από τη φασματοφωτομετρική μελέτη και την παρατήρησή τους στο ΟΜ αντίστοιχα, μπορούμε να ξεκινήσουμε τις μετρήσεις στο ΜΑΔ. Σε αυτό, όπως έχουμε ήδη αναφέρει, η διακριτική ικανότητα είναι πολύ μεγαλύτερη από το ΟΜ με αποτέλεσμα να μπορούμε να μελετήσουμε επιφάνειες κυττάρων με λεπτομέρεια νανομέτρου. Μέσω του λογισμικού Nona, μας δίνεται η δυνατότητα μερικής επεξεργασίας των εικόνων που προκύπτουν από τις μετρήσεις. Έτσι, μπορούμε να επιλέξουμε την κατάλληλη χρωματική παλέτα, να χρησιμοποιήσουμε μετρητικά εργαλεία και να αναπροσαρμόσουμε την υψομετρική χρωματική κλίμακα, έτσι ώστε να μπορούμε να πραγματοποιούμε αρκετά ακριβείς στατιστικές μελέτες και να καταγράφουμε ποιοτικές εικόνες των δειγμάτων μας.

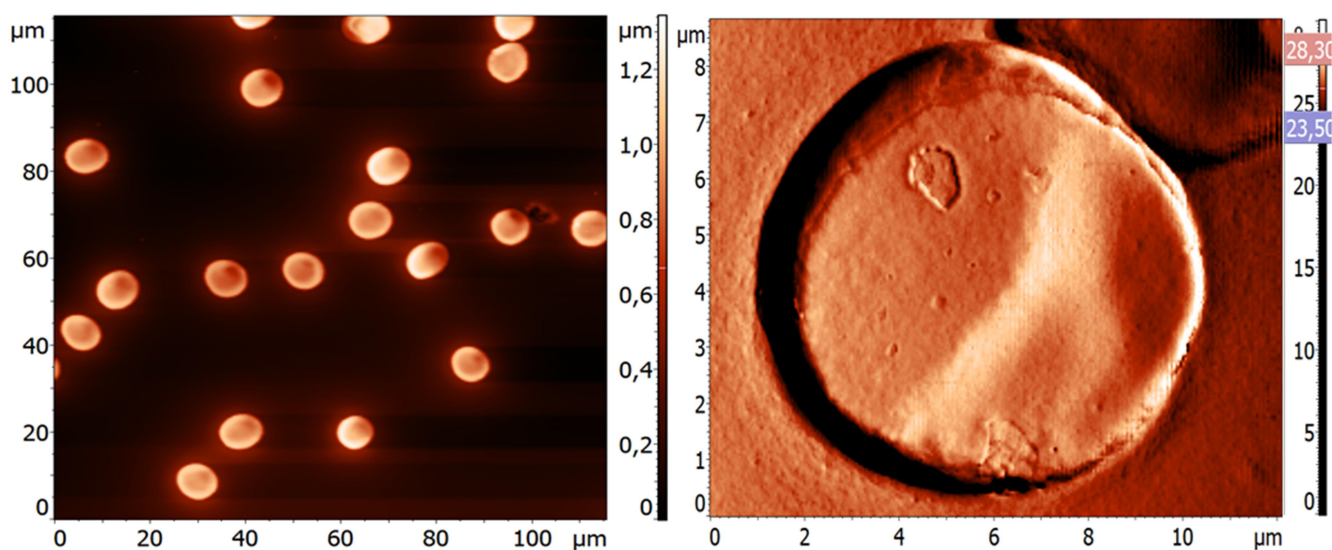
Ύστερα, λοιπόν, από τις μετρήσεις μας στο ΜΑΔ, παρατηρούμε τα εξής για κάθε ένα από τα δείγματα, ξεκινώντας από τα δείγματα αναφοράς:

Eth-nic (αιθανόλη με παράγωγα καπνού): Παρατηρούμε κοκκία διαφόρων μεγεθών καθώς και συσσωματώματα αυτών, όπως φαίνεται και στις εικόνες 4.3.α που ακολουθούν. Το ύψος του δείγματος είναι μεγάλο, φτάνοντας περίπου τα 1,3μm. Οι εικόνες φάσης, συγκρινόμενες με τις εικόνες ύψους, μας βοηθούν να διακρίνουμε καλύτερα ορισμένα χαρακτηριστικά των δειγμάτων και στη συγκεκριμένη περίπτωση τα κοκκία.



Εικόνες 4.3.α: Eth-nic: Αριστερά: εικόνα φάσης ΜΑΔ με εμφανή κοκκία μεγέθους μέχρι και 5 μm σε κλίμακα 50x50μm. Δεξιά: εικόνα φάσης ΜΑΔ με κοκκία διαφόρων μεγεθών σε κλίμακα 12x12μm.

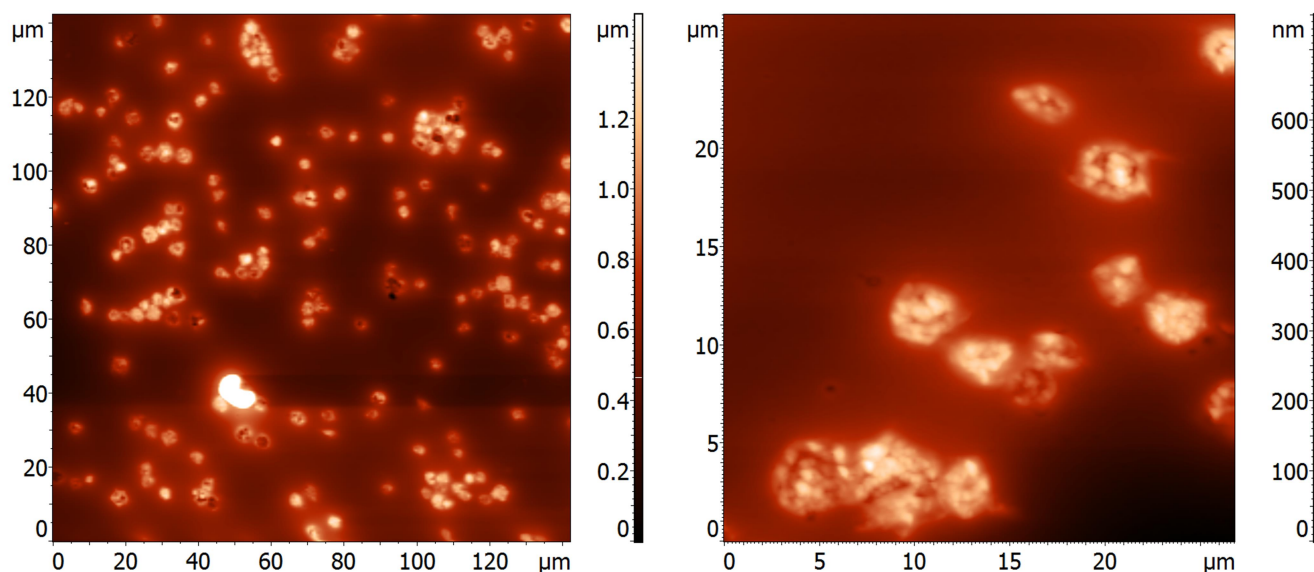
αΕκ1α (100 μl αίμα και 400 μl από το ppp2): Έχουμε ερυθροκύτταρα διαμέτρου 8-10μm (η μέτρια αυτή ανισοκυττάρωση παρατηρήθηκε και στο OM) και ύψους 1,4μm με επιφανειακές εξελκώσεις διαμέτρων 0,5-1,3μm. Η στατιστική που προέκυψε είναι $0,44 \pm 0,02$ εξελκώσεις, και $0,05 \pm 0,02$ κυστίδια, μεγαλύτερα των 0,5 μm, ανά ερυθροκύτταρο, μετά από μελέτη 34 κυττάρων. Ως σφάλμα έχουμε θεωρήσει 1 συμβάν (μία εξέλκωση ή ένα κυστίδιο αντίστοιχα) ανά το σύνολο των κυττάρων που μελετήθηκαν ($\frac{1}{41} \approx 0,02$). Το σχήμα τους δε φαίνεται να έχει παραμορφωθεί από τη φυγοκέντρωση. Όπως παρατηρούμε στην εικόνα 4.3.γ1, δε φαίνεται να υπάρχει συσσωμάτωση και αλληλεπικαλύψεις κυττάρων.



Εικόνα 4.3.γ1: αΕκ1α: Εικόνα τοπογραφίας MAD ερυθροκυττάρων σε κλίμακα 115x115μm.

Εικόνα 4.3.γ2: αΕκ1α: Εικόνα φάσης MAD ερυθροκυττάρου με εξέλκωση >0.5μm σε κλίμακα 12x12μm.

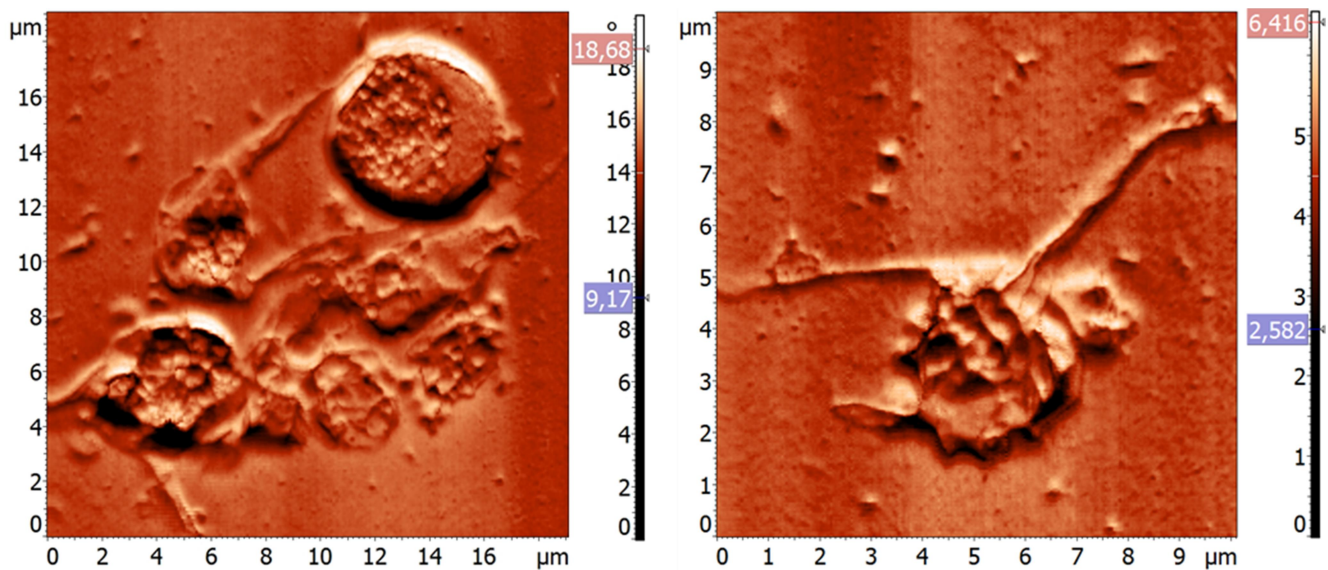
PCP_1B (συμπυκνωμένα αιμοπετάλια): Η γενική εικόνα αποτελείται από πολυάριθμα αιμοπετάλια και 1-2 διάσπαρτα ερυθροκύτταρα. Κάποια αιμοπετάλια είναι ενεργοποιημένα, εξαιτίας της μηχανικής τους καταπόνησης έπειτα από τη φυγοκέντρωση. Η ενεργοποίηση αυτή εντοπίζεται στο σχηματισμό ψευδοποδίων που όμως δεν ξεπερνούν σε μήκος τα 2μm, που έχουμε θέσει σαν ελάχιστο όριο στη στατιστική μας μελέτη. Έχουμε ανισοκυττάρωση με το μέγεθος των αιμοπεταλίων να κυμαίνεται μεταξύ 2 και 4 μm. Τα ερυθροκύτταρα έχουν μέγεθος 5-7μm και παραμορφωμένο σχήμα, που οφείλεται στην υψηλή ταχύτητα φυγοκέντρωσης (2400g). Ωστόσο, το γεγονός ότι παρέμειναν στο υπερκείμενο μετά τη φυγοκέντρωση υποδεικνύει ότι πιθανόν να είχαν εξ αρχής έλλειμμα μάζας, δηλαδή να είχαν χάσει το κυτταρόπλασμά τους. Ακόμα, παρατηρούμε πως υπάρχει μία τάση για σχηματισμό συσσωματωμάτων.



Εικόνα 4.3.6: PCP_1B: Αριστερά: Εικόνα τοπογραφίας ΜΑΔ σε κλίμακα 140x140μm, όπου φαίνονται πολλά αιμοπετάλια με τάση προς σχηματισμό συσσωματωμάτων και ένα παραμορφωμένο ερυθροκύτταρο. Δεξιά: Εικόνα τοπογραφίας ΜΑΔ αιμοπεταλίων σε κλίμακα 25x25μm.

Στη συνέχεια, παρατίθενται οι μετρήσεις ΜΑΔ των δειγμάτων αιμοπεταλίων, δηλαδή του SP1_2H, του SP2_2H και του SP3_2H.

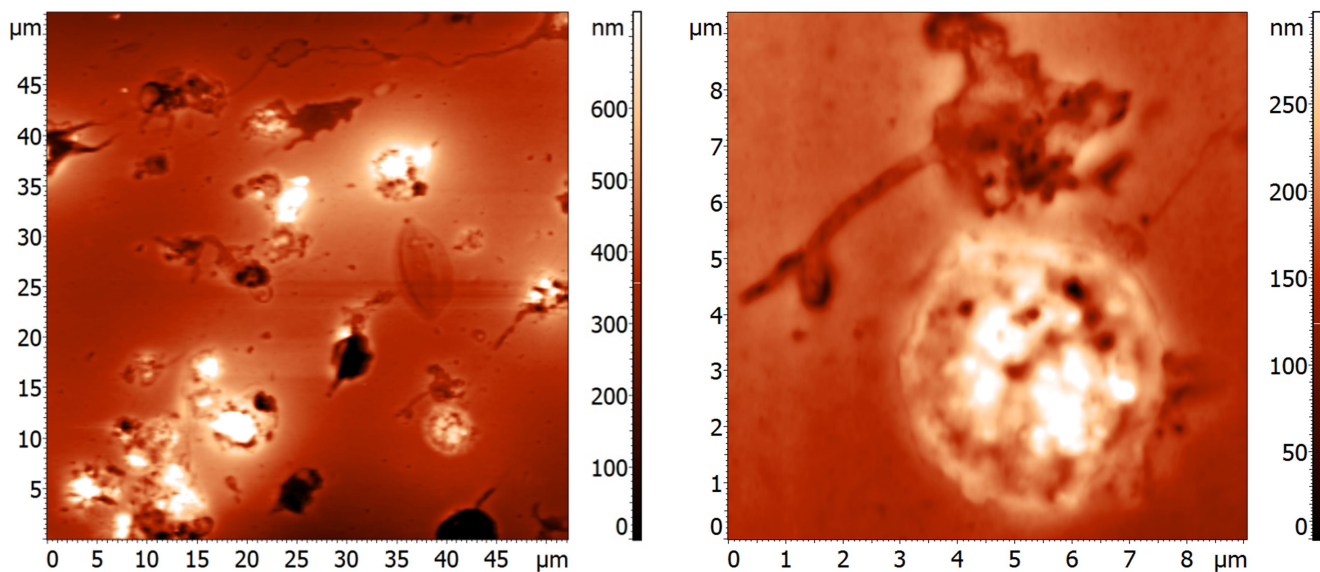
SP1_2H (70 μl pcpr και 7 μl αιθανόλης): Έχουμε εικόνα με λίγα ερυθροκύτταρα, αρκετά αιμοπετάλια, συσσωματώματα από κοκκία αιμοπεταλίων και κομμάτια μεμβρανών. Τα ερυθροκύτταρα έχουν μέγεθος 6-10 μm και κάποια από αυτά φαίνεται να έχουν χάσει κυτταρόπλασμα με αποτέλεσμα να είναι παραμορφωμένα. Τα αιμοπετάλια είναι ενεργοποιημένα με μέγεθος 2-6 μm, δημιουργούν μεγάλα συσσωματώματα και έχουν υποστεί αποκοκκίωση. Παρατηρούμε ψευδοπόδια (με μήκος >2 μm) σε σχετικά μικρό ποσοστό, δηλαδή $0,27 \pm 0,02$ /αιμοπετάλιο σε στατιστικό δείγμα 59 αιμοπεταλίων. Το σφάλμα προκύπτει αν θεωρήσουμε αβεβαιότητα μέτρησης 1 ψευδοποδίου στο σύνολο των κυττάρων ($\frac{1}{59} \approx 0,02$). Τα αιμοπετάλια χάνουν όγκο και μάζα για να αυξήσουν την επιφανειακή τους κάλυψη. Έτσι, η διάμετρός τους αυξάνεται φτάνοντας μέχρι και 6 μm. Οι επιφάνειές τους έχουν μεγάλη τραχύτητα, λόγω της αποκοκκίωσης. Όλα αυτά συμβαίνουν, προφανώς, λόγω της παρουσίας της αιθανόλης. Το ύψος του δείγματος φτάνει μέχρι 3 μm. Χαρακτηριστική εικόνα συσσωματώματος αιμοπεταλίων αποτελεί η 4.3.δ1 όπου φαίνονται οι αποκοκκιωμένες επιφάνειες των κυττάρων και μερικά ψευδοπόδια, ενώ στην εικόνα 4.3.δ2 φαίνεται ένα αιμοπετάλιο με δύο ψευδοπόδια, μεγαλύτερα των 2 μm.



Εικόνα 4.3.δ1: SP1_2H: Εικόνα φάσης ΜΑΔ με αιμοπετάλια και ερυθροκύτταρο, όπου φαίνεται η τάση συσσωμάτωσης των κυττάρων και η έντονη αποκοκκίωση.

Εικόνα 4.3.δ2: SP1_2H: Εικόνα φάσης ΜΑΔ αιμοπεταλίου. Διακρίνονται δύο ψευδοπόδια μεγέθους >2μm.

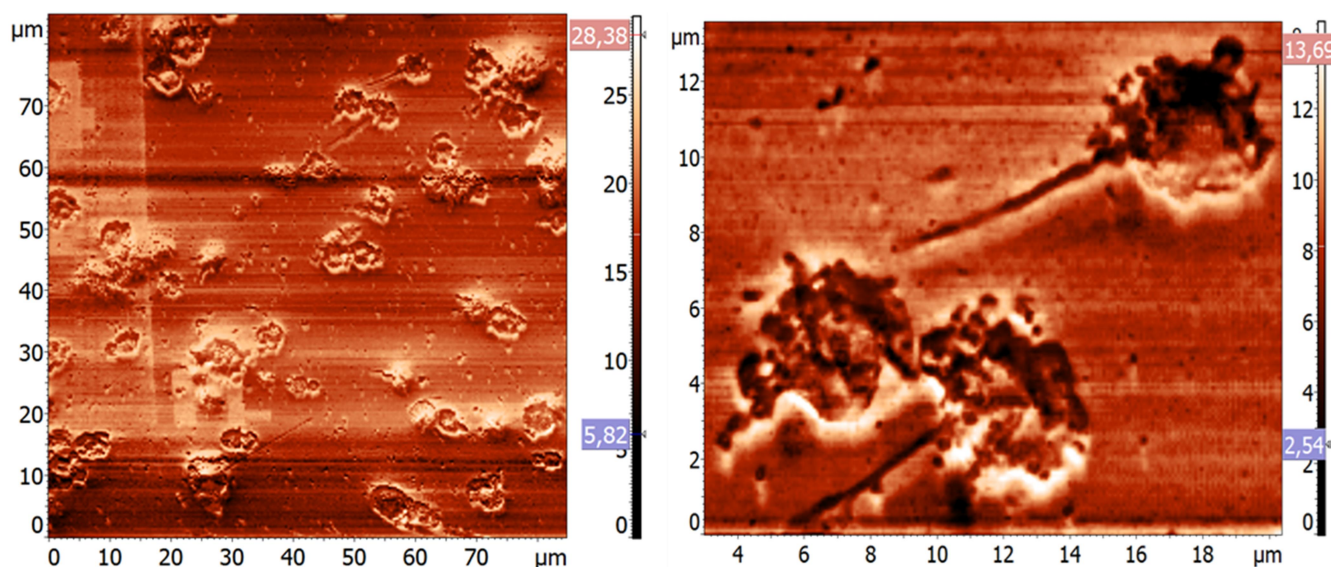
SP2_2H (70 μl rcp και 7 μl αιθανόλης με παράγωγα καπνού): Η εικόνα αποτελείται από ενεργοποιημένα αιμοπετάλια και πολλά συσσωματώματα αυτών. Σε σχέση με το δείγμα SP1_2H, τα κύτταρα είναι εμφανώς πιο παραμορφωμένα. Όπως βλέπουμε και στην εικόνα 4.3.ε1, έχουμε συσσωματώματα αιμοπεταλίων με αυξημένες επιφάνειες και σχηματισμό ψευδοποδίων, μερικών εκ των οποίων έχουν μήκος μεγαλύτερο από 20 μm. Ο μηχανισμός ενεργοποίησης αιμοπεταλίων μέσω του σχηματισμού ψευδοποδίων αποτελεί το μηχανικό τρόπο με τον οποίο τείνουν να συγκολληθούν, ιδιαίτερα όταν απέχουν σχετικά μεγάλες αποστάσεις μεταξύ τους. Πράγματι, εδώ, βλέπουμε ότι όντως έχουν αρχίσει να συνδέονται με τον τρόπο αυτό. Η διάμετρός τους κυμαίνεται από 2 μέχρι 7 μm και παρουσιάζουν $0,57 \pm 0,03$ ψευδοπόδια (>2 μm) το καθένα, αριθμός που προέκυψε από στατιστική δειγμάτων 40 κυττάρων. Στο υπόβαθρο βρίσκονται διάσπαρτα κοκκία αιμοπεταλίων. Στην εικόνα 4.3.ε2, φαίνονται δύο αιμοπετάλια ενεργοποιημένα με διαφορετικό μηχανισμό το καθένα. Το ένα έχει αυξημένο μέγεθος με διάμετρο 4,5 μm, ενώ το άλλο έχει σχηματίσει ένα ψευδοπόδιο μήκους περίπου 4 μm.



Εικόνα 4.3.ε1: SP2_2H: Εικόνα τοπογραφίας ΜΑΔ σε κλίμακα 50x50μm με ενεργοποιημένα αιμοπετάλια. Είναι εμφανής ο σχηματισμός ψευδοποδίων με μεγάλο μήκος.

Εικόνα 4.3.ε2: SP2_2H: Εικόνα τοπογραφίας ΜΑΔ δύο αιμοπεταλίων σε κλίμακα 9x9μm, το ένα εκ των οποίων φέρει ψευδοπόδιο μήκους 4μm.

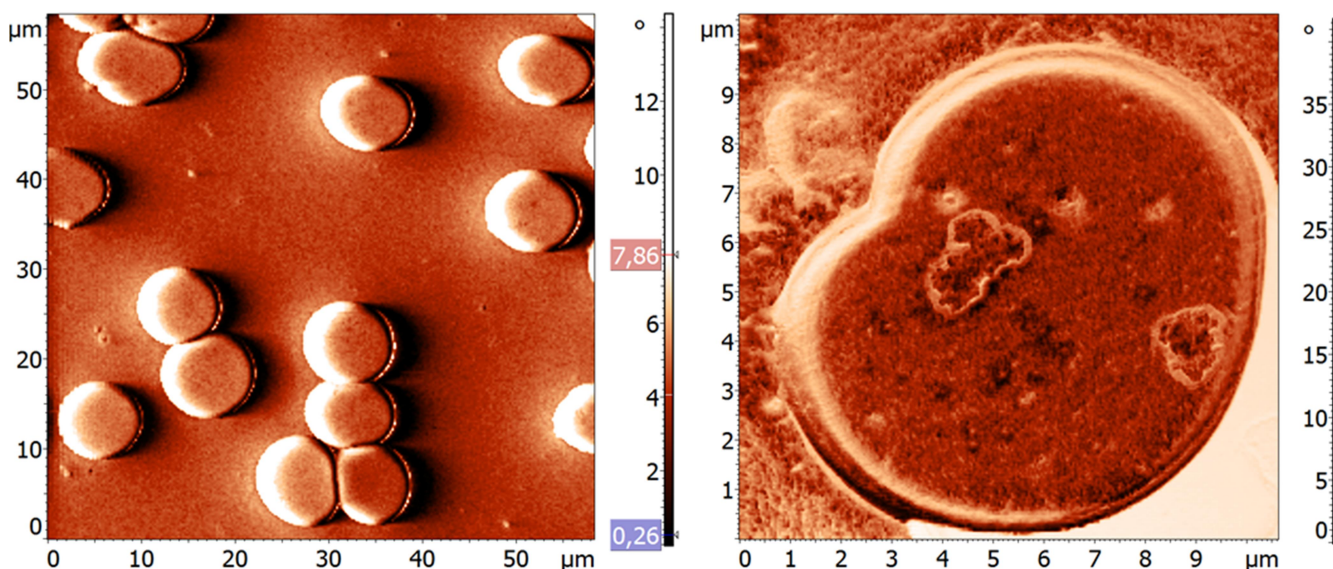
SP3_2H (70 μl rcp και 14 μl αιθανόλης με παράγωγα καπνού): Παρατηρούμε έντονους σχηματισμούς και πολλά συσσωματώματα αιμοπεταλίων και τμημάτων αυτών (εικόνες 4.3.στ). Έχουμε και εδώ ενεργοποιημένα αιμοπετάλια με χαρακτηριστική την ύπαρξη ψευδοποδίων, πολύ περισσότερων από αυτά του δείγματος SP1_2H, δηλαδή περίπου $0,58 \pm 0,02$ ψευδοπόδια (με μήκος $>2 \mu\text{m}$) ανά αιμοπετάλιο σε στατιστικό δείγμα 30 κυττάρων. Συγκρινόμενο με το δείγμα SP2_2H, έχει περίπου ίδιο ποσοστό ψευδοποδίων το μήκος των οποίων είναι εξίσου μεγάλο. Στο υπόβαθρο βρίσκονται διάσπαρτα κοκκία αιμοπεταλίων. Τα συσσωματώματα που δημιουργούνται από τα τμήματα των αιμοπεταλίων είναι πολύ μεγάλα, φτάνοντας σε μέγεθος μέχρι και 40 μm. Τα αιμοπετάλια έχουν μέγεθος 3-7μm.



Εικόνες 4.3.στ: SP3_2H: Αριστερά: Εικόνα φάσης ΜΑΔ αιμοπεταλίων με εμφανή την ύπαρξη ψευδοποδίων, σε κλίμακα 80x80μm. Δεξιά: Εικόνα φάσης ΜΑΔ τριών αιμοπεταλίων με ύπαρξη ψευδοποδίων $>2\mu\text{m}$.

Ακολουθώς, παρατίθενται οι μετρήσεις ΜΑΔ των δειγμάτων ερυθροκυττάρων, δηλαδή του SR1_2H, του SR2_2H και του SR3_2H.

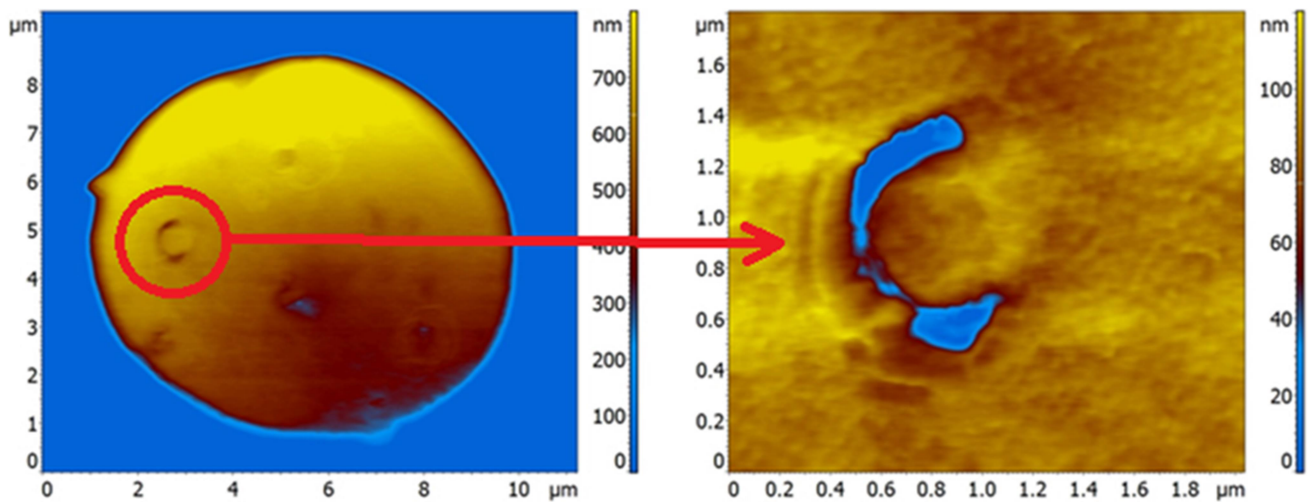
SR1_2H (150 μl αΕκ και 15 μl αιθανόλης): Στην οθόνη εμφανίζονται ερυθροκύτταρα μεγέθους 8-10 μm με μερικά από αυτά να σχηματίζουν γραμμικά συσσωματώματα (εικόνα 4.3.ζ1). Το σχήμα τους σε γενικές γραμμές δεν είναι παραμορφωμένο. Στην επιφάνειά τους υπάρχουν αρκετές εξελκώσεις, διαμέτρων περίπου 0,5-2 μm (εικόνα 4.3.ζ2). Ύστερα από μελέτη 38 κυττάρων, προέκυψαν κατά μέσο όρο $1,18 \pm 0,03$ εξελκώσεις και $0,59 \pm 0,03$ κυστίδια ανά ερυθροκύτταρο. Τα ερυθροκύτταρα οργανώνονται σε γραμμικά συσσωματώματα χάρη στις ειδικές ουσίες που περιέχουν και οι οποίες ονομάζονται συγκολλητινογόνα [1.4.2]. Η συγκόλληση των ερυθρών εξαρτάται από το pH του περιβάλλοντος. Είναι, δηλαδή, πιθανό να δημιουργούνται λόγω του αλκοολικού περιβάλλοντος. Στην περίπτωση μας η περιεκτικότητα της αιθανόλης είναι μεγάλη (10%).



Εικόνα 4.3.ζ1: SR1_2H: Εικόνα φάσης ερυθροκυττάρων ΜΑΔ σε κλίμακα 80x80 μm . Διακρίνουμε τάση προς σχηματισμό γραμμικών συσσωματωμάτων.

Εικόνα 4.3.ζ2: SR1_2H: Εικόνα φάσης ΜΑΔ ερυθροκυττάρου με δύο εξελκώσεις >0.5 μm .

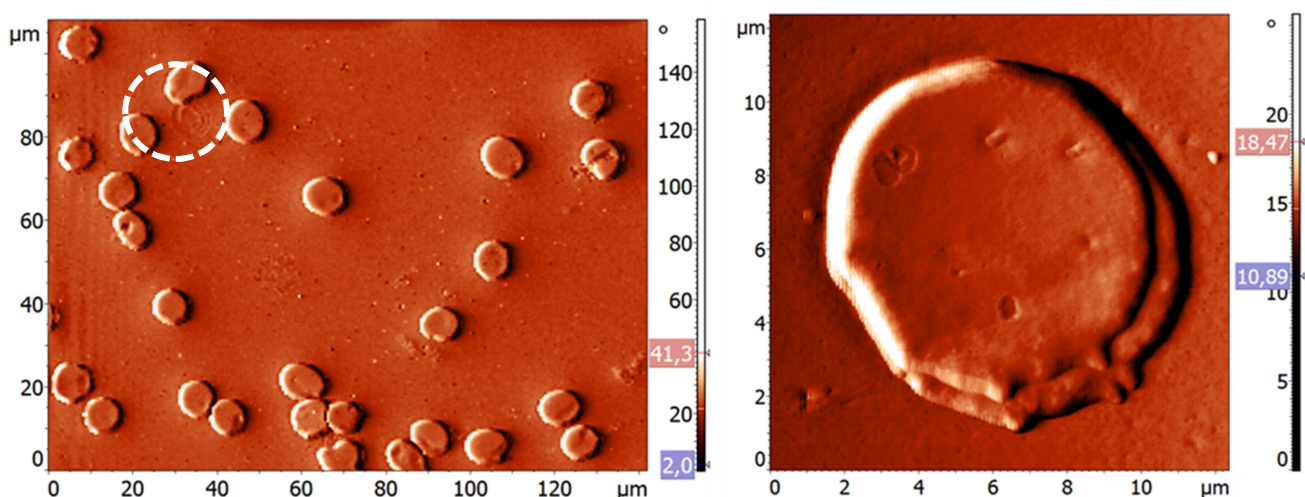
Διαλέγοντας μια διαφορετική παλέτα χρωμάτων, από αυτές που διαθέτει το λογισμικό Nona, μπορούμε να αναδείξουμε καλύτερα ορισμένα χαρακτηριστικά των κυττάρων του δείγματος και στην προκειμένη περίπτωση τα κυστίδια των ερυθροκυττάρων (εικόνες 4.3.ζ3 και 4.3.ζ4). Με μπλε χρώμα παρουσιάζονται οι υψομετρικά πιο χαμηλές περιοχές του δείγματος, όπως υποδεικνύει και η χρωματική κλίμακα στα δεξιά κάθε εικόνας.



Εικόνα 4.3.ζ3: SR1_2H: Εικόνα τοπογραφίας ΜΑΔ ερυθροκυττάρου με κυστίδιο (στον κύκλο).

Εικόνα 4.3.ζ4: SR1_2H: Εικόνα τοπογραφίας ΜΑΔ κυστιδίου σε μεγέθυνση. Με το μπλε χρώμα αναδεικνύονται τα πιο χαμηλά σημεία, όπως υποδεικνύει η χρωματική κλίμακα δεξιά.

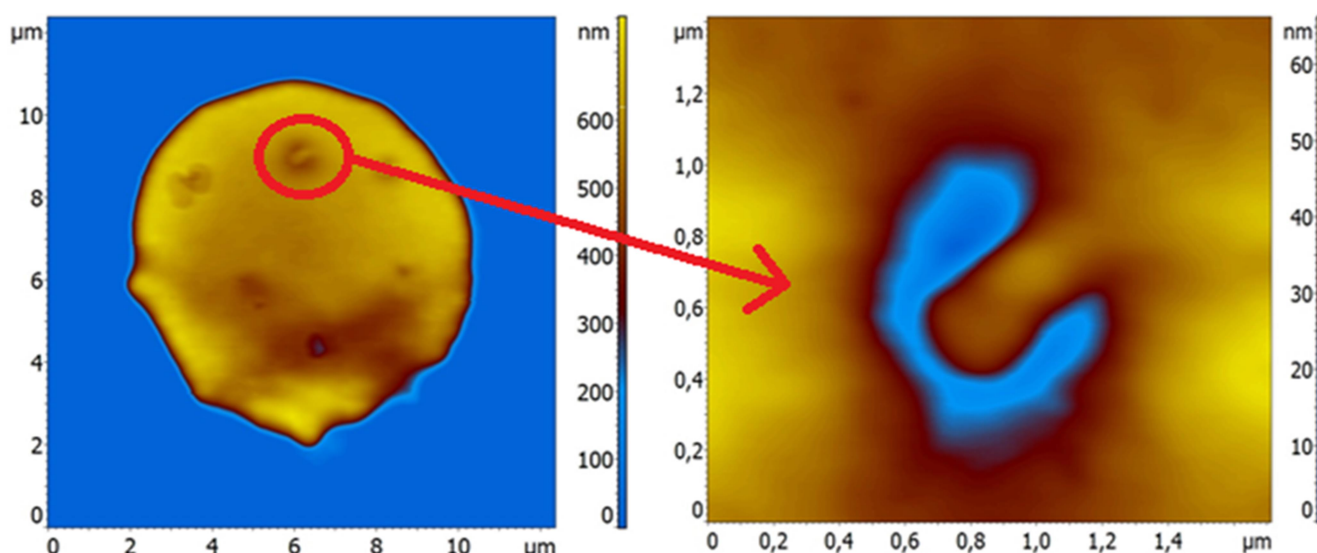
SR2_2H (150 μl αΕκ και 15 μl αιθανόλης με παράγωγα καπνού): Παρατηρούμε ερυθροκύτταρα διαμέτρων 8-10 μm , που έχουν και εδώ την τάση να συγκολλούνται μεταξύ τους. Στην επιφάνειά τους φέρουν εξελκώσεις με στατιστική $0,86 \pm 0,03$ εξελκώσεις και $0,62 \pm 0,03$ κυστίδια ($>0,5 \mu\text{m}$) ανά ερυθροκύτταρο, έπειτα από μελέτη 29 κυττάρων. Οι εξελκώσεις, εδώ, είναι λιγότερες και σε γενικές γραμμές μικρότερες σε μέγεθος σε σχέση με τις εξελκώσεις των κυττάρων του δείγματος SR1_2H. Στο οπτικό πεδίο διακρίνονται αμυδρά 3-4 ερυθροκύτταρα που έχουν χάσει μεγάλο ποσοστό του κυτταροπλάσματός τους κι έτσι το πάχος τους είναι της τάξης των νανομέτρων. Χαρακτηριστικά, φαίνεται ένα στην εικόνα 4.3.η1, εντός του λευκού κύκλου. Στην εικόνα 4.3.η2 παρατηρούμε ερυθροκύτταρο στην επιφάνεια του οποίου διακρίνονται δύο κυστίδια και τρεις εξελκώσεις. Αμέσως πιο κάτω θα δούμε το κύτταρο αυτό σε διαφορετική χρωματική παλέτα. Στον κενό χώρο βρίσκονται διασκορπισμένα κοκκία.



Εικόνα 4.3.η1: SR2_2H: Εικόνα φάσης ΜΑΔ ερυθροκυττάρων, σε κλίμακα $140 \times 140 \mu\text{m}$. Στον κύκλο διακρίνεται αμυδρά ερυθροκύτταρο που έχει χάσει κυτταρόπλασμα («φάντασμα»).

Εικόνα 4.3.η2: SR2_2H: Εικόνα φάσης ΜΑΔ ερυθροκυττάρου, σε κλίμακα $12 \times 12 \mu\text{m}$, στην επιφάνεια του οποίου φαίνονται κυστίδια και εξελκώσεις.

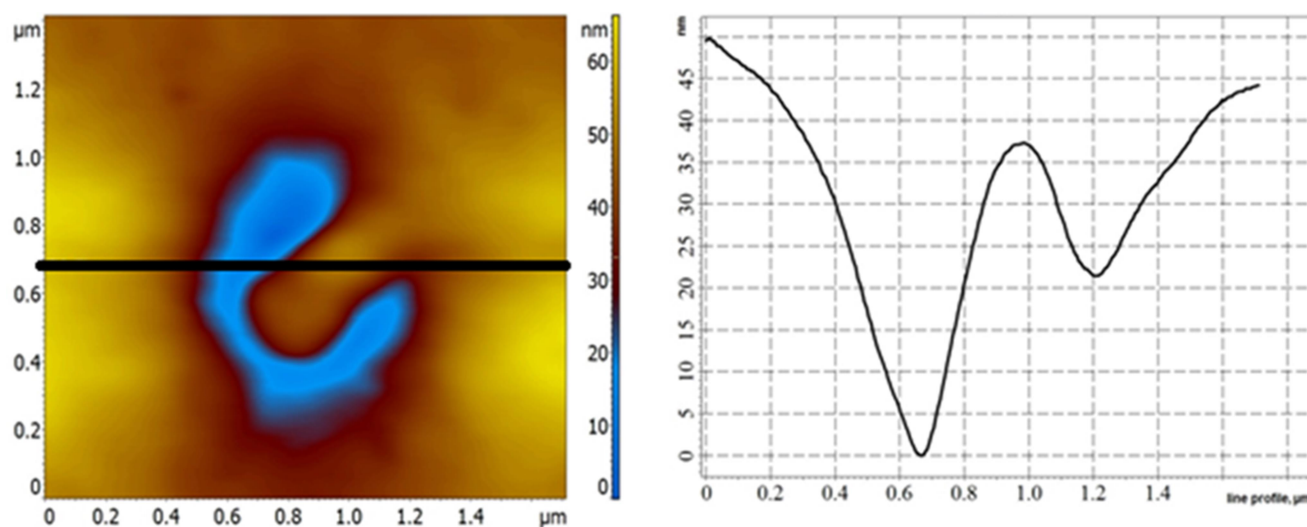
Διαλέγοντας πάλι τη διαφορετική παλέτα χρωμάτων που χρησιμοποιήσαμε και στην περίπτωση του δείγματος SR1_2H, αναδεικνύουμε καλύτερα την ύπαρξη κυστιδίων. Στην εικόνα 4.3.η4 παρατηρούμε τη μορφή του κυστιδίου που βρίσκεται εντός του κύκλου της εικόνας 4.3.η3, με το χαρακτηριστικό μπλε χρώμα να υποδεικνύει τις πιο χαμηλές περιοχές του δείγματος. Το κυστίδιο έχει σχήμα «δακτύλου» το οποίο στη συνέχεια αποβάλλεται από το κύτταρο ως αποτέλεσμα διαδικασιών εξωκυττάρωσης, αφήνοντας στο σημείο αυτό μία αποδόμηση βάθους >20nm [1.4.7],[1.4.8].



Εικόνα 4.3.η3: SR2_2H: Εικόνα τοπογραφίας ΜΑΔ ερυθροκυττάρου με κυστίδιο (εντός κύκλου).

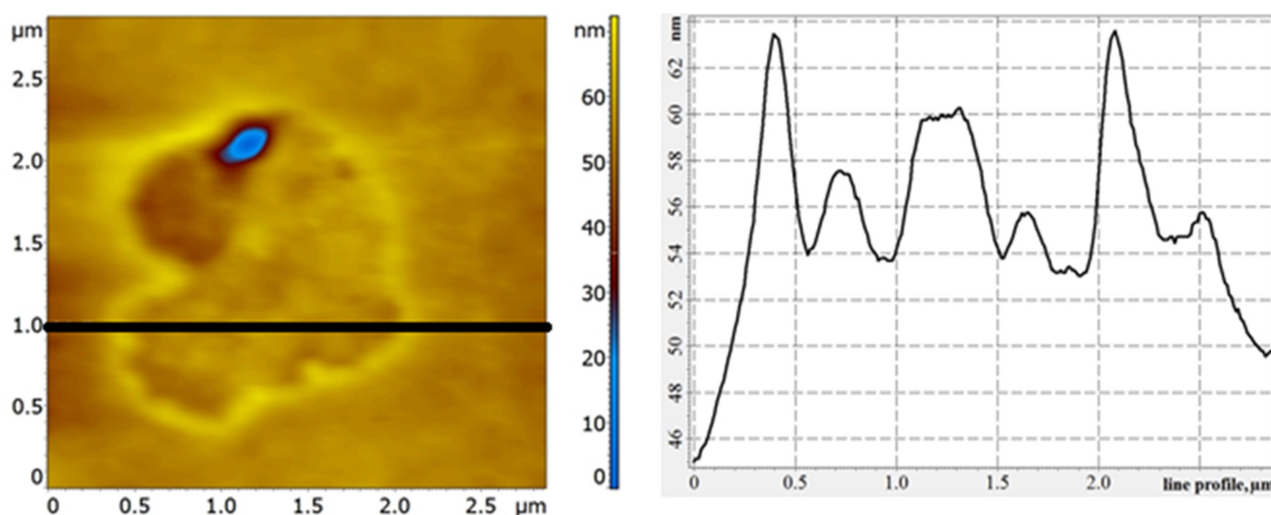
Εικόνα 4.3.η4: SR2_2H: Εικόνα τοπογραφίας ΜΑΔ του κυστιδίου σε μεγέθυνση.

Στις εικόνες 4.3.η5, παρουσιάζεται η τομή του ερυθροκυττάρου γύρω από κυστίδιο, κατά μήκος της μαύρης, οριζόντιας γραμμής. Στην περίπτωση των κυστιδίων, είναι προφανές ότι το βάθος είναι αισθητά μεγαλύτερο από αυτό των εξελκώσεων, γι' αυτό και υποθέτουμε ότι ογκικές αποδομήσεις μπορούν να προκύψουν ύστερα από αποκόλληση κυστιδίων.



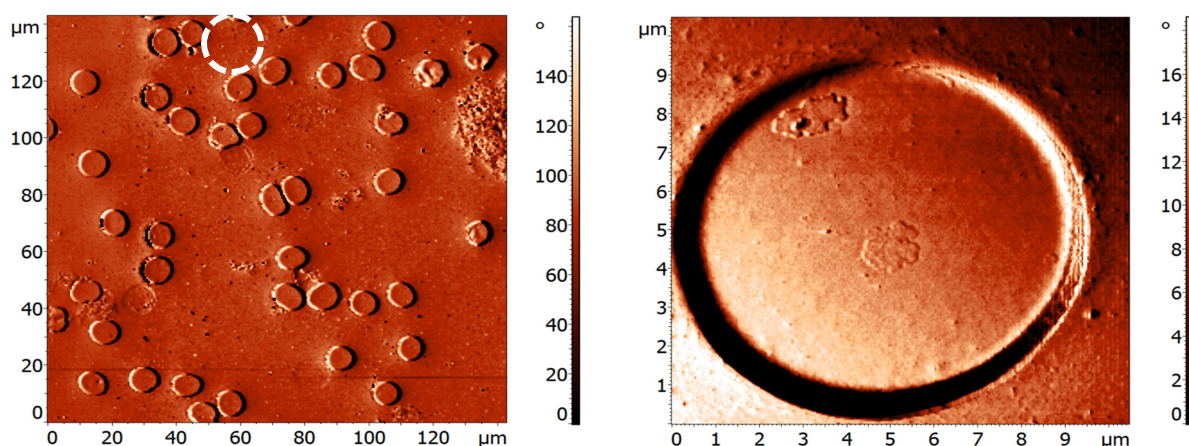
Εικόνα 4.3.η5: SR2_2H: Τομή του κυστιδίου κατά μήκος της μαύρης, οριζόντιας γραμμής.

Στις εικόνες 4.3.η6, φαίνεται η τομή μιας εξέλκωσης του δείγματος. Το γράφημα που παρατίθεται δεξιά δείχνει χαρακτηριστικά τον επιφανειακό χαρακτήρα των εξελκώσεων μιας και το βάθος τους δεν ξεπερνά τα 20 nm. Η τομή αυτή αντιστοιχεί στην εξέλκωση της αριστερής εικόνας, κατά μήκος της μαύρης, οριζόντιας γραμμής. Το μπλε σημάδι της αριστερής εικόνας είναι διαφοροποιημένο χρωματικά, καθώς αντιστοιχεί σε πιο χαμηλά σημεία, σύμφωνα με τη χρωματική, τοπογραφική κλίμακα στα δεξιά της, εξαιτίας μικρής ογκικής αποδόμησης στο σημείο αυτό.



Εικόνα 4.3.η6: SR2_2H: Τομή εξέλκωσης κατά μήκος της μαύρης, οριζόντιας γραμμής.

SR3_2H (150 μl αΕκ και 30 μl αιθανόλης με παράγωγα καπνού): Παρατηρούμε ερυθροκύτταρα διαμέτρων 8-10 μm, με τάση να έλκονται μεταξύ τους όπως και στα προηγούμενα δύο δείγματα. Στην επιφάνεια καθενός υπάρχουν περίπου $1,55 \pm 0,03$ εξελκώσεις και $0,14 \pm 0,03$ κυστίδια, έπειτα από στατιστική μελέτη 29 κυττάρων. Δηλαδή, συγκρινόμενο με τα προηγούμενα δείγματα ερυθροκυττάρων, εμφανίζει περισσότερες εξελκώσεις, και λιγότερα κυστίδια.



Εικόνα 4.3.ι1: SR3_2H: Εικόνα φάσης ΜΑΔ ερυθροκυττάρων, μερικά εκ των οποίων έχουν χάσει κυτταρόπλασμα (διακρίνονται εντός των κύκλων), σε κλίμακα 140x140μm.

Εικόνα 4.3.ι2: SR3_2H: Εικόνα φάσης ΜΑΔ ερυθροκυττάρου με δύο εξελκώσεις >0.5μm, σε κλίμακα 10x10μm.

Στο οπτικό πεδίο (εικόνα 4.3.11) διακρίνονται εντός των κύκλων μερικά ερυθροκύτταρα-«φαντάσματα», δηλαδή ερυθροκύτταρα που έχουν χάσει μεγάλο μέρος του κυτταροπλάσματος τους. Στην εικόνα 4.3.12 φαίνεται η εικόνα φάσης ενός ερυθροκυττάρου στην επιφάνεια του οποίου υπάρχουν δύο εξελκώσεις $>0,5 \mu\text{m}$.

Τέλος, παρατίθενται οι μετρήσεις ΜΑΔ των δειγμάτων πλάσματος (φτωχού σε αιμοπετάλια-ppp), δηλαδή του SPPP1_30, του SPPP2_30 και του SPPP3_30.

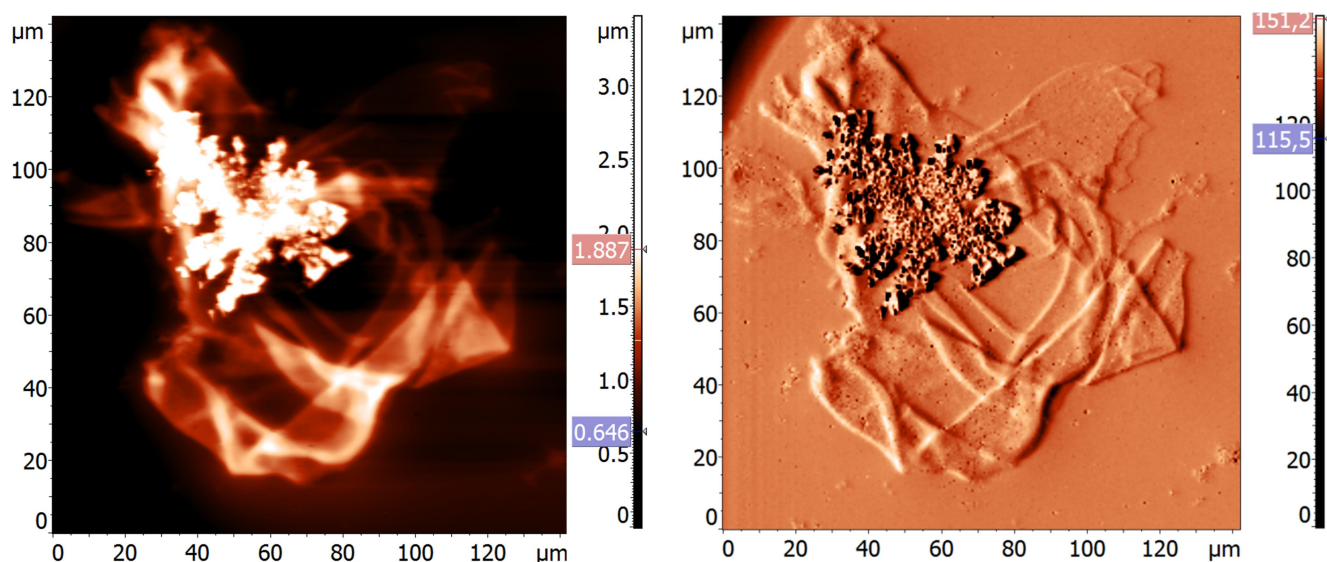
SPPP1_30 (150 μl ppp και 15 μl αιθανόλη): Για το δείγμα αυτό δεν είχαμε αρκετά οπτικά πεδία ΜΑΔ με αποτέλεσμα τα ευρήματά μας να μην αντικατοπτρίζουν την πραγματική εικόνα αυτού. Η μελέτη των επιθυμητών περιοχών του δείγματος ήταν δύσκολη καθώς η επιλογή της κάθε νέας υπό σάρωση περιοχής γίνεται «τυφλά», δηλαδή χωρίς οπτική καθοδήγηση. Αντιθέτως, από τη μελέτη του δείγματος αυτού στο ΟΜ, όπου είχαμε στη διάθεσή μας πολυάριθμα οπτικά πεδία και δυνατότητα ακριβούς μετακίνησης πάνω στο δείγμα, παρατηρήθηκε ύπαρξη δομών με πτυχώσεις και αρκετά συσσωματώματα αιμοπεταλίων, όπως αναφέραμε στην αντίστοιχη ενότητα.

SPPP2_30 (150 μl ppp και 15 μl αιθανόλης με παράγωγα καπνού): Έχουμε αρκετά διαφορετική εικόνα με έντονα συσσωματώματα και δομές με πτυχώσεις δεκάδων μm όπως παρατηρήσαμε και στο ΟΜ. Αντιπροσωπευτικές εικόνες ΜΑΔ παρουσιάζονται πιο κάτω στις 4.3.λ1-4.3.λ6 και 4.3.λ7.

Συγκεκριμένα, στις εικόνες 4.3.λ1-4.3.λ6, δίνεται το σήμα τοπογραφίας στα αριστερά, ενώ στα δεξιά δίνεται το αντίστοιχο σήμα φάσης. Η χρωματική κλίμακα των εικόνων έχει αναπροσαρμοστεί κατάλληλα ώστε να αναδεικνύονται με τον καλύτερο τρόπο όλες οι λεπτομέρειες του δείγματος.

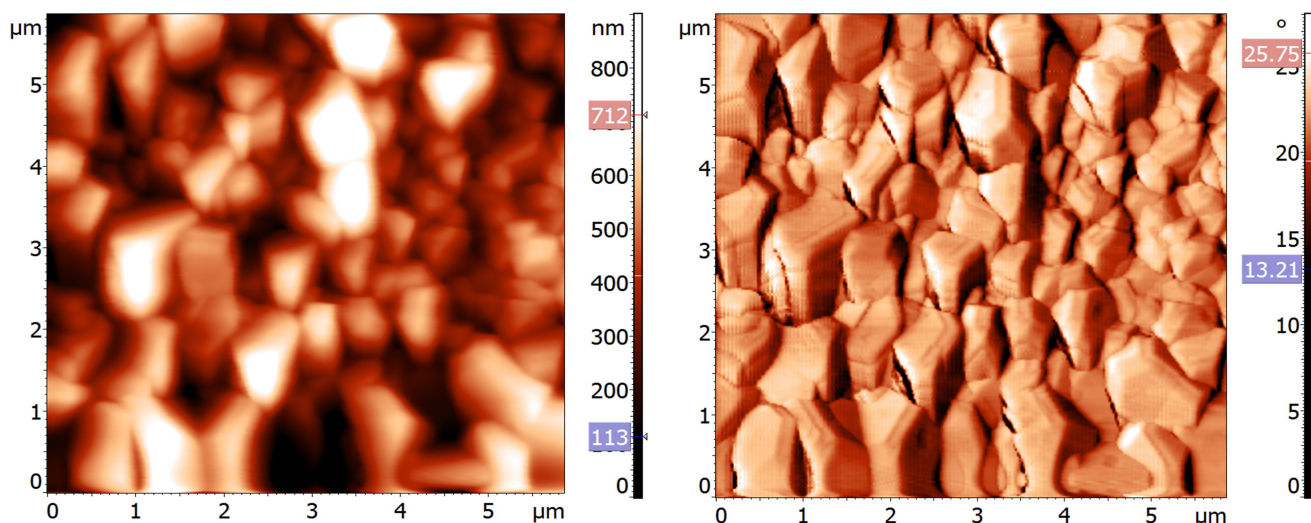
Χαρακτηριστικά, στην εικόνα 4.3.λ1 διακρίνονται οι πολυεπίπεδες πτυχώσεις, με τη βοήθεια της χρωματικής υψομετρικής κλίμακας. Δηλαδή, οι περιοχές που έχουν περισσότερα στρώματα του ιστού αυτού είναι πιο ψηλές με αποτέλεσμα να εμφανίζονται πιο φωτεινές, όπως υποδεικνύει και η κλίμακα στα δεξιά της εικόνας. Στο αντίστοιχο σήμα φάσης, στην εικόνα 4.3.λ2, φαίνονται ορισμένες περιοχές που έχουν χαθεί στο σήμα τοπογραφίας, εξαιτίας της αναπροσαρμογής της χρωματικής κλίμακας. Επιπλέον, σε αυτό φαίνονται αρκετά καθαρά οι επιφάνειες του ιστού και του συσσωματώματος, με τους πόρους και τα κοκκία αυτών, αντίστοιχα. Τα κοκκία του συσσωματώματος αυτού διακρίνονται σε μεγέθυνση στην εικόνα τοπογραφίας 4.3.λ3, με τις χαρακτηριστικές τους υψομετρικές διαφορές, αλλά και στην εικόνα φάσης 4.3.λ4, όπου φαίνονται καλύτερα οι μικροσκοπικές διαστάσεις τους. Τα συσσωματώματα έχουν μέγεθος μέχρι και $50 \mu\text{m}$ και φαίνονται να αποτελούνται από μικρά κοκκία μεγέθους $1 \mu\text{m}$ περίπου. Όσον αφορά τις πτυχωτές δομές, πιθανότατα αποτελούν τμήματα ινώδους ιστού μεγέθους $130 \mu\text{m}$, ο οποίος έχει ομοιόμορφη όψη, στην κλίμακα που εξετάζουμε. Στην εικόνα τοπογραφίας 4.3.λ5 φαίνεται ένα τμήμα τους με τις πτυχώσεις που προαναφέραμε και τους πόρους που φέρουν στην επιφάνειά τους, σε μεγέθυνση. Στην αντίστοιχη εικόνα φάσης 4.3.λ6, παρουσιάζονται καλύτερα τόσο οι πτυχώσεις όσο και οι μικρο/νανο-σκοπικοί πόροι, πολλοί από τους οποίους δε φαίνονται στην εικόνα τοπογραφίας.

Ακόμη, όπως φαίνεται στην εικόνα 4.3.λ7, στο δείγμα αυτό υπάρχουν διάσπαρτα συσσωματώματα αιμοπεταλίων. Αυτά τα ευρήματα βρίσκονται σε συμφωνία με τα δεδομένα ΟΜ. Το ύψος του δείγματος πλησιάζει τα 3 μm . Η γενική εικόνα του είναι αποτέλεσμα του συνδυασμού της αιθανόλης και των παραγώγων καπνού και οφείλεται στη δράση των πρωτεϊνών πήξης του πλάσματος [4.2.2] και των πρωτεϊνών των αιμοπεταλίων [4.2.3].



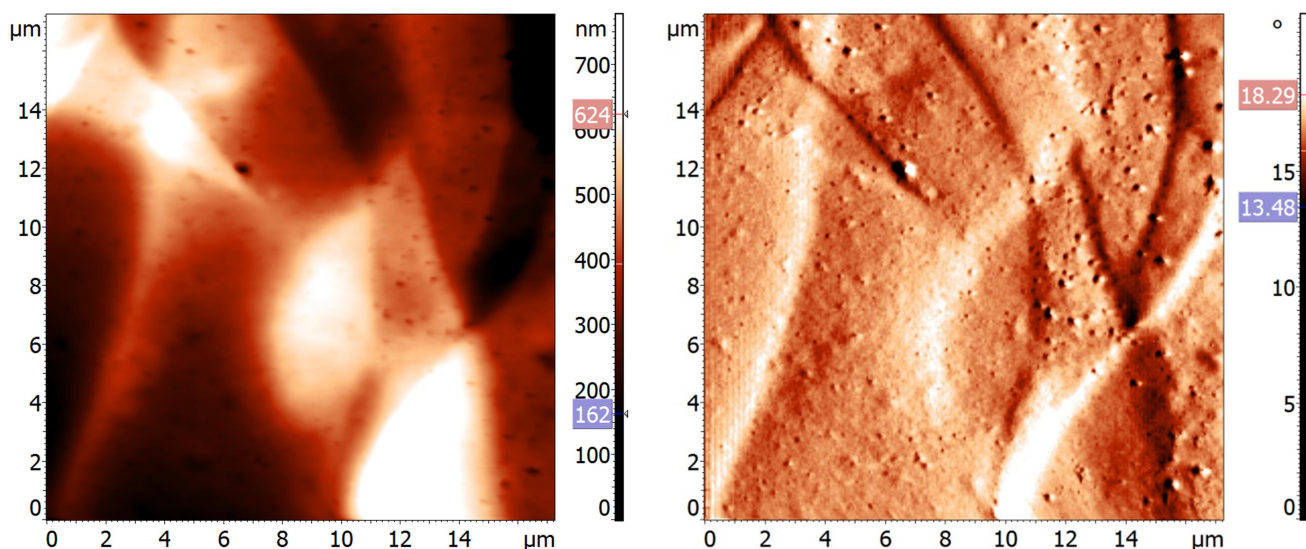
Εικόνα 4.3.λ1: SPPP2_30: Εικόνα τοπογραφίας ΜΑΔ, όπου φαίνεται ο ινώδης ιστός και το συσσωμάτωμα κοκκίων. Φαίνονται καθαρά οι πολυεπίπεδες πτυχώσεις του ιστού.

Εικόνα 4.3.λ2: SPPP2_30: Εικόνα φάσης ΜΑΔ του ίδιου στιγμιότυπου. Διακρίνονται κοκκία και πόροι.



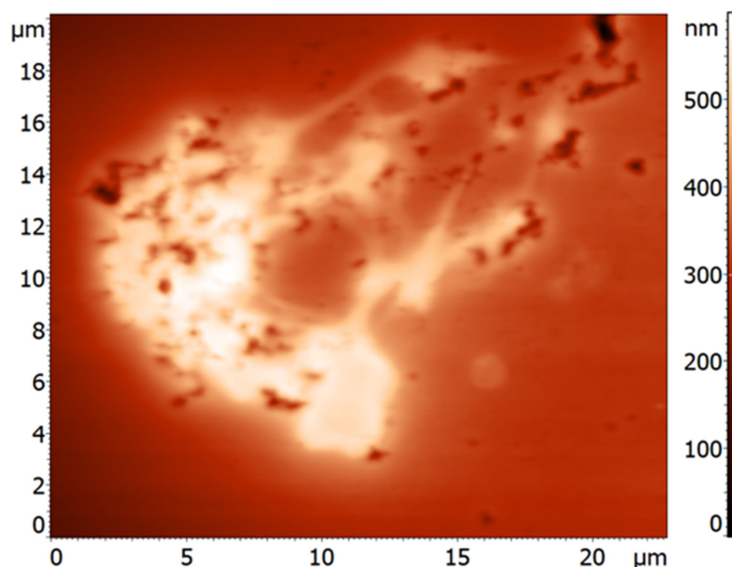
Εικόνα 4.3.λ3: SPPP2_30: Εικόνα τοπογραφίας ΜΑΔ, όπου φαίνεται τμήμα του συσσωματώματος κοκκίων σε μεγέθυνση.

Εικόνα 4.3.λ4: SPPP2_30: Εικόνα φάσης ΜΑΔ του ίδιου στιγμιότυπου. Διακρίνονται κοκκία μεγέθους περίπου 1 μm .



Εικόνα 4.3.λ5: SPPP2_30: Εικόνα τοπογραφίας ΜΑΔ, όπου φαίνεται τμήμα του ινώδους ιστού σε μεγέθυνση. Διακρίνονται πτυχώσεις και μικρο/νανο-σκοπικοί πόροι.

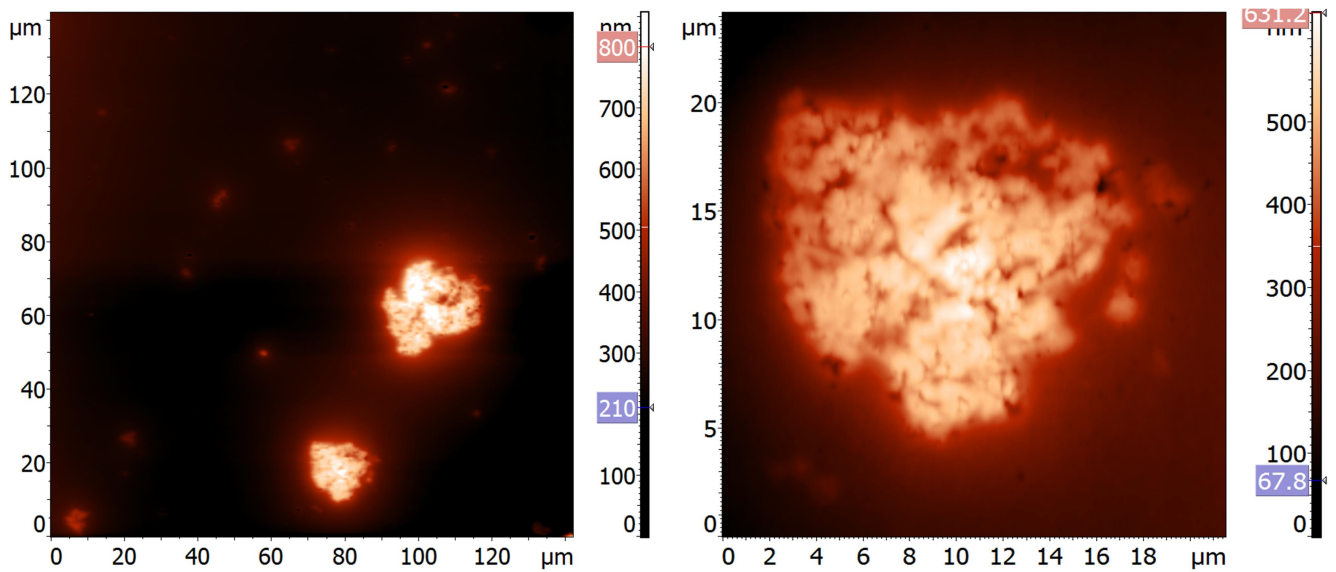
Εικόνα 4.3.λ6: SPPP2_30: Εικόνα φάσης ΜΑΔ του ίδιου στιγμιότυπου.



Εικόνα 4.3.λ7: SPPP2_30: Εικόνα τοπογραφίας ΜΑΔ όπου φαίνεται συσσωμάτωμα αιμοπεταλίων μεγέθους 20 μm .

SPPP3_30 (150 μl rpp και 30 μl αιθανόλης με παράγωγα καπνού): Στο δείγμα αυτό, όπως παρατηρούμε στις εικόνες 4.3.μ, έχουμε τεράστια συσσωματώματα, μεγέθους μέχρι και 60 μm , τα οποία μοιάζουν να είναι αθροίσματα αιμοπεταλίων που έχουν σχηματίσει μεγάλες δομές. Το ύψος τους φτάνει περίπου τα 1,5 μm . Διαφαίνονται λίγα αιμοπετάλια και τμήματα αυτών, ενώ ο ενδιαμέσος χώρος μοιάζει να είναι σχετικά κενός. Τα συσσωματώματα πιθανότατα έχουν δημιουργηθεί από τη δράση των πρωτεϊνών πήξης του πλάσματος και των πρωτεϊνών των αιμοπεταλίων. Από τη μελέτη του δείγματος αυτού στο ΟΜ, παρατηρήθηκε ύπαρξη δομών με πτυχώσεις, κάτι που δεν είδαμε στο ΜΑΔ. Αυτό οφείλεται στα περιορισμένα οπτικά πεδία που

μελετήσαμε στο ΜΑΔ σε σχέση με το ΟΜ και την περιορισμένη δυνατότητα περιήγησης στις περιοχές του δείγματος με το μικροσκόπιο αυτό.



Εικόνες 4.3.μ: SPPP3_30: Αριστερά: Εικόνα φάσης ΜΑΔ οπτικού πεδίου σε κλίμακα 140x140μm, όπου φαίνονται μεγάλα συσσωματώματα. Δεξιά: Εικόνα φάσης ΜΑΔ συσσωματώματος, σε κλίμακα 20x25μm.

5. Συμπεράσματα και μελλοντικοί στόχοι

Στην παρούσα εργασία μελετήθηκαν βιολογικά δείγματα ερυθροκυττάρων και αιμοπεταλίων τα οποία ωρίμασαν *ex vivo* παρουσία αιθανόλης (70% σε H₂O) και αιθανόλης με παράγωγα καπνού. Τα γεωμετρικά και μορφολογικά χαρακτηριστικά των κυττάρων αυτών είναι της τάξης των μm και nm . Η μελέτη πραγματοποιήθηκε με χρήση OM και MAD, τα οποία λειτούργησαν συμπληρωματικά στην καταγραφή των πληροφοριών και την κατανόησή τους. Το OM προσφέρει διαστάσεις εικόνες της μορφολογίας του δείγματος στην κλίμακα των μm με δυνατότητα γρήγορης εναλλαγής των οπτικών πεδίων. Από την άλλη, το MAD μας παρέχει την υψηλή διακριτική ικανότητα της τάξης των nm και ψηφιακές εικόνες με δυνατότητα λεπτομερούς καταγραφής συγκεκριμένων χαρακτηριστικών των κυτταρικών επιφανειών. Η ψηφιακή μορφή των πληροφοριών μας επιτρέπει σε μετέπειτα χρόνο την επεξεργασία τους ώστε να αναδείξουμε ορισμένα ιδιαίτερα χαρακτηριστικά. Αυτό, για παράδειγμα, μπορεί να γίνει με αναπροσαρμογή της χρωματικής κλίμακας με την κλίμακα ύψους ή και με επιλογή προβολής και επεξεργασίας της εικόνας ως σήμα τοπογραφίας ή ως σήμα φάσης.

Ειδικότερα, έχοντας μελετήσει τα πειραματικά αποτελέσματα των δειγμάτων μας με τη χρήση των δύο προαναφερθέντων μικροσκοπιών, καταλήγουμε σε ορισμένα συμπεράσματα όσον αφορά τη δράση των παραγώγων καπνού, που βρίσκονται διαλυμένα σε αιθανόλη (70% σε H₂O), στα έμμορφα στοιχεία του αίματος. Αρχικά, από τη στατιστική μελέτη των δειγμάτων των ερυθροκυττάρων, βρήκαμε ότι στο δείγμα αναφοράς αυτών (αΕκ1α) εμφανίζονται $0,44 \pm 0,02$ εξελκώσεις ($>0,5 \mu\text{m}$) και $0,05 \pm 0,02$ κυστίδια ανά ερυθροκύτταρο, έπειτα από μελέτη 41 κυττάρων. Στο δείγμα των ερυθροκυττάρων με την αιθανόλη (70% σε H₂O) (SR1_2H), εμφανίζονται $1,18 \pm 0,03$ εξελκώσεις ($>0,5 \mu\text{m}$) και $0,59 \pm 0,03$ κυστίδια ανά ερυθροκύτταρο, μετά από μελέτη 39 κυττάρων. Στο δείγμα των ερυθροκυττάρων με τα παράγωγα καπνού, που είναι διαλυμένα σε αιθανόλη (70% σε H₂O) (SR2_2H), έχουμε $0,86 \pm 0,03$ εξελκώσεις ($>0,5 \mu\text{m}$) και $0,62 \pm 0,03$ κυστίδια στην επιφάνεια κάθε κυττάρου, που προέκυψαν από μελέτη 29 κυττάρων, ενώ για το αντίστοιχο δείγμα με διπλάσια περιεκτικότητα αιθανόλης-παραγώγων καπνού (SR3_2H) έχουμε $1,55 \pm 0,03$ εξελκώσεις ($>0,5 \mu\text{m}$) και $0,14 \pm 0,03$ κυστίδια για το καθένα, σε δείγμα 29 κυττάρων. Από τα παραπάνω, λοιπόν, συμπεραίνουμε ότι η αιθανόλη είναι εμφανώς επιβλαβής προς τα ερυθροκύτταρα, όπως και η εμπλουτισμένη με παράγωγα καπνού αιθανόλη. Ωστόσο, το μικρότερο ποσοστό εξελκώσεων του δείγματος με την εμπλουτισμένη αιθανόλη, υποδεικνύει ότι τα παράγωγα καπνού, παραδόξως, δρουν σχετικά προστατευτικά στα κύτταρα, συγκρινόμενα με την αιθανόλη αυτή καθ' αυτή. Επιπλέον, όταν διπλασιάσουμε την περιεκτικότητα των παραγώγων καπνού στην αιθανόλη, τα επίπεδα των εξελκώσεων αυξάνονται εκ νέου, σε αντίθεση με τα κυστίδια που μειώνονται, πιθανόν λόγω αποκόλλησής τους από τα κύτταρα με ταυτόχρονη δημιουργία αποδομήσεων βάθους $>20 \text{ nm}$. Στο ίδιο συμπέρασμα καταλήγουμε και από τη στατιστική μελέτη των ερυθροκυττάρων στο OM, όπου μελετήθηκε το ποσοστό των κυττάρων που έχουν χάσει μεγάλο μέρος του κυτταροπλάσματος τους («φαντάσματα»). Σε αυτήν προέκυψε ποσοστό «φαντασμάτων» $6,22 \pm 0,24 \%$ στο δείγμα με την αιθανόλη, $4,77 \pm 0,18 \%$ στο δείγμα με την αιθανόλη και τα παράγωγα καπνού, ενώ για το δείγμα με τη διπλάσια περιεκτικότητα αυτών προέκυψε ποσοστό $14,33 \pm 0,11 \%$. Τα

ερυθροκύτταρα – «φαντάσματα» φαίνονται να μειώνονται με την προσθήκη παραγώγων καπνού συγκριτικά με την αιθανόλη αυτή καθ' αυτή, μέχρι μία κρίσιμη συγκέντρωσή τους πέρα από την οποία αρχίζουν να αυξάνουν εκ νέου.

Στη γενικότερη εικόνα των ερυθροκυττάρων των δειγμάτων μας, παρατηρούμε ότι η ύπαρξη της αιθανόλης (70% σε H₂O) και της αιθανόλης (70% σε H₂O) με παράγωγα καπνού προκαλεί μεταβολές στη μορφολογία τους, παρουσιάζοντας μικρές προεξοχές στην επιφάνειά τους. Σύμφωνα με την αρθρογραφία, το φαινόμενο αυτό επιβεβαιώνεται για τη δράση των παραγώγων καπνού [1.6.1], κάτι που εδώ μοιάζει να ισχύει και για τη δράση της αιθανόλης στα κύτταρα.

Στη συνέχεια, από τη στατιστική μελέτη των δειγμάτων αιμοπεταλίων, παρατηρήσαμε την ύπαρξη $0,27 \pm 0,02$ ψευδοποδίων ($>2 \mu\text{m}$) ανά αιμοπετάλιο στο δείγμα αιμοπεταλίων με αιθανόλη (70% σε H₂O) (SP1_2H), από μελέτη 59 κυττάρων και $0,57 \pm 0,03$ ψευδοποδίων ($>2 \mu\text{m}$) ανά αιμοπετάλιο, στο δείγμα αιμοπεταλίων με αιθανόλη (70% σε H₂O) εμπλουτισμένη με παράγωγα καπνού (SP2_2H), σε δείγμα 40 κυττάρων. Για το δείγμα με διπλάσια περιεκτικότητα σε αιθανόλη εμπλουτισμένη με παράγωγα καπνού (SP3_2H), προέκυψαν $0,58 \pm 0,03$ ψευδοπόδια ($>2 \mu\text{m}$) έπειτα από μελέτη 30 κυττάρων, δηλαδή περίπου ίδια με το προηγούμενο. Στο δείγμα αναφοράς των αιμοπεταλίων σε αυτόλογο πλάσμα (PCP_1β), δεν παρατηρήθηκαν ψευδοπόδια μήκους μεγαλύτερου των $2 \mu\text{m}$, ούτε συσσωματώματα κυττάρων, όμως μερικά αιμοπετάλια φάνηκαν ελαφρώς ενεργοποιημένα (σχηματισμός ψευδοποδίων $<2 \mu\text{m}$) πιθανώς λόγω της μηχανικής τους καταπόνησης μετά τη φυγοκέντρωση. Επομένως, στα δείγματα των αιμοπεταλίων, αντίθετα με τα δείγματα των ερυθροκυττάρων, φαίνεται ότι τα παράγωγα καπνού που βρίσκονται διαλυμένα σε αιθανόλη, εντείνουν ακόμα περισσότερο τη διαδικασία της ενεργοποίησης των κυττάρων σε σχέση με την αιθανόλη αυτή καθ' αυτή. Ωστόσο, αυτό συμβαίνει μέχρι μια συγκεκριμένη περιεκτικότητα παραγώγων καπνού διαλυμένων σε αιθανόλη, πέρα από την οποία δεν παρατηρούμε ιδιαίτερες μεταβολές.

Στη γενικότερη εικόνα των αιμοπεταλίων των δειγμάτων μας, παρατηρούμε ότι η παρουσία αιθανόλης (70% σε H₂O) και αιθανόλης (70% σε H₂O) με παράγωγα καπνού, εντείνει την ενεργοποίησή τους. Ορισμένες *in vivo* έρευνες, αναφέρουν ότι η νικοτίνη, ένα από τα βασικότερα παράγωγα που περιέχονται στον καπνό, αντίθετα απ' ότι θα αναμέναμε, ρυθμίζει την ενεργοποίηση των αιμοπεταλίων που προκαλείται από τα υπόλοιπα παράγωγα του καπνού. Το γεγονός αυτό παρατηρήθηκε σε καπνιστές τσιγάρων υψηλών σε ποσοστό νικοτίνης. Αντίθετα, στους καπνιστές τσιγάρων χαμηλών σε περιεκτικότητα νικοτίνης, τα υπόλοιπα παράγωγα καπνού επισκιάζουν την προστατευτική αυτή δράση της νικοτίνης με αποτέλεσμα να επικρατεί η βλαπτική δράση αυτών και τελικά, να εντείνεται η ενεργοποίηση των αιμοπεταλίων. [5.1]

Κατά τη διεξαγωγή της μελέτης μας, αναρωτηθήκαμε για την πορεία που θα μπορούσαμε να ακολουθήσουμε μελλοντικά, με σκοπό τη βελτιστοποίηση των αποτελεσμάτων μας. Στην παρούσα εργασία, αποφασίσαμε να μελετήσουμε δείγματα ενός μόνο δότη, αλλά διεξοδικά. Αρχικά, λοιπόν, κρίνεται σημαντικό να αυξηθεί ο αριθμός των δοτών και να κατηγοριοποιηθεί

ανάλογα με το φύλο, την ηλικία και τα παθολογικά χαρακτηριστικά καθενός (π.χ. καπνιστές-μη καπνιστές, άτομα με ιστορικό καρδιοπάθειας-άτομα που δε νοσούν, κ.λπ.). Με τον τρόπο αυτό, αυξάνεται το στατιστικό μας δείγμα και βελτιώνεται η αξιοπιστία του. Ακόμα, στην πειραματική μας διαδικασία χρησιμοποιήσαμε ως διαλύτη για τα παράγωγα του καπνού αιθανόλη (70% σε H_2O), καθώς τα παράγωγα καπνού είχαν πολύ καλή διαλυτότητα σε αυτήν. Δεδομένου ότι η αιθανόλη δεν είναι απόλυτα βιοσυμβατή, σε μελλοντική μελέτη, θα μπορούσαν να χρησιμοποιηθούν άλλες ουσίες ως διαλύτες των παραγώγων καπνού. Συγκεκριμένα θα μπορούσε να χρησιμοποιηθεί φυσιολογικός ορός (0,9% NaCl), που είναι απόλυτα βιοσυμβατός, ή ακόμα καλύτερα αυτόλογο πλάσμα. Τέλος, θα μπορούσε να πραγματοποιηθεί μια πιο στοχευμένη έρευνα σχετικά με τους παράγοντες που επηρεάζουν τα έμμορφα στοιχεία του αίματος εξαιτίας του καπνίσματος, μέσω της επιλεκτικής χρήσης τόσο συγκεκριμένων ουσιών όσο και της συγκέντρωσής τους από το σύνολο των ουσιών που περιλαμβάνονται στον καπνό. Πλέον, η διαχείριση αυτή είναι εύκολα υλοποιήσιμη μέσω των διαλυμάτων που χρησιμοποιούνται στο ηλεκτρονικό «άτμισμα» ως υποκατάστατα παραγώγων καπνού και κυκλοφορούν στο εμπόριο σε συγκεκριμένες περιεκτικότητες ως προς αυτά.

6. Βιβλιογραφία

[1.1.1] Satarug S, Moore M, *Adverse Health Effects of Chronic Exposure to Low-Level Cadmium in Foodstuffs and Cigarette Smoke*, Environmental Health Perspectives, **112**, 2004, 1099-1103.

[1.1.2] <http://tsigaro.weebly.com/pialpharhoalphagammaomegagammaeta-tausigmaiotagammaalpharhoomicronupsilon.html>

[1.1.3] <http://www.nosmoke.gr/smokingandconsequences/smokesubstances.html>

[1.1.4] <http://www.bestrong.org.gr/el/health/nosmoking/faqaboutsmoking>

[1.2.1] Du Plooy JN, Buys A, Duim W, Pretorius E, *Comparison of Platelet Ultrastructure and Elastic Properties in Thrombo-Embolic Ischemic Stroke and Smoking Using Atomic Force and Scanning Electron Microscopy*, Plos One, **8**, 2013, e69774.

[1.2.2] <http://ebooks.edu.gr/modules/ebook/show.php/DSGYM-A103/517/3366,13574>

[1.3.1] https://el.wikipedia.org/wiki/Αναπνευστικό_σύστημα

[1.3.2] http://www2.ellinogermaniki.gr/biblio/ST/03_anapneustiko.pdf

[1.4.1] http://www.funsci.com/fun3_en/blood/blood.htm

[1.4.2] <https://el.wikipedia.org/wiki/Αίμα>

[1.4.3] <https://el.wikipedia.org/wiki/Ερυθροκύτταρο>

<https://el.wikipedia.org/wiki/Αιμοπετάλιο>

https://el.wikipedia.org/wiki/Λευκό_αιμοσφαίριο

[1.4.4] Fletcher D, Mullins D, *Cell mechanics and the cytoskeleton*, Nature, **463**, 2010, 485-492.

[1.4.5] Stamopoulos D, Mpakirtzi N, Afentakis N, Grapsa E, *Ulcer-like deconstructionw of the red blood cell membrane induced by the uraemic milieu in haemodialysis patients*, Nephrol Dial Transplant, **29**, 2014, 491-500.

[1.4.6] Stamopoulos D, Bakirtzi N, Manios E, Grapsa E, *Does the extracorporeal circulation worsen anemia in hemodialysis patients? Investigation with advanced microscopes of red blood cells drawn at the beginning and end of dialysis*, International Journal of Nanomedicine, **8**, 2013, 3887–3894.

[1.4.7] <https://eclass.teiath.gr/modules/document/file.php/TIE149/.../KYTTAPO.doc>

[1.4.8] Stamopoulos D, Grapsa E, Manios E, Gogola V, Bakirtzi N, *Defected red blood cell membranes and direct correlation with the uraemic milieu: the connection with the decreased red blood cell lifespan observed in haemodialysis patients*, Nanotechnology, **23**, 2012, 485101.

- [1.5.1] http://www.nottingham.ac.uk/nursing/sonet/rlos/bioproc/plasma_proteins
- [1.6.1] Pretorius E, du Plooy JN, Soma P, Keyser I, Buys AV, *Smoking and fluidity of erythrocyte membranes: A high resolution, Nitric Oxide*, **6**, 2013, 35-42.
- [1.6.2] Masilamani V, AlZahrani K, Devanesan S, AlQahtani H, AlSalhi MS, *Smoking Induced Hemolysis: Spectral and microscopic investigations*, Scientific Reports, **6**, 2016, 21095.
- [1.6.3] Kozlova E, Chernysh A, Moroz V, Gudkova O, Sergunova V, Kuzovlev A, *Transformation of membrane nanosurface of red blood cells under hemin action*, Scientific Reports, **4**, 2014, 6033.
- [1.6.4] <http://www.ygeiaonline.gr/component/k2/item/3737-aimolysh>
- [1.6.5] <https://healthsoc.wordpress.com/tag/κοτινίνη>
- [1.6.6] Asgary S, Naderi GH, Ghannady A, *Effects of cigarette smoke, nicotine and cotinine on red blood cell hemolysis and their -SH capacity*, Experimental & Clinical Cardiology, **10**, 2005, 116-119.
- [1.6.7] Καλλιακμάνης Ανδρέας, Διδακτορική διατριβή: *Study in platelets aggregability in chronic smokers after smoking a cigarette*, 1998.
- [2.1.1] <http://www.physics.ntua.gr/~cchrist/SIMEIOSEIS/TECH.PEIR.FYS.2004.PDF/TECH.PEIR.FYS.2004.KEF.07.pdf>
- [2.2.1] Gerdelmann J, Brunner C, Pawlizak S, *Scanning Force Microscopy (SFM)*, Soft Matter Physics Division, University of Leipzig, 2009.
- [2.2.2] https://institut2a.physik.rwth-aachen.de/de/teaching/praktikum/Anleitungen/Versuch_AFM_v4_engl.pdf
- [2.2.3] Schmitz I, Schreiner M, Friedbacher G, Grasserbauer M, *Phase imaging as an extension to tapping mode AFM for the identification of material properties on humidity-sensitive surfaces*, Applied Surface Science, **115**, 1997, 190-198.
- [2.2.4] Binnig G, Quate CF, *Atomic Force Microscope*, Physical Review Letters, **56**, 1986, 930.
- [2.2.5] <http://www.ntmdt-si.com/spm-principles/view/atomic-force-microscopy>
- [2.2.6] https://en.wikipedia.org/wiki/Atomic-force_microscopy
- [2.3.1] <https://el.wikipedia.org/Φασματοφωτόμετρο>

[2.3.2] <https://eclass.upatras.gr/modules/file/ΦΑΣΜΑΤΟΦΩΤΟΜΕΤΡΙΑ%20UV-Vis.doc>

[4.2.1] https://el.wikipedia.org/wiki/Ορατό_φάσμα

[4.2.2] www.agandreashosp.gr/Aimodosia/eisagogi-stin-aimostasi.pptx

[4.2.3] http://emed.med.uoa.gr/application/syllabus_i/aimopiisi/aima/aimopetalia/index.htm

[5.1] Girdhar G, Xu S, Bluestein D, Jesty J, *Reduced-nicotine cigarettes increase platelet activation in smokers in vivo: A dilemma in harm reduction*, Nicotine & Tobacco Research, **10**, 2008, 1737–1744.

7. Παράρτημα

	ΟΝΟΜΑΣΙΑ	ΠΟΣΟΤΗΤΑ	ΠΕΡΙΓΡΑΦΗ
πλακίδια αναφοράς	eth		σκέτη αιθανόλη
	eth-nic		αιθανόλη με παράγωγα καπνού
πλάσμα πλούσιο σε αιμοπετάλια	prp1	1,0 ml	υπερκείμενο από φυγοκέντριση αρχικού αίματος (1) στα 1200g
	prp2	1,1 ml	υπερκείμενο από φυγοκέντριση αρχικού αίματος (2) στα 1200g
πλακίδιο φτωχό σε αιμοπετάλια		20 μl	φυγοκέντριση στα 1200g έπειτα από λήψη υπερκείμενου από φυγοκέντριση prp στα 2400g για 5min
πλάσμα φτωχό σε αιμοπετάλια	ppp1	0,9 ml	υπερκείμενο από φυγοκέντριση prp1 στα 2400g για 5min
	ppp2	1,0 ml	υπερκείμενο από φυγοκέντριση prp2 στα 2400g για 5min
δείγματα πλάσματος με συμπυκνωμένα αιμοπετάλια	pcp1	0,1 ml	υπόλοιπο του prp1 μετά τη λήψη του ppp1
	pcp2	0,1 ml	υπόλοιπο του prp2 μετά τη λήψη του ppp2
πλακίδια πλούσια σε αιμοπετάλια	pcp1β	20 μl	φυγοκέντριση στα 1200g έπειτα από αραίωση του pcp1 με 50μl πλάσματος
	pcp2α	10 μl	φυγοκέντριση στα 1200g έπειτα από αραίωση του pcp2 με 50μl πλάσματος
δείγματα αναφοράς ερυθροκυττάρων	αΕκ1	0,5 ml	100 μl αίμα και 400 μl από το ppp2
	αΕκ2	0,5 ml	100 μl αίμα και 400 μl από το ppp2
πλακίδια κατανομής ερυθρών	αΕκ1α	30 μl	δείγμα αναφοράς
	αΕκ2β	30 μl	δείγμα αναφοράς
δείγματα αιμοπεταλίων	sp1	70μl+7μl	70 μl pcp και 7 μl αιθανόλης
	sp2	70μl+7μl	70 μl pcp και 7 μl αιθανόλης με παράγωγα καπνού
	sp3	70μl+14μl	70 μl pcp και 14 μl αιθανόλης με παράγωγα καπνού
δείγματα ερυθροκυττάρων	sr1	150μl+15μl	150 μl αΕκ και 15 μl αιθανόλης
	sr2	150μl+15μl	150 μl αΕκ και 15 μl αιθανόλης με παράγωγα καπνού
	sr3	150μl+30μl	150 μl αΕκ και 30 μl αιθανόλης με παράγωγα καπνού
δείγματα πλάσματος φτωχού σε αιμοπετάλια	sppp1	150μl+15μl	150 μl ppp και 15 μl αιθανόλη
	sppp2	150μl+15μl	150 μl ppp και 15 μl αιθανόλης με παράγωγα καπνού
	sppp3	150μl+30μl	150 μl ppp και 30 μl αιθανόλης με παράγωγα καπνού
δείγματα αιμοπεταλίων μετά από 30min	sppp1_30	150μl+15μl	150 μl ppp και 15 μl αιθανόλη
	sppp2_30	150μl+15μl	150 μl ppp και 15 μl αιθανόλης με παράγωγα καπνού
	sppp3_30	150μl+30μl	150 μl ppp και 30 μl αιθανόλης με παράγωγα καπνού
δείγματα αιμοπεταλίων μετά από 2h	sp1_2h	70μl+7μl	70 μl pcp και 7 μl αιθανόλης
	sp2_2h	70μl+7μl	70 μl pcp και 7 μl αιθανόλης με παράγωγα καπνού
	sp3_2h	70μl+14μl	70 μl pcp και 14 μl αιθανόλης με παράγωγα καπνού
δείγματα ερυθροκυττάρων μετά από 2h	sr1_2h	150μl+15μl	150 μl αΕκ και 15 μl αιθανόλης
	sr2_2h	150μl+15μl	150 μl αΕκ και 15 μl αιθανόλης με παράγωγα καπνού
	sr3_2h	150μl+30μl	150 μl αΕκ και 30 μl αιθανόλης με παράγωγα καπνού

