



Εθνικό Μετσόβιο Πολυτεχνείο
Σχολή Μηχανολόγων Μηχανικών

ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΕΜΒΙΟΜΗΧΑΝΙΚΗΣ ΚΑΙ ΣΥΣΤΗΜΙΚΗΣ
ΒΙΟΛΟΓΙΑΣ
ΤΟΜΕΑΣ ΜΗΧΑΝΟΛΟΓΙΚΩΝ ΚΑΤΑΣΚΕΥΩΝ ΚΑΙ ΑΥΤΟΜΑΤΟΥ ΕΛΕΓΧΟΥ

ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ

*Σχεδιασμός και Κατασκευή Συσκευής για
Αυτοματοποιημένη Μελέτη Κυττάρων Μέσω
Τρισδιάστατης Καλλιέργειας σε Πορώδη
Ικρίώματα Κολλαγόνου*

Πρέζα Ιωάννα

**Επιβλέπων: Επίκουρος Καθηγητής
Λεωνίδας Αλεξόπουλος**

Αθήνα 2015



Εθνικό Μετσόβιο Πολυτεχνείο
Σχολή Μηχανολόγων Μηχανικών

ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΕΜΒΙΟΜΗΧΑΝΙΚΗΣ ΚΑΙ ΣΥΣΤΗΜΙΚΗΣ
ΒΙΟΛΟΓΙΑΣ
ΤΟΜΕΑΣ ΜΗΧΑΝΟΛΟΓΙΚΩΝ ΚΑΤΑΣΚΕΥΩΝ ΚΑΙ ΑΥΤΟΜΑΤΟΥ ΕΛΕΓΧΟΥ

ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ

*Σχεδιασμός και Κατασκευή Συσκευής για
Αυτοματοποιημένη Μελέτη Κυττάρων Μέσω
Τρισδιάστατης Καλλιέργειας σε Πορώδη
Ικρίώματα Κολλαγόνου*

Πρέζα Ιωάννα

**Επιβλέπων: Επίκουρος Καθηγητής
Λεωνίδας Αλεξόπουλος**

Εγκρίθηκε την 14^η Ιουλίου 2015 από την τριμελή εξεταστική επιτροπή:

.....
Αλεξόπουλος Λεωνίδας
Επ. Καθηγητής ΕΜΠ

.....
Προβατίδης Χριστόφορος
Καθηγητής ΕΜΠ

.....
Τσαγγάρης Σωκράτης
Καθηγητής ΕΜΠ

Αθήνα, Ιούλιος 2015

.....

Πρέζα Ιωάννα

Διπλωματούχος Μηχανολόγων Μηχανικός Ε.Μ.Π.

Copyright © Πρέζα Ιωάννα, 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. Λεωνίδα Αλεξόπουλου.

Θα ήθελα να ευχαριστήσω τον κ. Αλεξόπουλο που έδωσε τη δυνατότητα σε μένα και πολλούς άλλους συναδέλφους και μη, να έρθουμε σε επαφή με έναν τομέα σύγχρονο και συνεχώς εξελισσόμενο καθώς και για όλα τα μέσα που μου προσφέρθηκαν για την εκπόνηση της παρούσας διπλωματικής εργασίας. Ευχαριστώ που μου δόθηκε η ευκαιρία να γίνω μέλος του εργαστηρίου και να αποκτήσω γνώσεις και εμπειρίες πολύτιμες για τη μελλοντική μου σταδιοδρομία.

Θα ήθελα να ευχαριστήσω όλα τα μέλη του εργαστηρίου ξεχωριστά για την βοήθεια και την συνεργασία τους. Ευχαριστώ ιδιαίτερα τον Δημήτρη Τζεράνη για τις συμβουλές, την καθοδήγηση και τον προσωπικό χρόνο που διέθεσε σε όλον αυτό το μακρύ δρόμο εκπόνησης της διπλωματικής εργασίας. Ευχαριστώ τον Γιώργο Κανακάρη για την συμβολή του στην κατασκευή της συσκευής που σχεδιάστηκε. Ευχαριστώ τον προπτυχιακό φοιτητή του Εθνικού Μετσόβιου Πολυτεχνείου Νίκο Κουκή για τον προγραμματισμό του συστήματος της αντλίας που χρησιμοποιήθηκε στη διπλωματική εργασία. Ευχαριστώ την Μαρίνα Ιωάννου για την άψογη συνεργασία και κατανόηση σε όλο αυτό διάστημα, την βοήθειά και τις συμβουλές της σε διάφορα βιολογικά πειράματα.

Ευχαριστώ πολύ την οικογένεια μου και τα κοντινά μου πρόσωπα για την υποστήριξη και την αγάπη τους.

ΠΕΡΙΛΗΨΗ.....
1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ	1
1.1 Μέθοδοι Καλλιέργειας Κυττάρων.....	1
1.1.1 Δισδιάστατη (2D) Καλλιέργεια Κυττάρων.....	1
1.1.2 Τρισδιάστατη Καλλιέργεια Κυττάρων (3D)	2
1.2 Χρήση Βιοϋλικών ως Ανάλογα της Εξωκυττάριας Μήτρας	3
1.3 Πορώδη Ικρίωματα Κολλαγόνου.....	4
1.4 Χρήση Πορωδών Ικρίωμάτων Κολλαγόνου ως Ανάλογο της Εξωκυττάριας Μήτρας	8
1.5 Στόχοι της Διπλωματικής	11
2. ΣΧΕΔΙΑΣΜΟΣ ΣΥΣΚΕΥΗΣ ΓΙΑ ΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΑ ΚΥΤΤΑΡΩΝ ΜΕΣΑ ΣΕ ΠΟΡΩΔΗ ΙΚΡΙΩΜΑΤΑ ΚΟΛΛΑΓΟΝΟΥ.....	12
2.1 Προδιαγραφές Συστήματος για Καλλιέργεια Κυττάρων Μέσα σε Πορώδη Ικρίωματα Κολλαγόνου.....	12
2.2 Εννοιολογικός Σχεδιασμός του Συστήματος Αυτόματης Καλλιέργειας Κυττάρων σε Πορώδη Ικρίωματα Κολλαγόνου	14
2.3 Υλικά και Κατεργασίες για Συσκευές Καλλιέργειας Κυττάρων σε Πορώδη Ικρίωματα Κολλαγόνου.....	15
2.4 Σχεδιαστική Υλοποίηση της Συσκευής Καλλιέργειας Κυττάρων σε Πορώδη Ικρίωματα Κολλαγόνου.....	16
2.5 Σύστημα Αυτόματης Διαχείρισης Ρευστών	23
2.5.1. Χαρακτηριστικά Αντλίας.....	23
2.5.2 Σχεδιασμός Διασύνδεσης της Συσκευής με την Αντλία	26
3. ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΕΣ ΜΕΘΟΔΟΙ.....	30
3.1 Καλλιέργεια Κυττάρων Μέσα σε Ικρίωματα Κολλαγόνου	30
3.1.1. Μέτρηση του Όγκου Ρευστού που Παγιδεύεται από το Ικρίωμα.....	30
3.1.2. Μέθοδοι Μέτρησης Κυττάρων.....	30
3.1.3. Καλλιέργεια Ινοβλαστών σε Πορώδη Ικρίωματα Κολλαγόνου	34
3.2 Εκτίμηση Τοξικότητας Υλικών	35
3.3 Μέτρηση Συγκέντρωσης Φθορίζοντος Διαλύματος Μέσω Φασματόμετρου Φθορισμού	37
3.3.1. Βαθμονόμηση Φασματόμετρο Φθορισμού	37
3.3.2. Επίδραση της Παρουσίας Ικρίωματος Κολλαγόνου στις Μετρήσεις του Φασματοσκοπίου	39
3.3.3. Μέτρηση Συγκέντρωσης Φθορίζοντος Διαλύματος Μέσα σε Πορώδες Ικρίωματα Κολλαγόνου	39
3.4 Εναλλαγή Ρευστών Μέσα σε Πορώδες Ικρίωμα Κολλαγόνου Μέσω Διάχυσης	41
3.4.1. Γενικά	41

3.5 Υπολογισμός των Απωλειών του Συστήματος της Αντλίας	44
3.6 Μέτρηση και Ελαχιστοποίηση του Χρόνου Εναλλαγής Ρευστού σε Πορώδες Ικρίωμα Κολλαγόνου Χρησιμοποιώντας το Σύστημα Συσκευής – Αντλίας.....	45
3.6.1 Εισαγωγή.....	45
3.6.2 Εναλλαγή Ρευστού σε Πορώδες Ικρίωμα Κολλαγόνου Μέσω Συνεχούς Παροχής.....	46
3.7 Πειράματα Αλληλεπίδρασης Κυττάρων Μέσα σε Πορώδες Ικρίωμα Κολλαγόνου	49
3.7.1. Κυτταρική Πρόσφυση σε Ικρίωμα Κολλαγόνου Παρουσία Ροής Ρευστού	49
3.7.2. Εισαγωγή Κυττάρων στο Πορώδες Ικρίωμα Κολλαγόνου με τη Συσκευή	50
4. ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΑ ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ.....	52
4.1 Εκτίμηση Τοξικότητας Υλικών.....	52
4.2 Υπολογισμός των Απωλειών του Συστήματος της Αντλίας	54
4.3 Μέτρηση Συγκέντρωσης Φθορίζοντος Διαλύματος Μέσω Φασματόμετρου Φθορισμού	57
4.3.1 Βαθμονόμηση Φασματόμετρο Φθορισμού	57
4.3.2 Επίδραση της Παρουσίας Ικρίωματος Κολλαγόνου στις Μετρήσεις του Φασματοσκοπίου	62
4.3.3 Μέτρηση Συγκέντρωσης Φθορίζοντος Διαλύματος Μέσα σε Πορώδες Ικρίωμα Κολλαγόνου	63
4.4 Εναλλαγή Ρευστών Μέσα σε Πορώδες Ικρίωμα Κολλαγόνου Μέσω Διάχυσης	65
4.5 Εναλλαγή Ρευστού σε Πορώδες Ικρίωμα Κολλαγόνου Μέσω Συνεχούς Παροχής.....	68
4.6 Εναλλαγή Ρευστού σε Πορώδες Ικρίωμα Κολλαγόνου Μέσω Εναλλασσόμενης Εξαναγκασμένης Ροής	70
4.7 Κυτταρική Πρόσφυση σε Ικρίωμα Κολλαγόνου Παρουσία Ροής Ρευστού.....	73
4.8 Εισαγωγή Κυττάρων στο Πορώδες Ικρίωμα Κολλαγόνου με τη Βοήθεια της Συσκευής	75
5. ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ – ΣΥΖΗΤΗΣΗ	76
5.1 Σχεδιασμός, Κατασκευή, και Χαρακτηρισμός του Συστήματος Συσκευή – Αντλία	76
5.2 Καλλιέργεια και Μελέτη Κυττάρων σε Πορώδη Ικρίωμα Κολλαγόνου Χρησιμοποιώντας το Σύστημα Συσκευή-Αντλία	79
5.3 Εισαγωγή Κυττάρων στο Πορώδες Ικρίωμα με Εναλλασσόμενη ροή	81
ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ Α	82
ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ Β.....	90
B.1 Καλλιέργεια ινοβλαστών σε φλάσκες.....	90
B2. Εισαγωγή Ινοβλαστών σε Πορώδη Ικρίωμα Κολλαγόνου.....	93
B.3 Πείραμα Εκτίμησης Βιοσυμβατότητας Υλικών	95

B.4 Βαθμονόμηση Φασματόμετρο Φθορισμού.....	96
B.5 Εναλλαγή ρευστών Μέσα σε Πορώδες Ικρίωμα Κολλαγόνου – Στατικό Πείραμα.....	100
B.6 Εναλλαγή Ρευστού σε Πορώδες Ικρίωμα Κολλαγόνου Μέσω Συνεχούς Παροχής	101
B.7 Εναλλαγή Ρευστού σε Πορώδες Ικρίωμα Κολλαγόνου Μέσω Εναλλασσόμενης Εξαναγκασμένης Ροής	103
B.8 Προσδιορισμός του Εύρους των Παροχών της Αντλίας που δεν Διαταράσσουν την Κυτταρική Καλλιέργεια	105
6. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ	108
6.1 Άρθρα σε Επιστημονικά Περιοδικά.....	108
6.2 Βιβλία – Παραδόσεις.....	109
6.3 Ιστότοποι.....	109

Περίληψη

Η τρέχουσα βιολογική γνώση βασίζεται κατά μεγάλο ποσοστό σε κλασσικά πειράματα βιοχημείας και γενετικής που πραγματοποιήθηκαν τα τελευταία 50 χρόνια σε κύτταρα που καλλιεργήθηκαν σε επίπεδες πλαστικές φλάσκες. Παρόλα αυτά, είναι γνωστό ότι στους ιστούς τα κύτταρα αλληλεπιδρούν με μια στερεά τρισδιάστατη εξωκυττάρια μήτρα, η οποία επηρεάζει σημαντικά την λειτουργία τους. Για να γεφυρωθεί αυτή η διαφορά στο στερεό περιβάλλον των κυττάρων, τα τελευταία 10 χρόνια αναπτύχθηκαν μοντέλα τρισδιάστατης κυτταρικής καλλιέργειας, στα οποία τα κύτταρα καλλιεργούνται και μελετώνται μέσα σε ένα ανάλογο της εξωκυττάριας μήτρας, τα οποία είναι συνήθως βιοϋλικά. Αυτά τα μοντέλα τρισδιάστατης καλλιέργειας υπόσχονται να βελτιώσουν τα αποτελέσματα των βιολογικών πειραμάτων δίνοντας την ευκαιρία να μελετηθούν τα κύτταρα σε ένα περιβάλλον που είναι πιο κοντά στην φυσιολογία ή την παθολογία τους.

Η τρισδιάστατη καλλιέργεια κυττάρων μέσα σε βιοϋλικά λόγω της αυξημένης πολυπλοκότητας της σε σχέση με την συμβατική καλλιέργεια απαιτεί νέες τεχνολογίες και συστήματα τα οποία θα δώσουν την δυνατότητα ελέγχου των μεταβλητών της καλλιέργειας.

Η παρούσα διπλωματική εργασία μελετά το σχεδιασμό και την κατασκευή μιας απλής και εύχρηστης συσκευής για την αυτοματοποίηση της μελέτης κυττάρων μέσα σε πορώδη ικρίωματα κολλαγόνου. Σκοπός της εργασίας είναι ο προσδιορισμός και ο έλεγχος παραγόντων που δυσχεραίνουν την κυτταρική καλλιέργεια στα πορώδη ικρίωματα και η ενσωμάτωση συστημάτων που θα επιτρέψουν την αυτοματοποίηση των διαδικασιών. Αυτά τα εργαλεία θα επιτρέψουν την εκτέλεση πειραμάτων πρωτεωμικής μεγάλου όγκου (high throughput) και μεγάλης ακρίβειας, τα οποία με τη σειρά τους μπορούν να επιταχύνουν την κυτταρική έρευνα για την ανάπτυξη φαρμάκων και τη μελέτη μοντέλων ασθενειών. Η εργασία αυτή αρχικά παρουσιάζει τις προδιαγραφές και τον σχεδιασμό της συσκευής. Στη συνέχεια η συσκευή χρησιμοποιείται για να μελετηθεί η διακίνηση ρευστών και η εισαγωγή κυττάρων μέσα στο πορώδες ικρίωμα.

Abstract

Over the last 50 years genetics and biochemistry experiments over cells cultured on flat substrates have contributed a great amount for today's biology knowledge. However, cell physiology indicates that in mammalian tissues cells connect with a solid 3D extracellular matrix (ECM), which affects cell function. The last 10 years, in order to bridge the gap concerning the surrounding of cells, 3D cell culture models have been adopted where cells are being studied inside ECM analogs. It is about a variety of materials, called biomaterials. These 3D cell culture models are very promising in improving current biological responses permitting cells to grow in an environment that more closely mimics their physiology or pathology.

The increasing and evolving study of 3D cell culture inside biomaterials promotes the use of advanced technological systems, permitting the control of several parameters, which have not been studied before.

This diploma thesis is about the design and fabrication of a simple and versatile device for studying automated cell culture inside porous collagen scaffolds. The purpose of this thesis is the identification and control of certain parameters that influence cell culture inside scaffolds and the adaptation of automated technological systems. Such tools can form the basis for novel platforms for high – throughput proteomic experiments which in turn paves the way for drug screening platforms, diseases models etc. In this study, the basic requirements and the design and manufacturing process are being studied for the device developed. Subsequently, the impact of automated fluid flow through the scaffold and automated cell seeding inside the scaffold through the device are being tested in order to improve cell culture protocols.

1. Εισαγωγή

Η καλλιέργεια κυττάρων είναι η διαδικασία στην οποία τα κύτταρα, αφού απομονωθούν από τους ιστούς στους οποίους βρίσκονται, αναπτύσσονται υπό ελεγχόμενες συνθήκες σε εργαστηριακό περιβάλλον. Στην καλλιέργεια τα κύτταρα έχουν τη δυνατότητα να διαχωρίζονται, να πολλαπλασιάζονται, να αυξάνονται σε μέγεθος, ή ακόμα και να διαφοροποιούνται. Οι τεχνικές καλλιέργειας κυτταρικών αναπτύχθηκαν κυρίως στα μέσα του 20^{ου} αιώνα και από τότε εξελίσσονται συνεχώς για περισσότερα και πιο πολύπλοκα είδη κυττάρων (π.χ. καλλιέργεια stem cells). Ο λόγος της συνεχούς αυτής εξέλιξης οφείλεται στον μεγάλο αριθμό εφαρμογών που έχουν προκύψει από την καλλιέργεια κυττάρων, για παράδειγμα η μελέτη του κυτταρικού μεταβολισμού, μελέτη της φυσιολογίας ή βιοχημείας του κυττάρου, η μελέτη της επίδρασης διαφόρων χημικών σκευασμάτων ή φαρμάκων σε συγκεκριμένους τύπους κυττάρων, η μελέτη παράλληλου ή διαδοχικού συνδυασμού κυττάρων διαφορετικού τύπου για την αναγέννηση τεχνητού ιστού. Εκτός από ερευνητικούς σκοπούς, η καλλιέργεια κυττάρων μπορεί να χρησιμοποιηθεί και για άλλες εφαρμογές όπως η έκφραση και απομόνωση βιολογικών προϊόντων (recombinant proteins: ένζυμα, πρωτεΐνες, ορμόνες, αντισώματα), η αποθήκευση και πολλαπλασιασμός στοιχείων DNA (τεχνολογία cDNA), οι βιολογικοί αντιδραστήρες, εφαρμογές εναλλακτικών πηγών παραγωγής ενέργειας, και εφαρμογές βιοϋλικών για επούλωση πληγών^[21].

Στο κεφάλαιο αυτό παρατίθεται μια εισαγωγή στην τρέχουσα τεχνολογία τρισδιάστατης καλλιέργειας κυττάρων. Τα εδάφια 1.1 και 1.2 παρουσιάζουν μια βιβλιογραφική ανασκόπηση σχετικά με την καλλιέργεια κυττάρων σε δισδιάστατα και τρισδιάστατα περιβάλλοντα, και τη χρήση βιοϋλικών ως ανάλογο της εξωκυττάριας μήτρας. Στα εδάφια 1.3 και 1.4 παρουσιάζονται λεπτομερώς τα πορώδη ικρίωματα κολλαγόνου, τα βιοϋλικά που χρησιμοποιούνται σε αυτή την εργασία, και τις εφαρμογές τους στην αναγέννηση οργάνων και σε τρισδιάστατη καλλιέργεια κυττάρων. Τέλος στο εδάφιο 1.5 παρουσιάζονται οι στόχοι της παρούσας διπλωματικής εργασίας.

1.1 Μέθοδοι Καλλιέργειας Κυττάρων

1.1.1 Δισδιάστατη (2D) Καλλιέργεια Κυττάρων

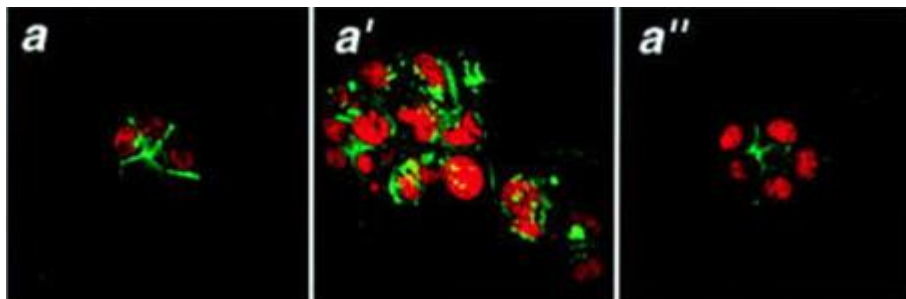
Στην συμβατική δισδιάστατη καλλιέργεια κυττάρων τα κύτταρα τοποθετούνται πάνω σε επίπεδα πλαστικά υποστρώματα (petri dish, flasks), τα οποία επιτρέπουν την ανάπτυξη των κυττάρων σε ένα μονοστρωματικό επίπεδο. Η κυτταρική καλλιέργεια απαιτεί τον έλεγχο του φυσικού (θερμοκρασία, ένταση οξυγόνου και διοξειδίου του άνθρακα) και χημικού (π.χ. συγκεντρώσεις θρεπτικών ουσιών διαλυμάτων, pH, ωσμωτική πίεση) περιβάλλοντος των κυττάρων της καλλιέργειας.

Παρόλο που η συντριπτική πλειοψηφία των δημοσιευμένων ευρημάτων της κυτταρικής και μοριακής βιολογίας έχουν προέλθει από δισδιάστατες (2D) κυτταρικές καλλιέργειες, υπάρχουν περιορισμοί στην 2D καλλιέργεια που πρέπει να ξεπεραστούν^[22]. Ο βασικός περιορισμός είναι η απουσία της εξωκυττάριας μήτρας. Στους ιστούς τα κύτταρα συνδέονται με μια στερεά «δομή στήριξης» που λέγεται εξωκυττάρια μήτρα (ECM). Αυτή η μήτρα αποτελείται κυρίως από δομικές πρωτεΐνες, όπως κολλαγόνο, λαμινίνη, ελαστίνη, οι οποίες δίνουν στους ιστούς τις μηχανικές τους ιδιότητες και βοηθούν στην επικοινωνία μεταξύ των κυττάρων που βρίσκονται στη μήτρα. Τα κύτταρα προσδένονται με τις πρωτεΐνες της εξωκυττάριας μήτρας μέσω υποδοχέων (receptors) στην επιφάνεια τους, κυρίως μέσω των υποδοχέων της οικογένειας των ιντεγκρινών (integrins)^[22]. Η πρόσδεση των κυττάρων μέσω των ιντεγκρινών υλοποιούν την επικοινωνία του κυττάρου με την εξωκυττάρια μήτρα και την μετάδοση σημάτων από το εξωτερικό περιβάλλον του κυττάρου στο εσωτερικό του. Δεδομένης αυτής της περίπλοκης μηχανικής και βιοχημικής αλληλεπίδρασης είναι πιθανό να χάνεται σημαντική βιολογική πληροφορία από την 2D καλλιέργεια σε επίπεδα υποστρώματα λόγω της έλλειψης εξωκυττάριας μήτρας.

1.1.2 Τρισδιάστατη Καλλιέργεια Κυττάρων (3D)

Η τρισδιάστατη καλλιέργεια κυττάρων μιμείται καλύτερα το περιβάλλον που αντιλαμβάνεται το κύτταρο στους φυσικούς ιστούς και στα όργανα λόγω της παρουσίας του ECM. Στην τρισδιάστατη καλλιέργεια τα κύτταρα μπορούν να αλληλεπιδράσουν τόσο μεταξύ τους όσο και με την εξωκυττάρια μήτρα, και να ασκήσουν δυνάμεις με αποτέλεσμα να παραμορφώνουν την μήτρα ή να «μεταναστεύουν» με τρόπο παρόμοιο με αυτό που έχει παρατηρηθεί στον οργανισμό (*in vivo*). Αντιθέτως, η δισδιάστατη καλλιέργεια αναγκάζει τη μία πλευρά του κυττάρου να προσκολληθεί στο πλαστικό υπόστρωμα, χωρίς καμία πιθανότητα κυτταρικής επαφής στην ανάποδη πλευρά, προκαλεί σημαντικές αλλαγές στο σχήμα του κυττάρου, και τελικά επιδρά σημαντικά σε πολλές κυτταρικές λειτουργίες^[23]. Ένα ακόμα σημαντικό πλεονέκτημα της τρισδιάστατης καλλιέργειας είναι η κυτταρική απόκριση στην δοκιμή φαρμάκων. Όταν δοκιμάζεται ένα φάρμακο στη δισδιάστατη καλλιέργεια για να διαχυθεί κατά μήκος της κυτταρικής μεμβράνης χρειάζεται να διανύσει μικρή απόσταση. Στην καλλιέργεια σε 3D το φάρμακο χρειάζεται να διαχυθεί δια μέσω πολλών στρωμάτων κυττάρου για να φτάσει το στόχο^[24]. Αυτή η προσέγγιση μπορεί να οδηγήσει σε πιο ρεαλιστικά μοντέλα ασθενειών (π.χ. χορήγηση φαρμάκων σε μεγάλους όγκους) και φέρνει τους επιστήμονες αντιμέτωπους με περισσότερες προκλήσεις. Παρόλο που πολλές φορές οι δοκιμές φαρμάκων δίνουν υποσχόμενα αποτελέσματα σε 2D καλλιέργεια, το 90% αυτών των αποτελεσμάτων αποτυγχάνει στις κλινικές δοκιμές, και πολλοί ερευνητές αναζητούν καλύτερα μοντέλα κυτταρικής καλλιέργειας. Τέλος, η αλλαγή του σχήματος και της μορφολογίας του κυττάρου που προξενεί η 3D καλλιέργεια έχει ως αποτέλεσμα αλλαγές στην έκφραση του γονιδιώματος και αλλαγές των κυτταρικών μονοπατιών σηματοδότησης. Η Εικόνα 1, παρουσιάζει ένα παράδειγμα όπου η καλλιέργεια κυττάρων σε τρισδιάστατο περιβάλλον έδωσε σημαντικά αποτελέσματα.

Το εργαστήριο της Mina Bissell έδειξε ότι συγκεκριμένο αντίσωμα αλληλοεπιδρώντας με συγκεκριμένη πρωτεΐνη στην επιφάνεια του κυττάρου αλλάζει τη συμπεριφορά καρκινικών κυττάρων του μαστού σε μη καρκινικά^[21].



Εικόνα 1: Καρκινικά κύτταρα του μαστού σε τρισδιάστατη καλλιέργεια (αριστερά), τα οποία γίνονται κακοήθη (μέση), αλλά επιστρέφουν στην αρχική τους κατάσταση (δεξιά) όταν τους χορηγηθεί ένα αντίσωμα που αναστέλλει τη δράση της β1- integrin, πρωτεΐνης προστίθεται στο σύστημα^[21]

1.2 Χρήση Βιοϋλικών ως Ανάλογα της Εξωκυττάριας Μήτρας

Πολλές επιστημονικές μελέτες εστιάζουν στην ανάπτυξη 3D μητρών από βιολογικά ή συνθετικά υλικά, με σκοπό την έρευνα κυτταρικών φαινοτύπων που δεν εκφράζονται στις συμβατικές 2D καλλιέργειες^[25]. Πολλές μελέτες χρησιμοποιούν γέλες (gels) από κολλαγόνο ή από υλικά που απομονώθηκαν από την εξωκυττάρια μήτρα του ιστού ενδιαφέροντος. Ένα συχνά χρησιμοποιούμενο υλικό είναι το matrigel, το οποίο προέρχεται από την εξωκυττάρια μήτρα καρκινικών κυττάρων. Το matrigel είναι ένα εμπορικά διαθέσιμο υλικό του οποίου η ακριβής σύσταση δεν είναι γνωστή, είναι γνωστό όμως ότι περιέχει κολλαγόνο, λαμινίνη, κάποια ένζυμα και αυξητικούς παράγοντες (growth factors)^[22]. Ωστόσο το matrigel δεν επιτρέπει σε βάθος έλεγχο της κινηματικής της ζελατινοποίησης, της ακαμψίας και της δομής του τελικού δικτύου, παράμετροι που μπορούν με τη σειρά τους να επηρεάσουν την κυτταρική απόκριση^[1]. Μία διαφορετική προσέγγιση είναι η δημιουργία τρισδιάστατης μήτρας προερχόμενη από τα ίδια τα κύτταρα (Cukierman *et al.* 2001).

Με τη βοήθεια των υλικών που αναπτύσσονται ως υποκατάστατο της εξωκυττάριας μήτρας για τρισδιάστατη καλλιέργεια κυττάρων γίνεται εκτενής μελέτη για την απόκριση της κυτταρικής συμπεριφοράς σε διάφορα ερεθίσματα όπως αυξητικοί παράγοντες (growth factors). Η απόκριση αυτή μπορεί να μετρηθεί είτε στο επίπεδο της γενετικής έκφρασης (gene expression) είτε στο επίπεδο της έκφρασης πρωτεϊνών (protein expression), είτε στο επίπεδο της απόκρισης των σηματοδοτικών μονοπατιών (signaling pathways) σε εξωτερικές διεγέρσεις.

Στην παρούσα διπλωματική εργασία μελετάται η τρισδιάστατη καλλιέργεια κυττάρων μέσα σε μια τρισδιάστατη μήτρα, και διερευνάται η βελτιστοποίηση ορισμένων

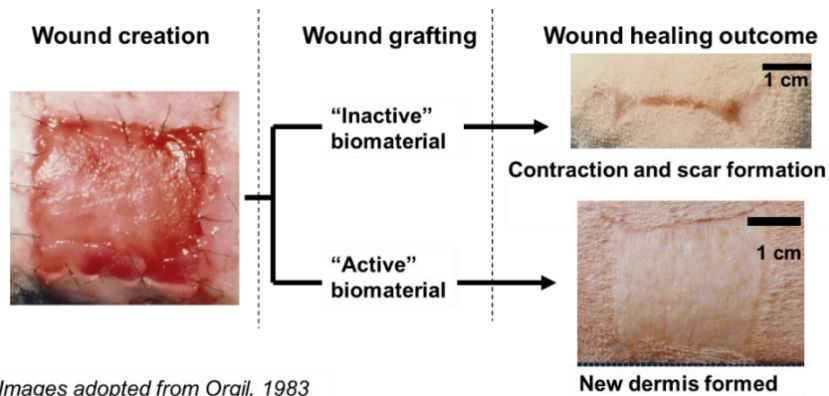
παραμέτρων για την ευκολότερη διαχείριση της καλλιέργειας και της μήτρας για πειράματα πρωτεωμικής. Το βιοϋλικό που χρησιμοποιείται σαν μήτρα είναι το πορώδες ικρίωμα κολλαγόνου, οι ιδιότητες του οποίου αναλύονται στην επόμενη ενότητα.

1.3 Πορώδη Ικρίωματα Κολλαγόνου

Το κολλαγόνο είναι βασική δομική πρωτεΐνη του συνδετικού ιστού (connective tissue) και αποτελεί βασικό συστατικό της εξωκυττάριας μήτρας, η οποία υποστηρίζει τους περισσότερους ιστούς. Τα μόρια κολλαγόνου στους ιστούς αποκτούν μια χαρακτηριστική 3-διάστατη δομή της τριπλής έλικας. Τα μόρια αυτά συνθέτουν ινίδια (fibrils) κολλαγόνου (διαμέτρου 50nm περίπου), τα οποία με την σειρά τους συνθέτουν ίνες (fibers) κολλαγόνου (διαμέτρου 5 μm περίπου). Το μέγεθος και η αρχιτεκτονική των παραπάνω υπερ-κατασκευών κολλαγόνου (ινίδια, ίδες) καθορίζεται από τα κύτταρα των ιστών που παράγουν και «συναρμολογούν» το κολλαγόνο (κυρίως ινοβλάστες) και μεταβάλλεται από όργανο σε όργανο έτσι ώστε οι κατασκευές κολλαγόνου να βοηθούν στην εκτέλεση της λειτουργίας του οργάνου.

Τα ικρίωματα κολλαγόνου που χρησιμοποιούνται σε αυτή την διπλωματική ανακαλύφθηκαν και αναπτύχθηκαν στο εργαστήριο του Δρ. Ιωάννη Β. Γιαννά (Prof. I. V. Yannas) καθηγητή του Massachusetts Institute of Technology (MIT). Τα ικρίωματα αυτά ανακαλύφθηκαν και εφαρμόστηκαν ως «τεχνητό δέρμα» σε εφαρμογές αναγεννητικής ιατρικής, τα τελευταία όμως χρόνια χρησιμοποιούνται ολοένα και περισσότερο ως ανάλογα της εξωκυττάριας μήτρας^[3]. Τα πορώδη αυτά ικρίωματα αποτελούνται από κολλαγόνο τύπου I (collagen type I) και από πολυσακχαρίτες (glycosaminoglycan-GAG) και κατασκευάζονται με τη μέθοδο της λυοφιλοποίησης.

Τα πορώδη ικρίωματα κολλαγόνου έχουν ευρεία εφαρμογή στην αναγέννηση σημαντικών πληγών στο δέρμα, όπως π.χ. στην επούλωση εγκαυμάτων. Το υλικό αυτό βρέθηκε να προκαλεί αναγέννηση ιστού (δέρμα που βρίσκεται κάτω από την επιδερμίδα, Εικόνα 2). Σε κλινικές εφαρμογές το ικρίωμα κολλαγόνου καλύπτεται από μία συνθετική επίστρωση σιλικόνης ώστε να προστατεύει το δέρμα από βακτήρια και μολύνσεις και να συγκρατεί εσωτερικά την υγρασία^[26]. Τα υλικά αυτά χρησιμοποιούνται κλινικά και για την αναγέννηση σημαντικών τραυμάτων σε περιφερειακά νεύρα σε ασθενείς που τα άκρα τους έχουν παραλύσει λόγω σοβαρού τραυματισμού. Επίσης ανάλογη συμπεριφορά του υλικού έχει παρατηρηθεί και σε άλλα όργανα εκτός από το δέρμα. Υλικά από κολλαγόνο έχουν επάγει αναγέννηση σε οστά, στις βαλβίδες της καρδιάς, στον αρθρικό χόνδρο, στην σπονδυλική στήλη, σε όργανα του ουροποιητικού συστήματος και σε περιφερειακά νεύρα^[4].



Images adopted from Orgil, 1983

Εικόνα 2: Εφαρμογή του ικρίωματος κολλαγόνου στην αναγέννηση δέρματος

Όσο αναφορά τις εργαστηριακές εφαρμογές, το πορώδες ικρίωμα κολλαγόνου έχει μελετηθεί αρκετά ως προς τις ιδιότητές του και τον προσδιορισμό της επίδρασης των διαφόρων φυσικό-χημικών παραμέτρων του στην ικανότητα του να προκαλεί αναγέννηση πληγών^[5]. Πειραματικά δεδομένα δείχνουν ότι οι ιδιότητες του ικρίωματος ελέγχουν τους στοιχειώδεις κυτταρικούς φαινότυπους που επιδρούν στην διαδικασία επούλωσης μιας πληγής. Για παράδειγμα έχει παρατηρηθεί πως το μέσο μέγεθος του πόρου του ικρίωματος επηρεάζει την προσκόλληση των κυττάρων, την ανάπτυξή τους και γενικά το φαινότυπό τους για μια ποικιλία κυτταρικών σειρών^[5]. Ακόμη έχει μελετηθεί πως η ομοιογένεια και η ελαστικότητα του υλικού παίζουν σημαντικό ρόλο σε εφαρμογές ανάπτυξης ιστών μέσα στο πορώδες ικρίωμα^[6]. Άλλες εργαστηριακές μελέτες περιλαμβάνουν την αλληλεπίδραση κυττάρων μέσα στο υλικό ή την δημιουργία «μοτίβων» (patterns) μέσα στο υλικό από ουσίες που διεγείρουν μια συγκεκριμένη κυτταρική απόκριση^{[7], [8]}.

Παρ' όλα αυτά η έρευνα για την επίδραση του πορώδους ικρίωματος κολλαγόνου σε συστημικό επίπεδο, δηλαδή σε επίπεδο επίδρασης των σηματοδοτικών μονοπατιών του κυττάρου και επίδρασης του κυτταρικού φαινότυπου είναι περιορισμένη. Για τη διεξαγωγή αυτών των πειραμάτων που εμπίπτουν στον ευρύτερο κλάδο της πρωτεωμικής, είναι απαραίτητη η δημιουργία τεχνολογικών συστημάτων που να επιτρέπουν τη διεξαγωγή πολλαπλών πειραμάτων, τον έλεγχο και τη βελτιστοποίηση κρίσιμων παραμέτρων.

Παρασκευή Ικτριωμάτων Κολλαγόνου

Τα στάδια κατασκευής του ικτριώματος που χρησιμοποιείται και στην παρούσα εργασία είναι τα εξής:

- **Παρασκευή του εναιωρήματος (suspension) κολλαγόνου:** Ίνες κολλαγόνου Τύπου I μαζί με άλλα συστατικά (γλυκοζαμινογλυκάνες (GAG)) διαλύονται μέσα σε 50 mM οξικό οξύ. Το ποσοστό της μάζας του κολλαγόνου σε όλα τα είδη εναιωρημάτων είναι 0,5% ^[16].
- **Λυοφιλοποίηση (Freeze-Drying):** Το αιώρημα κολλαγόνου τοποθετείται μέσα σε ένα καλούπι, όπου καθορίζει το τελικό επιθυμητό σχήμα του υλικού. Στην διαδικασία της λυοφιλοποίησης, το αιώρημα αρχικά παγώνει με αποτέλεσμα να δημιουργούνται κρύσταλλοι πάγου (freezing step) οι οποίοι στην συνέχεια αφαιρούνται μέσω εξάχνωση εφαρμόζοντας κενό (drying step). Το τελικό αποτέλεσμα είναι ένα πορώδες φύλλο πάχους 3mm που αποτελείται από το κολλαγόνο που είχε παγιδευτεί στους κρυστάλλους μετά το πάγωμα και από πόρους που αντιστοιχούν στους κρυστάλλους πάγου που αφαιρέθηκαν. Έχει διαπιστωθεί ότι η μικροδομή των πόρων του ικτριώματος εξαρτάται σημαντικά από τη μεταφορά θερμοκρασίας κατά την φάση της ^[16].
- **Δημιουργία Σταυροδεσμών (Cross-linking) στο ικρίωμα:** Μετά την διαδικασία της λυοφιλοποίησης, το φύλλο ικτριώματος 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. Στην διαδικασία αυτή σχηματίζονται ομοιοπολικοί δεσμοί μεταξύ των διαφόρων μορίων του ικτριώματος ^[16], μέσω της εφαρμογής θερμοκρασίας 105-120 °C υπό κενό.

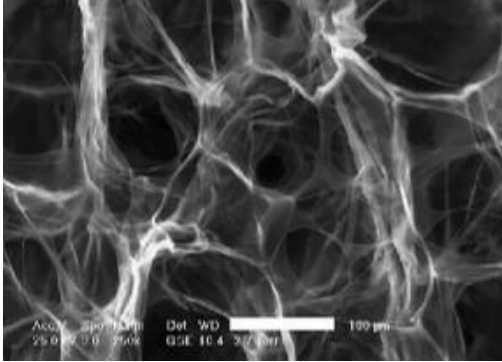
Χαρακτηριστικά Πορώδους Ικτριώματος Κολλαγόνου

Το πορώδες ικρίωμα κολλαγόνου είναι ένα στερεό υλικό (αναλογία μάζας 0,5%) με σπογγώδη δομή και μέσο μέγεθος πόρου 90 – 95 μm (Εικόνα 3). Τα βασικά του πλεονεκτήματα είναι η βιοσυμβατότητα του καθώς αποτελεί ένα κλινικά εγκεκριμένο υλικό που αποτελεί ανάλογο της εξωκυττάριας μήτρας. Η πορώδης δομή του επιτρέπει στα κύτταρα να εισέρχονται μέσα του, να αλληλεπιδρούν ευρέως με το υλικό, και να δημιουργούν νέους ιστούς. Η δυνατότητα ελέγχου της δομής και των μηχανικών ιδιοτήτων του υλικού (ελαστικότητα, μέγεθος πόρου) το καθιστά κατάλληλο για διαφορετικού είδους εφαρμογές.

Παρότι τα ικτριώματα κολλαγόνου έχουν ευρεία χρήση στην αναγεννητική ιατρική, η εφαρμογή τους ως τρισδιάστατο ανάλογο της είναι ακόμα περιορισμένη, λόγω διάφορων δυσκολιών στη χρήση τους.

- Ο περιορισμός στην διάχυση των ρευστών μέσα στο ικρίωμα μπορεί να επηρεάσει την επιβίωση των κυττάρων. Λόγω της αργής διάχυσης ουσιών και της πορώδης φύσης του ικτριώματος, η εναλλαγή ρευστών είναι χρονοβόρα με αποτέλεσμα τα σηματοδοτικά μονοπάτια που ενεργοποιούνται μέσα σε αυτό το χρόνο να μην μπορούν να ανιχνευθούν.

- Η ελαστικότητα του κυμαίνεται σε χαμηλές τιμές για χρήση του υλικού σε εφαρμογές μηχανικής ιστών (tissue engineering).
- Η απεικόνιση των κυττάρων μέσα σε μια 3D καλλιέργεια κυττάρων απαιτεί πολύπλοκες τεχνικές (συνεστιακή μικροσκοπία, μη-γραμμική μικροσκοπία) και ακριβό εξοπλισμό.



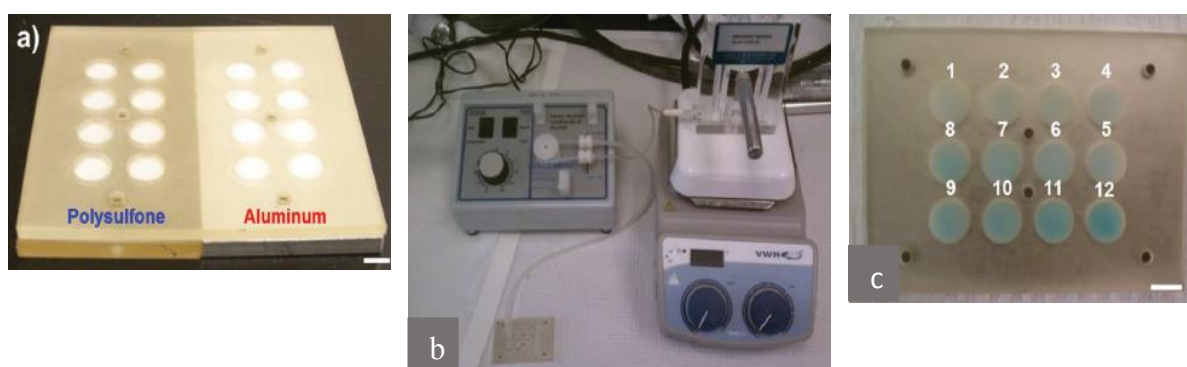
Εικόνα 3: Πορώδης δομή του ικρίωματος κολλαγόνου. Το μέσο μέγεθος πόρου είναι 100 μm (Pek et al. 2004, Hong et al 2010)

1.4 Χρήση Πορώδων Ικριωμάτων Κολλαγόνου ως Ανάλογο της Εξωκυττάριας Μήτρας

Μέχρι σήμερα, έχουν αναπτυχθεί και εφαρμοστεί πολλά αρκετά συστήματα για τη μελέτη καλλιέργειας κυττάρων σε τρισδιάστατα περιβάλλοντα. Πολλά από αυτά τα συστήματα απαιτούν εξειδικευμένες μεθόδους κατασκευής και πολύπλοκο τεχνολογικό εξοπλισμό. Παρ' όλα αυτά λίγες εφαρμογές έχουν ενσωματώσει αυτές τις τεχνολογίες για την καλλιέργεια κυττάρων σε πορώδη ικρίωματα κολλαγόνου.

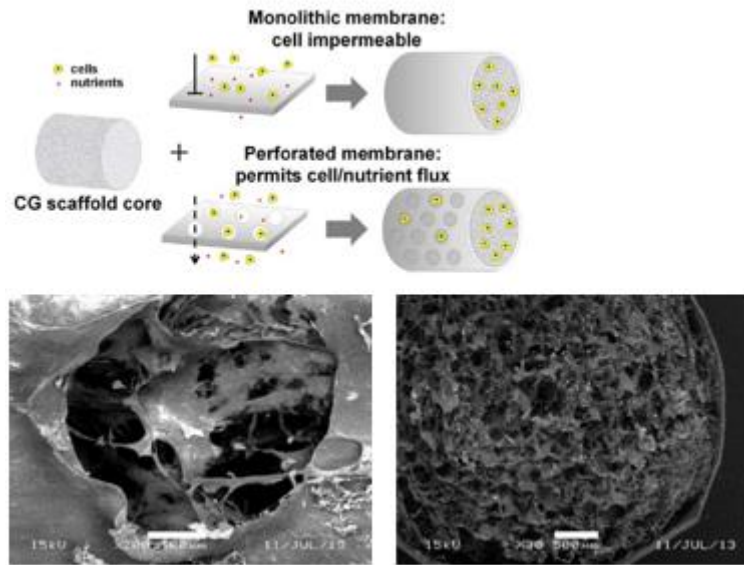
Στη συνέχεια παρατίθενται ορισμένες εφαρμογές χρήσης του πορώδους ικρίωματος κολλαγόνου ως ανάλογο της εξωκυττάριας μήτρας.

Η Εικόνα 4 παρουσιάζει μια εφαρμογή που περιλαμβάνει την δημιουργία του πορώδους ικρίωματος κολλαγόνου μέσα σε ειδικά κατασκευασμένο καλούπι προκειμένου να επηρεαστεί η ανισοτροπία και το μέγεθος του πόρου του ικρίωματος. Στη συνέχεια χρησιμοποιήθηκε μια περισταλτική αντλία, για τη δημιουργία γραμμικής κλίσης αραιώσεων διαφόρων ουσιών βιομοριακών σημάτων. Η συγκεκριμένη εφαρμογή χρησιμοποιήθηκε για τη μελέτη της δραστηριότητας μεσεγχυματικών βλαστικών κυττάρων^[9].



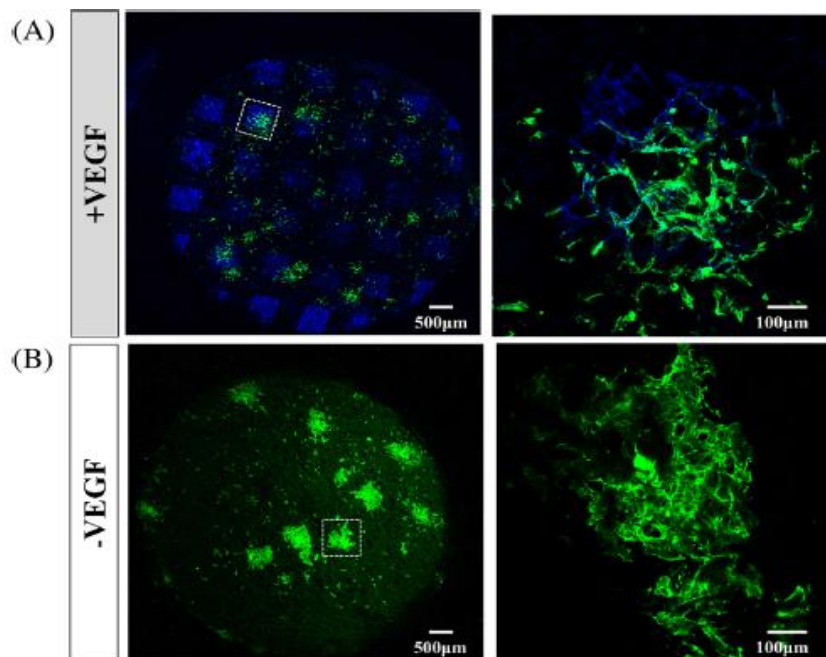
Εικόνα 4: Εφαρμογή καλλιέργειας βλαστικών κυττάρων μέσα σε πορώδες ικρίωμα κολλαγόνου. a) Καλούπι για δημιουργία πορώδους ικρίωματος με τη μέθοδο λυοφιλοποίησης, b) Συσκευή (gradient maker) για τη δημιουργία ουσιών διαφορετικών αραιώσεων, c) Γραμμική κατανομή φθορίζουσας ουσίας (Cy5-labeled BSA) στο καλούπι^[9]

Η Εικόνα 5 παρουσιάζει μια εφαρμογή για τη δημιουργία μεμβρανών από PDMS γύρω από το πορώδες ικρίωμα κολλαγόνου ώστε να αυξηθεί η μηχανική του αντοχή. Η συγκεκριμένη εφαρμογή χρησιμοποιήθηκε για μελέτη αναγέννησης του τένοντα.



Εικόνα 5: Κατασκευή ανθεκτικότερης δομής πορώδους ικρίωματος κολλαγόνου για εφαρμογή στη μηχανική των ιστών. Σχηματική αναπαράσταση της κατασκευής (πάνω). Πορώδες ικρίωμα κολλαγόνου με μεμβράνη από PDMS (κάτω, εικόνες μικροσκοπίου) ^[10].

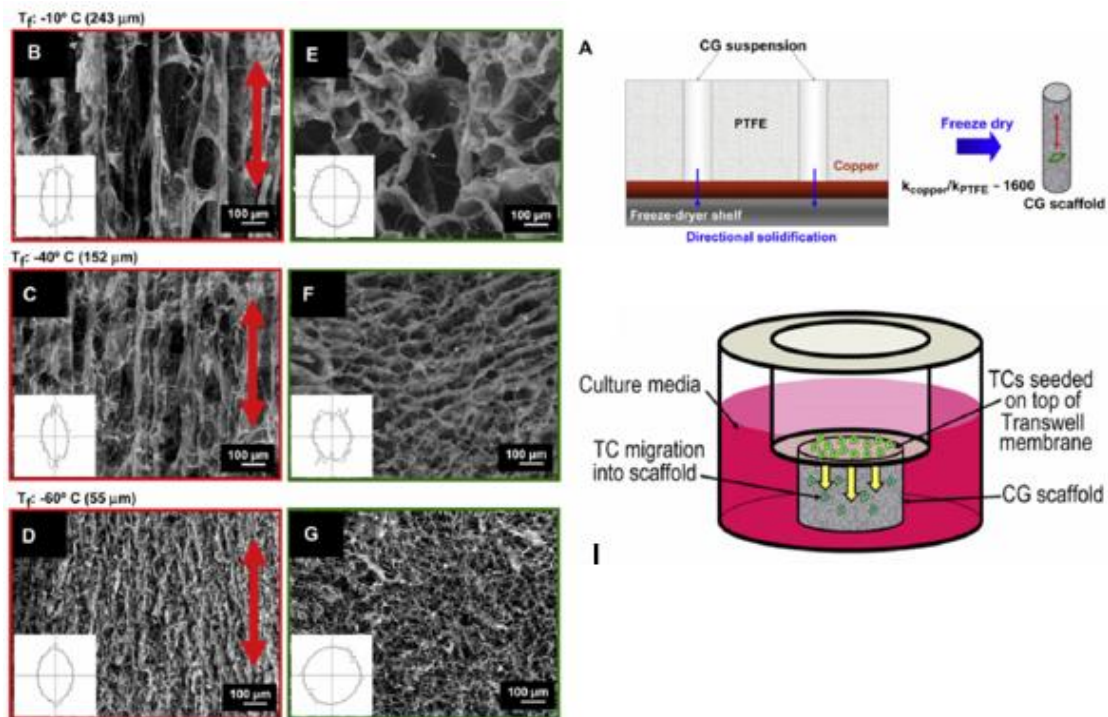
Στην Εικόνα 6 παρουσιάζεται πορώδες ικρίωμα κολλαγόνου στο οποίο έχουν δημιουργηθεί με φωτολιθογραφία τετραγωνικά μοτίβα από αυξητικό παράγοντα (growth factor, VEGF) ο οποίος βρίσκεται να επηρεάζει την απόκριση και τη μορφολογία των κυττάρων. Χρησιμοποιούνται ανθρώπινα ενδοθηλιακά φλεβικά κύτταρα για εφαρμογές ιστομηχανικής.



Εικόνα 6: Μοτίβα αυξητικού παράγοντα VEGF μέσα στο πορώδες ικρίωμα οδηγούν σε φαινοτυπικές διαφορές στα κύτταρα (HUVEC cells). Α) Μορφολογία κυττάρων μέσα σε

πορώδη κριώματα κολλαγόνου με τετραγωνικά μοτίβα VEGF (μπλε), B) Μορφολογία κυττάρων σε πορώδη κριώματα χωρίς VEGF^[11].

Στην Εικόνα 7 παρουσιάζεται μια ακόμη εφαρμογή ιστομηχανικής για κύτταρα του τένοντα. Μελετάται η κατασκευή σε ειδικά κατασκευασμένο καλούπι, ανισοτροπικού πορώδους κριώματος κολλαγόνου με ευθυγραμμισμένους ελλειψοειδείς πόρους και διαφορετικές διαμέτρους πόρων. Καλλιεργώντας κύτταρα του τένοντα σε αυτά τα υλικά μελετώνται η προσκόλληση των κυττάρων, η μεταβολική τους δραστηριότητα, η ευθυγράμμισή τους και η απόκρισή τους σε αυξητικούς παράγοντες.



Εικόνα 7: Δημιουργία ανισοτροπικών κριωμάτων κολλαγόνου και καλλιέργεια κυττάρων του τένοντα μέσα σε αυτά. A) Καλούπι από υλικά διαφορετικής θερμικής αγωγιμότητας, B-D) Μικροδομή πορώδους κριώματος κολλαγόνου στο διάμηκες επίπεδο για διαφορετικές θερμοκρασίες παγώματος (freezing step), E-G) Μικροδομή του κριώματος στο εγκάρσιο επίπεδο, I) Καλλιέργεια κυττάρων μέσα σε πλαστικές πλάκες δύο επιπέδων (transwell plates)^[12].

1.5 Στόχοι της Διπλωματικής

Η τρισδιάστατη καλλιέργεια κυττάρων είναι σημαντικά πιο πολύπλοκη σε σχέση με την συμβατική καλλιέργεια κυττάρων. Απαιτεί περισσότερα και πιο σύνθετα συστήματα για τον έλεγχο περισσότερων παραμέτρων και την αυτοματοποίηση των διαδικασιών που είναι απαραίτητα για τη διεξαγωγή πειραμάτων μεγάλης κλίμακας.

Η παρούσα διπλωματική εργασία πραγματεύεται το σχεδιασμό και την κατασκευή ενός συστήματος για την αυτοματοποίηση της καλλιέργειας και μελέτης κυττάρων μέσα σε πορώδη ικρίωματα κολλαγόνου. Βασικός σκοπός είναι η δημιουργία μιας συσκευής που θα επιτρέπει τον αυτοματοποιημένο έλεγχο διαφόρων παραμέτρων της κυτταρικής καλλιέργειας με στόχο την ελαχιστοποίηση των δυσκολιών που σχετίζονται με την καλλιέργεια κυττάρων μέσα στα ικρίωματα κολλαγόνου. Ξεπερνώντας τις δυσκολίες που σχετίζονται με το χειρισμό των ικρίωμάτων, η συσκευή που αναπτύχθηκε μπορεί να αποτελέσει τη βάση για τη διεξαγωγή ευρέων πειραμάτων πρωτεωμικής μέσα σε κύτταρα που καλλιεργούνται σε προηγμένα μοντέλα εξωκυττάριας μήτρας.

Για την υλοποίηση του στόχου της, η εργασία αυτή χωρίζεται σε δύο βασικά μέρη. Το πρώτο μέρος παρουσιάζει τον σχεδιασμό του συστήματος και περιλαμβάνει τον καθορισμό των προδιαγραφών που απαιτούνται από το σύστημα, την επιλογή των υλικών, την κατασκευή του συστήματος και την επιλογή και χαρακτηρισμό των διαφόρων εξαρτημάτων του. Το δεύτερο μέρος παρουσιάζει πειράματα που χαρακτηρίζουν την λειτουργία του συστήματος και προτείνουν τις βέλτιστες παραμέτρους λειτουργίας του. Διεξήχθησαν ακόμη πειράματα για τον υπολογισμό και την ελαχιστοποίηση του χρόνου εναλλαγής ρευστών δια μέσου του ικρίωματος. Ο χρόνος αυτός είναι ιδιαίτερα σημαντικός γιατί επιδρά στη διάρκεια πειραμάτων κυτταρικής καλλιέργειας και γιατί εμποδίζει την εκτέλεση πειραμάτων πρωτεωμικής για την μελέτη σηματοδοτικών μονοπατιών ταχείας απόκρισης. Τέλος, δοκιμάζονται πρωτόκολλα μέσω αυτόματης ροής για τη βελτίωση της αποτελεσματικότητας εισαγωγής κυττάρων μέσα στο πορώδες ικρίωμα.

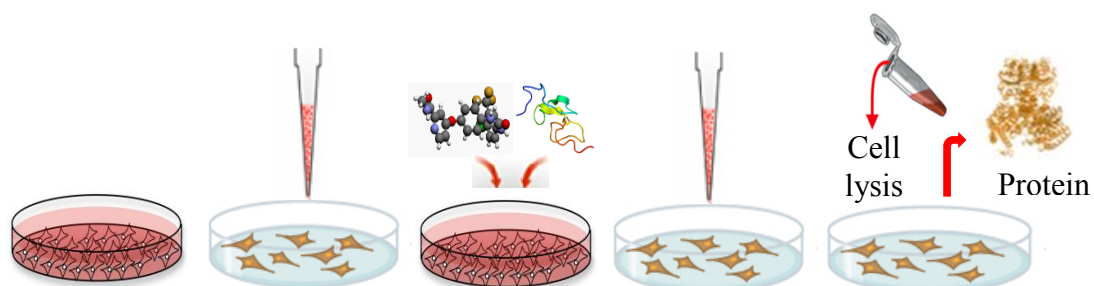
2. Σχεδιασμός Συσκευής για Καλλιέργεια Κυττάρων Μέσα σε Πορώδη Ικρίωματα Κολλαγόνου

Στην παρούσα ενότητα περιγράφεται ο σχεδιασμός μιας συσκευής για την καλλιέργεια κυττάρων μέσα σε πορώδη ικρίωματα κολλαγόνου. Βασικός στόχος είναι η δημιουργία ενός απλού και εύχρηστου συστήματος που θα αποτελέσει τη βάση για μελέτες ευρείας κλίμακας, κυττάρων μέσα σε ικρίωματα κολλαγόνου. Βασική προϋπόθεση για μελέτες ευρείας κλίμακας είναι η ενσωμάτωση ενός αυτόματου συστήματος διακίνησης ρευστών δια μέσου της συσκευής και η βελτιστοποίηση των συνθηκών της κυτταρικής καλλιέργειας. Συνδυάζοντας κατάλληλα αυτά τα επιθυμητά χαρακτηριστικά η συσκευή αυτή αποτελεί τη βάση για την διεξαγωγή πολλαπλών πειραμάτων πρωτεωμικής (high-throughput proteomics) σε κύτταρα που θα αλληλοεπιδρούν με ένα κατάλληλο μοντέλο εξωκυττάριας μήτρας. Στις υποενότητες που ακολουθούν περιγράφονται τα προβλήματα που αναμένονται να λύσει ένα τέτοιο σύστημα, ο καθορισμός των προδιαγραφών του συστήματος, (εδάφιο 2.1), οι μέθοδοι κατασκευής (εδάφιο 2.4), η επιλογή υλικών (εδάφιο 2.3).

2.1 Προδιαγραφές Συστήματος για Καλλιέργεια Κυττάρων Μέσα σε Πορώδη Ικρίωματα Κολλαγόνου

Το πρώτο κύριο βήμα στο σχεδιασμό της συσκευής είναι ο καθορισμός των προδιαγραφών της κατασκευής.

Η Εικόνα 8 δείχνει τα διάφορα βήματα ενός τυπικού πειράματος πρωτεωμικής σε κύτταρα που καλλιεργούνται σε επίπεδες πλαστικές φλάσκες. Τα πιο βασικά βήματα είναι η τοποθέτηση των κυττάρων σε μια πλαστική πλάκα και η καλλιέργεια τους σε κατάλληλο περιβάλλον μέχρι τα κύτταρα να πολλαπλασιαστούν αρκετά. Μετά την απομάκρυνση του θρεπτικού και την πλύση της πλάκας (wash) τα κύτταρα διεγείρονται με κατάλληλους χημικούς παράγοντες (π.χ. φάρμακα, ορμόνες, αυξητικοί παράγοντες). Η πρωτεϊνική απόκριση των κυττάρων σε αυτά τα ερεθίσματα ποσοτικοποιείται μέσω της λύσης των κυττάρων και της ποσοτικοποίησης της ενεργοποίησης συγκεκριμένων πρωτεϊνών ενδιαφέροντος.



Εικόνα 8: Στάδια ενός τυπικού πειράματος για την μελέτη των σηματοδοτικών μονοπατιών σε κύτταρα μέσω πρωτεωμικής ανάλυσης.

Εκτός από την συμβατική μέθοδο της Εικόνα 8, καλλιέργεια κυττάρων και πρωτεωμική ανάλυση μπορεί να γίνει και σε κύτταρα που καλλιεργούνται μέσα σε τρισδιάστατα μοντέλα της εξωκυττάριας μήτρας, τα οποία προσφέρουν ένα πιο φυσιολογικό περιβάλλον στα κύτταρα, το οποίο είναι όμως πειραματικά πιο πολύπλοκο^[17]. Ενδεικτικά για το πορώδες ικρίωμα κολλαγόνου, αναφέρεται η δυσκολία στην εποπτεία της καλλιέργειας καθώς τα κύτταρα δεν είναι ορατά από το μικροσκόπιο, η δυσκολία στην εισαγωγή των κυττάρων μέσα στο υλικό και λόγω του πορώδους του τα πειράματα πρωτεωμικής καθίστανται περισσότερο χρονοβόρα.

Σκοπός της συγκεκριμένης εργασίας είναι ο σχεδιασμός μιας συσκευής η οποία θα αυτοματοποιεί την καλλιέργεια κυττάρων μέσα σε πορώδη ικρίωματα κολλαγόνου με σκοπό την βελτίωση της επαναληψιμότητας των πειραμάτων και την αύξηση των δειγμάτων ανά μονάδα χρόνου.

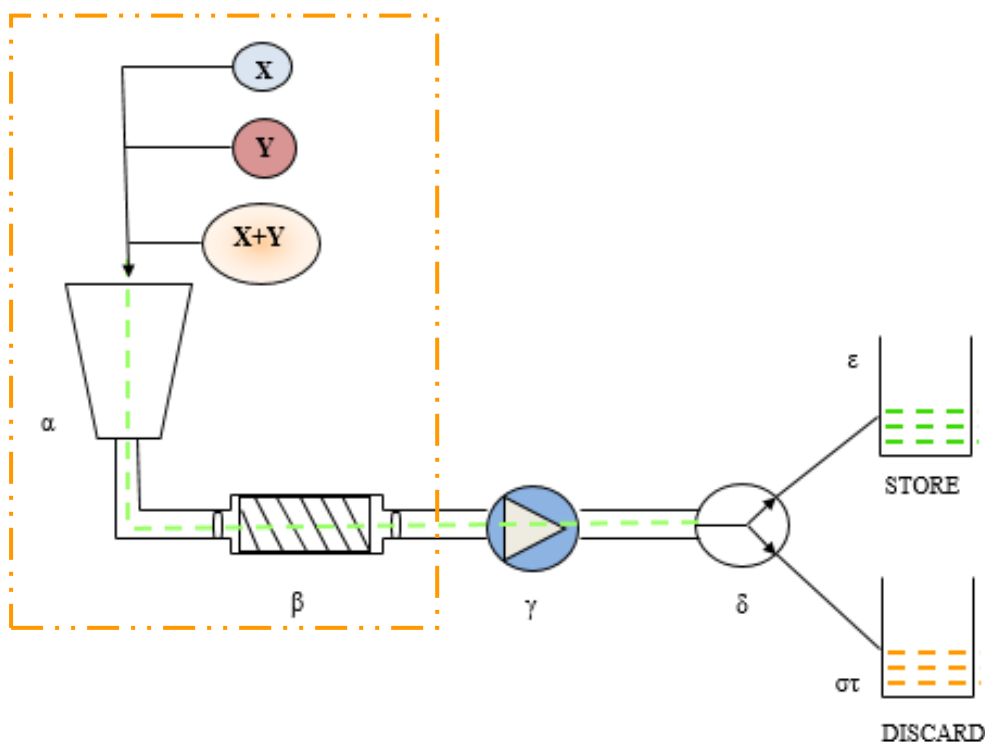
Με βάση την διαδικασία ενός τυπικού πειράματος πρωτεωμικής, οι βασικές προδιαγραφές του συστήματος είναι οι εξής:

- Δυνατότητα παροχής ρευστού έως 3ml
- Ελεγχόμενη παροχή ρευστού μέσα στη μήτρα μεταξύ 1μl/sec-30 μl/sec
- Το ικρίωμα κολλαγόνου να βρίσκεται σε θάλαμο κλειστής μορφής και να μπορεί να διασφαλιστεί στεγανότητα του θαλάμου
- Να υπάρχει δυνατότητα πρόσβασης στο θάλαμο για την αλλαγή του ικρίωματος κολλαγόνου, τον καθαρισμό και την αποστείρωση του θαλάμου
- Επειδή το ικρίωμα κολλαγόνου είναι κυλινδρικής μορφής με $\Phi= 4,5\text{mm}$ και ύψος $h= 3\text{mm}$, ο θάλαμος που θα τοποθετηθεί θα πρέπει να είναι σχεδιασμένος κατάλληλα ώστε να το συγκρατεί ακόμα και στην περίπτωση που αυτό θα έχει συρρικνωθεί. Η διάμετρος και το ύψος του ικρίωματος μικραίνουν όταν αυτό έχει εμποτιστεί με υγρό
- Να υπάρχει δυνατότητα τα διαλύματα να συγκρατούνται σε δοχείο όταν χρειάζονται για το πείραμα και για περαιτέρω επεξεργασία ενώ όταν δεν χρειάζονται να απορρίπτονται σε ξεχωριστό δοχείο. Η παραπάνω διαδικασία να γίνεται αυτόματα.

2.2 Εννοιολογικός Σχεδιασμός του Συστήματος Αυτόματης Καλλιέργειας Κυττάρων σε Πορώδη Ικρίωματα Κολλαγόνου

Για την υλοποίηση των σχεδιαστικών προδιαγραφών απαιτείται ένα σύστημα, το οποίο θα εκτελεί τις βασικές λειτουργίες που παρουσιάζονται στην Εικόνα 9.

Το σύστημα πρέπει να αποτελείται από: i) έναν θάλαμο του ικρίωματος (scaffold housing chamber) όπου στεγάζεται το ικρίωμα, ii) ένα θάλαμο αποθήκευσης διαλυμάτων (liquid source chamber) όπου ο χρήστης θα εισάγει τα ρευστά που θα έρθουν σε επαφή με το ικρίωμα, iii) δοχεία (drain) όπου θα καταλήγουν τα ρευστά μετά το θάλαμο είτε για αποθήκευση (storage) είτε για απόρριψη (discard) ανάλογα με την περίπτωση, iv) σύστημα (αντλίες, βαλβίδες, σωληνώσεις) για την αυτοματοποίηση και τον έλεγχο της ροής του ρευστού διαμέσου του ικρίωματος.



Εικόνα 9: α) Δοχείο στο οποίο θα εισάγονται διάφορα διαλύματα β) Μήτρα στην οποία θα τοποθετείται το κολλαγόνο και θα συγκρατείται γ) Αντλία για τον καθορισμό διεύθυνσης της ροής δ) Βαλβίδα δύο θέσεων για τον έλεγχο της κατεύθυνσης της ροής, ε) Διάταξη στην οποία θα εισέρχεται το διάλυμα και θα αποθηκεύεται εάν είναι επιθυμητό στ) Διάταξη στην οποία θα εισέρχεται το διάλυμα και θα οδηγείται σε δοχείο για να απορριφθεί.

Με βάση τις απαιτούμενες βασικές λειτουργίες του συστήματος και την διαθεσιμότητα των εξαρτημάτων, επιλέχθηκε το σύστημα να αποτελείται από 2 κύρια μέρη (Εικόνα 9):

- Συσκευή: περιέχει και υλοποιεί τα liquid source, housing, drain, (σχέδια εντός του πλαισίου στην Εικόνα 9)
- Αντλία και βαλβίδες: υλοποιούν το σύστημα ελέγχου υγρών. Το μοντέλο της αντλίας που χρησιμοποιήθηκε είναι Cantro XP3000 Modular Digital Pump.

2.3 Υλικά και Κατεργασίες για Συσκευές Καλλιέργειας Κυττάρων σε Πορώδη Ικρίωματα Κολλαγόνου

Οι σύγχρονες μικροσυσκευές για καλλιέργεια κυττάρων βασίζονται στις μεθόδους της φωτολιθογραφίας, μέθοδοι εγχάραξης με λέιζερ, χύτευση, και dry etching (εκτοπισμός υλικού με βομβαρδισμό ιόντων) κ.τ.λ. Οι περισσότερες από αυτές τις μεθόδους απαιτούν ιδιαίτερο εξοπλισμό και κάποιες παρουσιάζουν δυσκολία στη χρήση. Πολλές μέθοδοι όπως φωτολιθογραφία, μέθοδοι εγχάραξης με λέιζερ, dry etching, είναι τεχνικές που εφαρμόζονται σε περιπτώσεις που απαιτείται μεγάλη ακρίβεια στην κατασκευή (της τάξης των εκατοντάδων nm). Στη συγκεκριμένη περίπτωση, η συσκευή για την καλλιέργεια κυττάρων μέσα σε ένα ικρίωμα κολλαγόνου (διαστάσεις της τάξης των 3 mm) δεν απαιτεί μεγάλη ακρίβεια στην κατασκευή.

Λόγω των διαθέσιμων μεθόδων κατασκευής (τόρνος, φρέζα, χύτευση, laser cutter) τα υποψήφια υλικά για την κατασκευή ήταν το PDMS (πολυδιλομεθυλοξάνη) και το PMMA (plexiglass).

Οι περισσότερες μικροροϊκές συσκευές (microfluidic systems) στην βασική βιολογική έρευνα κατασκευάζονται από PDMS (polydimethylsiloxane) και άλλα πολυμερή. Η κατασκευή με πολυμερή είναι πιο εύκολη, πιο φθηνή και πιο ευέλικτη από ότι το πυρίτιο ή το γυαλί. Το PDMS είναι ένα οπτικά διαφανές ελαστομερές του οποίου η δυσκαμψία μπορεί να ελεγχθεί μέσω κατάλληλης αναλογίας στην ανάμιξη των δύο ελαστομερών σιλικόνης που απαιτούνται για την παραγωγή του^[18]. Το plexiglass είναι ένα διαφανές θερμοπλαστικό, το οποίο προτιμάται σε κατασκευές χαμηλού κόστους όπου δεν απαιτούνται μεγάλες δυνάμεις. Εμφανίζει ψαθυρή συμπεριφορά όταν φορτίζεται και παρουσιάζει ευαισθησία σε πολύ υψηλές θερμοκρασίες.

Η κατασκευή ενός καλουπιού για την εξαγωγή του PDMS θεωρήθηκε περισσότερο δύσκολη, καθώς το καλούπι απαιτούσε μεγαλύτερη ακρίβεια σε διαστάσεις και

απλότητα, προκειμένου να αποτραπεί ζημιά στην κατασκευή κατά την εξαγωγή της από το καλούπι. Επίσης προκειμένου να είναι απλό το καλούπι θα χρειάζονταν περισσότερα από ένα καλούπια για τη συνολική κατασκευή. Αυτό σημαίνει πολλά ξεχωριστά κομμάτια που θα έπρεπε να συνδεθούν με κάποιο τρόπο. Το PDMS μπορεί να σφραγιστεί σε εργαστηριακές συνθήκες εκθέτοντας την επιφάνεια του σε πλάσμα αερίου ή οξυγόνου. Τότε το PDMS μπορεί να σφραγισθεί με PDMS, πυρίτιο, πολυστυρένιο, νιτρίδιο του πυριτίου, πολυαιθυλένιο, plexiglass^[18]. Μετά από εργαστηριακές δοκιμές η διαδικασία αυτή δεν είναι πάντα εύκολο να επιτευχθεί, με αποτέλεσμα να μπορούν να προκύπτουν με αυτό τον τρόπο προβλήματα στεγανοποίησης.

Με βάση τις παραπάνω πληροφορίες, επιλέχθηκε η κατασκευή της συσκευής από plexiglass με συμβατικές μεθόδους κατεργασίας. Η μέθοδος αυτή σε σχέση με αυτή του καλουπιού παρουσιάζει το μειονέκτημα της δυσκολίας αναπαραγωγής της συσκευής, δηλαδή της δημιουργίας πολλαπλών συσκευών με εύκολο και σχετικά γρήγορο τρόπο.

Πριν την κατασκευή των συσκευών έγιναν πειράματα για την εξέταση της βιοσυμβατότητας των δύο υλικών (εδάφιο 3.2), καθώς και δοκιμές αποστείρωσης των υλικών σε υψηλές θερμοκρασίες ώστε να βεβαιωθεί η καταλληλότητα τους για τη συγκεκριμένη εφαρμογή.

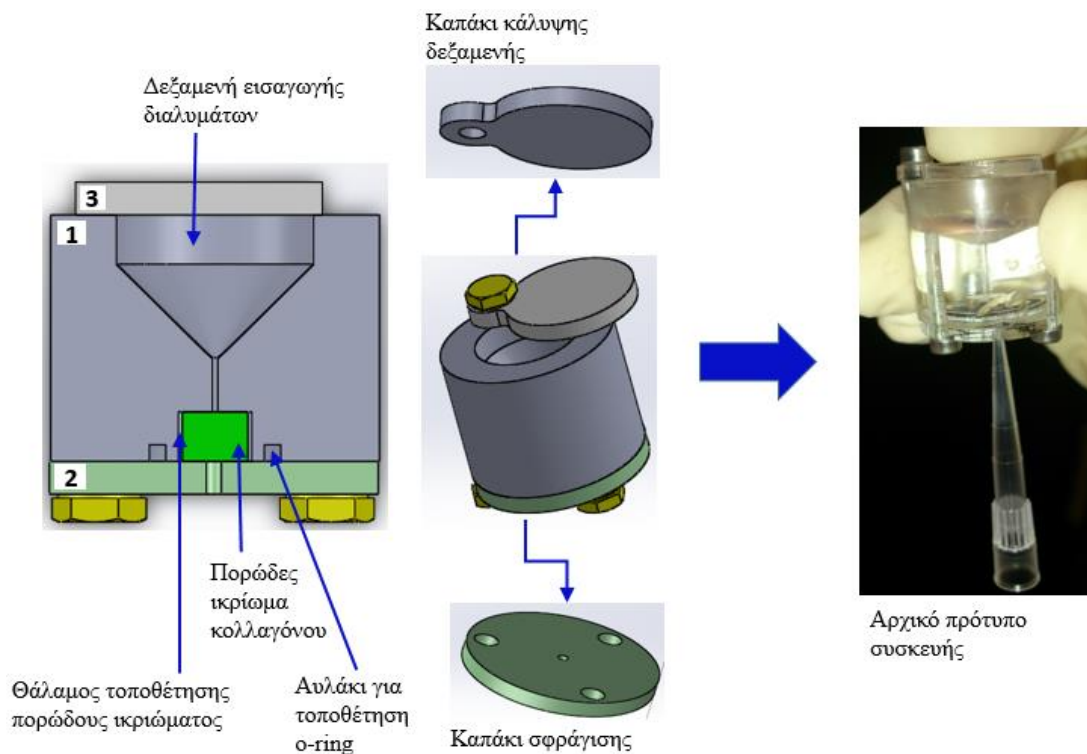
2.4 Σχεδιαστική Υλοποίηση της Συσκευής Καλλιέργειας Κυττάρων σε Πορώδη Ικρίωματα Κολλαγόνου

Στην ενότητα αυτή παρουσιάζονται δύο εκδόσεις για την σχεδιαστική υλοποίηση της συσκευής καλλιέργειας κυττάρων μέσα σε πορώδη ικρίωματα κολλαγόνου. Τα κατασκευαστικά σχέδια της δεύτερης και τελικής έκδοσης παρατίθενται στο παράρτημα Α.

Έκδοση 1: Αρχικό πρωτότυπο της συσκευής

Η αρχική υλοποίηση της κατασκευής (Εικόνα 10) αποτελείται από:

- Το κυρίως κομμάτι που περιέχει το θάλαμο που στεγάζει το πορώδες ικρίωμα κολλαγόνου και το δοχείο εισαγωγής ρευστού. Το κομμάτι αυτό κατασκευάζεται από PMMA μέσω κατεργασίας σε τόρνο.
- Το κάτω κομμάτι που στεγανοποιεί τον θάλαμο στέγασης του ικρίωματος μέσω ενός o-ring. Κατασκευή κόβοντας plexiglass μέσω λέιζερ
- Το πάνω κομμάτι που κλείνει τον θάλαμο εισαγωγής ρευστού. Κατασκευάζεται από plexiglass με κοπή σε λέιζερ



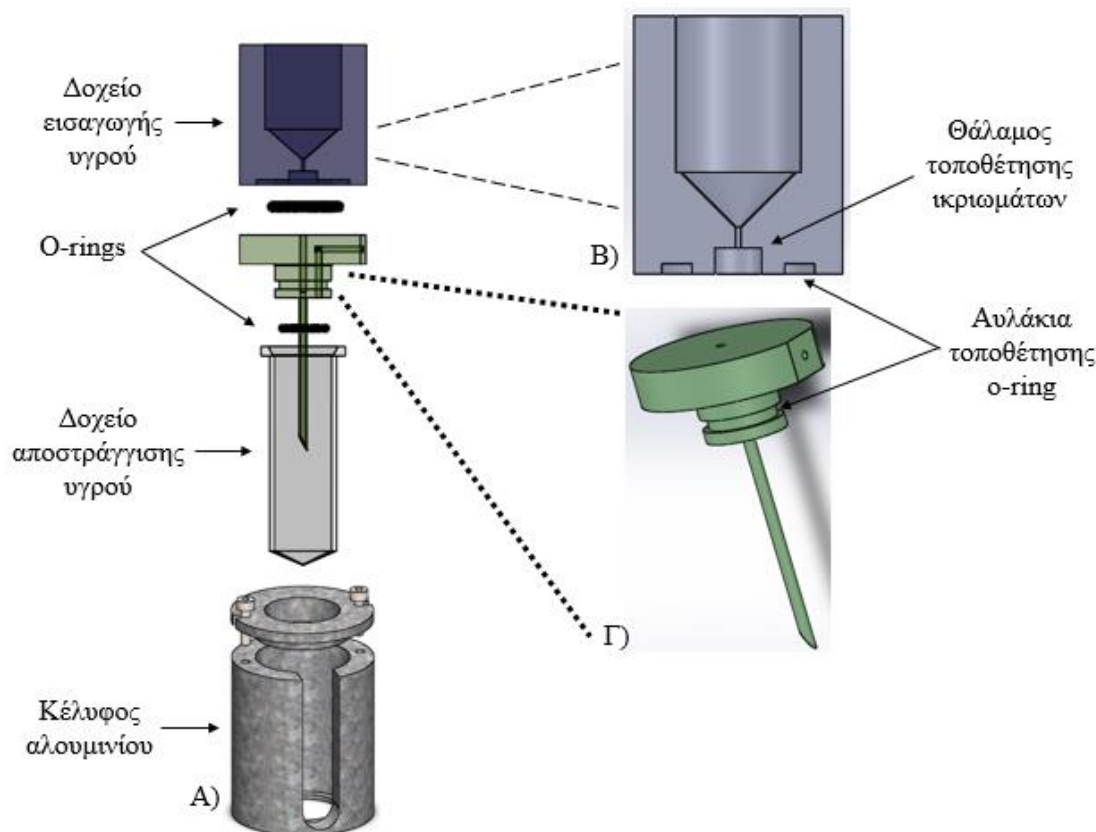
Εικόνα 10: Τρισδιάστατα μοντέλα CAD της συσκευής για καλλιέργεια κυττάρων σε πορώδη ικρίωματα κολλαγόνου και αρχικό πρότυπο της συσκευής από PMMA

Η πρώτη έκδοση της συσκευής κρίθηκε ότι πρέπει να τροποποιηθεί για διάφορους λόγους:

1. Το αυτοματοποιημένο σύστημα για τη διακίνηση ρευστού που επιλέχθηκε είναι μία αντλία σύριγγας, Canro XP 3000. Η αντλία επιλέχθηκε να έρχεται σε επαφή μόνο με αέρα ή νερό και όχι με ρευστά που περιέχουν σωματίδια ή κύτταρα που θα μπορούσαν να προκαλέσουν μόλυνση των κυττάρων. Σε αυτή την περίπτωση η συσκευή θα έπρεπε να συνδέεται με ένα άλλο κλειστό και στεγανό δοχείο στο οποίο να καταλήγουν τα διαλύματα και έπειτα αυτό το δοχείο να συνδέεται με την αντλία. Εναλλακτικά, στην περίπτωση που η συλλογή ρευστών γίνονταν από τον πειραματιστή, το σύστημα θα μπορούσε να λειτουργεί με δημιουργία κενού στο σωλήνα διακίνησης ρευστών. Σε αυτή την περίπτωση όμως θα απαιτούνταν μεγάλο μήκος σωλήνα με αποτέλεσμα αύξηση απωλειών και δημιουργία φυσαλίδων.
2. Για να είναι πιο εύκολη η πρόσβαση στο θάλαμο που περιέχει το πορώδες ικρίωμα προτείνεται ένας διαφορετικός τρόπος διασύνδεσης των επιμέρους κομματιών της συναρμογής.
3. Η δυσκολία της δημιουργίας σπειρώματος στα λεπτά τοιχώματα του PMMA και η συνεχής χρήση των βιδών δια μέσου του θα μπορούσε να δημιουργήσει ρωγμές στο υλικό.

Επίσης προκειμένου να μην υπάρχουν δύο δοχεία για την συλλογή διαλυμάτων τα οποία απαιτούν την εγκατάσταση βαλβίδων, επιλέχθηκε η συλλογή διαλυμάτων, όταν απαιτείται η αποθήκευσή τους, να γίνεται χειροκίνητα από τον χρήστη.

Έκδοση 2: Τελικό πρωτότυπο της συσκευής



Εικόνα 11: Τρισδιάστατα μοντέλα CAD τροποποιημένου σχεδίου της συσκευής. Α) Κέλυφος αλουμινίου με καπάκι που πιέζει τα δύο κομμάτια της συσκευής Β, Γ με δύο βίδες Β) Θάλαμος τοποθέτησης πορώδους ικρίωματος κολλαγόνου από PMMA, Γ) Τεμάχιο που βοηθά στη στεγανοποίηση της συσκευής και στη διασύνδεση της με το σύστημα της αντλίας από PMMA.

Η τελική έκδοση της συσκευής αποτελείται από τα εξής μέρη:

Το κομμάτι Β που αποτελείται από το θάλαμο τοποθέτησης του ικρίωματος, Εικόνα 11Β. Σε σχέση με την πρώτη έκδοση (Εικόνα 10, τεμάχιο1) υπάρχουν διαφορές στη διαστασιολόγηση. Το δοχείο εισαγωγής υγρού έγινε μεγαλύτερο ώστε να συγκρατεί περισσότερο όγκο. Η απόσταση μεταξύ του θαλάμου εισαγωγής του ικρίωματος και του αυλακιού τοποθέτησης των στεγανοποιητικών δακτυλίων (o-rings) έγινε μεγαλύτερη για να μην υπάρξει περίπτωση εγκλωβισμού του ικρίωματος στο λαστιχένιο o-ring. Το κομμάτι Γ που προστέθηκε (Εικόνα 11, τεμάχιο Γ), αποτελείται από δύο οπές. Μία διαμπερής οπή για την κατάληξη του ρευστού στο δοχείο αποστράγγισης (2ml tube), στην άκρη της οποίας τοποθετείται το στόμιο μίας πιπέτας των 10μl, για την ομαλή κατάληξη του ρευστού στο δοχείο. Μία οπή τύπου γ, όπου η μία άκρη της καταλήγει μέσα στο δοχείο αποστράγγισης και η άλλη άκρη της στην κυλινδρική περιφέρεια του τεμαχίου. Η οπή αυτή στην περιφέρεια του κυλίνδρου συνδέεται με κατάλληλο σωλήνα ο οποίος συνδέεται με το σύστημα της αντλίας. Το κομμάτι Γ υλοποιεί την σύνδεση της συσκευής με την αντλία. Όταν το σύστημα

συσκευή-αντλία είναι κλειστό και δεν υπάρχουν απώλειες αέρα, στο δοχείο αποστράγγισης ρευστού έχει εγκλωβιστεί αέρας και έχει αναπτυχθεί πίεση που δεν επιτρέπει στο ρευστό που βρίσκεται μέσα στο δοχείο εισαγωγής υγρού να κατευθυνθεί προς τα κάτω. Όταν η αντλία τραβήξει αέρα από τη μεριά που είναι συνδεδεμένη με τη συσκευή τότε δημιουργείται πτώση πίεσης μέσα στο θάλαμο αποστράγγισης που αναγκάζει το ρευστό να κινηθεί προς τα κάτω. Το κέλυφος αλουμινίου (Εικόνα 11, τεμάχιο Α), αποτελεί έναν διαφορετικό τρόπο διασύνδεσης των κομματιών και εξασφαλίζει τη στεγάνωση του συστήματος. Το αλουμίνιο επιλέχθηκε για λόγους ανθεκτικότητας και ευκολίας στην κατεργασία.

Σύμφωνα με τις προδιαγραφές του συστήματος (Ενότητα 2.1), η τελική συσκευή παρέχει ένα θάλαμο κλειστής μορφής για το πορώδες ικρίωμα κολλαγόνου. Ο θάλαμος αυτός έχει κατασκευαστεί με μικρότερη διάμετρο και ύψος από ότι το πορώδες ικρίωμα, έτσι ώστε όταν αυτό συρρικνωθεί ο κενός χώρος μέσα στο θάλαμο να είναι λιγότερος. Παρ' όλα αυτά το ικρίωμα δεν συγκρατείται με κάποιο τρόπο όταν έχει υγροποιηθεί με αποτέλεσμα η ροή να μην περνά μόνο δια μέσου του ικριώματος. Η διάμετρος του θαλάμου τοποθέτησης του υλικού δεν μπορεί να μικρύνει πάρα πολύ γιατί το ικρίωμα θα παραμορφώνονταν πολύ στην αρχική, ξηρή μορφή του. Μέσω των δακτυλίων (o-ring) διασφαλίζεται η στεγανότητα του θαλάμου και δίδεται η δυνατότητα πρόσβασης στο θάλαμο για καθαρισμό και αποστείρωση. Επίσης, η συσκευή συγκρατεί όλα τα διαλύματα που διέρχονται από το θάλαμο στο δοχείο αποστράγγισης. Επομένως όταν το δοχείο γεμίσει ή εάν το διάλυμα πρέπει να πεταχτεί η διαδικασία γίνεται χειροκίνητα από το χρήστη. Έτσι, τα βιολογικά πειράματα δεν μπορούν να γίνονται πλήρως αυτοματοποιημένα. Το κριτήριο της πλήρους αυτοματοποίησης του συστήματος δεν αποτέλεσε το βασικό γνώμονα στο σχεδιασμό καθώς αύξανε την πολυπλοκότητα του συστήματος. Στην παρούσα φάση του σχεδιασμού βασικό κίνητρο είναι να μπορέσει ο πειραματιστής να εξετάσει την αλληλεπίδραση ενός αυτοματοποιημένου συστήματος στην καλλιέργεια κυττάρων μέσα σε πορώδη ικρίωματα κολλαγόνου για μελλοντικά πειράματα πρωτεωμικής.

Διαδικασία κατασκευής τελικού προτύπου της συσκευής

Τεμάχιο Α: Κέλυφος Αλουμινίου

- Χρησιμοποιήθηκε ράβδος αλουμινίου εξωτερικής διαμέτρου $\Phi_{εξ}= 30\text{mm}$ και μήκους 34mm
- Στον τόρνο διανοίχθηκε οπή στο κέντρο της ράβδου $\Phi_{εσ}= 20\text{mm}$, ώστε να εφάπτονται τα δύο κομμάτια της συσκευής από PMMA (τεμάχια Β, Γ) και βάθους κοπής 33mm
- Στην άλλη πλευρά του κομματιού, στον τόρνο, διανοίχθηκε διαμετρής οπή $\Phi= 16\text{mm}$ (για να στηρίζονται τα κομμάτια της συσκευής)
- Στη φρέζα, το κομμάτι στηρίχθηκε στις επίπεδες πλευρές του και διανοίχθηκε αυλάκι σε όλο το πάχος του υλικού πλάτους 8mm και συνολικού ύψους ~32mm

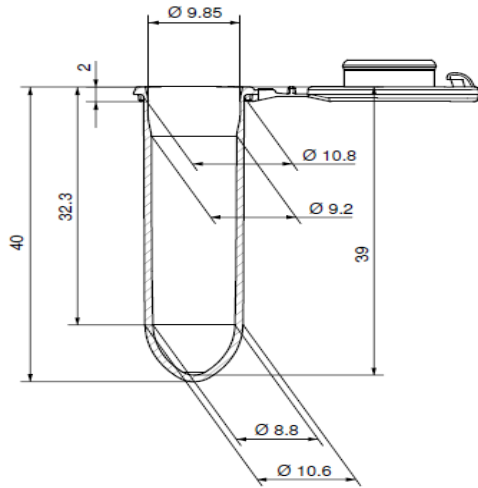
- Για το καπάκι του κελύφους χρησιμοποιήθηκε ράβδος αλουμινίου διαμέτρου $\Phi_{εξ}= 30\text{mm}$ και μήκους 9mm
- Στον τόρνο διανοίχθηκε διαμπερής οπή διαμέτρου 16mm
- Το καπάκι κόπηκε περιφερειακά στον τόρνο μέχρι διαμέτρου των 20mm με βάθος κοπής τα 3,2mm

Τεμάχιο Β (Εικόνα 11Β) – θάλαμος τοποθέτησης των ικριωμάτων

- Χρησιμοποιήθηκε ράβδος PMMA $\Phi_{εξ}= 20\text{mm}$ και ύψους ~25mm
- Στον τόρνο διανοίχθηκε οπή στο κέντρο της ράβδου διαμέτρου 12mm και ύψους 15mm. Οι διαστάσεις αυτές προκύπτουν μετά από υπολογισμούς ώστε ο συνολικός όγκος του δοχείου εισαγωγής υγρού να είναι 2ml.
- Με κατάλληλο εργαλείο κωνικής διαμόρφωσης 45° δημιουργήθηκε κωνικότητα στο δοχείο μήκους ~5,5mm ώστε να μην παραμένουν υπολείμματα διαλυμάτων
- Στην άλλη πλευρά του κομματιού, στον τόρνο, διανοίχθηκε οπή διαμέτρου 4mm και βάθους 2,5mm (μικρότερες από τις διαστάσεις του ικριώματος $\Phi= 4,5\text{mm}$, $h= 3\text{mm}$)
- Από τις δύο πλευρές του κομματιού, για να μην σπάσει το κοπτικό εργαλείο, δημιουργήθηκε οπή διαμέτρου 0,5mm και βάθους 2mm, η οποία συνδέει το δοχείο εισαγωγής υγρού με το θάλαμο του πορώδους ικριώματος
- Στην πλευρά του θαλάμου, διανοίχθηκε αυλάκι στον τόρνο πλάτους 2,8mm και βάθους 1mm. Οι διαστάσεις προέκυψαν με βάση την επιλογή στεγανοποιητικού δακτυλίου για την συγκεκριμένη συναρμογή, όπως εξηγείται πιο κάτω.

Τεμάχιο Γ (Εικόνα 11Γ) – Κομμάτι διασύνδεσης με το σύστημα της αντλίας

- Χρησιμοποιήθηκε ράβδος PMMA $\Phi_{εξ}= 20\text{mm}$ και ύψους ~11mm
- Γνωρίζοντας τις διαστάσεις ενός 2ml centrifuge tube (Εικόνα 12) η εσωτερική διάμετρος του είναι 9,85mm. Επιλέγεται το τεμάχιο Γ να κοπεί περιφερειακά στον τόρνο μέχρι $\Phi= 8,9\text{mm}$ και διαμήκη μετατόπιση του εργαλείου κατά 6mm
- Το αυλάκι για την τοποθέτηση του στεγανωτικού δακτυλίου, διανοίχθηκε περιφερειακά με βάθος κοπής 0,7mm και διαμήκη μετατόπιση του εργαλείου 1,5mm.
- Στον τόρνο διανοίχθηκε και η διαμπερής κεντρική οπή διαμέτρου 1mm
- Η οπή τύπου γ , έγινε στη φρέζα. Η οπή στην επίπεδη επιφάνεια του κομματιού ($\Phi= 1\text{mm}$) έγινε σε απόσταση 2,5mm από την κεντρική διαμπερής οπή και βάθος διείδυσης του κοπτικού εργαλείου 9mm. Η οπή στην κυλινδρική περιφέρεια ($\Phi= 1\text{mm}$) έγινε με βάθος κοπής 7,5mm. Ιδιαίτερη προσοχή δόθηκε στην ευθυγράμμιση του κομματιού έτσι ώστε οι δύο τρύπες να συμπέσουν σχηματίζοντας γ .



Εικόνα 12: Τυπικές διαστάσεις ενός αναλώσιμου 2ml centrifuge tube^[34]

Επιλογή στεγανωτικών δακτυλίων (o-ring)

Στην έκδοση 2 της συσκευής, δύο ζεύγη εξαρτημάτων (εξαρτήματα Β και Γ, εξάρτημα Γ και αναλώσιμο δοχείο) πρέπει να συναρμολογηθούν με τρόπο που να εξασφαλίζει την στεγάνωση τους. Η συναρμολόγηση των εξαρτημάτων Β και Γ πρέπει να επιτρέπει την εύκολη τοποθέτηση/απομάκρυνση των ικριωμάτων, και ταυτόχρονα την στεγάνωση της επιφάνειας επαφής τους ώστε να αποτραπεί απώλεια του υγρού που διαρρέει το ικρίωμα ή μόλυνση από το περιβάλλον. Η συναρμολόγηση του εξαρτήματος Γ με το δοχείο πρέπει να επιτρέπει την εύκολη συναρμολόγηση και αποσυναρμολόγηση του, αλλά ταυτόχρονα πρέπει να εξασφαλίζει καλή στεγάνωση ώστε η αντλία να μπορεί να τραβάει κενό και να μετακινεί υγρά διαμέσου του ικριώματος. Και στις δύο περιπτώσεις η στεγάνωση υλοποιήθηκε μέσω ενός στεγανωτικού δακτυλίου (o-ring) λόγω της απλότητας του σχεδιασμού της στεγάνωσης. Στο ζεύγος των εξαρτημάτων Β και Γ ο δακτύλιος στεγανοποιεί κατά την αξονική κατεύθυνση του, στο ζεύγος Γ-δοχείο ο δακτύλιος στεγανοποιεί κατά την ακτινική κατεύθυνση του.

Οι περισσότεροι στεγανωτικοί δακτύλιοι o-ring διατίθενται σε καθορισμένα μεγέθη. Όμως όταν η εφαρμογή αφορά δυναμική, παλινδρομική κίνηση, δεν είναι όλα τα μεγέθη o-ring αποδεκτά. Σε τέτοιες εφαρμογές, τα o-ring με μικρότερη διάμετρο διατομής είναι λιγότερο σταθερά με τάση να συστρέφονται στο αυλάκι^[37]. Στην περίπτωση του αυλακιού o-ring στο τεμάχιο Γ, παρ' όλο που η στεγάνωση είναι στατική, λόγω της συνεχούς αλλαγής του αναλώσιμου δοχείου αποστράγγισης, παρατηρήθηκε αυτό το φαινόμενο. Γι' αυτό επιλέχθηκε o-ring μεγαλύτερης διαμέτρου διατομής.

Όταν ένα o-ring τοποθετηθεί στο αυλάκι έδρασης του, υφίσταται μια αρχική παραμόρφωση κατά τη διάμετρό του, η οποία εξασφαλίζει την επαφή του o-ring με τα τοιχώματα υπό στατικές συνθήκες. Όταν ασκηθεί περαιτέρω πίεση το o-ring παραμορφώνεται και άλλο προκειμένου να μην υπάρξει διαρροή^[19]. Έτσι το αυλάκι που θα δημιουργηθεί πρέπει να είναι αρκετά μεγάλο ώστε να «χωρέσει» τη μέγιστη

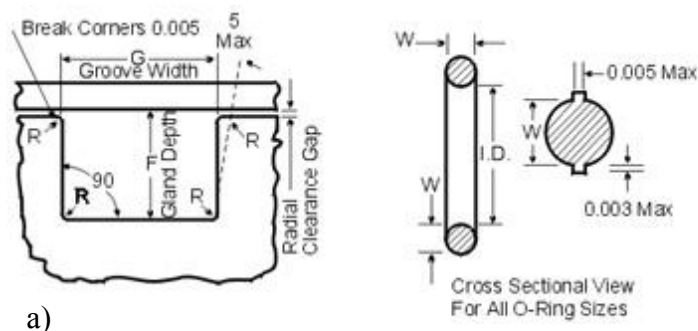
διαστολή του o-ring. Σύμφωνα με την παρακάτω εικόνα και τον συνοδευόμενο πίνακα επιλέχθηκαν οι κατάλληλες διαστάσεις για τη δημιουργία αυλακιών τοποθέτησης των o-ring (Εικόνα 13). Επίσης, ενδεικνύόμενες οδηγίες για την επιλογή των διαστάσεων συνιστούν: α) Η διάμετρος διατομής (W) του o-ring να είναι περίπου 20% μεγαλύτερη από το “gland depth” (Εικόνα 13a), β) το πλάτος του αυλακιού να είναι περίπου 1,5 φορές μεγαλύτερο από τη διάμετρο διατομής (W) του o-ring^[19].

Έτσι για τη στεγάνωση του τεμαχίου Γ (Εικόνα 11Γ) με το αναλώσιμο δοχείο (2ml centrifuge tube) ο στεγανωτικός δακτύλιος διαστασιολογήθηκε ως εξής:

- Η εξωτερική διάμετρος του τεμαχίου Γ (9,1 mm) που θα τοποθετηθεί ο δακτύλιος πρέπει να είναι λίγο μεγαλύτερη από την εσωτερική διάμετρο του αναλώσιμου δοχείου (9,2 mm) για να μην έρθουν σε επαφή. Το διάκενο που απομένει στην κάθε πλευρά είναι 0,5 mm
- Η διάμετρος του αυλακιού του τεμαχίου Γ, η θέση που εφάπτεται η εσωτερική διάμετρος του στεγανοποιητικού δακτυλίου, είναι 7,6 mm. Άρα το βάθος του αυλακιού είναι $\frac{9,1-7,6}{2} = 0,75 \text{ mm}$.
- Το συνολικό βάθος, gland depth, (Εικόνα 13a, (F)) είναι $F = 0,75 + 0,5 = 1,25$

Σύμφωνα και με τις ενδεικνύόμενες οδηγίες που αναφέρθηκαν παραπάνω η διάμετρος διατομής (W) του o-ring επιλέχθηκε 20% μεγαλύτερη από το gland depth (F). Το o-ring που επιλέχθηκε έχει εσωτερική διάμετρο 5 mm και διάμετρο διατομής W= 1,5 mm.

Με παρόμοιο τρόπο επιλέχθηκε το o-ring για το τεμάχιο Β (Εικόνα 11Β), εσωτερικής διαμέτρου 8 mm και διάμετρο διατομής W= 2 mm.



a)

Table 1. Gland Depth for O-Ring Applications

Standard O-Ring Cross-Sectional Diameter (in.)	Gland Depth (in.)	
	Reciprocating Seals	Static Seals
0.070	0.055 to 0.057	0.050 to 0.052
0.103	0.088 to 0.090	0.081 to 0.083
0.139	0.121 to 0.123	0.111 to 0.113
0.210	0.185 to 0.188	0.170 to 0.173
0.275	0.237 to 0.240	0.226 to 0.229

b)

Εικόνα 13: a) Σχεδιαστικές λεπτομέρειες αυλακιού και o-ring, b) Συνιστάμενο gland depth (F) για εφαρμογές στεγανοποίησης^[19]

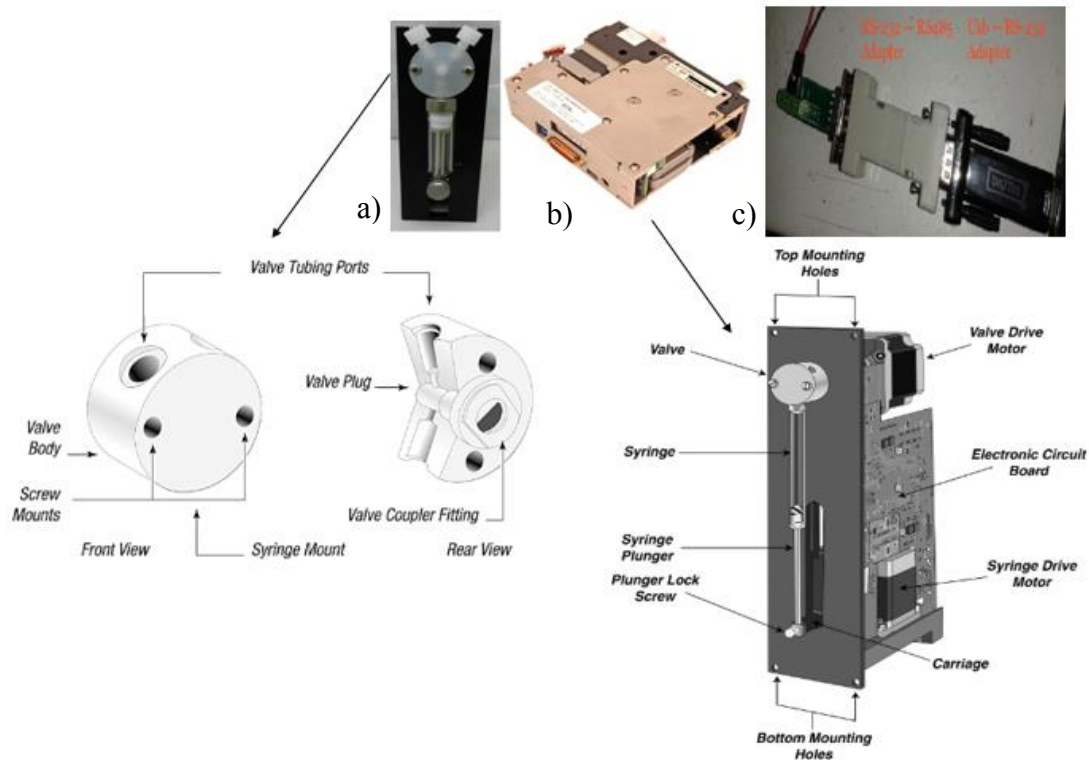
2.5 Σύστημα Αυτόματης Διαχείρισης Ρευστών

Στην ενότητα αυτή παρουσιάζεται η διασύνδεση της συσκευής με το αυτοματοποιημένο σύστημα της αντλίας. Στην ενότητα 2.5.1 περιγράφεται το μοντέλο της αντλίας, τα επιμέρους χαρακτηριστικά του και το γραφικό περιβάλλον μέσω του οποίου ο χρήστης την ελέγχει. Στην ενότητα 2.5.2 περιγράφεται ο τρόπος διασύνδεσης της αντλίας με τη συσκευή και τα υλικά που χρησιμοποιήθηκαν.

Ο προγραμματισμός της αντλίας και η δημιουργία του γραφικού περιβάλλοντος έγινε από τον προπτυχιακό φοιτητή, του τμήματος μηχανολόγων μηχανικών Νίκο Κουκή, σε γλώσσα προγραμματισμού Python.

2.5.1. Χαρακτηριστικά Αντλίας

Το μοντέλο της αντλίας που χρησιμοποιήθηκε είναι Cavro XP3000 Modular Digital Pump, μία αντλία θετικής μετατόπισης τύπου σύριγγας. Πρόκειται για ένα ολοκληρωμένο σύστημα που περιέχει το έμβολο της σύριγγας, μια βαλβίδα ελέγχου της ροής, δύο κινητήρες που ελέγχουν την κίνηση του εμβόλου και της βαλβίδας, και ηλεκτρονικά συστήματα ελέγχου και οδήγησης (Εικόνα 14b). Η αντλία μπορεί να φέρει σύριγγα διαφόρων μεγεθών, παρόλα αυτά σε όλα τα πειράματα της συγκεκριμένης εργασίας χρησιμοποιήθηκε σύριγγα 1ml. Η βαλβίδα του συστήματος μπορεί να βρεθεί σε τρεις θέσεις που αντιστοιχούν σε i) είσοδος ρευστού (input), ii) έξοδος ρευστού (output), iii) παράκαμψη της σύριγγας (bypass). Η αντλία συνδέεται με το περιβάλλον της μέσω δύο οπών θηλυκού σπειρώματος M6 στην βαλβίδα (Εικόνα 14). Η αντλία συνδέεται μέσω σειριακής επικοινωνίας σε H/Y (Εικόνα 14c) και ο χρήστης μπορεί να επικοινωνήσει με την αντλία, εγκαθιστώντας το κατάλληλο λογισμικό^[35], μέσω του γραφικού περιβάλλοντος.



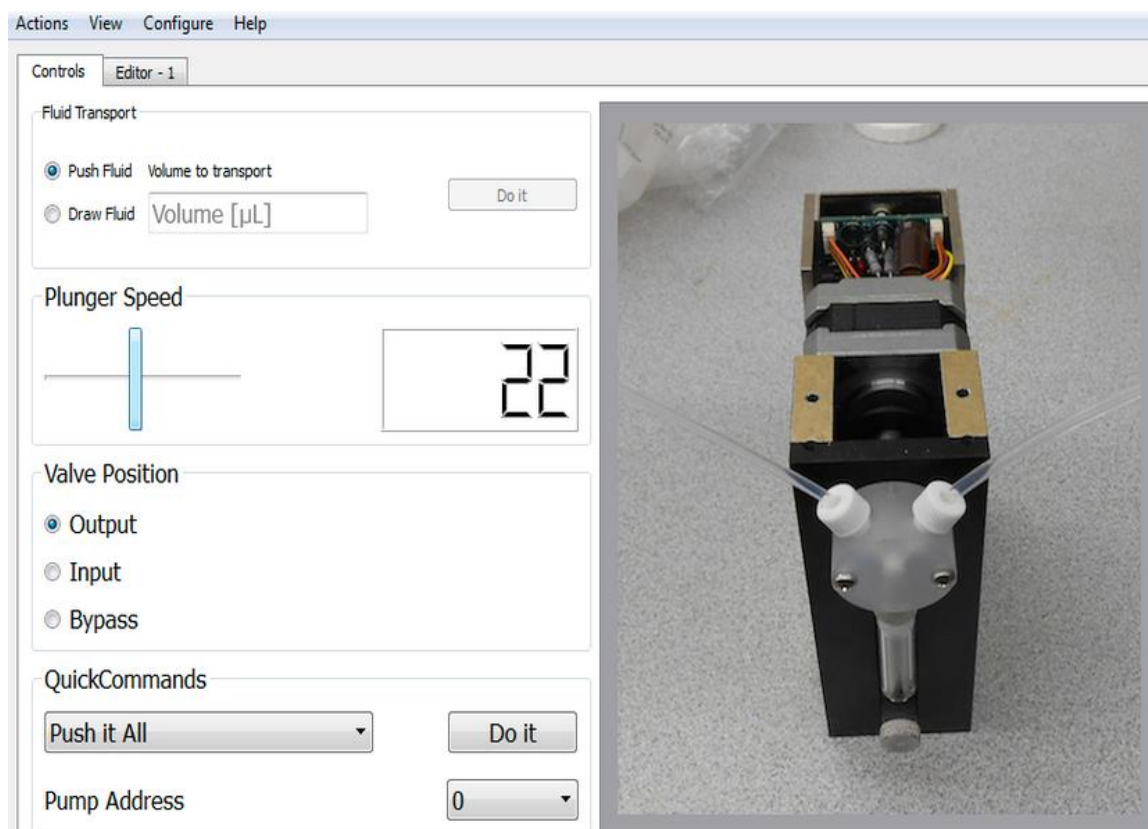
Εικόνα 14: a) Πρόοψη της αντλίας – Η θέση της σύριγγας – Οι θέσεις input, output, bypass, b) Ολοκληρωμένο σύστημα της αντλίας, c) Υποδοχείς διασύνδεσης της αντλίας με τον υπολογιστή

Γραφικό περιβάλλον του συστήματος της αντλίας

Μόλις ο χρήστης, ακολουθώντας σωστά τις οδηγίες για να συνδεθεί με την αντλία^[36], εισέλθει στο γραφικό περιβάλλον του συστήματος, γίνεται αυτόματα από το λογισμικό αρχικοποίηση της αντλίας μετακινώντας την σύριγγα στην επάνω θέση. Το γραφικό περιβάλλον που παρατηρείται μόλις ανοίξει το σύστημα είναι αυτό που φαίνεται παρακάτω (Εικόνα 15). Υπάρχουν τέσσερις διακριτές περιοχές όπως παρατηρείται και από την εικόνα που οριοθετούνται από πλαίσιο.

- Στην 1^η περιοχή ο χρήστης μπορεί να ορίσει τον όγκο ρευστού (σε μl) που επιθυμεί να διακινηθεί, καθώς και την φορά κίνησης της σύριγγας (push/ pull)
- Στη 2^η περιοχή ο χρήστης ορίζει την ταχύτητα του εμβόλου της σύριγγας. Η κλίμακα από 1 μέχρι 40 αντιστοιχεί από την πιο γρήγορη στην πιο αργή ταχύτητα. Παρακάτω δίδεται πίνακας που φανερώνει την αντιστοιχία της κλίμακας 1 - 40 σε μονάδες συχνότητας (Hz) και σε παροχή (μl/sec) για τις πιο συχνά χρησιμοποιούμενες τιμές της ταχύτητας.
- Στην 3^η περιοχή ο χρήστης επιλέγει τη θέση της βαλβίδας (input, output, bypass)
- Η 4^η περιοχή παρέχει διάφορες εντολές ελέγχου της αντλίας. Για παράδειγμα, μπορεί να οριστεί η μετακίνηση του εμβόλου από τη θέση που βρίσκεται στη θέση τερματισμού, προς τα πάνω ή προς τα κάτω. Δίνεται ακόμη η δυνατότητα τερματισμού μιας εντολής που ήδη βρίσκεται σε εξέλιξη

Τέλος, μέσω του editor's tab, δίδεται η δυνατότητα δημιουργίας και εκτέλεσης μιας σειράς εντολών (scripting), (Εικόνα 15). Με αυτό το τρόπο ο χρήστης μπορεί να καθορίσει μια σειρά διαδικασιών οι οποίες θα εκτελεστούν αυτόματα όταν αυτός το ορίσει, και να παρακολουθήσει το ιστορικό και την πρόοδο της αντλίας.



Εικόνα 15: Βασικό παράθυρο γραφικού περιβάλλοντος του συστήματος της αντλίας^[36]

Speed code	Pump Frequency (Hz)	Fluid Supply ($\mu\text{l}/\text{sec}$)
1	5600	833,33
5	3200	526,3
10	1600	270,3
15	600	100
20	170	28,2
25	120	20
30	70	11,6
35	20	3,33
40	10	1,66

Πίνακας 1: Κλίμακα ταχύτητας του γραφικού περιβάλλοντος της αντλίας σε μονάδες συχνότητας και παροχής

2.5.2 Σχεδιασμός Διασύνδεσης της Συσκευής με την Αντλία

Σε αυτή την ενότητα επεξηγείται ο τρόπος με τον οποίο επιλέχθηκαν τα στοιχεία διασύνδεσης της συσκευής για καλλιέργεια κυττάρων (ενότητα 2.4) με την αντλία (ενότητα 2.5.1). Βασικός στόχος αποτέλεσε η εξάλειψη απωλειών και διαρροών και η ομαλή λειτουργία του συστήματος. Εκτός από την επιλογή κατάλληλου σωλήνα για τη διακίνηση ρευστών, αναλύεται και ο τρόπος που ο σωλήνας συνδέθηκε με την αντλία και τη συσκευή, και δίδεται μια σύντομη περιγραφή για τη λειτουργία ολόκληρου του συστήματος.

Εκλογή Σωλήνα για τη Διακίνηση Ρευστών στο Σύστημα Συσκευή – Αντλία

Βασικό κριτήριο για την επιλογή σωλήνα αποτέλεσε να είναι από ένα μη τοξικό υλικό το οποίο να μπορεί να αποστειρωθεί (μέχρι τους $\sim 120^{\circ}\text{C}$) και η εσωτερική του διάμετρος να μην ξεπερνά τα 2mm καθώς θα πρέπει να μπορούν να διακινούνται μικροί όγκοι χωρίς τη δημιουργία φυσαλίδων. Οι διαθέσιμες επιλογές σωληνώσεων που ικανοποιούν τα δύο αναφερθέντα κριτήρια είναι σωλήνες από σιλικόνη (Ibidi, cells in focus) που παρουσιάζονται στον πίνακα 2.

Για το σωλήνα	1	2	3
Εσωτερική διάμετρος (mm)	0,5	0,8	1,6
Εξωτερική διάμετρος (mm)	2,1	2,8	3,2
Πάχος τοιχώματος (mm)	0,8	1	0,8

Πίνακας 2: Χαρακτηριστικές διαστάσεις σωλήνων διασύνδεσης της συσκευής με την αντλία

Η ανάλυση που ακολουθεί αφορά το σωλήνα με εσωτερική διάμετρο 0,8mm και πάχος τοιχώματος 1mm που επιλέχθηκε για τη συσκευή. Η 3^η επιλογή του πίνακα 2, για σωλήνα εσωτερικής διαμέτρου 1,6 mm, δεν επιλέχθηκε καθώς είναι αρκετά μεγάλη για την διακίνηση μικρών ποσοτήτων με αποτέλεσμα τη δημιουργία κενού και φυσαλίδων διαμέσου του σωλήνα. Μεταξύ της 1^{ης} και της 2^{ης} επιλογής καμία από τις δύο δεν βρέθηκε να προκαλεί τυρβώδη ροή, σύμφωνα με την παρακάτω ανάλυση. Η 2^η επιλογή έγινε για λόγους χρήσης μικρότερου μήκους σωλήνα για τη διακίνηση των ρευστών.

Γνωρίζουμε από τη μηχανική ρευστών ότι για να είναι στρωτή η ροή σε έναν αγωγό ο αριθμός Reynolds πρέπει να είναι $Re \leq 2300$. Ο αριθμός Reynolds δίνεται από τη σχέση

$$Re = V * \frac{D}{\nu}$$

, όπου V η ταχύτητα του ρευστού, D η διάμετρος του αγωγού και ν η κινηματική συνεκτικότητα του ρευστού [20]

Για σωλήνα με $D=0,8\text{mm}$ και για ροή νερού $\nu = 10^{-6} \text{ m}^2/\text{s}$ (κινηματικό ιξώδες νερού), η μέγιστη ταχύτητα για την οποία η ροή μέσα στον σωλήνα είναι στρωτή είναι:

$$V_{max} = 2300 * \frac{10^{-6}}{8 * 10^{-4}} = 2,875 \text{ m/s}$$

Η V_{max} είναι η οριακή ταχύτητα που επιτρέπεται να έχει το ρευστό μέσα στο σωλήνα ώστε η ροή να είναι στρωτή. Η αντίστοιχη μέγιστη επιτρεπόμενη παροχή στο σωλήνα είναι:

$$Q = V_{max} * A$$

$$Q = \frac{\pi}{4} * (8 * 10^{-4})^2 * 2,875 \approx 1444 \text{ } \mu\text{l/sec}$$

Σύμφωνα με τον Πίνακα 1 η μέγιστη παροχή που αναπτύσσεται στην αντλία για μέγεθος σύριγγας 1ml είναι $Q=833,33 \text{ } \mu\text{l/s}$. Η παροχή αυτή σε ένα σωλήνα διαμέτρου 0,8 mm αντιστοιχεί σε μέση ταχύτητα ρευστού

$$V = 833,33 * \frac{10^{-9} \frac{\text{m}^3}{\text{s}}}{\frac{\pi}{4} * (8 * 10^{-4})^2 (\text{m})^2} \approx 1,66 \text{ m/s}$$

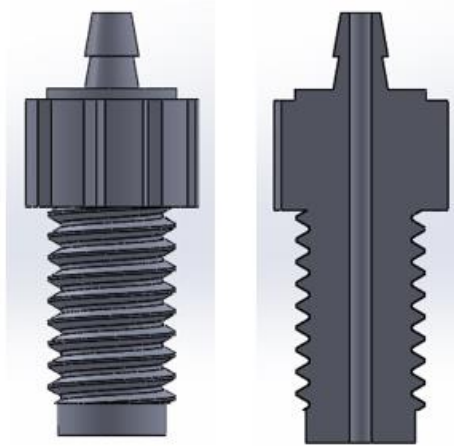
, η οποία είναι μικρότερη από την επιτρεπόμενη για στρωτή ροή.

Όπως θα αναφερθεί στη συνέχεια, δεν είναι όλες οι παροχές τις αντλίας κατάλληλες για τα πειράματα ενδιαφέροντος καθώς η παροχή και η πίεση που αναπτύσσεται σε ορισμένες περιπτώσεις σε σχέση με τον όγκο του πορώδους ικρίωματος είναι πολύ υψηλές.

Σχεδιασμός και Κατασκευή Στοιχείων Διασύνδεσης Της Συσκευής Με Την Αντλία

Όπως αναφέρθηκε σε προηγούμενη ενότητα η είσοδος και η έξοδος της αντλίας αποτελούνται από δύο οπές θηλυκού σπειρώματος M6 στην βαλβίδα τους. Για τη σύνδεση της εισόδου και της εξόδου με το σωλήνα 0,8 mm σχεδιάστηκαν προσαρμογείς (fittings) αρσενικού σπειρώματος M6, οι οποίοι κατασκευάστηκαν σε ένα 3-διάστατο εκτυπωτή υψηλής ανάλυσης (Form1+, High Resolution 3D Printer, εργαστήριο εμβιομηχανικής ΕΜΠ).

Τα fittings αποτελούνται από ένα σπείρωμα M6, μία φλάντζα μεγαλύτερης διαμέτρου ώστε να μπορεί εύκολα να τοποθετηθεί στην οπή, και ένα στόμιο κωνικής διαβάθμισης που εξασφαλίζει τη στεγάνωση με το σωλήνα (Εικόνα 16).

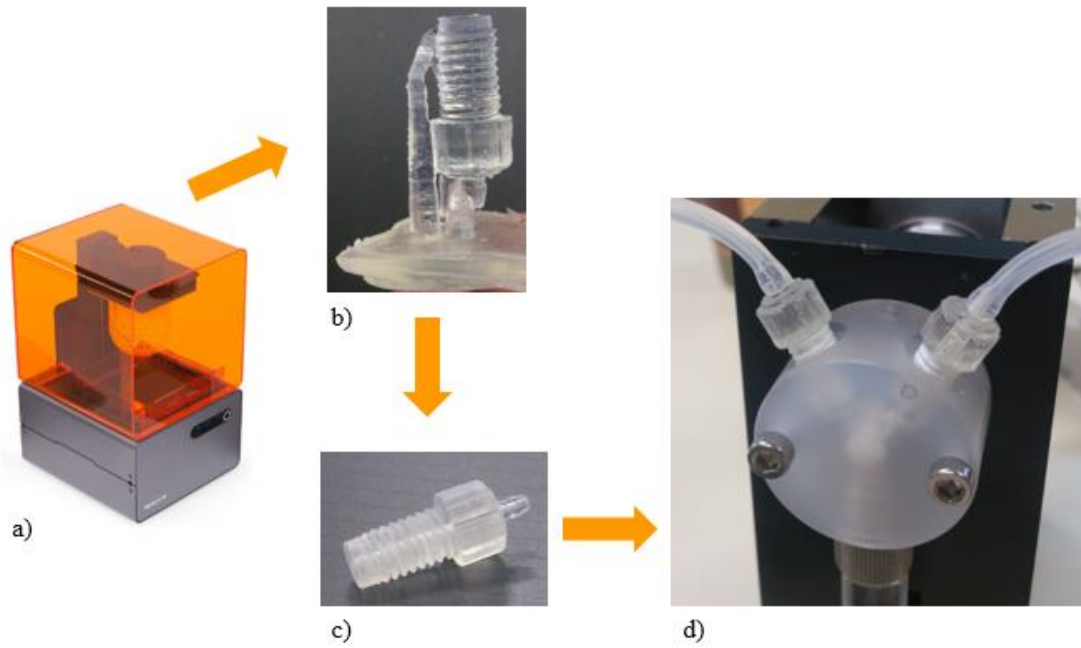


Εικόνα 16: Προσαρμογέας (fitting) που συνδέει την αντλία που οδηγεί στην συσκευή. Αριστερά: τρισδιάστατο σχέδιο. Δεξιά: μετωπική τομή.

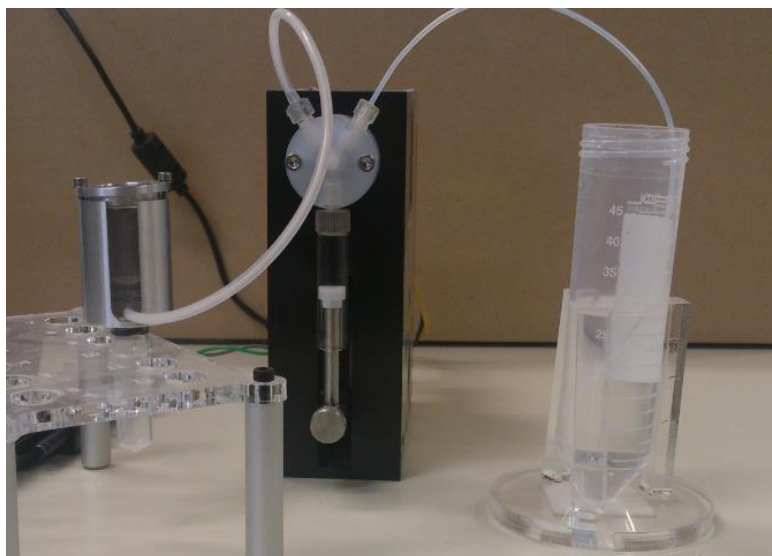
Τα στάδια δημιουργίας των fitting είναι:

- Δημιουργείται το σχέδιο του κομματιού προς εκτύπωση και μετατρέπεται σε αρχείο επεξεργάσιμο από τον εκτυπωτή (.STL).
- Το σχέδιο φορτώνεται τον εκτυπωτή (Εικόνα 17a). Επιλέγεται ο αριθμός των κομματιών προς εκτύπωση και η συνολική βάση με τα στηρίγματα που είτε δημιουργούνται αυτόματα είτε επιλέγονται από τον χρήστη.
- Όταν το κομμάτι εκτυπωθεί (Εικόνα 17b), βυθίζεται σε διάλυμα ισοπροπανόλης για περίπου 20 λεπτά και στη συνέχεια αφήνεται να στεγνώσει στον αέρα.
- Κόβονται οι βάσεις, λειαίνονται τυχόν υπολείμματα από την επιφάνεια και το κομμάτι είναι έτοιμο προς χρήση (Εικόνα 17c).
- Τα fitting συνδέονται στην είσοδο και την έξοδο της αντλίας (Εικόνα 17d).

Κατά την τρισδιάστατη εκτύπωση χρειάζεται προσεκτική επιλογή των βάσεων του κομματιού. Αποφεύγονται οι πολλές στηρίξεις στο σπείρωμα και στο στόμιο επειδή μετά οι επιφάνειες δεν μπορούν να λειανθούν. Η κάτω επιφάνεια του fitting χρειάζεται καλό γυάλισμα επειδή είναι αυτή που πατά στο κάτω μέρος της οπής της αντλίας, όπου απαιτείται καλή επαφή ώστε να μην υπάρχουν διαρροές.



Εικόνα 17: Στάδια δημιουργίας κατάλληλων προσαρμογών για το σύστημα της αντλίας



Εικόνα 18: Συναρμολογημένη διάταξη συσκευής – αντλίας

3. Πειραματικές Μέθοδοι

3.1 Καλλιέργεια Κυττάρων Μέσα σε Ικρίωματα Κολλαγόνου

Στην ενότητα αυτή παρατίθεται συνοπτικά κάποια βασικά πειράματα που συμπεριλαμβάνονται στην καλλιέργεια κυττάρων με ή χωρίς τη χρήση πορώδους ικρίωματος κολλαγόνου.

3.1.1. Μέτρηση του Όγκου Ρευστού που Παγιδεύεται από το Ικρίωμα

Σκοπός του πειράματος είναι να υπολογιστεί ο όγκος ρευστού που παγιδεύεται μέσα στο ικρίωμα λόγω της σπογγώδους φύσης του. Το υγρό που παγιδεύεται μέσα στο υλικό δεν είναι δυνατό να διεξαχθεί με κάποιο τρόπο και συντελεί στο πρόβλημα της αργής εναλλαγής ρευστού μέσα στο ικρίωμα.

Ο όγκος που παγιδεύεται στο ικρίωμα υπολογίστηκε ως εξής:

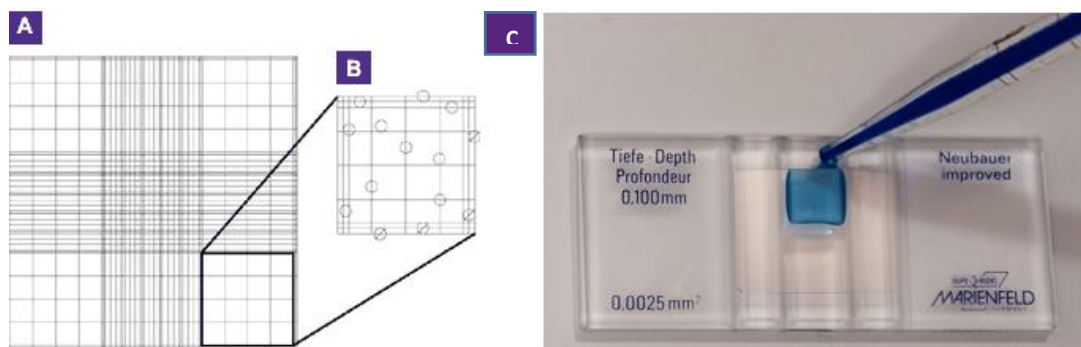
- Σε μία ζυγαριά ακριβείας 10mg (Meter Toledo) μετρήθηκε το βάρος ενός Eppendorf tube (~ 507mg) και μηδενίστηκε η ένδειξη της ζυγαριάς
- Εισήχθη ένα κυλινδρικό δείγμα ικρίωματος κολλαγόνου διαμέτρου 4,5mm και ύψους $h=3\text{mm}$ στο Eppendorf tube και μετρήθηκε η ένδειξη της ζυγαριάς
- Αφαιρέθηκε το δείγμα από το Eppendorf tube και εμποτίστηκε με υγρό. Το δείγμα επανατοποθετήθηκε στο Eppendorf tube και μετρήθηκε η ένδειξη της ζυγαριάς
- Η διαφορά των δύο τιμών που μετρήθηκε στις δύο μετρήσεις ισούται με την μάζα του υγρού που παγιδεύεται στο δείγμα. Θεωρώντας πυκνότητα νερού $\rho=1000\text{ kg/m}^3$, ο όγκος του νερού υπολογίστηκε ότι είναι ~ 9,3μl.

3.1.2. Μέθοδοι Μέτρησης Κυττάρων

Στην παρούσα διπλωματική εργασία, η μέτρηση του αριθμού των κυττάρων είναι απαραίτητο βήμα σε διάφορα στάδια της κυτταρικής καλλιέργειας. Τις περισσότερες φορές είναι απαραίτητο να γνωρίζουμε τον αριθμό των κυττάρων που εισάγουμε σε μια καλλιέργεια ή και τον αριθμό των κυττάρων που επιζούν μετά από κάποιο διάστημα καλλιέργειας. Ο αριθμός των κυττάρων μετριέται είτε άμεσα μέσω αιμοκυττάρου μετρου, είτε έμμεσα μέσω μέτρησης της συγκέντρωσης πρωτεΐνης σε ένα δείγμα κυττάρων μετά από την λύση του.

3.1.2.1. 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.



Εικόνα 19: Αιμοκυτταρόμετρο, Α) Το πλέγμα του αιμοκυτταρόμετρου, το πιο αραιό πλέγμα είναι για τη μέτρηση των κυττάρων Β) Τεταρτημόριο του πλέγματος του αιμοκυτταρόμετρου με κύτταρα Γ) Πάνω και κάτω θάλαμος του αιμοκυτταρόμετρου που τοποθετείται το διάλυμα με τα κύτταρα

Αποτελείται από μία παχιά γυάλινη πλάκα μικροσκοπίου με μια ορθογώνια οδόντωση που δημιουργεί ένα θάλαμο. Πάνω από το θάλαμο τοποθετούνται καλυπτρίδες που έχουν κατασκευαστεί ειδικά για να είναι παχύτερες από τις συμβατικές καλυπτρίδες μικροσκοπίου. Ο θάλαμος είναι εγχαραγμένος με λέιζερ δημιουργώντας ένα πλέγμα κάθετων γραμμών^[29]. Σε αυτό το πλέγμα με τη βοήθεια του μικροσκοπίου διακρίνονται τέσσερα τεταρτημόρια. Σε κάθε ένα από αυτά μετριέται ο αριθμός των κυττάρων και υπολογίζεται η μέση τιμή τους. 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.

Έτσι, 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. Συγκεκριμένα έχοντας ένα αρχικό διάλυμα με κύτταρα τοποθετείται στις δύο περιοχές του θαλάμου μικρή ποσότητα από το διάλυμα (Εικόνα 19) και μετριέται σε κάθε διακριτό τεταρτημόριο ο αριθμός των κυττάρων. Όσο περισσότερες είναι οι μετρήσεις τόσο μεγαλύτερη ακρίβεια θα έχει το αποτέλεσμα στη μέτρηση του αριθμού των κυττάρων. Υπολογίζεται η μέση τιμή των δειγμάτων που μετρήθηκαν και έπειτα ο συνολικός αριθμός N των κυττάρων υπολογίζεται ως:

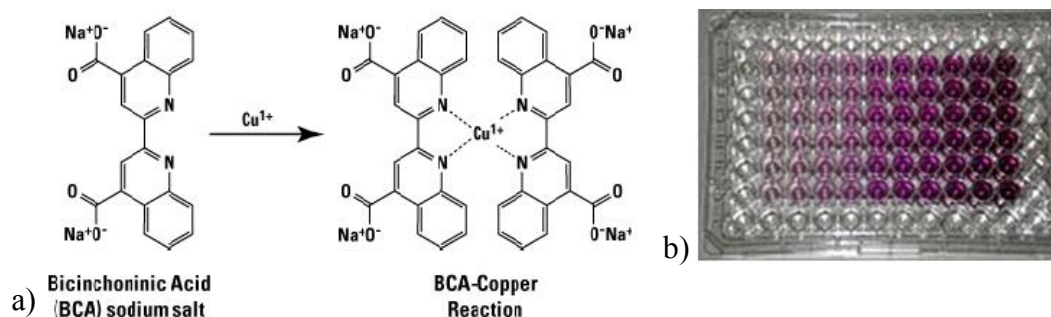
$$N = \mu \cdot d \cdot 10^4 \cdot V$$

Όπου μ είναι ο μέσος όρος του αριθμού κυττάρων, d είναι ο λόγος αραιώσης του δείγματος πριν τη μέτρηση και V είναι ο όγκος του μίγματος από όπου συλλέξαμε το δείγμα σε ml.

3.1.2.2. Μέτρηση Αριθμού Κυττάρων Μέσω Μέτρησης Συγκέντρωσης Πρωτεΐνης

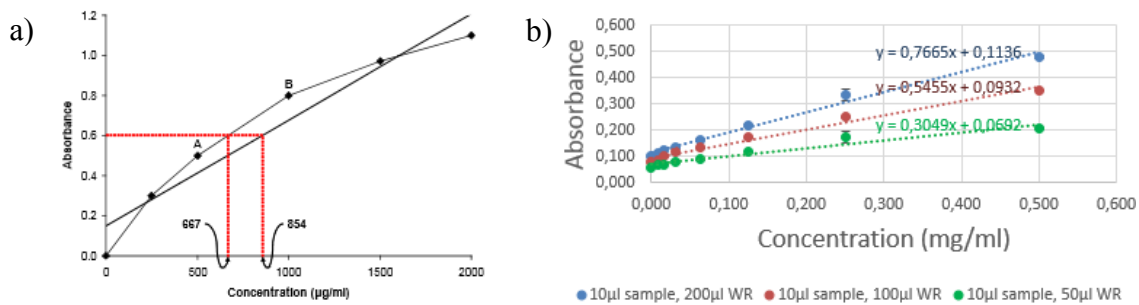
BCA assay

Η μέθοδος δικινχονινικού οξέος ή μέθοδος BCA assay είναι μια ευρέως διαδεδομένη μέθοδος για την μέτρηση της συνολική συγκέντρωση πρωτεΐνης σε ένα διάλυμα. Εκφράζεται με αλλαγή χρώματος στο διάλυμα του δείγματος από πράσινο σε διαφορετικές αποχρώσεις του μωβ ανάλογα με τη συγκέντρωση πρωτεΐνης^[30]. Η αλλαγή αυτή μπορεί να μετρηθεί με διάφορες μεθόδους χρωματομετρίας. Η μέθοδος BCA βασίζεται σε δύο αντιδράσεις ιόντων χαλκού (Cu^{+2}) και το προϊόν της αντίδρασης είναι η δημιουργία μωβ χρώματος (Εικόνα 20a). 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^[31]. Η συγκέντρωση πρωτεΐνης προσδιορίζεται με γνώμονα μια καμπύλη βαθμονόμησης χρησιμοποιώντας μια πρωτεΐνη γνωστής συγκέντρωσης (standard protein/ BSA) (Εικόνα 20b).



Εικόνα 20: a) Αντίδραση του BCA με ιόντα χαλκού, b) Διαδοχικές αραιώσεις της πρότυπης συγκέντρωσης

Έτσι, 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. Τυπική μορφή μιας πρότυπης καμπύλης μπορεί να μπορεί να είναι αυτή που φαίνεται στην παρακάτω εικόνα (Εικόνα 21a)^[32]. Η μορφή της πρότυπης καμπύλης μετά από κατάλληλο συνδυασμό ποσότητας δείγματος και αναλογία buffer, βελτιστοποιήθηκε ώστε να έχει με μεγάλη ακρίβεια γραμμική μορφή^[17].



Εικόνα 21: a) Τυπική μορφή πρότυπης καμπύλης συγκέντρωσης πρωτεΐνης (γραμμική παρεμβολή). b) Βελτιστοποίηση τυπικής μορφής καμπύλης γνωστής συγκέντρωσης πρωτεΐνης

Μέτρηση αριθμού κυττάρων

Ένας εναλλακτικός τρόπος εκτίμησης αριθμού κυττάρων, που χρησιμοποιείται και εδώ, είναι ο έμμεσος τρόπος μέτρησης του συνολικού αριθμού κυττάρων μέσω λύσης των κυττάρων. Η λύση κυττάρων αναφέρεται στη διαδικασία, την οποία με χρήση κάποιων ενζύμων, σπάει η κυτταρική μεμβράνη, με αποτέλεσμα ένα διάλυμα των συνολικών πρωτεϊνών του κυττάρου^[33]. Επομένως, μετρώντας τη συνολική πρωτεΐνη των κυττάρων και γνωρίζοντας τη μάζα της πρωτεΐνης ανά κύτταρο, εκτιμάται ο συνολικός αριθμός κυττάρων ενός δείγματος. Η μάζα πρωτεΐνης ανά κύτταρο για τους ινοβλάστες που χρησιμοποιούνται εδώ είναι $m = 0,23 \text{ ng}^{[17]}$. Τα βήματα για τον υπολογισμό του αριθμού των κυττάρων σε ένα δείγμα είναι τα εξής:

- 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
- Το δείγμα τοποθετείται στους 4° C για 15-20 λεπτά και στην συνέχεια εάν είναι επιθυμητή 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:

- ρ είναι η συγκέντρωση πρωτεΐνης που προκύπτει από την καμπύλη βαθμονόμησης
- V είναι ο όγκος του δείγματος που έχει γίνει η λύση
- μ είναι η μάζα πρωτεΐνης ανά κύτταρο

3.1.3. Καλλιέργεια Ινοβλαστών σε Πορώδη Ικρίωματα Κολλαγόνου

Η καλλιέργεια κυττάρων στα πορώδη ικρίωματα κολλαγόνου παρουσιάζει κάποιες ιδιαιτερότητες και δυσκολίες σε σχέση με την καλλιέργεια σε μια συμβατική πλάκα. Τα άνυδρα φύλλα ικριωμάτων που παρασκευάζονται κόβονται σε κυλινδρικής μορφής σχήματα με punch βιοψίας (biopsy punch). Πρέπει να σημειωθεί ότι οι δύο πλευρές του φύλλου ικριώματος 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, οπότε ως προς αυτή εισάγεται το διάλυμα των κυττάρων.

3.1.3.1. Εισαγωγή Ινοβλαστών και Καλλιέργεια στο Ικρίωμα

Για την εισαγωγή των κυττάρων στο πορώδες ικρίωμα, σε μια συμβατική πλάκα, η διαδικασία είναι η εξής:

- Τοποθετείται στην πλάκα κατάλληλη ποσότητα από αгарόζη, η οποία εμποδίζει τα κύτταρα από το να προσκολληθούν στην βάση της πλάκας
- Τοποθετείται σταγόνα από το κυτταρικό εναιώρημα στον πυθμένα της πλάκας, η κυτταρική συγκέντρωση καθορίζεται από τον πειραματιστή
- Τοποθετείται το κυλινδρικό ικρίωμα, από την απορροφητική πλευρά πάνω στη σταγόνα για να απορροφήσει το υγρό
- Το δείγμα επωάζεται στους 37° C για μία ώρα ώστε να προσκολληθούν τα κύτταρα
- Προστίθεται DMEM++, το οποίο αλλάζεται κάθε δύο-τρεις μέρες

3.1.3.2. Ανάκτηση Κυττάρων από το Ικρίωμα

Σε μια συμβατική καλλιέργεια για να αποκολληθούν τα κύτταρα από την πλάκα χρησιμοποιείται σε κατάλληλη ποσότητα τρυψίνη. Για την ανάκτηση των κυττάρων από το πορώδες ικρίωμα χρησιμοποιείται κατάλληλο ένζυμο, η κολλαγενάση, το οποίο διασπά τους πεπτιδικούς δεσμούς του κολλαγόνου. Όταν αυτό χρησιμοποιηθεί με το ικρίωμα, διαλύει εντελώς το υλικό και τα κύτταρα απελευθερώνονται.

3.1.3.3. Λύση των Κυττάρων στο Ικρίωμα

Η λύση στην καλλιέργεια κυττάρων σε πορώδες ικρίωμα γίνεται με τον ίδιο τρόπο όπως και στη συμβατική καλλιέργεια. Διώχνεται το θρεπτικό, DMEM++, από την πλάκα και γίνεται μια πλύση με κάποιο buffer (PBS). Η μόνη διαφορά είναι ότι σε αυτό το βήμα αναμένεται κάποιος χρόνος για την εναλλαγή των ρευστών. Χρησιμοποιείται κατάλληλη ποσότητα διαλύματος (lysis buffer). Σε αυτή την περίπτωση το ικρίωμα δεν χρειάζεται να αποσυντεθεί με κολλαγενάση. Έπειτα το δείγμα ψύχεται στους 4° C για μία ώρα.

3.2 Εκτίμηση Τοξικότητας Υλικών

Όπως αναφέρθηκε και στο προηγούμενο κεφάλαιο, τα υποψήφια υλικά για την κατασκευή του κυρίου μέρους της συσκευής ήταν το PMMA (πολυμεθακρυλικός μεθυλεστέρας) και το PDMS (πολυδιμεθυλοσιλοξάνιο). Βασικό βήμα για την αποδοχή ή απόρριψη των υλικών ήταν τυχόν τοξική επίδραση των υλικών σε κύτταρα. Σκοπός των πειραμάτων τοξικότητας ήταν η μελέτη της επίδρασης των υλικών αυτών στη βιωσιμότητα των κυττάρων.

Τα πειράματα τοξικότητας σε καλλιέργειες κυττάρων μπορούν να προσεγγισθούν με διάφορους τρόπους. Ο απλούστερος τρόπος είναι η μέτρηση των ζωντανών και νεκρών κυττάρων. Εναλλακτικά, εξετάζεται και ο ρυθμός πολλαπλασιασμού των κυττάρων ή αλλαγές στο φαινότυπο των ζωντανών κυττάρων^[27]. Επίσης στην περίπτωση που το υλικό που εξετάζεται πρόκειται να έρθει σε άμεση επαφή με τα κύτταρα εξετάζεται κατά πόσον τα κύτταρα προσκολλώνται στην επιφάνεια του και εάν αναπτύσσονται φυσιολογικά^[13]. Στο συγκεκριμένο πείραμα εξετάστηκε το κατά πόσον η παρουσία των δύο υλικών (PMMA, PDMS) επηρεάζει τη βιωσιμότητα των κυττάρων σε διάστημα 5 ημερών.

Πειραματικός σχεδιασμός:

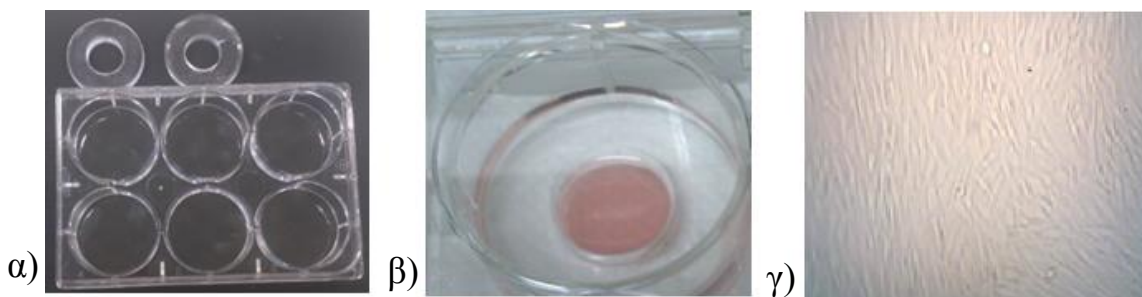
Κατασκευάστηκαν δακτύλιοι από PMMA ή PDMS. Για την κατασκευή του PMMA χρησιμοποιήθηκαν φύλλα plexiglass πάχους 5mm, τα οποία κόπηκαν στην κατάλληλη μορφή με λέιζερ εγχάραξης. Η μήτρα που χρησιμοποιήθηκε για το PDMS ήταν μια συμβατική πλάκα καλλιέργειας (6 well plate). Έτσι δημιουργήθηκαν κυλινδρικά τεμάχια πάχους 5mm τα οποία κόπηκαν με κατάλληλο κυλινδρικό εργαλείο μικρότερης διαμέτρου. Οι δακτύλιοι έχουν εξωτερική διάμετρο $\Phi_{\text{εξ}} = 34,8\text{mm}$ έτσι ώστε όταν αυτοί τοποθετούνται να εφάπτονται με τα τοιχώματα μιας συμβατικής πλάκας καλλιέργειας, 6 well plate, (Εικόνα 22). Η εσωτερική διάμετρος των δακτυλίων αποτελεί ουσιαστικά το χώρο ο οποίος μένει διαθέσιμος για να προσκολληθούν τα κύτταρα και πρέπει να έχει την ίδια διάσταση με τη συμβατική πλάκα που χρησιμοποιείται για να καλλιεργηθούν τα κύτταρα χωρίς τα υλικά (24 well plate/ $\Phi_{\text{εσ}} = 15,6\text{ mm}$). Σκοπός αυτής της κατασκευής είναι οι δακτύλιοι να βρίσκονται σε επαφή με τα κύτταρα ενώ αυτά είναι προσκολλημένα σε μια συμβατική πλάκα. Ο λόγος είναι ότι στη συγκεκριμένη εφαρμογή της καλλιέργειας των κυττάρων μέσα στη συσκευή τα κύτταρα θα βρίσκονται μέσα στο ικρίωμα και όχι σε άμεση επαφή με το υλικό.

Αφού ετοιμαστούν οι δακτύλιοι η πειραματική διαδικασία μέτρησης της τοξικότητας έχει ως εξής (πρωτόκολλο παράρτημα Β.3):

- Οι δακτύλιοι από PMMA ή PDMS τοποθετούνται σε μία συμβατική πλάκα, 6 well plate (τρία δείγματα για κάθε υλικό)
- Αφού συλλεχθούν τα κύτταρα από την φλάσκα που γίνεται η καλλιέργεια, διαλύεται το ίζημα των κυττάρων με PBS
- Τοποθετείται ίδια ποσότητα κυττάρων στην πλάκα με τους δακτυλίους και σε μία συμβατική πλάκα, 24 well plate

- Την επόμενη μέρα τα κύτταρα αποκολλώνται από την πλάκα χρησιμοποιώντας τρυψίνη
- Υπολογίζεται ο αριθμός των κυττάρων με το αιμοκυτταρόμετρο
- Τα υπόλοιπα δείγματα ανανεώνονται με θρεπτικό, DMEM++, κάθε δύο ημέρες
- Την πέμπτη μέρα μετρείται με το αιμοκυτταρόμετρο ο αριθμός των κυττάρων στα υπόλοιπα δείγματα

Μία παράμετρος που ίσως επηρεάζει τα αποτελέσματα είναι η αρχική πυκνότητα των κυττάρων που τοποθετούνται στα δείγματα. Έτσι εκτελέστηκε το ίδιο πείραμα με διαφορετική αρχική πυκνότητα κυττάρων ανά δείγμα (π.χ. 25, 30, 40 χιλιάδες). Με αυτό τον τρόπο παρατηρούμε κατά πόσον η αρχική πυκνότητα των κυττάρων επηρεάζει τον πολλαπλασιασμό τους μέσα σε κάθε υλικό.



Εικόνα 22: α) Δακτύλιοι από Plexiglas (πάνω αριστερά) και PDMS (πάνω δεξιά), πλάκα καλλιέργειας/ 6well plate, β) Καλλιέργεια ινοβλαστών σε 6well plate παρουσία δακτυλίου Plexiglas γ) Εικόνα μικροσκοπίου που δείχνει την καλλιέργεια ινοβλαστών (human dermal fibroblasts) σε Plexiglas.

Η επεξεργασία των αποτελεσμάτων έγινε μέσω του λογισμικού Excel. Με τη διεξαγωγή στατιστικών Student test συγκρίνεται η στατιστική ομοιότητα ή διαφορά των δειγμάτων στα διάφορα υλικά, όσο αναφορά τον αριθμό των κυττάρων

3.3 Μέτρηση Συγκέντρωσης Φθορίζοντος Διαλύματος Μέσω Φασματόμετρου Φθορισμού

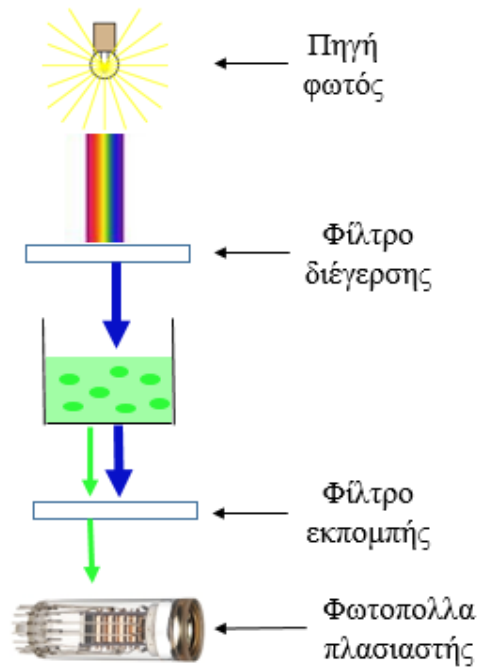
3.3.1. Βαθμονόμηση Φασματόμετρο Φθορισμού

Το φασματόμετρο φθορισμού είναι μια συσκευή που επιτρέπει την ποσοτικοποίηση διαλυμάτων φθορίζοντων ουσιών. Το φθορίζον διάλυμα μπορεί να περιλαμβάνει φθορίζοντα μόρια, κύτταρα βαμμένα με φθορίζοντα χρώματα ή αντισώματα συνδεδεμένα με φθορίζοντα μόρια. Στην παρούσα εργασία το φασματόμετρο φθορισμού χρησιμοποιείται για την μελέτη της διάχυσης φθορίζοντων μορίων μέσα σε ικρίωματα κολλαγόνου. Προτού όμως μετρηθεί η διάχυση διαλυμάτων μέσα σε ικρίωματα κολλαγόνου θα πρέπει να προηγηθεί η βαθμονόμηση του φασματόμετρο φθορισμού. Σκοπός της βαθμονόμησης είναι ο προσδιορισμός της μέγιστης και ελάχιστης συγκέντρωσης ενός φθορίζοντος διαλύματος που μπορεί να μετρηθεί γραμμικά για συγκεκριμένες τιμές των παραμέτρων της μέτρησης (π.χ. όγκος διαλύματος, επιλογή φίλτρων, κέρδος αισθητήρα).

Η συσκευή που χρησιμοποιήθηκε (CytoFluor Series 4000) μετράει οπτικό σήμα που δημιουργήθηκε από φθορισμό μέσω ενός φωτοπολλαπλασιαστή. Η βασική αρχή λειτουργίας της μέτρησης σήματος φθορισμού με το φασματόμετρο φαίνεται στην παρακάτω εικόνα (Εικόνα 23). Το φθορίζον διάλυμα ουσία που χρησιμοποιείται σε αυτή την εργασία είναι 1mM FITC (Sigma-Aldrich) σε διάλυμα συγκέντρωσης 50 mM tris (tris(hydroxymethyl)aminomethane), pH8. Η φλορεσίνη (fluorescein isothiocyanate, FITC) είναι ένα φθορίζον μόριο ευρείας χρήσης με βέλτιστο μήκος κύματος διέγερσης και εκπομπής $\lambda_{ex} = 460$ και $\lambda_{em} = 515\text{nm}$ αντίστοιχα.

Για την βαθμονόμηση της συσκευής φασματομετρίας φθορισμού, μετρήθηκε το σήμα από διαλύματα FITC γνωστής συγκέντρωσης (από 1mM μέχρι 0.01μM) σε 50 mM Tris pH8. Οι μετρήσεις έγιναν μεταβάλλοντας δύο πειραματικές παραμέτρους:

- Ο όγκος του διαλύματος. Δοκιμάστηκαν οι ποσότητες 100, 75, 50μl.
- Το κέρδος (gain) του φωτοπολλαπλασιαστή. Το κέρδος ρυθμίζεται μέσω της τάσης του φωτοπολλαπλασιαστή από 0-1080 Volt.



Εικόνα 23: Βασική αρχή λειτουργίας του φασματόμετρου φθορισμού. Το δείγμα που φέρει τη φθορίζουσα ουσία διεγείρεται από πηγή φωτός μέσω του κατάλληλου φίλτρου διέγερσης. Το δείγμα εκπέμπει φως που μετρείται μέσω του φωτοπολλαπλασιαστή.

Σύμφωνα και με τις οδηγίες χρήσεις του CytoFluor για να προσδιοριστούν τα όρια του κέρδους στα οποία επιτυγχάνεται βέλτιστη επίδοση, χρησιμοποιείται υψηλή τάση για να ανιχνευθούν οι χαμηλές συγκεντρώσεις και χαμηλή τάση για να ανιχνευθούν οι υψηλές συγκεντρώσεις. Επίσης ο συνδυασμός υψηλού κέρδους και μεγάλου όγκου διαλύματος και χαμηλού κέρδους και μικρού όγκου διαλύματος αυξάνουν την διακριτική ικανότητα του οργάνου σε χαμηλές και υψηλές συγκεντρώσεις αντίστοιχα^[28].

Στα πειράματα που διεξήχθησαν χρησιμοποιήθηκαν τρία δείγματα για κάθε συγκέντρωση του FITC και για κάθε επιλεγμένο κέρδος του φωτοπολλαπλασιαστή. Για κάθε πείραμα τα δεδομένα παρεμβάλλονται σε μια καμπύλη. Η καμπύλη αυτή είναι μια συνάρτηση της συγκέντρωσης του διαλύματος και του σήματος που εκπέμπει το φασματόμετρο. Ανάλογα με το πόσο προσεγγίζει η καμπύλη τη γραμμική περιοχή, χωρίς μεγάλο θόρυβο επιλέγεται η κατάλληλη συγκέντρωση και ο όγκος διαλύματος καθώς και το κέρδος του φωτοπολλαπλασιαστή για τα επόμενα πειράματα.

Για να βρεθεί η διακριτική ικανότητα του οργάνου (η ελάχιστη συγκέντρωση FITC που μπορεί να μετρηθεί δεδομένου όγκου διαλύματος και κέρδους αισθητήρα), διεξάγεται στατιστική ανάλυση με Student's t test, για να προσδιοριστεί η χαμηλότερη συγκέντρωση που είναι στατιστικά διαφορετική από το μηδέν.

3.3.2. Επίδραση της Παρουσίας Ικρίωματος Κολλαγόνου στις Μετρήσεις του Φασματοσκοπίου

Το φασματοσκόπιο φθορισμού χρησιμοποιείται συνήθως για την ποσοτικοποίηση διαλυμάτων φθορίζοντων ουσιών. Αντίθετα, η συγκεκριμένη εργασία εστιάζει σε διαλύματα μέσα σε πορώδη ικρίωματα κολλαγόνου.

Σκοπός του παρόντος πειράματος είναι να μελετηθεί η επίδραση της παρουσίας ενός πορώδους ικρίωματος κολλαγόνου μέσα στο φθορίζον διάλυμα. Ο κύριος λόγος που η παρουσία του ικρίωματος μπορεί να επηρεάσει την μέτρηση είναι ότι το κολλαγόνο είναι ασθενώς φθορίζον υλικό.

Με βάση το πείραμα βαθμονόμησης του οργάνου, μετρήθηκε το σήμα από διαλύματα FITC, συγκέντρωσης 10 και 1μM, συνολικού όγκου 75μl, με κέρδος φωτοπολλαπλασιαστή 50 παρουσία ή απουσία ικρίωματος. Το πείραμα έγινε ως εξής:

- Σε 3 βοθρία μιας 96άρας πλάκας τοποθετούνται διαλύματα FITC 10 μM όγκου 75 μl.
- Στην ίδια πλάκα τοποθετείται μία σταγόνα από τις συγκεντρώσεις 10 και 1μM και στη συνέχεια πάνω στη σταγόνα τοποθετείται το ικρίωμα
- Αναμονή 20 λεπτά, ώστε το ικρίωμα να απορροφήσει το υγρό
- Προστίθεται και η υπόλοιπη ποσότητα Fite μέχρι ο συνολικός όγκος να φτάσει τα 75μl
- Επαναλαμβάνεται η ίδια διαδικασία με διάλυμα PBS (buffer) με και χωρίς την παρουσία ικρίωματος

Το φθορίζον σήμα μετρείται με το φασματόμετρο φθορισμού, CytoFluor. Για κάθε ζευγάρι πειραμάτων (μία συγκέντρωση FITC, με και χωρίς το ικρίωμα) διεξάγεται στατιστική ανάλυση Student's t test για να εξεταστεί αν η παρουσία του ικρίωματος επηρεάζει το σήμα. Εάν τα σήματα είναι στατιστικά διαφορετικά για την κάθε περίπτωση, τότε ο φθορισμός του ικρίωματος είναι παρατηρήσιμος από το όργανο.

3.3.3. Μέτρηση Συγκέντρωσης Φθορίζοντος Διαλύματος Μέσα σε Πορώδες Ικρίωματα Κολλαγόνου

Επειδή η συγκεκριμένη εργασία εστιάζει σε διαλύματα μέσα σε πορώδη ικρίωματα κολλαγόνου, είναι ενδιαφέροντος να διερευνηθεί αν είναι δυνατών να μετρηθεί η συγκέντρωση ενός φθορίζοντος διαλύματος μέσα σε ένα πορώδες ικρίωμα κολλαγόνου. Η ακρίβεια μιας τέτοιας μέτρησης μπορεί να περιοριστεί από διάφορους παράγοντες: i) ο όγκος του διαλύματος μέσα στο ικρίωμα είναι μικρός, ii) η μέτρηση να εξαρτάται σημαντικά από την θέση του ικρίωματος μέσα στο βοθρίο της πλάκας όπου γίνεται η μέτρηση.

Σκοπός του πειράματος είναι να εξεταστεί εάν το πορώδες ικρίωμα, εμποτισμένο με ένα φθορίζον διάλυμα μπορεί να μετρηθεί από το μηχάνημα μέτρησης φθορισμού (CytoFluor). Όπως έχει αναφερθεί και πιο πάνω πορώδες ικρίωμα κολλαγόνου

διαμέτρου $\Phi = 4.5\text{mm}$ και ύψους $h = 3\text{mm}$ κρατά συνολικό όγκο ρευστού $\sim 9.3\mu\text{l}$. Έχοντας εμποτίσει τα ικρίωματα με διαλύματα διαφορετικής συγκέντρωσης (10-1-0.1 μM), αυτά τοποθετούνται σε διαφορετικές θέσεις μέσα στην 96άρα πλάκα. Εξετάζεται εάν τα ικρίωματα διαφορετικής συγκέντρωσης δίνουν στατιστικά διαφορετικό σήμα καθώς και εάν η θέση τους μέσα στην 96άρα πλάκα επηρεάζει το σήμα.

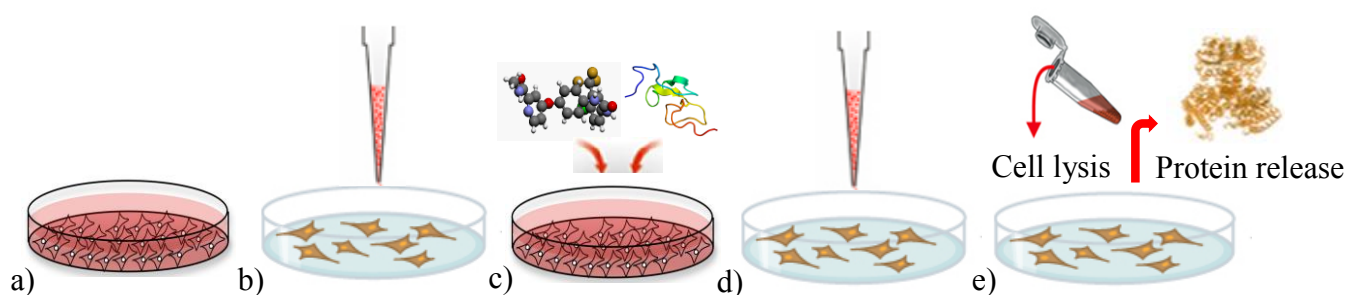
3.4 Εναλλαγή Ρευστών Μέσα σε Πορώδες Ικρίωμα Κολλαγόνου Μέσω Διάχυσης

3.4.1. Γενικά

Μια χαρακτηριστική δυσκολία της μελέτης κυττάρων μέσα σε πορώδη ικρίωματα κολλαγόνου είναι οι περιορισμοί στην διαχείριση ρευστών. Λόγω της στερεάς, σπογγώδους δομής του, το ικρίωμα κατακρατεί μια ποσότητα ρευστού η οποία δεν είναι δυνατόν να εκδιωχθεί πλήρως, με αποτέλεσμα η εναλλαγή ρευστών να καθίσταται χρονοβόρα.

Σκοπός αυτού του πειράματος είναι πρώτον, να υπολογιστεί με σχετική ακρίβεια ο συνολικός χρόνος που απαιτείται να γίνει εναλλαγή ρευστού μέσα στο πορώδες ικρίωμα. Δεύτερον, να εξεταστούν εναλλακτικοί τρόποι με τους οποίους μπορεί ο χρόνος αυτός να μειωθεί σημαντικά με τη βοήθεια του ανοικτού συστήματος συσκευή – αντλία που περιεγράφηκε στο κεφάλαιο 2.

Ο λόγος για τον οποίο δίνεται ιδιαίτερη έμφαση στη μείωση του χρόνου αλλαγής ρευστού στο ικρίωμα είναι ότι ένα τυπικό πείραμα πρωτεωμικής περιέχει πολλά στάδια εναλλαγής ρευστών (Εικόνα 24) και η παρουσία του ικρίωματος καθυστερεί στην εκτέλεση του πειράματος. Αυτή η καθυστέρηση έχει δύο σημαντικές παρενέργειες: i) εμποδίζει την μελέτη σημαντικών σηματοδοτικών μονοπατιών (τα οποία έχουν σταθερά χρόνου της τάξης των 1 – 5 λεπτών δηλαδή είναι πιο γρήγορα από τον χρόνο αλλαγής υγρού στο ικρίωμα), και ii) δεν διευκολύνει στη διεξαγωγή πολλαπλών πειραμάτων, κρίσιμου χαρακτηριστικού των μοντέρνων πειραματικών μεθόδων της βιολογίας συστημάτων.



Εικόνα 24: Στάδια ενός τυπικού πειράματος για την μελέτη των σηματοδοτικών μονοπατιών σε κύτταρα μέσω πρωτεωμικής ανάλυσης. Τα κύτταρα καλλιεργούνται σε μια φλάσκα (a). Το θρεπτικό απομακρύνεται με μια πλύση (b) και τα κύτταρα διεγείρονται από ένα διάλυμα που περιέχει βιολογικούς παράγοντες ή φάρμακα (c). Μετά από κάποιο συγκεκριμένο χρονικό διάστημα το διάλυμα διέγερσης απομακρύνεται με μια πλύση (d) και τα κύτταρα λύνονται (e) ώστε να υποστούν πρωτεωμική ανάλυση. Συνολικά το πείραμα απαιτεί τουλάχιστον 4 αλλαγές του διαλύματος στο περιβάλλον των κυττάρων.

Τα βήματα του πειράματος διάχυσης απεικονίζονται στην Εικόνα 25 και έχουν ως εξής:

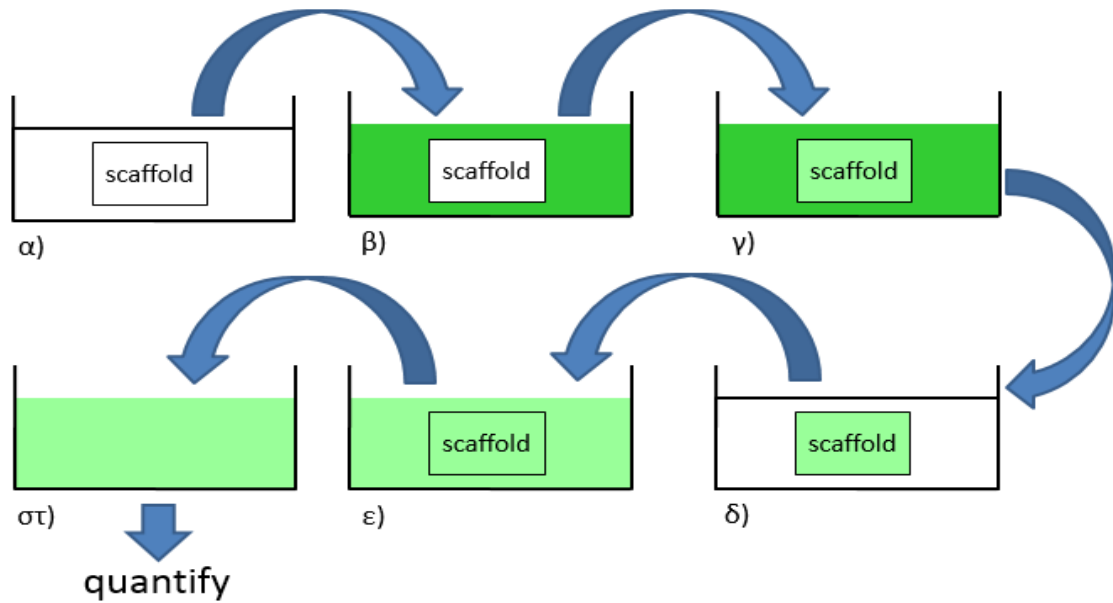
- Τα ικρίωματα τοποθετούνται σε ~ 200μl διάλυμα tris για περίπου 10-15 λεπτά (Εικόνα 25α)
- Την χρονική στιγμή $t=0$, το ικρίωμα τοποθετείται μέσα σε διάλυμα FITC 10 μM και όγκου $V_2= 100\mu\text{l}$ (Εικόνα 25β)
- Επιλέγονται διάφορες χρονικές στιγμές για να διαχυθεί το FITC στο ικρίωμα, $t= 2, 5, 15, 30$ λεπτά (Εικόνα 25γ). Τότε το ικρίωμα μεταφέρεται σε διάλυμα Tris 75μl (Εικόνα 25δ)
- Μετά από δύο ώρες (απαραίτητο ώστε το σύστημα να φτάσει σε ισορροπία (Εικόνα 25ε) το ικρίωμα αφαιρείται και μετρείται το διάλυμα που απομένει στο φασματόμετρο φθορισμού, CytoFluor (Εικόνα 25στ)
- Με βάση την καμπύλη βαθμονόμησης του οργάνου (για συγκεκριμένο όγκο, φθορίζων μόριο, και κέρδος) υπολογίζεται η συγκέντρωση του διαλύματος Εικόνα 25ε.
- Με βάση τον όγκο ρευστού που κατακρατείται από το ικρίωμα (για $\Phi=4\text{mm}$ ο όγκος είναι ~8μl), τις συγκεντρώσεις και τους όγκους των διαλυμάτων στα διάφορα στάδια, η μέση συγκέντρωση του FITC μέσα στο ικρίωμα την χρονική στιγμή t (Εικόνα 25γ) υπολογίζεται ως

$$C = \frac{100}{108} * 10$$

και στη συνέχεια, επειδή το ικρίωμα μεταφέρεται ξανά σε διάλυμα Tris 75μl, η συγκέντρωση που αναμένεται να μετρηθεί στη μόνιμη κατάσταση είναι

$$C_1 = C * \frac{8}{83}$$

$$C_1 = \frac{100}{108} * 10 * \frac{8}{83} \cong 0,89\mu\text{M}$$



Εικόνα 25: Στάδια του πειράματος διάχυσης σε πορώδες ικρίωμα κολλαγόνου

Για κάθε τιμή της χρονικής διάρκειας της διάχυσης (Εικόνα 25β) το πείραμα επαναλαμβάνεται τρεις φορές. Τα δεδομένα για την απόκριση $y(t)$ εισάγονται στο matlab. Τα δεδομένα αυτά προσαρμόζονται σε μια εκθετική καμπύλη $y = A + Be^{-t/\tau}$ μέσω της μεθόδου των ελαχίστων τετραγώνων. Με βάση την αναλυτική έκφραση της καμπύλης υπολογίζεται η χρονική σταθερά του συστήματος (τ). Σύμφωνα με τη θεωρία των δυναμικών γραμμικών συστημάτων 1^{ης} τάξης, μετά από χρόνο περίπου $4 \cdot \tau$ η απόκριση του συστήματος παραμένει σταθερή. Με αυτό τον τρόπο υπολογίζεται ο χρόνος που χρειάζεται για να γίνει η πλήρης διάχυση στο πορώδες ικρίωμα κολλαγόνου.

3.5 Υπολογισμός των Απωλειών του Συστήματος της Αντλίας

Σκοπός του πειράματος αυτού είναι να υπολογιστούν οι απώλειες ρευστού στο σύστημα της αντλίας και να χαρακτηριστούν ως προς το εάν οφείλονται σε κάποιο τυχαίο ή συστηματικό σφάλμα.

Το πείραμα αποτελείται από τα έξι βήματα:

- Ζυγίζονται σε μια ζυγαριά ακρίβειας (Meter Toledo), αναλώσιμα πλαστικά δοχεία τα οποία θα χρησιμοποιηθούν για τη συλλογή του ρευστού (2ml Eppendorf tube)
- Γίνεται αρχικοποίηση της αντλίας και γεμίζονται τα σωληνάκια με υγρό ώστε να μην υπάρχει κενό
- Ζητείται από την αντλία να σπρώξει μια συγκεκριμένη ποσότητα υγρού (500, 200, 100, 50, 20, ή 10μl) η οποία καταλήγει στο πλαστικό δοχείο
- Το δοχείο ζυγίζεται στη ζυγαριά ακριβείας και υπολογίζονται ο πραγματικός όγκος ρευστού που παρέδωσε η αντλία

Η επεξεργασία των αποτελεσμάτων έγινε μέσω του λογισμικού Excel. Το πείραμα αυτό οδήγησε στο να γίνουν σημαντικές αλλαγές στο σχεδιασμό των κατάλληλων προσαρμογέων (fittings) των σωληνώσεων στην αντλία ώστε να περιοριστούν οι απώλειες που προέρχονται από το τμήμα διασύνδεσης της αντλίας με τους σωλήνες.

3.6 Μέτρηση και Ελαχιστοποίηση του Χρόνου Εναλλαγής Ρευστού σε Πορώδες Ικρίωμα Κολλαγόνου Χρησιμοποιώντας το Σύστημα Συσκευής – Αντλίας

3.6.1 Εισαγωγή

Η συσκευή που περιεγράφηκε στο Κεφάλαιο 2 συνδεδεμένη με μία αντλία σύριγγας, (Cavro XP 3000), επιτρέπει τον έλεγχο της ροής ρευστού διαμέσου ενός θαλάμου που περιέχει ένα ικρίωμα κολλαγόνου με ή χωρίς κύτταρα. Αυτός ο έλεγχος δεν είναι δυνατόν να πραγματοποιηθεί με χειροκίνητες μεθόδους καλλιέργειας κυττάρων. Συγκεκριμένα, το σύστημα αντλία-συσκευή επιτρέπει τον έλεγχο διάφορων παραμέτρων της ροής:

- Της ταχύτητας και παροχής ρευστού δια μέσου του ικρίωματος
- Δυνατότητα συνεχούς και διακοπτόμενης ροής

Σκοπός της παρούσας ενότητας είναι ο προσδιορισμός των κατάλληλων παραμέτρων για την ελαχιστοποίηση του χρόνου που απαιτείται ώστε να πραγματοποιηθεί αλλαγή ρευστού μέσα σε ένα πορώδες ικρίωμα κολλαγόνου. Για να επιτευχθεί αυτή η αλλαγή, εξετάστηκαν δύο σενάρια:

- Στο πρώτο σενάριο (ενότητα 3.6.2) η αλλαγή του διαλύματος γίνεται με συνεχή ροή ενός σημαντικού όγκου ρευστού διαμέσου του ικρίωματος. Αυτό το σενάριο προσομοιώνει στην διαδικασία της πλύσης (wash) στα πειράματα πρωτεωμικής, όπου ο όγκος διαλύματος είναι υποδεέστερης σημασίας λόγω του χαμηλού κόστους
- Στο δεύτερο σενάριο (ενότητα 3.6.3) είναι ανάγκη να ελαχιστοποιηθεί ο χρόνος όπου ένας μικρός όγκος ρευστού (50 μl περίπου) διαχέεται μέσα στο ικρίωμα. Αυτό το σενάριο εναλλαγής αντιστοιχεί στην διαδικασία της διέγερσης (stimulation) ή λύσης των κυττάρων (Εικόνα 24) όπου ο όγκος διαλύματος είναι μικρός

3.6.2 Εναλλαγή Ρευστού σε Πορώδες Ικρίωμα Κολλαγόνου Μέσω Συνεχούς Παροχής

Σκοπός του πειράματος είναι η ελαχιστοποίηση του συνολικού χρόνου που χρειάζεται για αλλαγή ρευστού μέσα σε ένα πορώδες ικρίωμα κολλαγόνου με τη βοήθεια του συστήματος συσκευή – αντλίας, το οποίο παρέχει συνεχόμενη ροή συνολικού όγκου 2ml διαμέσου του ικρίωματος. Κύρια ανεξάρτητη παράμετρος προς προσδιορισμό είναι η μέση παροχή διαμέσου του ικρίωματος.

Το πείραμα αποτελείται από τα εξής βήματα:

- Ξηρά ικρίωματα κολλαγόνου διαμέτρου 3 ή 4mm και ύψους 3mm τοποθετούνται στο θάλαμο της συσκευής και συνδέονται με τη συσκευή και την αντλία
- Προστίθεται στη δεξαμενή υποδοχής ρευστού διάλυμα tris
- Η αντλία ρουφά ~ 50μl tris έτσι ώστε να γεμίσει ο θάλαμος και να υγροποιηθεί το ικρίωμα
- Μετά από 10 λεπτά η αντλία ρουφά όλο το διάλυμα tris μέχρι να αδειάσει ο θάλαμος
- Προστίθεται στη δεξαμενή υποδοχής ρευστού διάλυμα 10μM FITC 2ml
- Η αντλία ξεκινά να ρουφά αέρα μέχρι όλο το διάλυμα να καταλήξει στο χώρο συλλογής (2ml conical tube). Το βήμα αυτό δοκιμάζεται για διάφορες τιμές της παροχής ($Q = 270.3\mu\text{l}/\text{sec}$, $100\mu\text{l}/\text{sec}$, $28.2\mu\text{l}/\text{sec}$, $20\mu\text{l}/\text{sec}$, $11,6\mu\text{l}/\text{sec}$, $3.33\mu\text{l}/\text{sec}$, $1.66\mu\text{l}/\text{sec}$). Για κάθε παροχή χρησιμοποιούνται τρία δείγματα. Η συγκέντρωση του ικρίωματος στην τελική κατάσταση ισορροπίας είναι:

$$C_0 = \frac{2000}{2008} * 10$$

- Μετά το πέρας της ροής, το ικρίωμα απομακρύνεται από το θάλαμο και τοποθετείται σε μία πλάκα με 80μl tris
- Μετά από 2 ώρες (ώστε το σύστημα να φτάσει σε ισορροπία) το ικρίωμα αφαιρείται και το διάλυμα που απομένει μετρίεται στο φασματόμετρο φθορισμού, CytoFluor. Η αναμενόμενη συγκέντρωση του διαλύματος αφού επέλθει ισορροπία στην περίπτωση που το ρευστό έχει πλήρως διαχυθεί στο πορώδες ικρίωμα υπολογίζεται ως:

$$C_2 = C_0 * \frac{8}{88} = \frac{2000}{2008} * \frac{8}{83} = 0,933 \mu\text{M}$$

Το σήμα που μετρίεται από κάθε πείραμα συγκρίνεται με το σήμα C2 στη μόνιμη κατάσταση, στην περίπτωση που το ρευστό έχει πλήρως διαχυθεί στο ικρίωμα. Για κάθε πείραμα διεξάγεται στατιστική ανάλυση μέσω του Student's t test, για να διαπιστωθεί εάν το σήμα είναι στατιστικά διαφορετικό με αυτό στη μόνιμη κατάσταση. Εξετάζονται ακόμη ανά δύο τα πειράματα για να διαπιστωθεί εάν έχουν

στατιστικά διαφορετικό σήμα μεταξύ τους. Εάν δύο πειράματα δεν είναι στατιστικά διαφορετικά, η βέλτιστη επιλογή θα είναι το πείραμα που διαρκεί λιγότερο.

3.6.3 Εναλλαγή Ρευστού σε Πορώδες Ικρίωμα Κολλαγόνου Μέσω Εναλλασσόμενης Εξαναγκασμένης Ροής

Σκοπός του πειράματος είναι η εξέταση βελτίωσης του συνολικού χρόνου διάχυσης διαμέσου του ικρίωματος με τη βοήθεια του συστήματος συσκευή – αντλία, το οποίο προκαλεί εξαναγκασμένη ροή ρευστού εναλλασσόμενης διεύθυνσης διαμέσου του ικρίωματος. Αυτού του είδους τα πειράματα απευθύνονται σε περιπτώσεις που ο όγκος ρευστού είναι πολύτιμος, άρα και λιγοςτός. Βασικός στόχος είναι να επιταχυνθεί η διάχυση και σε αυτή την περίπτωση.

Τα βασικά βήματα του πειράματος είναι:

- Ξηρά ικρίωματα κολλαγόνου διαμέτρου 3 ή 4mm και ύψους 3mm τοποθετούνται στο θάλαμο της συσκευής και συνδέονται με τη συσκευή και την αντλία
- Ύστερα τα ικρίωματα τοποθετούνται στο θάλαμο της συσκευής η οποία συνδέεται με την αντλία
- Προστίθεται στη δεξαμενή υποδοχής ρευστού διάλυμα tris
- Η αντλία ρουφά ~ 50μl tris έτσι ώστε να γεμίσει ο θάλαμος και να υγροποιηθεί το ικρίωμα
- Μετά από χρόνο 10 λεπτά περίπου η αντλία ρουφά όλο διάλυμα tris μέχρι να αδειάσει ο θάλαμος
- Προστίθεται διάλυμα Fitc, τόσο όσο να γεμίσει ο θάλαμος ($V \sim 50\mu\text{l}$), συγκέντρωσης $C_2 = 10\mu\text{M}$
- Η αντλία ξεκινά να ρουφά αέρα μέχρι να γεμίσει ο θάλαμος με το φθορίζον υγρό
- Στη συνέχεια η αντλία σπρώχνει και ρουφά ~ 15μl επαναλαμβανόμενα προκαλώντας αντίστοιχη εναλλασσόμενη εξαναγκασμένη ροή στο θάλαμο όπου βρίσκεται το ικρίωμα.
- Ο θάλαμος αδειάζει μέχρι όλο το φθορίζον υγρό να πέσει στο δοχείο συλλογής
- Το ικρίωμα βγαίνει από το θάλαμο και τοποθετείται σε μία πλάκα με το αρχικό buffer, tris
- Μετά από 2 ώρες το ικρίωμα αφαιρείται και μετριέται το διάλυμα που απομένει στο φασματόμετρο φθορισμού, CytoFluor. Η συγκέντρωση του διαλύματος που αναμένεται να μετρηθεί αφού επέλθει ισορροπία και έχει διαχυθεί πλήρως το ρευστό από το πορώδες ικρίωμα υπολογίζεται από τη σχέση

$$C3 = \frac{50}{58} * 10 * \frac{8}{83} \cong 0,804\mu M$$

Το πείραμα, για κάθε παροχή υγρού που χρησιμοποιείται, εκτελείται σε διάφορες χρονικές στιγμές έτσι ώστε να υπολογιστεί ο χρόνος στον οποίο σταθεροποιείται το σήμα και να βρεθεί ο βέλτιστος. Το σήμα που μετριέται από κάθε πείραμα συγκρίνεται με το σήμα στη μόνιμη κατάσταση, δηλαδή όταν το ρευστό έχει πλήρως διαχυθεί στο ικρίωμα. Για κάθε πείραμα διεξάγεται στατιστική ανάλυση μέσω του Student's t test, για να διαπιστωθεί εάν το σήμα είναι στατιστικά διαφορετικό σε κάθε χρονική στιγμή. Οι κώδικες που διαβάζει η αντλία για κάθε πείραμα παρουσιάζονται στο Παράρτημα Β.

3.7 Πειράματα Αλληλεπίδρασης Κυττάρων Μέσα σε Πορώδες Ικρίωμα Κολλαγόνου

Στην ενότητα αυτή παρουσιάζονται κάποια αρχικά πειράματα που πραγματοποιήθηκαν με τη συσκευή παρουσία του πορώδους ικρίωματος κολλαγόνου με κύτταρα. Τα πειράματα που πραγματοποιήθηκαν είναι δύο ειδών και παρουσιάζονται στις υποενότητες που ακολουθούν.

3.7.1. Κυτταρική Πρόσφυση σε Ικρίωματα Κολλαγόνου Παρουσία Ροής Ρευστού

Σκοπός αυτού του πειράματος είναι ο προσδιορισμός της επίδρασης που έχει η εξαναγκασμένη παροχή ρευστού (μέσω της αντλίας) στα κύτταρα που καλλιεργούνται μέσα στο ικρίωμα. Συγκεκριμένα, μετρήθηκε η αποκόλληση κυττάρων που καλλιεργούνται μέσα στο ικρίωμα λόγω εξαναγκασμένης ροής διαφόρων παροχών. Η διαδικασία εκτέλεσης του πειράματος έχει ως εξής:

- Ξηρά ικρίωματα κολλαγόνου κόβονται σε κυλινδρικά κομμάτια διαμέτρου 4mm και ύψους 3mm
- Σύμφωνα με το αναλυτικό πρωτόκολλο που παρέχεται στο Παράρτημα Β, εισάγονται κύτταρα στο πορώδες ικρίωμα (~ 30000 κύτταρα/ δείγμα) και αφήνονται σε μια συμβατική πλάκα με θρεπτικό για μια ημέρα. Αφήνονται μια ημέρα έτσι ώστε τα κύτταρα να έχουν εισχωρήσει στο υλικό και να μην βρίσκονται στην επιφάνεια του υλικού. Να σημειωθεί πως όταν τα κύτταρα μένουν στην επιφάνεια του ικρίωματος είναι πιο εύκολο να αποκολληθούν από αυτή ακόμη και με μια πιπέτα. Επίσης είναι αναμενόμενο πως κάποια από αυτά θα βρίσκονται στην επιφάνεια του πορώδους ικρίωματος, άρα θα τραβηχτούν ακόμα και στις χαμηλές παροχές της αντλίας.
- Μετά από μια μέρα τα ικρίωματα τοποθετούνται στο θάλαμο της συσκευής η οποία συνδέεται με την αντλία
- Προστίθεται στη δεξαμενή υποδοχής ρευστού θρεπτικό DMEM++ (~ 80-100 μl)
- Η αντλία τραβά ~ 50μl έτσι ώστε να γεμίσει ο θάλαμος με το ικρίωμα με θρεπτικό
- Στη συνέχεια η αντλία σπρώχνει και ρουφά ~ 15μl επαναλαμβανόμενα προκαλώντας αντίστοιχη εναλλασσόμενη εξαναγκασμένη ροή στο θάλαμο όπου βρίσκεται το ικρίωμα.
- Ο θάλαμος αδειάζει μέχρι όλο το θρεπτικό να πέσει στο δοχείο συλλογής
- Μετριέται με μια πιπέτα ο ακριβής όγκος του θρεπτικού μέσα στο αναλώσιμο δοχείο (2ml centrifuge tube) και στη συνέχεια υπολογίζεται ο αριθμός των κυττάρων σε κάθε δείγμα με το αιμοκυτταρόμετρο
- Δύο από το συνολικό αριθμό δειγμάτων χρησιμοποιήθηκαν για να μετρηθεί ο συνολικός αριθμός κυττάρων μέσα στο ικρίωμα με τη μέθοδο αποσύνθεσης του ικρίωματος με αгарόζη (περιγράφεται αναλυτικά στο πρωτόκολλο του

Παραρτήματος Β). Ο λόγος αυτής της μέτρησης είναι να επαληθευτεί ότι υπήρχαν ζωντανά κύτταρα μέσα στο υλικό και για να υπάρχει μια ένδειξη του πόσα κύτταρα υπάρχουν και πόσα αποκολλώνται από την αντλία.

Το πείραμα εκτελέστηκε για διάφορες τιμές παροχών και ο συνολικός χρόνος της εναλλασσόμενης ροής με την αντλία διήρκησε περίπου 1 λεπτό. Για κάθε διαφορετική τιμή της παροχής χρησιμοποιήθηκαν δύο δείγματα. Τα αποτελέσματα επεξεργάστηκαν στο λογισμικό Excel. Το ίδιο πείραμα, όπως θα φανεί και στα αποτελέσματα εκτελέστηκε και με συνεχόμενη παροχή 1,5 ml από την αντλία. Τα αποτελέσματα των δύο αυτών δοκιμών δίδονται στο αντίστοιχο κεφάλαιο.

3.7.2. Εισαγωγή Κυττάρων στο Πορώδες Ικρίωμα Κολλαγόνου με τη Συσκευή

Σκοπός αυτού του πειράματος είναι να εκτιμηθεί η αποτελεσματικότητα του της συσκευής στην εισαγωγή κυττάρων μέσα στο πορώδες ικρίωμα κολλαγόνου με αυτοματοποιημένο τρόπο. Η διαδικασία εφαρμόζοντας εναλλασσόμενη εξαναγκασμένη ροή σε διάλυμα μικρού όγκου που περιέχει τα κύτταρα προς εισαγωγή στο ικρίωμα. Η εναλλασσόμενη ροή εφαρμόζεται για συγκεκριμένη παροχή και για διαφορετικές χρονικές στιγμές. Από το πείραμα αυτό εκτιμάται εάν το σφάλμα της συσκευής είναι μικρότερο ή μεγαλύτερο σε σχέση με το σφάλμα που δημιουργείται, χωρίς τη βοήθεια της συσκευής, από τον ίδιο τον πειραματιστή.

Η διαδικασία εκτέλεσης του πειράματος έχει ως εξής:

- Ξηρά ικρίωματα κολλαγόνου κόβονται σε κυλινδρικά κομμάτια διαμέτρου 4mm και ύψους 3mm
- Δημιουργείται διάλυμα από ινοβλάστες συγκεκριμένης πυκνότητας (3000 κύτταρα/μl)
- Το πορώδες ικρίωμα τοποθετείται στο θάλαμο της συσκευής, η οποία έχει συνδεθεί με την αντλία
- Στο δοχείο εισαγωγής υγρού της συσκευής τοποθετούνται 20μl κυτταρικού διαλύματος
- Η αντλία ρουφά λίγη ποσότητα ώστε οριακά να γεμίσει ο θάλαμος που βρίσκεται το ικρίωμα
- Στην συνέχεια η αντλία αρχίζει με εναλλασσόμενη ροή (push/ pull) να διακινεί το ρευστό πάνω κάτω μέσα στο θάλαμο. Η διαδικασία αυτή γίνεται για παροχή 20μl/sec και για διάφορες χρονικές στιγμές (1, 2, 3, 10 min)
- Το ικρίωμα απομακρύνεται από το θάλαμο της συσκευής και εισέρχεται μέσα σε μια συμβατική πλάκα (24 well plate) στον incubator
- Μετά από μία ώρα τοποθετείται σε κάθε δείγμα 1 ml θρεπτικού (DMEM++)
- Μετά από 24 ώρες, όπου τα κύτταρα έχουν εισέλθει στο ικρίωμα, πραγματοποιείται λύση των κυττάρων στο ικρίωμα. Η μέθοδος λύσης κυττάρων που βρίσκονται μέσα στο ικρίωμα περιγράφεται στο Παράρτημα Β.
- Το προϊόν της λύσης (πρωτεΐνες) μετριέται με τη μέθοδο BCA (ενότητα 3.1.2)

- ο Γνωρίζοντας τη συγκέντρωση πρωτεΐνης σε κάθε δείγμα και γνωρίζοντας τη συνολική μάζα πρωτεΐνης ανά κύτταρο για τους ινοβλάστες (0,23 ng) υπολογίζεται ο συνολικός αριθμός κυττάρων κάθε δείγματος

Για κάθε χρονική στιγμή χρησιμοποιήθηκαν δύο με τρία δείγματα. Να σημειωθεί πως χρησιμοποιήθηκαν και δείγματα ικριωμάτων χωρίς καθόλου κύτταρα (μόνο θρεπτικό) για έλεγχο καθώς το προϊόν της λύσης αποτελείται και από πρωτεΐνες που ενδεχομένως προέρχονται από υπολείμματα θρεπτικού στο ικρίωμα. Το σήμα που προέρχεται από τα ικρίωματα που δεν έχουν κύτταρα αφαιρείται από κάθε δείγμα με κύτταρα και υπολογίζεται ο πραγματικός αριθμός των κυττάρων. Τα αποτελέσματα επεξεργάστηκαν στο λογισμικό Excel. Για κάθε πείραμα διεξάγεται στατιστική ανάλυση μέσω του Student's t test για να διαπιστωθεί εάν διαφέρουν στατιστικά τα αποτελέσματα του αριθμού των κυττάρων μεταξύ διαφορετικών χρονικών στιγμών ή μεταξύ του τρόπου εισαγωγής των κυττάρων (με ή χωρίς τη συσκευή).

4. Πειραματικά Αποτελέσματα

4.1 Εκτίμηση Τοξικότητας Υλικών

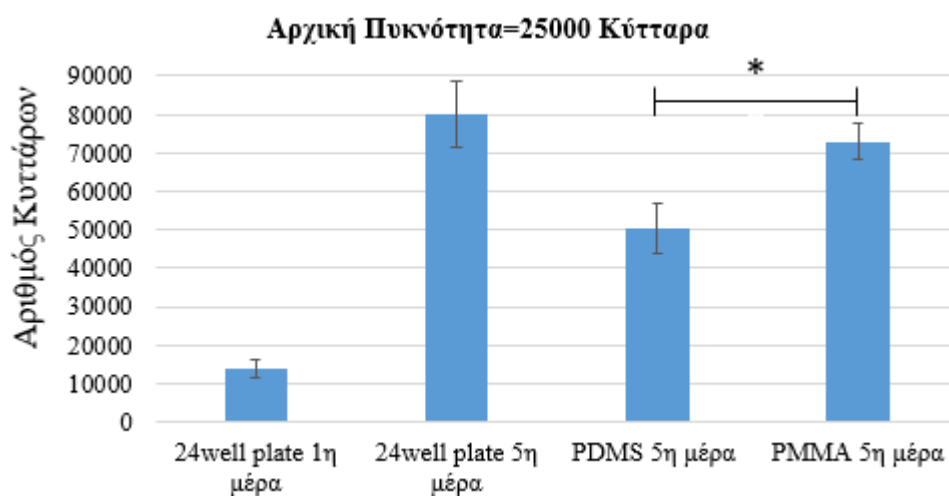
Στο πείραμα εκτίμησης τοξικότητας εξετάστηκε η κύτταρο-τοξικότητα δύο υλικών (PDMS, PMMA) υποψήφιων να χρησιμοποιηθούν στην συσκευή που περιγράφεται στο κεφάλαιο 2 σε σχέση με το σύνηθες πλαστικό υλικό (πολυστυρένιο) μιας συμβατικής πλάκας καλλιέργειας.

Στην Εικόνα 26 και Εικόνα 27 παρουσιάζονται ο αριθμός των ζωντανών κυττάρων μέσα σε βοθρία από πολυστυρένιο, PDMS και PMMA 5 μέρες μετά την εισαγωγή 25000 (Εικόνα 26) ή 40000 (Εικόνα 27) κυττάρων. Οι μετρήσεις έγιναν με αιμοκυτταρόμετρο. Οι εικόνες αυτές παρουσιάζουν ως αναφορά τον αριθμό των ζωντανών κυττάρων 1 μέρα μετά την εισαγωγή σε βοθρία πολυστυρενίου.

Ο κατακόρυφος άξονας κάθε εικόνας παρουσιάζει τον αριθμό των ζωντανών κυττάρων που μετρήθηκαν στα 4 πειραματικά σημεία κάθε πειράματος, τα οποία είναι:

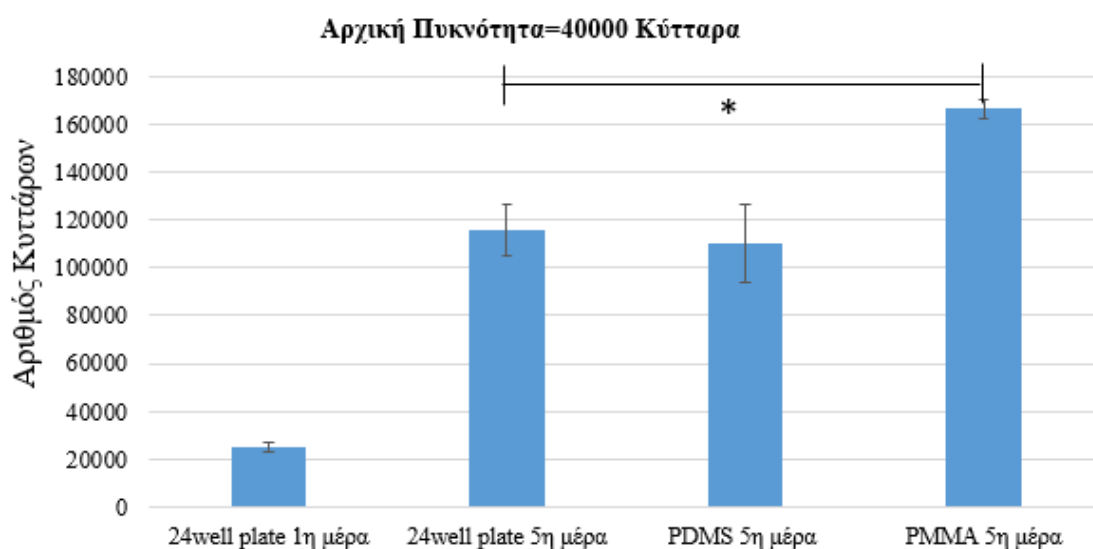
- i. 1^η μέρα μετά την εισαγωγή των κυττάρων σε βοθρίο συμβατικής πλάκας 24άρων βοθρίων
- ii. 5 μέρες μετά την εισαγωγή κυττάρων σε βοθρίο συμβατικής πλάκας 24άρων βοθρίων
- iii. 5 μέρες μετά την εισαγωγή των κυττάρων σε βοθρίο από PDMS
- iv. 5 μέρες μετά την εισαγωγή των κυττάρων σε βοθρίο από PMMA

Σε κάθε πειραματικό σημείο παρουσιάζονται οι μέσες τιμές και η τυπική απόκλιση από 3 διαφορετικά πειράματα



Εικόνα 26: Αριθμός ζωντανών κυττάρων 1 ή 5 μέρες μετά την εισαγωγή 25000 κυττάρων σε βοθρίο πλάκας πολυστυρενίου (plate), σε βοθρίο με τοιχώματα PDMS, ή σε βοθρίο με

τοιχώματα PMMA. Τα δεδομένα παρουσιάζουν την μέση τιμή και την τυπική απόκλιση n=3 μετρήσεων σε αιμοκυτταρόμετρο ($p < 0.05$)



Εικόνα 27: Αριθμός ζωντανών κυττάρων 1 ή 5 μέρες μετά την εισαγωγή 40000 κυττάρων σε βοθρίο πλάκας πολυστυρενίου (plate), σε βοθρίο με τοιχώματα PDMS, ή σε βοθρίο με τοιχώματα PMMA. Τα δεδομένα παρουσιάζουν την μέση τιμή και την τυπική απόκλιση n=3 μετρήσεων σε αιμοκυτταρόμετρο ($p < 0.05$).

Η στατιστική ανάλυση των αποτελεσμάτων δείχνει ότι δεν υπάρχει στατιστική διαφορά μεταξύ του αριθμού των κυττάρων 5 μέρες μετά την εισαγωγή του σε πολυστυρένιο, και PMMA, στην περίπτωση εισαγωγής 40000 κυττάρων την πρώτη ημέρα (Εικόνα 27). Όταν ξεκινήσει η καλλιέργεια με μικρότερο αριθμό κυττάρων (25000), τα κύτταρα φαίνονται να αναπτύσσονται με πιο αργό ρυθμό στο PDMS από ότι στα άλλα δύο υλικά. Για αυτή την περίπτωση το στατιστικό τεστ επιβεβαιώνει ότι τα δείγματα στην συμβατική πλάκα πολυστυρενίου και τα δείγματα στο PMMA δεν είναι στατιστικά διαφορετικά, ενώ στο PDMS επηρεάζονται.

Σημαντικό συμπέρασμα αποτελεί και το γεγονός ότι ο ρυθμός ανάπτυξης των κυττάρων στα υλικά PMMA και PDMS επηρεάζεται από την αρχική πυκνότητα κυττάρων που τοποθετούνται στην επιφάνεια. Παρατηρούμε δηλαδή ότι μόλις αυξάνουμε την αρχική πυκνότητα κατά ένα ποσοστό 37,5%, στο PDMS ο αριθμός των κυττάρων αυξάνεται κατά 54,4% και στο PMMA κατά 56%.

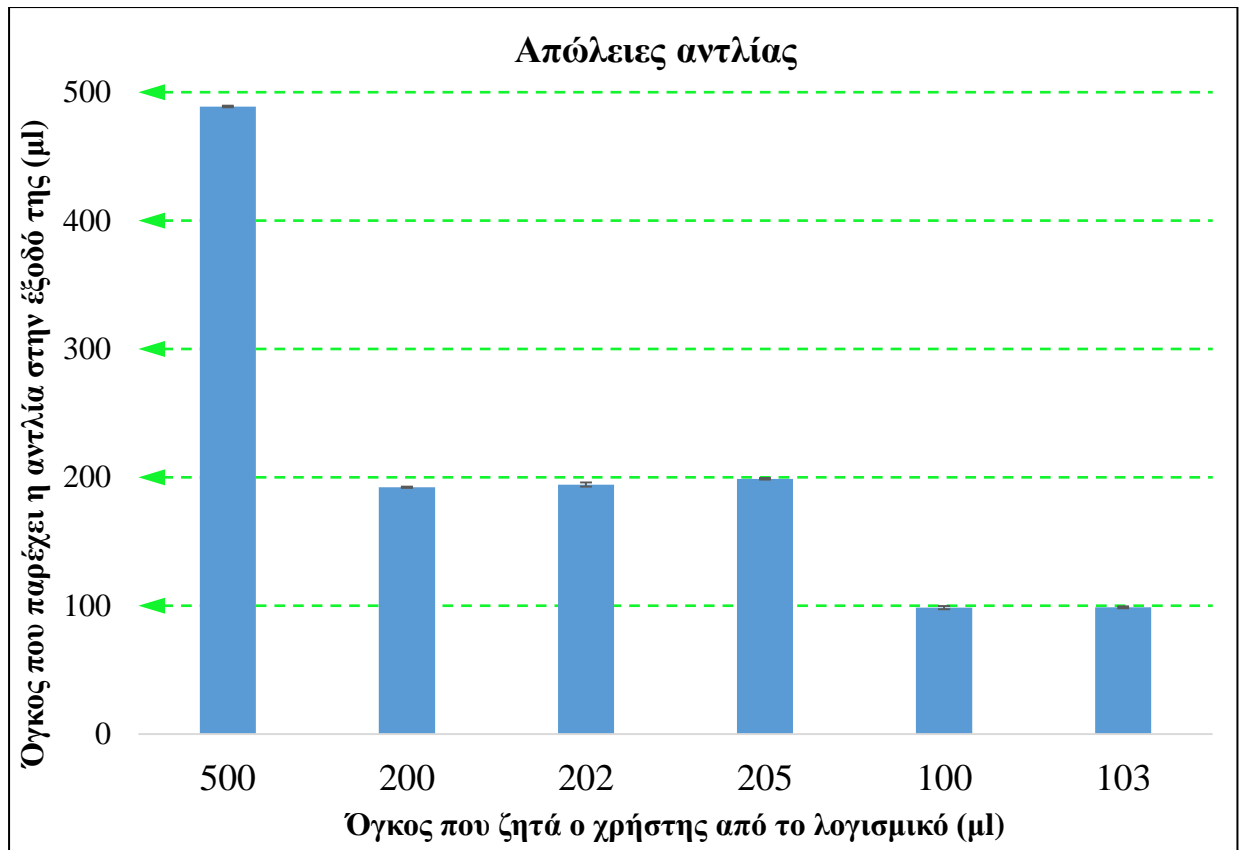
4.2 Υπολογισμός των Απωλειών του Συστήματος της Αντλίας

Σε αυτό το πείραμα υπολογίστηκαν οι απώλειες του συστήματος της αντλίας, το γεγονός δηλαδή ότι η αντλία δεν παρέχει ακριβώς τον όγκο του νερού που της ζητείται. Οι απώλειες αυτές προέρχονται κυρίως από τη διασύνδεση της βαλβίδας της αντλίας με τις σωληνώσεις μέσω των προσαρμογέων (fittings). Τα δύο κρίσιμα σημεία των προσαρμογέων είναι το σπείρωμα και η επίπεδη επιφάνεια που σφραγίζει τη βαλβίδα. Αν τα σημεία αυτά δεν έχουν τυπωθεί με ακρίβεια είναι πιθανόν να προκαλέσουν απώλειες υγρού ή εισαγωγή αέρα στο σύστημα.

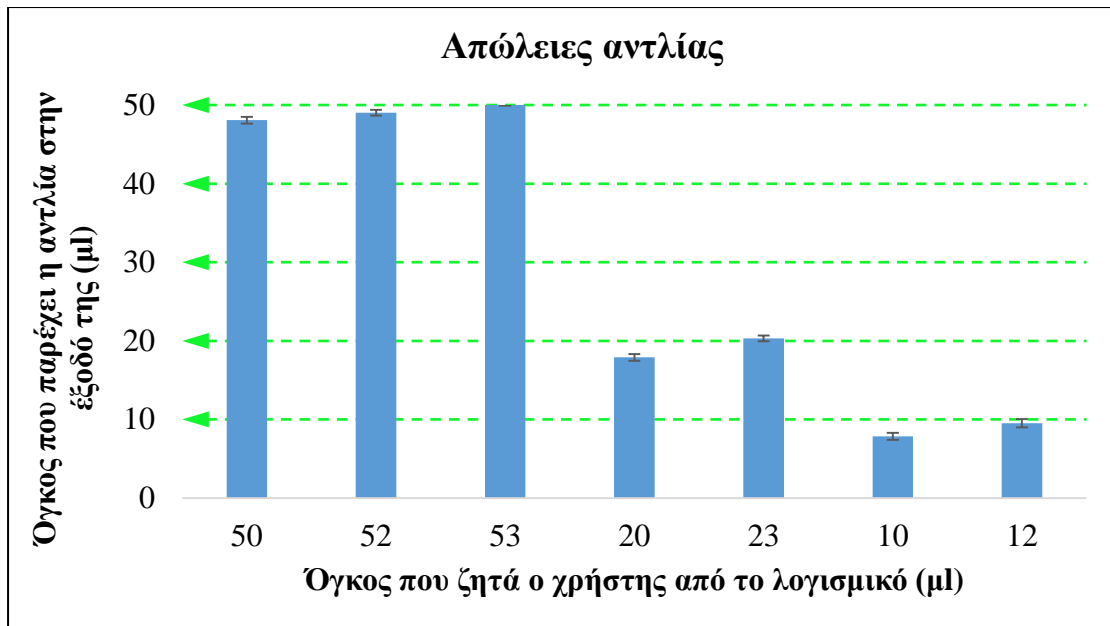
Στην Εικόνα 28 και Εικόνα 29 παρουσιάζεται η πραγματική ποσότητα νερού V_{real} που παρέχει η αντλία (κατακόρυφος άξονας) για διάφορες τιμές της επιθυμητής ποσότητας V_{des} νερού που ζητήθηκαν από το χρήστη (οριζόντιος άξονας). Δοκιμάστηκαν διάφορες τιμές επιθυμητής ποσότητας $V_{des}= 500, 200, 100, 50, 20, 10\mu\text{l}$. Για κάθε επιθυμητή ποσότητα υγρού, οι εικόνες παρουσιάζουν την μέση τιμή και την τυπική απόκλιση από $n=3$ δείγματα.

Τα αποτελέσματα των μετρήσεων έδειξαν ότι το σφάλμα (η διαφορά μεταξύ του ζητούμενου και του παρεχόμενου όγκου νερού) είναι ανάλογο του ζητούμενου όγκου: μικρό σφάλμα στους χαμηλούς όγκους και μεγαλύτερο σφάλμα στους υψηλούς όγκους (500, 200 μl). Η Εικόνα 30 δείχνει ότι τα πειραματικά δεδομένα προσεγγίζονται πολύ καλά από μια γραμμική συνάρτηση ($R^2=0,999$)

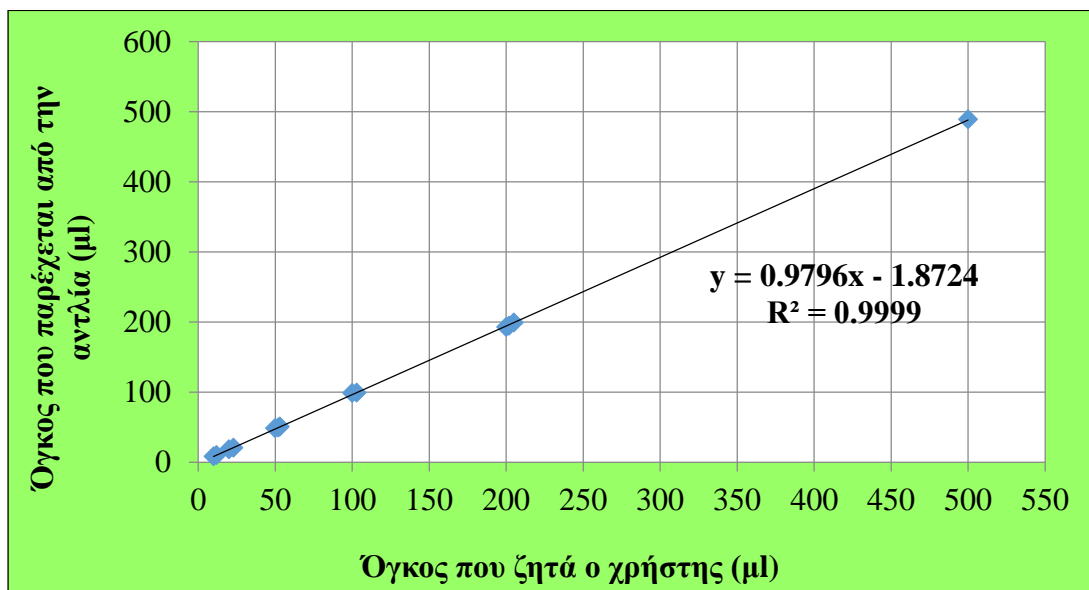
$$V_{real} = 0,9796 \cdot V_{des} - 1.8724$$



Εικόνα 28: Χαρακτηρισμός των απωλειών του συστήματος αντλίας όταν της ζητείται να παρέχει όγκους ρευστού μεταξύ 100 και 500 μL. Τα δεδομένα παρουσιάζουν την μέση τιμή και την τυπική απόκλιση από n=3 πειράματα για διάφορες πειραματικές συνθήκες.



Εικόνα 29: Χαρακτηρισμός των απωλειών του συστήματος αντλίας όταν της ζητείται να παρέχει όγκους ρευστού μεταξύ 10 και 50 μL. Τα δεδομένα παρουσιάζουν την μέση τιμή και την τυπική απόκλιση από n=3 πειράματα για διάφορες πειραματικές συνθήκες.



Εικόνα 30: Βαθμονόμηση της αντλίας. Σύγκριση του ζητούμενου (οριζόντιος άξονας) και του παρεχόμενου όγκου (κατακόρυφος άξονας). Τα αποτελέσματα έχουν προσαρμοστεί σε ένα γραμμικό μοντέλο $y = ax + \beta$, όπου οι παράμετροι a και β εκτιμήθηκαν μέσω της μεθόδου των ελαχίστων τετραγώνων.

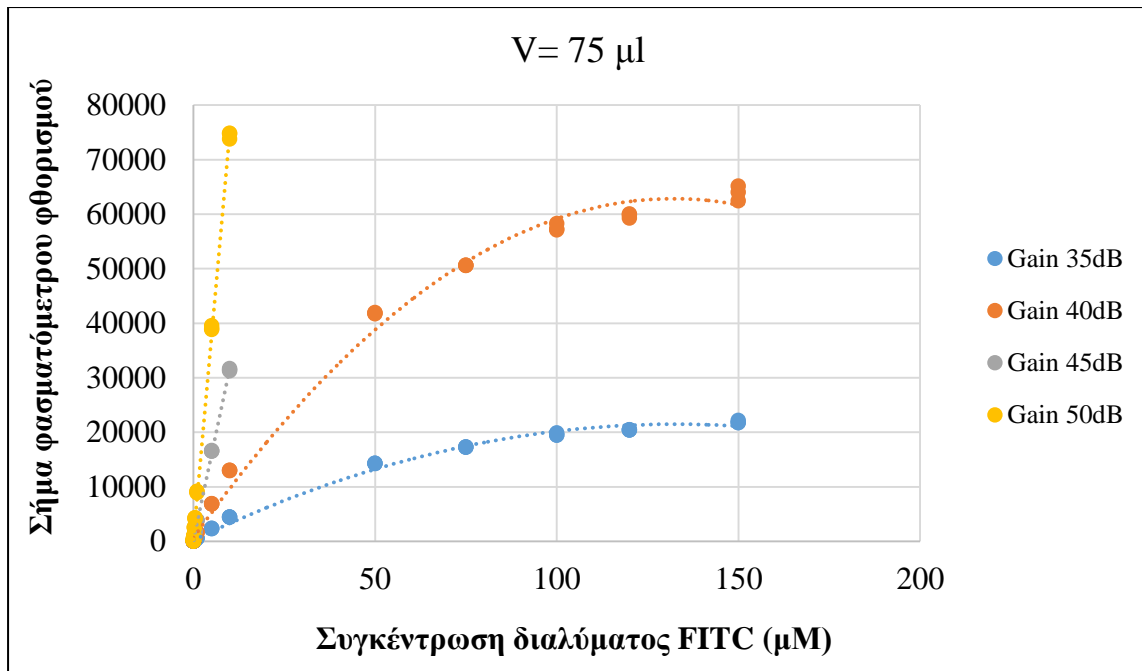
4.3 Μέτρηση Συγκέντρωσης Φθορίζοντος Διαλύματος Μέσω Φασματόμετρου Φθορισμού

4.3.1 Βαθμονόμηση Φασματόμετρο Φθορισμού

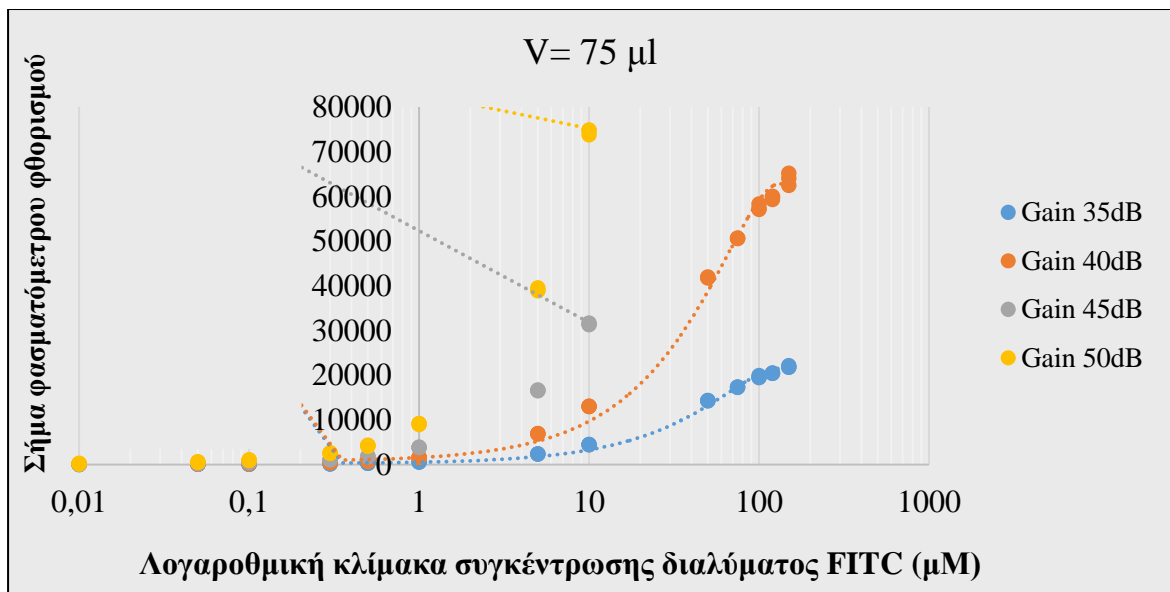
Για τη βαθμονόμηση του φασματόμετρου φθορισμού, (CytoFluor Series 4000), χρησιμοποιήθηκε ως πρώτη ύλη φθορίζουσα ουσία FITC (fluorescein isothiocyanate), συγκέντρωσης 1 mM. Από αυτό το διάλυμα προετοιμάστηκαν αραιώσεις του FITC συγκέντρωσης από 1 mM μέχρι και 0,0005 μ M. Συγκεκριμένοι όγκοι (50, 75, ή 100 μ l) των διαλυμάτων σε βοθρία πλάκας 96 βοθρίων μετρήθηκαν στο φασματόμετρο φθορισμού για διάφορες τιμές του κέρδους του φωτοπολλαπλασιαστή του φασματόμετρου.

Παρατηρήθηκε πως σε υψηλές τιμές του κέρδους του φωτοπολλαπλασιαστή (50, 80 dB) το φασματόμετρο έδινε υψηλά σήματα φθορισμού ακόμα και για διαλύματα χαμηλών συγκεντρώσεων, δεν μπορούσε όμως να ανιχνεύσει το σήμα στις πιο υψηλές συγκεντρώσεις (250, 100 ή και 10 μ M) λόγω κορεσμού του αισθητήρα. Επίσης σε χαμηλότερο κέρδος φωτοπολλαπλασιαστή μπορούσε να ανιχνεύσει διαλύματα μεγαλύτερης συγκέντρωσης, όμως το σήμα πέρα από κάποιο όριο δεν ήταν γραμμικό και παρουσίαζε υψηλό θόρυβο. Σε αυτή την περίπτωση δεν ήταν δυνατό να διακριθούν και βασικές διαφορές μεταξύ των συγκεντρώσεων διαλυμάτων (π.χ. 10 και 1 μ M δεν είχαν στατιστικά διαφορετικό σήμα).

Στην Εικόνα 31 παρουσιάζονται ένα παράδειγμα καμπυλών βαθμονόμησης για διαλύματα FITC όγκου 75 μ l και συγκέντρωσης διαλυμάτων στο εύρος 1000- 0,001 μ M για διαφορετικά κέρδη του φωτοπολλαπλασιαστή (35-40-45-50 dB). Στον οριζόντιο άξονα απεικονίζεται η συγκέντρωση των διαλυμάτων (σε μ M) και στον κατακόρυφο άξονα το σήμα του φασματόμετρου. Στην Εικόνα 32 παρουσιάζεται το ίδιο διάγραμμα με λογαριθμική κλίμακα των συγκεντρώσεων στον οριζόντιο άξονα. Για κάθε αραιώση παρουσιάζεται η μέση τιμή του σήματος και η τυπική απόκλιση από n=3 δείγματα. Για χαμηλότερα κέρδη του φωτοπολλαπλασιαστή η μορφή της καμπύλης που φαίνεται να ακολουθούν τα σημεία δεν είναι γραμμική αλλά παρουσιάζει γραμμικότητα στην αρχή, αυξάνεται στη συνέχεια μέχρι ένα σημείο και σταθεροποιείται σε αυτό. Η μορφή της απόκρισης οφείλεται στον κορεσμό του αισθητήρα ο οποίος παρουσιάζει κάποια όρια στο μέγιστο σήμα που μπορεί να ανιχνεύσει. Σε υψηλότερα κέρδη του φωτοπολλαπλασιαστή για την ίδια ποσότητα διαλύματος η καμπύλη παρουσιάζει γραμμικότητα και υψηλό σήμα, περιορίζεται όμως κατά πολύ το εύρος των συγκεντρώσεων που μπορούν να ανιχνευθούν και αυξάνεται ο θόρυβος.



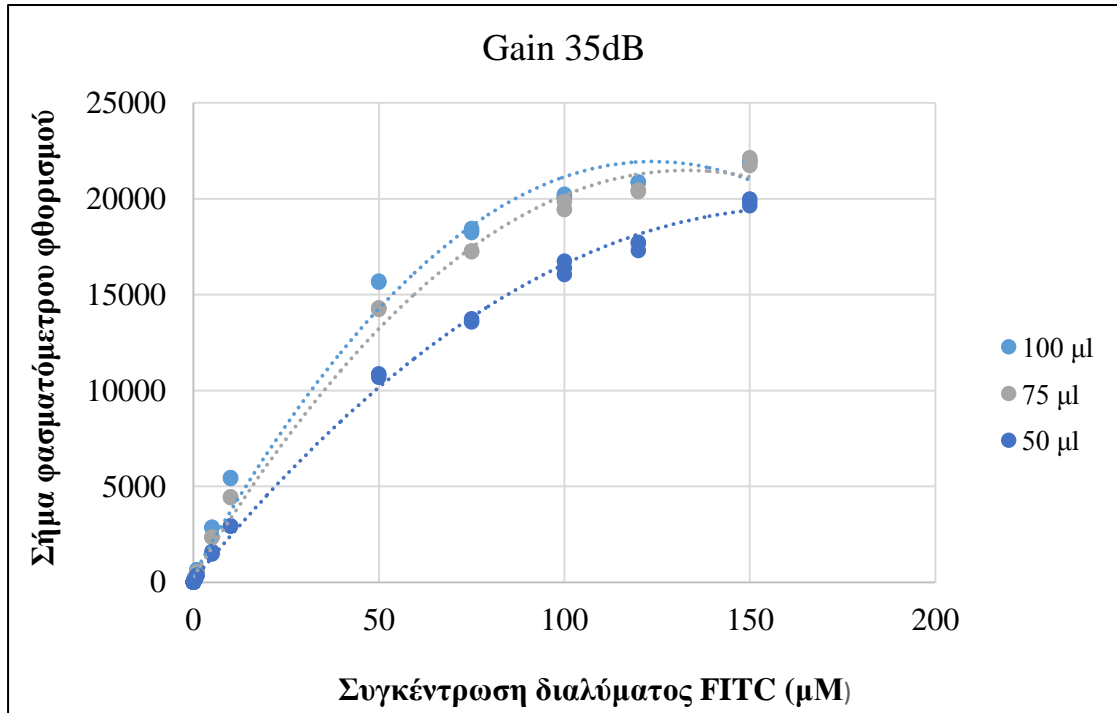
Εικόνα 31: Καμπύλη βαθμονόμησης φασματομέτρου φθορισμού σε διαλύματα FITC σε Tris. Παράμετροι οργάνου: Gain: 35, 40, 45, 50 dB, Όγκος διαλύματος: 75μl



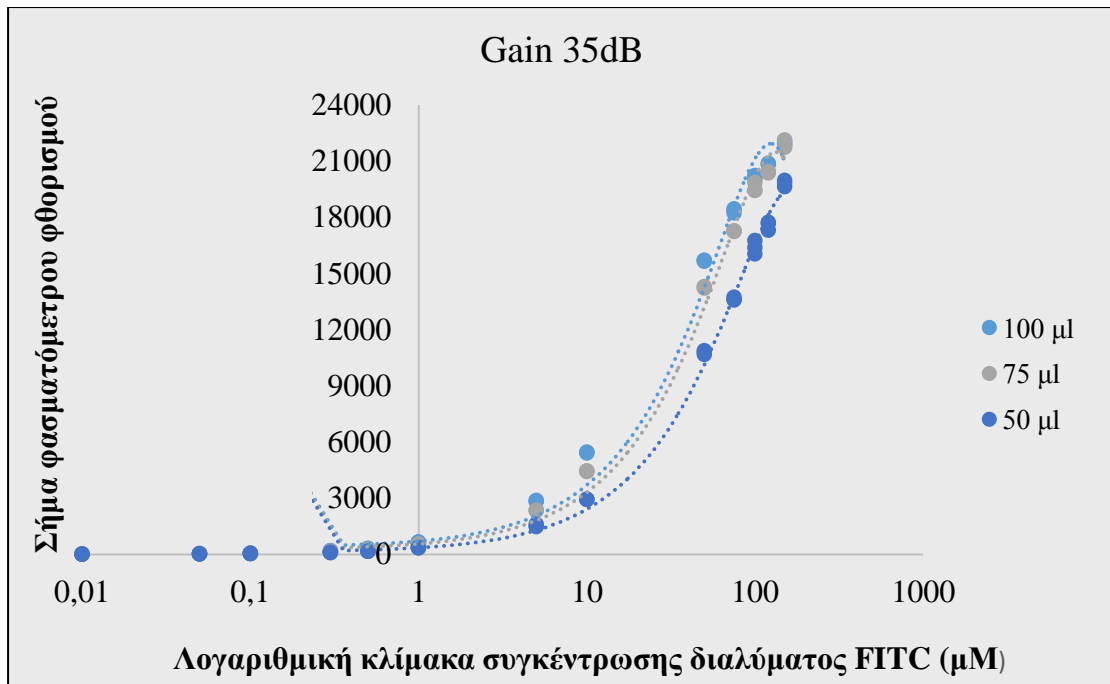
Εικόνα 32: Καμπύλη βαθμονόμησης φασματομέτρου φθορισμού σε διαλύματα FITC σε Tris σε λογαριθμική κλίμακα. Παράμετροι οργάνου: Gain: 35, 40, 45, 50 dB, Όγκος διαλύματος: 75μl

Στην Εικόνα 33 παρουσιάζεται η καμπύλη βαθμονόμησης για κέρδος του φωτοπολλαπλασιαστή 35 dB, συγκέντρωση διαλυμάτων στο εύρος 1000-0,001 μM και διαφορετικές ποσότητες διαλυμάτων (100, 75, 50 μl). Στον οριζόντιο άξονα απεικονίζεται η συγκέντρωση των διαλυμάτων (σε μM) και στον κατακόρυφο άξονα το σήμα του φασματομέτρου. Στην Εικόνα 34 παρουσιάζεται το ίδιο διάγραμμα με λογαριθμική κλίμακα των συγκεντρώσεων στον οριζόντιο άξονα. Για το ίδιο κέρδος

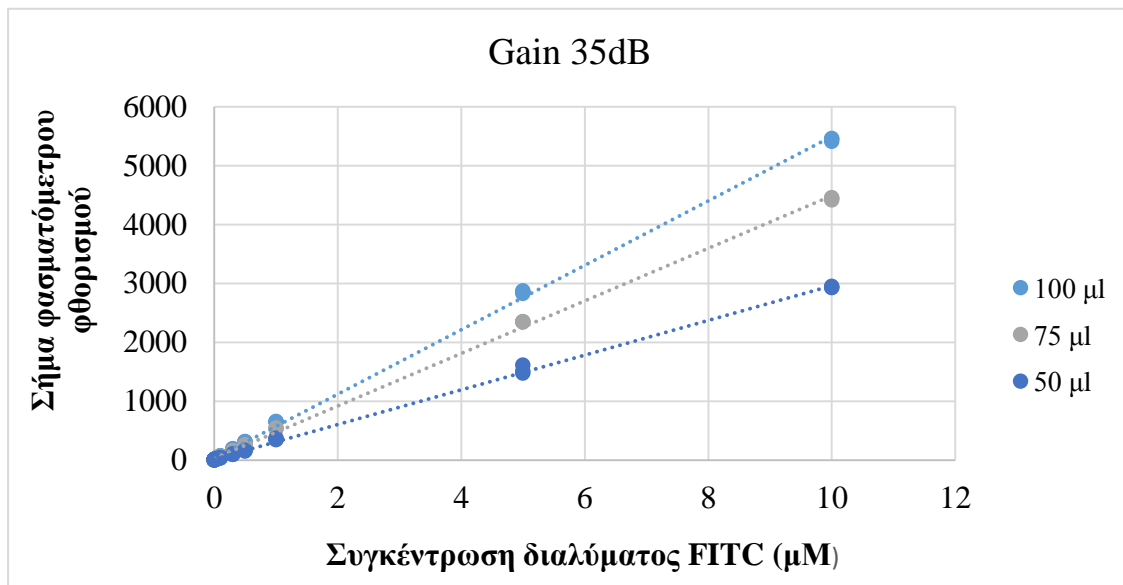
φωτοπολλαπλασιαστή μετράτε το ίδιο εύρος συγκεντρώσεων με υψηλότερο σήμα στις υψηλότερες ποσότητες. Στην Εικόνα 35 παρουσιάζεται το ίδιο διάγραμμα με την Εικόνα 34 σε μικρότερο όμως εύρος συγκέντρωσης διαλυμάτων στο οποίο η καμπύλη παρουσιάζει με μεγάλη ακρίβεια γραμμικότητα.



Εικόνα 33: Καμπύλη βαθμονόμησης φασματόμετρου φθορισμού σε διαλύματα FITC σε Tris. Παράμετροι οργάνου: Gain: 35 dB, Όγκος διαλύματος: 100, 75, 50 μl



Εικόνα 34: Καμπύλη βαθμονόμησης φασματόμετρου φθορισμού σε διαλύματα FITC σε Tris σε λογαριθμική κλίμακα. Παράμετροι οργάνου: Gain: 35 dB, Όγκος διαλύματος: 100, 75, 50 μl



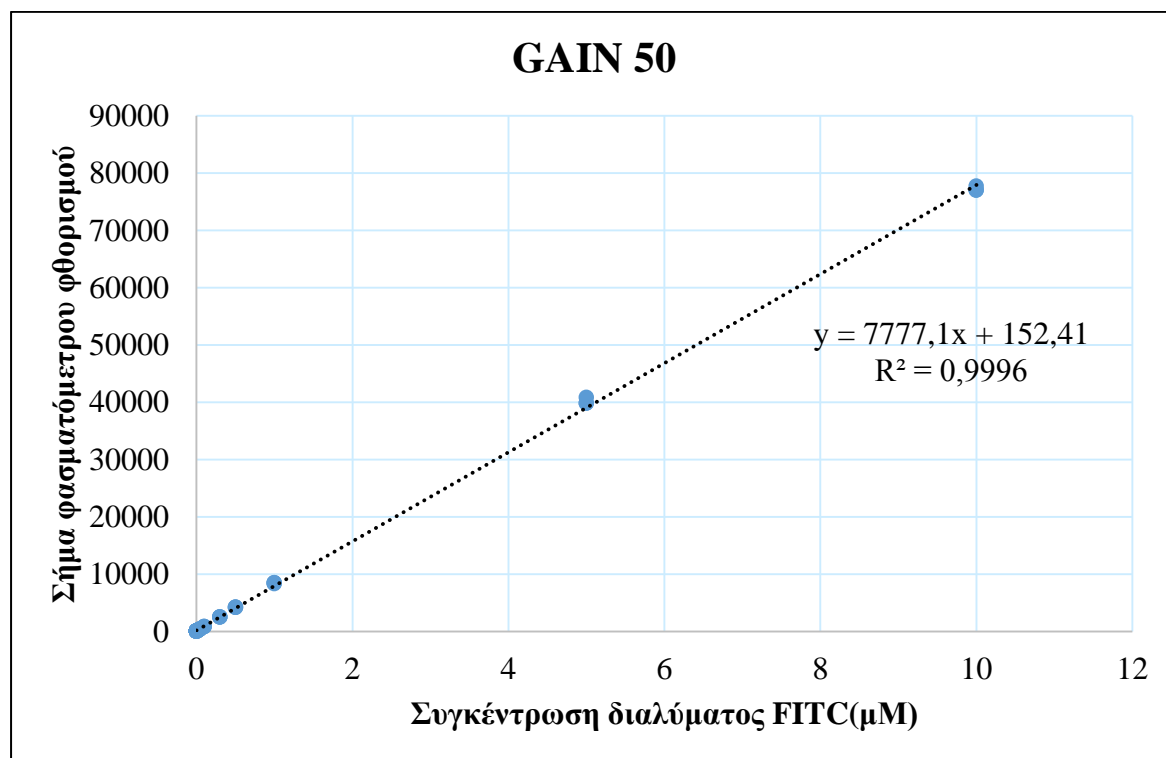
Εικόνα 35: Γραμμικό τμήμα καμπύλης βαθμονόμησης φασματόμετρου φθορισμού σε διαλύματα FITC σε Tris. Παράμετροι οργάνου: Gain: 35 dB, Όγκος διαλύματος: 100, 75, 50 μl

Σκοπός αυτού του πειράματος είναι ο προσδιορισμός του μεγαλύτερου εύρους σήματος που παρουσιάζει γραμμική συμπεριφορά με καλή ακρίβεια και μικρό θόρυβο. Για το σκοπό αυτό δοκιμάστηκε το ίδιο πείραμα βαθμονόμησης με μικρότερο εύρος συγκεντρώσεων στα δείγματα για διάφορους όγκους διαλύματος και κέρδη φωτοπολλαπλασιαστή.

Μετά από πολλές δοκιμές επιλέχθηκε όγκος ρευστού 75μl και gain=50dB. Η καμπύλη βαθμονόμησης του οργάνου που παρουσιάζεται στην Εικόνα 36 περιγράφεται από την γραμμική σχέση ($R^2 = 0.9996$):

$$y = 7777.1 * x + 152.41$$

όπου x η συγκέντρωση του διαλύματος FITC σε μM, και y η μέτρηση του φασματόμετρου.



Εικόνα 36: Καμπύλη βαθμονόμησης φασματόμετρου φθορισμού σε διαλύματα FITC σε Tris. Παράμετροι οργάνου: Gain: 50 dB, Όγκος διαλύματος: 75μl

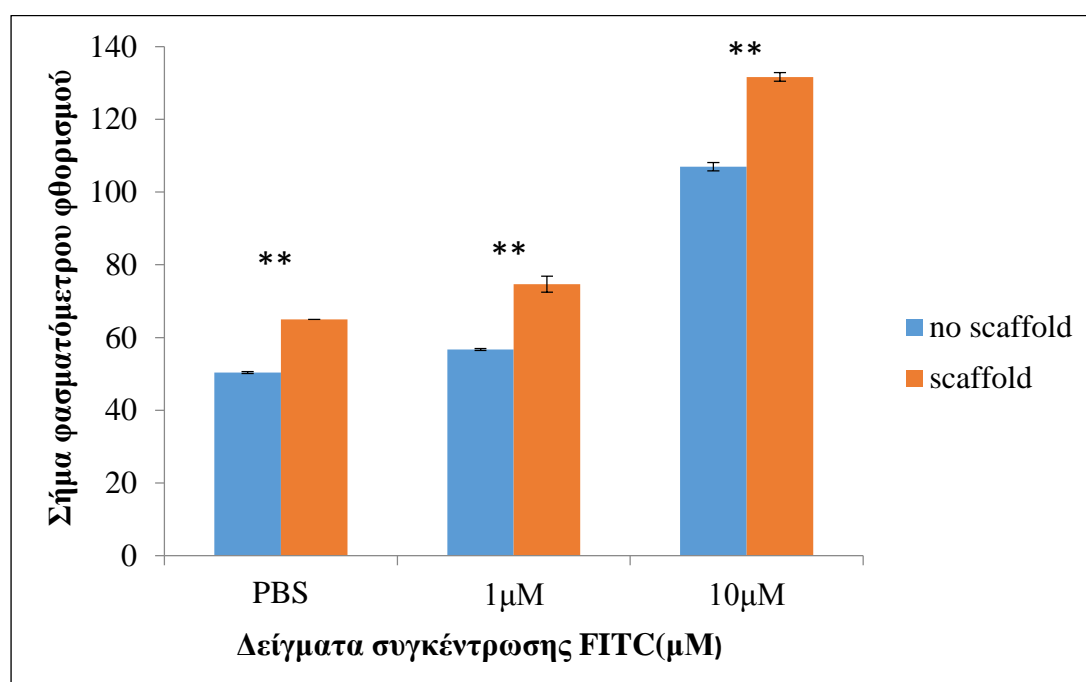
Η καμπύλη που επιλέχθηκε είναι η βέλτιστη καμπύλη βαθμονόμησης με υψηλό σήμα, χαμηλό θόρυβο και γραμμική απόκριση. Μετά την εκτέλεση στατιστικών Student test διαπιστώθηκε η ελάχιστη διακριτική ικανότητα του οργάνου, δηλαδή η ελάχιστη συγκέντρωση διαλύματος που μπορεί να ξεχωρίσει από το μηδέν για τις δεδομένες συνθήκες του βέλτιστου πειράματος. Η ελάχιστη διακριτική ικανότητα του φασματόμετρου βρέθηκε ότι είναι τα 0,0005 μM.

4.3.2 Επίδραση της Παρουσίας Ικριώματος Κολλαγόνου στις Μετρήσεις του Φασματοσκοπίου

Στο πείραμα αυτό εξετάζεται η επίδραση της παρουσίας ενός πορώδους ικριώματος κολλαγόνου μέσα σε ένα φθορίζων διάλυμα στην μέτρηση που παρέχει το φασματοσκόπιο φθορισμού.

Η Εικόνα 37 παρουσιάζει μετρήσεις από διαλύματα FITC σε PBS διάφορων συγκεντρώσεων με (πορτοκαλί χρώμα) και χωρίς (μπλε χρώμα) την παρουσία ενός πορώδους ικριώματος κολλαγόνου. Ο κατακόρυφος άξονας παρέχει το σήμα του φασματοσκοπίου (μέση τιμή και τυπική απόκλιση από n=3 μετρήσεις).

Η στατιστική ανάλυση μέσω Student test δείχνει ότι και στις τρεις περιπτώσεις η παρουσία του ικριώματος αυξάνει το σήμα σημαντικά. Είναι γνωστό ότι το κολλαγόνο είναι ασθενώς φθορίζων μόριο. Τα δεδομένα αυτά δείχνουν ότι αυτό το ασθενές σήμα είναι αρκετά σημαντικό ώστε να επηρεάζει μετρήσεις σε συγκεντρώσεις έως 10 μ M.



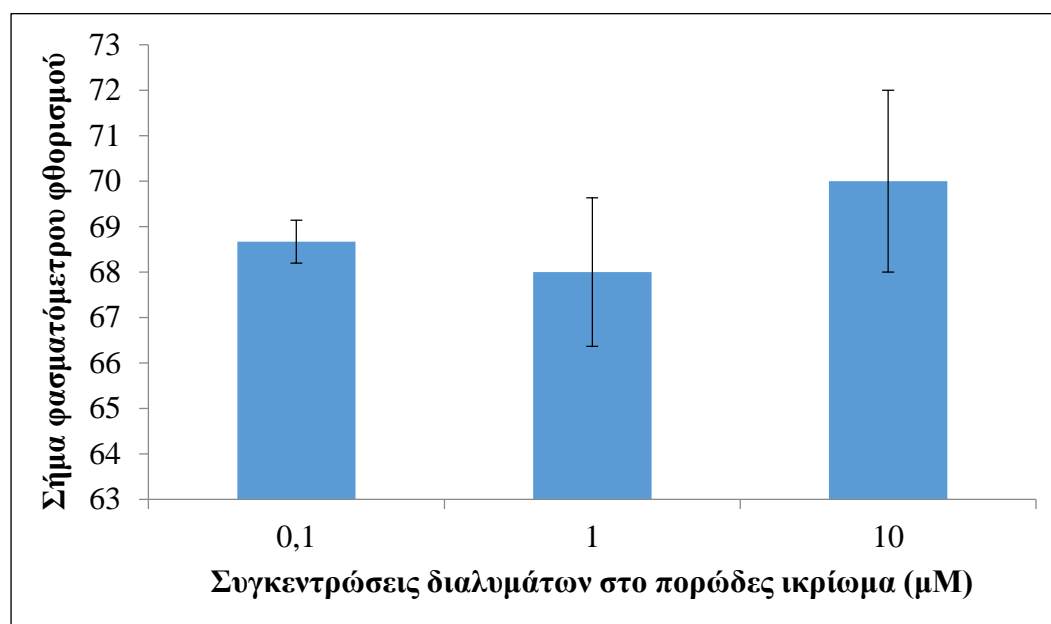
Εικόνα 37: Επίδραση της παρουσίας πορώδους ικριώματος κολλαγόνου (scaffold) σε φθορίζοντα διαλύματα (**, p<0.01).

4.3.3 Μέτρηση Συγκέντρωσης Φθορίζοντος Διαλύματος Μέσα σε Πορώδες Ικρίωματα Κολλαγόνου

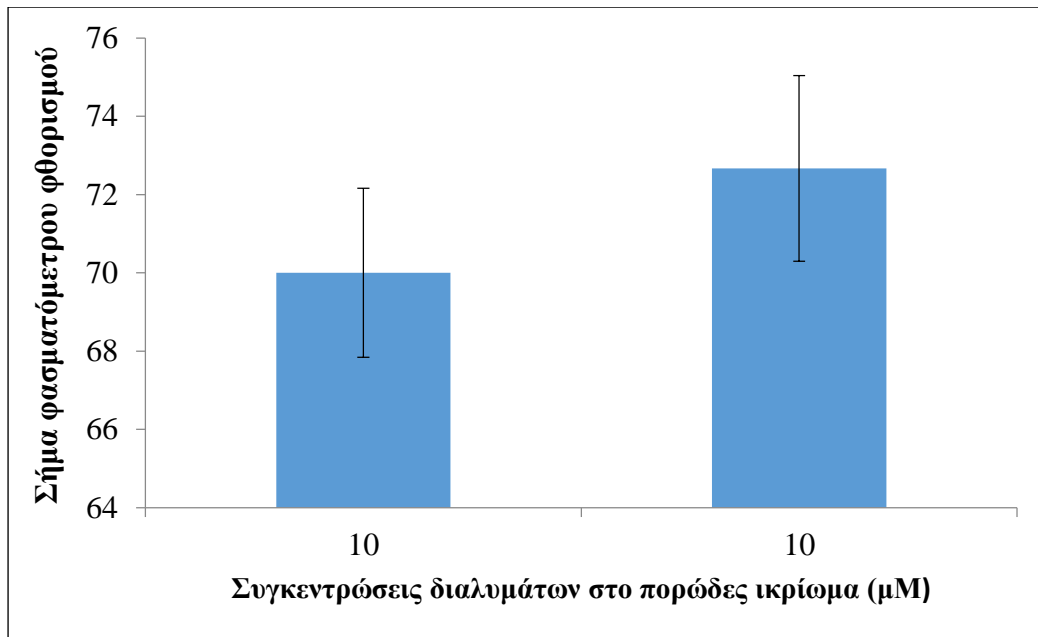
Στο πείραμα αυτό εξετάζεται η επίδραση της παρουσίας πορώδους ικρίωματος κολλαγόνου, εμποτισμένο με ένα φθορίζον διάλυμα, στο σήμα φθορισμού. Εάν δηλαδή μπορεί να μετρηθεί η φθορίζουσα ουσία που συγκρατεί το ικρίωμα (~ 8 – 9 μl).

Στην Εικόνα 38 παρουσιάζεται η μέση τιμή του σήματος του φασματόμετρου φθορισμού για τις περιπτώσεις όπου το πορώδες ικρίωμα έχει εμποτιστεί με φθορίζων διάλυμα συγκέντρωσης 10, 1 και 0,1 μM . Μετά την εκτέλεση στατιστικών Student test τα σήματα αυτά δεν είναι στατιστικά διαφορετικά μεταξύ τους ($p > 0.05$). Αυτό σημαίνει ότι το φασματόμετρο δεν μπορεί να διακρίνει και να μετρήσει φθορισμό δια μέσου του ικρίωματος.

Στο επόμενο γράφημα (Εικόνα 39) δοκιμάστηκε η μέτρηση του ίδιου scaffold, με την ίδια συγκέντρωση σε διαφορετικές θέσεις μέσα στην 9άρα πλάκα. Τα στατιστικά τεστ επαληθεύουν πως η θέση του scaffold δεν επηρεάζει το σήμα, αφού δεν είναι στατιστικά διαφορετικό για την κάθε θέση ($p > 0.05$).



Εικόνα 38: Μέτρηση φθορισμού σε πορώδη ικρίωματα κολλαγόνου εμποτισμένα με FITC



Εικόνα 39: Μέτρηση φθορισμού σε πορώδη ικρίωματα κολλαγόνου εμποτισμένα με FITC ίδιας συγκέντρωσης σε διαφορετικές θέσεις στην πλάκα της μέτρησης

4.4 Εναλλαγή Ρευστών Μέσα σε Πορώδες Ικρίωμα Κολλαγόνου Μέσω Διάχυσης

Η συγκεκριμένη εργασία εστιάζει στον τρόπο εναλλαγής διαλυμάτων μέσα σε ένα ικρίωμα λόγω της επίδρασης του σε διάφορα στάδια της κυτταρικής καλλιέργειας και σε πειράματα πρωτεωμικής.

Η ενότητα αυτή παρουσιάζει τον χρόνο που απαιτείται για την πλήρη εναλλαγή ενός ρευστού δια μέσου του ικριώματος. Η μέτρηση γίνεται μετρώντας την διάχυση ενός φθορίζοντος διαλύματος FITC (10 μM) μέσα σε ένα ικρίωμα που αρχικά έχει υγρανθεί σε μη-φθορίζων διάλυμα tris. Το πείραμα αυτό, όπως εξηγείται στην Ενότητα 3.3 γίνεται με έμμεσο τρόπο αφού το πορώδες ικρίωμα δεν μπορεί να μετρηθεί απ' ευθείας στο φασματόμετρο φθορισμού.

Τα δεδομένα που προκύπτουν από το πείραμα είναι οι χρονικές στιγμές που αφήνεται ικρίωμα μέσα στο φθορίζον διάλυμα και το σήμα που μετριέται τελικά από το φασματόμετρο φθορισμού. Από το σήμα αυτό και από τη γνωστή καμπύλη βαθμονόμησης

$$y = 7777.1 * x + 152.41$$

υπολογίζεται η συγκέντρωση του διαλύματος η οποία διαιρείται με την τιμή της συγκέντρωσης που αναμένεται στη μόνιμη κατάσταση ($C_1 \sim 0,89 \mu\text{M}$).

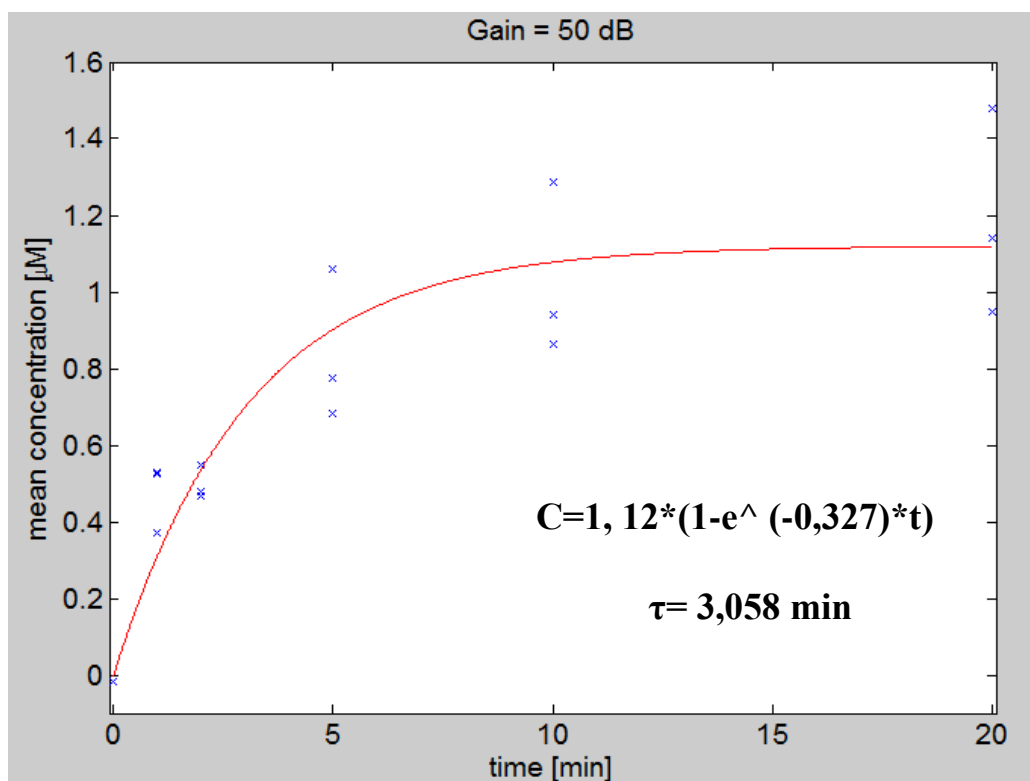
Η Εικόνα 40 παρουσιάζει την εκθετική καμπύλη του κανονικοποιημένου σήματος σε σχέση με το χρόνο που προσαρμόστηκε στο matlab. Σε κάθε χρονική στιγμή αντιστοιχούν τρία δείγματα. Με βάση την αναλυτική έκφραση της καμπύλης υπολογίζεται η χρονική σταθερά του συστήματος ($\tau = 1/ 0,327 \sim 3,058 \text{ min}$). Μετά από χρόνο περίπου

$$4 * \tau \approx 12,2 \text{ min}$$

, η απόκριση του συστήματος παραμένει σταθερή.

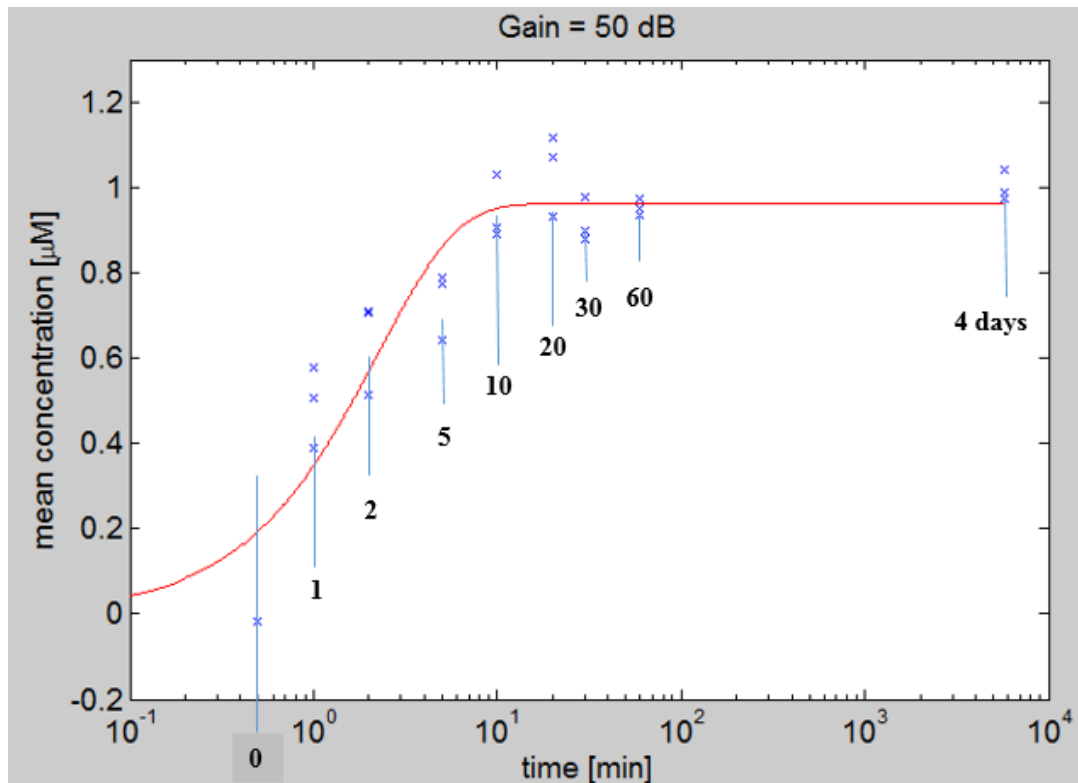
Από την Εικόνα 40 μετά από αυτό το χρόνο (12,2 min) η καμπύλη φαίνεται να φτάνει στη μέγιστη τιμή του σήματος και να σταθεροποιείται.

Από το αποτέλεσμα αυτό γίνεται κατανοητό, πόσο αργή καθίσταται η διαχείριση των ικριωμάτων κολλαγόνου στην καλλιέργεια κυττάρων και ειδικότερα σε πειράματα πρωτεωμικής. Κάθε φορά που απαιτείται εναλλαγή ρευστών η διαδικασία είναι χρονοβόρα και πολλές φορές ο χρόνος αυτός εμποδίζει την διεξαγωγή πειραμάτων πρωτεωμικής όταν η κυτταρική απόκριση αναμένεται να είναι γρηγορότερη από το χρόνο εναλλαγής ρευστού.



Εικόνα 40: Εναλλαγή ρευστών μέσα σε πορώδες ικρίωμα κολλαγόνου μέσω διάχυσης

Το πείραμα διάχυσης δοκιμάστηκε σε πορώδες ικρίωμα το οποίο μετρήθηκε μετά από 4 μέρες. Σκοπός ήταν να διαπιστωθεί εάν μετά από άπειρο χρόνο το σήμα έχει αυξηθεί. Εάν δηλαδή στο ικρίωμα παγιδεύεται ποσότητα ρευστού που δεν είναι δυνατό να εκδιωχθεί με στατικό τουλάχιστον τρόπο. Στην Εικόνα 41 παρουσιάζεται η καμπύλη διάχυσης για περισσότερες χρονικές στιγμές, με την τελευταία μέτρηση να αντιστοιχεί μετά από άπειρο χρόνο (4 ημέρες). Στον οριζόντιο άξονα παρουσιάζεται ο χρόνος σε λογαριθμική κλίμακα με τη χρονική στιγμή μηδέν να σημειώνεται στο σχήμα. Η καμπύλη αυτή τη φορά παρουσιάζει ελαφρώς γρηγορότερη απόκριση και το σήμα την 4^η μέρα παραμένει σταθερό. Επομένως η διάχυση είναι πλήρης μετά από χρόνο $4*\tau$, (τ = χρονική σταθερά), όπως υπολογίστηκε αρχικά.



Εικόνα 41: Εναλλαγή ρευστών μέσα σε πορώδες ικρίωμα κολλαγόνου μέσω διάχυσης και μέτρηση του σήματος μετά από 4 ημέρες. Λογαριθμική κλίμακα χρόνου.

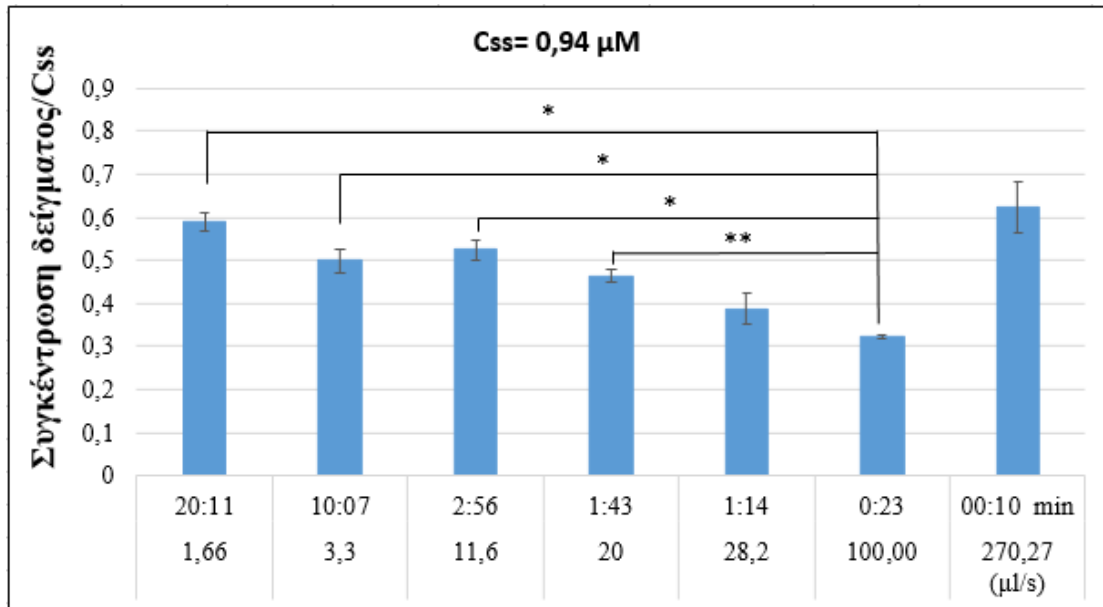
Το πείραμα εναλλαγής ρευστών δοκιμάστηκε και με δυναμικό τρόπο με το σύστημα της συσκευής σε σύνδεση με την αντλία για συνεχή και εναλλασσόμενη ροή. Τα αποτελέσματα των πειραμάτων αυτών σχολιάζονται στις ενότητες 4.5 και 4.6.

4.5 Εναλλαγή Ρευστού σε Πορώδες Ικρίωμα Κολλαγόνου Μέσω Συνεχούς Παροχής

Στο πείραμα αυτό εξετάζεται η δυνατότητα επιτάχυνσης του χρόνου εναλλαγής ρευστών δια μέσου του πορώδους ικριώματος κολλαγόνου εφαρμόζοντας μια συνεχή παροχή ρευστού. Όπως αναλύθηκε στην ενότητα 3.6.2 η συγκέντρωση στη μόνιμη κατάσταση αναμένεται $C_2 = 0,93 \mu\text{M}$.

Στο γράφημα που ακολουθεί (Εικόνα 42) στον κατακόρυφο άξονα παρατηρείται η τιμή της συγκέντρωσης για κάθε παροχή σε σχέση με την τιμή της συγκέντρωσης στη μόνιμη κατάσταση. Η τιμές της συγκέντρωσης για κάθε δείγμα προκύπτουν από το σήμα του φασματόμετρου φθορισμού και από τη γνωστή καμπύλη βαθμονόμησης. Στον οριζόντιο άξονα δίδονται οι τιμές των παροχών, από την πιο αργή στην πιο γρήγορη παροχή, και το αντίστοιχο χρονικό διάστημα που διαρκεί το πείραμα για κάθε παροχή. Η επεξεργασία των αποτελεσμάτων έγινε μέσω του λογισμικού Excel. Οι τιμές που παρουσιάζονται σε κάθε γράφημα είναι οι μέσες τιμές από πειράματα με τρία δείγματα, όπου παρουσιάζεται το τυπικό σφάλμα μεταξύ αυτών των τιμών.

Από το γράφημα διαπιστώνεται ότι η συγκέντρωση του ικριώματος δεν προσεγγίζει την τιμή στην μόνιμη κατάσταση ακόμη και στις πιο γρήγορες παροχές. Στην περίπτωση της παροχής που έχει διάρκεια 20 λεπτά η συγκέντρωση αναμένονταν να φτάσει την τιμή στη μόνιμη κατάσταση καθώς ο χρόνος αυτός υπερβαίνει το χρόνο πλήρους διάχυσης που έχει βρεθεί και από το στατικό πείραμα (~12min). Συμπεραίνεται πως με αυτόν τον τρόπο της συνεχούς ροής δεν κατορθώνεται να απορροφηθεί όλη η φθορίζουσα ουσία από το ικρίωμα. Παρ' όλα αυτά παρατηρείται πως πάνω από το 50% της τιμής της συγκέντρωσης στη μόνιμη κατάσταση επιτυγχάνεται για διαφορετικές τιμές των παροχών. Η διεξαγωγή στατιστικών Student test δείχνει ότι για τις τιμές παροχών 1,66, 3,3, 11,6, 20 $\mu\text{l/s}$, οι τιμές της συγκέντρωσης δεν είναι στατιστικά διαφορετικές. Η τιμή της παροχής που διαφέρει στατιστικά από τις παροχές που αναφέρθηκαν (3,3, 11,6, 20 $\mu\text{l/s}$) είναι τα 100 $\mu\text{l/s}$ (επίπεδο εμπιστοσύνης 0,995). Επομένως ο βέλτιστος χρόνος για τη διάχυση με συνεχή ροή δια μέσου του ικριώματος στο 50% της συγκέντρωσης στη μόνιμη κατάσταση είναι 1,14 λεπτά. Μετά την εκτέλεση αυτού του πειράματος διαπιστώθηκε πως το εύρος των παροχών, άρα και των ταχυτήτων που μπορούν να χρησιμοποιηθούν είναι περιορισμένο. Πρώτον, κάποιες ταχύτητες είναι πολύ χαμηλές με αποτέλεσμα το πείραμα διάχυσης να μην επιταχύνεται. Δεύτερον, στις πολύ γρήγορες ταχύτητες οι πιέσεις που αναπτύσσονταν στο θάλαμο οδηγούσαν το ικρίωμα να στροβιλίζεται ανεξέλεγκτα και έπειτα να φράζει τον αγωγό εξόδου της ροής. Έτσι στα επόμενα πειράματα το εύρος ταχυτήτων που χρησιμοποιείται περιορίζεται σημαντικά.



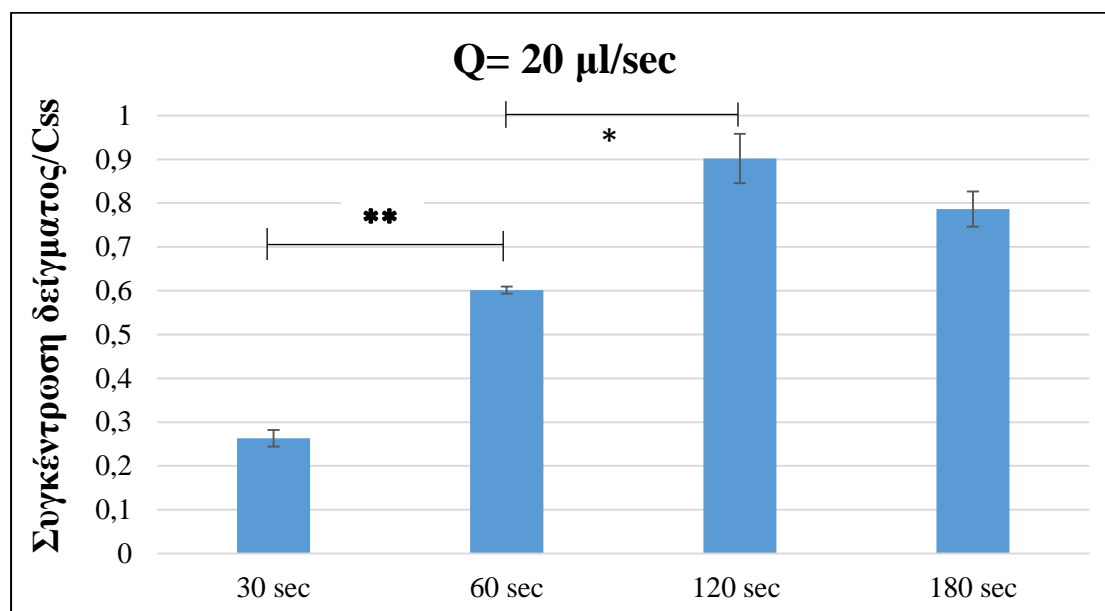
Εικόνα 42: Κανονικοποιημένη τιμή της συγκέντρωσης πορώδους κριώματος κολλαγόνου για συνεχόμενη παροχή. Τιμές στον οριζόντιο άξονα: χρονική διάρκεια πειράματος σε λεπτά για κάθε παροχή και τιμές της κάθε παροχής σε μl/sec. (*, $p < 0.05$, **, $p < 0.01$)

4.6 Εναλλαγή Ρευστού σε Πορώδες Ικρίωμα Κολλαγόνου Μέσω Εναλλασσόμενης Εξαναγκασμένης Ροής

Στο πείραμα αυτό εξετάζεται η δυνατότητα επιτάχυνσης του χρόνου εναλλαγής ρευστών δια μέσου του πορώδους ικρίωματος κολλαγόνου με εναλλασσόμενη εξαναγκασμένη ροή ρευστού. Το εύρος των διαφορετικών παροχών περιορίζεται από τις αποδεκτές τιμές του προηγούμενου πειράματος (Ενότητα 4.2). Το πείραμα της εναλλασσόμενης ροής πραγματοποιήθηκε για παροχές 11,6 και 20 $\mu\text{l/s}$ και για τρεις διαφορετικές χρονικές στιγμές. Όπως αναλύθηκε στην ενότητα 3.6.3 η συγκέντρωση στη μόνιμη κατάσταση αναμένεται $C3 \sim 0,8 \mu\text{M}$.

Στα δύο γραφήματα που ακολουθούν (Εικόνα 43, Εικόνα 44) στον κατακόρυφο άξονα παρατηρείται η τιμή της συγκέντρωσης για κάθε παροχή, την κάθε χρονική στιγμή, σε σχέση με την τιμή της συγκέντρωσης στη μόνιμη κατάσταση. Οι τιμές της συγκέντρωσης για κάθε δείγμα προκύπτουν από το σήμα του φασματόμετρου φθορισμού και από τη γνωστή καμπύλη βαθμονόμησης. Ο οριζόντιος άξονας είναι συναρτήσεως του χρόνου. Για τις δύο παροχές που δοκιμάστηκαν, $Q = 20 \mu\text{l/s}$ και $Q = 11,6 \mu\text{l/s}$, οι χρονικές διάρκειες που επιλέχθηκαν είναι τα 30, 60, 120 και 180 λεπτά.

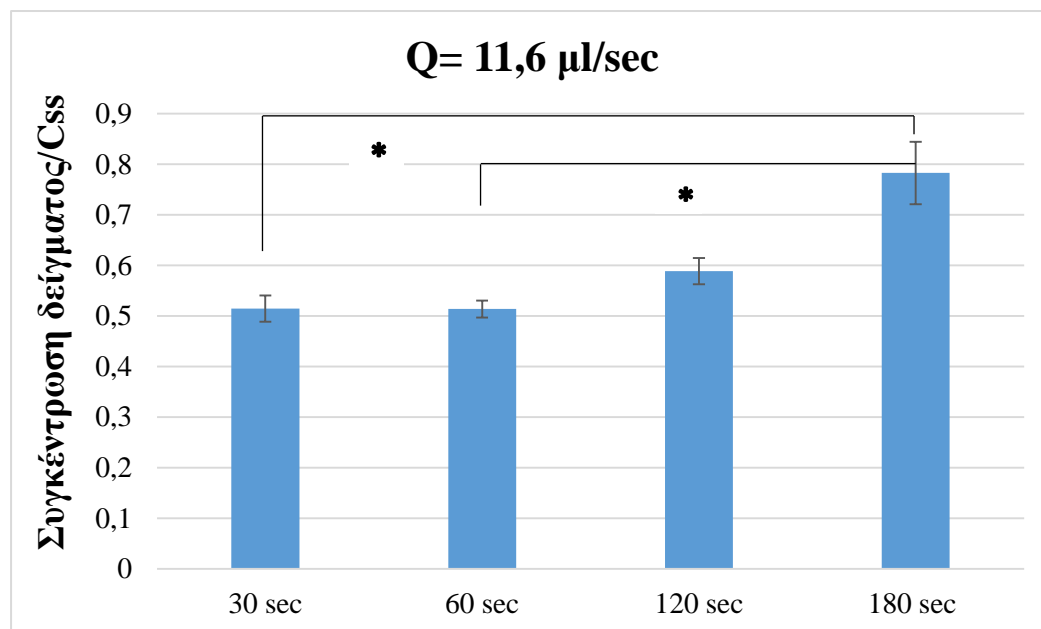
Η επεξεργασία των αποτελεσμάτων έγινε μέσω του λογισμικού Excel. Οι τιμές που παρουσιάζονται σε κάθε γράφημα είναι οι μέσες τιμές από πειράματα με τρία δείγματα, όπου παρουσιάζεται το τυπικό σφάλμα μεταξύ αυτών των τιμών.



Εικόνα 43: Κανονικοποιημένη τιμή της συγκέντρωσης πορώδους ικρίωματος κολλαγόνου για εναλλασσόμενη εξαναγκασμένη παροχή $Q = 20 \mu\text{l/s}$ (**, $p < 0.01$, *, $p < 0.05$).

Η εκπόνηση στατιστικών τεστ μεταξύ των χρονικών στιγμών 30 και 60 δευτερόλεπτα φανερώνει πως το σήμα για αυτές τις περιπτώσεις είναι στατιστικά σημαντικά διαφορετικό, όπως και για τις χρονικές στιγμές 60 και 120 δευτερόλεπτα. Αντίθετα οι

συγκεντρώσεις για τις χρονικές στιγμές 2 και 3 λεπτά δεν είναι στατιστικά διαφορετικές. Επομένως με τον τρόπο της εναλλασσόμενης ροής και με τη συγκεκριμένη παροχή η εναλλαγή ρευστών μέσω του ικρίωματος δεν επιταχύνεται εφόσον ο απαιτούμενος χρόνος είναι 2 λεπτά.



Εικόνα 44: Κανονικοποιημένη τιμή της συγκέντρωσης πορώδους ικρίωματος κολλαγόνου για εναλλασσόμενη εξαναγκασμένη παροχή $Q=11,6 \mu\text{l/s}$.

Η εκπόνηση στατιστικών τεστ μεταξύ των χρονικών στιγμών 30 – 60, 60 – 120, 120 – 180 δευτερόλεπτα για $Q=11,6 \mu\text{l/s}$ φανερώνει πως το σήμα για αυτές τις περιπτώσεις δεν είναι στατιστικά διαφορετικό ($p > 0.05$). Παρ' όλα αυτά η συγκέντρωση μεταξύ των χρονικών στιγμών 30 – 180 ή 60 – 180 δευτερόλεπτα είναι στατιστικά διαφορετική. Επομένως η εναλλαγή ρευστών μέσω του ικρίωματος με εξαναγκασμένη ροή δεν επιταχύνεται σε σχέση με το πείραμα της συνεχούς ροής αφού ο συνολικός χρόνος για την διάχυση παραμένει 3 λεπτά.

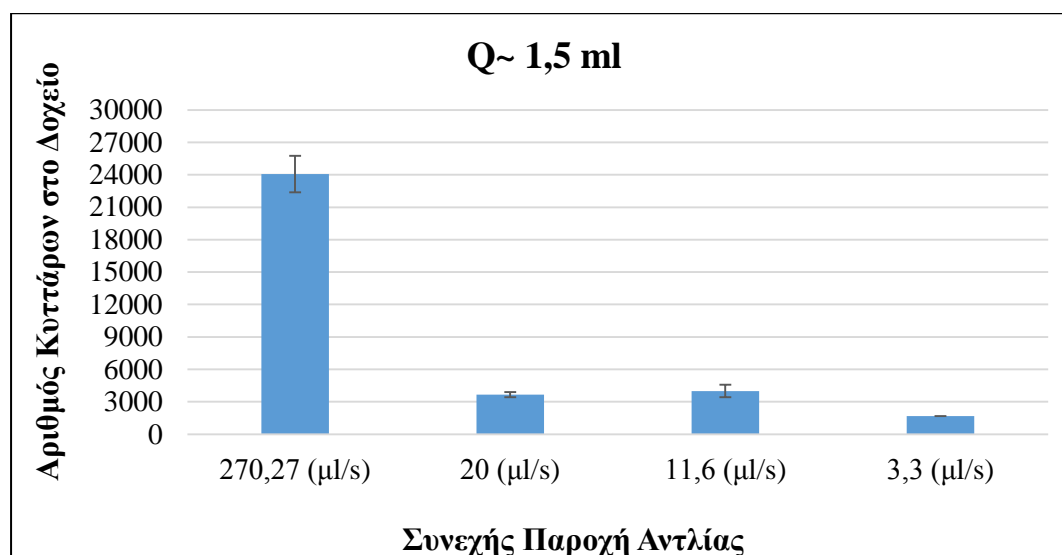
Αυτό το οποίο επιτυγχάνεται με το πείραμα της εξαναγκασμένης εναλλασσόμενης ροής σε σχέση με το πείραμα της συνεχούς ροής δια μέσου του ικρίωματος είναι η ποσότητα ρευστού που κατορθώνεται να εκδιωχθεί από το πορώδες ικρίωμα. Παρατηρώντας την Εικόνα 42 για τις παροχές $Q=20 \mu\text{l/s}$ και $Q=11,6 \mu\text{l/s}$ η συγκέντρωση του δείγματος φτάνει περίπου στο 50% της τιμής της στην μόνιμη κατάσταση. Με το πείραμα της εναλλασσόμενης ροής οι τιμές της συγκέντρωσης φτάνουν στο 90 και 80 % της τιμής της συγκέντρωσης στη μόνιμη κατάσταση. Με τον τρόπο αυτό δηλαδή, στον ίδιο χρόνο (2 και 3 λεπτά αντίστοιχα) ο όγκος του ρευστού που παγιδεύεται από το πορώδες ικρίωμα μειώνεται. Τα στατιστικά Student t test, επαληθεύουν πως στα 120 λεπτά για $Q=20 \mu\text{l/s}$ και στα 180 λεπτά για $Q=11,6 \mu\text{l/s}$ οι τιμές της συγκέντρωσης δεν διαφέρουν στατιστικά από το 1, την κανονικοποιημένη δηλαδή τιμή της συγκέντρωσης. Άρα μπορούμε να πούμε πως η εναλλαγή ρευστού είναι πλήρης.

4.7 Κυτταρική Πρόσφυση σε Ικρίωματα Κολλαγόνου Παρουσία Ροής Ρευστού

Στο πείραμα αυτό εξετάζεται η πιθανότητα αποκόλλησης των κυττάρων μέσα από το πορώδες ικρίωμα κολλαγόνου μέσω εναλλασσόμενης και συνεχούς ροής από το σύστημα της αντλίας.

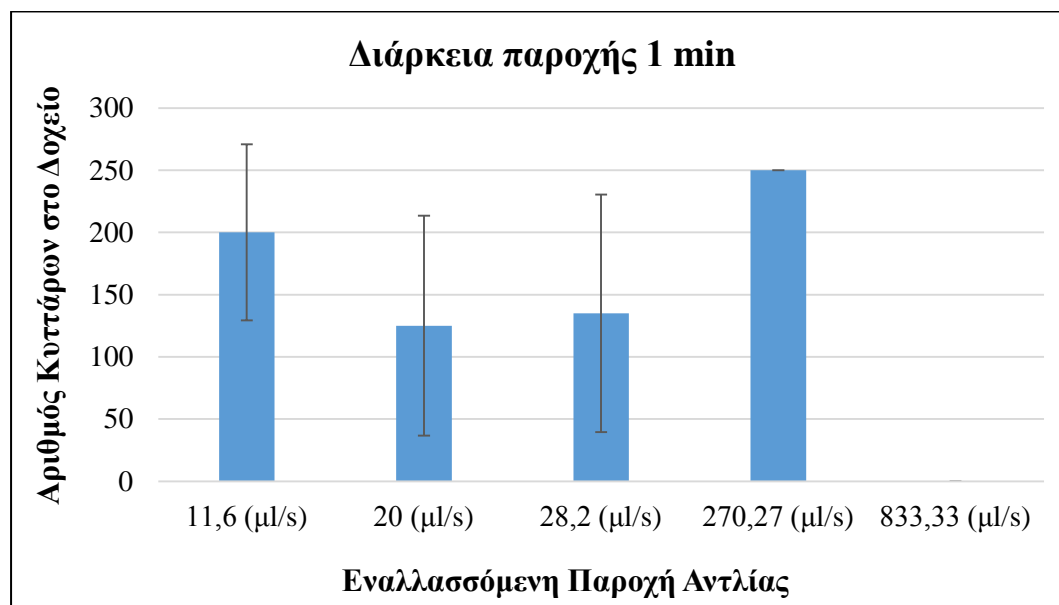
Στο διάγραμμα που ακολουθεί δίνονται τα αποτελέσματα του πειράματος της συνεχούς ροής δια μέσου του ικρίωματος. Στον κατακόρυφο άξονα διακρίνεται ο αριθμός των κυττάρων που μετρήθηκε από τη ροή στο αναλώσιμο δοχείο και στον οριζόντιο άξονα οι παροχές της αντλίας. Να σημειωθεί ότι ο αριθμός των κυττάρων που υπήρχαν αρχικά στο ικρίωμα (μετά την πρώτη ημέρα καλλιέργειας) ήταν κατά μέσο όρο ~14000 – 15000 κύτταρα.

Όπως παρατηρείται από το διάγραμμα στην πιο γρήγορη παροχή φαίνεται να έχει αποκολληθεί όλη η ποσότητα των κυττάρων ενώ στις υπόλοιπες παροχές αποκολλώνται περίπου 2000 – 3000 κύτταρα. Τα δεδομένα αυτά δεν έχουν μεγάλη ακρίβεια, γεγονός που οφείλεται στη μέθοδο της μέτρησης των κυττάρων. Ο συνολικός όγκος από τη συνεχή παροχή που καταλήγει στο αναλώσιμο δοχείο είναι περίπου 1,5 ml και από αυτά μόνο 10 μ l δείγματος που μετρούνται στο αιμοκυτταρόμετρο. Το δείγμα είναι αραιωμένο και ο αριθμός των κυττάρων στο αιμοκυτταρόμετρο, αν και πολύ μικρός, αναγάγει τον συνολικό αριθμό κυττάρων στο δείγμα πολύ υψηλό. Μπορεί κανείς να θεωρήσει, εξαιρώντας την πιο γρήγορη παροχή ($Q = 270.27 \mu\text{l}/\text{s}$), πως στις υπόλοιπες παροχές τις αντλίας τα κύτταρα δεν αποκολλώνται.



Εικόνα 45: Πείραμα συνεχούς ροής 1.5 ml θεραπευτικού δια μέσου πορώδους ικρίωματος κολλαγόνου στο οποίο είχαν εισαχθεί 30000 ινοβλάστες. Ο κατακόρυφος άξονας δείχνει τον αριθμό των κυττάρων που ξεκόλλησαν από το ικρίωμα και βρέθηκαν μέσα στο δοχείο ως συνάρτηση της παροχής του ρευστού που ασκείται στο σύστημα.

Το πείραμα διεξήχθη και για την περίπτωση της εναλλασσόμενης ροής δια μέσου του πορώδους ικρίωματος. Ο όγκος ρευστού που καταλήγει στο αναλώσιμο δοχείο είναι περίπου 45 – 50 μl. Και σε αυτή την περίπτωση ο αριθμός των κυττάρων που προκύπτουν από τη μέτρηση με το αιμοκυτταρόμετρο είναι πολύ μικρός (150 – 200 κύτταρα), με αποτέλεσμα να θεωρείται πως καμιά παροχή δεν διαταράσσει τα κύτταρα στην περίπτωση της εναλλασσόμενης ροής (Εικόνα 46).



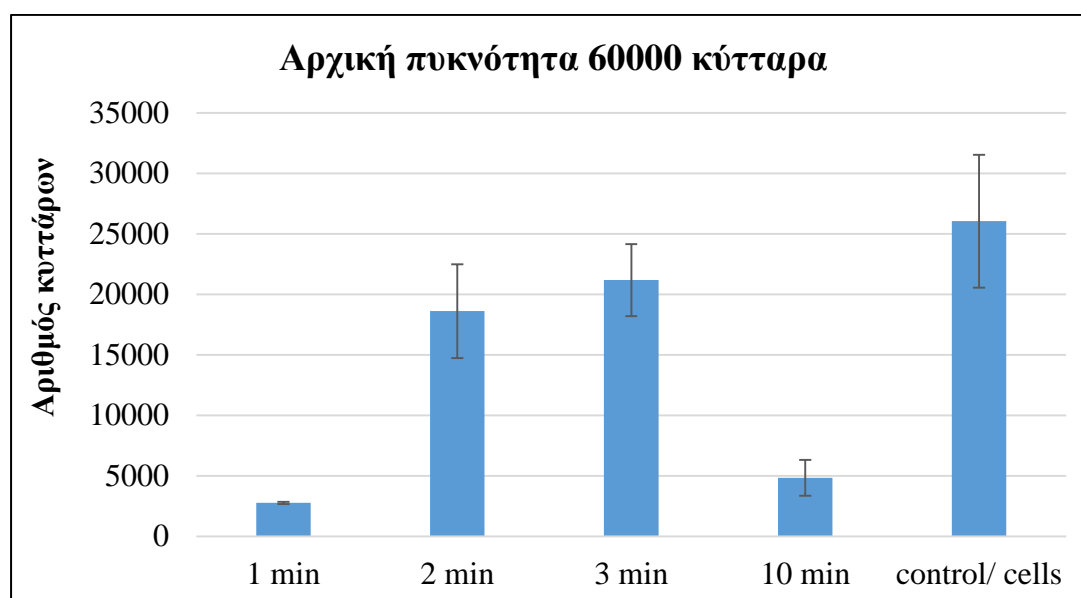
Εικόνα 46: Πείραμα εναλλασσόμενης ροής θρεπτικού δια μέσου πορώδους ικρίωματος κολλαγόνου στο οποίο είχαν εισαχθεί 30000 ινοβλάστες. Ο κατακόρυφος άξονας δείχνει τον αριθμό των κυττάρων που ξεκόλλησαν από το ικρίωμα και βρέθηκαν μέσα στο δοχείο ως συνάρτηση της παροχής του ρευστού που ασκείται στο σύστημα.

4.8 Εισαγωγή Κυττάρων στο Πορώδες Ικρίωμα Κολλαγόνου με τη Βοήθεια της Συσκευής

Στο πείραμα αυτό εξετάζεται η εισαγωγή κυττάρων στο πορώδες ικρίωμα κολλαγόνου μέσω της συσκευής και με εναλλασσόμενη ροή από την αντλία. Στο δοχείο εισαγωγής ρευστών τοποθετούνται ~ 20 μl κυτταρικού διαλύματος τα οποία καταλήγουν μέσα στο θάλαμο με το πορώδες ικρίωμα και εφαρμόζεται εναλλασσόμενη ροή ($Q= 20 \mu\text{l/s}$) για την εξαναγκασμένη εισαγωγή των κυττάρων μέσα στο υλικό.

Η Εικόνα 47 παρουσιάζει τα αποτελέσματα από τη μέτρηση του αριθμού των κυττάρων μέσα στο πορώδες ικρίωμα 24 ώρες μετά την εισαγωγή τους. Στον οριζόντιο άξονα παρουσιάζονται οι διαφορετικές χρονικές διάρκειες της εναλλασσόμενης ροής και στον κατακόρυφο άξονα παρουσιάζεται ο συνολικός αριθμός κυττάρων που υπολογίστηκαν μέσω της BCA μεθόδου (ενότητα 3.7.2 & ενότητα 3.1.2). Το τελευταίο δείγμα που παρατηρείται στο γράφημα αντιπροσωπεύει τρία δείγματα στα οποία τα κύτταρα εισήχθησαν στο πορώδες ικρίωμα χωρίς τη χρήση της συσκευής από τον πειραματιστή.

Όπως παρατηρείται και από την Εικόνα 47 για τις χρονικές στιγμές της εναλλασσόμενης ροής 1 και 10 λεπτά δεν εισέρχεται μεγάλος αριθμός κυττάρων. Αντιθέτως στα 2 ή 3 λεπτά εναλλασσόμενης ροής ο αριθμός των κυττάρων που εισέρχονται στο ικρίωμα είναι στατιστικά ίδιος με τον αριθμό των κυττάρων που εισέρχονται και χωρίς τη συσκευή από τον πειραματιστή.



Εικόνα 47: Εισαγωγή κυττάρων σε πορώδη ικρίωματα κολλαγόνου με εξαναγκασμένη εναλλασσόμενη ροή από την αντλία σύριγγας.

5. Συμπεράσματα – Συζήτηση

Σκοπός αυτής της εργασίας είναι η αυτοματοποίηση της τρισδιάστατης καλλιέργειας κυττάρων μέσα σε πορώδες ικρίωμα κολλαγόνου μέσω της ανάπτυξης ενός συστήματος που ενσωματώνει το πορώδες ικρίωμα και επιτρέπει αυτόματη διακίνηση ρευστών.

Στο κεφάλαιο αυτό αναλύονται τα βασικά συμπεράσματα που προκύπτουν από τα πειραματικά αποτελέσματα και συζητείται πώς τα δεδομένα αυτά μπορούν να χρησιμοποιηθούν για τη διεξαγωγή πειραμάτων πρωτεωμικής μεγάλου όγκου (high-throughput) σε κύτταρα που αλληλοεπιδρούν με μια τρισδιάστατη «μήτρα». Παρατίθενται ακόμη, τα οφέλη και οι δυνατότητες που προκύπτουν από τη χρήση του συστήματος συσκευής – αντλίας. Τέλος, αναλύονται τα προβλήματα που προέκυψαν κατά τη χρήση της συσκευής και προτείνονται τρόποι αντιμετώπισης τους.

5.1 Σχεδιασμός, Κατασκευή, και Χαρακτηρισμός του Συστήματος Συσκευής – Αντλία

Η συσκευή που αναπτύχθηκε σε αυτή τη διπλωματική εργασία σκοπεύει στη αυτοματοποίηση και βελτίωση της καλλιέργειας κυττάρων μέσα σε πορώδες ικρίωμα κολλαγόνου. Βασικός στόχος αποτέλεσε η συσκευή να είναι απλά και εύχρηστη προκειμένου να διερευνηθεί σε πρώτο στάδιο η αξία ύπαρξης ενός τέτοιου συστήματος για πειράματα πρωτεωμικής.

Αρχικά, τα πειράματα βιοσυμβατότητας (εδάφια 3.2 και 4.1) δείχνουν ότι ο πολλαπλασιασμός των κυττάρων δεν επηρεάζεται από την παρουσία του υλικού που επιλέχθηκε για την κατασκευή της συσκευής (PMMA) μετά από 5 μέρες καλλιέργειας.

Η συσκευή παρέχει έναν οριοθετημένο χώρο στο ικρίωμα, γεγονός που βοηθά τη ροή του ρευστού να περνά κατά το δυνατών δια μέσου του ικρίωματος και να μην το παρακάμπτει και μειώνει τον απαιτούμενο όγκο ρευστού για να γεμίσει ο θάλαμος στον οποίο βρίσκεται το ικρίωμα. Ο θάλαμος εισαγωγής του ικρίωματος εξασφαλίζει πλήρη στεγανότητα και εύκολη πρόσβαση στον πειραματιστή. Επίσης στο κομμάτι της αντλίας που συνδέεται με την συσκευή, με το σχεδιασμό κατάλληλων προσαρμογών και την επιλογή σωληνώσεων, έχουν εξασφαλιστεί απώλειες μεγέθους των 3 μl.

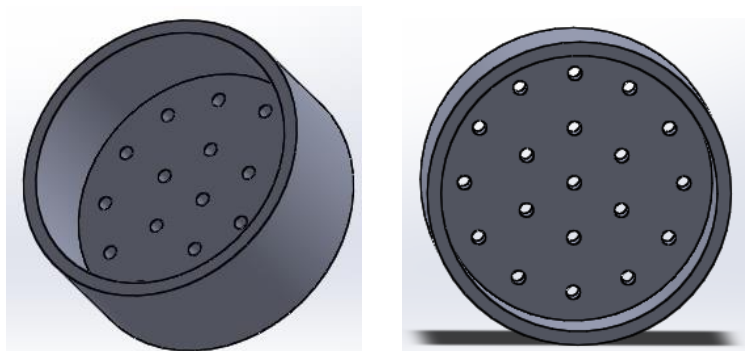
Η κατασκευή της μικροσυσκευής δεν απαιτεί πολύ χρόνο και υψηλή τεχνογνωσία. Η συσκευή μπορεί να αναπαραχθεί εύκολα και να λειτουργήσει με το ίδιο σύστημα αντλίας για τη διεξαγωγή πολλαπλών πειραμάτων πρωτεωμικής. Ωστόσο, επειδή το σύστημα δεν είναι ακόμα πλήρως αυτοματοποιημένο και απαιτεί αρκετές φορές παρέμβαση από τον πειραματιστή δεν μπορεί να χρησιμοποιηθεί άμεσα για πειράματα μεγάλης κλίμακας. Σε αυτή την περίπτωση το σύστημα θα έπρεπε να αποτελείται από ένα κομμάτι που θα περιλαμβάνει πολλούς θαλάμους, για την

τοποθέτηση πολλών ικριωμάτων κολλαγόνου, ένα καπάκι που θα στεγανοποιούσε τους θαλάμους και θα εξασφάλιζε εύκολη πρόσβαση στον πειραματιστή κ.τ.λ.

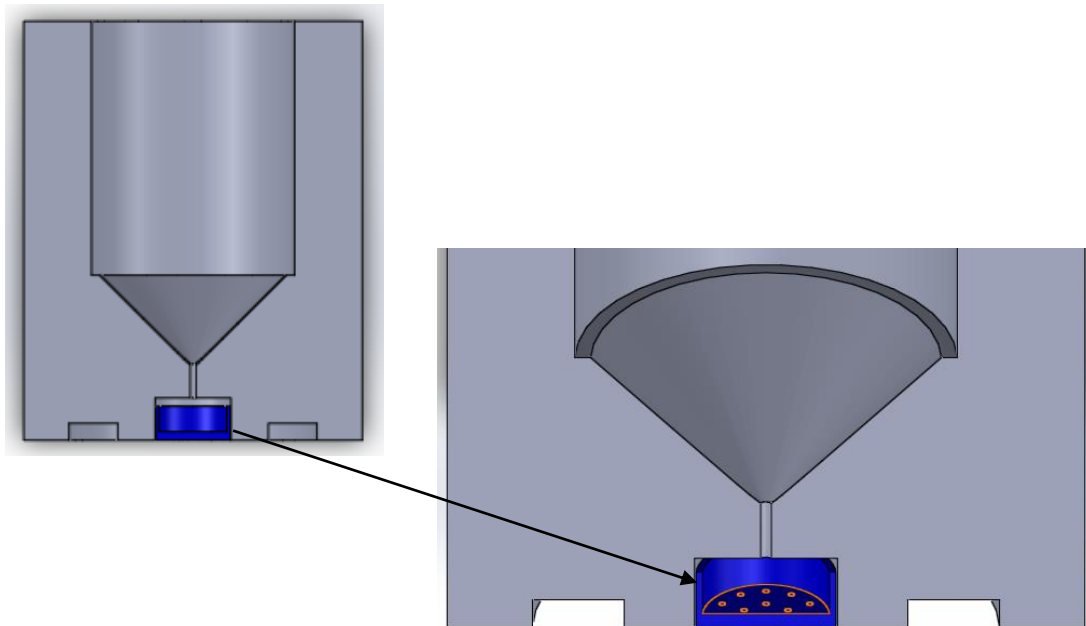
Τα βασικά προβλήματα που προέκυψαν κατά τη χρήση της συσκευής είναι:

- Σε μεγάλες παροχές της αντλίας, το υλικό εγκλωβίζεται στην οπή διαμέτρου 1mm που καταλήγει στο δοχείο συλλογής διαλυμάτων λόγω συρρίκνωσης του ικριώματος. Αυτό γίνεται αντιληπτό είτε γιατί το υλικό εμποδίζει πλήρως τη ροή και το υγρό δεν φτάνει στο δοχείο, είτε γιατί η ροή επιβραδύνεται αισθητά. Για αυτό το λόγο, προτείνεται να αποφεύγονται οι παροχές μεγαλύτερες από 28,2 ml/s.

Εάν μπορούσε να παρεμβληθεί κάποιο φίλτρο μεταξύ της οπής και του ικριώματος έτσι ώστε το υλικό να συγκρατείται σε όλες τις ταχύτητες, θα μπορούσαν δυνητικά να χρησιμοποιηθούν πιο μεγάλες παροχές ρευστών. Η Εικόνα 48 παρουσιάζει μια ιδέα για την κατασκευή ενός τέτοιου φίλτρου. Οι διαστάσεις του φίλτρου έχουν επιλεγεί ώστε αυτό να χωράει στο θάλαμο τοποθέτησης του πορώδους ικριώματος κολλαγόνου. Ένα τέτοιο φίλτρο θα μπορούσε να κατασκευαστεί μέσω 3διάστατης εκτύπωσης. Η Εικόνα 49, παρουσιάζει την συναρμογή του φίλτρου στο θάλαμο της συσκευής.



Εικόνα 48: Τρισδιάστατο σχέδιο φίλτρου για το θάλαμο τοποθέτησης του πορώδους ικριώματος κολλαγόνου



Εικόνα 49: Συναρμογή φίλτρου (μπλε χρώμα) στο κομμάτι του θαλάμου της συσκευής

Η ενσωμάτωση ενός τέτοιου φίλτρου στο σύστημα δίνει τη δυνατότητα χρήσης μεγαλύτερων παροχών οι οποίες ενδεχομένως βελτιώσουν την εναλλαγή ρευστών δια μέσου του ικρίωματος. Βέβαια σε πολύ μεγάλες ταχύτητες έχει παρατηρηθεί πως δημιουργούνται φυσαλίδες και εγκλωβίζεται αέρας στο θάλαμο που τοποθετείται το υλικό με αποτέλεσμα να ανακόπτεται η ροή. Ένα άλλο σημαντικό πλεονέκτημα από την τοποθέτηση του φίλτρου είναι ότι ο θάλαμος που εμπεριέχει έχοντας μικρότερη διάμετρο από το θάλαμο τοποθέτησης του ικρίωματος είναι ο χώρος στον οποίο το ικρίωμα θα μπει μόλις υγροποιηθεί. Έτσι το διάκενο μεταξύ του θαλάμου και του ικρίωματος μικραίνει και η περίπτωση η ροή να παρακάμπτει το ικρίωμα ελαχιστοποιείται.

- Ένα πρόβλημα που μπορεί να ανακύψει με τους προσαρμογείς που στεγανοποιούν την βαλβίδα της αντλίας είναι ότι το υλικό από το οποίο έχουν τυπωθεί είναι αρκετά ελαστικό με αποτέλεσμα να φθείρονται εύκολα. Για να μειωθεί η φθορά τους και να αυξηθεί η διάρκεια ζωής τους, προτείνεται να είναι μόνιμα τοποθετημένοι στην αντλία. Η φθορά τους είναι εύκολα ορατή. Στην περίπτωση φθοράς, το σύστημα έχει απώλειες και παρατηρείται είτε η εισροή φυσαλίδων στο υγρό (ειδικά όταν οι αντλία λειτουργεί στις πιο γρήγορες ταχύτητες), είτε η διαρροή νερού από το ίδιο το σπείρωμα.
- Στα πειράματα εναλλασσόμενης ροής με την αντλία παρατηρήθηκε σε συγκεκριμένη κλίμακα παροχής (Κλίμακα: 30, Παροχή: 11,6 ml/sec) να μην λειτουργεί σωστά. Συγκεκριμένα αντλούσε περισσότερο όγκο από ότι ζητούνταν από το πρόγραμμα ενώ ωθούσε σταθερό όγκο με αποτέλεσμα η εναλλασσόμενη ροή να μην πραγματοποιούνταν με σταθερό ρυθμό.

5.2 Καλλιέργεια και Μελέτη Κυττάρων σε Πορώδη Ικρίωματα Κολλαγόνου Χρησιμοποιώντας το Σύστημα Συσκευή-Αντλία

Εναλλαγή Ρευστού Μέσα σε Πορώδες Ικρίωμα Κολλαγόνου Μέσω Διάχυσης

Κατά τα διάφορα στάδια της κυτταρικής καλλιέργειας μέσα σε πορώδη ικρίωματα κολλαγόνου το βασικότερο πρόβλημα εντοπίζεται στη αργή εναλλαγή ρευστών δια μέσου του ικρίωματος. Σε όλα τα στάδια που απαιτούν αλλαγή του ρευστού μέσα στο ικρίωμα, απαιτούνται περίπου 15 – 20 λεπτά για την αλλαγή υγρού. Αυτό μπορεί να αποτελέσει έναν ανασταλτικό παράγοντα σε πειράματα πρωτεωμικής καθώς περιορίζει το εύρος των κυτταρικών αποκρίσεων που μπορούν να ανιχνευθούν.

Ο πιο απλός τρόπος εναλλαγής ρευστού σε ένα ικρίωμα είναι μέσω διάχυσης. Τα αντίστοιχα πειράματα (εδάφιο 4.4) παρέχουν μια εκτίμηση για τον απαιτούμενο χρόνο εναλλαγής ρευστού κατά 99% σε ένα πορώδους ικρίωματος ο οποίος για ένα ικρίωμα διαμέτρου 4 mm είναι περίπου 12,2 λεπτά.

Όπως έχει αναφερθεί και προηγουμένως ο χρόνος αυτός μπορεί να αποτελέσει ανασταλτικό παράγοντα σε πειράματα πρωτεωμικής.

Εναλλαγή Ρευστού Μέσα σε Πορώδες Ικρίωμα Κολλαγόνου Μέσω Συνεχούς ή Εναλλασσόμενης Ροής

Λόγω του σημαντικού χρόνου που απαιτείται για την αλλαγή ρευστού μέσω διάχυσης, επιχειρήθηκε να χρησιμοποιηθεί το σύστημα συσκευής-αντλίας που περιεγράφηκε στο κεφάλαιο 2 με σκοπό να διερευνηθεί αν η εξαναγκασμένη ροή ρευστού σε ένα θάλαμο που περιέχει το ικρίωμα μπορεί να επιταχύνει σημαντικά την εναλλαγή ρευστών. Τα πειράματα εναλλαγής ρευστών με τη βοήθεια του συστήματος της συσκευής και της αντλίας (εδάφια 3.6, 4.5, 4.6) στοχεύουν στη μείωση του χρόνου που απαιτείται για την εναλλαγή ρευστών δια μέσου του ικρίωματος.

Το πείραμα της συνεχούς παροχής δια μέσω του ικρίωματος βελτιώνει το χρόνο εναλλαγής ρευστού περίπου 10 φορές (1,14 λεπτά) σε σχέση με το πείραμα διάχυσης χωρίς τη συσκευή. Ο χρόνος όμως αυτός όπως παρατηρήθηκε δεν είναι αρκετός για την πλήρη εναλλαγή ρευστού δια μέσου του ικρίωματος καθώς μόνο το 50% του ρευστού αλλάζει. Το πείραμα αυτό βρίσκει εφαρμογή στις περιπτώσεις εκείνες όπου η ποσότητα του ρευστού δεν έχει ιδιαίτερο κόστος στα πειράματα πρωτεωμικής (π.χ. αλλαγή θρεπτικού στα κύτταρα, πλύση με κάποιο ρυθμιστικό (buffer)).

Στο πείραμα της εναλλασσόμενης ροής αντιθέτως, χρησιμοποιείται ο ελάχιστος δυνατός όγκος για την εκτέλεση του πειράματος. Λόγω του μικρού χώρου της συσκευής στον οποίο τοποθετείται το πορώδες ικρίωμα ο συνολικός όγκος για να γεμίσει με υγρό ο θάλαμος είναι περίπου 45 μl. Χρησιμοποιώντας μικρότερο όγκο σε

διάφορα στάδια πειραμάτων πρωτεωμικής (π.χ.stimulation) το κόστος διεξαγωγής πειραμάτων με τη συσκευή μειώνεται σημαντικά.

Εκτός από τη μείωση του κόστους των πειραμάτων, το πείραμα της εναλλασσόμενης ροής στοχεύει στη μείωση του χρόνου εναλλαγής ρευστών και στο να εξαναγκάσει το ρευστό να διαπεράσει το πορώδες ικρίωμα. Τα αποτελέσματα αυτών των πειραμάτων φανερώνουν ότι ανάλογα με την παροχή η εναλλαγή ρευστού κατά 90%, σε ένα ικρίωμα διαμέτρου 4 mm, επιτυγχάνεται μέχρι και στα 120 δευτερόλεπτα. Σε σχέση με το πείραμα της συνεχούς ροής σε λιγότερο χρόνο η διάχυση δια μέσου του ικρίωματος είναι υψηλότερη (η συγκέντρωση του διαλύματος είναι υψηλότερη). Σε περισσότερο χρονικό διάστημα (2 ή 3 λεπτά ανάλογα με την παροχή) η εναλλασσόμενη ροή επιτυγχάνει σχεδόν πλήρως την αλλαγή ρευστού.

Ενδεχομένως το αρχικό πρωτόκολλο συνεχούς ροής να πρέπει να αλλάξει έτσι ώστε η ίδια ή λιγότερη ποσότητα ρευστού (2 ml) να μπορεί να προκαλέσει αποτελεσματική αλλαγή υγρού μέσα στο ικρίωμα.

Το δυναμικό πείραμα εναλλαγής ρευστών με εναλλασσόμενη ροή επιτυγχάνει βελτίωση του χρόνου διάχυσης ρευστού σε σχέση με το στατικό πείραμα αλλά και βελτίωση του ποσοστού του όγκου του ρευστού που απομακρύνεται από το ικρίωμα. Επομένως το πείραμα εναλλασσόμενης ροής μπορεί να χρησιμοποιηθεί σε κάθε περίπτωση είτε ο όγκος που χρησιμοποιείται είναι σημαντικός είτε όχι (wash ή stimulation).

5.3 Εισαγωγή Κυττάρων στο Πορώδες Ικρίωμα με Εναλλασσόμενη ροή

Κατά την εισαγωγή των κυττάρων μέσα στο ικρίωμα από τη στιγμή που το διάλυμα των κυττάρων εισέρχεται στο υλικό μέχρι τη στιγμή που θα προστεθεί το θρεπτικό μεσολαβεί διάστημα ~ 1 ώρας έτσι ώστε τα κύτταρα να προλάβουν να προσδεθούν στο υλικό ^[14]. Εκτός όμως από το χρόνο, δυσκολία έγκειται και στο συνολικό αριθμό των κυττάρων που εισάγονται στο πορώδες υλικό. Πολλές φορές από το συνολικό αριθμό κυττάρων που προστίθενται μόλις το 50 – 60% καταφέρνει να εισέλθει μέσα στο υλικό. Τα υπόλοιπα που δεν καταφέρνουν να εισέλθουν στο πορώδες ικρίωμα μένουν στην επιφάνεια του υλικού και πεθαίνουν. Στην παρούσα εργασία εξετάστηκε κατά πόσον ο αριθμός των κυττάρων που εισέρχονται στο ικρίωμα μπορεί να αυξηθεί μέσω εξαναγκασμένης ροής από το σύστημα της αντλίας.

Το αρχικό πείραμα που δοκιμάστηκε για συγκεκριμένη παροχή της αντλίας εισάγει τον ίδιο αριθμό κυττάρων, σε σχέση με το πείραμα χωρίς τη συσκευή από τον πειραματιστή, σε χρονικό διάστημα 2 – 3 λεπτά. Το συγκεκριμένο πείραμα συνιστά περαιτέρω διερεύνηση για βελτίωση του ποσοστού εισαγωγής των κυττάρων σε πιο γρήγορες παροχές.

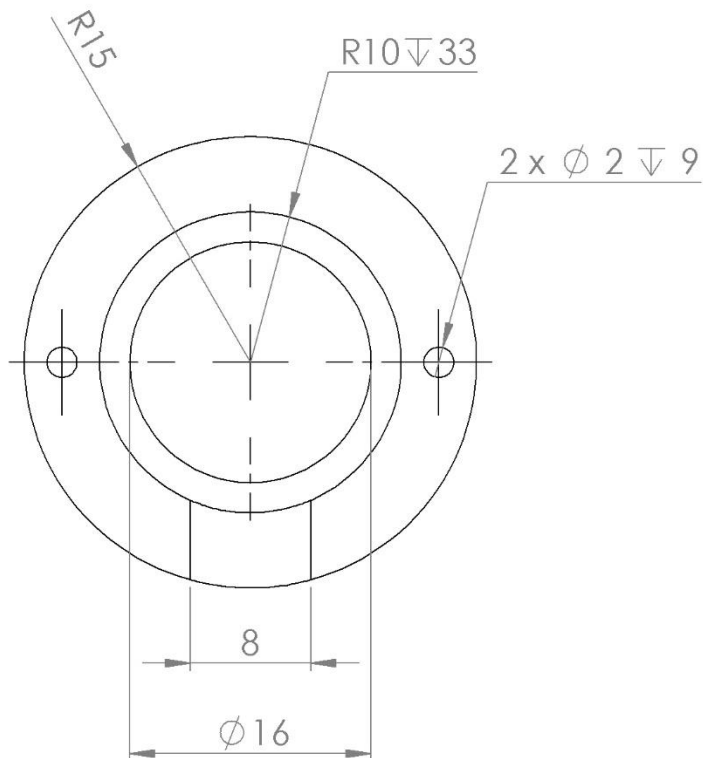
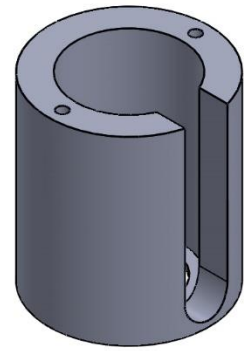
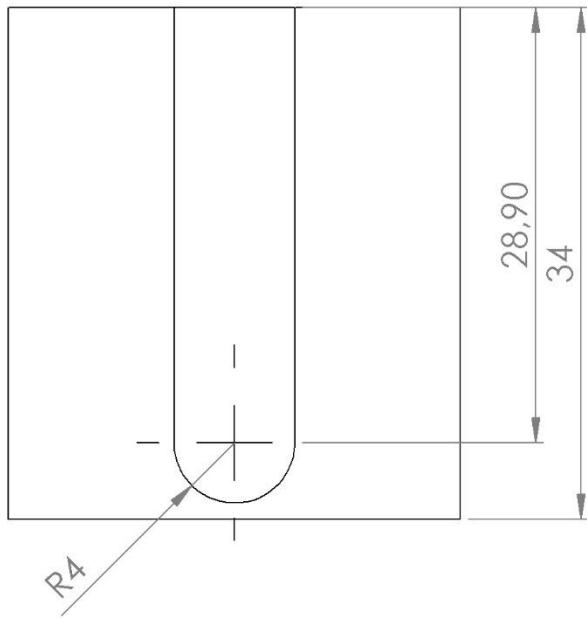
Συνολικά, το σύστημα που αναπτύχθηκε παρέχει ακριβή και επαναλήψιμα αποτελέσματα για την μελέτη κυττάρων μέσα σε πορώδη ικρίωματα κολλαγόνου. Η χρήση της συσκευής ενδείκνυται και για τη μελέτη περισσότερο πολύπλοκων βιολογικών διεργασιών καθώς στην παρούσα εργασία μελετήθηκαν τρόποι βελτιστοποίησης διαφόρων παραγόντων που εμπλέκονται στα διάφορα βιολογικά πειράματα. Τέλος το σύστημα συσκευής που αναπτύχθηκε επιτρέπει τη χρήση του σε μεγαλύτερη κλίμακα για τη διεξαγωγή πειραμάτων πρωτεωμικής και την ανάπτυξη μεθόδων εύρεσης φαρμάκων.

ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ Α

ΚΑΤΑΣΚΕΥΑΣΤΙΚΑ ΣΧΕΔΙΑ

Στο παράρτημα Α δίδονται τα κατασκευαστικά σχέδια των επιμέρους κομματιών της κατασκευής που δημιουργήθηκε για την καλλιέργεια κυττάρων μέσα σε πορώδες ικρίωμα.

Στο τέλος του παραρτήματος παρατίθεται και σχεδιαστική απεικόνιση ολόκληρης της συναρμογής για εποπτικούς λόγους.



ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ
ΕΜΒΙΟΜΗΧΑΝΙΚΗΣ
& ΣΥΣΤΗΜΙΚΗΣ ΒΙΟΛΟΓΙΑΣ

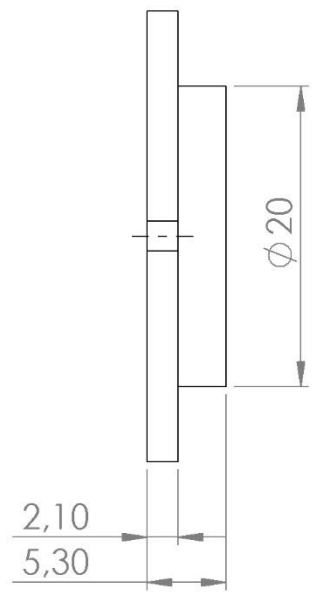
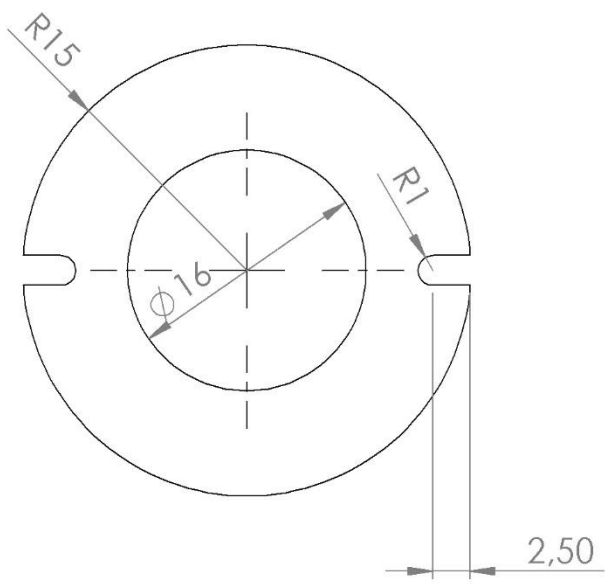
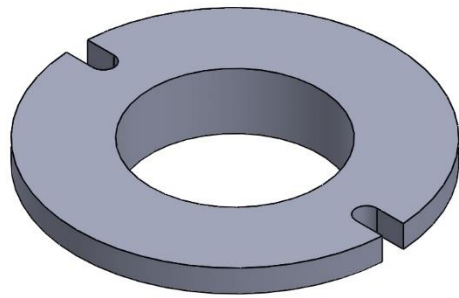
DEBUR AND
BREAK SHARP
EDGES

DO NOT SCALE DRAWING

REVISION

NAME	SIGNATURE	DATE		
DRAWN ΠΙΡΕΖΑ ΙΩΑΝΝΑ		20/06/15		
CHK'D				
APP'VD				
MFG				
Q.A				
MATERIAL:				
ΑΛΟΥΜΙΝΙΟ				
WEIGHT:				

TITLE:		ΤΕΜΑΧΙΟ Α	
DWG NO.			
SCALE:2:1		SHEET 1 OF 1	
		A4	



ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ
ΕΜΒΙΟΜΗΧΑΝΙΚΗΣ
& ΣΥΣΤΗΜΙΚΗΣ ΒΙΟΛΟΓΙΑΣ

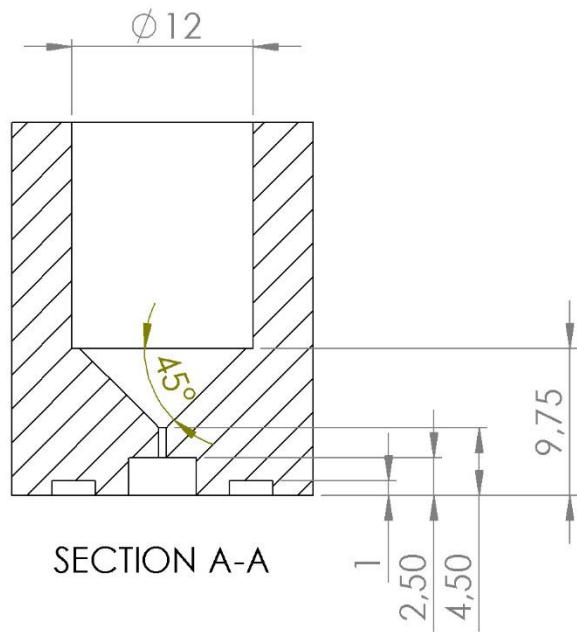
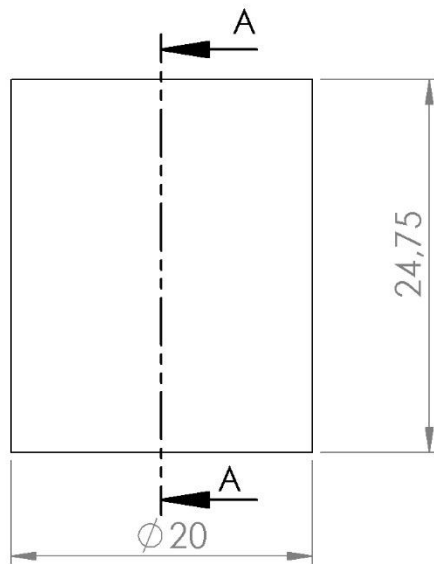
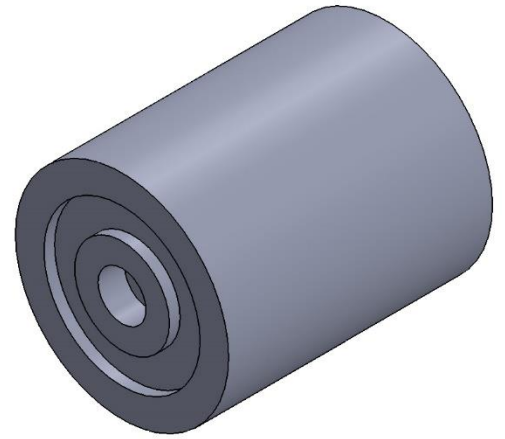
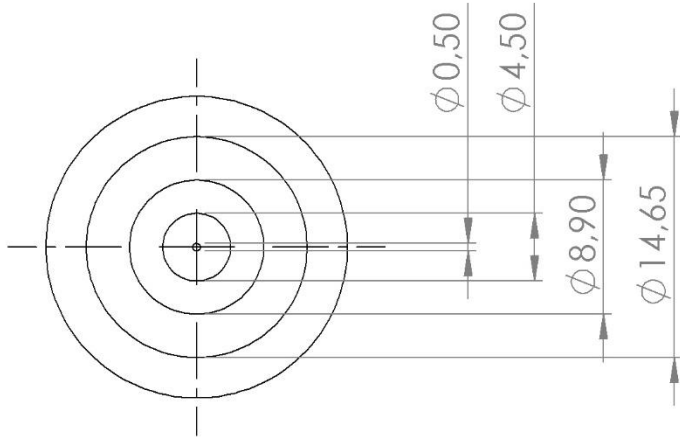
DEBUR AND
BREAK SHARP
EDGES

DO NOT SCALE DRAWING

REVISION

	NAME	SIGNATURE	DATE
DRAWN	ΓΙΡΕΖΑ ΙΩΑΝΝΑ		20/06/15
CHK'D			
APPV'D			
MFG			
Q.A			
MATERIAL:			
ΑΛΟΥΜΙΝΙΟ			
WEIGHT:			

TITLE:		<h1>ΤΕΜΑΧΙΟ Α</h1>
DWG NO.	ΚΑΠΑΚΙ ΚΕΛΥΦΟΥΣ	
SCALE:2:1	SHEET 1 OF 1	A4



FINISH:

DEBUR AND
BREAK SHARP
EDGES

DO NOT SCALE DRAWING

REVISION

NAME	SIGNATURE	DATE		
DRAWN ΠΙΡΕΖΑ ΙΩΑΝΝΑ		20/06/15		
CHK'D				
APP'VD				
MFG				
Q.A				
MATERIAL:				
PMMA/ Plexiglass				
WEIGHT:				

TITLE:

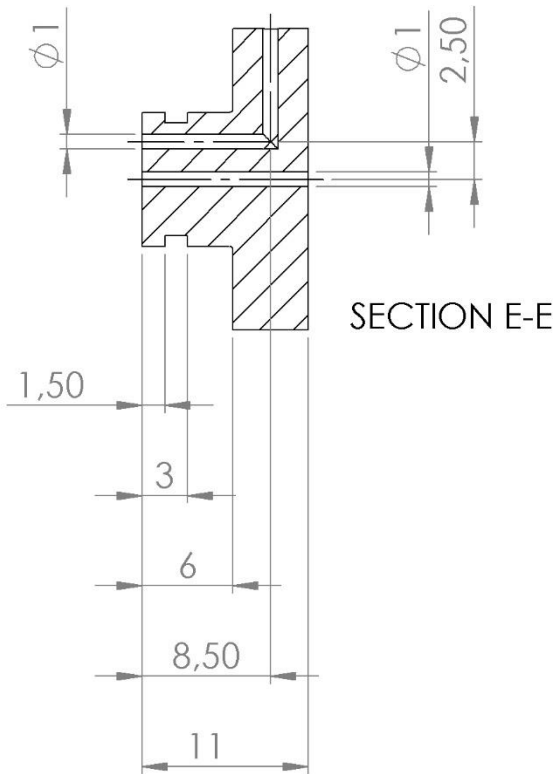
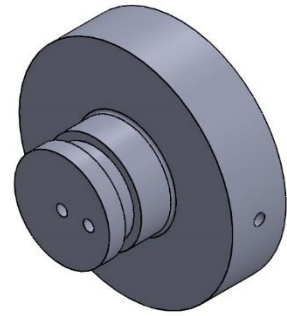
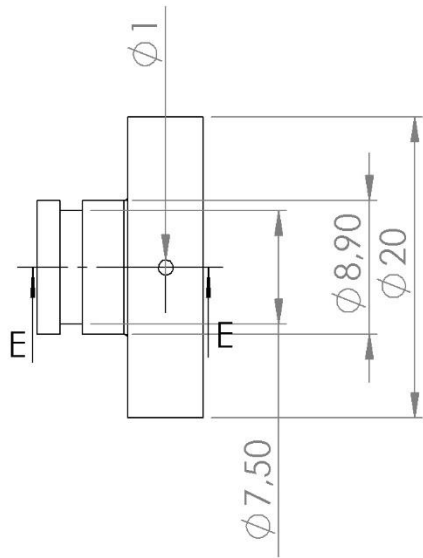
ΤΕΜΑΧΙΟ Β

DWG NO. ΘΑΛΑΜΟΣ ΤΟΠΟΘΕΤΗΣΗΣ ΙΚΡΙΩΜΑΤΟΣ ΚΟΛΛΑΓΟΝΟΥ

A4

SCALE:2:1

SHEET 1 OF 1



ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ
ΕΜΒΙΟΜΗΧΑΝΙΚΗΣ
& ΣΥΣΤΗΜΙΚΗΣ ΒΙΟΛΟΓΙΑΣ

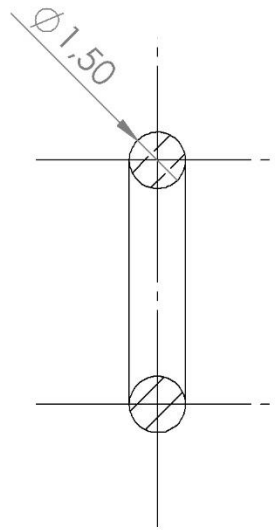
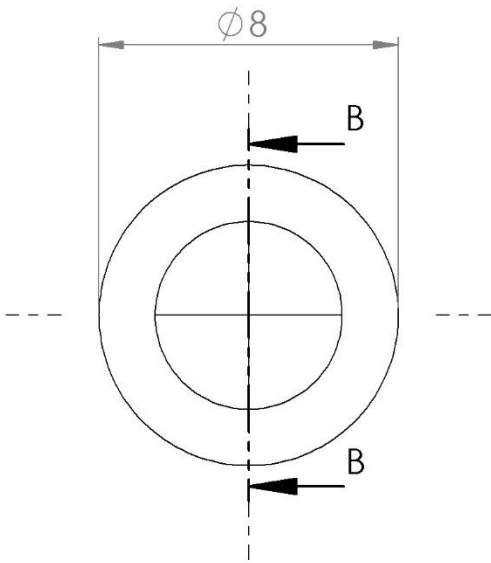
DEBUR AND
BREAK SHARP
EDGES

DO NOT SCALE DRAWING

REVISION

	NAME	SIGNATURE	DATE		
DRAWN	ΠΙΡΕΖΑ ΙΩΑΝΝΑ		20/06/15		
CHK'D					
APP'VD					
MFG					
Q.A					
				MATERIAL:	
				PMMA/ Plexiglass	
				WEIGHT:	

TITLE:		<h1>ΤΕΜΑΧΙΟ Γ</h1>	
DWG NO. ΤΕΜΑΧΙΟ ΔΙΑΣΥΝΔΕΣΗΣ ΜΕ ΑΝΤΛΙΑ ΣΥΡΙΓΓΑΣ			
SCALE:2:1		SHEET 1 OF 1	
		A4	



SECTION B-B
SCALE 5 : 1



ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ
ΕΜΒΙΟΜΗΧΑΝΙΚΗΣ &
ΣΥΣΤΗΜΙΚΗΣ ΒΙΟΛΟΓΙΑΣ

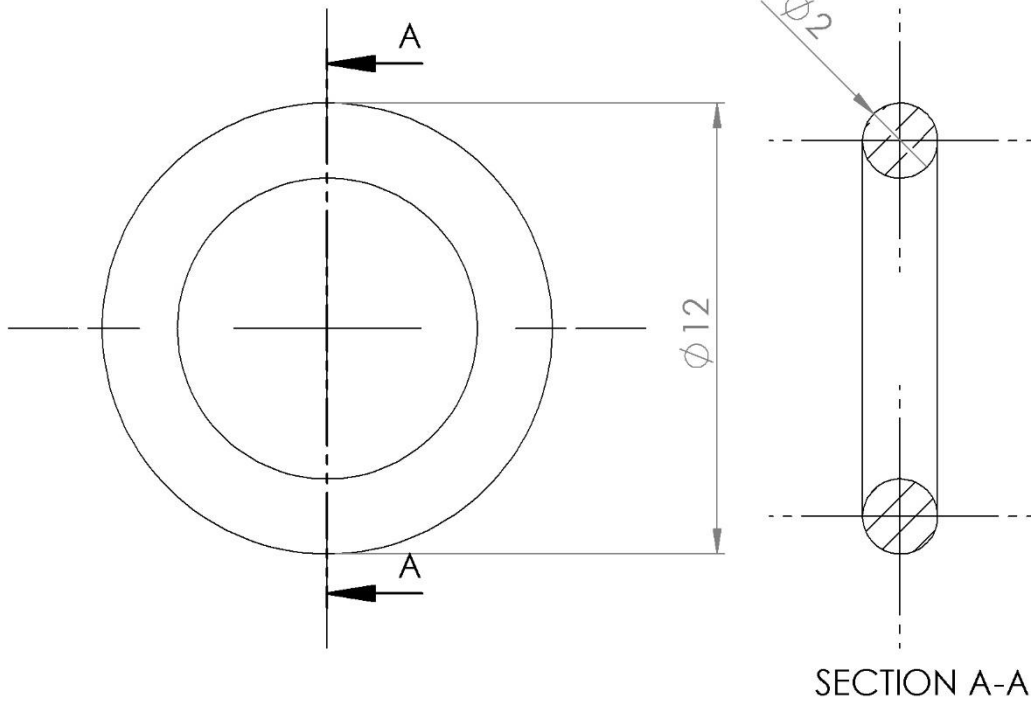
DEBUR AND
BREAK SHARP
EDGES

DO NOT SCALE DRAWING

REVISION

	NAME	SIGNATURE	DATE		
DRAWN	ΠΙΡΕΖΑ ΙΩΑΝΝΑ		20/06/15		
CHK'D					
APP'VD					
MFG					
Q.A					
				MATERIAL:	
				Nitrile	
				WEIGHT:	

TITLE:		O-ring A	
DWG NO.			
SCALE:5:1		SHEET 1 OF 1	
		A4	



ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ
ΕΜΒΙΟΜΗΧΑΝΙΚΗΣ &
ΣΥΣΤΗΜΙΚΗΣ ΒΙΟΛΟΓΙΑΣ

DEBUR AND
BREAK SHARP
EDGES

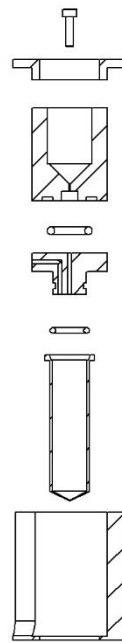
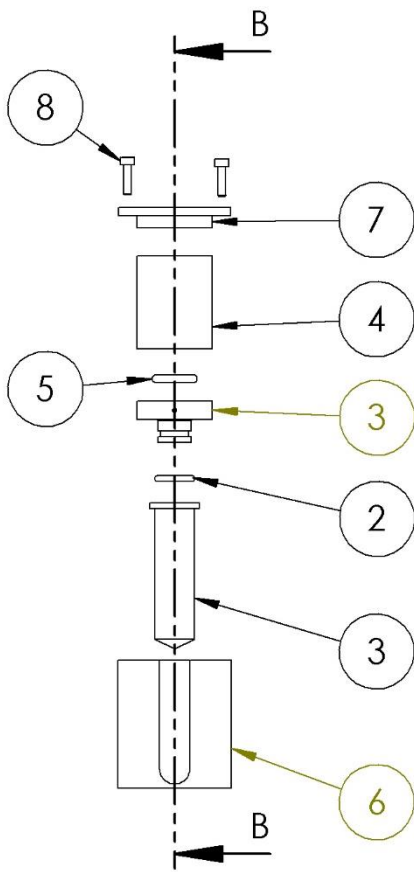
DO NOT SCALE DRAWING

REVISION

	NAME	SIGNATURE	DATE		
DRAWN	ΠΙΡΕΖΑ ΙΩΑΝΝΑ		20/06/15		
CHK'D					
APP'VD					
MFG					
Q.A					
				MATERIAL:	
				Nitrile	
				WEIGHT:	

TITLE:	O-ring B	
DWG NO.	oring_8x2b	A4
SCALE:5:1	SHEET 1 OF 1	

ITEM NO.	PART NUMBER	Part description	QTY.
1	TEMAXIO.Γ	ΜΕΡΟΣ ΔΙΑΣΥΝΔΕΣΗΣ ΜΕ ΤΗΝ ΑΝΤΛΙΑ	1
2	oring_5x1.5	ΣΤΕΓΑΝΟΠΟΙΗΤΙΚΟΣ ΔΑΚΤΥΛΙΟΣ	1
3	tube_2ml	2 ml centrifuge tube	1
4	TEMAXIO.B	ΘΑΛΑΜΟΣ ΤΟΠΟΘΕΤΗΣΗΣ ΙΚΡΙΩΜΑΤΩΝ	1
5	oring_8x2	ΣΤΕΓΑΝΟΠΟΙΗΤΙΚΟΣ ΔΑΚΤΥΛΙΟΣ	1
6	TEMAXIO.A	ΚΕΛΥΦΟΣ ΑΟΥΜΙΝΙΟΥ	1
7	TEMAXIO.A.ΚΑΠΑΚΙ	ΚΑΠΑΚΙ ΚΕΛΥΦΟΥΣ	1
8	ISO 4762 M2 x 8 --- 8N	ΒΙΔΕΣ	2



SECTION B-B



ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ
ΕΜΒΙΟΜΗΧΑΝΙΚΗΣ
& ΣΥΣΤΗΜΙΚΗΣ ΒΙΟΛΟΓΙΑΣ

DEBUR AND
BREAK SHARP
EDGES

DO NOT SCALE DRAWING

REVISION

NAME	SIGNATURE	DATE
DRAWN ΠΡΕΖΑ ΙΩΑΝΝΑ		20/06/15
CHK'D		
APP'VD		
MFG		
Q.A		
MATERIAL:		
WEIGHT:		

TITLE: ΣΥΝΑΡΜΟΓΗ ΣΥΣΚΕΥΗΣ
DWG NO.
A4
SCALE:1:2
SHEET 1 OF 1

ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ Β

B.1 Καλλιέργεια ινοβλαστών σε φλάσκες

Το παρόν πρωτόκολλο περιγράφει τη διαδικασία αποκόλλησης ινοβλαστών από μια φλάσκα καλλιέργειας και τη μεταφορά των κυττάρων σε μία νέα φλάσκα ή τη χρησιμοποίησή τους σε οιοδήποτε είδους πειράματα.

Υλικά:

- PBS, sterile, φυλάσσεται στους 4°C.
- DMEM++ cell culture medium (DMEM plus 10% FBS, 1% penicillin/streptomycin)
- Trypsin EDTA), όταν χρησιμοποιείται φυλάσσεται στους 4°C σε aliquots

Εξοπλισμός:

- Water bath
- Biological Hood
- Cell incubator (CO₂ 5%, 37° C)
- Microscope
- Hemocytometer (Αιμοκυτταρόμετρο)
- Φυγοκεντριστής (table centrifuge)

Διαδικασία:

- Προετοιμασία του bio-hood: έκθεση σε “UV” ακτινοβολία για 15 λεπτά και καθαρισμός του bio-hood με 70% αιθανόλη
- Θερμαίνεται το PBS, η trypsin/EDTA και το θρεπτικό (DMEM++) στο water bath στους 37°C για 10 min.
- Μεταφέρεται η φλάσκα – (εξ) με τα κύτταρα στο μικροσκόπιο: ελέγχεται το ποσοστό των κυττάρων που έχουν καλύψει την επιφάνεια της φλάσκας (confluency).
- Η αποκόλληση των κυττάρων (cell splitting), γίνεται όταν αυτό το ποσοστό είναι ~ 70 – 80%

Αποκόλληση κυττάρων

- Η φλάσκα (T 75) μεταφέρεται από το cell incubator στο bio-hood και απορροφάται το υπάρχον DMEM με μία πιπέτα των 10 ml
- Προστίθεται 4 ml PBS και ανακατεύουμε ελαφρά. Η πλύση αυτή απομακρύνει υπολείμματα DMEM++, το οποίο απενεργοποιεί τη δράση της τρυψίνης (trypsin/EDTA).

- Απορροφάται πάλι το PBS με κατάλληλη πιπέτα και προστίθενται 2 ml trypsin/EDTA. Η φλάσκα να επωάζεται 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 γίνεται έλεγχος στο μικροσκόπιο (τα αποκολλημένα κύτταρα φαίνονται σαν σφαιρίδια που επιπλέουν στο θρεπτικό)
- Αν τα κύτταρα δεν έχουν αποκολληθεί τα αφήνουμε να επωαστούν για 2' λεπτά ακόμα
- Στην συνέχεια προστίθενται 3 ml cell culture medium, ώστε να απενεργοποιηθεί η δράση της trypsin/EDTA
- Ανακατεύουμε το κυτταρικό εναιώρημα, απορροφώντας και ξανά-απορροφώντας περίπου για 5 φορές, αποφεύγοντας τις φουσκάλες
- Το κυτταρικό εναιώρημα μεταφέρεται σε ένα 15 ml conical tube

Μέτρηση κυττάρων

- Γίνεται φυγοκέντριση του κυτταρικού εναιωρήματος στις 1500 rpm (380×g), για 10' λεπτά, στους 25°C
- Όταν γίνει η φυγοκέντριση μεταφέρεται το conical tube στο bio-hood και συλλέγεται το υπερκείμενο (supernatant) με μία πιπέτα προσέχοντας να μην διαταραχθεί το ίζημα των κυττάρων (pellet)
- Προστίθεται 1ml PBS με μια πιπέτα 1000ul και με την ίδια πιπέτα διαταράσσεται το ίζημα (pellet) ώστε να δημιουργηθεί πάλι το εναιώρημα
- Προστίθεται άλλα 3 ml PBS ώστε το μείγμα να φτάσει τα 4 ml
- Το κυτταρικό μίγμα ανακατεύεται αρκετές φορές και στη συνέχεια χρησιμοποιείται μία 200 ul πιπέτα για να μεταφερθούν 40 μl από το εναιώρημα σε ένα tube 0,6 ml
- Γίνεται ξανά φυγοκέντριση του κυτταρικού εναιωρήματος στις 1500 rpm (380×g), για 10' λεπτά, στους 25°C
- Κατά τη διάρκεια της φυγοκέντρισης τα κύτταρα μετρούνται με το αιμοκυτταρόμετρο όπως έχει περιγραφεί και σε προηγούμενη ενότητα:
 - Καθαρίζεται η επιφάνεια του αιμοκυτταρόμετρου με 70% αιθανόλη
 - Μεταφέρονται 20 μl του κυτταρικού εναιωρήματος στις δύο πλευρές του αιμοκυτταρόμετρου
 - Μετρίεται ο αριθμός των κυττάρων σε κάθε τεταρτημόριο. Υπολογίζεται η μέση τιμή του αριθμού των κυττάρων που μετρήθηκαν σε κάθε πλευρά
 - Ο συνολικός αριθμός των κυττάρων δίνεται από τη σχέση

$$N = \mu \cdot d \cdot 10^4 \cdot V_{cellsPBS}$$
 ,όπου μ είναι ο μέσος όρος του αριθμού κυττάρων, d είναι ο λόγος αραιώσης του δείγματος πριν τη μέτρηση ($d=1$, εάν δεν έχει αραιωθεί

το δείγμα με trypan blue, για τη μέτρηση των νεκρών κυττάρων) και V_{cellsPBS} είναι ο όγκος του μίγματος από όπου συλλέξαμε το δείγμα σε ml.

- Μόλις τελειώσει η φυγοκέντριση μεταφέρεται το conical tube στο bio-hood και συλλέγεται το υπερκείμενο (supernatant) με μία πιπέτα προσέχοντας να μην διαταραχθεί το ίζημα των κυττάρων (pellet)
- Ανάλογα με την πυκνότητα των κυττάρων που είναι επιθυμητό να έχει το δείγμα προσθέτουμε κατάλληλη ποσότητα DMEM++. Για παράδειγμα εάν το κυτταρικό ίζημα αποτελείται από 1×10^6 κύτταρα και για κάποιο πείραμα χρειάζονται 1000 κύτταρα/μl στο κυτταρικό ίζημα θα προστεθεί 1 ml DMEM++

Δημιουργία νέας καλλιέργειας σε φλάσκα

- Εφόσον δεν χρησιμοποιηθούν όλα τα κύτταρα σε ένα πείραμα χρησιμοποιούνται νέες φλάσκες. Σε μια καινούργια φλάσκα προστίθενται ~ 7 μL DMEM++
- Οι φλάσκες τοποθετούνται στους 37°C στον incubator
- Όταν είναι έτοιμο το κυτταρικό εναιώρημα οι φλάσκες τοποθετούνται στο bio-hood και με μια πιπέτα προστίθεται κατάλληλη ποσότητα από τα κύτταρα
- Οι φλάσκες ψεκάζονται με αιθανόλη και μεταφέρονται ξανά στον incubator

B2. Εισαγωγή Ινοβλαστών σε Πορώδη Ικρίωματα Κολλαγόνου

Υλικά:

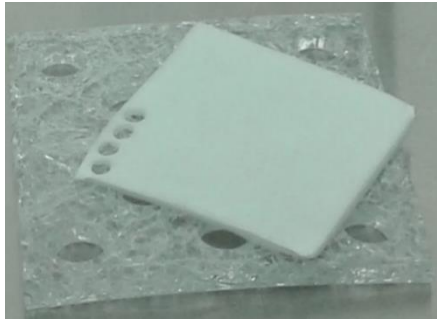
- 3mm πάχους φύλλα πορώδους ικρίωματος κολλαγόνου, αποστειρωμένα και αποθηκευμένα σε αλουμινόχαρτο σε θερμοκρασία δωματίου
- Συμβατικές πλάκες καλλιέργειας (24-well polystyrene plate)
- 0.2% διάλυμα αγαρόζης
- PBS, sterile, φυλάσσεται στους 4°C.
- DMEM++ cell culture medium (DMEM plus 10% FBS, 1% penicillin/streptomycin)
- Biopsy punch, διαμέτρου 4 ή 4.5 mm
- Τσιμπίδα
- Πλαστικό στήριγμα από PMMA

Εξοπλισμός:

- Water bath
- Biological Hood
- Cell incubator (CO₂ 5%, 37° C)
- Mini-centrifuge tube (Eppendorf)

Κοπή ικριωμάτων κολλαγόνου σε μικρά κυλινδρικά κομμάτια

- Ψεκάζεται το bio-hood (Laminar Flow Cabinet) με 70% αιθανόλη
- Ψεκάζεται 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)
- Το φύλλο ικρίωματος τοποθετείται στο στήριγμα με την γυαλιστερή πλευρά προς τα κάτω
- Με την χρήση biopsy punch διαμέτρου 4 mm ή 4.5 mm κόβουμε τα δείγματα με αργή περιστροφική κίνηση, χωρίς να ασκείται κάθετη δύναμη στο φύλλο ικρίωματος
- Συλλέγουμε τα δείγματα με μια τσιμπίδα και τα αποθηκεύουμε στο δοχείο (mini-centrifuge tube)



Εικόνα 50: Διαδικασία προετοιμασίας δειγμάτων ικρίωματος

Κάλυψη των πηγαδιών της συμβατικής πλάκας (24-well polystyrene plate) με αγαρόζη

- Η πλάκα καλλιέργειας ψεκάζεται με 70% αιθανόλη και ανοίγεται μέσα στο bio-hood
- Σε κάθε πηγαδάκι της πλάκας προστίθενται 300 μl αγαρόζης (24-well plate)
- Το διάλυμα της αγαρόζης ανακινείται ώστε να απλωθεί ομοιόμορφα στην επιφάνεια του πηγαδιού της πλάκας
- Η πλάκα αφήνεται μέσα στο bio-hood κατά τη διάρκεια της νύχτας ώστε να στεγνώσει. Η αγαρόζη αποτρέπει τα κύτταρα να ‘κολλήσουν’ στη συμβατική πλάκα ώστε να προτιμήσουν να προσκολληθούν στο ικρίωμα κολλαγόνου

Εισαγωγή κυττάρων στο πορώδες ικρίωμα

Αφού η αγαρόζη έχει εξατμιστεί από την πλάκα και αφού ετοιμαστούν τα κυλινδρικά κομμάτια του πορώδους ικρίωματος κολλαγόνου η διαδικασία για την εισαγωγή κυττάρων μέσα σε αυτό είναι:

- Τα κύτταρα αποκολλώνται από τη φλάσκα και δημιουργείται το κυτταρικό εναιώρημα επιθυμητής πυκνότητας με τον τρόπο που περιγράφεται στην προηγούμενη ενότητα
- Τοποθετείται μια σταγόνα από το κυτταρικό εναιώρημα σε κάθε πηγάδι της πλάκας. Η ποσότητα της σταγόνας εξαρτάται από το πείραμα
- Με την τσιμπίδα τοποθετείται το κυλινδρικό δείγμα ικρίωματος, που έχει προηγουμένως κοπεί, με την Mat πλευρά πάνω στην σταγόνα
- Αφού τοποθετηθούν όλα τα δείγματα η πλάκα μεταφέρεται στον incubator για περίπου 1 ώρα ώστε να προσκολληθούν τα κύτταρα στο υλικό
- Ύστερα από 1 ώρα επώαση προσθέτουμε 500μl 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

B.3 Πείραμα Εκτίμησης Βιοσυμβατότητας Υλικών

Το πρωτόκολλο αυτό περιγράφει τον αριθμό των κυττάρων που παραμένουν ζωντανά (μετά από πέντε μέρες) σε μια συμβατική πλάκα καλλιέργειας αλληλοεπιδρώντας με τα υλικά PDMS, PMMA.

Υλικά:

- PBS, sterile, φυλάσσεται στους 4°C.
- DMEM++ cell culture medium (DMEM plus 10% FBS, 1% penicillin/streptomycin)
- Trypsin EDTA), όταν χρησιμοποιείται φυλάσσεται στους 4°C σε aliquots
- Πλαστικοί δακτύλιοι από PMMA και PDMS
- Τσιμπίδα

Εξοπλισμός:

- Water bath
- Biological Hood
- Cell incubator (CO2 5%, 37° C)
- Microscope
- Hemocytometer (Αιμοκυτταρόμετρο)
- 2× 24well polystyrene plate (πλαστικές πλάκες καλλιέργειας)
- 6well polystyrene plate
- Χύτρα αποστείρωσης
- Mini-centrifuge tube (Eppendorf)

Προετοιμασία:

- Καθαρίζουμε τους δακτυλίους από PMMA και PDMS (πλυσίματα με σαπουνόνερο, νερό και 70% αιθανόλη) και τους αποστειρώνουμε σε χύτρα αποστείρωσης

Διαδικασία:

- Αφού αποκολληθούν οι ινοβλάστες από τη φλάσκα, προετοιμάζεται διάλυμα κυτταρικού εναιωρήματος πυκνότητας 1000 κύτταρα/μl (Παράρτημα B.1)
- Οι πλαστικές πλάκες ψεκάζονται με 70% αιθανόλη και εισάγονται στο bio-hood. Το ίδιο ισχύει και για τους δακτυλίους που έχουν αποστειρωθεί
- Με την τσιμπίδα οι δακτύλιοι από PMMA και PDMS εισάγονται στα πηγαδάκια (wells) της συμβατικής πλάκας (6well plate)
- Με μια 1000ul πιπέτα προστίθεται DMEM++: 500 μl στα wells με PDMS και 1 ml στα wells με PMMA

- Σε δύο πλαστικές πλάκες 24άρων πηγαδιών (24well plate, για τη μέτρηση της 1^{ης} και της 5^{ης} ημέρας) με μια 1000ul πιπέτα προστίθεται 500 μl DMEM++
- Σε κάθε well από τα παραπάνω δείγματα προστίθενται 25 μl από το κυτταρικό εναιώρημα (το ίδιο πείραμα έγινε και με αρχική πυκνότητα κυττάρων 40000 κύτταρα)
- Οι πλάκες επιστρέφονται στον incubator για την συνέχεια της καλλιέργειας
- Η αλλαγή θρεπτικού γίνεται κάθε 2 ημέρες

1^η ημέρα μέτρηση κυττάρων

- Θερμαίνεται το PBS, η trypsin/EDTA και το θρεπτικό (DMEM++) στο water bath στους 37°C για 10 min.
- Η 24well plate πλάκα ψεκάζεται με 70% αιθανόλη, μεταφέρεται στο bio-hood και απορροφάται το υπάρχον DMEM++ με μία πιπέτα των 1000 ul
- Γίνεται πλύση με PBS (~500 μl). Η πλύση αυτή απομακρύνει υπολείμματα DMEM++, το οποίο απενεργοποιεί τη δράση της τρυψίνης (trypsin/EDTA).
- Απορροφάται πάλι το PBS με κατάλληλη πιπέτα και προστίθενται 50 μl trypsin/EDTA. Η φλάσκα να επωάζεται 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 γίνεται έλεγχος στο μικροσκόπιο (τα αποκολλημένα κύτταρα φαίνονται σαν σφαιρίδια που επιπλέουν στο θρεπτικό)
- Αν τα κύτταρα δεν έχουν αποκολληθεί τα αφήνονται να επωαστούν για 2' λεπτά ακόμα
- Στην συνέχεια προστίθενται 75 μl PBS σε κάθε δείγμα
- Ανακατεύουμε το κυτταρικό εναιώρημα, απορροφώντας και ξανά-απορροφώντας περίπου για 5 φορές, αποφεύγοντας τις φουσκάλες
- Το κυτταρικό εναιώρημα για κάθε δείγμα μεταφέρεται στα μικρά αναλώσιμα δοχεία (Mini-centrifuge tube)
- Για κάθε δείγμα υπολογίζεται ο αριθμός των κυττάρων με το αιμοκυτταρόμετρο όπως αναφέρθηκε αναλυτικά και πιο πάνω

5^η ημέρα μέτρηση κυττάρων

- Την 5^η ημέρα ακολουθείται η ίδια διαδικασία και για τις υπόλοιπες πλάκες με τη μόνη διαφορά ότι αφαιρούνται οι δακτύλιοι από PMMA και PDMS από τις μεγαλύτερες πλάκες (6well plate)
- Επειδή οι επιφάνειες είναι μεγαλύτερες χρησιμοποιούνται οι διπλάσιες ποσότητες διαλυμάτων (100 μl trypsin/EDTA και στη συνέχεια προσθήκη 150 μl PBS)

B.4 Βαθμονόμηση Φασματόμετρο Φθορισμού

Σε αυτό το πρωτόκολλο εξηγείται το πείραμα βαθμονόμησης και περιγράφεται αναλυτικά ο τρόπος μέτρησης φθορίζοντος σήματος στο φασματόμετρο φθορισμού. Να σημειωθεί ότι λόγω ευαισθησίας της φθορίζουσας ουσίας στο φως το πείραμα εκτελείται σε χώρο με ελάχιστο φως.

Υλικά:

- Διάλυμα συγκέντρωσης 50 μM Tris (tris(hydroxymethyl)aminomethane), pH8
- Φθορίζον διάλυμα FITC (Sigma-Aldrich) συγκέντρωσης 1 mM

Εξοπλισμός:

- Φασματόμετρο μέτρησης φθορισμού (CytoFluor Series 4000)
- 96well polystyrene plate

Διαδικασία:

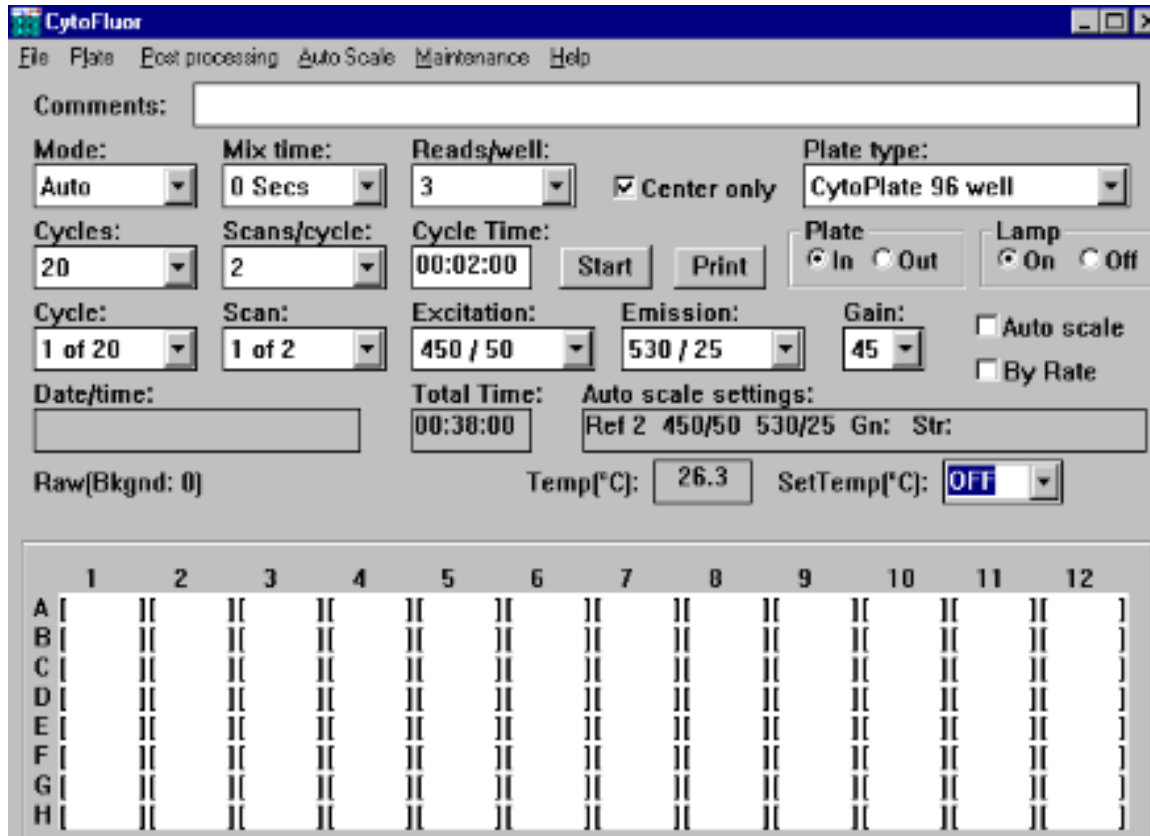
- Από το διάλυμα FITC (Sigma-Aldrich) γνωστής συγκέντρωσης (1 mM) δημιουργούνται διαλύματα FITC από 20 μM μέχρι 0,0005 μM αραιωμένα σε διάλυμα Tris 50 μM . Συγκεκριμένα οι συγκεντρώσεις που δημιουργήθηκαν ήταν 20 – 10 – 5 – 1 – 0.5 – 0.3 – 0.1 – 0.05 – 0.025 – 0.01 – 0.005 – 0.0025 – 0.001 – 0.0005 μM .
- Σε μία πλάκα (96 well plate) τοποθετούνται τρία δείγματα για κάθε μια από τις παραπάνω συγκεντρώσεις σε ποσότητες των 50, 75, 100 μl
- Στην ίδια πλάκα τοποθετούνται και διαλύματα με Tris 50 μM ποσοτήτων 50, 75, 100 μl (control)
- Παράλληλα με τη διαδικασία δημιουργίας των διαλυμάτων τίθεται σε λειτουργία το φασματόμετρο μέτρησης φθορισμού (CytoFluor Series 4000) και ενεργοποιείται η λάμπα φθορισμού. Η λάμπα απαιτείται να ζεσταθεί τουλάχιστον 20 λεπτά πριν από οποιαδήποτε μέτρηση

Στη συνέχεια περιγράφεται η διαδικασία μέτρησης στο φασματόμετρο φθορισμού.

Με την ενεργοποίηση του μηχανήματος και του λογισμικού φανερώνεται το παράθυρο της παρακάτω (Εικόνα 51). Από αυτό το παράθυρο οι παράμετροι που δοκιμάζονται και τροποποιούνται είναι οι εξής:

- Reads/well: οι μετρήσεις που παίρνει το μηχάνημα πάνω από κάθε δείγμα και υπολογίζει το μέσο όρο αυτών. Στα πειράματα αυτής της εργασίας επιλέχθηκαν συνολικά 5 reads/well
- Center only: το σήμα ανιχνεύεται από το κέντρο του πηγαδιού της πλάκας. Όταν δεν επιλεγεί η παράμετρος το σήμα ανιχνεύεται από διάφορα σημεία μέσα πηγάδι της πλάκας. Συνίσταται για πλάκες μεγαλύτερου μεγέθους από αυτές που χρησιμοποιούνται στο πείραμα (96well plate)
- Plate type: Επιλέγεται το είδος της πλάκας που θα γίνει η μέτρηση
- Scans/cycle: Ορίζεται πόσες φορές θα γίνει μέτρηση σε ένα κύκλο. Ορίζονται από 1-4 scans και πολλές φορές χρησιμοποιείται για να αλλαχθεί το κέρδος του αισθητήρα σε μια μέτρηση

- Start: αφού οριστούν οι παράμετροι και εισέλθει η πλάκα για μέτρηση, δίνει την εκκίνηση για μέτρηση
- Plate in/out: Ανοίγει ή κλείνει το συρτάρι για την τοποθέτηση ή την αποθήκευση της πλάκας μέσα στο φασματόμετρο αντίστοιχα
- Lamp on/off: Ενεργοποίηση/ απενεργοποίηση της λάμπας φθορισμού
- Excitation/ Emission: Στα δύο αυτά κουτιά επιλέγονται τα φίλτρα διέγερσης και εκπομπής ανάλογα με τη φθορίζουσα ουσία που χρησιμοποιείται
- Gain: Προσαρμόζεται η τάση – κέρδος του αισθητήρα



Εικόνα 51: Παράθυρο του λογισμικού περιβάλλοντος του φασματοσκοπίου φθορισμού (CytoFluor)

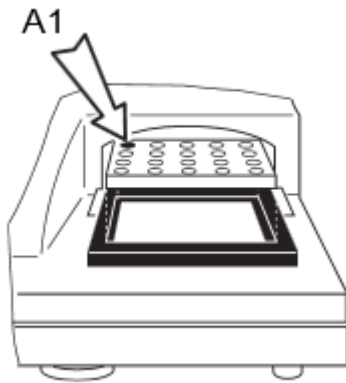
Μετά τη σύντομη περιγραφή, αφού έχουν δημιουργηθεί τα διαλύματα διαφορετικών συγκεντρώσεων FITC και αφού έχει ζεσταθεί η λάμπα του φασματοσκοπίου η διαδικασία συνεχίζεται ως εξής:

- Πατώντας από το παράθυρο του λογισμικού του CytoFluor 'plate out', ανοίγει το συρτάρι και τοποθετείται η πλάκα στην κατάλληλη θέση (Εικόνα 52)
- Πατώντας από το παράθυρο του λογισμικού του CytoFluor 'plate in', το συρτάρι μαζί με την πλάκα σύρονται μέσα στο μηχάνημα
- Πατώντας το start το φασματόμετρο ξεκινά τη μέτρηση
- Μόλις η μέτρηση ολοκληρωθεί η πλάκα σύρεται αυτόματα προς τα έξω

- Πατώντας ξανά ‘plate in’ το συρτάρι σύρεται μέσα στο μηχάνημα
- Πατώντας ‘file’ και ‘save as’ αποθηκεύεται το αρχείο με τις μετρήσεις

Μετά την δοκιμή διαφορετικών παραμέτρων, οι επιθυμητές τιμές τους για να εμφανίζεται γραμμικό το προφίλ της βαθμονόμησης με μεγάλη ακρίβεια είναι οι εξής:

- Κέρδος αισθητήρα: Gain 50
- Μήκος κύματος διέγερσης: 485/20 nm, μήκος κύματος εκπομπής: 530/25 nm
- Ποσότητα δείγματος: 75 μl



Εικόνα 52: Τοποθέτηση της πλάκας στο συρτάρι του φασματόμετρου φθορισμού (CytoFluor)

B.5 Εναλλαγή ρευστών Μέσα σε Πορώδες Ικρίωμα Κολλαγόνου – Στατικό Πείραμα

Υλικά:

- Διάλυμα συγκέντρωσης 50 μM Tris (tris(hydroxymethyl)aminomethane), pH8
- Φθορίζον διάλυμα FITC (Sigma-Aldrich) συγκέντρωσης 10 μM
- Πορώδες ικρίωμα κολλαγόνου κυλινδρικής μορφής διαμέτρου 4 mm

Εξοπλισμός:

- Φασματόμετρο μέτρησης φθορισμού (CytoFluor Series 4000)
- 96well polystyrene plate

Διαδικασία:

- Σε μία πλάκα (96well plate) τοποθετούνται τα ικρίωματα κολλαγόνου μέσα σε διάλυμα 50 μM Tris όγκου ~ 400 μl
- Μετά από 10 λεπτά τα πορώδη ικρίωματα κολλαγόνου τοποθετούνται με μια τσιμπίδα στην ίδια πλάκα σε διάλυμα FITC 10 μM όγκου 100 μl
- Το πείραμα γίνεται σε σχετικά σκοτεινό χώρο και τα δείγματα καλύπτονται με αλουμινόχαρτο καθώς το FITC είναι ουσία ευαίσθητη στο φως
- Μετά από χρόνο 1, 2, 5, 10, 20 λεπτά αντίστοιχα κάθε δείγμα τοποθετείται ξανά σε διάλυμα 50 μM Tris όγκου 75 μl
- Αναμένεται χρονικό διάστημα 2 ωρών. Μισή ώρα περίπου πριν το πέρας αυτού του διαστήματος ενεργοποιείται η λάμπα από το φασματόμετρο φθορισμού
- Ορίζονται οι κατάλληλες παράμετροι του φασματοσκοπίου για τη συγκεκριμένη μέτρηση:
 - Κέρδος αισθητήρα: Gain 50
 - Μήκος κύματος διέγερσης: 485/20 nm, μήκος κύματος εκπομπής: 530/25 nm
- Μετά τις 2 ώρες αφαιρείται το ικρίωμα από το διάλυμα
- Με μια 100 ul πιπέτα μεταφέρονται 75 μl του διαλύματος σε μια πλάκα (96well plate)
- Γίνεται η μέτρηση με το φασματόμετρο φθορισμού
- Από τη μέτρηση και από τη γραμμική καμπύλη βαθμονόμησης
$$y = 7777.1 * x + 152.41$$

, για τη συγκεκριμένη ποσότητα (75 μl) και χαρακτηριστικά του φασματόμετρου υπολογίζεται η συγκέντρωση του τελικού διαλύματος.

B.6 Εναλλαγή Ρευστού σε Πορώδες Ικρίωμα Κολλαγόνου Μέσω Συνεχούς Παροχής

Υλικά:

- Διάλυμα συγκέντρωσης 50 μM Tris (tris(hydroxymethyl)aminomethane), pH8
- Φθορίζον διάλυμα FITC (Sigma-Aldrich) συγκέντρωσης 10 μM
- Πορώδες ικρίωμα κολλαγόνου κυλινδρικής μορφής διαμέτρου 4 mm

Εξοπλισμός:

- Φασματόμετρο μέτρησης φθορισμού (CytoFluor Series 4000)
- Συσκευή καλλιέργειας κυττάρων στο πορώδες ικρίωμα κολλαγόνου
- Αντλία σύριγγας Cantro XP3000 Modular Digital Pump
- 96well polystyrene plate

Διαδικασία:

- Ξηρά ικρίωματα κολλαγόνου διαμέτρου 4mm και ύψους 3mm τοποθετούνται στο θάλαμο της συσκευής η οποία συνδέεται με την αντλία
- Προστίθεται στη δεξαμενή υποδοχής ρευστού διάλυμα tris \sim 400 μl
- Η αντλία ρουφά \sim 50 μl tris έτσι ώστε να γεμίσει ο θάλαμος και να υγροποιηθεί το ικρίωμα
- Μετά από 10 λεπτά η αντλία ρουφά όλο το διάλυμα tris μέχρι να αδειάσει ο θάλαμος
- Προστίθεται στη δεξαμενή υποδοχής ρευστού διάλυμα 10 μM FITC όγκου 2ml
- Η αντλία ξεκινά να ρουφά αέρα μέχρι όλο το διάλυμα να καταλήξει στο χώρο συλλογής (2ml conical tube).
- Μετά το πέρας της ροής, το ικρίωμα βγαίνει από το θάλαμο και τοποθετείται σε μία πλάκα (96well plate) με 80 μl tris
- Μετά από 2 ώρες (το σύστημα φτάνει σε ισορροπία) το ικρίωμα αφαιρείται
- Με μια 100 μl πιπέτα μεταφέρονται 75 μl του διαλύματος σε μια πλάκα (96well plate) και το διάλυμα μετριέται στο φασματόμετρο φθορισμού, CytoFluor.
- Μέσω της γραμμικής καμπύλης βαθμονόμησης, όπως εξηγήθηκε και στο προηγούμενο πείραμα υπολογίζεται η συγκέντρωση του τελικού διαλύματος

Κώδικας για την αντλία

Η σύριγγα που είναι τοποθετημένη στο σύστημα της αντλίας είναι χωρητικότητας 1 ml. Για να είναι συνεχής η ροή γράφεται ένας αλγόριθμος που εκτελείται κάθε φορά στο στάδιο που απαιτείται παροχή 2 ml από την αντλία. Ο αλγόριθμος αυτός γράφεται στο λογισμικό περιβάλλον της αντλίας που εμπεριέχει «παράθυρο» για την

εκτέλεση εντολών από το χρήστη (Editor's tab). Παρακάτω δίδεται ο αλγόριθμος που χρησιμοποιήθηκε για το συγκεκριμένο σκοπό του πειράματος.

- `pump.initialize_pump(output = 'right')`

Αρχικοποίηση της αντλίας και ορισμός της θέσης της βαλβίδας εξόδου που συνδέεται με τη συσκευή

- `pump.property_set('speed', '20')`

Καθορισμός ταχύτητας του εμβόλου της σύριγγας που αντιστοιχεί σε συγκεκριμένη παροχή

- `pump.send_Command('A3000')`

#Καθορισμός της θέσης στην οποία θα μετακινηθεί το έμβολο. A3000 αντιστοιχεί στην κάτω θέση του εμβόλου. Η σύριγγα γεμίζει σε αυτή τη θέση με 1000 μl

- `pump.valve_command('in')`

Εντολή για την αλλαγή θέσης της βαλβίδας

- `pump.property_set('speed', '1')`

Καθορισμός ταχύτητας του εμβόλου της σύριγγας που αντιστοιχεί σε συγκεκριμένη παροχή. Επιλέγεται η πιο γρήγορη ταχύτητα.

- `pump.send_Command('A0')`

#Καθορισμός της θέσης στην οποία θα μετακινηθεί το έμβολο. A0 αντιστοιχεί στην πάνω θέση του εμβόλου. Η σύριγγα αδειάζει σε αυτή τη θέση 1000 μl (στο δοχείο που συνδέεται με τη βαλβίδα "input").

- `pump.valve_command('out')`

Αλλαγή της θέσης της βαλβίδας στη θέση εξόδου ("output") που συνδέεται με τη συσκευή

- `pump.property_set('speed', '20')`

Καθορισμός ταχύτητας του εμβόλου της σύριγγας. Καθορίζεται η ίδια ταχύτητα για τη συνεχή παροχή

- `pump.send_Command('A3000')`

B.7 Εναλλαγή Ρευστού σε Πορώδες Ικρίωμα Κολλαγόνου Μέσω Εναλλασσόμενης Εξαναγκασμένης Ροής

Υλικά:

- Διάλυμα συγκέντρωσης 50 μM Tris (tris(hydroxymethyl)aminomethane), pH8
- Φθορίζον διάλυμα FITC (Sigma-Aldrich) συγκέντρωσης 10 μM
- Πορώδες ικρίωμα κολλαγόνου κυλινδρικής μορφής διαμέτρου 4 mm

Εξοπλισμός:

- Φασματόμετρο μέτρησης φθορισμού (CytoFluor Series 4000)
- Συσκευή καλλιέργειας κυττάρων στο πορώδες ικρίωμα κολλαγόνου
- Αντλία σύριγγας Cavnro XP3000 Modular Digital Pump
- 96well polystyrene plate

Διαδικασία:

- Τα ικρίωματα κολλαγόνου ($d=4$ mm) τοποθετούνται στο θάλαμο της συσκευής η οποία συνδέεται με την αντλία
- Προστίθεται στη δεξαμενή υποδοχής ρευστού διάλυμα tris ~ 400 μl και η αντλία ρουφά ~ 50 μl tris έτσι ώστε να γεμίσει ο θάλαμος και να υγροποιηθεί το ικρίωμα
- Μετά από 10 λεπτά η αντλία ρουφά όλο το διάλυμα tris μέχρι να αδειάσει ο θάλαμος
- Προστίθεται στη δεξαμενή υποδοχής ρευστού διάλυμα 10 μM FITC όγκου 80 μl το πολύ
- Η αντλία έχει προγραμματιστεί να τραβήξει ~ 45 μl από το FITC ώστε να γεμίσει ο θάλαμος, χωρίς να πέσει υγρό στο χώρο συλλογής, και έπειτα ξεκινά να σπρώχνει και να τραβά 15 μl τα οποία μένουν στο θάλαμο και δημιουργούν εναλλασσόμενη ροή. Το βήμα αυτό επαναλαμβάνεται πολλές φορές ανάλογα με την παροχή και τη χρονική διάρκεια που εκτελείται το πείραμα. Τέλος η αντλία απορροφά όλο τον όγκο του διαλύματος ώστε να καταλήξει στο δοχείο συλλογής. Οι χρονικές στιγμές που επιλέχθηκαν για αυτό το βήμα είναι $t = \frac{1}{2}, 1, 2, 3$ min.
- Μετά το πέρας της ροής, το ικρίωμα βγαίνει από το θάλαμο και τοποθετείται σε μία πλάκα (96well plate) με 80 μl tris
- Μετά από 2 ώρες (το σύστημα φτάνει σε ισορροπία) το ικρίωμα αφαιρείται και το διάλυμα που απομένει
- Με μια 100 μl πιπέτα μεταφέρονται 75 μl του διαλύματος σε μια πλάκα (96well plate) και το διάλυμα μετريέται στο φασματόμετρο φθορισμού, CytoFluor.

- Μέσω της γραμμικής καμπύλης βαθμονόμησης, όπως εξηγήθηκε και στο προηγούμενο πείραμα υπολογίζεται η συγκέντρωση του τελικού διαλύματος

Κώδικας για την αντλία

Ο αλγόριθμος που ακολουθεί γράφτηκε για τη στιγμή που αντλία ωθεί το στο θάλαμο του ικριώματος μέχρι και το πέρας της εναλλασσόμενης ροής από την αντλία.

```

pump.initialize_pump(output = 'right')

# Αρχικοποίηση της αντλίας

pump.property_set('speed', '25')

# Καθορισμός ταχύτητας του εμβόλου της σύριγγας που αντιστοιχεί σε συγκεκριμένη
παροχή (για το πείραμα οι ταχύτητες που χρησιμοποιήθηκαν είναι 25, 30)

pump.volume_command(direction = 'P', vol = '45')

# Καθορισμός της διεύθυνσης της σύριγγας (direction = 'P', προς τα κάτω για να
τραβήξει αέρα) και του όγκου σε  $\mu\text{L}$  που θα μετακινήσει (vol = '45')

pump.property_set('speed', '25')

# Καθορισμός της ίδιας ταχύτητας του εμβόλου της σύριγγας για επαλήθευση

pump.volume_command(direction = 'D', vol = '15')

# Καθορισμός της διεύθυνσης της σύριγγας (direction = 'D', προς τα πάνω για να
σπρώξει αέρα και να οδηγηθεί το ρευστό στο θάλαμο προς τα πάνω) και του όγκου σε
 $\mu\text{L}$  που θα μετακινήσει (vol = '15')

pump.volume_command(direction = 'P', vol = '15')
pump.volume_command(direction = 'D', vol = '15')
pump.volume_command(direction = 'P', vol = '15')
pump.volume_command(direction = 'P', vol = '150')

# Η αντλία οδηγεί στο θάλαμο συλλογής ρευστού όλο το διάλυμα FITC

```

Επαναλαμβάνεται n φορές
ανάλογα με την επιθυμητή
διάρκεια της ροής

B.8 Προσδιορισμός του Εύρους των Παροχών της Αντλίας που δεν Διαταράσσουν την Κυτταρική Καλλιέργεια

Υλικά:

- PBS, sterile, φυλάσσεται στους 4°C.
- DMEM++ cell culture medium (DMEM plus 10% FBS, 1% penicillin/streptomycin)
- 3mm πάχους φύλλα πορώδους ικρίωματος κολλαγόνου, αποστειρωμένα και αποθηκευμένα σε αλουμινόχαρτο σε θερμοκρασία δωματίου
- Συμβατικές πλάκες καλλιέργειας (24-well polystyrene plate)
- 0.2% διάλυμα αγαρόζης
- Διάλυμα κολλαγενάσης (Collagenase stock (10mg/ml))
- Χειρουργική τσιμπίδα

Εξοπλισμός:

- Water bath
- Biological Hood
- Cell incubator (CO₂ 5%, 37° C)
- Microscope
- Hemocytometer (Αιμοκυτταρόμετρο)
- Χύτρα αποστείρωσης
- Eppendorf tube 0.6 ml
- Συσκευή καλλιέργειας κυττάρων στο πορώδες ικρίωμα κολλαγόνου
- Αντλία σύριγγας Canto XP3000 Modular Digital Pump

Προετοιμασία:

- Καθαρίζουμε όλα τα μέρη από τα οποία αποτελείται η συσκευή (πλυσίματα με σαπουνόνερο, νερό και 70% αιθανόλη) και αποστειρώνουμε σε χύτρα αποστείρωσης
- Κόβουμε μέσα στο bio-hood με biopsy punch κυλινδρικά κομμάτια πορώδους ικρίωματος κολλαγόνου διαμέτρου 4 mm
- Στην 24well plate εισάγονται 300 μl αγαρόζης και αφήνονται να εξατμιστούν για ~ 8 ώρες (overnight)
- Όπως αναλυτικά αναφέρεται στο Παράρτημα B2 εισάγουμε σε κάθε δείγμα από το πορώδες ικρίωμα κύτταρα πυκνότητας 30000/ δείγμα, βάζουμε θρεπτικό και αφήνουμε (incubator) τα κύτταρα να προσκολληθούν για μια ημέρα. Η κυτταρική σειρά που χρησιμοποιείται είναι ινοβλάστες (HDF p12)

Διαδικασία:

- Θερμαίνεται το PBS και το θρεπτικό (DMEM++) στο water bath στους 37°C για 10 min.
- Η πλάκα με τα τους ινοβλάστες μέσα στα ικρίωματα κολλαγόνου ψεκάζεται με 70% αιθανόλη και εισάγεται στο bio-hood
- Με μια 1000ul πιπέτα απορροφάται από την πλάκα το θρεπτικό
- Με την τσιμπίδα το πορώδες ικρίωμα τοποθετείται στο θάλαμο της συσκευής
- Η συσκευή βιδώνεται και τοποθετείται στο θάλαμο εισαγωγής ρευστών θρεπτικό DMEM++ (~ 100 μl)
- Η αντλία έχει προγραμματιστεί να τραβήξει ~ 45 μl από το θρεπτικό ώστε να γεμίσει ο θάλαμος, χωρίς να πέσει υγρό στο χώρο συλλογής, και έπειτα ξεκινά να σπρώχνει και να τραβά 15 μl τα οποία μένουν στο θάλαμο και δημιουργούν εναλλασσόμενη ροή. Το βήμα αυτό επαναλαμβάνεται πολλές φορές ανάλογα με την παροχή ώστε ο συνολικός χρόνος της ροής να διαρκέσει 1 λεπτό. Τέλος η αντλία απορροφά όλο τον όγκο του διαλύματος ώστε να καταλήξει στο δοχείο συλλογής.
- Το δοχείο συλλογής αποθηκεύεται και μετريέται ο συνολικός αριθμός κυττάρων του ρευστού με το αιμοκυτταρόμετρο (κατά τα γνωστά, εδάφιο 3.1.2)
- Η συσκευή ανοίγεται και το ικρίωμα συλλέγεται σε ένα 0,6 ml eppendorf tube
- Γίνεται μια πλύση του θαλάμου της συσκευής με την αντλία εισάγοντας ~ 1 ml PBS και τραβώντας τα με την αντλία με συνεχή παροχή
- Μετά το πέρας αυτού του βήματος εισάγονται εκ νέου στο σύστημα της συσκευής καινούργια δείγματα και επαναλαμβάνεται η ίδια διαδικασία

Αποικοδόμηση ικρίωματος και μέτρηση κυττάρων

Την 1^η μέρα μετά την εισαγωγή των ινοβλαστών στα ικρίωματα κολλαγόνου σε δύο από τα συνολικά δείγματα μετριέται ο συνολικός αριθμός κυττάρων που έχουν εισαχθεί μέσα στο ικρίωμα. Η μέτρηση γίνεται με αποικοδόμηση του ικρίωματος με διάλυμα κολλαγενάσης και μέτρηση με το αιμοκυτταρόμετρο. Η διαδικασία γίνεται ως εξής:

- Η κολλαγενάση συγκέντρωσης 10mg/ml, ψεκάζεται με 70% αιθανόλη και αφήνεται να ξεπαγώσει στο bio-hood
- Για κάθε δείγμα ικρίωματος, προετοιμάζεται διάλυμα 100μl σε Eppendorf tube 0,6ml. Η κολλαγενάση επιθυμώ να έχει συγκέντρωση 2mg/ml, οπότε διαλύεται σε DMEM++ (για διάλυμα 100μl είναι 20 μl κολλαγενάση, 9 μl που βρίσκονται ήδη παγιδευμένα στο ικρίωμα. Άρα προστίθεται 100-29= 71 μl DMEM++)
- Η πλάκα 12-well plate εισάγεται από τον incubator στο bio-hood
- Απορροφάται το θρεπτικό που υπάρχει γύρω από τα δείγματα σε κάθε well

- Τα πορώδη ικρίωματα τοποθετούνται ξεχωριστά στα δοχεία (Eppendorf tube 0,6ml) που περιέχουν το διάλυμα της κολλαγενάσης, με τη βοήθεια της χειρουργικής τσιμπίδας
- Τα δοχεία που φέρουν τα υλικά τοποθετούνται για 1 ώρα στον incubator
- Μετά τη 1 ώρα αναμένεται το κολλαγόνο να έχει διαλυθεί στο μίγμα της κολλαγενάσης. Εάν είναι ακόμη ορατά κομμάτια του υλικού αφήνεται στον incubator για περίπου μισή ώρα
- Όταν πιο το κολλαγόνο έχει διαλυθεί το tubes εισάγονται στο bio-hood και με μια πιπέτα ανακατεύεται το διάλυμα πολύ καλά
- Ελέγχεται εάν ο όγκος σε κάθε tube είναι 100 μl (το ικρίωμα μπορεί να μην έχει συγκρατήσει ακριβώς 9 μl, όπως ειπώθηκε πιο πάνω)
- Για κάθε δείγμα υπολογίζεται ο αριθμός των κυττάρων με τη βοήθεια του αιμοκυτταρόμετρου ($N_{cells} = \mu * d * V * 10^4$)

6. Βιβλιογραφία

6.1 Άρθρα σε Επιστημονικά Περιοδικά

1. Sara Pedron, Eftalda Becka, and Brendan A. Harley: Spatially Graded Hydrogel Platform as a 3D Engineered Tumor Microenvironment. *Adv.Mat* 2014
2. Weaver, V. M. *et al.* *J. Cell Biol.* **137**, 231–245 (1997)
3. I. V. Yannas, D. S. Tzeranis, B. A. Harley and P. T. C. SO: Biologically active collagen-based scaffolds: advances in processing and characterization. *Phil. Trans. R. Soc. A* (2010) **368**, 2123–2139
4. Eric C. Soller, Dimitrios S. Tzeranis, Kathy Miu, Peter T.C. So, Ioannis V. Yannas: Common features of optimal collagen scaffolds that disrupt wound contraction and enhance regeneration both in peripheral nerves and in skin. *Biomaterials* 33 (2012) 4783 – 4791
5. Fergal J. O’Brien, Brendan A. Harley, Ioannis V. Yannas, Lorna Gibson: Influence of freezing rate on pore structure in freeze-dried collagen-GAG scaffolds. *Biomaterials* 25 (2004) 1077–1086
6. Hollister SJ, Maddox RD, Taboas JM: Optimal design and fabrication of scaffolds to mimic tissue properties and satisfy biological constraints. *Biomaterials* 2002;23(20):4095–103.
7. Steven R. Caliari and Brendan A.C. Harley: The effect of anisotropic collagen-GAG scaffolds and growth factor supplementation on tendon cell recruitment, alignment and metabolic activity. *Biomaterials*. 2011 August: 32(23): 5330–5340
8. Aurora T. Alsop, Jacquelyn C. Pence, Daniel W. Weisgerber, Brendan A.C. Harley, Ryan C. Bailey: Photo patterning of vascular endothelial growth factor within collagen-glycosaminoglycan scaffolds can induce a spatially confined response in human umbilical vein endothelial cells. *Acta Biomaterialia* (2014)
9. Steven R. Caliari , Emily A. Gonnerman , William K. Grier , Daniel W. Weisgerber ,Jessica M. Banks , Aurora J. Alsop , Jae-Sung Lee , Ryan C. Bailey , and Brendan A. C. Harley: Collagen Scaffold Arrays for Combinatorial Screening of Biophysical and Biochemical Regulators of Cell Behavior. *Adv. Healthcare Mater.* 2014
10. Steven R. Caliari, et al.: Periodically perforated core shell collagen biomaterials balance cell infiltration, bioactivity and mechanical properties. *J Biomed Mater Res Part A* 2014: 102A:917-927
11. Aurora T. Alsop, Jacquelyn C. Pence, Daniel W. Weisgerber, Brendan A.C. Harley, Ryan C. Bailey: Photo patterning of vascular endothelial growth factor within collagen-glycosaminoglycan scaffolds can induce a spatially confined response in human umbilical vein endothelial cells. *Acta Biomaterialia* (2014)

12. Steven R. Caliarì and Brendan A.C. Harley: The effect of anisotropic collagen-GAG scaffolds and growth factor supplementation on tendon cell recruitment, alignment, and metabolic activity. *Biomaterials* 2011 August 32(23): 5330–5340
13. Sylvie I. Ertel¹, Buddy D. Ratner^{1, 2,*}, Amarjeev Kaul³, Michael B. Schway³ and Thomas A. Horbett^{1, 2}: *In vitro* study of the intrinsic toxicity of synthetic surfaces to cells. Article first published online: 13 SEP 2004 (DOI: 10.1002/jbm.820280603)
14. Rebecca A. Hortensius, Brendan A.C. Harley: The use of bioinspired alterations in the glycosaminoglycan content of collagen - GAG scaffolds to regulate cell activity. In Elsevier, *Biomaterials* 2013 Oct,34(31)
15. Steven R. Caliarì , Emily A. Gonnerman , William K. Grier , Daniel W. Weisgerber , Jessica M. Banks , Aurora J. Alsop , Jae-Sung Lee , Ryan C. Bailey and Brendan A. C. Harley: Collagen Scaffold Arrays for Combinatorial Screening of Biophysical and Biochemical Regulators of Cell Behavior. In *Adv. Healthcare Mater.* 2014

6.2 Βιβλία – Παραδόσεις

16. Dimitrios S. Tzeranis, *Imaging Studies of Peripheral Nerve Regeneration Induced by Porous Collagen Biomaterials*, Massachusetts Institute of Technology, September 2013
17. Μ. Ιωάννου, Διπλωματική Εργασία, «Βελτιστοποίηση Καλλιέργειας Ινοβλαστών σε Ικρίωματα από Κολλαγόνο για Πρωτεωμικές Μελέτες Σηματοδότησης», ΕΜΠ, Αθήνα 2015.
18. Sindy K.Y. Tang and George M. Whitesides, Chapter 2: ‘Basic Microfluidic and Soft Lithographic Techniques’, Department of Chemistry and Chemical Biology, Harvard University 2009
19. Eric Oberg, Franklin D. Jones, Holbrook L. Horton, and Henry H. Ryffel: 27th Edition *Machinery’s Handbook*, Industrial Press Inc. New York, 2004
20. Σ. Τσαγγάρης, ‘Μηχανική των Ρευστών’, Αθήνα 2005, Εκδόσεις Συμεών

6.3 Ιστότοποι

21. <http://www.scq.ubc.ca/cell-culture/>
22. <http://www.nature.com/drugdisc/news/articles/424870a.html#b3>
23. <https://3dbiomatrix.com/wp-content/uploads/2013/10/5-Reasons-Cancer-Researchers-Adopt-3D-Cell-Culture-White-Paper.pdf>
24. http://www.microtissues.com/three_dimensional_3d_cell_culture_versus_two_dimensional_2d_cell_culture.htm
25. https://en.wikipedia.org/wiki/Cell_culture
26. <http://techtv.mit.edu/videos/10604-artificial-skin---ioannis-yannas-1982>

27. <http://info.gbiosciences.com/blog/bid/164400/What-is-Cell-Cytotoxicity-and-How-to-Measure-It>
28. http://www3.appliedbiosystems.com/cms/groups/mcb_support/documents/generaldocuments/cms_041570.pdf
29. <http://en.wikipedia.org/wiki/Hemocytometer>
30. http://en.wikipedia.org/wiki/Bicinchoninic_acid_assay
31. <http://www.assay-protocol.com/biochemistry/BCA-assay>
32. <https://tools.lifetechnologies.com/content/sfs/brochures/TR0057-Read-std-curves.pdf>
33. <http://en.wikipedia.org/wiki/Lysis>
34. <http://www.eppendorf.com/int/index.php?sitemap=2.1&action=products&contentid=1&catalognode=9775&productpage=3>
35. <https://github.com/bergercookie/Pump3000>
36. <http://bergercookie.github.io/Projects/Pump3000/installation.html#using-the-software>
37. https://www.parker.com/literature/ORD%205700%20Parker_O-Ring_Handbook.pdf