



ΕΘΝΙΚΟ ΜΕΤΣΟΒΙΟ ΠΟΛΥΤΕΧΝΕΙΟ

ΣΧΟΛΗ ΧΗΜΙΚΩΝ ΜΗΧΑΝΙΚΩΝ

Τομέας II: Ανάλυσης, Σχεδιασμού & Ανάπτυξης Διεργασιών & Συστημάτων

**Εξέλιξη της Κατανομής Μεγέθους στα Μικροφύκη
του Γένους *Dunaliella salina*
υπό την Επίδραση Σταθερής Διατμητικής Τάσης**

ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ

της

ΜΑΡΙΑΣ ΣΥΓΓΕΛΑΚΗ

Επιβλέπων Καθηγητής : Ανδρέας Γ. Μπουντουβής

Αθήνα, Σεπτέμβριος 2014

Ευχαριστίες

Η παρούσα διπλωματική εργασία εκπονήθηκε στο Technical University of Munich (TUM), στα πλαίσια του προγράμματος Erasmus Plus.

Αρχικά, θα ήθελα να ευχαριστήσω τον επιβλέποντα της διπλωματικής εργασίας, κ. Ανδρέα Μπουντουβή για τη πολύτιμη βοήθεια και υποστήριξη που μου παρείχε. Θερμές ευχαριστίες θα ήθελα να εκφράσω στον κ. Μιχάλη Καβουσανάκη για τη καθοδήγηση και τις γνώσεις που μου παρείχε καθ' όλη τη διάρκεια της εργασίας και κυρίως στο κομμάτι της προσομοίωσης. Ακόμη, θα ήθελα να ευχαριστήσω τον επιβλέποντα καθηγητή της διπλωματικής εργασίας στο TUM, κ. H. Briesen. Ιδιαίτερες ευχαριστίες στον κ. Δημήτρη Κόκκινο, υποψήφιο διδάκτορα στο TUM, για την πολύτιμη βοήθεια που μου παρείχε στο πειραματικό μέρος της εργασίας και για τη προθυμία του να με βοηθήσει σε κάθε δυσκολία που αντιμετώπισα κατά την εκπόνηση της εργασίας. Τέλος, θα ήθελα να ευχαριστήσω την οικογένειά μου και όλους τους φίλους που στάθηκαν κοντά μου κατά τη διάρκεια των σπουδών μου.

Περίληψη

Βασικός στόχος της παρούσας διπλωματικής εργασίας είναι η μελέτη της επίδρασης σταθερής διατμητικής τάσης στην ανάπτυξη μιας καλλιέργειας μικροφυκών του γένους *Dunaliella salina*.

Οι διατμητικές τάσεις που ασκούνται στα κύτταρα δημιουργούνται από την ανάδευση της καλλιέργειας, η οποία όμως είναι απαραίτητη, έτσι ώστε τα μικροφύκη να διατηρούνται σε εναιώρημα, εξασφαλίζοντας την επαρκή κατανομή φωτός και πρόσβαση στο υπόστρωμα. Στα πειράματα που πραγματοποιήθηκαν στο πλαίσιο αυτής της εργασίας, διερευνήθηκε η επίδραση των διατμητικών τάσεων στη βιωσιμότητα μιας καλλιέργειας μικροφυκών του γένους *Dunaliella salina*. Για το λόγο αυτό, χρησιμοποιήθηκε μια καλλιέργεια ελέγχου (control), πολύ χαμηλής ανάδευσης και η ανάπτυξη της καλλιέργειας αυτής συγκρίθηκε με την ανάπτυξη μιας καλλιέργειας που τοποθετήθηκε σε βιοαντιδραστήρα (reactor) με ταχύτητες ανάδευσης 400 και 500 rpm.

Στη συνέχεια, χρησιμοποιήθηκαν μαθηματικά μοντέλα τα οποία λαμβάνουν υπόψη την κυτταρική ετερογένεια της καλλιέργειας και είναι γνωστά ως Ισοζύγια Κυτταρικών Πληθυσμών (Cell Population Balance Models). Τα μοντέλα αυτά περιγράφουν τη δυναμική συμπεριφορά των κατανομών κυτταρικών πληθυσμών ως προς κυτταρικές ιδιότητες. Στη συγκεκριμένη περίπτωση η κυτταρική ιδιότητα που μελετήθηκε ήταν η διάμετρος των κυττάρων (μm).

Με τη χρήση του υπολογιστικού πακέτου COMSOL Multiphysics, που βασίζεται στη μέθοδο πεπερασμένων στοιχείων, πραγματοποιήθηκαν προσομοιώσεις για την επίλυση των εξισώσεων αυτών των μαθηματικών μοντέλων δίνοντας τη χρονική εξέλιξη των πληθυσμών μέχρι τη μόνιμη κατάσταση. Ενώ η σχετική βιβλιογραφία δίνει πληροφορίες για τους ρυθμούς ανάπτυξης των κυττάρων, ο ρυθμός θανάτωσης δεν είναι γνωστός. Για το λόγο αυτό, δοκιμάστηκαν διάφορες μορφές του όρου αυτού και πραγματοποιήθηκε παραμετρική ανάλυση με σκοπό να διαπιστωθεί η επίδραση των διαφορετικών όρων στη συμπεριφορά της κατανομής.

Development of the size distribution of the Microalgae *Dunaliella salina* under constant shear stress.

Abstract

The main objective of this thesis is to study the effect of shear stress on the development of the size distribution of a culture of Microalgae *Dunaliella salina*.

The shear forces exerted on the cells are generated by the agitation of the culture, which is necessary in order to keep the microalgae in suspension and achieve adequate light distribution and access to the substrate. In the experiments we carried out in this work, we tried to observe the effect of shear stress on the viability of a culture of microalgae of the genus *Dunaliella salina* is investigated. For this reason, a control culture was used, where very low agitation was exerted, and the development of the culture was compared to the development of a culture placed in a bioreactor with stirring speeds of 400 and 500 *rpm*.

We also utilized mathematical models that take into account the cell population heterogeneity widely known as Cell Population Balance Models. These models describe the dynamic behavior of the distributions of cell properties. In this case, we studied the dynamics of the cell diameter distribution.

By using the computational package COMSOL Multiphysics, which is based on the finite element method, simulations were performed to solve the equations of the models and to observe the time evolution of the population until it reaches a steady state. Since there is lack of information for the death term, we tested different forms of this term and parametric analysis was carried out in order to determine the effect of various parameters on the behavior of the distribution.

Εισαγωγή

Η ελεγχόμενη καλλιέργεια μικροοργανισμών σε μεγάλη κλίμακα γίνεται όλο πιο σημαντική στον τομέα της βιοτεχνολογίας, έτσι ώστε να επιτυγχάνεται η μεγιστοποίηση της παραγωγής ουσιών που παράγονται από τους μικροοργανισμούς και χρησιμοποιούνται στη βιομηχανία φαρμάκων, τροφίμων και αλλού. Σε μια καλλιέργεια μικροοργανισμών είναι απαραίτητη η συνεχής ανάδευση, έτσι ώστε τα κύτταρα να διατηρούνται σε εναιώρημα, εξασφαλίζοντας την καλύτερη μεταφορά των θρεπτικών συστατικών και την επαρκή κατανομή φωτός για την ανάπτυξη των κυττάρων. Το κύριο μειονέκτημα της ανάδευσης είναι ότι τα κύτταρα υφίστανται διατμητικές τάσεις που μπορεί να είναι καταστρεπτικές για τη βιωσιμότητά τους. Η μελέτη της επίδρασης των διατμητικών τάσεων και ο προσδιορισμός του μέγιστου επιπέδου διατμητικών τάσεων που μπορούν να αντέξουν οι μικροοργανισμοί έχει μεγάλο ενδιαφέρον για την ανάπτυξη των βιομηχανικών βιοαντιδραστήρων.

Η σχετική βιβλιογραφία για τις επιπτώσεις της διατμητικής τάσης σε διάφορα είδη κυττάρων είναι πλούσια, ωστόσο, εξαιτίας της διαφορετικότητας των κυττάρων που μελετούνται κάθε φορά και των συσκευών που χρησιμοποιούνται για την παραγωγή διατμητικών τάσεων, υπάρχουν πολλά αναπάντητα ερωτήματα που σχετίζονται με τις επιδράσεις των διατμητικών τάσεων στη βιωσιμότητα των κυττάρων. Ένας σημαντικός περιορισμός έγκειται στην κατανόηση της σχέσης μεταξύ των διατμητικών τάσεων και των βιολογικών επιδράσεων. Υπάρχουν δύο πτυχές του προβλήματος: η ρευστομηχανική πτυχή, που σχετίζεται με τις διατμητικές δυνάμεις που αναπτύσσονται στον αντιδραστήρα και η βιολογική πτυχή, που σχετίζεται με την απόκριση των κυττάρων σε αυτές τις δυνάμεις. Παρά τη συνεχή διερεύνηση της επίδρασης των διατμητικών τάσεων στα κύτταρα, ο μηχανισμός δεν είναι ακόμα σαφής. Το μεγαλύτερο μέρος της ερευνητικής προσπάθειας έχει πραγματοποιηθεί σε συσκευές ελεγχόμενης έντασης διατμητικής τάσης, π.χ. ιξωδόμετρα και συσκευές ροής. Σε αυτές τις συσκευές τα αναπτυσσόμενα πεδία ροής είναι στρωτά και δεν μπορούν να προσομοιώσουν τις τυρβώδεις συνθήκες διάτμησης που υπάρχουν στους αντιδραστήρες βιομηχανικού μεγέθους. Η μοντελοποίηση των βιομηχανικών αντιδραστήρων είναι περίπλοκη, καθώς η ένταση της τύρβης ποικίλλει σημαντικά από περιοχή σε περιοχή. Παρά το σημαντικό ρόλο των τυρβωδών

δυνάμεων, δεν έχει πραγματοποιηθεί μια συστηματική μελέτη που να καλύπτει ένα ευρύ φάσμα διαμέτρων αντιδραστήρων, διαφορετικών στροφείων, κατανάλωση ενέργειας, κ.ά. Επιπλέον, η απόκριση των κυττάρων ποικίλλει ανάλογα με το είδος του κυττάρου, τη φυσιολογική κατάσταση των κυττάρων, τις συνθήκες ανάπτυξης, το ιστορικό ανάπτυξης κτλ. Έτσι, μια εκτενής πειραματική μελέτη θα πρέπει να πραγματοποιηθεί, για την κατανόηση του μηχανισμού απόκρισης των κυττάρων στις διατμητικές δυνάμεις.

Οι καλλιέργειες μικροφυκών προσφέρουν ένα απλό μοντέλο για τη μελέτη των επιπτώσεων της διατμητικής τάσης σε πιο περίπλοκα κύτταρα, όπως φυτικά και ζωικά, καθώς έχουν παραπλήσιο μέγεθος. Τα μικροφύκη χρησιμοποιούνται ως ζωοτροφές για την υδατοκαλλιέργεια αλλά και για θηλαστικά ζώα, στην ανθρώπινη διατροφή, στα καλλυντικά και για την παραγωγή ουσιών υψηλής εμπορικής αξίας, όπως πολυακόρεστα λιπαρά οξέα και χρωστικές ουσίες. Στη συγκεκριμένη εργασία πραγματοποιήθηκαν πειράματα με τα μικροφύκη του γένους *Dunaliella salina*. Τα μικροφύκη αυτά αποτελούν την πλουσιότερη φυσική πηγή β – καροτίνης, η οποία χρησιμοποιείται ως φυσική χρωστική τροφίμων, ως ρετινόλη και ως πρόσθετο καλλυντικών.

Ένα άλλο πρόβλημα που συναντάται στις καλλιέργειες κυττάρων είναι η ετερογένεια των κυτταρικών πληθυσμών. Η βιολογική συμπεριφορά ενός κυτταρικού πληθυσμού δεν είναι αποτέλεσμα μόνο των αλληλεπιδράσεων μεταξύ των πολυάριθμων συστατικών εντός των μεμονωμένων κυττάρων, αλλά εξαρτάται ισχυρά και από την πολυπλοκότητα και τις άμεσες και έμμεσες αλληλεπιδράσεις μεταξύ των κυττάρων ενός πληθυσμού. Αυτές οι διακυτταρικές και ενδοκυτταρικές αλληλεπιδράσεις οδηγούν σε σημαντικές διακυμάνσεις του φαινοτύπου από κύτταρο σε κύτταρο και το φαινόμενο αυτό χαρακτηρίζεται ως ετερογένεια κυτταρικών πληθυσμών. Για το λόγο αυτό, έχουν κατασκευαστεί μοντέλα που περιγράφουν τη δυναμική συμπεριφορά ενός ολόκληρου κυτταρικού πληθυσμού και τα οποία λαμβάνουν υπόψη την εγγενή κυτταρική ετερογένεια του πληθυσμού. Τα μαθηματικά αυτά μοντέλα είναι γνωστά ως Ισοζύγια Κυτταρικών Πληθυσμών (Cell Population Balance Models) και περιγράφουν τη δυναμική συμπεριφορά των κατανομών κυτταρικών ιδιοτήτων, όπως το μέγεθος των κυττάρων ή το ενδοκυτταρικό περιεχόμενο, μέσω μερικών διαφορικών εξισώσεων που

περιέχουν ολοκληρώματα. Τα μοντέλα αυτά χαρακτηρίζονται από αξιολογική μαθηματική πολυπλοκότητα και χωρίς την εφαρμογή περιοριστικών υποθέσεων, συνήθως, δεν μπορούν να επιλυθούν αναλυτικά.

Περιεχόμενα

Ευχαριστίες.....	1
Περίληψη.....	2
Abstract.....	3
Εισαγωγή.....	4-6
Κεφάλαιο 1: Βιβλιογραφική επισκόπηση.....	9-24
1.1 Γενικά.....	9
1.2 Παραγωγή μικροφυκών σε βιομηχανική κλίμακα.....	9-11
1.3 Φάσεις κυτταρικής ανάπτυξης.....	11-12
1.4 Τα μικροφύκη του γένους <i>Dunaliella salina</i>	13-14
1.5 Μηχανική καψουλών.....	15-16
1.6 Επίδραση της διατμητικής τάσης σε καλλιέργειες ζωικών, φυτικών και μικροβιακών κυττάρων.....	16-23
1.7 Μεταβολή της ακαμψίας του κυτταρικού τοιχώματος κατά τη διάρκεια της κυτταρικής ανάπτυξης.....	23
1.8 Κατάσταση ισορροπίας κατά την ανάπτυξη των κυττάρων.....	24
1.9 Ετερογένεια κυτταρικών πληθυσμών.....	24-25
Κεφάλαιο 2: Πειραματική μελέτη της εξέλιξης της κατανομής μεγέθους ενός πληθυσμού μικροφυκών του γένους <i>Dunaliella salina</i>	26-52
2.1 Γενικά.....	26
2.2 Υλικά και μέθοδοι.....	26-35
2.2.1 Μικροσκοπία φθορισμού.....	26-31
2.2.2 Φασματοφωτομετρία UV-VIS.....	31-33

2.2.3 Σφάλμα φασματοφωτομέτρου.....	33-34
2.2.4 Φυγοκέντρωση.....	34
2.2.5 FDA (fluorescein diacetate).....	35
2.3 Πειραματική Διαδικασία.....	35-40
2.3.1 Προετοιμασία καλλιέργειας.....	35-36
2.3.2 Προκαταρκτικά πειράματα.....	36-38
2.3.3 Πραγματικά Πειράματα.....	38-40
2.4 Αποτελέσματα και Σχολιασμός.....	40-52
2.4.1 Αποτελέσματα και σχολιασμός μετρήσεων φασματοφωτομέτρου..	40-45
2.4.2 Αποτελέσματα και σχολιασμός αποτελεσμάτων μικροσκοπίου.....	45-52
Κεφάλαιο 3: Μαθηματικό Μοντέλο.....	53-57
3.1 Ετερογένεια Κυτταρικών Πληθυσμών.....	53-54
3.2 Ισοζύγια Κυτταρικών Πληθυσμών.....	54-57
Κεφάλαιο 4: Επίλυση του προβλήματος με το υπολογιστικό πακέτο COMSOL Multiphysics.....	58-68
4.1 Το υπολογιστικό πακέτο COMSOL Multiphysics.....	58
4.2 Μέθοδος πεπερασμένων στοιχείων.....	58
4.3 Επίλυση με το υπολογιστικό πακέτο COMSOL Multiphysics 4.3b.....	59
4.4 Αποτελέσματα.....	59-61
4.5 Θάνατος κυττάρων.....	62-68
Κεφάλαιο 5: Συμπεράσματα και προτάσεις για μελλοντική έρευνα.....	69-71
Βιβλιογραφία.....	72-74
Παράρτημα.....	75-79

Κεφάλαιο 1: Βιβλιογραφική Επισκόπηση

1.1 Γενικά

Τα μικροφύκη είναι φωτοσυνθετικοί μικροοργανισμοί που βρίσκονται στα γλυκά και αλμυρά νερά. Ανάλογα με το είδος των μικροφυκών, το μέγεθός τους ποικίλει από μερικά μικρόμετρα μέχρι μερικές εκατοντάδες μικρόμετρα. Τα μικροφύκη, μέσω της φωτοσύνθεσης που πραγματοποιούν, αποτελούν ένα σημαντικό κομμάτι της ζωής στον πλανήτη, καθώς παράγουν σχεδόν τη μισή ποσότητα ατμοσφαιρικού οξυγόνου και ταυτόχρονα χρησιμοποιούν διοξείδιο του άνθρακα για να αναπτυχθούν.

Η βιοποικιλότητα των μικροφυκών είναι τεράστια και αντιπροσωπεύουν ένα σχεδόν ανεκμετάλλευτο πόρο. Έχει εκτιμηθεί ότι υπάρχουν περίπου 200.000 – 800.000 είδη, εκ των οποίων μόνο τα 50.000 είδη έχουν πλήρως περιγραφεί. Τα περισσότερα από αυτά τα είδη μικροφυκών παράγουν προϊόντα, όπως καροτενοειδή, αντιοξειδωτικά, λιπαρά οξέα, ένζυμα, πολυμερή, πεπτίδια, τοξίνες και στερόλες.

Η χημική σύσταση των μικροφυκών δεν είναι σταθερή, αλλά ποικίλλει ανάλογα με το είδος και τις συνθήκες καλλιέργειας. Ο έλεγχος παραγωγής των επιθυμητών προϊόντων στα μικροφύκη είναι δυνατός σε μεγάλο βαθμό μεταβάλλοντας τις περιβαλλοντικές συνθήκες, όπως τη θερμοκρασία, το φωτισμό, το pH, τη διαθεσιμότητα διοξειδίου του άνθρακα, των διαφόρων θρεπτικών συστατικών και της περιεκτικότητας του μέσου ανάπτυξης σε άλας.

1.2 Παραγωγή μικροφυκών σε βιομηχανική κλίμακα

Η καλλιέργεια των μικροφυκών μπορεί να πραγματοποιηθεί σε ανοικτά ή κλειστά συστήματα. Στα ανοικτά συστήματα, τα μικροφύκη καλλιεργούνται σε τεχνητούς ή φυσικούς περιέκτες, όπως δεξαμενές, λίμνες κλπ., ενώ στα κλειστά συστήματα, η καλλιέργεια γίνεται σε κλειστούς περιέκτες που ονομάζονται φωτοβιοαντιδραστήρες. Στους φωτοβιοαντιδραστήρες είναι ευκολότερος ο έλεγχος των περιβαλλοντικών συνθηκών.

Ανοικτά συστήματα καλλιέργειας

Το πλεονέκτημα των ανοικτών συστημάτων καλλιέργειας είναι ότι έχουν μικρότερο κόστος εγκατάστασης και λειτουργίας σε σχέση με κλειστά συστήματα. Όμως, τα μικροφύκη είναι εκτεθειμένα σε ανεξέλεγκτες περιβαλλοντικές συνθήκες και μπορούν να επιμολυνθούν και από διάφορα άλλα είδη μικροοργανισμών. Ένα βασικό μειονέκτημα των ανοικτών συστημάτων είναι ότι μεγάλη ποσότητα του νερού εξατμίζεται με αποτέλεσμα την αύξηση της συγκέντρωσης αλάτων που από ένα σημείο και μετά επιδρούν ανασταλτικά στην ανάπτυξη των μικροφυκών. Επιπλέον, σε ορισμένες περιοχές, οι περίοδοι καλλιέργειάς τους είναι περιορισμένες, λόγω έντονων εποχιακών περιβαλλοντικών διακυμάνσεων ή χαμηλών θερμοκρασιών και ηλιοφάνειας. Χώρες με μεγάλη διάρκεια ηλιοφάνειας, όπως η Ελλάδα, έχουν πλεονέκτημα στην εγκατάσταση καλλιέργειας μικροφυκών.

Τα μειονεκτήματα των ανοικτών συστημάτων καλλιέργειών μπορούν να αντιμετωπιστούν με τη χρήση κατάλληλων συνθηκών για το είδος των μικροφυκών. Αποτελεσματικές συνθήκες ανάπτυξης μιας συγκεκριμένης καλλιέργειας είναι συνήθως οι ακραίες συνθήκες, οι οποίες είναι ευνοϊκές μόνο για συγκεκριμένα είδη μικροφυκών, ενώ είναι ακατάλληλες για τους υπόλοιπους μικροοργανισμούς. Η *Dunaliella salina* αποτελεί ένα παράδειγμα μικροφυκών που καλλιεργούνται σε ακραίες συνθήκες, καθώς μπορεί να αναπτυχθεί σε πολύ αλμυρά νερά.

Μια σημαντική σχεδιαστική παράμετρος των ανοικτών δεξαμενών είναι το βάθος τους, το οποίο δε θα πρέπει να είναι πολύ μικρό για να μην μεταβάλλεται η συγκέντρωση ιόντων του υποστρώματος λόγω εξάτμισης του νερού, αλλά ούτε πολύ μεγάλο, έτσι ώστε να επιτρέπεται η διείσδυση του φωτός. Τέλος, η ανάδευση των καλλιέργειών είναι απαραίτητη, καθώς εμποδίζει τη συσσωμάτωση και καθίζηση των μικροφυκών, συμβάλλει στην αξιοποίηση του φωτός και ομογενοποιεί το υπόστρωμα καθιστώντας τα ανόργανα και οργανικά στοιχεία πιο προσπελάσιμα για την πρόσληψή τους από τα μικροφύκη.

Κλειστά συστήματα καλλιέργειας

Τα κλειστά συστήματα καλλιέργειας μικροφυκών αναπτύσσονται σε κλειστούς περιέκτες, τους φωτοβιοαντιδραστήρες. Στους φωτοβιοαντιδραστήρες υπάρχει καλύτερος έλεγχος των

συνθηκών καλλιέργειας, καλύτερος έλεγχος της παροχέτευσης και της κίνησης των αερίων (πχ. CO_2), περιορισμός της εξάτμισης νερού από το υπόστρωμα, καλύτερη θερμική κατανομή στο υπόστρωμα, προστασία από επιμολύνσεις από διάφορους μικροοργανισμούς και σχετικά υψηλές αποδόσεις σε σχέση με τις ανοικτές δεξαμενές. Ωστόσο, το κόστος των φωτοβιοαντιδραστήρων είναι αυξημένο και η δυνατότητα κατασκευής εγκαταστάσεων μεγάλης κλίμακας είναι περιορισμένη.

Ο βασικός περιοριστικός παράγοντας για την κατασκευή εγκαταστάσεων μεγάλης κλίμακας είναι η συγκέντρωση του διαλυμένου οξυγόνου στο υγρό υπόστρωμα ανάπτυξης. Κατά τη φωτοσύνθεση των μικροφυκών παράγεται μοριακό οξυγόνο το οποίο διαλύεται στο υγρό υπόστρωμα ανάπτυξης. Το διαλυμένο οξυγόνο θα πρέπει να απομακρύνεται γιατί μεγάλες συγκεντρώσεις του αναστέλλουν την ανάπτυξη των μικροφυκών.

1.3 Φάσεις κυτταρικής ανάπτυξης

Η γνώση των φάσεων της κυτταρικής ανάπτυξης των μικροφυκών είναι απαραίτητη για την κατανόηση της λειτουργίας τους κατά τη διάρκεια της καλλιέργειάς τους. Η κυτταρική ανάπτυξη περιλαμβάνει πέντε φάσεις:

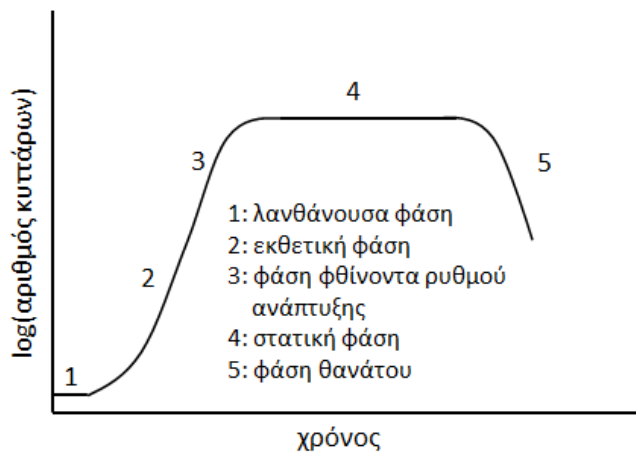
1. Λανθάνουσα φάση: Τα κύτταρα προσαρμόζονται στις συνθήκες περιβάλλοντος, χωρίς να πολλαπλασιάζονται. Στη φάση αυτή αυξάνονται τα ένζυμα και οι μεταβολίτες που εμπλέκονται στην ανάπτυξη των κυττάρων και τη δέσμευση άνθρακα.
2. Εκθετική φάση: Η πυκνότητα των κυττάρων αυξάνεται εκθετικά συναρτήσει του χρόνου, με ρυθμό που εξαρτάται από διάφορες συνθήκες, όπως η ένταση της φωτεινής ακτινοβολίας και η θερμοκρασία.
3. Φάση φθίνοντος ρυθμού ανάπτυξης: η ανάπτυξη των κυττάρων αναστέλλεται, λόγω εξάντλησης των θρεπτικών συστατικών.
4. Στατική φάση: Οι παράγοντες ανάπτυξης εξαντλούνται και τοξικά μεταβολικά προϊόντα συσσωρεύονται. Στη φάση αυτή αναπτύσσεται ισορροπία μεταξύ του ρυθμού

ανάπτυξης και του ρυθμού θανάτου με αποτέλεσμα η πυκνότητα των κυττάρων να παραμένει σταθερή.

5. Φάση θανάτου: Η ποιότητα του νερού υποβαθμίζεται, τα θρεπτικά συστατικά εξαντλούνται κι έτσι η πυκνότητα των κυττάρων μειώνεται. Άλλες παράμετροι που οδηγούν στο ίδιο αποτέλεσμα είναι η έλλειψη οξυγόνου, οι θερμοκρασιακές μεταβολές και οι μεταβολές στο pH.

Στόχος μιας καλλιέργειας μικροφυκών είναι η όσο το δυνατόν μεγαλύτερη παραμονή των κυττάρων στην εκθετική φάση. Στη φάση αυτή η θρεπτική αξία καθώς και η ανθεκτικότητα των παραγομένων μικροφυκών είναι αυξημένη [Lavens, 1996].

Στο παρακάτω διάγραμμα παρουσιάζονται οι φάσεις κυτταρικής ανάπτυξης των μικροφυκών.



Διάγραμμα 1.1: Σχηματική αναπαράσταση φάσεων κυτταρικής ανάπτυξης μικροφυκών

1.4 Τα μικροφύκη του γένους *Dunaliella salina*

Τα μικροφύκη του γένους *Dunaliella* είναι μονοκύτταρα, ωοειδή, χρώματος πράσινου, μεγέθους 2 – 30 μm και μπορούν να ζήσουν ακόμη και σε κορεσμένο αλατούχο διάλυμα. Το μέγεθός τους ποικίλει ανάλογα με τις συνθήκες ανάπτυξης και τη διαθεσιμότητα φωτός. Πρώτη φορά παρατηρήθηκαν το 1838 σε αλυκές στα νότια της Γαλλίας από τον Michel Felix Dunal από τον οποίο πήραν και το όνομά τους το 1905.



Εικόνα 1.1:
Dunaliella salina

Το γένος περιγράφηκε πρώτη φορά από τον Teodoresco, το 1905, ο οποίος περιέγραψε δύο είδη του γένους *Dunaliella*: *Dunaliella salina* και *Dunaliella viridis*. Αργότερα, προστέθηκαν κι άλλα είδη στο γένος, ιδίως χάρη στις μελέτες της Lerche και του Butcher, όπως οι *Dunaliella parva*, *Dunaliella euchlora*, *Dunaliella tertiolecta*, *Dunaliella primolecta* κ.ά. Το 1973, στη μονογραφία της, η Massyuk διαχωρίζει το γένος *Dunaliella* σε δύο υποκατηγορίες, τη *Dunaliella* (23 είδη) και τη *Pascheria* (5 είδη).

Κάτω από κατάλληλες συνθήκες η *Dunaliella salina* συνθέτει καροτενοειδείς χρωστικές, δίνοντας στα κύτταρα κόκκινη απόχρωση σε αντίθεση με τη *Dunaliella viridis* που δεν παράγει τέτοια κύτταρα. Η *Dunaliella salina* είναι η πλουσιότερη φυσική πηγή β – καροτίνης, η οποία χρησιμοποιείται ως φυσική χρωστική τροφίμων, ως ρετινόλη και ως πρόσθετο καλλυντικών. Πρώτη φορά προτάθηκε ως εμπορική πηγή β – καροτίνης από την Massyuk, το 1966.

Διάφορες τεχνολογίες χρησιμοποιήθηκαν για την αποδοτικότερη παραγωγή καροτενοειδών. Μια από τις πιο συνηθισμένες μεθόδους είναι η μείωση του ρυθμού ανάπτυξης των κυττάρων μέσω στέρησης των θρεπτικών συστατικών. Σήμερα, η β – καροτίνη από τη *Dunaliella salina* παράγεται σε εμπορική κλίμακα στην Αυστραλία, στις Η.Π.Α. και στο Ισραήλ. [Oren, 2005]

Ωσμωτική συμπεριφορά της *Dunaliella*

Τα κύτταρα της *Dunaliella* δεν έχουν κυτταρικό τοίχωμα αλλά μια ελαστική κυτταρική μεμβράνη, η οποία επιτρέπει στο κύτταρο να πάρει διαφορετικές μορφές, ανάλογα με τη

συγκέντρωση του νερού σε αλάτι. Έτσι, η μορφολογία των κυττάρων επηρεάζεται σημαντικά από τις αλλαγές του pH.

Ο Teodoresco παρατήρησε ότι με απότομη μείωση της συγκέντρωσης του νερού σε αλάτι, τα κύτταρα παίρνουν σφαιρικό σχήμα, μειώνεται η κινητικότητά τους, ο όγκος τους αυξάνεται και τελικά σπάνε. Αυτό είναι αποτέλεσμα της υψηλής ωσμωτικής πίεσης σε σχέση με τη μειωμένη πυκνότητα του περιβάλλοντος. Σε αντίθεση, αύξηση της συγκέντρωσης του νερού σε αλάτι, προκαλεί επιμήκυνση των κυττάρων. [Oren, 2005]

Χρήση των μικροφυκών

Τα μικροφύκη χρησιμοποιούνται ως ζωοτροφές για την υδατοκαλλιέργεια αλλά και για θηλαστικά ζώα, σε είδη διατροφής, στα καλλυντικά και για την παραγωγή ουσιών υψηλής εμπορικής αξίας, όπως πολυακόρεστα λιπαρά οξέα και χρωστικές ουσίες.

Η μεγαλύτερη παραγωγή μικροφυκών χρησιμοποιείται ως τροφή για οστρακοειδή. Γενικά, η καλλιέργεια των μικροφυκών για αυτές τις εφαρμογές λαμβάνει χώρα σε διαφανείς πλαστικές σακούλες. Επειδή η χωρητικότητα των συστημάτων αυτών είναι σχετικά μικρή, το κόστος παραγωγής είναι υψηλό. Για το λόγο αυτό, εναλλακτικά συστήματα παραγωγής μεγάλης κλίμακας για μικροφύκη εξετάζονται, όπως είναι οι βιοαντιδραστήρες. Ωστόσο, λόγω της απαιτούμενης ανάδευσης στους βιοαντιδραστήρες προκαλούνται διατμητικές τάσεις που μπορεί να είναι επιβλαβείς για ευαίσθητα μικροφύκη και μπορεί να οδηγήσουν σε διαφορές στη μεταβολική διαδικασία ή ακόμη και σε θάνατο των κυττάρων. Παρ' όλα αυτά, η ανάμιξη και ομογενοποίηση του μίγματος στο βιοαντιδραστήρα είναι αναγκαία ώστε να διατηρηθούν τα μικροφύκη σε εναιώρημα, για να επιτευχθεί επαρκής κατανομή φωτός και αποτελεσματικότερη πρόσβαση στο θρεπτικό υπόστρωμα. Για το βέλτιστο σχεδιασμό των βιοαντιδραστήρων είναι επομένως απαραίτητο να γνωρίζουμε το μέγιστο επίπεδο διατμητικών τάσεων στα οποία μπορούν να υποβληθούν τα μικροφύκη. [Michels κ.ά., 2010]

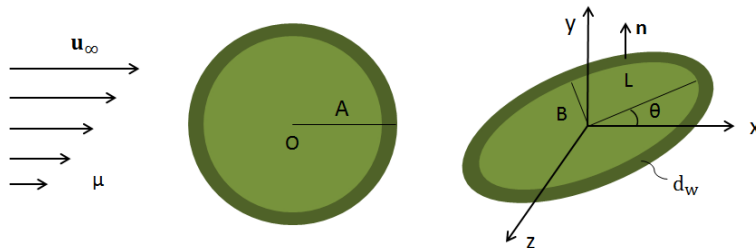
1.5 Μηχανική καψουλών

Μια κάψουλα αποτελείται από ένα εσωτερικό υγρό το οποίο περικλείεται από μια ημιδιαπερατή μεμβράνη [Barthes-Biesel, 1988]. Οι κάψουλες ποικίλλουν σε μέγεθος και σχήμα και οι μηχανικές ιδιότητες του εσωτερικού υγρού και της μεμβράνης διαφέρουν από κύτταρο σε κύτταρο. Η κίνηση, η παραμόρφωση και η διάρρηξη μιας κάψουλας που δέχεται πίεση, εξαρτάται από τρεις εγγενείς φυσικές ιδιότητες: την αρχική γεωμετρία, τη διαφορά ιξώδους μεταξύ του εσωτερικού υγρού και του περιβάλλοντος διαλύματος, καθώς και τη συμπεριφορά στη διεπιφάνεια της κάψουλας. Ο άμεσος προσδιορισμός των μηχανικών ιδιοτήτων της μεμβράνης είναι δύσκολος λόγω της αστάθειας και της λεπτότητάς της. Μόλις τα τελευταία χρόνια έχουν προταθεί διάφορες τεχνικές, με τις οποίες είτε μετρούνται τοπικά οι ιδιότητες της μεμβράνης, είτε καθορίζεται η συνολική παραμόρφωση της κάψουλας υπό στατικές συνθήκες. Συνήθως, τα αποτελέσματα παρέχουν περιορισμένες πληροφορίες σχετικά με τις μηχανικές ιδιότητες της μεμβράνης κι έτσι είναι δύσκολο, για παράδειγμα, να ληφθεί ο συντελεστής διάτμησης και το μέτρο επιφανειακής συμπίεστικότητας της μεμβράνης με ένα μόνο πείραμα.

Συνήθως, οι κάψουλες είναι διεσπαρμένες σε κάποιο ρευστό και η κίνηση και η παραμόρφωσή τους μελετάται σε συγκεκριμένες συνθήκες ροής. Για μια συνολική εικόνα, μετρήσεις της παραμόρφωσης των καψουλών πρέπει να πραγματοποιούνται και σε άλλα ρευστά. Παρόλα αυτά εξακολουθεί να είναι δύσκολο να συσχετιστεί η συνολική παραμόρφωση της κάψουλας με τις εγγενείς φυσικές ιδιότητες του σωματιδίου, εκτός και εάν ένα πλήρες μοντέλο της μηχανικής της κάψουλας είναι διαθέσιμο. Ένα τέτοιο μοντέλο προτάθηκε από την Barthers και περιγράφεται παρακάτω.

Κίνηση μιας κάψουλας υπό την επίδραση διατμητικής τάσης

Μια σφαιρική κάψουλα ακτίνας A , αιωρείται σε ένα νευτωνικό, ασυμπίεστο υγρό, ιξώδους μ , ρυθμού διάτμησης γ και ταχύτητας u_∞ . Η κάψουλα περιέχει νευτωνικό, ασυμπίεστο ρευστό και περικλείεται από μια αδιαπέραστη, κυτταρική μεμβράνη, πάχους d_w και ελαστικότητα η οποία προσδιορίζεται από το μέτρο του Young, E_y .



Σχήμα 1: Σχηματική αναπαράσταση σφαιρικής κάψουλας πριν και μετά την επίδραση διατμητικής τάσης

Για τον υπολογισμό της επίδρασης των ιξωδών δυνάμεων σε σχέση με την επιφανειακή τάση, χρησιμοποιείται ο τριχοειδής αδιάστατος αριθμός (capillary number), που δίνεται από τη σχέση:

$$Ca = \frac{\tau A}{E_y d_w} \quad (1.1)$$

όπου,

τ [Pa], η διατμητική τάση που δίνεται από τη σχέση $\tau = \mu G$

A [μm], η ακτίνα της σφαιρικής κάψουλας πριν την παραμόρφωση

E_y [Pa], η ελαστικότητα της κάψουλας

d_w [μm], το πάχος της κυτταρικής μεμβράνης

1.6 Επίδραση της διατμητικής τάσης σε καλλιέργειες ζωικών, φυτικών και μικροβιακών κυττάρων

Σύμφωνα με τον J.b. Joshi [Joshi κ.ά., 1996], η καλλιέργεια μικροβιακών, φυτικών ή ζωικών κυττάρων απαιτεί ανάδευση για την εξασφάλιση της μεταφοράς οξυγόνου και τροφής και για τη διατήρηση των κυττάρων σε ομογενές εναιώρημα. Η περιστροφή του στροφείου στον βιοαντιδραστήρα πλήρους ανάμιξης και η διοχέτευση αερίου προκαλούν ανάδευση και μίξη. Από τις βαθμίδες ταχύτητας που υπάρχουν μεταξύ των δύο ρευμάτων ρευστών ορίζεται ο ρυθμός διάτμησης, γ :

$$\dot{\gamma}_{ij} = \frac{\partial u_i}{\partial x_j} + \frac{\partial u_j}{\partial x_i} \quad (1.2)$$

Ο ρυθμός διάτμησης επιφέρει μεταφορά ορμής, θερμότητας και μάζας στο ρευστό και δίνεται από τη σχέση:

$$\vec{\tau} = -\mu\dot{\gamma} \quad (1.3)$$

όπου,

μ , το ιξώδες του υγρού

$\vec{\tau}$, ο δυαδικός ιξώδους τάσης και

$\dot{\gamma}$, ο δυαδικός του ρυθμού παραμόρφωσης.

Οι παραπάνω εξισώσεις μπορούν να εφαρμοστούν σε νευτωνικά ρευστά υπό στρωτή ροή. Στα νευτωνικά ρευστά, το ιξώδες παραμένει σταθερό, ενώ στα μη νευτωνικά ρευστά, το ιξώδες εξαρτάται από το ρυθμό διάτμησης. Στην τυρβώδη ροή, παρατηρούνται διακυμάνσεις στις συνιστώσες της ταχύτητας. Οι τυχαίες κινήσεις του ρευστού, γνωστές ως δίνες, συνεπάγονται ακανόνιστη ταχύτητα και βαθμίδες πίεσης.

Τα κύτταρα μικροβιακής, φυτικής και ζωικής προέλευσης ποικίλουν στον τρόπο απόκρισής τους στις διατμητικές τάσεις. Παρά το πλήθος βιβλιογραφικών αναφορών που υπάρχει σχετικά με την επίδραση της διατμητικής τάσης, είναι ακόμη δύσκολο να εξαχθούν γενικά συμπεράσματα σχετικά με τη συσχέτιση των διατμητικών δυνάμεων με τις βιολογικές αποκρίσεις που παρατηρούνται. Αυτό οφείλεται κυρίως στον διαφορετικό εξοπλισμό που χρησιμοποιείται σε κάθε μελέτη για να υποβληθούν τα κύτταρα σε διατμητική τάση, καθώς και στα διαφορετικά είδη κυττάρων που μελετούνται.

Σύμφωνα με τον Cherry [Cherry, 1993], ο θάνατος των κυττάρων σε ένα βιοαντιδραστήρα υπό ανάδευση συμβαίνει είτε σταδιακά, είτε αιφνιδίως. Ο σταδιακός θάνατος των κυττάρων επέρχεται από τη συσσώρευση της βιολογικής απόκρισης των κυττάρων σε μια σειρά μικρών τραυμάτων, ενώ ο αιφνίδιος θάνατος προκαλείται από κάποιο απότομο, μεμονωμένο γεγονός που καταστρέφει το κύτταρο και έχει πολύ χαμηλή πιθανότητα να συμβεί.

Έχουν πραγματοποιηθεί διάφορα πειράματα, σε διαφορετικές συνθήκες ανάδευσης, με διάρκεια μερικών ημερών. Ο παρατηρούμενος μειωμένος ρυθμός ανάπτυξης ερμηνεύεται με την παραδοχή ότι ενώ τα κύτταρα αναπτύσσονται και διαιρούνται με ρυθμό ίσο με το ρυθμό που αναπτύσσονται και διαιρούνται όταν δεν είναι υπό ανάδευση, ένα μέρος τους πεθαίνει με έναν απροσδιόριστο μηχανισμό που σχετίζεται με τις δυνάμεις που αναπτύσσονται στο ρευστό. Ο ρυθμός αυτός θανάτου μπορεί να υπολογιστεί από τη διαφορά του φαινομενικού ρυθμού ανάπτυξης των κυττάρων στο βιοαντιδραστήρα υπό ανάμιξη και από το ρυθμό ανάπτυξης των κυττάρων σε μια καλλιέργεια ελέγχου (control), όπου δεν υπάρχει ανάδευση. Με αυτόν τον τρόπο, έχει προσδιοριστεί ότι στις καλλιέργειες υπό ανάδευση, ο θάνατος των κυττάρων επέρχεται μετά από 30 – 300 ώρες παραμονής, ανάλογα με το είδος των κυττάρων, την ταχύτητα ανάδευσης, κ.ά.

Σε άλλες μελέτες έχουν διερευνηθεί οι επιπτώσεις των δυνάμεων που αναπτύσσονται στο βιοαντιδραστήρα στις εσωτερικές διεργασίες του κυττάρου. Η ανάδευση προκαλεί αύξηση της δραστηριότητας των μιτοχονδρίων, υψηλότερα επίπεδα κατανάλωσης γλυκόζης, διατάραξη των αγγελιαφόρων RNA, αλλαγές στην έκφραση των γονιδίων και αλλοίωση της δομής του κυτταροπλάσματος. Ωστόσο, οι επιπτώσεις των διατμητικών τάσεων στις διεργασίες των κυττάρων δεν είναι ξεκάθαρες και περαιτέρω μελέτες πρέπει να πραγματοποιηθούν. Στη συνέχεια, δίνεται μια σύντομη περιγραφή της επίδρασης της διατμητικής τάσης σε φυτικά κύτταρα, μονοκύτταρα φύκη, μικρόβια, θηλαστικά κύτταρα, μικροφύκη του γένους *Chaetoceros muelleri* και υβριδώματα.

Επίδραση διατμητικής τάσης σε καλλιέργειες φυτικών κυττάρων

Στην μελέτη του J.b. Joshi [Joshi κ.ά., 1993], αναφέρεται ότι οι καλλιέργειες φυτικών κυττάρων αξιοποιούνται για την παραγωγή δευτερογενών μεταβολιτών που χρησιμοποιούνται ευρέως στη βιομηχανία. Τα κύρια προβλήματα που περιορίζουν τη δυναμική χρήση των καλλιεργειών αυτών είναι οι δυσκολίες στην μεταφορά μάζας και θρεπτικών συστατικών στα μη νευτωνικά ρευστά και η τάση των κυττάρων να συσσωματώνονται. Τα προβλήματα αυτά μεγεθύνονται λόγω της ευαισθησίας των φυτικών κυττάρων στη διατμητική τάση. Η ευαισθησία αυτή αποδίδεται στο μεγάλο μέγεθος των κυττάρων (20 – 150 μm), στην παρουσία άκαμπτων

κυτταρικών τοιχωμάτων και μεγάλων κενотоπιών εντός του κυττάρου, καθώς και στο φαινόμενο της συσσωμάτωσης. Τα κενотоπία περιέχουν ρευστό χαμηλότερου ιξώδους από το κυτταρόπλασμα κι έτσι επηρεάζουν το ιξώδες του κυττάρου και κατά συνέπεια τη διατμητική τάση που ασκείται στο κύτταρο.

Με πειράματα που διεξήχθησαν σε κύτταρα *Catharanthus roseus* από τον Tanaka [Joshi κ.ά., 1993], χρησιμοποιώντας φιάλες ανακίνησης, διαπιστώθηκε ότι τα φυτικά κύτταρα είναι ευαίσθητα στις διατμητικές δυνάμεις που αναπτύσσονται. Όμως, σε υψηλότερες ταχύτητες ανάδευσης τα συσσωματώματα των κυττάρων σπάνε και αυτό οδηγεί σε χαμηλότερο ρυθμό ανάπτυξης. Σε πειράματα που πραγματοποιήθηκαν σε αντιδραστήρες ανάδευσης, παρατηρήθηκε μείωση του ρυθμού ανάπτυξης των κυττάρων σε υψηλές ταχύτητες ανάδευσης. Ακόμη, διαπιστώθηκε ότι η διατμητική τάση επιφέρει αλλαγές στη δομή και στο κυτταρικό τοίχωμα των κυττάρων.

Η επίδραση της διατμητικής τάσης στη βιωσιμότητα των φυτικών κυττάρων έχει μελετηθεί είτε παρακολουθώντας την απελευθέρωση των ενδοκυτταρικών ουσιών στο μέσο ανάπτυξης, είτε υπολογίζοντας το ρυθμό ανάπτυξης ως προς το χρόνο διπλασιασμού των κυττάρων. Η ευαισθησία των κυττάρων στη διατμητική τάση ποικίλλει ανάλογα με τον τύπο του κυττάρου. Μελέτες που έχουν πραγματοποιηθεί με τη χρήση ιξωδομέτρων, έχουν δείξει ότι τα κύτταρα καταπονούνται περισσότερο στην τυρβώδη, παρά στη στρωτή ροή. Σε υψηλές διατμητικές τάσεις παρατηρείται εκτεταμένη λύση των κυττάρων.

Επίδραση της διατμητικής τάσης σε μονοκύτταρα φύκη

Σύμφωνα με τους J.b. Joshi [Joshi κ.ά., 1993], τα μονοκύτταρα φύκη είναι φωτοαυτότροφα και χρησιμοποιούν το διοξείδιο του άνθρακα ως πηγή άνθρακα. Πολύ λίγες μελέτες έχουν γίνει για να διαπιστωθεί η ευαισθησία τους στη διατμητική τάση. Στις μελέτες αυτές, ασκείται διατμητική τάση σε μια καλλιέργεια κυττάρων με διάφορους τρόπους, ανάλογα με το είδος των κυττάρων, και χρησιμοποιείται μια καλλιέργεια κυττάρων ως δείγμα αναφοράς, όπου εξετάζεται ο πολλαπλασιασμός των κυττάρων. Παρατηρήθηκε ότι τα κύτταρα που εκτέθηκαν σε υψηλότερες διατμητικές τάσεις παρέμειναν μεγαλύτερο χρονικό διάστημα στη λανθάνουσα φάση πριν συνεχιστεί ο πολλαπλασιασμός τους. Αυτή η συμπεριφορά μπορεί να οφείλεται

στην απελευθέρωση των ενδοκυτταρικών περιεχομένων τα οποία παρακολουθήθηκαν με τη μέτρηση της απορρόφησης του μέσου ανάπτυξης και υποδεικνύουν τη λύση των κυττάρων. Οι καλλιέργειες φυκών προσφέρουν ένα απλό μοντέλο για τη μελέτη των επιπτώσεων της διατμητικής τάσης σε πιο περίπλοκα κύτταρα, όπως φυτικά και ζωικά, καθώς έχουν παραπλήσιο μέγεθος.

Επίδραση υψηλής διατμητικής τάσης στη βιωσιμότητα μικροβίων

Στα πειράματα των H. Lange [Lange κ.ά., 2001], εναιωρήματα *Escherichia coli* και *Saccharomyces cerevisiae* υποβλήθηκαν σε ελεγχόμενη διατμητική τάση, ρέοντας μέσα σε ένα τριχοειδή σωλήνα. Διαπιστώθηκε ότι πάνω από μια κρίσιμη τιμή διατμητικής τάσης, η βιωσιμότητα των μικροοργανισμών μειώνεται. Ο καθορισμός του αριθμού και της βιωσιμότητας των κυττάρων μετρήθηκε με τη βοήθεια μικροσκοπίου. Επιπλέον, η συγκέντρωση των δειγμάτων ήταν ένας σημαντικός παράγοντας στη μείωση της βιωσιμότητας. Όσο υψηλότερη είναι η κυτταρική συγκέντρωση, τόσο υψηλότερος είναι ο ρυθμός θνησιμότητας. Η βιωσιμότητα επηρεάζεται επίσης από τον αριθμό των περασμάτων από την πειραματική συσκευή διατμητικής τάσης και από το χρόνο έκθεσης των μικροοργανισμών στη διατμητική τάση. Τέλος, τα πειράματα που πραγματοποιήθηκαν έδειξαν ότι η κρίσιμη τιμή της διατμητικής τάσης για τη βιωσιμότητα των μικροβίων είναι χαρακτηριστική για κάθε μικροοργανισμό.

Επίδραση της διατμητικής τάσης στη βιωσιμότητα θηλαστικών κυττάρων

Στη μελέτη του T. Tazeglock [Tazeglock κ.ά., 2009], εξετάστηκε αν το είδος της διατμητικής τάσης που εφαρμόζεται στα κύτταρα, επηρεάζει τη βιωσιμότητά τους. Έχει αποδειχτεί ότι η απόκριση των κυττάρων των θηλαστικών διαφέρει ανάλογα με τον τύπο της ροής. Δύο συσκευές χρησιμοποιήθηκαν για την επιβολή πεδίων ροής: ομοιόμορφη σταθερή απλή ροή και ταλαντωτική εκτατική ροή (oscillating extensional flow). Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι κύτταρα από τις ωθήκες του κινέζικου χάμστερ και ανθρώπινα εμβρυικά νεφρικά κύτταρα υφίστανται απόπτωση όταν υποβάλλονται σε χαμηλή διατμητική τάση (περίπου $2 Pa$), σε ταλαντωτική εκτατική ροή. Σε αντίθεση, τα κύτταρα υφίστανται νέκρωση όταν εκτίθενται σε

χαμηλή διατμητική τάση (περίπου 1 Pa), σε απλή διατμητική ροή ή σε εκτατική ροή περίπου 500 Pa.

Η μέτρηση των κυττάρων που πεθαίνουν πραγματοποιείται μέσω υπολογισμού της περιεκτικότητας του υπερκείμενου υγρού σε DNA. Όταν δεν υφίσταται θάνατος των κυττάρων, ενδοκυτταρικά μόρια, όπως το DNA, δεν περνούν στο μέσο της καλλιέργειας και ως εκ τούτου, η συγκέντρωση του υπερκείμενου παραμένει σταθερή. Πάνω από μια συγκεκριμένη τιμή διατμητικής τάσης για κάθε είδος κυττάρου παρατηρήθηκε ότι η απελευθέρωση DNA συνεχώς αυξάνεται, που σημαίνει ότι κύτταρα πεθαίνουν. Επιπλέον, η κατανομή του μεγέθους των κυττάρων επηρεάζει την ανθεκτικότητά τους σε υφιστάμενες διατμητικές τάσεις, καθώς μόνο ένα μέρος των κυττάρων μπορεί να αντέξει την πίεση και να επιβιώσει.

*Επίδραση της διατμητικής τάσης στη βιωσιμότητα μικροφυκών του γένους *Chaetoceros muelleri**

Ο Michels [Michels κ.ά., 2010] μελέτησε την επίδραση της διατμητικής τάσης στη βιωσιμότητα των μικροφυκών του γένους *Chaetoceros muelleri*, χρησιμοποιώντας ρεόμετρο και άλλες συσκευές διάτμησης, εφαρμόζοντας διατμητικές τάσεις διαφορετικής έντασης. Ήταν δυνατό να προσδιοριστεί ποσοτικά η επίδραση της διατμητικής τάσης σε ένα ευρύ φάσμα, διατηρώντας συνθήκες στρωτής ροής. Το κατώτατο εύρος διατμητικών τάσεων στο οποίο η βιωσιμότητα των φυκών επηρεάστηκε αρνητικά ήταν μεταξύ 1 και 1.3 Pa. Πάνω από αυτό το εύρος, η βιωσιμότητα των κυττάρων μειώνεται απότομα σε τιμές μεταξύ 52 και 66 %. Μια περαιτέρω αύξηση της διατμητικής τάσης σε 19.4 Pa δε μειώνει σημαντικά τη βιωσιμότητα. Επομένως, η επίδραση της διατμητικής τάσης στη βιωσιμότητα των κυττάρων μπορεί να περιγραφεί ως μια βηματική απόκριση με ένα σχεδόν παρόμοιο αποτέλεσμα πέρα από την οριακή τιμή. Αυτό σημαίνει ότι μόνο ένα ποσοστό των κυττάρων είναι ευαίσθητα στη διατμητική τάση και ότι υψηλότερες διατμητικές τάσεις από την οριακή τιμή μέχρι τη τιμή 19.4 Pa, επηρεάζουν μόνο τα ευαίσθητα κύτταρα. Αν και δεν είναι σαφές ποια κύτταρα είναι πιο επιρρεπή στη διατμητική τάση, άλλες μελέτες έχουν προτείνει ότι η διατμητική τάση διαταράσσει την κυτταρική διαίρεση. Τα κύτταρα που βρίσκονται στο στάδιο της διαίρεσης είναι πιθανό να είναι πιο ευαίσθητα στη διατμητική τάση.

Στα πειράματα χρησιμοποιήθηκαν συσκευές ομόκεντρων κυλίνδρων Couette και πραγματοποιήθηκαν ρεολογικές μετρήσεις για να μελετηθεί η επίδραση ομοιόμορφης και σαφώς καθορισμένης διατμητικής τάσης στη βιωσιμότητα των κυττάρων *Chaetoceros muelleri*.

Για να μελετηθεί η χρονική εξάρτηση της επίδρασης της διατμητικής τάσης στη βιωσιμότητα των κυττάρων, τα κύτταρα εκτέθηκαν σε μια σταθερή διατμητική τάση. Μετά από ένα λεπτό, η βιωσιμότητα των κυττάρων μειώθηκε έως 82 % και συνέχισε να μειώνεται τα επόμενα επτά λεπτά. Σε μεγαλύτερο χρόνο έκθεσης η βιωσιμότητα των κυττάρων δε μειώνεται περαιτέρω. Αυτό σημαίνει ότι η επίδραση της διατμητικής τάσης είναι σχεδόν ανεξάρτητη του χρόνου. Η επίδραση της διατμητικής τάσης μπορεί να θεωρηθεί σχεδόν στιγμιαία σε σύγκριση με τους κανονικούς χρόνους καλλιέργειας. Το γεγονός ότι η βιωσιμότητα δε μειώνεται εντελώς δείχνει ότι μόνο τα πιο ευαίσθητα κύτταρα είναι επιρρεπή στη διατμητική τάση, ενώ τα πιο ανθεκτικά κύτταρα δεν επηρεάζονται, ακόμη και για μεγαλύτερο χρόνο έκθεσης.

Επίδραση της διατμητικής τάσης στη βιωσιμότητα υβριδωμάτων

Ο C. Born κ.ά. [C. Born, 1992], πρότειναν ένα θεωρητικό μοντέλο για τη πρόβλεψη της συμπεριφοράς των υβριδωμάτων και άλλων ζωικών κυττάρων που υφίστανται στρωτή ροή, προσδιορίζοντας κάποιες μηχανικές ιδιότητες των κυττάρων. Το μοντέλο αυτό υποθέτει ότι θα υπάρχει μια γρήγορη αρχική απώλεια ζωικών κυττάρων κατά την έκθεσή τους σε στρωτή ροή, ανεξάρτητα από τη διάρκεια της έκθεσης. Το μοντέλο αυτό επιβεβαιώθηκε με πειράματα που πραγματοποίησε σε υβριδώματα. Τα πειράματα απέδειξαν επίσης ότι το μοντέλο μπορεί να προβλέψει με επιτυχία την επίδραση της διατμητικής τάσης στη βιωσιμότητα των κυττάρων με μέγιστο σφάλμα 30 %.

Το μοντέλο υποθέτει ότι η δυναμική συμπεριφορά των κυττάρων, δεν επιδρά στην κρίσιμη τιμή διατμητικής τάσης για τη βιωσιμότητα των κυττάρων. Ωστόσο, η υπόθεση αυτή δεν έχει ερευνηθεί σε πιο περίπλοκα πεδία ροής.

Τα θεωρητικά και πειραματικά αποτελέσματα έδειξαν ότι οι μηχανικές ιδιότητες των κυττάρων και ειδικότερα η αντοχή τους στη διατμητική τάση, αντιπροσωπεύουν σημαντικές ιδιότητες των υβριδωμάτων και πιθανώς και άλλων ζωικών κυττάρων, για τον προσδιορισμό της

ευαισθησίας τους σε διάφορα πεδία ροής. Έτσι, θα μπορούσε να είναι δυνατή η χρήση αυτών των ιδιοτήτων για τη μοντελοποίηση της απόκρισης των κυττάρων σε διατμητική τάση σε πιο πολύπλοκα πεδία ροής, όπως ροή σε τριχοειδή σωλήνα και σε βιοαντιδραστήρες, αν και η μέθοδος μπορεί να απαιτεί και την ενσωμάτωση και άλλων παραμέτρων.

1.7 Μεταβολή της ακαμψίας του κυτταρικού τοιχώματος κατά τη διάρκεια της κυτταρικής ανάπτυξης

Το κυτταρικό τοίχωμα των κυττάρων παίζει σημαντικό ρόλο στην ανάπτυξή τους. Στη μελέτη του ο Radotic κ.ά. [Radotic, 2012] χρησιμοποίησαν μικροσκοπία ατομικής δύναμης (AFM) για να εξετάσει την κατανομή της ακαμψίας του κυτταρικού τοιχώματος καλλιέργειας εναιωρήματος του φυτού *Arabidopsis thaliana*, κατά τη διάρκεια διαφόρων φάσεων ανάπτυξης των κυττάρων. Οι μηχανικές μετρήσεις συσχετίστηκαν με αλλαγές στη σύνθεση του κυτταρικού τοιχώματος, οι οποίες παρατηρήθηκαν με φασματοσκοπία με χρήση μετασχηματισμού Fourier (FTIR – Fourier Transform Infrared Spectroscopy).

Τα πειράματα πραγματοποιήθηκαν σε κύτταρα διαφορετικών μεγεθών. Όμως, το μέγεθος των κυττάρων φάνηκε ότι δεν επηρεάζει την κατανομή ακαμψίας του κυτταρικού τοιχώματος. Έτσι, μπορεί να θεωρηθεί ότι η μεταβολή στην ακαμψία καθορίζεται αποκλειστικά από τη φάση ανάπτυξης των κυττάρων.

Στην αρχή και στο τέλος της κυτταρικής ανάπτυξης, η μέση ακαμψία του κυτταρικού τοιχώματος ήταν χαμηλή και το τοίχωμα μηχανικά ομοιογενές, ενώ στη λογαριθμική φάση ανάπτυξης, η μέση ακαμψία του τοιχώματος αυξάνεται, με την αύξηση της ετερογένειας. Σε αυτή τη φάση, η διαφορά μεταξύ της επιφανειακής και της εσωτερικής ακαμψίας του τοιχώματος ήταν μεγαλύτερη.

1.8 Κατάσταση ισορροπίας κατά την ανάπτυξη των κυττάρων

Οι Collins και Richmond [Collins & Richmond, 1962] μελέτησαν το ρυθμό ανάπτυξης του βακτηρίου *Bacillus cereus*. Τα βακτήρια αυτά αυξάνονται εκθετικά και έχουν μια σταθερή κατανομή μεγέθους. Ο ρυθμός ανάπτυξης των βακτηρίων φτάνει σε μια κατάσταση ισορροπίας, στην οποία η ανάπτυξη των κυττάρων πραγματοποιείται με σταθερό ρυθμό. Αυτό σημαίνει ότι η κανονικοποιημένη κατανομή κάποιων ιδιοτήτων φτάνει σε κατάσταση ισορροπίας κι έτσι δεν αλλάζει πια σχήμα (μόνιμη κατάσταση).

Η εκθετική ανάπτυξη μιας καλλιέργειας εκφράζεται από τη σχέση:

$$n = n_0 e^{kt} \quad (1.4)$$

όπου, n είναι ο αριθμός των οργανισμών τη χρονική στιγμή t ,

n_0 , ο αριθμός των οργανισμών για $t = 0$

k , η σταθερά εκθετικής ανάπτυξης.

Ιδιότητες όπως η μέση μάζα και το μέσο μέγεθος των οργανισμών παραμένουν σταθερές κατά τη διάρκεια αυτής της φάσης ανάπτυξης της καλλιέργειας.

1.9 Ετερογένεια κυτταρικών πληθυσμών

Ένας σημαντικός παράγοντας που πρέπει να λαμβάνεται υπόψη στη μελέτη καλλιεργειών κυττάρων είναι η ετερογένεια των κυτταρικών πληθυσμών. Η βιολογική συμπεριφορά ενός κυτταρικού πληθυσμού εξαρτάται από τις αλληλεπιδράσεις των συστατικών εντός των μεμονωμένων κυττάρων αλλά και από τις άμεσες και έμμεσες αλληλεπιδράσεις μεταξύ των κυττάρων. Αυτές οι διακυτταρικές και ενδοκυτταρικές αλληλεπιδράσεις οδηγούν σε σημαντικές διακυμάνσεις του φαινοτύπου από κύτταρο σε κύτταρο και το φαινόμενο αυτό χαρακτηρίζεται ως ετερογένεια κυτταρικών πληθυσμών.

Ο Elowitz [Elowitz, 2002], στη μελέτη του, αναλύει ότι κλώνοι ενός πληθυσμού κυττάρων εμφανίζουν φαινοτυπικές διακυμάνσεις. Αυτή η ετερογένεια μπορεί να είναι απαραίτητη σε πολλές βιολογικές διεργασίες και εικάζεται ότι προέρχεται από τυχαία γεγονότα ή από θόρυβο στη γονιδιακή έκφραση. Για τα πειράματά του, κατασκεύασε στελέχη *Escherichia coli* που επιτρέπουν την ανίχνευση του θορύβου και τη διάκριση μεταξύ των δύο μηχανισμών που προκαλούν τις φαινοτυπικές διακυμάνσεις. Τα τυχαία γεγονότα της βιοχημικής διεργασίας της γονιδιακής έκφρασης (εγγενής θόρυβος) και οι διακυμάνσεις σε άλλα κυτταρικά συστατικά (εξωγενής θόρυβος) συμβάλλουν στην συνολική διακύμανση. Ο ρυθμός μεταγραφής και διάφοροι γενετικοί παράγοντες καθορίζουν το πλάτος του θορύβου.

Κεφάλαιο 2: Πειραματική μελέτη της εξέλιξης της κατανομής μεγέθους ενός πληθυσμού μικροφυκών του γένους *Dunaliella salina*

2.1 Γενικά

Στο κεφάλαιο αυτό αρχικά περιγράφονται τα υλικά και οι μέθοδοι που χρησιμοποιήθηκαν για τη διεξαγωγή των πειραμάτων, στη συνέχεια η πειραματική διαδικασία και τέλος τα αποτελέσματα και ο σχολιασμός τους.

Κύριος στόχος των πειραμάτων ήταν να διαπιστωθεί η επίδραση διαφορετικών διατμητικών τάσεων σε μια καλλιέργεια μικροφυκών του γένους *Dunaliella salina*. Χρησιμοποιήθηκε μια καλλιέργεια ελέγχου (control), πολύ χαμηλής ανάδευσης και η ανάπτυξη της καλλιέργειας αυτής συγκρίθηκε με την ανάπτυξη μιας καλλιέργειας που τοποθετήθηκε σε βιοαντιδραστήρα (reactor) με ταχύτητες ανάδευσης 400 και 500 *rpm*. Για τη σύγκριση αυτή χρησιμοποιήθηκε ένα φασματοφωτόμετρο, όπου διαπιστώθηκε μεταβολή στη βιωσιμότητα των κυττάρων και ένα μικροσκόπιο φθορισμού, όπου μετά την προσθήκη χρωστικής ουσίας στα κύτταρα, ήταν δυνατός ο προσδιορισμός της διαμέτρου των ζωντανών κυττάρων.

2.2 Υλικά και μέθοδοι

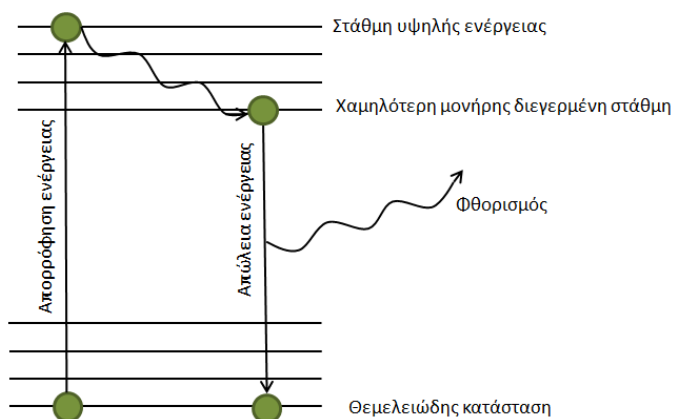
2.2.1 Μικροσκοπία φθορισμού

Στα πειράματα που πραγματοποιήθηκαν χρησιμοποιήθηκε μικροσκοπία φθορισμού, μετά την προσθήκη μικρής ποσότητας χρωστικής ουσίας FDA (περιγράφεται στην παράγραφο 2.2.5) στα δείγματα, για την εκτίμηση του αριθμού και του μεγέθους των ζωντανών κυττάρων.

Κατά το φθορισμό ευαίσθητα μόρια εκπέμπουν φως από διεγερμένες στάθμες που δημιουργήθηκαν από κάποιον φυσικό, μηχανικό ή χημικό μηχανισμό. Η φωταύγεια μέσω της διέγερσης ενός μορίου με τη χρήση φωτονίων στο ορατό φάσμα ή στην περιοχή του υπεριώδους καλείται φωτοφωταύγεια, η οποία διακρίνεται σε φθορισμό και φωσφορισμό. Ο φθορισμός είναι η ιδιότητα κάποιων μορίων να απορροφούν φως συγκεκριμένου μήκους

κύματος και στη συνέχεια να εκπέμπουν φως μεγαλύτερου μήκους κύματος, μετά από ένα μικρό χρονικό διάστημα, που καλείται διάρκεια ζωής του φθορισμού.

Η διαδικασία του φθορισμού αποτελείται από τρεις διεργασίες, οι οποίες συμβαίνουν σε διαφορετικές χρονικές τάξεις μεγέθους. Αρχικά, ένα ηλεκτρόνιο στη θεμελιώδη κατάσταση απορροφά ενέργεια και μεταβαίνει σε στάθμη υψηλής ενέργειας. Στη συνέχεια, με ταλαντωτική χαλάρωση εκπίπτει στη χαμηλότερη μονήρης διεγερμένη στάθμη, και τελικά, επιστρέφει στη θεμελιώδη κατάσταση με εκπομπή ενός φωτονίου, το οποίο είναι ορατό κατά το φθορισμό. Η διαδικασία αυτή παρουσιάζεται στο παρακάτω σχήμα. [Α. Πετρή, 2013]



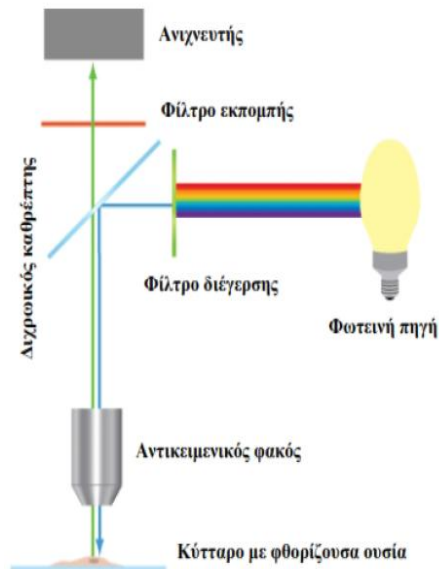
Σχήμα 2.1: Διαδικασία φθορισμού

Λειτουργία του μικροσκοπίου φθορισμού

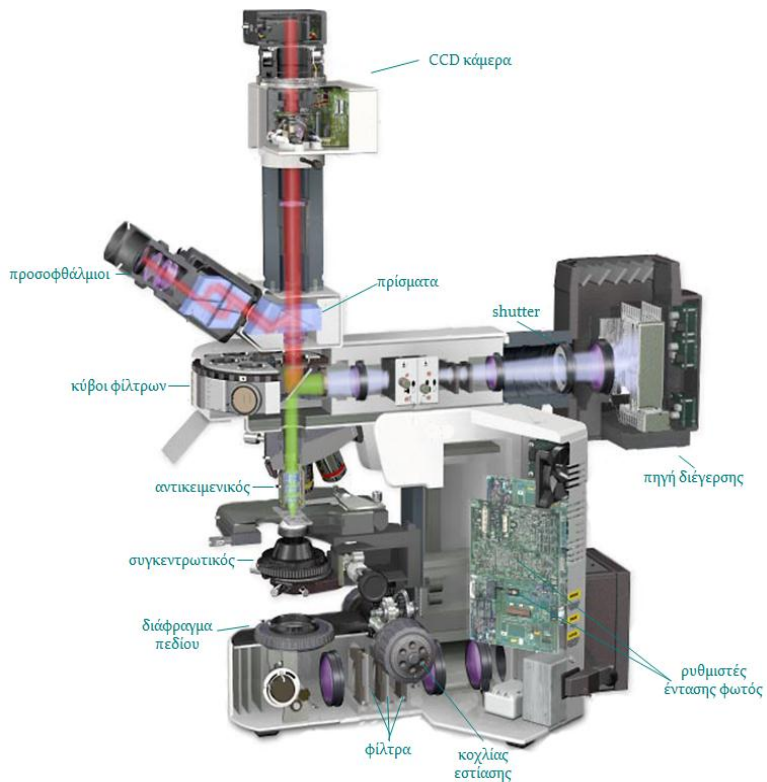
Το μικροσκόπιο φθορισμού μοιάζει με το οπτικό μικροσκόπιο, με τη διαφορά ότι το φως που χρησιμοποιείται για την απεικόνιση προέρχεται από το φθορισμό του δείγματος. Ο φθορισμός αυτός μπορεί να οφείλεται είτε σε φθορίζουσα ουσία που έχει προστεθεί στο δείγμα είτε στον αυτοφθορισμό. Το οπτικό μικροσκόπιο χρησιμοποιεί φως στο φάσμα του ορατού (400 – 700 nm), ενώ το μικροσκόπιο φθορισμού χρησιμοποιεί μια πηγή φωτός μεγαλύτερης έντασης που διεγείρει το δείγμα, το οποίο εκπέμπει φως χαμηλότερης ενέργειας και μεγαλύτερου μήκους κύματος.

Η μικροσκοπία φθορισμού χρησιμοποιείται συχνά για να απεικονίσει κάποια χαρακτηριστικά μικρών δειγμάτων είτε για να ενισχύσει οπτικά τρισδιάστατα χαρακτηριστικά σε μικρές κλίμακες. Αυτό μπορεί να επιτευχθεί προσκολλώντας φθορίζοντες ιχνηθέτες σε αντισώματα που προσκολλώνται σε στοχευμένα χαρακτηριστικά. Όταν το ανακλώμενο φως και ο φθορισμός του υποβάθρου φιλτράρονται, μπορούν να απεικονιστούν συγκεκριμένα χαρακτηριστικά ενός δείγματος.

Τα φθορίζοντα μόρια απορροφούν σε συγκεκριμένα μήκη κύματος, για το λόγο αυτό ένα μικροσκόπιο φθορισμού πρέπει να διαθέτει μια πηγή φωτός ικανή να παράγει μήκη κύματος που θα διεγείρουν το δείγμα. Αυτό επιτυγχάνεται με τη χρήση μιας λυχνίας ξένου (xenon) ή μιας λυχνίας ατμών υδραργύρου, οι οποίες εκπέμπουν σε όλα τα μήκη κύματος του ορατού φάσματος. Για την απομόνωση ενός μήκους κύματος, χρησιμοποιείται ένα οπτικό φίλτρο που ονομάζεται φίλτρο διέγερσης και ρυθμίζεται έτσι ώστε να αφήνει στην έξοδό του μόνο το μήκος κύματος που χρησιμοποιείται για να διεγείρει τα φθορίζοντα μόρια. Μετά το φίλτρο αυτό ακολουθεί ο διχρωικός καθρέπτης, που ανακλά ορισμένα μήκη κύματος ενώ αφήνει τα υπόλοιπα να τον διαπεράσουν. Όταν το μονοχρωματικό φως εξέρχεται από αυτή τη διάταξη, φτάνει στο δείγμα και διεγείρει τα φθορίζοντα μόρια. Έτσι, τα μόρια αυτά απορροφούν φωτόνια και εκπέμπουν φωτόνια χαμηλότερης ενέργειας, δηλαδή μεγαλύτερου μήκους κύματος. Τα εκπεμπόμενα φωτόνια με μικρότερο μήκος κύματος διαπερνούν το διχρωικό καθρέπτη και φτάνουν στον ανιχνευτή του μικροσκοπίου. Η διαδικασία απεικονίζεται στο σχήμα 2.2.



Σχήμα 2.2: Σχηματική αναπαράσταση της λειτουργίας του μικροσκοπίου



Σχήμα 2.3: Olympus Bx51

Στις πειραματικές μετρήσεις που πραγματοποιήθηκαν για την εργασία αυτή χρησιμοποιήθηκε το μικροσκόπιο φθορισμού Olympus BX51 με προσπίπτοντα φωτισμό. Το διάγραμμα του μικροσκοπίου και οι οπτικοί δρόμοι παρουσιάζονται Σχήμα 2.3. Για τη διέγερση των δειγμάτων χρησιμοποιήθηκε λυχνία υδραργύρου 100 W και φίλτρο πράσινης διέγερσης (green excitation filter). Για τη συλλογή των εικόνων φθορισμού χρησιμοποιήθηκε ο αντικειμενικός φακός LMPlanFL 20x / 0.40 BD. Η συλλογή των εικόνων έγινε από την έγχρωμη κάμερα Olympus XC50. Ο έλεγχος της λήψης και μεταφοράς εικόνων έγινε με τη χρήση του προγράμματος Olympus Particle Inspector.

Αιματοκυτταρόμετρο παρατήρησης κυττάρων

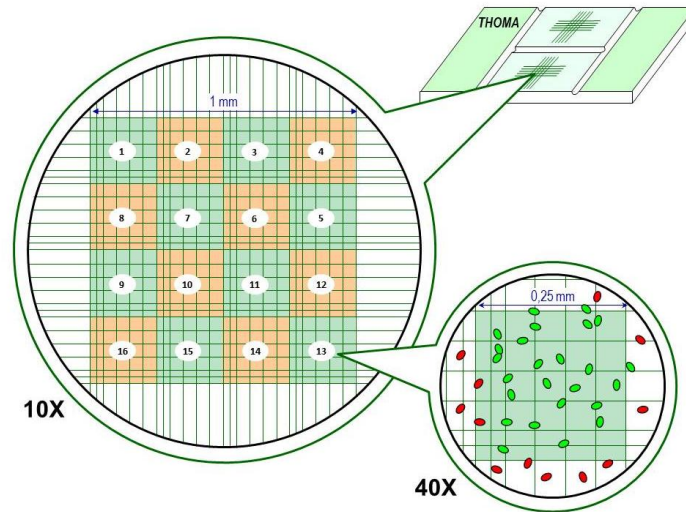
Το αιματοκυτταρόμετρο χρησιμοποιείται για τη διευκόλυνση της παρατήρησης και του υπολογισμού της συγκέντρωσης των κυττάρων ενός δείγματος. Αποτελείται από μια παχιά

αντικειμενοφόρο πλάκα με μια ορθογώνια εσοχή που δημιουργεί ένα θαλαμίσκο. Αυτός ο θαλαμίσκος είναι χαραγμένος με ένα πλέγμα κάθετων γραμμών. Η συσκευή είναι προσεκτικά κατασκευασμένη ώστε οι διαστάσεις της περιοχής που οριοθετείται από τις γραμμές να είναι γνωστές, καθώς και το βάθος του θαλάμου. Έτσι, είναι δυνατόν να μετρηθεί ο αριθμός των κυττάρων σε ένα συγκεκριμένο όγκο ρευστού και κατά συνέπεια να υπολογιστεί η συγκέντρωση των κυττάρων στο ρευστό.

Στα πειράματα που πραγματοποιήθηκαν χρησιμοποιήθηκε το αιματοκυτταρόμετρο Thoma, το οποίο απεικονίζεται στο σχήμα 2.4. Στο κέντρο αυτού του θαλαμίσκου υπάρχει τετραγωνικό πλέγμα εμβαδού 1 mm^2 το οποίο μπορεί να παρατηρηθεί συνολικά σε εστίαση του μικροσκοπίου 10x. Αυτό το πλέγμα χωρίζεται σε δεκαέξι τετράγωνα, το καθένα από τα οποία περιέχει εικοσιπέντε μικρά τετράγωνα. Όταν τοποθετείται το δείγμα κάτω από την καλυπτρίδα, το κυτταρικό εναιώρημα φτάνει σε ύψος 0.1 mm . Έτσι, ο όγκος του μεγάλου τετραγωνικού πλέγματος θα είναι $1\text{ mm} \times 1\text{ mm} \times 0.1\text{ mm} = 0.1\text{ mm}^3 = 10^{-4}\text{ ml}$.

Οι φωτογραφίες που λήφθηκαν για την παρατήρηση των κυττάρων έγιναν σε εστίαση 20x. Με στόχο την εξαγωγή της μέγιστης δυνατής πληροφορίας, αντί για την ορισμένη περιοχή του αιματοκυτταρομέτρου, χρησιμοποιήθηκε η συνολική περιοχή που μπορούσε να καλύψει ο φωτογραφικός φακός.

Το εμβαδό κάθε φωτογραφίας ήταν 4976832 pixels , με $0.33980\text{ }\mu\text{m} / \text{pixel}$. Έτσι, το εμβαδό κάθε φωτογραφίας σε μm^2 ήταν $4976832 \cdot 0.3980^2 = 574645\text{ }\mu\text{m}^2$. Πολλαπλασιάζοντας με τον ύψος που φτάνει το κυτταρικό εναιώρημα, $100\text{ }\mu\text{m}$, υπολογίζεται ο όγκος που είναι ίσος με $5.7 \cdot 10^7\text{ }\mu\text{m}^3 = 5.7 \cdot 10^{-5}\text{ mL}$.



Σχήμα 2.4: Αιματοκυτταρόμετρο Thoma

2.2.2 Φασματοφωτομετρία UV – VIS

Κατά τη διεξαγωγή των πειραμάτων χρησιμοποιήθηκε φασματοφωτόμετρο UV – VIS για τον υπολογισμό της απορρόφησης των δειγμάτων. Χρησιμοποιήθηκαν δείγματα ιζήματος και υπερκείμενου. Στο ίζημα βρίσκονται τα κύτταρα που μας ενδιαφέρουν σε μεγαλύτερη συγκέντρωση, ενώ στο υπερκείμενο βρίσκεται ελεύθερη χλωροφύλλη που συσχετίζεται με τον αριθμό θανόντων κυττάρων.

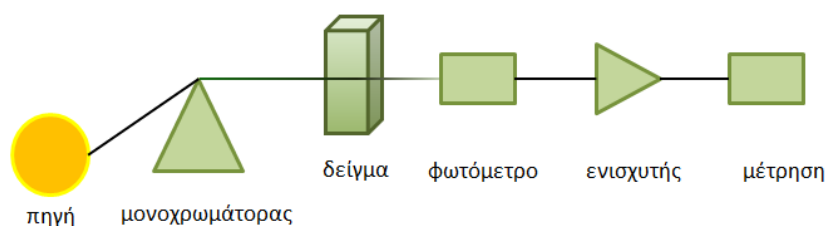
Το φασματοφωτόμετρο μετρά τη μεταβολή της έντασης μιας επιλεγμένης συχνότητας ακτινοβολίας, η οποία διέρχεται μέσα από ένα δείγμα. Οι φασματοσκοπικές μέθοδοι χημικής ανάλυσης, στις οποίες ανήκει και η φασματοφωτομετρία UV-VIS (190 – 1100 nm), χρησιμοποιούνται για την επίλυση διαφόρων χημικών προβλημάτων, που σχετίζονται με τη δομή, την κινητική, την ποσοτική ανάλυση, την ταυτοποίηση διαφόρων ενώσεων, κ.ά.

Οι φασματοφωτομετρικές μέθοδοι βασίζονται στην επίδραση κατάλληλης ηλεκτρομαγνητικής ακτινοβολίας σε μια ουσία, που δεσμεύεται από τα άτομα, ή τα μόρια της ύλης και προκαλεί ηλεκτρονιακές διεγέρσεις, διεγέρσεις πυρήνων, αλλαγές στην περιστροφή και τη δόνηση των μορίων. Έπειτα, τα άτομα και τα μόρια επιστρέφουν στην αρχική τους κατάσταση, αφού

αποβάλλουν το ποσό της ενέργειας που απορρόφησαν. Η καταγραφή της έντασης απορρόφησης συναρτήσει του μήκους κύματος ή της συχνότητας της ακτινοβολίας αποτελεί το φάσμα απορρόφησης.

Στο φασματοφωτόμετρο ορατού φάσματος (VIS), η πηγή είναι μια κοινή λάμπα πυρακτώσεως ενώ στο φασματοφωτόμετρο υπεριώδους (UV), η πηγή είναι λυχνία δευτερίου ή ξένου, που παράγει υπεριώδη ακτινοβολία. Το σύστημα διαχωρισμού (μονοχρωμάτορας) είναι ένα κοινό πρίσμα ή ένα περιθλαστικό φράγμα, το οποίο απομονώνει την επιθυμητή μονοχρωματική ακτινοβολία. Η ακτινοβολία αυτή περνάει μέσα από μια κυψελίδα, δηλαδή ένα διαφανές άχρωμο δοχείο που περιέχει το προς εξέταση δείγμα και όσο φως δεν απορροφά το διάλυμα μετράται από ένα φωτόμετρο. Οι κυψελίδες κατασκευάζονται από χαλαζία για τη περιοχή UV, ή και από ύαλο για τη περιοχή VIS. Ο ενισχυτής ενισχύει το εξερχόμενο σήμα. Η μέτρηση ή και καταγραφή του σήματος γίνεται από ένα φωτοκύτταρο και εκφράζεται σαν απορρόφηση ή διαπερατότητα.

Το φασματοφωτόμετρο υπεριώδους συνήθως περιλαμβάνει και λυχνία πυρακτώσεως ώστε να μπορεί να γίνουν μετρήσεις και στο ορατό φάσμα. Τότε αναφέρεται ως UV-VIS. Η σχηματική παράσταση του φασματοφωτομέτρου UV-VIS παρουσιάζεται στο Σχήμα 2.5.



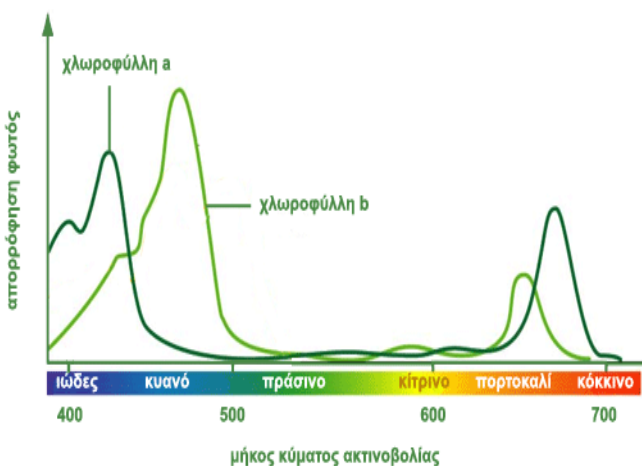
Σχήμα 2.5: Σχηματική παράσταση φασματοφωτομέτρου UV-VIS

Το φασματοφωτόμετρο που χρησιμοποιήθηκε για τη μέτρηση της απορρόφησης των δειγμάτων ήταν το SPECORD 50 Plus, με λυχνία δευτερίου. Αυτό που μετρήθηκε με το φασματοφωτόμετρο ήταν η χλωροφύλλη που περιέχεται στα δείγματα.

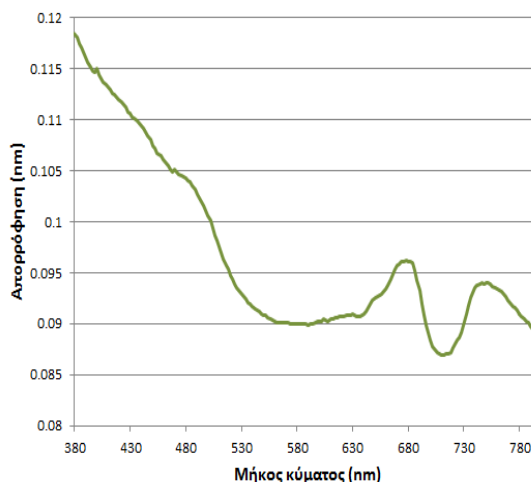
Η χλωροφύλλη είναι μια χρωστική στην οποία αποδίδεται το πράσινο χρώμα των φυτών και ενεργοποιείται κυρίως από την ιώδη, κυανή και ερυθρή ακτινοβολία, αλλά αντανακλά το

πράσινο φως. Από χημικής άποψης η χλωροφύλλη είναι μια πορφυρίνη που περιέχει μαγνήσιο σε διάφορες αλυσίδες, δημιουργώντας έτσι διάφορες κατηγορίες, όπως χλωροφύλλη α, χλωροφύλλη β, κ.ά.

Σε 80 % ακετόνη – νερό, το μήκος κύματος μέγιστης απορρόφησης της χλωροφύλλης – α είναι 663 nm και της χλωροφύλλης – β είναι 645 nm [Arnon, 1949], όπως φαίνεται και στο Διάγραμμα 2.1. Επειδή όμως το διάλυμα μας είναι διαφορετικό και δεν έχουμε καθαρή χλωροφύλλη, η κορυφή της απορρόφησης είναι μετατοπισμένη στα 680 nm, όπως παρατηρήθηκε από τα πειραματικά αποτελέσματα και φαίνεται στο Διάγραμμα 2.2. Έτσι, στα πειράματα που πραγματοποιήθηκαν λήφθηκαν μετρήσεις μόνο στα 680 nm και όχι σε όλο το φάσμα.



Διάγραμμα 2.1: Φάσμα απορρόφησης της χλωροφύλλης α και β

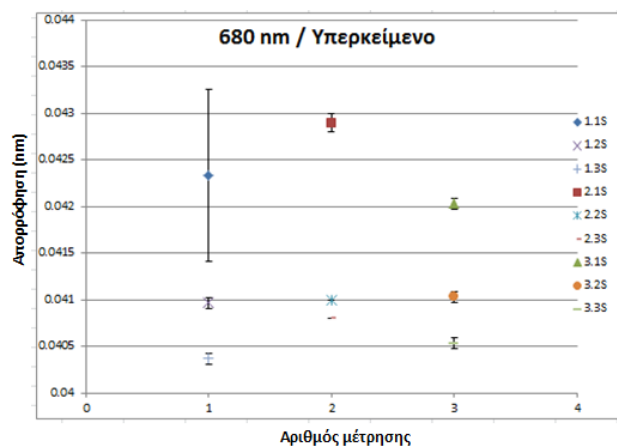


Διάγραμμα 2.2: Πειραματικό φάσμα απορρόφησης του δείγματος μας

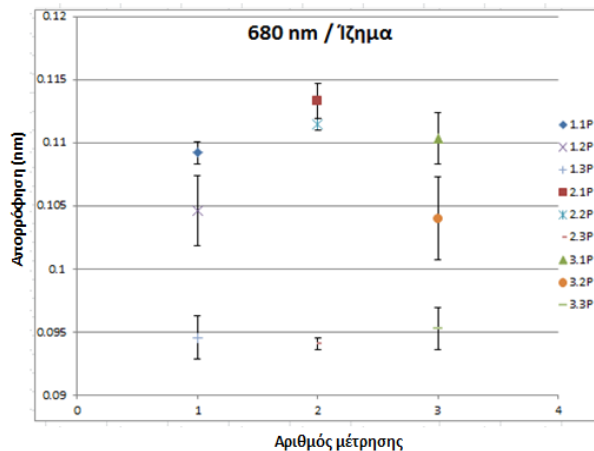
2.2.3 Σφάλμα φασματοφωτομέτρου

Στα πειράματα που πραγματοποιήθηκαν χρησιμοποιήθηκε το ίζημα και το υπερκείμενο από κάθε δείγμα που θέλαμε να μελετήσουμε. Στο ίζημα βρίσκονται σε υψηλή συγκέντρωση τα υπό μελέτη κύτταρα, ενώ στο υπερκείμενο εντοπίσαμε ελεύθερη χλωροφύλλη, η οποία υποδηλώνει το θάνατο των κυττάρων.

Για τον υπολογισμό του σφάλματος του φασματοφωτομέτρου, παραλήφθηκαν τρία δείγματα των 10 ml και κάθε μέτρηση επαναλήφθηκε τρεις φορές. Στα παρακάτω Διαγράμματα φαίνονται οι μέσες τιμές των μετρήσεων καθώς και οι τυπικές αποκλίσεις για το ίζημα και το υπερκείμενο διάλυμα στα 680 nm.



Διάγραμμα 2.3: Μέσες τιμές και τυπικές αποκλίσεις μετρήσεων για το υπερκείμενο διάλυμα στα 680 nm



Διάγραμμα 2.4: Μέσες τιμές και τυπικές αποκλίσεις μετρήσεων για το ίζημα στα 680 nm

Μετά από υπολογισμούς προέκυψε ότι η τυπική απόκλιση κυμαίνεται από 0 έως 3.16 % της μέσης τιμής των μετρήσεων, ενώ το σφάλμα από την επανάληψη του πειράματος κυμαίνεται από 3.6 έως 4.9 % για το υπερκείμενο και από 13.4 μέχρι 17 % για το ίζημα.

2.2.4 Φυγοκέντριση

Η φυγοκέντριση είναι μια διαδικασία διαχωρισμού μιγμάτων διαφορετικής πυκνότητας κατά την οποία εκμεταλλευόμαστε τη φυγόκεντρο δύναμη, που αναπτύσσεται λόγω της ταχύτατης περιστροφικής κίνησης κατάλληλων μηχανικών συστημάτων. Κατά τη φυγοκέντριση τα βαρέα στοιχεία του μίγματος συγκεντρώνονται στον πυθμένα του σωληναρίου ενώ τα ελαφρύτερα παραμένουν πάνω από τον πυθμένα. Τα στοιχεία του πυθμένα αποτελούν το ίζημα και τα στοιχεία που βρίσκονται στην επιφάνεια αποτελούν το υπερκείμενο.

Η φυγόκεντρος που χρησιμοποιήθηκε στα πειράματα ήταν η Centrifuge 5804R (Eppendorf). Όλα τα πειράματα φυγοκέντρισης πραγματοποιήθηκαν στις 2000 rpm για χρονικό διάστημα τεσσάρων λεπτών.

2.2.5 FDA (fluorescein diacetate)

Το FDA χρησιμοποιείται για την εκτίμηση του αριθμού των ζωντανών κυττάρων. Οι εστεράσες στα ζωντανά κύτταρα διασπούν το FDA και σχηματίζουν φλουορεσκεΐνη, μια ένωση που προσδίδει πράσινο χρώμα στα ζωντανά και μεταβολικά ενεργά κύτταρα και δε προσδίδει χρώμα στα νεκρά [Altman, 1993]

Για τη προετοιμασία του FDA χρησιμοποιήθηκαν 15 ml ακετόνης και 0.015 g FDA και το διάλυμα αποθηκεύεται στο σκοτάδι στους $-4\text{ }^{\circ}\text{C}$. Για 1 ml δείγματος χρησιμοποιήθηκαν 50 μL FDA, το δείγμα αναδεύτηκε και ακολουθήθηκε χρόνος παραμονής 5 λεπτών, έως ότου το FDA μπορέσει να αντιδράσει με όλα τα κύτταρα.

2.3 Πειραματική Διαδικασία

2.3.1 Προετοιμασία καλλιέργειας

Τα μικροφύκη που χρησιμοποιήθηκαν στα πειράματα προέρχονται από το γένος *Dunaliella salina*. Το μέσο ανάπτυξης των μικροφυκών προετοιμάζεται με βάση τις οδηγίες του Borowitzka (1988) και περιέχει τις εξής χημικές ενώσεις (ποσότητες ανά 1L διαλύματος):

Πίνακας I: Χημικές ενώσεις του μέσου ανάπτυξης των μικροφυκών

Χημική ένωση	Συγκέντρωση ($\frac{g}{L}$)	Χημική ένωση	Συγκέντρωση ($\frac{g}{L}$)
Na_2EDTA	0.189	$MgCl_2 \cdot 6H_2O$	1.5
$FeCl_3 \cdot 6H_2O$	0.244	$MgSO_4 \cdot 7H_2O$	0.5
H_3BO_3	0.061	KCl	0.2
$(NH_4)_6Mo_7O_{24} \cdot 4H_2O$	0.038	$CaCl_2 \cdot 2H_2O$	0.2
$CuSO_4 \cdot 5H_2O$	0.006	KNO_3	1.0
$CoCl_2 \cdot 6H_2O$	0.0051	$NaHCO_3$	0.043
$ZnCl_2$	0.0041	KH_2PO_4	0.035
$MnCl_2 \cdot 4H_2O$	0.0041	$NaCl$	65

Αρχικά, πραγματοποιήθηκαν δύο προκαταρκτικά πειράματα, με ταχύτητα ανάδευσης του αντιδραστήρα 500 rpm και διάρκεια τριών ημερών και έπειτα ένα πείραμα με ταχύτητα ανάδευσης 400 rpm και ένα με 500 rpm, διάρκειας τεσσάρων ημερών. Τα προκαταρκτικά πειράματα πραγματοποιήθηκαν για την εξοικείωση με την πειραματική διαδικασία και τα όργανα, για τον καθορισμό της ποσότητας μικροφυκών και μέσου ανάπτυξης που χρειάζεται αλλά και για τη διάρκεια που πρέπει να έχουν τα πειράματα ώστε να εξαγάγουμε συμπεράσματα..

2.3.2 Προκαταρκτικά πειράματα

Για τα πειράματα αυτά χρησιμοποιήθηκαν 400 ml μικροφυκών και 400 ml μέσου ανάπτυξης.

1^η ημέρα πειραμάτων: Η καλλιέργεια διατηρήθηκε σε ένα δοχείο των 1000 ml και χρησιμοποιήθηκε ένας μαγνητικός αναδευτήρας, μήκους 4.5 cm, με ταχύτητα ανάδευσης 200 rpm, ώστε τα κύτταρα να διατηρηθούν σε εναιώρημα και να μεταβούν από τη λανθάνουσα στην εκθετική φάση. Στη λανθάνουσα φάση τα κύτταρα προσαρμόζονται στις νέες συνθήκες του περιβάλλοντος και είναι πιο ευαίσθητα σε διατμητικές τάσεις [C. Born κ.ά., 1992]. Για το λόγο αυτό, προτιμήσαμε η μελέτη της επίδρασης της διατμητικής τάσης στη βιωσιμότητα των κυττάρων να πραγματοποιηθεί όταν αυτά βρίσκονται στην εκθετική φάση ανάπτυξης. Επιπλέον, κατά την εκθετική φάση ανάπτυξης, η θρεπτική αξία καθώς και η ανθεκτικότητα των παραγομένων μικροφυκών είναι αυξημένη [Lavens, 1996].

Δύο φορές κατά τη διάρκεια της ημέρας παραλήφθηκαν 10 ml δείγματος και τοποθετήθηκαν στη φυγόκεντρο. Έπειτα, έγινε παραλαβή του υπερκείμενου διαλύματος (3 ml) και του ιζήματος (3 ml) και τοποθετήθηκαν στο φασματοφωτόμετρο, ενώ το ενδιάμεσο εναιώρημα (4 ml) απορρίφθηκε.

2^η ημέρα πειραμάτων: Παραλήφθηκαν 10 ml δείγματος και έγινε αντίστοιχη μέτρηση με το φασματοφωτόμετρο. Έπειτα, το δείγμα διαιρέθηκε σε δύο μέρη των 400 ml, ένα που χρησιμοποιήθηκε ως control και ένα ως reactor. Το δείγμα του control τοποθετήθηκε σε ένα δοχείο των 1000 ml και αναδευτήκε όπως το αρχικό δείγμα με ταχύτητα ανάδευσης 200 rpm. Το δείγμα του reactor τοποθετήθηκε στο φωτοβιοαντιδραστήρα όγκου 500 ml που

παρουσιάζεται στην Εικόνα 2.1. Χρησιμοποιήθηκε ένας αναδευτήρας τύπου άγκυρας, που παρουσιάζεται στην Εικόνα 2.2, με ταχύτητα ανάδευσης 500 *rpm*. Κατά τη διάρκεια της ημέρας παραλήφθηκαν είτε δύο είτε τρεις φορές 10 *ml* δείγματος από το control και 10 *ml* δείγματος από το reactor και πραγματοποιήθηκαν μετρήσεις με το φασματοφωτόμετρο.



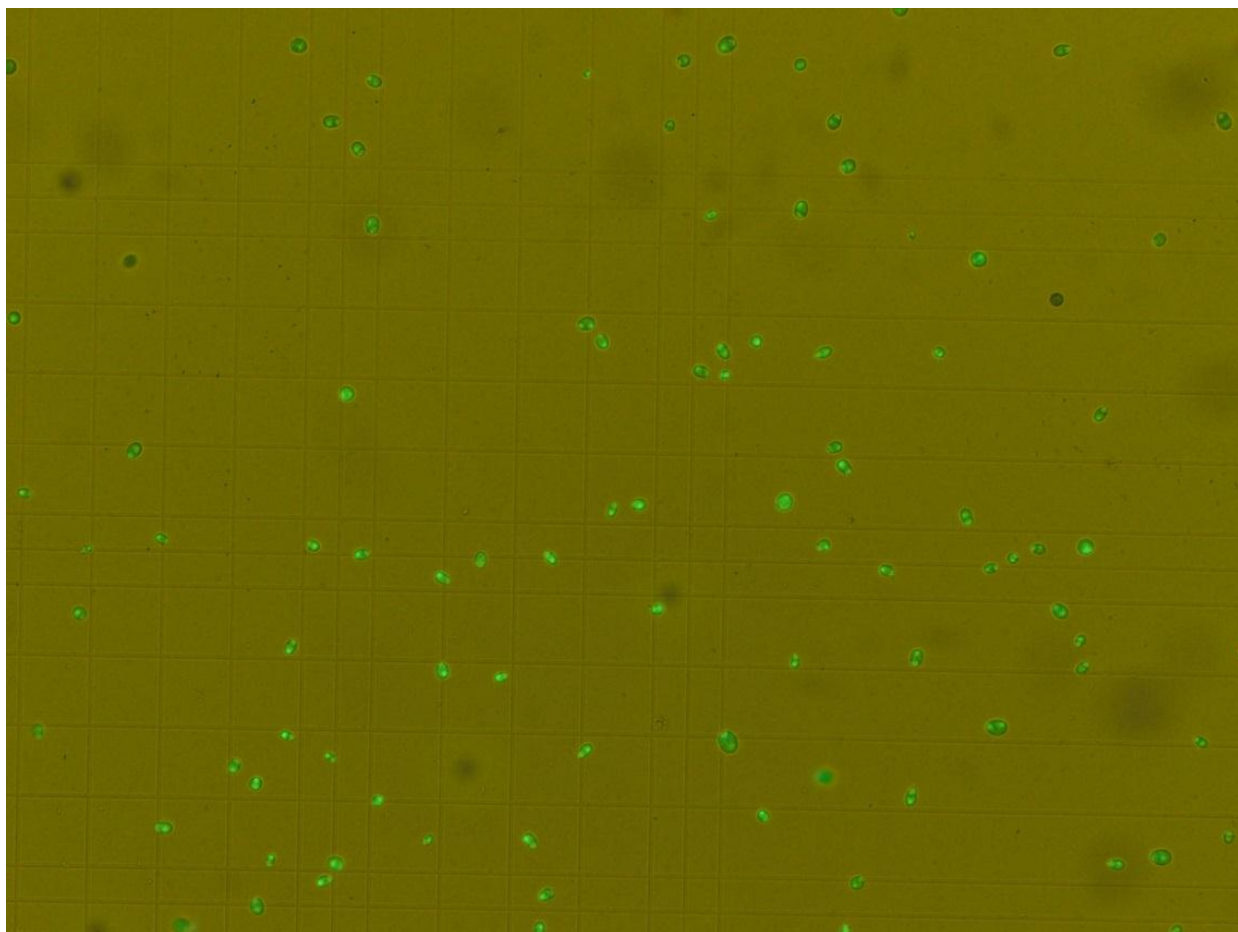
Εικόνα 2.1: Φωτοβιοαντιδραστήρας



Εικόνα 2.2: Αναδευτήρας τύπου άγκυρας

Για το δεύτερο πείραμα των 500 *rpm*, παραλήφθηκε ένα δείγμα 30 *ml* από το control καθώς και ένα δείγμα 30 *ml* από το reactor και τοποθετήθηκαν στη φυγόκεντρο. Παραλήφθηκε το ίζημα (1 *ml*) από το κάθε δείγμα και προστέθηκαν 50 μ L FDA. Έπειτα, παραλήφθηκαν δύο δείγματα των 18 μ L για το μικροσκόπιο. Τα δείγματα τοποθετήθηκαν κάτω από το μικροσκόπιο (σε counting chamber Thoma) και αποθηκεύτηκαν οι φωτογραφίες των κυττάρων για περαιτέρω επεξεργασία και εξαγωγή αποτελεσμάτων.

Παρακάτω δίνεται μια χαρακτηριστική φωτογραφία των κυττάρων μετά την προσθήκη FDA. Τα ζωντανά κύτταρα φωσφορίζουν με έντονο πράσινο.



Εικόνα 2.3: Χαρακτηριστική φωτογραφία μικροσκοπίου, μετά τη προσθήκη FDA

3^η ημέρα πειραμάτων: Παραλήφθηκαν 10 ml δείγματος από το control και 10 ml δείγματος από το reactor και πραγματοποιήθηκαν τέσσερις μετρήσεις με το φασματοφωτόμετρο. Επιπλέον, για το δεύτερο πείραμα, παραλήφθηκε ένα δείγμα 30 ml από το control καθώς και ένα δείγμα 30 ml από το reactor και ακολουθήθηκε η ίδια διαδικασία για τη παραλαβή αποτελεσμάτων με τη βοήθεια του μικροσκοπίου, μία φορά το πρωί και μία το απόγευμα. Τα πειράματα τερματίστηκαν αυτήν την ημέρα λόγω εξάντλησης του δείγματος.

2.3.3 Πραγματικά Πειράματα

Στόχος των πειραμάτων ήταν ο προσδιορισμός της επίδρασης διαφορετικών ταχυτήτων ανάδευσης στον αντιδραστήρα, 400 και 500 rpm, καθώς προκαλούν διαφορετικό ρυθμό διάτμησης και επηρεάζουν τη βιωσιμότητα των μικροφυκών. Όπως και τα προκαταρκτικά

πειράματα, χρησιμοποιήθηκε μια καλλιέργεια ελέγχου (control), πολύ χαμηλής ανάδευσης και η ανάπτυξη της καλλιέργειας αυτής συγκρίθηκε με την ανάπτυξη μιας καλλιέργειας που τοποθετήθηκε σε βιοαντιδραστήρα (reactor).

Πραγματοποιήθηκαν δύο πειράματα με ταχύτητα ανάδευσης του αντιδραστήρα 400 και 500 *rpm*. Χρησιμοποιήθηκαν 450 *ml* μικροφυκών και 450 *ml* μέσου ανάπτυξης και η διάρκεια των πειραμάτων ήταν τέσσερις ημέρες.

1^η ημέρα πειραμάτων: Η καλλιέργεια διατηρήθηκε σε ένα δοχείο των 1000 *ml*, όπως στα προκαταρκτικά πειράματα, και χρησιμοποιήθηκε ο ίδιος μαγνητικός αναδευτήρας, με ταχύτητα ανάδευσης 200 *rpm*.

Δύο φορές κατά τη διάρκεια της ημέρας παραλήφθηκαν 10 *ml* δείγματος και πραγματοποιήθηκε αντίστοιχη μέτρηση με το φασματοφωτόμετρο, όπως στην 1^η ημέρα των προκαταρκτικών πειραμάτων.

2^η ημέρα πειραμάτων: Παραλήφθηκαν 10 *ml* δείγματος και έγινε αντίστοιχη μέτρηση με το φασματοφωτόμετρο. Έπειτα, το δείγμα διαιρέθηκε σε δύο μέρη των 450 *ml*, ένα που χρησιμοποιήθηκε ως control και ένα ως reactor. Το δείγμα του control τοποθετήθηκε σε ένα δοχείο των 1000 *ml* και αναδευτήκε όπως το αρχικό δείγμα με ταχύτητα ανάδευσης 200 *rpm*. Το δείγμα του reactor τοποθετήθηκε στο φωτοβιοαντιδραστήρα, με τον ίδιο αναδευτήρα τύπου άγκυρας, με ταχύτητα ανάδευσης 400 είτε 500 *rpm*. Κατά τη διάρκεια της ημέρας, παραλήφθηκαν τρεις φορές 10 *ml* δείγματος από το control και 10 *ml* δείγματος από το reactor και πραγματοποιήθηκαν μετρήσεις με το φασματοφωτόμετρο.

Επίσης, παραλήφθηκε ένα δείγμα 30 *ml* από το control καθώς και ένα δείγμα 30 *ml* από το reactor, προετοιμάστηκαν τα δείγματα και λήφθηκαν φωτογραφίες με το μικροσκόπιο, όπως στα προκαταρκτικά πειράματα.

3^η ημέρα πειραμάτων: Παραλήφθηκαν 10 *ml* δείγματος από το control και 10 *ml* δείγματος από το reactor και πραγματοποιήθηκαν τέσσερις μετρήσεις με το φασματοφωτόμετρο. Ακόμη, παραλήφθηκε ένα δείγμα 30 *ml* από το control καθώς και ένα δείγμα 30 *ml* από το reactor

και ακολουθήθηκε η ίδια διαδικασία για τη παραλαβή αποτελεσμάτων με τη βοήθεια του μικροσκοπίου.

4^η ημέρα πειραμάτων: Πραγματοποιήθηκαν αντίστοιχες μετρήσεις με την 3^η ημέρα.

2.4 Αποτελέσματα και Σχολιασμός

2.4.1 Αποτελέσματα και σχολιασμός μετρήσεων φασματοφωτομέτρου

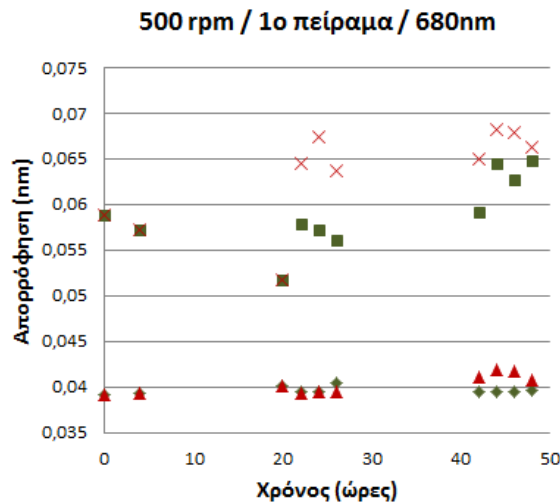
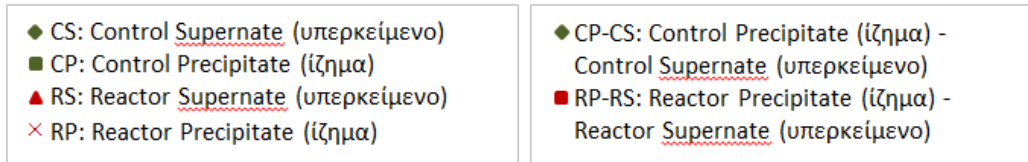
Μέσω των μετρήσεων του φασματοφωτομέτρου, στο ίζημα, όπου βρίσκονται τα υπό μελέτη κύτταρα, μπορούμε να παρατηρήσουμε πως μεταβάλλεται η απορρόφηση των κυττάρων και κατά συνέπεια ο αριθμός τους. Έτσι, είναι δυνατό να διαπιστωθεί σε ποια φάση της κυτταρικής ανάπτυξης βρίσκεται ο πληθυσμός. Ακόμη, συγκρίνοντας το υπερκείμενο του control και του reactor είναι δυνατό να συμπεράνουμε εάν πραγματοποιείται λύση των κυττάρων, καθώς στο υπερκείμενο μπορεί να εμφανίζεται ελεύθερη χλωροφύλλη η οποία ελευθερώνεται από τα κύτταρα κατά τη λύση τους. Η καθαρή απορρόφηση των κυττάρων είναι επίσης χρήσιμο να εξεταστεί, καθώς εκεί φαίνεται η πραγματική απορρόφηση των κυττάρων που μας ενδιαφέρουν, χωρίς να λαμβάνονται υπόψη τα υπόλοιπα στοιχεία που υπάρχουν στο δείγμα.

Ο ρυθμός θανάτωσης των κυττάρων αναμένεται να είναι χαμηλότερος στα 400 σε σχέση με τα 500 *rpm*, καθώς χαμηλότερος ρυθμός ανάδευσης δημιουργεί μικρότερης έντασης διατμητικές τάσεις.

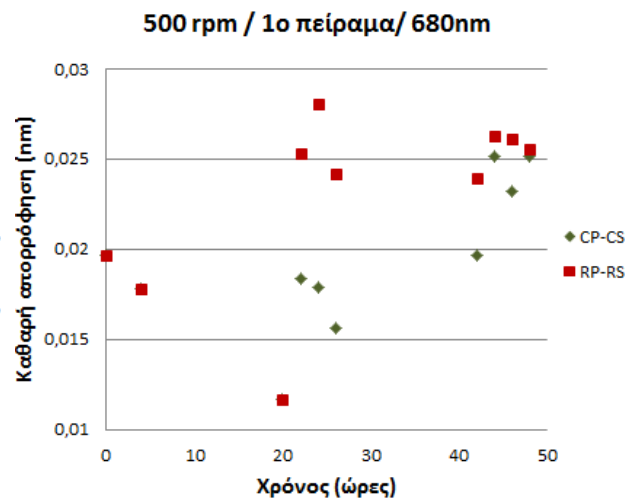
Στα παρακάτω Διαγράμματα παρουσιάζονται τα αποτελέσματα του φασματοφωτομέτρου για το control και το reactor για τα προκαταρκτικά και τα πραγματικά πειράματα. Οι τρεις πρώτες μετρήσεις σε όλες τις περιπτώσεις είναι οι μετρήσεις του αρχικού δείγματος, πριν γίνει ο διαχωρισμός του σε control και reactor, για αυτό και συμπίπτουν. Σε όλα τα Διαγράμματα, με πράσινο χρώμα συμβολίζεται το control και με κόκκινο το reactor. Στα Διαγράμματα 2.7, 2.9, 2.11, και 2.13 παρουσιάζεται η απορρόφηση των κυττάρων συναρτήσει του χρόνου, ενώ στα Διαγράμματα 2.8, 2.10, 2.12 και 2.14 παρουσιάζεται η καθαρή απορρόφηση των κυττάρων,

δηλαδή η τιμή της απορρόφησης του ιζήματος μείον την τιμή της απορρόφησης του υπερκείμενου, συναρτήσει του χρόνου.

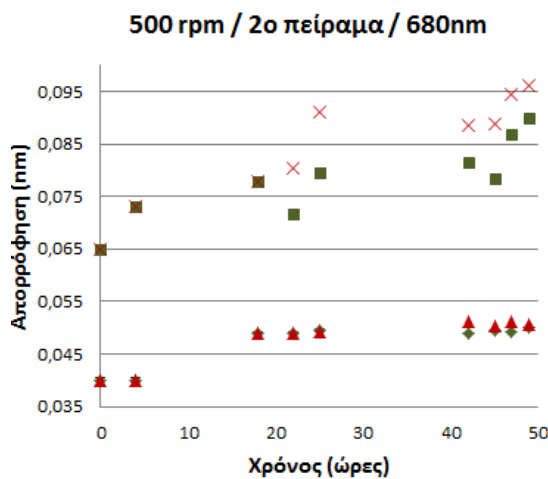
Προκαταρκτικά πειράματα



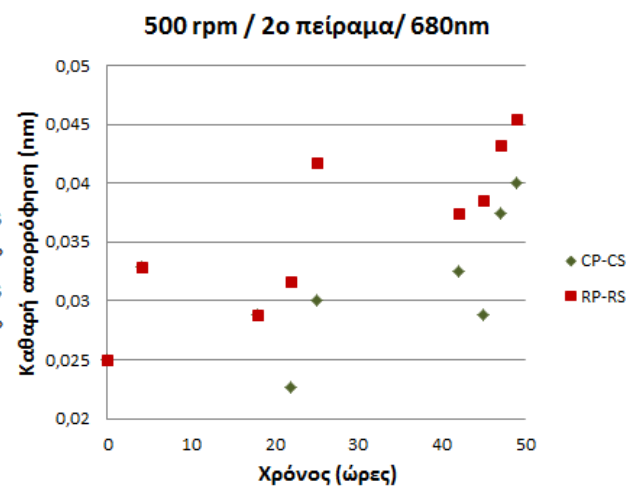
Διάγραμμα 2.7: Πυκνότητα των κυττάρων συναρτήσει του χρόνου με ταχύτητα ανάδευσης 500 rpm (1^ο πείραμα) για το reactor και για απορρόφηση στα 680 nm



Διάγραμμα 2.8: Καθαρή απορρόφηση των κυττάρων συναρτήσει του χρόνου με ταχύτητα ανάδευσης 500 rpm (1^ο πείραμα) για το reactor και για απορρόφηση στα 680 nm



Διάγραμμα 2.9: Πυκνότητα των κυττάρων συναρτήσει του χρόνου με ταχύτητα ανάδευσης 500 rpm (2^ο πείραμα) για το reactor και για απορρόφηση στα 680 nm



Διάγραμμα 2.10: Καθαρή απορρόφηση των κυττάρων συναρτήσει του χρόνου με ταχύτητα ανάδευσης 500 rpm (2^ο πείραμα) για το reactor και για απορρόφηση στα 680 nm

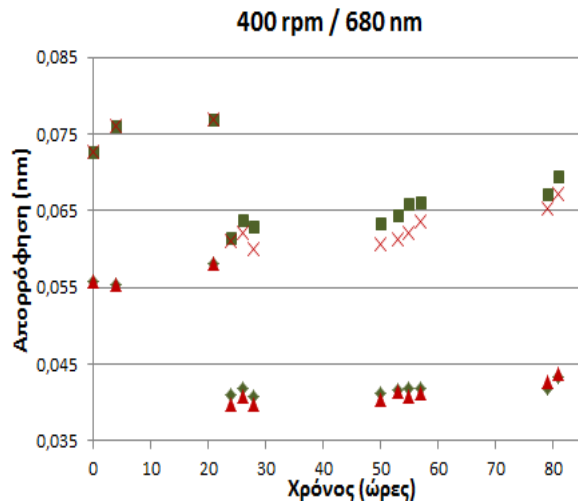
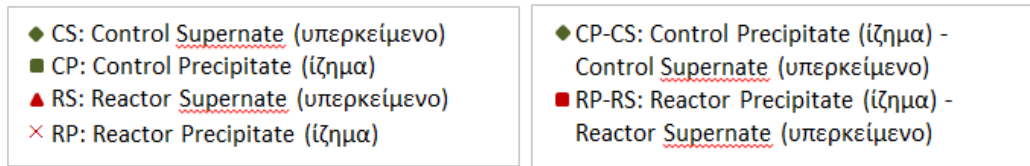
Όπως φαίνεται στα Διαγράμματα 2.7, 2.9, 2.11 και 2.13, με τις μετρήσεις του φασματοφωτομέτρου είναι δυνατό να συσχετιστεί η πυκνότητα των κυττάρων με την απορρόφηση του φωτός, καθώς όταν υπάρχουν περισσότερα κύτταρα που απορροφούν στο μήκος κύματος που εξετάζεται, η απορρόφηση είναι μεγαλύτερη.

Στα Διαγράμματα 2.7 και 2.8 παρατηρούμε ότι στο ίζημα (CP και RP), όπου βρίσκονται τα κύτταρα που μας ενδιαφέρουν, ο αριθμός των κυττάρων αυξάνεται, γεγονός που επιβεβαιώνει ότι βρισκόμαστε στην εκθετική φάση ανάπτυξης των κυττάρων.

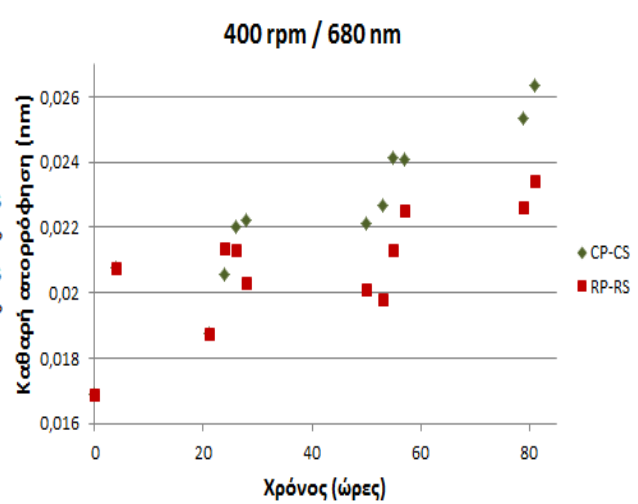
Επίσης, στα Διαγράμματα 2.7 και 2.9, παρατηρούμε ότι στο υπερκείμενο του control και του reactor (CS και RS), η τιμή της απορρόφησης του reactor είναι ελαφρώς μεγαλύτερη από την τιμή της απορρόφησης στο control. Αύξηση στην τιμή της απορρόφησης στο υπερκείμενο μπορεί να προκύψει από λύση των κυττάρων, καθότι μετά την λύση τους απελευθερώνεται χλωροφύλλη στο διάλυμα, και άρα η απορρόφηση στα 680 nm, που είναι η περιοχή της μέγιστης τιμής απορρόφησης της χλωροφύλλης, αυξάνεται. Ωστόσο, αυτή η συμπεριφορά δεν είναι τόσο εμφανής όσο στα πραγματικά πειράματα που παρουσιάζονται παρακάτω, επειδή τα πειράματα τερματίστηκαν την 3^η ημέρα.

Στα Διαγράμματα 2.8 και 2.10, η καθαρή απορρόφηση των κυττάρων του control και του reactor φαίνεται να αυξάνεται. Αύξηση της απορρόφησης υποδηλώνει αύξηση της συγκέντρωσης του κυτταρικού πληθυσμού, που επιβεβαιώνει ότι βρισκόμαστε στην εκθετική φάση ανάπτυξης των κυττάρων. Ωστόσο, από τη μία ημέρα στην άλλη παρατηρείται ότι η απορρόφηση των κυττάρων είναι σταθερή ή μπορεί και να μειώνεται. Αυτό μπορεί να δικαιολογηθεί από την υπόθεση ότι κατά τη διάρκεια της νύχτας τα κύτταρα δεν έχουν φως για να αναπτυχθούν κι έτσι, είτε πεθαίνουν είτε η ανάπτυξή τους αναστέλλεται.

Πραγματικά πειράματα

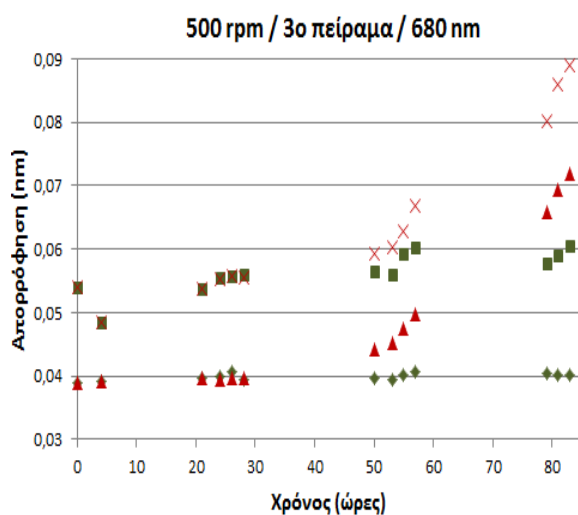


Διάγραμμα 2.11: Πυκνότητα των κυττάρων συναρτήσει του χρόνου με ταχύτητα ανάδευσης 400 rpm για το reactor και για απορρόφηση στα 680 nm

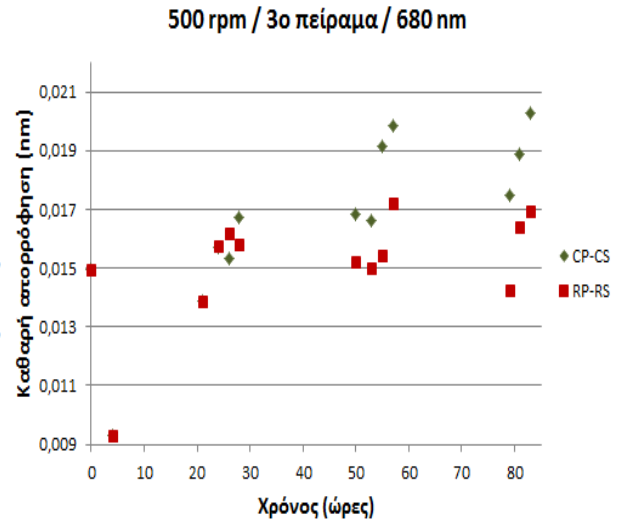


Διάγραμμα 2.12: Καθαρή απορρόφηση των κυττάρων συναρτήσει του χρόνου με ταχύτητα ανάδευσης 400 rpm για το reactor και για απορρόφηση στα 680 nm

Παρατήρηση: Στο Διάγραμμα 2.11, στις τρεις πρώτες μετρήσεις, χρησιμοποιήθηκαν άλλου είδους κυψελίδες, για αυτό η απορρόφηση είναι μεγαλύτερη από αυτή που αναμέναμε. Ωστόσο, αυτή η διαφορά εξαλείφεται στο διάγραμμα της καθαρής απορρόφησης (Διάγραμμα 2.12).



Διάγραμμα 2.13: Πυκνότητα των κυττάρων συναρτήσει του χρόνου με ταχύτητα ανάδευσης 500 rpm (3^ο πείραμα) για το reactor και για απορρόφηση στα 680 nm



Διάγραμμα 2.14: Καθαρή απορρόφηση των κυττάρων συναρτήσει του χρόνου με ταχύτητα ανάδευσης 500 rpm (3^ο πείραμα) για το reactor και για απορρόφηση στα 680 nm

Το βασικό συμπέρασμα που προκύπτει από τις πειραματικές μετρήσεις είναι ότι η ταχύτητα ανάδευσης των 400 *rpm* δεν είναι τόσο υψηλή όσο αυτή των 500 *rpm*, ώστε να προκαλέσει λύση των κυττάρων. Αυτό είναι εμφανές στο 3^ο πείραμα των 500 *rpm* (Διάγραμμα 2.13), όπου παρατηρούμε ότι στο υπερκείμενο του control και του reactor (CS και RS), η τιμή της απορρόφησης του reactor είναι συνεχώς όλο και μεγαλύτερη από την τιμή της απορρόφησης στο control. Όπως αναφέρθηκε παραπάνω, αύξηση στην τιμή της απορρόφησης στο υπερκείμενο προκύπτει από την λύση των κυττάρων. Από την άλλη πλευρά, στο πείραμα των 400 *rpm* (Διάγραμμα 2.11), στο υπερκείμενο του control και του reactor (CS και RS), δεν παρατηρείται το ίδιο φαινόμενο. Η τιμή της απορρόφησης του υπερκείμενου του reactor δεν διαφέρει ιδιαίτερα από την τιμή της απορρόφησης του υπερκείμενου του control. Επομένως, μπορούμε να συμπεράνουμε ότι δεν πραγματοποιείται λύση των κυττάρων, όπως διαπιστώσαμε ότι συμβαίνει στα πειράματα των 500 *rpm*.

Στα Διαγράμματα 2.11 και 2.13 παρατηρούμε ότι στο ίζημα (CP και RP), όπου βρίσκονται τα κύτταρα που μας ενδιαφέρουν, ο αριθμός των κυττάρων αυξάνεται, γεγονός που επιβεβαιώνει ότι βρισκόμαστε στην εκθετική φάση ανάπτυξης των κυττάρων. Η ίδια συμπεριφορά παρατηρήθηκε και στα προκαταρκτικά πειράματα, όπως αναφέρθηκε παραπάνω, (Διαγράμματα 2.7 και 2.8), αν και όχι τόσο εμφανώς.

Επιπλέον, παρατηρήθηκε ότι στο ίζημα, στα 400 *rpm* (Διάγραμμα 2.11), ο αριθμός των κυττάρων του reactor (RP), από τη δεύτερη ημέρα και μετά, είναι σταθερά μικρότερος από τον αριθμό των κυττάρων του control (CS), ενώ στα 500 *rpm* και στα τρία πειράματα (Διαγράμματα 2.7, 2.9 και 2.13) είναι μεγαλύτερος. Αυτό, μπορεί να οφείλεται στον διαφορετικό τρόπο ανάμιξης των διαλυμάτων, στις διαφορετικές συνθήκες αερισμού και στις διαφορετικές συνθήκες φωτισμού, καθώς δεν υπήρχε έλεγχος του φωτισμού (διακύμανση ηλιοφάνειας κατά τη διάρκεια των πειραμάτων).

Στα Διαγράμματα 2.12 και 2.14, η καθαρή απορρόφηση των κυττάρων του control και του reactor αυξάνεται. Αύξηση της απορρόφησης υποδηλώνει αύξηση της συγκέντρωσης του κυτταρικού πληθυσμού, που επιβεβαιώνει ότι η καλλιέργεια βρίσκεται στην εκθετική φάση ανάπτυξης. Ωστόσο, από τη μία ημέρα στην άλλη παρατηρείται ότι η απορρόφηση των

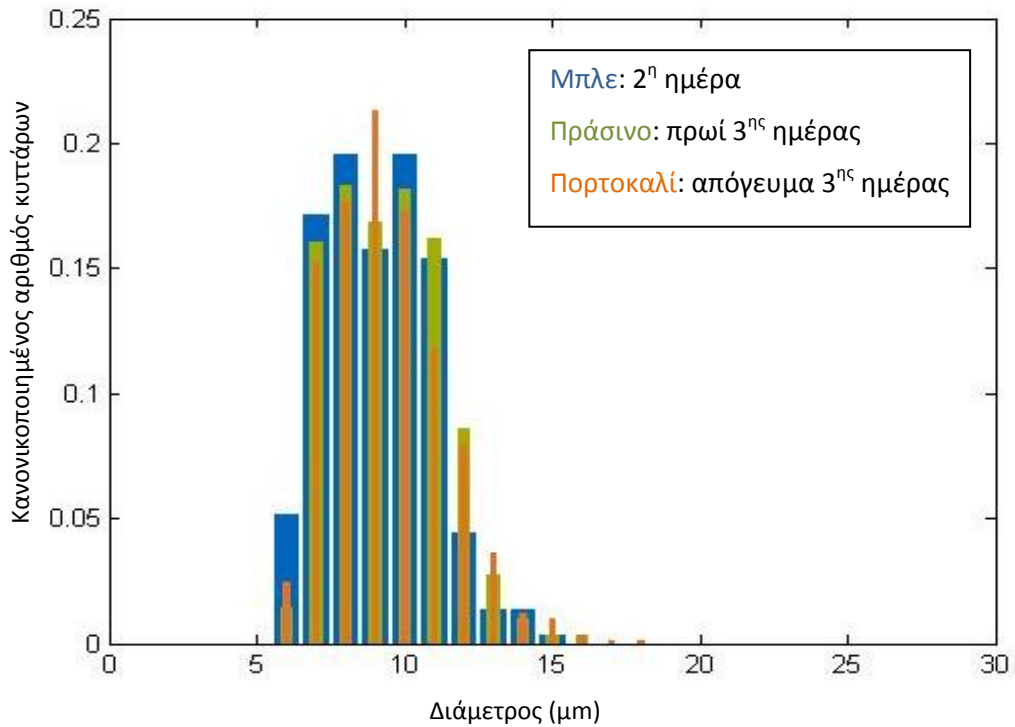
κυττάρων είναι σταθερή ή μπορεί και να μειώνεται, καθώς κατά τη διάρκεια της νύχτας τα κύτταρα δεν έχουν φως για να αναπτυχθούν κι έτσι, αναστέλλεται η ανάπτυξή τους, όπως αναφέρθηκε και παραπάνω, στα προκαταρκτικά πειράματα.

Τέλος, στα Διαγράμματα 2.12 και 2.14, παρατηρούμε ότι η καθαρή απορρόφηση του control είναι μεγαλύτερη από την καθαρή απορρόφηση του reactor και για τα δύο πειράματα. Αυτό σημαίνει ότι η ανάπτυξη των κυττάρων είναι μεγαλύτερη στο control από ότι στο reactor, καθώς στο reactor οι διατμητικές τάσεις που αναπτύσσονται λόγω ανάδευσης του δείγματος προκαλούν λύση των κυττάρων. Όμως, στα 500 *rpm*, το αποτέλεσμα αυτό δεν συμφωνεί με τα προκαταρκτικά πειράματα (Διαγράμματα 2.8 και 2.10), όπου η καθαρή απορρόφηση του control είναι μικρότερη από την καθαρή απορρόφηση του reactor.

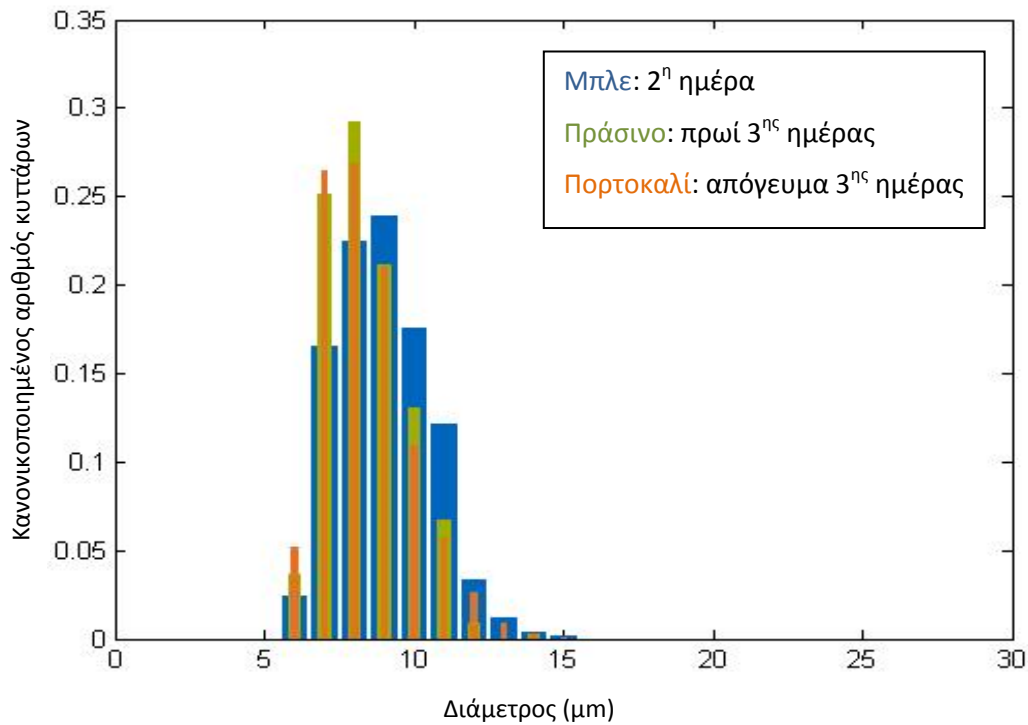
2.4.2 Αποτελέσματα και σχολιασμός μετρήσεων μικροσκοπίου

Από την επεξεργασία των φωτογραφιών του μικροσκοπίου μέσω ενός κώδικα στο λογισμικό Matlab, ο οποίος υπολογίζει τον αριθμό των ζωντανών κυττάρων ανάλογα με το χρώμα τους (φωσφορίζε πράσινο, όπως φαίνεται στην Εικόνα 2.3) καθώς και τη διάμετρό τους, προέκυψαν τα παρακάτω ιστογράμματα για τη μέση τιμή της διαμέτρου των κυττάρων στα 400 και 500 *rpm* (2^ο και 3^ο πείραμα) για το control και το reactor. Τα ιστογράμματα αυτά απεικονίζουν τον κανονικοποιημένο αριθμό κυττάρων, ο οποίος λαμβάνεται από την αρχική κατανομή διαιρεμένη με τον συνολικό αριθμό των κυττάρων.

Προκαταρκτικά πειράματα



Διάγραμμα 2.15: Ιστόγραμμα για το control του 2^{ου} πειράματος των 500 rpm



Διάγραμμα 2.16: Ιστόγραμμα για το reactor του 2^{ου} πειράματος των 500 rpm

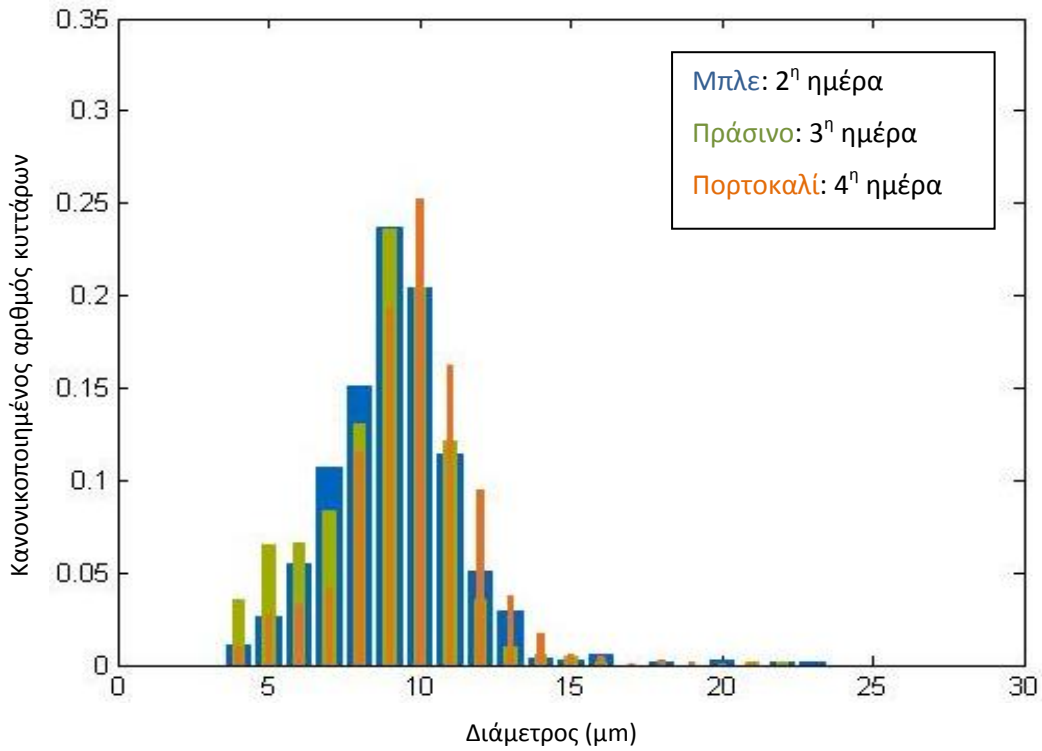
Βασική παρατήρηση από τα αποτελέσματα του μικροσκοπίου είναι ότι ο πληθυσμός που εξετάζουμε είναι ετερογενής, όπως αναφέρθηκε και στο θεωρητικό κομμάτι της εργασίας (κεφάλαιο 1.9), λόγω των διαφορετικών μεγεθών κυττάρων που υπάρχουν στην καλλιέργεια. Η διάμετρος των κυττάρων κυμαίνεται από 4 έως 25 μm .

Στα προκαταρκτικά πειράματα, στο control του 2^{ου} πειράματος των 500 *rpm* (Διάγραμμα 2.15), το ιστόγραμμα παραμένει σχεδόν αμετάβλητο, με το πρωί της 3^{ης} ημέρας να μετακινείται ελαφρώς προς μεγαλύτερες διαμέτρους κυττάρων και το απόγευμα της 3^{ης} ημέρας ελαφρώς προς μικρότερες διαμέτρους. Στο reactor του 2^{ου} πειράματος των 500 *rpm* (Διάγραμμα 2.16), το ιστόγραμμα μετακινείται προς μικρότερες διαμέτρους κυττάρων το πρωί της 3^{ης} ημέρας σε σχέση με το ιστόγραμμα της 2^{ης} ημέρας και παραμένει σχεδόν ίδιο το απόγευμα της 3^{ης} ημέρας.

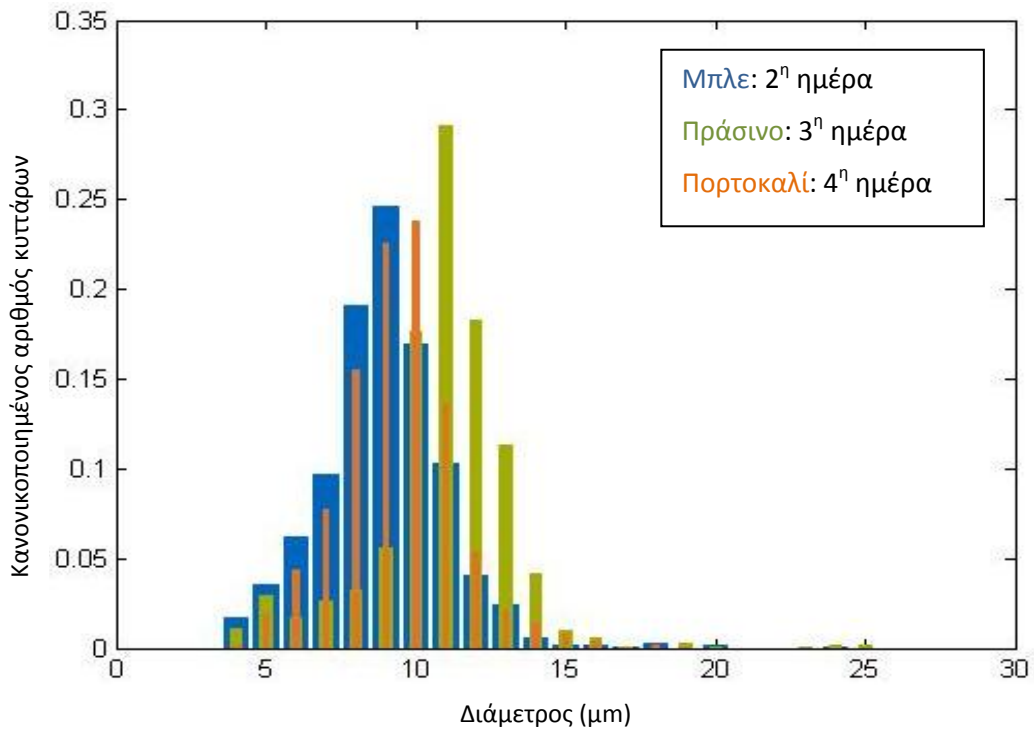
Στο control (Διαγράμματα 2.15) το ιστόγραμμα παραμένει σχεδόν σταθερό, όπως αναμέναμε, καθώς η αρχική μέση τιμή της κυτταρικής διαμέτρου (2^η ημέρα) είναι 9.09 μm , ενώ το πρωί της 3^{ης} ημέρας είναι 9.4 μm και το απόγευμα της 3^{ης} ημέρας είναι 9.38 μm . Από τα αποτελέσματα του φασματοφωτομέτρου, τα κύτταρα βρίσκονται στην εκθετική φάση ανάπτυξης. Στην φάση αυτή, δεν αναμέναμε μεταβολές στα ιστογράμματα του control, καθώς απεικονίζουν τον κανονικοποιημένο αριθμό κυττάρων, όπου η ανάπτυξη των κυττάρων φτάνει σε μια κατάσταση ισορροπίας, κατά την οποία η ανάπτυξη γίνεται με σταθερό ρυθμό [J. F. Collins και M. H. Richmond, 1962].

Στο reactor, τη 2^η ημέρα, η αρχική μέση τιμή της κυτταρικής διαμέτρου είναι 8.94 μm , το πρωί της 3^{ης} ημέρας είναι 8.37 μm και το απόγευμα της ίδιας ημέρας είναι 8.39 μm . Η μετακίνηση του reactor προς τα αριστερά (Διάγραμμα 2.16) σημαίνει ότι υπάρχουν περισσότερα κύτταρα με μικρή διάμετρο, το οποίο δείχνει ότι τα κύτταρα μεγάλης διαμέτρου πεθαίνουν με μεγαλύτερο ρυθμό. Ωστόσο, αυτό δε συμφωνεί με τα πραγματικά πειράματα, όπως θα δούμε παρακάτω, όπου το ιστόγραμμα μετακινείται αρχικά προς τα μεγαλύτερες και έπειτα προς τα μικρότερες διαμέτρους κυττάρων, δηλαδή αρχικά η ανάπτυξη των κυττάρων ευνοείται και έπειτα, από την 4^η ημέρα των πειραμάτων επέρχεται θάνατος των κυττάρων.

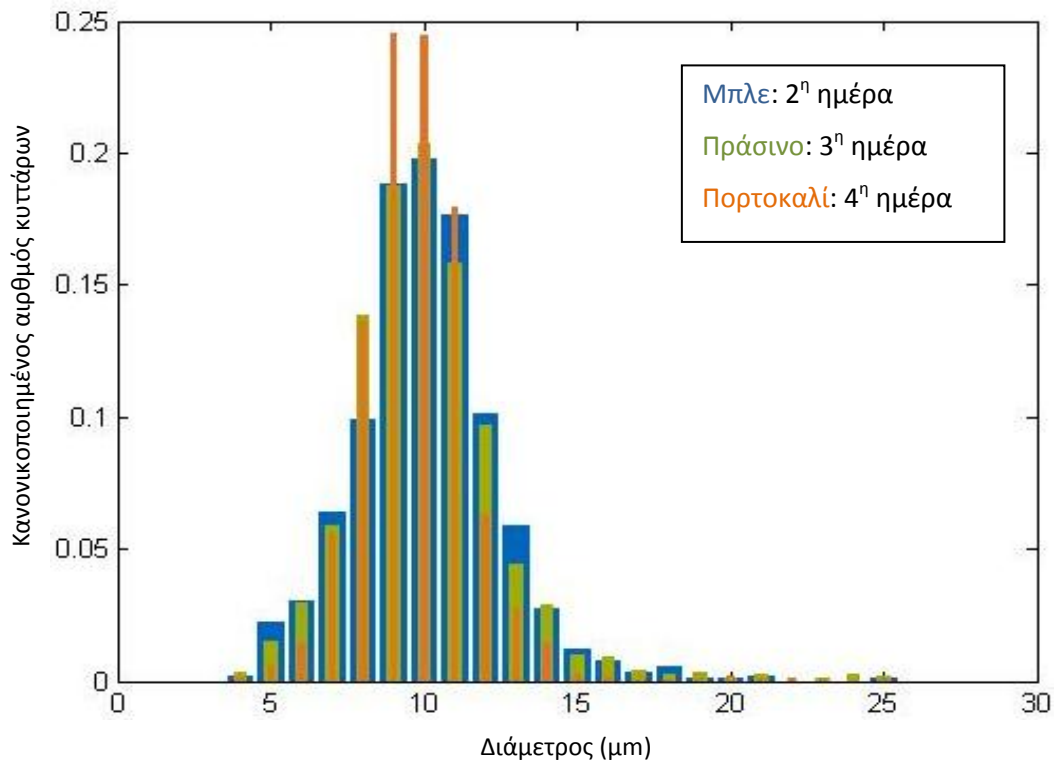
Πραγματικά πειράματα



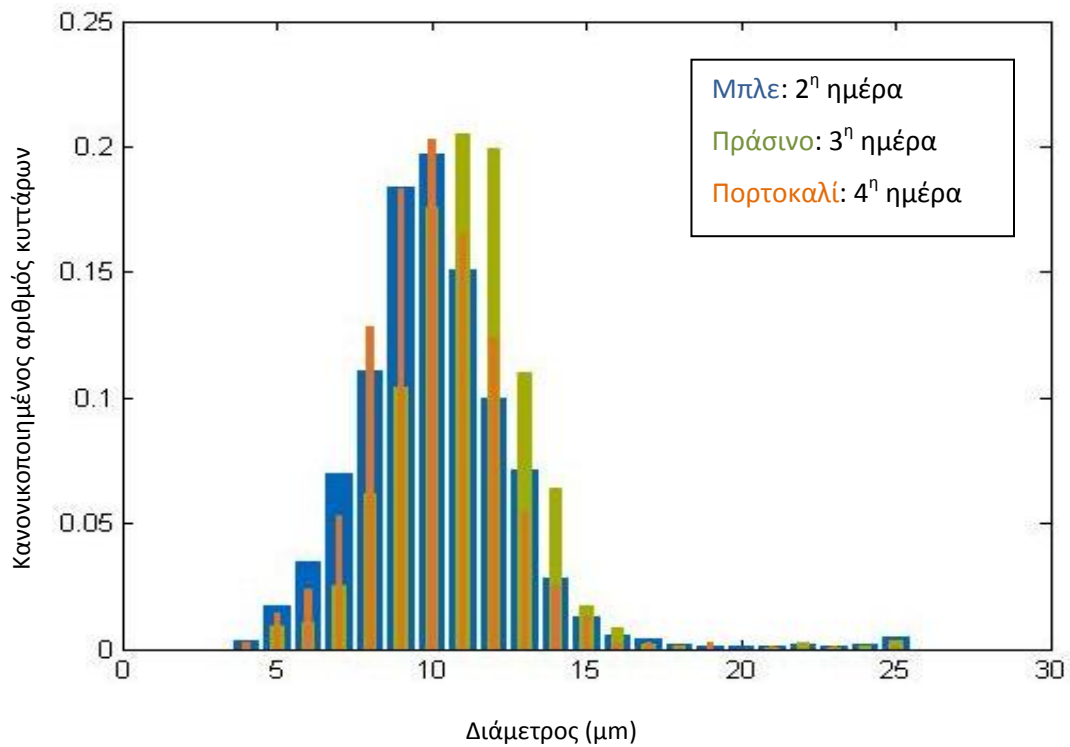
Διάγραμμα 2.17: Ιστόγραμμα για το control των 400 rpm



Διάγραμμα 2.18: Ιστόγραμμα για το reactor των 400 rpm



Διάγραμμα 2.19: Ιστόγραμμα για το control του 3^{ου} πειράματος των 500 rpm



Διάγραμμα 2.20: Ιστόγραμμα για το reactor του 3^{ου} πειράματος των 500 rpm

Στα πραγματικά πειράματα, στο control των 400 rpm (Διάγραμμα 2.17) το ιστόγραμμα παραμένει σχεδόν αμετάβλητο, με την 3^η ημέρα να μετακινείται ελαφρώς δεξιά και την 4^η ημέρα των πειραμάτων να μετακινείται ελαφρώς αριστερά. Συγκεκριμένα, την 2^η ημέρα η μέση τιμή της κυτταρικής διαμέτρου είναι 9.15 μm , την 3^η είναι 8.76 μm και την 4^η είναι 9.8 μm . Στο reactor των 400 rpm (Διάγραμμα 2.18) το ιστόγραμμα μετακινείται εμφανώς δεξιά την 3^η ημέρα και αριστερά την 4^η ημέρα των πειραμάτων. Την 2^η ημέρα η μέση τιμή της κυτταρικής διαμέτρου είναι 8.89 μm , την 3^η είναι 10.86 μm και την 4^η είναι 9.4 μm .

Στο control του 3^{ου} πειράματος των 500 rpm (Διάγραμμα 2.19), την 3^η ημέρα το ιστόγραμμα παραμένει σχεδόν ίδιο με την 2^η ημέρα και μετακινείται ελαφρώς αριστερά την 4^η ημέρα των πειραμάτων. Την 2^η ημέρα η μέση τιμή της κυτταρικής διαμέτρου είναι 10.07 μm , την 3^η είναι 10.38 μm και την 4^η είναι 9.78 μm . Το ιστόγραμμα του reactor (Διάγραμμα 2.20) μετακινείται εμφανώς δεξιά την 3^η ημέρα και αριστερά την 4^η ημέρα των πειραμάτων. Την 2^η ημέρα η μέση τιμή της κυτταρικής διαμέτρου είναι 10.12 μm , την 3^η είναι 11.05 μm και την 4^η είναι 10.07 μm .

Έτσι, διαπιστώνουμε ότι τα ιστογράμματα του control (Διαγράμματα 2.17 και 2.19) έχουν την τάση να μετακινούνται προς τα δεξιά αρχικά (αν και στο 3^ο πείραμα των 500 rpm το ιστόγραμμα παραμένει σχεδόν σταθερό) και έπειτα αριστερά. Ωστόσο, οι μετακινήσεις αυτές είναι μικρές (στα όρια του σφάλματος μέτρησης) ώστε να εξαχθούν συμπεράσματα με βεβαιότητα.

Όπως συμπεράναμε από τα αποτελέσματα του φασματοφωτομέτρου, τα κύτταρα βρίσκονται στην εκθετική φάση ανάπτυξης. Στην φάση αυτή, όπως αναφέρθηκε παραπάνω, δεν αναμένονται μεταβολές στα ιστογράμματα του control, καθώς απεικονίζουν τον κανονικοποιημένο αριθμό κυττάρων, όπου η ανάπτυξη των κυττάρων φτάνει σε μια κατάσταση ισορροπίας, κατά την οποία η ανάπτυξη γίνεται με σταθερό ρυθμό [J. F. Collins και M. H. Richmond, 1962].

Στα πραγματικά πειράματα (πείραμα 400 rpm και 3^ο πείραμα 500 rpm) τα ιστογράμματα του reactor (Διαγράμματα 2.18 και 2.20) μετακινούνται αρχικά προς τα δεξιά, γεγονός που υποδεικνύει ότι αρχικά ευνοείται η ανάπτυξη των κυττάρων. Η ανάπτυξη των κυττάρων μπορεί

να θεωρηθεί ότι ευνοείται λόγω της ανάδευσης, η οποία συμβάλλει στην καλύτερη μεταφορά των θρεπτικών συστατικών και στην επαρκή κατανομή φωτός. Στη συνέχεια όμως, την 4^η ημέρα των πειραμάτων, τα ιστογράμματα του reactor μετακινούνται προς τα αριστερά, γεγονός που σημαίνει ότι υπάρχουν περισσότερα κύτταρα με μικρή διάμετρο, κι επομένως τα κύτταρα μεγάλης διαμέτρου πεθαίνουν με μεγαλύτερο ρυθμό λόγω της διατμητικής τάσης στην οποία υποβάλλονται. Αυτό μπορεί να εξηγηθεί είτε με την υπόθεση ότι τα κύτταρα μεγαλύτερου μεγέθους είναι πιο ευαίσθητα στις διατμητικές τάσεις, καθώς οι δυνάμεις που τους ασκούνται συσσωρεύονται και τελικά προκαλούν το θάνατό τους, είτε με την υπόθεση ότι τα κύτταρα μεγαλύτερου μεγέθους διαιρούνται και παράγουν θυγατρικά κύτταρα μικρότερου μεγέθους. Ωστόσο, η δεύτερη υπόθεση μπορεί εύκολα να αντικρουστεί, αν λάβουμε υπόψη τα αποτελέσματα του φασματοφωτομέτρου, όπου καταλήξαμε στο συμπέρασμα ότι την 4^η ημέρα των πειραμάτων των 400 και ειδικά των 500 *rpm* επέρχεται θάνατος των κυττάρων, λόγω της ελεύθερης χλωροφύλλης που εντοπίστηκε στο υπερκείμενο των δειγμάτων.

Επιπροσθέτως, ο Cherry [Cherry, 1993], υποστηρίζει ότι ο θάνατος των κυττάρων σε ένα βιοαντιδραστήρα υπό ανάδευση επέρχεται είτε από τη συσσώρευση της βιολογικής απόκρισης των κυττάρων σε μια σειρά μικρών τραυμάτων, είτε από κάποιο απότομο, μεμονωμένο γεγονός που καταστρέφει το κύτταρο και έχει πολύ χαμηλή πιθανότητα να συμβεί. Η συμπεριφορά των κυττάρων που παρατηρήθηκε στα πειραματικά αποτελέσματα, δηλαδή ότι αρχικά ευνοείται η ανάπτυξή τους και στη συνέχεια επέρχεται θάνατος, συμφωνεί με την πρώτη υπόθεση του Cherry, ότι οι δυνάμεις που τους ασκούνται δρουν συσσωρευτικά και τελικά προκαλούν το θάνατό τους. Επίσης, ο Cherry αναφέρει ότι απαιτείται ένα χρονικό διάστημα 30 – 300 ωρών που σχετίζεται με το είδος των κυττάρων και την ταχύτητα ανάδευσης στο βιοαντιδραστήρα, ώστε να αρχίσει η λύση των κυττάρων, υπόθεση που συμφωνεί με τα πειραματικά αποτελέσματα, καθώς παρατηρείται θάνατος των κυττάρων μετά από δύο ημέρες παραμονής στο βιοαντιδραστήρα.

Επιπλέον, συγκρίνοντας το reactor στα δύο αυτά πειράματα (πείραμα 400 *rpm* και 3^ο πείραμα 500 *rpm*, Διαγράμματα 2.18 και 2.20 αντίστοιχα), διαπιστώνεται ότι στα 400 *rpm* την 3^η

ημέρα, που το ιστόγραμμα μετακινείται προς τα δεξιά, η μετακίνηση αυτή είναι πιο έντονη από την μετακίνηση της 3^{ης} ημέρας του 3^{ου} πειράματος των 500 *rpm*. Αυτό μπορεί να εξηγηθεί από την υπόθεση ότι στα 400 *rpm*, η ανάπτυξη των κυττάρων ευνοείται περισσότερο από ότι στα 500 *rpm*, όπου πραγματοποιείται λύση κάποιων κυττάρων, ήδη από την 3^η ημέρα των πειραμάτων.

Κεφάλαιο 3: Μαθηματικό Μοντέλο

3.1 Ετερογένεια Κυτταρικών Πληθυσμών

Όπως αναφέρθηκε στο θεωρητικό κομμάτι της εργασίας (κεφάλαιο 1.9), κάθε πληθυσμός κυττάρων εμφανίζει ετερογένεια μεταξύ των κυττάρων που τον απαρτίζουν. Αυτή η ετερογένεια μπορεί να είναι απαραίτητη για πολλές βιολογικές διεργασίες και θεωρείται ότι προέρχεται από τυχαία γεγονότα ή από θόρυβο στη γονιδιακή έκφραση. Έτσι, και στα πειράματα που πραγματοποιήθηκαν, εντοπίστηκε ετερογένεια των κυτταρικών πληθυσμών, κάτι που έγινε εμφανές από τα αποτελέσματα του μικροσκοπίου, όπου διαπιστώθηκε ότι η διάμετρος των κυττάρων κυμαίνεται από 4 έως 25 μm .

Η παρατηρούμενη ετερογένεια ενός πληθυσμού κυττάρων που χαρακτηρίζεται από πανομοιότυπη γενετική σύνθεση, σε ένα ομοιόμορφο εξωκυτταρικό περιβάλλον προέρχεται από δύο διαφορετικές πηγές. Το σύνολο των ενδοκυτταρικών συστατικών του μητρικού κυττάρου, με εξαίρεση το DNA, κληροδοτείται ανισομερώς στα θυγατρικά κύτταρα. Οι διακυμάνσεις στο περιεχόμενο των θυγατρικών κυττάρων και ειδικά στον αριθμό των ρυθμιστικών μορίων οδηγούν σε διαφορετικούς φαινοτύπους. Λόγω της λειτουργίας του κυτταρικού κύκλου, το φαινόμενο αυτό ανατροφοδοτείται οδηγώντας σε περαιτέρω διακυμάνσεις. Η ετερογένεια που προκύπτει από αυτήν την πηγή χαρακτηρίζεται ως εξωγενής. Επιπλέον, τα ρυθμιστικά μόρια, που καθορίζουν σε μεγάλο βαθμό τον κυτταρικό φαινότυπο, βρίσκονται σε μικρές συγκεντρώσεις. Έτσι, οι ρυθμοί των ενδοκυτταρικών αντιδράσεων, οι οποίες ρυθμίζονται από αυτά τα μόρια, χαρακτηρίζονται από τυχαίες διακυμάνσεις. Για το λόγο αυτό, σε συγκεκριμένες χρονικές στιγμές, ακόμα και τα κύτταρα με τον ίδιο αριθμό ρυθμιστικών μορίων μπορεί να συμπεριφέρονται με τελείως διαφορετικό τρόπο. Η ετερογένεια που προέρχεται από τέτοιου είδους στοχαστικά ενδοκυτταρικά γεγονότα χαρακτηρίζεται ως ενδογενής. Τέλος, κάθε κυτταρικό συστατικό που δρα στοχαστικά οδηγεί σε ποικίλες κυτταρικές καταστάσεις, με αποτέλεσμα να αποτελεί πηγή εξωγενούς ετερογένειας. Έτσι, οι δύο τύποι ετερογένειας είναι συζευγμένοι μεταξύ τους. [Mantzaris, 2006].

Κατά συνέπεια, το βασικό ερώτημα που γεννάται είναι πως οι ενδοκυτταρικές διεργασίες επηρεάζουν τον ρυθμό ανάπτυξης των κυττάρων.

3.2 Ισοζύγια Κυτταρικών Πληθυσμών

Για να δοθεί απάντηση στο παραπάνω ερώτημα κατασκευάζονται μαθηματικά μοντέλα που περιγράφουν τη δυναμική συμπεριφορά ενός ολόκληρου κυτταρικού πληθυσμού, λαμβάνοντας υπόψη την εγγενή κυτταρική ετερογένεια.

Συγκεκριμένα, γίνεται χρήση μιας ειδικής κατηγορίας μαθηματικών μοντέλων, γνωστά ως Ισοζύγια Κυτταρικών Πληθυσμών (Cell Population Balance Models), τα οποία προτάθηκαν πρώτη φορά από τον Fredrickson και τους συνεργάτες του [Fredrickson κ.ά., 1967]. Τα μοντέλα αυτά περιγράφουν τη δυναμική συμπεριφορά των κατανομών κυτταρικών ιδιοτήτων, όπως το μέγεθος των κυττάρων ή το ενδοκυτταρικό περιεχόμενο, μέσω μερικών διαφορικών εξισώσεων που περιέχουν ολοκληρώματα. Αν ληφθεί υπόψη η διαθεσιμότητα του υποστρώματος, οι εξισώσεις αυτές είναι μη γραμμικά συζευγμένες με συνήθεις διαφορικές εξισώσεις που περιέχουν ολοκληρώματα [Mantzaris, 2006].

Τα μοντέλα αυτά περιλαμβάνουν την έκφραση του ρυθμού ανάπτυξης των κυττάρων, του ρυθμού με τον οποίο ένα κύτταρο διαιρείται για να δώσει δύο κύτταρα μικρότερου μεγέθους, καθώς και της πυκνότητας πιθανότητας ένα διαιρούμενο κύτταρο με περιεχόμενο x' να δώσει ένα θυγατρικό κύτταρο με περιεχόμενο x και ένα άλλο με περιεχόμενο $x' - x$. Οι συναρτήσεις αυτές αναφέρονται στη βιβλιογραφία ως *intrinsic physiological functions* και είναι άγνωστες για τα περισσότερα συστήματα κυττάρων, παρόλο που έχουν αναπτυχθεί μέθοδοι για τον πειραματικό προσδιορισμό τους.

Τα Ισοζύγια Κυτταρικών Πληθυσμών χαρακτηρίζονται από αξιοσημείωτη μαθηματική πολυπλοκότητα. Χωρίς την εφαρμογή περιοριστικών υποθέσεων, τα μαθηματικά αυτά μοντέλα, συνήθως, δεν μπορούν να επιλυθούν αναλυτικά, γι' αυτό και χρησιμοποιούνται αριθμητικές μέθοδοι επίλυσης.

Διατύπωση προβλήματος

Θεωρούμε ένα πληθυσμό κυττάρων τα οποία διαφέρουν μεταξύ του ως προς τη μάζα ή οποιαδήποτε άλλη ιδιότητα που συσχετίζεται με το νόμο διατήρησης της μάζας, όπως η διάμετρος των κυττάρων, που εξετάστηκε στα πειράματά μας. Έστω $n(x, t)$ ο αριθμός των κυττάρων τα οποία τη χρονική στιγμή t έχουν διάμετρο μεταξύ x και $x + dx$. Ο ρυθμός ανάπτυξης των κυττάρων συμβολίζεται με $r(x, S)$ και εξαρτάται από τη διάμετρο των κυττάρων και την συγκέντρωση του υποστρώματος S . Η συνάρτηση αυτή μπορεί να πάρει τη μορφή:

$$r(x, S) = h(x)g(S) \quad (3.1)$$

όπου $h(x)$ και $g(S)$ είναι η συνάρτηση που αντιπροσωπεύει την εξάρτηση του ρυθμού ανάπτυξης από τη μάζα και τη συγκέντρωση του υποστρώματος αντίστοιχα. Στην περίπτωση που η συγκέντρωση του υποστρώματος είναι σταθερή, δηλαδή $g(S) = 1$, ο ρυθμός ανάπτυξης των κυττάρων παίρνει τη μορφή:

$$r(x, S) = h(x) \quad (3.2)$$

Ο ρυθμός διαίρεσης των κυττάρων ορίζεται ως:

$$\Gamma(x, S) = \frac{f(x)}{1 - \int_0^x f(x') dx'} r(x, S) = \gamma(x) r(x, S) \quad (3.3)$$

όπου $f(x)$ είναι η συνάρτηση πυκνότητας πιθανότητας διαίρεσης ενός κυττάρου και θεωρείται ότι εξαρτάται μόνο από τη μάζα του κυττάρου. Αυτή η συνάρτηση ακολουθεί κανονική κατανομή, οπότε υπολογίζεται από τη σχέση:

$$f(x) = \frac{1}{\sigma_f} \frac{1}{\sqrt{2\pi}} \exp\left(-\frac{1}{2} \left(\frac{x - \mu_f}{\sigma_f}\right)^2\right) \quad (3.4)$$

Η διαίρεση ενός κυττάρου σε δύο θυγατρικά κύτταρα περιγράφεται από την συνάρτηση $P(x, x', S)$, που εκφράζει την πιθανότητα ένα κύτταρο μάζας x' να γεννήσει ένα θυγατρικό κύτταρο μάζας x . Η συνάρτηση αυτή θεωρείται ότι είναι ανεξάρτητη από τη συγκέντρωση του

υποστρώματος, δηλαδή $P(x, x', S) = P(x, x')$ και ακολουθεί συμμετρική βήτα κατανομή, με μια παράμετρο q :

$$P(x, x') = \frac{1}{B(q, q)} \frac{1}{x'} \left(\frac{x}{x'}\right)^{q-1} \left(1 - \frac{x}{x'}\right)^{q-1} \quad (3.5)$$

Τέλος, γίνεται η υπόθεση ότι δεν επέρχεται θάνατος στα κύτταρα και ότι τα κύτταρα αναπτύσσονται σε έναν βιοαντιδραστήρα διαλείποντος έργου (batch).

Σύμφωνα με τις παραπάνω υποθέσεις, η δυναμική του κυτταρικού πληθυσμού, μπορεί να μοντελοποιηθεί από το παρακάτω ισοζύγιο κυτταρικού πληθυσμού:

$$\frac{\partial n(x, t)}{\partial t} + \frac{\partial}{\partial x} [r(x, S)n(x, t)] + \Gamma(x, S)n(x, t) = 2 \int_x^\infty \Gamma(x', S)P(x, x', S)N(x', t)dx \quad (3.6)$$

με αρχική συνθήκη $n(x, 0) = n_0(x)$, που αποτελεί το αριστερό τμήμα της περικομμένης κανονικής κατανομής με μέση τιμή μ_i , τυπική απόκλιση σ_i , και συνοριακή συνθήκη $n(0, t) = 0$ που υποδηλώνει ότι δεν υπάρχουν κύτταρα μηδενικής μάζας σε οποιαδήποτε χρονική στιγμή.

Το ισοζύγιο μάζας στο υπόστρωμα περιγράφεται από την εξίσωση:

$$\frac{dS}{dt} = \frac{1}{Y} \int_0^\infty r(x, S)n(x, t)dx \quad (3.7)$$

με αρχική συνθήκη $S(0) = S_0$.

Αντικαθιστώντας τις εξισώσεις (3.2) και (3.3) στην (3.6) το ισοζύγιο του κυτταρικού πληθυσμού παίρνει τη μορφή:

$$\begin{aligned} \frac{\partial n(x, t)}{\partial t} + \frac{\partial}{\partial x} [h(x)g(S)n(x, t)] + \gamma(x)h(x)g(S)n(x, t) = \\ 2 \int_0^\infty \gamma(x')h(x')g(S)P(x, x')n(x', t)dx \end{aligned} \quad (3.8)$$

Στην περίπτωση σταθερής συγκέντρωσης του υποστρώματος, $g(S) = 1$, η εξίσωση (3.8) απλοποιείται:

$$\frac{\partial n(x, t)}{\partial t} + \frac{\partial}{\partial x} [h(x)n(x, t)] + \gamma(x)h(x)n(x, t) = 2 \int_0^\infty \gamma(x')h(x')P(x, x')n(x', t)dx \quad (3.9)$$

Στην περίπτωση ίσης κατανομής της μάζας στα θυγατρικά κύτταρα και σταθερής συγκέντρωσης του υποστρώματος, $g(S) = 1$, η εξίσωση (3.8) παίρνει τη μορφή:

$$\frac{\partial n(x,t)}{\partial t} + \frac{\partial}{\partial x} [h(x)n(x,t)] + \gamma(x)h(x)n(x,t) = 4\gamma(2x)h(2x)n(2x,t) \quad (3.10)$$

Οι εξισώσεις (3.8), (3.9) και (3.10) έχουν αρχική συνθήκη $n(x,0) = n_0(x)$ και συνοριακή συνθήκη $n(0,t) = 0$ που υποδηλώνει ότι δεν υπάρχουν κύτταρα μηδενικής μάζας σε οποιαδήποτε χρονική στιγμή.

Ακόμη, οι εξισώσεις (3.8), (3.9) και (3.10) έχουν τέσσερις όρους: τον όρο συσσώρευσης, ανάπτυξης, διαίρεσης και γέννησης. Ο όρος της ανάπτυξης αναφέρεται στο γεγονός ότι ο αριθμός των κυττάρων με μάζα x μειώνεται εξαιτίας της ανάπτυξής τους σε κύτταρα μεγαλύτερης μάζας. Ο όρος της διαίρεσης περιγράφει το ρυθμό με τον οποίο μειώνεται ο αριθμός των κυττάρων μάζας x λόγω κυτταρικής διαίρεσης που οδηγεί σε κύτταρα μικρότερης μάζας. Ο όρος της γέννησης περιγράφει το ρυθμό γέννησης κυττάρων μάζας x προερχόμενα από τη διαίρεση όλων των κυττάρων μάζας μεγαλύτερης από x . Ο παράγοντας 2 μπροστά από το ολοκλήρωμα της εξίσωσης (3.8) οφείλεται στο γεγονός ότι από κάθε κυτταρική διαίρεση γεννιούνται δύο κύτταρα, ενώ ο παράγοντας 4 στον όρο της γέννησης στην εξίσωση (3.10) οφείλεται στο γεγονός ότι στην περίπτωση ίσης κατανομής της μάζας στα θυγατρικά κύτταρα, η μάζα του αρχικού κυττάρου είναι διπλάσια από τη μάζα κάθε θυγατρικού κυττάρου που παράγεται κατά τη διαίρεση [Mantzaris, 2006].

Κεφάλαιο 4: Επίλυση των Ισοζυγίων Κυτταρικών Πληθυσμών με το υπολογιστικό πακέτο COMSOL Multiphysics

4.1 Το υπολογιστικό πακέτο COMSOL Multiphysics

Το COMSOL Multiphysics (<http://www.comsol.com/comsol-multiphysics>) είναι ένα πακέτο κατάλληλο για τη μοντελοποίηση και επίλυση διαφόρων επιστημονικών και τεχνικών προβλημάτων που μπορούν να περιγραφούν από μερικές διαφορικές εξισώσεις. Το λογισμικό COMSOL Multiphysics προσφέρει τη δυνατότητα επίλυσης σύνθετων φυσικών φαινομένων με την μέθοδο των πεπερασμένων στοιχείων.

4.2 Μέθοδος πεπερασμένων στοιχείων [R.W. Lewis κ.ά., 2004]

Με την μέθοδο των πεπερασμένων στοιχείων ένα συνεχές σύστημα με άπειρους βαθμούς ελευθερίας προσεγγίζεται από ένα σύστημα στοιχείων με καθορισμένο αριθμό αγνώστων. Αυτά τα στοιχεία συνδέονται μεταξύ τους σε διακεκριμένα σημεία. Έτσι, περίπλοκα προβλήματα μπορούν να προσεγγιστούν με συστήματα πεπερασμένου αριθμού αλγεβρικών εξισώσεων. Η λύση προσεγγίζεται με μια παραμετροποιημένη δοκιμαστική συνάρτηση. Αντικαθιστώντας στο πρόβλημα, επιλύονται οι προκύπτουσες εξισώσεις ελαχιστοποιώντας το ολοκλήρωμα του παραμένοντος σφάλματος ως προς τις παραμέτρους, ώστε να επιτευχθεί η καλύτερη δυνατή προσέγγιση.

Με τη διαδικασία της διακριτοποίησης, η περιοχή ενδιαφέροντος διαιρείται σε μικρότερα πεπερασμένα στοιχεία και προσεγγίζεται η λύση σε κάθε ένα από αυτά. Η πληθώρα των συστημάτων της επιστήμης των μηχανικών μπορούν να απλοποιηθούν με την υποδιαίρεση τους σε μικρότερα στοιχεία. Αυτά τα στοιχεία μπορούν εύκολα να αναλυθούν από βασικές αρχές και με τον συνδυασμό όλων αυτών των αρχών, αναδομείται η ανάλυση του πλήρους αρχικού συστήματος. Τα συστήματα αυτά αποκαλούνται διακριτά συστήματα.

4.3 Επίλυση με το υπολογιστικό πακέτο COMSOL Multiphysics 4.3b

Η επίλυση της διακριτοποιημένης εξίσωσης (3.9) πραγματοποιείται μέσω του υπολογιστικού πακέτου COMSOL Multiphysics 4.3b.

$$\frac{\partial n(x,t)}{\partial t} + \frac{\partial}{\partial x} [h(x)n(x,t)] + \gamma(x)h(x)n(x,t) = 2 \int_0^\infty \gamma(x')h(x')P(x,x')n(x',t)dx \quad (3.9)$$

Στην εξίσωση αυτή έχουμε θεωρήσει ότι η συγκέντρωση του υποστρώματος είναι σταθερή και ότι πραγματοποιείται άνιση κατανομή της μάζας στα θυγατρικά κύτταρα. Για την επίλυση του προβλήματος ορίζουμε τις παρακάτω τιμές παραμέτρων. Ο ρυθμός ανάπτυξης των κυττάρων είναι γραμμικός και έχει τη μορφή:

$$h(m) = k_2 \cdot m \quad (4.1)$$

όπου $k_2 = \frac{\ln 2}{T_d}$ και $T_d = 5h$.

Για τη συνάρτηση πιθανότητας ένα κύτταρο μάζας x' να γεννήσει ένα θυγατρικό κύτταρο μάζας x , $P(x, x')$, θεωρούμε $q = 30$.

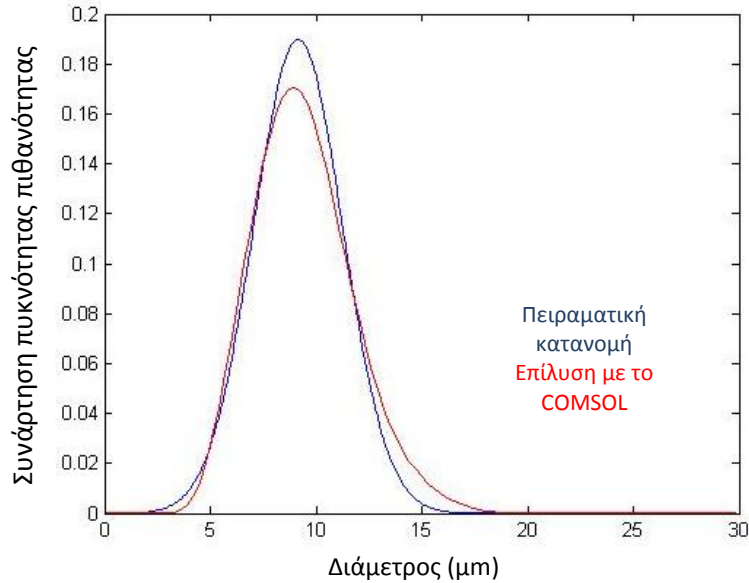
Για τη μέση τιμή, μ_i , και την τυπική απόκλιση, σ_i , της αρχικής κατανομής $n_0(m)$, δοκιμάστηκαν οι πειραματικές τιμές της κανονικής κατανομής του control της 2^{ης} ημέρας των πειραμάτων για 400 rpm, δηλαδή $\mu_i = 9.15218$, $\sigma_i = 2.1012$. Για την μέση τιμή και τυπική απόκλιση της συνάρτησης πυκνότητας πιθανότητας διαίρεσης ενός κυττάρου, $f(x)$, δοκιμάστηκαν διάφορες τιμές, ώστε η κατανομή που προκύπτει να προσεγγίζει την πειραματική κατανομή. Έτσι, επιλέχθηκε $\mu_f = 14$ και $\sigma_f = 2$. Παρακάτω παρατίθεται αυτή η κατανομή.

Για όλα τα υπόλοιπα αποτελέσματα χρησιμοποιήθηκαν η μέση τιμή και απόκλιση για τα 400 rpm.

Ο χρόνος επίλυσης του προβλήματος είναι 7 s.

4.4 Αποτελέσματα

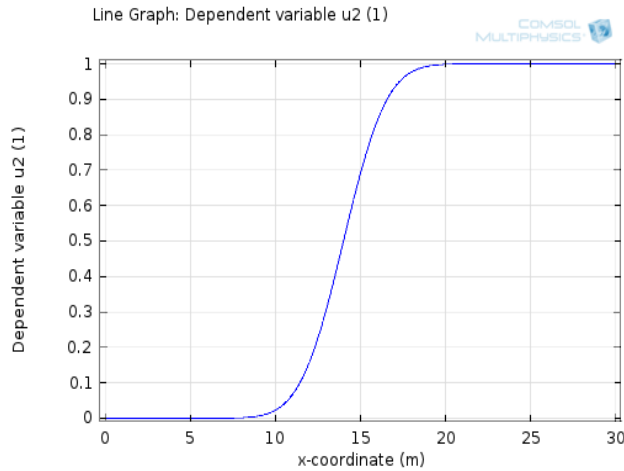
Αρχικά, παρουσιάζονται δύο σετ κατανομών ώστε να γίνει σύγκριση μεταξύ των πειραματικών αποτελεσμάτων και της προσομοίωσης. Με μπλε γραμμή είναι τα πειραματικά αποτελέσματα ενώ με κόκκινη τα αποτελέσματα του COMSOL.



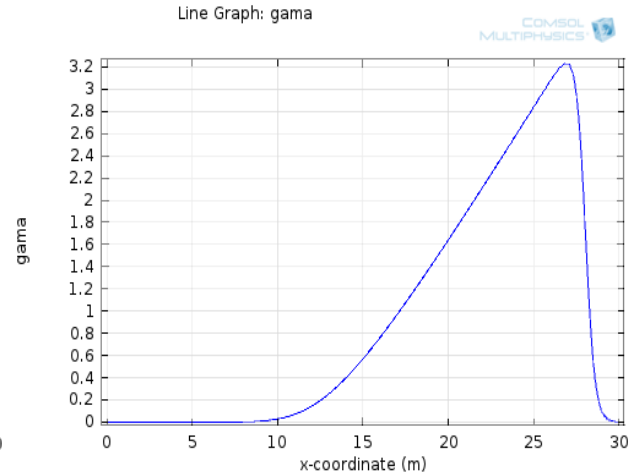
Διάγραμμα 4.1: Μεταβολή της συνάρτησης πυκνότητας πιθανότητας των πειραματικών αποτελεσμάτων του control για το πείραμα των 400 rpm και για το COMSOL για $\mu_f = 14$ και $\sigma_f = 2$ της συνάρτησης πυκνότητας πιθανότητας διαίρεσης ενός κυττάρου, $f(x)$

Παρατηρούμε ότι η κατανομή που προκύπτει από την επίλυση του Ισοζυγίου Κυτταρικού Πληθυσμού μέσω του COMSOL προσεγγίζει σε μεγάλο βαθμό την κατανομή που προκύπτει από τα πειραματικά αποτελέσματα.

Στο Διάγραμμα 4.2 παρουσιάζεται η γραφική παράσταση του $u2 = \int_0^x f(x)dx$ συναρτήσεως της κυτταρικής διαμέτρου, που χρησιμοποιήθηκε κατά την επίλυση του Ισοζυγίου Κυτταρικού Πληθυσμού. Στο Διάγραμμα 4.3 παρουσιάζεται η γραφική παράσταση του $gamma = \frac{f(x)}{1 - \int_0^x f(x')dx'}$ συναρτήσεως της διαμέτρου. Το gamma εκφράζει το ρυθμό διαίρεσης των κυττάρων και εξαρτάται μόνο από το μέγεθος των κυττάρων. Κύτταρα μεγαλύτερης διαμέτρου έχουν υψηλότερο ρυθμό διαίρεσης.

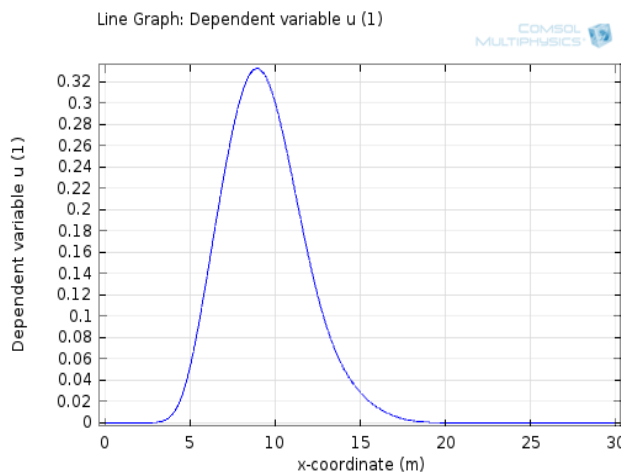


Διάγραμμα 4.2: Μεταβολή του $u2 = \int_0^x f(x) dx$ συναρτήσει της διαμέτρου

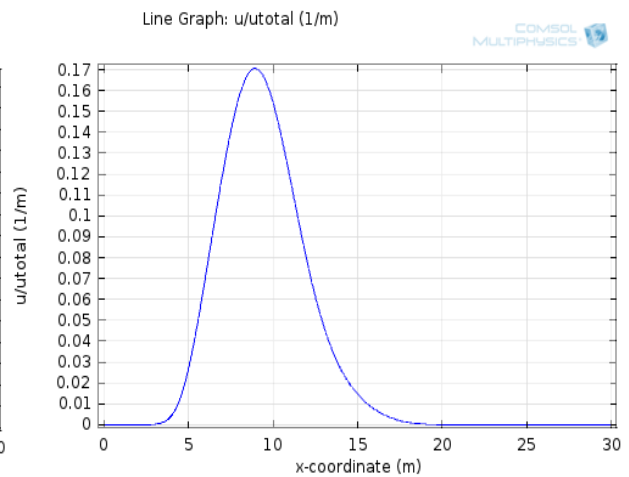


Διάγραμμα 4.3: Μεταβολή του ρυθμού διαίρεση των κυττάρων $gama = \frac{f(x)}{1 - \int_0^x f(x') dx'}$ συναρτήσει της διαμέτρου

Στα Διαγράμματα 4.4 και 4.5 παρουσιάζεται η λύση του Ισοζυγίου Κυτταρικού Πληθυσμού σε χρόνο $T = 25 h$. Στο Διάγραμμα 4.4 παρουσιάζεται η λύση του μη κανονικοποιημένου αριθμού κυττάρων, u , συναρτήσει της διαμέτρου, ενώ στο Διάγραμμα 4.5 παρουσιάζεται η λύση του κανονικοποιημένου αριθμού κυττάρων, $u/utotal$, συναρτήσει της διαμέτρου, μετά τη διαίρεση με τον συνολικό αριθμό κυττάρων.



Διάγραμμα 4.4: Γραφική παράσταση του u συναρτήσει της διαμέτρου τη χρονική στιγμή $T = 25 h$



Διάγραμμα 4.5: Γραφική παράσταση του $u/utotal$ συναρτήσει της διαμέτρου τη χρονική στιγμή $T = 25 h$

4.5 Θάνατος κυττάρων

Στα πειράματα που πραγματοποιήθηκαν, θεωρήθηκε ότι ένας αριθμός των κυττάρων της καλλιέργειας πεθαίνουν λόγω της διατμητικής τάσης που τους ασκείται. Στην παράγραφο αυτή, θα μοντελοποιήσουμε το θάνατο των κυττάρων. Για το λόγο αυτό, προστίθεται ένας επιπλέον όρος στην εξίσωση (3.9), ο οποίος περιγράφει το θάνατο των κυττάρων.

Η πιο απλή μορφή που μπορεί να περιγράψει το θάνατο των κυττάρων είναι η εκθετική μείωση:

$$\frac{\partial n(x,t)}{\partial t} = -k_d n(x,t) \quad (4.2)$$

Ο όρος αυτός περιγράφει ότι όλα τα κύτταρα πεθαίνουν το ίδιο, ανεξάρτητα του μεγέθους τους.

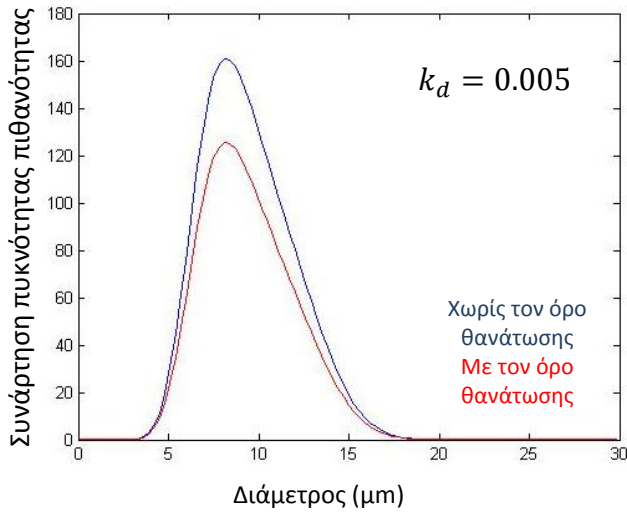
Έτσι, η εξίσωση (3.9) παίρνει τη μορφή:

$$\frac{\partial n(x,t)}{\partial t} + \frac{\partial}{\partial x} [h(x)n(x,t)] + \gamma(x)h(x)n(x,t) = 2 \int_0^\infty \gamma(x')h(x')P(x,x')n(x',t)dx - k_d n(x,t) \quad (4.3)$$

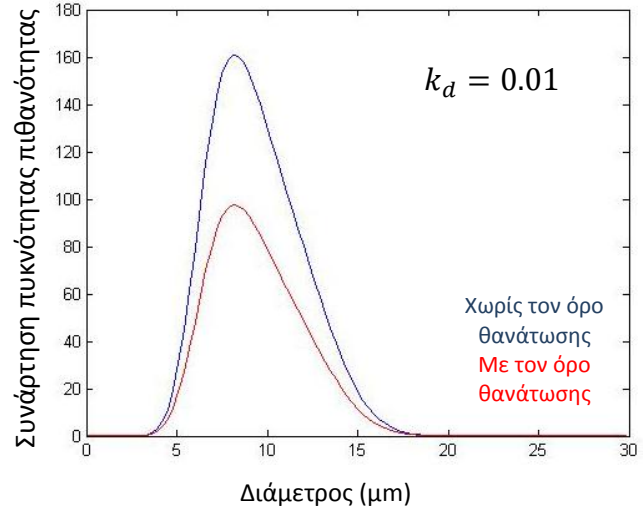
Η εκθετική μείωση μπορεί να περιγραφεί από τον χρόνο ημιζωής. Ο χρόνος ημιζωής είναι το χρονικό διάστημα κατά τη διάρκεια του οποίου η συγκέντρωση μιας ποσότητας ελαττώνεται στο 50 %. Ο χρόνος ημιζωής δίνεται από τη σχέση:

$$t_{1/2} = \frac{\ln 2}{\lambda} = \frac{0.693}{k_d} \Rightarrow k_d = \frac{0.693}{t^{1/2}} \quad (4.4)$$

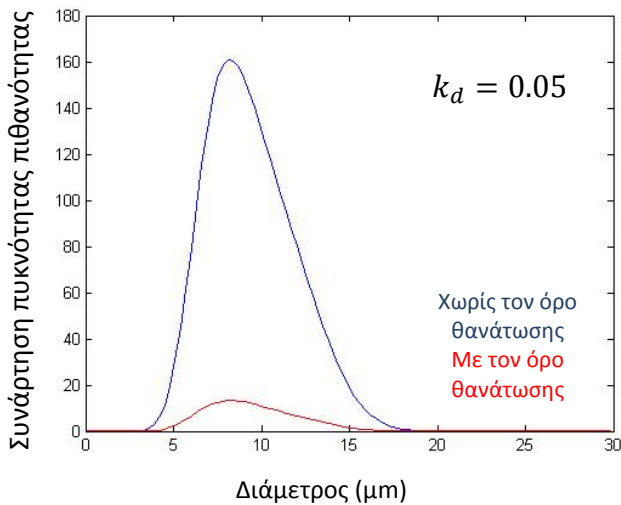
Δοκιμάστηκαν διάφορες τιμές k_d και μέσω του λογισμικού Matlab συγκρίθηκαν οι νέες αυτές κατανομές με τη κατανομή όπου δεν υπάρχει όρος θανάτωσης. Η επίλυση πραγματοποιήθηκε μέχρι χρόνο $T = 50 h$, όπου διαπιστώθηκε ότι έχει επέλθει ισορροπία του συστήματος. Παρακάτω παρουσιάζονται τα διαγράμματα των μη κανονικοποιημένων κατανομών. Με μπλε χρώμα απεικονίζεται η κατανομή χωρίς τον όρο θανάτωσης ενώ με κόκκινο η κατανομή με τον όρο θανάτωσης.



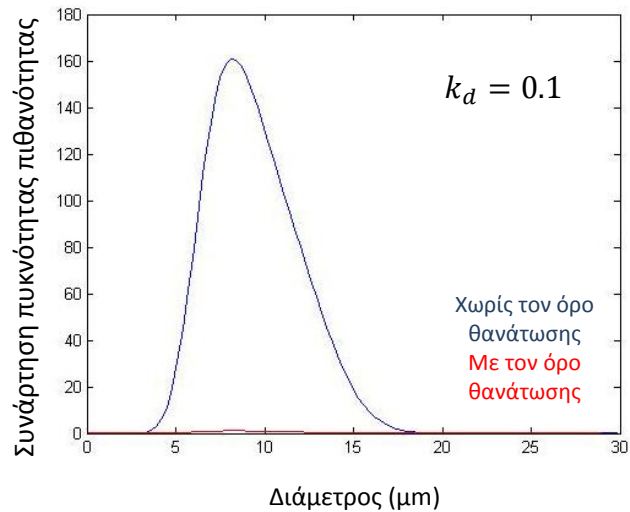
Διάγραμμα 4.6: Μεταβολή του n συναρτήσει της διαμέτρου τη χρονική στιγμή $T = 50 h$, με και χωρίς τον όρο θανάτωσης, για $k_d = 0.005$



Διάγραμμα 4.7: Μεταβολή του n συναρτήσει της διαμέτρου τη χρονική στιγμή $T = 50 h$, με και χωρίς τον όρο θανάτωσης, για $k_d = 0.01$



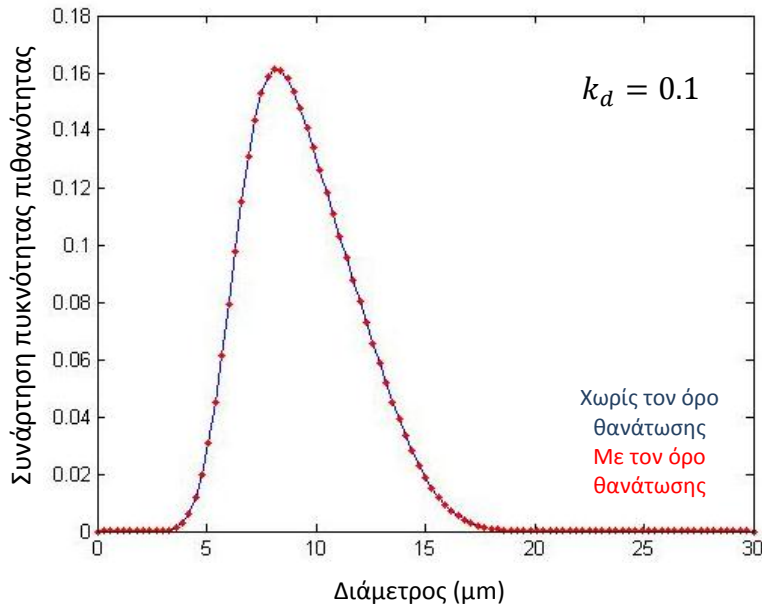
Διάγραμμα 4.8: Μεταβολή του n συναρτήσει της διαμέτρου τη χρονική στιγμή $T = 50 h$, με και χωρίς τον όρο θανάτωσης, για $k_d = 0.05$



Διάγραμμα 4.9: Μεταβολή του n συναρτήσει της διαμέτρου τη χρονική στιγμή $T = 50 h$, με και χωρίς τον όρο θανάτωσης, για $k_d = 0.1$

Παρατηρούμε ότι αυξάνοντας την τιμή του k_d η κορυφή της κατανομής ελαχιστοποιείται, καθώς περισσότερα κύτταρα πεθαίνουν, οδηγώντας στη θανάτωση όλων των κυττάρων, όπως φαίνεται στο Διάγραμμα 4.9, για τιμή $k_d = 0.1$. Ωστόσο, για να διαπιστωθεί το μέγεθος των

κυττάρων που πεθαίνουν πρέπει να συγκρίνουμε τις κανονικοποιημένες κατανομές, όπως φαίνεται στο παρακάτω διάγραμμα.



Διάγραμμα 4.10: Μεταβολή του n/n_{total} συναρτήσει της διαμέτρου τη χρονική στιγμή $T = 50 h$, με και χωρίς τον όρο θανάτωσης, για $k_d = 0.1$

Στο Διάγραμμα 4.10 παρατηρούμε ότι οι κανονικοποιημένες κατανομές με και χωρίς τον όρο θανάτωσης συμπίπτουν. Αυτό εξηγείται από το γεγονός ότι με αυτόν τον όρο θανάτωσης (Εξίσωση 4.2)), ο θάνατος των κυττάρων δεν επηρεάζεται από το μέγεθός τους. Την ίδια συμπεριφορά παρουσιάζουν και οι κανονικοποιημένες κατανομές που λαμβάνονται για διαφορετικές τιμές του k_d .

Μια άλλη μορφή που μπορεί να περιγράψει το θάνατο των κυττάρων είναι ένας όρος αντίστοιχος με τον όρο γέννησης των κυττάρων:

$$\frac{\partial n(x,t)}{\partial t} = -k_d \frac{f_d(x)}{1 - \int_0^x f_d(x') dx'} \quad (4.5)$$

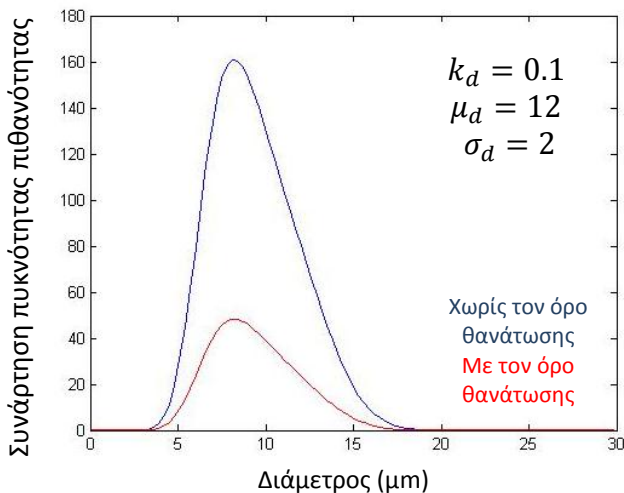
όπου $f_d(x) = \frac{1}{\sigma_d} \frac{1}{\sqrt{2\pi}} \exp\left(-\frac{1}{2} \left(\frac{x-\mu_d}{\sigma_d}\right)^2\right)$

Ο όρος αυτός, σε αντίθεση με τον προηγούμενο όρο, προβλέπει ότι ο ρυθμός θανάτωσης των μεγαλύτερων κυττάρων είναι αυξημένος, όπως διαπιστώθηκε και στα πειραματικά αποτελέσματα του μικροσκοπίου.

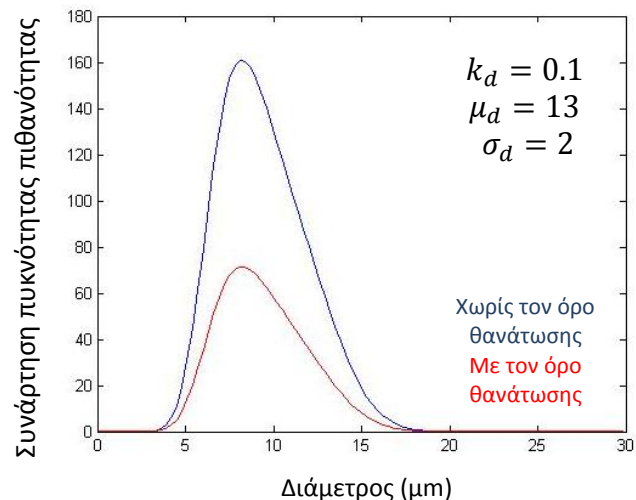
Έτσι, η εξίσωση (3.9) παίρνει τη μορφή:

$$\frac{\partial n(x,t)}{\partial t} + \frac{\partial}{\partial x} [h(x)n(x,t)] + \gamma(x)h(x)n(x,t) = 2 \int_0^\infty \gamma(x')h(x')P(x,x')n(x',t)dx - k_d \frac{f_d(x)}{1 - \int_0^x f_d(x')dx'} \quad (4.6)$$

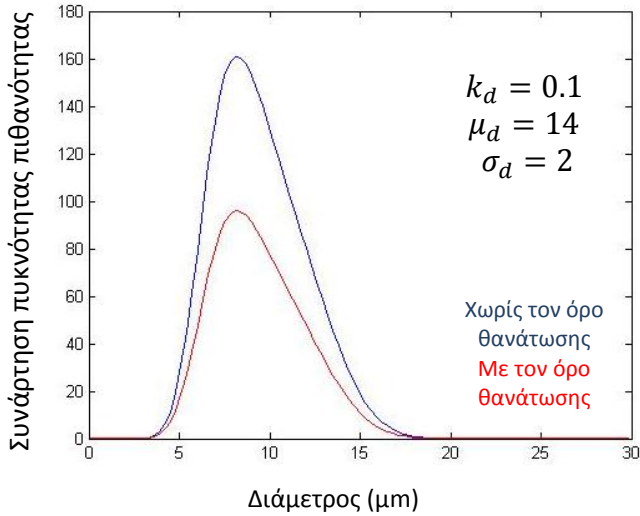
Στην περίπτωση αυτή έχουμε τρεις παραμέτρους που επηρεάζουν τον όρο θανάτωσης των κυττάρων, τις k_d, m_d και σ_d . Δοκιμάσαμε διάφορες τιμές k_d, μ_d και σ_d και μέσω του λογισμικού Matlab συγκρίναμε τις νέες αυτές κατανομές με τη κατανομή του Διαγράμματος 4.4, όπου δεν υπάρχει όρος θανάτωσης. Η επίλυση πραγματοποιήθηκε μέχρι χρόνο $T = 50 h$, όπου διαπιστώθηκε ότι έχει επέλθει ισορροπία του συστήματος. Παρακάτω παρουσιάζονται τα διαγράμματα των μη κανονικοποιημένων κατανομών. Με μπλε χρώμα είναι η κατανομή χωρίς τον όρο θανάτωσης ενώ με κόκκινο η κατανομή με τον νέο όρο θανάτωσης.



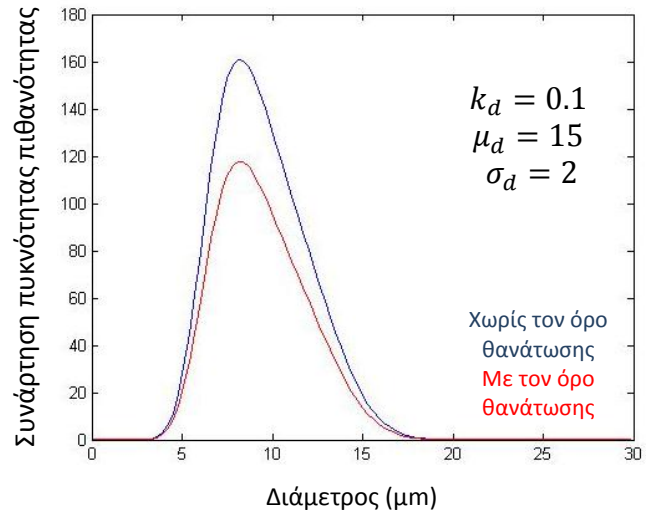
Διάγραμμα 4.11: Μεταβολή του n συναρτήσει της διαμέτρου τη χρονική στιγμή $T = 50 h$, με και χωρίς τον όρο θανάτωσης, για $k_d = 0.1, \mu_d = 12, \sigma_d = 2$



Διάγραμμα 4.12: Μεταβολή του n συναρτήσει της διαμέτρου τη χρονική στιγμή $T = 50 h$, με και χωρίς τον όρο θανάτωσης, για $k_d = 0.1, \mu_d = 13, \sigma_d = 2$



Διάγραμμα 4.13: Μεταβολή του n συναρτήσει της διαμέτρου τη χρονική στιγμή $T = 50 h$, με και χωρίς τον όρο θανάτωσης, για $k_d = 0.1, \mu_d = 14, \sigma_d = 2$



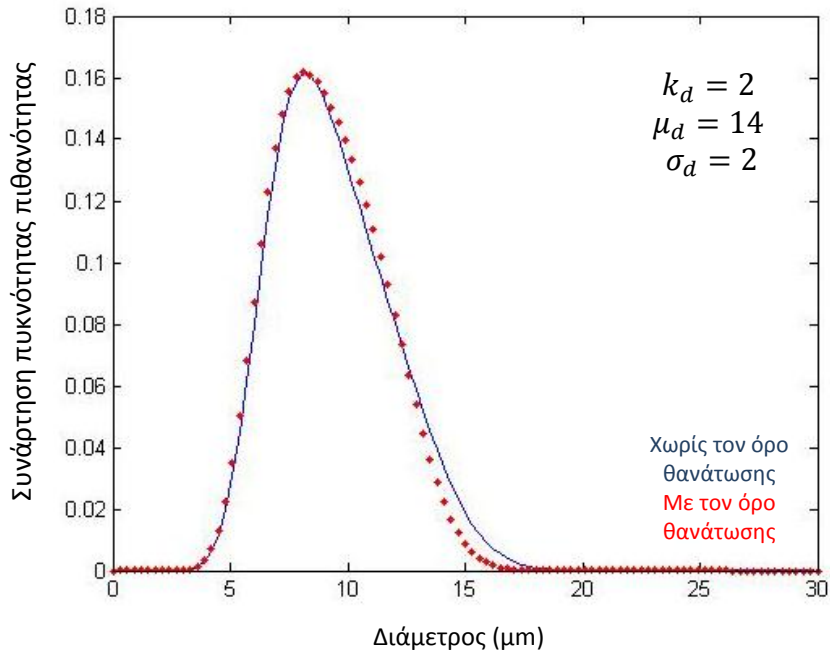
Διάγραμμα 4.14: Μεταβολή του n συναρτήσει της διαμέτρου τη χρονική στιγμή $T = 50 h$, με και χωρίς τον όρο θανάτωσης, για $k_d = 0.1, \mu_d = 15, \sigma_d = 2$

Στον όρο διαίρεσης, καθώς αυξάνεται η μέση τιμή της κατανομής, μ_f , η κορυφή αντιστοιχεί σε μικρότερο αριθμό κυττάρων και η κατανομή μετακινείται προς μεγαλύτερες διαμέτρους κυττάρων. Αυξάνοντας το μ_f , τα κύτταρα διαιρούνται πιο αργά, άρα έχουμε περισσότερα μεγάλα και λιγότερα μικρά και για αυτό η κατανομή μετακινείται προς τα δεξιά.

Κατά την επίλυση της εξίσωσης με τον όρο θανάτωσης, όταν $\mu_d < \mu_f$, όπως συμβαίνει στα Διαγράμματα 4.11 και 4.12, όπου $\mu_d = 12$ και 13 αντίστοιχα ενώ $\mu_f = 14$, τα περισσότερα κύτταρα δεν προλαβαίνουν να διαιρεθούν και πεθαίνουν. Έτσι, η κατανομή μετακινείται προς τα αριστερά και η κορυφή κατεβαίνει, αφού έχουμε μικρότερο πληθυσμό.

Αντιθέτως, όταν $\mu_d > \mu_f$, όπως συμβαίνει στο Διάγραμμα 4.14, τα περισσότερα κύτταρα προλαβαίνουν να διαιρεθούν και πεθαίνουν λιγότερα κύτταρα. Έτσι, η κορυφή της κατανομής βρίσκεται πιο ψηλά σε σχέση με την κορυφή στα Διαγράμματα 4.11 και 4.12.

Στο παρακάτω διάγραμμα συγκρίνουμε τις κανονικοποιημένες κατανομές, για $k_d = 2, \mu_d = 14$ και $\sigma_d = 2$.

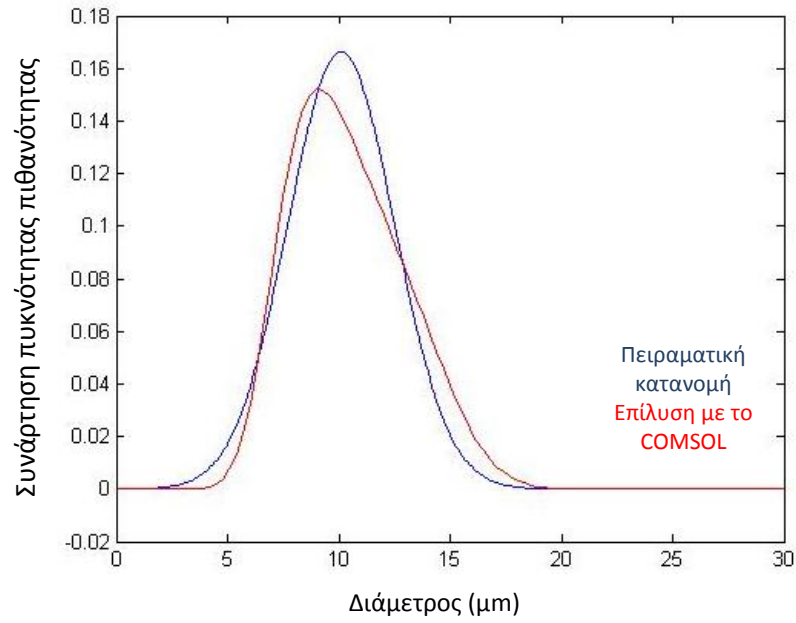


Διάγραμμα 4.15: Μεταβολή του n συναρτήσει της διαμέτρου τη χρονική στιγμή $T = 50 h$, με και χωρίς τον όρο θανάτωσης, για $k_d = 2$, $\mu_d = 15$, $\sigma_d = 2$

Στο Διάγραμμα 4.15 παρατηρούμε ότι στην κανονικοποιημένη κατανομή με τον όρο θανάτωσης τα κύτταρα μεγαλύτερου μεγέθους πεθαίνουν, όπως αναμέναμε με τη χρήση αυτού του όρου.

Στο παρακάτω διάγραμμα δίνεται η κανονικοποιημένη κατανομή με αυτόν τον όρο θανάτωσης με κόκκινο χρώμα, ενώ με μπλε χρώμα είναι η κανονικοποιημένη κατανομή της 4^{ης} ημέρας του 3^{ου} πειράματος των 500 rpm, όπου συμπεράναμε ότι επέρχεται θάνατος των κυττάρων. Για να έρθουν πιο κοντά οι κατανομές δοκιμάστηκαν διάφορες τιμές για τη μέση τιμή, μ_f , και για την τυπική απόκλιση, σ_f , της συνάρτησης πυκνότητας πιθανότητας διαίρεσης ενός κυττάρου, $f(x)$, και τελικά επιλέχτηκαν $\mu_f = 15$ και $\sigma_f = 2$.

Παρατηρούμε ότι η κατανομή που προκύπτει από την επίλυση του Ισοζυγίου Κυτταρικού Πληθυσμού μέσω του COMSOL προσεγγίζει σε μεγάλο βαθμό την κατανομή που προκύπτει από τα πειραματικά αποτελέσματα.



Διάγραμμα 4.16: Μεταβολή της συνάρτησης πυκνότητας πιθανότητας των πειραματικών αποτελεσμάτων του reactor για την 4^η ημέρα του 3^{ου} πειράματος των 500 rpm και για το COMSOL για $\mu_f = 15$ και $\sigma_f = 2$ της συνάρτησης πυκνότητας πιθανότητας διαίρεσης ενός κυττάρου, $f(x)$

Κεφάλαιο 5: Συμπεράσματα – Προτάσεις για μελλοντική έρευνα

Ο βασικός σκοπός της παρούσας εργασίας ήταν η μελέτη της επίδρασης σταθερής διατμητικής τάσης στα μικροφύκη του γένους *Dunaliella salina*, τα οποία χρησιμοποιούνται για την παραγωγή ουσιών υψηλής εμπορικής αξίας, όπως χρωστικές ουσίες και πολυακόρεστα λιπαρά οξέα, καθώς και στα καλλυντικά, στην ανθρώπινη διατροφή και ως πρόσθετα σε ζωοτροφές. Η μελέτη αυτή πραγματοποιήθηκε τόσο πειραματικά, αλλά και υπολογιστικά.

Μέσω των πειραμάτων του φασματοφωτομέτρου, συμπεράναμε σε υψηλές τιμές διατμητικής τάσης (500 rpm) παρατηρείται λύση των κυττάρων. Η αύξηση του ρυθμού θανάτωσης μετράται από την αυξημένη χλωροφύλλη που απελευθερώνεται στο διάλυμα. Ωστόσο, στο πείραμα των 400 rpm, η μετρούμενη χλωροφύλλη βρίσκεται σε χαμηλότερα επίπεδα, συνεπώς η ταχύτητα ανάδευσης δεν είναι επαρκής για να προκαλέσει λύση των κυττάρων.

Επιπλέον, διαπιστώθηκε ότι καθ' όλη τη διάρκεια των πειραμάτων, τα κύτταρα βρίσκονταν στην εκθετική φάση ανάπτυξης, κάτι που είναι επιθυμητό καθώς στη φάση αυτή η θρεπτική αξία και η ανθεκτικότητα των παραγομένων μικροφυκών είναι αυξημένη. Ωστόσο, κατά τη διάρκεια της νύχτας η ανάπτυξη των κυττάρων αναστέλλεται, λόγω έλλειψης φωτός.

Οι κατανομές των κυττάρων ως προς τη διάμετρό τους τόσο για τα δείγματα ελέγχου (control), όσο και για τα δείγματα του βιοαντιδραστήρα (reactor), παράχθηκαν από την επεξεργασία των εικόνων του μικροσκοπίου.

Για δείγματα του control οι μεταβολές των κατανομών είναι αμελητέες, καθώς η ανάπτυξη των κυττάρων φτάνει σε μια κατάσταση ισορροπίας, όπου τα κύτταρα αναπτύσσονται με σταθερό ρυθμό.

Για το reactor, και στα δύο πειράματα, παρατηρήθηκε ότι τη 3^η ημέρα των πειραμάτων ευνοείται η ανάπτυξη των κυττάρων λόγω της ανάδευσης, η οποία συμβάλλει στην καλύτερη μεταφορά των θρεπτικών συστατικών και στην επαρκή κατανομή φωτός για την ανάπτυξη των κυττάρων. Στη συνέχεια, την 4^η ημέρα των πειραμάτων, υπάρχουν λιγότερα κύτταρα, καθώς πεθαίνουν λόγω της διατμητικής τάσης που τους ασκείται. Επιπλέον, από την 3^η στην 4^η ημέρα

φαίνεται ότι έχουμε λιγότερα κύτταρα μεγάλου μεγέθους και περισσότερα μικρού μεγέθους, καθώς τα κύτταρα μεγαλύτερου μεγέθους είναι πιο ευαίσθητα στις διατμητικές τάσεις, αφού οι δυνάμεις που τους ασκούνται συσσωρεύονται και τελικά προκαλούν το θάνατό τους.

Επιπροσθέτως, από τα ιστογράμματα φαίνεται ότι η ανάπτυξη των κυττάρων ευνοείται περισσότερο στα 400 *rpm* από ότι στα 500 *rpm*, όπου πραγματοποιείται λύση κάποιων κυττάρων, ήδη από την 3^η ημέρα των πειραμάτων.

Στο υπολογιστικό κομμάτι αυτής της εργασίας, εξετάστηκε η δυναμική συμπεριφορά των κυτταρικών πληθυσμών μέσω μαθηματικών μοντέλων, που είναι γνωστά ως Ισοζύγια Κυτταρικών Πληθυσμών (Cell Population Balance Models). Αποδείχθηκε ότι τα μοντέλα αυτά προσεγγίζουν ικανοποιητικά τα πειραματικά αποτελέσματα. Στην εργασία αυτή, μελετήθηκαν δύο διαφορετικές εκφράσεις για το ρυθμό θανάτωσης των κυττάρων.

Η πρώτη έκφραση που δοκιμάστηκε εκφράζει την εκθετική μείωση των κυττάρων και δεν λαμβάνει υπόψη το μέγεθος των κυττάρων. Η δεύτερη έκφραση που δοκιμάστηκε συσχετίζει το ρυθμό θανάτωσης των κυττάρων με το μέγεθός τους. Συγκεκριμένα, τα κύτταρα μεγαλύτερου μεγέθους πεθαίνουν πιο εύκολα από τα κύτταρα μικρότερου μεγέθους, όπως υποθέσαμε παραπάνω, λόγω συσσώρευσης των δυνάμεων που τους ασκούνται. Η εφαρμογή της έκφρασης αυτής παράγει αποτελέσματα αυξημένης ακρίβειας.

Ένα βασικό ερώτημα που προέκυψε κατά τη διάρκεια της διπλωματικής εργασίας ήταν ο προσδιορισμός των διατμητικών τάσεων που ασκούνται στα κύτταρα λόγω της ανάδευσης που υπάρχει στο βιοαντιδραστήρα και ο ορισμός της μέγιστης διατμητικής τάσης που μπορούν να αντέξουν. Ωστόσο, ο υπολογισμός των τάσεων αυτών αποτελεί ένα περίπλοκο πρόβλημα ρευστομηχανικής. Ο προσδιορισμός του ορίου διατμητικής τάσης ίσως είναι δυνατός με τη χρήση άλλων συσκευών παραγωγής διατμητικών τάσεων, όπου είναι ικανή η μέτρηση της έντασης των τάσεων, όπως ρεόμετρα.

Επιπροσθέτως, το συμπέρασμα ότι κύτταρα μεγαλύτερου μεγέθους είναι πιο επιρρεπή στις διατμητικές τάσεις είναι απαραίτητο να εξακριβωθεί, καθώς και να επιλεγθεί ο κατάλληλος όρος που θα περιγράφει το θάνατο των κυττάρων. Για να επιτευχθεί αυτό είναι αναγκαίο να

πραγματοποιηθούν κι άλλες σειρές πειραμάτων σε συνδυασμό με υπολογιστικές προσομοιώσεις.

Βιβλιογραφία

Δημοσιεύσεις σε διεθνή επιστημονικά περιοδικά

- Altman, S. A., L. Randers, and G. Rao. "Comparison of Trypan Blue Dye Exclusion and Fluorometric Assays for Mammalian Cell Viability Determinations." *Biotechnology Progress* 9.6 (1993): 671-74.
- Arnon, D. I. "Coppen Enzymes in Isolated Chloroplasts. Polyphenoloxidase in Beta Vulgaris." *Plant Physiology* 24.1 (1949): 1-15.
- Barthes-Biesel, D. "Mechanics of Encapsulated Droplets - Springer." *Progressive Colloid Polymer Science* 111 (1988): 58-64.
- Born, C., Z. Zhang, M. Al-Rubeai, and C.R. Thomas. "Estimation of Disruption of Animal Cells by Laminar Shear Stress." *Biotechnology and Bioengineering* 40.9 (1992): 1004-010.
- Borowitzka, M. A. "The Mass Culture of Dunaliella Salina." *Technical Resource Papers* (1990): 63-88.
- Briesen, H. "Simulation of Size and Shape by Means of a Reduced Two-Dimensional Population Balance Model." *Chemical Engineering Science* 61.1 (2006): 104-12
- Cherry, R. S. "Animal Cells in Turbulent Fluids: Details of the Physical Stimulus and the Biological Response." *Biotechnology Advances* 11.2 (1993): 279-99.
- Clausen, J. R., and C. K. Aidun. "Capsule Dynamics and Rheology in Shear Flow: Particle Pressure and Normal Stress." *Physics of Fluids* 22.12 (2010): 123302.
- Collins, J. F., and M. H. Richmond. "Rate of Growth of Bacillus Cereus Between Divisions." *Microbiology* 28.1 (1962): 15-33.
- Elowitz, M. B. "Stochastic Gene Expression in a Single Cell." *Science* 297.5584 (2002): 1183-186.
- Fredrickson, A. G., Ramkrishna, D., Tsuchiya, H.M. "Statistics and dynamics of prokaryotic cell populations." *Math. Biosci* (1967): 1, 327–374.
- Joshi, J.b., C.b. Elias, and M.s. Patole. "Role of Hydrodynamic Shear in the Cultivation of Animal, Plant and Microbial Cells." *The Chemical Engineering Journal and the Biochemical Engineering Journal* 62.2 (1996): 121-41.

- Lange, H., P. Taillandier, and J. P. Riba. "Effect of High Shear Stress on Microbial Viability." *Journal of Chemical Technology and Biotechnology* 76 (2001): 501-05.
- Lavens, P., and P. Sorgeloos. "Manual on the Production and Use of Live Food for Aquaculture." *FAO Fisheries Technical Paper* 361 (1996): 10-30.
- Liou, J., F. Sreenc, and A.G. Fredrickson. "Solutions of Population Balance Models Based on a Successive Generations Approach." *Chemical Engineering Science* 52.9 (1997): 1529-540.
- Mantzaris, N. V., J. Liou, P. Daoutidis, and F. Sreenc. "Numerical Solution of a Mass Structured Cell Population Balance Model in an Environment of Changing Substrate Concentration." *Journal of Biotechnology* 71.1-3 (1999): 157-74.
- Mantzaris, N. V. "Stochastic and Simulations of Heterogeneous Cell Population Dynamics." *Journal of Theoretical Biology* 241 (2006): 690-706.
- Michels, M. H. A., Atze J. Goot, N. H. Norsker, and R. H. Wijffels. "Effects of Shear Stress on the Microalgae *Chaetoceros Muelleri*." *Bioprocess and Biosystems Engineering* 33.8 (2010): 921-27.
- Oren, A. "A Hundred Years of *Dunaliella* Research: 1905–2005." *Saline Systems* 1.2 (2005)
- Radotic, K., C. Roduit, J. Simonovic, P. Hornitschek, C. Fankhauser, D. Mutavdzic, G. Steinbach, G. Dietler, and S. Kasas. "Atomic Force Microscopy Stiffness Tomography on Living *Arabidopsis Thaliana* Cells Reveals the Mechanical Properties of Surface and Deep Cell-Wall Layers during Growth." *Biophysical Journal* 103 (2002): 386-94.
- Spetsieris, K., and K. Zygorakis. "Single-cell Behavior and Population Heterogeneity: Solving an Inverse Problem to Compute the Intrinsic Physiological State Functions." *Journal of Biotechnology* 158.3 (2012): 80-90.
- Tanzeglock, T., M. Soos, G. Stephanopoulos, and M. Morbidelli. "Induction of Mammalian Cell Death by Simple Shear and Extensional Flows." *Biotechnology and Bioengineering* 104.2 (2009): 360-70.

- Καβουσανάκης, Μ.Ε., "Αδρομερής Προσομοίωση Περίπλοκων Φυσικοχημικών και Βιολογικών Συστημάτων με Μεθόδους Ανάλυσης Πολλαπλών Κλιμάκων, Διακλάδωσης και Ομοιοτυπίας." Διδακτορική Διατριβή, ΕΜΠ, Αθήνα 2007
- Πετρή, Α. Γ., "Διερεύνηση Μηχανισμών Συνδυαστικής Δράσης Φωτός, Φωτοευαίσθητων Ουσιών & Φυσικών Αντιοξειδωτικών σε Μοντέλα Νεοπλασιών με Ανάπτυξη Οπτικών Μεθόδων." Διδακτορική Διατριβή, ΕΜΠ, Αθήνα 2013

Online βιβλιογραφία

- "Introduction to Fluorescence Microscopy." *Olympus Microscopy Resource Center*. <<http://www.olympusmicro.com/primer/techniques/fluorescence/fluorointrohome.html>>.
- "Thoma Cell Counting Chamber." *Thoma Cell Counting Chamber*. <http://insilico.ehu.es/counting_chamber/thoma.php>.
- "Φασματοφωτομετρία UV-VIS." *Χημικό Εργαστήριο*. <<http://chimikoergastirio.blogspot.de/2008/09/uv-vis.html>>.
- "Ο Ρόλος των Χρωστικών." *ΚΠΕ Καστοριάς*. <<http://kpe-kastor.kas.sch.gr/leaf/texts/pigments.htm>>.
- "COMSOL Multiphysics®." *Multiphysics Simulation Software*. <<http://www.comsol.com/comsol-multiphysics>>.

Βιβλία

- Lewis, R.W., P. Nithiarasu, K.N. Seetharamu, "Fundamentals of the Finite Element Method for Heat and Fluid Flow", Wiley, 2004.

Παράρτημα

Επίλυση ισοζυγίου κυτταρικού πληθυσμού με το υπολογιστικό πακέτο COMSOL Multiphysics

Στο κεφάλαιο αυτό περιγράφεται η διαδικασία επίλυσης του ισοζυγίου κυτταρικού πληθυσμού, που διατυπώνεται από την εξίσωση (4.6), μέσω του υπολογιστικού πακέτου COMSOL Multiphysics. Στην εξίσωση αυτή, έχουμε θεωρήσει ότι η συγκέντρωση του υποστρώματος είναι σταθερή, ότι πραγματοποιείται άνιση κατανομή της μάζας στα θυγατρικά κύτταρα και ότι υπάρχει όρος θανάτωσης.

$$\frac{\partial n(x,t)}{\partial t} + \frac{\partial}{\partial x} [h(x)n(x,t)] + \gamma(x)h(x)n(x,t) = 2 \int_0^{\infty} \gamma(x')h(x')P(x,x')n(x',t)dx - k_d \frac{1}{1+\exp\left(\frac{x-\mu_d}{\mu_d}\right)} n \quad (4.6)$$

Για την επίλυση του προβλήματος ορίζουμε την αρχική κατανομή του πληθυσμού και τη συνάρτηση πυκνότητας πιθανότητας διαίρεσης κάθε κυττάρου με τις τιμές που παρουσιάστηκαν στο κεφάλαιο 4.3. Ακόμη, ο ρυθμός ανάπτυξης των κυττάρων είναι γραμμικός και έχει τη μορφή:

$$h(m) = k_2 \cdot m$$

όπου $k_2 = \frac{\ln 2}{T_d}$ και $T_d = 5h$.

Για τη συνάρτηση πιθανότητας ένα κύτταρο μάζας x' να γεννήσει ένα θυγατρικό κύτταρο μάζας x , $P(x, x')$, θεωρούμε $q = 30$.

Για την κατασκευή του μοντέλου, στο εισαγωγικό παράθυρο του COMSOL αρχικά καθορίζεται η διάσταση του προβλήματος ως 1D. Στη συνέχεια, καθορίζεται η μορφή της προς επίλυση εξίσωσης: **Add Physics>Mathematics>PDE Interfaces>General Form PDE(g)** και **Finish**. Η μορφή General Form χρησιμοποιείται κυρίως για μη γραμμικά μοντέλα.

Έπειτα, σχεδιάζεται το υπολογιστικό χωρίο το οποίο είναι το ευθύγραμμο τμήμα με μήκος τέτοιο ώστε να καλύπτει το εύρος τιμών της διαμέτρου των κυττάρων.

Οι παράμετροι του προβλήματος εισάγονται σε ειδικό παράθυρο που ενεργοποιείται από το μενού **Global Definitions>Parameters**, όπως φαίνεται στον παρακάτω πίνακα:

Name	Expression
k2	log(2)/5
sigma	2
mu	14
sigma0	9.15218
mu0	2.1012
Beta	5.64E-19
q	30
kd	0.1
mud	13
sigmad	2

Στη συνέχεια, εισάγονται οι μεταβλητές του προβλήματος σε ειδικό παράθυρο που ενεργοποιείται από το μενού **Global Definitions>Variables**, όπως φαίνεται στον παρακάτω πίνακα:

Name	Expression
fx	$(1/(\text{sigma}*(2*\text{pi})^{1/2}))*\exp(-((x-\text{mu})^2)/(2*\text{sigma}^2))$
h1	$k2*x$
gama	$\text{fx}/(1-\text{mod}1.u2)$
Pxipsi	$(1/\text{beta})*(1/\text{psi}2)*(\text{ksi}2/\text{psi}2)^{(q-1)}*(1-\text{ksi}2/\text{psi}2)^{(q-1)}$
utotal	$\text{mod}1.\text{intop}1(u)$
fxd	$(1/(\text{sigmad}*(2*\text{pi})^{1/2}))*\exp(-((x-\text{mud})^2)/(2*\text{sigmad}^2))$
gamad	$\text{fxd}/(1-\text{mod}1.u3)$

Οι πέντε τελευταίες μεταβλητές περιγράφονται παρακάτω.

Για τον υπολογισμό του ολοκληρώματος της σχέσης (3.3), $\Gamma(x, S) = \frac{f(x)}{1-\int_0^x f(x')dx'}$ $r(x, S) = \gamma(x)r(x, S)$, θεωρούμε την εξίσωση

$$u^2 = \int_0^x f(x) dx \Rightarrow \frac{du^2}{dx} = f(x)$$

και ορίζουμε μια νέα διαφορική εξίσωση επιλέγοντας **Model 1>Add Physics> Mathematics> PDE Interfaces>General Form PDE(g)** και **Finish**.

Για την επίλυση της εξίσωσης στο παράθυρο που ενεργοποιείται επιλέγοντας **General Form PDE(g2)>General Form PDE 1**, εισάγονται οι εκφράσεις των Γ, F, e_a, d_a :

$$\Gamma = 0$$

$$F = u^2 x - f x$$

$$d_a = 1$$

$$e_a = 0$$

Στη συνέχεια, στο παράθυρο που ενεργοποιείται από την επιλογή **General Form PDE 2 (g2)>Constraint**, εισάγεται η συνοριακή συνθήκη στο σύνορο 1, $R = -u^2$.

Αντίστοιχη διαδικασία ακολουθεί για τον υπολογισμό του ολοκληρώματος του όρου θανάτωσης, $-k_d \frac{f_a(x)}{1 - \int_0^x f_a(x') dx'}$.

Ορίζουμε μια νέα διαφορική εξίσωση επιλέγοντας **Model 1>Add Physics>Mathematics>PDE Interfaces>General Form PDE(g)** και η **μόνη διαφορά είναι ότι στο General Form PDE (g3), ορίζουμε**

$$F = u^3 x - f x d$$

Για τον υπολογισμό της πιθανότητας ένα κύτταρο μάζας x' να γεννήσει ένα θυγατρικό κύτταρο μάζας x , που δίνεται από την εξίσωση (3.5):

$$P(x, x') = \frac{1}{B(q, q)} \frac{1}{x'} \left(\frac{x}{x'}\right)^{q-1} \left(1 - \frac{x}{x'}\right)^{q-1}$$

πρέπει να οριστεί ένα νέο δισδιάστατο μοντέλο, επιλέγοντας **Root>Add Model>2D** και **Finish**.

Ως ανεξάρτητες μεταβλητές ορίζονται οι: $ksi2, psi2, z$, όπου το $ksi2$ συμβολίζει τη μεταβλητή x και το $psi2$ τη μεταβλητή x' .

Η έκφραση της συνάρτησης πυκνότητας ένα κύτταρο μάζας x' να γεννήσει ένα θυγατρικό κύτταρο μάζας x , εισάγεται στο παράθυρο που ενεργοποιείται από το μενού **Global Definitions>Variables**:

$$Pxipsi = \frac{1}{beta} \cdot \frac{1}{psi2} \left(\frac{ksi2}{psi2} \right)^{(q-1)} \left(1 - \frac{ksi2}{psi2} \right)^{(q-1)}$$

Στο χωρίο **Geometry 2**, σχεδιάζεται ένα τετράγωνο με πλευρές μήκους 30, ώστε να γίνει ο υπολογισμός του $P(m, m')$.

Στο **Model 1**, στο παράθυρο που ενεργοποιείται από την επιλογή **Definitions>Variables**, ορίζεται η μεταβλητή $Ga = gama * h1 * u$ και η μεταβλητή $prod = mod2.genproj1(prod)$.

Στη συνέχεια, στο **Model 1**, επιλέγεται **Definitions>Model Couplings>Integration** και επιλέγεται το χωρίο 1. Για τη σύζευξη του Model 1 με το Model 2, επιλέγεται **Definitions>Model Couplings>General Extrusion**. Επιλέγεται το χωρίο 1 και το πεδίο **Use source map** εισάγεται η μεταβλητή x , ενώ στο **Destination Map**, εισάγεται η μεταβλητή $psi2$. Στο **Model 2**, στο παράθυρο που ενεργοποιείται από την επιλογή **Definitions>Variables**, ορίζονται οι μεταβλητές $Ga = mod1.genext1(Ga)$ και $prod = Pxipsi * Ga * (psi2 > 0) * (psi2 > ksi2)$ και επιλέγεται **Definitions>Model Couplings>General Projection** με Source Map $x: ksi2$ και $y: psi2$ και Destination Map: x για το χωρίο 1.

Ακολουθεί η διατύπωση της εξίσωσης (4.6). Στο Model 1, στο πεδίο **General Form PDE(g)>General Form PDE 1**, εισάγονται οι εκφράσεις των Γ, F, e_a, d_a :

$$\Gamma = h1 * u$$

$$F = 2 * prod - gama * h1 * u - kd * gamad * u$$

$$d_a = 1$$

$$e_a = 0$$

Ως αρχική συνθήκη, στο πεδίο Initial Values 1, εισάγεται:

$$u = (1/(\sigma_0 * (2 * \rho)^{(1/2)})) * \exp(-((x - \mu_0)^2)/(2 * \sigma_0^2))$$

Τέλος, επιλέγονται οι συνοριακές συνθήκες, ως Constraint 1 στο σύνορο 1, με $R = u$ και ως Constraint 2 στο σύνορο 2, με $R = -u$.

Ακολουθεί ο ορισμός του πλέγματος, ως Extremely fine και στα δύο μοντέλα και η επίλυση του προβλήματος με την επιλογή Add Study. Αρχικά, πρέπει να επιλυθούν τα ολοκληρώματα g_2 και g_3 για να χρησιμοποιηθεί η λύση του στην επίλυση της g . Για να γίνει αυτό, επιλέγεται **Add Study>Stationary** με Selected Physics τη General Form PDE(g_2) και **Finish**. Έπειτα, επιλέγεται **Add Study>Time Dependent** με Selected Physics μόνο τη General Form PDE(g) και **Finish**. Επιλύεται το Study 1 με την επιλογή Compute.

Στο **Study 2>Step 1:Time Dependent**, στο πεδίο Times εισάγεται range (0,0.1,50) και επιλέγεται Compute. Για να χρησιμοποιήσει ο Solver τη λύση των g_2 και g_3 , στο παράθυρο που εμφανίζεται από την επιλογή **Study 2>Solver Configurations>Solver 2>Dependent Variables 1**, στο πεδίο General επιλέγεται Defined by study step: User defined, στο πεδίο Initial Values of Variables Solved for επιλέγεται Method: Solution και Solution: Solver 1 και στο πεδίο Values of Variables Not Solved For επιλέγεται Method: Solution και Solution: Solver 1. Ακολουθεί επίλυση των δύο μοντέλων.

Ο χρόνος επίλυσης του Study 1 (επίλυση της g_2) είναι 2 s και ο χρόνος επίλυσης του Study 2 (επίλυση της g) είναι 6 s.