



Εθνικό Μετσόβιο Πολυτεχνείο
Σχολή Μηχανολόγων Μηχανικών

Εργαστήριο Εμβιομηχανικής και Συστημικής Βιολογίας
Τομέας Μηχανολογικών Κατασκευών και Αυτομάτου Ελέγχου

Διπλωματική Εργασία

**Λεπτά Πορώδη Ικρίώματα Κολλαγόνου: Παρασκευή,
Χαρακτηρισμός και Εφαρμογή στη Μελέτη Φαρμάκων**

Σαρκίρη Μαρία

Επιβλέπων Καθηγητής: Λεωνίδας Αλεξόπουλος, Επ. Καθηγητής
Επιβλέπων: Δημήτριος Τζεράνης

Αθήνα 2016



Εθνικό Μετσόβιο Πολυτεχνείο
Σχολή Μηχανολόγων Μηχανικών

Εργαστήριο Εμβιομηχανικής και Συστημικής Βιολογίας
Τομέας Μηχανολογικών Κατασκευών και Αυτομάτου Ελέγχου

Διπλωματική Εργασία

**Λεπτά Πορώδη Ικρίώματα Κολλαγόνου: Παρασκευή,
Χαρακτηρισμός και Εφαρμογή στη Μελέτη Φαρμάκων**

Σαρκίρη Μαρία

Επιβλέπων: Επίκουρος Καθηγητής Λεωνίδας Αλεξόπουλος

Εγκρίθηκε την από την τριμελή εξεταστική επιτροπή:

.....
Αλεξόπουλος Λεωνίδας	Προβατίδης Χριστόφορος	Τσαγγάρης Σωκράτης
Επ. Καθηγητής ΕΜΠ	Καθηγητής ΕΜΠ	Καθηγητής ΕΜΠ

Αθήνα, Ιούλιος 2016

.....

Σαρκίρη Μαρία

Διπλωματούχος Μηχανολόγος Μηχανικός ΕΜΠ

Copyright © Σαρκίρη Μαρία, 2016

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 θερμά τον κ. Αλεξόπουλο για την ευκαιρία που μου έδωσε να γίνω μέλος του εργαστηρίου του. Οι γνώσεις και οι εμπειρίες που απέκτησα κατά τη διεξαγωγή της διπλωματικής μου εργασίας είναι πολύτιμες και πολύπλευρες.

Θα ήθελα να ευχαριστήσω όλα τα μέλη του εργαστηρίου για την όμορφη συνεργασία και την βοήθεια που μου παρείχε ο καθένας στον τομέα του. Θερμές ευχαριστίες οφείλω στον κ. Δημήτρη Τζεράνη για όλη την καθοδήγηση, γνώση και στήριξη που μου πρόσφερε καθ' όλη τη διάρκεια εκπόνησης της παρούσας εργασίας. Ακόμη ευχαριστώ πολύ τον Jan Rozanc για τον χρόνο και τη γνώση που διέθεσε για το βιολογικό κομμάτι της εργασίας. Ευχαριστώ τον Μιχάλη Σαλούφα και την Αναστασία Γκιουσουδή για την εκμάθηση χρήσης της πρέσας μηχανικών δοκιμών, ενώ πολύτιμη ήταν η συμβολή της κ. Αντωνία Μαλένου σε κατασκευαστικό κομμάτι της εργασίας και του κ. Λάμπρου Πατσιούρα στην εξοικείωση με την διαδικασία της ηλεκτρονικής μικροσκοπίας σάρωσης. Ευχαριστώ ακόμα τον Θεόδωρο Σακελλαρόπουλο, τη Μαρίνα Ιωάννου, την Ιωάννα Πρέζα, τον Άλεξ Πολέσιουκ και τον Νίκο Καβαλόπουλο για τη βασική εκπαίδευση που μου προσέφεραν στις πρώτες μου επαφές με το εργαστήριο.

Ευχαριστώ πολύ τους γονείς μου, Γιώργο και Μαρία, τον αδερφό μου, Νίκο και τη θεία μου, Φωτεινή για όλη την αγάπη και υποστήριξη που μου δίνουν πάντα. Ακόμη, ευχαριστώ τους φίλους μου που με συνόδευσαν σταθερά και ουσιαστικά κατά την πορεία μου στη Σχολή των Μηχανολόγων Μηχανικών και μου έδωσαν δύναμη όσες φορές με κυρίευσε το άγχος. Ιδιαίτερος ευχαριστώ τους Δημήτρη Χριστοδούλου και Μιχάλη Παντερή που καθ' όλη τη διάρκεια των σπουδών μας συνεργαστήκαμε άψογα και καταφέραμε να αποφοιτήσουμε παρέα. Τελός, ευχαριστώ πολύ τον Απόστολο Κρυσταλλίδη που τα δύο τελευταία χρόνια των σπουδών μου με στήριζε και με εμπύχωνε διαρκώς.

Περίληψη

Η αλληλεπίδραση των κυττάρων μέσα στους ζωντανούς οργανισμούς με την τρισδιάστατη εξωκυττάρια μήτρα είναι το βασικό κίνητρο για την ανάπτυξη των *in vitro* συστημάτων τρισδιάστατης κυτταρικής καλλιέργειας, όπου τα κύτταρα καλλιεργούνται και μελετώνται μέσα σε βιοϋλικά. Τέτοια συστήματα υπόσχονται κυτταρικές μελέτες σε ένα περιβάλλον περισσότερο φυσιολογικό σε σχέση με τις παραδοσιακές (δισδιάστατες) καλλιέργειες κυττάρων, όπου λαμβάνουν χώρα σε επίπεδες πλαστικές επιφάνειες.

Ένα πολλά υποσχόμενο βιοϋλικό για ανάπτυξη τρισδιάστατων κυτταροκαλλιιεργειών είναι τα πορώδη ικρίωματα. Πορώδη ικρίωματα κολλαγόνου έχουν ήδη σημαντική κλινική εφαρμογή στην αναγεννητική ιατρική, παρ' όλα αυτά περιορισμένη σε *in vitro* μελέτες. Η συντριπτική πλειοψηφία των *in vitro* εφαρμογών πορώδων ικρίωμάτων που αναφέρονται στην βιβλιογραφία χρησιμοποιούν ικρίωματα πάχους μερικών χιλιοστών. Δυστυχώς, οι δυσκολίες που έχουν παρατηρηθεί κατά την καλλιέργεια και μελέτη κυττάρων μέσα σε πορώδη ικρίωματα περιορίζουν την χρήση τους από την επιστημονική και βιομηχανική κοινότητα.

Πρόσφατα στα πλαίσια του ευρωπαϊκού ερευνητικού προγράμματος H2020 Als-on-a-chip (Δρ. Δ. Τζεράνης) αναπτύχθηκε μια διαδικασία κατασκευής λεπτών πορώδων ικρίωμάτων πάνω σε επιφάνειες που επιτρέπουν οπτική απεικόνιση (π.χ. γυαλί). Αυτά τα λεπτά πορώδη ικρίωματα υπόσχονται να λύσουν τις δυσκολίες καλλιέργειας (αργός ρυθμός ροής θεραπευτικών συστατικών, ανομοιόμορφη κατανομή των κυττάρων στο ικρίωμα) και μελέτης (γρήγορη διαδικασία, απεικόνιση σε τρισδιάστατο περιβάλλον) κυττάρων μέσα σε πορώδη ικρίωματα παρέχοντας συνάμα στα κύτταρα το κατάλληλο τρισδιάστατο περιβάλλον, βρίσκονται όμως ακόμα σε στάδιο ανάπτυξης και βελτιστοποίησης.

Σκοπός της παρούσας διπλωματικής εργασίας είναι η παρασκευή και ο χαρακτηρισμός τέτοιων λεπτών ικρίωμάτων κολλαγόνου (πάχους 100-200 μm) με σκοπό τη διερεύνηση των φυσικό-μηχανικών ιδιοτήτων τους, καθώς και του τρόπου με τον οποίο οι διάφορες παράμετροι της διαδικασίας παρασκευής τους επιδρούν σε αυτές. Τα λεπτά πορώδη ικρίωματα φιλοδοξούν να γίνουν ένα εύχρηστο και χρήσιμο σύστημα κυτταροκαλλιέργειας όπου οι μελετητές θα καλλιεργούν κύτταρα με παρόμοιο τρόπο όπως στις παραδοσιακές πλαστικές πλάκες. Η παρούσα εργασία παρουσιάζει την πρώτη πιλοτική εφαρμογή τους σε μια κυτταρική μελέτη, και συγκεκριμένα στην μελέτη της επίδρασης δύο φαρμάκων σε κακοήθη μελανοκύτταρα.

Abstract

The interaction of the cells within the living bodies with the three-dimensional extracellular matrix is the basic motive for the development of the *in vitro* 3D cell culture systems, in which the cells are cultured and studied into biomaterials. These systems promise cell cultures into a more physiological environment compared to the traditional 2D cell cultures into flat plastic systems.

A really promising biomaterial for the development of 3D cell cultures is the porous scaffold. Porous collagen scaffolds have already been implemented clinically in regenerative medicine, but their use is limited in *in vitro* studies. Most of the *in vitro* applications of porous scaffolds use scaffolds of thickness of a few millimeters. Unfortunately, the difficulties noticed when culturing and studying cells into these porous scaffolds restrict their use by the scientific and industrial community.

Recently, as part of the European research project H2020 ALS-on-a-chip (Dr. D. Tzeranis), a process of fabricating thin porous scaffolds on the top of surfaces, that facilitate imaging studies (e.g. glass), was developed. These thin scaffolds promise to solve difficulties in cell cultures (slow flow of nutrients, heterogeneous distribution of the cells into the biomaterial) and difficulties in cell study (easy procedure, imaging into the 3D environment), when the cells are cultured into porous scaffolds, offering, at the same time, an appropriate 3D environment to the cells. However, they are still in the phase of development and optimization.

The purpose of this diploma thesis is the fabrication and characterization of thin collagen scaffolds (100-200 microns of thickness) in order to notice their physical and mechanical characteristics, as well as, to examine the way that the various fabrications parameters influence these characteristics. The thin porous collagen scaffolds aspire to become a handy and useful cell culture system in which the researchers will culture cells similarly as in the plastic plates. This diploma thesis presents the first pilot implementation of the thin collagen scaffolds in a cell study, and specifically, in the study of the influence that two drugs have on malignant melanoma cells.

Πίνακας Περιεχομένων

Περίληψη.....	vii
Abstract.....	viii
1 Εισαγωγή	1
1.1 Σημαντικά χαρακτηριστικά των 3D ανάλογων της εξωκυττάριας μήτρας,	1
1.2 Μέθοδοι Παρασκευής Ικριωμάτων	2
1.3 Πορώδη Ικρίωματα Κολλαγόνου	3
1.4 Λεπτά ικρίωματα κολλαγόνου.....	5
1.5 Μελέτη Κακοηθών Μελανοκυττάρων	7
1.5.1 Τα Χαρακτηριστικά των Καρκινικών Κυττάρων	7
1.5.2 Καλλιέργεια καρκινικών κυττάρων στα ικρίωματα κολλαγόνου	8
1.6 Στόχοι της διπλωματικής	10
2 Πειραματικές Μέθοδοι και Κατασκευή Βιοϋλικών	11
2.1 Παρασκευή λεπτών ικριωμάτων.....	11
2.1.1 Επιφανειακή Κατεργασία με Πλάσμα.....	11
2.1.2 Λυοφιλοποίηση	13
2.1.3 Παρασκευή Φύλλων PDMS.....	15
2.2 Μέθοδοι Χαρακτηρισμού Λεπτών Ικριωμάτων	16
2.2.1 Ηλεκτρονική Μικροσκοπία Σάρωσης.....	17
2.2.2 Μέτρηση Μηχανικών Ιδιοτήτων των Ικριωμάτων	18
2.3 Εφαρμογή Λεπτών Πορώδων Ικριωμάτων στην Μελέτη Κακοηθών Μελανοκυττάρων .	19
2.3.1 Καλλιέργεια Μελανοκυττάρων στα Λεπτά Ικρίωματα.....	19
2.3.2 Απεικόνιση Κυττάρων Μέσω Μικροσκοπίας Φθορισμού.....	19
2.3.3 Ποσοτικοποίηση Έκφρασης Gardh μέσω της μεθόδου Luminex ELISA.....	20
3 Πειραματικός Σχεδιασμός και Αποτελέσματα	21
3.1 Παρασκευή ικριωμάτων	21
3.2 Χαρακτηρισμός Δομής Λεπτών Ικριωμάτων Μέσω Ηλεκτρονικής Μικροσκοπίας Σάρωσης (SEM).....	24
Μέτρηση Πάχους Λεπτών Ικριωμάτων	32
3.3 Μέτρηση Μηχανικών Ιδιοτήτων	35
3.4 Μελέτη Καλλιέργειας Μελανοκυττάρων	45
3.4.1 Πείραμα Απεικόνισης.....	45
3.4.2 Επίπεδα έκφρασης ενζύμου Gardh.....	47

4	Συζήτηση-Συμπεράσματα.....	49
4.1	Χαρακτηρισμός Ικριώματων	49
4.2	Κυτταρική Μελέτη	51
4.3	Κατασκευή συστήματος τρισδιάστατης καλλιέργειας.	52
	ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ Α.....	53
	ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ Β.....	67
5	Βιβλιογραφία	74
5.1	Άρθρα σε Επιστημονικά Πεδία	74
5.2	Βιβλία-παραδόσεις.....	75
5.3	Ιστοσελίδες	75

1 Εισαγωγή

Αρχικώς η βασική λειτουργία των ικριωμάτων αφορούσε καθαρά την εφαρμογή τους στην αναγεννητική ιατρική. Λεπτά φύλλα ικριωμάτων παρασκευάζονται και χρησιμοποιούνται ως τεχνητός ιστός για να επουλώσουν πληγές αλλά και για να δώσουν τη θέση τους σε νέο φυσικά σχηματιζόμενο ιστό σε μετέπειτα στάδιο. [20]

Με σκοπό την μελέτη και την κατανόηση της λειτουργίας των κυττάρων *in vivo*, πραγματοποιούνται πολλές *in vitro* κυτταρικές καλλιέργειες σε επίπεδες πλαστικές φλάσκες και έπειτα σε πλάκες πολλών βοθρίων (multi well-plates). Η ανάγκη οι *in vitro* μελέτες κυττάρων να συμπεριλαμβάνουν τις αλληλεπιδράσεις των κυττάρων με την τρισδιάστατη εξωκυττάρια μήτρα, έχει καταστήσει σημαντική την μετάβαση από τη δισδιάστατη καλλιέργεια κυττάρων (σε πλάκες), στην τρισδιάστατη καλλιέργεια κυττάρων (αυτή όπου τα κύτταρα καλλιεργούνται μέσα σε βιοϋλικά). Σε αυτή την περίπτωση, τα βιοϋλικά αποτελούν ένα τεχνητό κυτταρικό περιβάλλον που προσομοιώνει την εξωκυττάρια μήτρα με την οποία τα κύτταρα αλληλεπιδρούν στους ιστούς. Ως αποτέλεσμα πιο αντιπροσωπευτικά πειράματα *in vitro* μπορούν να διεξαχθούν και πιο ασφαλή συμπεράσματα απορρέουν.

Προς αυτή την κατεύθυνση πραγματοποιούνται συνεχώς μελέτες με σκοπό την εύρεση των καταλληλότερων βιοϋλικών και των πιο αποτελεσματικών μεθόδων παρασκευής ώστε τα παραγόμενα ικριώματα να έχουν τις επιθυμητές ιδιότητες για την αντιπροσωπευτική αλληλεπίδραση με τα κύτταρα.

1.1 Σημαντικά χαρακτηριστικά των 3D ανάλογων της εξωκυττάριας μήτρας.

Ανεξάρτητα με τη μέθοδο παρασκευής τους τα ικριώματα που χρησιμοποιούνται για *in vitro* μελέτες με κύτταρα οφείλουν να έχουν κάποια βασικά χαρακτηριστικά ώστε να έχουν ουσιώδη πλεονεκτήματα συγκριτικά με τις δισδιάστατες καλλιέργειες.

- Οφείλουν να είναι ικανοποιητικώς πορώδη ώστε τα κύτταρα να μπορούν να κινούνται και να μεταναστεύουν μέσα σ αυτά, όπως συμβαίνει *in vivo*. Η ύπαρξη πόρων διευκολύνει επίσης τη μεταφορά θρεπτικών συστατικών μέσα στο ικρίωμα για την επιβίωση των κυττάρων.
- Ο ρυθμός αποικοδόμησής των ικριωμάτων δεν πρέπει να είναι πολύ γρήγορος ώστε να δίνεται χρόνος στα κύτταρα να αναπτυχθούν και να λειτουργήσουν φυσιολογικά.
- Είναι απαραίτητο τα ικριώματα να είναι βιοσυμβατά, με μηδαμινό βαθμό τοξικότητας ή μόλυνσης για τα κύτταρα.
- Επιπλέον προσόν θεωρείται το βασικό συστατικό των ικριωμάτων να αποτελεί συστατικό της εξωκυττάριας μήτρας. Αυτό βοηθάει ώστε το βιοϋλικό να προσομοιώνει καλύτερα την εξωκυττάρια μήτρα.
- Τέλος, παρ' ότι έχει αναφερθεί και παρασκευή ικριωμάτων πάχους μερικών μόνο νανομέτρων [3], τα ικριώματα που χρησιμοποιούνται ως ανάλογα της εξωκυττάριας μήτρας για *in vitro* μελέτες, θα πρέπει να έχουν ορισμένο πάχος (τουλάχιστον μερικές δεκάδες μικρόμετρα), προσδίδοντας έτσι στα κύτταρα το τρισδιάστατο περιβάλλον που είναι απαραίτητο.

1.2 Μέθοδοι Παρασκευής Ικριωμάτων

Όπως αναφέρθηκε στο εδάφιο 1.1, ανάλογα με τα πειράματα που ενδιαφέρεται να διεξάγει ο ερευνητής, τις παραμέτρους που θέλει να εξετάσει, καθώς και με τις επιθυμητές ιδιότητες και την τάξη μεγέθους των παραχθέντων ικριωμάτων (από νανοδομή μέχρι και πάχη μερικών χιλιοστών), χρησιμοποιούνται διάφορες μέθοδοι παρασκευής ικριωμάτων.

- Λυοφιλοποίηση (freeze-drying)

Η λυοφιλοποίηση αποτελεί ουσιαστικά μέθοδο αφυδάτωσης. Εδώ, το εναιώρημα των βιοϋλικών ψύχεται σε πρώτο στάδιο ώστε να δημιουργηθεί ένα δίκτυο κρυστάλλων πάγου. Έπειτα μειώνεται η πίεση, με παράλληλη αύξηση της θερμοκρασίας, ώστε να επιτραπεί η απευθείας μετάβαση του παγωμένου νερού που υπάρχει στο υλικό από τη στέρεα στην αέρια φάση. Αυτή η εξάχνωση ουσιαστικά παράγει τα πορώδη ικριώματα. [4, 19]

Τα συχνότερα συστατικά που επιλέγονται σε αυτήν τη μέθοδο παρασκευής ικριωμάτων είναι το κολλαγόνο τύπου I, ο συνδυασμός του κολλαγόνου με γλυκοζαμινογλυκάνες, καθώς και η ζελατίνη. Η επιλογή οφείλεται στην παρουσία των συγκεκριμένων συστατικών στην εξωκυττάρια μήτρα.

- Διήθηση άλατος (Salt leaching)

Σε αυτή τη μέθοδο, κρύσταλλοι άλατος τίθενται στο επιθυμητό καλούπι, ενώ το πολυμερές που θα αποτελέσει το υλικό των ικριωμάτων εγχύεται πάνω στους κρυστάλλους άλατος διεισδύοντας στους μικρούς σχηματιζόμενους χώρους ανάμεσά σε αυτούς. Καθώς το πολυμερές σκληρύνεται, το αλάτι διαλύεται με την προσθήκη διαλύτη, με αποτέλεσμα το παραμένον να είναι το σκληρυμένο πολυμερές με ανοιχτούς πόρους στις θέσεις όπου αρχικά υπήρχε αλάτι. [5]

Με αυτή τη μέθοδο παράγονται ικριώματα από τεχνητά πολυμερή όπως το poly(lactic-co-glycolicacid) (PLGA), το polylacticacid (PLA) και το Polyethyleneglycol (PEG).

- Κρυογέλες (Cryogelation)

Εδώ, το εναιώρημα των κρυογελών, αφού τοποθετηθεί σε γυάλινο κυλινδρικό καλούπι, ψύχεται σε χρονικό διάστημα 20-30 λεπτών μέχρι τους $-12\text{ }^{\circ}\text{C}$ όπου και διατηρείται σε αυτή τη θερμοκρασία για περίπου ένα οκτώωρο. Ακολουθεί τήξη σε θερμοκρασία δωματίου, δημιουργώντας ένα κυλινδρικού σχήματος ικρίωμα, το οποίο δύναται να κοπεί σε τεμάχια διαφορετικών παχών ανάλογα με την μετέπειτα διεξαγόμενη μελέτη [1]

Πολυμερή ή και μονομερή διαλύματα είναι κατάλληλες επιλογές για την παρασκευή κρυογελών ικριωμάτων, συνήθως σε συνδυασμό με κάποια γέλη (gel).

- Σωματίδια βιοανθρακικού αμμωνίου

Ένας εναλλακτικός τρόπος παρασκευής ικριωμάτων πάχους μερικών εκατοντάδων μικρομέτρων, αποτελεί η ανάμιξη πολυμερούς διαλύματος και χλωροφόρμιου με σωματίδια βιοανθρακικού αμμωνίου. Το ιξώδες διάλυμα που προκύπτει χυτεύεται σε κατάλληλο δοχείο κι αφού εξατμιστεί το χλωροφόρμιο, το μίγμα ψήνεται κατά τη διάρκεια μιας ολόκληρης νύχτας. Μέσα σ' αυτό το χρόνο, τα σωματίδια βιοανθρακικού αμμωνίου διασπώνται σε αμμωνία,

διοξειδίου του άνθρακα και νερό, αφήνοντας ανοιχτούς πόρους. Ως αποτέλεσμα έχει προκύψει το πορώδες ικρίωμα.[2]

- Τρισδιάστατη Εκτύπωση (3D Printing)

Έχει αναφερθεί ακόμη, παρασκευή ικριωμάτων μέσω τρισδιάστατης εκτύπωσης. [13] Σε αυτήν τη μέθοδο, η σκόνη κάποιου πολυμερούς απλώνεται αρχικά στην πλατφόρμα κατασκευής και έπειτα ένα συνδεδειγμένο διάλυμα εγχύεται σε καθορισμένες περιοχές που ορίζουν τη δομή του ικριώματος. Έπειτα απομακρύνεται η περίσσεια σκόνη. Στη συνέχεια, η πλατφόρμα κατασκευής χαμηλώνει και η διαδικασία επαναλαμβάνεται μέχρι την παρασκευή της τελικής δομής. Στην συγκεκριμένη μέθοδο, υπάρχει ποικιλία σε σκόνες πολυμερούς και συνδεδειγμένα υλικά ανάλογα με τα επιθυμητά χαρακτηριστικά των ικριωμάτων. Παρ' όλ' αυτά είναι σημαντικό μετά την τελική παρασκευή των ικριωμάτων και πριν την επαφή τους με κύτταρα ή τον ζωντανό ιστό, να έχει αφαιρεθεί πλήρως το συνδεδειγμένο υλικό καθώς μπορεί να είναι τοξικό.

- Μέθοδοι nano-scaffolding

Υπάρχουν ακόμη και μερικοί τρόποι παρασκευής ικριωμάτων της τάξεως λίγων μικρομέτρων ή ακόμα και νανομέτρων. Παρ' ότι όπως εξηγήθηκε προηγουμένως βιοϋλικά με πόρους της τάξης νανομέτρων δεν εξυπηρετεί τις *in vitro* μελέτες, αναφέρονται παρακάτω μερικοί μέθοδοι παρασκευής τέτοιων ικριωμάτων που αναφέρονται στην βιβλιογραφία [3]:

- ❖ Electrospinning: Μέθοδος παραγωγής ινών με χρήση ηλεκτρικής δύναμης για την έλξη των φορτισμένων νημάτων του διαλύματος πολυμερούς. Δημιουργείται ένα δίκτυο από αυτά τα νήματα κι έτσι προκύπτουν οι πόροι.
- ❖ Διαχωρισμός φάσεων: Στην περίπτωση πολυμερούς εναιωρήματος, με την αλλαγή θερμοκρασίας, αυτό διαχωρίζεται σε ένα τμήμα πλούσιο σε πολυμερές και σε ένα φτωχό στο πολυμερές. Με χρήση κενού ή της διαδικασίας της λυοφιλοποίησης, αφαιρείται ο διαλύτης και σχηματίζεται πορώδες ικρίωμα νανοδομής.
- ❖ Λιθογραφία: Επιφανειακές νανοτοπογραφίες τυπώνονται πάνω στο βιοϋλικό με γεωμετρικά οργανωμένα μοτίβα.

1.3 Πορώδη Ικρίωματα Κολλαγόνου

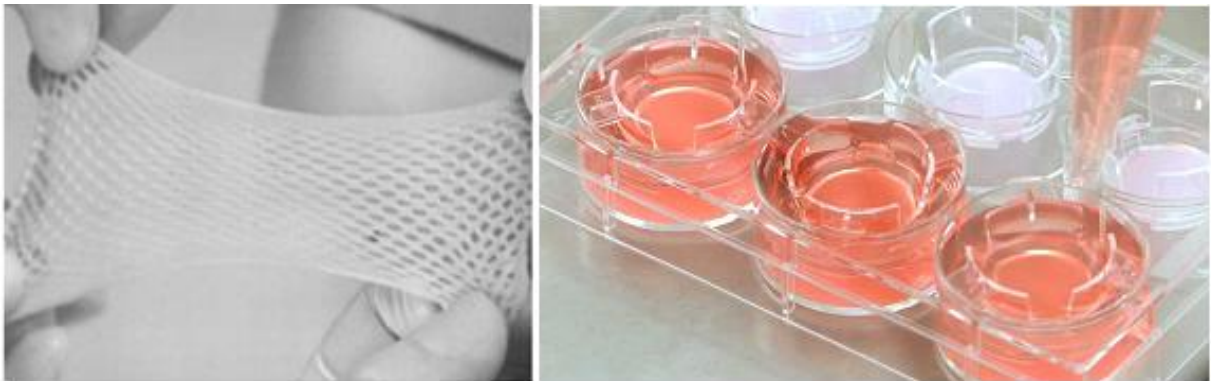
Τα πορώδη ικρίωματα κολλαγόνου (ΠΚ) βρίσκουν εδώ και χρόνια ευρεία εφαρμογή στην αναγεννητική ιατρική. Τα τελευταία χρόνια αξιολογείται η εφαρμογή τους σε *in vitro* κυτταρικές μελέτες. Το γεγονός ότι το κολλαγόνο τύπου I είναι η βασική πρωτεΐνη του συνδεδειγμένου ιστού και βρίσκεται σε αφθονία στην εξωκυττάρια μήτρα, τα καθιστά βιοσυμβατά και ωφέλιμα για τα κύτταρα. Στις εφαρμογές της αναγεννητικής ιατρικής, τα ΠΚ είναι ο συχνότερα επιλεγόμενος τεχνητός ιστός που λειτουργεί ως μόσχευμα για τη δημιουργία καινούριου ιστού (Εικόνα 1). Τα ΠΚ αποτελούνται από κολλαγόνο τύπου I, το κύριο συστατικό της δερμίδας, και γι' αυτό τον λόγο λειτουργούν ως ανάλογα της εξωκυττάριας μήτρας και αναφέρονται συχνά ως τεχνητό δέρμα.[7] Τα ικρίωματα κολλαγόνου τύπου I εφαρμόζονται κλινικά στην αναγέννηση δέρματος (έπειτα από σοβαρά εγκαύματα ή χρόνιες πληγές) και στην αναγέννηση περιφερειακών νεύρων. [8] Ακόμη, πραγματοποιούνται κλινικές μελέτες που αφορούν τη νεοαρμογή των συγκεκριμένων ικριωμάτων στην ανάπλαση συνδεδειγμένου ιστού, οστών και άλλων οργάνων. [8]

Η εφαρμογή των ΠΚ στις τρισδιάστατες καλλιέργειες κυττάρων είναι πολλά υποσχόμενη, όμως δε χρησιμοποιείται ακόμα ευρέως. Τα πορώδη ικρίωματα είναι πολύ διαπερατά λόγω της

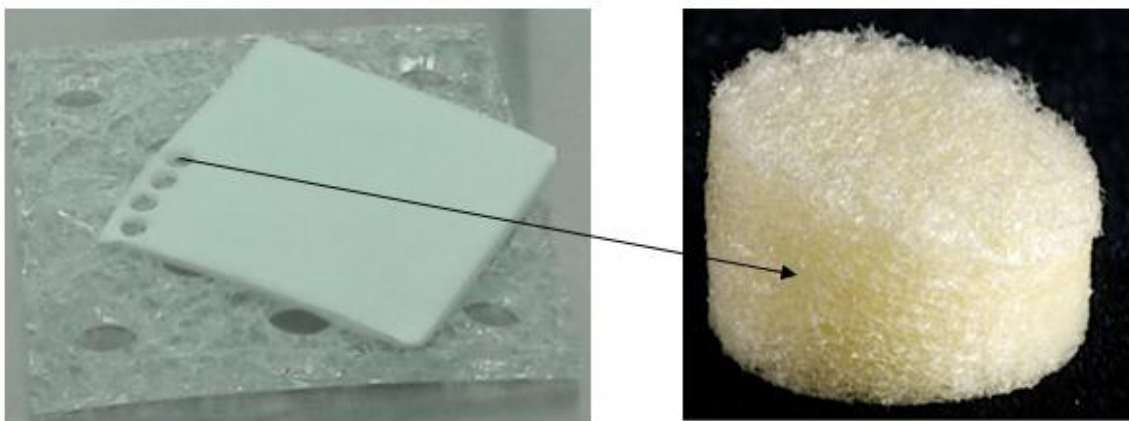
πορώδους δομής τους, επιτρέποντας έτσι την κυτταρική προσκόλληση, μετανάστευση και αλληλεπίδραση αλλά και τη μεταφορά θρεπτικών ουσιών διαμέσω τους. Λόγω της τρισδιάστατης δομής τους επιτρέπουν στα κύτταρα να αλληλεπιδράσουν με το υλικό που τα περιβάλλει και στις τρεις διαστάσεις. Η αφθονία του κολλαγόνου τύπου I στην εξωκυττάρια μήτρα επιτυγχάνει όπως και στις κλινικές εφαρμογές ένα πιο φυσιολογικό περιβάλλον για τα κύτταρα με το οποίο μπορούν να αλληλεπιδρούν όπως συμβαίνει στον οργανισμό [27]. Αυτά έρχονται σε αντίθεση με την καλλιέργεια κυττάρων σε πλάκες όπου τα κύτταρα αναπτύσσονται με διαφορετικό τρόπο απ' ό,τι στον ιστό καθώς η μία τους πλευρά προσκολλάται στην πλάκα και αποκτούν επίπεδη αντί τρισδιάστατη δομή. [27]

Στο εργαστήριο Εμβιομηχανικής και Συστημικής Βιολογίας του Εθνικού Μετσόβιου Πολυτεχνείου έχουν ήδη πραγματοποιηθεί μελέτες που αφορούν την καλλιέργεια κυττάρων σε πορώδη ικρίωματα κολλαγόνου τύπου I. (Εικόνα 2)

- Η Μαρίνα Ιωάννου στη διπλωματική της εργασία ασχολήθηκε με την βελτιστοποίηση των πρωτοκόλλων καλλιέργειας ινοβλαστών σε ικρίωματα από κολλαγόνο πάχους 2-3 mm και μέσου μεγέθους πόρου περίπου 90 μm . [16]
- Η Ιωάννα Πρέζα στη διπλωματική της εργασία σχεδίασε και κατασκεύασε μια συσκευή για αυτοματοποιημένη καλλιέργεια κυττάρων μέσα στα πορώδη ικρίωματα κολλαγόνου πάχους 2-3 mm και μέσου μεγέθους πόρου περίπου 90 μm . [17]



Εικόνα 1: (αριστερά) Τεχνητό δέρμα από κολλαγόνο. [26] (Δεξιά) Εισαγωγή κυτταρικού εναιωρήματος (πορτοκαλί υγρό) σε ικρίωματα (λευκά) που βρίσκονται μέσα σε 6 well-plate για τρισδιάστατη καλλιέργεια κυττάρων. [31]



Εικόνα 2: (αριστερά) Φύλλο ικρίωματος κολλαγόνου πάχους 2mm παρασκευασμένο με λυοφιλοποίηση [16], (δεξιά) Κυλινδρικό δείγμα από ικρίωμα κολλαγόνου, διαμέτρου 6 mm και πάχους 2mm [17]

Παρά τα πλεονεκτήματα που προσφέρουν τα πορώδη ικρίωματα κολλαγόνου στις *in vitro* μελέτες, έχουν παρατηρηθεί ορισμένες δυσκολίες κατά την εφαρμογή τους ως τρισδιάστατο μέσο καλλιέργειας, στις οποίες αναφέρθηκαν στην έρευνά τους η Μαρίνα Ιωάννου και η Ιωάννα Πρέζα. [16, 17]

- Η πολυπλοκότητα και χαμηλή επαναληψιμότητα της διαδικασίας εισαγωγής κυττάρων στα ικρίωματα. Η μέθοδος είναι πολύ πιο χρονοβόρα και δύσκολη σε σύγκριση με την καλλιέργεια σε 96-wellplates.
- Η παραμονή των περισσότερων κυττάρων κοντά στην πάνω και στην κάτω επιφάνεια των ικριωμάτων και η μη διείσδυση στο βαθύ εσωτερικό του ικριώματος
- Η αργή ροή υγρών και θρεπτικών συστατικών: η σταθερά χρόνου για την πλήρη εναλλαγή υγρών σε ένα πορώδες ικρίωμα πάχους 3 mm και διαμέτρου 3 mm είναι της τάξεως των 2 λεπτών.
- Η δυσκολία απεικόνισής τους.

1.4 Λεπτά ικρίωματα κολλαγόνου

Αίτιο για τα παραπάνω προβλήματα στην εφαρμογή των ΠΙΚ σε *in vitro* κυτταρικές καλλιέργειες αποτελεί σε μεγάλο βαθμό το πάχος των μερικών χιλιοστών που έχουν τα ικρίωματα κολλαγόνου που χρησιμοποιήθηκαν στις μελέτες που αναφέρονται στην βιβλιογραφία. [15, 16, 17]

Με σκοπό τη λύση των παραπάνω προβλημάτων και την διευκόλυνση της καλλιέργειας και μελέτης κυττάρων μέσα σε ΠΙΚ, παρασκευάστηκαν στα πλαίσια της παρούσας διπλωματικής εργασίας με την μέθοδο της λυοφιλοποίησης, λεπτά πορώδη ικρίωματα κολλαγόνου, πάχους της τάξεως 100-200 μm. Αυτό το μέγεθος διατηρεί επιτυχώς την τρισδιάστατη δομή που οφείλει να έχει το ανάλογο της εξωκυττάριας μήτρας και συγχρόνως παρέχει τα εξής πλεονεκτήματα:

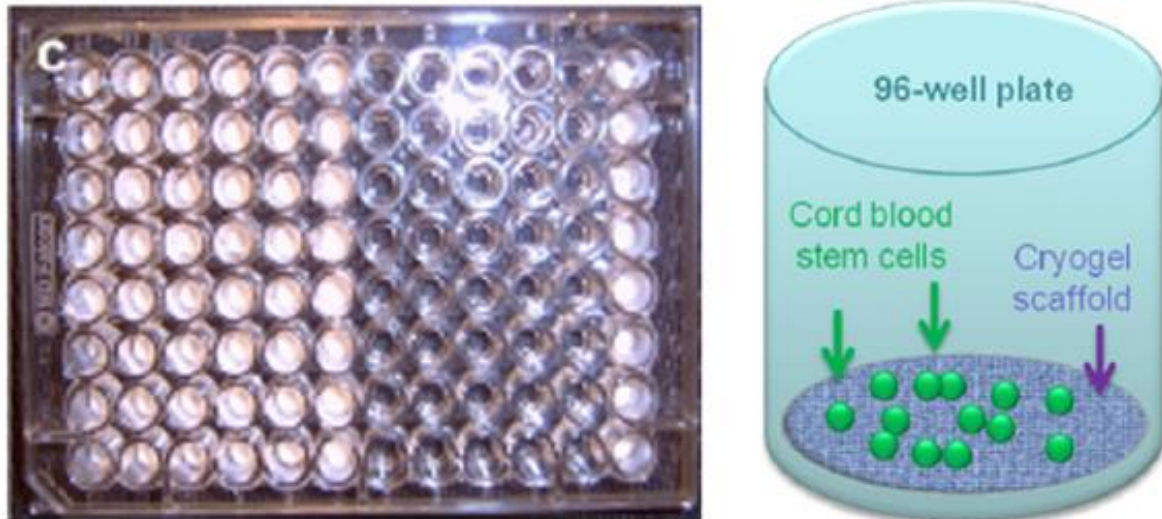
- Καλύτερη κατανομή των κυττάρων σε όλο το ικρίωμα λόγω της μικρής προσφερόμενης επιφάνειας, και κατ' επέκταση καλύτερη αλληλεπίδραση και ανάπτυξή τους.
- Γρηγορότερη μεταφορά αερίων και θρεπτικών συστατικών σε όλο το ικρίωμα
- Ευκολότερη μελέτη των κυτταροκαλλιιεργειών μέσω μικροσκοπίας και μεθόδων προτεομικής.
- Εύκολη χρήση, παρόμοια με τη γνωστή στους βιολόγους καλλιέργεια σε well-plates.
- Οικονομία υλικού λόγω του μικρότερου πάχους των συγκεκριμένων ικριωμάτων.

Φυσικά υπάρχουν τομείς που τα λεπτά ικρίωματα κολλαγόνου μειονεκτούν. Λόγω του πολύ μικρού τους μεγέθους είναι περισσότερο ευαίσθητα και απαιτείται πολύς λεπτός χειρισμός τους, ενώ περιορίζονται και οι μέθοδοι χαρακτηρισμού που μπορούν να εφαρμοστούν.

Στη βιβλιογραφία [1, 2] υπάρχουν δύο προηγούμενες μελέτες που περιγράφουν την παρασκευή λεπτών ικριωμάτων πάχους περίπου 100-200 μm :

- Ο Ke Cheng με την ερευνητική του ομάδα παρασκεύασε λεπτά ικρίωματα απευθείας μέσα σε 96-well-plates (Εικόνα 3), με τη μέθοδο των σωματιδίων βιοανθρακικού αμμωνίου που περιγράφηκε στο εδάφιο 1.2. [2] Τα ικρίωματα είχαν πάχος 150-300 μm και μέσο μέγεθος πόρου 60-80μm. Μέσα σε αυτά καλλιεργήθηκαν νευρικά βλαστικά κύτταρα και μελετήθηκε η μορφολογία των κυττάρων στο τρισδιάστατο περιβάλλον καθώς και η αλληλεπίδραση τους με αυτό.

- Σε μια άλλη προσέγγιση ο Marcin Jurga επέλεξε τη δημιουργία ικριωμάτων, πάχους 10 mm, με την μέθοδο Cryogelation που περιγράφηκε στο εδάφιο 1.2. [1] Μετά την παρασκευή, γίνεται κοπή των κυλίνδρων σε μικρότερα κυλινδρικά ικριώματα πάχους 100-200 μm, εισαγωγή αυτών σε 96 well plate για τρισδιάστατη καλλιέργεια βλαστικών κυττάρων του ομφάλιου λόρου και μελέτη της διαφοροποίησης και συμπεριφοράς των κυττάρων κατά την καλλιέργειά τους μέσα σε αυτά τα ικριώματα. (Εικόνα 3)



Εικόνα 3: Προηγούμενες μέθοδοι παρασκευής λεπρών πορώδων ικριωμάτων. (αριστερά) Ικριώματα βιοανθρακικού αμμωνίου μέσα σε 96 well plate [2] , (δεξιά) Καλλιέργεια βλαστικών κυττάρων σε ικριώματα παρασκευασμένων με τη μέθοδο των κυρογελών [1]

Τα μειονεκτήματα των παραπάνω μελετών σε σχέση με την προσέγγιση που πραγματεύεται η παρούσα εργασία, αφορούν κυρίως την επιλογή βιοϋλικού και μεθόδου παρασκευής. Στην ερευνητική εργασία του Ke Cheng η παρασκευή απαιτεί τη χρήση σωματιδίων βιοανθρακικού αμμωνίου, περιορίζοντας την εφαρμογή διαφορετικών βιοϋλικών. Αντίθετα, στην παρούσα εργασία η επιλεγόμενη μέθοδος παρασκευής είναι η λυοφιλοποίηση, η οποία επιτρέπει την μελέτη βιοϋλικών στενά συνδεδεμένων με την εξωκυττάρια μήτρα, όπως το κολλαγόνο τύπου Ι που έχει αποδειχθεί όχι μόνο βιοσυμβατό για τα κύτταρα αλλά και κατάλληλο για *in vivo* και *in vitro* μελέτες [27]

Όσον αφορά το πλεονέκτημα της συγκεκριμένης μελέτης σε σύγκριση με την έρευνα του Marcin Jurga, αυτό βρίσκεται εν μέρει στην ίδια τη μέθοδο παρασκευής. Καθώς το ικριώμα που παρασκεύασε ήταν αρκετά μεγάλο (πάχος 10 mm) ο έλεγχος της μεταφοράς θερμότητας κατά την ψύξη της κρυογέλης είναι δύσκολος οπότε και η ρύθμιση του μεγέθους των πόρων. Σε δεύτερο στάδιο, η κοπή ενός μεγάλου ικριώματος πάχους 10 mm σε ισόπαχα ικριώματα πάχους μόνο 100 μm παρουσιάζει δυσκολίες. Οπότε ενώ υπάρχει μαζική παραγωγή λεπτών ικριωμάτων είναι εμφανής η πολυπλοκότητα της διαδικασίας και η δυσκολία για επαναληψιμότητα. Στην περίπτωση της απευθείας παρασκευής λεπτών ικριωμάτων με λυοφιλοποίηση αποφεύγεται η δυσχερής διαδικασία της κοπής ενώ είναι εύκολος ο έλεγχος του μεγέθους και του πλήθους των πόρων μέσω αλλαγών στο πρωτόκολλο της λυοφιλοποίησης. (περισσότερες λεπτομέρειες ακολουθούν στο εδάφιο 2.1.2)

1.5 Μελέτη Κακοηθών Μελανοκυττάρων

Στην παρούσα ενότητα γίνεται αναφορά στο κομμάτι της εργασίας που σχετίζεται με την μελέτη κακοηθών μελανοκυττάρων μέσω της καλλιέργειας τους σε λεπτά ικρίωματα. Με σκοπό την κατανόηση του πειράματος αυτού, δίνονται αρχικά πληροφορίες σχετικά με τα βασικά χαρακτηριστικά που παρουσιάζουν όλα τα είδη καρκινικών κυττάρων, αλλά και σχετικά με τη σημασία υλοποίησης ενός τρισδιάστατου μοντέλου της εξωκυττάριας μήτρας για την μελέτη καρκινικών κυττάρων.

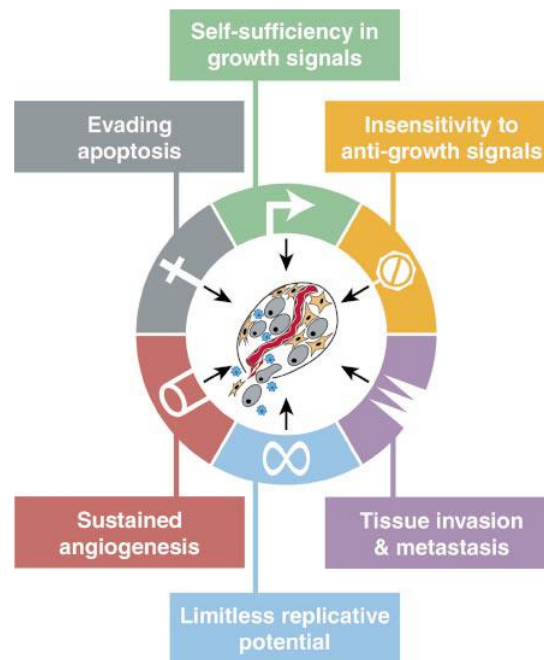
1.5.1 Τα Χαρακτηριστικά των Καρκινικών Κυττάρων

Ο όρος καρκίνος αποδίδεται σε μια ομάδα ασθενειών που χαρακτηρίζονται από ανεξέλεγκτο πολλαπλασιασμό των κυττάρων με αποτέλεσμα το σχηματισμό μια μεγάλης μάζας κυττάρων, γνωστή ως όγκος. Αυτό συμβαίνει συνήθως μετά από αρκετές γονιδιακές μεταλλάξεις. Επιπλέον, η ανεπάρκεια του ανοσοποιητικού συστήματος επιτρέπει στα καρκινικά κύτταρα να ξεφύγουν τον έλεγχο και να σχηματίσουν την μάζα όγκου, κάτι που αποφεύγεται στο ενεργό ανοσοποιητικό σύστημα. Τα καρκινικά κύτταρα, ασχέτως από το είδος τους ή το όργανο που προσβάλλουν, έχουν όλα τους ορισμένα χαρακτηριστικά (hallmarks) που τα ξεχωρίζουν από τα φυσιολογικά κύτταρα και τους επιτρέπουν να πολλαπλασιάζονται με υψηλούς ρυθμούς και να λειτουργούν ακανόνιστα, καθιστώντας τα ιδιαίτερος επικίνδυνα για τον οργανισμό. [10]

- Ικανότητα πολλαπλασιασμού εν απουσία αυξητικών παραγόντων: Τα φυσιολογικά κύτταρα απαιτούν συγκεκριμένα σήματα που τους επιτρέπουν να ξεκινήσουν τη διαδικασία της μίτωσης. Αυτά τα σήματα προκύπτουν όταν αυξητικοί παράγοντες προσδεθούν σε συγκεκριμένες θέσεις ένωσης, συχνά πάνω στην εξωκυττάρια μήτρα. Σε αντίθεση, τα καρκινικά κύτταρα μπορούν να παράγουν δικά τους σήματα ανάπτυξης και επομένως δε χρειάζονται εξωτερική διέγερση για να αρχίσουν τον πολλαπλασιασμό τους.
- Μη ευαισθησία σε αντί-ανάπτυξιακούς παράγοντες: Στον φυσιολογικό ιστό υπάρχουν ορισμένα σήματα που συμβάλλουν στην παύση του πολλαπλασιασμού των κυττάρων και τη διατήρηση της ομοιότητας. Αυτά τα σήματα ονομάζονται καταστολείς της ανάπτυξης και όταν έρθουν σε επαφή με τους σωστούς υποδοχείς δρουν κατασταλτικά. Τα καρκινικά κύτταρα δύνανται να αλλοιώσουν ή και να μπλοκάρουν το μονοπάτι σημάτων που οδηγεί στην εκδήλωση των κατασταλτικών για την ανάπτυξη σημάτων, διατηρώντας την ικανότητα για πολλαπλασιασμό.
- Αντίσταση στην απόπτωση: Τα φυσιολογικά κύτταρα μετά την φάση της ανάπτυξης και του πολλαπλασιασμού οδηγούνται στην φάση της απόπτωσης που αποτελεί ουσιαστικά τον προγραμματισμένο από τον οργανισμό θάνατό τους. Ουσιαστικά συγκεκριμένα συστατικά που δρουν ως αισθητήρες αντιλαμβάνονται την ύπαρξη μη φυσιολογικών συνθηκών στο κυτταρικό περιβάλλον και ενεργοποιούν άλλα συστατικά, τα οποία δίνουν την εντολή της απόπτωσης. Όταν κάποια μετάλλαξη αδρανοποιήσει τους ρυθμιστές της απόπτωσης τότε τα κύτταρα δε λαμβάνουν την εντολή του προγραμματισμένου θανάτου και συνεχίζουν να πολλαπλασιάζονται. Το συγκεκριμένο χαρακτηριστικό παίζει μεγάλο ρόλο στην εξέλιξη του καρκίνου.
- Απεριόριστες δυνατότητες αντιγραφής: Τα φυσιολογικά κύτταρα διαιρούνται με μεγάλους ρυθμούς όταν ο οργανισμός είναι νέος ενώ όσο περνούν τα χρόνια ο ρυθμός διαίρεσης μειώνεται και σχετίζεται μόνο με την αντικατάσταση κυττάρων που έχουν πληγεί ή φθαρεί. Αντιθέτως, στην περίπτωση των καρκινικών κυττάρων αυτή η φυσιολογική γήρανση στις ιδιότητες αποφεύγεται. Αυτό επιτυγχάνεται μέσω ενός ενζύμου, της τελομεράσης, η οποία συμπληρώνει σε μήκος το τελευταίο κομμάτι των χρωμοσωμάτων, τα τελομερή, επιτρέποντας τη συνέχιση του κυτταρικού πολλαπλασιασμού.

- Αγγειογένεση: Το οξυγόνο και τα θρεπτικά συστατικά που προσφέρει το αγγειακό σύστημα είναι σημαντικά για την κυτταρική ανάπτυξη και επιβίωση. Τα καρκινικά κύτταρα έχουν την ιδιότητα να εκφράζουν δικούς τους προ-αγγειογενετικούς παράγοντες που οδηγούν σε ένα νέο αγγειακό σύστημα, πιο πυκνό από το φυσιολογικό. Έτσι παρέχουν στους εαυτούς τους τα απαραίτητα συστατικά και αυξητικούς παράγοντες για την επιτυχή επέκταση.
- Μετάσταση: Στην περίπτωση των καλοηθών όγκων, τα αυξανόμενα καρκινικά κύτταρα δημιουργούν μια μεγάλη στάσιμη μάζα, η οποία συνήθως δεν απειλεί τον οργανισμό. Στην περίπτωση όμως των κακοηθών όγκων, τα καρκινικά κύτταρα όχι μόνο πολλαπλασιάζονται ανεξέλεγκτα αλλά εισβάλλουν σε γειτονικούς ιστούς και περνώντας στο αγγειακό σύστημα μπορούν να μεταφερθούν μέσω του αίματος σε άλλα όργανα δημιουργώντας εκεί νέες αποικίες όγκων εκεί. Σε αυτό το φαινόμενο της μετάστασης οφείλεται περίπου το 90% των θανάτων από καρκίνο.

Οι παραπάνω έξι ιδιότητες καρκινικών κυττάρων, οι οποίες φαίνονται σχηματικά στην εικόνα 4, είναι εμφανείς σε όλους σχεδόν τους τύπους καρκίνων αλλά η σειρά με την οποία λειτουργούν όπως και οι μηχανισμοί μέσω των οποίων διαταράσσουν την ομοιόσταση και εκδηλώνονται δεν είναι μοναδικοί ή δεδομένοι. [10]



Εικόνα 4: Βασικά χαρακτηριστικά του καρκίνου [10]

1.5.2 Καλλιέργεια καρκινικών κυττάρων στα ικρίωματα κολλαγόνου

Είναι γνωστό ότι η εξωκυττάρια μήτρα συμμετέχει σε μεγάλο βαθμό στην ρύθμιση της ομοιόστασης και των βασικών λειτουργιών των κυττάρων, όπως επίσης ότι τα καρκινικά κύτταρα εκμεταλλεύονται ορισμένα συστατικά και ιδιότητες της μήτρας για να δράσουν [12]. Αυτό το γεγονός έχει καταστήσει απαραίτητη την δημιουργία ενός τρισδιάστατου μοντέλου για τις *in vitro* μελέτες του καρκίνου, το οποίο θα επιτρέψει την αλληλεπίδραση των κυττάρων μεταξύ τους αλλά και με την τεχνητή μήτρα.

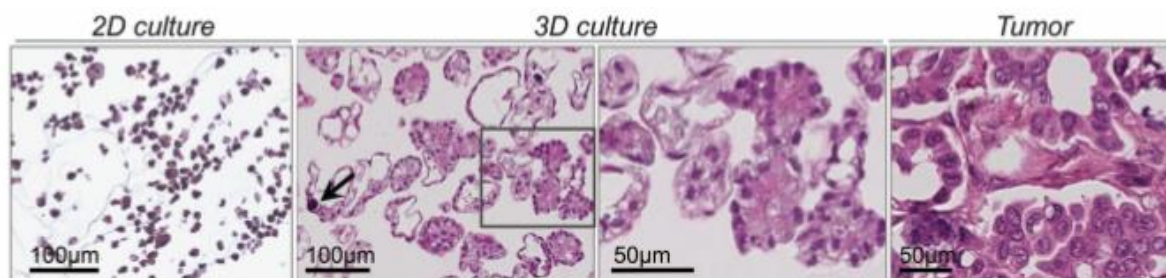
Μελέτες έχουν πραγματοποιηθεί κυρίως σε διδιάστατες πλάκες αλλά υπάρχουν μερικές βιολογικές μελέτες [27] που σημειώνουν ότι στο τρισδιάστατο περιβάλλον τα καρκινικά κύτταρα έχουν διαφορετική συμπεριφορά, η οποία αφορά την ανάπτυξη, την διαφοροποίηση,

την επικοινωνία και τη λειτουργία των κυττάρων. Μάλιστα οι αλλαγές στον τρόπο αλληλεπίδρασης μεταξύ των κυττάρων που προκύπτουν σε δισδιάστατες καλλιέργειες, επηρεάζουν την μετάδοση σημάτων μεταξύ τους, γεγονός που πιθανολογείται να επιδρά εν τέλει στην γονιδιακή έκφραση των κυττάρων. Για την ουσιαστική αναπαράσταση του καρκινικού περιβάλλοντος απαιτείται όμως τρισδιάστατος σχηματισμός των κυττάρων, αλληλεπίδραση με την εξωκυττάρια μήτρα, φυσιολογική απόκρισή τους και γενικώς αναπαράσταση των συνθηκών που επικρατούν κατά την εμφάνισή του. [27] Ακόμη, το τρισδιάστατο περιβάλλον επηρεάζει σημαντικά και τη δράση των διαφόρων φαρμάκων που εξετάζονται *in vitro* με σκοπό την αντιμετώπιση του καρκίνου. Αυτό συμβαίνει καθώς στις διδιάστατες πλάκες τα φάρμακα χρειάζονται λιγότερο «χρόνο» να δράσουν λόγω του σχήματος των κυττάρων σε αυτές ενώ στις τρισδιάστατες καλλιέργειες όπου τα καρκινικά κύτταρα αναπτύσσονται και κατανέμονται στο χώρο πιο φυσιολογικά, μπορούν να αντιστέκονται περισσότερο στην δράση των φαρμάκων [27]. Στην εικόνα 5 φαίνεται η διαφορετική μορφολογία που αποκτούν τα καρκινικά επιθηλιακά κύτταρα στις τρισδιάστατες καλλιέργειες σε σχέση με αυτή στις διδιάστατες.

Έχουν ήδη δοκιμαστεί αρκετά *in vitro* καρκινικά μοντέλα που προσομοιάζουν το τρισδιάστατο περιβάλλον των όγκων, όπως η καλλιέργεια σφαιρικών συσσωματωμάτων (spheroids) από καρκινικά κύτταρα με σκοπό την προσομοίωση της “ογκικής” συμπεριφοράς, ο συνδυασμός διάφορων gels ως μοντέλα της εξωκυττάριας μήτρας του όγκου, και τέλος μοντέλα ικριωμάτων για την τρισδιάστατη καλλιέργεια των καρκινικών κυττάρων μέσα σε αυτά. [11]

Η τελευταία προσπάθεια μπορεί να διεξαχθεί σε λεπτά ικριώματα κολλαγόνου ή και ζελατίνης, δηλαδή πρωτεϊνών που βρίσκονται σε αφθονία στην εξωκυττάρια μήτρα. Αυτό το τρισδιάστατο μοντέλο βασίζεται στην διαπίστωση ότι κατά την δράση των καρκινικών κυττάρων υπάρχει αλλαγή στην δομή και την σύσταση της εξωκυττάριας μήτρας. [12] Ένα χαρακτηριστικό, για παράδειγμα, που φαίνεται να σχετίζεται με την εμφάνιση όγκου, είναι η στιβαρότητα της εξωκυττάριας μήτρας η οποία είναι αυξημένη στην περίπτωση της καρκινικής αγγειογένεσης. Επίσης, εμφανίζεται αποσύνθεση της εξωκυττάριας μήτρας κατά τη δημιουργία κυτταρικών προεξοχών, ονόματι invadopodia, τα οποία αποτελούν αρχικό στάδιο της εισβολής σε ξένους ιστούς και της μετάστασης.

Στην συγκεκριμένη εργασία πραγματοποιείται μελέτη της επίδρασης φαρμάκων σε κυτταρικές σειρές κακοηθών μελανοκυττάρων, τα οποία αποτελούν μοντέλα του μελανώματος. (καρκίνος του δέρματος και των σπλάγχων). Τα συγκεκριμένα καρκινικά κύτταρα, όπως και των περισσότερων ειδών, χαρακτηρίζονται από την φύση που αναλύθηκε ακριβώς παραπάνω. Η μελέτη γίνεται μέσω καλλιέργειας των κακοηθών μελανοκυττάρων μέσα σε ικριώματα ζελατίνης και ικριώματα κολλαγόνου-γλυκοζαμινογλυκάνων με σκοπό την διαπίστωση της επίδρασης συγκεκριμένων φαρμάκων σε καρκινικά κύτταρα και την σύγκριση με τα αποτελέσματα από πειράματα σε δισδιάστατες καλλιέργειες. Η εφαρμογή των ικριωμάτων κολλαγόνου που αναφέρονται συχνά ως τεχνητό δέρμα παρουσιάζεται ενδιαφέρουσα για την συγκεκριμένη μελέτη χάρη στο φυσιολογικό περιβάλλον που προσφέρει στα κύτταρα που αφορούν τον καρκίνο του δέρματος.



Εικόνα 5: Σχήμα καρκινικών επιθηλιακών κυττάρων των ωοθηκών σε 2D και 3D καλλιέργειες [26]

1.6 Στόχοι της διπλωματικής

Οι προκλήσεις που εμφανίζονται κατά την καλλιέργεια και μελέτη κυττάρων μέσα σε πορώδη ικρίωματα πάχους μερικών χιλιοστών οδήγησαν στην ανάπτυξη λεπτότερων ικριωμάτων στα πλαίσια του ευρωπαϊκού ερευνητικού προγράμματος ALS-on-a-chip (horizon 2020 IF 658850). Το μικρό πάχος των ικριωμάτων παρακάμπτει πολλές από τις δυσκολίες αυτές, και ταυτόχρονα, προσφέρει στα κύτταρα το απαραίτητο περιβάλλον ώστε να μπορούν να αλληλεπιδράσουν με την τρισδιάστατη τοπολογία που συναντάται στους ιστούς.

Το πρώτο μέρος της παρούσας διπλωματικής εργασία πραγματεύεται τον δομικό και μηχανικό χαρακτηρισμό λεπτών ικριωμάτων κολλαγόνου που κατασκευάζονται με νέο πρωτόκολλο παρασκευής που αναπτύχθηκε στο πρόγραμμα ALS-on-a-chip, προσαρμόζοντας το κλασσικό πρωτόκολλο λυοφιλοποίησης που αναπτύχθηκε στο MIT (εργαστήριο I.V. Yannas) για παρασκευή των “κλασσικών” ικριωμάτων κολλαγόνου (τεχνητό δέρμα). Η εργασία αξιολογεί τα δομικά και μηχανικά χαρακτηριστικά των λεπτών ικριωμάτων σε σχέση με αυτά των “κλασσικών” ικριωμάτων και διερευνά πώς τα χαρακτηριστικά αυτά εξαρτώνται από διάφορες παραμέτρους της παρασκευής.

Το δεύτερο μέρος της εργασίας χρησιμοποιεί τα λεπτά ικρίωματα κολλαγόνου σε μια κυτταρική μελέτη. Τα λεπτά ικρίωματα αναπτύχθηκαν σε σκοπό τη δημιουργία μοντέλων της εξωκυττάριας μήτρας μέσα στα οποία θα μπορούν εύκολα να καλλιεργηθούν, μελετηθούν και ποσοτικοποιηθούν κύτταρα με τρόπο όμοιο όπως στις καλλιέργειες κυττάρων σε πλαστικές πλάκες πολλών βοθρίων (multi-well-plates). Στην συγκεκριμένη εργασία, τα λεπτά ικρίωματα εφαρμόστηκαν σε μια πιλοτική μελέτη της επίδρασης φαρμάκων σε μεταστατικά καρκινικά κύτταρα μελανώματος. Τα συγκεκριμένα κύτταρα κατά τη φάση της μετάστασης πρέπει να αποδημήσουν μέσω της δερμίδας (συνδετικού ιστού πλούσιου σε κολλαγόνο). Επομένως, αναμένεται τα κύτταρα αυτά να αλληλεπιδρούν εύκολα με τα πορώδη ικρίωματα κολλαγόνου. Το ερώτημα της συγκεκριμένης κυτταρικής μελέτης είναι αν η παρουσία ενός ανάλογου της εξωκυττάριας μήτρας (ικρίωμα) επηρεάζει τον τρόπο με τον οποίο τα κύτταρα αποκρίνονται *in vitro* σε φάρμακα χημιοθεραπείας και αν αυτή η απόκριση διαφέρει σε σχέση με την *in vitro* απόκριση που έχει μετρηθεί όταν τα κύτταρα καλλιεργούνται σε επίπεδες πλαστικές πλάκες (96 well-plates).

2 Πειραματικές Μέθοδοι και Κατασκευή Βιοϋλικών

Η παρούσα ενότητα περιγράφει αναλυτικά τις μεθόδους παρασκευής και χαρακτηρισμού των λεπτών ικριωμάτων. Αναλύεται ακόμη ο σχεδιασμός του συστήματος που θα φέρει τα ικριώματα και θα ομοιάζει στον τρόπο καλλιέργειας στις γνωστές 96-wellplates.

2.1 Παρασκευή λεπτών ικριωμάτων

Όπως έχει ήδη αναφερθεί στο εδάφιο 1.6, ένας εκ των σκοπών της εργασίας αυτής είναι η δημιουργία ενός εύχρηστου συστήματος τρισδιάστατης καλλιέργειας κυττάρων που θα προσφέρει αξιόπιστα αποτελέσματα. Η ιδέα είναι η δημιουργία ενός ανάλογου των well-plates που θα περιέχει έτοιμα λεπτά ικριώματα κολλαγόνου πάνω σε γυαλί με σκοπό την τρισδιάστατη καλλιέργεια κυττάρων και το οποίο θα προσφέρεται συγχρόνως για άμεση απεικόνιση. Σε αυτή την ενότητα γίνεται αναφορά στις μεθόδους που χρησιμοποιήθηκαν γι' αυτόν τον σκοπό. Το αναλυτικό πρωτόκολλο παρασκευής βρίσκεται στο Παράρτημα Α, χωρίο Α1.

2.1.1 Επιφανειακή Κατεργασία με Πλάσμα

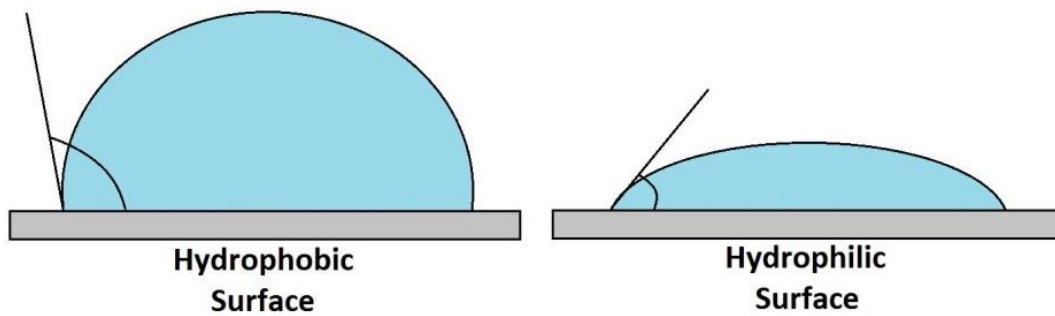
Για την κατανόηση των βημάτων παρασκευής του τρισδιάστατου συστήματος καλλιέργειας παρατίθενται μερικές βασικές πληροφορίες σχετικά με την φύση του Πλάσματος αλλά και σχετικά με το πώς η συγκεκριμένη διεργασία συνεισφέρει στο bonding.

Το πλάσμα χαρακτηρίζεται ως η τέταρτη κατάσταση της ύλης. Θεωρείται ως ένα ιονισμένο αέριο, αποτελούμενο από ελεύθερα ηλεκτρόνια και ιόντα. Δε λαμβάνει ακριβή όγκο και σχήμα αλλά παρουσιάζει διαφορετική συμπεριφορά από τα αέρια. Είναι καλός αγωγός του ηλεκτρισμού και μάλιστα το σχήμα και ο όγκος του καθορίζονται σημαντικά από το υπάρχον ηλεκτρικό ή μαγνητικό πεδίο. Το πλάσμα οξυγόνου, όπως και το πλάσμα ατμοσφαιρικού αέρα (το τελευταίο διατίθεται και στο εργαστήριο Εμβιομηχανικής και Βιοϊατρικής Τεχνολογίας) προωθούν την οξειδωση των επιφανειών που εκτίθενται στη διεργασία και την υδροξυλίωσή τους, δηλαδή των σχηματισμό ομάδων OH- στην επιφάνεια. Ως αποτέλεσμα αυξάνεται η υδροφιλικότητα της επιφάνειας. [24] Το πλάσμα οξυγόνου και το πλάσμα ατμοσφαιρικού αέρα αφαιρούν οργανικές ακαθαρσίες από την επιφάνεια του υλικού και αλλάζουν τη χημική της σύσταση, προσθέτοντας SiOH ομάδες, και επιτρέποντας έτσι την ένωση-κόλληση επιφανειών. Οι παράμετροι του πλάσματος επηρεάζουν σημαντικά την αποτελεσματικότητα του bonding, ιδίως ο χρόνος έκθεσης στην διεργασία του πλάσματος. Επίσης, θεωρείται ότι γενικώς το πλάσμα οξυγόνου φέρει καλύτερα αποτελέσματα στις περιπτώσεις bonding καθώς ο ατμοσφαιρικός αέρας δεν έχει πλήρως σταθερή σύσταση σε καθημερινή βάση. [29]

Η ένταση του πλάσματος μπορεί να διαπιστωθεί σε πρώτο στάδιο από την παρατήρηση του χρώματος που επικρατεί στον θάλαμο που εκτελείται η διεργασία. [29] Για παράδειγμα, στο πλάσμα οξυγόνου το χρώμα στον θάλαμο είναι γαλαζωπό ενώ στο ατμοσφαιρικό πλάσμα το χρώμα αναμένεται ροζ-ανοιχτό μωβ (εικόνα 6). Επιπλέον, όσο αποτελεσματικότερη είναι η πρόσδοση υδροφιλικότητας από το πλάσμα, τόσο περισσότερο η έπειτα εγγεόμενη σταγόνα τείνει να απλωθεί σε όλο το υδρόφιλο μέρος (μικρότερη γωνία επαφής). [30] Σε αντίθεση, σε μια υδρόφοβη επιφάνεια η σταγόνα θα συσσωρευτεί σε μια σφαίρα ακριβώς στο σημείο έγχυσης (Εικόνα 7). Η εικόνα 8 δείχνει την υδροφιλικότητα που απέκτησε ένα γυαλί σε συγκεκριμένες κυκλικές επιφάνειες μετά από την υποβολή του στην επιφανειακή κατεργασία του πλάσματος μαζί με την μάσκα που επίσης φαίνεται στην εικόνα 8.



Εικόνα 6: Ο θάλαμος του PlasmaEtcher του Εργαστηρίου Εμβιομηχανικής και Συστημικής Βιολογίας κατά την διεργασία του πλάσματος ατμοσφαιρικού αέρα



Εικόνα 7: Γωνία επαφής σταγόνας σε υδρόφοβη και υδρόφιλη επιφάνεια [29]



Εικόνα 8: Έγχυση σταγόνων νερού μετά από κατεργασία γυαλιού (δεξιά) με ατμοσφαιρικό πλάσμα. Το γυαλί ήταν καλυμμένο με μάσκα PDMS (αριστερά) έτσι ώστε μόνο συγκεκριμένα σημεία του να γίνουν υδρόφιλα.

Τις παραπάνω ιδιότητες του πλάσματος, δηλαδή την πρόσδοση υδροφιλικότητας καθώς και την αλλαγή χημικών ομάδων στην επιφάνεια του υποβαλλόμενου σε πλάσμα δείγματος με σκοπό την επίτευξη bonding, εκμεταλλεύεται η παρούσα εργασία για την δημιουργία των τρισδιάστατων well-plates. Οι ακριβείς συθήκες και τα υλικά που χρησιμοποιήθηκαν προς αυτό το σκοπό περιέχονται παρακάτω στο παράρτημα Α, χωρίο Α1.

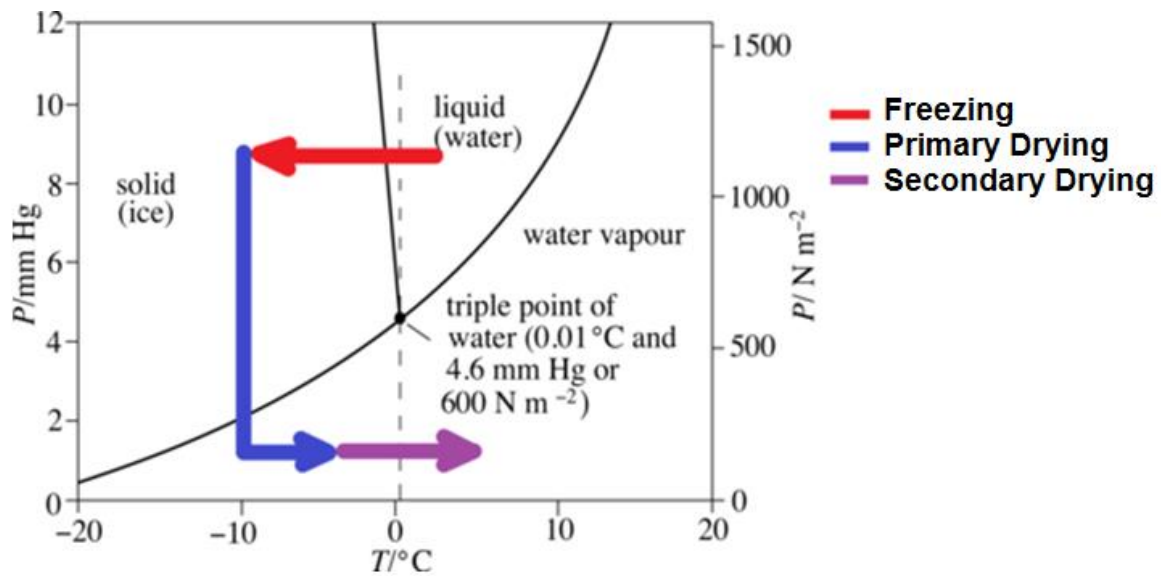
2.1.2 Λυοφιλοποίηση

Στη συγκεκριμένη εργασία η μέθοδος που επιλέχθηκε για την παρασκευή των ικριωμάτων είναι η λυοφιλοποίηση (freeze-drying). Ο όρος προέρχεται από τις λέξεις «λύω + φιλία» που σημαίνει «αγάπη προς το να διαλύομαι». Όπως αναφέρθηκε και στην εισαγωγή, η λυοφιλοποίηση αποτελεί μέθοδο αφυδάτωσης, κατά την οποία το παγωμένο νερό που περιέχεται στο υλικό διέρχεται απευθείας από την στέρεα φάση στην αέρια. [18, 20]

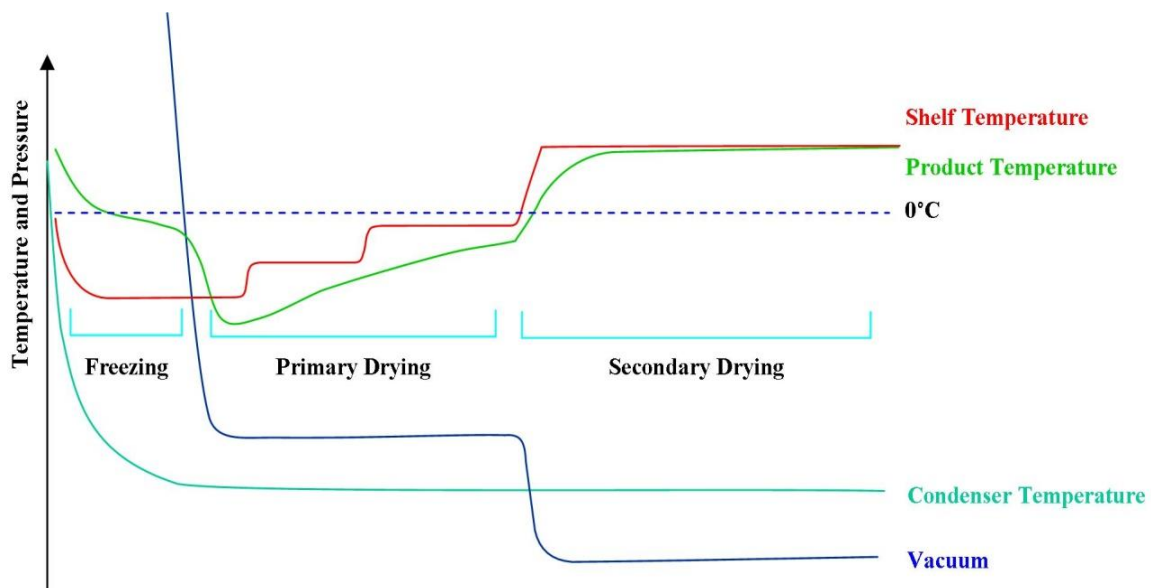
Αναλυτικά τα στάδια της λυοφιλοποίησης είναι τα εξής τρία :

- Ψύξη: Το υλικό ψύχεται σε θερμοκρασία χαμηλότερη από εκείνη που η στερεή και η υγρή φάση συνυπάρχουν. Η συνήθης τελική θερμοκρασία ψύξης είναι γύρω στους $-40\text{ }^{\circ}\text{C}$, ενώ η χαμηλότερη πιθανή είναι οι $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$. Μετά την ψύξη συχνά ακολουθεί και μια επιπλέον φάση που ονομάζεται ανόπτηση. Κατά τη διάρκεια της ανόπτησης το υλικό παραμένει για κάποιο χρονικό διάστημα στην τελική θερμοκρασία ψύξης, γεγονός που επιτρέπει την κρυσταλλοποίηση παραγόντων διόγκωσης που μπορεί να έχουν προστεθεί στο υλικό, όπως η μανιτόλη. Ο τελικός σκοπός είναι η αποφυγή κατάρρευσης του λυοφιλοποιημένου υλικού. Ανόπτηση μπορεί να λάβει χώρα και πριν την επίτευξη της τελικής θερμοκρασίας ψύξης, σε μια ενδιάμεση θερμοκρασία κατά το στάδιο της ψύξης. [21]
- Πρωτοταγής Αφυδάτωση: Σ' αυτό το στάδιο έχουμε μείωση της περιβάλλουσας πίεσης και άνοδο της θερμοκρασίας ώστε να πραγματοποιηθεί η εξάχνωση. Ο ρυθμός πρόσδοσης θερμότητας στο υλικό είναι αργός ώστε να μην αλλάξουν οι ιδιότητες ή η δομή του και η τελική θερμοκρασία μετά απ' αυτό το στάδιο είναι πάντα χαμηλότερη του σημείου ισορροπίας (0°C). Σε αυτή τη φάση εξαχνώνεται γύρω στο 95% του υπάρχοντος αρχικά νερού. [19]
- Δευτεροταγής Αφυδάτωση: Σε αυτήν τη φάση πραγματοποιείται άνοδος της θερμοκρασίας μέχρι και τη θερμοκρασία περιβάλλοντος με σκοπό να αφαιρεθούν τα μόρια του νερού που δεν ψύχθηκαν αρχικά. Συνήθως το υλικό μένει στην τελική θερμοκρασία για τουλάχιστον δύο ώρες ώστε να επέλθει ισορροπία. Το τελικό ποσοστό νερού που παραμένει στο λυοφιλοποιημένο προϊόν είναι μόνο περίπου 1%. [19]

Η εικόνα 9 δείχνει τα τρία στάδια της λυοφιλοποίησης ενώ στην εικόνα 10 φαίνεται η αλλαγή σε θερμοκρασία και πίεση που επικρατεί στον συμπτυκνωτή του λυοφιλοποιητή, τα ράφια του καθώς και στο ίδιο το προς λυοφιλοποίηση δείγμα κατά την ψύξη, την πρωτοταγή αφυδάτωση και τη δευτεροταγή αφυδάτωση.



Εικόνα 9: Τα τρία στάδια της λυοφιλοποίησης [18]



Εικόνα 10: Μεταβολή θερμοκρασίας και πίεσης κατά τα διάφορα στάδια της λυοφιλοποίησης [28]

Οι εικόνες 9 και 10 δείχνουν τη θερμοκρασία και την πίεση που επικρατούν κατά τα διάφορα στάδια της λυοφιλοποίησης, στον condenser του λυοφιλοποιητή, στο ράφι που τοποθετείται το δείγμα αλλά και στο ίδιο το δείγμα.

Στην περίπτωση των ικτριωμάτων κολλαγόνου, το υλικό που τοποθετείται στον λυοφιλοποιητή με σκοπό να υποστεί την διεργασία της λυοφιλοποίησης λέγεται εναιώρημα κολλαγόνου (collagensuspension). Τα βήματα που ακολουθούνται για την παρασκευή των λεπτών ικτριωμάτων κολλαγόνου παρατίθενται συνοπτικά παρακάτω:

- Ίνες μικροϊνώδους κολλαγόνου Τύπου I μαζί με άλλα συστατικά (συχνός ο συνδυασμός με γλυκοζαμινογλυκάνες) διαλύονται σε 0,05M οξικού οξέος. Το ποσοστό της μάζας του

κολλαγόνου είναι 0,5%. Μετά την ομοιογενοποίηση του εναιωρήματος ακολουθεί πάντα επιβολή κενού 100mbar με σκοπό την αφαίρεση τυχόν φυσαλίδων [6]

- Το παραγόμενο εναιώρημα εγχύεται με πιπέττα σε διάφορα σημεία πάνω σε γυαλί παίρνοντας κυλινδρική μορφή διαμέτρου 6mm και πάχους περίπου 100 μm (ο απαραίτητος όγκος για το σχηματισμό ενός τέτοιου κυλίνδρου είναι περίπου 2,826 μl). Το γυαλί έχει προηγουμένως υποβληθεί στην διεργασία του πλάσματος με σκοπό την πρόσδοση υδροφιλικότητας στα σημεία έγχυσης του εναιωρήματος.
- Με βάση την περιγραφή της διαδικασίας της λυοφιλοποίησης που έγινε προηγουμένως, το γυαλί με τα ικρίωματα τοποθετείται σε ένα ράφι του λυοφιλοποιητή και μετά την επιλογή του κατάλληλου πρωτοκόλλου ξεκινάει η διαδικασία. Στο πρώτο στάδιο (ψύξη) λαμβάνει χώρα το πάγωμα του εναιωρήματος κολλαγόνου, με αποτέλεσμα το μεγαλύτερο μέρος του νερού να σχηματίζει κρυστάλλους πάγου ενώ τα σωματίδια κολλαγόνου παγιδεύονται στα όρια των κόκκων του πάγου. Για σταθεροποίηση τα πρώιμα ικρίωματα παραμένουν για περίπου μία ώρα στην τελική θερμοκρασία ψύξης (ανόπτηση). Στο δεύτερο στάδιο (αφυδάτωση) πραγματοποιείται η απομάκρυνση του παγιδευμένου νερού οπότε προκύπτει ένα πορώδες υλικό που ομοιάζει σε σπόγγο, αποτελούμενο από αντηρίδες (αντιστοιχούν στη φάση ανάμεσα στους κρυστάλλους πάγου μετά την ψύξη όπου παγιδεύτηκε το κολλαγόνο) και πόρους (αντιστοιχούν στους κρυστάλλους πάγου που απομακρύνθηκαν κατά τη διάρκεια της εξάχνωσης). [6] Έχει διαπιστωθεί ότι ο ρυθμός ψύξης επηρεάζει τη δομή και το μέγεθος των πόρων του σχηματιζόμενου ικρίωματος, γι' αυτό κατά την πειραματική διαδικασία μελετήθηκαν διάφορα πρωτόκολλα λυοφιλοποίησης και παρατηρήθηκε η συγκεκριμένη επίδραση. [14]
- Τη διαδικασία της λυοφιλοποίησης ακολουθεί σχεδόν πάντα η δημιουργία σταυροδεσμών (cross-linking) με τη μέθοδο αφυδροθερμικής διεργασίας (dehydrothermal treatment). Το γυαλί με τα έτοιμα πλέον ικρίωματα τοποθετείται σε ανοιχτό μεταλλικό δοχείο, το οποίο με τη σειρά τοποθετείται σε ειδικό χώρο όπου επικρατεί θερμοκρασία γύρω στους 100-110 °C υπό κενό, με σκοπό τη δημιουργία σταυροδεσμών. Οι σταυροδεσμοί αυτοί προσφέρουν στα ικρίωματα περισσότερη στιβαρότητα και μηχανική ακαμψία αλλά και αποτελεσματικότερη αντίσταση στην αποικοδόμηση. Ο χρόνος έκθεσης στη συγκεκριμένη διεργασία ποικίλει από 8-48 ώρες και θεωρητικά αύξησή του οδηγεί σε καλύτερη αντίσταση στην αποικοδόμηση. [7]

2.1.3 Παρασκευή Φύλλων PDMS

Το PDMS (polydimethylsiloxane) είναι ένα οργανικό ελαστομερές με βάση το πυρίτιο. Η ευκαμψία του μπορεί να ελεγχθεί βάσει του πρωτοκόλλου παρασκευής του. Παρουσιάζει ιξωδοελαστική συμπεριφορά ενώ είναι ιδιαιτέρως γνωστό για τις ρεολογικές του ιδιότητες και. Όταν το ρευστό PDMS εγχυθεί σε μία επιφάνεια τείνει να απλωθεί ώσπου να την καλύψει όλη. [22] Επίσης είναι μη τοξικό για τα κύτταρα. [18]

Οι εφαρμογές του PDMS ποικίλουν κυρίως λόγω της θερμικής του σταθερότητας, της χημικής του αδράνειας, της διαπερατότητας του σε πολλά αέρια, όπως και στο οξυγόνο, και του χαμηλού κόστους του [9, 22]:

- Το πιο σύνηθες υλικό στα microfluidicschips και στα bio-MEMS.
- Ως συστατικό σε φάρμακο θεραπείας για ψείρες.
- Ως πρόσθετο σε μαγειρικά λάδια

Στην συγκεκριμένη μελέτη το PDMS έχει διπλό ρόλο. Αρχικά χρησιμοποιείται με σκοπό την

πρόσδοση υδροφιλικότητας σε επιλεγμένα σημεία πάνω στο γυαλί. Το PDMS παρασκευασμένο σε κατάλληλης μορφής φύλλα τοποθετείται πάνω στο γυαλί αφήνοντας ακάλυπτες ορισμένες κυκλικές περιοχές όπου επιθυμείται να γίνει η έγχυση του εναιωρήματος και επομένως κατά την διεργασία του πλάσματος, η ιδιότητα της υδροφιλικότητας εμφανίζεται μόνο σ' αυτές τις ακάλυπτες περιοχές. Ακόμη χρησιμοποιείται ως η μάσκα που θα τοποθετηθεί πάνω στο γυαλί που φέρει τα ικριώματα και θα μετατρέψει το όλο σύστημα σε τρισδιάστατη well-plate που θα χρησιμοποιείται για την καλλιέργεια κυττάρων. Με αυτόν τον σκοπό τα φύλλα PDMS έχουν ορθογώνιο σχήμα διαστάσεων 22 mm x 44mm x 3mm, ενώ κατά το μήκος του υπάρχουν έξι κυκλικές οπές διαμέτρου 6mm (Εικόνα 11). Το συγκεκριμένο ύψος προσφέρει τα κατάλληλα τοιχώματα για την πραγματοποίηση καλλιιεργειών ενώ το πλάτος του PDMS είναι εμφανώς μικρότερο από αυτό του γυαλιού (24x50mm) ώστε να επιτρέπει την πρόσδεση του συστήματος σε μικροσκόπιο, οπότε και την παρατήρηση και την απεικόνιση κυττάρων.

Το PDMS που χρησιμοποιείται συνήθως σε εργαστηριακό επίπεδο, στον τομέα των microfluidics αλλά και στην συγκεκριμένη μελέτη, προέρχεται από το PDMS kit, Dowcorning, Sylgard 184, που αποτελείται από μία βάση και από ένα curing agent. Το πρωτόκολλο παρασκευής του παρατίθεται στο Παράρτημα Α, χωρίο Α2 στο τέλος της εργασίας. Ευχαριστίες για την προμήθεια του PDMS kit, Dowcorning, Sylgard 184 κατά τα πρώτα πειράματα, όπως και για την εκμάθηση του βασικού πρωτοκόλλου παρασκευής του πολυμερισμένου PDMS οφείλουν να δοθούν στην κ. Αντωνία Μαλένου, ερευνήτρια στο Ερευνητικό κέντρο «Δημόκριτος».

Τα καλούπια που χρησιμοποιήθηκαν για τη χύτευση του PDMS έχουν κατασκευαστεί από το πλαστικό υλικό PMMA (Poly-methyl-methacrylate). Τα επιμέρους κομμάτια έχουν σχεδιαστεί στο Solidworks, έχουν κοπεί σε laser-cutter, έχουν ευθυγραμμιστεί με χρήση κοχλίων και έχουν κολληθεί μεταξύ τους με ειδική κόλλα για πλαστικά υλικά. Με σκοπό την ολοκληρωτική στεγάνωση των καλουπιών (δηλαδή την αποφυγή διαρροής μείγματος PDMS ανάμεσα στα επιμέρους κομμάτια PMMA) πραγματοποιήθηκε έγχυση με σύριγγα πολύ μικρής ποσότητας γλωροφόρμιου στις θέσεις που ενώνονται τα επιμέρους κομμάτια.



Εικόνα 11: (αριστερά) Ελαστικότητα φύλλον PDMS, (δεξιά) Φύλλο PDMS με οπές για εφαρμογή στην κατασκευή της τρισδιάστατης well-plate

2.2 Μέθοδοι Χαρακτηρισμού Λεπτών Ικριωμάτων

Για τον χαρακτηρισμό των λεπτών ικριωμάτων μετρήθηκαν τέσσερες βασικές παραμέτρους που επηρεάζουν την εφαρμογή τους σε τρισδιάστατες καλλιέργειες κυττάρων:

- το πάχος (κατάλληλο τρισδιάστατο περιβάλλον για τα κύτταρα)

- η μέση διάμετρος πόρων (πόροι κατάλληλοι για την απορρόφηση του κυτταρικού εναιωρήματος και των θρεπτικών συστατικών)
- Η ομοιομορφία στην κατανομή και στο μέγεθος των πόρων των ικριωμάτων (ομοιομορφία κατανομής κυττάρων σε όλο το ικρίωμα)
- το μακροσκοπικό μέτρο ελαστικότητάς τους και η συμπεριφορά που παρουσιάζουν σε μηχανική καταπόνηση (ικανοποιητική αντοχή σε αποικοδόμηση)

Για την λήψη των απαραίτητων πληροφοριών σχετικά με τις ανωτέρω ιδιότητες πραγματοποιήθηκε επιφανειακός και μηχανικός χαρακτηρισμός των ικριωμάτων μέσω ενός ηλεκτρονικού μικροσκοπίου σάρωσης και μιας μηχανικής πρέσας BOSE3100 αντίστοιχα.

2.2.1 Ηλεκτρονική Μικροσκοπία Σάρωσης

Το ηλεκτρονικό μικροσκόπιο σάρωσης, (Scanning Electron Microscopy, SEM) είναι ένα μικροσκόπιο που παράγει εικόνες του εκάστοτε δείγματος μέσω της σάρωσής αυτού από μια εστιασμένη δέσμη ηλεκτρονίων. Λόγω της αλληλεπίδρασης των ηλεκτρονίων με τα άτομα του δείγματος παράγονται σήματα που φέρουν πληροφορίες σχετικά με τη σύσταση και την μορφή της επιφάνειας του δείγματος. Αυτά τα σήματα μετατρέπονται από τον σαρωτή του μικροσκοπίου σε εικόνες.[23] Στον πιο κλασσικό τύπο SEM, η ανίχνευση των σημάτων γίνεται από τα δευτερεύοντα ηλεκτρόνια που εκπέμπουν τα άτομα του δείγματος όταν διεγείρονται από την αρχική δέσμη των ηλεκτρονίων. Σε αυτόν τον τύπο SEM είναι σημαντική για το αποτέλεσμα και η γωνία με την οποία η δέσμη των ηλεκτρονίων συναντά την επιφάνεια του δείγματος. [23]

Για τον επιφανειακό χαρακτηρισμό των λεπτών ικριωμάτων έγινε χρήση του ηλεκτρονικού μικροσκοπίου σάρωσης που στεγάζεται στο Τμήμα Εφαρμοσμένων Μαθηματικών και Φυσικών Επιστημών του Εθνικού Μετσόβιου Πολυτεχνείου (ΣΕΜΦΕ), το οποίο χρησιμοποιεί για την ανίχνευση δευτερεύοντα ηλεκτρόνια. Οι ευχαριστίες για την εκμάθηση χρήσης του οφείλουν να δοθούν στον κ. Λάμπρο Πατσιούρα και τον καθηγητή κ. Δημήτρη Τσουκαλά.

Η εικόνα 12 δείχνει τα λεπτά ικρίωματα τοποθετημένα στην ειδική βάση του ηλεκτρονικού μικροσκοπίου σάρωσης με σκοπό τον δομικό χαρακτηρισμό τους.

Η επεξεργασία των εικόνων SEM με που λήφθηκαν στο ΣΕΜΦΕ με σκοπό την εύρεση του μέσου μεγέθους πόρου των ικριωμάτων πραγματοποιήθηκε με το πρόγραμμα *Imagej*. Αρχικά γίνεται αντιστοίχιση pixels σε πραγματική απόσταση και οι πόροι των ικριωμάτων αντιστοιχούνται με κατάλληλες ελλείψεις, οπότε η μέση διάμετρος τους βρίσκεται από το μέσο όρο μικρής και μεγάλης διαμέτρου των ελλείψεων. Για κάθε εικόνα (μεγένθυση 700x) λαμβάνονται μετρήσεις από 30 πόρους από όπου υπολογίζονται η μέση τιμή και η τυπική απόκλιση της διαμέτρου των πόρων.

Συγκρίσεις για αναγνώριση στατιστικά σημαντικών διαφορών μεταξύ πειραματικών μετρήσεων από διαφορετικά είδη ικριωμάτων προκύπτουν μέσω της στατιστικής ανάλυσης Anova. Η στατιστική ανάλυση πραγματοποιείται στο υπολογιστικό εργαλείο, Matlab μέσω της εντολής `anova1`. Η ανάλυση Anova είναι ανάλογη του Students t-test αλλά ισχύει για περισσότερους από δύο πληθυσμούς. Λεπτομέρειες για την διαδικασία απεικόνισης μέσω SEM παρατίθενται στο πρωτόκολλο που βρίσκεται στο Παράρτημα Α, χωρίο Α5.



Εικόνα 12: Τοποθέτηση ικριωμάτων στην βάση για την έναρξη της ηλεκτρονικής μικροσκοπίας σάρωσης

2.2.2 Μέτρηση Μηχανικών Ιδιοτήτων των Ικριωμάτων

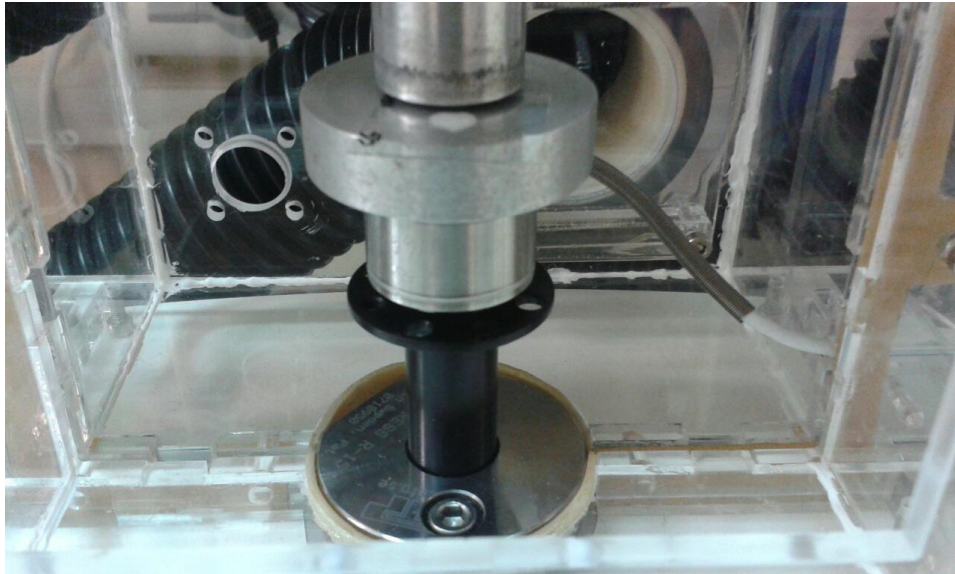
Ο μηχανικός χαρακτηρισμός των ικριωμάτων πραγματοποιήθηκε στην πρέσα BOSE electroforce 3100 του Εργαστηρίου Εμβιομηχανικής και Συστημικής Βιολογίας του Εθνικού Μετσόβιου Πολυτεχνείου.

Αρχικά μέσω της μέτρησης ενός δείγματος αναφοράς και έπειτα μέσω της μέτρησης του δείγματος ενδιαφέροντος προσδιορίζεται το ακριβές πάχος του τελευταίου. Έπειτα το εκάστοτε δείγμα τοποθετείται στην ειδική βάση της πρέσας και υφίσταται τη μηχανική δοκιμή της θλίψης. (Εικόνα 13). Κατά την δοκιμή της θλίψης μειώνεται το πάχος του ικριώματος μέχρι μιας ορισμένης από τον χρήστη τιμής και καταγράφεται η απαιτούμενη δύναμη καταπόνησης.

Πιο συγκεκριμένα, μετά τη μέτρηση του πραγματικού πάχους του ικριώματος υπολογίζονται τιμές παραμόρφωσης του ικριώματος κατά 5%, 10%, 20% και 30% του αρχικού πάχους. Ο χρόνος μετάβασης από το ένα βήμα παραμόρφωσης στο άλλο είναι 0.05 δευτερόλεπτα ενώ ο χρόνος παραμονής σε κάθε μετατόπιση είναι 15 λεπτά. Μετά το πείραμα γίνεται επεξεργασία των πειραματικών δεδομένων στο περιβάλλον αριθμητικής υπολογιστικής, Matlab και υπολογίζονται ακολούθως η τιμή του μακροσκοπικού μέτρου ελαστικότητας των δειγμάτων, η σταθερά χρόνου της απόκρισης, καθώς και οι καμπύλες δύναμης-χρόνου. Μέσω του εργαλείου *cftool* γίνεται προσέγγιση των αποκρίσεων από την εκθετικής μορφής εξίσωση $F = a * e^{-b*t} + c$ και υπολογίζονται οι τιμές των παραμέτρων a, b, c . Η σταθερά χρόνου δίνεται από την σχέση $\tau = \frac{1}{b}$ ενώ για τον υπολογισμό του μέτρου ελαστικότητας χρησιμοποιήθηκε η γνωστή σχέση: $E = \frac{\delta F}{A * \delta \epsilon}$, όπου F η ακούμενη θλιπτική δύναμη, A το εμβαδόν των ικριωμάτων που ασκείται η δύναμη και ϵ η παραμόρφωση του πάχους.

Ο υπολογισμός του μέτρου ελαστικότητας έγινε για $\delta \epsilon = 10\%$ όταν η αντίστοιχη μεταβολή της δύναμης είναι $\delta F = c_2 - c_1$, όπου c_1 είναι η τελική τιμή δύναμης όταν το υλικό έχει φτάσει σε πάχος 80% του αρχικού και c_2 η αντίστοιχη δύναμη όταν έχει φτάσει σε πάχος 70% του αρχικού.

Ευχαριστίες οφείλουν να δοθούν στην μεταπτυχιακή φοιτήτρια του εργαστηρίου, Αναστασία Γκιουσουδάκη και στον προπτυχιακό φοιτητή Μιχάλη Σαλούφα για την εκμάθηση χρήσης της πρέσας και την βοήθεια στην πραγμάτωση του πρώτου πειράματος.



Εικόνα 14: Τοποθέτηση λεπτού ικριώματος στην βάση της BOSE3100 για υποβολή στη μηχανική δοκιμή της θλίψης μέσω της ράβδου που βρίσκεται πάνω από το ικρίωμα

2.3 Εφαρμογή Λεπτών Πορώδων Ικριωμάτων στην Μελέτη Κακοηθών Μελανοκυττάρων

2.3.1 Καλλιέργεια Μελανοκυττάρων στα Λεπτά Ικρίωματα

Η μέθοδος καλλιέργειας των κακοηθών μελανοκυττάρων μέσα στο τρισδιάστατο σύστημα καλλιέργειας ομοιάζει σε μεγάλο βαθμό τον τρόπο καλλιέργειας κυττάρων στις κλασικές 96 well-plates, γεγονός που συμπεριλαμβάνεται στα πλεονεκτήματά του. Το ακριβές πρωτόκολλο καλλιέργειας στα λεπτά ικρίωματα περιγράφεται στο Παράστημα Β, χωρίο Β2. Στην περίπτωση της πιλοτικής μελέτης της επίδρασης φαρμάκων στα κύτταρα εν παρουσία τεχνητής εξωκυττάριας μήτρας, συγκεκριμένη ποσότητα φαρμάκων αναμείχθηκε με το διάλυμα θρεπτικών συστατικών των κυττάρων και εγχύθηκε στα βοθρία της τρισδιάστατης πλάκας ικριωμάτων. Τα αποτελέσματα της μελέτης αυτής ερευνήθηκαν μέσω κυτταρικής απεικόνισης και μέτρησης των επιπέδων έκφρασης ενός ενζύμου που συνδέεται στενά με την ύπαρξη καρκινικών κυττάρων.

2.3.2 Απεικόνιση Κυττάρων Μέσω Μικροσκοπίας Φθορισμού

Με σκοπό την παρατήρηση της μορφολογίας που αποκτούν τα κακοηθή μελανοκύτταρα μέσα στα λεπτά ικρίωματα πραγματοποιήθηκε μέθοδος απεικόνισης με βαφή (staining). Μετά από καλλιέργεια κυττάρων μέσα στα λεπτά ικρίωματα με ή χωρίς την παρουσία φαρμάκου, τους προστέθηκαν τρεις βαφές, η κάθε μία εκ των οποίων έχει την ιδιότητα χρωματισμού άλλου τύπου. Συγκεκριμένα, η μία βαφή χρωματίζει με πράσινο χρώμα τα ζωντανά κύτταρα, μία άλλη βαφή έχει την ιδιότητα να εισέρχεται στα νεκρά κύτταρα και να τους προσδίδει κόκκινο χρώμα ενώ η τρίτη δύναται να εισέρχεται στον πυρήνα του κυττάρου και να τον χρωματίζει με μπλε χρώμα. Μετά από επώαση των κυττάρων εντός των ικριωμάτων στον επωαστή κυττάρων για κατάλληλο χρονικό διάστημα απομακρύνεται το διάλυμα βαφής και γίνεται απεικόνιση των δειγμάτων στο JULI stage μικροσκόπιο του Εργαστηρίου Εμβιομηχανικής και Συστημικής Βιολογίας. Το JULI

stage μικροσκόπιο περιέχει διαφορετικά κανάλια τα οποία αντιστοιχούν στην κάθε διαφορετική βαφή:

- Κανάλι DAPI : Μπλε χρωματισμός. Βαφή Hoechst που παρουσιάζει τους πυρήνες όλων των κυττάρων

- Κανάλι GFP: Πράσινος χρωματισμός. Βαφή calcein AM που παρουσιάζει το κυτταροπλασμα και των πυρήνα μόνο των ζωντανών κυττάρων.

- Κανάλι RFP: Κόκκινος χρωματισμός: Βαφή propodium iodide που παρουσιάζει τους πυρήνες μόνο των νεκρών κυττάρων.

- Κανάλι brightfield: Ασπρόμαυρη εικόνα που δύναται να απεικονίσει και το περιβάλλον καλλιέργειας των κυττάρων (ένδειξη δομής ικριώματος στην συγκεκριμένη εργασία)

Οι εικόνες που λήφθηκαν μέσω του μικροσκοπίου αυτού χρησιμοποιήθηκαν για την παρατήρηση της δομής που αποκτούν τα κύτταρα κατά την καλλιέργεια μέσα στα ικριώματα, την παρατήρηση της επίδρασης του υλικού, καθώς και την παρατήρηση της επίδρασης της προσθήκης φαρμάκων στην βιωσιμότητα των κυττάρων. Το πρωτόκολλο απεικόνισης κυττάρων με την παραπάνω τεχνική παρατίθεται στο Παράρτημα Β, χωρίο Β3.

2.3.3 Ποσοτικοποίηση Έκφρασης Gardh μέσω της μεθόδου Luminex ELISA

Το GapdH (Glyceraldehyde 3-phosphatedehydrogenase) είναι ένα ένζυμο με ποικίλες λειτουργίες όπως η κατάλυση του έκτου βήματος της γλυκόλυσης, η συμμετοχή του στην μεταγραφή αλλά και στην ενεργοποίηση της απόπτωσης. Το ένζυμο αυτό το εκφράζουν όλα τα είδη κυττάρων σε σταθερή ποσότητα ανεξαρτήτως από τις συνθήκες διαβίωσής τους. Τα επίπεδα έκφρασης του GapdH παρουσιάζονται μεγάλα στην περίπτωση καρκινικών κυττάρων και συνδέονται με την εξέλιξη του όγκου. [25] Με βάση αυτό το γεγονός, οι βιολόγοι καλλιεργούν κύτταρα σε 96 well-plates για ορισμένο χρονικό διάστημα και όταν είναι επιθυμητή η λήψη αποτελεσμάτων πραγματοποιείται το πρωτόκολλο ELISA, το οποίο παρατίθεται στο Παράρτημα Β, χωρίο Β4, και το οποίο μετράει τα επίπεδα έκφρασης του ενζύμου Gardh.

Στην παρούσα εργασία η μέτρησης σήματος του ενζύμου Gardh αποσκοπεί στην μελέτη της αλληλεπίδρασης των καρκινικών κυττάρων με την τεχνητή εξωκυττάρια μήτρα. Επίπεδα έκφρασης Gardh μετρήθηκαν σε κύτταρα που καλλιεργούνται μέσα σε ικριώματα αλλά και στις κλασικές 96-well plates. Επίσης, μέσω του σήματος του συγκεκριμένου ενζύμου παρατηρήθηκε η επίδραση συγκεκριμένων φαρμάκων στον πολλαπλασιασμό και την βιωσιμότητα των κακοηθών μελανοκυττάρων όταν αυτά καλλιεργούνται σε λεπτά ικριώματα και έγινε σύγκριση με τα αντίστοιχα αποτελέσματα σε 96 well-plates.

3 Πειραματικός Σχεδιασμός και Αποτελέσματα

Στο κεφάλαιο 3 περιγράφεται ο πειραματικός σχεδιασμός και παρουσιάζονται τα πειραματικά πειράματα που πραγματοποιήθηκαν στα δύο μέρη της εργασίας. Το πρώτο μέρος παρουσιάζει πειράματα που περιγράφουν τις δομικές και μηχανικές ιδιοτήτων των λεπτών πορώδων ικριωμάτων και πως επηρεάζονται από τις παραμέτρους της διαδικασίας παρασκευής. Στην ενότητα 3.1 παρουσιάζεται ο πειραματικός σχεδιασμός του πρώτου μέρους. Στο εδάφιο 3.2 παρουσιάζεται ο χαρακτηρισμός των δομικών χαρακτηριστικών των κρυωμάτων (πάχος, διάμετρος πόρων, ιδιότητες πόρων). Στο εδάφιο 3.3 παρουσιάζεται ο χαρακτηρισμός των μηχανικών ιδιοτήτων των κρυωμάτων. Το δεύτερο μέρος του παρόντος κεφαλαίου αφορά μια μελέτη της επίδρασης δύο φαρμάκων σε κύτταρα μελανώματος. Στο εδάφιο 3.4 παρουσιάζεται ο πειραματικός σχεδιασμός και παρατίθενται τα πειραματικά πειραματικά αποτελέσματα.

3.1 Παρασκευή ικριωμάτων

Το πρώτο μέρος της εργασίας εστιάζει στον χαρακτηρισμό των μηχανικών και δομικών ιδιοτήτων των λεπτών ικριωμάτων κολλαγόνου. Σκοπός του είναι ο χαρακτηρισμός των δομικών ιδιοτήτων (πάχος, ομοιομορφία, μέση διάμετρος πόρων, ιδιότητες πόρων) και μηχανικών ιδιοτήτων (μέτρο ελαστικότητας, ξυωδοελαστικότητα) των κρυωμάτων ως συνάρτηση τεσσάρων παραμέτρων της διαδικασίας παρασκευής :

- Ρυθμός ψύξης: Σύμφωνα με τη βιβλιογραφία, το μέσο μέγεθος πόρων των ικριωμάτων σχετίζεται σημαντικά με τη διαδικασία λυοφιλοποίησης, και πιο συγκεκριμένα με τον ρυθμό ψύξης. [14] Οι σχετικές μελέτες αναφέρουν ότι αργότερος ρυθμός ψύξης οδηγεί σε μεγαλύτερο μέσο μέγεθος πόρων. Με σκοπό τη μελέτη της συγκεκριμένης παραμέτρου και την εύρεση του πρωτοκόλλου που επιτυγχάνει ικανοποιητικό μέγεθος πόρων, η διαδικασία της λυοφιλοποίησης έλαβε χώρα ως την τελική θερμοκρασία ψύξης $-40\text{ }^{\circ}\text{C}$ με τρεις διαφορετικούς ρυθμούς ψύξης: $0.2\text{ }^{\circ}\text{C}/\text{min}$, $0.5\text{ }^{\circ}\text{C}/\text{min}$ και $1^{\circ}\text{C}/\text{min}$. Οι υπόλοιποι χρόνοι και ρυθμοί κατά τις φάσεις ανόπτησης και πρωτοταγούς - δευτεροταγούς αφυδάτωσης διατηρήθηκαν ίδιοι και στις τρεις περιπτώσεις.
- Χημική σύσταση: Τα ικρίωματα παρασκευάζονται με λυοφιλοποίηση ενός εναιωρήματος που βασίζεται σε κολλαγόνο τύπου I. Η χημική σύσταση του εναιωρήματος καθορίζει την χημική σύσταση του ικριώματος. Στο εναιώρημα αυτό μπορούν να προστεθούν πέραν του κολλαγόνου I επιπλέον συστατικά (φυσικά ή τεχνητά πολυμερή) με σκοπό τον έλεγχο των ιδιοτήτων του και την επίδραση των κυττάρων. Ιστορικά το πιο σημαντικό εναιώρημα συνδυάζει κολλαγόνο τύπου I με γλυκοζαμινογλυκάνες (glycosaminoglycans, GAG) και αντιστοιχεί στο ικρίωμα που χρησιμοποιείται στην αναγέννηση δέρματος. Οι γλυκοζαμινογλυκάνες προσφέρουν στο ικρίωμα μηχανική ακαμψία και συνεισφέρουν στον έλεγχο του ρυθμού αποικοδόμησης του ικριώματος, ενός χαρακτηριστικού πολύ σημαντικό στις εφαρμογές αναγεννητικής ιατρικής.[7] Αντίθετα, σε εφαρμογές αναγέννησης περιφερειακών νεύρων χρησιμοποιείται εναιώρημα που περιέχει μόνο κολλαγόνο I. Η συγκεκριμένη εργασία μελετά ικρίωματα από κολλαγόνο I, ικρίωματα κολλαγόνου-GAG, και επιπλέον ικρίωματα ζελατίνης. Η ζελατίνη παράγεται από την υδρόλυση του κολλαγόνου και αποτελείται από τις αποδιαταγμένες τρεις αλυσίδες του μορίου του κολλαγόνου. Όταν το εναιώρημα ζελατίνης είναι σε θερμοκρασία μικρότερη από τη θερμοκρασία δωματίου αποκτά το εναιώρημα ζελατίνης μετατρέπεται σε γέλη (gel).
- Πάχος ικριωμάτων: Το αναμενόμενο πάχος t ενός λεπτού κρυώματος διαμέτρου d που προκύπτει από μια σταγόνα εναιωρήματος όγκου V μπορεί να εκτιμηθεί βάση την εξίσωση

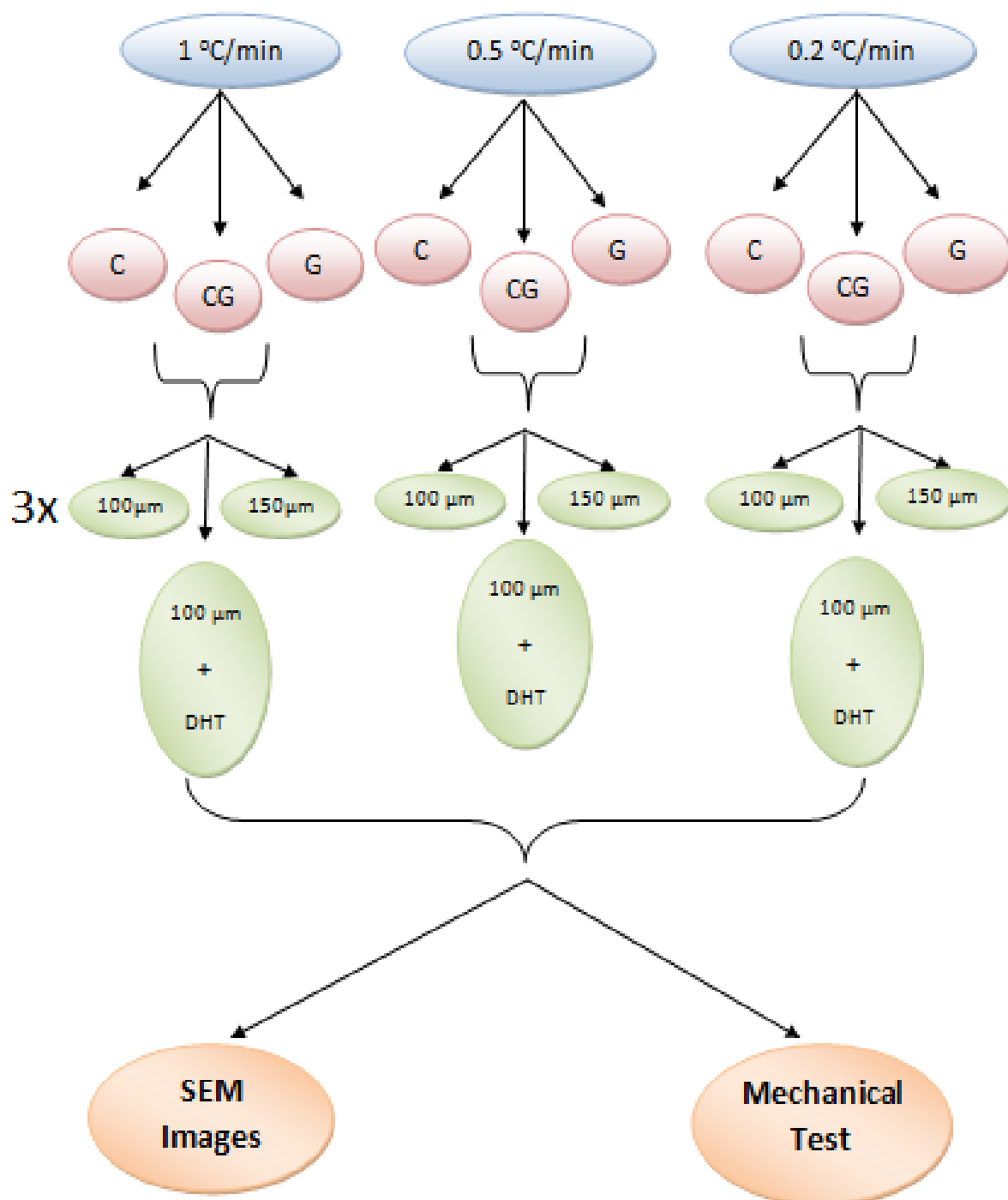
όγκου κυλίνδρου, $V = \pi * \frac{d^2}{4} * t$. Στην πράξη το πάχος του ικρωμάτος μπορεί να διαφέρει για διάφορους λόγους (εξάτμιση εναιωρήματος, σφάλμα έγχυσης με πιπέτα). Επιλέχθηκαν αρχικά ποσότητες εναιωρήματος τέτοιες ώστε να προκύψουν ικριώματα ονομαστικού ύψους 100μm και 150μm. Λόγω όμως της παρατήρησης πολύ γρήγορης εξάτμισης του μικρού όγκου εναιωρήματος μέχρι την έναρξη της ψύξης, μετά από δοκιμές, επιλέχθηκαν τελικά όγκοι εναιωρήματος που προσφέρουν ονομαστικό πάχος ικριωμάτων 120μm και 180μm. Αυτό διασφάλισε ότι σε περίπτωση απώλειας όγκου το τελικό πάχος θα ήταν ικανοποιητικά κοντά στα 100 μm και 150μm αντίστοιχα. Όπως έχει ήδη αναφερθεί η διάμετρος των ικριωμάτων επιλέχθηκε 6mm, δηλαδή ο κοντινότερος ακέραιος αριθμός στην διάμετρο που έχουν τα wells σε μια 96 well-plate (d=6.3mm).

- Δημιουργία σταυροδεσμών (Cross-linking): Η υποβολή των ικριωμάτων στην διαδικασία cross-linking είναι ιδιαίτερα σημαντική για την ρύθμιση της στιβαρότητας καθώς και του ρυθμού αποικοδόμησής του ικριώματος. [7] Στα πλαίσια της παρούσας εργασίας ορισμένα λυοφιλοποιημένα ικριώματα υποβλήθηκαν σε cross-linking ενώ άλλα όχι, στοχεύοντας στην διερεύνηση του πόσο η διαδικασία αυτή επιδρά στην τιμή του μακροσκοπικού μέτρου ελαστικότητας των ικριωμάτων.

Συνολικά οι διαφορετικοί παράμετροι παρασκευής είναι τέσσερις. Με κάθε πρωτόκολλο λυοφιλοποίησης (δηλαδή για κάθε έναν απ' τους τρεις διαφορετικούς ρυθμούς ψύξης) παρασκευάστηκαν ικριώματα τριών διαφορετικών χημικών συστάσεων για τελικά πάχη 100μm και 150μm. Παρασκευάστηκε και μετρήθηκε μια τριάδα ικριωμάτων για κάθε δυνατό συνδυασμό. Η πλειοψηφία των ικριωμάτων δεν υποβλήθηκε στη διεργασία του cross-linking αλλά παρασκευάστηκε με ρυθμό ψύξης 1 °C/min και μία επιπλέον τριάδα ικριωμάτων ονομαστικού πάχους 100 μm και των τριών χημικών συστάσεων, η οποία υπέστη cross-linking (105 °C, 50 mtorr, 24h) με σκοπό την παρατήρηση της επίδρασης της συγκεκριμένης παραμέτρου.

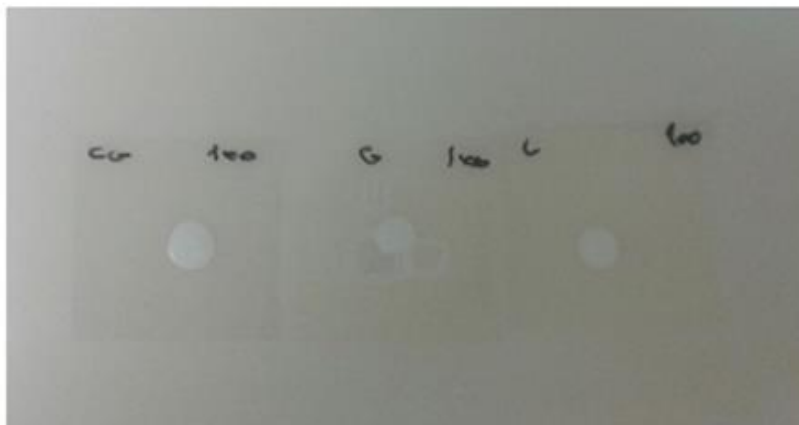
Λόγω της απαίτησης για χαρακτηρισμό κάθε ικριώματος ξεχωριστά, αυτά παρασκευάστηκαν πάνω σε καλυπτρίδες μικροσκοπίας (διαστάσεις: 22mm x 22mm x 0.17 mm). Η διαδικασία καθαρισμού και παρασκευής ήταν η ίδια ακριβώς με αυτή που έχει αναλυθεί στην ενότητα 2 με μόνη διαφορά ότι δεν χρειάζεται η τελική μάσκα PDMS ώστε να δημιουργηθούν βοθρία για καλλιέργεια καθώς τα συγκεκριμένα ικριώματα χρησιμοποιούνται απλώς για τα πειράματα χαρακτηρισμού.

Ο πειραματικός σχεδιασμός για την αξιολόγηση της επίδρασης των παραμέτρων παρασκευής στις ιδιότητες των ικριωμάτων παρουσιάζεται συνοπτικά στο σχεδιάγραμμα 1. Στην εικόνα 15 φαίνονται τα λεπτά ικριώματα κολλαγόνου, κολλαγόνου-γλυκοζαμινογλυκάνης και ζελατίνης που παρασκευάστηκαν με σκοπό τον χαρακτηρισμό μέσω της ηλεκτρονικής μικροσκοπίας σάρωσης και της μηχανικής δοκιμής της θλίψης. Η εικόνα 16 δείχνει το ολοκληρωμένο τρισδιάστατο σύστημα καλλιέργειας με τα ικριώματα.

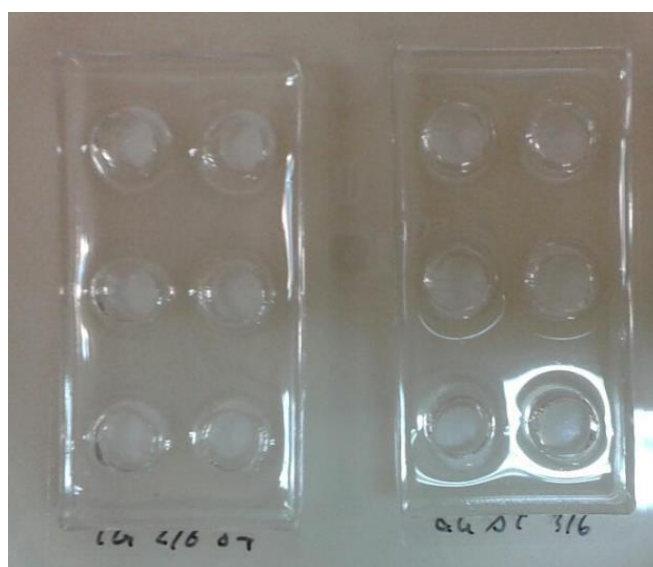


C=Collagen, CG=Collagen-GAG, G=Gelatin, DHT=Cross-linking

Σχδιάγραμμα 1: Βήματα παρασκευής και χαρακτηρισμού λεπτών ικτριωμάτων



Εικόνα 15: Φωτογραφίες ικριωμάτων κολλαγόνου-γλυκοζαμινογλυκάνης (αριστερά), ζελατίνης (μέση), κολλαγόνου (δεξιά)



Εικόνα 16: Το τρισδιάστατο σύστημα καλλιέργειας. Ικριώματα κολλαγόνου-γλυκοζαμινογλυκάνης πάχους 100 μm πάνω στο λεπτό γυαλί μικροσκοπίας που φέρει και τη μάσκα από PDMS η οποία δημιουργεί τα βοθρία, προσφέροντας τη δυνατότητα καλλιέργειας.

3.2 Χαρακτηρισμός Δομής Λεπτών Ικριωμάτων Μέσω Ηλεκτρονικής Μικροσκοπίας Σάρωσης (SEM)

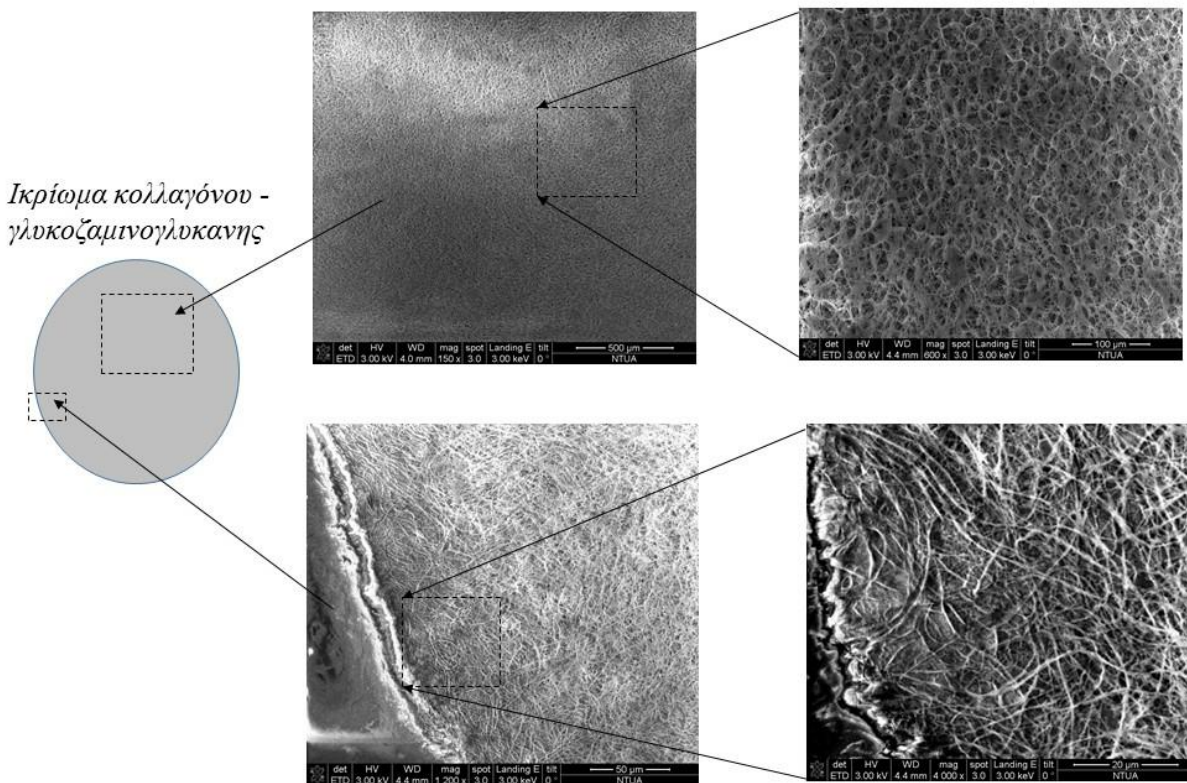
Το παρόν εδάφιο παρουσιάζει πειραματικά δεδομένα ηλεκτρονικής μικροσκοπίας σάρωσης με σκοπό να ποσοτικοποιηθεί η επίδραση της χημικής σύστασης και του ρυθμού ψύξης του πρωτοκόλλου της λυοφιλοποίησης στη μορφολογία, την ομοιομορφία, το μέγεθος διαμέτρου των πόρων αλλά και το πλήθος τους στα λεπτά ικριώματα. Μέσω ηλεκτρονικής μικροσκοπίας

σάρωσης λήφθηκαν φωτογραφίες για μια τριάδα από κάθε είδος ικριωμάτων (κάθε είδος αντιστοιχεί σε διαφορετικό συνδυασμό χημικής σύστασης και ρυθμού ψύξης). Τα πειραματικά αποτελέσματα φαίνονται στις εικόνες 17 ως 21.

Μελέτη Ομοιομορφίας Δομής

1. Είναι η δομή των πόρων ομοιόμορφη στο ικρίωμα;

Η εικόνα 17 παρουσιάζει αντιπροσωπευτικές εικόνες SEM από ένα ικρίωμα κολλαγόνου-γλυκοσαμινογλυκάνης (CG) διαμέτρου 6mm σε διάφορα σημεία του ικριώματος. Η εικόνα αυτή δείχνει ότι η δομή και το μέγεθος των πόρων είναι ομοιόμορφη σε ολόκληρο το ικρίωμα κολλαγόνου-γλυκοσαμινογλυκάνης εκτός από μια απόσταση περίπου 100 μm στην άκρη του ικριώματος.



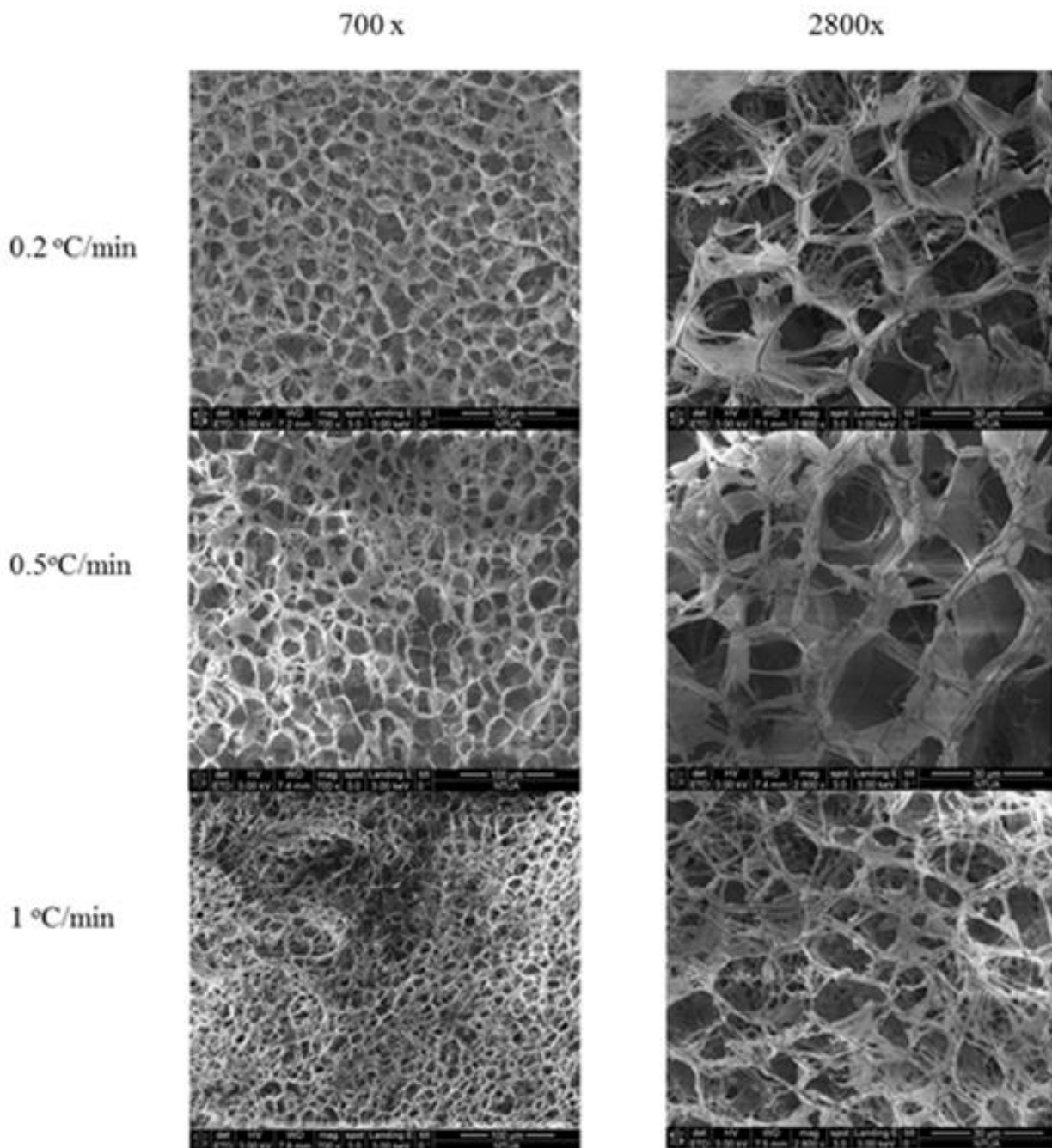
Εικόνα 17: Το σχήμα αριστερά αντιπροσωπεύει το ικρίωμα κολλαγόνου-γλυκοσαμινογλυκάνης διαμέτρου 6 mm. Η πάνω εικόνα αριστερά δείχνει ένα τμήμα του ικριώματος, έκτασης περίπου 2 mm, ενώ η πάνω εικόνα δεξιά αποτελεί μεγέθυνση ενός μικρότερου τμήματος αυτού. Στην εικόνα κάτω αριστερά φαίνεται ένα ακριανό τμήμα του ικριώματος, ενώ η εικόνα δεξιά αποτελεί μεγέθυνση μιας έκτασης 80 μm της ακριανής όψης του ικριώματος.

Μελέτη Δομής των Πόρων

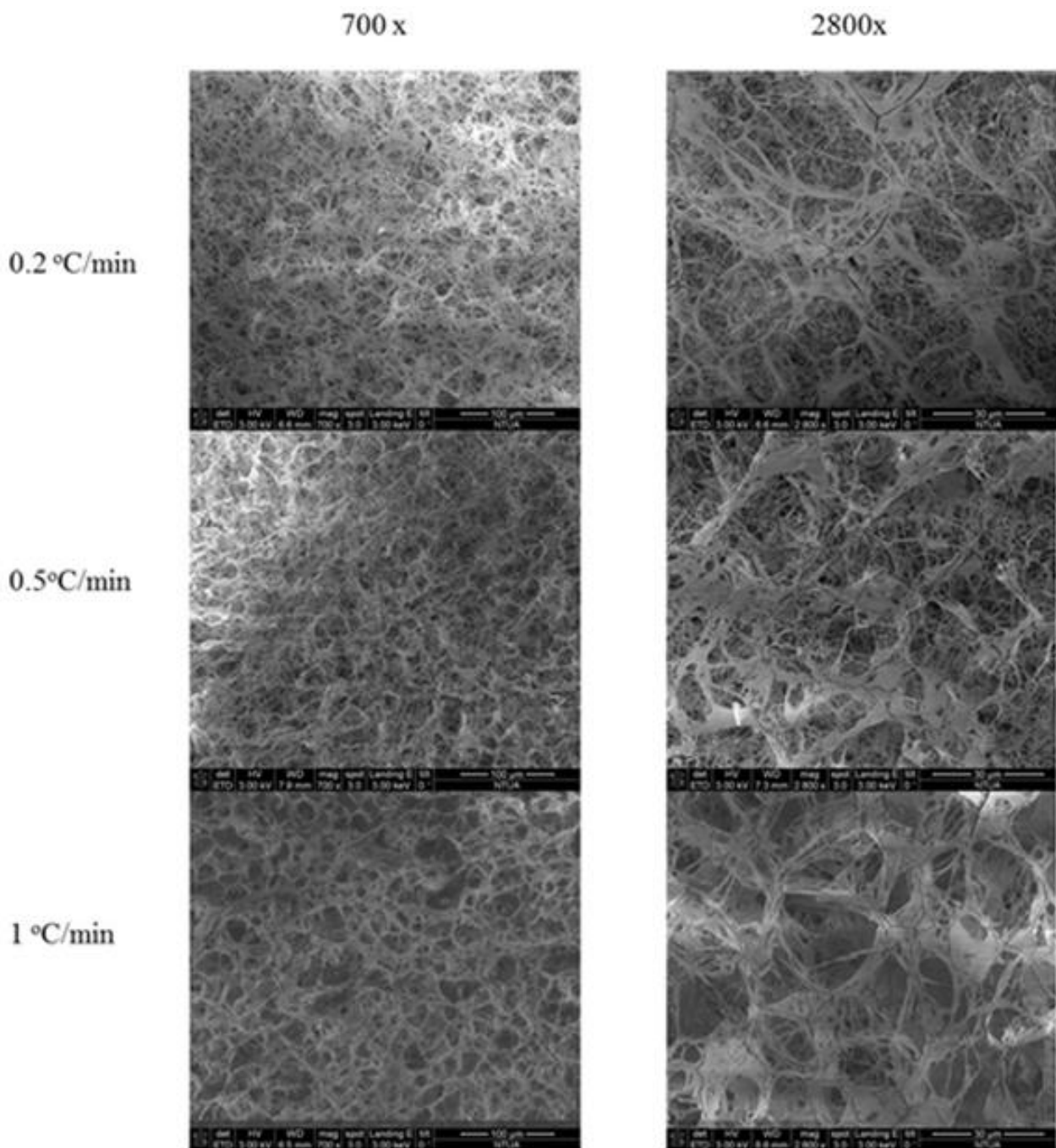
2. Πως επηρεάζεται το μέσο μέγεθος πόρου από την χημική σύσταση, το πάχος του ικριώματος και τον ρυθμό ψύξης του πρωτοκόλλου λυοφιλοποίησης;

Οι εικόνες 18 έως 20 παρουσιάζουν πειραματικά δεδομένα που αξιολογούν πως επηρεάζεται το μέσο μέγεθος πόρου από την χημική σύσταση, το πάχος του ικριώματος και τον ρυθμό ψύξης του

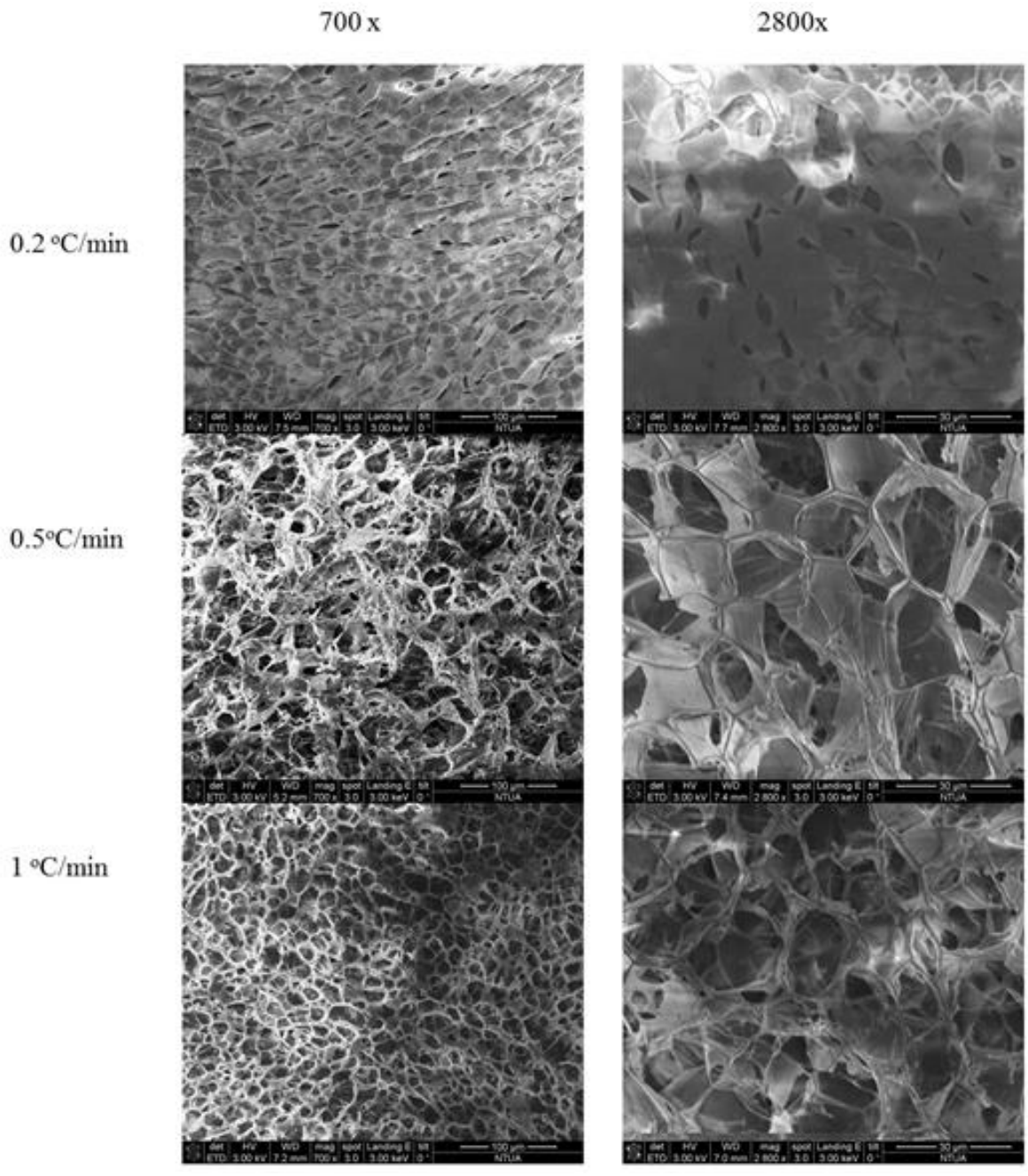
πρωτοκόλλου λυοφιλοποίησης. Σε αυτές φαίνεται η επίδραση του ρυθμού ψύξης στην μορφολογία και το μέσο μέγεθος πόρου των ικριωμάτων κολλαγόνου (C), κολλαγόνου-γλυκοζαμινογλυκάνης (CG) και ζελατίνης (G), αντιστοίχως. Οι εικόνες SEM έχουν ληφθεί σε μενένθυση 700x και 2800x. Σύμφωνα με την εικόνα 18, οι αργότεροι ρυθμοί ψύξης (0.2 °C/min και 0.5°C/min) επιτυγχάνουν μεγαλύτερο μέγεθος πόρων στα ικριώματα κολλαγόνου. Η εικόνα 19 δίδει ότι τα ικριώματα κολλαγόνου-γλυκοζαμινογλυκάνης παρουσιάζουν μια περισσότερο δαιδαλώδη δομή στους πόρους σε σχέση με τα ικριώματα κολλαγόνου. Δείχνει επίσης ότι ο ρυθμός ψύξης δε μεταβάλλει έντονα το μέγεθος πόρου. Η εικόνα 20 δείχνει αύξηση της μέσης διαμέτρου των πόρων στα ικριώματα ζελατίνης όταν ο ρυθμός ψύξης μειώνεται από 1 °C/min σε 0.5 °C/min. Δείχνει επίσης την αδυναμία ανάπτυξης ανοικτών πόρων όταν ο ρυθμός ψύξης μειώνεται σε 0.2 °C/min.



Εικόνα 18: Εικόνες ηλεκτρονικής μικροσκοπίας σάρωσης σε μεγενθύνσεις 700x και 2800x ικριωμάτων κολλαγόνου παρασκευασμένων με ρυθμό ψύξης 0.2 °C/min, 0.5 °C/min ή 1 °C/min



Εικόνα 19: Εικόνες ηλεκτρονικής μικροσκοπίας σάρωσης σε μεγεθύνσεις 700x και 2800x ικριωμάτων κολλαγόνου-γλυκοζαμινογλυκανών, παασκευασμένων με ρυθμό ψύξης 0.2 °C/min, 0.5 °C/min ή 1 °C/min

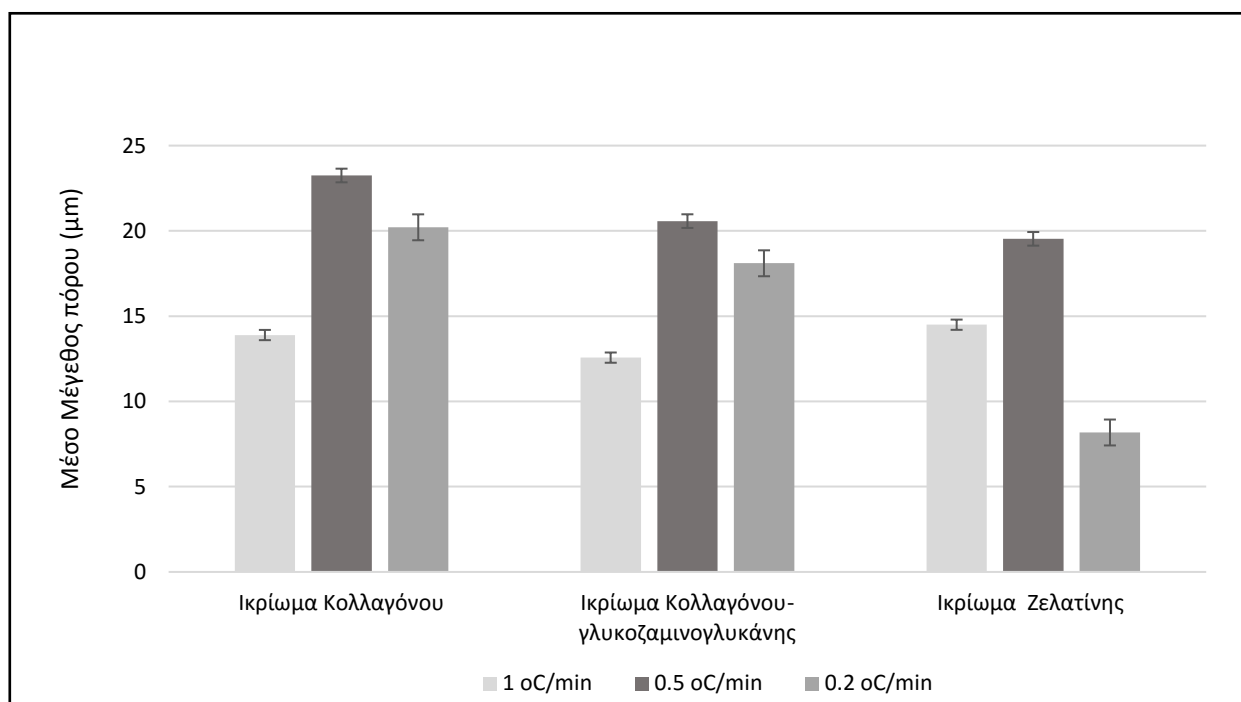


Εικόνα 20: Εικόνες ηλεκτρονικής μικροσκοπίας σάρωσης σε μεγεθύνσεις 700x και 2800x ικτριωμάτων ζελατίνης παρασκευασμένων με ρυθμό ψύξης 0.2 °C/min, 0.5 °C/min ή 1 °C/min

Με βάση τις εικόνες 18-20 μετρήθηκε η μέση τιμή της διαμέτρου των πόρων των ικριωμάτων στο πρόγραμμα ImageJ με τον τρόπο που περιγράφηκε στο εδάφιο 2.2.1. Η ποσοτικοποίηση των αποτελεσμάτων παρουσιάζεται στους πίνακες 1 και 2, καθώς και στα διαγράμματα 1,2.

Πίνακας 1: Ποσοτικοποίηση της διαμέτρου πόρων σε ικριώματα πάχους 150 μm , παρασκευασμένα με τρεις διαφορετικούς ρυθμούς ψύξης. Τα δεδομένα παρουσιάζονται ως μέση τιμή + τυπική απόκλιση του μέσου ($n=3$)

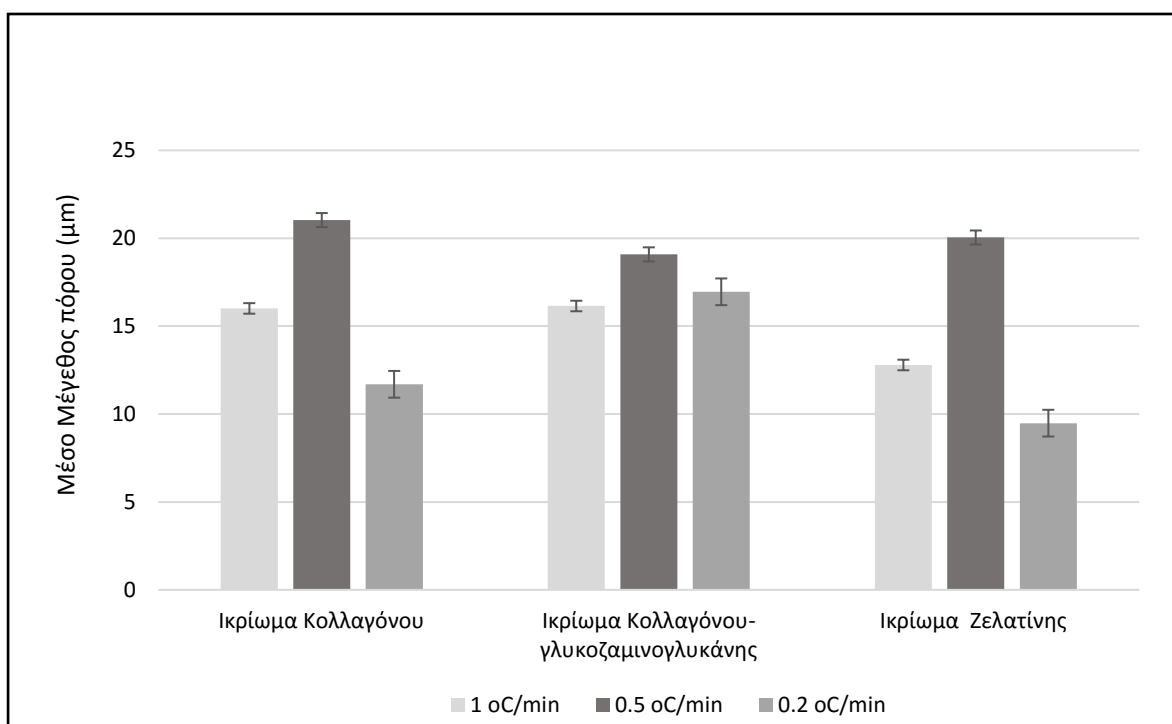
$t_{\text{νομομαστικο}} = 180 \mu\text{m}$	Ικρίωμα Κολλαγόνου	Ικρίωμα Κολλαγόνου-γλυκοζαμινογλυκάνης	Ικρίωμα Ζελατίνης
1 °C/min	13.89 \pm 0.68	12.57 \pm 0.79	14.50 \pm 0.82
0.5 °C/min	23.25 \pm 1.01	20.57 \pm 0.38	19.53 \pm 0.27
0.2 °C/min	20.21 \pm 0.32	18.10 \pm 0.45	8.18 \pm 0.62



Διάγραμμα 1: Μέσο μέγεθος πόρων ικριωμάτων πάχους 150 μm στους διαφορετικούς ρυθμούς ψύξης

Πίνακας 2: Ποσοτικοποίηση της διαμέτρου πόρων σε ικριώματα πάχους 100 μm , παρασκευασμένα με τρεις διαφορετικούς ρυθμούς ψύξης. Τα δεδομένα παρουσιάζονται ως μέση τιμή + τυπική απόκλιση του μέσου ($n=3$)

$t_{\text{νομομαστικο}} = 120 \mu\text{m}$	Ικρίωμα Κολλαγόνου	Ικρίωμα Κολλαγόνου-γλυκοζαμινογλυκάνης	Ικρίωμα Ζελατίνης
1 °C/min	16.01 \pm 0.15	16.15 \pm 0.33	12.79 \pm 1.01
0.5 °C/min	21.03 \pm 0.53	19.08 \pm 0.15	20.04 \pm 0.40
0.2 °C/min	11.69 \pm 0.93	16.96 \pm 0.39	9.48 \pm 0.29



Διάγραμμα 2: Μέσο μέγεθος πόρων κρυωμάτων πάχους 100 μm στους διαφορετικούς ρυθμούς ψύξης

3. Είναι σημαντικά διαφορετικές οι τιμές στο μέσο μέγεθος πόρων σε κρυώματα διαφορετικής χημικής σύστασης και παρασκευασμένων με διαφορετικό ρυθμό ψύξης ;

Για την απάντηση σε αυτό το ερώτημα πραγματοποιήθηκε στατιστική ανάλυση. Τα αποτελέσματα παρουσιάζονται στους πίνακες 3 και 4. Κάθε στοιχείο του πίνακα 3 εκφράζει την πιθανότητα κρυώματα όμοιας χημικής σύστασης αλλά παρασκευασμένα με διαφορετικό ρυθμό ψύξης να έχουν μη στατιστική διαφορετική μέση τιμή. Κάθε στοιχείο του πίνακα 4 δείχνει την πιθανότητα κρυώματα διαφορετικής χημικής σύστασης αλλά παρασκευασμένα με τον ίδιο ρυθμό ψύξης να έχουν μη στατιστικά διαφορετική μέση τιμή.

Στους πίνακες 3 και 4 φαίνεται ότι ο διαφορετικός ρυθμός ψύξης καθώς και η χημική σύσταση έχουν αξιοσημείωτη επίδραση στο μέσο μέγεθος πόρου των κρυωμάτων ανεξαρτήτως του πάχους αυτών. Με βάση των πίνακα 4, μόνο στις περιπτώσεις όπου ο ρυθμός ψύξης ήταν 0.5°C/min με πάχος των κρυωμάτων 100 μm και ο ρυθμός ψύξης ήταν 1 °C/min με πάχος 150 μm , η στατιστική ανάλυση έδειξε μη σημαντική διαφορετικότητα στο μέσο μέγεθος πόρου. Οι περιπτώσεις όπου η στατιστική ανάλυση έδειξε μη σημαντική διαφορά μέσων τιμών χρωματίζεται στους πίνακες.

Πίνακας 3: Στατιστική Ανάλυση Ανονα στο μέσο μέγεθος πόρου κρυωμάτων ίδιας χημικής σύστασης στους τρεις διαφορετικούς ρυθμούς ψύξης. Χρωματισμένες είναι οι περιπτώσεις μη σημαντικής διαφοράς στο μέσο μέγεθος πόρων.

ANOVA	Κρυώμα Κολλαγόνου	Κρυώμα Κολλαγόνου-Γλυκοζαμινογλυκάνης	Κρυώμα Ζελατίνης
120 μm	0.0004	0.001	0.0005
180 μm	0.0008	0.0005	0.00001

Πίνακας 4: Στατιστική Ανάλυση ΑνοVA στο μέσο μέγεθος πόρου ικριωμάτων παρασκευασμένων με τον ίδιο ρυθμό ψύξης αλλά διαφορετικής χημικής σύστασης. Χρωματισμένες είναι οι περιπτώσεις μη σημαντικής διαφοράς στο μέσο μέγεθος πόρων.

ANOVA	0.2 °C/min	0.5 °C/min	1 °C/min
120 μm	0.001	0.2513 > 0.05	0.0336
180 μm	0.000013	0.0376	0.389 > 0.05

Ποσοτικοποίηση πλήθους πόρων στα λεπτά ικριώματα

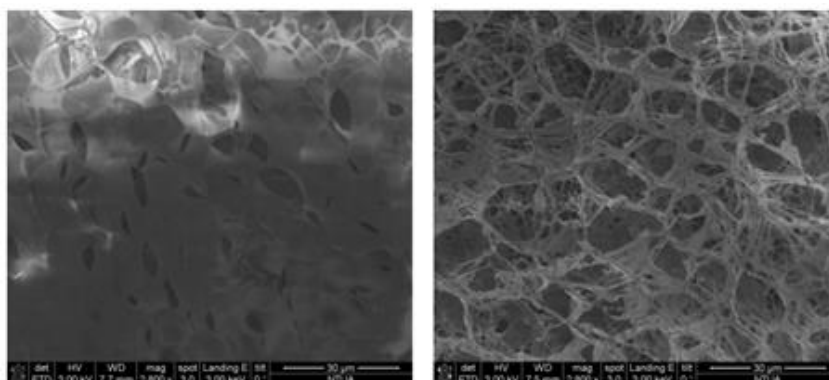
4. Είναι στο μεγαλύτερο μέρος τους τα λεπτά ικριώματα πορώδη ;

Για να εκτιμηθεί αν η πάνω επιφάνεια των λεπτών ικρυωμάτων είναι στο μεγαλύτερο μέρος πορώδης (με ανοικτούς πόρους μέσα στους οποίους μπορούν να μπουν κύτταρα) έγινε ποιοτική αξιολόγηση των πόρων από τις εικόνες ηλεκτρονικής μικροσκοπίας σάρωσης και εκτιμήθηκε ποιοτικά αν το πλήθος των πόρων είναι μεγάλο ή μικρό. Το αποτέλεσμα φαίνεται στον πίνακα 5. Ακολουθεί και επεξηγηματικό παράδειγμα στην εικόνα 21.

Πίνακας 5: Ποιοτικός χαρακτηρισμός πλήθους πόρων στα λεπτά ικριώματα. Η ερμηνεία είναι η εξής:

- “-” : Καθόλου πόροι
- “+” : Μικρός αριθμός πόρων
- “+ +” : Μέτριος αριθμός πόρων
- “+ + +” : Μεγάλος αριθμός πόρων

	Ικρίωμα Κολλαγόνου	Ικρίωμα Κολλαγόνου Γλυκοζαμινογλυκάνης	Ικρίωμα Ζελατίνης
0.2 C/min	+ +	+ + +	+
0.5 C/min	+ + +	+ + +	+ + +
1 C/min	+ + +	+ + +	+ + +



↑
Πολύ μικρή ποσότητα πόρων
“+ +”

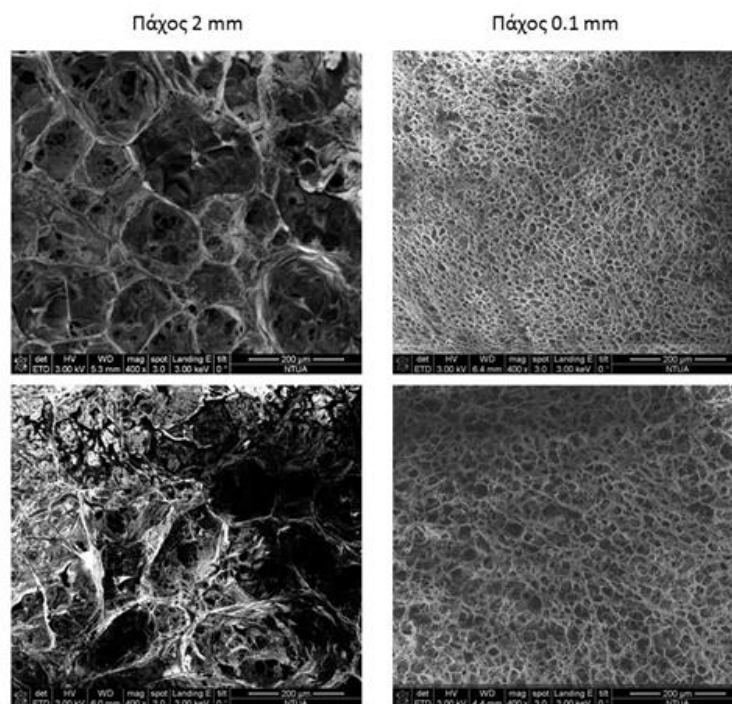
↑
Μεγάλη ποσότητα πόρων
“+ + +”

Εικόνα 21: Ερμηνεία του συμβολισμού για το ποσοστό της επιφάνειας ενός ικριώματος που καλύπτεται από ανοικτούς πόρους

Σύγκριση Δομής Λεπτών Ικριωμάτων με τα Κλασσικά Πορώδη Ικριώματα

5. Πώς η μορφολογία των λεπτών ικριωμάτων συγκρίνεται με αυτή των τυπικών ικριωμάτων πάχους 1-3 mm;

Στην εικόνα 22 παρουσιάζονται εικόνες SEM από ικριώματα κολλαγόνου και κολλαγόνου-γλυκοζαμινογλυκάνης, πάχους 2mm και 100 μm, παρασκευασμένα με ρυθμό ψύξης 1 °C/min. Η εικόνα αυτή δείχνει ότι το μέσο μέγεθος πόρων των ικριωμάτων πάχους 2mm είναι περίπου 80-100μm σε συμφωνία με την βιβλιογραφία [15, 16]. Επίσης φαίνεται ότι παρά την σημαντικά μικρότερη τιμή του μέσου μεγέθους πόρου των λεπτών ικριωμάτων από αυτά των 2 mm πάχους, υπάρχει μεγαλύτερη ομοιομορφία στη δομή των πόρων στα λεπτά ικριώματα.



Εικόνα 22: Σύγκριση ομοιομορφίας και μεγέθους πόρου μεταξύ ικριωμάτων πάχους 2mm και 100 μm

Μέτρηση Πάχους Λεπτών Ικριωμάτων

Κατά την παρασκευή των ικριωμάτων ο όγκος του εναιωρήματος που χρησιμοποιήθηκε στόχευε αρχικά σε πάχη 100 και 150 μm. Στα πρώτα πειράματα όμως παρατηρήθηκε εξάτμιση σημαντικής ποσότητας εναιωρήματος μέχρι την έναρξη της λυοφιλοποίησης, λόγω του πολύ μικρού εγγεόμενου όγκου. Το πρόβλημα αντιμετωπίστηκε μερικώς με την έγχυση περισσότερου όγκου εναιωρήματος. Αφού παρατηρήθηκε ο ρυθμός με τον οποίο εξατμίζεται το εναιώρημα, υπολογίστηκε ο χρόνος που το εναιώρημα παραμένει πάνω στο γυαλί πριν την έναρξη της λυοφιλοποίησης και εγχύθηκε μεγαλύτερη ποσότητα όγκου εναιωρήματος που πρόσφερε θεωρητικά ονομαστικό πάχος ικριωμάτων, 120 μm και 180 μm, με σκοπό την τελική παρασκευή ικριωμάτων πάχους περίπου 100 μm και 150 μm. Μια επιπλέον πηγή σφάλματος στο πάχος του λεπτού ικριώματος είναι τυχόν σφάλματα της πιπέτας. Αυτό αντιμετωπίστηκε βαθμονομώντας τον όγκο του αιωρήματος που μεταφέρει κάθε πιπέτα για δεδομένα είδος αιωρήματος.

6. Είναι επαναλήψιμη η τιμή του πάχους στα ικρίώματα ίδιου εγχεόμενου όγκου και ίδιας χημικής σύστασης ;

Οι δύο παραπάνω πηγές σφάλματος στον όγκο του εναιωρήματος, σε συνδυασμό με σφάλμα στην διάμετρο του ικριώματος έχει σαν αποτέλεσμα το πραγματικό πάχος t του εναιωρήματος να διαφέρει από αυτό που υπολογίστηκε αναλυτικά t_0 . Πιο σημαντικό από την παρουσία του σφάλματος $t - t_0$ είναι η επαναληψιμότητα του, καθώς αν για δεδομένη διαδικασία το πάχος t έχει μικρή μεταβλητότητα, τότε μέσω βαθμονόμησης είναι δυνατών να παρασκευαστούν λεπτά ικρίωματα επιθυμητού ύψους.

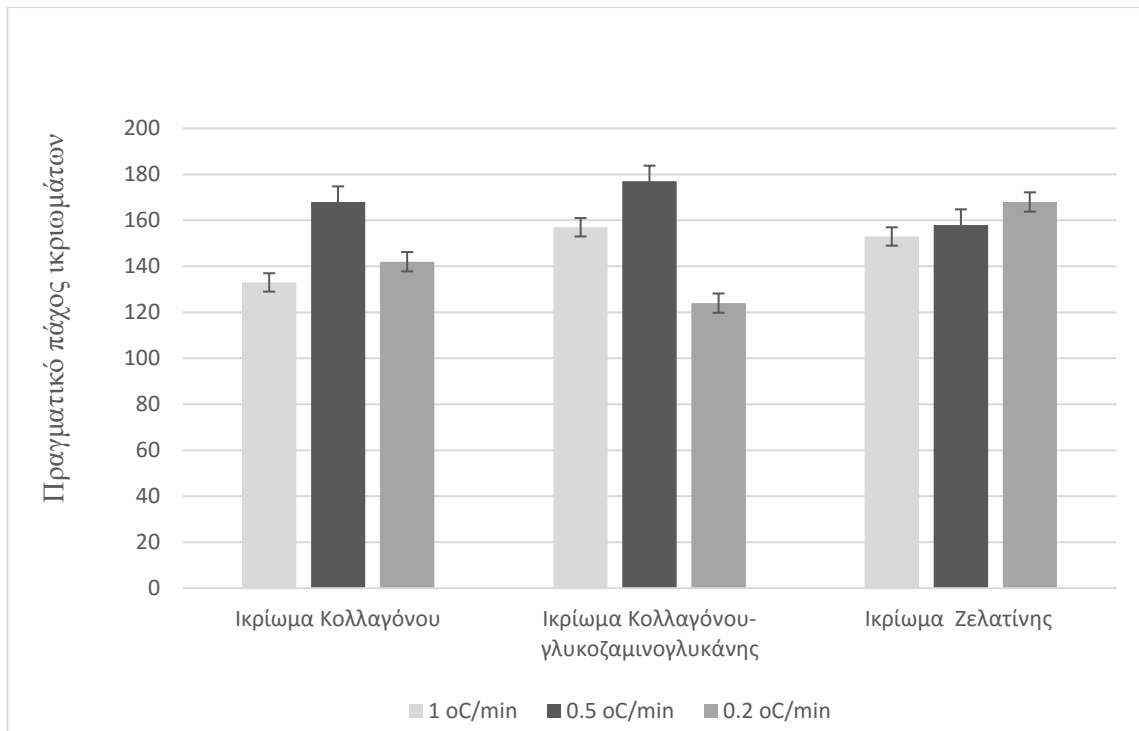
Με σκοπό τον υπολογισμό της μέσης τιμής και της τυπικής απόκλισης (μέτρο της μεταβλητότητας) του ύψους του λεπτού ικριώματος, χρησιμοποιήθηκε η πρέσα BOSE electroforce 3100 για να μετρηθεί το πάχος (βλέπε πρωτόκολο στο Παράρτημα Α, χωρίο Α.6)

Ο πίνακας 6 δείχνει τα πειραματικά αποτελέσματα για την μέση τιμή και το τυπικό σφάλμα της μέσης τιμής από $n=3$ δείγματα ανά είδος ικριώματος. Τα αποτελέσματα αυτά παρουσιάζονται και στα διαγράμματα 3 και 4. Από τις τιμές του πίνακα 6 φαίνεται ότι υπάρχει μεγάλη διαφορά μεταξύ ονομαστικού και πραγματικού πάχους, όπως και υψηλή τιμή τυπικού σφάλματος στο ίδιο δείγμα.

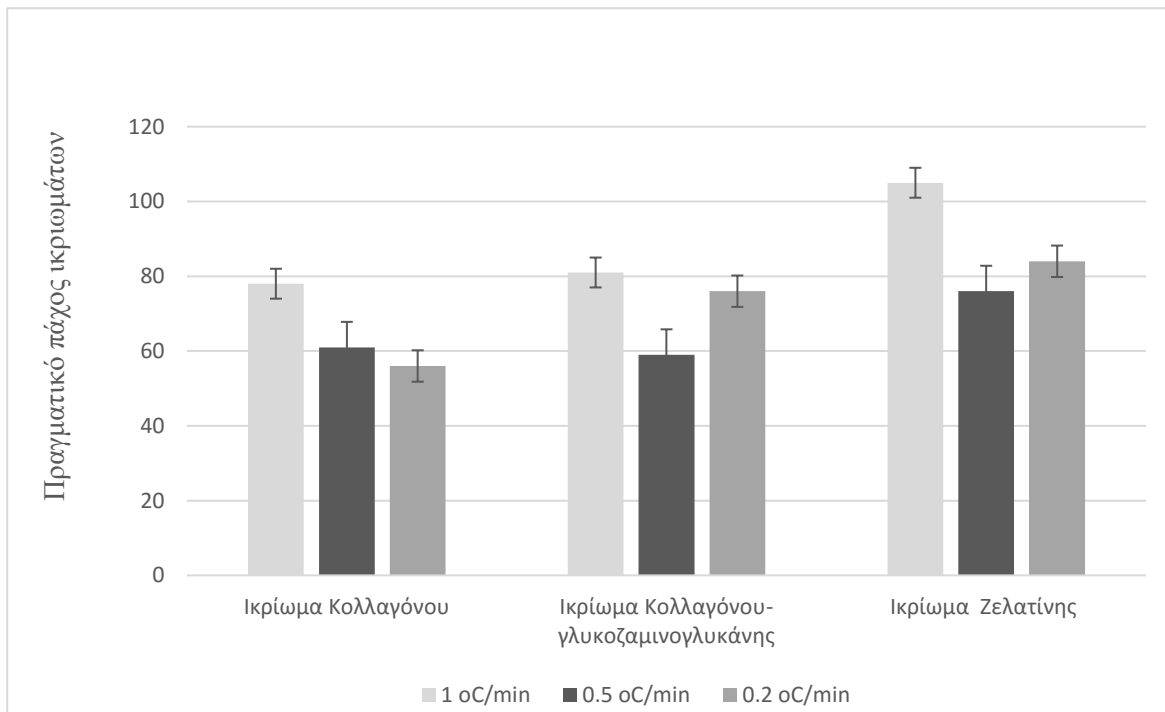
Για να απαντηθεί το παραπάνω ερώτημα και να προκύψουν συμπεράσματα από την παρακάτω ποσοτικοποίηση, ακολουθεί στατιστική ανάλυση των αποτελεσμάτων (ANOVA), η οποία φαίνεται στους πίνακες 7 και 8. Βάσει αυτής η τιμή του πάχους των ικριωμάτων ίδιας χημικής σύστασης δε διαφέρει σημαντικά στην περίπτωση διαφορετικού ρυθμού ψύξης κατά την παρασκευή. Επίσης παρατηρείται ότι μόνο για ρυθμό ψύξης $0.2 \text{ }^\circ\text{C/min}$, δεν υπάρχει επαναληψιμότητα στην τιμή του πάχους για ικρίωματα διαφορετικής χημικής σύστασης.

Πίνακας 6: Ονομαστικό και πραγματικό πάχος ικριωμάτων όπως μετρήθηκε στην BOSE electroforce 3100. Τα δεδομένα παρουσιάζονται ως μέση τιμή + τυπική απόκλιση του μέσου ($n=3$)

Πάχος Ικριωμάτων	0.2 °C/min		0.5 °C/min		1 °C/min	
	Ονομαστικό t_0 (μm)	Πραγματικό t (μm)	Ονομαστικό t_0 (μm)	Πραγματικό t (μm)	Ονομαστικό t_0 (μm)	Πραγματικό t (μm)
Ικρίωμα Κολλαγόνου	120	56 ± 3.21	120	61 ± 7.19	120	78 ± 2.31
Ικρίωμα Ζελατίνης	120	84 ± 6.13	120	76 ± 4.84	120	105 ± 2.60
Ικρίωμα Κολλαγόνου-γλυκοζαμινογλυκάνης	120	76 ± 3.27	120	59 ± 8.49	120	81 ± 7.10
Ικρίωμα Κολλαγόνου	180	142 ± 10.39	180	168 ± 5.44	180	133 ± 4.91
Ικρίωμα Ζελατίνης	180	168 ± 4.24	180	177 ± 0.72	180	157 ± 9.43
Ικρίωμα Κολλαγόνου-γλυκοζαμινογλυκάνης	180	124 ± 7.68	180	158 ± 3.56	180	153 ± 5.62



Διάγραμμα 3: Πραγματικό πάχος ικριωμάτων ονομαστικού πάχους 180 μm στους διαφορετικούς ρυθμούς ψύξης



Διάγραμμα 4: Πραγματικό πάχος ικριωμάτων ονομαστικού πάχους 120 μm στους διαφορετικούς ρυθμούς ψύξης

Πίνακας 7: Στατιστική Ανάλυση Ανονα στο πάχος των ικριωμάτων ίδιας χημικής σύστασης στους τρεις διαφορετικούς ρυθμούς ψύξης. Χρωματισμένες είναι οι περιπτώσεις μη σημαντικής διαφοράς πάχους ικριωμάτων.

ANOVA	Ικρίωμα Κολλαγόνου	Ικρίωμα Κολλαγόνου-Γλυκοζαμινογλυκάνης	Ικρίωμα Ζελατίνης
120 μm	0.1024 > 0.05	0.173 > 0.05	0.0615 > 0.05
180 μm	0.1199 > 0.05	0.0398	0.417 > 0.05

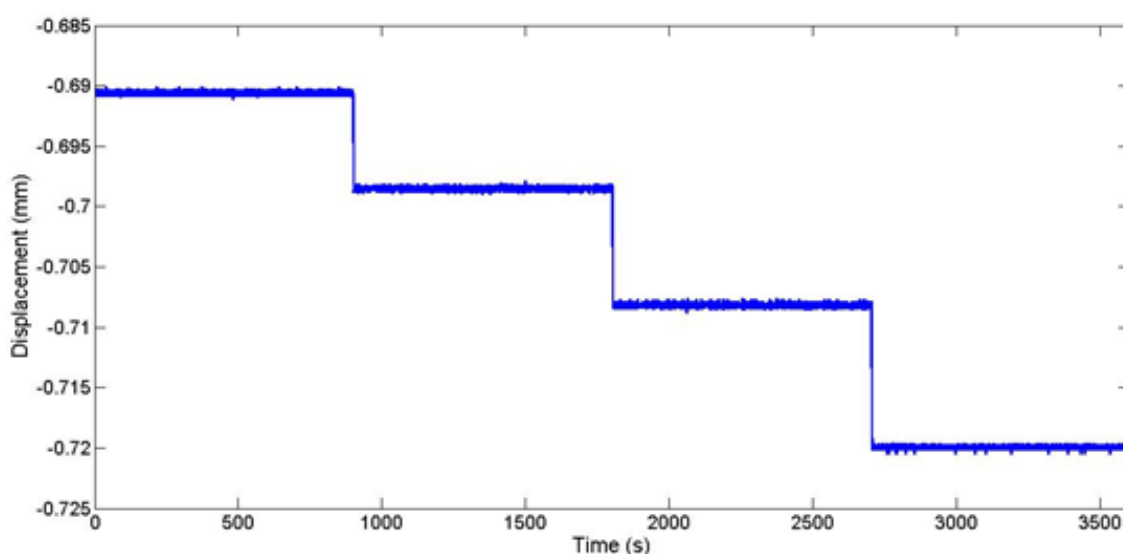
Πίνακας 8 : Στατιστική Ανάλυση Ανονα στο πάχος ικριωμάτων παρασκευασμένων με τον ίδιο ρυθμό ψύξης αλλά διαφορετικής χημικής σύστασης. Χρωματισμένες είναι οι περιπτώσεις μη σημαντικής διαφοράς πάχους ικριωμάτων.

ANOVA	0.2 °C/min	0.5 °C/min	1 °C/min
120 μm	0.0245	0.3805 > 0.05	0.024
180 μm	0.0191	0.1055 > 0.05	0.3258 > 0.05

3.3 Μέτρηση Μηχανικών Ιδιοτήτων

Μέσω της μηχανικής δοκιμής της θλίψης μελετάται η επίδραση του ρυθμού ψύξης, της χημικής σύστασης, του ύψους αλλά και της δημιουργίας σταυροδεσμών (cross-linking) στις μηχανικές ιδιότητες των λεπτών πορώδων ικριωμάτων, όπως το μακροσκοπικό μέτρο ελαστικότητας των ικριωμάτων και η ιξωδοελαστική συμπεριφορά.

Σε κάθε πείραμα θλίψης τα ικρίωματα τοποθετήθηκαν στην βάση της BOSE electroforce 3100 και η μηχανική καταπόνηση της θλίψης έλαβε χώρα ως το 30% του αρχικού πάχους των ικριωμάτων με βήματα: 0 → 5% → 10% → 20% → 30%. Στην εικόνα 23 φαίνεται η εφαρμοζόμενη τροπή ως προς τον χρόνο.



Εικόνα 23 : Εφαρμοζόμενη μετατόπιση ως προς τον χρόνο

Υπολογισμός μέτρου ελαστικότητας και σταθεράς χρόνου

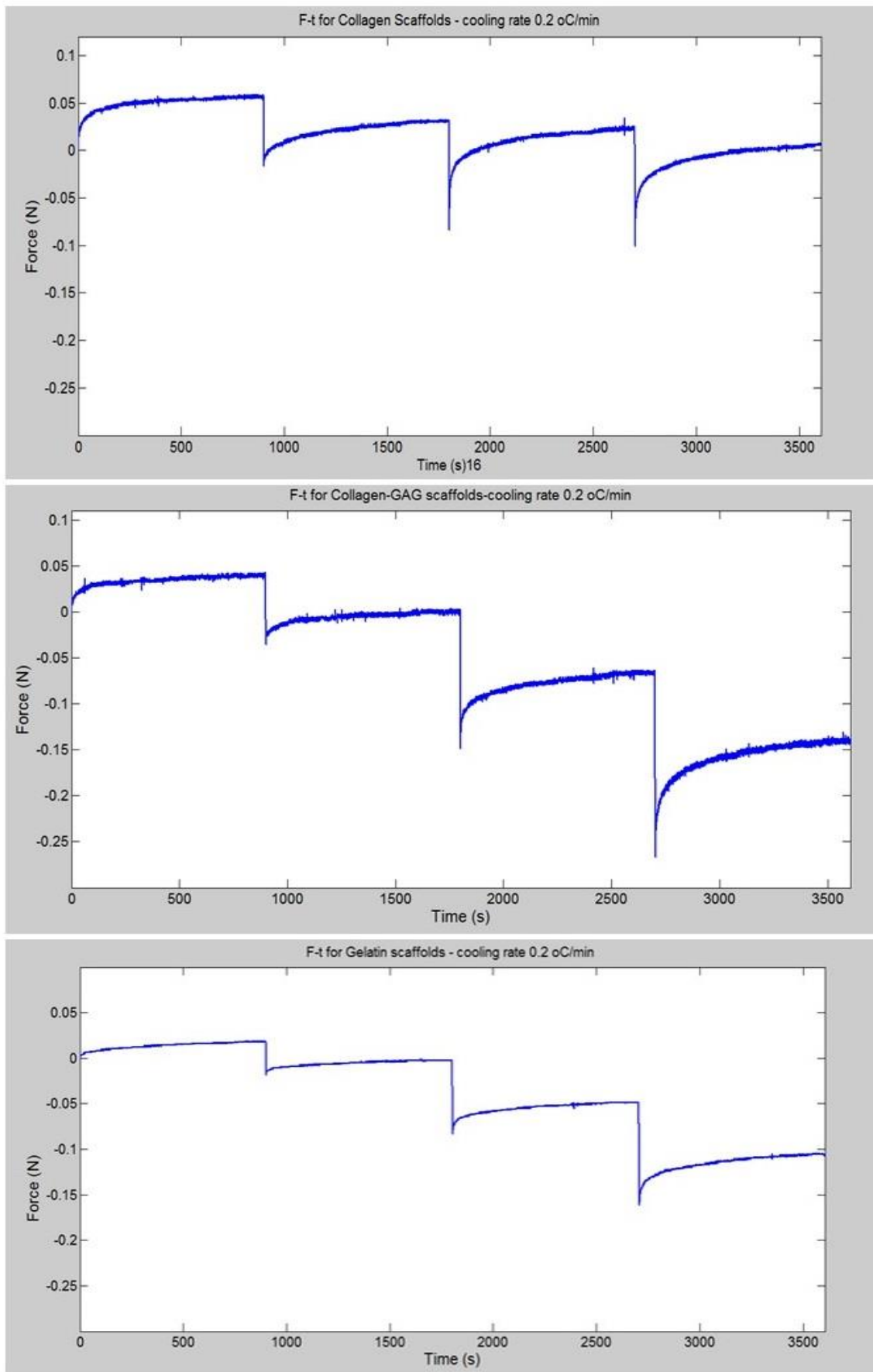
7. Πως επηρεάζεται η τιμή του μέτρου ελαστικότητας από τον ρυθμό ψύξης του πρωτοκόλλου λυοφιλοποίησης, τη χημική σύσταση και το πάχος του ικριώματος;
8. Αυξάνεται σημαντικά το μέτρο ελαστικότητας με την υποβολή του ικριώματος στην διεργασία του *cross-linking* ;

Οι εικόνες 24, 25 και 26 δείχνουν αντιπροσωπευτικές αποκρίσεις της μετρώμενης θλιπτικής δύναμης για λεπτά πορώδη ικριώματα που διαφέρουν στην χημική σύσταση και τον ρυθμό ψύξης κατά την παρασκευή τους. Τα ικριώματα αυτά δεν έχουν υποστεί θερμική διαδικασία δημιουργίας σταυροδεσμών (DHT *cross-linking*). Η εικόνα 27 παρουσιάζει την αποκρίση της δύναμης σε ικριωμάτων που έχουν υποβλήθηκαν σε DHT *cross-linking* μετά την παρασκευή τους.

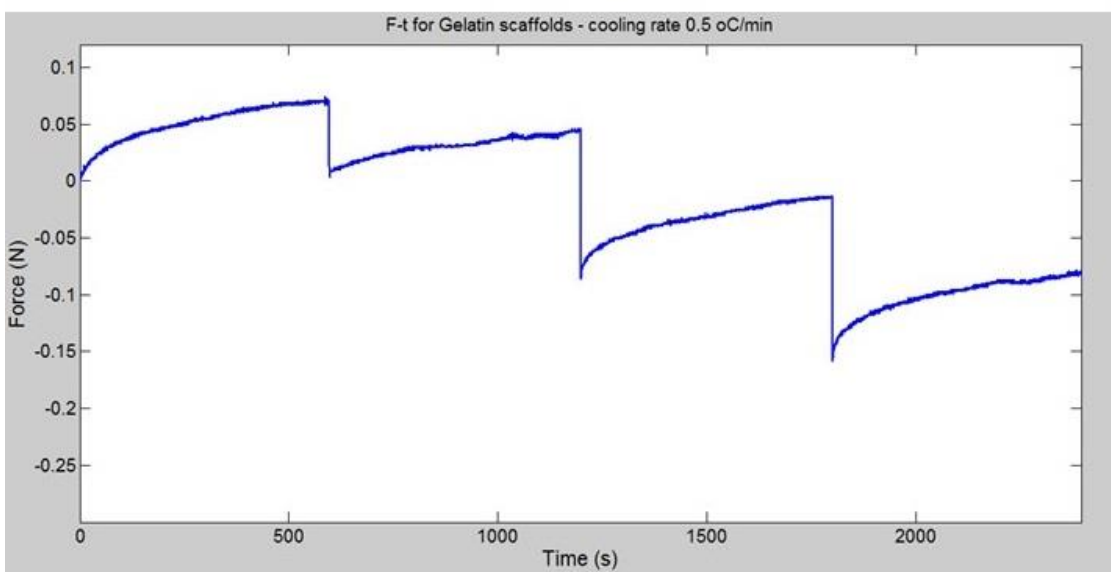
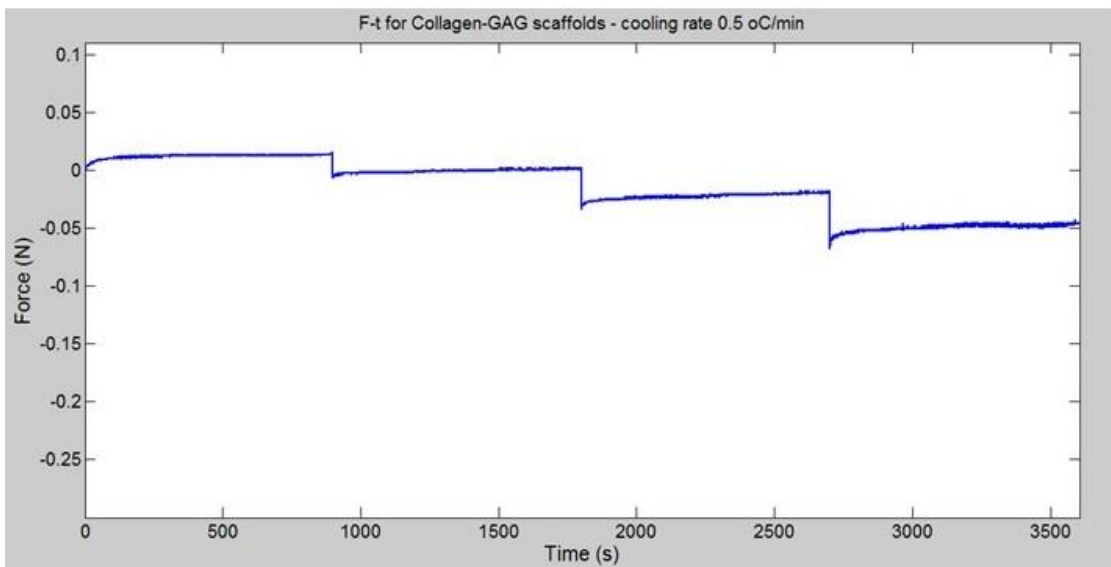
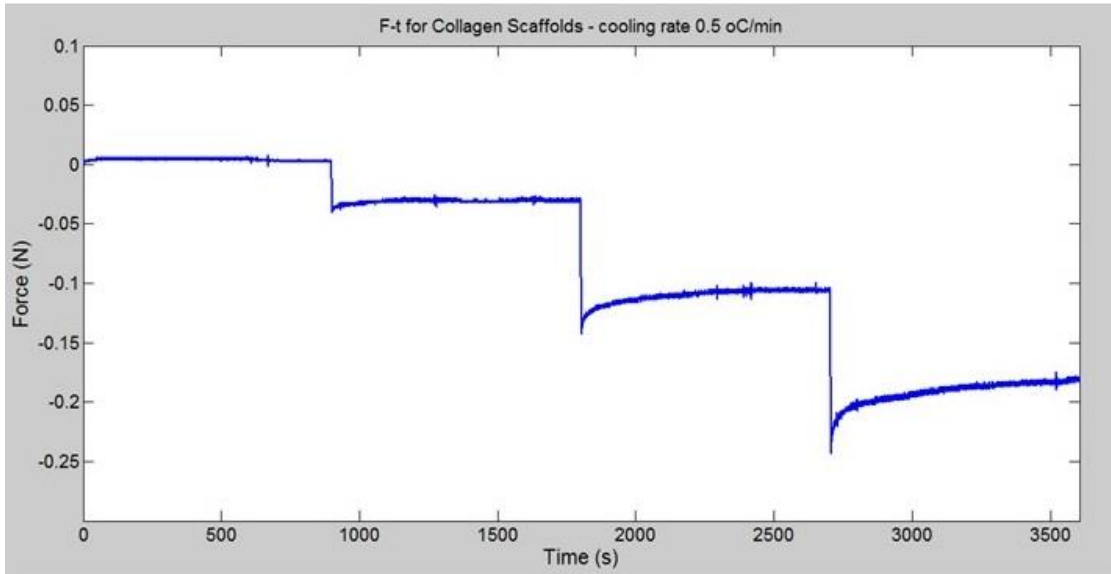
Από τις εικόνες φαίνεται ότι οι αποκρίσεις έχουν παρόμοια ιξωδοελαστική συμπεριφορά ανεξαρτήτως της χημικής σύστασης ή του ρυθμού ψύξης. Επίσης παρατηρείται ότι ούτε η δημιουργία σταθροδεσμών (*cross-linking*) σημαντικά την ιξωδοελαστική συμπεριφορά των ικριωμάτων.

Από την ποσοτικοποίηση των αποτελεσμάτων στον πίνακα 9 φαίνεται ότι η σταθερά χρόνου είναι της τάξεως λίγων εκατοντάδων δευτερολέπτων. Ακόμη η τιμή του μέτρου ελαστικότητας κυμαίνεται για όλα τα είδη από 10 – 30 KPa ενώ φαίνεται πως για ρυθμό ψύξης 0.2 °C/min και 1 °C/min τα ικριώματα κολλαγόνου-γλυκοζαμινογλυκάνης έχουν τη μεγαλύτερη τιμή μέτρου ελαστικότητας ενώ για ρυθμό ψύξης 0.5 °C/min παρουσιάζουν τη μικρότερη. Από την ποσοτικοποίηση φαίνεται επίσης ότι υπάρχει μεγάλη τυπική απόκλιση στην σταθερά χρόνου της απόκρισης. Αυτό το γεγονός πιθανώς να οφείλεται σε θόρυβο που προέκυψε κατά τη διεξαγωγή των πειραμάτων οπότε λόγω ευαισθησίας η προσέγγιση στο εργαλείο Matlab παρουσιάζει σφάλματα.

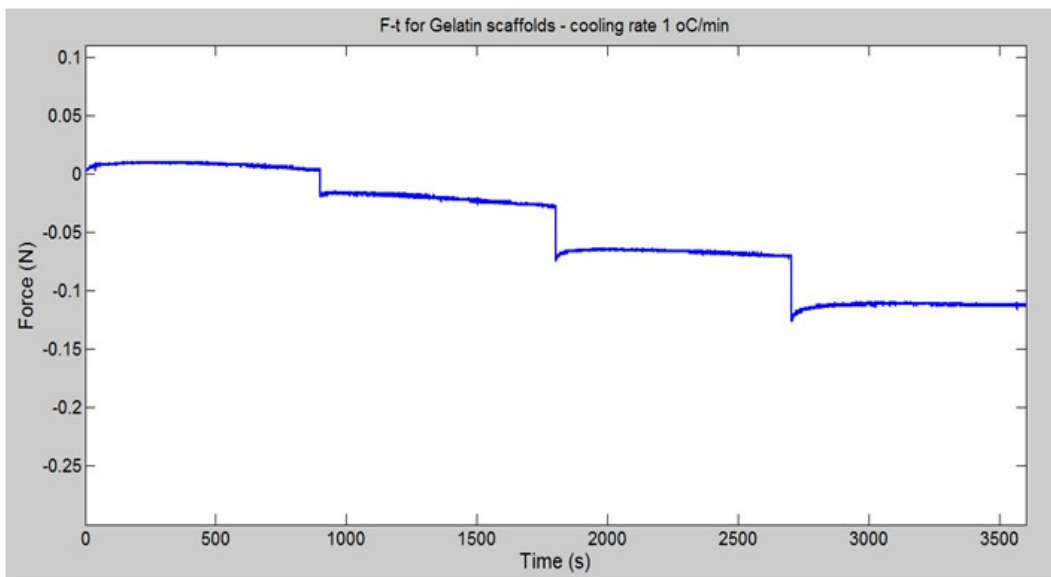
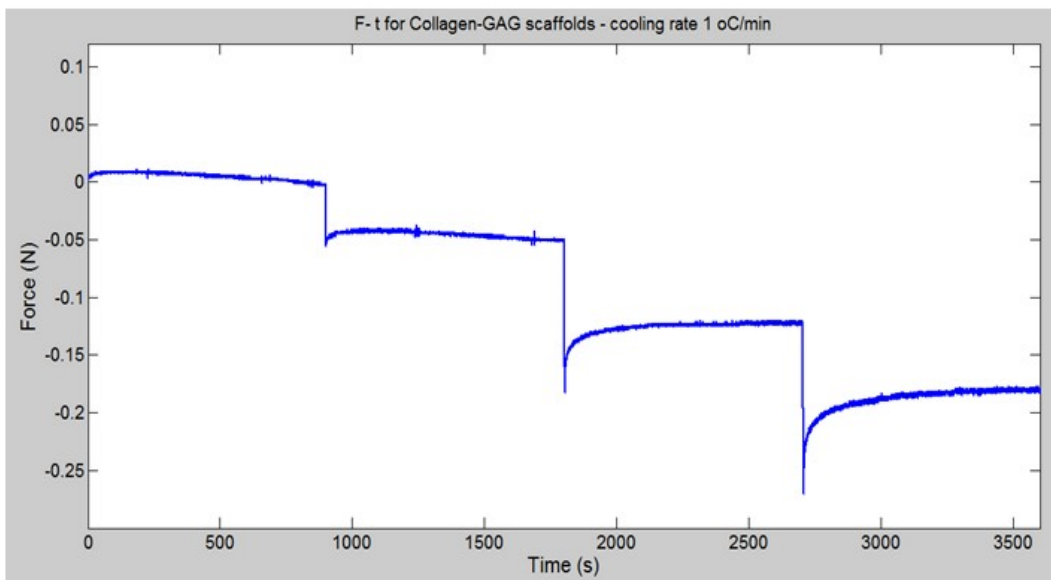
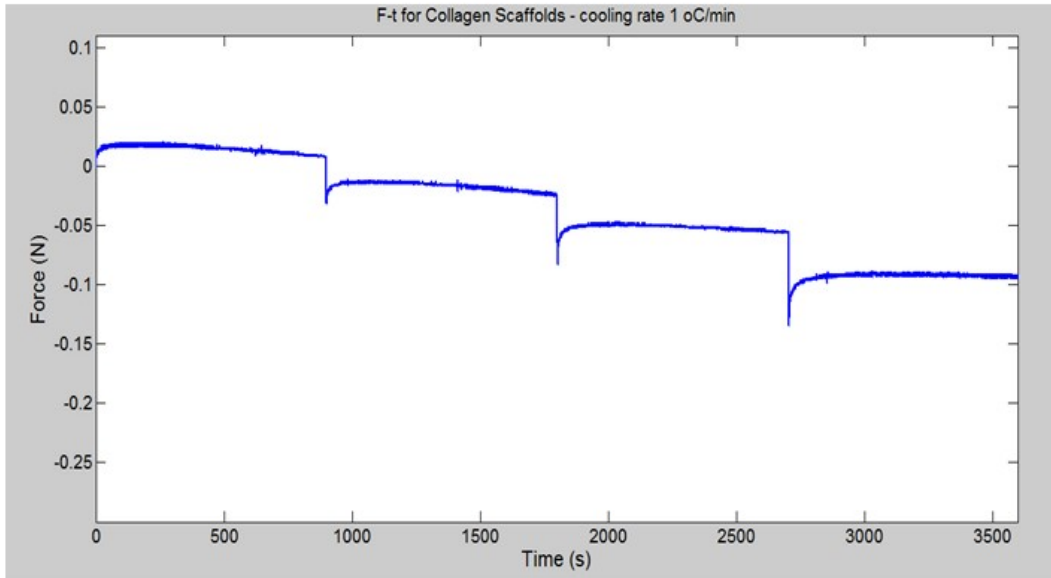
Μετά τον πίνακα ποσοτικοποίησης, ακολουθεί και στατιστική ανάλυση των αποτελεσμάτων για το μακροσκοπικό μέτρο ελαστικότητας των ικριωμάτων. Με βάση τον πίνακα 10 υπάρχει σημαντική διαφορά στην τιμή του μακροσκοπικού μέτρου ελαστικότητας ικριωμάτων διαφορετικής χημικής σύστασης εκτός από την περίπτωση που ο ρυθμός ψύξης είναι 1 °C/min. Βάσει τον πίνακα 11, τα ικριώματα ίδιας χημικής σύστασης και ύψους 150 μm έχουν παρόμοιο μέτρο ελαστικότητας ανεξαρτήτως του ρυθμού παρασκευής.



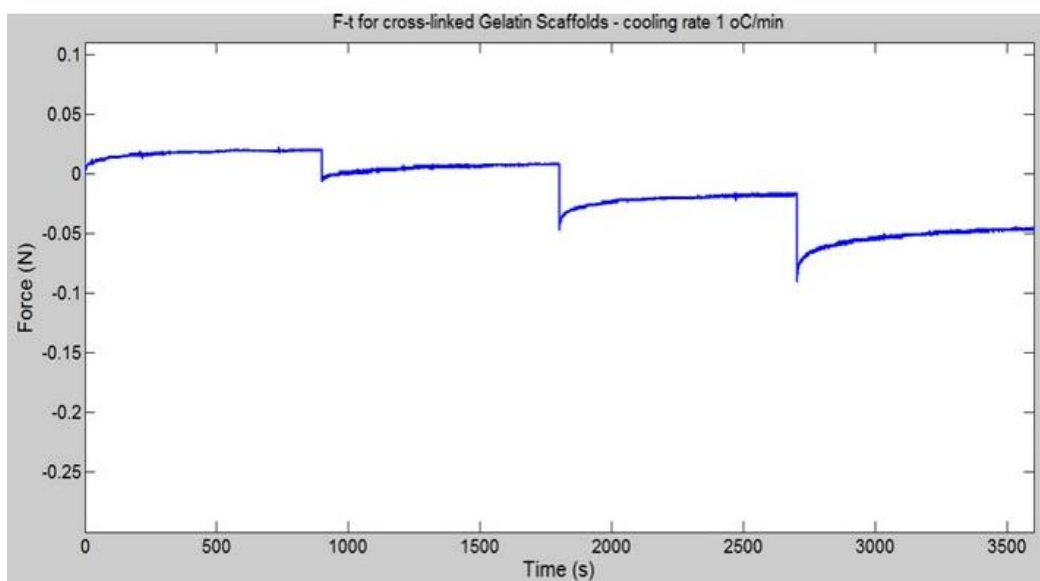
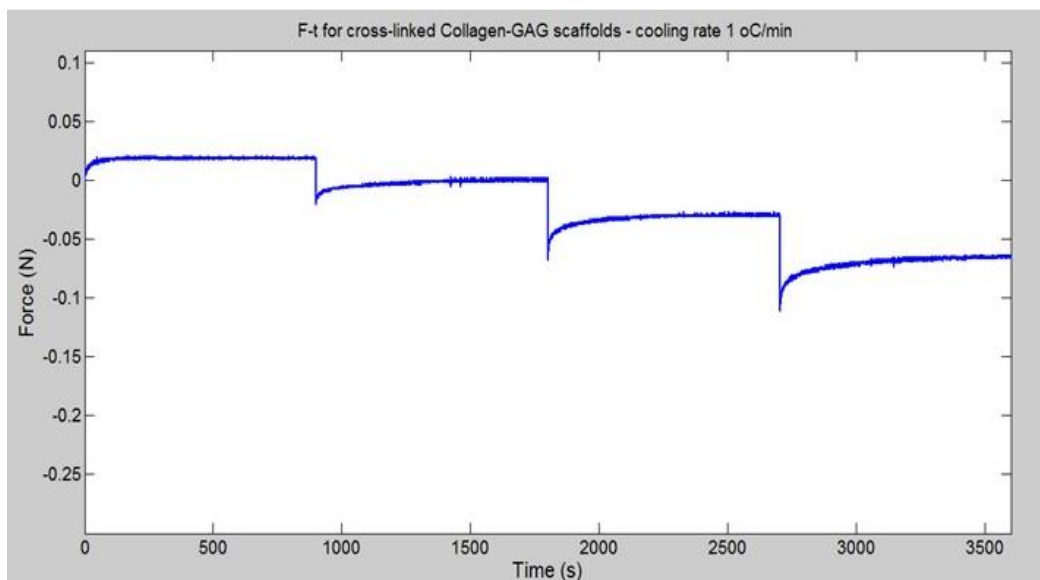
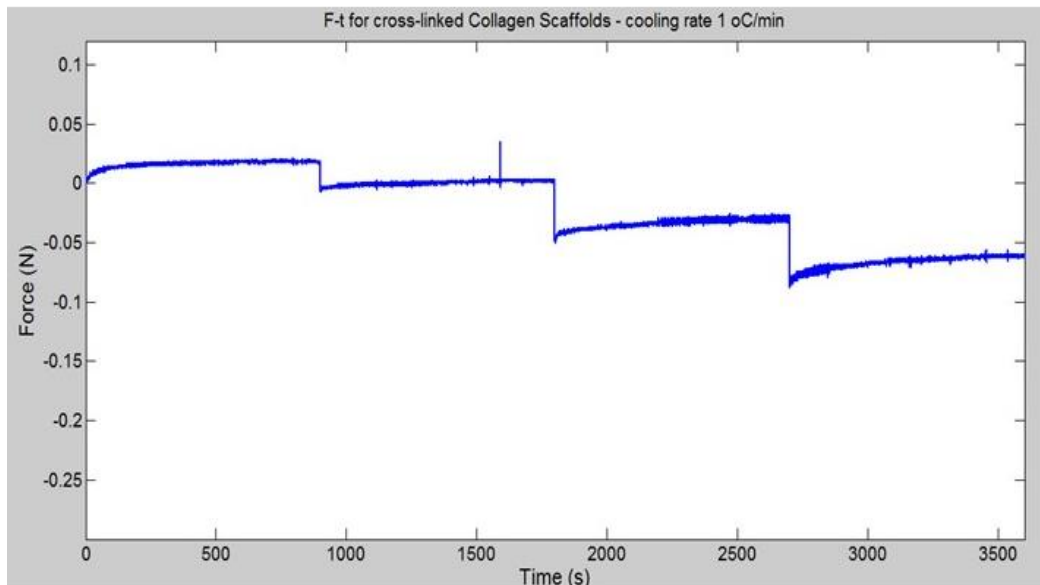
Εικόνα 24: Αποκρίσεις δύναμης θλιπτικής καταπόνησης σε συνάρτησι με τον χρόνο για ικρίώματα κολλαγόνου, κολλαγόνου-γλυκοζαμινογλυκάνης και ζελατίνης, παρασκευασμένων με ρυθμό ψύξης 0.2 °C/min



Εικόνα 25: Αποκρίσεις δύναμης θλιπτικής καταπόνησης σε συνάρτησι με τον χρόνο για ικρίώματα κολλαγόνου, κολλαγόνου-γλυκοζαμινογλυκάνης και ζελατίνης, παρασκευασμένων με ρυθμό ψύξης 0.5 °C/min



Εικόνα 26: Αποκρίσεις δύναμης θλιπτικής καταπόνησης σε συνάρτησι με τον χρόνο για ικρίώματα κολλαγόνου, κολλαγόνου-γλυκοζαμινογλυκάνης και ζελατίνης, παρασκευασμένων με ρυθμό ψύξης 1 °C/min



Εικόνα 27: Αποκρίσεις δύναμης θλιπτικής καταπόνησης σε συνάρτησι με τον χρόνο για ικρίώματα κολλαγόνου, κολλαγόνου-γλυκοζαμινογλυκάνης και ζελατίνης, παρασκευασμένων με ρυθμό ψύξης 1 °C/min και υποβαλόμενων σε cross-linking.

Πίνακας 9: Σταθερά χρόνου τ και μακροσκοπικό μέτρο ελαστικότητας $\frac{\delta\sigma}{\delta\varepsilon}$ για λεπτά ικρίωματα διαφορετικής χημικής σύστασης και παρασκευασμένα με διαφορετικό ρυθμό ψύξης. Τα δεδομένα παρουσιάζονται ως μέση τιμή + τυπική απόκλιση του μέσου ($n=3$)

$\tau_{\text{ονομαστικο}} = 120 \mu\text{m}$	0.2 °C/min		0.5 °C/min		1 °C/min	
	τ (sec)	$\frac{\delta\sigma}{\delta\varepsilon}$ (KPa)	τ (sec)	$\frac{\delta\sigma}{\delta\varepsilon}$ (KPa)	τ (sec)	$\frac{\delta\sigma}{\delta\varepsilon}$ (KPa)
Ικρίωμα Κολλαγόνου	125.16 ± 34.67	8.20 ± 1.29	358.79 ± 8.29	26.41 ± 2.80	91.81 ± 3.07	14.05 ± 0.79
Ικρίωμα Ζελατίνης	189.45 ± 50.57	26.03 ± 4.36	265.67 ± 38.82	26.6 ± 1.49	111.13 ± 15.71	17.65 ± 1.29
Ικρίωμα Κολλαγόνου-γλυκοζαμινογλυκάνης	215.75 ± 4.47	22.26 ± 0.07	208.40 ± 8.12	9.77 ± 0.14	383.46 ± 36.21	19.30 ± 0.2
$\tau_{\text{ονομαστικο}} = 180 \mu\text{m}$	0.2 °C/min		0.5 °C/min		1 °C/min	
	τ (sec)	$\frac{\delta\sigma}{\delta\varepsilon}$ (KPa)	τ (sec)	$\frac{\delta\sigma}{\delta\varepsilon}$ (KPa)	τ (sec)	$\frac{\delta\sigma}{\delta\varepsilon}$ (KPa)
Ικρίωμα Κολλαγόνου	59.14 ± 2.34	9.80 ± 0.21	215.98 ± 5.29	32.60 ± 3.62	93.50 ± 11.27	11.87 ± 1.05
Ικρίωμα Ζελατίνης	344.33 ± 50.71	19.4 ± 0.35	151.13 ± 39.24	25.22 ± 0.50	219.97 ± 21.12	19.55 ± 0.20
Ικρίωμα Κολλαγόνου-γλυκοζαμινογλυκάνης	107.14 ± 41.43	22.5 ± 0.06	111.59 ± 13.27	8.09 ± 0.26	174.56 ± 41.43	28.05 ± 6.29

Πίνακας 10: Στατιστική Ανάλυση ANOVA στο μακροσκοπικό μέτρο ελαστικότητας ικριωμάτων παρασκευασμένων με τον ίδιο ρυθμό ψύξης αλλά διαφορετικής χημικής σύστασης. Χρωματισμένες είναι οι περιπτώσεις μη σημαντικής διαφοράς μέτρου ελαστικότητας ικριωμάτων.

ANOVA	0.2 °C/min	0.5 °C/min	1 °C/min
120 μm	0.077 > 0.05	0.0003	0.3682 > 0.05
180 μm	0.000861	0.0033	0.2602 > 0.05

Πίνακας 11: Στατιστική Ανάλυση ANOVA στο μακροσκοπικό μέτρο ελαστικότητας ικριωμάτων ίδιας χημικής σύστασης στους τρεις διαφορετικούς ρυθμούς ψύξης. Χρωματισμένες είναι οι περιπτώσεις μη σημαντικής διαφοράς μέτρου ελαστικότητας ικριωμάτων.

ANOVA	Ικρίωμα Κολλαγόνου	Ικρίωμα Κολλαγόνου-Γλυκοζαμινογλυκάνης	Ικρίωμα Ζελατίνης
100 μm	0.0286	0.043	0.0622 > 0.05
150 μm	0.4078 > 0.05	0.1543 > 0.05	0.2365 > 0.05

Στη συνέχεια, στον πίνακα 12 συγκρίνονται οι μηχανικές ιδιότητες ικριωμάτων που έχουν υποβληθεί σε cross-linking και ικριωμάτων που δεν έχουν. Όλων το πάχος είναι περίπου 100 μm ενώ όλα έχουν παρασκευαστεί με ρυθμό ψύξης 1 °C/min. Βάσει των δεδομένων του πίνακα αυτού προκύπτει ότι οι τιμές σταθεράς χρόνου και μακροσκοπικού μέτρου ελαστικότητας των ικριωμάτων δε διαφέρουν ουσιαστικά ασχέτως της υποβολής ή όχι στην διεργασία του cross-linking.

Στον πίνακα 13 φαίνονται τα αποτελέσματα της στατιστικής ανάλυσης. Βάσει αυτών δεν υπάρχει σημαντική διαφορά στην μέση τιμή του μέτρου ελαστικότητας μεταξύ των ικριωμάτων που έχουν υποβληθεί σε cross-linking και αυτών που δεν έχουν. Ακόμα και στην περίπτωση ικριωμάτων ζελατίνης το στατιστικό students' t-test δίνει πιθανότητα οριακά μη σημαντική. (0.0048 δηλαδή σχεδόν ίση με 0.005)

Πίνακας 12: Σταθερά χρόνου τ και μακροσκοπικό μέτρο ελαστικότητας $\frac{\delta\sigma}{\delta\varepsilon}$ για λεπτά ικριώματα διαφορετικής χημικής σύστασης και παρασκευασμένα με διαφορετικό ρυθμό ψύξης. Τα δεδομένα παρουσιάζονται ως μέση τιμή + τυπική απόκλιση του μέσου ($n=3$)

$t_{\text{ονομαστικό}} = 120 \mu\text{m}$	Χωρίς Cross-linking		Με Cross-linking	
	τ (sec)	$\frac{\delta\sigma}{\delta\varepsilon}$ (KPa)	τ (sec)	$\frac{\delta\sigma}{\delta\varepsilon}$ (KPa)
Ικρίωμα Κολλαγόνου	91.81 ± 3.07	14.05 ± 0.79	285.00 ± 63.12	13.15 ± 0.65
Ικρίωμα Ζελατίνης	111.13 ± 15.71	17.65 ± 1.29	153.23 ± 41.59	14.28 ± 3.32
Ικρίωμα Κολλαγόνου-γλυκοζαμινογλυκάνης	383.46 ± 36.21	19.30 ± 0.2	149.72 ± 22.98	16.23 ± 0.92

Πίνακας 13: Στατιστική Ανάλυση με Students' t-test για το μακροσκοπικό μέτρο ελαστικότητας ικριωμάτων πάχους 100 μm και παρασκευασμένων στον ίδιο ρυθμό, αλλά με διαφορά στο αν δημιουργήθηκαν ή όχι σταυροδεσμοί σε αυτά. Χρωματισμένες είναι οι περιπτώσεις μη σημαντικής διαφοράς μέτρου ελαστικότητας ικριωμάτων.

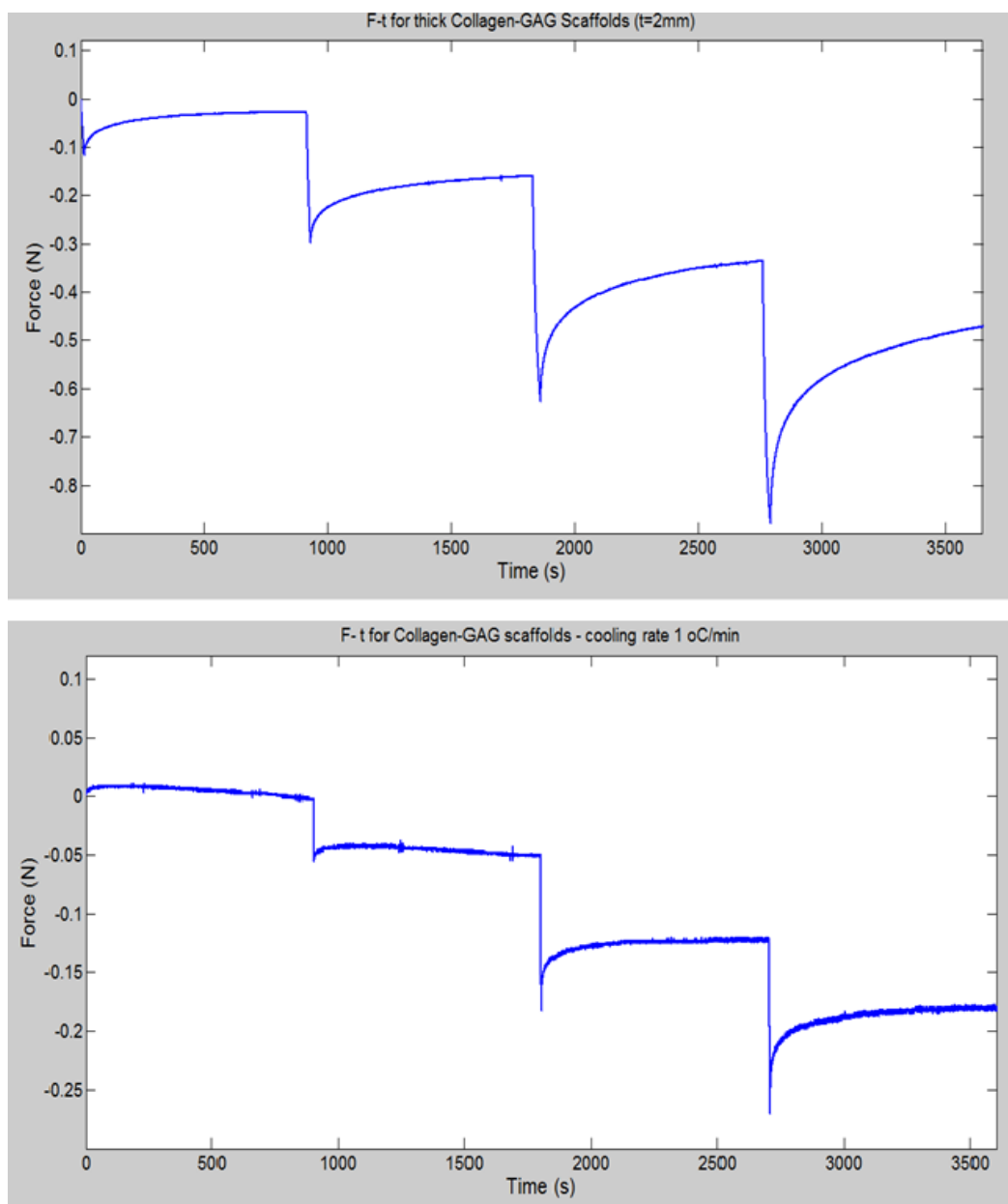
<i>t-test</i>	Ικρίωμα Κολλαγόνου	Ικρίωμα Κολλαγόνου-Γλυκοζαμινογλυκάνης	Ικρίωμα Ζελατίνης
Σύγκριση με και χωρίς Σταυροδεσμούς	0.2022 > 0.05	0.1641 > 0.05	0.0048 < 0.05

Σύγκριση Λεπτών Ικριωμάτων με τα Κλασσικά Ικριώματα

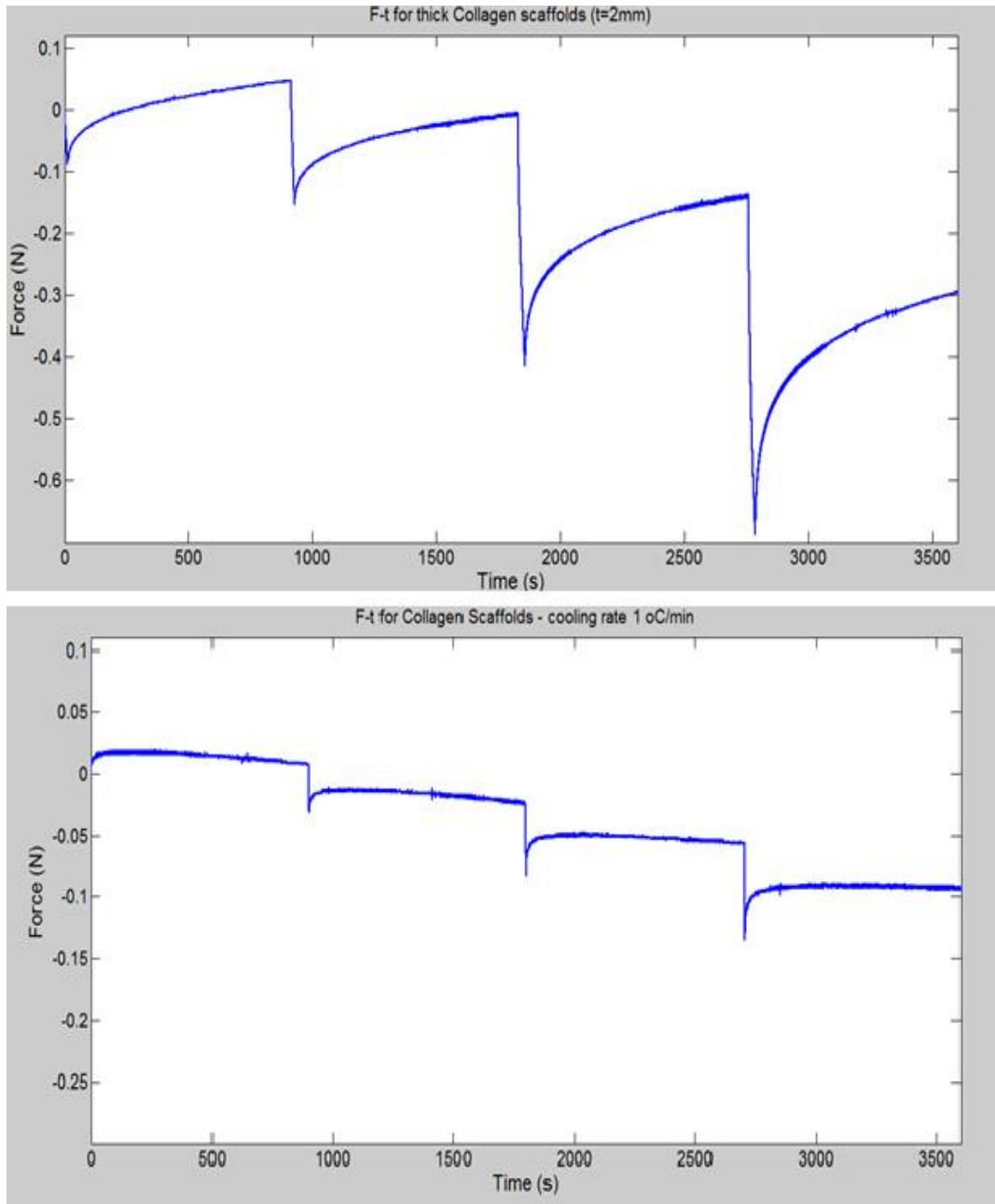
9. Πώς διαφέρουν οι μηχανικές ιδιότητες των λεπτών ικριωμάτων κολλαγόνου από αυτές των ικριωμάτων πάχους 2mm ;

Εκτός από τα λεπτά πορώδη ικριώματα, μετρήθηκε στην πρέσα και η μηχανική συμπεριφορά των «κλασσικών» πορώδων ικριωμάτων πάχους περίπου 2mm. Ο σκοπός του πειράματος ήταν η σύγκριση των μηχανικών ιδιοτήτων (χρονική σταθερά εξωδοελαστικότητας, στιβαρότητα) των λεπτών και των κλασσικών πορώδων ικριωμάτων. Οι εικόνες 27 και 28 δείχνουν ότι στα κλασσικά ικριώματα κολλαγόνου η τελική τιμή δύναμης για παραμόρφωση 30 % είναι μεγαλύτερη από την απαιτούμενη στα λεπτά ικριώματα, όπως επίσης ότι ο 15λεπτος χρόνος παραμονής σε κάθε παραμόρφωση δεν επαρκεί για την σταθεροποίηση της τιμής της δύναμης.

Στον πίνακα 14 φαίνεται ότι η τιμή του μακροσκοπικού μέτρου ελαστικότητας των ικριωμάτων πάχους 2 mm είναι αρκετά μεγαλύτερη από τα λεπτότερα ικριώματα. Οι τιμές του μακροσκοπικού μέτρου ελαστικότητας των κλασσικών ξηρών πορώδων ικριωμάτων πάχους περίπου 2mm συμφωνούν με αυτές που έχουν γίνει σε προηγούμενες μελέτες. [15] Η στατιστική ανάλυση που φαίνεται στον πίνακα 15, δείχνει ότι υπάρχει στατιστικά σημαντική διαφορά στο μέτρο ελαστικότητας μεταξύ ικριωμάτων πάχους 100 μm και 2mm.



Εικόνα 28: Σύγκριση αποκρίσεων θλιπτικής δύναμης – χρόνου ικριωμάτων κολλαγόνου – γλυκοζαμινογλυκάνης με παράμετρο σύγκρισης το διαφορετικός πάχος (αριστερά $t=2mm$ και δεξιά $t=100\mu m$)



Εικόνα 29: Σύγκριση αποκρίσεων θλιπτικής δύναμης – χρόνου ικριωμάτων κολλαγόνου με παράμετρο σύγκρισης το διαφορετικός πάχος (αριστερά $t=2mm$ και δεξιά $t=100\mu m$)

Πίνακας 14: Διαφορά τιμής σταθεράς χρόνου και μέτρου ελαστικότητας μεταξύ ικριωμάτων πάχους 100 μm και 2mm. Τα δεδομένα παρουσιάζονται ως μέση τιμή + τυπική απόκλιση του μέσου ($n=3$). Τα αποτελέσματα προκύπτουν σημαντικά διαφορετικά μετά από το Student's test.

Μηχανικές Ιδιότητες ΙΚριωμάτων πάχους 100 μm και 2 mm	Λεπτά ικριώματα πάχους 100 μm		ΙΚριώματα πάχους 2 mm	
	τ (sec)	$\frac{\delta\sigma}{\delta\varepsilon}$ (KPa)	τ (sec)	$\frac{\delta\sigma}{\delta\varepsilon}$ (KPa)
ΙΚριώμα Κολλαγόνου	91.81 \pm 3.07	14.05 \pm 0.79	374.24 \pm 1.12	32.95 \pm 0.87
ΙΚριώμα Κολλαγόνου- γλυκοζαμινογλυκάνης	383.46 \pm 36.21	19.30 \pm 0.2	222.16 \pm 2.69	50.35 \pm 0.39

3.4 Μελέτη Καλλιέργειας Μελανοκυττάρων

Το κομμάτι του πειραματικού σχεδιασμού που σχετίζεται με την καλλιέργεια καρκινικών μελανοκυττάρων σε λεπτά ικριώματα κολλαγόνου βασίστηκε ουσιαστικά στην έρευνα του Διδακτορικού φοιτητή Jan Rozanc. Πειράματα που εκείνος έχει διεξάγει στις κλασσικές επίπεδες 96 well-plates επαναλήφθηκαν σε ικριώματα κολλαγόνου-γλυκοζαμινογλυκάνης και ζελατίνης με σκοπό την παρατήρηση της επίδρασης της τεχνητής εξωκυττάριας μήτρας στον πολλαπλασιασμό των κυττάρων, καθώς και στην απόκριση συγκεκριμένων φαρμάκων.

Θερμές ευχαριστίες οφείλουν να δοθούν στον Jan Rozanc για την επιλογή των πιο ενδιαφερουσών κυτταροσειρών και φαρμάκων, καθοδήγηση των πειραμάτων και όλη την πολύτιμη βοήθεια που προσέφερε σε πρακτικό επίπεδο.

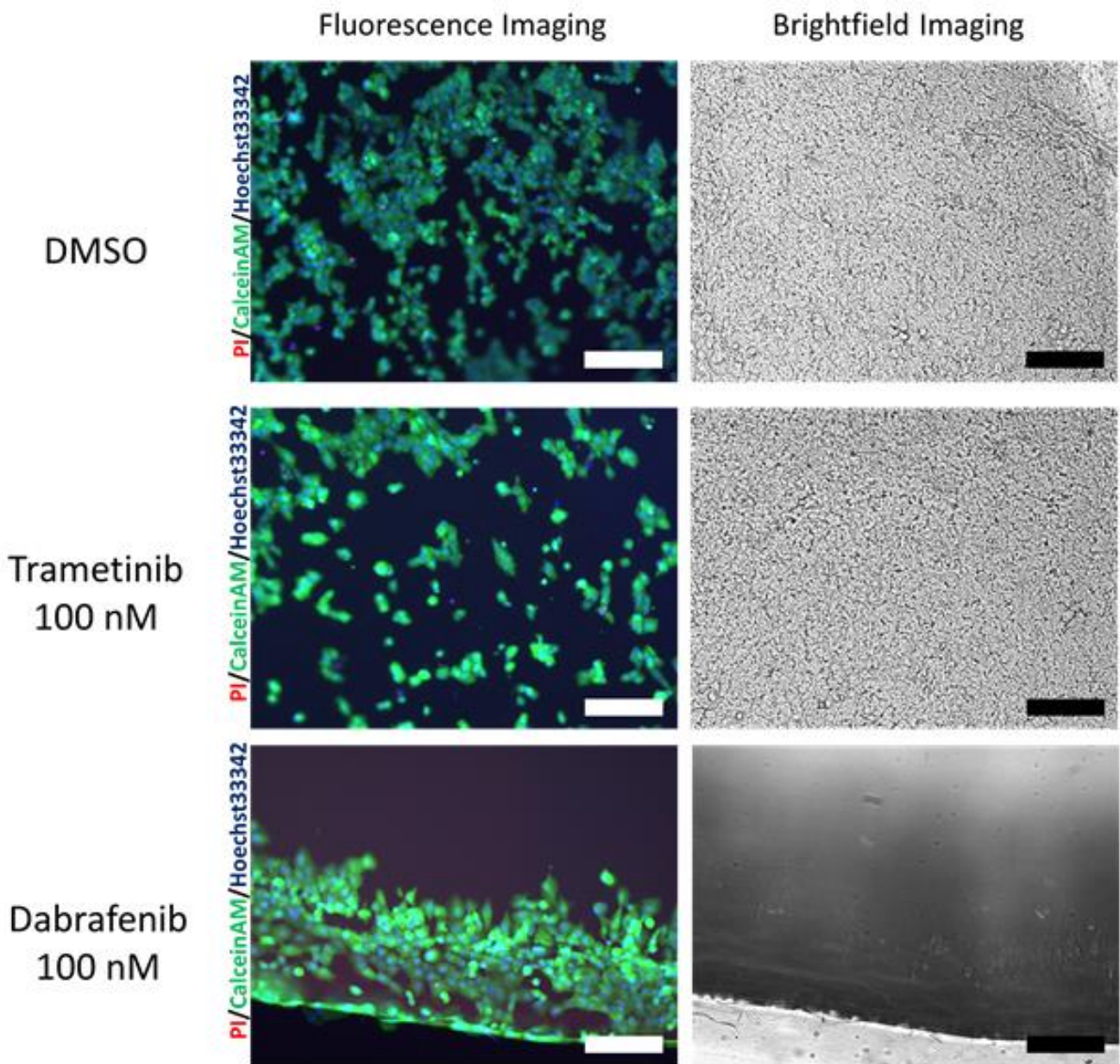
3.4.1 Πείραμα Απεικόνισης

Κύτταρα της μεταστατικής κυτταροσειράς μελανώματος MALME-3M, καλλιεργήθηκαν για διάστημα τεσσάρων ημερών μέσα σε λεπτά ικριώματα κολλαγόνου-γλυκοζαμινογλυκάνης και ζελατίνης με και χωρίς την παρουσία φαρμάκων. Τα επιλεγόμενα φάρμακα είναι τα Trametinib και Dabrafenib, τα οποία είναι αναστολείς της κίνησης MEK και του γονιδίου BRAF αντίστοιχα, τα οποία με τη σειρά τους αποτελούν βασικά σημεία του “μονοπατιού” που σχετίζεται με το μελάνωμα αλλά και άλλους τύπους καρκίνου. Μετά από τέσσερις ημέρες καλλιέργειας των κυττάρων MALME-3, προστέθηκαν σε αυτά κατάλληλες βαφές και πραγματοποιήθηκε πείραμα απεικόνισης με την τεχνική που αναφέρεται στο Παράρτημα Β, χωρίο Β3.

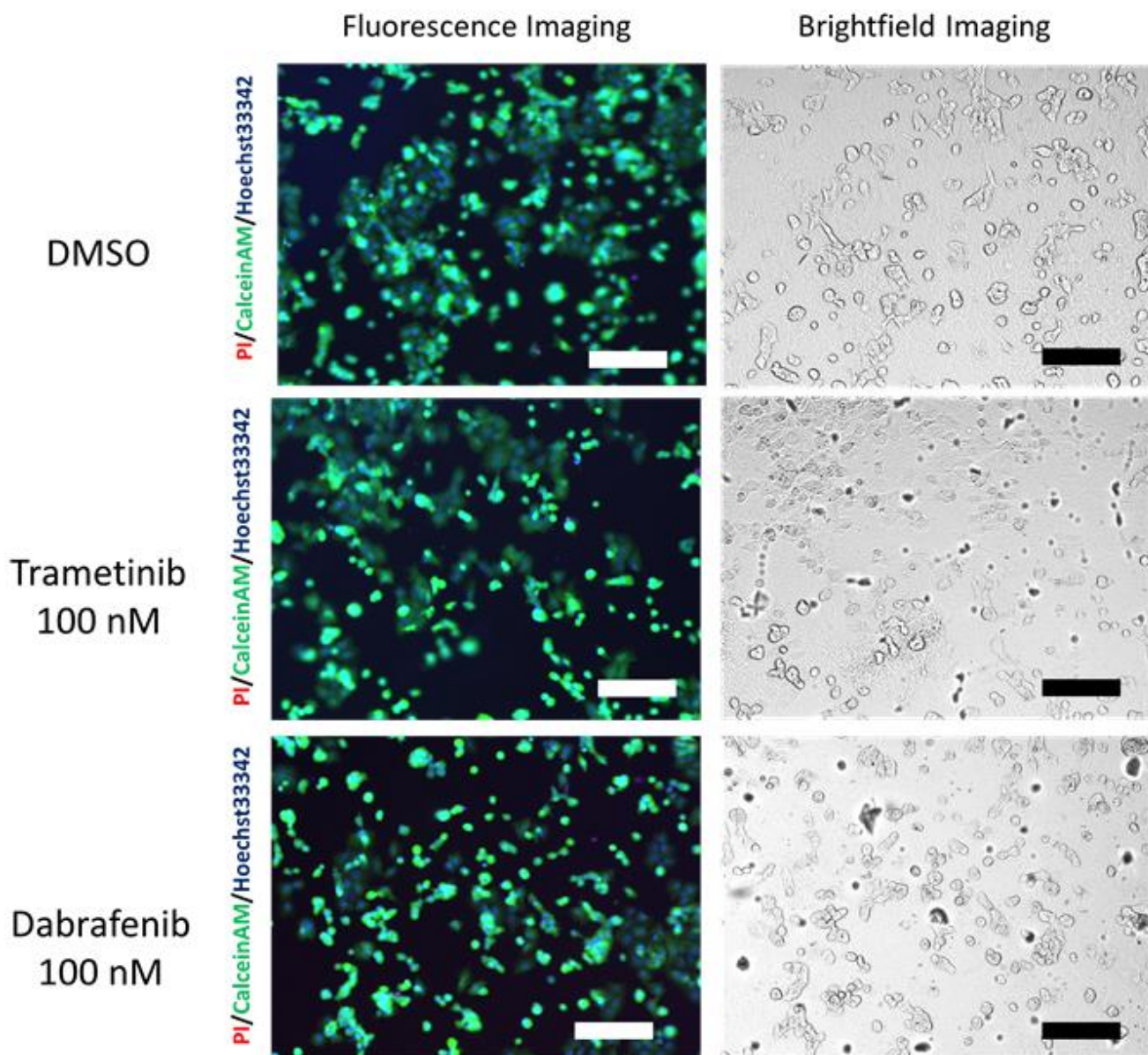
Στις εικόνες 30 και 31 φαίνονται τα αποτελέσματα της απεικόνισης κυττάρων μετά την προσθήκη βαφών όπως αναλύθηκε στο εδάφιο 2.3.2 και επεξηγείται στο πρωτόκολλο που βρίσκεται στο Παράρτημα Β, χωρίο Β3.

Από την εικόνα 30 παρατηρείται ότι τα με ή χωρίς την παρουσία φαρμάκου τα περισσότερα κύτταρα παραμένουν ζωντανά στην περίπτωση καλλιέργειας μέσα σε ικρίωμα κολλαγόνου-γλυκοζαμινογλυκάνης. Επίσης στις εικόνες του Brightfield φαίνεται η παρουσία του ικριώματος, ενώ στην τελευταία γραμμή της εικόνας 30 παρουσιάζεται επίπεδη μορφολογία των κυττάρων (αριστερά) η οποία πιθανόν σχετίζεται με την απουσία ικριώματος (δεξιά).

Η εικόνα 31 δείχνει ότι και στην περίπτωση τριήμερης καλλιέργειας σε ικρίωμα ζελατίνης τα κύτταρα παραμένουν ζωντανά με ή χωρίς την παρουσία φαρμάκου. Ακόμη παρατηρείται η αποδόμηση του βιοϋλικού σε μεγάλη έκταση.



Εικόνα 30: Απεικόνιση κυττάρων μελανώματος που καλλιεργήθηκαν μέσα σε ικρίωματα κολλαγόνου-γλυκοζαμινογλυκάνης με ή χωρίς την παρουσία φαρμάκων (Trametinib, Dabrafenib) για τρεις μέρες. Στην αριστερή στήλη φαίνονται εικόνες φθορισμού των κυττάρων (το μπλε χρώμα δείχνει τον πυρήνα των κυττάρων, το πράσινο δείχνει τα ζωντανά κύτταρα ενώ το κόκκινο-ροζ αντιστοιχεί σε νεκρά κύτταρα). Δεξιά φαίνεται ασπρόμαυρη εικόνα των αντίστοιχων σημείων η οποία φανερώνει την ύπαρξη ή όχι ικρίωματος. Η μπάρα κάτω δεξιά σε κάθε εικόνα αντιστοιχεί σε απόσταση 400μm.



Εικόνα 31: Απεικόνιση κυττάρων μελανώματος που καλλιεργήθηκαν μέσα σε ικρίωματα ζελατίνης με ή χωρίς την παρουσία φαρμάκων (Trametinib, Dabrafenib) για τρεις μέρες. Στην αριστερή στήλη φαίνονται εικόνες φθορισμού των κυττάρων (το μπλε χρώμα δείχνει τον πυρήνα των κυττάρων, το πράσινο δείχνει τα ζωντανά κύτταρα ενώ το κόκκινο-ροζ αντιστοιχεί σε νεκρά κύτταρα). Δεξιά φαίνεται ασπρόμαυρη εικόνα των αντίστοιχων σημείων η οποία φανερώνει την ύπαρξη ή όχι ικρίωματος. Η μπάρα κάτω δεξιά σε κάθε εικόνα αντιστοιχεί σε απόσταση 400μm.

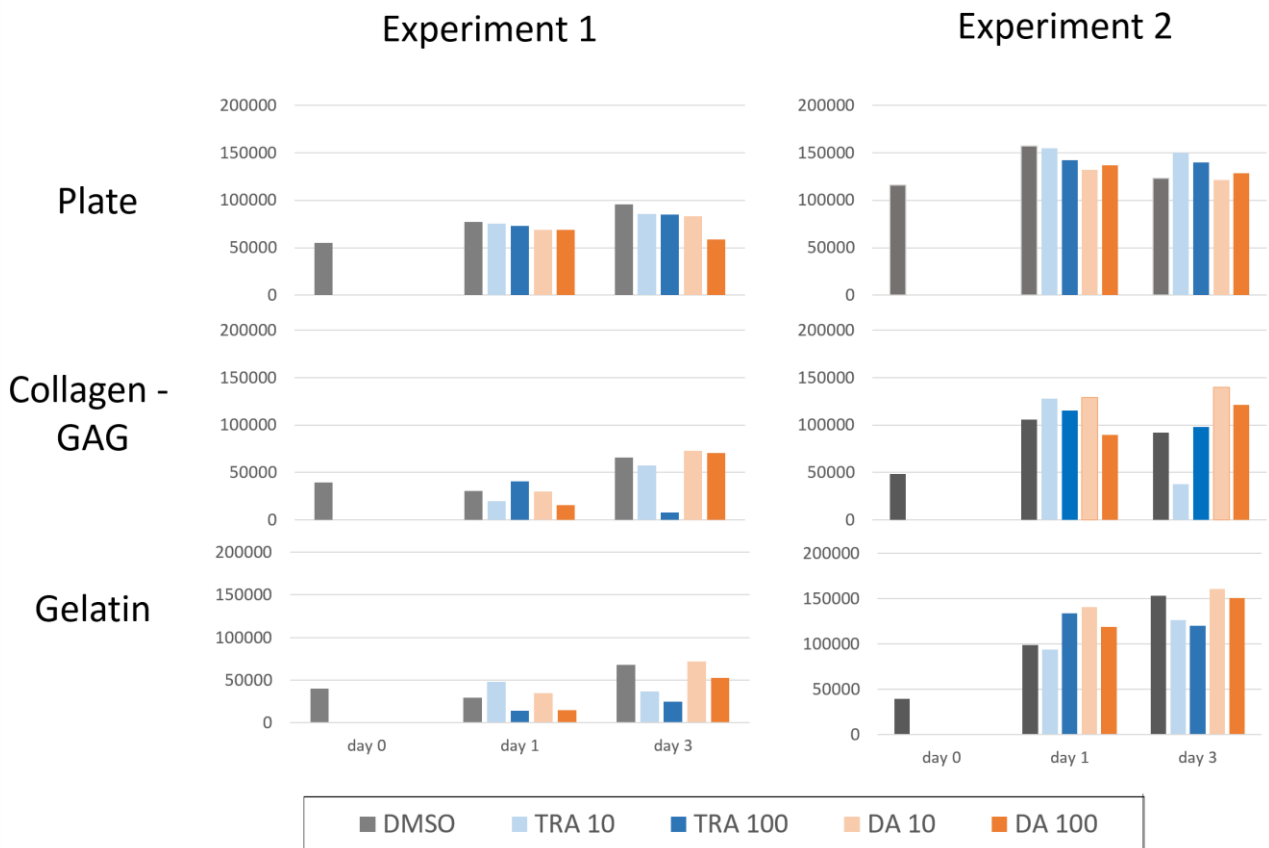
3.4.2 Επίπεδα έκφρασης ενζύμου Gardh

Κύτταρα της κυτταροσειράς, MALME-3M καλλιεργήθηκαν μέσα σε λεπτά ικρίωματα κολλαγόνου-γλυκοζαμινογλυκάνης και ζελατίνης για διάστημα τεσσάρων ημερών. Σε διάστημα μίας ημέρας μετά την εισαγωγή τους στα ικρίωματα τους προστέθηκαν τα φάρμακα Trametinib και Dabrafenib σε συγκεντρώσεις 10nM και 100nM. Για έλεγχο υπήρχε και ένα ικρίωμα σε κάθε κατηγορία χωρίς φάρμακο. Μέσω της μεθόδου της λύσης, δηλαδή της διάσπασης της κυτταρικής μεμβράνης των κυττάρων, λαμβάνονται οι πρωτεΐνες και τα ένζυμα των κυττάρων, επομένως και το περιεχόμενο σε Gardh. Τα επίπεδα έκφρασης του Gardh μετρήθηκαν ακριβώς πριν την

προσθήκη των φαρμάκων αλλά και σε διάστημα επίδρασης των φαρμάκων για ένα 24ωρο και για 72 ώρες. Το ίδιο πείραμα πραγματοποιήθηκε σε κλασσική 96-well plate και τα αποτελέσματα συγκρίθηκαν μεταξύ τους.

Στην εικόνα 32 φαίνονται τα πειραματικά αποτελέσματα. Το πείραμα διεξάχθει δύο φορές με τις ίδιες συνθήκες. Στην πρώτη στήλη φαίνεται το πρώτο πείραμα ενώ η δεύτερη στήλη παρουσιάζει τη δεύτερη διεξαγωγή του πειράματος. Από τα δεδομένα του πειράματος είναι εμφανής η μη επαναληψιμότητα αρχικά στα μεγέθη σήματος Gardh. Στο πρώτο σήμα το πείραμα είχε πολύ μικρότερες τιμές μετά από μία και δύο μέρες καλλιέργειας συγκριτικά με το δεύτερο πείραμα αν και στις δύο περιπτώσεις εισάχθηκε ο ίδιος αριθμός κυττάρων. Επίσης παρατηρείται μικρή διακύμανση των τιμών του σήματος στο ίδιο πείραμα ανεξαρτήτως απ' το αν το υλικό ήταν το πλαστικό ή κάποιο βιοϋλικό (κολλαγόνο-γλυκοζαμινογλυκάνη ή ζελατίνη). Το σήμα στην πλάκα εμφανίζεται και στις δύο περιπτώσεις λίγο μεγαλύτερο καθ' όλη τη διάρκεια του πειράματος συγκριτικά με αυτό στα βιοϋλικά.

Ακόμη τα αποτελέσματα και των δύο πειραμάτων δε συμφωνούν με τα αποτελέσματα των πειραμάτων του Jan Rozanc, ο οποίος έδειξε ότι οι συγκεκριμένες ποσότητες φαρμάκων κατά την καλλιέργεια σε διδιάστατη πλάκα αρκούν για σημαντική μείωση του αριθμού των κυττάρων μετά από διάστημα τριών ημερών.



Εικόνα 32: Σήμα Gardh που εκφράζουν τα κύτταρα όταν καλλιεργούνται μέσα σε επίπεδες πλάκες, ικρίώματα κολλαγόνο-γλυκοζαμινογλυκάνης και ικρίώματα ζελατίνης για διάστημα τριών ημερών με ή χωρίς την παρουσία φαρμάκων. Οι δύο στήλες αναφέρονται στις δύο διαφορετικές διεξαγωγές του ίδιου πειράματος ενώ οι τρεις νοητές γραμμές αντιστοιχούν στα διαφορετικά υλικά. Η μέρα 0 αναφέρεται στην στιγμή πριν την εισαγωγή του φάρμακος ενώ οι μέρες 1 και 3 αντιστοιχούν σε διάστημα 24 και 72 ωρών με φάρμακο, αντίστοιχα. Το DMSO συμβολίζει την απουσία φαρμάκου, το TRA 10 αντιστοιχεί σε συγκέντρωση 10 nM φαρμάκου Trametinib, το TRA 100 αντιστοιχεί σε συγκέντρωση 100 nM φαρμάκου Trametinib, το DA 10 αντιστοιχεί σε συγκέντρωση 10 nM φαρμάκου Dabrafenib και το DA 100 αντιστοιχεί σε συγκέντρωση 100 nM φαρμάκου Dabrafenib.

4 Συζήτηση-Συμπεράσματα

4.1 Χαρακτηρισμός Ικριώματων

Δομικά Χαρακτηριστικά

Από τα αποτελέσματα της Ηλεκτρονικής Μικροσκοπίας Σάρωσης παρατηρείται η ομοιομορφία της δομής των ικριωμάτων ανεξαρτήτως της χημικής τους σύστασης, του πάχους τους ή του ρυθμού ψύξης κατά την παρασκευή τους. Η δομή και το μέγεθος των πόρων είναι ομοιόμορφο σε όλη τη διάμετρο των 6 mm του ικριώματος εκτός από μια έκταση περίπου 100 μm στην εξωτερική περιμέτρή τους.

Το μέσο μέγεθος πόρου των ικριωμάτων είναι περίπου 15 μm για όλα τα ικριώματα που παρασκευάστηκαν με ρυθμό ψύξης 1 °C/min ενώ παρουσιάζεται άνοδος του μέσου μεγέθους πόρου σε 20-25 μm όταν ο ρυθμός ψύξης μειώνεται στα 0.5 °C/min. Περαιτέρω όμως μείωση του ρυθμού ψύξης (0.2 °C/min) οδηγεί σε μείωση του μέσου μεγέθους πόρου, ενώ ειδικά στην περίπτωση των ικριωμάτων ζελατίνης οδηγεί σε σημαντική μείωση του πλήθους των ανοιχτών πόρων. Η μικρή αλλαγή στο πάχος των λεπτών ικριωμάτων δεν φαίνεται να επηρεάζει το μέσο μέγεθος πόρου. Ο σκοπός της διερεύνησης της αλλαγής του μέσου μεγέθους πόρου που δίνουν οι αλλαγές στον ρυθμό ψύξης, αποσκοπεί στην εύρεση του πρωτοκόλλου που προσφέρει αρκετά μεγάλο μέγεθος πόρων ώστε τα κύτταρα να εισέρχονται στο εσωτερικό του ικριώματος και να αναπτύσσονται φυσιολογικά. Με βάση την παρούσα μελέτη το ιδανικότερο μέγεθος πόρων το παράγει ρυθμός ψύξης 0.5 °C/min, παρ' όλ' αυτά επιθυμείται η ανάπτυξη πρωτοκόλλου που θα παράγει ικριώματα μεγαλύτερου μεγέθους πόρου από τα 25 μm. Σε πείραμά του ο κ. Δημήτρης Τζεράνης διαπίστωσε ότι συγκεκριμένες κυτταρικές σειρές (ινοβλάστες) μπορούσαν να μπουν και να παραμείνουν μέσα στα λεπτά ικριώματα, αυτό όμως δεν ήταν δυνατόν σε κύτταρα μεγαλύτερου μεγέθους (π.χ. μοντέλα κινητικών νευρώνων).

Τα αποτελέσματα του χαρακτηρισμού των λεπτών ικριωμάτων συγκρίθηκαν με αποτελέσματα χαρακτηρισμού κλασσικών πορώδων ικριωμάτων (πάχους περίπου 2 mm, παρασκευασμένα με ρυθμό ψύξης 1 °C/min) από τα ίδια όργανα και πρωτόκολλα. Ο λόγος είναι ότι η βιβλιογραφία παρέχει αρκετές πληροφορίες σχετικά με τις δομικές και μηχανικών ιδιότητες των κλασσικών πορώδων ικριωμάτων. Η απεικόνιση των κλασσικών πορώδων ικριωμάτων μέσω ηλεκτρονικής μικροσκοπίας σάρωσης και η επεξεργασία μέσω του προγράμματος *Imagej* έδωσε μέσο μέγεθος πόρων στο εύρος 80-100 μm, το οποίο συμφωνεί με την βιβλιογραφία [15, 18]. Είναι εμφανής η αρκετά μικρότερη τιμή του μέσου μεγέθους πόρου των λεπτών ικριωμάτων σε σχέση με τα κλασσικά ικριώματα. Παρ' όλ' αυτά, παρατηρήθηκε ακόμα ότι στα λεπτά ικριώματα υπάρχει μεγαλύτερη ομοιομορφία στο μέγεθος των πόρων σε σχέση με τα κλασσικά.

Ο Harley στη διδακτορική διατριβή του [18] χρησιμοποίησε διαφορετικούς ρυθμούς ψύξης για την παρασκευή ικριωμάτων πάχους μερικών χιλιοστών. Το αποτέλεσμα της έρευνας του έδειξε ότι μειώνοντας τον ρυθμό ψύξης από 0.9 °C/min σε 0.7 °C/min και έπειτα σε 0.6 °C/min κατάφερε αύξηση του μέσου μεγέθους πόρου. Αυτή η αντιστρόφως ανάλογη αύξηση του μέσου μεγέθους πόρου με την μείωση του ρυθμού ψύξης συμφωνεί με τα αποτελέσματα της παρούσας εργασίας σε μείωση από 1 °C/min σε 0.5 °C/min. Επίσης ο Harley στη διδακτορική διατριβή του δοκίμασε κατά τη διαδικασία της λυοφιλοποίησης να αυξήσει την τελική θερμοκρασία ψύξης από τους -40 °C/min σε -30, -20 και -10 °C/min, διατηρώντας σε κάθε περίπτωση τον ίδιο ρυθμό ψύξης. Κλασσική θερμοκρασία ψύξης, η οποία χρησιμοποιήθηκε και στην παρούσα μελέτη, θεωρούνται οι -40 °C/min. Η πιο ευρέως χρησιμοποιούμενη τελική θερμοκρασία της φάσης ψύξης, η οποία χρησιμοποιήθηκε και στην παρούσα μελέτη, είναι -40 °C. Με αυτήν τη μελέτη ο Harley έδειξε ότι υψηλότερες τελικές θερμοκρασίες ψύξης οδηγούν σε αύξηση του μέσου μεγέθους πόρου.

Με βάση λοιπόν την παρούσα εργασία και τη διατριβή του Harley, παρουσιάζεται ενδιαφέρον, σε επόμενο στάδιο, ο συνδυασμός ρυθμού ψύξης 0.5 °C/min, με μια μεγαλύτερη των -40°C/min

τελική θερμοκρασία ψύξης με σκοπό την αναζήτηση του πρωτοκόλλου λυοφιλοποίησης που θα προσφέρει ένα ικανοποιητικά μεγάλο μέγεθος πόρων στα λεπτά ικριώματα.

Πάχος Λεπτών Ικριωμάτων

Με την πρέσα BOSE electroforce 3100 υπολογίστηκε το πραγματικό πάχος ικριωμάτων ονομαστικού πάχους 120 μm και 180 μm . Βάσει των αποτελεσμάτων είναι εμφανής η σημαντική διαφορά μεταξύ ονομαστικού και πραγματικού πάχους. Η διαφορά αυτή οφείλεται στην άμεση εξάτμιση του εναιωρήματος λόγω μεγάλου λόγου επιφάνειας αέρα εναιωρήματος προς όγκο εναιωρήματος, καθώς και σε σφάλματα κατά την έγχυση του εναιωρήματος. Τα σφάλματα έγχυσης οφείλονται σε σφάλματα της ίδιας της πιπέτας κατά την έγχυση πολύ μικρών όγκων καθώς και σε σφάλματα λόγω της χειροκίνητης έγχυσης για όλα τα ικριώματα.

Παρατηρείται ότι για ονομαστικό πάχος 180 μm η πραγματική τιμή δε διαφέρει εξίσου σημαντικά όπως στην περίπτωση των ικριωμάτων ονομαστικού πάχους 120 μm . Αυτό επιβεβαιώνει την σημασία της επίδρασης του σφάλματος πιπέτας, το οποίο μειώνεται όσο μειώνεται ο εγχυόμενος όγκος καθώς και στην ευκολία εξάτμισης όσο μεγαλύτερος είναι ο λόγος επιφάνειας αέρα εναιωρήματος προς όγκο εναιωρήματος. Επίσης παρατηρείται ότι στην περίπτωση των ικριωμάτων κολλαγόνου η διαφορά μεταξύ πραγματικού και ονομαστικού πάχους είναι αυξημένη, γεγονός που εξηγείται λόγω του μεγάλου ιξώδους της συγκεκριμένου εναιωρήματος, το οποίο δυσκολεύει την αναρρόφηση και έγχυση του ακριβή επιθυμητού όγκου εναιωρήματος.

Θετικό συμπέρασμα αποτελεί το μικρό τυπικό σφάλμα στο πάχος ικριωμάτων παρασκευασμένων με τις ίδιες συνθήκες (ίδια χημική σύσταση, ίδιος ρυθμός ψύξης). Επομένως, ακριβέστερος υπολογισμός της ποσότητας του εναιωρήματος που εξατμίζεται πριν την έναρξη της λυοφιλοποίησης μπορεί να οδηγήσει στη δημιουργία ικριωμάτων επαναλήψιμα παρόμοιου ονομαστικού και πραγματικού όγκου.

Μηχανικά Χαρακτηριστικά

Οι αποκρίσεις θλιπτικής δύναμης ως προς τον χρόνο των ικριωμάτων φανέρωσαν την ιξωδοελαστική συμπεριφορά και των τριών βιοϋλικών, η οποία είναι εμφανής και σε κλασσικά ικριώματα πάχους 2 mm.

Η χρονική σταθερά των αποκρίσεων είναι της τάξης των 100-300 δευτερολέπτων, με αρκετά μεγάλο τυπικό σφάλμα στην περίπτωση ικριωμάτων παρασκευασμένων με ίδιες παραμέτρους. Για τον υπολογισμό έγινε προσέγγιση της καμπύλης στη μη γραμμικά ελαστική περιοχή με τη μέθοδο που αναλύθηκε στο εδάφιο 2.2.2. Γενικά η ακρίβεια της προσέγγισης εκθετικών συναρτήσεων είναι ευαίσθητη στην παρουσία θορύβου. Λόγω της μεγάλης ευαισθησίας του οργάνου BOSE electroforce 3100 και του μικρού μεγέθους των μετρώμενων δυνάμεων (έως 0.2 N), αρκετά πειράματα περιείχαν δυστυχώς σημαντικό θόρυβο ο οποίος επηρέασε και τα αποτελέσματα της καμπύλης. Γι' αυτόν το λόγο, θεωρείται θεμιτό να δοθεί σημασία στην τάξη μεγέθους της σταθεράς χρόνου και όχι στο ακριβές εύρος τιμών της και στο τυπικό σφάλμα.

Η τιμή του μακροσκοπικού μέτρου ελαστικότητας $\frac{\delta\sigma}{\delta\varepsilon}$ κυμαίνεται μεταξύ 10-30 KPa για κάθε είδος ικριωμάτων (χημική σύσταση, πάχος, ρυθμός παρασκευής). Επίσης, ικριώματα ίδιας χημικής σύστασης έχουν παρόμοια τιμή μέτρου ελαστικότητας ανεξαρτήτως πάχους ή ρυθμούς ψύξης, εκτός από την περίπτωση των ικριωμάτων κολλαγόνου όπου για ρυθμό ψύξης 0.2 $^{\circ}\text{C}/\text{min}$ εμφανίζουν αρκετά μικρότερη τιμή από αυτή σε παρασκευή με άλλους ρυθμούς ψύξης.

Όσον αφορά τη σύγκριση με τα κλασσικά ικριώματα, επαναλήφθηκε το πείραμα της θλίψης και σε ικριώματα κολλαγόνου και κολλαγόνου-γλυκοζαμινογλυκάνης πάχους περίπου 2 mm. Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι η σταθερά χρόνου είναι ίδιας τάξης μεγέθους ενώ το μακροσκοπικό

μέτρο ελαστικότητας των λεπτών ικριωμάτων είναι μισό από αυτό των κλασσικών. Για ίδια διάμετρο ικριώματος και επιβολή ίδιας παραμόρφωσης, το παραπάνω αποτέλεσμα είναι προϊόν της μεγαλύτερης θλιπτικής δύναμης που απαιτείται για αυτή την τροπή στα κλασσικά ικριώματα. Αυτή η διαφορά έρχεται σε διαφωνία με την βιβλιογραφία [15] καθώς εκεί αναφέρεται ότι ο λόγος $\frac{\delta\sigma}{\delta\varepsilon}$ ξηρών ικριωμάτων πάχους μερικών χιλιοστών προκύπτει της τάξης των 10-15 KPa, δηλαδή ίδια τάξη μεγέθους με το μακροσκοπικό μέτρο ελαστικότητας των λεπτών ικριωμάτων της παρούσας μελέτης.

4.2 Κυτταρική Μελέτη

Απεικόνιση κυττάρων

Η διεξαγωγή του βιολογικού πειράματος με τα μεταστατικά κύτταρα του μελανώματος ήταν, όπως αναφέρθηκε και στην εισαγωγή, πιλοτική. Τα περισσότερα αποτελέσματα δεν οδηγούν σε ασφαλή συμπεράσματα και απαιτείται συνέχεια της μελέτης.

Από την απεικόνιση των κυττάρων κατά την καλλιέργειά τους μέσα σε ικριώματα ζελατίνης και κολλαγόνου-γλυκοζαμινογλυκάνης με ή χωρίς την παρουσία φαρμάκου προκύπτουν τα εξής :

- Παρά την παρουσία φαρμάκου για τρεις μέρες τα κύτταρα παραμένουν ζωντανά.
- Στην περίπτωση της καλλιέργειας κυττάρων σε ικριώματα κολλαγόνου-γλυκοζαμινογλυκάνης το υλικό δεν αποδομήθηκε κατά τη διάρκεια του πειράματος όπως δείχνουν οι εικόνες στο κανάλι Brightfield.
- Κατά την καλλιέργεια κυττάρων σε ικριώματα ζελατίνης παρατηρείται έντονη αλλοίωση και αποικοδόμηση του βιοϋλικού στο μεγαλύτερο εύρος του βοθρίου.
- Στην περίπτωση που η τεχνητή εξωκυττάρια μήτρα απουσίαζε (για άγνωστο λόγο) είναι εμφανής η επιπεδότητα των κυττάρων σε αντίθεση με την πιο πολύπλοκη και τρισδιάστατη μορφολογία των κυττάρων που καλλιεργούνται μέσα στα ικριώματα.
- Μερικά απεικονιζόμενα κύτταρα είναι περισσότερο φωτεινά ενώ άλλα είναι αρκετά θολά στην ίδια εικόνα. Αυτό αποδεικνύει την εισαγωγή των κυττάρων και στο εσωτερικό του λεπτού ικριώματος.

Μέτρηση σήματος Gapdh

Από το συγκεκριμένο πείραμα που διεξήχθη δύο φορές δεν μπορούν να ληφθούν αξιόπιστα συμπεράσματα. Μπορούν να γίνουν οι εξής παρατηρήσεις :

- Ανεξαρτήτως από την παρουσία φαρμάκου ή όχι τα κύτταρα δεν πολλαπλασιάζονται στο πέρας των τριών ημερών.
- Στην περίπτωση καλλιέργειας σε διδιάστατη πλάκα παρατηρούνται λίγο μεγαλύτερες τιμές σήματος Gapdh απ' ό,τι κατά την καλλιέργεια στην τεχνητή εξωκυττάρια μήτρα.
- Οι τιμές σήματος Gapdh μεταξύ των δύο διεξαγόμενων πειραμάτων με ίδιες συνθήκες διαφέρουν σημαντικά μεταξύ τους.

Υπάρχουν διάφορες πιθανές αιτίες που εξηγούν τα παραπάνω αποτελέσματα.. Θα μπορούσε να ευθύνεται αρχικά η καθημερινή αλλαγή θρεπτικού και φαρμάκου, καθώς με την απομάκρυνση του προηγούμενου θρεπτικού ίσως απομακρύνεται και ποσότητα κυττάρων. Αυτή η αλλαγή πραγματοποιήθηκε λόγω της μικρής χωρητικότητας σε όγκο των τρισδιάστατων βοθρίων και έλαβε χώρα και στην επίπεδη πλαστική πλάκα 96 βοθρίων με σκοπό την διατήρηση ακριβώς ίδιων συνθηκών στο ίδιο πείραμα. Ακόμη, είναι πιθανά λάθη κατά την χρήση πιπέττας αλλά καθώς τα αποτελέσματα είναι παρόμοια στο ίδιο πείραμα, αυτή η αιτιολογία δεν παρουσιάζεται και σημαντικά πιθανή.

Είναι πολύ σημαντική η επανάληψη του συγκεκριμένου πειράματος με τις ίδιες συνθήκες και η διερεύνηση κάθε παράγοντα ξεχωριστά με σκοπό την εύρεση του προβλήματος και την διαπίστωση της απόκρισης των φαρμάκων εν παρουσία τεχνητής εξωκυττάριας μήτρας.

4.3 Κατασκευή συστήματος τρισδιάστατης καλλιέργειας.

Το σύστημα τρισδιάστατης καλλιέργειας έξι βοθρίων που περιέχουν ικρίωματα κολλαγόνου, ζελατίνης ή κολλαγόνου-γλυκοζαμινογλυκάνης αποτελεί το πρώτο βήμα προς την ανάπτυξη συστημάτων τρισδιάστατης καλλιέργειας με βάση τα λεπτά ικρίωματα κολλαγόνου και παρουσιάζει ενθαρρυντικά αποτελέσματα.

Η διαδικασία της καλλιέργειας κυττάρων στο σύστημα έξι βοθρίων μοιάζει σημαντικά στην μέθοδο καλλιέργειας σε κλασσικές πλάκες (multi-well plates). Το πείραμα μέτρησης σήματος Gapdh απέδειξε ότι η διαδικασία της λύσης σε ένα βοθρίο με ικρίωμα επιτυγχάνεται με όμοιο τρόπο όπως στις πλαστικές πλάκες. Επίσης, η βιωσιμότητα των κυττάρων μέσα στα βοθρία με τα ικρίωματα για τρεις μέρες δείχνει όχι μόνο τη βιοσυμβατότητα των ικριωμάτων αλλά και την επιτυχή αλλαγή θρεπτικού με τον κλασσικό τρόπο όπως στα βοθρία των επίπεδων πλαστικών πλακών. Ακόμη, σύμφωνα με το πείραμα απεικόνισης, επιτεύχθηκε η εισαγωγή των κυττάρων στο εσωτερικό του ικριώματος, και η διατήρηση της τρισδιάστατης δομής τους.

Μελλοντικά το παρόν σύστημα θα μπορούσε να βελτιωθεί σε ορισμένους τομείς και να αυξήσει τις δυνατότητές του. Οι πρώτες πιθανές βελτιώσεις είναι οι εξής:

- Αυτοματοποίηση της διαδικασίας έγχυσης του εναιωρήματος στο υδρόφιλο γυαλί για αποφυγή σφαλμάτων που οφείλονται στον χειροκίνητο έλεγχο. Έτσι θα επιτευχθεί καλύτερη επαναληψιμότητα στο τελικό πάχος των ικριωμάτων.
- Παρασκευή παχύτερου φύλλου PDMS με σκοπό την αύξηση της χωρητικότητας των βοθρίων και την αποφυγή αλλαγής θρεπτικών συστατικών σε καθημερινή βάση.
- Αύξηση του πλήθους των βοθρίων σε ένα σύστημα τρισδιάστατης καλλιέργειας με σκοπό τη δημιουργία μιας τρισδιάστατης 96 well-plate σε μακρυπρόθεσμο μέλλον.

ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ Α

A1. ΚΑΤΑΣΚΕΥΗ ΤΡΙΣΔΙΑΣΤΑΤΩΝ WELL-PLATES

Υλικά

- Εναιώρημα βιοϋλικού
- Πολυμερισμένο φύλλο PDMS
- Λεπτό γυαλί μικροσκοπίας (διαστάσεις: 24x50 mm, πάχους 17μm)/

Εξοπλισμός

- Plasma Etcher (Plasma Etch, # 775-883-1336)
- Λυοφιλοποιητής, Virtis Genesis 25EL.
- Πιπέττες όγκου 20 μl (RAININ Pipet-Life XLS)
- Οδηγός βάση από PMMA
- Μεταλλικό κυλινδρικό δοχείο
- Γυάλινο δοχείο με νερό
- Petri-dishes για κυτταροκαλλιέργεια
- Scotch tape

Διαδικασία

1. Πρώτο βήμα αποτελεί η παρασκευή του εναιωρήματος κολλαγόνου και η φύλαξή του στους 4 °C.
2. Σε επόμενο στάδιο πρέπει να πραγματοποιηθεί το πρωτόκολλο καθαρισμού των λεπτών γυαλιών μικροσκοπίου. Το πρωτόκολλο παρατίθεται αναλυτικά στο Παράρτημα Α, χωρίο Α3.
3. Κατά τη διάρκεια καθαρισμού των γυαλιών, το πολυμερισμένο φύλλο PDMS που έχει ωριότερα παρασκευαστεί με το πρωτόκολλο που βρίσκεται στο Παράρτημα Α, χωρίο Α2, πρέπει να αφαιρεθεί από το καλούπι του και να διατηρηθεί σε tape για την αφαίρεση τυχόν σκόνης μέχρι την ώρα που η διαδικασία του πλάσματος θα λάβει μέρος.
4. Μετά την ολοκλήρωση του πρωτοκόλλου καθαρισμού, το κομμάτι PDMS τοποθετείται καλά πάνω στο κομμάτι γυαλί και μαζί τοποθετούνται στον θάλαμο του Plasma Etcher με σκοπό την πρόσδοση υδροφιλικότητας στις ακάλυπτες κυκλικές επιφάνειες του γυαλιού. Με αυτό τον σκοπό η ελεύθερη επιφάνεια του γυαλιού ακουμπάει στην βάση. Οι συνθήκες που επικρατούν στο Plasma Etcher κατά τη διάρκεια της διεργασίας είναι οι εξής:
 - Χρόνος διεργασίας Πλάσματος: 40 sec
 - Πίεση: 300,9 mTorr
 - Χρόνος ατμοσφαιρικού εξαερισμού: 1 min
 - Χρόνος απομάκρυνσης αέρα: 1min
 - Χρόνος σταθεροποίησης αερίου: 10 sec
 - Χρόνος μέχρι την έναρξη συναγερμού κενού: 5 min
5. Εφόσον ολοκληρωθεί η διεργασία, το κομμάτι γυαλί μαζί με το PDMS τοποθετούνται πάνω σε έναν οδηγό που ορίζει τα σημεία που θα εγχυθεί το εναιώρημα. Έπειτα αφαιρείται το κομμάτι PDMS και γίνεται η έγχυση του απαραίτητου όγκου. Λόγω της υδροφιλικότητας η

σταγόνα του εναιωρήματος απλώνεται στην κυκλική επιφάνεια διαμέτρου 6 mm. Πρέπει να σημειωθεί ότι στην περίπτωση του εναιωρήματος ζελατίνης, λόγω της τζελώδους υφής που παρουσιάζει σε χαμηλές θερμοκρασίες, θα πρέπει να τεθεί σε θερμοκρασία δωματίου ένα τέταρτο πριν την επιθυμητή έγχυση. Επίσης στην περίπτωση του εναιωρήματος κολλαγόνου πρέπει να δοθεί προσοχή κατά την έγχυση καθώς λόγω της ιδιαίτερας ιξώδους υφής του μπορεί να μεταφερθεί μικρότερος του επιθυμητού όγκου.

6. Σε επόμενο στάδιο το γυαλί με τους πολύ λεπτούς κυλίνδρους από εναιώρημα τοποθετείται στον θάλαμο του λυοφιλοποιητή και αφού σφραγιστεί καλά η πόρτα, η διαδικασία της λυοφιλοποίησης ξεκινάει. Θα πρέπει να έχει ενεργοποιηθεί ο λυοφιλοποιητής για περίπου ένα μισάωρο ώστε να οριστεί το επιθυμητό πρωτόκολλο λυοφιλοποίησης αλλά και να πραγματοποιηθεί η πρότερη ψύξη του συμπυκνωτή. Το αναλυτικό πρωτόκολλο λειτουργίας ενός κύκλου λυοφιλοποίησης βρίσκεται στο Παράρτημα Α, χωρίο Α4.
7. Όταν το πρωτόκολλο της λυοφιλοποίησης ολοκληρωθεί και τα ικρίωματα έχουν επιτυχώς παρασκευαστεί, ο λυοφιλοποιητής απενεργοποιείται και το γυαλί που φέρει τα φρέσκα εναιωρήματα τοποθετείται σε ένα μεταλλικό δοχείο το οποίο με τη σειρά του εισάγεται στον cross-linker για περίπου 24 ώρες με σκοπό την δημιουργία των σταυροδεσμών που θα προσφέρουν στιβαρότητα και μηχανική ακαμψία στα ικρίωματα. Το πρωτόκολλο λειτουργίας του Cross-linker βρίσκεται στο Παράρτημα Α, χωρίο Α5.
8. Αφού ολοκληρωθεί και η διαδικασία του cross-linking ένα νέο κομμάτι PDMS ίδιας μορφής με το αρχικό, το οποίο έχει επίσης διατηρηθεί στο καλούπι του ως την ώρα του bonding και έχει προστατευθεί με Scotchtape τα τελευταία λεπτά, εισάγεται στον θάλαμο του PlasmaEtcher. Σκοπό αυτή τη φορά αποτελεί η ενεργοποίηση συγκεκριμένων χημικών ομάδων (SiOH groups) στη μία επιφάνεια του PDMS ώστε να μπορέσει να κολληθεί με το γυαλί. Οι συνθήκες που επικρατούν στον PlasmaEtcher με σκοπό την πραγμάτωση του bonding είναι οι εξής:
 - Χρόνος διεργασίας Πλάσματος: 20 sec
 - Πίεση: 300,9 mTorr
 - Χρόνος ατμοσφαιρικού εξαερισμού: 1 min
 - Χρόνος απομάκρυνσης αέρα: 1 min
 - Χρόνος σταθεροποίησης αερίου: 10 sec
 - Χρόνος μέχρι την έναρξη συναγερμού κενού: 5 min
9. Μετά την ολοκλήρωση της διεργασίας πρέπει να γίνει άμεση τοποθέτηση του κομματιού PDMS πάνω στο γυαλί και άσκηση πίεσης για μερικά λεπτά ενώ για ασφάλεια του αποτελέσματος προτείνεται η άσκηση ελαφριάς πίεσης για τη διάρκεια μιας νύχτας.
10. Προκύπτει τελικά μια τρισδιάστατη well-plate όπου στην παρούσα φάση φέρει έξι wells διαμέτρου 6 mm και βάθους 2.5-3 mm με ενσωματωμένα ικρίωματα για καλλιέργεια κυττάρων
11. Η τρισδιάστατη well-plate φυλάσσεται ως την *in vitro* χρήση της σε plexiglass

A2. ΠΑΡΑΣΚΕΥΗ PDMS

Υλικά

- PDMS kit (Dow corning, Sylgard 184). Αποτελείται από την βάση και τον curing agent.

Εξοπλισμός

- Αντλία κενού (N035AN.18, KNF NEUBERGER)
- Ζυγαριά (Mettler Toledo NewClassic MS)
- Σύριγγες
- Καλούπια από PMMA
- Pasteur πιπέττες
- Νυστέρι (No 22, Huian Tianda Medical Instruments CO, LTD)
- Αναδευτήρας
- Scotch tape
- Ισοπροπανόλη (Applichen #131090.1211)

Διαδικασία

1. Φραγή του ανοιχτού στομίου μιας σύριγγας χωρητικότητας περισσότερων ml από τον επιθυμητό όγκο PDMS με μια κολλητική ταινία
2. Τοποθέτηση της σύριγγας σε βάση για στήριξη και τοποθέτηση έπειτα σε ζυγαριά. Ακολουθεί μηδενισμός της ένδειξης της ζυγαριάς.
3. Χρήση Pasteur πιπέττας για έγχυση της επιθυμητής ποσότητας βάσης. Ακολουθεί το ίδιο για το curingagent με διαφορετική πιπέττα. Υπάρχουν δύο αναλογίες όγκου βάσης : curingagent,
 - 10:1 (περισσότερο ελαστικό PDMS)
 - 7:1 (σκληρότερο PDMS)Στην συγκεκριμένη μελέτη έγινε επιλογή της αναλογίας 10:1, περισσότερο για λόγους οικονομίας του curing agent, το οποίο προσφέρεται σε μικρή ποσότητα από τον κατασκευαστή. Εξάλλου αυτή είναι και η συνήθως χρησιμοποιούμενη αναλογία σε εφαρμογές στα microfluidics.
4. Μετά την ζύγιση της ποσότητας του επιθυμητού PDMS πρέπει να γίνει πολύ καλή ανάδευση του μείγματος ώσπου να αποκτήσει λευκό χρώμα. Έτσι πραγματοποιείται ο πρώτος πολυμερισμός. Για ένα μείγμα περίπου 15 ml είναι επαρκής η ανάδευση για 3-4 min.
5. Έπειτα η σύριγγα με τη βάση της τοποθετείται σε έναν ξηραντή ο οποίος συνδέεται με την αντλία κενού. Η διαδικασία degassing ξεκινάει με την έναρξη του κενού και διαρκεί όσο χρειάζεται ώστε οι φυσαλίδες να εξαφανιστούν πλήρως. Για μείγμα 15 ml μια τυπική διαδικασία degassing διαρκεί περίπου 30 min.
6. Αφού όλες οι φυσαλίδες έχουν αφαιρεθεί γίνεται έγχυση του διάφανου πλέον μείγματος στο καλούπι. Αφαιρούμε την ταινία με την οποία είχαμε πρωτύτερα φράξει το στόμιο της σύριγγας και πραγματοποιούμε την έγχυση με την ίδια.

7. Τοποθετούμε το καλούπι στον ξηραντή για περίπου 20-30 min ώστε να αφαιρεθούν τυχόν φυσαλίδες που προέκυψαν κατά τη χύτευση του πολυμερούς.
8. Για την στερεοποίηση και τον ολοκληρωμένο πολυμερισμό προτείνονται δύο εναλλακτικές:
 - Έκθεση του μείγματος σε θερμοκρασία δωματίου για 24-48 h (εξαρτάται από την ακριβή θερμοκρασία δωματίου και την υπάρχουσα υγρασία)
 - Έκθεση του μείγματος σε θερμοκρασία 50-60 °C για 2h.
9. Όταν ο πολυμερισμός και η στερεοποίηση έχουν ολοκληρωθεί, αφαιρούνται τα σχηματιζόμενα ελαστικά κομμάτια PDMS με τη βοήθεια νυστεριού και σκεπάζονται με Scotchtape μέχρι τη χρήση τους.
10. Μετά το τέλος του πολυμερισμού απαιτείται προσεκτικός καθαρισμός του καλουπιού ώστε να είναι δυνατή η επαναλαμβανόμενη χρήση του. Πρώτα γίνεται αφαίρεση υπολειμμάτων PDMS με τσιμπίδα ενώ στη συνέχεια το καλούπι τοποθετείται σε αιθανόλη και υποβάλλεται σε sonicating για “ελευθέρωση” κολλημένων υπολειμμάτων. Έπειτα γίνεται αφαίρεση και αυτών με τσιμπίδα.

Α3.ΚΑΘΑΡΙΣΜΟΣ ΓΥΑΛΙΩΝ ΜΙΚΡΟΣΚΟΠΙΟΥ

Υλικά

- 70% αιθανόλη μετουσιωμένη με κετόνες (Applichem #A0565)
- Type-1 νερό
- Γυαλιά μικροσκοπίας (24x50mm, t=0.17 mm)

Εξοπλισμός

- Bath Sonicator (Digital Ultrasonic Heater)
- Θήκη για κατακόρυφη τοποθέτηση των γυαλιών

Διαδικασία

1. Τα γυαλιά τοποθετούνται κατακόρυφα στην ειδική θήκη, προστίθεται Type-1 νερό μέχρι να καλυφθεί η επιφάνεια των γυαλιών και η θήκη με τα γυαλιά υποβάλλεται για 30' σε sonicating.
2. Όταν η διεργασία τελειώσει αφαιρείται το νερό, και στεγνώνεται πολύ καλά η θήκη με χρήση χαρτιού κουζίνας
3. Προστίθεται 70% αιθανόλη ώσπου να καλυφθεί πάλι η επιφάνεια των γυαλιών. Η εμβάπτιση στην αιθανόλη διαρκεί 20'.
4. Ακολουθεί αφαίρεση της αιθανόλης από το κουτί που περιέχει τη θήκη και εξάτμιση της αιθανόλης από τα γυαλιά (air dry)
5. Τα γυαλιά φυλάσσονται στην ειδική θήκη μέχρι την χρήση τους.

A4. ΠΡΩΤΟΚΟΛΛΟ ΛΥΟΦΙΛΟΠΟΙΗΣΗΣ

Εξοπλισμός

- Λυοφιλοποιητής, Virtis Genesis 25EL.
- Υπολογιστής Ελέγχου του Λυοφιλοποιητή. Περιλαμβάνει το λογισμικό “ENCORE” που ελέγχει και αναφέρει την λειτουργία του λυοφιλοποιητή.
- Παροχή Ρεύματος, Sentinel Power Green SPH 10, 10 kVA.

Διαδικασία

Ενεργοποίηση του Λυοφιλοποιητή

1. Εισαγωγή του κλειδιού άδειας χρήσης του υπολογιστή στην κατάλληλη θύρα.
2. Ενεργοποίηση της παροχής ρεύματος:
 - Ενεργοποίηση του διακόπτη “IN” (ακριβώς δεξιά στο πίσω μέρος της παροχής ρεύματος)
 - Επιλογή του πλήκτρου “Select” στο μπροστινό πίνακα της παροχής ρεύματος και έλεγχος των ρυθμίσεων στην οθόνη του μπροστινού πίνακα της παροχής ρεύματος:
 - Η τάση εισόδου της παροχής ρεύματος πρέπει να είναι περίπου 230 Volts
 - Η τάση εξόδου και η συχνότητα της παροχής ρεύματος πρέπει να είναι περίπου 230 Volts και 60 Hz, αντίστοιχα.
 - Συνεχόμενη πίεση του πλήκτρου “ON” στον μπροστινό πίνακα της παροχής ρεύματος μέχρι να ακουστεί ο ηλεκτρονικός ήχος, μπιπ.
 - Έλεγχος ότι το ημιτονοειδές στην οθόνη του μπροστινού πίνακα της παροχής ρεύματος αναβοσβήνει.
 - Ενεργοποίηση του διακόπτη “OUT” (αριστερά στο πίσω μέρος της παροχής ρεύματος)
3. Ενεργοποίηση του διακόπτη που θέτει σε λειτουργία τον Λυοφιλοποιητή (διακόπτης στο πίσω τμήμα του λυοφιλοποιητή)
4. Ενεργοποίηση του υπολογιστή ελέγχου του λυοφιλοποιητή.
5. Επιλογή της οθόνης “Synoptic” στο λογισμικό ENOCRE (το οποίο ανοίγει αυτόματα με την ενεργοποίηση του υπολογιστή και του λυοφιλοποιητή) και έλεγχος ότι οι παράμετροι έχουν λογικές τιμές.

Επιλογή και Έναρξη Πρωτοκόλλου Λυοφιλοποίησης

1. Επιλογή του επιθυμητού πρωτοκόλλου για να πραγματοποιηθεί :
 - Επιλογή της οθόνης “Freeze dry Screen” στο λογισμικό ENCORE. Έπειτα πάτημα του “Load Recipe”, επιλογή του επιθυμητού πρωτοκόλλου από τα αποθηκευμένα και πάτημα της επιλογής “Continue”.
2. Στην οθόνη “Freeze dry Screen” στο λογισμικό ENCORE, επιλέγεται το “Shelf Load” οπότε και αρχίζει η ψύξη του συμπυκνωτή.
3. Όταν τα δείγματα είναι έτοιμα να λυοφιλοποιηθούν, τοποθετούνται στα ράφια του λυοφιλοποιητή:
 - Επιλογή της οθόνης “Manual Tools” στο λογισμικό ENCORE και ενεργοποίηση του διακόπτη “Release Vacuum” και αποσφράγιση της θύρας του λυοφιλοποιητή
 - Αναμονή ώσπου η πίεση μέσα στον λυοφιλοποιητή να ισορροπήσει με την πίεση του περιβάλλοντος και άνοιγμα της θύρας του λυοφιλοποιητή μόλις γίνει αυτό.

- Τοποθέτηση των δειγμάτων στα ράφια του λυοφιλοποιητή και καλό κλείσιμο της θύρας.
 - Στην οθόνη “Manual Tools” απενεργοποιείται ο διακόπτης “Release Vacuum”.
4. Επιβεβαίωση ότι η θύρα του λυοφιλοποιητή και η θύρα του συμπυκνωτή είναι πολύ καλά κλειστές.
 5. Επιλογή της οθόνης “Freeze dry Screen” στο λογισμικό ENCORE και επιλογή του πλήκτρου “Start the Cycle”. Επιβεβαίωση επιλογής εισάγοντας “y” στην εμφανιζόμενη οθόνη.
 - Αρχίζει η πραγμάτωση του πρωτοκόλλου λυοφιλοποίησης που περιγράφεται στην οθόνη “Freeze dry Screen”
 - Τυπικά πρωτόκολλα λυοφιλοποίησης για λεπτά ικρίωματα διαρκούν 7 ώρες ενώ για παχύτερα ικρίωματα απαιτούνται περίπου 36 ώρες.
 - Έλεγχος ότι στο στάδιο της πρωτοταγούς αφυδάτωσης η αντλία κενού επιτυγχάνει κενό 150 mT. Σε περίπτωση που αυτό δε συμβεί, οι πιθανές αιτίες είναι δύο:
 - i. Το λάδι της αντλίας κενού χρειάζεται αλλαγή
 - ii. Η θύρα του λυοφιλοποιητή ή του συμπυκνωτή δεν είναι καλά κλειστή. Σε αυτή την περίπτωση η λειτουργία του λυοφιλοποιητή πρέπει να διακοπεί άμεσα.

Διακοπή κύκλου λυοφιλοποίησης και απομάκρυνση λυοφιλοποιημένων δειγμάτων

1. Μετά από τουλάχιστον 2 ώρες δευτεροταγούς αφυδάτωσης στους 20 °C/min, επιλέγεται το πλήκτρο “Cancel Current Cycle” στον πίνακα ENOCRE που εμφανίζεται δεξιά όλων των επιλεγόμενων οθόνων. Επιβεβαίωση επιλογής εισάγοντας “y” στην εμφανιζόμενη οθόνη.
2. Επιλογή της οθόνης “Manual Tools” στο λογισμικό ENCORE και ενεργοποίηση του διακόπτη “Release Vacuum” και αποσφράγιση της θύρας του λυοφιλοποιητή
3. Αποσφράγιση της θύρας του λυοφιλοποιητή και αναμονή ώσπου η πίεση μέσα στον λυοφιλοποιητή να ισορροπήσει με την πίεση του περιβάλλοντος οπότε και ανοίγει η θύρα.
4. Αφαίρεση των δειγμάτων από τα ράφια του λυοφιλοποιητή και καλό κλείσιμο της θύρας.

Απενεργοποίηση λυοφιλοποιητή

1. Στην οθόνη “Manual Tools” απενεργοποιείται ο διακόπτης “Release Vacuum” και ενεργοποιείται ο διακόπτης “Defrost” που βρίσκεται πάλι στην Οθόνη “Manual Tools”.
 - Με την ενεργοποίηση του διακόπτη “Defrost” ενεργοποιείται και το σύστημα θέρμανσης του λυοφιλοποιητή, ενώ παράγεται θόρυβος από τους δύο ανεμιστήρες που λειτουργούν σε αυτήν τη φάση.
2. Επιλογή της οθόνης “Synoptic Screen” και παρατήρηση της αύξησης της θερμοκρασίας του συμπυκνωτή.
3. Μόλις η θερμοκρασία του συμπυκνωτή φτάσει περίπου 35-40 °C/min, απενεργοποιείται ο διακόπτης “Defrost” στην οθόνη “Manual Tools”.
 - Σε αυτό το σημείο η θερμοκρασία του “interstate” συστήματος θα είναι μικρότερη των - 10 °C/min.
4. Αποσφράγιση της θύρας του συμπυκνωτή και αναμονή ώσπου να λιώσει όλος ο υπάρχον πάγος.
5. Με χρήση ενός στυλό πραγματοποιείται απαλά πίεση της βαλβίδας αποστάγγισης νερού που βρίσκεται στα αριστερά της θύρας του συμπυκνωτή με σκοπό την απομάκρυνση τυχόν νερού.
 - Στην περίπτωση που το δείγμα είναι λεπτά ικρίωματα, τότε το υπάρχον νερό είναι ελάχιστο ως μηδαμινό.
6. Αναμονή ώσπου η θερμοκρασία και του “interstate” συστήματος και του συμπυκνωτή να φτάσουν τη θερμοκρασία περιβάλλοντος.

7. Απενεργοποίηση του διακόπτη του λυοφιλοποιητή (διακόπτης στο πίσω τμήμα του λυοφιλοποιητή)
8. Απενεργοποίηση του υπολογιστή που ελέγχει τον λυοφιλοποιητή (μέσω πληκτρολόγησης της επιλογής “Windows start” στο πληκτρολόγιο και μετέπειτα επιλογή της εντολής “Shut down”)
9. Απενεργοποίηση της παροχής ρεύματος
 - Απενεργοποίηση του διακόπτη “OUT” (αριστερά στο πίσω μέρος της παροχής ρεύματος)
 - Συνεχόμενη πίεση της επιλογής “standby” στον μπροστινό πίνακα της παροχής ρεύματος ώσπου να σημειωθεί συνεχόμενο ηλεκτρονικός ήχος, μιμικ και να αναβοσβήνει στην οθόνη του πίνακα ένα τριγωνικό σήμα προσοχής με θαυμαστικό.
 - Απενεργοποίηση του διακόπτη “IN” (δεξιά στο πίσω μέρος της παροχής ρεύματος)
 - Προτείνεται η απομάκρυνση και φύλαξη του κλειδιού άδειας χρήσης του υπολογιστή

A5. ΠΡΩΤΟΚΟΛΛΟ ΛΕΙΤΟΥΡΓΙΑΣ ΣΤΑΥΡΟΔΕΣΜΩΝ (Cross-linking)

Εξοπλισμός

- Εναλλασσόμενου Ρεύματος Μετατροπέας Τάσης από 230 σε 115 Volts, 3000 kVA, 550 W, IP21 (Rita Transformers)
- Κλίβανος κενού (Fisher Isotemp, Model 201)
- Αντλία κενού (Welch ChemStar, 1400N)
- Εναλλασσόμενου ρεύματος ανεμιστήρας (SUNON DP201A)

Διαδικασία

1. Σύνδεση του εναλλασσόμενου ρεύματος μετατροπέα τάσης στην εναλλασσόμενη παροχή ρεύματος.
 - Τα δύο βύσματα εξόδου 115 Volts του μετασχηματιστή είναι πάντα συνδεδεμένα με τις εισόδους τροφοδοσίας της αντλίας κενού και του κλιβάνου κενού.
 - Προσοχή για την αποφυγή ηλεκτρικού σοκ.
2. Παρατηρείται ότι η θερμοκρασία εντός του κλιβάνου αρχίζει να αυξάνεται και μέσα σε περίπου 30 λεπτά θα σταθεροποιηθεί περίπου στους 110 °C/min
 - Η παρατήρηση της θερμοκρασίας μπορεί να γίνει με τη βοήθεια ενός θερμοστοιχείου
 - Η τελική θερμοκρασία του κλιβάνου ορίζεται στον δείκτη που υπάρχει στο μπροστά μέρος του κλιβάνου
3. Όταν η θερμοκρασία σταθεροποιηθεί στους 110 °C/min, η θύρα του κλιβάνου ανοίγει και τα δείγματα τοποθετούνται μέσα
 - Ικρίωματα πάχους μερικών χιλιοστών : Τοποθετούνται μέσα σε αλουμινόχαρτο του οποίου το πάνω μέρος πρέπει να είναι ανοιχτό.
 - Λεπτά ικρίωματα : Τοποθετούνται σε μεταλλικό δοχείο χωρίς το κάλυμμα του.
 - Και στις δύο περιπτώσεις η παραγόμενη υγρασία κατά την διεργασία πρέπει να αφαιρεθεί εντελώς.
 - Προσοχή κατά την τοποθέτηση καθώς τα τοιχώματα του κλιβάνου έχουν πολύ υψηλή θερμοκρασία σε αυτήν τη φάση.
4. Γρήγορο κλείσιμο της θύρας του κλιβάνου και σφράγισμά της με το ειδικό εξάρτημα.
5. Σύνδεση του κλιβάνου κενού με την αντλία κενού
 - Απενεργοποίηση της βαλβίδας “Purge”
 - Ενεργοποίηση της βαλβίδας “Vacuum”
 - Ενεργοποίηση του διακόπτη λειτουργίας της αντλίας κενού
 - Καθώς η αντλία τραβάει κενό, η πίεση γίνεται 28 bar μέσα σε 1 λεπτό.
6. Ενεργοποίηση του εναλλασσόμενου ρεύματος ανεμιστήρα και τοποθέτησή του μπροστά από τον κινητήρα της αντλίας κενού.
7. Μετά από διάστημα 8-48 ωρών, ανάλογα με το πρωτόκολλο, η διαδικασία του cross-linking τερματίζεται :
 - Απενεργοποίηση του διακόπτη λειτουργίας της αντλίας κενού
 - Απενεργοποίηση της βαλβίδας “Vacuum”

- Ενεργοποίηση της βαλβίδας “Purge”. Καθώς ατμοσφαιρικός αέρας εισέρχεται στον θάλαμο του κλιβάνου, η πίεση μειώνεται
 - Αποσφράγιση του εξαρτήματος που συγκρατεί κλειστή την θύρα του κλιβάνου και άνοιγμα αυτής μόλις η πίεση του κλιβάνου ισορροπήσει με την πίεση περιβάλλοντος.
 - Πολύ γρήγορη αφαίρεση των δειγμάτων και φύλαξή τους σε κλειστό δοχείο ώστε να μην έρθουν σε επαφή με σκόνη του περιβάλλοντος.
8. Κλείσιμο της θύρας του κλιβάνου και σφράγισμά της με το ειδικό εξάρτημα.
 9. Αποσύνδεση του εναλλασσόμενου ρεύματος μετατροπέα τάσης από την παροχή ρεύματος
 10. Αποσύνδεση του ανεμιστήρα εναλλασσόμενου ρεύματος από την παροχή ρεύματος.

Α6. ΜΗΧΑΝΙΚΟΣ ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΜΟΣ ΙΚΡΙΩΜΑΤΩΝ ΜΕΣΩ ΤΗΣ ΔΟΚΙΜΗΣ ΤΗΣ ΘΛΙΨΗΣ

Υλικά

- Λεπτά ικρίωματα κολλαγόνου
- Λεπτά ικρίωματα ζελατίνης
- Λεπτά ικρίωματα κολλαγόνου-γλυκοζαμινογλυκανών

Εξοπλισμός

- BOSE Electroforce 3100
- Personal Computer
- ΛΑΒΙΔΑ
- Λεπτά γυαλιά μικροσκοπίας (διαστάσεις: 22mmx22mm)

Διαδικασία

1. Ενεργοποίηση του Ηλεκτρονικού Υπολογιστή
2. Άνοιγμα του διακόπτη της πρέσσας BOSE 3100 και του διακόπτη παροχής ρεύματος
3. Επιλογή προγράμματος «WinTest» από την «Έναρξη»
4. Στην οθόνη χειρισμού του προγράμματος επιλέγεται το «SetUp» menu και έπειτα το «channels» menu όπου ορίζεται για «Load» και «Displacement» η επιλογή «auto» με σκοπό τον μηδενισμό τιμής δύναμης και μετατόπισης.
5. Στο «Tune» menu επιλέγεται το menu «Manual» και ορίζονται τα κέρδη αναλογικού (P), ολοκληρωτικού (I) και διαφορικού (D) ελέγχου.
6. Στην επιλογή «Local» ενεργοποιείται η επιλογή «High» που ενεργοποιεί την BOSE3100. Όταν έχει ενεργοποιηθεί η επιλογή «High» χρωματίζεται πράσινη.
7. Ανοίγει η μικρή θύρα, τοποθετείται το λεπτό γυαλάκι μικροσκοπίας διαστάσεων 22x22 mm στην ειδική βάση της πρέσσας και σφραγίζεται η θύρα.
8. Από την επιλογή «Position» κατεβαίνει σιγά σιγά η ράβδος ώσπου να έρθει σε επαφή με το γυαλί αναφοράς. Μόλις ακουμπήσουν μεταξύ τους, σημειώνονται αρνητικές τιμές της δύναμης. Σε τιμή περίπου -0,050 N σημειώνεται η τιμή της αντίστοιχης θέσης.
9. Επιλέγεται το «Home» που μετακινεί την ράβδο στη θέση 0.
10. Αφαιρείται το γυαλί αναφοράς και τοποθετείται στην ειδική βάση το προς χαρακτηρισμό ικρίωμα.
11. Μόλις σφραγιστεί πάλι η θύρα, κατεβαίνει πάλι σιγά σιγά μέσω της επιλογής «Position» η ράβδος ώσπου να έρθει σε επαφή με το ικρίωμα. Μόλις το ακουμπήσει, σημειώνονται αρνητικές τιμές δύναμης. Σε τιμή πάλι περίπου -0,050 N σημειώνεται η τιμή της αντίστοιχης θέσης.
12. Επιλέγεται το «Home» που μετακινεί την ράβδο στη θέση 0.
13. Αφαιρώντας μεταξύ τους τις δύο τιμές θέσης υπολογίζεται το πάχος του ικριώματος.
14. Στην επιλογή «Local» απενεργοποιείται η επιλογή «High» για εξοικονόμηση ενέργειας. Όταν έχει απενεργοποιηθεί η επιλογή «High» χρωματίζεται γκρι.

15. Υπολογίζονται ως ποσοστά του πάχους του ικρίωματος οι μετατοπίσεις που ενδιαφέρουν το πείραμα.
16. Στην επιλογή «TuneIQWaveform» ορίζεται το πρωτόκολλο καταπόνησης.
17. Στο menu «Data Acquisition» επιλέγεται αρχικά τιμή για το «NumberofScans», δηλαδή τον συνολικό χρόνο δειγματοληψίας καθώς και με το τι βήμα θα σημειώνονται τιμές. Με την επιλογή «Browse» αποθηκεύεται η θέση στον δίσκο και το όνομα του αρχείου όπου θα καταγράφονται τα δεδομένα. Για αποθήκευση επιλέγεται το «Ok»
18. Ενεργοποιείται πάλι η επιλογή «High» μέσω του μενού «Local».
19. Μέσω της επιλογής «Position», κατεβαίνει πάλι η ράβδος ώσπου να έρθει στην θέση που είχε προηγουμένως αγγίζει το ικρίωμα.
20. Στο menu «Run» επιλέγεται το «Start»
21. Άμεσα στο menu «Data Acquisition» επιλέγεται το «Start». Σ' αυτή την περίπτωση το εικονίδιο δίπλα στο «Data Acquisition» χρωματίζεται κίτρινο.
22. Κατά τη διάρκεια του πειράματος η πρέσσα καθώς και ο πάγκος που είναι τοποθετημένη πρέπει να μείνουν ανέγγιχτοι για αποφυγή θορύβου στο πείραμα.
23. Όταν το πείραμα ολοκληρωθεί, επιλέγεται το «Home» που μετακινεί την ράβδο στη θέση 0.
24. Στη θέση του δίσκου όπου επιλέχθηκε να γίνει η καταγραφή των δεδομένων του πειράματος υπάρχει ένα txt αρχείο το οποίο μετακινείται σε usb και οδηγείται στο υπολογιστικό εργαλείο, Matlab για επεξεργασία των αποτελεσμάτων.
25. Πραγματοποιείται έξοδος από το πρόγραμμα «WinTest» και απενεργοποιείται ο υπολογιστής.
26. Κλείσιμο του διακόπτη της πρέσας BOSE 3100 και του διακόπτη παροχής ρεύματος.

A7. ΗΛΕΚΤΡΟΝΙΚΗ ΜΙΚΡΟΣΚΟΠΙΑ ΣΑΡΩΣΗΣ

Υλικά

- Λεπτά ικρίωματα κολλαγόνου
- Λεπτά ικρίωματα ζελατίνης
- Λεπτά ικρίωματα κολλαγόνου-γλυκοζαμινογλυκανών

Εξοπλισμός

- NOVA NANOSEM 230
- Προσωπικός Υπολογιστής
- Λαβίδα τοποθέτησης και απομάκρυνσης θέσεων δειγμάτων
- Λαβίδα τοποθέτησης δειγμάτων
- Καινούριο usb

Διαδικασία

1. Άνοιγμα της οθόνης του υπολογιστή που συνδέεται με το ηλεκτρονικό μικροσκόπιο σάρωσης. (Παραμένουν και τα δύο συνεχώς ενεργοποιημένα για συνεχή ύπαρξη κενού στον θάλαμο)
2. Στο menu που εμφανίζεται στην οθόνη επιλέγεται το «Vent»→«yes»ενώ ανοίγει χειροκίνητα η βαλβίδα (μετακίνησε προς τα δεξιά) για να κυκλοφορήσει το αέριο άζωτο στον θάλαμο.
3. Όταν το εικονίδιο χαμηλά και αριστερά στην οθόνη χρωματιστεί γκρι, τότε είναι δυνατό το άνοιγμα της θύρας του ηλεκτρονικού μικροσκοπίου σάρωσης.
4. Τοποθετούνται στην βάση του θαλάμου οι ειδικές για τα δείγματα θέσεις μέσω της κατάλληλης λαβίδας και έπειτα μέσω άλλης κατάλληλης λαβίδας τοποθετούνται προσεκτικά τα δείγματα προς μελέτη πάνω στις ειδικές θέσεις.
5. Σφραγίζεται η πόρτα αργά και προσεκτικά και γίνεται χειροκίνητο κλείσιμο της βαλβίδας.
6. Στο menu της οθόνης επιλέγεται το «Pump»
7. Μόλις η πίεση στον θάλαμο λάβει τιμή τάξης 10^{-4} , η οποία φαίνεται χαμηλά στην οθόνη, και το εικονίδιο χαμηλά και αριστερά χρωματιστεί πράσινο, μπορεί να ξεκινήσει η μέτρηση.
8. Στο menu της οθόνης επιλέγεται το «HV», το οποίο ενεργοποιεί την πηγή υψηλής τάσης.
9. Επιλέγεται επιθυμητή τιμή υψηλής τάσης.
10. Η οθόνη χωρίζεται σε τέσσερις υπο-οθόνες. Η πάνω δεξιά και η κάτω αριστερά δεν χρησιμοποιούνται. Στην οθόνη κάτω δεξιά φαίνεται ο θάλαμος και η θέση της κάμερας σε κάθε στιγμή της μέτρησης. Στην οθόνη πάνω δεξιά φαίνεται το τι εντοπίζει η κάμερα.
11. Επιλέγεται στο menu «Stage»→ «CenterPosition» για κεντράρισμα της βάσης
12. Επιλέγεται η πάνω αριστερά εικόνα και με κλικάρισμα του F6 από το πληκτρολόγιο η αρχικά ακίνητη εικόνα βρίσκεται εν κινήσει.
13. Πιέζοντας την ροδέλα στο ποντίκι και μετακινώντας το γίνεται η μετακίνηση πάνω από τα δείγματα. Παρατηρώντας την κάτω δεξιά οθόνη διαπιστώνεται η κατεύθυνση της κίνησης. Μόλις στην πάνω αριστερά εικόνα φανεί το προς χαρακτηρισμό δείγμα μπορεί να σταματήσει η μετακίνηση του ποντικιού.
14. Επιλέγοντας το menu εικονίδιο σε μορφή γραναζιού που βρίσκεται πάνω δεξιά εμφανίζεται στην οθόνη η θέση του spot την παρούσα στιγμή. Μέσω του άξονα Ζ μπορεί να οριστεί η

επιθυμητή απόσταση εργασίας (working distance). Οι καλύτερες απεικονίσεις λαμβάνονται σε απόσταση εργασίας περίπου 5.7 mm, ενώ το spot και το δείγμα πρέπει να βρίσκονται σε απόσταση τουλάχιστον 5mm.

15. Μεσω των «+» και «-» του πληκτρολογίου πραγματοποιείται μετάβαση σε μεγαλύτερη ή μικρότερη μεγέθυνση αντιστοίχως.
16. Επιλέγοντας την πάνω αριστερά εικόνα και έπειτα F5, η εικόνα εμφανίζεται σε πλήρη οθόνη.
17. Με επιλογή του εικονιδίου εστίασης πάνω αριστερά στην οθόνη επιλέγεται διόρθωση της εστίασης. Η διόρθωση της εστίασης πραγματοποιείται με δεξί click στο ποντίκι και μετακίνηση δεξιά και αριστερά. Η εστίαση πρέπει να γίνεται σταδιακά από χαμηλότερη σε μεγαλύτερη εστίαση ώστε να προκύψουν καθαρές εικόνες.
18. Επιλέγονται το «Modulator» στο menu δεξιά, γίνεται έλεγχος ότι η εικόνα κινείται μόνο μπρος-πίσω αλλά όχι ως προς τις άλλες διαστάσεις. Στην περίπτωση που δεν ισχύει αυτό γίνεται μετακίνηση των αξόνων του «Modulator» μέχρι να επιτευχθεί η σωστή κίνηση. Η διόρθωση του «Modulator» απαιτείται μόνο μια φορά κατά τη διεξαγωγή του πειράματος.
19. Στο menu δεξιά επιλέγεται το «Stigmator» και η διόρθωση του αστιγματισμού πραγματοποιείται με μετακίνηση των αξόνων.
20. Όλες οι εργασίες πριν την λήψη εικόνας πρέπει να γίνονται σε χρόνο δειγματοληψίας 4x50ns.
21. Όταν επιθυμείται να ληφθεί εικόνα ο χρόνος δειγματοληψίας αλλάζει στα 6ms και επιλέγεται στο πληκτρολόγιο δύο συνεχόμενες φορές το F6.
22. Το μονοπάτι για την αποθήκευση της εικόνας είναι το εξής: File → Save As και αποθήκευση με κάποιο χαρακτηριστικό όνομα.
23. Μόλις τελειώσει η λήψη των επιθυμητών εικόνων επιλέγεται το F5 και γίνεται επαναφορά στις τέσσερις υπο-οθόνες.
24. Επιλέγεται το «HV» για να απενεργοποιηθεί η πηγή υψηλής τάσης
25. Επιλέγεται το «Vent» και έπειτα «yes» ενώ ανοίγει χειροκίνητα η βαλβίδα (μετακίνηση προς τα δεξιά) για να κυκλοφορήσει το αέριο άζωτο στον θάλαμο.
26. Όταν το εικονίδιο χαμηλά και αριστερά στην οθόνη χρωματιστεί γκρι, τότε είναι δυνατό το άνοιγμα της θύρας του ηλεκτρονικού μικροσκοπίου σάρωσης.
27. Αφαιρούνται τα δείγματα και οι ειδικές θέσεις τοποθέτησής τους και φυλάσσονται.
28. Σφραγίζεται η πόρτα αργά και προσεκτικά και γίνεται χειροκίνητο κλείσιμο της βαλβίδας.
29. Στο menu της οθόνης επιλέγεται το «Pump»
30. Τοποθετείται στην ειδική θύρα usb ένα όχι πρωτίστως χρησιμοποιημένο usb και μεταφέρονται οι ληφθείσες εικόνες.
31. Αφαιρείται το usb και απενεργοποιείται η οθόνη του υπολογιστή χωρίς να απενεργοποιηθεί ο υπολογιστής ή το ηλεκτρονικό μικροσκόπιο σάρωσης.

ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ Β

B.1 ΑΠΟΚΟΛΛΗΣΗ ΚΥΤΤΑΡΩΝ ΑΠΟ ΦΛΑΣΚΑ ΚΑΙ ΔΙΑΙΡΕΣΗ ΚΥΤΤΑΡΙΚΟΥ ΕΝΑΙΩΡΗΜΑΤΟΣ ΣΕ ΠΕΡΙΣΣΟΤΕΡΕΣ ΦΛΑΣΚΕΣ

Υλικά

- PBS sterile
- Cell culture Medium (RPMI Medium 1640(1X) + GlutaMAX™-1)
- Trypsin EDTA
- Χλωρίνη
- 70% Αιθανόλη

Εξοπλισμός

- Cell Incubator (CO₂ 5% , 37 °C, υγρασία > 90%)
- Biological Hood – Laminar flow
- Φορητή UV λάμπα
- Μικροσκόπιο
- Φυγόκεντρος
- Αιμοκυτταρόμετρο
- Πιπέττες (RAININ Pipet-Life XLS)
- 15 ml Conical Tubes
- Eppendorfs
- Φλάσκες

Διαδικασία

1. Έλεγχος confluency φλάσκας στο μικροσκόπιο → Έναρξη αποκόλλησης και διαίρεσης κυττάρων για confluency 70-80%
2. Έκθεση biological hood σε UV φως για 15-20 λεπτά
3. Θέρμανση PBS, Trypsin και Culture Medium για 15 λεπτά στο Incubator (37 °C) αφού ψεκαστούν πολύ καλά με αιθανόλη
4. Μετά την έκθεση με UV light το biological-hood καθαρίζεται πολύ καλά με 70% αιθανόλη όπως και ό,τι εισάγεται μέσα στο hood ή τον incubator
5. Όταν όλα είναι έτοιμα μεταφέρεται η φλάσκα με τα κακοήθη μελανοκύτταρα στο hood και συλλέγεται το υπάρχον culturemedium
6. Προστίθενται 4ml PBS στην φλάσκα και ανακινείται ελαφρά ώστε να καθαριστεί το περιεχόμενό της από υπολείμματα culturemedium καθώς αυτό απενεργοποιεί την δράση της Trypsin η οποία αποκολλά τα κύτταρα
7. Αφαιρείται το PBS, προστίθενται 3ml Trypsin και η φλάσκα μεταφέρεται για 5 λεπτά στον Incubator με σκοπό την αποκόλληση των κυττάρων.
8. Μετά το πέρας των 5 λεπτών ελέγχεται στο μικροσκόπιο το αν έχουν αποκολληθεί τα κύτταρα. Σε περίπτωση που δεν έχουν, ένα ελαφρύ χτύπημα στη φλάσκα θα βοηθήσει. Αν και πάλι δεν φαίνονται αποκολλημένα η φλάσκα μεταφέρεται για 2 λεπτά πίσω στον Incubator
9. Όταν πραγματοποιηθεί η αποκόλληση η φλάσκα μεταφέρεται στο biologicalhood και προστίθενται 3ml culture Medium για να απενεργοποιηθεί η δράση της Trypsin, η οποία μπορεί να τα σκοτώσει αν δράσει για περισσότερη ώρα

10. Πραγματοποιούνται up-and-downs με πιπέττα για πέντε με έξι φορές ώστε να ανακατευτεί το κυτταρικό εναιώρημα, αποφεύγοντας τις φουσκάλες και εν τέλει μεταφέρεται σε 15 ml conical tube.
11. Γίνεται φυγοκέντριση του κυτταρικού εναιωρήματος για 10 λεπτά στους 25 °C και σε 1500 rpm. Για αυτό το βήμα χρειάζεται ένα conical tube που θα περιέχει νερό όγκου όσος είναι ο όγκος του κυτταρικού εναιωρήματος και θα λειτουργεί ως αντίβαρο για την φυγοκέντριση του εναιωρήματος.
12. Κατά τη διάρκεια της φυγοκέντρισης εισάγεται στο hood μια νέα φλάσκα, εισάγονται σε αυτή 7-8 ml culture medium και μεταφέρεται στον Incubator καθώς πρέπει να βρίσκεται στους 37 °C όταν προστεθούν τα κύτταρα
13. Μετά την φυγοκέντριση μεταφέρεται το conical tube με το κυτταρικό εναιώρημα πίσω στο biological hood και συλλέγεται το culture medium με προσοχή για να μην σπάσει το ίζημα που περιέχει και τα κύτταρα
14. Εγχύεται έπειτα 1ml PBS και με ups-and-downs διαλύεται το ίζημα και ανακατεύεται το εναιώρημα
15. Ύστερα προστίθενται 3ml PBS και ανακατεύεται πολύ καλά το εναιώρημα
16. Αφαιρούνται περίπου 40 μl από το κυτταρικό εναιώρημα και εισάγονται σε ένα μικρό erpendorf με σκοπό την μέτρηση των κυττάρων
17. Το 15ml conical tube μεταφέρεται πάλι στην φυγόκεντρο και αφού επιλεγεί και το κατάλληλο αντίβαρο 4ml γίνεται πάλι φυγοκέντριση
18. Κατά την διάρκεια της φυγοκέντρισης γίνεται μέτρηση του αριθμού των κυττάρων που περιείχε η φλάσκα.
 - Καθαρισμός του αιμοκυτταρόμετρου και της καλυπτρίδας με 70% αιθανόλη
 - Τοποθέτηση του αιμοκυτταρόμετρου στο μικροσκόπιο και της καλυπτρίδας πάνω στο αιμοκυτταρόμετρο και εστίαση
 - Έγχυση 10 μl από το κυτταρικό εναιώρημα που εισήχθη στο erpendorf
 - Στο αιμοκυτταρόμετρο υπάρχουν τέσσερα τεταρτημόρια εκ των οποίων το καθένα φέρει 16 τετραγωνάκια. Γίνεται μέτρηση κυττάρων σε κάθε μία από τις τέσσερις 16άδες και υπολογίζεται ο μέσος όρος των κυττάρων σ' αυτές τις τέσσερις 16άδες
 - Ο τελικός αριθμός των κυττάρων υπολογίζεται από τη σχέση:

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

Όπου μ ο μέσος όρος των κυττάρων στις τέσσερις 16άδες, d ο αριθμός αραιώσης των 40μl κυτταρικού εναιωρήματος πριν τη μέτρηση (επομένως $d=1$ στο παρόν πρωτόκολλο και γενικώς στην περίπτωση που δεν έχει γίνει αραιώση) και V ο όγκος του κυτταρικού εναιωρήματος απ' όπου αφαιρέθηκαν τα 40μl εναιωρήματος για την μέτρηση (επομένως $V=4$ ml για το παρόν πρωτόκολλο)
 - Το αιμοκυτταρόμετρο και η καλυπτρίδα καθαρίζονται πολύ καλά με 70% αιθανόλη και φυλάσσονται
19. Μόλις τελειώσει η δεύτερη φυγοκέντριση μεταφέρεται το conical tube με το κυτταρικό εναιώρημα πίσω στο biological hood και συλλέγεται το PBS με προσοχή για να μην σπάσει το ίζημα που περιέχει και τα κύτταρα
20. Προστίθεται 1ml culture medium και με up-and-downs διαλύεται το ίζημα και ανακατεύεται το εναιώρημα
21. Έπειτα με βάση των αριθμό κυττάρων που προέκυψε από την μέτρηση, προστίθεται ο απαραίτητος όγκος cell culture medium που χρειάζεται ώστε η ποσότητα των κυττάρων να είναι 1000 cells/ml ή 2000 cells/ml, ανάλογα με την προτίμηση του ερευνητή ή το πείραμα που ενδιαφέρεται να διεξάγει σε σύντομο χρονικό διάστημα.
22. Μεταφέρεται πίσω το biological hood η νέα φλάσκα με το φρέσκο culture medium και εισάγεται σ' αυτή περίπου το 1/4 του κυτταρικού εναιωρήματος εκτός αν υπάρχει λόγος για μεγαλύτερη ποσότητα.

23. Το εναιώρημα των κυττάρων που περισσεύει χρησιμοποιείται σε κάποιο πείραμα προγραμματισμένο για εκείνη τη μέρα, αλλιώς εισάγεται σε αυτό χλωρίνη και μετά από 20 λεπτά απορρίπτεται.
24. Ομοίως εισάγεται χλωρίνη σε οτιδήποτε ήρθε σε επαφή με κύτταρα και μετά από 20 λεπτά απορρίπτεται.
25. PBS, Trypsin και culturemedium φυλάσσονται στους 4 °C
26. Το biological hood καθαρίζεται πολύ καλά με αιθανόλη
27. Έκθεση biological hood σεUV light για 15-20 λεπτά

B.2 ΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΑ ΚΥΤΤΑΡΩΝ ΣΕ ΛΕΠΤΟ ΠΟΡΩΔΕΣ ΙΚΡΙΩΜΑ

Υλικά

- Cell culture Medium (RPMI Medium 1640(1X) + GlutaMAX™-1)
- 70% Αιθανόλη

Εξοπλισμός

- Cell Incubator (CO₂ 5%, 37 °C, υγρασία > 90%)
- Biological Hood – Laminar flow
- Μικροσκόπιο
- Πιπέττες (RAININ Pipet-Life XLS)
- Φλάσκες

Διαδικασία

1. Επανάληψη των βημάτων 1-21 του πρωτοκόλλου B1 (Αποκόλληση κυττάρων από φλάσκα και διαίρεση κυτταρικού εναιωρήματος σε περισσότερες φλάσκες)
2. Μετά την δημιουργία της επιθυμητής αναλογίας $\lambda = \frac{\text{Αριθμός Κυττάρων}}{\mu\text{l}}$ στο κυτταρικό εναιώρημα γίνεται υπολογισμός της ποσότητας εναιωρήματος που θα εισαχθεί στα ικρίωματα. Συνήθεις αναλογίες είναι τα $\frac{1000 \text{ κύτταρα}}{\mu\text{l}}$ ή $\frac{2000 \text{ κύτταρα}}{\mu\text{l}}$
 - Η μέγιστη χωρητικότητα των βοθρίων σε όγκο είναι 50 μl οπότε υπολογίζεται ο συνολικός απαραίτητος όγκος εναιωρήματος μέσω της σχέσης, $V^{\text{total}} = 50\mu\text{l} * N^{\beta}$, όπου N^{β} είναι ο αριθμός των βοθρίων του τρισδιάστατου συστήματος καλλιέργειας.
 - Έπειτα υπολογίζεται ο συνολικός αριθμός κυττάρων που απαιτείται για την καλλιέργεια. Συνήθης ποσότητα κυττάρων που χρησιμοποιείται σε πειράματα είναι τα $\frac{10K}{\text{βοθρίο}}$, οπότε ο συνολικός αριθμός κυττάρων σε αυτή την περίπτωση είναι $N_{\text{tot}}^{\text{cell}} = 10K * N^{\beta}$.
 - Βάσει την αναλογία κυττάρων που έχει προκύψει στο βήμα 2 του παρόντος πρωτοκόλλου και τον συνολικό αριθμός κυττάρων $N_{\text{tot}}^{\text{cell}}$ προκύπτει ο ακριβής όγκος κυτταρικού εναιωρήματος που απαιτείται. Η σχέση υπολογισμού του είναι : $V_{\text{susp}}^{\text{cell}} = \frac{N_{\text{tot}}^{\text{cell}}}{\lambda}$.
 - Ο όγκος cell culture medium που απαιτείται για το πείραμα ορίζεται από τη σχέση $V^{\text{medium}} = V^{\text{total}} - V_{\text{susp}}^{\text{cell}}$.
 - Επομένως ο συνολικός όγκος που χρειάζεται για την καλλιέργεια κυττάρων στα βοθρία με τα ικρίωματα προκύπτει από την καλή ανάμιξη του V^{medium} και του $V_{\text{susp}}^{\text{cell}}$.
3. Στη συνέχεια γίνεται έγχυση 50 μl του V^{total} μέσα σε κάθε βοθρίο με πολύ προσοχή ώστε η πιπέττα να μην ακουμπήσει το ικρίωμα και το φθείρει.
 - Τα 6-well τρισδιάστατα συστήματα καλλιέργειας είναι διαρκώς τοποθετημένα ανά δύο μέσα σε petri-dishes τα οποία έχουν ψεκαστεί καλά με αιθανόλη και έχουν εισαχθεί μέσα στο biological hood χωρίς κάλυμμα κατά τη διάρκεια λειτουργίας της UV lamp ώστε να αποστειρωθούν.
4. Μετά την καλλιέργεια τα petri-dishes που φέρουν τα συστήματα καλλιέργειας με ικρίωματα μεταφέρονται στον επωαστή κυττάρων.
5. Σε καθημερινή βάση όσο διαρκεί η καλλιέργεια πρέπει να ελέγχεται στο μικροσκόπιο η ύπαρξη κυττάρων μέσα στα βοθρία που φέρουν τα ικρίωματα, όπως επίσης και να

πραγματοποιείται αλλαγή του cell culture medium καθώς η χωριτικότητα των 50 μl δεν επαρκεί για την επιβίωση των κυττάρων για περισσότερο από μία μέρα.

- Το petri-dishes με τα τρισδιάστατα συστήματα καλλιέργειας μεταφέρεται στο biological hood.
- Αφαιρείται το cell culture medium προσεκτικά ώστε η πιπέτα να μην έρθει σε επαφή με το κρύωμα
- Εισάγονται 50 μl cell culture medium σε κάθε βοθρίο
- Το όλο σύστημα μεταφέρεται πάλι στον επωαστή κυττάρων.

B.3 ΒΑΦΗ ΚΑΙ ΑΠΕΙΚΟΝΙΣΗ ΚΥΤΤΑΡΩ ΜΕΣΩ ΜΙΚΡΟΣΚΟΠΙΑΣ ΦΘΟΡΙΣΜΟΥ

Υλικά

- Calcein AM (thermo scientific C1430) αποθηκευμένη στους -20 °C ως διάλυμα 100 μM μέσα σε DMSO
- Hoechst 33342 (thermo scientific H3570) αποθηκευμένη στους -20 °C σε συγκέντρωση 20ng/ml
- Propidium Iodide (thermo scientific P3566) αποθηκευμένη στους 4 °C, σε συγκέντρωση 1mg/ml
- Cell culture Medium (RPMI Medium 1640(1X) + GlutaMAX™-1)

Εξοπλισμός

- Cell Incubator (CO₂ 5%, 37 °C, υγρασία > 90%)
- Biological Hood – Laminar flow
- Μικροσκόπιο JULI stage
- Πιπέττες (RAININ Pipet-Life XLS)
- Αντάπτορας πρόσδεσης τρισδιάστατου συστήματος καλλιέργειας στη βάση του μικροσκοπίου JULI stage

Διαδικασία

1. Μεταφέρεται στο Biological Hood το petri-dish που περιέχει τα συστήματα καλλιέργειας με τα ικρίωματα στα οποία έχουν καλλιεργηθεί για διάστημα τριών ημερών κύτταρα μελανώματος με και χωρίς την παρουσία των φαρμάκων Dabrafenib και Tramatenib μέσα σε 50 μl cell culture medium ανά βοθρίο.
2. Το cell culture medium αφαιρείται από κάθε βοθρίο προσεκτικά ώστε η πιπέττα να μην έρθει σε επαφή με τα ικρίωματα
3. Σε κάθε βοθρίο προστίθενται 30 μl διαλύματος βαφής (0.5 μM calcein AM, 0.1 ng/ml hoechst 33342, 1 uM propidium iodide)
4. Μεταφορά του συστήματος τρισδιάστατης καλλιέργειας στον επωαστή κυττάρων για επώαση των κυττάρων στο διάλυμα βαφής για 45 λεπτά.
5. Μεταφορά του συστήματος στο biological hood και απομάκρυνση της βαφής από κάθε βοθρίο.
6. Προσθήκη 50 μl cell culture medium σε κάθε βοθρίο
7. Τοποθέτηση του τρισδιάστατου συστήματος καλλιέργειας στον αντάπτορα και έπειτα στη βάση του μικροσκοπίου για απεικόνιση. Η απεικόνιση γίνεται με τις εξής παραμέτρους:
 - Μεγέθυνση φακού 4x
 - Διάρκεια έκθεσης καναλιού Brightfield 5 ms
 - Διάρκεια έκθεσης καναλιού Dapi 50 ms
 - Διάρκεια έκθεσης καναλιού GFP 70 ms
 - Διάρκεια έκθεσης καναλιού RFP 100ms
8. Σε κάθε δείγμα (ικρίωμα με κύτταρα) πάρθηκαν εικόνες από δύο σημεία του βοθρίου. Σε κάθε σημείο πάρθηκαν τέσσερις εικόνες, μία για κάθε κανάλι: brightfield, DAPI, GFP, RFP.
 - Η εστίαση σε κάθε πεδίο έγινε με βάση το κανάλι dapi.
 - Το εύρος πεδίου κάθε εικόνας είναι 2165x1600 μm.
9. Σε κάθε σημείο οι εικόνες σώθηκαν είτε σαν μια σύνθετη έγχρωμη εικόνα (συνδυασμός των μπλε (κανάλι DAPI), πράσινο (κανάλι GFP) και κόκκινο (κανάλι RFP) είτε σαν ασπρόμαυρη εικόνα για το κανάλι brightfield.

B.4 ELISA PROTOCOL – GAPDH Test (protocol in english)

1. Resuspend the selected antibody-coupled microsphere sets (vortex and sonication for 10 seconds).
2. Mix coupled microspheres (stock concentration 5000 microspheres/ul) to a final concentration of 50 microspheres of each set/ul using as diluent Assay buffer (PBS, BSA 1%).
3. Mix biotinylated detection antibodies using as diluent Assay buffer (20ul of the detection antibody mix are needed for the sandwich ELISA reaction at step 14). The volume of each detection antibody needed for the reaction is different for each detection Ab and has been optimized.
4. Transfer 50ul of the microsphere mixture into each well of a flat bottom 96-well plate.
5. Place the plate on the magnetic separator, wait for 1 minute and discard supernatant.
6. Add 100ul/well assay buffer.
7. Place the plate on the magnetic separator, wait for 1 minute and discard supernatant.
8. Transfer 50ul of the sample or standard into the appropriate wells.
9. Cover plate with a plate sealer and shake it at maximum speed (800 rpm) for 90 minutes at room temperature.
10. Place the plate on the magnetic separator, wait for 1 minute and discard supernatant.
11. Add 100ul/well assay buffer.
12. Place the plate on the magnetic separator, wait for 1 minute and discard supernatant.
13. Repeat steps 10-11.
14. Transfer 20ul of the detection antibody mix into each well of the plate.
15. Cover plate with a plate sealer and shake it at maximum speed (800 rpm) for 90 minutes at room temperature.
16. Place the plate on the magnetic separator, add 100ul/well assay buffer and discard supernatant.
17. Add 100ul/well assay buffer.
18. Place the plate on the magnetic separator, wait for 1 minute and discard supernatant.
19. Prepare the PE mix, diluting 1:200 the stock (1mg/ml) SAPE into assay buffer. Make enough in order to add 50ul per well.
20. Add the freshly prepared, photophobic (!) PE mix (50ul/well).
21. Cover plate with a plate sealer and shake it at maximum speed (800 rpm) for 15 minutes at room temperature.
22. Place the plate on the magnetic separator, wait for 1 minute and discard supernatant.
23. Add 100ul/well assay buffer.
24. Place the plate on the magnetic separator, wait for 1 minute and discard supernatant.
25. Remove the plate from the magnetic separator and resuspend the microspheres in 130ul/well assay buffer.
26. Cover plate with a plate sealer and shake it at maximum speed (800 rpm) for 1 minute at room temperature.
27. Remove the plate sealer, place the plate in the Luminex instrument for measurement.
28. Analyze 100ul in the Luminex instrument according to the system manual.

5 Βιβλιογραφία

5.1 Άρθρα σε Επιστημονικά Πεδία

- [1] Marcin Jurga, Maia Dainiak, and Anna Sarnowska: The performance of laminin-containing cryogel scaffolds in neural tissue regeneration. *Biomaterials* 32 (2011) 3423-3434.
- [2] Ke Cheng, Yinzhi Lai, and William S Kisaalitiv: Three-dimensional polymer scaffolds for high throughput cell-based assay systems. *Biomaterials* 29 (2008) 2802-2812.
- [3] Robin Ng, Ru Zang, Kevin K. Yang, Ning Liu and Shang-Tian Yang: Three-dimensional fibrous scaffolds with microstructures and nanotextures for tissue engineering. *RSC Advances*, 2012, 2, 10110-10124.
- [4] Paul J. Geutjes, Willeke F. Daamen, Pieter Buma, Wout F. Feitz, Kaeuis A. Faraj, Toin H. van Kuppevelt: From Molecules to Matrix: Construction and Evaluation of molecularly defined bio-scaffolds. *Advances in Experimental Medicine and Biology*, Volume 585, 279-295.
- [5] Hak-Joon Sung, Carson Meredith, Chad Johnson, Zorina S. Galis: The effect of scaffold degradation rate on three-dimensional cell growth and angiogenesis. *Biomaterials* 25 (2004) 5735-5742.
- [6] Dimitrios S. Tzeranis: Imaging Studies of Peripheral Nerve Regeneration Induced by Porous Collagen Biomaterials, *published by Massachusetts Institute of Technology*, 2013
- [7] I.V. Yannas and John F. Burke: Design of an artificial skin I. Basic design principles. *J Biomed Mater Res.* 1980 Jan; 14(1): 65-81
- [8] 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
- [9] Yufei Ren, Shun-Ho Huang, Sébastien Mosser, Marc Olivier Heuschkel, Arnaud Bertsch, Patrick C. Fraering, Jia-Jin Jason Chen, and Philippe Renaud: A Simple and Reliable PDMS and SU-8 Irreversible Bonding Method and Its Application on a Microfluidic-MEA Device for Neuroscience Research. *Micromachines; Dec 2015, Vol. 6 Issue 12, p1923*
- [10] Douglas Hanahan and Robert A. Weinberg: The Hallmarks of Cancer, 2000. *Cell*, Volume 100, Issue 1, 7 January 2000, 57-70
- [11] Chengyang Wang, Zhenyu Tang, Yu Zhao, Rui Yao, Lingsong Li and Wei Sun: Three-dimensional *in vitro* cancer models: a short review. *Biofabrication*, 2014 Jun; 6(2):022001
- [12] Michael W Pickup, Janna K Mouw¹ & Valerie M Weave: The extracellular matrix modulates the hallmarks of cancer. *Embo Rep.* 2014 Dec; 15(12):1243-53
- [13] Anh-Vu Do, Behnoush Khorsand, Sean M. Geary, and Aliasger K. Salem: 3D Printing of Scaffolds for Tissue Regeneration Applications. *Adv Healthc Mater.* 2015 Aug 26; 4(12):1742-62
- [14] F.J. O'Brien, B.A. Harley, I.V. Yannas, and L.J. Gibson: The effect of pore size on cell adhesion in collagen-GAG scaffolds. *Biomaterials* 26 (2005) 433-41.
- [15] Brendan A. Harley, Janet H Leung, Emilio C.C.C. Silva, and Lorna J. Gibson: Mechanical characterization of collagen-glycosaminoglycan scaffolds. *Acta Biomateriala* 3 (2007) 463-474.

5.2 Βιβλία-παραδόσεις

[16] Μ. Ιωάννου, Διπλωματική Εργασία: «Βελτιστοποίηση Καλλιέργειας Ινοβλαστών σε Ικριώματα από Κολλαγόνο για Προτεομικές Μελέτες Σηματοδότησης», ΕΜΠ Αθήνα 2015.

[17] Ι. Πρέζα, Διπλωματική Εργασία: « Σχεδιασμός κα Κατασκευή Συσκευής για Αυτοματοποιημένη Μελέτη Κυττάρων Μέσω Τρισδιάστατης Καλλιέργειας σε Πορώδη Ικριώματα Κολλαγόνου», ΕΜΠ Αθήνα 2015.

[18] Brendan A. Harley, Διδακτορική Διατριβή: «Cell-Matrix Interactions: Collagen-GAG Scaffold Fabrication, Characterization, and Measurement of Cell Migratory and Contractile Behavior via Confocal Microscopy», MIT (2002), Harvard College (2000).

5.3 Ιστοσελίδες

[19]<https://biotech-ntua.wikispaces.com/Freeze+dryer+protocol+and+temperature+control>

[20]https://en.wikipedia.org/wiki/Tissue_engineering

[21]<https://en.wikipedia.org/wiki/Freeze-drying>

[22]<https://en.wikipedia.org/wiki/Polydimethylsiloxane>

[23]https://en.wikipedia.org/wiki/Scanning_electron_microscope

[24]<http://harrickplasma.com/applications/surface-adhesion>

[25]https://en.wikipedia.org/wiki/Glyceraldehyde_3-phosphate_dehydrogenase

[26] <http://www.discoveriesinmedicine.com/Apg-Ban/Artificial-Skin.html>

[27] <https://3dbiomatrix.com/wp-content/uploads/2013/10/5-Reasons-Cancer-Researchers-Adopt-3D-Cell-Culture-White-Paper.pdf>

[28]<http://biopharma.co.uk/blog/2013/03/06/common-misconceptions-in-freeze-drying-part-1/>

[29]<http://www.elveflow.com/microfluidic-tutorials/soft-lithography-reviews-and-tutorials/how-to-get-the-best-process/soft-lithography-glass-pdms-bonding/>

[30]<http://www.intechopen.com/books/advances-in-bioengineering/incorporation-of-primary-amines-via-plasma-technology-on-biomaterials>

[31]https://www.google.gr/search?q=cell+culture+into+scaffolds&source=lnms&tbn=isch&sa=X&ved=0ahUKEwjx9JHWsdrNAhXIwxQKHVJBAQ0Q_AUICCgB&biw=1517&bih=741&dpr=0.9#imgrc=_