



Εθνικό Μετσόβιο Πολυτεχνείο  
Σχολή Ηλεκτρολόγων Μηχανικών και Μηχανικών  
Η/Υ

**ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΕΜΒΙΟΜΗΧΑΝΙΚΗΣ ΚΑΙ ΣΥΣΤΗΜΙΚΗΣ ΒΙΟΛΟΓΙΑΣ**  
ΤΟΜΕΑΣ ΜΗΧΑΝΟΛΟΓΙΚΩΝ ΚΑΤΑΣΚΕΥΩΝ ΚΑΙ ΑΥΤΟΜΑΤΟΥ ΕΛΕΓΧΟΥ  
ΣΧΟΛΗ ΜΗΧΑΝΟΛΟΓΩΝ ΜΗΧΑΝΙΚΩΝ

## **ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ**

***ΒΕΛΤΙΣΤΟΠΟΙΗΣΗ ΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΑΣ ΙΝΟΒΛΑΣΤΩΝ  
ΣΕ ΙΚΡΙΩΜΑΤΑ ΑΠΟ ΚΟΛΛΑΓΟΝΟ ΓΙΑ  
ΠΡΩΤΕΟΜΙΚΕΣ ΜΕΛΕΤΕΣ ΣΗΜΑΤΟΔΟΤΗΣΗΣ***

**Ιωάννου Μαρίνα**

**Επιβλέπων: Επίκουρος Καθηγητής  
Λεωνίδας Αλεξόπουλος**

**Αθήνα**





Εθνικό Μετσόβιο Πολυτεχνείο  
Σχολή Ηλεκτρολόγων Μηχανικών και Μηχανικών  
Η/Υ

**ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΕΜΒΙΟΜΗΧΑΝΙΚΗΣ ΚΑΙ ΣΥΣΤΗΜΙΚΗΣ ΒΙΟΛΟΓΙΑΣ**  
ΤΟΜΕΑΣ ΜΗΧΑΝΟΛΟΓΙΚΩΝ ΚΑΤΑΣΚΕΥΩΝ ΚΑΙ ΑΥΤΟΜΑΤΟΥ ΕΛΕΓΧΟΥ  
ΣΧΟΛΗ ΜΗΧΑΝΟΛΟΓΩΝ ΜΗΧΑΝΙΚΩΝ

## **ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ**

***ΒΕΛΤΙΣΤΟΠΟΙΗΣΗ ΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΑΣ ΙΝΟΒΛΑΣΤΩΝ  
ΣΕ ΙΚΡΙΩΜΑΤΑ ΑΠΟ ΚΟΛΛΑΓΟΝΟ ΓΙΑ  
ΠΡΩΤΕΟΜΙΚΕΣ ΜΕΛΕΤΕΣ ΣΗΜΑΤΟΔΟΤΗΣΗΣ***

**Ιωάννου Μαρίνα**

**Επιβλέπων: Επίκουρος Καθηγητής  
Λεωνίδας Αλεξόπουλος**

Εγκρίθηκε την 29<sup>η</sup> Απριλίου 2015 από την τριμελή εξεταστική επιτροπή:

.....  
Αλεξόπουλος Λεωνίδας  
Επ. Καθηγητής ΕΜΠ

.....  
Νικήτα Κωνσταντίνα  
Καθηγητής ΕΜΠ

.....  
Ματσόπουλος Γιώργος  
Αν. Καθηγητής ΕΜΠ  
Αθήνα, Απρίλιος 2015

.....

Μαρίνα Ιωάννου

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

Copyright © Μαρίνα Ιωάννου, 2015

Με επιφύλαξη παντός δικαιώματος. All rights reserved.

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

## Ευχαριστίες

Η παρούσα διπλωματική εργασία εκπονήθηκε στο εργαστήριο Εμβιομηχανικής και Συστημικής Βιολογίας, στη Σχολή Μηχανολόγων Μηχανικών ΕΜΠ, υπό την επίβλεψη του επίκουρου καθηγητή Κ. Αλεξόπουλου.

Η ευκαιρία που μου δόθηκε να γίνω μέλος του εργαστηρίου ήταν πολύτιμη καθώς με βοήθησε σημαντικά να προσθέσω γνώσεις και εμπειρίες στο δυναμικό μου.

Θα ήθελα να ευχαριστήσω όλα τα μέλη ξεχωριστά του εργαστηρίου για την πολύτιμη βοήθεια και υποστήριξη τους, διασφαλίζοντας ένα ιδανικό περιβάλλον συνεργασίας και ομαδικότητας. Ευχαριστώ ιδιαίτερα τον Δημήτρη Τζεράνη για την πολύ καλή συνεργασία, την πολύτιμη βοήθεια και τον άπλετο χρόνο που διέθεσε καθ' όλη τη διάρκεια των πειραμάτων καθώς και την Ιωάννα Πρέζα για την αλληλοβοήθεια, την υποστήριξη και την αμέριστη κατανόηση της.

Ευχαριστώ τους γονείς μου, την Χαρά και τον Θοδωρή για την ανεκτίμητη υποστήριξη και αγάπη τους.

Οφείλω όμως πολλά ευχαριστώ στον κ. Αλεξόπουλο που μου έδωσε την σημαντική ευκαιρία να συνεργαστώ με αυτό το εργαστήριο, να ασχοληθώ με ένα τομέα που μου καθορίζει τη μελλοντική μου πορεία, καθώς και για όλα τα μέσα που μου παρείχε για την εκπόνηση αυτής της διπλωματικής.

Ευχαριστώ και την κυρία Νικήτα και το κύριο Ματσόπουλο, που μέσα από τα μαθήματα τους στη Σχολή Ηλεκτρολόγων Μηχανικών και Μηχανικών Η/Υ μου έδωσαν εκείνα τα ερεθίσματα ώστε να ασχοληθώ με αυτό τον τομέα.



## Πίνακας περιεχομένων

Περίληψη .....	2
1.Εισαγωγή .....	2
1.1 Πορώδη ικρίωματα κολλαγόνου .....	2
1.1.1 Γενικά .....	2
1.1.2 Παρασκευή Ικριωμάτων.....	3
1.1.3 Εφαρμογές στην Αναγεννητική Ιατρική .....	4
1.1.4 Αλληλεπίδραση Κυττάρου – Εξωκυττάριας Μήτρας.....	7
1.2 Καλλιέργεια Κυττάρων σε Πορώδη Ικρίωματα Κολλαγόνου .....	9
1.2.1 Εφαρμογές ως Ανάλογο της Εξωκυττάριας Μήτρας .....	9
1.2.2 Οφέλη.....	13
1.3 Μελέτη Κυττάρων Μέσω Περιγραφής Μονοπατιών Μεταγωγής Σήματος .....	14
1.3.1 Μονοπάτια Μετάδοσης Σήματος.....	14
1.3.2 Μελέτη Μονοπατιών Μετάδοσης Σήματος σε Κύτταρα .....	16
1.3.3 Μελέτη Μονοπατιών Μετάδοσης Σήματος σε Κύτταρα Μέσα σε 3D Μήτρες.....	18
1.4 Σκοποί της Διπλωματικής.....	19
2. Πειραματικές Μέθοδοι .....	21
2.1 Μέθοδοι Συγκέντρωσης Πυκνότητας Πρωτεΐνης .....	21
2.1.1 Γενικά .....	21
2.1.2 Μέθοδος BCA για τη Μέτρηση Συγκέντρωσης Πρωτεΐνης .....	21
2.1.3 Βελτιστοποίηση του Πρωτοκόλλου της BCA Μεθόδου .....	24
2.2 Μέθοδοι Μέτρησης Κυττάρων .....	25
2.2.1 Μέτρηση Κυττάρων με Αιμοκυτταρόμετρο .....	26



2.2.2 Μέτρηση Αριθμού Κυττάρων Μέσω Μέτρησης Συγκέντρωσης Πρωτεΐνης.....	28
2.3 Καλλιέργεια Ινοβλαστών σε Πορώδη Ικρίωματα Κολλαγόνου.....	30
2.3.1 Προετοιμασία Δειγμάτων Ικρίωματος.....	30
2.3.2 Εισαγωγή Ινοβλαστών και Καλλιέργεια στο Ικρίωμα.....	31
2.3.3 Ανάκτηση Κυττάρων από το Ικρίωμα.....	32
2.3.4 Διέγερση και Λύση των Κυττάρων στο Ικρίωμα.....	33
2.4 Πρωτεομική Μελέτη της Επίδρασης του Ικρίωματος σε Ινοβλάστες.....	34
2.4.1 Φωσφοπρωτεομική Ποσοτικοποίηση Πρωτεϊνών.....	34
3. Πειραματικά Αποτελέσματα.....	36
3.1 Μέτρηση Συγκέντρωσης Πρωτεΐνης.....	36
3.1.1 Μέτρηση Συγκέντρωσης Πρωτεΐνης με τη Μέθοδο BCA.....	36
3.2 Εκτίμηση Μάζας Πρωτεΐνης ανά Κύτταρο.....	42
3.3 Μέτρηση Αριθμού Κυττάρων.....	43
3.4 Εισαγωγή Κυττάρων σε Ικρίωματα Κολλαγόνου.....	45
3.5 Αποτελέσματα Πειραμάτων Ανάπτυξης κυττάρων.....	47
4. Συζήτηση – Συμπεράσματα.....	49
4.1 Μέτρηση Κυττάρων.....	49
4.1.1 Όρια και ακρίβεια του.....	49
4.1.2 Εφαρμογές στην Πρωτεομική.....	51
4.2 Βελτιστοποίηση της εισαγωγής και καλλιέργειας κυττάρων μέσα σε ικρίωμα κολλαγόνου.....	51
5. Παράρτημα.....	55
5.1 Πρωτόκολλο BCA Μεθόδου.....	55
5.2 Πρωτόκολλο Micro BCA Μεθόδου.....	56
5.3 Μέτρηση με Αιμοκυτταρόμετρο.....	57



5.4 Διαδικασία Για Κοπή Μικρά Κυλινδρικά Ικριώματα Κολλαγόνου.....	59
5.5 Διαδικασία Για Την Εισαγωγή Κυττάρων Στα Ικριώματα .....	60
5.5.1 Διαδικασία για την αποκόλληση κυττάρων από την φλάσκα.....	60
5.5.2 Αποκόλληση κυττάρων .....	61
5.5.3 Μέτρηση Κυττάρων .....	61
5.5.4 Εισαγωγή των κυττάρων στο ικριώμα κολλαγόνου .....	62
5.6 Παρασκευή Διαλύματος Κολλαγενάσης .....	63
6. Βιβλιογραφία .....	65
6.1 Άρθρα σε Επιστημονικά Περιοδικά .....	65
6.2 Βιβλία- Παραδόσεις.....	67
6.3 Ιστότοποι.....	68

## Πίνακας Εικόνων

Εικόνα 1: Εφαρμογή του ικριώματος κολλαγόνου στην αναγέννηση δέρματος 7	
Εικόνα 2: Διαφορές στην μορφολογία ινοβλαστών σε 2D και 3D μήτρα [9].....	9
Εικόνα 3: Σύνθεση, δομή και λειτουργικός ρόλος της εξωκυττάριας μήτρας [8] .....	10
Εικόνα 4: Πορώδης δομή του ικριώματος κολλαγόνου. Το μέσο μέγεθος του πόρου είναι 100μm [10] .....	14
Εικόνα 5: Υπόδειγμα μονοπατιών μετάδοσης σήματος [32] .....	16
Εικόνα 6: Μηχανισμός μετάδοσης σήματος στο κύτταρο [24].....	18
Εικόνα 7: Βασική αντίδραση στη μέθοδο BCA .....	22
Εικόνα 8: Διαδοχικές αραιώσεις της πρότυπης συγκέντρωσης .....	23
Εικόνα 9: Πρότυπη καμπύλη για τη μέθοδο BCA [35].....	23
Εικόνα 10: Πρότυπη καμπύλη για τη μέθοδο Micro BCA [36] .....	24
Εικόνα 11: Διάταξη αιμοκυτταρόμετρου [39].....	26
Εικόνα 12: Το πλέγμα του αιμοκυτταρόμετρου [38].....	27
Εικόνα 13: Η μορφή των ινοβλαστών [34].....	31





Εικόνα 14: Εξέλιξη αποικοδόμησης ικρίωματος ..... 49

### Πίνακας Γραφημάτων

Γράφημα 1: Αποτελέσματα Καμπυλών βαθμονόμησης BCA..... 37  
Γράφημα 2: Σύγκριση Πρωτοκόλλων BCA..... 38  
Γράφημα 3: Βαθμονόμηση BCA με διαφορετική αναλογία Buffer..... 39  
Γράφημα 4: Πρωτόκολλο BCA για 2μL sample, 40μL WR..... 40  
Γράφημα 5: Καμπύλη βαθμονόμησης Micro BCA ..... 40  
Γράφημα 6: Καμπύλη βαθμονόμησης Micro BCA για χαμηλές συγκεντρώσεις ..... 41  
Γράφημα 7: Υπολογισμός μάζας πρωτεΐνης ανά κύτταρο ..... 43  
Γράφημα 8: Σύγκριση BCA και Αιμοκυτταρόμετρου για τη μέτρηση πρωτεϊνών ..... 45  
Γράφημα 9: Αποτελέσματα πειραμάτων ανάπτυξης κυττάρων ..... 48  
Γράφημα 10: Ρυθμός ανάπτυξης κυττάρων σε πλάκα καλλιέργειας ..... 48  
Γράφημα 11: Ανάκτηση κυττάρων από ικρίωμα ..... 53

### Περιεχόμενο Πινάκων

Πίνακας 1: Στατιστική Ανάλυση Πρωτοκόλλων BCA ..... 37  
Πίνακας 2: Στατιστική ανάλυση επίδραση Buffer στο BCA..... 39  
Πίνακας 3: Στατιστική ανάλυση βαθμονόμησης Micro BCA..... 41  
Πίνακας 4: Στατιστική ανάλυση βαθμονόμησης Micro BCA για χαμηλές συγκεντρώσεις ..... 41  
Πίνακας 5: Βελτιστοποίηση πρωτοκόλλων εισαγωγής κυττάρων σε ικρίωματα 4mm..... 46  
Πίνακας 6: Βελτιστοποίηση πρωτοκόλλων εισαγωγής κυττάρων σε ικρίωματα 6mm..... 47



## Περίληψη

Στα τρισδιάστατα συστήματα καλλιέργειας κυττάρων, τα κύτταρα αναπτύσσονται και μελετούνται μέσα σε βιοϋλικά, τα οποία παρέχουν στα κύτταρα ένα περιβάλλον ανάλογο της εξωκυττάριας μήτρας. Σε σύγκριση με την καθιερωμένη δισδιάστατη κυτταρική καλλιέργεια σε πλαστικές επίπεδες επιφάνειες, η τρισδιάστατη καλλιέργεια προσφέρει την ικανότητα να μελετηθούν οι επιδράσεις περισσότερων βιοφυσικών και βιοχημικών παραγόντων με περισσότερη λεπτομέρεια. Ωστόσο, η χρήση τρισδιάστατων συστημάτων καλλιέργειας κυττάρων είναι αρκετά πιο περίπλοκη συγκριτικά με τις δισδιάστατες. Ο σκοπός της παρούσης εργασίας είναι να παρέχει τα κατάλληλα εργαλεία και πρωτόκολλα που θα προωθήσουν την βιολογική και βιοϊατρική έρευνα σε κύτταρα που καλλιεργούνται μέσα σε πορώδη ικρίωματα κολλαγόνου. Συγκεκριμένα, αναπτύσσονται και βελτιστοποιούνται πρωτόκολλα για την εισαγωγή κυττάρων σε ικρίωματα κολλαγόνου, για ανάκτηση των κυττάρων από αυτά καθώς και για την επιβολή εξωτερικών διεγέρσεων στα κύτταρα καθώς καλλιεργούνται μέσα στα ικρίωματα. Τα αποτελέσματα της εργασίας θα βελτιώσουν την ευκολία και ακρίβεια της μελέτης κυττάρων μέσα σε ικρίωματα κολλαγόνου μέσω πρωτεομικής (High Throughput Proteomics), θέτοντας τα θεμέλια για έρευνα σε διάφορα επιστημονικά πεδία (κυτταρική βιολογία, βιολογία συστημάτων, φαρμακολογία), η οποία θα παρέχει πιο ακριβή βιολογικά αποτελέσματα βασισμένη σε προηγούμενες τρισδιάστατες καλλιέργειες.

Λέξεις Κλειδιά: ικρίωματα κολλαγόνου, ινοβλάστες, πρωτόκολλα, πρωτεομική



## **Abstract**

In 3D culture systems cells are grown inside biomaterials that provide cells an analog of the extracellular matrix. Compared to established 2D cell culture in plastic dish, 3D culture offers the ability to investigate the effects of more biophysical and biochemical factors in a more realistic environment. However, working with cells inside biomaterials is more complex comparing to traditional culture. The purpose of this diploma thesis is to provide tools and protocols that promote the biological and biomedical research related to cells cultured inside porous collagen scaffolds. In particular, protocols for cell culture inside porous collagen scaffolds, cell recovery, lysis and stimulation are developed and optimized. The results derived from this thesis will improve and facilitate the study of cells inside porous collagen scaffolds through high-throughput proteomic experiments. This work will also provide the necessary protocols for any biological study (cell biology, systems biology, drug discovery) related to 3D environments.

**Key Words:** collagen scaffolds, fibroblast, protocols, proteomic

# 1.Εισαγωγή

## 1.1 Πορώδη ικρίωματα κολλαγόνου

### 1.1.1 Γενικά

Η παρούσα διπλωματική εργασία αφορά την ανάπτυξη και την βελτιστοποίηση βιολογικών πρωτοκόλλων για καλλιέργεια κυττάρων μέσα σε ικρίωματα κολλαγόνου με στόχο την υλοποίηση σύνθετης πρωτεομικής ανάλυσης. Τα πειράματα πρωτεομικής (High Throughput Proteomics) σε ικρίωματα κολλαγόνου απαιτούν πολλά βήματα που χρήζουν ιδιαίτερη προσοχή και βελτιστοποίηση. Για αυτό το λόγο, η εργασία επικεντρώνεται στην διαδικασία που επιτελείται κατά την εισαγωγή και καλλιέργεια των κυττάρων μέσα στα ικρίωματα κολλαγόνου καθώς και στην ανάκτηση των κυττάρων από το ικρίωμα, τη λύση και την επιβολή ερεθίσματος σε αυτά.

Το ικρίωμα κολλαγόνου που χρησιμοποιείται βασίζεται στη διαδικασία κατασκευής που έχει αναπτυχθεί στο εργαστήριο του Prof. I. V. Yannas, καθηγητή του Massachusetts Institute of Technology (MIT). Η κατασκευή αυτή στηρίζεται στην διαδικασία της λυοφιλοποίησης (freeze-drying). Το αποτέλεσμα αυτής της διαδικασίας είναι ένα άνυδρο φύλλο ικρίωματος, το οποίο χρησιμοποιείται αφενός σε πειράματα *in vivo* για αναγέννηση του δέρματος, όπου το ικρίωμα λειτουργεί σαν μόσχευμα για σοβαρούς δερματικούς τραυματισμούς και αφετέρου σε πειράματα *in vitro* για τη μελέτη των αλληλεπιδράσεων της μήτρας με τα κύτταρα, όπου το ικρίωμα λειτουργεί σαν ανάλογο της εξωκυττάριας μήτρας.

Το άνυδρο φύλλο ικρίωματος που δημιουργείται έχει σπογγώδη μορφή και λευκό χρώμα. Ανάμεσα στις ιδιότητες του είναι η διαπερατότητα και η πορώδης δομή, με τη μέση διάμετρο των πόρων να είναι 90μm. Αυτά τα χαρακτηριστικά διαδραματίζουν σημαντικό ρόλο στην ερευνητική μελέτη αυτής της εργασίας αφού χρησιμοποιήθηκαν αφενός για τον καθορισμό του βέλτιστου τρόπου εισαγωγής των κυττάρων, δοκιμάζοντας διαφορετικά

πρωτόκολλα με διαφορετικό αριθμό κυττάρων και διαφορετική κυτταρική πυκνότητα και αφετέρου για τη μελέτη της επιβολής ερεθισμάτων στα κύτταρα που καλλιεργούνται μέσα σε αυτά τα ικρίωματα.

### 1.1.2 Παρασκευή Ικριωμάτων

Τα στάδια της κατασκευής του ικριώματος είναι:

- **Παρασκευή του εναιωρήματος (suspension) κολλαγόνου:** Σε αυτό το στάδιο ίνες μικροϊνώδους κολλαγόνου Τύπου I μαζί με άλλα συστατικά διαλύονται σε 0,05M οξικού οξέος, δημιουργώντας ένα εναιώρημα. Υπάρχουν διαφορετικά είδη εναιωρημάτων ανάλογα με την παρουσία γλυκοζαμινογλυκάνων (GAG) στο διάλυμα του κολλαγόνου τύπου I. Το ποσοστό της μάζας του κολλαγόνου σε όλα τα είδη εναιωρημάτων είναι 0,5%. Το βασικό εναιώρημα που αποτελείται μόνο από σωματίδια μικροϊνιδικού κολλαγόνου συμβολίζεται ως "0.5C100". Το εναιώρημα κολλαγόνου-γλυκοζαμινογλυκάνων (GAG) συμβολίζεται ως "0.5CG100" και είναι αυτό που χρησιμοποιείται για την αναγέννηση του δέρματος. Ύστερα από την ομογενοποίηση τα εναιωρήματα περιέχουν φυσαλίδες αέρα που απομακρύνονται με επιβολή κενού ώστε να αποφευχθεί η ανομοιογένεια στα εναιωρήματα.[25]
- **Λυοφιλοποίηση (Freeze-Drying):** Η λυοφιλοποίηση αποτελείται από δύο στάδια. Στο πρώτο γίνεται η ψύξη του εναιωρήματος κολλαγόνου, με αποτέλεσμα το μεγαλύτερο μέρος του νερού να σχηματίζει κρυστάλλους πάγου, ενώ τα σωματίδια κολλαγόνου παγιδεύονται στα όρια των κόκκων του πάγου. Στο δεύτερο στάδιο, το νερό απομακρύνεται μέσω εξάχνωσης με εφαρμογή υψηλού κενού. Το υλικό που προκύπτει είναι πορώδες και σπογγώδες και αποτελείται από αντηρίδες (αντιστοιχούν στη φάση ανάμεσα στους κρυστάλλους πάγου μετά την ψύξη όπου παγιδεύτηκε το κολλαγόνο) και πόρους (αντιστοιχούν στους κρυστάλλους πάγου που απομακρύνθηκαν κατά τη διάρκεια της εξάχνωσης). Έχει διαπιστωθεί ότι η μικροδομή των πόρων του ικριώματος εξαρτάται σημαντικά από τη μεταφορά θερμοκρασίας κατά τη διάρκεια της ψύξης.[25]

- **Δημιουργίας Σταυροδεσμών (Cross-linking) του ικρίωματος:** Μετά την διαδικασία της λυοφιλοποίησης, το ικρίωμα υπόκειται στην διαδικασία της δημιουργίας σταυροδεσμών (cross-linking), ώστε να αυξηθεί η αντοχή του στην αποικοδόμηση (από ένζυμα που εκκρίνονται από τα κύτταρα) και να αυξηθεί η μηχανική ακαμψία του. Η διαδικασία αυτή σχηματίζονται ομοιοπολικοί δεσμοί μεταξύ των διαφόρων μορίων του ικρίωματος. Σε αυτή την διπλωματική εργασία, η διαδικασία αυτή έχει υλοποιηθεί με την μέθοδο *Dehydro-thermal treatment (DHT)*, όπου η άσκηση υψηλής θερμοκρασίας σε χαμηλή πίεση (απουσία υγρασίας) οδηγεί σε διαμοριακές αντιδράσεις συμπύκνωσης στις αντηρίδες του ικρίωματος, έχοντας σαν αποτέλεσμα το ικρίωμα να υποστεί cross-linking. Η διαδικασία υλοποιείται με εφαρμογή κενού (50 mTorr) σε αυξημένη θερμοκρασία (105 °C έως 120 °C) για 24 και 48 ώρες. Στην μέθοδο DHT η δημιουργία σταυροδεσμών εξαρτάται από i) το χρονικό διάστημα της εφαρμογής και ii) την θερμοκρασία. [25]

### 1.1.3 Εφαρμογές στην Αναγεννητική Ιατρική

Σε πολλές κλινικές εφαρμογές έχει παρουσιαστεί η ανάγκη για ανάπτυξη και χρήση τεχνικών που να υποστηρίζουν την υποκατάσταση ή την αναγέννηση κατεστραμμένων ή αλλοιωμένων ιστών. Ο εκφυλισμός των οργάνων και των ιστών που προέρχεται είτε από τραυματισμό ή χρόνιες ασθένειες είναι σοβαρό πρόβλημα που επηρεάζει χιλιάδες ανθρώπους. Στα θηλαστικά, όπως οι άνθρωποι, ο τραυματισμός ενός οργάνου συνεπάγεται ένα σύμπλεγμα βιολογικών γεγονότων που δεν οδηγούν στην απόλυτη αποκατάσταση της αρχικής λειτουργίας και δομής του οργάνου. Αντίθετα, η επούλωση των πληγών στα ενήλικα θηλαστικά, πολλές φορές έχει σαν αποτέλεσμα ένα όργανο, του οποίου η λειτουργία και δομή θέτουν σε κίνδυνο τη ζωή του ανθρώπου ή περιορίζουν την ποιότητα της ζωής του.

Κατά τον εκφυλισμό του οργάνου ή του ιστού, το αποτέλεσμα της επούλωσης ονομάζεται 'αναγέννηση' όταν οι ιστοί που προκύπτουν ταιριάζουν με τη δομή και τη λειτουργία του αρχικού οργάνου. Αντίστοιχα, το αποτέλεσμα χαρακτηρίζεται ως 'επισκευή' όταν οι ιστοί που προκύπτουν δεν ταιριάζουν με

τη δομή του αρχικού οργάνου και συνεπώς αδυνατούν να λειτουργήσουν κανονικά.[25]

Η μηχανική των ιστών (tissue engineering) αποτελεί ένα διεπιστημονικό πεδίο που εφαρμόζει τις αρχές της μηχανικής των επιστημών της ζωής για την ανάπτυξη βιολογικών υποκατάστατων που επαναφέρουν, διατηρούν ή βελτιώνουν τη λειτουργία των ιστών ή ενός ολόκληρου οργάνου. Αντίστοιχα, η αναγεννητική ιατρική (regenerative medicine) αποτελεί κλάδο της επιστήμης που ασχολείται με την διαδικασία της αναγέννησης ανθρωπίνων κυττάρων, ιστών ή οργάνων για την αποκατάσταση της δομής και της λειτουργίας των κατεστραμμένων οργάνων ή ιστών [33]. Οι θεραπείες που σχετίζονται με αυτές τις δύο επιστήμες περιλαμβάνουν τη χρήση πορωδών βιοϋλικών από κολλαγόνου που λειτουργούν σαν μοσχεύματα για την αναγέννηση των ιστών (δέρματος, περιφερειακών νευρών). Παρά την επιτυχία αυτών των υλικών υπάρχουν και άλλες θεραπείες που περιλαμβάνουν ανάπτυξη βιομιμητικών υλικών που έχουν παρόμοια δομή και χημική σύνθεση με την εξωκυττάρια μήτρα, αποκυτταριοποίηση μοσχευμάτων, τεχνητά υλικά που οδηγούν στην ελεγχόμενη διαφοροποίηση βλαστοκυττάρων και άλλες χημικές πρακτικές. Γενικότερα, οι τεχνικές για την επούλωση των ιστών ή την βελτίωση των μηχανικών τους ιδιοτήτων περιλαμβάνουν την χρήση ικριωμάτων, αυξητικών παραγόντων, ανάπτυξη κυττάρων ή και συνδυασμό από αυτές τις μεθόδους.[27]

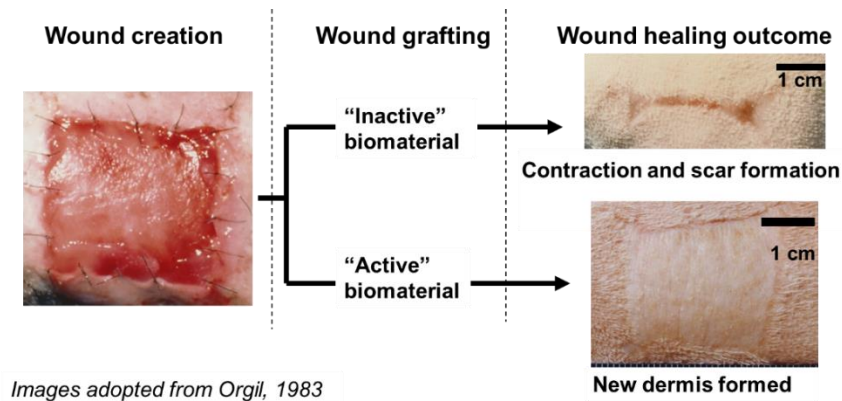
Διάφορες μέθοδοι που βασίζονται σε ικριώματα και γενικά βιοϋλικά έχουν δοκιμαστεί και δοκιμάζονται ευρέως στο πεδίο της αναγεννητικής ιατρικής και έχουν την ικανότητα να προκαλέσουν την αναγέννηση ιστών και οργάνων. Σε πολλές από τις μεθόδους το κολλαγόνο διαδραματίζει σπουδαίο ρόλο, καθώς έχουν παρατηρηθεί τα ιδιαίτερα χαρακτηριστικά που συμβάλλουν στην αναδόμηση των ιστών. Τα υποστρώματα κολλαγόνου έχουν δειχθεί ότι τροποποιούν την μορφολογία, την κυτταρική μετανάστευση, προσκόλληση, ανάπτυξη καθώς και σε μερικές περιπτώσεις την κυτταρική διαφοροποίηση. Επίσης, το κολλαγόνο θεωρείται ασθενώς νοσογόνο σε σύγκριση με τις υπόλοιπες πρωτεΐνες και όντας φυσική πρωτεΐνη είναι βιοαποικοδομήσιμη αφού καταστρέφεται μέσα στους ιστούς μέσω καταβολικών διαδικασιών.

Ανάμεσα στα είδη κολλαγόνου που υπάρχουν, το κολλαγόνο τύπου I αποτελεί το πιο ευρέως χρησιμοποιούμενο σαν βιοϋλικό και εξάγεται από το δέρμα.

Συγκεκριμένα τα τελευταία 30 χρόνια έχουν αναπτυχθεί θεραπείες, οι οποίες εφαρμόζονται και κλινικά, που προκαλούν αναγέννηση οργάνων και βασίζονται σε ικριώματα κολλαγόνου τύπου I και γλυκοζαμινογλυκάνων (GAG). Έχει διαπιστωθεί ότι η διαδικασία επούλωσης σε τραυματισμένα όργανα, στα ενήλικα θηλαστικά, μπορεί να τροποποιηθεί με τέτοιο τρόπο ώστε να αποφέρει μερική ή ολική αναγέννηση του οργάνου, χρησιμοποιώντας ικριώματα που παρουσιάζουν αναλογία με την εξωκυττάρια μήτρα. Επίσης, κάποιες φορές, σε αυτά τα ικριώματα γίνεται και ταυτόχρονη καλλιέργεια αυτόλογων κυττάρων από το όργανο που προορίζεται να αναγεννηθεί.[1]

Ένα παράδειγμα χρήσης ικριώματος στην αναγεννητική ιατρική είναι η αναγέννηση του δέρματος, η οποία αναφέρεται ως 'τεχνητό δέρμα' (artificial skin). Έχει παρατηρηθεί αναγέννηση δέρματος σε ινδικό χοιρίδιο με ένα πρότυπο ικριώμα για αναγέννηση δέρματος (Dermis Regeneration Template-DRT), που αποτελεί ένα εξαιρετικά πορώδες ανάλογο της εξωκυτταρικής μήτρας με δομή που αποικοδομείται σε ελεγχόμενο ρυθμό *in vivo*, όπου έγινε και εισαγωγή κερατινοκυττάρων (κύτταρα που βρίσκονται στην επιδερμίδα ή στο τριχοθυλάκιο και είναι υπεύθυνα για την σύνθεση της κερατίνης). Ύστερα από σύγκριση των χαρακτηριστικών του φυσιολογικού δέρματος, της ουλής και της αναγεννημένης επιδερμίδας, προκύπτει ότι η αναγεννημένη επιδερμίδα είναι μηχανικά επαρκής, πλήρως αγγειωμένη, διαθέτει τριχοειδείς θηλές και είναι ευαίσθητη στην αφή, στη ζέστη και στο κρύο. Ωστόσο το αναγεννημένο δέρμα διαφέρει από το φυσιολογικό δέρμα λόγω απουσίας κάποιων χαρακτηριστικών, όπως είναι τα θυλάκια της τρίχας και οι ιδρωτοποιοί αδένες.[1]





**Εικόνα 1: Εφαρμογή του ικριώματος κολλαγόνου στην αναγέννηση δέρματος**

Ανάλογη συμπεριφορά παρατηρείται και στα περιφερειακά νεύρα. Έχει αποδειχθεί ότι η ικανότητα του πορώδους ικριώματος να επάγει την αναγέννηση στο δέρμα και στα περιφερειακά νεύρα συσχετίζεται με τη μείωση του ρυθμού συρρίκνωσης της πληγής. Εκτός από αυτά τα δύο παραδείγματα, τα πορώδη υλικά από κολλαγόνο έχουν επάγει αναγέννηση και στον επιπεφυκότα, καθώς επίσης σε οστά, στις βαλβίδες της καρδιάς, στον αρθρικό χόνδρο, στην σπονδυλική στήλη και σε όργανα του ουροποιητικού συστήματος.[3]

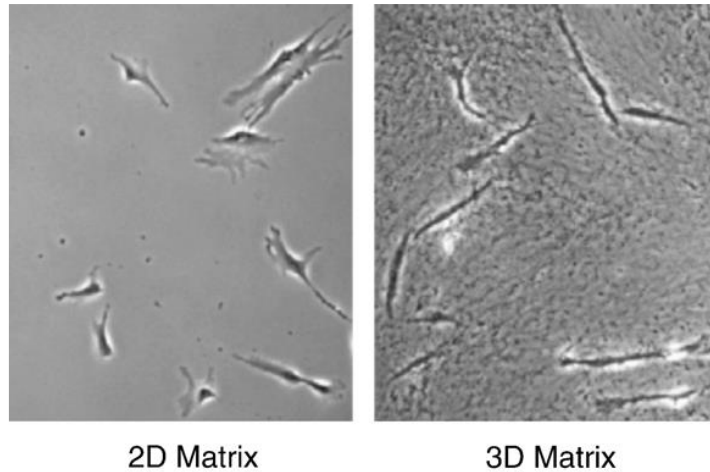
Παρά την αυξανόμενη κλινική χρήση των ικριωμάτων για την αναγέννηση συγκεκριμένων ειδών οργάνων και ιστών, υπάρχουν ακόμα πολλά ζητήματα που αφορούν την ασφάλεια, το μηχανισμό δράσης και την αποτελεσματικότητά τους, τα οποία απαιτούν περισσότερη έρευνα και αποσαφήνιση. Κάποια ενδεικτικά στοιχεία είναι ότι το αναγεννημένο δέρμα, όπως αναφέρθηκε προηγουμένως, δεν παρουσιάζει κάποια βασικά χαρακτηριστικά και επίσης καθυστερεί η αγγείωση του. Επίσης τα περιφερειακά νεύρα που αναγεννιούνται παρουσιάζουν σημαντικά μικρότερο πλάτος ηλεκτρικών παλμών σε σχέση με τα φυσιολογικά νεύρα.[1]

#### 1.1.4 Αλληλεπίδραση Κυττάρου – Εξωκυττάριας Μήτρας

Η έρευνα που αφορά τη βιολογία του κυττάρου βασίζεται συχνά σε πειραματικά δεδομένα από καλλιέργεια κυττάρων σε τεχνητά υποστρώματα όπως πλαστικό ή γυαλί. Δυστυχώς, η καλλιέργεια σε τεχνητά επίπεδες και άκαμπτες επιφάνειες είναι πιθανό να επηρεάσουν τα κύτταρα οδηγώντας σε

στρεβλά ευρήματα. Αντίθετα, το αυθεντικό υπόστρωμα για τα περισσότερα κύτταρα σε ζωντανούς οργανισμούς είναι η εξωκυττάρια μήτρα, που είναι τρισδιάστατη, σύνθετη και δυναμική στη μοριακή σύνθεσή της. Η εξωκυτταρική μήτρα ανιχνεύεται από τα κύτταρα μέσω ιντεγκρινών. Οι ιντεγκρίνες σε διάφορες δομές που σχετίζονται με τη μεμβράνη, και ονομάζονται συμφύσεις μήτρας – κυττάρων (cell – matrix adhesion), διαβιβάζουν τις πληροφορίες με αμφίδρομο τρόπο μεταξύ της εξωκυτταρικής μήτρας και του κυτταροπλάσματος. Τα cell – matrix adhesion διαμεσολαβούν στις φυσιολογικές αποκρίσεις που ρυθμίζουν την κυτταρική ανάπτυξη, τη μετανάστευση, την διαφοροποίηση, την επιβίωση και την οργάνωση του ιστού. Οι διάφοροι τύποι cell – matrix adhesion που οργανώνονται από τις ιντεγκρίνες *in vitro* και τα σήματα που μεταδίδουν επηρεάζονται έντονα από τις επίπεδες, άκαμπτες επιφάνειες των πλακών καλλιέργειας (flasks, culture dishes).[17]

Έχει παρατηρηθεί ότι οι ινοβλάστες που καλλιεργούνται σε τρισδιάστατο ικρίωμα έχουν μία επιμήκης, ατρακτοειδή μορφολογία, που είναι χαρακτηριστική των ινοβλαστών που βρίσκονται *in vivo* [9]. Ακόμη, από την ύπαρξη τρισδιάστατης μήτρας φαίνεται να επηρεάζεται η προσκόλληση των ινοβλαστών και συγκεκριμένα να ενισχύεται, ενώ αύξηση υπήρξε και στην ταχύτητα που γίνεται η κυτταρική μετανάστευση. Επίσης, έχει παρατηρηθεί ότι η φυσική κατάσταση ενός δεδομένου υποστρώματος μπορεί να επηρεάσει τη σηματοδότηση. Ο μηχανισμός αυτός μπορεί να περιλαμβάνει πολλούς παράγοντες ταυτόχρονα με την ύπαρξη των τριών διαστάσεων, όπως είναι οι διαφορετικοί τρόποι παρουσίασης των ινιδίων της εξωκυττάριας μήτρας στα κύτταρα. Ωστόσο, αυτοί οι παράγοντες που μπορούν να ρυθμίσουν τρισδιάστατη σηματοδότηση εξακολουθούν να χρειάζονται περαιτέρω πειραματική αξιολόγηση [9].



Εικόνα 2: Διαφορές στην μορφολογία ινοβλαστών σε 2D και 3D μήτρα [9]

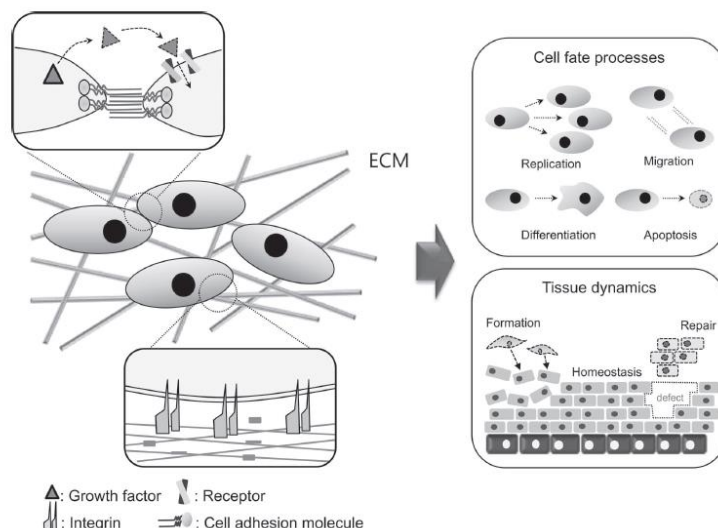
Όσον αφορά συγκεκριμένα στα ικρίωματα κολλαγόνου, πολλές μελέτες που αφορούν την συμπεριφορά των κυττάρων έχουν δείξει την επίδραση του κολλαγόνου στη μετανάστευση, την κυτταρική πρόσφυση και την κυτταρική διαφοροποίηση. Το πορώδες ικρίωμα του κολλαγόνου επιτρέπει τους ινοβλάστες που εισάγονται μέσα σε αυτό να πολλαπλασιάζονται και να μεταναστεύουν σταδιακά. Σε ικρίωμα κολλαγόνου – γλυκοζαμινογλυκάνων – χιτοζάνης καλλιεργήθηκαν ανθρώπινοι ινοβλάστες και σε διάστημα 10 ημερών καλλιέργειας, η κυτταρική ανάπτυξη διαπιστώθηκε ότι γινόταν με μικρότερο ρυθμό και για αυτό αυξήθηκε η ποσότητα σε κολλαγόνο.[14]

## 1.2 Καλλιέργεια Κυττάρων σε Πορώδη Ικρίωματα Κολλαγόνου

### 1.2.1 Εφαρμογές ως Ανάλογο της Εξωκυττάριας Μήτρας

Η εξωκυττάρια μήτρα (ECM) είναι το εξωκυτταρικό τμήμα κάθε ζωικού ιστού που προσφέρει υποστηρικτικές λειτουργίες στα κύτταρα. Είναι μια σχετικά σταθερή δομή, αποτελούμενη από ινώδεις πρωτεΐνες (κολλαγόνο, ελαστίνη, φιβρονεκτίνη) και διάφορες πολύπλοκες μεγαλομοριακές ενώσεις όπως είναι οι πρωτεογλυκάνες, οι γλυκοζαμινογλυκάνες (GAGs), οι γλυκοπρωτεΐνες (GPS), και βρίσκεται κάτω από το επιθήλιο και περιτριγυρίζει τους συνδετικούς ιστούς. Σημαντικές πρωτεΐνες στην εξωκυττάρια μήτρα είναι η ελαστίνη, το κολλαγόνο, η φιβρονεκτίνη και η λαμινίνη, των οποίων η λειτουργία και η σύνθεση διαφέρουν για κάθε τύπο ιστού. Η ελαστίνη βρίσκεται σε μεγάλες

ποσότητες στους ιστούς που απαιτούν ελαστικές ιδιότητες, όπως οι ιστοί της αρτηρίας και της ουροδόχου κύστης. Το κολλαγόνο είναι άφθονο στα οστά και στον ιστό του δέρματος, όπου συναθροίζεται σε ινώδεις δομές που μεταφέρουν αντοχή στον εφελκυσμό. Το κολλαγόνο έχει πολλές πεπτιδικές αλληλουχίες που είναι ενεργά εμπλεκόμενες στις αλληλεπιδράσεις με τους υποδοχείς της κυτταρικής μεμβράνης. Μια ακόμα σημαντική πρωτεΐνη είναι η φιμπρονεκτίνη, η οποία συμμετέχει στον πολλαπλασιασμό, στην κινητικότητα, στη διαφοροποίηση, στη μορφογένεση και στην προσκόλληση των κυττάρων. Έχει την ιδιότητα να συνδέεται με τις εξωκυττάριας, τις επιφανειακές και τις ενδοκυττάριας πρωτεΐνες, ώστε να ρυθμίζονται λειτουργίες, όπως η σύνδεση-επικοινωνία των κυττάρων, ο πολλαπλασιασμός και η μετανάστευση. Η λαμινίνη είναι σημαντικό και ενεργό συστατικό της βασικής μεμβράνης, καθώς επηρεάζει τη διαφοροποίηση των κυττάρων, τη μετανάστευσή τους, τη προσκόλλησή τους, το φαινότυπο και την επιβίωσή τους και εμφανίζεται σε ιστούς όπως ο πνεύμονας. Επίσης, οι γλυκοζαμινογλυκάνες (GAG) μπορούν να ελέγξουν την αποθήκευση και την απελευθέρωση των αυξητικών παραγόντων (growth factors), ενώ οι αλληλεπιδράσεις των γλυκοζαμινογλυκανών με τους αυξητικούς παράγοντες προστατεύουν από την πρωτεολυτική αποικοδόμηση.[16,8]



**Εικόνα 3: Σύνθεση, δομή και λειτουργικός ρόλος της εξωκυττάριας μήτρας [8]**

Η εξωκυττάρια μήτρα είναι συνεπώς εξ ορισμού από τη φύσης της ιδανικό βιολογικό ικρίωμα. Έχει σχεδιαστεί και κατασκευαστεί από τα κύτταρα του κάθε ιστού και οργάνου και είναι σε μια κατάσταση δυναμικής ισορροπίας με το γύρω μικροπεριβάλλον της. Τα δομικά και λειτουργικά μόρια της εξωκυττάριας μήτρας παρέχουν τα μέσα με τα οποία γειτονικά κύτταρα επικοινωνούν μεταξύ τους και με το εξωτερικό περιβάλλον, δηλαδή προωθεί τη σηματοδότηση και παρέχει τη διαρθρωτική στήριξη στα κυττάρων και στους ιστούς του σώματος. Αποτελεί υποστηρικτικό μέσο για τα αιμοφόρα αγγεία, τα νεύρα και τα λεμφαγγεία καθώς και για τη διάχυση των θρεπτικών ουσιών από το αίμα στα περιβάλλοντα κύτταρα. Με άλλα λόγια, η εξωκυττάρια μήτρα διαθέτει όλα τα χαρακτηριστικά για ένα ιδανικό ικρίωμα για την ιστομηχανική ή για ένα βιοϋλικό. [16]

Μεμονωμένα συστατικά της εξωκυττάριας μήτρας, όπως το κολλαγόνο, η λαμινίνη, η φιμπρονεκτίνη και το υαλουρονικό οξύ μπορούν να απομονωθούν και να χρησιμοποιηθούν τόσο *in vitro* όσο και *in vivo* για τη διευκόλυνση της κυτταρικής ανάπτυξης και διαφοροποίησης. Υπάρχει ένας αριθμός από διαθέσιμες προσεγγίσεις για τη δημιουργία τρισδιάστατων ικριωμάτων με έλεγχο των φυσικών, μηχανικών και χημικών ιδιοτήτων τους καθώς και έλεγχο της κυτταρικής πρόσφυση στα ικριώματα και της απελευθέρωση των αυξητικών παραγόντων (growth factors).[10] Τα ικριώματα που μιμούνται σημαντικά χαρακτηριστικά της αρχιτεκτονικής της εξωκυττάριας μήτρας ονομάζονται βιομιμητικά ικριώματα.

Πολλά εργαστήρια έχουν στηρίξει τις μελέτες τους για τα πορώδη ικριώματα κολλαγόνου, χρησιμοποιώντας αυτά τα ικριώματα ως ανάλογα της εξωκυττάριας μήτρας και προσπαθώντας να αλλάξουν ελεγχόμενα κάποια χαρακτηριστικά του ικριώματος. Για παράδειγμα, έχει γίνει εισαγωγή ενδοθηλιακών κυττάρων από ομφαλική φλέβα σε συγκεκριμένου μεγέθους λωρίδες ικριώματος κολλαγόνου και γλυκοζαμινογλυκάνων ώστε να αποδειχθεί ότι μέσω φωτοδιαμόρφωσης, τα ικριώματα μπορούν να ενεργοποιηθούν με αυξητικούς παράγοντες σε ένα ελεγχόμενο χώρο με ταυτόχρονη πρόκληση κυτταρικής απόκρισης [18]. Επίσης, έχουν καλλιεργηθεί μεσεγχυματικά βλαστοκύτταρα του λιπώδους ιστού σε ικριώματα

κολλαγόνου-γλυκοζαμινογλυκάνων με σκοπό τον ανεξάρτητο έλεγχο της αδρανοποίησης πολλαπλών βιομοριακών ειδών και των μηχανικών ιδιοτήτων αυτού του μοντέλου ικρίωματος με διαδοχική χρήση του crosslinking (δημιουργία σταυροδεσμών) με καρβαμίδιο (carbodiimide) [19]. Τα ίδια κύτταρα έχουν χρησιμοποιηθεί για τη μελέτη δημιουργίας ενός εκκολαπτόμενου αγγειακού δικτύου *in vitro* μέσα σε ικρίωμα κολλαγόνου-γλυκοζαμινογλυκάνων για την επιτάχυνση της αναγέννησης του ιστού [23]. Έχει γίνει ακόμη καλλιέργεια κυττάρων μυελού των οστών για να μελετηθούν απλές τροποποιήσεις στο πρότυπο ικρίωμα για τη διερεύνηση των ρόλων της δομής του ικρίωματος (γεωμετρική ανισοτροπία, περιεκτικότητα σε ανόργανα άλατα, σχετική πυκνότητα) σε συνδυασμό με την συμπλήρωση βιομορίων ώστε να επιτευχθεί η διαφοροποίηση των βλαστοκυττάρων για δημιουργίου ιστού του τένοντα, οστών και χόνδρου [21,22]. Ένα άλλο παράδειγμα, είναι η καλλιέργεια σε ίδιου είδους ικρίωμα με παραπάνω, κυττάρων από τον τένοντα αλόγου για την αξιολόγηση της μικροδομής του ικρίωματος και της μηχανικής του, για την βιωσιμότητα των κυττάρων του τένοντα και το προφίλ της γονιδιακής έκφρασης τους [22] καθώς και μελέτη της επίδρασης των γλυκοζαμινογλυκάνων στην κυτταρική δραστηριότητα. Τέλος, έχουν ακόμη καλλιεργηθεί και προ-οστεοβλάστες ώστε να συγκριθεί ο ρυθμός αποκόλλησης των κυττάρων σε δισδιάστατο και τρισδιάστατο περιβάλλον.

Σε όλες τις παραπάνω μελέτες γίνεται η θεώρηση ότι το ικρίωμα κολλαγόνου λειτουργεί σαν ανάλογο της εξωκυττάριας μήτρας, αλλά δεν υπάρχει ακριβής γνώση ως προς τη διαδικασία εισαγωγής και καλλιέργειας των κυττάρων μέσα στο ικρίωμα. Για αυτό το λόγο, σε αυτή τη διπλωματική εργασία γίνεται προσπάθεια να καθοριστούν και να βελτιστοποιηθούν τα πρωτόκολλα για την εισαγωγή των κυττάρων μέσα στο ικρίωμα, τον αριθμό των κυττάρων που εισάγονται αλλά και για την ανάκτηση των κυττάρων από το ικρίωμα ώστε να υπάρξει μια πιο ακριβής μελέτη της αλληλεπίδρασης του ικρίωματος στα κύτταρα και στον χαρακτηρισμό των βιοϋλικών.

### 1.2.2 Οφέλη

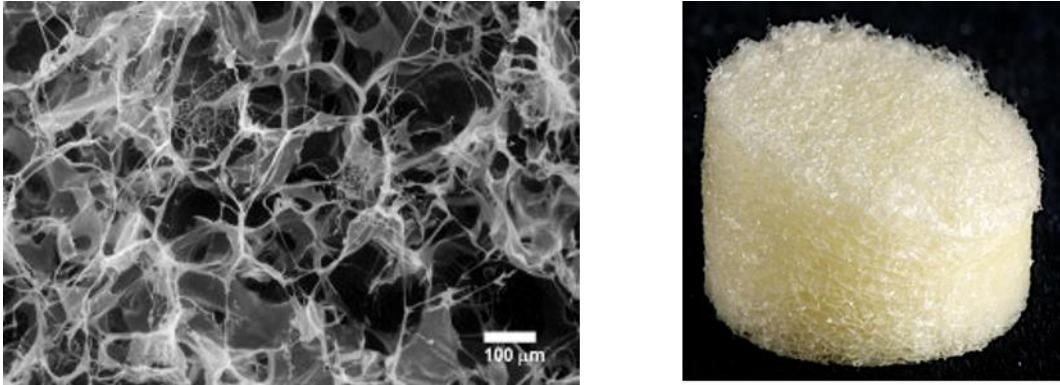
Τα τρισδιάστατα ικρίωματα έχουν αποκτήσει πλέον σπουδαίο ρόλο στην έρευνα για την ιστογένεση και στη μελέτη της επίδρασης της εξωκυττάριας μήτρας στα κύτταρα. Τα πιο γνωστά μόρια της εξωκυττάριας μήτρας του συνδετικού ιστού είναι το κολλαγόνο, το υαλουρονικό και οι γλυκοζαμινογλυκάνες. Το κολλαγόνο όμως έχει χρησιμοποιηθεί σε φυσική μορφή και ως μετουσιωμένη ζελατίνη. Λόγω της αφθονίας του στον οργανισμό και της βιοσυμβατότητάς του, το κολλαγόνο, κυρίως τύπου I, είναι το πιο συχνά χρησιμοποιούμενο σε ικρίωματα για βιολογικές μελέτες. Μπορεί να χρησιμοποιηθεί άθικτο ή μετά από πρωτεολυτική απομάκρυνση των μικρών τελοπεπτιδίων.[10]

Παρακάτω παρουσιάζονται τα οφέλη και οι περιορισμοί της χρήσης του κολλαγόνο σαν ικρίωμα

- **Οφέλη:**
  - Βιοσυμβατό
  - Οστεοσυμβατό
  - Μικρή πιθανότητα για αντιγονικότητα μετά την απομάκρυνση των τελοπεπτιδίων
  - Πορώδες (προσφέρει χώρο για το νέο ιστό)
  - Ίνες φαίνονται να ενσωματώνονται στη νέα μήτρα ιστού
  - Μπορεί να συνδυαστεί με άλλα υλικά
  - Το θρεπτικό μπορεί να διαχέεται στο εσωτερικό του
- **Περιορισμοί:**
  - Δεν έχει εγγενή ακαμψία

Με άλλα λόγια, το κολλαγόνο έχει ένα αριθμό πλεονεκτημάτων ως ικρίωμα. Οι σπόγγοι κολλαγόνο (το ικρίωμα έχει σπογγώδη μορφή) κατασκευάζονται από 0,5% κ.β. διαλύματα, υπόκεινται λυοφιλοποίηση για να διατηρήσουν την πορώδη επιφάνεια και δημιουργούν σταυροδεσμούς μέσω συγκεκριμένης διαδικασίας ώστε να έχουν διασυνδεδεμένους πόρους, κατάλληλους για κυτταρική ανάπτυξη και ιστογένεση. Είναι γενικά εξαιρετικά πορώδη (>95%) με

διαμέτρους πόρων από 120-200  $\mu\text{m}$ . Επίσης το ικρίωμα λειτουργεί προσωρινά σαν εξωκυττάρια μήτρα όπου τα κύτταρα αλληλεπιδρούν είτε για να μελετηθεί η επίδραση της μήτρας σε αυτά ή για το σχηματισμό νέου ιστού.



Εικόνα 4: Πορώδης δομή του ικρίωματος κολλαγόνου. Το μέσο μέγεθος του πόρου είναι 100 $\mu\text{m}$  [10]

## 1.3 Μελέτη Κυττάρων Μέσω Περιγραφής Μονοπατιών Μεταγωγής Σήματος

### 1.3.1 Μονοπάτια Μετάδοσης Σήματος

Τα κύτταρα βρίσκονται και συνυπάρχουν σε ένα πολύ σύνθετο βιοχημικό μικροπεριβάλλον. Ο τρόπος με τον οποίο αντιλαμβάνονται το περιβάλλον τους αποδίδεται σε εξειδικευμένα πρωτεϊνικά μόρια, στην επιφάνειά τους, που ονομάζονται υποδοχείς.[31]

Διάφορα ερεθίσματα από το περιβάλλον του κυττάρου προσκολλώνται στους υποδοχείς, οι οποίοι στην συνέχεια ενεργοποιούνται ξεκινώντας τη διαδικασία σηματοδότησης. Όταν ένας υποδοχέας ενεργοποιείται, ενεργοποιεί και τις κατάντη πρωτεΐνες, οι οποίες με τη σειρά τους ενεργοποιούν τις κατάντη πρωτεΐνες, και η διαδικασία συνεχίζεται μέχρι η πληροφορία – σήμα να φτάσει σε μία οικογένεια πρωτεϊνών, η οποία ονομάζεται παράγοντες μεταγραφής (transcription factors). [32]

Οι παράγοντες αυτοί αφού ενεργοποιηθούν μπαίνουν μέσα στον πυρήνα του κυττάρου, προσκολλώνται στις προωθημένες περιοχές του γενετικού υλικού και εκφράζουν συγκεκριμένες κωδικοποιημένες περιοχές, τα γονίδια. Τα

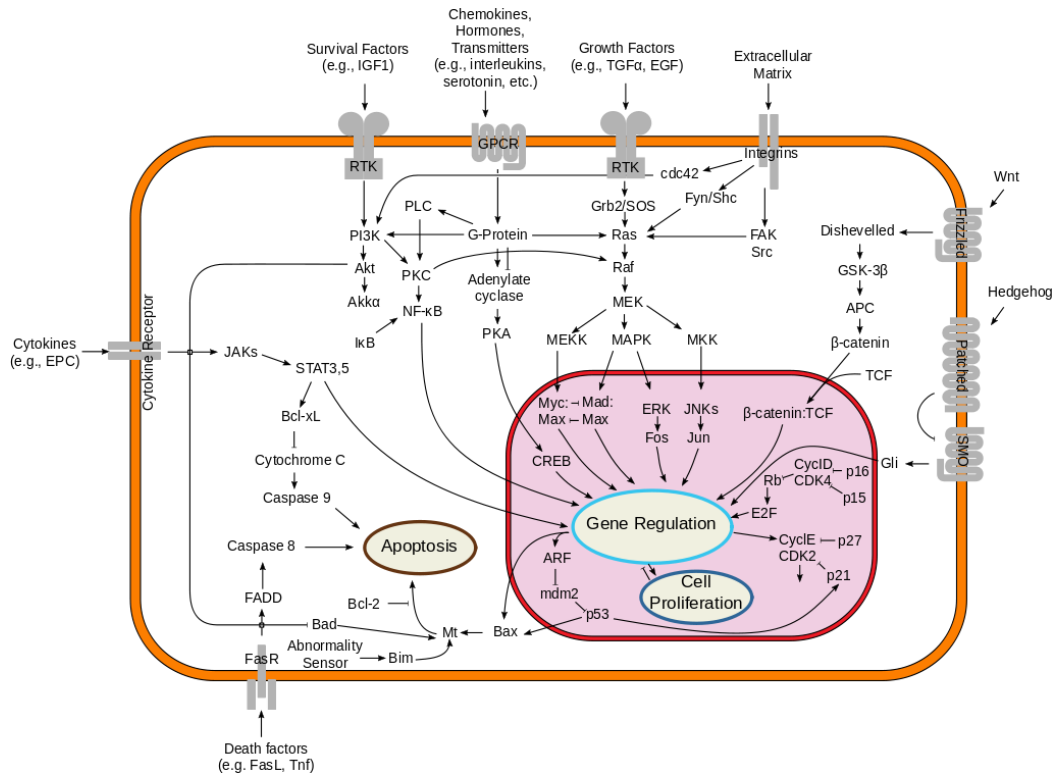


γονίδια μετά μεταφράζονται σε πρωτεΐνες και με αυτόν τον τρόπο το κύτταρο οργανώνει τη λειτουργία του και ρυθμίζονται συγκεκριμένες συμπεριφορές του, όπως ο πολλαπλασιασμός των κυττάρων, η μετανάστευση των κυττάρων και η κυτταρική απόπτωση. [32]

Η μεταγωγή του σήματος είναι η διαδικασία της διάδοσής του από τη μία πρωτεΐνη στην επόμενη, ξεκινώντας από το επίπεδο των υποδοχέων φτάνοντας μέσα στον πυρήνα. Γενικά, η μελέτη της μεταγωγής σήματος μπορεί να διαφωτίσει τον τρόπο με τον οποίο τα κύτταρα αποκρίνονται στους παράγοντες του βιοχημικού τους μικροπεριβάλλοντος.

Τα γεγονότα της σηματοδότησης των κυττάρων αναπαρίστανται τυπικά σε δίκτυα, τα οποία αποκαλούνται δίκτυα σηματοδότησης ή μονοπάτια σηματοδότησης.

Συνεπώς, μονοπάτια μετάδοσης σήματος (signaling transduction pathways) ορίζουμε μία ομάδα πρωτεϊνών, οι οποίες μεταφέρουν μεταγωγικά σήματα (μετατρέπουν σήματα από το εξωτερικό περιβάλλον του κυττάρου σε διαφορετικά σήματα στο εσωτερικό του κυττάρου). Για παράδειγμα, μία ορμόνη δεσμεύεται στον υποδοχέα της κυτταρικής μεμβράνης (έξω από το κύτταρο). Ο υποδοχέας, ο οποίος μόλις ενεργοποιηθεί μπορεί να αλληλεπιδράσει με ενδοκυτταρικές πρωτεϊνικές ουσίες, οι οποίες παράγουν νέα σήματα μέσα στο κύτταρο. [24]



Εικόνα 5: Υπόδειγμα μονοπατιών μετάδοσης σήματος [32]

### 1.3.2 Μελέτη Μονοπατιών Μετάδοσης Σήματος σε Κύτταρα

Οι κυτταρικές δραστηριότητες και οι κυτταρικές λειτουργίες καθορίζονται από ένα σύνθετο σύστημα επικοινωνίας, το οποίο αποκαλείται μετάδοση σημάτων μεταξύ κυττάρων ή Cell Signaling Transduction.[12] Η δυνατότητα των κυττάρων να αντιλαμβάνονται και να αντιδρούν με ανάλογο τρόπο κάθε φορά στο περιβάλλον τους, είναι θεμελιώδης για την ανάπτυξη, την ανάπλαση την ανοσία και την ομοιοσύσταση των ιστών. Σφάλματα που τυχαίνει να συμβούν στη διεργασία μετάδοσης των κυτταρικών πληροφοριών ευθύνονται για ασθένειες, όπως ο καρκίνος, τα αυτοάνοσα νοσήματα και η υπεργλυκαιμία (σάκχαρο). Η πλήρης και σωστή κατανόηση της μεταγωγής σημάτων μεταξύ των κυττάρων, μας βοηθάει να κατανοήσουμε πως αλληλεπιδρούν τα κύτταρα για να σχηματίσουν ένα ολοκληρωμένο οργανισμό από ένα γονιμοποιημένο ωάριο, τον τρόπο αντιμετώπισης ασθενειών και πώς να σχεδιάσουμε νέα φάρμακα που στόχος τους είναι ειδικά μονοπάτια κυτταρικής σηματοδότησης.

Για να επιβιώσει ένα κύτταρο μέσα στο πολύπλοκο περιβάλλον του απαιτείται να έχει τη δυνατότητα να ερμηνεύει ποικίλα σήματα που εκπέμπονται από

άλλα κύτταρα και να προσαρμόσει ανάλογα τη συμπεριφορά του. Στη συνέχεια θα περιγραφούν οι τρόποι με τους οποίους τα κύτταρα επικοινωνούν μεταξύ τους καθώς και με ποιες μεθόδους διαδίδεται και αξιοποιείται η πληροφορία από το ίδιο το κύτταρο. Αρχικά όμως θα αναφερθούν συγκεκριμένοι ορισμοί, όπως ότι το κύτταρο το οποίο εκπέμπει την πληροφορία ονομάζεται σηματοδοτικό κύτταρο (signaling cell), ενώ το κύτταρο το οποίο λαμβάνει την πληροφορία ονομάζεται κύτταρο στόχος (target cell). Η διαδικασία της ανταλλαγής πληροφοριών μεταξύ των κυττάρων και η διάδοση της πληροφορίας μέσα στο κύτταρο δέκτη, ονομάζεται κυτταρική σηματοδότηση (cell signaling). [32]

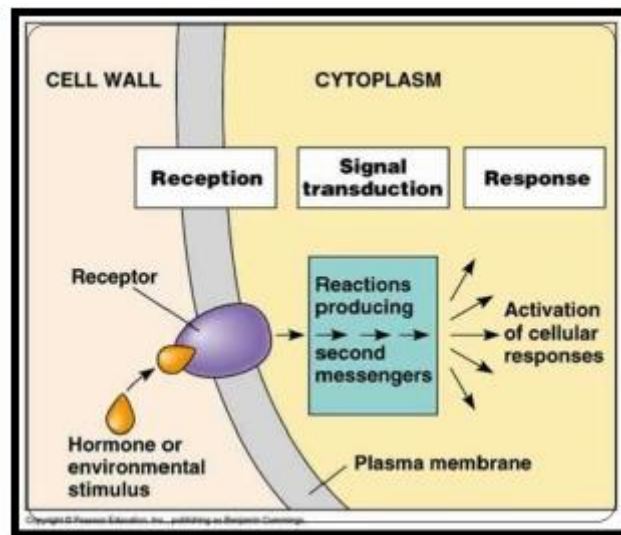
Τα σήματα που μεταδίδονται ανάμεσα στα κύτταρα είναι συνήθως συγκεκριμένα χημικά μόρια, πρωτεΐνες, πεπτίδια, αμινοξέα, νουκλεοτίδια, στεροειδή, παράγωγα λιπαρών οξέων ή ακόμα και αέριες ουσίες σε διάλυμα. Ανάλογα με την ταχύτητα μετάδοσης και την απόσταση μεταξύ της θέσης παραγωγής του μηνυματοφόρου μορίου και του κυττάρου στόχου, υπάρχουν τέσσερις μηχανισμοί με τους οποίους επιτυγχάνεται η επικοινωνία μεταξύ των κυττάρων: η ενδοκρινής επικοινωνίας, η παρακρινής επικοινωνία, νευρωνική και επικοινωνίας εξαρτώμενη από την επαφή. [32]

Όσον αφορά στον τρόπο με τον οποίο τα κύτταρα διακρίνουν τα σήματα, θα πρέπει στην επιφάνεια του κυττάρου να υπάρχει μια πρωτεΐνη η οποία θα δράσει σαν υποδοχέας (receptor protein). Με αυτό τον τρόπο περιορίζεται ο αριθμός των σημάτων στα οποία μπορεί να αντιδράσει ένα κύτταρο, αφού γύρω του μπορεί να υπάρχουν εκατοντάδες σήματα, αλλά κάθε κύτταρο διαθέτει μόνο μερικές δεκάδες διαφορετικούς υποδοχείς.[28]

Στην περίπτωση που ένα κύτταρο διαθέτει το συγκεκριμένο υποδοχέα, η διαδικασία μετάδοσης του σήματος στο εσωτερικό του κυττάρου για την επίτευξη του αντίστοιχου σκοπού είναι αρκετά πολύπλοκη, καθώς λαμβάνουν μέρος και άλλες ενδοκυτταρικές σηματοδοτικές πρωτεΐνες.

Επίσης, ένα κύτταρο μπορεί να έχει μερικές δεκάδες υποδοχείς και να δέχεται διαφορετικά σήματα ταυτόχρονα. Αυτά τα σήματα μπορεί να αλληλεπιδρούν μεταξύ τους καθώς διακινούνται μέσα από το ενδοκυτταρικό σηματοδοτικό

δίκτυο. Η παρουσία ενός σήματος, δηλαδή, μπορεί να μπλοκάρει πλήρως ή μερικά τη διάδοση ενός άλλου. Αντίστροφα, για την διάδοση ενός σήματος μπορεί να απαιτείται και η παρουσία ενός άλλου. Ο ακριβής τρόπος πάντως με τον οποίο ένα κύτταρο ανταποκρίνεται στα εξωτερικά ερεθίσματα δεν έχει διευκρινιστεί ακόμα και αποτελεί αντικείμενο μελέτης.



Εικόνα 6: Μηχανισμός μετάδοσης σήματος στο κύτταρο [24]

### 1.3.3 Μελέτη Μονοπατιών Μετάδοσης Σήματος σε Κύτταρα Μέσα σε 3D Μήτρες

Η μέχρι τώρα γνώση για τα σηματοδοτικά μονοπάτια βασίζεται κυρίως σε μελέτες που έχουν πραγματοποιηθεί σε κύτταρα που καλλιεργούνται σε επίπεδα τεχνητά υποστρώματα από πλαστικό ή γυαλί *in vitro*. Υπό αυτές τις συνθήκες τα κύτταρα αναγκάζονται να προσαρμοστούν σε αφύσικα επίπεδες επιφάνειες που διαφέρουν σημαντικά από την φυσική εξωκυττάρια μήτρα, η οποία περιβάλλει τα περισσότερα κύτταρα στους ζώντες οργανισμούς. Δεδομένου ότι η δραστηριότητα των κυτταρικών σηματοδοτικών μονοπατιών εξαρτάται σημαντικά από τις περιβαλλοντικές συνθήκες, η χρήση πιο φυσιολογικών πειραματικών συνθηκών, όπως είναι οι τρισδιάστατες μήτρες, μπορεί να παρέχει μια καλύτερη εικόνα για τα σηματοδοτικά μονοπάτια σε *in vivo* περιβάλλον. [13]

Συνεπώς, είναι αναμενόμενο ότι διάφορες μορφές μεταγωγής σήματος μπορεί να διαφέρουν σημαντικά σε κύτταρα που καλλιεργούνται μέσα σε μια τρισδιάστατη μήτρα συγκριτικά με τα κύτταρα που καλλιεργούνται σε πλαστικά τριβλία. Για παράδειγμα, έχει παρατηρηθεί ότι η φωσφορυλίωση της πρωτεΐνης Focal Adhesion Kinase (FAK) στις κυτταρικές συμφύσεις (focal adhesions) είναι σχεδόν απύσχα σε καλλιέργεια ανθρώπινων ινοβλαστών σε τρισδιάστατη μήτρα. Αυτό μπορεί να οφείλεται στην εξάρτηση της σηματοδότησης του FAK από τη μήτρα ή την διαφορετική ακαμψία του υποστρώματος. Ένα άλλο παράδειγμα συναντάται στην σηματοδότηση μέσω της οικογένειας Rho των τριφωσφορικών γουανιδινών (guanosine triphosphate (GTP)) στην οποία η ενεργοποίηση της οικογένειας πρωτεϊνών Rac μειώνεται στην τρισδιάστατη καλλιέργεια, επηρεάζοντας έτσι την μεταναστευτική συμπεριφορά των ινοβλαστών. [9]

Τα παραπάνω, υποδεικνύουν τη σημασία της μελέτης των σηματοδοτικών μονοπατιών σε φυσιολογικές τρισδιάστατες συνθήκες που να προσομοιάζουν καλύτερα τις *in vivo* συνθήκες που αναπτύσσονται φυσιολογικά τα κύτταρα. Τα ικριώματα κολλαγόνου προσφέρουν τη δυνατότητα μετάβασης από το δισδιάστατο περιβάλλον σε ένα τρισδιάστατο, το οποίο ανταποκρίνεται καλύτερα στο φυσιολογικό περιβάλλον των κυττάρων. Τα πειράματα πρωτεομικής είναι δυνατό να πραγματοποιηθούν μέσω των τρισδιάστατων συστημάτων ώστε να αξιολογηθούν με βάση τα πειράματα που βασίζονταν στην παραδοσιακή καλλιέργεια.

## 1.4 Σκοποί της Διπλωματικής

Η παρούσα διπλωματική εργασία εστιάζει στον χαρακτηρισμό και την βελτιστοποίηση πρωτοκόλλων για την τρισδιάστατη καλλιέργεια κυττάρων μέσα σε πορώδη ικριώματα κολλαγόνου. Παραδοσιακά, τα πειράματα πρωτεομικής πραγματοποιούνται σε δισδιάστατο περιβάλλον (στον πάτο πλαστικών βοθρίων) το οποίο αποτελεί ένα εντελώς τεχνητό περιβάλλον για τα κύτταρα, καθώς αυτά στην πραγματικότητα των ιστών περιβάλλονται από μια εξωκυττάρια μήτρα. Η εργασία αυτή έχει ως στόχο, χρησιμοποιώντας το

ικρίωμα κολλαγόνου σαν ανάλογο την εξωκυττάριας μήτρας, να προσφέρει τις βάσεις για περαιτέρω μελέτη των τρισδιάστατων συστημάτων σε πειράματα πρωτεομικής. Η βιβλιογραφική μελέτη που πραγματοποιήθηκε σχετικά με τη χρήση ικρίωμάτων κολλαγόνου σε διάφορα εργαστήρια κατέδειξε την περιορισμένη γνώση που υπάρχει σχετικά με τα πρωτόκολλα που χρησιμοποιούνται στην καλλιέργεια των κυττάρων και στο πως επηρεάζουν τα αποτελέσματα των βιολογικών πειραμάτων. Κρίθηκε αναγκαίο, αυτή η εργασία να εστιαστεί στον χαρακτηρισμό και τη βελτιστοποίηση των πρωτοκόλλων που αφορούν βιολογικά πειράματα σε ικρίωματα κολλαγόνου. Επομένως, στα πλαίσια αυτής της διπλωματικής, αναπτύχθηκαν και συγκρίθηκαν λεπτομερώς διαφορετικά πρωτόκολλα που αφορούσαν την εισαγωγή και την καλλιέργεια ινοβλαστών μέσα στα ικρίωματα κολλαγόνου, την ανάκτηση των κυττάρων από αυτά, καθώς και πρωτόκολλα που αφορούσαν τη λύση και την διέγερση των κυττάρων. Τα αποτελέσματα που προέκυψαν σχετικά με τον αριθμό των κυττάρων που μπορούν να εισαχθούν μέσα σε δείγματα ικρίωματος, τον τρόπο και τον χρόνο καλλιέργειας καθώς και τη μέθοδο που συλλέγουμε και υπολογίζουμε τον αριθμό των κυττάρων από το ικρίωμα επιτρέπουν την προσαρμογή των παραδοσιακών πρωτοκόλλων για δισδιάστατη διαχείρισης κυττάρων σε τρισδιάστατη. Τα πρωτόκολλα που αναπτύχθηκαν μπορούν άμεσα να χρησιμοποιηθούν στην διεξαγωγή πρωτεομικών μελετών συστημικής φύσεως (High Throughput Proteomics), στα οποία εστιάζεται ερευνητικά το εργαστήριο Εμβιομηχανικής και Συστημικής Βιολογίας του ΕΜΠ.

## 2. Πειραματικές Μέθοδοι

### 2.1 Μέθοδοι Συγκέντρωσης Πυκνότητας Πρωτεΐνης

#### 2.1.1 Γενικά

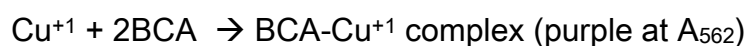
Σε όλα τα πεδία των επιστημών που σχετίζονται με την βιολογία είναι απαραίτητη η γνώση της επίδρασης που έχει η μελέτη σε ένα σύστημα στη συγκέντρωση των πρωτεϊνών. Λόγω αυτής της απαίτησης, αναπτύχθηκαν διάφορες μέθοδοι εκτίμησης της συγκέντρωσης των πρωτεϊνών σε ένα δείγμα. Αυτές οι μέθοδοι μέτρησης της συγκέντρωσης της πρωτεΐνης (protein assays) έχουν σκοπό τη μέτρηση της άγνωστης πρωτεΐνης σε ένα διάλυμα.

Υπάρχουν διάφορες μέθοδοι καθορισμού της συγκέντρωσης της πρωτεΐνης, η οποία καθεμία ακολουθεί το δικό της μηχανισμό. Παραδείγματα τέτοιων μεθόδων είναι η μέθοδος Biuret, η μέθοδος Modified Lowry Protein, η μέθοδος BCA, η μέθοδος Bradford και η μέθοδος που βασίζεται στην απορρόφηση φωτός στα 280nm.

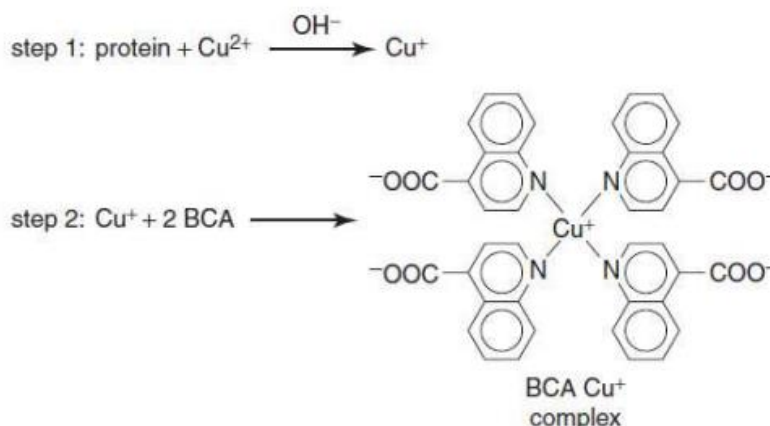
Στην εργασία αυτή χρησιμοποιήθηκε η μέθοδος BCA λόγω του χαμηλού κόστους, των μικρών απαιτήσεων σε όγκο δειγμάτων πρωτεΐνης, της ακρίβειας στη μέτρηση σε σύγκριση με τις υπόλοιπες μεθόδους και της ευρωστίας της στην ύπαρξη διάφορων χημικών πρόσθετων στα διαλύματα (όπως π.χ. τα σαπούνια, απαραίτητο συστατικό των διαλυμάτων λύσης).

#### 2.1.2 Μέθοδος BCA για τη Μέτρηση Συγκέντρωσης Πρωτεΐνης

Η μέθοδος δικινχονινικού οξέος ή μέθοδος BCA (είναι επίσης γνωστή και ως Smith Assay) είναι μία βιοχημική μέθοδος για τον προσδιορισμό της συνολικής συγκέντρωσης πρωτεΐνης σε ένα διάλυμα και είναι παρόμοια με τις μεθόδους Lowry και Bradford. Η αρχή αυτής της μεθόδου είναι η παρακάτω:



Και σχηματικά:



Εικόνα 7: Βασική αντίδραση στη μέθοδο BCA

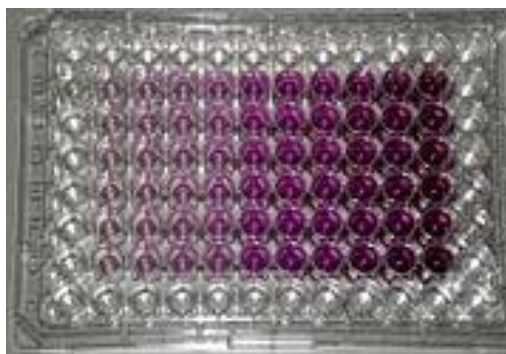
Οι πρωτεΐνες αντιδρούν με ιόντα χαλκού ( $\text{Cu}^{+2}$ ) σε αλκαλικό περιβάλλον (αντίδραση διουρίας) και το αποτέλεσμα της αντίδρασης είναι η αναγωγή των δισθενών ιόντων  $\text{Cu}^{+2}$  σε μονοσθενή ιόντα  $\text{Cu}^{+1}$  (Smith et al 1985). Τα μονοσθενή ιόντα  $\text{Cu}^{+1}$ , χρησιμοποιώντας ένα μοναδικό αντιδραστήριο που περιέχει δικινχονικό οξύ, διαθέτουν χαρακτηριστικά υψηλής ευαισθησίας και επιλεκτικής χρωματικής ανίχνευσης. Στη συνέχεια, αυτά αντιδρούν με δύο μόρια BCA και το προϊόν της αντίδρασης είναι η δημιουργία μωβ χρώματος. Η χρωματογόνος αυτή ένωση παρουσιάζει υψηλή οπτική απορρόφηση σε μήκος κύματος 562nm, η οποία εμφανίζει γραμμικότητα με αυξανόμενες συγκεντρώσεις πρωτεΐνης σε ένα ευρύ φάσμα από 20μg/ml έως και 2.000μg/ml. Στη μέθοδο BCA η αντίδραση δεν φτάνει σε ένα τελικό σημείο, δηλαδή το χρώμα συνεχίζει να αναπτύσσεται. Ωστόσο, μετά την επώαση, το ποσοστό της συνεχούς δημιουργίας του χρώματος είναι αρκετά αργό ώστε να επιτρέπεται ένα μεγάλος αριθμός δειγμάτων να προσδιοριστεί μαζί. [35]

Το χρώμα που δημιουργείται στη μέθοδο BCA οφείλεται στην μακρομοριακή δομή της πρωτεΐνης, στον αριθμό των πεπτιδικών δεσμών και στην παρουσία τεσσάρων συγκεκριμένων αμινοξέων (Κυστεΐνη, κυστίνη, τρυπτοφάνη και τυροσίνη). [35]

Η συγκέντρωση της πρωτεΐνης προσδιορίζεται με γνώμονα μια κοινή γνώστη πρωτεΐνη (standard protein), όπως είναι η αλβουμίνη βούς (BSA).

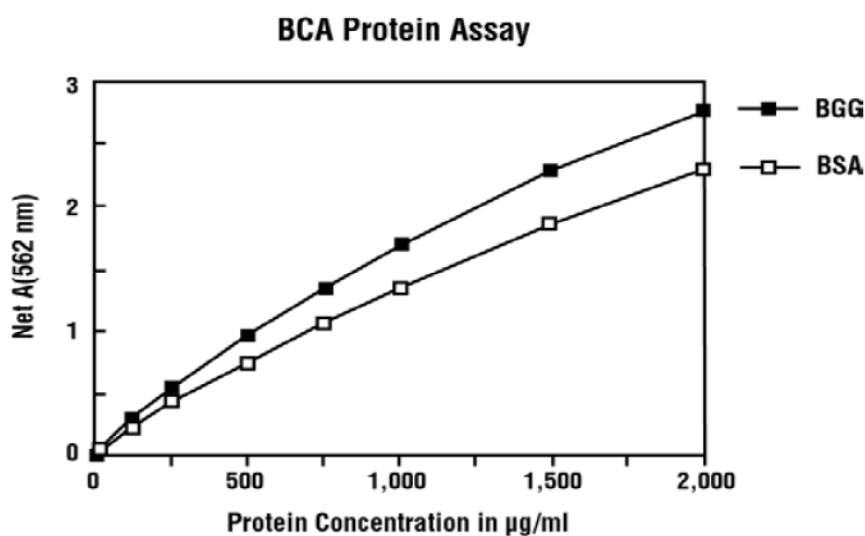


Παρασκευάζεται μια σειρά αραιώσεων από γνωστή συγκέντρωση πρωτεΐνης και παράλληλα τοποθετείται το δείγμα με την άγνωστη συγκέντρωση πρωτεΐνης, ώστε μέσα από την πρότυπη καμπύλη (standard curve) να προσδιοριστεί και αυτή.



Εικόνα 8: Διαδοχικές αραιώσεις της πρότυπης συγκέντρωσης

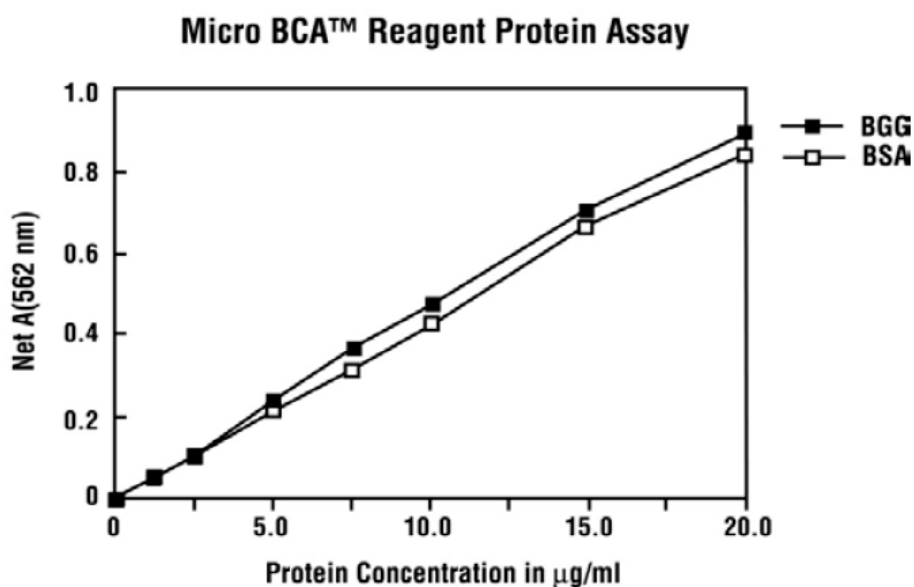
Η μορφή της πρότυπης καμπύλης που πρέπει να προκύψει είναι η ακόλουθη



Εικόνα 9: Πρότυπη καμπύλη για τη μέθοδο BCA [35]

Μια παραλλαγή της μεθόδου BCA είναι η μέθοδος Micro BCA η οποία είναι πιο ευαίσθητη (μπορεί και μετρά πιο μικρές συγκεντρώσεις πρωτεΐνης) αλλά έχει μικρότερο δυναμικό εύρος. Συγκεκριμένα, η μέθοδος Micro BCA είναι βελτιστοποιημένη για να ανιχνεύει συγκεντρώσεις πρωτεϊνών στο εύρος 0.5–20 µg/ml, ενώ η μέθοδος BCA μπορεί να μετρήσει συγκεντρώσεις πρωτεϊνών στο εύρος 20–2000 µg/ml. [36]

Μια τυπική μορφή της καμπύλης βαθμονόμησης για τη μέθοδο Micro BCA παρουσιάζεται στην παρακάτω εικόνα:



Εικόνα 10: Πρότυπη καμπύλη για τη μέθοδο Micro BCA [36]

### 2.1.3 Βελτιστοποίηση του Πρωτοκόλλου της BCA Μεθόδου

Σε πρώτο στάδιο πραγματοποιήθηκε η βελτιστοποίηση του πρωτοκόλλου της BCA μεθόδου, σύμφωνα και με τις απαιτήσεις του Kit της εταιρείας (Pierce 23227). Σκοπός αυτής της βελτιστοποίησης ήταν ο καθορισμός των μέγιστων και ελαχίστων συγκεντρώσεων που μπορούν να μετρηθούν με την ταυτόχρονη μείωση της ποσότητας της πρωτεΐνης και του αντιδραστηρίου (Working Reagent). Τα κίνητρα για την μείωση της ποσότητας της πρωτεΐνης που χρησιμοποιείται στην μέθοδο ήταν η χρήση λιγότερου δείγματος και λιγότερων αντιδραστηρίων σε κάθε μέτρηση. Το βέλτιστο πρωτόκολλο εξαρτάται από τον όγκο του δείγματος προς μέτρηση.

Δοκιμάστηκαν διαφορετικές ποσότητες από την πρότυπη πρωτεΐνη και το Working Reagent, διατηρώντας όμως σταθερή την αναλογία μεταξύ τους και έχοντας σταθερή αναλογία στο buffer.

*Πειραματικός Σχεδιασμός:* Στο βασικό πρωτόκολλο της BCA μεθόδου γίνεται ανάμιξη από 10µL πρωτεΐνης (πρότυπης και άγνωστης) με 200µL Working

Reagent. Για την βελτιστοποίηση του πρωτοκόλλου δοκιμάστηκαν οι ποσότητες

- 5μL πρότυπης πρωτεΐνης με 100μL Working Reagent
- 2μL πρότυπης πρωτεΐνης με 40μL Working Reagent.

Για περαιτέρω μελέτη διερευνήθηκε και το ενδεχόμενο χρήσης μικρότερης ποσότητας Working Reagent, χρησιμοποιώντας τις ίδιες ποσότητες πρότυπης πρωτεΐνης που αναφέρθηκαν παραπάνω. Οι δοκιμές που έγιναν ήταν:

- 10μL πρότυπης πρωτεΐνης με 100μL Working Reagent
- 10μL πρότυπης πρωτεΐνης με 50μL Working Reagent
- 2μL πρότυπης πρωτεΐνης με 20μL Working Reagent

Για την επεξεργασία των αποτελεσμάτων χρησιμοποιήσαμε την στατιστική ανάλυση **Student's t test**. Το t στατιστικό τεστ για τη διαφορά της μέσης τιμής δείγματος (single sample t-test) χρησιμοποιεί δεδομένα που προέρχονται από ένα δείγμα για να ελέγξει υποθέσεις που σχετίζονται με τη μέση τιμή ενός πληθυσμού όταν η διακύμανση του αρχικού πληθυσμού είναι άγνωστη. Σε αυτή τη στατιστική μέθοδο γίνεται μία εκτίμηση της διακύμανσης του πληθυσμού με τη βοήθεια της διακύμανσης του δείγματος. Η μηδενική υπόθεση δηλώνει και πάλι μία συγκεκριμένη τιμή για την μέση τιμή του άγνωστου πληθυσμού που προκύπτει από την αλλαγή της ανεξάρτητης μεταβλητής. Για την εύρεση των κρίσιμων περιοχών ο ερευνητής επιλέγει ένα επίπεδο σημαντικότητας και υπολογίζει τους βαθμούς ελευθερίας.

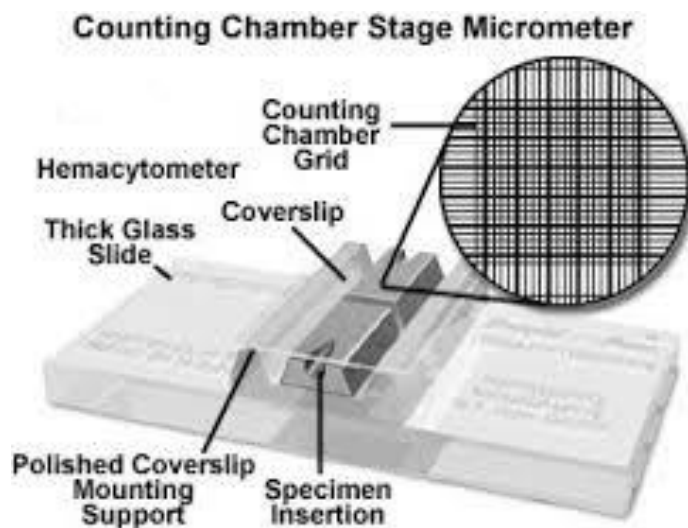
## 2.2 Μέθοδοι Μέτρησης Κυττάρων

Στην παρούσα διπλωματική εργασία, η μέτρηση του αριθμού των κυττάρων είναι απαραίτητη για τον χαρακτηρισμό των βιολογικών πρωτοκόλλων που αφορούν τα ικρίωματα κολλαγόνου. Κατά την εισαγωγή των κυττάρων στα ικρίωματα κολλαγόνου, αλλά και για το καθορισμό των κυττάρων που εισήχθησαν σε αυτά μελετάται ο αριθμός των κυττάρων με τη χρήση δύο μεθόδων, του αιμοκυττάρου μετρου και τη μέτρησης της συγκέντρωσης πρωτεΐνης στο δείγμα.

### 2.2.1 Μέτρηση Κυττάρων με Αιμοκυτταρόμετρο

Το αιμοκυτταρόμετρο είναι μία συσκευή που χρησιμοποιείται ευρέως για τη μέτρηση κυττάρων και η οποία σχεδιάστηκε αρχικά για την καταμέτρηση των κυττάρων του αίματος.

Το αιμοκυτταρόμετρο εφευρέθηκε από τον Louis-Charles Malassez και αποτελείται από μία παχιά γυάλινη αντικειμενοφόρο πλάκα μικροσκοπίου με μια ορθογώνια οδόντωση που δημιουργεί ένα θάλαμο. Αυτός ο θάλαμος είναι χαραγμένος δημιουργώντας ένα πλέγμα κάθετων γραμμών. Η συσκευή είναι κατασκευασμένη με προσοχή έτσι ώστε η περιοχή που οριοθετείται από τις γραμμές να είναι γνωστή και το βάθος του θαλάμου να είναι γνωστό. Οπότε είναι δυνατό να μετρηθεί ο αριθμός των κυττάρων, ή σωματιδίων σε ένα συγκεκριμένο όγκο ρευστού και στη συνέχεια να υπολογιστεί ο αριθμός των κυττάρων στο υγρό συνολικά. [38]



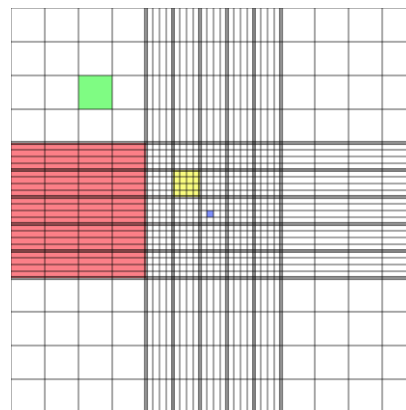
Εικόνα 11: Διάταξη αιμοκυτταρόμετρου [39]

Οι καλυπτρίδες που χρησιμοποιούνται για την χρήση του αιμοκυτταρόμετρου έχουν κατασκευαστεί ειδικά για να είναι παχύτερες από τις συμβατικές καλυπτρίδες μικροσκοπίου, διότι πρέπει να είναι σε θέση να ξεπεράσουν την επιφανειακή τάση μιας σταγόνα υγρού.

Το πλέγμα του αιμοκυτταρόμετρου αποτελείται από εννέα  $1 \times 1 \text{ mm}$  ( $1 \text{ mm}^2$ ) τετράγωνα. Αυτά υποδιαιρούνται σε τρεις κατευθύνσεις:  $0,25 \times 0,25 \text{ mm}$  ( $0,0625 \text{ mm}^2$ ),  $0,25 \times 0,20 \text{ mm}$  ( $0,05 \text{ mm}^2$ ) και  $0,20 \times 0,20 \text{ χιλιοστά}$  ( $0,04$

mm<sup>2</sup>). Το κεντρικό τετράγωνο υποδιαιρείται περαιτέρω σε 0,05 × 0.05 mm (0,0025 mm<sup>2</sup>) τετράγωνα. Οι υπερυψωμένες ακμές του αιμοκυτταρόμετρο κρατούν την γυάλινη αντικειμενοφόρο πλάκα σε απόσταση 0,1mm από το πλέγμα, δίνοντας σε κάθε τετράγωνο ένα καθορισμένο όγκο. [37]

Dimensions	Area	Volume at 0.1 mm depth
1 x 1 mm	1 mm <sup>2</sup>	100 nL
0.25 x 0.25 mm	0.0625 mm <sup>2</sup>	6.25 nL
0.25 x 0.20 mm	0.05 mm <sup>2</sup>	5 nL
0.20 x 0.20 mm	0.04 mm <sup>2</sup>	4 nL
0.05 x 0.05 mm	0.0025 mm <sup>2</sup>	0.25 nL



Εικόνα 12: Το πλέγμα του αιμοκυτταρόμετρου [38]

Για να χρησιμοποιηθεί το αιμοκυτταρόμετρο απαιτείται να βεβαιωθεί πρώτα ότι η καλυπτρίδα είναι καλά τοποθετημένη πάνω στην επιφάνεια του θαλάμου μέτρησης. Όταν οι δύο επιφάνειες είναι σε κατάλληλη επαφή τότε είναι ορατά τα δαχτυλίδια του Νεύτωνα. Αν συμβεί αυτό, μπορεί να τοποθετηθεί το κυτταρικό εναιώρημα στην άκρη της καλυπτρίδας ώστε να εισχωρήσει στο κενό ανάμεσα στον θάλαμο και την καλυπτρίδα και να γεμίσει εντελώς ο θάλαμος με το δείγμα. Με τη χρήση ενός μικροσκοπίου μπορεί να μετρηθεί άμεσα ο αριθμός των κυττάρων στον θάλαμο και αυτός ο αριθμός χρησιμοποιείται για να προσδιοριστεί η πυκνότητα των κυττάρων στο αρχικό μίγμα από όπου προέρχεται το δείγμα. Το αποτέλεσμα είναι ο αριθμός των κυττάρων στον θάλαμο διαιρεμένος δια του όγκου του θαλάμου, ο οποίος είναι γνωστός από την αρχή, λαμβάνοντας υπόψη τυχόν αραιώσεις και συντομεύσεις κατά την καταμέτρηση. Δηλαδή:

$$C_{cells} = \frac{N_{cells}}{R_{chamber} V_{squares}} \frac{V_{dilution}}{V_{sample}}$$

Όπου:

- $C_{cells}$ : η συγκέντρωση των κυττάρων στο προς μέτρηση δείγμα.
- $N_{cells}$ : ο αριθμός των κυττάρων που μετρήθηκε

- $R_{\text{chamber}}$ : αναλογία των θαλάμων που μετρήθηκαν
- $V_{\text{squares}}$ : ο όγκος των τετραγώνων που μετρήθηκαν
- $V_{\text{dilution}}$ : ο όγκος του δείγματος μετά από αραιώση και
- $V_{\text{sample}}$ : ο όγκος του κυτταρικού εναιωρήματος χωρίς την αραιώση.

Στις περισσότερες εφαρμογές, τα τέσσερα μεγάλα τετράγωνα στις γωνίες χρησιμοποιούνται μόνο. Τα κύτταρα που βρίσκονται πάνω ή αγγίζουν τις επάνω και αριστερά γραμμές υπολογίζονται, αλλά αυτά που βρίσκονται ή αγγίζουν τις δεξιά ή κάτω γραμμές αγνοούνται.

Ο συνολικός αριθμός  $N$  των κυττάρων υπολογίζεται ως:

$$N = \mu \cdot d \cdot 10^4 \cdot V$$

Όπου  $\mu$  είναι ο μέσος όρος του αριθμού κυττάρων στα τέσσερα γωνιακά τετράγωνα του αιμοκυτταρόμετρου (προκύπτει από τη μέτρηση στο μικροσκόπιο),  $d$  είναι ο λόγος αραιώσης του δείγματος πριν τη μέτρηση και  $V$  είναι ο όγκος του μίγματος από όπου συλλέξαμε το δείγμα σε ml

Ωστόσο, αυτή η μέθοδος παρουσιάζει ορισμένους περιορισμούς καθώς η μετρήσεις που προκύπτουν είναι δυνατό να έχουν σφάλμα σε περίπτωση χρήσης αρκετά αραιωμένου διαλύματος, λόγω της διαδικασίας Poisson. Επίσης, για μια σωστή μέτρηση, απαιτείται αρκετή ποσότητα (περισσότερη ποσότητα από 20μl) από το κυτταρικό εναιώρημα, κάτι το οποίο περιορίζει την ποσότητα του δείγματος που πρόκειται να χρησιμοποιηθεί για άλλα πρωτόκολλα.

### 2.2.2 Μέτρηση Αριθμού Κυττάρων Μέσω Μέτρησης Συγκέντρωσης Πρωτεΐνης

Ένας εναλλακτικός τρόπος εκτίμησης αριθμού κυττάρων σε κάποιο διάλυμα είναι ο έμμεσος τρόπος μέτρησης του συνολικού αριθμού κυττάρων μέσω λύσης των κυττάρων, μέτρησης της συνολικής πρωτεΐνης των κυττάρων και εκτίμηση του αριθμού των κυττάρων από τη μάζα της πρωτεΐνης ανά κύτταρο. Σε αυτή την εργασία, η ποσότητα πρωτεΐνης μετριέται μέσω της μεθόδου BCA ενώ τα κύτταρα που χρησιμοποιούνται είναι ινοβλάστες και συγκεκριμένα HDF (Human Dermal Fibroblast)

### 2.2.2.1 Ποσοτικοποίηση της Μάζας Πρωτεΐνης ανά Κύτταρο

Προτού εκτιμηθεί η ποσότητα των κυττάρων σε ένα δείγμα, είναι απαραίτητο να υπολογιστεί η μάζα μ της πρωτεΐνης ανά κύτταρο. Θα θεωρηθεί ότι η μάζα μ εξαρτάται μόνο από την κυτταροσειρά που χρησιμοποιείται (εδώ: ινοβλάστες) και δε μεταβάλλεται καθώς τα κύτταρα καλλιεργούνται.

Η διαδικασία που υλοποιήθηκε στο πείραμα εύρεσης της μάζας της πρωτεΐνης ανά κύτταρο μ είναι:

- Αφού συλλεχθούν τα κύτταρα από την φλάσκα που γίνεται η καλλιέργεια, διαλύεται το ίζημα των κυττάρων με PBS
- Τοποθετούνται συγκεκριμένες ποσότητες κυττάρων (π.χ. 100K, 80k, 60k, 40k) σε Eppendorf tube των 0,6 ml
- Προστίθεται Lysis Buffer για να γίνει η λύση των κυττάρων
- Συλλέγεται συγκεκριμένη ποσότητα από το δείγμα και εκτελείται η BCA μέθοδος
- Με την βοήθεια της πρότυπης καμπύλης, αναγάζεται τα αποτελέσματα αυτής της μεθόδου ώστε να προκύψει η μάζα της πρωτεΐνης μ σε ng

### 2.2.2.2 Εύρεση Ποσότητας Κυττάρων σε Δείγμα

Για να μετρηθεί ο αριθμός των κυττάρων σε ένα άγνωστο δείγμα, μέσω της μεθόδου BCA, απαιτείται να γίνει λύση των κυττάρων στο δείγμα

- Σε δείγμα με άγνωστο αριθμό κυττάρων προστίθεται τόση ποσότητα Lysis Buffer ώστε ανάλογα με τον αριθμό των κυττάρων που αναμένεται να είναι μέσα στα ανιχνεύσιμα όρια της BCA μεθόδου
  - Για να προστατευθούν οι πρωτεΐνες από τις πρωτεάσες χρησιμοποιούνται αναστολείς πρωτεασών, όπως είναι: PMSF (P7626 SIGMA Phenylmethanesulfonyl fluoride)
  - Ο παράγοντας PMSF αποτελεί το 1/50 της ποσότητας του Lysis Buffer
  - Τοποθετείται το δείγμα στους 4° C για 15'-20' λεπτά και στην συνέχεια εάν επιθυμείτε η αποθήκευση, τοποθετείται στους -20° C, αλλιώς εκτελείται κατευθείαν η BCA μέθοδος

- Έχοντας γνωστό τον όγκο του δείγματος που έχει γίνει η λύση και γνωρίζοντας την μάζα της πρωτεΐνης ανά κύτταρο, είναι δυνατό μέσω της πρότυπης καμπύλης να μετρηθεί ο αριθμός των κυττάρων

Η σχέση που παρέχει τον αριθμό των κυττάρων  $N$  είναι:

$$N = \frac{4 \cdot \rho \cdot V \cdot 10^6}{\mu}$$

Όπου:

- $\rho$  είναι η συγκέντρωση πρωτεΐνης που προκύπτει από την καμπύλη βαθμονόμησης
- $V$  είναι ο όγκος του δείγματος που έχει γίνει η λύση
- $\mu$  είναι η μάζα πρωτεΐνης ανά κύτταρο

## 2.3 Καλλιέργεια Ινοβλαστών σε Πορώδη Ικρίωματα Κολλαγόνου

### 2.3.1 Προετοιμασία Δειγμάτων Ικρίωματος

Το υλικό που προκύπτει από τη διαδικασία της λυοφιλοποίησης είναι ένα άνυδρο φύλλο ικρίωματος. Ωστόσο για τη μελέτη της αλληλεπίδρασης του ικρίωματος στα κύτταρα ή για πειράματα που αφορούν χαρακτηρισμό βιοϋλικών, απαιτούνται μικρότερα και κυλινδρικά δείγματα των ικρίωμάτων. Αυτά τα δείγματα κόβονται από το αρχικό φύλλο ικρίωματος χρησιμοποιώντας biopsy punch.

Τα προς μελέτη ικρίωματα που χρησιμοποιήθηκαν είχαν πάχος 3mm και η διάμετρος του biopsy punch για την κοπή των δειγμάτων ήταν 4mm και 6mm. Για την πιο εύκολη κοπή των δειγμάτων κατασκευάστηκε και τετράγωνο στήριγμα από Plexiglas με οπές που έχουν κατάλληλη διάμετρο ώστε κατά την κοπή των δειγμάτων να μην υπάρχει μεγάλη παραμόρφωση σε αυτά.

Πρέπει να σημειωθεί ότι οι δύο πλευρές του φύλλου ικρίωματος κολλαγόνου είναι διαφορετικές. Η μία πλευρά είναι γνωστή ως γυαλιστερή και η άλλη ως

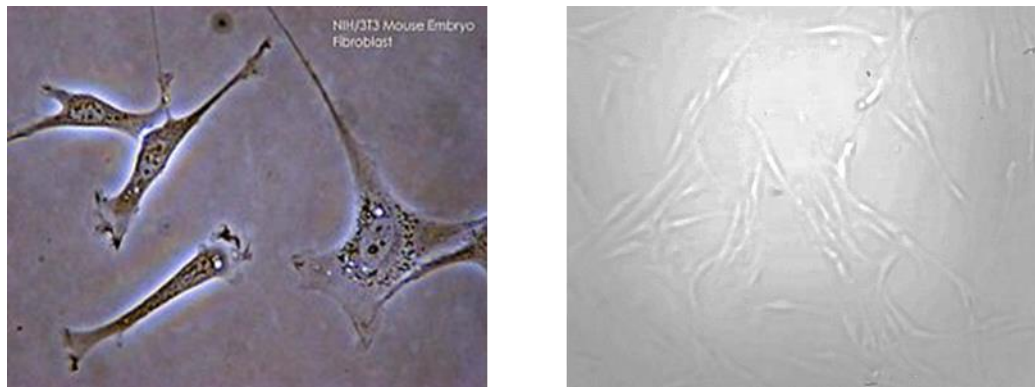


mat πλευρά (λιγότερο γυαλιστερή). Η mat πλευρά θεωρείται πιο διαπερατή από την γυαλιστερή.

### 2.3.2 Εισαγωγή Ινοβλαστών και Καλλιέργεια στο Ικρίωμα

Όπως έχει αναφερθεί και παραπάνω ένας από τους βασικούς σκοπούς αυτής διπλωματικής εργασία είναι η βελτιστοποίηση του πρωτοκόλλου εισαγωγής κυττάρων, και συγκεκριμένα ινοβλαστών, στα ικρίωματα κολλαγόνου. Συνεπώς, πραγματοποιήθηκαν διάφορες μέθοδοι εισαγωγής κυττάρων χρησιμοποιώντας διαφορετική ποσότητα κυττάρων κάθε φορά, σε διαφορετική πυκνότητα και για τα δύο είδη δειγμάτων που παρουσίαζαν διαφορετική διάμετρο (4mm, 6mm).

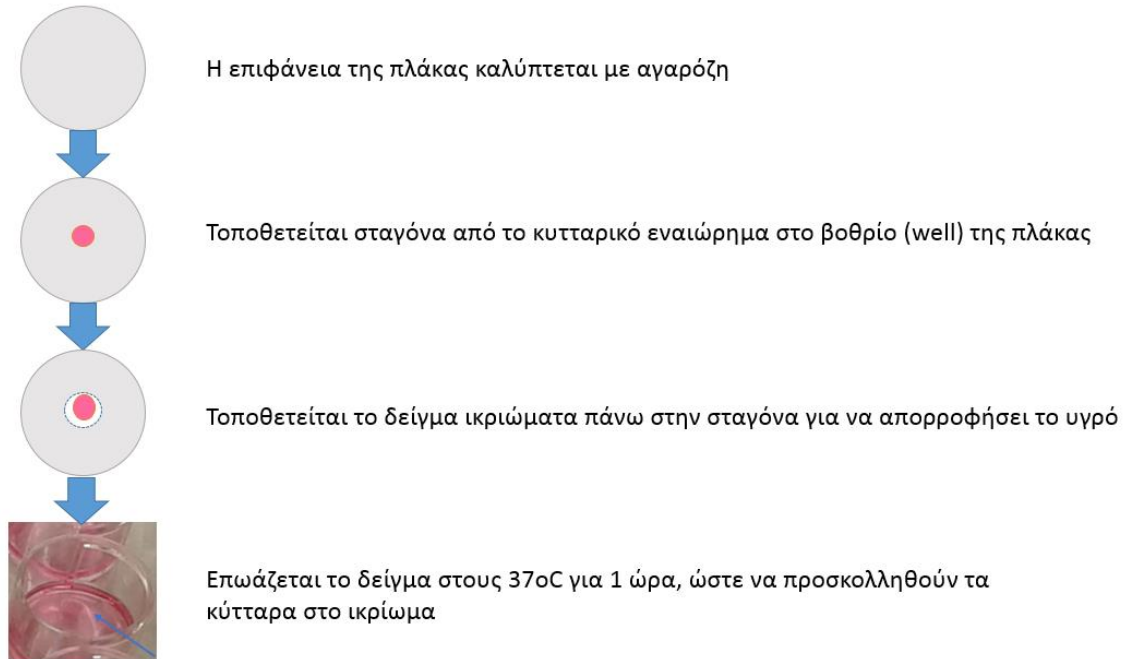
Οι ινοβλάστες χρησιμοποιούνται καθώς αποτελούν τα πιο χαρακτηριστικά κύτταρα του συνδετικού ιστού. Εμφανίζουν διαφόρου βαθμού εξειδίκευση και είναι υπεύθυνα για την παραγωγή και συγκέντρωση στη θεμέλιο ουσία των πρωτεογλυκανών (βλεννοπολυσακχαριστών) καθώς και των κολλαγόνων και ελαστικών ινών. Η μορφή τους παρουσιάζεται στις παρακάτω εικόνες:



**Εικόνα 13: Η μορφή των ινοβλαστών [34]**

Αφού πραγματοποιηθεί η εισαγωγή κυττάρων στο ικρίωμα κολλαγόνου, μπορεί να γίνει κανονικά καλλιέργεια όπως συμβαίνει και στην παραδοσιακή δισδιάστατη καλλιέργεια.

Το θρεπτικό στην καλλιέργεια των δειγμάτων ικρίωματος σε ένα 12-well plate πρέπει να αλλάζεται κάθε δύο με τρεις ημέρες και να προστίθεται κάθε φορά 1ml DMEM++.



Έχει παρατηρηθεί, επίσης, ότι σε καλλιέργεια δείγματος ικρίωματος διαμέτρου 4mm σε 12-well plate, το δείγμα αποικοδομήθηκε σε διάστημα 35 ημερών.

### 2.3.3 Ανάκτηση Κυττάρων από το Ικρίωμα

Σε πολλές πειραματικές μεθόδους απαιτείται να ανακτήσουμε τα κύτταρα που έχουμε εισάγει στο ικρίωμα κολλαγόνου. Μία πειραματική μέθοδος χρήσιμη για την διεξαγωγή της μελέτης για την βελτιστοποίηση των πρωτοκόλλων ήταν και η συλλογή των κυττάρων από το ικρίωμα είτε για να αξιολογηθεί ο τρόπος εισαγωγής των κυττάρων ή για να επανατοποθετηθούν και να καλλιεργηθούν σε πλάκες καλλιέργειας (φλάσκες, petri dish) για περαιτέρω διερεύνηση της συμπεριφοράς τους.

Η διαδικασία αυτή μπορεί να επιτευχθεί με τη βοήθεια ενός ενζύμου, της κολλαγενάσης, η οποία διασπά τους πεπτιδικούς δεσμούς του κολλαγόνου. Όταν αυτό χρησιμοποιηθεί με το ικρίωμα, διαλύει εντελώς το υλικό και τα κύτταρα απελευθερώνονται.

Πριν προχωρήσουμε στην υλοποίηση της ανάκτησης των κυττάρων από το ικρίωμα, πρέπει να σημειώσουμε ότι μελετήθηκε αρχικά η ποσότητα του υγρού που δεσμεύεται στο ικρίωμα κολλαγόνου.

Ποσότητα υγρού που παγιδεύεται στο ικρίωμα

- Χρησιμοποιήθηκε μία ζυγαριά ακριβείας
- Μετρήθηκε το βάρος ενός Eppendorf tube 0,6ml και μηδενίστηκε η ένδειξη της ζυγαριάς
- Εισήχθη ένα κυλινδρικό δείγμα ικριώματος κολλαγόνου διαμέτρου 4mm στο eppendorf tube και μετρήθηκε η ένδειξη
- Αφαιρέθηκε το δείγμα από το Eppendorf tube και εμποτίστηκε με υγρό. Το δείγμα επανατοποθετήθηκε στο Eppendorf tube
- Μετρήθηκε η ένδειξη. Η διαφορά των δύο τιμών που μετρήθηκε στις δύο ενδείξεις αποτελεί την ποσότητα του υγρού που παγιδεύεται στο δείγμα

#### 2.3.4 Διέγερση και Λύση των Κυττάρων στο Ικρίωμα

Σε πολλές βιολογικές διαδικασίες που εκτελούνται σε αυτή την διπλωματική εργασία είναι απαραίτητη η λύση της κυτταρικής μεμβράνης των ινοβλαστών.

Η λύση του κυττάρου αναφέρεται στην διάσπαση της κυτταρικής μεμβράνης ενός κυττάρου, συχνά από ιούς, ενζυματικούς ή οσμωτικούς μηχανισμούς. Στην παρούσα εργασία η λύση των κυττάρων γίνεται με ειδικό διάλυμα απορρυπαντικού (detergent), το οποίο αναφέρεται ως Lysis Buffer και παρασκευάζεται στην εταιρεία Protatonce.

Μεταξύ άλλων οι πρωτεΐνες θεωρούνται και αυτές προϊόν της λύσης των κυττάρων. Για να προστατευθούν οι πρωτεΐνες από την δράση των πρωτεασών χρησιμοποιούνται αναστολείς πρωτεασών, και συγκεκριμένα το κοκτέιλ Protease inhibitors-PI (ProtATonce Ltd) μαζί με PMSF (P7626 SIGMA Phenylmethanesulfonyl fluoride).

Οι πρωτεΐνες που συλλέγονται χρησιμοποιούνται για πρωτεομική ανάλυση αλλά για τον καθορισμό του αριθμού των κυττάρων της άγνωστης ποσότητας δείγματος, μέσω της μεθόδου BCA. Συγκεκριμένα, ύστερα από τη διαδικασία εισαγωγής των κυττάρων στα ικρίωματα κολλαγόνου και αφού είχε περάσει μία μέρα από την εισαγωγή τους, γινόταν λύση στο ικρίωμα και συλλεγόταν το δείγμα προς μέτρηση. Αυτή η διαδικασία είχε στόχο την εύρεση του αριθμού

των κυττάρων που εισήχθησαν ώστε να βελτιστοποιηθεί το πρωτόκολλο εισαγωγής κυττάρων στα ικρίωματα.

Επίσης πραγματοποιήθηκε και διέγερση των κύτταρων με ερέθισμα ώστε να μελετηθεί η επίδραση μιας τέτοιας αλλαγής στο σύστημα και να συγκριθεί η τρισδιάστατη καλλιέργεια στο ικρίωμα και η δισδιάστατη στις πλάκες καλλιέργειας. Η μελέτη αυτή γίνεται μέσω σύγκριση των πρωτεϊνών ή των σηματοδοτικών μονοπατιών που είτε ενεργοποιούνται είτε όχι. Η διέγερση έχει πραγματοποιηθεί είτε απευθείας στο ικρίωμα κολλαγόνου που περιέχει τα κύτταρα είτε σε κύτταρα που μέσω της διαδικασίας ανάκτησης των κυττάρων από το ικρίωμα επανατοποθετήθηκαν σε πλάκες καλλιέργειας.

## 2.4 Πρωτεομική Μελέτη της Επίδρασης του Ικρίωματος σε Ινοβλάστες

### 2.4.1 Φωσφοπρωτεομική Ποσοτικοποίηση Πρωτεϊνών

Η Φωσφοπρωτεομική (Phosphoproteomics) είναι κλάδος της “Πρωτεομικής” που αναγνωρίζει, καταγράφει και χαρακτηρίζει πρωτεΐνες που περιέχουν μία φωσφορική ομάδα σαν μετά-μεταφραστική τροποποίηση. Η φωσφορυλίωση είναι βασική, αντιστρεπτή τροποποίηση η οποία ρυθμίζει την πρωτεϊνική λειτουργία, τον ενδοκυτταρικό εντοπισμό, τον σχηματισμό συμπλεγμάτων, την αποδόμηση πρωτεϊνών και κατ’ επέκταση τα δίκτυα σηματοδότησης των κυττάρων. Με βάση τα δεδομένα αυτών των τροποποιήσεων, εκτιμάται ότι πάνω από το 30% όλων των πρωτεϊνών μπορεί να φωσφορυλιωθεί πολλές φορές. Επειδή μια αλλαγή στη κατάσταση της φωσφορυλίωσης αντανακλά σχεδόν πάντα μια αλλαγή στη δραστικότητα κάποιας πρωτεΐνης, η “Φωσφοπρωτεομική” προσφέρει ενδείξεις για τις πρωτεΐνες ή τα σηματοδοτικά μονοπάτια που είναι πιθανόν να ενεργοποιηθούν εξαιτίας μίας τέτοιας αλλαγής.

Μέσω της διέγερσης που αναφέρθηκε παραπάνω είναι δυνατό να επιβληθούν κάποια ερεθίσματα (π.χ. EGF, IL1b) και σε κύτταρα που καλλιεργούνται μέσα στο ικρίωμα κολλαγόνου ή εναλλακτικά σε κύτταρα που μέσω της διαδικασίας

ανάκτησης των κυττάρων από το ικρίωμα επανατοποθετήθηκαν σε πλάκες καλλιέργειας και σε κύτταρα που εξ αρχής καλλιεργήθηκαν σε πλάκες. Η διαδικασία αυτή συμβάλλει στην μελέτη της επίδρασης που έχει η μήτρα (ικρίωμα) στην συμπεριφορά των κυττάρων και στη σύγκριση των σηματοδοτικών μονοπατιών που προκύπτουν από τα δύο διαφορετικά περιβάλλοντα που αναπτύσσονται τα κύτταρα.

## 3. Πειραματικά Αποτελέσματα

### 3.1 Μέτρηση Συγκέντρωσης Πρωτεΐνης

Στην παρούσα ενότητα θα γίνει η παρουσίαση των εξαγόμενων αποτελεσμάτων, όπως προέκυψαν από τον BCA μέθοδο που αναπτύχθηκε. Η επεξεργασία των αποτελεσμάτων πραγματοποιήθηκε μέσω του λογισμικού Excel. Επίσης, αναπτύχθηκε και στατιστική ανάλυση των αποτελεσμάτων, μέσω στατιστικού τεστ Student's t-test, έτσι ώστε να ληφθούν υπόψη μόνο τα στατιστικά σημαντικά αποτελέσματα.

#### 3.1.1 Μέτρηση Συγκέντρωσης Πρωτεΐνης με τη Μέθοδο BCA

##### *3.1.1.1 Βελτιστοποίηση της Μεθόδου Bca*

Αρχικά, παρουσιάζονται τα αποτελέσματα του πρωτοκόλλου που είναι βασισμένο στις οδηγίες του κατασκευαστή (Pierce 23227) και έπειτα παρουσιάζονται οι δοκιμές που πραγματοποιήθηκαν για την βελτιστοποίηση αυτής της μεθόδου.

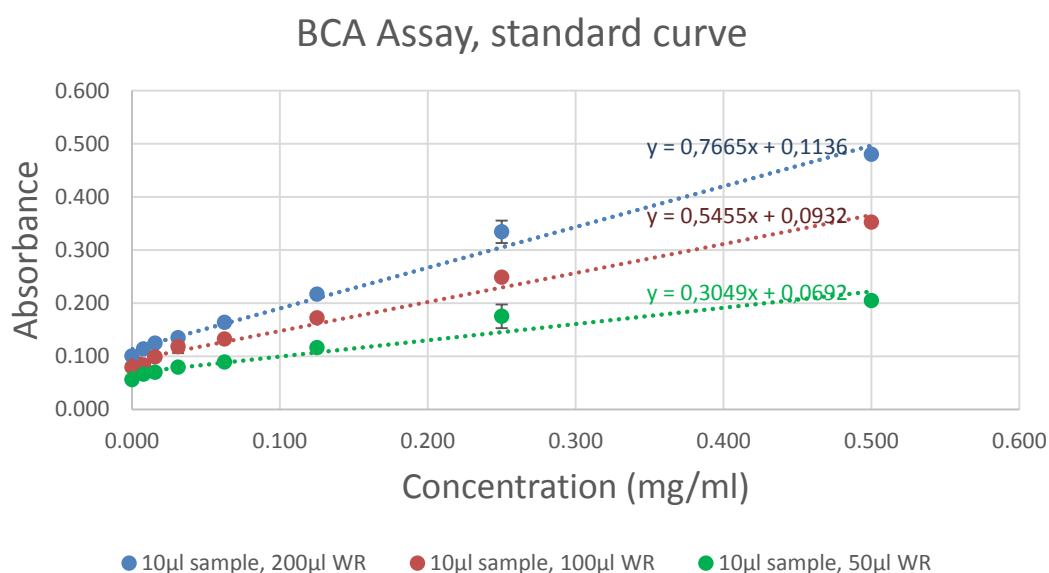
Τα αποτελέσματα που λαμβάνονται ανταποκρίνονται στο σήμα της απορρόφησης (absorbance) που προέρχεται από τη μέτρηση των δειγμάτων στο Plate reader. Οι τιμές που απεικονίζονται στην καμπύλη κάθε πειράματος είναι οι μέσες τιμές από πείραμα με triplicates, όπου παρουσιάζεται το τυπικό σφάλμα μεταξύ αυτών τιμών. Η εξίσωση της standard curve προκύπτει ύστερα από χρήση της μεθόδου ελαχίστων τετραγώνων. Με τη χρήση του Student's t-test, βρίσκουμε την κατώτερη τιμή της συγκέντρωσης που μπορούμε να μετρήσουμε με αυτή τη μέθοδο και είναι στατιστικά σημαντική καθώς επίσης παρατηρούμε ότι και τα αποτελέσματα είναι στατιστικά διαφορετικά μεταξύ τους. Με το 'ροζ' χρώμα παρουσιάζονται οι τιμές που είναι στατιστικά σημαντικές με επίπεδο σημαντικότητας 0.1% και αντίστοιχα με κίτρινο χρώμα οι τιμές που είναι στατιστικά σημαντικές με επίπεδο σημαντικότητας 5%.

1. Στο βασικό πρωτόκολλο της BCA μεθόδου γίνεται ανάμειξη από 10μL πρωτεΐνης (πρότυπης και άγνωστης) με 200μL από το αντιδραστήριο

(Working Reagent) και λαμβάνουμε την πρότυπη καμπύλη για συγκεντρώσεις 0.5, 0.25, 0.125, 1/16, 1/32, 1/64, 1/128 mg/ml.

2. Δοκιμάστηκε πρωτόκολλο 10μL πρότυπης πρωτεΐνης με 100μL από το αντιδραστήριο (Working Reagent) για συγκεντρώσεις 0.5, 0.25, 0.125, 1/16, 1/32, 1/64, 1/128 mg/ml
3. Καθώς και πρωτόκολλο για 10μL πρότυπης πρωτεΐνης με 50μL από το αντιδραστήριο (Working Reagent) για τις ίδιες συγκεντρώσεις όπως παραπάνω

Τα αποτελέσματα των καμπυλών βαθμονόμησης από τα 3 πρωτόκολλα παρουσιάζονται στο παρακάτω γράφημα:



**Γράφημα 1: Αποτελέσματα Καμπυλών βαθμονόμησης BCA**

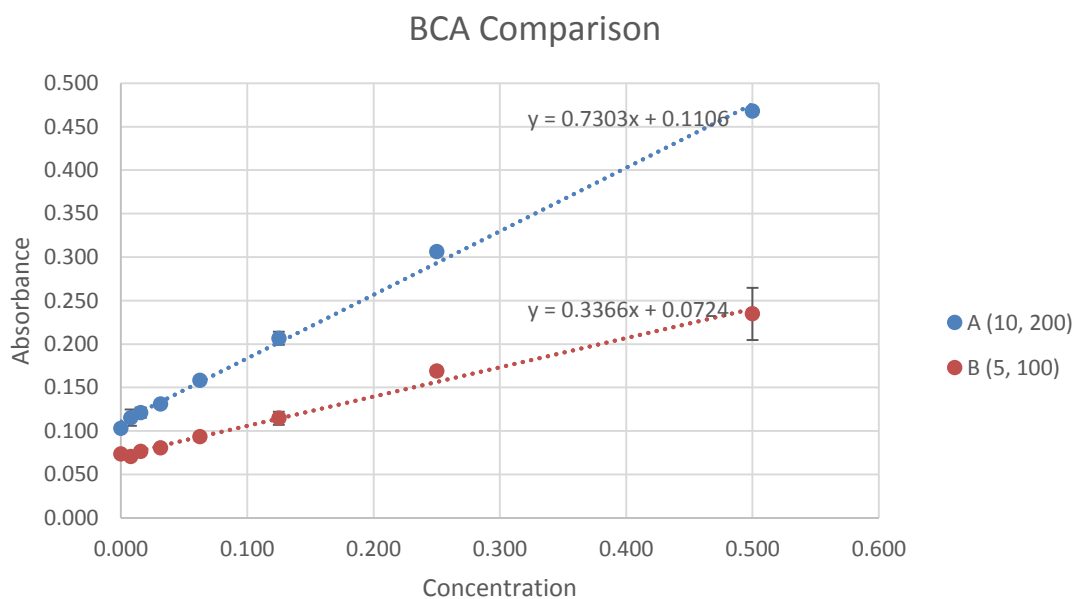
Η στατιστική ανάλυση έδωσε τα παρακάτω αποτελέσματα για κάθε πρωτόκολλο:

T Test	0,5	0,25	0,125	0,063	0,031	0,016	0,008
10-200	4.58E-05	1.84E-04	2.52E-03	2.92E-03	9.27E-03	4.71E-02	1.62E-01
10-100	1.50E-04	2.20E-04	1.32E-03	4.51E-03	3.59E-02	3.35E-02	2.96E-01
10-50	6.80E-04	1.66E-02	7.42E-05	3.89E-03	2.35E-02	2.85E-02	2.58E-02

**Πίνακας 1: Στατιστική Ανάλυση Πρωτοκόλλων BCA**

4. Στη συνέχεια, δοκιμάστηκε το πρωτόκολλο για 5μL πρότυπης πρωτεΐνης με 100μL από το αντιδραστήριο (Working Reagent) για συγκεντρώσεις 0.5, 0.25, 0.125, 1/16, 1/32, 1/64, 1/128 mg/ml.

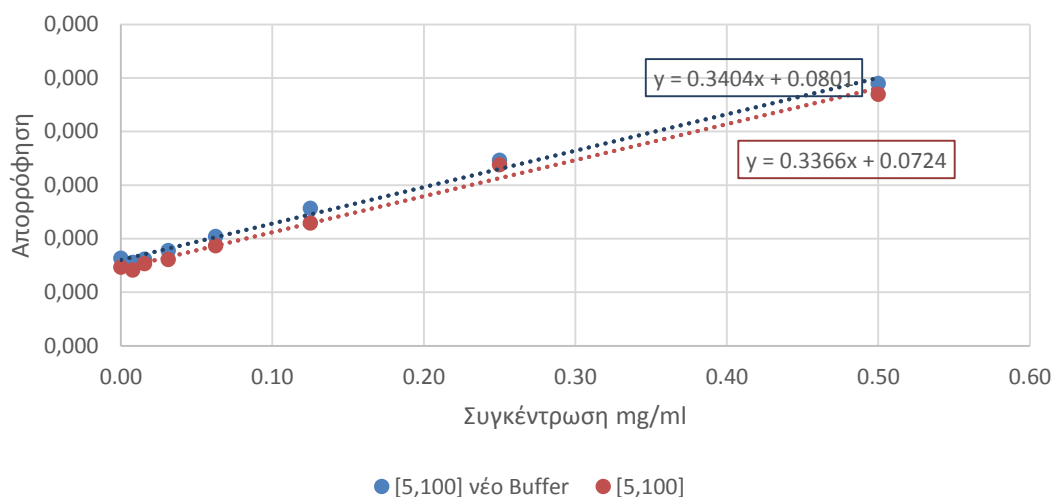
Στο γράφημα παρακάτω παρουσιάζεται συγκριτικά με το βασικό πρωτόκολλο της μεθόδου



**Γράφημα 2: Σύγκριση Πρωτοκόλλων BCA**

5. Για το ίδιο πρωτόκολλο (5μL πρότυπης πρωτεΐνης με 100μL Working Reagent) και για συγκεντρώσεις 1, 0.5, 0.25, 0.125, 1/16, 1/32, 1/64, 1/128 mg/ml δοκιμάστηκε και διαφορετική αναλογία Buffer [2 Lysis Buffer : 3 PBS]





Γράφημα 3: Βαθμονόμηση BCA με διαφορετική αναλογία Buffer

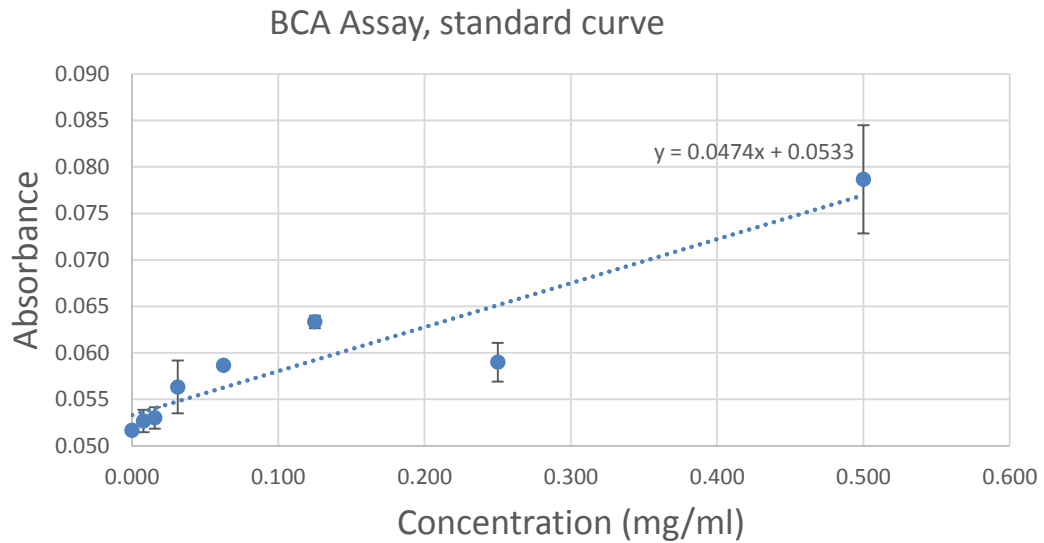
Τα αποτελέσματα από το Student's t-test για αυτά τα δύο πειράματα είναι:

T Test	0,5	0,25	0,125	0,063	0,031	0,016	0,008
5-100(4)	1.64E-02	1.11E-03	1.57E-02	2.15E-02	4.29E-02	7.61E-02	9.17E-02
5-100(5)	5.10E-04	5.80E-04	3.08E-03	2.47E-02	1.45E-01	4.55E-01	2.87E-01

Πίνακας 2: Στατιστική ανάλυση επίδραση Buffer στο BCA

Σημείωση: πραγματοποιήθηκε και BCA assay με από 10μL πρότυπης πρωτεΐνης και 200μL Working Reagent με Buffer [2 Lysis Buffer : 3 PBS], αλλά τα αποτελέσματα δεν ήταν αξιόλογα

6. Για το πρωτόκολλο 2μL πρότυπης πρωτεΐνης με 40μL Working Reagent και για συγκεντρώσεις 0.5, 0.25, 0.125, 1/16, 1/32, 1/64, 1/128 mg/ml τα αποτελέσματα είναι:

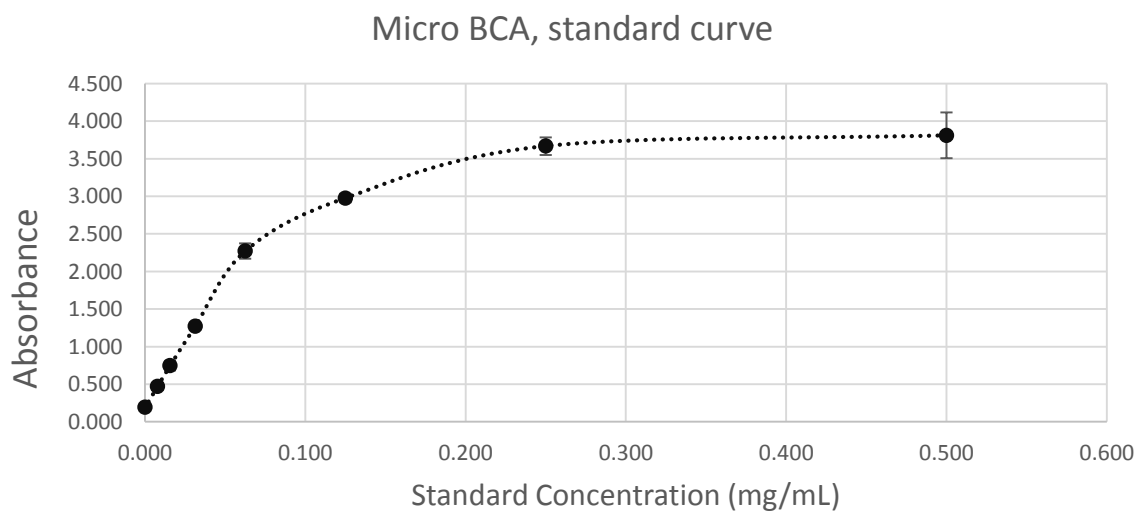


**Γράφημα 4: Πρωτόκολλο BCA για 2μL sample, 40μL WR**

Ωστόσο η στατιστική ανάλυση δεν έδειξε αξιόλογα αποτελέσματα και υπήρχε αρκετό σφάλμα στις μετρήσεις λόγω χρήσης πολύ μικρών ποσοτήτων που καθιστούσαν δύσκολη τη διαχείριση τους με την πιπέτα.

7. Επίσης, όπως αναφέρθηκε σε προηγούμενη παράγραφο αναπτύχθηκε και η μέθοδος Micro BCA ώστε να γίνει η σύγκριση με την BCA μέθοδο.

Τα αποτελέσματα για τις συγκεντρώσεις 0.5, 0.25, 0.125, 1/16, 1/32, 1/64, 1/128 mg/ml είναι:



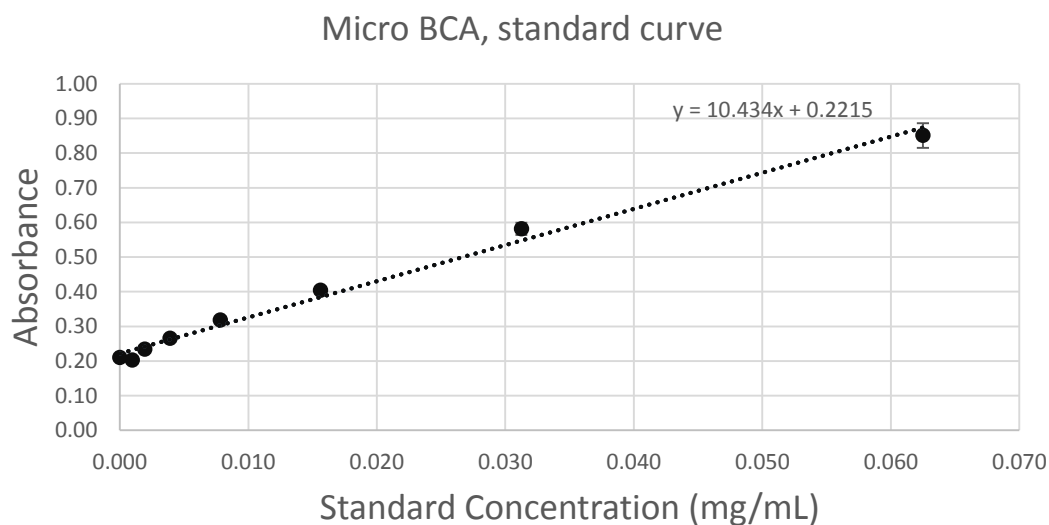
**Γράφημα 5: Καμπύλη βαθμονόμησης Micro BCA**

Με το Student's t-test:

T Test	0,5	0,25	0,125	0,063	0,031	0,016	0,008
0	3.47E-03	5.60E-04	2.10E-04	1.16E-03	9.50E-04	6.24E-03	1.25E-02

Πίνακας 3: Στατιστική ανάλυση βαθμονόμησης Micro BCA

8. Για τις συγκεντρώσεις 1/16, 1/32, 1/64, 1/128, 1/256, 1/512, 1/1024mg/ml



Γράφημα 6: Καμπύλη βαθμονόμησης Micro BCA για χαμηλές συγκεντρώσεις

Μέσω της στατιστικής ανάλυσης προκύπτει:

T Test	0,5	0,25	0,125	0,063	0,031	0,016	0,008
0	7.70E-04	1.00E-04	4.80E-04	2.81E-03	1.24E-02	6.92E-02	2.99E-01

Πίνακας 4: Στατιστική ανάλυση βαθμονόμησης Micro BCA για χαμηλές συγκεντρώσεις

Παρατηρούμε ότι από τα πρωτόκολλα που πραγματοποιήθηκαν για την βελτιστοποίηση της BCA μεθόδου, τα πρωτόκολλα που έδωσαν αξιόλογα αποτελέσματα είναι:

- 10μL πρωτεΐνης, 200μl Working Reagent,
- 10μL πρωτεΐνης, 100μl Working Reagent,

- 10μL πρωτεΐνης, 50μl Working Reagent με χρήση Buffer σε αναλογία Lysis Buffer προς PBS 1/4 και
- 5μL πρωτεΐνης, 100μL Working Reagent με χρήση Buffer σε αναλογία Lysis Buffer προς PBS 2/3.

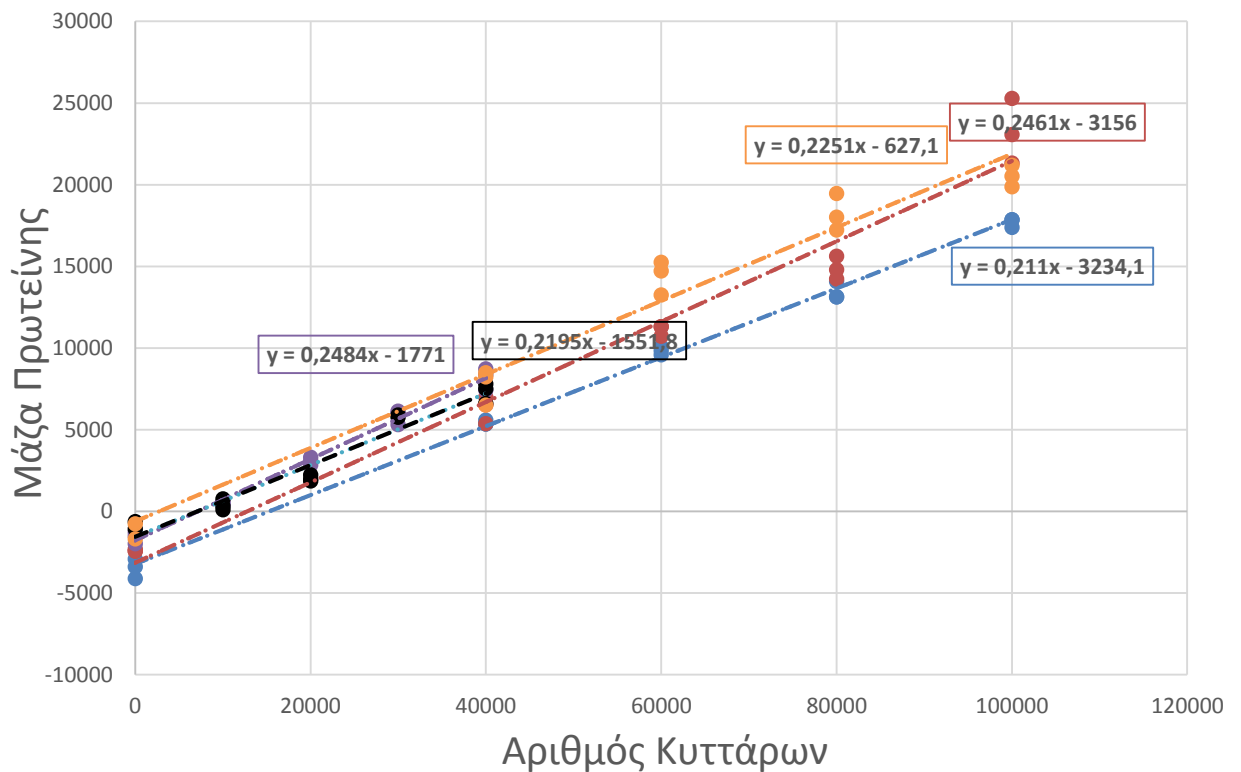
Η Micro BCA είναι μια πιο ευαίσθητη μέθοδος που σαν κατώτατη μετρήσιμη συγκέντρωση θεωρείται η τιμή 1/256mg/ml (περίπου 4 μg/ml).

### 3.2 Εκτίμηση Μάζας Πρωτεΐνης ανά Κύτταρο

Σε αυτή την ενότητα θα παρουσιαστούν τα αποτελέσματα από πειράματα που πραγματοποιήθηκαν για την εύρεση της μάζας (μ) της πρωτεΐνης που υπάρχει σε κάθε κύτταρο. Η ποσοτικοποίηση της μάζας έγινε με την μέθοδο BCA και διεξάχθηκαν 5 πειράματα, όπου κάθε τιμή που μετρήθηκε ήταν σε triplicates.

Το διάγραμμα παρακάτω παρουσιάζει τη μάζα της πρωτεΐνης για κάθε ποσότητα κυττάρων που μετρήθηκε. Οι καμπύλες στο διάγραμμα εξάγονται από τη μέθοδο των ελαχίστων τετραγώνων και η κλίση της κάθε καμπύλης αντιπροσωπεύει τη μάζα της πρωτεΐνης ανά κύτταρο.

Στα πειράματα έχουν χρησιμοποιηθεί οι εξής ποσότητες κυττάρων: 100.000, 80.000, 60.000, 40.000, 0 και 40.000, 30.000, 20.000, 10.000, 0



Γράφημα 7: Υπολογισμός μάζας πρωτεΐνης ανά κύτταρο

Συμπερασματικά, οι τιμές που προκύπτουν για τη μάζα ( $\mu$ ) της πρωτεΐνης ανά κύτταρο είναι:

- 0,2461 ng
- 0,2195 ng
- 0,2484 ng
- 0,2111 ng
- 0,2251 ng

Ο μέσος όρος των οποίων είναι: 0, 23 ng με τυπική απόκλιση: 0,0165 και συντελεστή διακύμανσης: 7%

### 3.3 Μέτρηση Αριθμού Κυττάρων

Ένας από τους βασικούς στόχους αυτής της διπλωματικής εργασίας είναι η βελτιστοποίηση βιολογικών πρωτοκόλλων για πειράματα που σχετίζονται με καλλιέργεια κυττάρων μέσα σε ικριώματα κολλαγόνου. Για να κριθούν

επιτυχημένα τα βιολογικά πειράματα είναι απαραίτητη η γνώση του αριθμού των κυττάρων που εισάγονται ή πολλαπλασιάζονται είτε σε ικρίωματα κολλαγόνου είτε σε φλάσκες ή πλάκες καλλιέργειας για παραδοσιακή καλλιέργεια. Σε αυτό το κεφάλαιο, παρουσιάζονται αποτελέσματα για τη μέτρηση του αριθμού κυττάρων που προκύπτουν μέσω δύο μεθόδων, του αιμοκυτταρόμετρου και της BCA μεθόδου ώστε να αξιολογηθεί ο βέλτιστος τρόπος μέτρησης κυττάρων που έχουν εισαχθεί στο ικρίωμα καλλογόνου.

Για να παρουσιαστούν τα αποτελέσματα για τη μέτρηση κυττάρων με τη χρήση του αιμοκυτταρόμετρου και της BCA μεθόδου χρησιμοποιούμε αποτελέσματα από εισαγωγή κυττάρων μέσα σε δείγματα ικρίωματος. Έγινε εισαγωγή 40.000 κυττάρων σε 4 δείγματα 4mm, εκ των οποίων δύο μετρήθηκαν μέσω της κλασσικής μεθόδου του αιματοκυτταρόμετρου και τα υπόλοιπα με την BCA μεθόδου (η μέτρηση έγινε μία ημέρα μετά την εισαγωγή των κυττάρων στα ικρίωματα).

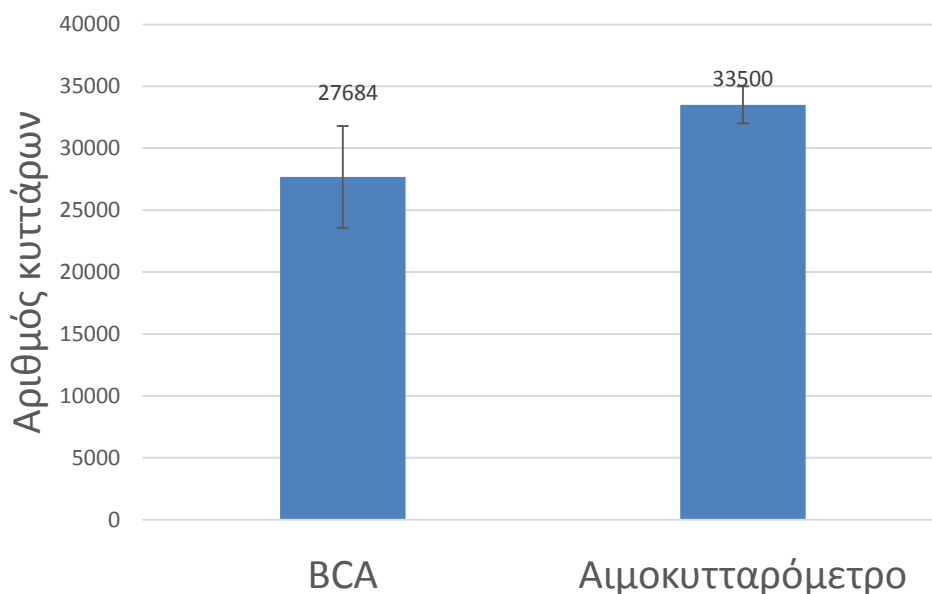
Σύμφωνα με το πρωτόκολλο για μέτρηση κυττάρων με αιμοκυτταρόμετρο που έχει περιγραφεί σε προηγούμενη παράγραφο, για την εισαγωγή 40.000 κυττάρων μέσα στο ικρίωμα μετρήθηκαν τα εξής: 35.000 και 32.000

Ο μέσος όρος αυτών των μετρήσεων είναι: 33500 κύτταρα με τυπική απόκλιση: 2121,32

Τα υπόλοιπα δείγματα, όπως αναφέραμε, μετρήθηκαν με τη μέθοδο BCA και με τη βοήθεια της σχέσης που δόθηκε στο υποκεφάλαιο 2.2.2.2. Για τη μάζα της πρωτεΐνης ανά κύτταρο, όπως θα αποδειχθεί παρακάτω θεωρούμε την τιμή: 0,23ng.

Τα αποτελέσματα που προέκυψαν: 31785 και 23583

Ο μέσος όρος των οποίων είναι: 27684 κύτταρα με τυπική απόκλιση 5800



Γράφημα 8: Σύγκριση BCA και Αιμοκυτταρόμετρου για τη μέτρηση πρωτεϊνών

### 3.4 Εισαγωγή Κυττάρων σε Ικρίωματα Κολλαγόνου

Σε αυτή την παράγραφο θα παρουσιάσουμε τα αποτελέσματα από τα πειράματα εισαγωγής των κυττάρων μέσα σε δείγματα από ικρίωμα κολλαγόνου. Κρίνεται η αποδοτικότητα των πρωτοκόλλων με βάση τον αριθμό των κυττάρων που εισάγονται ύστερα από μία ημέρα στα κύτταρα και του συνολικού αριθμού κυττάρων που τοποθετήθηκε. Τα δείγματα που χρησιμοποιήθηκαν είχαν πάχος 3mm και διάμετρο 4mm και 6mm. Πραγματοποιήθηκαν πειράματα με διαφορετική ποσότητα κυττάρων και σε διαφορετική αναλογία τα οποία διαφοροποιούνταν ανάμεσα στα δύο είδη ικρίωματος (το είδος έγκειται στη διαφορετική διάμετρο των δειγμάτων που κόπηκαν).

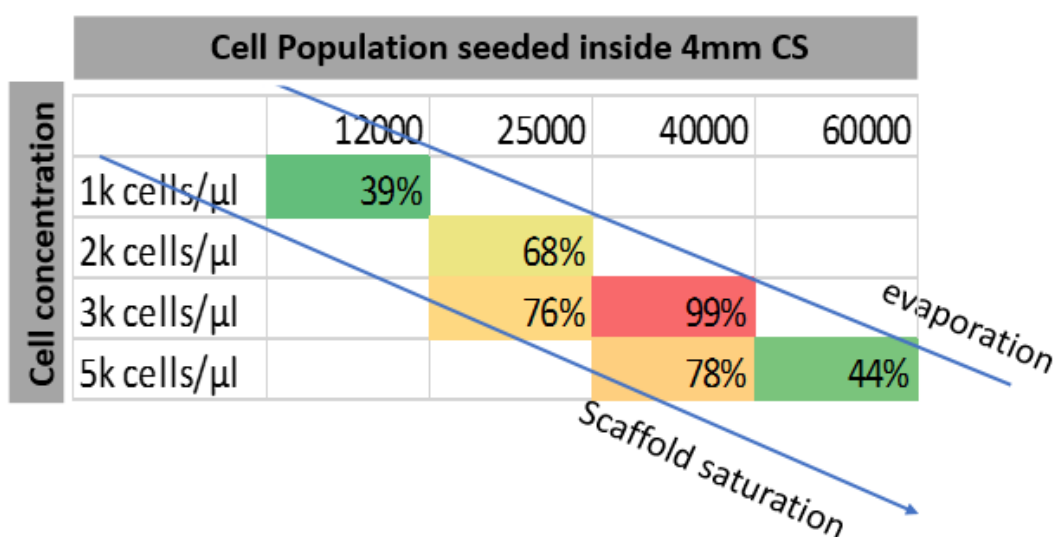
Για τα δείγματα με διάμετρο 4mm πραγματοποιήθηκαν τα πειράματα με αριθμό κυττάρων [12.000, 25.000, 40.000, 60.000] και σε πυκνότητα [1000/μl, 2000/μl, 3000/μl, 5000/μl].

Για τα δείγματα με διάμετρο 6mm πραγματοποιήθηκαν τα πειράματα με αριθμό κυττάρων [25.000, 60.000, 80.000, 100.000] και σε πυκνότητα [1000/μl, 2000/μl, 3000/μl, 5000/μl].

Σημείωση: Οι ποσότητες των κυττάρων και η πυκνότητά τους, επιλέχθηκαν με βάση την ποσότητα του υγρού που μπορεί να δεσμευτεί μέσα στο δείγμα του ικρίωματος. Διαπιστώθηκε ότι για δείγμα με διάμετρο 4mm δεσμεύονται περίπου 9μl υγρού και για δείγμα με διάμετρο 6mm δεσμεύονται περίπου 20μl υγρού. Επίσης, το υγρό για να απορροφηθεί από το δείγμα, χρειάζεται χρόνο της τάξης των 10 λεπτών. Συνεπώς οι ποσότητες που μπορούμε να χρησιμοποιήσουμε δεν μπορούν να είναι πολύ μικρές καθώς θα εξατμιστούν προτού απορροφηθούν από το ικρίωμα και δεν μπορούν να είναι πολύ μεγάλες καθώς το δείγμα μπορεί να δεσμεύσει συγκεκριμένη ποσότητα (scaffold saturation).

Ύστερα από μία μέρα από την εισαγωγή των κυττάρων στα δείγματα του ικρίωματος, συλλέγαμε τα δείγματα και πραγματοποιούσαμε τη λύση τους. Στη συνέχεια, μετρούσαμε με τη μέθοδο BCA την πρωτεΐνη και κατά συνέπεια τον αριθμό των κυττάρων που είχαν καταφέρει να εισαχθούν. Τα αποτελέσματα κρίνονται με βάση τον αριθμό  $\mu$  που παρουσιάστηκε παραπάνω.

Παρουσιάζεται το ποσοστό του αριθμού των κυττάρων που εισήχθη στα δείγματα 4mm και 6mm σε σχέση με τη πυκνότητα των κυττάρων κάθε φορά. Αυτό το ποσοστό το ονομάζουμε ως την απόδοση της εισαγωγής των κυττάρων στο ικρίωμα (seeding efficiency).



Πίνακας 5: Βελτιστοποίηση πρωτοκόλλων εισαγωγής κυττάρων σε ικρίωματα 4mm



		Cell Population seeded inside 6mm CS			
		25000	60000	80000	100000
Cell concentration	1k cells/ $\mu$ l	28%			
	2k cells/ $\mu$ l		21%		
	3k cells/ $\mu$ l		147%	56%	
	5k cells/ $\mu$ l		67%	89%	42%

evaporation

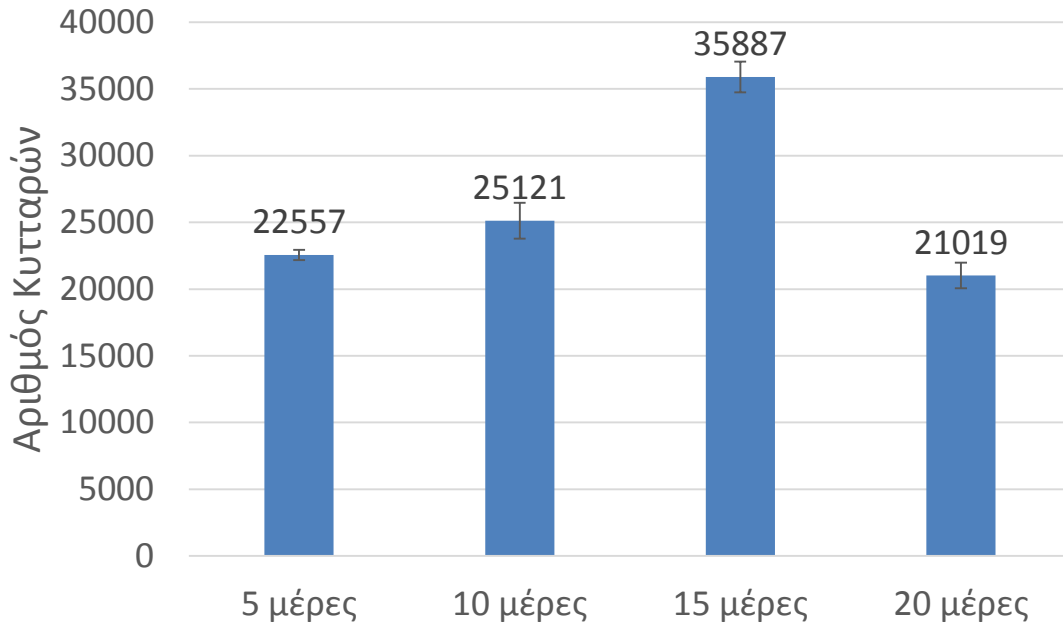
Scaffold saturation

Πίνακας 6: Βελτιστοποίηση πρωτοκόλλων εισαγωγής κυττάρων σε ικρίωματα 6mm

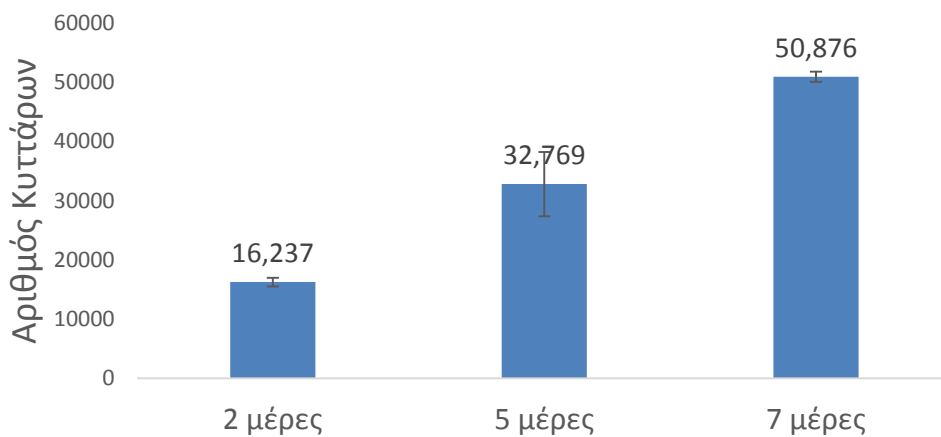
Με κόκκινο χρώμα παρουσιάζεται το βέλτιστο πρωτόκολλο και η χρωματική διαβάθμιση δείχνει τον αμέσως επόμενο βαθμό αποδοτικότητας.

### 3.5 Αποτελέσματα Πειραμάτων Ανάπτυξης κυττάρων

Πραγματοποιήθηκε πείραμα κατά το οποίο μελετήθηκε ο ρυθμός ανάπτυξης των κυττάρων μέσα στο ικρίωμα για διαφορετικές μέρες και συγκεκριμένα για 5, 10, 15 και 20 μέρες. Ταυτόχρονα πραγματοποιήθηκε πείραμα για το ρυθμό ανάπτυξης των κυττάρων και σε πλάκα καλλιέργειας, έτσι ώστε να γίνει η σύγκριση.



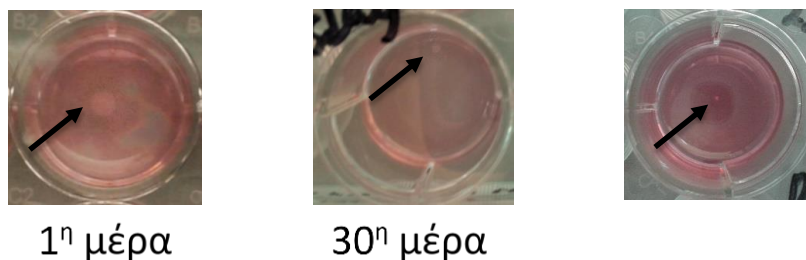
**Γράφημα 9: Αποτελέσματα πειραμάτων ανάπτυξης κυττάρων**



**Γράφημα 10: Ρυθμός ανάπτυξης κυττάρων σε πλάκα καλλιέργειας**

Επίσης έχει διαπιστωθεί πειραματικά ότι το ικρίωμα κατά την καλλιέργεια των κυττάρων συρρικνώνεται σταδιακά. Συγκεκριμένα, ένα δείγμα ικριώματος διαμέτρου 4mm αποικοδομείται μέσα σε 35 ημέρες.

Οι παρακάτω φωτογραφίες δείχνουν πως εξελίσσεται το ικρίωμα την 1<sup>η</sup> μέρα και την 30<sup>η</sup> μέρα.



Εικόνα 14: Εξέλιξη αποικοδόμησης ικρίωματος

## 4. Συζήτηση – Συμπεράσματα

### 4.1 Μέτρηση Κυττάρων

Στην ενότητα αυτή θα παρουσιάσουμε τα συμπεράσματα που εξάγονται από τα αποτελέσματα που συνδέονται με τη μέτρηση των κυττάρων μέσω της μέτρησης της συγκέντρωσης πρωτεΐνης, και συγκεκριμένα μέσω της μεθόδου BCA.

#### 4.1.1 Όρια και ακρίβεια του

Στην ενότητα των αποτελεσμάτων, παρουσιάστηκαν οι τρόποι και οι δοκιμές που έλαβαν χώρα έτσι ώστε να βελτιστοποιηθεί η μέθοδος BCA με την ταυτόχρονη ακριβέστερη μέτρηση, λήψη αξιόπιστων αποτελεσμάτων και χρήση λιγότερης ποσότητας πρωτεΐνης. Με τη χρήση της στατιστικής ανάλυσης t test εκτιμήθηκαν τα μέγιστα και ελάχιστα όρια τα οποία είναι στατιστικά σημαντικά για κάθε μέτρηση.

Για τη μέθοδο BCA, σε όλα τα πρωτόκολλα έχει πραγματοποιηθεί μέτρηση για ανώτερη συγκέντρωση στα 0,5mg/ml και παρατηρείται ότι σε αυτή την τιμή η καμπύλη δεν έχει φτάσει σε κορεσμό και υπάρχει η δυνατότητα να είναι γραμμική και για μεγαλύτερες συγκεντρώσεις. Δεν χαρακτηρίστηκε η συμπεριφορά μεγαλύτερων συγκεντρώσεων, καθώς τα δείγματα άγνωστης συγκέντρωσης που χρησιμοποιήθηκαν σε αυτή τη διπλωματική εργασία δεν παρουσίαζαν συγκέντρωση μεγαλύτερη από τα 0,5mg/ml. Παρατηρήσεις για τα πρωτόκολλα παρουσιάζονται πιο αναλυτικά παρακάτω.

Συγκεκριμένα, στα πρωτόκολλα όπου η ποσότητα της πρότυπης πρωτεΐνης (10μl) διατηρείται σταθερή και μειώνεται η ποσότητα του αντιδραστηρίου (200μl, 100μl, 50μl), οι ελάχιστες ποσότητες που είναι δυνατό να μετρηθούν με επίπεδο σημαντικότητας 5% είναι 1/64mg/ml για τα πρωτόκολλα [10-200] και [10-100] και 1/128mg/ml για το πρωτόκολλο [10-50]. Θεωρώντας επίπεδο σημαντικότητας 1%, για το πρωτόκολλο [10-200] μπορεί να μετρηθεί η συγκέντρωση 1/32mg/ml και για τα πρωτόκολλα [10-100] και [10-50] μπορεί να μετρηθεί η τιμή 1/16mg/ml. Παρατηρείται όμως πως ταυτόχρονα με τη μείωση της ποσότητας του αντιδραστηρίου, μειώνεται και η ευαισθησία, καθιστώντας πιθανότατα δύσκολη την αντιστοίχιση της συγκέντρωσης της άγνωστης πρωτεΐνης στις γνωστές συγκεντρώσεις της πρότυπης πρωτεΐνης.

Όσον αφορά στη μείωση της χρησιμοποιούμενης ποσότητας πρωτεΐνης και αντιδραστηρίου, δηλαδή το πρωτόκολλο [5,100], πραγματοποιήθηκαν δυο διαφορετικά πρωτόκολλα με χρήση δύο διαφορετικών αναλογιών στο Buffer και εκτιμήθηκε η ευαισθησία στην διακριτική ικανότητα αυτών των δυο. Σύμφωνα με το στατιστικό τεστ διακρίνουμε ότι το πιο αξιόπιστο πρωτόκολλο που μας δίνει ακριβή αποτελέσματα με επίπεδο σημαντικότητας 1% είναι το πρωτόκολλο με αναλογία buffer [2 Lysis Buffer : 3 PBS]. Οι ελάχιστες τιμές που είναι δυνατό να μετρηθούν είναι 1/16mg/ml με επίπεδο σημαντικότητας 5% και 1/8mg/ml με επίπεδο σημαντικότητας 1%.

Συνεπώς, τα δύο πρωτόκολλα που συνδυάζουν τις ανάγκες μας για ακρίβεια στις μικρές συγκεντρώσεις αλλά και χρήση μικρότερης ποσότητας πρωτεΐνης (πρότυπης και άγνωστης) και αντιδραστηρίου είναι τα [10-200] με αναλογία Buffer: [1 Lysis Buffer : 4 PBS] και το [5,100] με αναλογία Buffer: [2 Lysis Buffer : 3 PBS].

Σχετικά με τη μέθοδο Micro BCA, για τις συγκεντρώσεις 0.5, 0.25, 0.125, 1/16, 1/32, 1/64, 1/128 που πραγματοποιήθηκαν, παρατηρείται ότι από τη συγκέντρωση 0,25mg/ml η καμπύλη γίνεται γραμμική, καθιστώντας έτσι ως μέγιστη μετρήσιμη τιμή, την συγκέντρωση 1/8mg/ml. Το επόμενο πρωτόκολλο που πραγματοποιήθηκε, χρησιμοποιώντας μικρότερες συγκεντρώσεις,

διαπιστώθηκε ότι η μικρότερη στατιστικά σημαντική συγκέντρωση είναι η 1/256mg/ml.

#### 4.1.2 Εφαρμογές στην Πρωτεομική

Από τα παραπάνω δεδομένα σημειώνεται ότι αν συγκέντρωση του άγνωστου δείγματος αναμένεται ότι είναι πέρα από το ανιχνεύσιμο εύρος είτε προσθέτουμε περισσότερη ποσότητα από το διάλυμα PBS ώστε να αραιωθεί το δείγμα και να χρησιμοποιηθεί η BCA μέθοδος, είτε στην περίπτωση που το δείγμα έχει πολύ μικρή συγκέντρωση χρησιμοποιείται απευθείας η πιο ευαίσθητη μέθοδος του Micro BCA.

Αυτό το συμπέρασμα δίνει τη δυνατότητα στα μέλη του εργαστηρίου Εμβιομηχανικής και Συστημικής Βιολογίας να κρίνουν ποια μέθοδο και στη συνέχεια ποιο πρωτόκολλο θα χρησιμοποιήσουν έτσι ώστε να έχουν τα επιθυμητά αποτελέσματα για το άγνωστο δείγμα και ταυτόχρονα να εξοικονομήσουν ποσότητα πρωτεΐνης από το δείγμα.

Επίσης, η βελτιστοποίηση της BCA μεθόδου συνεισφέρει στο εργαστήριο στα πλαίσια των πειραμάτων πρωτεομικής. Είναι απαραίτητο τα δείγματα που προορίζονται για πρωτεομική να έχουν την ίδια ποσότητα σε πρωτεΐνη, έτσι ώστε τα αποτελέσματα να οφείλονται μόνο σε βιολογικά δεδομένα και όχι σε σφάλμα συγκέντρωσης πρωτεΐνης στο δείγμα. Συνεπώς, η μέθοδος που είναι δυνατό να χρησιμοποιηθεί για τον καθορισμό της συγκέντρωσης της πρωτεΐνης στα δείγματα, είναι η BCA μέθοδος.

## **4.2 Βελτιστοποίηση της εισαγωγής και καλλιέργειας κυττάρων μέσα σε ικρίωμα κολλαγόνου**

Για την αξιολόγηση της αποδοτικότητας των διαφορετικών παραμέτρων (αριθμός κυττάρων, κυτταρική πυκνότητα) στο πρωτόκολλο εισαγωγής των κυττάρων στα ικρίωματα κολλαγόνου, ήταν αναγκαίο πρώτα να αξιολογηθεί η μέθοδος μέτρησης των κυττάρων που εισήχθησαν.

Οι μέθοδοι που χρησιμοποιήθηκαν ήταν ο παραδοσιακός τρόπος μέτρησης κυττάρων με αιματοκυτταρόμετρο και ο έμμεσος τρόπος διαμέσου της μέτρησης της συγκέντρωσης της πρωτεΐνης στο δείγμα. Αυτοί οι δύο μέθοδοι συγκρίθηκαν και αξιολογήθηκε η αποδοτικότητα τους μέσω στατιστικής ανάλυσης (T test). Προέκυψε ότι οι δύο μέθοδοι δίνουν αποτελέσματα για τη μέτρηση του αριθμού των κυττάρων που δεν παρουσιάζουν στατιστική διαφορά μεταξύ τους.

Για το καθορισμό της αποδοτικότητας του πρωτοκόλλου για την εισαγωγή των κυττάρων στο ικρίωμα, χρησιμοποιήθηκε η BCA μέθοδος.

Για τα ικρίωματα με διάμετρο 4mm το βέλτιστο πρωτόκολλο για την εισαγωγή των κυττάρων είναι κατά την εισαγωγή 40.000 κυττάρων σε πυκνότητα 3000κύτταρα/μl. Για τα ικρίωματα διαμέτρου 6mm η πιο αποδοτική μέθοδος είναι η εισαγωγή 60.000 με πυκνότητα 3000κύτταρα/μl.

Η επιλογή των παραμέτρων του κυτταρικού αριθμού και της κυτταρικής πυκνότητας που χρησιμοποιήθηκαν περιορίστηκε από την άμεση εξάτμιση του κυτταρικού εναιωρήματος και από το φαινόμενο του κορεσμού του ικριώματος. Εξάτμιση του κυτταρικού εναιωρήματος συμβαίνει όταν τοποθετείται πολύ μικρή ποσότητα από το εναιώρημα με αποτέλεσμα να μην προλάβει να απορροφήθει από το ικρίωμα (ο χρόνος απορρόφησης είναι περίπου στα 10 λεπτά). Αντίστοιχα, ο κορεσμός του ικριώματος αναφέρεται στη τοποθέτηση μεγάλης ποσότητας κυτταρικού εναιωρήματος, η οποία αδυνατεί να εισχωρήσει και να απορροφηθεί πλήρως από το ικρίωμα λόγω του συγκεκριμένου όγκου υγρού που έχει τη δυνατότητα να απορροφήσει.

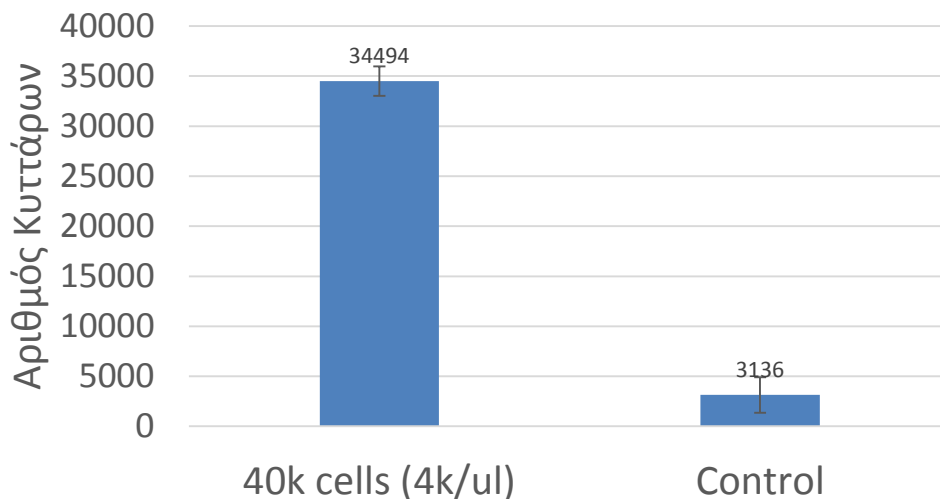
Σημειώνεται σχετικά με τα ικρίωματα διαμέτρου 4mm ότι τα [12k κύτταρα, 1k/μl], [25k κύτταρα, 2k/μl], [40k κύτταρα, 3k/μl], [60k κύτταρα, 5k/μl] έχουν διεξαχθεί 2 φορές, το [25k κύτταρα, 3k/μl] έχει διεξαχθεί 3 φορές και το [40k κύτταρα, 5k/μl] έχει διεξαχθεί 1 φορά. Αντίστοιχα για τα ικρίωματα 6mm, τα [25k κύτταρα, 1k/μl], [60k κύτταρα, 2k/μl], [60k κύτταρα, 5k/μl], [80k κύτταρα, 5k/μl], [100k κύτταρα, 5k/μl], [80k κύτταρα, 3k/μl] έχει διεξαχθεί 1 φορά, ενώ το πρωτόκολλο [60k κύτταρα, 3k/μl] έχει διεξαχθεί 3 φορές. Η επανάληψη των

πρωτοκόλλων περιορίστηκε από την ανάγκη εξοικονόμησης του υλικού για διεξαγωγή παράλληλων πειραμάτων.

Η ανάπτυξη των κυττάρων μέσα στο ικρίωμα αξιολογήθηκε με βάση μετρήσεις που διεξάχθηκαν αντίστοιχα και σε καλλιέργεια σε δισδιάστατη πλάκα για το ίδιο passage των κυττάρων

Παρατηρείται ότι ο ρυθμός ανάπτυξης κυττάρων στο ικρίωμα είναι χαμηλότερος από ότι στην δισδιάστατη καλλιέργεια, πιθανότατα λόγω της έλλειψης στιβαρότητας στο περιβάλλον του ικρίωματος. Ο μέγιστος αριθμός των κυττάρων εμφανίζεται ύστερα από 15 μέρες καλλιέργειας και είναι 35887 κύτταρα, ενώ είχαν εισαχθεί 40.000 κύτταρα. Επίσης μετά το πέρας των 15 ημερών ο αριθμός των κυττάρων αρχίζει και ελαττώνεται, πιθανότατα λόγω της συρρίκνωσης των κυττάρων που οφείλεται στις μηχανικές πιέσεις που ασκούν τα κύτταρα στο ικρίωμα.

Επίσης, κατά τη διαδικασία της λύσης, στα αποτελέσματα που λαμβάνονται από τη μέθοδο BCA διακρίνεται ότι υπάρχει κάποιο σήμα στο δείγμα του ικρίωματος που δεν έχει κύτταρα, αλλά έχει τοποθετηθεί για τον έλεγχο του θορύβου (control).



Γράφημα 11: Ανάκτηση κυττάρων από ικρίωμα

Αυτό μπορεί να οφείλεται είτε σε υπολείμματα από θρεπτικό είτε από πρωτεΐνη του ικρίωματος κολλαγόνου. Ωστόσο, σημειώνεται ότι η διαδικασία της λύσης

καταστρέφει μόνο την μεμβράνη των κυττάρων και αφήνει ανέπαφο το ικρίωμα του κολλαγόνου.



## 5. Παράρτημα

### 5.1 Πρωτόκολλο BCA Μεθόδου

#### Υλικά:

- Δείγμα πρωτεΐνης άγνωστης συγκέντρωσης
- BCA kit (Pierce 23227)
- BSA protein standards 2mg/ml in PBS (Pierce)

#### Εξοπλισμός:

Biochrom Asys Expert Plus Microplate Reader (Systems Bioengineering Group Lab)

#### Διαδικασία:

- Προετοιμασία κοινού διαλύματος αραιώσης (buffer) που αποτελείται από PBS και Lysis Buffer (ProtATonce Ltd). Η αναλογία αυτών των δύο είναι 1/4 Lysis Buffer και 3/4 PBS της συνολικής ποσότητας του buffer.
- Προετοιμάζονται 3 σειρές (triplicates) από διαδοχικές αραιώσεις της πρότυπης πρωτεΐνης από το kit (0.5, 0.25, 0.125, 1/16, 1/32, 1/64 mg/ml) διαλύοντας την με την αντίστοιχη ποσότητα buffer
  - Οι πρότυπες πρωτεΐνες θα πρέπει να διαλύονται στο ίδιο buffer με το δείγμα της άγνωστης συγκέντρωσης πρωτεΐνης που πρόκειται να μετρηθεί
- Ύστερα από τις διαδοχικές αραιώσεις, η ποσότητα της πρότυπης πρωτεΐνης και της άγνωστης πρωτεΐνης του δείγματος θα είναι 10 μl
- Προετοιμάζονται 200 μl από τα αντιδρώντα (Working Reagent) για κάθε δείγμα (πρότυπης και άγνωστο) που θα μετρηθεί
  - Προστίθενται 50 μέρη από το Working Reagent A και 1 μέρος από το Working Reagent B. Γίνεται ανάμειξη μέχρι το μείγμα να γίνει ομοιογενές
- Προστίθενται 200 μl σε κάθε δείγμα και γίνεται ανάμειξη ελαφρά με τη βοήθεια ενός plate shaker για 30'' δευτερόλεπτα

- Τα δείγματα επωάζονται για 30' λεπτά στους 37° C
- Η μέτρηση γίνεται με απορρόφηση μήκους κύματος 562nm σε plate reader
  - Η επεξεργασία των αποτελεσμάτων απαιτεί πρώτα τη μέτρηση της πρότυπης πρωτεΐνης με σκοπό της εξαγωγή της πρότυπης καμπύλης

## 5.2 Πρωτόκολλο Micro BCA Μεθόδου

### Υλικά:

- Δείγμα πρωτεΐνης άγνωστης συγκέντρωσης
- Micro BCA kit (Pierce 23235)
- BSA protein standards 2mg/ml in PBS (Pierce)

### Εξοπλισμός:

Biochrom Asys Expert Plus Microplate Reader (Systems Bioengineering Group Lab)

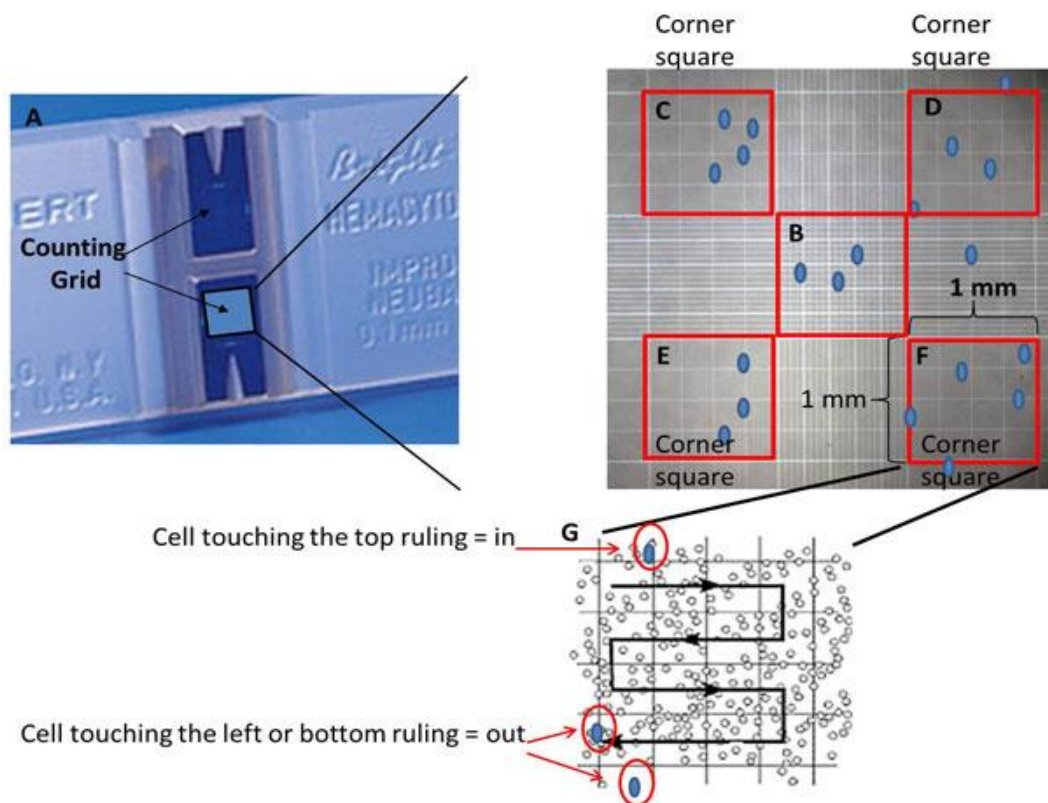
### Διαδικασία:

- Προετοιμασία κοινού διαλύματος αραιώσης (buffer) που αποτελείται από PBS και Lysis Buffer (ProtATonce Ltd). Η αναλογία αυτών των δύο είναι 1/4 Lysis Buffer και 3/4 PBS της συνολικής ποσότητας του buffer.
- Προετοιμάζονται 3 σειρές (triplicates) από διαδοχικές αραιώσεις της πρότυπης πρωτεΐνης από το kit (0.5, 0.25, 0.125, 1/16, 1/32, 1/64, 1/128 mg/ml και 1/16, 1/32, 1/64, 1/128, 1/256, 1/512, 1/1024 mg/ml ) διαλύοντας την με την αντίστοιχη ποσότητα buffer
  - Οι πρότυπες πρωτεΐνες θα πρέπει να διαλύονται στο ίδιο buffer με το δείγμα της άγνωστης συγκέντρωσης πρωτεΐνης που θέλουμε να μετρήσουμε
- Ύστερα από τις διαδοχικές αραιώσεις, η ποσότητα της πρότυπης πρωτεΐνης και της άγνωστης πρωτεΐνης του δείγματος θα είναι 150 μl

- Προετοιμάζονται 150 μl από τα αντιδρώντα (Working Reagent) για κάθε δείγμα (πρότυπης και άγνωστο) που θα μετρηθεί
  - Προστίθενται 25 μέρη από το Working Reagent A, 24 μέρη από το Working Reagent B και 1 μέρος από το Working Reagent C. Γίνεται ανάμειξη μέχρι το μείγμα να γίνει ομοιογενές
- Προστίθενται 150 μl σε κάθε δείγμα και γίνεται ανάμειξη ελαφρά με τη βοήθεια ενός plate shaker για 30'' δευτερόλεπτα
- Τα δείγματα επωάζονται για 2 ώρες στους 37° C
- Η μέτρηση γίνεται με απορρόφηση μήκους κύματος 562nm σε plate reader
  - Η επεξεργασία των αποτελεσμάτων απαιτεί πρώτα τη μέτρηση της πρότυπης πρωτεΐνης με σκοπό της εξαγωγή της πρότυπης καμπύλης

### 5.3 Μέτρηση με Αιμοκυτταρόμετρο

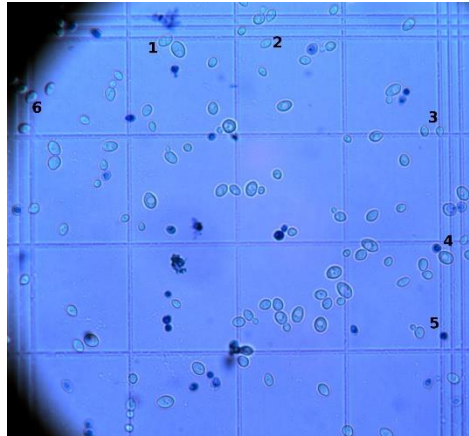
- Αρχικά διασφαλίζεται ότι τόσο το hemocytometer όσο και η καλυπτρίδα είναι καθαρά, απομακρύνοντας τυχόν σωματίδια ή σκόνη με ειδικό χαρτί
- Ύστερα από την φυγοκέντριση, σπάμε το ίζημα των κυττάρων και προκύπτει το ελαιώρημα από όπου θα συλλέξουμε το δείγμα. Το ελαιώρημα αυτό πρέπει να αναμειχθεί καλά ώστε να εξασφαλίσουμε ότι το δείγμα θα είναι αντιπροσωπευτικό. Θα πρέπει να χρησιμοποιείται κατάλληλη αραιώση του μίγματος σε σχέση με τον αριθμό των κυττάρων που πρόκειται να μετρηθούν, ώστε το δείγμα να μην είναι πολύ γεμάτο με κύτταρα και είναι δύσκολο να μετρήσει, αλλά όχι και πολύ αραιό
- Αφού τοποθετηθεί η καλυπτρίδα πάνω από την επιφάνεια της μέτρησης γεμίζουμε πλήρως την επιφάνεια με περίπου 10 μl από το ελαιώρημα του δείγματος
- Μετράμε όπως φαίνεται στο παρακάτω σχήμα



Εικόνα 15: Μέτρηση κυττάρων με αιμοκυτταρόμετρο

Και λαμβάνοντας υπόψη τον αριθμό  $\mu$  που μετράμε, την αραιώση και τον αρχικό όγκο, υπολογίζουμε τον αριθμό των κυττάρων στο αρχικό εναιώρημα

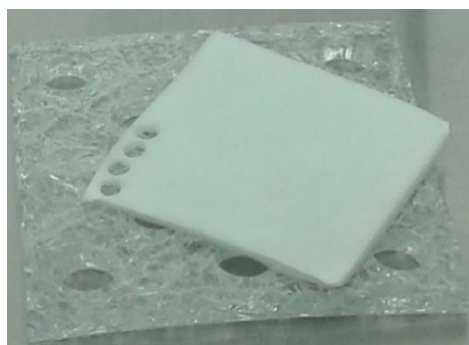
- Για να γίνει διάκριση μεταξύ νεκρών και ζωντανών κυττάρων, συχνά το δείγμα αραιώνεται με μία χρωστική, όπως είναι το Trypan Blue.
- (Αυτή η μέθοδος χρώσης, χρησιμοποιεί διαζόχρωμα (diazo dye) που διαπερνά επιλεκτικά τις κυτταρικές μεμβράνες των νεκρών κυττάρων, χρωματίζοντας τες μπλε, ενώ δεν απορροφάται από τις μεμβράνες των ζωντανών κυττάρων. Όταν παρατηρείται κάτω από ένα μικροσκόπιο, τα νεκρά κύτταρα εμφανίζονται με σκούρο μπλε χρώμα, όπως φαίνεται στην εικόνα).



Εικόνα 16: Διάκριση νεκρών από ζωντανά κύτταρα

#### 5.4 Διαδικασία Για Κοπή Μικρά Κυλινδρικά Ικρίωματα Κολλαγόνου

- Ψεκάζουμε το Hood (Laminar Flow Cabinet) με 70% αιθανόλη
- Ψεκάζουμε με 70% αιθανόλη το στήριγμα από plexiglass που έχει κατασκευαστεί ειδικά για αυτή την διαδικασία (το στήριγμα διαθέτει ειδικές οπές ώστε να διευκολύνεται η κοπή των κυλινδρικών δειγμάτων)
- Τοποθετούμε το φύλλο ικρίωματος στο στήριγμα με την γυαλιστερή πλευρά προς τα κάτω
- Με την χρήση biopsy punch διαμέτρου 4mm ή 6mm κόβουμε τα δείγματα με αργή περιστροφική κίνηση, χωρίς να ασκείται κάθετη δύναμη στο φύλλο ικρίωματος
- Συλλέγουμε τα δείγματα και τα αποθηκεύουμε σε falcon tubes



Εικόνα 17: Διαδικασία προετοιμασίας δειγμάτων ικρίωματος

## 5.5 Διαδικασία Για Την Εισαγωγή Κυττάρων Στα Ικρίωματα

### 5.5.1 Διαδικασία για την αποκόλληση κυττάρων από την φλάσκα

#### ▪ Υλικά:

- PBS, sterile, φυλάσσεται στους 4°C.
- DMEM++ cell culture medium (DMEM plus 10% FBS, 1% penicillin/streptomycin)
  - DMEM, high glucose
  - Fetal bovine serum, φυλάσσεται στους -20°C πριν προστεθεί στο DMEM.
  - Penicillin/streptomycin, φυλάσσεται στους -20°C πριν προστεθεί στο DMEM.
- Trypsin EDTA), φυλάσσεται στους 4°C σε aliquots όταν χρησιμοποιείται

#### Εξοπλισμός

- Water bath
- Biological Hood
- Cell incubator (CO<sub>2</sub> 5%, 37° C)
- Microscope
- Hemocytometer
- Centrifuge

#### Διαδικασία

- Προετοιμασία του bio-hood: “UV” για 15 λεπτά και ψεκάζουμε με 70% αιθανόλη
- Θερμαίνουμε το PBS, την trypsin/EDTA και το θρεπτικό (cell medium aliquots) στο water bath στους 37°C για 10 min.
- Ελέγχουμε το Confluency της φλάσκας που γίνεται η καλλιέργεια, Confluency: το ποσοστό της φλάσκας που είναι καλυμμένη με κύτταρα.

- Προχωράμε στην κυτταρική διαίρεση (cell splitting) όταν η κυτταρική καλλιέργεια είναι 70-80% confluent.

### 5.5.2 Αποκόλληση κυττάρων

- Μεταφέρουμε την φλάσκα (T 75) από το bio-hood και απορροφάμε το υπάρχον DMEM
- Προσθέτουμε 4 ml PBS και ανακατεύουμε ελαφρά. Η πλύση αυτή απομακρύνει υπολείμματα DMEM, το οποίο απενεργοποιεί trypsin/EDTA activity.
- Απορροφάμε πάλι το PBS και προσθέτουμε 2 ml trypsin/EDTA και αφήνουμε την φλάσκα να επωαστεί στους 37°C στον incubator για 10' λεπτά.
- Ύστερα από την επώαση χτυπάμε ελαφρά την φλάσκα ώστε να αποκολληθούν όσα κύτταρα δεν έχουν ήδη αποκολληθεί και το ελέγχουμε στο μικροσκόπιο (τα αποκολλημένα κύτταρα φαίνονται σαν σφαιρίδια που επιπλέουν στο θρεπτικό
- Αν δεν έχουν αποκολληθεί τα αφήνουμε να επωαστούν για 2' λεπτά ακόμα
- Στην συνέχεια προσθέτουμε 3 ml cell culture medium, δηλαδή τόση ποσότητα ώστε να απενεργοποιηθεί η δράση της trypsin/EDTA
- Ανακατεύουμε το κυτταρικό εναιώρημα, απορροφώντας και ξανά-απορροφώντας περίπου για 5 φορές, αποφεύγοντας τις φουσκάλες
- Μεταφέρουμε το κυτταρικό εναιώρημα σε ένα 15 mL conical tubes.

### 5.5.3 Μέτρηση Κυττάρων

- Γίνεται φυγοκέντριση του conical tubes που περιέχει το κυτταρικό εναιώρημα στις 1500 rpm (δες 380 g), για 10' λεπτά, στους 25°C
- Όταν γίνει η φυγοκέντριση μεταφέρουμε το conical tube στο biohood και συλλέγουμε το υπερκείμενο (supernatant)
- Προσθέτουμε 1ml DMEM έτσι ώστε να σπάσουμε το ίζημα (pellet) και να δημιουργηθεί πάλι το εναιώρημα
- Προσθέτουμε άλλα 3 ml DMEM ώστε το μείγμα να φτάσει τα 4 ml και ανακατεύουμε αρκετές φορές

- Συλλέγουμε και μεταφέρουμε 40  $\mu\text{L}$  σε ένα tube 0,6 ml και το χρησιμοποιούμε για τη μέτρηση του συνολικού αριθμού κυττάρων
- Γίνεται φυγοκέντριση του κυτταρικού εναιωρήματος στις 1500 rpm (δες 380 g), για 10' λεπτά, στους 25°C
- Κατά τη διάρκεια της φυγοκέντριση μετράμε τα κύτταρα με τη μέθοδο που περιεγράφηκε παραπάνω
- Γνωρίζοντας τον συνολικό αριθμό των κυττάρων, μεταφέρουμε το conical tube στο bio-hood και προσθέτουμε τόση ποσότητα DMEM όση επιθυμούμε να είναι η πυκνότητα των κυττάρων στο κυτταρικό εναιώρημα και ταυτόχρονα σπάμε και το ίζημα των κυττάρων.

#### 5.5.4 Εισαγωγή των κυττάρων στο ικρίωμα κολλαγόνου

- Καλύπτουμε τα well (πηγάδια) ενός 12-well plate με 300  $\mu\text{L}$  από 0.2% αγαρόζης
- Ανακινούμε ελαφρά την πλάκα έτσι ώστε η αγαρόζη να καλύψει πλήρως το well
- Αφήνουμε το 12-well plate μέσα στο bio-hood κατά τη διάρκεια της νύχτας ώστε να στεγνώσει (χωρίς να καλύπτεται η πλάκα με το καπάκι)
  - Η δράση της αγαρόζης είναι ότι αποτρέπει τα κύτταρα να 'κολλήσουν' στην πλάκα και προτιμούν να προσκολληθούν στο ικρίωμα κολλαγόνου
- Στο τελευταίο βήμα της αποκόλλησης κυττάρων από την φλάσκα, προσθέτουμε στο ίζημα που προκύπτει από την δεύτερη φυγοκέντριση τόση ποσότητα DMEM όση απαιτείται για να πετύχουμε την επιθυμητή πυκνότητα των κυττάρων
  - Οι πυκνότητες των κυττάρων που χρησιμοποιήσαμε σε αυτή την διπλωματική εργασία ήταν 1k cells/ $\mu\text{l}$ , 2k cells/ $\mu\text{l}$ , 3k cells/ $\mu\text{l}$ , 5k cells/ $\mu\text{l}$  και για διαφορετικές ποσότητες κυττάρων ανάλογα με το μέγεθος του ικρίωματος που χρησιμοποιούσαμε (4mm ή 6mm διάμετρο στο ικρίωμα)
- Τοποθετούμε μία σταγόνα από το κυτταρικό εναιώρημα (η ποσότητα της σταγόνας εξαρτάται από το πείραμα) σε κάθε well του 12-well plate



- Με μία χειρουργική τσιμπίδα παίρνουμε το κυλινδρικό δείγμα ικρίωματος, που έχει προηγουμένως κοπεί και το τοποθετούμε με την Mat πλευρά πάνω στην σταγόνα
- Καθώς το ικρίωμα έρχεται σε επαφή με την σταγόνα, το κυτταρικό εναιώρημα απορροφάται σταδιακά εντός του ικρίωματος. Αυτή η διαδικασία απαιτεί περίπου 10 λεπτά
- Επαναλαμβάνεται αυτή η διαδικασία για όλα τα επιθυμητά ικρίωματα
- Έπειτα τοποθετείται το 12-well plate στον Incubator για περίπου 1 ώρα (37°C, 5% CO<sub>2</sub>)
  - Αυτός ο χρόνος επιτρέπει στα κύτταρα να δεθούν στο ικρίωμα
- Ύστερα από 1 ώρα επώαση προσθέτουμε 500ul DMEM σε κάθε well για κάθε ικρίωμα
- Επιστρέφουμε το 12-well plate στον incubator για την συνέχεια της καλλιέργειας
- Η αλλαγή θρεπτικού γίνεται κάθε 2 με 3 ημέρες

## 5.6 Παρασκευή Διαλύματος Κολλαγενάσης

### Υλικά:

- Collagenase stock (10mg/ml)
- DMEM++ (10% FBS και 1% penicillin/streptomycin)

### Διαδικασία:

- Ξεπαγώνουμε ένα aliquote κολλαγενάσης με συγκέντρωση 10mg/ml
- Για κάθε δείγμα ικρίωματος, προετοιμάζουμε διάλυμα 100ul σε Eppendorf tube 0,6ml. Η κολλαγενάση επιθυμώ να έχει συγκέντρωση 2mg/ml, οπότε διαλύεται σε DMEM++
  - Στην ποσότητα DMEM++ που προστίθεται, λαμβάνεται υπόψη και η ποσότητα που έχει ήδη παγιδευτεί στο δείγμα κατά τη διάρκεια της καλλιέργειας

**Αποικοδόμηση του Ικριώματος**

- Παίρνουμε το 12-well plate από τον incubator και το τοποθετούμε στο bio-hood
- Λαμβάνουμε το θρεπτικό που υπάρχει γύρω από κάθε δείγμα σε κάθε well
- Τοποθετούμε κάθε δείγμα ξεχωριστά σε Eppendorf tube 0,6ml που περιέχουν το διάλυμα της κολλαγενάσης, με τη βοήθεια μιας χειρουργικής τσιμπίδας

## 6. Βιβλιογραφία

### 6.1 Άρθρα σε Επιστημονικά Περιοδικά

- 1 Yannas, I. V.; Tzeranis, D. S.; Harley, B. A.; So, P. T. C. (2010): Biologically active collagen-based scaffolds: advances in processing and characterization. In *Philos Trans A Math Phys Eng Sci* 368 (1917)
2. Tomasek, James J.; Gabbiani, Giulio; Hinz, Boris; Chaponnier, Christine; Brown, Robert A. (2002): Myofibroblasts and mechano-regulation of connective tissue remodelling. In *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 3 (5)
- 3 Soller, Eric C.; Tzeranis, Dimitrios S.; Miu, Kathy; So, Peter T. C.; Yannas, Ioannis V. (2012): Common features of optimal collagen scaffolds that disrupt wound contraction and enhance regeneration both in peripheral nerves and in skin. In *Biomaterials* 33 (19), pp. 4783–4791(Tomaseketal.È
- 4 Rhee, Sangmyung; Grinnell, Frederick (2007): Fibroblast mechanics in 3D collagen matrices. In *Adv. Drug Deliv. Rev.* 59 (13), pp. 1299–1305
- 5 Pampaloni, Francesco; Reynaud, Emmanuel G.; Stelzer, Ernst H. K. (2007): The third dimension bridges the gap between cell culture and live tissue. In *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 8 (10), pp. 839–845
- 6 Ma, L. (2003): Collagen/chitosan porous scaffolds with improved biostability for skin tissue engineering. In *Biomaterials* 24 (26), pp. 4833–4841
- 7 Kleinman, Hynda K.; Philp, Deborah; Hoffman, Matthew P. (2003): Role of the extracellular matrix in morphogenesis. In *Current Opinion in Biotechnology* 14 (5), pp. 526–532
- 8 Kim, Taek Gyoung; Shin, Heungsoo; Lim, Dong Woo (2012): Biomimetic Scaffolds for Tissue Engineering. In *Adv. Funct. Mater.* 22 (12), pp. 2446–2468
- 9 Green, J. Angelo; Yamada, Kenneth M. (2007): Three-dimensional microenvironments modulate fibroblast signaling responses. In *Adv. Drug Deliv. Rev.* 59 (13), pp. 1293–1298
- 10 Glowacki, Julie; Mizuno, Shuichi (2008): Collagen scaffolds for tissue engineering. In *Biopolymers* 89 (5), pp. 338–344
- 11 Gentleman, Eileen; Lay, Andrea N.; Dickerson, Darryl A.; Nauman, Eric A.; Livesay,

- Glen A.; Dee, Kay C. (2003): Mechanical characterization of collagen fibers and scaffolds for tissue engineering. In *Biomaterials* 24 (21), pp. 3805–3813
- 12 Frantz, Christian; Stewart, Kathleen M.; Weaver, Valerie M. (2010): The extracellular matrix at a glance. In *J. Cell. Sci.* 123 (Pt 24), pp. 4195–4200
- 13 Damianova, Ralica; Stefanova, Nadezhda; Cukierman, Edna; Momchilova, Albena; Pankov, Roumen (2008): Three-dimensional matrix induces sustained activation of ERK1/2 via Src/Ras/Raf signaling pathway. In *Cell Biol. Int.* 32 (2), pp. 229–234
- 14 Chevallay, B.; Herbage, D. (2000): Collagen-based biomaterials as 3D scaffold for cell cultures. Applications for tissue engineering and gene therapy. In *Med. Biol. Eng. Comput.* 38 (2), pp. 211–218
- 15 Bodine, S. C.; Latres, E.; Baumhueter, S.; Lai, V. K.; Nunez, L.; Clarke, B. A. et al. (2001): Identification of ubiquitin ligases required for skeletal muscle atrophy. In *Science* 294 (5547), pp. 1704–1708
- 16 Badylak, Stephen F. (2007): The extracellular matrix as a biologic scaffold material. In *Biomaterials* 28 (25), pp. 3587–3593
- 17 Cell interactions with three-dimensional matrices, Edna Cukierman, Roumen Pankov, and Kenneth M Yamada. *Current Opinion in Cell Biology* 14(5):633–640 (2002)
- 18 Alsop, Aurora T.; Pence, Jacquelyn C.; Weisgerber, Daniel W.; Harley, Brendan A. C.; Bailey, Ryan C. (2014): Photopatterning of vascular endothelial growth factor within collagen-glycosaminoglycan scaffolds can induce a spatially confined response in human umbilical vein endothelial cells. In *Acta Biomater* 10 (11), pp. 4715–4722
- 19 Banks, Jessica M.; Mozdzen, Laura C.; Harley, Brendan A. C.; Bailey, Ryan C. (2014): The combined effects of matrix stiffness and growth factor immobilization on the bioactivity and differentiation capabilities of adipose-derived stem cells. In *Biomaterials* 35 (32), pp. 8951–8959
- 20 Caliarì, Steven R.; Gonnerman, Emily A.; Grier, William K.; Weisgerber, Daniel W.; Banks, Jessica M.; Alsop, Aurora J. et al. (2015): Collagen scaffold arrays for combinatorial screening of biophysical and biochemical regulators of cell behavior. In *Adv Healthc Mater* 4 (1), pp. 58–64
- 21 Caliarì, Steven R.; Harley, Brendan A. C. (2014): Collagen-GAG scaffold biophysical properties bias MSC lineage choice in the presence of mixed soluble signals. In *Tissue Eng Part A* 20 (17-18), pp. 2463–2472

- 22 Caliari, Steven R.; Harley, Brendan A. C. (2014): Structural and biochemical modification of a collagen scaffold to selectively enhance MSC tenogenic, chondrogenic, and osteogenic differentiation. In *Adv Healthc Mater* 3 (7), pp. 1086–1096
- 23 GP Duffy, TM McFadden, EM Byrne, SL Gill, E Farrell, FJ O'Brien, Towards in vitro vascularisation of collagen-GAG scaffolds, *European cells & materials* 12 (21), 15-30
- 24 Michael J. Berridge, "Cell Signalling Pathways", Cell Signalling Biology, Module 2, 2012
- 25 Dimitrios S. Tzeranis, Imaging Studies of Peripheral Nerve Regeneration Induced by Porous Collagen Biomaterials, Massachusetts Institute of Technology, September 2013
- 26 Στυλιανού Ανδreas, Επίδραση Οπτικής Ακτινοβολίας στην Τοπολογία Κολλαγόνου με Χρήση Απεικονιστικής Μικροσκοπίας Ατομικής Δύναμης και Σάρωσης Ηλεκτρονίων, ΕΜΠ, Απρίλιος 2014
- 27 Kew SJ<sup>1</sup>, Gwynne JH, Enea D, Abu-Rub M, Pandit A, Zeugolis D, Brooks RA, Rushton N, Best SM, Cameron RE, Regeneration and repair of tendon and ligament tissue using collagen fibre biomaterials, *Acta Biomater.* 2011 Sep

## 6.2 Βιβλία- Παραδόσεις

- 28 Λ. Αλεξόπουλος, "Σημειώσεις μαθήματος «Εμβιομηχανική και Βιοϊατρική Τεχνολογία», Κεφάλαιο 2: Εισαγωγή στη Βιολογία", Ε.Μ.Π., Αθήνα 2011
- 29 Gomperts B.D., Tatham P.E.R., Kramer I.M. Signal Transduction 2002
- 30 Λ. Αλεξόπουλος, "Σημειώσεις μαθήματος «Εμβιομηχανική και Βιοϊατρική Τεχνολογία», Κεφάλαιο 6: Συστημική Βιολογία (Systems Biology)", Ε.Μ.Π., Αθήνα 2011.

### 6.3 Ισότοποι

- 31 [http://en.wikipedia.org/wiki/Cell\\_signaling](http://en.wikipedia.org/wiki/Cell_signaling)
- 32 [http://en.wikipedia.org/wiki/Signal\\_transduction](http://en.wikipedia.org/wiki/Signal_transduction)
- 33 [http://en.wikipedia.org/wiki/Tissue\\_engineering](http://en.wikipedia.org/wiki/Tissue_engineering)
- 34 <http://en.wikipedia.org/wiki/Fibroblast>
- 35 [http://genome.yale.edu/resources/protocols/protein/685\\_162459\\_BCA.pdf](http://genome.yale.edu/resources/protocols/protein/685_162459_BCA.pdf)
- 36 [http://wolfson.huji.ac.il/purification/PDF/Protein\\_Quantification/PIERCE\\_BCA\\_Micro\\_KIT.pdf](http://wolfson.huji.ac.il/purification/PDF/Protein_Quantification/PIERCE_BCA_Micro_KIT.pdf)
- 37 <http://bitesizebio.com/13687/cell-counting-with-a-hemocytometer-easy-as-1-2-3/>
- 38 <http://en.wikipedia.org/wiki/Hemocytometer>
- 39 <https://www.microscopyu.com/articles/formulas/measurements.html>
- 40 [http://braukaiser.com/wiki/index.php?title=Microscope\\_use\\_in\\_brewing](http://braukaiser.com/wiki/index.php?title=Microscope_use_in_brewing)