



Εθνικό Μετσόβιο Πολυτεχνείο

ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΕΜΒΙΟΜΗΧΑΝΙΚΗΣ ΚΑΙ ΣΥΣΤΗΜΙΚΗΣ ΒΙΟΛΟΓΙΑΣ

ΤΟΜΕΑΣ ΜΗΧΑΝΟΛΟΓΙΚΩΝ ΚΑΤΑΣΚΕΥΩΝ ΚΑΙ ΑΥΤΟΜΑΤΟΥ ΕΛΕΓΧΟΥ

ΣΧΟΛΗ ΜΗΧΑΝΟΛΟΓΩΝ ΜΗΧΑΝΙΚΩΝ

ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ

Αυτοματοποίηση Κατασκευής Συσκευών με Συστοιχίες
Λεπτών Πορώδων Ικτριωμάτων για Βιολογικές Μελέτες

Ιορδανίδης Θεοχάρης - Νικηφόρος

Επιβλέπων Καθηγητής: Λεωνίδας Αλεξόπουλος, Επ. Καθηγητής ΕΜΠ
Δρ. Δημήτριος Τζεράνης, Ερευνητής ΕΜΠ

ΑΘΗΝΑ 2017



Εθνικό Μετσόβιο Πολυτεχνείο

ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΕΜΒΙΟΜΗΧΑΝΙΚΗΣ ΚΑΙ ΣΥΣΤΗΜΙΚΗΣ ΒΙΟΛΟΓΙΑΣ

ΤΟΜΕΑΣ ΜΗΧΑΝΟΛΟΓΙΚΩΝ ΚΑΤΑΣΚΕΥΩΝ ΚΑΙ ΑΥΤΟΜΑΤΟΥ ΕΛΕΓΧΟΥ

ΣΧΟΛΗ ΜΗΧΑΝΟΛΟΓΩΝ ΜΗΧΑΝΙΚΩΝ

ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ

Αυτοματοποίηση Κατασκευής Συσκευών με Συστοιχίες
Λεπτών Πορώδων Ικτριωμάτων για Βιολογικές Μελέτες

Ιορδανίδης Θεοχάρης - Νικηφόρος

Επιβλέπων: Λεωνίδας Αλεξόπουλος, Επ. Καθηγητής

Εγκρίθηκε την 3^η Μαρτίου 2017 από την τριμελή επιτροπή:

.....
Αλεξόπουλος Λεωνίδας
Επ. Καθηγητής ΕΜΠ

.....
Προβατίδης Χριστόφορος
Καθηγητής ΕΜΠ

.....
Σπιτάς Βασίλειος
Καθηγητής ΕΜΠ

ΑΘΗΝΑ 2017

Copyright © Ιορδανίδης Θεοχάρης-Νικηφόρος, 2017

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 και να συνεργαστούμε. Οι γνώσεις και οι εμπειρίες που απέκτησα κατά τη διεξαγωγή της διπλωματικής μου εργασίας είναι πολύτιμες. 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 και ουσιαστικά αυτή την εργασία οφείλω στον Δρ. Δημήτρη Τζεράνη για την απόφαση του να μου εμπιστευτεί αυτή την έρευνα και την προσπάθεια του να με καθοδηγήσει και να με εκπαιδεύσει σε κάθε πτυχή του δύσκολου αυτού αντικειμένου. Ακόμη ευχαριστώ πολύ την Δανάη Ζαρέιφη για τον χρόνο και τη γνώση που διέθεσε για το βιολογικό κομμάτι της εργασίας και για την στήριξη και συνεργασία. Ευχαριστώ πολύ και τον Αλέξανδρο Πολέσιουκ για την εκμάθηση του TECAN και την συνδρομή του σε κατασκευαστικά και διαδικαστικά ζητήματα, οι γνώσεις του και η βοήθεια του είναι πολύτιμες. Ευχαριστώ ακόμα τον Θεόδωρο Σακελλαρόπουλο για την βοήθεια σε κάθε τι υπολογιστικό και τον Δρ. Σταμάτη Πολύδωρα (ΕΔΙΠ) για την συνεργασία, την βοήθεια και την κατασκευαστική δυνατότητα που μου έδωσε με την χρήση της μηχανής τρισδιάστατης εκτύπωσης Stratasys του Εργαστηρίου Ταχείας Κατασκευής Πρωτοτύπων και Εργαλείων του ΕΜΠ.

Ευχαριστώ πολύ την οικογένεια μου και ειδικά τους γονείς μου, Χαρίλαο και Μαρίνα, για την υποστήριξη τους και την δυνατότητα που μου έδωσαν να σπουδάσω με μεγάλες θυσίες και την αδερφή μου, Θέκλα για την ψυχολογική στήριξη.

Ακόμη, ευχαριστώ όσους ήταν κοντά μου σε αυτή την ταραχώδη διαδρομή από την εισαγωγή μου στο ίδρυμα ως τώρα. Ιδιαίτερα ευχαριστώ τους φίλους μου Νίκο, Μιχάλη, Μάριο, Δημήτρη, Άγγελο, Μάκη και φυσικά τη Βάσω και τους Λιάνα, Κάστωρ και Τίνα Παπανικολάου. Χωρίς τη στήριξη τους και την αγάπη τους θα ήταν όλα πολύ χειρότερα.

Περιεχόμενα

Ευχαριστίες	i
Περίληψη	1
Abstract.....	1
Κεφάλαιο 1: Εισαγωγή.....	3
1.1 Τρισδιάστατες κυτταρικές καλλιέργειες	3
Εξωκυττάρια μήτρα	3
Κυτταρικές Καλλιέργειες στη Βιολογική Έρευνα	3
Είδη Τρισδιάστατων Κυτταρικών Καλλιιεργειών	4
Γέλες (Gels)	4
ΙΚριώματα (Scaffolds)	4
Σφαιροειδή (Hanging Drop Spheroids)	5
Organ-on-a-chip	6
Organoids	7
Ανάλογα της Εξωκυττάριας Μήτρας	7
1.2 Πορώδη Ικρίωματα Κολλαγόνου.....	8
Περιγραφή και εφαρμογές.....	8
Λεπτά Ικρίωματα Κολλαγόνου	9
Κατασκευή.....	10
1.3 Εφαρμογές Κυτταρικών Μοντέλων στη Σύγχρονη Βιολογία	11
Βιολογία Συστημάτων	11
Ανάπτυξη Φαρμάκων	11
Μοντέλα Ασθενειών.....	12
1.4 Στόχοι της διπλωματικής.....	12
Βελτίωση Ακρίβειας και επαναληψιμότητας.....	12
Δημιουργία Βιβλιοθηκών Υλικών.....	12
Δημιουργία Συστοιχιών Λεπτών Πορώδων Ικριωμάτων σε Μορφοποίηση Πλάκας	13
Κεφάλαιο 2: Σχεδιασμός Συσκευών με Συστοιχίες Λεπτών Πορώδων Ικριωμάτων	15
2.1 Περιεχόμενα.....	15
2.2 Περιγραφή του προβλήματος.....	15
2.3 Κατασκευαστικές Προδιαγραφές.....	15
2.4 Εννοιολογικός Σχεδιασμός	16
2.5 Λεπτομερής Σχεδιασμός	18
2.5.1 Βάση Συσκευών	18
2.5.2 Συσκευή συστοιχιών ΛΠΙΚ.....	23

Κεφάλαιο 3: Χαρακτηρισμός και Αυτοματοποίηση Κατασκευής Συσκευών Συστοιχιών Λεπτών Πορώδων Ικτριωμάτων	27
3.1 Περιεχόμενα	27
3.2 Βήματα Διαδικασίας Κατασκευής Λεπτών Πορώδων Ικτριωμάτων	27
3.3 Σχεδιασμός Κατασκευή και Αξιολόγηση Καλουπιών PDMS	29
3.3.1 Προδιαγραφές	29
3.3.2 Διαδικασία κατασκευής	29
3.3.3 Κατασκευαστική Υλοποίηση	29
• Καλούπι Υπερκατασκευών 24 X 50 mm	30
• Καλούπι Υπερκατασκευών 75 X 25 mm	30
3.3.4 Αποτελέσματα και Συμπεράσματα	32
3.4 Αυτοματοποίηση Εναπόθεσης Αιωρήματος	33
3.4.1 Προδιαγραφές	33
3.4.2 Υλοποίηση μέσω της ρομποτικής διάταξης TECAN.	33
3.4.3 Χαρακτηρισμός απόδοσης TECAN	34
3.5 Λυοφιλοποίηση	39
3.5.1 Φυσικές Αρχές	39
3.5.2 Χαρακτηρισμός Τριών Πρωτοκόλλων Λυοφιλοποίησης	41
3.5.3 Αποτελέσματα	48
3.5.4 Συμπεράσματα	49
3.6 Ενεργοποίηση Επιφανειών μέσω Πλάσματος	50
3.6.1 Φυσικές Αρχές	50
3.6.2 Βελτιστοποίηση & Χαρακτηρισμός	51
3.6.3 Πειραματικά αποτελέσματα	52
3.6.4 Συμπεράσματα	53
3.7 Δημιουργία Σταυροδεσμών στα Λεπτά Πορώδη Ικτριώματα	54
3.7.1 Φυσικές Αρχές	54
3.7.2 Βελτιστοποίηση & Χαρακτηρισμός	54
3.7.3 Πειραματικά Αποτελέσματα - Εφύγρυνση	54
Πειραματικά Αποτελέσματα	56
3.8 Συναρμολόγηση Εξαρτημάτων Συσκευών Λεπτών Πορώδων Ικτριωμάτων	56
3.9 Συμπεράσματα	56
Κεφάλαιο 4: Εφαρμογές Συστοιχιών Λεπτών Πορώδων Ικτριωμάτων στην Βιοϊατρική Έρευνα	57
4.1 Περιεχόμενα	57
4.2 Καλλιέργεια και διαφοροποίηση Νευρικών Βλαστοκυττάρων	57
4.3 Μοντέλα Ήπατος	60

Επαγωγή μη αλκοολικής λιπώδους νόσου του ήπατος σε πρωτογενή ανθρώπινα ηπατοκύτταρα – Primary Human Hepatocytes pHH.....	60
4.4 Συμπεράσματα	62
Κεφάλαιο 5: Σύνοψη και Μελλοντική Εργασία.....	63
5.1 Σύνοψη Εργασίας	63
5.2 Μελλοντική Εργασία	63
Βιβλιογραφία	65
Βιβλία & Παραδόσεις	65
Εργασίες	65
Επιστημονικές Δημοσιεύσεις	65
Ιστοσελίδες.....	67
Παραρτημα Α: Πρωτόκολλα Κατασκευής Συσκευών	69
A.1 Καθαρισμός Καλυπτρίδων	69
A.2 Χύτευση και Πολυμερισμός Υπερκατασκευών PDMS	70
A.3 Επιφανειακή Κατεργασία PDMS με Πλάσμα και κόλληση με καλυπτρίδα	71
A.4 Τοποθέτηση Αιωρήματος Κολλαγόνου στις Καλυπτρίδες.....	72
A.5 Λυοφιλοποίηση.....	73
A.6 Δημιουργία Σταυροδεσμών Μέσω Θερμικής Κατεργασίας	75
Παραρτημα Β: Αποτελέσματα Πειραματικών Πρωτόκολλων	77
B.1 Απεικόνιση Ικτριωμάτων στο Μικροσκόπιο Juli Stage	77
B.2 Πείραμα Αξιολόγησης Ακρίβειας TECAN	80
Παραρτημα Γ: Οδηγός Χρήσης TECAN	83
Η Ρομποτική διάταξη TECAN - Περιγραφή δομής και Αρχές λειτουργίας.....	83
Προγραμματισμός του TECAN	86
Παραρτημα Δ: Κατασκευαστικά Σχέδια.....	95
Δ.1 Βάση συσκευών	95
Δ.2 Συσκευή συστοιχιών ΛΠΙΚ.....	96
Δ.3 Καλούπι Χύτευσης PDMS (Υπερκατασκευή 25 X 75 mm).....	97
Δ.4 Καλούπι Χύτευσης PDMS (Καλούπι Υπερκατασκευής 24 X 50 mm)	100
Παράρτημα Ε : Αναδρομή Κατασκευών Καλουπιών Χύτευσης PDMS.....	103

Περίληψη

Οι παραδοσιακές κυτταροκαλλιέργειες σε επίπεδες επιφάνειες πολυστυρενίου αποτελούν το βασικότερο εργαλείο ενός επιστήμονα για την *in vitro* ανάλυση βιολογικών συστημάτων.

Δυστυχώς όμως, λόγω της φύσης των βιολογικών συστημάτων και του ίδιου του βασικού στοιχείου τους – τα κύτταρα, η δισδιάστατη φύση των καλλιεργειών αυτών θέτει όρια του βαθμού εξομίωσης των *in vivo* διαδικασιών σε *in vitro* εργαστηριακές μελέτες. Η απουσία αλληλεπίδρασης των κυττάρων με τα περιβάλλοντα κύτταρα και την εξωκυττάρια μήτρα είναι η αιτία απώλειας βιολογικής πληροφορίας στις παραδοσιακές μεθόδους και θέτει το στόχο της χρήσης ενός υποκατάστατου εξωκυττάριας μήτρας στις *in vitro* μελέτες, συνεπώς της εξέλιξης τρισδιάστατων κυτταροκαλλιεργειών όπου τα κύτταρα καλλιεργούνται μέσα σε βιοϋλικά.

Την ανάγκη τέτοιων υλικών έρχονται να καλύψουν τα πορώδη ικρίωματα, που έχουν ήδη χρησιμοποιηθεί σε εφαρμογές αναγεννητικής ιατρικής. Έρχονται ωστόσο με συγκεκριμένες δυσκολίες και μειονεκτήματα έναντι των παραδοσιακών μεθόδων καλλιέργειας τόσο στην παραγωγή όσο και στη χρήση τους.

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 θρεπτικών 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 ανάπτυξη πρωτοκόλλων και υποδομών αυτοματοποιημένης παραγωγής τέτοιων λεπτών ικρίωμάτων κολλαγόνου (πάχους 100-200 μm) με σκοπό την επαναλήψιμη και ευκολότερη παραγωγή συσκευών με πορώδη ικρίωματα διαφόρων τύπων σε ικανό όγκο για εκτεταμένη έρευνα, καθώς και την συμμόρφωση στις εργονομικές απαιτήσεις του τελικού χρήστη ώστε το προϊόν να είναι συμβατό με όλες τις υπάρχουσες τεχνικές καλλιέργειας και απεικόνισης που γνωρίζει κ χρησιμοποιεί.

Abstract

Cell cultures are an indispensable tool for the *in vitro* study of biological systems. Unfortunately, the current culturing method of cell monolayers on polystyrene plate devices is showing its limits in the emulation of the *in vivo* system response, mainly due to the fact that there is information loss as a consequence of the absence of extracellular matrices and therefore any 3-dimensional interactions between the cells themselves and their matrix support.

Thus the development for 3D cell culture methods becomes a necessity for further advances in *in vitro* studies. Applicable biomaterials include biocompatible porous scaffolds that emulate the extracellular matrix and are the main subject of this thesis.

This work aims to propose and develop a method of massed and repeatable / standardized production of porous scaffold devices for 3D cell cultures, while trying to eliminate as many inherent disadvantages compared to current 2D methods as possible and appeal to the ergonomic needs and requests of the end user/biologist so that current techniques, protocols and procedures for culturing and imaging can be used. In conclusion, our aim is an optimized 3d culture platform requiring minimal retraining from the user and facilitating high throughput proteomics at an acceptable cost.

Κεφάλαιο 1: Εισαγωγή

1.1 Τρισδιάστατες κυτταρικές καλλιέργειες

Εξωκυττάρια μήτρα

Για να γίνει κατανοητή η ανάγκη της ανάπτυξης των τρισδιάστατων καλλιιεργειών και των πλεονεκτημάτων τους έναντι των συγχρόνων μονοστρωματικών πρέπει πρώτα να γίνει αντιληπτή η σημασία των “κοινωνικών” αλληλεπιδράσεων των κυττάρων στο χωρικό τους περιβάλλον. Τα κύτταρα είναι αντιδρασθήρια – μικρά βιολογικά συστήματα που συνθέτουν πολυκύτταρους οργανισμούς. Για να υπάρξει οποιαδήποτε οργάνωση και δράση σε έναν οργανισμό υπάρχει είσοδος, έξοδος και μετάδοση σημάτων μεταξύ αυτών των δυναμικών συστημάτων. Με την επαφή τους μεταξύ τους και με την εξωκυττάρια μήτρα θέτονται οριακές συνθήκες και οργάνωση των κυττάρων.

Η εξωκυττάρια μήτρα είναι ο στερεός ιστός γύρω από τα κύτταρα. Αποτελείται από πρωτεΐνες που σχηματίζουν ίνες (κολλαγόνο, ελαστίνη) , πρωτεΐνες πρόσδεσης (φιμπρονεκτίνη, βιτρονεκτίνη) , γλυκαμινογλυκάνες (π.χ. υαλουρονικό οξύ, χονδροϊτίνη) και πρωτεογλυκάνες (π.χ. αγκρεκάνη) , που της δίνουν τις χημικές και μηχανικές της ιδιότητες.

Η εξωκυττάρια μήτρα, πέρα από στήριξη, ορίζει συνοχή μεταξύ των κυττάρων, παρέχει διόδους μετακίνησης τους και ορίζει τον προσανατολισμό της εσωτερικής τους δομής και το εξωτερικό τους σχήμα μέσω της πρόσδεσης των πρωτεϊνών στις εξωτερικές τους μεμβράνες σε αυτήν. [1][2]

Η αλληλεπίδραση κυττάρου – εξωκυττάριας μήτρας έχει μεγάλη επίδραση στις διαδικασίες της διαφοροποίησης, πολλαπλασιασμού, απόπτωσης και βασικών κυτταρικών λειτουργιών όπως η έκφραση των γονιδίων. Με αυτό τον τρόπο η απουσία της στις παραδοσιακές μονοστρωματικές *in vitro* μελέτες και καλλιέργειες προκαλεί τις απορίες:

Πόσο ακριβής μπορεί να είναι η εξομοίωση των βιολογικών συστημάτων στα παρόντα μοντέλα και πόση πληροφορία χάνεται λόγω απουσίας ενός τέτοιου δικτύου τρισδιάστατης φύσης?

Πως μπορούμε να επανεισάγουμε μια τέτοια συνθήκη και τι οφέλη θα έχει στις μελέτες?

Κυτταρικές Καλλιέργειες στη Βιολογική Έρευνα

Η προσπάθεια για διατήρηση και καλλιέργεια κυττάρων από τους βιολόγους έχει μακρά ιστορία, με απαρχές στα τέλη του 19^{ου} αιώνα και αρχές του 20^{ου}. Αποδείχθηκε τότε η δυνατότητα να διατηρούνται κύτταρα σε φυσιολογικό ορό και να επιβιώνουν αν βρίσκονται σε τεχνητό θρεπτικό διάλυμα σε στείρες συνθήκες. Προκύπτουν λοιπόν οι *in vitro* συνθήκες μελέτης ώστε να μελετηθούν απομονωμένα τα διάφορα στοιχεία των ανώτερων οργανισμών σε φιάλες και δοκιμαστικούς σωλήνες, καλλιεργούμενα θεωρητικά επ άπειρον στο οποιοδήποτε εργαστήριο. Πρακτικά ωστόσο μόνο μετασχηματισμένα και εξαλλαγμένα κύτταρα πολυκύτταρων οργανισμών μπορούν να ζήσουν παραπάνω από μερικές μέρες σε *in vitro* συνθήκες λόγω απουσίας φυσικού στερεού υποστρώματος, θρεπτικών συστατικών, της προστασίας από μόλυνσεις και γενικά του συνόλου του περιβάλλοντος τους αφού αφαιρέθηκαν από τον οργανισμό. Το κύριο πλεονέκτημα των *in vitro* μελετών είναι η ευκολία ελέγχου των συνθηκών της καλλιέργειας (θερμοκρασία, CO₂, θρεπτικό μέσο) σε αντίθεση με το χαστικό σύστημα ενός πλήρους βιολογικού συστήματος. Αυτό σημαίνει δυνατότητα εφαρμογής συγκεκριμένων προεπιλεγμένων πειραματικών χειρισμών και σχετική ευκολία στην στατιστική επεξεργασία των αποτελεσμάτων των πειραμάτων.

Ως κυτταροκαλλιέργεια θεωρείται κάθε διατήρηση και ανάπτυξη μεμονωμένων κυττάρων σε *in vitro* συνθήκες για διαστήματα άνω των 24 ωρών. Τα περισσότερα κύτταρα απαιτούν στερεό υπόστρωμα για να προσκολληθούν και να επιζήσουν. Εξαιρέσεις είναι τα λεμφοκύτταρα και μερικά καρκινικά μεταστατικά κύτταρα. Παραδοσιακά αυτή είναι η επίπεδη επιφάνεια από πολυστυρένιο των δοχείων καλλιέργειας. Οι κυτταροκαλλιέργειες δημιουργούνται αρχικά από μεμονωμένα κύτταρα που εξάγονται από όργανα και

χαρακτηρίζονται πρωτογενείς. Περιέχουν διαφόρους τύπους κυττάρων αλλά τελικά επικρατούν οι ταχύτερα διαιρούμενοι, έως και να φτάσει η καλλιέργεια το στάδιο της πληρότητας – την αναστολή ανάπτυξης λόγω επαφής των κυττάρων – οπότε και ο πολλαπλασιασμός διακόπτεται. Προκειμένου να επιβιώσει η καλλιέργεια τα κύτταρα αποκολλώνται χημικά από την επιφάνεια και μεταφέρονται σε άλλα δοχεία με μικρότερη συγκέντρωση για επανεκκίνηση του κύκλου καλλιέργειας μέχρι και το στάδιο της πληρότητας. Έτσι δημιουργείται η λεγόμενη κυτταρική σειρά, το συνηθέστερο αντικείμενο καλλιέργειας - εάν βέβαια πρόκειται για σταθερή σειρά που διατηρούν τα κύτταρα τις ιδιότητές τους παρά τις επαναλαμβανόμενες διαιρέσεις και επανεκκινήσεις καλλιέργειας. Οι σταθερές κυτταρικές σειρές είναι εξαιρετικά χρήσιμες για τη βιοϊατρική έρευνα ως μέσα δοκιμής ουσιών (τοξικά, καρκινογόνα, παράγοντες αύξησης), ή έως ακόμη και παραγωγής ιστού (εμβρυϊκά βλαστοκύτταρα). Αντίστοιχα οι πρωτογενείς καλλιέργειες είναι πιο ευαίσθητες αλλά και πιο ακριβής απομίμηση των λειτουργιών στον οργανισμό. [2]

Είδη Τρισδιάστατων Κυτταρικών Καλλιεργειών

Ως τρισδιάστατες καλούνται οι καλλιέργειες που αποτελούνται από επαρκή αριθμό στρωμάτων κυττάρων, που έχουν δηλαδή την δυνατότητα να αναπτύσσονται προς όλες τις κατευθύνσεις στον τρισδιάστατο χώρο. Στην προσπάθεια ανάπτυξης τρισδιάστατων κυτταροκαλλιεργειών έχουν αναπτυχθεί διαφορετικές μέθοδοι εκ των οποίων οι επικρατέστερες [8][9] :

Γέλες (Gels)

Γέλες είναι ημίρευστα υλικά με μικρή ακαμψία που προσομοιάζουν τον ιστό – όπου και εισάγονται τα προς καλλιέργεια κύτταρα. Αποτελούν τις πρώτες προσπάθειες να προσομοιαστεί η εξωκυττάρια μήτρα. Πρόκειται περι μείγματος πρωτεϊνών και βιοπολυμερών που απαντώνται στην εξωκυττάρια μήτρα (συνήθως τζελατίνη, κολλαγόνο, λαμίνη), για χρήση ως υπόστρωμα στις παρούσες διατάξεις κυτταροκαλλιέργειας. Παρασκευάζονται ως φυσικά εκχυλίσματα ζωντανών οργανισμών, όπως το Matrigel™ (Engelbreth-Holm-Swarm (EHS) mouse sarcoma extract), αλλά λόγω πιθανότητας παραμένουσων ουσιών (αυξητικούς παράγοντες/μικροοργανισμούς) ή/και αγνώστων μη ποσοτικοποιημένων συστατικών – συνεπώς προβλημάτων στην επαναληψιμότητα της παραγωγής – έχει γίνει προσπάθεια ανάπτυξης και συνθετικών αναλόγων όπως των υδρογελών πολυεθυλενογλυκόλης της QGel™. Παρά τις δυσκολίες χειρισμού τους (π.χ. ανάγκη ψύξης του Matrigel για διατήρηση του ιξώδους του), η ποικιλία φυσικών και συνθετικών υλικών και η δυνατότητα συνδυασμού τους με άλλες μεθόδους και διατάξεις κάνει τις γέλες δημοφιλείς στον τομέα των κυτταροκαλλιεργειών. [10][11]

Ικρίσματα (Scaffolds)

Πρόκειται για σπογγώδη βιοϋλικά διαφόρων συστάσεων, πορότητας, διαπερατότητας και μηχανικών ιδιοτήτων με σκοπό να προσομοιάσουν την *in vivo* εξωκυττάρια μήτρα των ιστών και οργάνων προς μοντελοποίηση. [17][18] Κατασκευάζονται με διάφορες μεθόδους όπως:

- Λυοφιλοποίηση (Freeze Drying)

Αποτελεί μέθοδο αφυδάτωσης: Το εναιώρημα των βιοϋλικών ψύχεται έως κρυσταλλοποίησης του νερού και με μείωση της πίεσης και παράλληλης θέρμανσης συντελείται εξάχνωση των κρυστάλλων πάγου ώστε να δημιουργηθούν οι πόροι. [51][12]

- Διήθηση άλατος (Salt leaching)

Στο επιθυμητό καλούπι τοποθετούνται κρύσταλλοι άλατος και έπειτα εγχύεται το πολυμερές υλικό του ικρίματος επάνω τους και διεισδύει στον διαθέσιμο χώρο ανάμεσα τους. Μετά την σκλήρυνση του πολυμερούς προστίθεται διαλύτης που απομακρύνει το αλάτι αφήνοντας πόρους στις θέσεις των κρυστάλλων. [13]

- Κρυογέλες (Cryogelation)

Το εναιώρημα της κρυογέλης, αφού τοποθετηθεί σε γυάλινο κυλινδρικό καλούπι, ψύχεται σε χρονικό διάστημα 20-30 λεπτών μέχρι τους -12 °C όπου και διατηρείται σε αυτή τη θερμοκρασία για περίπου οκτώ ώρες. Ακολουθεί τήξη σε θερμοκρασία δωματίου, δημιουργώντας ένα κυλινδρικού σχήματος ικρίωμα, το οποίο μπορεί να τεμαχιστεί στο επιθυμητό πάχος. [14]

- Σωματίδια βιοανθρακικού αμμωνίου

Για την παρασκευή ικριωμάτων πάχους τάξεως εκατοντάδων μικρομέτρων γίνεται να αναμιχθεί διάλυμα πολυμερούς και χλωροφορμίου με σωματίδια βιοανθρακικού αμμωνίου. Μετά την ανάμιξη ακολουθεί χύτευση σε δοχείο και μετά το πέρας της εξάτμισης του χλωροφορμίου, ψήσιμο για αρκετές ώρες (8-12), οπότε και τα σωματίδια διασπώνται σε αμμωνία, διοξείδιο του άνθρακα κ νερό, αφήνοντας ανοικτούς πόρους στο υλικό. [15]

- Τρισδιάστατη Εκτύπωση (3D Printing)

Σκόνη πολυμερούς απλώνεται στην πλατφόρμα κατασκευής και συνδετικό διάλυμα εγχύεται σε ορισμένες περιοχές για ανάλογη τελική δομή του ικριώματος. Απομάκρυνση της περίσσειας σκόνης και επανάληψη της διαδικασίας για κάθε στρώμα δίνει το αποτέλεσμα του τρισδιάστατου υλικού. Σημαντικό είναι μετά την παρασκευή να αφαιρούνται τυχόν κυτταροτοξικά υλικά (π.χ. το συνδετικό διάλυμα). [16]

Ειδικά για εφαρμογές nano-scaffolding [17]

- Electrospinning

Χρησιμοποιείται ηλεκτρική δύναμη για την έλξη των φορτισμένων νημάτων του πολυμερούς στο εναιώρημα. Απο τη δίκτυο των ελκόμενων νημάτων προκύπτει το ικρίωμα και η πορότητά του.

- Διαχωρισμός Φάσεων

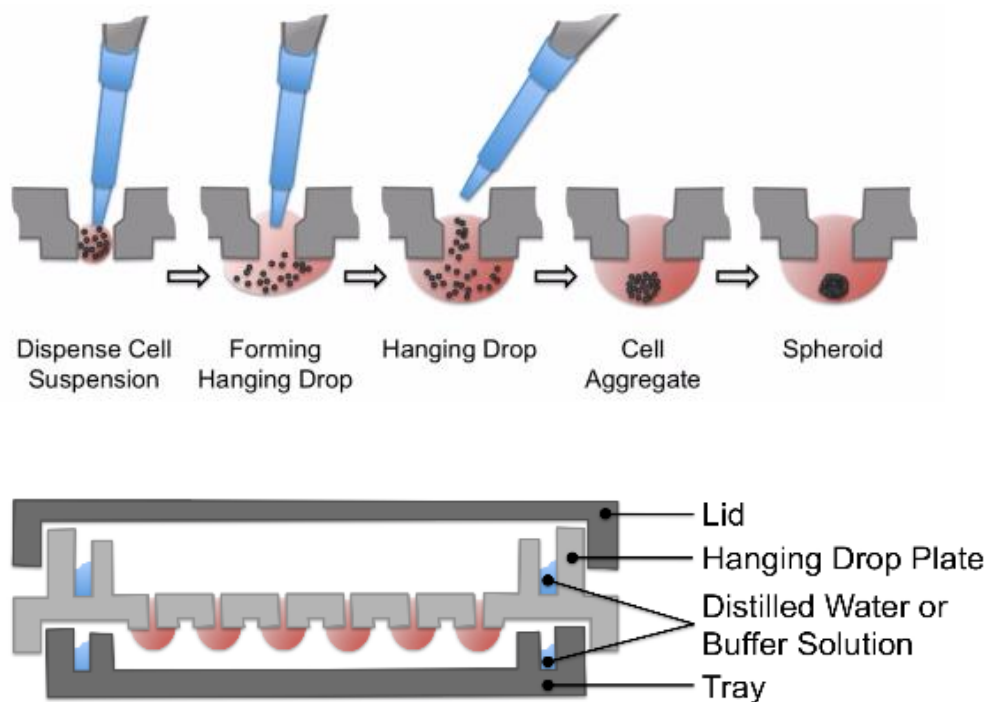
Σε πολυμερές εναιώρημα με την αλλαγή θερμοκρασίας γίνεται διαχωρισμός περιοχών πλουσίων και φτωχών σε πολυμερές. Με εφαρμογή κενού ή λυοφιλοποίησης αφαιρείται ο διαλύτης και σχηματίζεται το ικρίωμα.

- Λιθογραφία

Επιφανειακή κατεργασία επάνω σε βιολικό που “τυπώνει” γεωμετρικά μοτίβα.

Σφαιροειδή (Hanging Drop Spheroids)

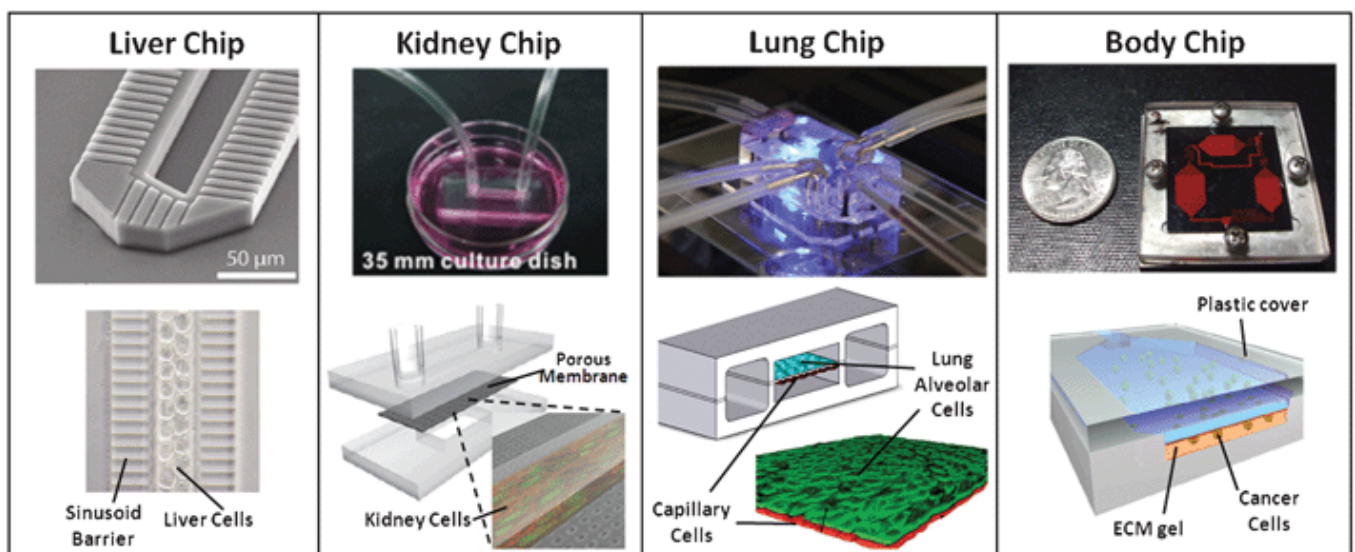
Σφαιροειδή καλούνται τα αυτοσυναρμολογούμενα συσσωματώματα κυττάρων σε “αποικίες” σφαιροειδούς μορφής. Μιμούνται διάφορες περιπτώσεις της *in vivo* κατάστασης σε ζωντανό ιστό και αποτελούν τρισδιάστατη καλλιέργεια χωρίς πρόσθετα. Τα κύτταρα αυτο-οργανώνουν τις μεταβολικές και αναπαραγωγικές τους λειτουργίες και παράγουν την δική τους εξωκυττάρια μήτρα ανάλογα με τις ανάγκες που αντιλαμβάνονται από το περιβάλλον. Αποτελούν εξαιρετικό εργαλείο μοντελοποίησης και βρίσκουν χρήση στα πεδία μελέτης καρκινικών κυττάρων, βλαστοκυττάρων και κυτταροτοξικότητας. Ωστόσο δεν διαθέτουν δομή μηχανικής στήριξης και δεν δύνανται να υπερβούν διαμέτρους τάξεως 500-600 μικρομέτρων καθώς επέρχεται νέκρωση – αρχικά των κυττάρων στο κέντρο λόγω δυσκολίας να τραφούν και έπειτα συνολικά. Διαμορφώνονται συνήθως από σταγόνες που διατηρούνται σε εκκρεμότητα λόγω επιφανειακών τάσεων σε ειδικά διαμορφωμένες πλάκες καλλιέργειας με οπές. [20][21][22]



Εικόνα 1: Σχηματισμός Σφαιροειδών σε πλάκα Perfecta3D Hanging Drop Plate της 3D Biomatrix

Organ-on-a-chip

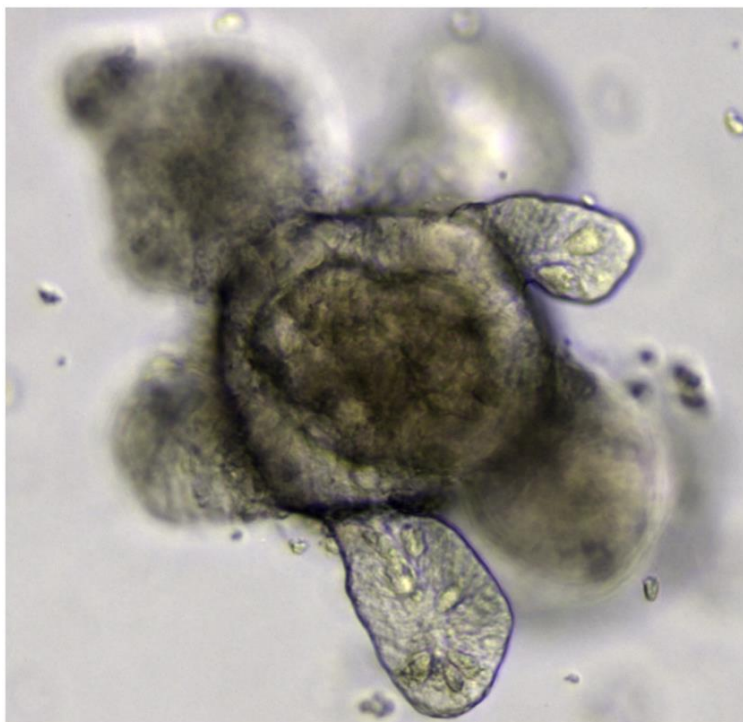
Πρόκειται για το νεότερο κύμα στην εξέλιξη της 3D κυτταροκαλλιέργειας. Κύτταρα ενός οργάνου καλλιεργούνται σε 3D μικροσκευές με διατάξεις μικροφλουϊδικής, κατασκευασμένες με τεχνικές αντίστοιχες των μικροκυκλωμάτων (εξ ού και chip), ώστε να μοντελοποιούνται όλες οι λειτουργίες και οι αποκρίσεις ενός οργάνου. Ουσιαστικά μια μικροδιάταξη τεχνητού οργάνου για *in vitro* μελέτη. Οι τεχνικές και κατασκευαστικές δυσκολίες σημαίνει ότι δεν έχουν τύχει ακόμη ευρείας χρήσης και η ανάγκη για ακριβέστερη εξομίωση καθιστά τον σχεδιασμό και λειτουργία τους δύσκολο και δυνατό μόνο από εξειδικευμένο προσωπικό. Συνήθως κατασκευάζονται από συνδυασμό μεθόδων όπως λιθογραφία και διατάξεις διαχείρισης ρευστών από σιλικονούχο ελαστομερές PDMS. [23][24]



Εικόνα 2: Organs-on-chips [44]

Organoids

Ακόμη μια τελευταία τεχνολογία, τα οργανοειδή αποτελούν μια *in vitro* παραγωγή απλουστευμένης εκδοχής οργάνων, που παρουσιάζει ωστόσο ρεαλιστική μικροανατομία σε τρεις διαστάσεις. Παράγονται είτε από πρωτογεννή κύτταρα του ιστού είτε από βλαστοκύτταρα (embryonic stem cells, induced pluripotent stem cells) και αυτο-οργανώνονται σε τρισδιάστατική αποικία/μικρο-όργανο *in vitro* επιζώντας με τις δικές τους δυνατότητες διαφοροποίησης και ανανέωσης, παρουσιάζοντας παράλληλα οργάνωση ανάμεσα σε διαφορετικούς φαινότυπους κυττάρων του οργάνου και τις βασικές λειτουργίες του. Συνεπώς καθίστανται εξαιρετικά εργαλεία μελέτης βιολογικών διαδικασιών, καθώς αποτελούν μια από τις κοντινότερες καταστάσεις στην *in vivo* που έχουν παραχθεί *in vitro* έως σήμερα. Μπορούν να καλλιεργηθούν μέσα σε θρεπτικά μέσα αλλά και σε συνδυασμό με γέλες η ικρίωματα. [25]



Εικόνα 3: Οργανοειδές εντερικών κυττάρων, καλλιεργημένο από *Lgr5+* βλαστοκύτταρα [45]

Ανάλογα της Εξωκυττάριας Μήτρας

Τα πορώδη ικρίωματα βιοϋλικών όταν εφαρμόζονται σε *in vitro* καλλιέργειες αποτελούν τεχνητά παρασκευασμένα ανάλογα της εξωκυττάριας μήτρας. Η βασική εφαρμογή τους ήταν στην αναγεννητική ιατρική αρχικώς ως φύλλα κολλαγόνου που τοποθετούνται σε πληγές και εγκαύματα με σκοπό να αναγεννηθεί ο προϋπάρχων ιστός χωρίς να σχηματιστεί ουλή [26][27]. Τα ικρίωματα προσφέρουν εύφορο περιβάλλον ανάπτυξης των κυττάρων και το να αποτελέσουν θεμέλιο παρόμοιο της εξωκυττάριας μήτρας ήταν το έναυσμα να προσαρμοστούν για χρήση σε διατάξεις *in vitro* εργαστηριακών μελετών.

Η δυνατότητα ακριβέστερης μοντελοποίησης των αλληλεπιδράσεων μεταξύ κυττάρων και στηρικτικού τους μηχανισμού παρέχει ακριβέστερα αποτελέσματα στα εργαστηριακά πειράματα σε σχέση με την *in vivo* κατάσταση, βελτιωμένη γνώση των κυτταρικών λειτουργιών και παρακολούθηση τους, αλλά φυσικά και περιστολή του κόστους των κλινικών δοκιμών αφού είναι δυνατόν ούσιες να απορρίπτονται από προκλινικά στάδια.

Ανεξάρτητα με την μέθοδο παρασκευής τους τα αναγκαία χαρακτηριστικά των αναλόγων της εξωκυττάριας μήτρας ώστε να διατηρούν συγκριτικό πλεονέκτημα έναντι των μονοστρωματικών καλλιεργειών είναι:

- Να είναι αρκετά πορώδη ώστε να υποστηρίζεται η κίνηση και μετανάστευση των κυττάρων μέσα τους, όπως επίσης και των θρεπτικών ουσιών που κάνουν δυνατή την επιβίωση της καλλιέργειας.
- Να αντιστέκονται στην αποικοδόμηση που υφίστανται από τα κύτταρα για ικανό χρόνο ώστε αυτά να αναπτυχθούν και να λειτουργήσουν υγιώς.
- Να είναι βιοσυμβατά και μη κυτταροτοξικά ως υλικό.
 - Κατά το δυνατόν να αποτελούνται από συστατικά που απαντώνται στην φυσική εξωκυττάρια μήτρα για ακόμη καλύτερη προσομοίωση
- Να έχουν ικανοποιητικό πάχος ώστε να υπάρχουν αρκετά στρώματα κυττάρων για πραγματικά τρισδιάστατο χαρακτήρα.

1.2 Πορώδη Ικρίωματα Κολλαγόνου

Περιγραφή και εφαρμογές

Τα πορώδη ικρίωματα κολλαγόνου εφαρμόστηκαν και αναπτύχθηκαν για εφαρμογές αναγεννητικής ιατρικής για θεραπεία σοβαρών τραυμάτων και εγκαυμάτων. Αποτελούνται από κολλαγόνο τύπου Ι, το κύριο συστατικό της δερμίδας, το οποίο σε συνδυασμό με την αρχική τους εφαρμογή τους έχει δώσει το προσωνύμιο “τεχνητό δέρμα”. Το κολλαγόνο τύπου Ι είναι και γενικά βασική πρωτεΐνη του συνδετικού ιστού και βρίσκεται σε αφθονία στην εξωκυττάρια μήτρα. Το γεγονός ότι πληρούνται οι προϋποθέσεις του υλικού και της βιοσυμβατότητας αναλόγου της εξωκυττάριας μήτρας κάνει τα πορώδη ικρίωματα να αποτελούν αντικείμενο μελετών για την ανάπλαση ιστών καθώς και *in vitro* κυτταρικών μελετών. [26][27]

Η εφαρμογή των πορώδων ικριωμάτων κολλαγόνου ως μέσο τρισδιάστατων κυτταροκαλλιιεργειών είναι πολλά υποσχόμενη αλλά όχι ευρέως διαδεδομένη. Η πορότητα τους επιτρέπει την μετακίνηση κυττάρων και θρεπτικού μέσου καθώς και την τρισδιάστατη πρόσδεση των κυττάρων στα στελέχη τους. Το γεγονός του ότι αποτελούνται κυρίως από κολλαγόνο – Ι , όπως και η φυσική εξωκυττάρια μήτρα, παρέχει στα κύτταρα ένα περιβάλλον αρκετά κοντά στο φυσικό ώστε αυτό να μεταφράζεται και σε φυσική λειτουργία και αλληλεπιδράσεις μεταξύ των. Η διαφορά με την ανάπτυξη των κυττάρων και τη μορφή που λαμβάνουν είναι εμφανής αν συγκριθεί με την καλλιέργεια σε πλάκες όπου προσκολλώνται μόνο από τη μία πλευρά και παραμένουν σε ένα επίπεδο.

Στο εργαστήριο Εμβιομηχανικής και Συστημικής Βιολογίας του Εθνικού Μετσόβιου

Πολυτεχνείου έχουν ήδη πραγματοποιηθεί μελέτες που αφορούν την καλλιέργεια κυττάρων σε πορώδη ικρίωματα κολλαγόνου τύπου Ι:

- 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 . [3]
- 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 . [4]

Υπάρχουν ωστόσο και ορισμένες δυσκολίες στην χρήση των πορώδων ικριωμάτων ως μέσο τρισδιάστατης κυτταροκαλλιέργειας, όπως και έχουν παρατηρηθεί και αναφερθεί στις ανωτέρω διπλωματικές:

- 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 πλάκες (96/384 well plates).
- Η παραμονή των περισσότερων κυττάρων κοντά στην πάνω και στην κάτω επιφάνεια των ικριωμάτων και η μη διεύδυση 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.
- Δυσκολίες στην αποκομιδή των αποτελεσμάτων σε σχέση με τις κλασσικές μεθόδους – είτε αυτό αποτελεί απεικόνιση / μικροσκοπία είτε λύση των κυττάρων για εξαγωγή ουσιών.

Λεπτά Ικρίωματα Κολλαγόνου

Κύριο αίτιο για τις ανωτέρω δυσκολίες αποτελεί το πάχος των ικριωμάτων που χρησιμοποιούνται στις μελέτες στη βιβλιογραφία. Λογικό επόμενο είναι η κατεύθυνση που ελήφθη ως αντίμετρο να είναι η παρασκευή λεπτών πορώδων ικριωμάτων κολλαγόνου (ΛΠΙΚ) τάξεως 100 με 200 μικρομέτρων - πάχος αρκούντως μικρό για να αμβλυνθούν οι περιορισμοί στη χρήση των αρχικών ικριωμάτων αλλά και αρκετό για να διατηρείται ο τρισδιάστατος χαρακτήρας της κυτταροκαλλιέργειας.

Στο εργαστήριο Εμβιομηχανικής και Συστημικής Βιολογίας του Εθνικού Μετσόβιου Πολυτεχνείου πραγματοποιήθηκε μια πρώτη ανάπτυξη μεθόδου παρασκευής ΛΠΙΚ με λυοφιλοποίηση και χαρακτηρισμού τους στα πλαίσια της διπλωματικής εργασίας της κ. Μαρίας Σαρκίρη *“Λεπτά Πορώδη Ικρίωματα Κολλαγόνου: Παρασκευή, Χαρακτηρισμός και Εφαρμογή στη Μελέτη Φαρμάκων”*.

• Πλεονεκτήματα

Αναφέρονται συνοπτικά τα πλεονεκτήματα των ΛΠΙΚ σε σχέση με τα προϋπάρχοντα:

- 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 κυτταροκαλλιέργειών μέσω μικροσκοπίας και μεθόδων προτεωμικής.
- Εύκολη χρήση, παρόμοια με τη γνωστή στους βιολόγους καλλιέργεια σε well-plates.
- Οικονομία υλικού λόγω του μικρότερου πάχους των συγκεκριμένων ικριωμάτων.

Παρόλα αυτά όμως υπάρχουν μειονεκτικά χαρακτηριστικά των ΛΠΙΚ, κυρίως όσον αφορά την ευαισθησία τους που επιβάλλει προσεκτικό χειρισμό και συγκεκριμένες μεθόδους χαρακτηρισμού που μπορούν να εφαρμοστούν.

• Τεχνολογική Στάθμη

Παραθέτονται μελέτες από τη βιβλιογραφία που περιγράφουν συναφείς μεθόδους παρασκευής για ικρίωματα μικρού πάχους:

- Ο Ke Cheng με την ερευνητική του ομάδα παρασκεύασε λεπτά ικρίωματα απευθείας μέσα σε 96-well-plates με τη μέθοδο των σωματιδίων βιοανθρακικού αμμωνίου. Τα ικρίωματα είχαν πάχος 150-300 μm και μέσο μέγεθος πόρου 60-80 μm. Μέσα σε αυτά καλλιεργήθηκαν νευρικά βλαστικά κύτταρα και μελετήθηκε η μορφολογία των κυττάρων στο τρισδιάστατο περιβάλλον καθώς και η αλληλεπίδραση τους με αυτό. [15]
- Σε μια άλλη προσέγγιση ο Marcin Jurga επέλεξε τη δημιουργία ικριωμάτων, πάχους 10 mm, με την μέθοδο Cryogelation. Μετά την παρασκευή, γίνεται κοπή των κυλίνδρων σε μικρότερα κυλινδρικά ικρίωματα 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 ικρίωματα. [14]

Σε αντιπαραβολή, η μέθοδος που αναπτύχθηκε αναπτύχθηκε στο Εργαστήριο Συστημικής Βιολογίας και Εμβιομηχανικής του ΕΜΠ (από τους Μ. Σαρκίρη και Δρ. Δ.Τζεράνη) [5] η κατασκευή των υλικών γίνεται μέσω λυοφιλοποίησης. Η μέθοδος αυτή επιτρέπει χρήση βιοϋλικών που απαντώνται στην εξωκυττάρια μήτρα όπως το κολλαγόνο I που είναι βιοσυμβατό και κατάλληλο για *In vitro* και *In vivo* μελέτες, λόγω της παρασκευής μέσω λυοφυσολοποίησης αντί για αυτήν των σωματιδίων του βιοανθρακικού αμμωνίου του Ke Cheng. Αντίστοιχα η παρασκευή αρχικά μεγάλου πάχους (10 mm) ικριωμάτων και έπειτα κοπής σε ΛΠΙΚ έχει δυσκολίες επαναληψιμότητας τόσο λόγω του ελέγχου μεταφοράς θερμότητας στην ψύξη της κρυογέλης όσο και της ακριβούς μετέπειτα κοπής.

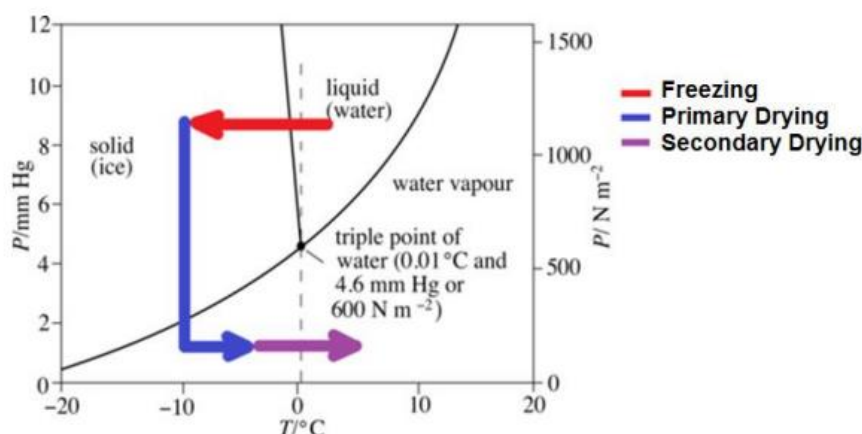
Η ανάπτυξη της μεθόδου παρασκευής επάνω σε επιφάνειες απεικόνισης (γυαλιά μικροσκοπίας) εξ αρχής λεπτών ικριωμάτων από διάφορα βιοσυμβατά βιοϋλικά με τη μέθοδο της λυοφιλοποίησης και ο έλεγχος της πορότητας αυτών μέσω παραμέτρων στα πρωτόκολλα προετοιμασίας και λυοφυλοποίησης όχι μόνο αποφεύγει δυσχερείς και δύσκολα επαναλήψιμες διαδικασίες όπως η κοπή του Jurga, αλλά ανοίγει και το δρόμο για μια τυποποιημένη και αυτοματοποιημένη διαδικασία. Αν θεωρηθεί πως είναι αναγκαίο ικρίσματα να παράγονται μαζικά και επαναλήψιμα για ευρεία χρήση, προσαρμοσμένα σε συσκευή αντίστοιχη με την 96άρα πλάκα που χρησιμοποιούν ήδη οι βιολόγοι, καθίσταται προφανής ο στόχος της παρούσας εργασίας.

Κατασκευή

Για την κατασκευή ΛΠΙΚ εφαρμόζονται δύο διαδικασίες που μετατρέπουν το αρχικά υγρό εναιώρημα του υλικού στο στερεό σπογγώδες ικρίωμα και του προσδίδουν τις φυσικές του ιδιότητες:

- **Λυοφιλοποίηση**

Ο όρος προέρχεται από τις λέξεις «λύω + φίλια» που σημαίνει «αγάπη προς το να διαλύομαι». Αποτελεί μέθοδο αφυδάτωσης, κατά την οποία το παγωμένο νερό που περιέχεται στο υλικό διέρχεται απευθείας από την στέρεα φάση στην αέρια. Αυτή ακριβώς η διαδικασία της κρυστάλλωσης του περιεχόμενου νερού στο εναιώρημα και η απομάκρυνση των κρυστάλλων κατά την εξάχνωση τους είναι που αφήνει κενό χώρο την θέση που καταλάμβαναν παράγει το πορώδες στερεό ικρίωμα. [6]



Εικόνα 4: Τα στάδια της λυοφιλοποίησης

- **Δημιουργία Σταυροδεσμών**

Την λυοφιλοποίηση ακολουθεί η διαδικασία της δημιουργίας σταυροδεσμών – cross linking. Επιλέχθηκε η μέθοδος αφυδροθερμικής διεργασίας (dehydrothermal treatment) λόγω της εκτεταμένης εφαρμογής της στην δημιουργία σταυροδεσμών στα ικρίσματα που χρησιμοποιούνται στην αναγεννητική ιατρική. Το γυαλί με τα ικρίσματα τοποθετείται σε ανοιχτό μεταλλικό δοχείο, το οποίο με τη σειρά του τοποθετείται σε ειδικό θάλαμο όπου επικρατεί θερμοκρασία 105 °C υπό κενό, με σκοπό τη δημιουργία σταυροδεσμών. Οι σταυροδεσμοί αυτοί προσφέρουν στα ικρίσματα περισσότερη στιβαρότητα και μηχανική ακαμψία αλλά και αποτελεσματικότερη αντίσταση στην αποικοδόμηση. Ο χρόνος έκθεσης στη συγκεκριμένη διεργασία ποικίλει και θεωρητικά αύξηση του προκαλεί αύξηση των σταυροδεσμών άρα και της αντοχής [28], υπάρχουν ωστόσο πρακτικά όρια καθώς μακρά έκθεση κάνει το υλικό υδρόφοβο και ακατάλληλο για καλλιέργειες καθώς είναι αδύνατον να το διαπεράσει επαρκώς το θρεπτικό μέσο. Η επίδραση του χρόνου έκθεσης και η επιλογή του βέλτιστου αποτελεί αντικείμενο επόμενου κεφαλαίου της εργασίας.

1.3 Εφαρμογές Κυτταρικών Μοντέλων στη Σύγχρονη Βιολογία

Βιολογία Συστημάτων

Η Βιολογία Συστημάτων είναι ένας τομέας που αφορά την ερμηνεία διάφορων βιολογικών συμβάντων χρησιμοποιώντας τη θεωρία των συστημάτων. Η μεγάλη διαφοροποίηση, διερευνώντας ένα βιολογικό συμβάν από τη σκοπιά της συστημικής βιολογίας, έγκειται στο ότι δεν έχουμε απλά μια συσχέτιση συμβάντων. Αντίθετα, με βάση τις πληροφορίες και τα δεδομένα που παράγονται, δομείται ολόκληρο το βιολογικό σύστημα. Στο σύστημα αυτό ελέγχεται η επικοινωνία μεταξύ των μερών καθώς και τα αποτελέσματα που έχει εν τέλει η ενεργοποίηση κάθε μέρους ξεχωριστά. Λόγω αυτής της θεώρησης των βιολογικών διεργασιών, πρόκειται περί ενός διατμηματικού τομέα επιστήμης καθώς η παραγωγή και η εκτίμηση των δεδομένων απαιτεί γνώσεις από το πεδίο της βιολογίας, των μαθηματικών, της φυσικής και της επιστήμης της πληροφορικής, καθώς και άλλους επιμέρους τομείς.

Η βιολογία συστημάτων χρησιμοποιεί μεθόδους υψηλής απόδοσης (high throughput) για να παραρχθεί ένας ικανός όγκος δεδομένων από πειράματα πρωτεωμικής (μελέτη πρωτεϊνών), γενομικής (μελέτη γενετικού υλικού) και απεικονίσεων (микροσκοπία), πολύ μεγαλύτερος σε σχέση με κλασσικών πειραμάτων. Τα δεδομένα αυτά έπειτα υπόκεινται σε μαθηματική επεξεργασία για να καταλήξουν στην περιγραφή των σηματοδοτικών μονοπατιών.[42]

Ανάπτυξη Φαρμάκων

Νέοι θεραπευτικοί χημικοί παράγοντες μπορούν να δοκιμαστούν γρήγορα και επιμελώς ώστε οι επιπτώσεις των πιθανών φαρμάκων που μπορούν να παραχθούν να αξιολογηθούν και να ταυτοποιηθούν οι μηχανισμοί δράσης τους. Πολλές διαφορετικές πτυχές μιας υποψήφιας νέας ουσίας μπορούν να αξιολογηθούν μέσω κυτταροκαλλιέργειών. Σχετικά με αυτή την προσπάθεια είναι τα καλλιεργούμενα κύτταρα που αναπαριστούν μια κατάσταση ασθένειας και αυτά που επιδεικνύουν συναφείς γενετικές και βιοχημικές ανωμαλίες, όπως και αλλαγές σε υποδοχείς, κανάλια ιόντων και σηματοδοτικά μονοπάτια των υποδοχέων. Είναι αυτές οι πτυχές των κυττάρων καλλιέργειας που δίνουν σημαντικές πληροφορίες για την υποτιθέμενη χρησιμότητα ενός θεραπευτικού παράγοντα σε τέτοιου τύπου παθολογίες. Όποιο σήμα κατατεθέν κατάστασης ασθένειας εκδηλώνεται *in vitro* δίνει τη δυνατότητα αξιολόγησης τρόπων άμβυλνσης των ανωμαλιών όταν ουσίες ενδιαφέροντος δοκιμάζονται στο σύστημα των καλλιεργούμενων κυττάρων.

Ίδιας ή και μεγαλύτερης σημασίας είναι η ευκαιρία που δίνουν οι κυτταροκαλλιέργειες να αξιολογηθούν όχι μόνο οι θετικές επιπτώσεις των νέων ουσιών, αλλά και τα προφίλ τοξικότητας στους ιστούς που εξετάζονται. Αλλαγές κατάστασης στις κυτταροκαλλιέργειες που, αν αναγνωριστούν, θα οδηγούσαν σε προφανείς αρνητικές συνέπειες για όλο τον οργανισμό δίνουν πληροφορία που μπορεί να αποτρέψει ένα φάρμακο από το να περάσει στο στάδιο των κλινικών δοκιμών σε ζώα ή σε ανθρώπους, αν φυσικά έχουν τεθεί σαφείς παράμετροι επιτρεπόμενης τοξικότητας. Το καλύτερο παράδειγμα αυτού του τύπου αξιολόγησης ουσιών αποτελεί ο τομέας αξιολόγησης ουσιών που δρουν σε νευρικούς ιστούς. Για νέες ουσίες που χρησιμοποιούνται για θεραπεία ασθενειών του κεντρικού νευρικού συστήματος είναι υψίστης σημασίας να είναι γνωστές οι επιπτώσεις τους στον εγκέφαλο. Ουσίες που έχουν επιδείξει χρησιμότητα σε άλλες καταστάσεις ασθένειας (π.χ. αντικαρκινικά) που κανονικά δεν χρησιμοποιούνται για δράση στον εγκέφαλο, έχουν τη δυνατότητα να αξιολογηθούν για πιθανή νευροτοξικότητα για την πιθανότητα χρήσης τους και σε αυτό τον τομέα. Φυσικά τη δυνατότητα αυτή τη δίνει η αξιολόγηση των επιπτώσεων των ουσιών σε καλλιέργειες νευρικών κυττάρων.

Καθώς είναι δυνατή η μελέτη των ιστών σε μια πλειάδα ζώων, συμπεριλαμβανωμένων των ανθρώπων, η ευελιξία της αξιολόγησης του πως το υποψήφιο φάρμακο θα επηρεάσει το σύστημα που στοχεύει *in vitro* δίνει μεγάλο πλεονέκτημα στα αρχικά στάδια της διαλογής νέων ουσιών. Προφανώς αποφεύγονται και τα ηθικά ζητήματα που εμφανίζονται, π.χ. δοκιμές σε ανθρώπους και ζώα μπορού να αποφευχθούν μέσω τις

αρχικής αξιολόγησης σε καλλιέργειες. Γενικά η χρήση του εργαλείου της κυτταροκαλλιέργειας βοηθά να ξεπεραστούν πολλά εμπόδια στην διαδικασία διαλογής και ανάπτυξης φαρμακευτικών ουσιών. [43]

Μοντέλα Ασθενειών

Τα μαθηματικά μοντέλα ασθενειών που εξάγονται από τα πειραματικά αποτελέσματα στη συστημική βιολογία αποτελούν μέσο ανάλυσης των βιοχημικών μηχανισμών των κανονικών φαινοτύπων κυττάρων και των κυτταρικών διαδικασιών που διαταράσσονται κατά τις καταστάσεις ασθένειας. Ειδικά σε περίπλοκες, πολυγενείς ασθένειες οι κυτταρικές μελέτες οδηγούν σε μεγαλύτερη κατανόηση της ασθένειας και στοχευμένες προσεγγίσεις για εύρεση θεραπείας. [43]

1.4 Στόχοι της διπλωματικής

Οι προκλήσεις που εμφανίζονται κατά την καλλιέργεια και μελέτη κυττάρων μέσα σε πορώδη ικρίωματα πάχους μερικών χιλιοστών οδήγησαν στην ανάπτυξη λεπών πορώδων 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. Με βάση την μελέτη και την ανάπτυξη των αρχικών πρωτοκόλλων παρασκευής των ικριωμάτων και των πρώιμων συσκευών ALS-on-a-chip στα πλαίσια της διπλωματικής εργασίας της κ. Μαρίας Σαρκίρη, η παρούσα μελέτη σκοπό της έχει να αναπτύξει διαδικασίες αυτοματοποίησης της κατασκευής συστοιχιών (arrays) από ΛΠΙΚ πάνω σε κομμάτια καλυπτρίδων, διαστάσεων αντιστοίχων των πλακών 96 βοθρίων. Τέτοιες συστοιχίες ΛΠΙΚ θα παρέχουν ένα εύχρηστο μέσο *in vitro* μελετών σε κυτταροκαλλιέργειες που θα προάγει την *in vitro* βιοϊατρική έρευνα. Η αυτοματοποίηση της διαδικασίας θα παρέχει συστοιχίες ΛΠΙΚ με επαναλήψιμα χαρακτηριστικά ελάχιστη ανθρώπινη παρέμβαση άρα και σφάλμα. Τελικός σκοπός είναι ένα προϊόν ευρείας χρήσης ανταγωνιστικό έναντι στις παραδοσιακές μονοστρωματικές καλλιέργειες πλάκας.

Για την επίτευξη αυτού του σκοπού η εργασία αυτή εστιάστηκε σε τρεις στόχους:

Βελτίωση Ακρίβειας και επαναληψιμότητας

Έγινε προσπάθεια για κατανόηση, χαρακτηρισμό, βελτιστοποίηση, και αυτοματοποίηση όσο το δυνατόν περισσότερων βημάτων κατασκευής των συστοιχιών ΛΠΙΚ:

- Χρήση της ρομποτικής διάταξης διαχείρισης ρευστών TECAN για την εναπόθεση του εναιωρήματος με ακρίβεια τοποθέτησης και όγκου εναπόθεσης ανώτερης της χειροκίνητης πιπέτας.
- Κατανόηση και βελτιστοποίηση της διαδικασίας επιφανειακής κατεργασίας πλάσματος.
- Κατανόηση και βελτιστοποίηση της διαδικασίας λυοφιλοποίησης.
- Κατανόηση και βελτιστοποίηση της διαδικασίας δημιουργίας σταυροδεσμών.
- Κατανόηση και βελτιστοποίηση της διαδικασίας παρασκευής υπερκατασκευών ελαστομερούς PDMS για τις συσκευές.

Δημιουργία Βιβλιοθηκών Υλικών

Εξετάζεται η απόδοση διαφόρων βιοσυμβατών υλικών όσον αφορά την ποιότητα του τελικού ικριώματος, την επιτυχία του ως μέσο καλλιέργειας με χρήση σε βιολογικά πειράματα και την ποιότητα εικόνων κατά την απεικόνιση.

Σκοπός είναι να υπάρχει ένας κατάλογος ΛΠΙΚ διαφορετικών προδιαγραφών ώστε να κατασκευάζεται ανάλογα με τις ανάγκες της βιολογικής εφαρμογής η κάθε συσκευή.

Δημιουργία Συστοιχιών Λεπτών Πορώδων Ικτριωμάτων σε Μορφοποίηση Πλάκας

Τελικός σκοπός είναι η παρασκευή συστοιχιών ΛΠΙΚ σε μορφοποίηση πλάκας ώστε να ικανοποιούν τις εργονομικές απαιτήσεις του βιολόγου/ χρήστη. Η πλάκα 96 βοθρίων αποτελεί εργαλείο γνωστό σε κάθε χρήστη και -κυρίως- κεντρικό σημείο σχεδίασης κάθε μηχανήματος μέτρησης και απεικόνισης στον τομέα. Η μορφοποίηση της συσκευής κατά αυτό το πρότυπο συνεπάγεται απουσία ανάγκης επανεκπαίδευσης των χρηστών και προσαρμογής οποιού μηχανήματος, που είναι και το ανταγωνιστικό πλεονέκτημα του τελικού προϊόντος προς παραγωγή και ένας τρόπος να προωθηθεί το σύνολο του τομέα συστημικής βιολογίας από τις μονοστρωματικές στις τρισδιάστατες καλλιέργειες.

Για τον σκοπό αυτό:

- Κατασκευάζεται ιδιοσυσκευή προσαρμογής των παραγόμενων συστοιχιών ΛΠΙΚ ώστε να αποτελούν στο σύνολο τους ανάλογο της 96άρας πλάκας και να συνεργάζονται με μετρητικά όργανα και όργανα απεικόνισης.
- Κατασκευάζονται κατάλληλα καλούπια για να παραχθούν οι υπερκατασκευές από PDMS που συντελούν στην κατασκευή αυτών των συσκευών.

Κεφάλαιο 2: Σχεδιασμός Συσκευών με Συστοιχίες Λεπτών Πορώδων Ικριωμάτων

2.1 Περιεχόμενα

Στο κεφάλαιο αυτό περιγράφεται ο σχεδιασμός των συσκευών συστοιχιών λεπτών πορώδων ικριωμάτων καθώς και της βάσης στήριξης τους, σύμφωνα με τις προδιαγραφές που τέθηκαν για ένα σύστημα κυτταροκαλλιέργειας που θα επιτρέπει εκτέλεση πολλών βιολογικών πειραμάτων μέσα σε λεπτά πορώδη ικρίωματα κολλαγόνου (ΛΠΙΚ).

2.2 Περιγραφή του προβλήματος

Δύο κύρια σημεία πρέπει να ληφθούν υπόψη στην χρήση ΛΠΙΚ για βιολογικά πειράματα:

1. Η ευκολία χρήσης τους από τους πιθανούς χρήστες (κυρίως βιολόγοι και ερευνητές) κατά την εκτέλεση πειραμάτων.
2. Η δυνατότητες εξαγωγής αποτελεσμάτων μέσω απεικόνισης των καλλιεργειών με μικροσκοπία ή μέσω μετρήσεων πρωτεομικής ή γενιμικής

Ένας βιολόγος έχει εκπαιδευτεί και διαθέτει εργαλεία ώστε να χειρίζεται καλλιέργειες σε πλάκες πολλών βοθρίων (6, 12, 24, 96, 384 βοθρία) όσον αφορά τις θέσεις και τον τρόπο που χειρίζεται τα ρευστά (θρεπτικό μέσο, χρωστικές κλπ) και τους όγκους αυτών. Χρειάζεται δηλαδή μια διάταξη που ανταποκρίνεται όμοια στον κλασικό χειρισμό με διαφορά ότι στον πυθμένα του βοθρίου υπάρχει ένα ΛΠΙΚ.

Αντίστοιχα τα περισσότερα μετρητικά όργανα, όπως το μικροσκόπιο Juli stage ή το μετρητικό Varioscanner που διαθέτει το Εργαστήριο Συστημικής Βιολογίας του ΕΜΠ, συνεργάζονται με τις ίδιες τις πλάκες που εφαρμόζουν στους ΧΥ φορείς τους ώστε να προσεγγίζεται το ανάλογο βοθρίο κάθε φορά από το μετρητικό όργανο.

2.3 Κατασκευαστικές Προδιαγραφές

Ζητείται ο σχεδιασμός μιας συσκευής για κυτταροκαλλιέργεια που αποτελείται από μια συστοιχία ΛΠΙΚ σε διαμόρφωση πλάκας 96 βοθρίων με δυνατότητες απεικόνισης και συνεργασίας με μετρητικά όργανα που συνεργάζονται με 96άρες πλάκες (π.χ. Juli Stage).

Οι βασικές προδιαγραφές της συσκευής αυτής είναι:

- Παρασκευή λεπτών πορώδων ικριωμάτων (ΛΠΙΚ) κατάλληλων για κυτταροκαλλιέργεια και απεικόνιση:
 - ο Χημική σύσταση από βιοσυμβατά μη κυτταροτοξικά υλικά, κυρίως με βάση το κολλαγόνο τύπου I
 - ο Πάχος ΛΠΙΚ 100-200 μm
 - ο Ελεγχόμενο μέσο μέγεθος πόρων ΛΠΙΚ άνω των 25 μm (επιθυμητό 50 μm)
 - ο Ομοιογένεια πόρων σε όλο τον όγκο κάθε ΛΠΙΚ
 - ο Αντοχή των ΛΠΙΚ στα ένζυμα αποδόμησης που εκκρίνουν τα κύτταρα κατά την καλλιέργεια διάρκειας τουλάχιστον 14 ημερών
- Καλλιέργεια κυττάρων μέσα σε κάθε ΛΠΙΚ με τρόπο που να προσομοιώνει την πράξη της καλλιέργειας σε πλάκες 96 βοθρίων
 - ο Παροχή θρεπτικού τουλάχιστον 150 μl .
 - ο Κυκλικό βοθρίο και ικρίωμα διαμέτρου 6 mm
 - ο Σύνδεση υπερκατασκευής PDMS με την καλυπτρίδα που φέρει τα ΛΠΙΚ ώστε να δημιουργηθούν τα ανάλογα βοθρία που στον πυθμένα τους βρίσκεται το ΛΠΙΚ.

- Στεγανότητα μετά τη σύνδεση PDMS με καλυπτρίδα
 - Επίπεδη κάτω επιφάνεια PDMS
 - Καλός πολυμερισμός
 - Επαρκής κατεργασία πλάσματος
- Διαμόρφωση στις διαστάσεις 96άρας πλάκας με δυνατότητες απεικόνισης
 - Κατασκευή προσαρμογέα φορέα καλυπτρίδων με τις γενικές διαστάσεις 96 πλάκας και προσαρμοσμένο για τοποθέτηση στην επιφάνεια εργασίας του TECAN, του JuLi Stage και του Varioscanner ή όποιας άλλης μετρητικής διάταξης συνεργάζεται με 96άρες πλάκες
 - Κατά το δυνατόν καλύτερη προσέγγιση του από αντικειμενικούς φακούς μικροσκοπίας υψηλής μεγένθυσης.
- Εύκολη ποσοτικοποίηση των ΛΠΙΚ μέσω πρωτεομικής και μέσω μικροσκοπίας υψηλής ανάλυσης
- Αυτοματοποίηση διαδικασιών:
 - Επαναληψιμότητα διαδικασιών
 - Ευκολία κατασκευής συσκευών/αναπαραγωγής διαδικασιών
- Ικανοποίηση εργονομικών απαιτήσεων βιολόγου χρήστη για την τελική συσκευή

Περιορισμοί που έχουν τεθεί είναι:

- Οι διαστάσεις τις 96άρας πλάκας
 - Συνολικό μέγεθος συσκευής άρα και τρόποι συναρμολόγησής της
 - Περιορισμοί διαστάσεων υπερκατασκευής PDMS για συνεργασία της με την βάση συσκευών
 - Προσέγγιση φακών μικροσκοπίας σε συγκεκριμένα βοθρία (υπάρχει και στις κανονικές πλάκες)
- Εύκολη παραγωγή – ελαχιστοποίηση κατεργασιών
 - Κυρίως χρήση του laser cutter και φύλλων PMMA
 - * Αυτό περιορίζει και τις δυνατότητες κατασκευής καλουπιών χύτευσης PDMS

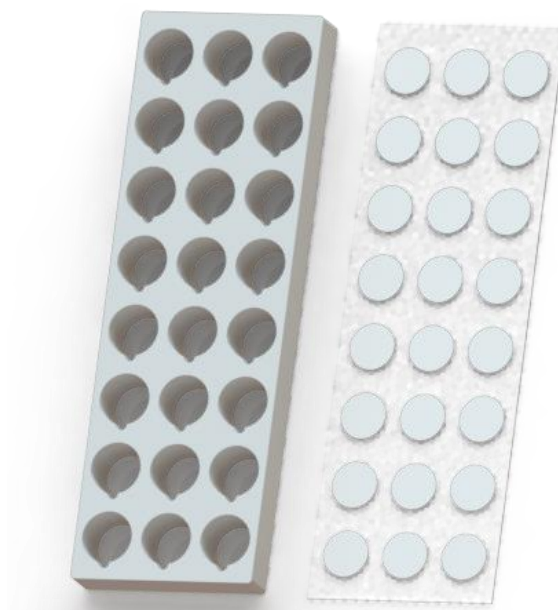
2.4 Εννοιολογικός Σχεδιασμός

Η ανάπτυξη της γενικής στρατηγικής προσέγγισης του προβλήματος που έχει τεθεί ξεκινά από τον πιο ανελαστικό περιορισμό που καθορίζει τη μορφή της βάσης:

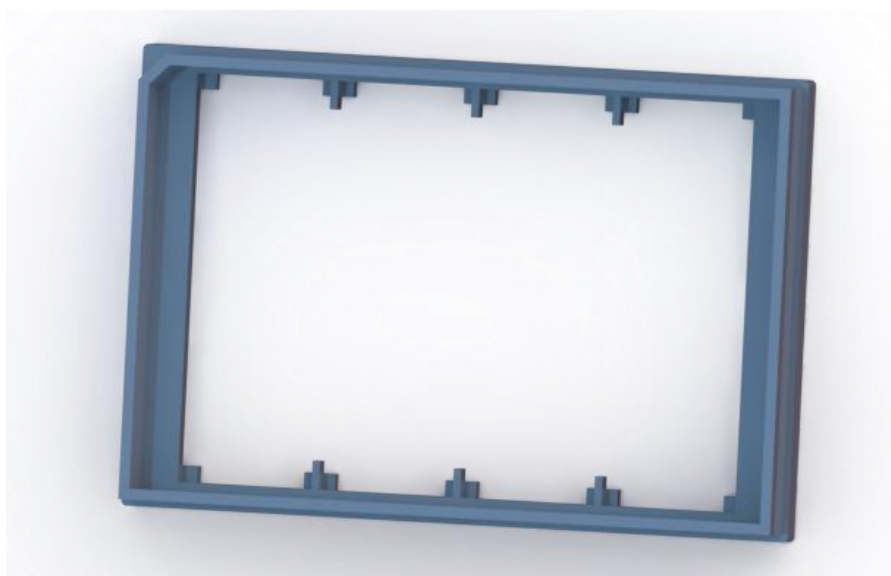
- Χρειάζεται μια βάση σε μορφή 96άρας πλάκας που φέρει τις συσκευές λεπτών πορώδων ικριωμάτων. Πρέπει να είναι ικανή να συγκρατεί τις συσκευές ώστε:
 1. Να διατηρούν τα βοθρία την σωστή θέση στο επίπεδο.
 2. Να προσεγγίζεται η καλυπτρίδα από φακό μικροσκοπίας.
 3. Να συνεργάζονται με τα καπάκια των πλακών του εμπορίου που διατίθενται.
 4. Να χωρούν στα μετρητικά και καθ ύψος.

Συνεπώς υπάρχουν αντικρουόμενες απαιτήσεις γενικών διαστάσεων της βάσης και στερέωσης των συσκευών. Ο περιορισμένος χώρος κάνει αδύνατες παραδοσιακές λύσεις στερέωσης καλυπτρίδων μικροσκοπίας, όπως μεταλλικές λάμες με κοχλίες. Ανάλογα με το κόστος και τις κατασκευαστικές δυνατότητες μπορούν να επιλεγούν διαφορετικά υλικά, κάτι που αλλάζει όμως τον τρόπο συναρμολόγησης της βάσης.

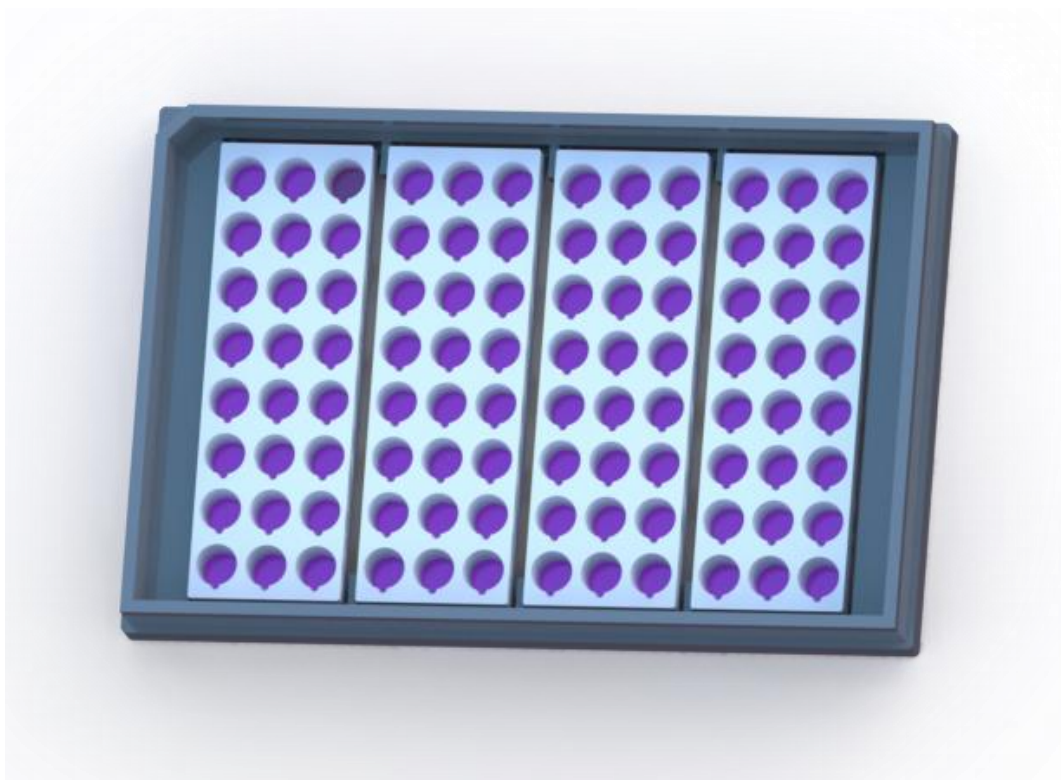
- Χρειάζεται συσκευές συστοιχιών ΛΠΙΚ που αποτελούνται από:
 1. **Καλυπτρίδες μικροσκοπίας** με συγκεκριμένες διαστάσεις 72 X 25 X 0.17 mm . Αυτές δίνουν τη δυνατότητα απεικόνισης αφού φέρουν τα ικριώματα επιφάνεια που χρησιμοποιείται συνήθως σε εφαρμογές απεικόνισης.
 2. **Λεπτά Πορώδη Ικριώματα**, κατασκευασμένα ώστε να πληρούν τις προδιαγραφές. Για το σκοπό αυτό αναπτύσσονται τα πρωτόκολλα εναπόθεσης, λυοφιλοποίησης και δημιουργίας σταυροδεσμών.
 3. **Υπερκατασκευή PDMS** ώστε να δημιουργείται το βοθρίο για να συγκρατεί τα ρευστά της καλλιέργειας. Το PDMS είναι υλικό αδρανές και χρησιμοποιείται συχνά στις εφαρμογές βιολογικών πειραμάτων αφού δεν επηρεάζει τα κύτταρα. Η παρασκευή του γενικά δεν είναι δύσκολη, αλλά υπάρχει ανάγκη σχεδιασμού καλουπιών και πρωτοκόλου κατεργασίας ώστε η κόλληση του με τις καλυπτρίδες να είναι επαναλήψιμη.



Εικόνα 5: Καλυπτρίδα 75*25, φέρουσα 24 ΛΠΙΚ (δεξιά) και υπερκατασκευή από PDMS (αριστερά). Μετά την σύνδεση τους αποτελούν τη συσκευή καλλιέργειας.



Εικόνα 6: Βάση Συσκευών



Εικόνα 7: Βάση με τοποθετημένες τις 4 συσκευές ΛΠΙΚ – Ανάλογο 96άρας πλάκας

2.5 Λεπτομερής Σχεδιασμός

Ακολουθεί πιο λεπτομερειακά η διαδικασία των σχεδιαστικών επιλογών. Τα αναλυτικά κατασκευαστικά σχέδια βρίσκονται στο παράρτημα Δ.

2.5.1 Βάση Συσκευών

- **Προδιαγραφές**

1. Ορισμός θέσης ΧΥ τεσσάρων συσκευών συστοιχιών ΛΠΙΚ
2. Εύκολη τοποθέτηση και ανάκτηση των συσκευών.
3. Ορισμός θέσης των συσκευών στο ίδιο επίπεδο Z για εύκολη εστίαση σε όλα τα ΛΠΙΚ κατά την μικροσκοπία.
4. Μεγιστοποίηση του αριθμού των βοθρίων που μπορεί να προσεγγίζει αντικειμενικός φακός μεγάλης μεγένθυσης.
5. Δυνατότητα αποστείρωσης της βάσης.
6. Διατήρηση της στεριότητας των καλλιεργειών κατά την απεικόνιση.

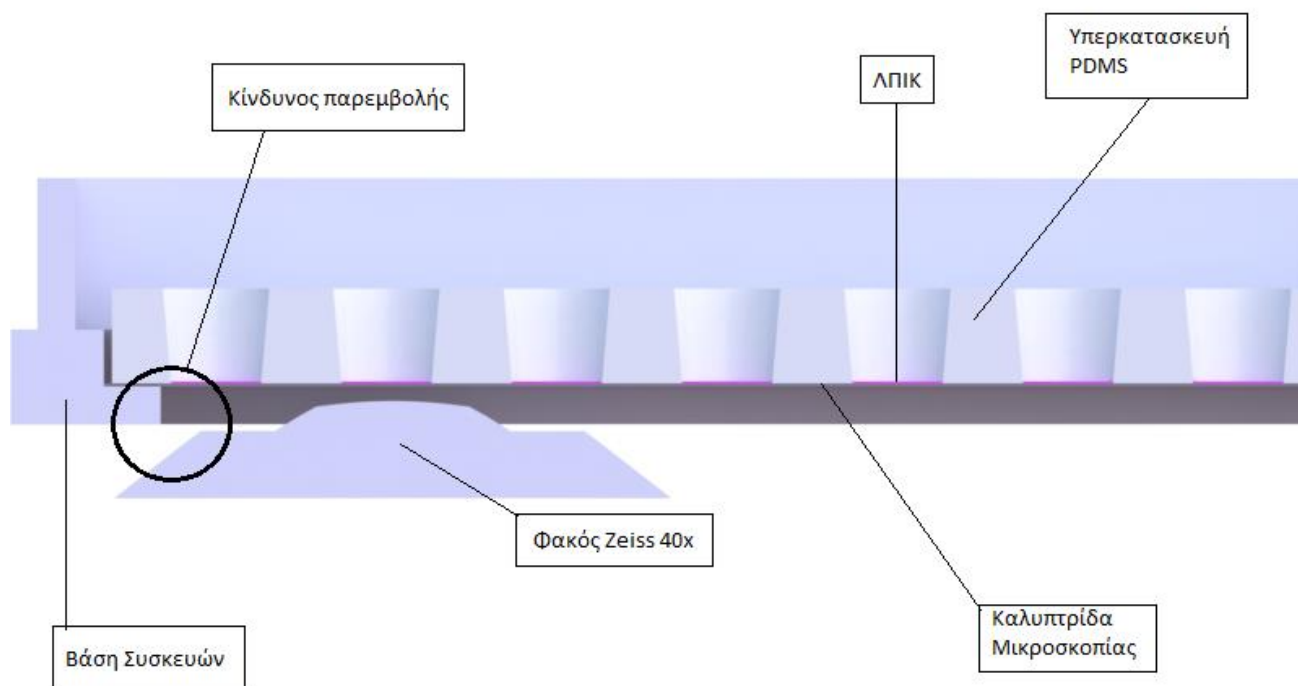
- **Υλοποίηση**

Κατασκευάζονται σχισμές όπου τοποθετούνται οι καλυπτρίδες σε θέσεις ώστε να αντιστοιχούν τα βοθρία των συσκευών σε αυτά μια πλάκας, με κατάλληλες ανοχές στην κατασκευή των σχισμών για ελεύθερη συναρμογή με τις συσκευές. Οι συσκευές συγκρατούνται κατά Z με τη βαρύτητα. Τίθενται σε ειδικές προεξοχές/πατούρες ώστε να στηρίζονται στις γωνίες τους. Για να μην συγκρουστεί ο φακός, που προσεγγίζει τη βάση από κάτω, με την προεξοχή όπου στηρίζονται οι συσκευές, αυτή κατασκευάζεται κατά το δυνατόν μικρή σε διαστάσεις.

Η βάση κατασκευάζεται από υλικό που μπορεί να καθαριστεί με αιθανόλη, ισοπροπανόλη και να αφεθεί σε ακτινοβολία UV – στην περίπτωσή μας το χυτό PMMA επαρκεί. Συνεργάζεται με καπάκια των πλακών του εμπορίου.

- **Ανάλυση**

1. Μετρώνται οι κατάλληλες διαστάσεις από τον άξονα συμμετρίας της βάσης ώστε οι άξονες συμμετρίας των ορθογωνίων που αποτελούν την κάτοψη των συσκευών να βρίσκονται στη σωστή θέση για την αντιστοιχία βοθρίων.
2. Για την ευκολότερη τοποθέτηση επιλέγονται ανοχές σχετικά μεγάλες στις διαστάσεις των σχισμών για να προληφθεί αδυναμία συναρμογής τόσο λόγω των διαστάσεων των καλυπτρίδων όσο και λόγω της υπερκατασκευής PDMS.
3. Η βαρύτητα επαρκεί για τις εφαρμογές που σχεδιάζεται η συσκευή. Δεν υπάρχει φόρτιση ή ανατροπή ούτε από τον χρήστη ούτε από τα μετρητικά όργανα, σύμφωνα με τις συστάσεις που ελήφθησαν από βιολόγο ερευνητή.
4. Με τη χρήση CAD σχεδιάστηκε μοντέλο του φακού με τις μεγαλύτερες διαστάσεις στις εφαρμογές (**Objective C-Apochromat 40x/1.2 W Corr M27**) [s5] και κατασκευάστηκαν προεξοχές ώστε να στηρίζουν τις γωνίες των συσκευών από το λεπτότερο φύλλο PMMA που διατίθεται. Αποτέλεσμα να αδυνατούν να προσεγγιστούν μόνο 4 βοθρία – 1 σε κάθε γωνία της συσκευής (Εικόνα 8). Λοιποί φακοί που παρέχουν μεγαλύτερες ανοχές, όπως αυτοί που διαθέτει το μικροσκόπιο του εργαστηρίου συνεργάζονται χωρίς κανένα πρόβλημα.
5. Το PMMA δεν επηρεάζεται από την ακτινοβολία UV και δεν παρέχει δυνατότητα ανάπτυξης μολύνσεων, αλλά πρέπει να είναι χυτό αλλιώς καταστρέφεται από καθαρισμό με αιθανόλη κ ισοπροπανόλη.
6. Κατασκευάστηκε κατάλληλη διαμόρφωση ώστε να τοποθετείται καπάκι πλάκας του εμπορίου με τον ίδιο τρόπο που γίνεται στις κοινές πλάκες και φυσικά με το συνολικό ύψος της βάσης να μένει ίδιο.

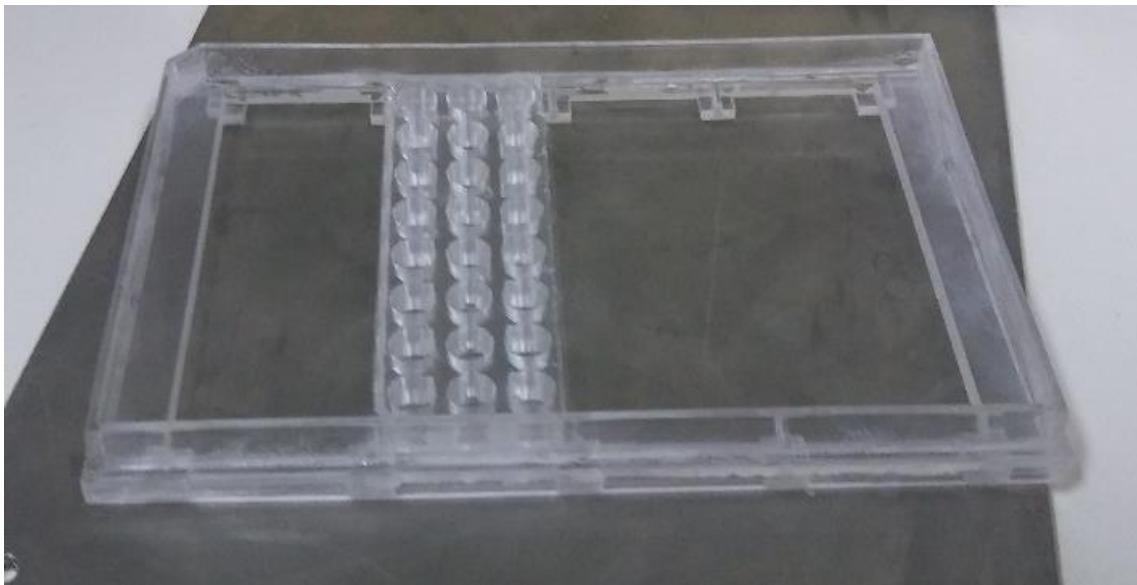


Εικόνα 8: Έλεγχος προσέγγισης φακού μεγάλης μεγένθυσης

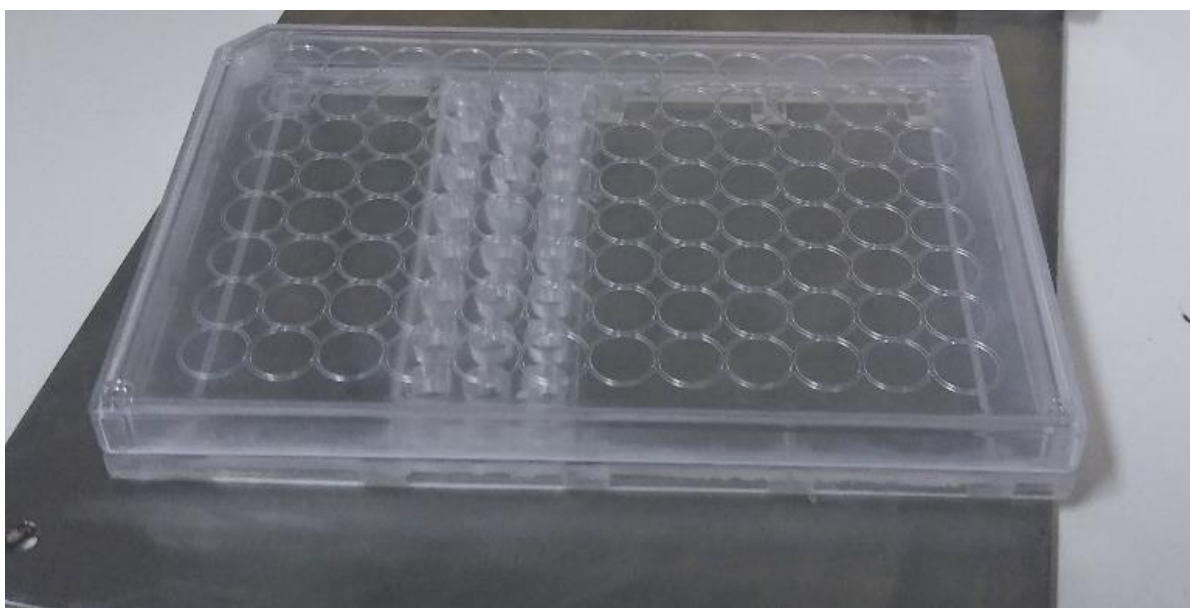
Υπενθυμίζεται ότι η ανάλυση που έχει γίνει για τον φακό Zeiss 40x Water Immersed είναι το χειρότερο σενάριο, καθώς οι περισσότεροι φακοί σε εφαρμογές High Content Screening έχουν μικρότερες μεγενθύνσεις (20x), μεγαλύτερη απόσταση λειτουργίας (Working Distance 5-10 mm – Zeiss 40x: 0.28 mm) και μικρότερες γενικές διαστάσεις. [s5]

Ρίσκα	Αντίμετρα
Λανθασμένη θέση των σχισμών λόγω κατασκευαστικών αδυναμιών του κόπτη Laser και της συναρμολόγησης της βάσης κατά στρώματα.	Γνώση της ακρίβειας του κόπτη Laser και σχεδιασμός που προλαμβάνει το πρόβλημα. Μπορεί επίσης η παραγόμενη κωνική κοπή να χρησιμοποιηθεί υπέρ του να ικανοποιηθούν οι προδιαγραφές.
Κατασκευαστικές ανοχές είτε μικρότερες από το σχεδιασμένο (αδυναμία συναρμογής) είτε μεγαλύτερες (κακή αντιστοιχία βοθρίων) λόγω κατασκευαστικού σφάλματος.	Όπως και με το αντιμετρο 1 επιλέγεται αρκετά μεγάλη ανοχή, την οποία και αντισταθμίζει το γεγονός ότι οι συσκευές τοποθετούνται κατά κέντρο συμμετρίας. Αυτό παράγει μια μόνιμη ανακρίβεια αλλά σε έυρος πάντα μισή από την διαφορά κατασκευαστικών με ονομαστικών διαστάσεων. Είναι ένας συμβιβασμός που κρατά το σφάλμα αντιστοιχίας βοθρίων σε επίπεδα που δεν επηρεάζουν τις μετρητικές διατάξεις.
Καμπύλωση της συναρμολογημένης κατασκευής ή μη επίπεδη επιφάνεια από το αρχικό φύλλο υλικού.	Επιλογή αρχικού υλικού με επαρκή επιπεδότητα και συναρμολόγηση με κόλληση για να αποφευχθούν τα φορτία που εισάγει η χρήση κοχλιών.
Καταστροφή / κακή ποιότητα κατασκευής πατούρας λόγω μικρών διαστάσεων. Αδυναμία στήριξης συσκευών με αποτέλεσμα να πέσουν αυτές μέσα από τη σχισμή.	Πρέπει να χρησιμοποιηθεί η γνώση των δυνατοτήτων του κόπτη Laser και οι κατασκευές που μπορεί να παράγει από το λεπτότερο διαθέσιμο φύλλο PMMA (2 mm). Η στήριξη σε 4 σημεία σε συνδυασμό με τις δεδομένες ανοχές εμποδίζει φυσικά την απώλεια της συσκευής.
Καταστροφή ή φθορά του υλικού κατα την κατασκευή, συναρμολόγηση, πλύση.	Πρέπει να χρησιμοποιηθεί χυτό PMMA για να αντέχει στις πλύσεις. Η συναρμολόγηση να γίνει με κόλληση και όχι με κοχλίες καθώς αυτοί εισάγουν φορτία – παραμόρφωση και ρωγμές λόγω διάνοιξης οπών η/και σπειρωμάτων που μπορεί οι πλύσεις με αιθανόλη να διογκώσουν.
Κακή κατασκευαστική ποιότητα μπορεί να οδηγήσει είτε σε ύπαρξη κενών που δίνουν τη δυνατότητα σε διάδοση μολύνσεων είτε απλώς σε λανθασμένες τελικές διαστάσεις και αδυναμία συνεργασίας με μετρητικά.	Για την κατασκευή διαμόρφωσης που δίνει τη δυνατότητα να χρησιμοποιηθεί καπάκι πρέπει να ακολουθηθούν πιστά στις διαστάσεις των πλακών του εμπορίου και να ευθυγραμμιστεί προσεκτικά κατά ΧΥ κατά την κόλληση με την βάση.

Πίνακας 1: Ρίσκα και αντιμέτρα αυτών για την σχεδιαστική προσέγγιση που ακολουθείται στη βάση συσκευών



Εικόνα 9: Βάση συσκευών με τοποθετημένη τη συσκευή στη θέση 2.



Εικόνα 10: Βάση συσκευών με τοποθετημένη τη συσκευή στη θέση 2, σφραγισμένη με καπάκι 96άρας πλάκας της Corning.

2.5.2 Συσκευή συστοιχιών ΛΠΙΚ

• Προδιαγραφές

1. Δυνατότητες απεικόνισης των καλλιεργιών
2. Αντιστοιχία με το 1/4 μιας 96άρας πλάκας – 4 συσκευές απαρτίζουν μια πλάκα
 - Αντιστοιχία θέσεων βοθρίων κατά ΧΥ.
3. Συνεργασία με τη βάση που κατασκευάζεται ώστε να απαρτίζουν μια πλάκα.
4. Διαχείριση 150 μ l ρευστού σε κάθε βοθρίο.
5. Στεγανότητα μεταξύ βοθρίων και περιβάλλοντος.

• Υλοποίηση

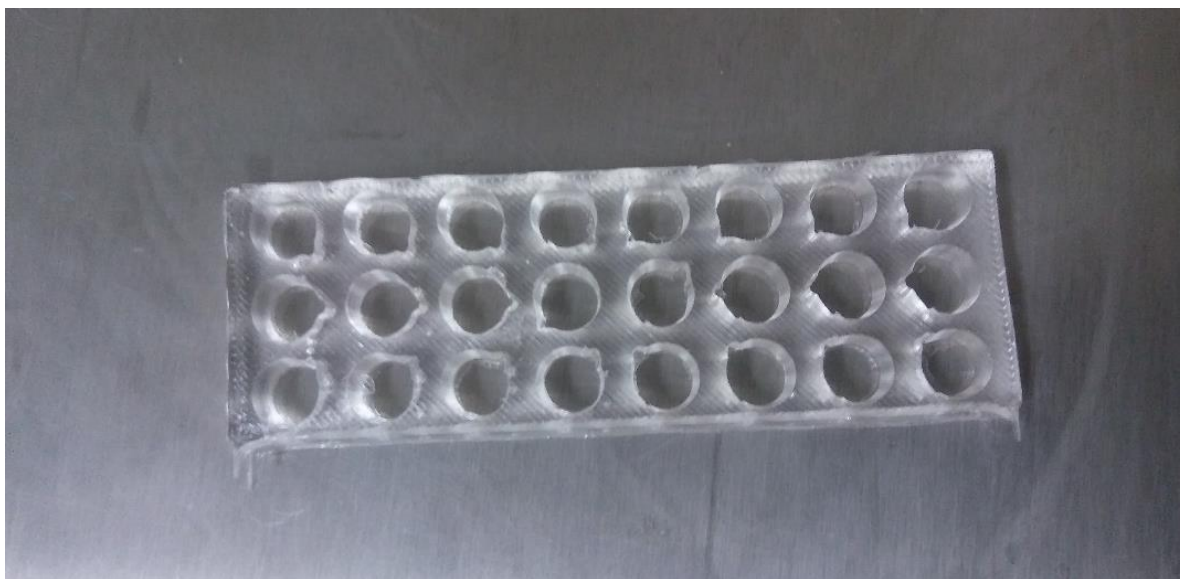
Χρησιμοποιούνται καλυπτρίδες μικροσκοπίας 25 X 75 X 0.17 mm ως βασικό στοιχείο των συσκευών. Πρέπει ενώ είναι τοποθετημένες οι συσκευές στη βάση τα βοθρία να βρίσκονται στις αντίστοιχες θέσεις μιας 96άρας πλάκας. Δηλαδή κάθε συσκευή φέρει συστοιχία 3 σειρών X 8 στηλών βοθρίων με αποστάσεις του κέντρου του καθενός 9mm από το διπλανό του. Πρέπει και οι διαστάσεις της υπερκατασκευής PDMS να συμμορφώνονται με τις κατασκευαστικές ανοχές καλυπτρίδων και βάσης. Για διάμετρο ικριώματος/βοθρίου 6mm χρειάζεται η υπερκατασκευή PDMS να είναι τουλάχιστον 5 mm σε ύψος. Η κόλληση της επιφάνειας της καλυπτρίδας με την υπερκατασκευή PDMS μετά από ενεργοποίηση τους με κατεργασία πλάσματος αν είναι αρκετά ισχυρή παρέχει την απαραίτητη στεγανότητα.

• Ανάλυση

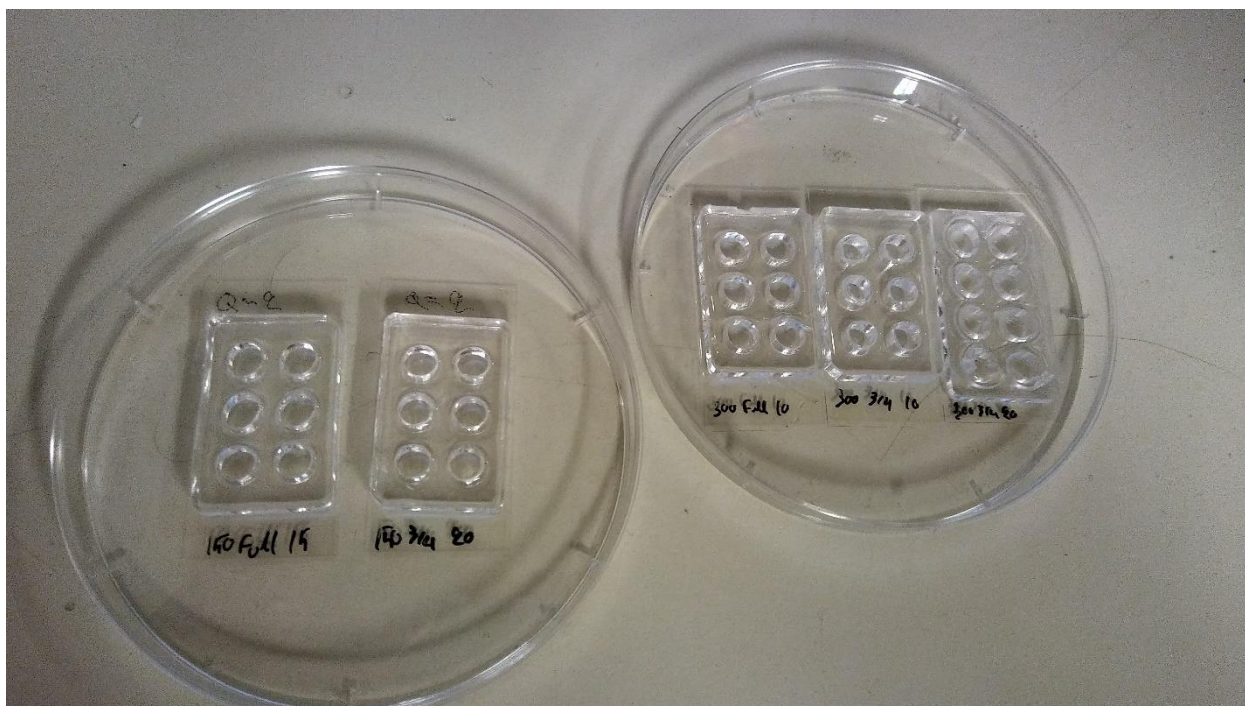
1. Οι καλυπτρίδες με πάχος .17 mm αποτελούν το πρότυπο στις εφαρμογές απεικόνισης.
2. Τα βοθρία ορίζονται από την τοποθέτηση των ικριωμάτων στις σωστές θέσεις με τη ρομποτική διάταξη TECAN, όπως περιγράφεται στο κεφάλαιο 3.4. Αντίστοιχα για την υπερκατασκευή PDMS από τον σχεδιασμό του καλουπιού χύτευσής της, όπως περιγράφεται και αυτός στο κεφάλαιο 3.3.
3. Οι διαστάσεις της υπερκατασκευής ορίζονται από το καλούπι χύτευσης.
4. Χρησιμοποιούνται εργαλεία σχεδιασμού CAD και κατασκευή με 3D printing για να παράγονται οι επιθυμητές ακριβείς μορφές του καλουπιού που παράγουν τα βοθρία.
5. Η κατανόηση της φυσικής της κατεργασίας παρέχει τη δυνατότητα να συσχετιστεί η τελική ποιότητα κόλλησης με τις παραμέτρους κατεργασίας πλάσματος (χρόνος, ισχύς) αναλυτικά στο κεφάλαιο 3.6.

Ρίσκα	Αντίμετρα
Καμπύλωση ή και θραύση της καλυπτρίδας κατά το χειρισμό της.	Κατά το δυνατόν λιγότερη ανθρώπινη παρέμβαση και εφαρμογή φορτίων κατά τη διαδικασία. Οι κατασκευές και οι αυτοματοποιημένες διαδικασίες (π.χ. εναπόθεση με TECAN) μειώνουν το ρίσκο.
Λανθασμένη τοποθέτηση ή/και όγκος του τελικού ικριώματος. Κακώς ευθυγραμμισμένη συναρμογή με την υπερκατασκευή PDMS.	Η ρύθμιση και βαθμονόμηση της διάταξης TECAN και η ευθυγράμμιση των καλυπτρίδων με τις υπερκατασκευές κατά την κόλληση τους υπο βάρη παράγουν ικανοποιητικά αποτελέσματα.
Λανθασμένος σχεδιασμός του καλουπιού που παράγει την υπερκατασκευή και παρεμβολή αυτής κατά την τοποθέτηση στην βάση.	Οι μορφές που κατασκευάζονται με 3D printing παρέχουν ικανοποιητική ακρίβεια. Οι λοιπές επιφάνειες υπάγονται στην γνώση των δυνατοτήτων του κόπτη Laser ώστε ο σχεδιασμός να παράγει τις σωστές διαστάσεις.
Η μορφή και το πλήθος των βοθρίων μπορεί να αφήσουν την υπερκατασκευή πολύ ευαίσθητη, δύσκολα εξαγώμενη από το καλούπι ή ακόμη και να συντελεστεί ελλιπής πολυμερισμός άρα και αρχήστευσή της.	Η κατασκευή καλουπιού με διαμορφώσεις κατασκευασμένες σε 3D printer παράγουν κωνικά βοθρία που διευκολύνουν την εξαγωγή και προσφέρουν αυξημένο όγκο, ενώ ο σχεδιασμός καλουπιού με ικανή ελεύθερη επιφάνεια διευκολύνει τον πολυμερισμό του PDMS. Αναλυτικά οι κατασκευαστικές λύσεις σε επόμενο κεφάλαιο.
Κακή επαναληψιμότητα ή ανεπάρκεια της κατεργασίας πλάσματος μπορεί να οδηγήσει σε καταστροφή της συσκευής με αποκόλληση της υπερκατασκευής ή ακόμη και αποκόλληση των ικριωμάτων από την καλυπτρίδα λόγω τάσεων ασκούμενων από τα κύτταρα.	Συντήρηση της διάταξης του θαλάμου πλάσματος και καθορισμός της περιοχής λειτουργίας του και επαναλήψιμου πρωτοκόλλου κατεργασίας.

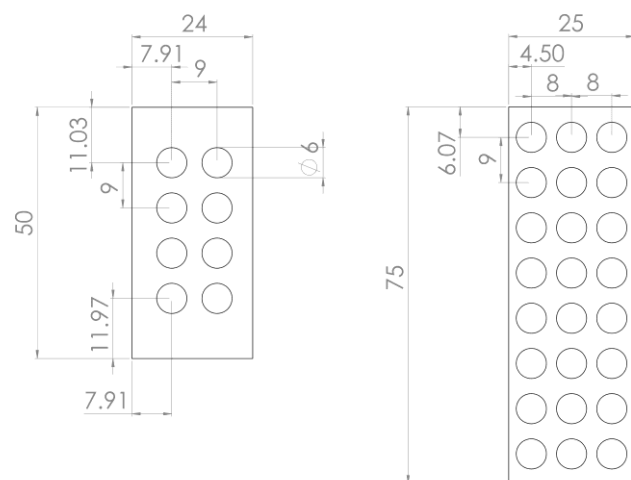
Πίνακας 2: Ρίσκα και αντιμέτρα αυτών για την σχεδιαστική προσέγγιση που ακολουθείται στη συσκευή ΛΠΙΚ



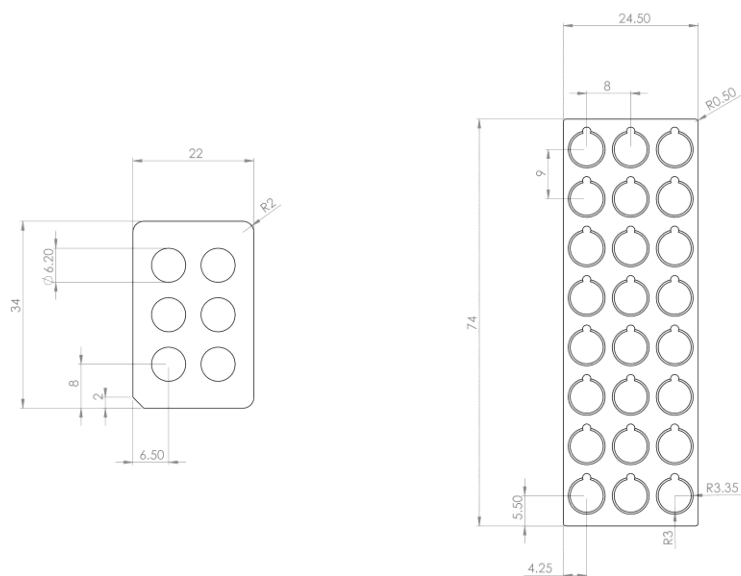
Εικόνα 11: Συσκευή συστοιχίας ΛΠΙΚ χωρίς τα ικριώματα – από τα πειράματα κόλλησης της υπερκατασκευής στην καλυπτρίδα. Τα ικριώματα βρίσκονται κανονικά στους πυθμένες των βοθρίων. Λεπτομέρεια οι εσοχές στα βοθρία για την ασφαλή εισαγωγή της πιπέτας.



Εικόνα 12: Υπερκατασκευές κολλημένες με καλυπτρίδες για την περίπτωση χρήσης καλυπτρίδας 24 X 50 mm και 6 βοθρίων ανά συσκευή



Εικόνα 13: Θέσεις ικριωμάτων/βοθρίων κατά τη διαμόρφωση 96άρας πλάκας σε καλυπτρίδες 24 X 50 (αριστερά) και 25 X 75 (δεξιά)



Εικόνα 14: Υπερκατασκευές 6 βοθρίων για καλυπτρίδα 24 X 50 (αριστερά) και 24 βοθρίων για καλυπτρίδα 25 X 75 (δεξιά)

Τα λεπτομερή κατασκευαστικά σχέδια των διατάξεων βρίσκονται στο παράρτημα Δ.1/Δ.2.

Κεφάλαιο 3: Χαρακτηρισμός και Αυτοματοποίηση Κατασκευής Συσκευών Συστοιχιών Λεπτών Πορώδων Ικριωμάτων

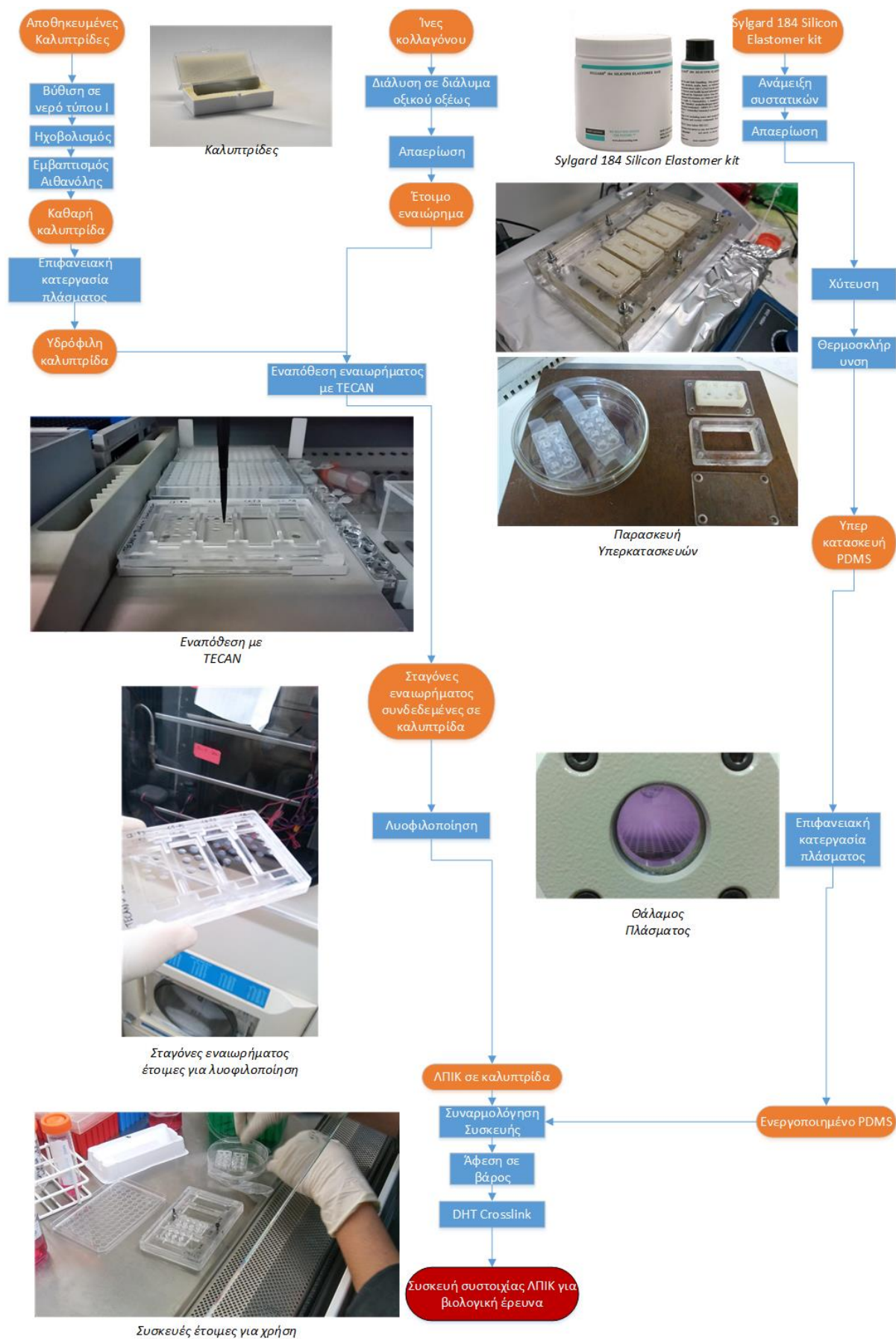
3.1 Περιεχόμενα

Στο κεφάλαιο αυτό παρουσιάζονται τα βήματα της διαδικασίας κατασκευής των εξαρτημάτων των συσκευών συστοιχιών ΛΠΙΚ και η τελική τους συναρμολόγηση, παρουσιάζοντας αναλυτικά και τις διατάξεις και μεθόδους που χρησιμοποιήθηκαν στη διαδικασία.

3.2 Βήματα Διαδικασίας Κατασκευής Λεπτών Πορώδων Ικριωμάτων

Η κατασκευή μίας συσκευής που περιέχει συστοιχία ΛΠΙΚ για βιολογική έρευνα περιλαμβάνει διάφορες διαδικασίες με ποικίλο εξοπλισμό. Τα πρωτόκολλα των διαδικασιών παρατίθενται αναλυτικά στο παράρτημα Α. Εδώ παρουσιάζονται συνοπτικά σε λίστα και διάγραμμα ροής του σχήματος 1:

1. Προετοιμασία εναιωρήματος υλικού του ΛΠΙΚ
2. Προετοιμασία του ελαστομερούς PDMS
 - a. Ανάμιξη συστατικών
 - b. Απαερίωση
 - c. Χύτευση στο καλούπι
 - d. Θερμοσκλήρυνση ως την τελική στερεή του κατάσταση
3. Καθαρισμός γυαλιών μικροσκοπίας
4. Επιφανειακή κατεργασία πλάσματος γυαλιών μικροσκοπίας
5. Εναπόθεση εναιωρήματος υλικού από τη ρομποτική διάταξη TECAN
6. Λυοφιλοποίηση του αιωρήματος
7. Ενεργοποίηση επιφανείας υπερκατασκευής PDMS μέσω πλάσματος και κόλληση με το γυαλί που φέρει τα ΛΠΙΚ
8. Συναρμολόγηση συσκευής
9. Δημιουργία σταυροδεσμών
10. Χρήση ή διατήρηση συσκευής



Σχήμα 1: Διάγραμμα Ροής διαδικασίας παρασκευής συσκευής συστοιχίας ΛΠΙΚ

3.3 Σχεδιασμός Κατασκευή και Αξιολόγηση Καλουπιών PDMS

3.3.1 Προδιαγραφές

Για την κατασκευή των συσκευών μας υπάρχει ανάγκη για την παραγωγή υπερκατασκευών PDMS με βασικές προδιαγραφές:

- Διαστάσεων (σύνδεση με καλυπτρίδα 75*25 mm)
- Θέσεως και διαστάσεων οπών που δημιουργούν τα βοθρία της συσκευής (θέσεις 96άρας πλάκας, ύψος τουλάχιστον 5 mm για τον απαιτούμενο όγκο).
- Η επιφάνεια της υπερκατασκευής που θα κατεργαστεί με πλάσμα πρέπει να είναι επίπεδη διότι αλλιώς δεν θα κολλήσει καλά με την καλυπτρίδα.
- Το τελικό προϊόν της υπερκατασκευής από στερεοποιημένο PDMS πρέπει να είναι καλής ποιότητας, δηλαδή πλήρως πολυμερισμένο και στερεοποιημένο σύμφωνα με τα πρωτόκολλα παρασκευής που τίθενται από την κατασκευάστρια εταιρία και από σχετικές επιστημονικές δημοσιεύσεις. [32][33][34][35][36][37][7]
 - ο Αναλυτικά το πρωτόκολλο παρασκευής PDMS στο παράρτημα Α, χωρίο Α.2 και οι επιδράσεις των παραμέτρων παρασκευής PDMS στην επιτυχία της κατεργασίας πλάσματος στο σχετικό κεφάλαιο 3.6.

Με βάση τον σχεδιασμό που περιγράφηκε στα εδάφια 2.2, πρέπει να κατασκευαστούν καλούπια υπερκατασκευών διαστάσεων 25 X 75 X 5 mm με 24 (3×8) οπές στις θέσεις που αντιστοιχούν βοθρία της 96άρας πλάκας με επίπεδη κάτω επιφάνεια. Τα καλούπια αυτά έπειτα πρέπει να μπορούν να αντέχουν τις θερμοκρασίες (65-75°C) κατά τον πολυμερισμό και την θερμοσκλήρυνση του PDMS.

3.3.2 Διαδικασία κατασκευής

Για λόγους ευκολίας κατασκευής και κόστους χρησιμοποιήθηκαν φύλλα χυτού PMMA κατεργασμένα με κοπή σε Laser. Θεωρείται ότι η δυνατότητα ταχείας κατασκευής και δοκιμής πρωτοτύπων με μικρό κόστος σε συνδυασμό με την σχετικά επίπεδη επιφάνεια που παρέχει μια τέτοια μορφή πρώτης ύλης υπερσχύει έναντι της θερμομονωτικής συμπεριφοράς του PMMA. Πρέπει ωστόσο να υπάρχει προσοχή κατά τη θερμοσκλήρυνση του PDMS ώστε να μην υπερβεί κανείς το όριο τήξης του PMMA.

Σε όλες τις εκδόσεις των καλουπιών που κατασκευάστηκαν για τα περισσότερα εξαρτήματα χρησιμοποιήθηκαν φύλλα PMMA, τα οποία κόπηκαν μέσω κοπής Laser. Εξάιρεση αποτελούν τα καλούπια που χρησιμοποιούν και μορφές που κατασκευάστηκαν με 3D Printing.

Τα διάφορα εξαρτήματα συναρμολογούνται και συσφίγγονται με χρήση κοχλιών για στεναγότητα και για δυνατότητα αποσυναρμολόγησης και εξαγωγής της υπερκατασκευής μετά τη θερμοσκλήρυνση.

Ακολουθεί μια καταγραφή των καλουπιών που κατασκευάστηκαν. Κατασκευαστικά σχέδια του τελικού καλουπιού που υλοποιεί την υπερκατασκευή για τις καλυπτρίδες 25 X 75 βρίσκονται στο παράρτημα Δ.

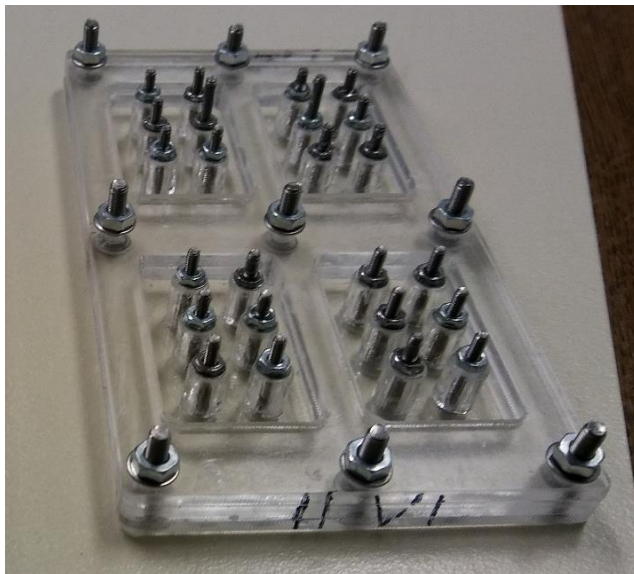
3.3.3 Κατασκευαστική Υλοποίηση

Στο παράρτημα Ε παρατίθεται αναδρομή όλων των ειδών καλουπιών χύτευσης που κατασκευάστηκαν κατά την εκπόνηση αυτής της εργασίας

Η υλοποίηση ξεκίνησε από κατασκευές που υλοποιήθηκαν κατά την εκπόνηση της διπλωματικής της κ. Σαρκίρη [5], οι οποίες και παρήγαγαν υπερκατασκευές για συναρμολόγηση με καλυπτρίδες 24 X 50 mm. Έγινε αρχικά μια προσπάθεια να αλλάξει ο σχεδιασμός, ώστε να ικανοποιηθεί η προδιαγραφή της διαμόρφωσης 96άρας πλάκας, δηλαδή τα κέντρα των βοθρίων να έχουν απόσταση 9 mm μεταξύ τους. Αυτό

ώστε όταν τοποθετούνται στις βάσεις απεικόνισης τα βοηθία με ικριώματα να βρίσκονται στις ήδη αποθηκευμένες συντεταγμένες των μετρητικών οργάνων. Ως αποτέλεσμα παράχθηκε το:

- Καλούπι Υπερκατασκευών 24 X 50 mm



Εικόνα 15: Καλούπι Υπερκατασκευών 24 X 50

Αποτέλεσε προσπάθεια βελτίωσης του προϋπάρχοντος καλουπιού. Πρόκειται για καλούπι που συναρμολογείται από 2 φύλλα PMMA: Την κάτω επίπεδη επιφάνεια (πάχος 3mm) και τα όρια που καθορίζουν τις XYZ διαστάσεις των υπερκατασκευών (πάχος 3mm). Τα βοηθία καθορίζονται από κυλίνδρους PMMA. Όλα τα εξαρτήματα συσφίγγονται με κοχλίες.

Η άνω επιφάνεια είναι ελεύθερη (επαφή με αέρα) καθώς δεν επιδρά η επιπεδότητα της στη συναρμογή με τις καλυπτρίδες και είναι επαρκής για την εξατμισμό του διαλύτη του μείγματος PDMS. Αυξήθηκε το ύψος των υπερκατασκευών από 3 σε 5/6 mm σύμφωνα με τις προδιαγραφές όγκου βοθρίων, ενώ οι κοχλίες σύσφιξης των εξαρτημάτων μετατράπηκαν σε περαστούς καθώς παρατηρήθηκε φθορά στο προϋπάρχον καλούπι τόσο από την αρχική διάνοιξη σπειρωμάτων όσο και από την διόγκωση των ρωγμών, λόγω των πλύσεων με ισοπροπανόλη για καθαρισμό.

Το παρόν καλούπι αποτελεί μια επιτυχημένη εφαρμογή και το πρότυπο για χρήση συσκευών βασισμένων σε καλυπτρίδες 24 X 50.

Με τα επόμενα μοντέλα έγινε η προσπάθεια να μετατραπούν σε κλειστά τα καλούπια χύτευσης για καλύτερο ορισμό των διαστάσεων των υπερκατασκευών σε συνδυασμό με τη χρήση μορφών κατασκευασμένων σε 3D Printer.

- Καλούπι Υπερκατασκευών 75 X 25 mm

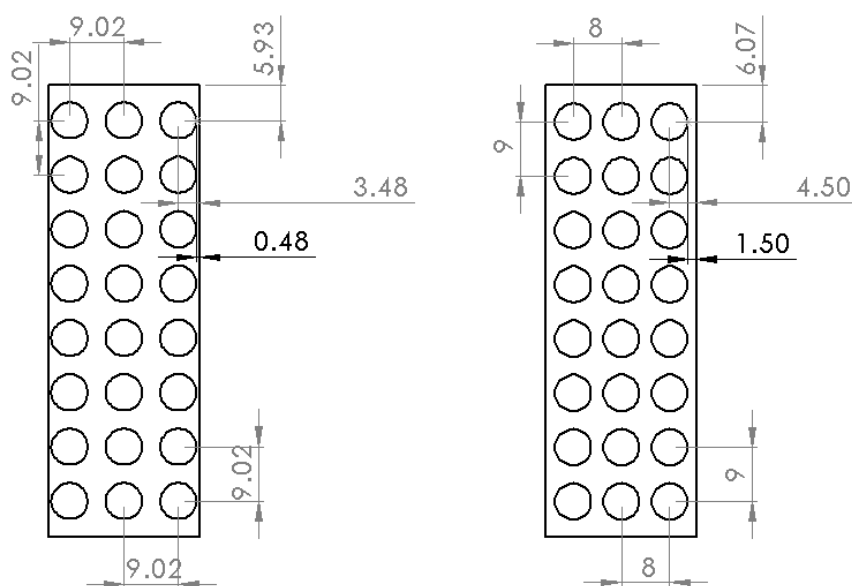
Ωστόσο η μετάβαση σε κλειστά καλούπια φάνέρωσε προβλήματα στην θερμοσκήρυνση του PDMS. Σε ανεπίτρεπτα μεγάλο ποσοστό των εφαρμογών ο πολυμερισμός δεν συντελούνταν επαρκώς και αυτό έκανε την κατεργασία πλάσματος άρα και την κόλληση τους με την καλυπτρίδα ανεπαρκή. Αυτό συνέβη διότι η άξηση του μεγέθους των κομματιών PMMA που περιέκλειαν πιά συνολικά την υπερκατασκευή σημαίνει και την αύξηση της μονωτικής συμπεριφοράς (μείωση συναγωγής). Σε συνδυασμό με τις μικρές οπές χύτευσης από όπου μπορούσε να εξατμιστεί ο διαλύτης υπήρχε μεγάλη πιθανότητα να μην καταφέρνει να θερμανθεί στην προδιαγεγραμμένη θερμοκρασία το PDMS και να συγκεντρώνεται διαλύτης στις επιφάνειες της υπερκατασκευής. Αυτό ήταν φανερό στην αφή ως κολλώδης επιφάνεια, και προκαλούσε αποτυχία της κατεργασίας πλάσματος και της κόλλησης στο γυαλί. Ήταν προφανής η ανάγκη για διαφορετική προσέγγιση του σχεδιασμού του καλουπιού όσο και της θέρμανσης του.

Αναπτύχθηκε έτσι το τελικό **Καλούπι Υπερκατασκευών 75 X 25 mm** , το οποίο θερμαίνεται σε ειδικό κλίβανο ρητινών με σύστημα ελέγχου θερμοκρασίας της Nabertherm που διαθέτει το εργαστήριο.

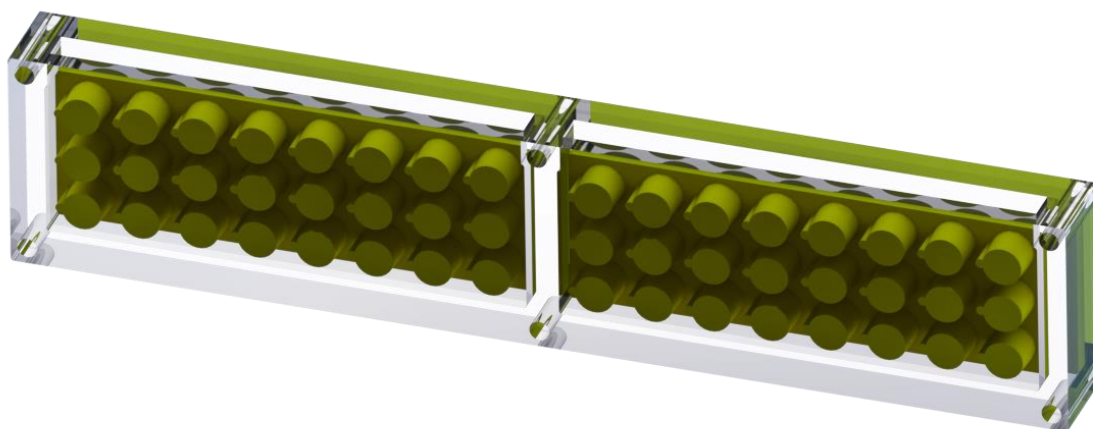
Πρόκειται για καλούπι με ελαχιστοποιημένα τα πάχη των κομματιών PMMA και ελεύθερη πλήρως την κατα μήκος επιφάνεια των υπερκατασκευών για χύτευση και απαγωγή διαλύτη. Οι αρχικές δοκιμές του παρήγαγαν ικανοποιητικά αποτελέσματα για υπερκατασκευές 24 X 50 mm και έτσι κατασκευάστηκε και για τις υπερκατασκευές των ζητούμενων διαστάσεων που συναρμολογούνται με την καλυπτρίδα 72 X 25 X 0.17 mm.

Αποτελεί στρωματική κατασκευή καθώς ” χτίζεται” από φύλλα PMMA που έχουν κοπεί με Laser (2D κατεργασία). Στον κενό θάλαμο χύτευσης που σχηματίζεται αν τα εξαρτήματα από PMMA συναρμολογηθούν εισέρχεται ένα εξάρτημα από ABS, κατασκευασμένο με 3D Printing – φέρει το ίδιο ”πείρο” που εισέρχεται σε εσοχή στο ανώτερο τεμάχιο PMMA του καλουπιού και έτσι ορίζεται η θέση του. Αυτό ορίζει το τελικό ύψος της υπερκατασκευής (άρα και τον όγκο των βοθρίων) και τα ίδια τα βοθρία ως μορφή και τοποθεσία κατά XY, μέσω των αρσενικών διαμορφώσεων που σχεδιάστηκαν για να παράγουν την επιθυμητή μορφή βοθρίου - σε αυτή την περίπτωση μια ελαφρά κωνικότητα για ευκολότερη εξαγωγή μετά τη χύτευση και μια εσοχή ώστε να μπορεί ο χρήστης να εισάγει την πιπέτα χωρίς να κινδυνεύει το ικρίωμα να ”τραυματιστεί” από σύγκρουση μεταξύ τους.

Λόγω περιορισμών χώρου όμως ήταν αναγκαίο να μεταφερθούν οι θέσεις των βοθρίων των σειρών 1 & 3 σε κάθε συσκευή 1 mm προς το εσωτερικό (εικόνα) καθώς αν ακολουθηθεί πλήρως η διαμόρφωση 96 άρας πλάκας θα έρεπε να υπάρχει διατομή πάχους 480 μm στις οριακές επιφάνειες της υπερκατασκευής – έως και αδύνατο κατασκευαστικά, σίγουρα αδύνατο να παρέχει στεγανότητα.



Εικόνα 16: Αναγκαστική διαφορά μεταξύ πραγματικής διαμόρφωσης 96άρας πλάκας (αριστερά) και τελικής σχεδίασης της συσκευής (δεξιά)



Εικόνα 17: Καλούπι υπερκατασκευών 25 X 75 mm



Εικόνα 18: Καλούπι Υπερκατασκευών 75 X 25 και υπερκατασκευή κολλημένη σε καλυπτρίδα 25 X 75

3.3.4 Αποτελέσματα και Συμπεράσματα

Η βιβλιογραφία αναφέρει χύτευση PDMS σε τριβλία ή άλλες διαμορφώσεις με ελεύθερη επιφάνεια ώστε να παρασκευαστούν φύλλα PDMS και έπειτα να καθοριστούν οι μορφές των ζητούμενων εξαρτημάτων μικροφλοϊδικής με κοπή με εργαλεία.

Η προσπάθεια να λύθουν τα προβλήματα πολυμερισμού του PDMS διδάσκει πως οι ανοικτές επιφάνειες είναι ένας σίγουρος τρόπος να κατασκευαστούν εξαρτήματα PDMS, αλλά είναι δυνατόν με κατάλληλα συστήματα ελέγχου θέρμανσης να παραχθούν εξαρτήματα και από κλειστά καλούπια.

Η χρήση 3D Printed εξαρτημάτων δίνει μεγάλη ελευθερία στις μορφές των εξαρτημάτων PDMS και αν συνδυαστεί με τη χρήση ποιοτικότερων υλικών για την κατασκευή του καλουπιού (PC / μεταλλικά / άλλα) που αντέχουν σε υψηλότερες θερμοκρασίες και παράγουν καλύτερες κατασκευαστικές ανοχές είναι δυνατή η ταχεία (<1h ανά κύκλο θερμοσκήρυξης) παραγωγή ακριβέστεων εξαρτημάτων από PDMS.

Στο σημείο αυτό θα ήθελα να ευχαριστήσω τους Δρ. Χριστόφορο Προβατίδη (Καθηγητής ΕΜΠ και υπεύθυνος εργαστηρίου) και Δρ. Σταμάτη Πολύδωρα (ΕΔΙΠ) του Εργαστηρίου Ταχείας Κατασκευής Πρωτοτύπων και Εργαλείων του ΕΜΠ για παροχή της δυνατότητας να κατασκευαστούν τα απάρτια στην μηχανή 3D Printing Stratasys Fortus MC360 και για την άψογη συνεργασία και βοήθεια στον σχεδιασμό και χειρισμό του λογισμικού της μηχανής.

3.4 Αυτοματοποίηση Εναπόθεσης Αιωρήματος

Έως τώρα η παρασκευή των ΛΠΙΚ ξεκινούσε με την εναπόθεση του εναιωρήματος βιοϋλικού στις ενεργοποιημένες με πλάσμα γυάλινες καλυπτρίδες. Παρόλο που οι χειροκίνητες πιπέτες 20 ul είναι αρκετά ακριβείς στην εναπόθεση του σωστού όγκου, η θέση στην οποία εναποτίθεται η σταγόνα δεν ορίζεται με αρκετή ακρίβεια. Για συσκευές με συστοιχίες λίγων ΛΠΙΚ αυτό είναι σχετικά ανεκτό μιας και τα ΛΠΙΚ απέχουν αρκετά μεταξύ τους. Για συσκευές με συστοιχίες ΛΠΙΚ υψηλών προδιαγραφών, η χειροκίνητη εναπόθεση του αιωρήματος δεν μπορεί να δώσει ικανοποιητικά αποτελέσματα. Ένας τρόπος να λυθεί αυτό το ζήτημα είναι η αυτοματοποιημένη εναπόθεση του αιωρήματος μέσω ρομποτικού μηχανισμού.

3.4.1 Προδιαγραφές

Σκοπός είναι η ακριβής και επαναλήψιμη εναπόθεση εναιωρήματος κολλαγόνου όγκου 6 ul κάθε φορά στις θέσεις που αντιστοιχούν στα βοθρία 96άρας πλάκας κυτταροκαλλιέργειας. Η υλοποίηση που περιγράφεται στο κεφάλαιο 2 προτείνει 4 συσκευές 75x25mm όπου κάθε μια περιέχει μια συστοιχία 8 σειρών και 3 στηλών ΛΠΙΚ ώστε από τη σύνθεσή τους να προκύπτει ανάλογο της 96άρας πλάκας (8 σειρές, 12 στήλες).

Λόγω της ανάγκης η υπερκατασκευή PDMS που δημιουργεί τα βοθρία να είναι αρκετά στιβαρή και να κολλήσει καλά με την καλυπτρίδα, η πρώτη και η Τρίτη στήλη ΛΠΙΚ της κάθε συστοιχίας μετατέθηκαν κατά 1 χιλιοστό προς την μεσαία στήλη (απέχουν 8 mm αντί για 9 mm). Αν και αποτελεί μια κατά 11% “ανακρίβεια” σε σχέση με τις παραδοσιακές πλάκες, κρίνεται μη κρίσιμη καθώς δεν αποτελεί εργονομικό εμπόδιο για το χρήστη και δεν χάνεται η δυνατότητα συνεργασίας των συσκευών με τα μετρητικά όργανα και τα όργανα απεικόνισης.

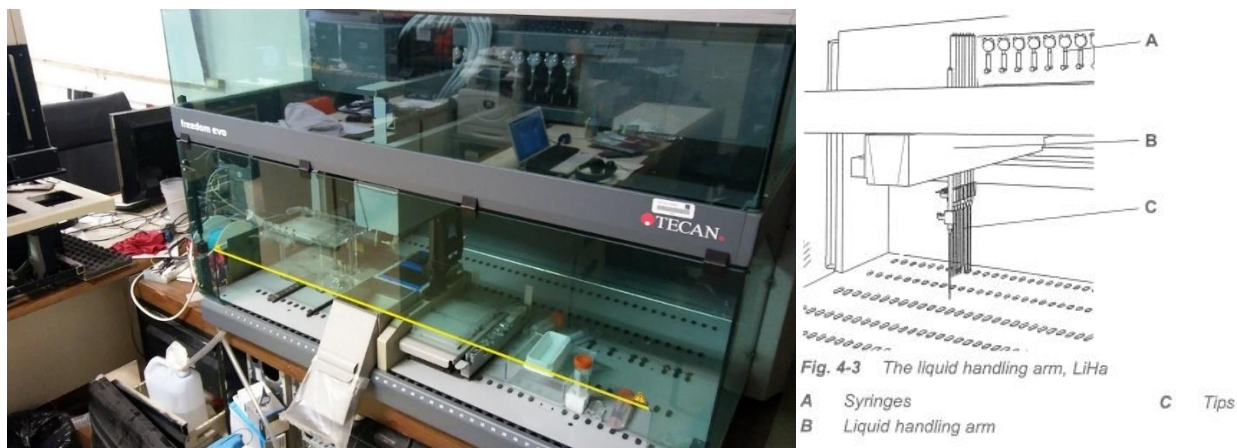
Τελικά οι προδιαγραφές συνοψίζονται σε:

- Ακρίβεια και επαναληψιμότητα όσον αφορά τη θέση των ικριωμάτων στην καλυπτρίδα. (διαμόρφωση 96άρας πλάκας)
- Ακρίβεια και επαναληψιμότητα όσον αφορά τον όγκο που εναποτίθεται (πάχος ικριώματος)
- Ακρίβεια και επαναληψιμότητα όσον αφορά την ταχύτητα εναπόθεσης (ομοιογένεια δομής ικριώματος – συνόλου ικριωμάτων)

3.4.2 Υλοποίηση μέσω της ρομποτικής διάταξης TECAN.

Για την ακριβή και επαναλήψιμη εναπόθεση των σταγόνων εναιωρήματος πάνω στις καλυπτρίδες ρησιμοποιήθηκε η ρομποτική διάταξη TECAN. Η δομή, η λειτουργία και η ρύθμιση της παρουσιάζεται αναλυτικά στο παράρτημα Γ.

Συνοπτικά: Πρόκειται περί ενός ρομποτικού βραχίονα με σύστημα διαχείρισης ρευστών που κινείται σε επιφάνεια εργασίας της οποίας τα στοιχεία μπορεί ο χρήστης να παραμετροποιήσει πλήρως και έπειτα να συγγράψει ένα πρόγραμμα στο περιβάλλον ελέγχου της συσκευής ώστε να εκτελέσει το ανάλογο πρωτόκολλο διαχείρισης ρευστών.



Εικόνα 19: Η διάταξη TECAN και ο ρομποτικός βραχίονας διαχείρισης ρευστών (LiHa)

Για την συγκεκριμένη εφαρμογή προγραμματίστηκαν οι οντότητες των σωλήνων Eppendorf 2ml που φέρουν τα εναιωρήματα, το φαντίο που τα φέρει, αντίστοιχα η βάση συσκευών και οι καλυπτρίδες που φέρει - όλα ως προσαρμογή στα προϋπάρχοντα φαντίνια που φέρουν απλές 96άρες πλάκες - και φυσικά η κλάση ρευστού που έχει αποθηκευμένες τις ρυθμίσεις που καθορίζουν την διαχείριση του εναιωρήματος από τις πιπέτες (ταχύτητες πιπεταρίσματος, όγκοι κλπ).

Έπειτα απλώς συνετέθη μια αλληλουχία εντολών στο περιβάλλον προγραμματισμού που οδηγεί το όργανο στο να ανακτά εναιώρημα από τις πηγές και να το εναποθέτει στις αντίστοιχες των βοθρίων θέσεις στις καλυπτρίδες που τίθενται στην επιφάνεια εργασίας του TECAN μετά την κατεργασία τους με πλάσμα.

3.4.3 Χαρακτηρισμός απόδοσης TECAN

Για την συγκεκριμένη εφαρμογή ενδιαφέρει η ακρίβεια και η επαναληψιμότητα τοποθέτησης πιπέτας στην σωστή θέση και εναπόθεσης του σωστού όγκου από το σύστημα TECAN.

Όσον αφορά την τοποθέτηση η διάταξη παρέχει άκρως ικανοποιητική ακρίβεια για την εφαρμογή αυτής της μελέτης. Συγκεκριμένα σφάλμα $\pm 0.4\text{mm}$ στις θέσεις XY (επίπεδο) Z(ύψος άφεσης) με επαναληψιμότητα $\pm 0.15\text{mm}$ στις κινήσεις κατά XY και $\pm 0.3\text{mm}$ κατά Z.

Η φύση της συγκεκριμένης εφαρμογής απαιτεί πολύ μικρούς όγκους εναπόθεσης (6 μl). Δυστυχώς η διάταξη που παρέχει το εργαστήριο δεν διαθέτει τις προσαρμογές της κατασκευάστριας εταιρίας για εφαρμογές μικρών όγκων. Αυτό σημαίνει πως υπήρχε αβεβαιότητα για το αν η διάταξη θα ανταπεξέλθει και τα ικρίσματα τελικά θα πληρούσαν τις προδιαγραφές τους.

Στην παρούσα διαμόρφωση το LiHa μπορεί να φέρει πιπέτες 200 και 1000 μl , και οι σύριγγες που ορίζουν την αναρρόφηση/εναπόθεση έχουν χωρητικότητα 1000 μl . Κατά την κατασκευάστρια το κάτω όριο λειτουργικότητας μιας τέτοιας διάταξης για την πιπέτα των 200 μl είναι 5 μl , χωρίς όμως να έχει εξεταστεί η ακρίβεια στους όγκους αναρρόφησης/εναπόθεσης. Καθώς η εταιρία προτείνει διαμορφώσεις ειδικές για την περιοχή 1-10 μl έχει δοκιμάσει και εξάγει δεδομένα για την ακρίβεια των πιπετών 200 μl σε αυτή τη διάταξη έως και 10 μl : 3.5% συγκεκριμένα είναι το μετρούμενο σφάλμα από την κατασκευάστρια. Φυσικά προτείνει την χρήση των πιπετών αυτών για όγκους άνω των 20-30 μl . Ωστόσο το κόστος αντικατάστασης της κεφαλής και ο πιθανός χρόνος που μπορεί να καταναλώσει καθίστανται απαγορευτικά.

Συνεπώς, εκτελέστηκε πείραμα για μέτρηση της απόδοσης των πιπετών και βαθμονόμησης στις ρυθμίσεις κλάσης ρευστού (Παράρτημα Γ) ώστε και όποια σφάλματα εμφανιστούν, αν είναι συστηματικά να εξαλειφθούν κατά το δυνατόν.

Αρχικά έγιναν πειράματα με διάλυμα γλυκερόλης 70%, ώστε να προσομοιαστεί το υψηλό ιξώδες των εναιωρημάτων χωρίς να σπαταληθούν αυτά, λόγω κόστους.

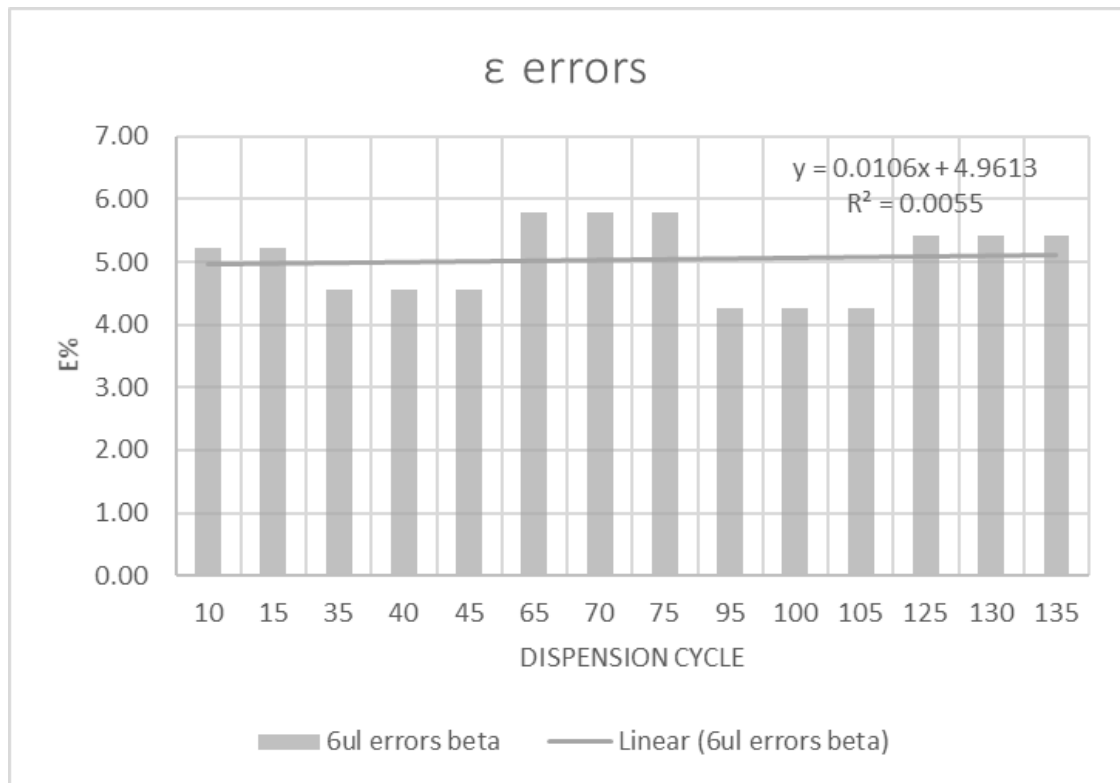
Μετρήθηκε η πυκνότητα του διαλύματος, έγινε εναπόθεση σε καλυπτρίδες και έπειτα μετρήθηκε το βάρος του υγρού που εναποθέθηκε με ζυγαριά ακριβείας και μετατράπηκε σε όγκο. Έπειτα συγκρίθηκε με την αρχική εντολή των 6 ul και επεργάστηκαν τα δεδομένα.

Μετά την προτυποποίηση της διαδικασίας και την ελαχιστοποίηση του σφάλματος με γλυκερόλη εκτελέστηκε και δοκιμή επιβεβαίωσης της ικανοποιητικής ακρίβειας με εναιώρημα CG.

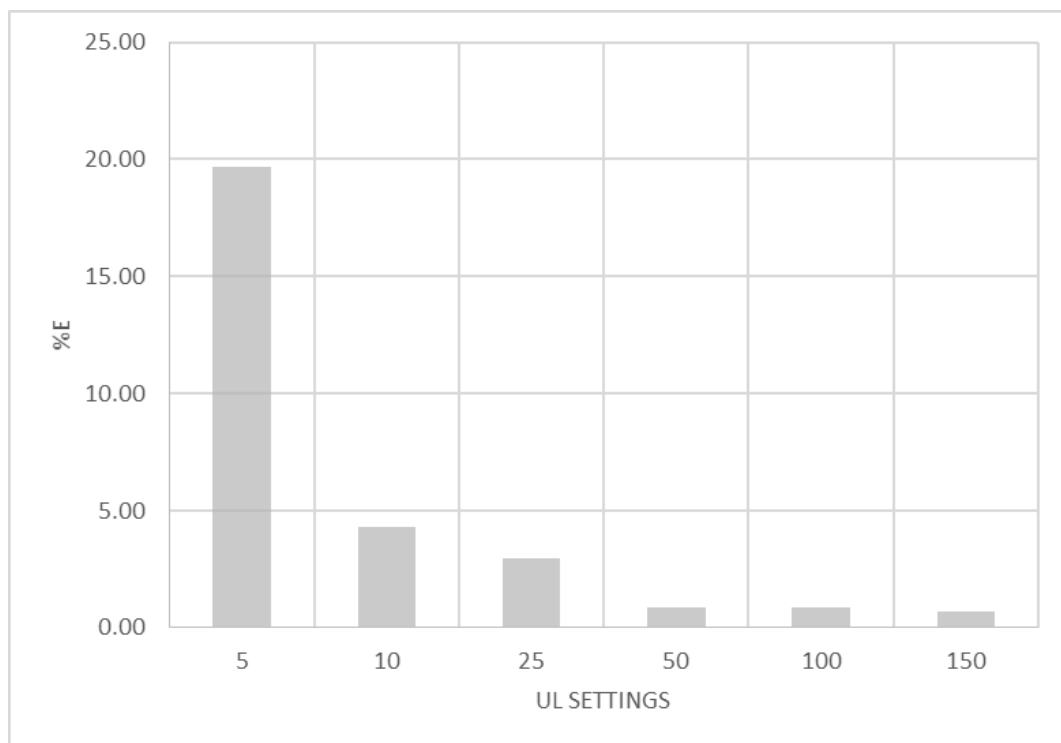
Ακολουθούν τα αποτελέσματα (Μετρήσεις στο παράρτημα Β, Γραφήματα εδώ): Αρχικά για το πείραμα με διάλυμα γλυκερόλης παρατίθενται τα γραφήματα (εικόνα 20 & εικόνα 21) που παρουσιάζουν τα πειραματικά αποτελέσματα απόκρισης του TECAN σε εντολές εναπόθεσης.

Στην εικόνα 20 παρουσιάζονται τα ποσοστιαία σφάλματα από τις μετρήσεις του πραγματικού όγκου που εναποτίθεται σε καλυπτρίδα αν η εντολή εναπόθεσης ορίζει όγκο 6 ul. Σκοπός αυτού του πειράματος είναι να ευρεθεί κατά πόσο επαναλήψιμη είναι η διαδικασία – να καθοριστεί αν το υπάρχον σφάλμα πρόκειται για τυχαίο (εκτός περιοχής λειτουργίας και αδύνατο να αντιμετωπιστεί με την παρούσα διάταξη) ή συστηματικό (αντιμετωπίζεται με βαθμονόμηση και η διαδικασία παραμένει επαναλήψιμη).

Στην εικόνα 21 μετρώνται οι πραγματικοί όγκοι εναπόθεσης για σχεδόν όλο το εύρος επιλογών στην εντολή (5-160 ul από το πλήρες εύρος των 5-200 ul για την πιπέτα που χρησιμοποιείται). Σκοπός αυτού του πειράματος είναι να ποσοτικοποιηθεί η απόκριση του TECAN στο εύρος των όγκων που δύναται να πιπετάρει και ένα εξαχθεί μια καμπύλη βαθμονόμησης. Αυτό γιατί το περιβάλλον προγραμματισμού (Παράρτημα Γ) για βαθμονόμηση χρησιμοποιεί μια γραμμική προσέγγιση αυτής της καμπύλης, που εκφράζει την πραγματική συμπεριφορά του μηχανήματος σε σχέση με τις εντολές που δίδονται. Η γνώση των συντελεστών της γραμμικής αυτής προσέγγισης υλοποιεί την βαθμονόμηση που επιθυμείται, ώστε να βελτιστοποιηθεί η ακρίβεια του οργάνου - αν αυτό κριθεί ότι παρέχει επαναληψιμότητα από το προηγούμενο πείραμα.

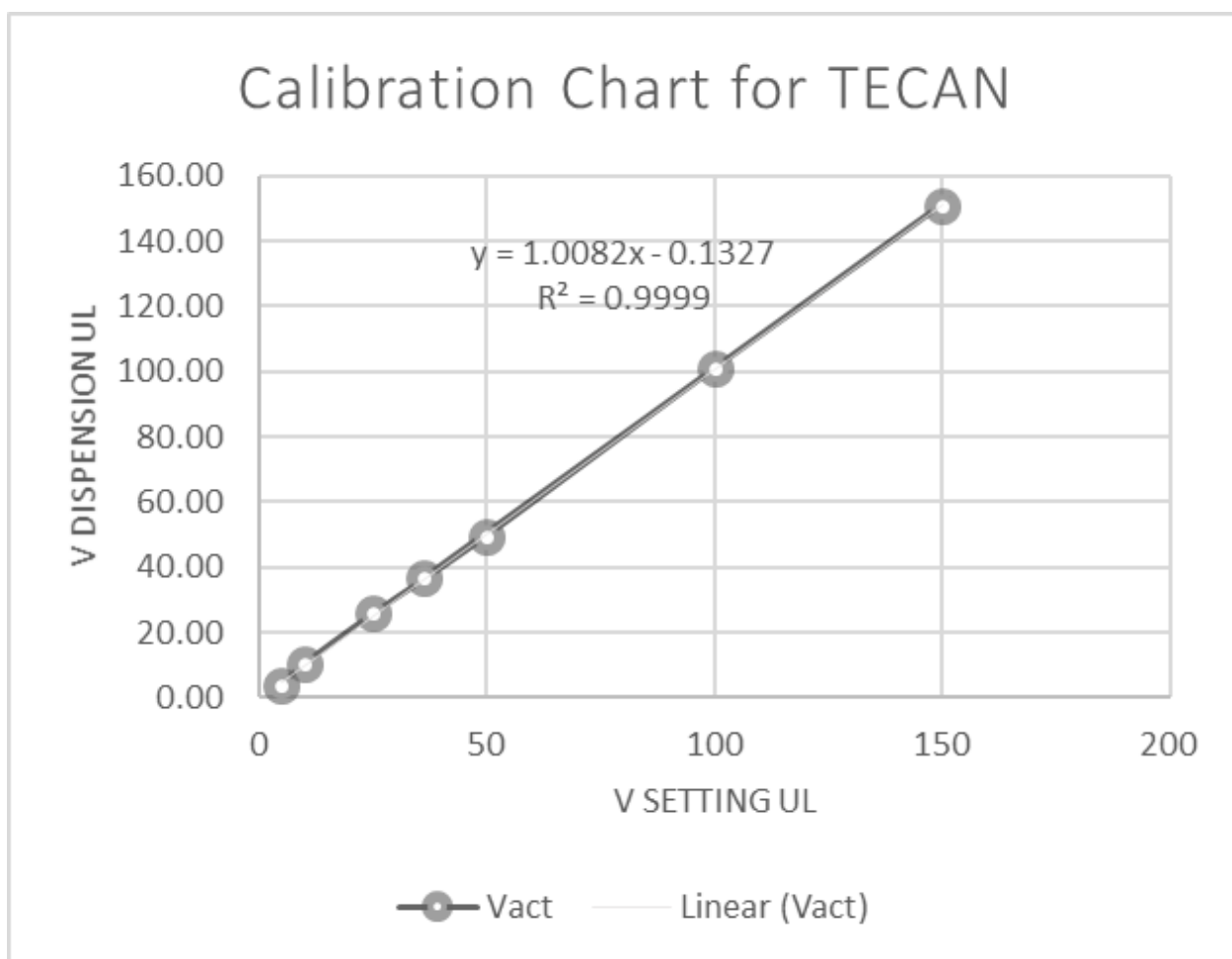


Εικόνα 20: Γράφημα των ποσοστιαίων σφαλμάτων όγκων που εναποθέθηκαν με εντολή 6ul. Η γραμμικοποίηση μας δείχνει πως το σφάλμα πέραν του αναμενόμενου από τον κατασκευαστή είναι κυρίως συστηματικό και μπορεί να εξαληφθεί με βαθμονόμηση.



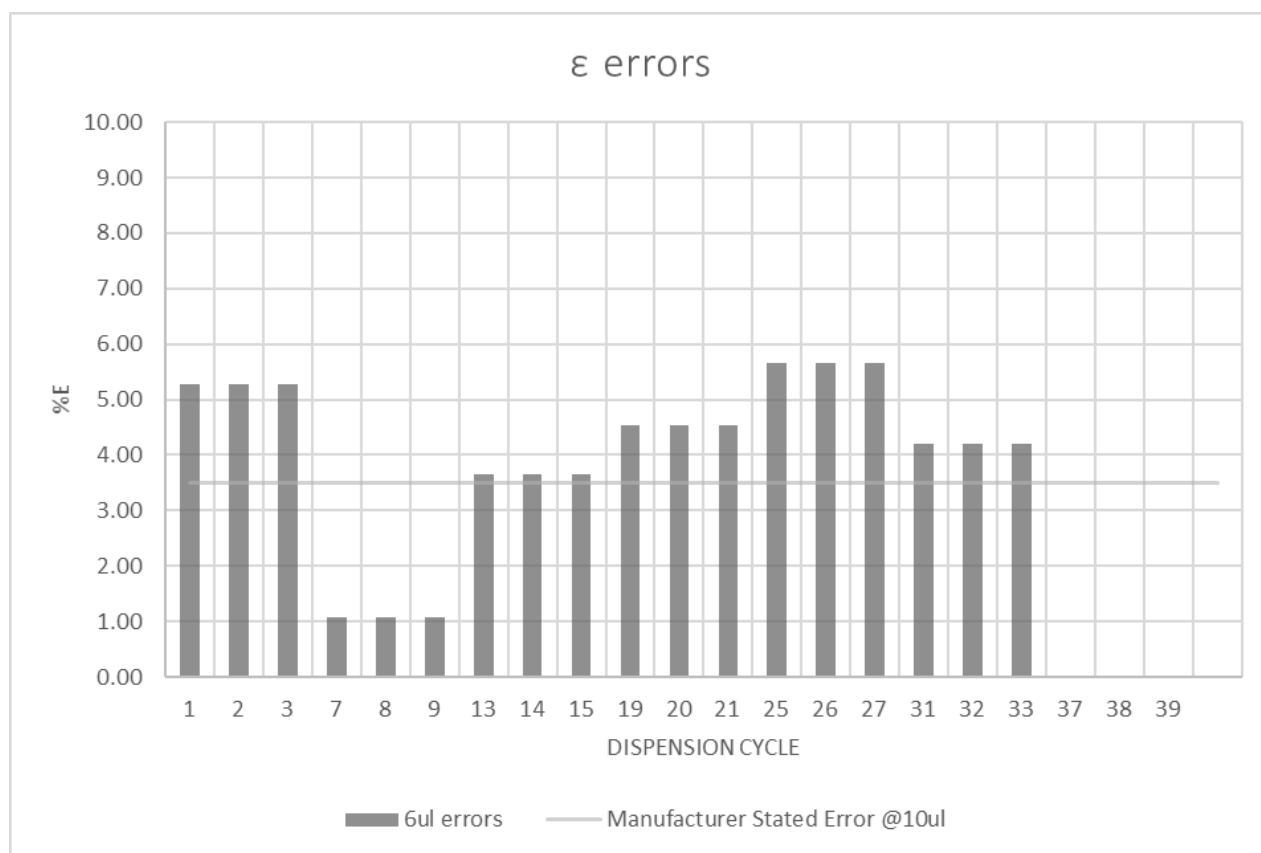
Εικόνα 21: Γράφημα που παρουσιάζει το ποσοστιαίο σφάλμα ανάλογα με τον όγκο που δίνεται στην εντολή εναπόθεσης. Φανερώνει την απόδοση του συστήματος ανάλογα με τον όγκο και επιβεβαιώνει την κατασκευάστρια – βελτιστη περιοχή άνω των 40/50 ul.

Χρησιμοποιείται το δεύτερο γράφημα για να εξαχθεί καμπύλη βαθμονόμησης για την κλάση της γλυκερόλης 70vol. Έτσι και στις επιλογές ρυθμίσεων του TECAN μπορεί να ρυθμιστεί το όργανο. αφού ζητά το συστηματικό σφάλμα (Offset - β) και την κλίση της ευθείας πραγματικής απόδοσης (α) – αν η ευθεία είναι η $y=ax+\beta$.



Εικόνα 22: Γράφημα Βαθμονόμησης TECAN

Το αρχικό πείραμα φανερώνει αρκετά καλή συμπεριφορά του TECAN για τους όγκους της εφαρμογής. Υπάρχει βέβαια ένα σφάλμα τυχαιότητας αλλά για εργασία στα όρια λειτουργικότητας θεωρείται ικανοποιητικό. Συνεπώς, με τη την εισαγωγή ενός offset των 0.2ul στο περιβάλλον προγραμματισμού μένει η επιβεβαίωση της απόδοσης και η τελική βαθμονόμηση με το πραγματικό υλικό / εναιώρημα CG:



Εικόνα 23: Γράφημα ποσοστιαίων σφαλμάτων εναπόθεσης όγκου 6ul εναιωρήματος CG.

Η απόδοση είναι παρόμοια με αυτή του διαλύματος γλυκερόλης και σύμφωνη με τις εκτιμήσεις κατασκευαστή για τη βέλτιστη περίπτωση των αραιών υδατικών διαλυμάτων. Προσοχή στον πρώτο πειραματικό κύκλο με μεγαλύτερο σφάλμα και στην μετέπειτα συμπεριφορά που φανερώνει την αλλαγή ιξωδους του υλικού με τη θερμοκρασία. Στον πρώτο κύκλο το εναιώρημα είχε μόλις βγει από τη συντήρηση των 4oC.

Τελικώς επιβεβαιώθηκε η δυνατότητα της διάταξης να εναποθέτει τους ζητούμενους όγκους με τη βέλτιστη δυνατή ακρίβεια που δύναται να έχει με τα παρόντα εξαρτήματα.

Η ακρίβεια όγκου είναι κατώτερη της αντίστοιχης χειροκίνητης πιπέτας των 20ul αλλά προφανώς οι ακρίβειες και οι επαναληψιμότητες θέσης και ταχύτητας ροής εναπόθεσης είναι απαράμμилες σε σχέση με το χειροκίνητο χειρισμό.

Σε περίπτωση αναβάθμισης της διάταξης με τον κατάλληλο εξοπλισμό (TECAN low volume option), θα παρέχεται εφάμιλλη ακρίβεια με τις πνευματικές πιπέτες μικρών όγκων.

Ωστόσο ακόμη και έτσι τα παραγώμενα ικρίσματα κρίνονται ικανοποιητικά και ουσιαστικά τίθεται ένα κάτω όριο όγκου τους που μπορεί να επιτευχθεί με εναπόθεση από τη διάταξη TECAN.

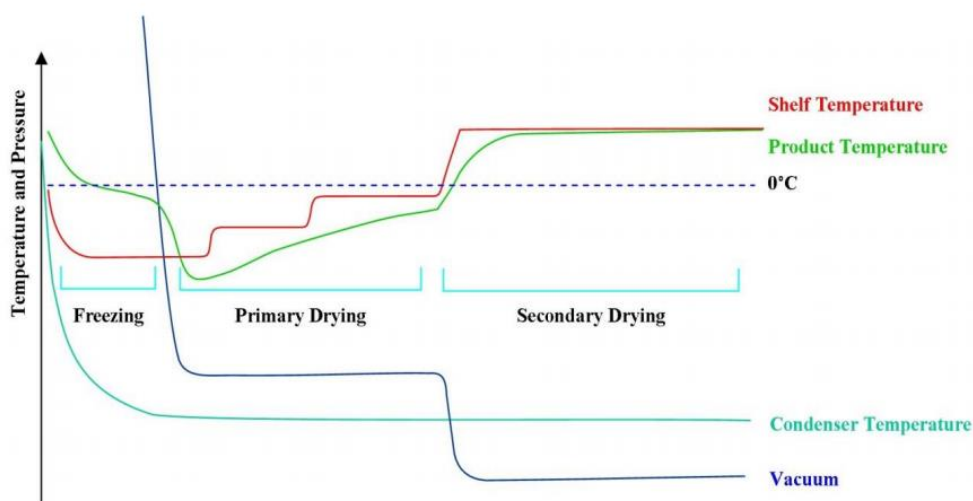
3.5 Λυοφιλοποίηση

3.5.1 Φυσικές Αρχές

Όπως αναφέρθηκε και στο εισαγωγικό κεφάλαιο η λυοφιλοποίηση αποτελεί διαδικασία αφυδάτωσης. Έχει επιλεγεί γιατί παράγει πορώδες στερεό υλικό, ακόμη και στις μικρές διαστάσεις που επιθυμείται, του οποίου η δομή μπορεί να είναι ελεγχόμενη μέσω των παραμέτρων φυσικών μεγεθών. Τον έλεγχο μας τον παρέχει ο λυοφιλοποιητής Virtis Genesis, με πολλές δυνατότητες και εντολές για ρύθμιση της διαδικασίας.

Οι φάσεις της διαδικασίας είναι [19]:

1. Ψύξη: Ψύξη του υλικού σε θερμοκρασία χαμηλότερη από αυτήν της συνύπαρξης στερεής και υγρής φάσης – συνήθως -40°C , έως και -80°C . Ενδιαμέσως στο πρωτόκολλο μπορούν να οριστούν “υποφάσεις”:
 - a. Πρωτοταγής ψύξη: Ψύξη κοντά στην τελική θερμοκρασία - και πάλι υπό την θερμοκρασία συνύπαρξης φάσεων.
 - b. Ανόπτηση: Παραμονή του υλικού σε υψηλότερη ενδιάμεση θερμοκρασία για μεγαλύτερο χρονικό διάστημα που επιτρέπει την κρυσταλλοποίηση παραγόντων διόγκωσης που μπορεί να έχουν προστεθεί στο υλικό, όπως η μανιτόλη.
 - c. Δευτεροταγής ψύξη: Ψύξη στην τελική θερμοκρασία και σύντομη παραμονή σε αυτήν.Τελικός σκοπός είναι η αποφυγή της κατάρρευσης του λυοφυλοποιημένου υλικού σε συνδυασμό με την επίτευξη του επιθυμητού μεγέθους πόρων και την ομοιογένεια τους σε όλο τον όγκο του υλικού.
2. Πρωτοταγής Αφυδάτωση: Μείωση πίεσης και ταυτόχρονη αύξηση της θερμοκρασίας ώστε να πραγματοποιηθεί η εξάχνωση, με αρκετά αργό ρυθμό ώστε να διατηρήσει το υλικό τις ιδιότητες και την δομή του. Τελική θερμοκρασία είναι πάντα χαμηλότερη του σημείου ισορροπίας 0°C . Σε αυτό το στάδιο εξαχνώνεται το μεγαλύτερο μέρος του υπάρχοντος νερού (~95%).
3. Δευτεροταγής Αφυδάτωση: 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%.



Εικόνα 24: Μεταβολές θερμοκρασίας στα διάφορα στοιχεία του λυοφιλοποιητή σε κάθε στάδιο της διαδικασίας – Κόκκινο: Θερμοκρασία Ραφίου, Πράσινο: Θερμοκρασία Υλικού, Μπλέ: Πίεση Θαλάμου, Γαλάζιο: Θερμοκρασία Συμπυκνωτή, Φάσεις: Ψύξη, Πρωτοταγής Αφυδάτωση, Δευτεροταγής Αφυδάτωση

Στην περίπτωση των ικριωμάτων κολλαγόνου, το υλικό που τοποθετείται στον λυοφιλοποιητή με σκοπό να υποστεί την διεργασία της λυοφιλοποίησης λέγεται εναιώρημα κολλαγόνου (collagen suspension).

Ακολουθεί συνοπτικά η διαδικασία παρασκευής του εναιωρήματος και της λυοφιλοποίησης του:

1. 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. 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.
2. Εισάγεται το εναιώρημα που προσκολλάται στο γυαλί στο ράφι του λυοφιλοποιητή και ξεκινά η εκτέλεση του προ-προγραμματισμένου πρωτοκόλλου. Κατά την 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 μιάμιση ώρα στην θερμοκρασία ανόπτησης. Κατά το στάδιο της αφυδάτωσης 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. [29][30][31] Η επίδραση των παραμέτρων του πρωτοκόλλου λυοφιλοποίησης στην δομή του υλικού έχει μελετηθεί και πειραματικώς και παρουσιάζεται στην επόμενη παράγραφο.

3.5.2 Χαρακτηρισμός Τριών Πρωτοκόλλων Λυοφιλοποίησης

Στα πλαίσια την διπλωματικής της εργασίας [5] στο Εργαστήριο Εμβιομηχανικής και Συστημικής Βιολογίας η κ. Σαρκίρη μελέτησε τον συσχετισμό μεταξύ πλήθους, ομοιομορφίας και μέσου μεγέθους πόρων με δύο παραμέτρους της διαδικασίας της λυοφιλοποίησης: τελική θερμοκρασία ψύξης, ρυθμού ψύξης.

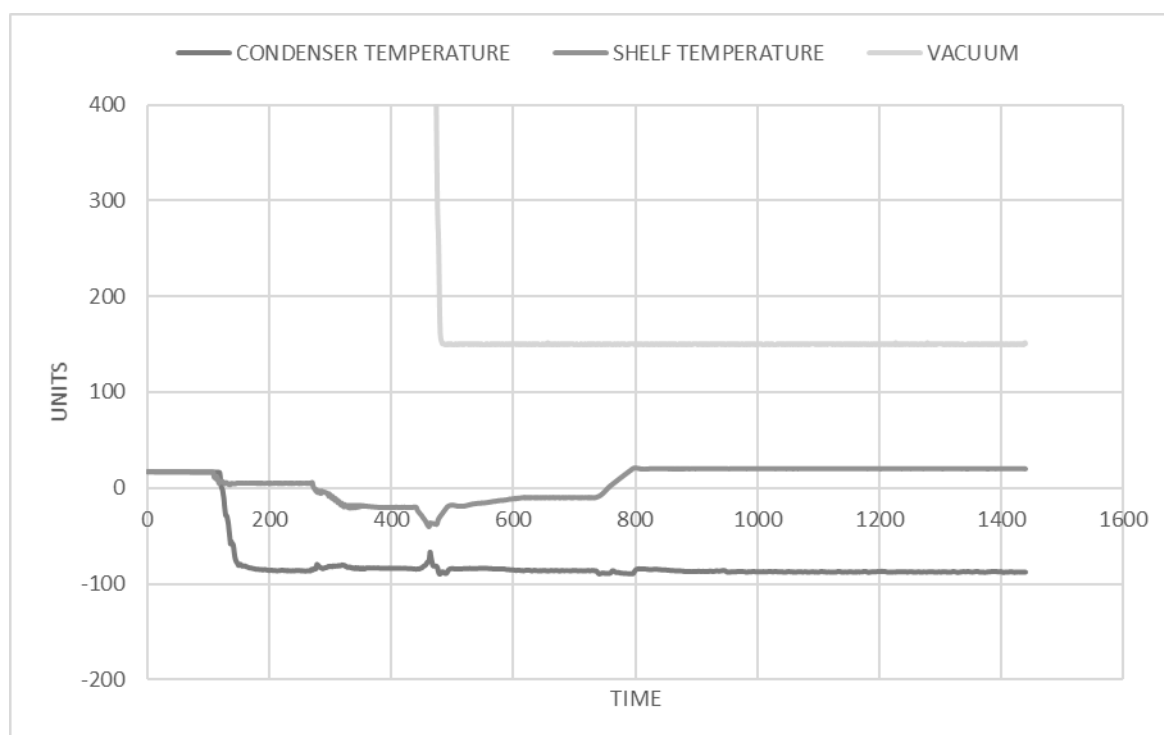
Για τελική θερμοκρασία ψύξης -40 βαθμών και ρυθμό ψύξης 0.5 °C/min παρατηρήθηκε σχετική ομοιογένεια του υλικού με μέσο μέγεθος πόρου περί τα 20 μm ως το βέλτιστο αποτέλεσμα.

Προσπαθώντας να κατανοηθεί η φυσική του προβλήματος ώστε να αποκτήσει το υλικό υψηλότερη ποιότητα εξετάζονται ΛΠΙΚ παρασκευασμένα με διαφορετικά πρωτόκολλα. Σημειώνεται επίσης η διαφορά χειροκίνητης εναπόθεσης από την κ. Σαρκίρη ενώ στην παρούσα εργασία η εναπόθεση υλοποιείται με τη ρομποτική διάταξη TECAN και γίνεται επίσης προσπάθεια ελέγχου του ρυθμού ψύξης περαιτέρω, μέσω εισαγωγής πλάκας ανοξειδωτου χάλυβα πάχους 3 mm στο ράφι του λυοφιλοποιητή και άφηση των καλυπτρίδων πάνω της για ελαφρά μείωση του ρυθμού ψύξης.

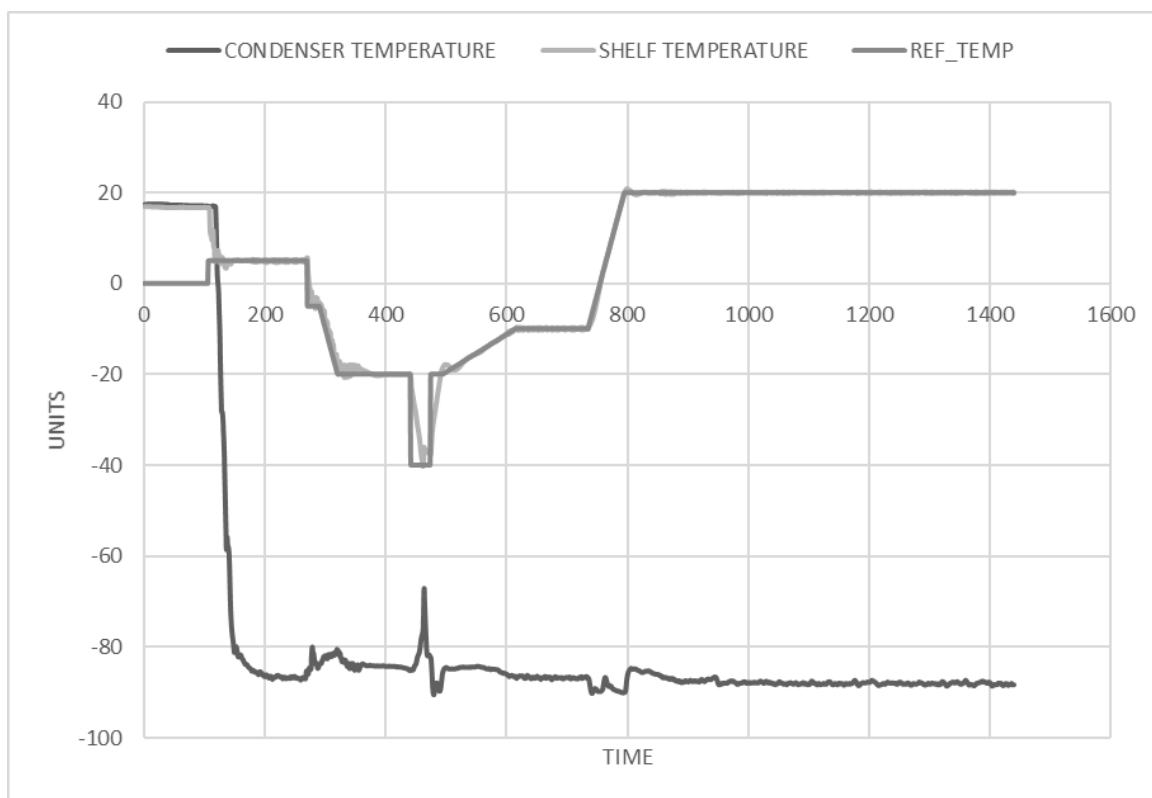
Πρωτόκολλο Λυοφιλοποίησης 1

1. Ψύξη έως την θερμοκρασία των -20 βαθμών με ρυθμό ~1°C/min
2. Ανόπτηση για 2 ώρες στην αυτή θερμοκρασία
3. Ταχεία ψύξη ως την θερμοκρασία των -45 βαθμών
4. Αφυδάτωση

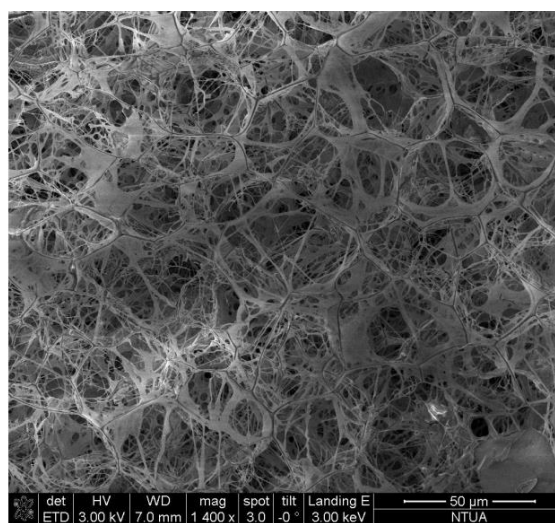
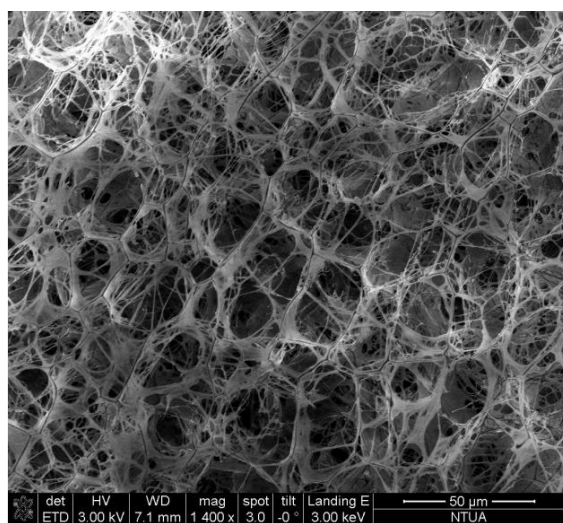
Ακολουθούν τα διαγράμματα απόκρισης του λυοφιλοποιητή (οριζόντιος άξων χρόνος, κάθετος μονάδες θερμοκρασίας °C ή πίεσης mbar αναλόγως το μέγεθος) καθώς και εικόνες των ικριωμάτων (Collagen – Collagen - GAG type) απο μικροσκόπιο ηλεκτρονικής σάρωσης SEM, με διαφορετικές ρυθμίσεις μεγένθυσης.



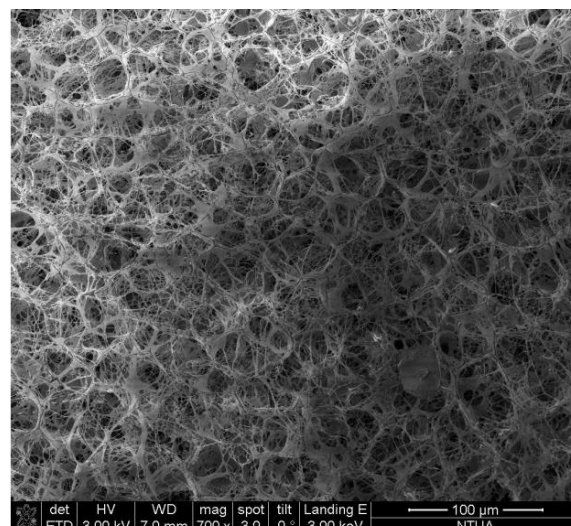
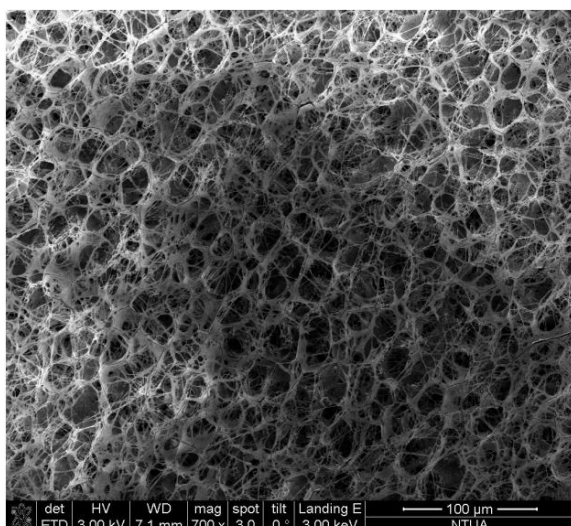
Εικόνα 25: Αποκρίσεις κενού, θερμοκρασίας τυμπάνου συμπυκνωτή και θερμοκρασίας ραφιού στο λυοφιλοποιητή (πρωτόκολλο 1)



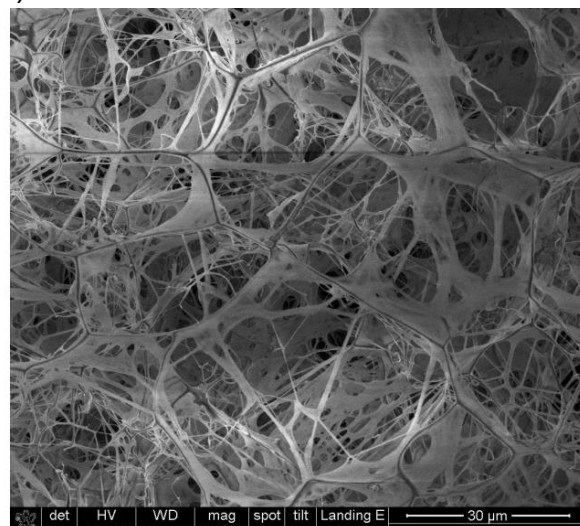
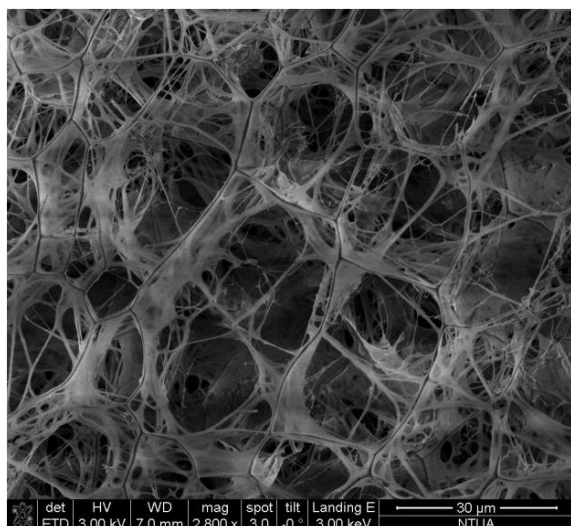
Εικόνα 26: Απόκριση θερμοκρασιών τυμπάνου και ραφιού συγκρινόμενου με την εντολή συστήματος στο λυοφιλοποιητή (πρωτόκολλο 1)



Εικόνα 27: Απεικόνιση ΛΠΙΚ (δείγματα 1&2) κολλαγόνου – γλυκαμινογλυκανών σε μεγενθύνη x700 (πρωτόκ. 1)



Εικόνα 28: Απεικόνιση ΛΠΙΚ (δείγματα 1&2) κολλαγόνου – γλυκαμινογλυκανών σε μεγενθύνη x1400 (πρωτόκ. 1)



Εικόνα 29: Απεικόνιση ΛΠΙΚ (δείγματα 1&2) κολλαγόνου – γλυκαμινογλυκανών σε μεγενθύνη x2800 (πρωτόκ.1)

Για τη μέτρηση των πόρων και την εξαγωγή της μέσης διαμέτρου πόρου χρησιμοποιήθηκε το λογισμικό imageJ. Μετρήθηκαν σε pixel (με υπέρθεση ελλείψεων) τα ανοίγματα των πόρων και μετρατράπηκαν στις διαστάσεις τους σε μm. Παράγονται ικρίσματα κολλαγόνου με μέγεθος πόρου $32.21 \pm 1.43 \mu\text{m}$ και κολλαγόνου με γλυκαμινογλυκάνες με μέγεθος πόρου $38.55 \pm 2.21 \mu\text{m}$ (μέση τιμή διαμέτρου και τυπική απόκλιση του μέσου).

Η αυτόματη εναπόθεση έχει αυξήσει την ομοιογένεια των πόρων καθώς και την ομοιότητα των δομών διαφορετικών ικριωμάτων.

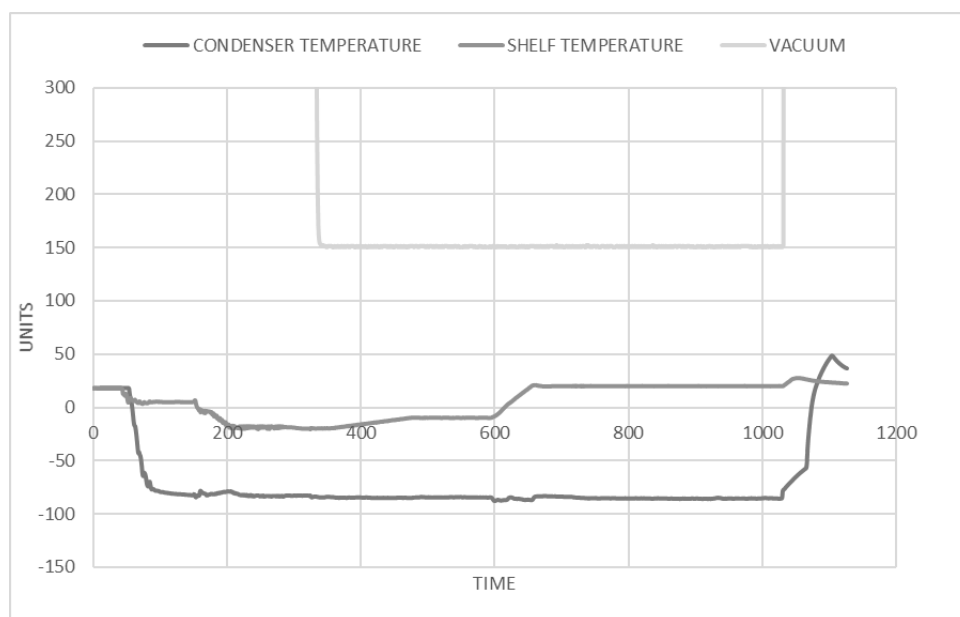
Η παρούσα εκδοχή του υλικού ήταν και αυτή που παράχθηκε κατά τον μεγαλύτερο όγκο και χρησιμοποιήθηκε σε πειράματα χρηστών, με τα κύτταρα να εισχωρούν πλήρως και να αναπτύσσονται (πλήρης παρουσίαση των εφαρμογών στο κεφάλαιο 4).

Αποτέλεσε έτσι τον κύριο τύπο ικριωμάτων που χρησιμοποιούνται στο Εργαστήριο Συστημικής Βιολογίας του ΕΜΠ.

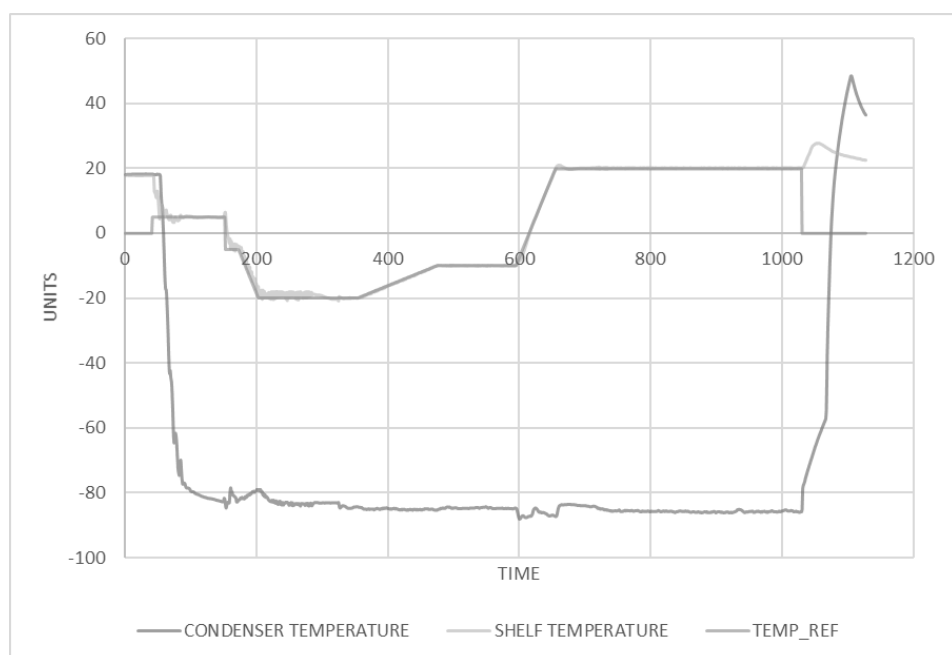
Πρωτόκολλο Λυοφιλοποίησης 2

1. Ψύξη έως την θερμοκρασία των -20 βαθμών με ρυθμό $\sim 1^{\circ}\text{C}/\text{min}$
2. Ανόπτηση για 2 ώρες στην αυτή θερμοκρασία
3. Αφαίρεση του βήματος ταχείας ψύξη ως την θερμοκρασία των -45 βαθμών
4. Αφυδάτωση

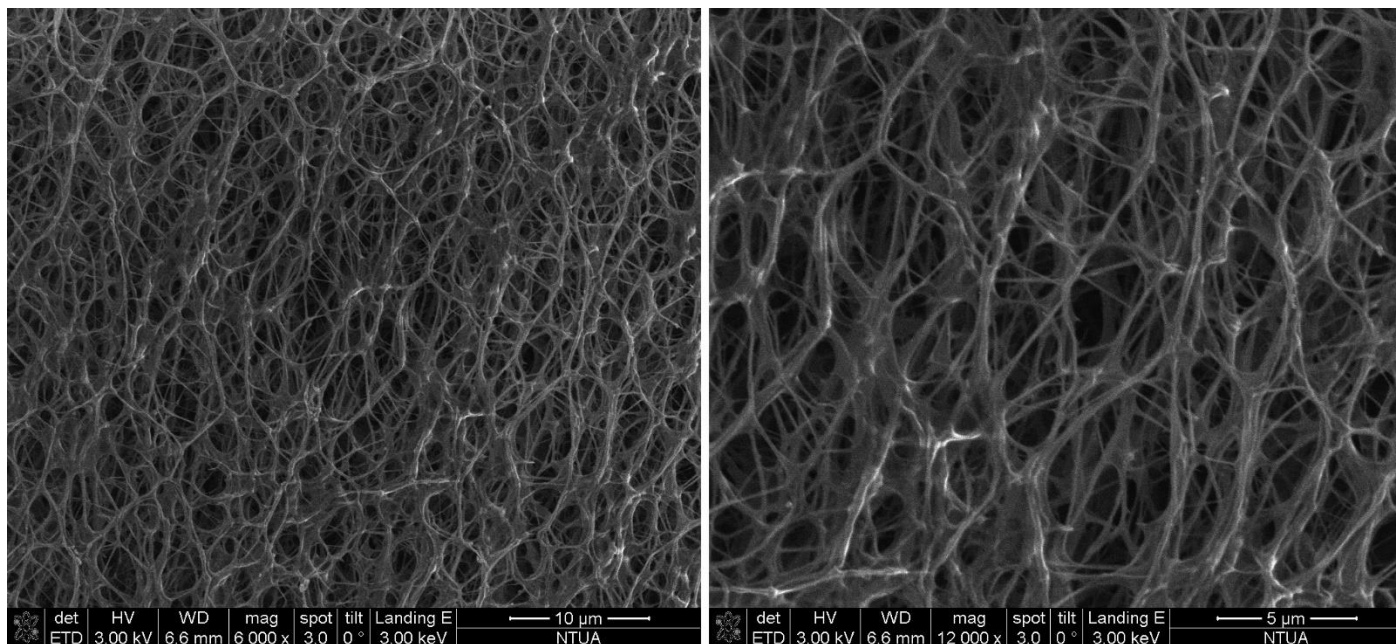
Ακολουθούν τα διαγράμματα απόκρισης του λυοφιλοποιητή (οριζόντιος άξων χρόνος, κάθετος μονάδες θερμοκρασίας $^{\circ}\text{C}$ ή πίεσης mbar αναλόγως) , εικόνες των ικριωμάτων (C & CG type) απο μικροσκόπιο ηλεκτρονικής σάρωσης SEM, με διαφορετικές ρυθμίσεις μεγένθυνσης και σύγκριση με το πρωτόκολλο 1.



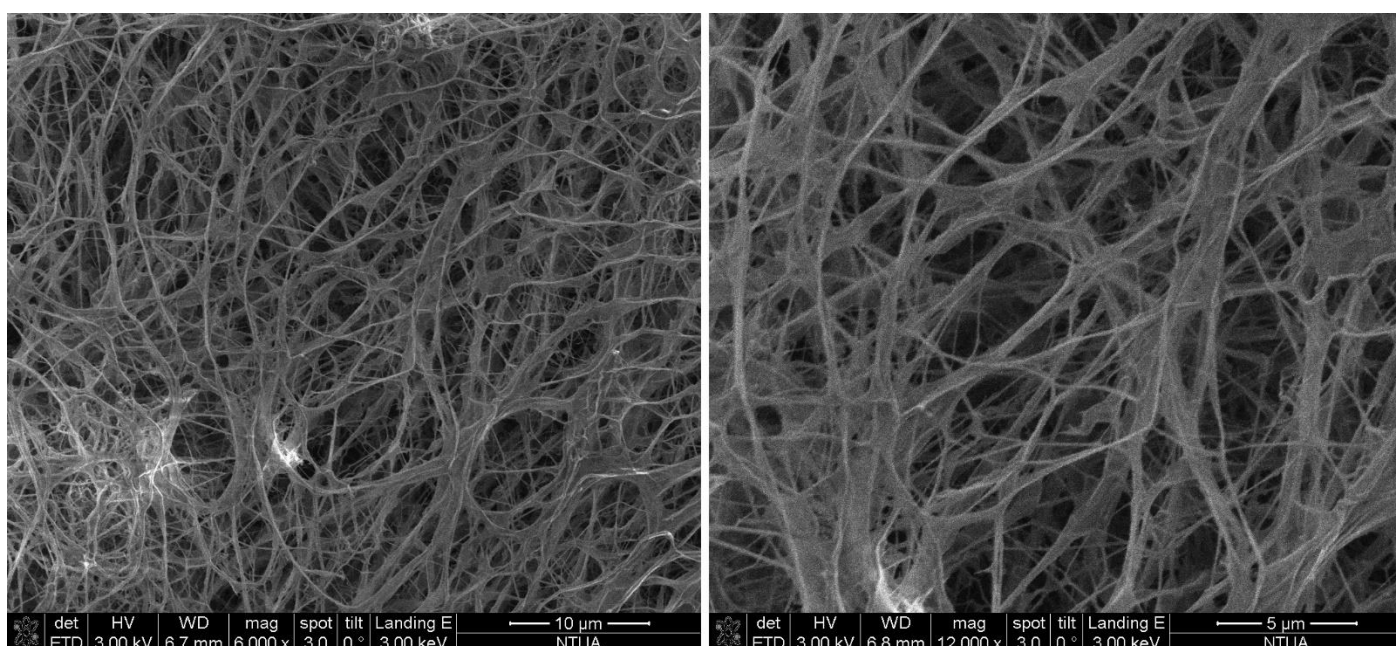
Εικόνα 30: Αποκρίσεις κενού, θερμοκρασίας τυμπάνου συμπυκνωτή και θερμοκρασίας ραφιού στο λυοφιλοποιητή (πρωτόκολλο 2)



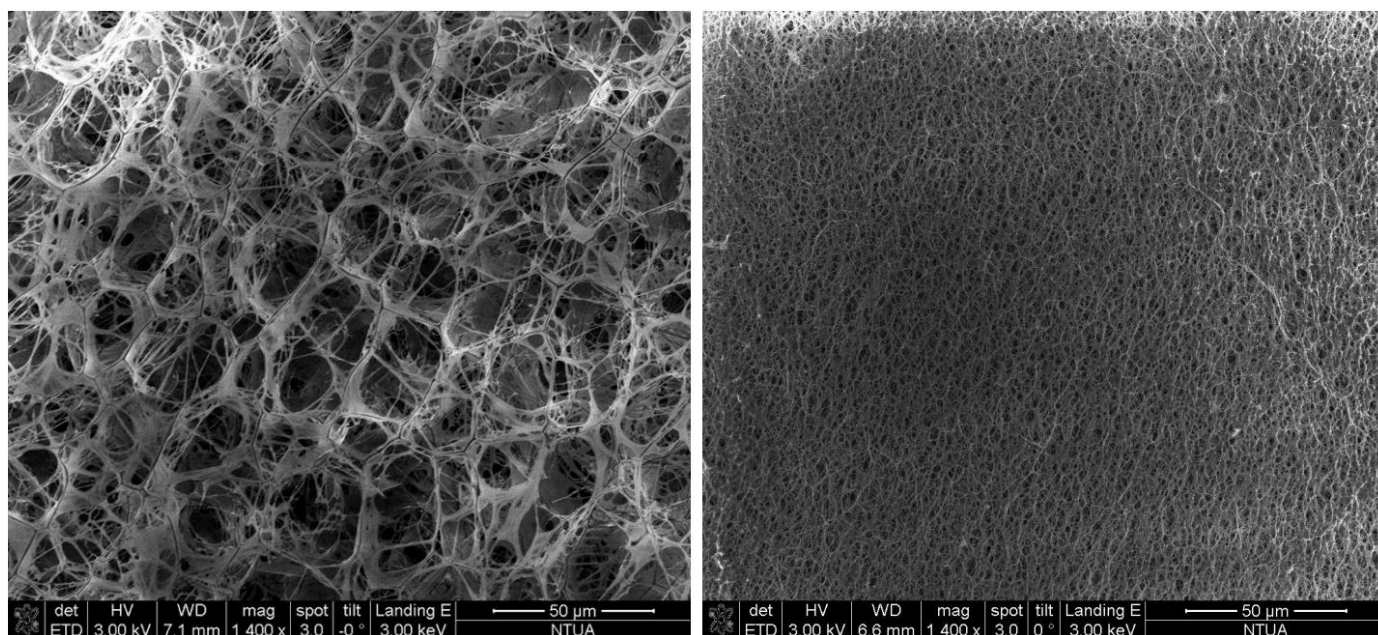
Εικόνα 31: Απόκριση θερμοκρασιών τυμπάνου και ραφιού συγκρινόμενου με την εντολή συστήματος στο λυοφιλοποιητή (πρωτόκολλο 2)



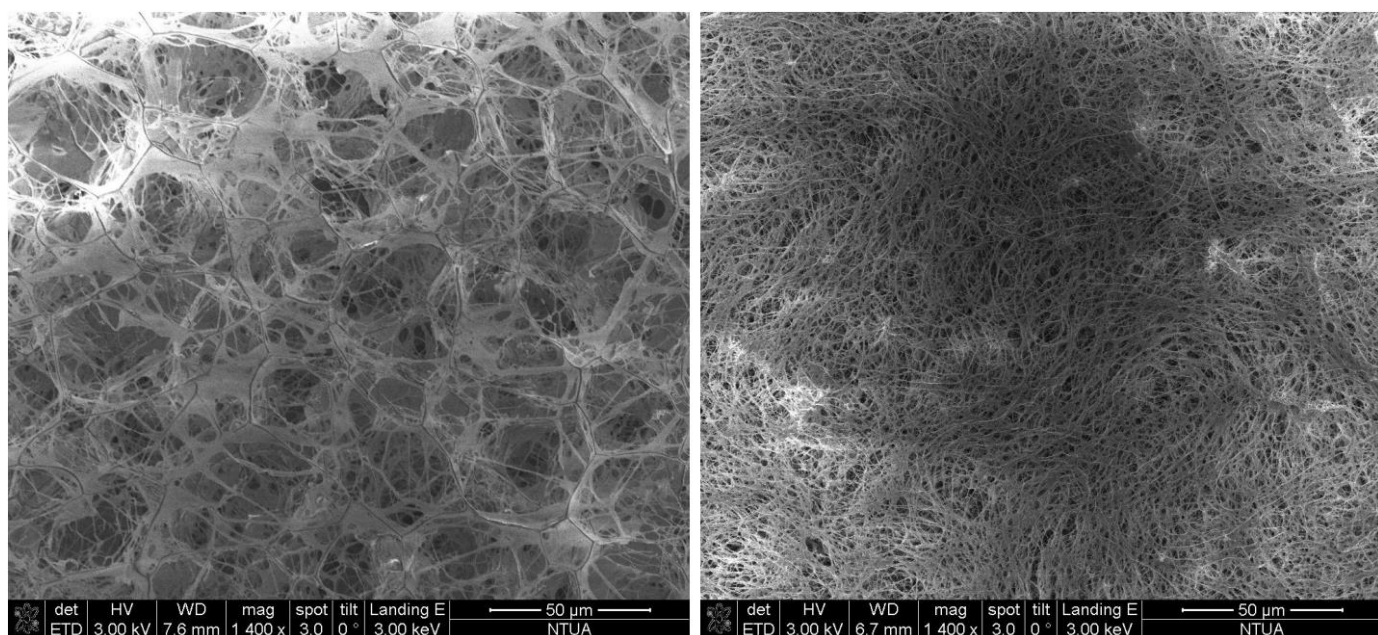
Εικόνα 32: Απεικόνιση ικριωμάτων κολλαγόνου σε μεγενθύνσεις x6000/x12000 (πρωτόκολλο 2)



Εικόνα 33: Απεικόνιση ικριωμάτων κολλαγόνου - γλυκαμινογλυκανών σε μεγενθύνσεις x6000/x12000 (πρωτόκ. 2)



Εικόνα 34: Σύγκριση ικτριωμάτων κολλαγόνου ανάμεσα στα πρωτόκολλα 1(αριστερά) & 2(δεξιά)



Εικόνα 35: Σύγκριση ικτριωμάτων κολλαγόνου – γλυκαμινογλυκανών ανάμεσα στα πρωτόκολλα 1(αριστερά & 2 δεξιά)

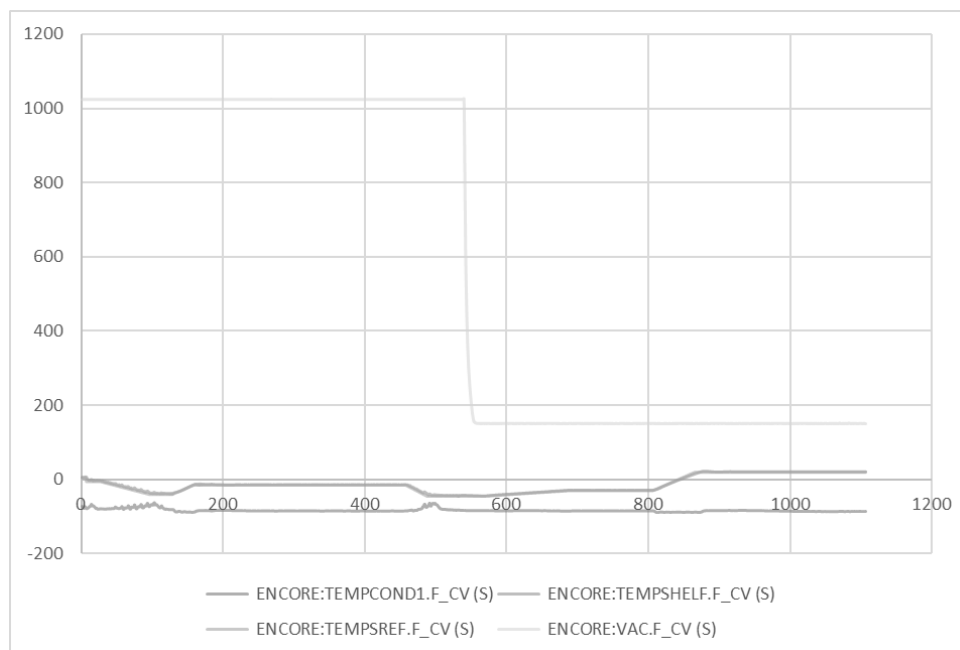
Αποτέλεσμα των παραμέτρων που τέθηκαν σε αυτό το πρωτόκολλό ήταν να μην υπάρχει μεγάλο πλήθος πόρων άρα και κρυστάλλωση, αλλά λόγω του ότι η αφυδάτωση δεν συντελέστηκε σε θερμοκρασία χαμηλότερη της υαλώδους μετάβασης του υλικού, αυτό κατέρρευσε με αποτέλεσμα το μέσο πορώδες να είναι σημαντικά μικρότερο σε σχέση με το πρωτόκολλο 1– $4.62 \pm 0.34 \mu\text{m}$ (C) και $4,83 \pm 0.26 \mu\text{m}$ (CG). Επίσης δεν υπάρχει και συνεισφορά στη διόγκωση των κρυστάλλων μετά την δημιουργία τους λόγω χαμηλότερων θερμοκρασιών.

Ωστόσο, αν και ακατάλληλα για καλλιέργεια, υλικά τέτοιας μορφής μπορεί να είναι χρήσιμα ως κατεργάσιμα με μικροκατεργασίες (π.χ. Laser) για χρήση σε διατάξεις chip.

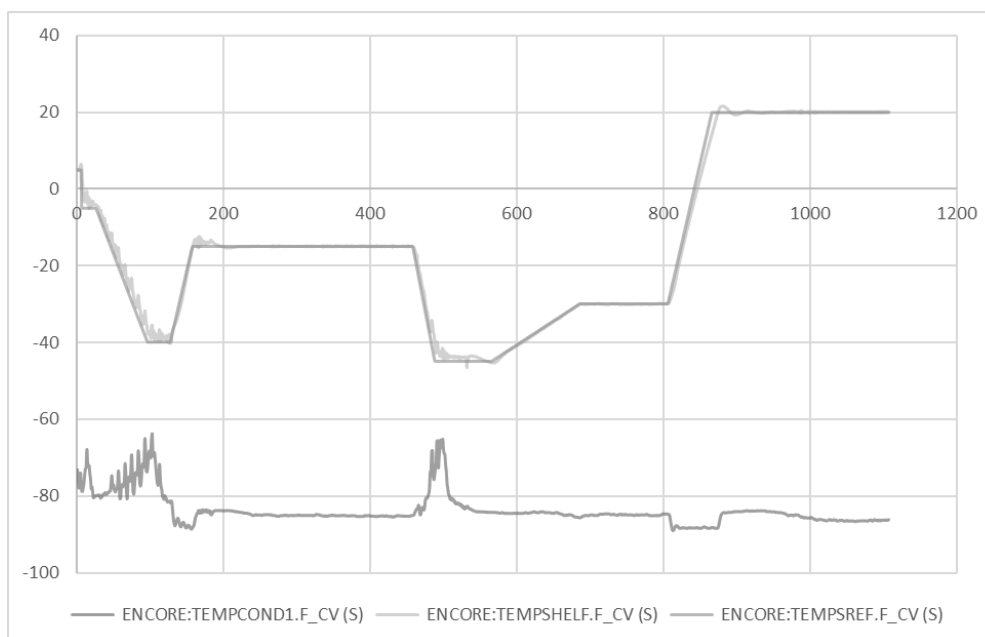
Πρωτόκολλο Λυοφιλοποίησης 3

1. Ψύξη έως την θερμοκρασία των -40 βαθμών με ρυθμό $\sim 1^{\circ}\text{C}/\text{min}$
2. Ανόπτηση για 2 ώρες στην θερμοκρασία των -15 βαθμών
3. Τελική Ψύξη στη θερμοκρασία των -45 βαθμών και σύντομη παραμονή εκεί
4. Αφυδάτωση

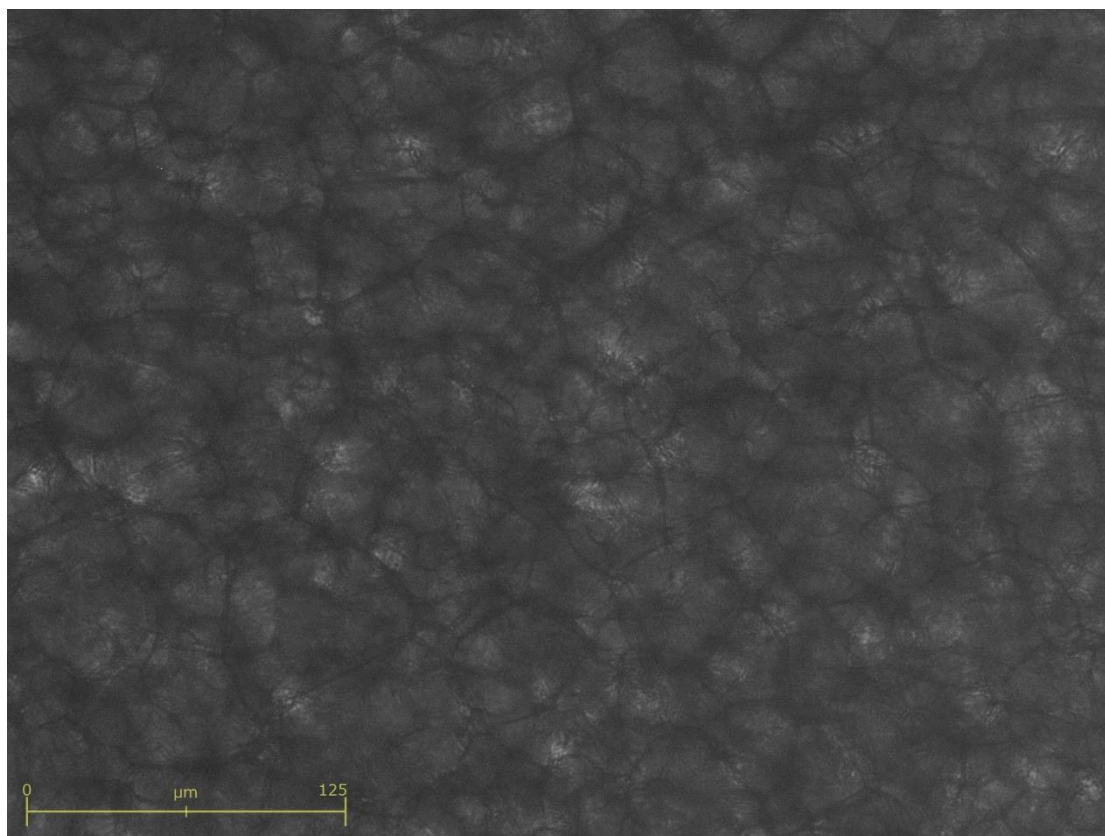
Ακολουθούν τα διαγράμματα απόκρισης του λυοφιλοποιητή (οριζόντιος άξων χρόνος, κάθετος μονάδες θερμοκρασίας $^{\circ}\text{C}$ ή πίεσης mbar αναλόγως το μέγεθος), εικόνες των ικριωμάτων (Collagen – CAG type) απο το μικροσκόπιο φθορισμού του εργαστηρίου συστημικής βιολογίας του ΕΜΠ – JuLi stage.



Εικόνα 36: Αποκρίσεις κενού, θερμοκρασίας τυμπάνου συμπυκνωτή και θερμοκρασίας ραφιού στο λυοφιλοποιητή (πρωτόκολλο 3)



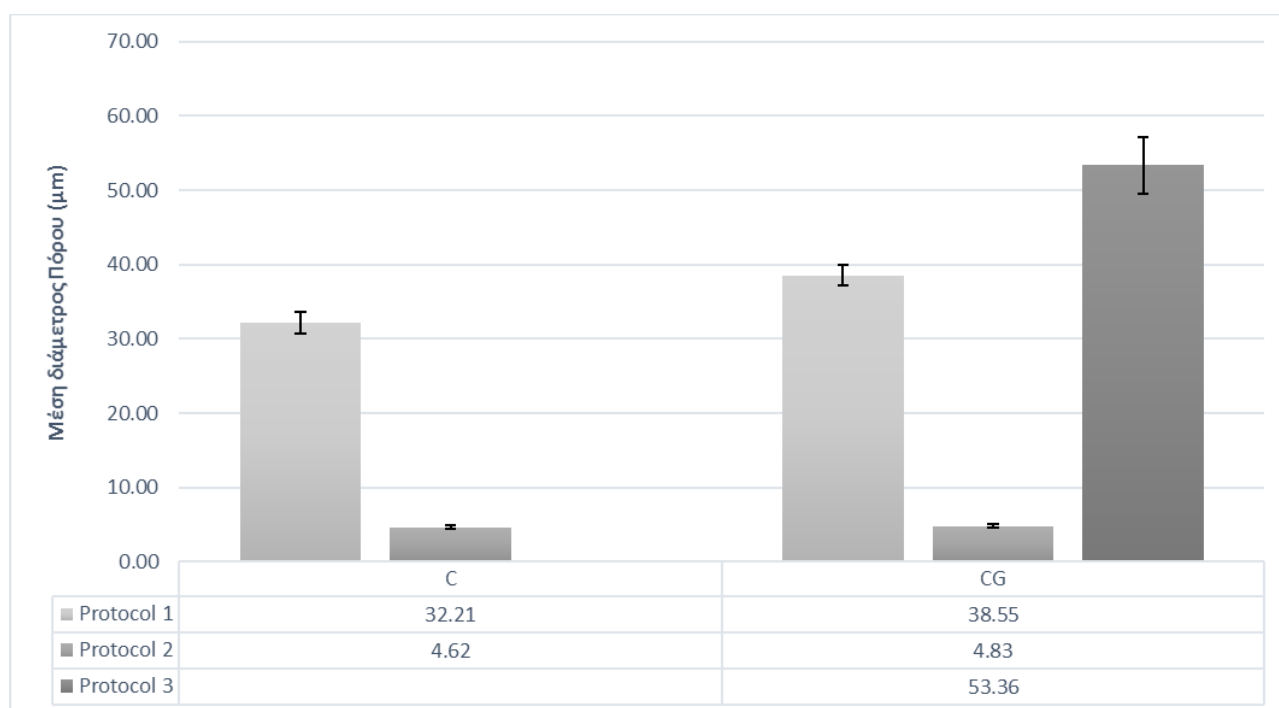
Εικόνα 37: Απόκριση θερμοκρασιών τυμπάνου και ραφιού συγκρινόμενου με την εντολή συστήματος στο λυοφιλοποιητή (πρωτόκολλο 3)



Εικόνα 38: Απεικόνιση ικριώματος κολλαγόνου – γλυκαμινογλυκανών στο μικροσκόπιο JuLi Stage του εργαστηρίου (Bright Channel, 20x Magnification) (Πρωτόκολλο 3)

3.5.3 Αποτελέσματα

Παρατίθενται συνοπτικά τα αποτελέσματα σε γράφημα ως μέση τιμή πόρου και τυπική απόκλιση του μέσου. Αναλυτικά οι μετρήσεις στο παράρτημα Β, χωρίο Β.1.



Πίνακας 3: Μέση διάμετρος πόρου ικριωμάτων υλικού C & CG ανάλογα με το πρωτόκολλο λυοφιλοποίησης

3.5.4 Συμπεράσματα

Η στατιστική επεξεργασία των μετρήσεων με τη μέθοδο ANOVA καθιστά σαφές πως οι παράμετροι του πρωτοκόλλου επηρεάζουν σε μεγάλο βαθμό την τελική διάμετρο πόρου των υλικών, ενώ η διαφορά της σύστασης τους δεν φαίνεται να έχει μεγάλη επίδραση, ωστόσο χρειάζεται μεγαλύτερος όγκος πειραματικών δεδομένων για να απαντηθεί το ερώτημα επακριβώς.

Η επιβεβαίωση της συσχέτισης (p value statistically significant) συμφωνεί με τις αρχικές μας υποθέσεις για τη φυσική του προβλήματος. Μεταβάλλοντας τις τελικές θερμοκρασίες ψύξης, τη θερμοκρασία και το χρόνο ανόπτησης και έπειτα τους ρυθμούς απόψυξης και το συνολικό χρόνο αφυδάτωσης μπορεί κανείς να παραμετροποιήσει το υλικό του ανάλογα με την επιθυμητή εφαρμογή.

Για την παρούσα μελέτη επιτεύχθηκε η ανάπτυξη του ζητούμενου υλικού με μέση πορότητα περί τα 50 μm , και μέσω των πειραμάτων ευρέθηκε τρόπος παρασκευής υλικού επιθυμητού για κατεργασία.

Στους παρακάτω πίνακες παραθέτονται τα αποτελέσματα της στατιστικής επεξεργασίας:

Coefficients:				
	Estimate	Std. Error	t value	Pr(> t)
(Intercept)	33.744	1.834	18.401	< 2e-16 ***
Protocol2c	-30.654	2.117	-14.477	< 2e-16 ***
Protocol3c	16.34	2.801	5.833	5.14e-07 ***
MaterialCG	3.275	2.117	1.547	0.129

Signif. codes: 0 '***' 0.001 '**' 0.01 '*' 0.05 '.' 0.1 ' ' 1				
Residual standard error: 6.696 on 46 degrees of freedom				
Multiple R-squared: 0.8991, Adjusted R-squared: 0.8925				
F-statistic: 136.6 on 3 and 46 DF, p-value: < 2.2e-16				

Πίνακας 4: Στατιστική Ανάλυση αποτελεσμάτων μέτρηση πόρων ικρωμάτων

Analysis of Variance Table					
Response:	Diameter				
	Df	Sum Sq	Mean Sq	F value	Pr(>F)
Protocol	2	18270.6	9135.3	203.7503	<2e-16 ***
Material	1	107.2	107.2	2.3918	0.1288
Residuals	46	2062.4	44.8		

Signif. codes: 0 '***' 0.001 '**' 0.01 '*' 0.05 '.' 0.1 ' ' 1					

Πίνακας 5: Συμπυκνωμένη παρουσίαση αποτελεσμάτων στατιστικής ανάλυσης ANOVA στα δείγματα των οποίων μετρήθηκαν οι πόροι

Ευχαριστίες για τις εικόνες που ελήφθησαν από τον κ. Φοίβο Χατζηδημητρίου (τμήμα Χημικών Μηχανικών ΕΜΠ) στα πλαίσια εκπόνησης της διπλωματικής του εργασίας στο εργαστήριο Εμβιομηχανικής και Συστημικής Βιολογίας του Εθνικού Μετσόβιου Πολυτεχνείου και για τον Δρ. Τσουκαλά του Τομέα Φυσικής ΕΜΠ, υπεύθυνο για το SEM, για την παροχή των δυνατοτήτων του μικροσκοπίου.

3.6 Ενεργοποίηση Επιφανειών μέσω Πλάσματος

3.6.1 Φυσικές Αρχές

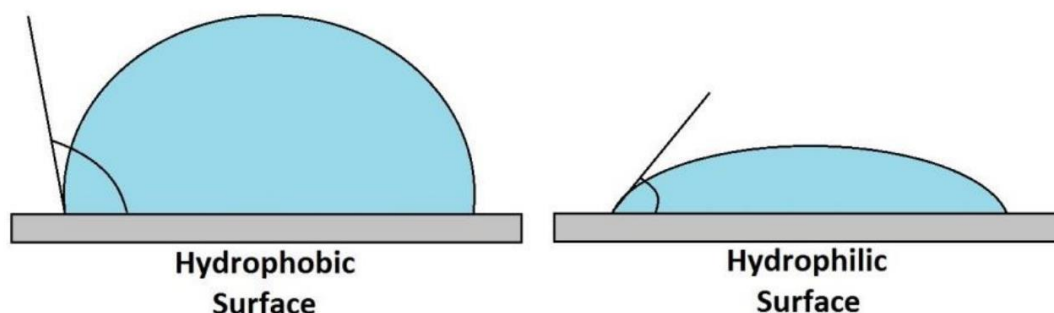
Το πλάσμα χαρακτηρίζεται ως η τέταρτη κατάσταση της ύλης. Θεωρείται ως ένα ιονισμένο αέριο, αποτελούμενο από ελεύθερα ηλεκτρόνια και ιόντα. Δε λαμβάνει ακριβή όγκο και σχήμα αλλά παρουσιάζει διαφορετική συμπεριφορά από τα αέρια. Είναι καλός αγωγός του ηλεκτρισμού και μάλιστα το σχήμα και ο όγκος του 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 οξείδωση των επιφανειών που εκτίθενται στη διεργασία και την υδροξυλίωσή τους, δηλαδή των σχηματισμό ομάδων OH^- στην επιφάνεια. Ως αποτέλεσμα αυξάνεται η υδροφιλικότητα της επιφάνειας. [s4] 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 της κόλλησης, ιδίως ο χρόνος έκθεσης στην διεργασία του πλάσματος. Επίσης, θεωρείται ότι γενικώς το πλάσμα οξυγόνου φέρει καλύτερα αποτελέσματα στις περιπτώσεις κόλλησης καθώς ο ατμοσφαιρικός αέρας δεν έχει πλήρως σταθερή σύσταση σε καθημερινή βάση. [s2] Η ένταση του πλάσματος μπορεί να διαπιστωθεί σε πρώτο στάδιο από την παρατήρηση του χρώματος που επικρατεί στον θάλαμο που εκτελείται η διεργασία. [s2] Για παράδειγμα, στο πλάσμα οξυγόνου το χρώμα στον θάλαμο είναι γαλαζωπό ενώ στο ατμοσφαιρικό πλάσμα το χρώμα αναμένεται ροζ-ανοιχτό μωβ (εικόνες 39 & 40)[37]. Επιπλέον, όσο αποτελεσματικότερη είναι η πρόσδοση υδροφιλικότητας από το πλάσμα, τόσο περισσότερο η έπειτα εγχέομενη σταγόνα τείνει να απλωθεί σε όλο το υδρόφιλο μέρος (μικρότερη γωνία επαφής). [s3] Σε αντίθεση, σε μια υδρόφοβη επιφάνεια η σταγόνα θα συσσωρευτεί σε μια σφαίρα ακριβώς στο σημείο έγχυσης (εικόνα γ).



Εικόνα 39: Ο θάλαμος του PlasmaEtcher του Εργαστηρίου Εμβιομηχανικής και Συστημικής Βιολογίας κατά την διεργασία του πλάσματος ατμοσφαιρικού αέρα



Εικόνα 40: Εικόνες Θαλάμου πλάσματος: α) προ ανάφλεξης, β) ανάφλεξη με ατμοσφαιρικό αέρα, γ) ανάφλεξη με οξυγόνο [37]



Εικόνα 41: Γωνία επαφής σταγόνας σε υδρόφοβη και υδρόφιλη επιφάνεια [s2]

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 κόλλησης, εκμεταλλεύεται η παρούσα εργασία για την δημιουργία των συσκευών ΛΠΙΚ. Οι ακριβείς συνθήκες και τα υλικά που χρησιμοποιήθηκαν προς αυτό το σκοπό περιέχονται παρακάτω στο παράρτημα Α, χωρίο Α3.

3.6.2 Βελτιστοποίηση & Χαρακτηρισμός

Για την λειτουργικότητα των συσκευών που κατασκευάζονται σημαντικό είναι να είναι η σύνδεση των εξαρτημάτων μόνιμη και σταθερή. Οι ομοιοπολικόι σταυροδεσμοί που δημιουργούνται μεταξύ των ελεύθερων ομάδων που σχηματίζονται στις επιφάνειες των πυριτιούχων υλικών (PDMS, γυαλί) λόγω της κατεργασίας με πλάσμα είναι ένας ικανοποιητικός τρόπος να επιτευχθεί η σύνδεση.[37] Εμφανίζονται ωστόσο πρακτικά προβλήματα:

1. Επιλογή αερίου πλάσματος
 - Οξυγόνο, ατμοσφαιρικός αεράς ή άλλα αέρια έχουν διαφορετική επίδραση στο αποτέλεσμα της κατεργασίας.
 - Στο εργαστήριο συστημικής βιολογίας έγινε χρήση ατμοσφαιρικού αέρα καθώς δεν διατίθονταν κάποιο άλλο αέριο, οπότε στην εφαρμογή αυτή έπρεπε να συνυπολογίζεται η επίπτωση της διαφορετικής σύστασης του ατμοσφαιρικού αέρα ανα τις ημέρες στην επαναληψιμότητα της διαδικασίας. [5]
2. Επιλογή χρόνου κατεργασίας.
 - Ανεπάρκεια του χρόνου κατεργασίας σημαίνει μικρή πυκνότητα των ομάδων OH- στις επιφάνειες, ουσιαστικά ανεπαρκής ενεργοποίηση τους. Ωστόσο και υπερβολική έκθεση των επιφανειών στο πλάσμα έχει ανεπιθύμητο αποτέλεσμα τα τραχειά επιφανειακά στρώματα που εμποδίζουν την σύνδεση μεταξύ των επίπεδων επιφανειών των εξαρτημάτων. [37]
3. Επιλογή συχνότητας ραδιοκυμάτων / Ισχύος γεννήτριας ραδιοκυμάτων – **RF Frequency / RF Power setting**.
 - Απο τη βιβλιογραφία [37] αναφέρεται ότι πλάσμα που παράγεται σε συχνότητες τάξεως των MHz (13.56MHz) σε μέση παροχή ισχύος (~40W) αποφέρει τις ευνοϊκότερες συνθήκες το βέλτιστο εύρος χρόνου για επιτυχημένη κατεργασία. Ο θάλαμος που διατίθεται στο εργαστήριο διαθέτει γεννήτρια των 40KHz μεταβλητής ισχύος έως και 400W.

Συνεπώς, σκοπός είναι να επιλεγούν ρυθμίσεις στο θάλαμο πλάσματος ώστε να είναι κατα το δυνατόν μεγαλύτερος ο “φάκελος” χρόνου για επιτυχημένες εφαρμογές, ώστε να προλαμβάνονται λοιπά σφάλματα και αποκλίσεις και να υπάρχει ένα γενικευμένο και επαναλήψιμο πρωτόκολλο κατεργασίας.

Για το σκοπό αυτό εκτελέστηκε πείραμα όπου δοκιμάστηκαν διάφορες ρυθμίσεις (χρόνος κατεργασίας, ισχύς RF πλάσματος, πίεση θαλάμου) για να αναγνωριστεί η περιοχή λειτουργίας του θαλάμου και η επίπτωση του κάθε φυσικού μεγέθους στο αποτέλεσμα της κατεργασίας.

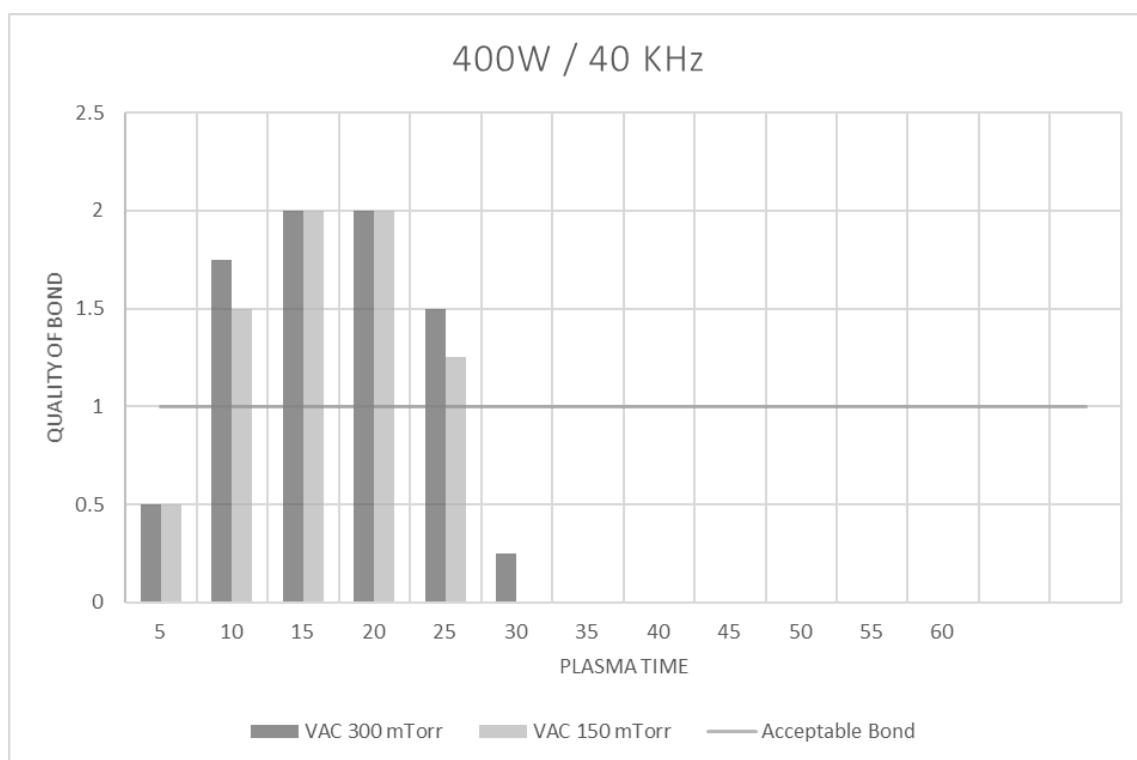
Ακολουθούν τα αποτελέσματα του πειράματος (Πίνακες αναλυτικά στο Παράρτημα Β, χωρίο Β.3)

3.6.3 Πειραματικά αποτελέσματα

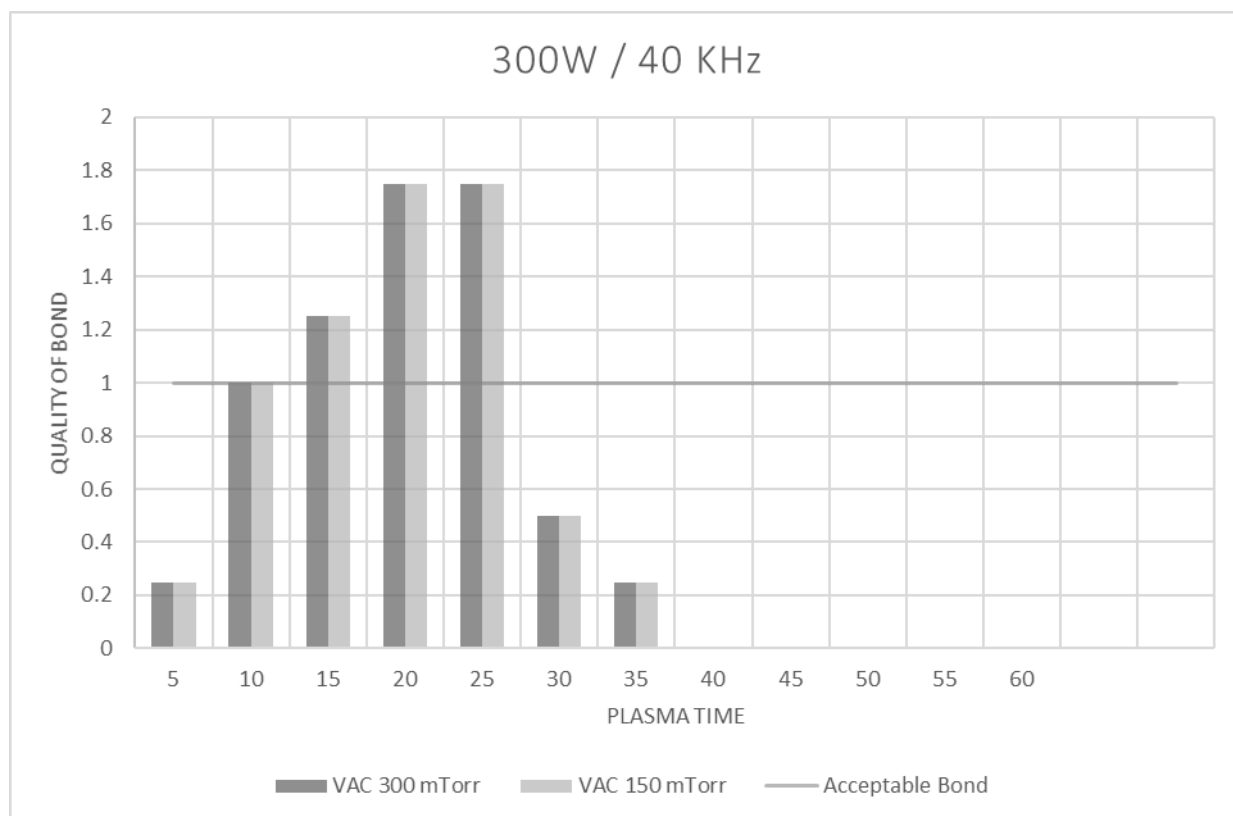
Κόλληση

Το πείραμα εκκίνησε με τις παραμέτρους του προϋπάρχοντος πρωτοκόλλου που παρουσίασε η κ. Σαρκίρη [5]. Με μέγιστη ισχύ δοκιμάστηκαν κύκλοι κατεργασίας διαφόρων χρόνων σε δύο διαφορετικές πιέσεις θαλάμου. Η αξιολόγηση της κόλλησης είναι ποιοτική, καθώς δεν διατίθεται διάταξη μέτρησης της δύναμης που συγκρατεί τα εξαρτήματα. Ορίζεται με έναν βαθμό ποιότητας αυθαίρετα από 0-2, όπου 0 η μηδενική κόλληση, 1 η μόλις αποδεκτή – μικρή άσκηση δύναμης αφαιρεί την υπερκατασκευή - και 2 η ισχυρή όπου είναι αδύνατη η αφαίρεση χωρίς θραύση της καλυπτρίδας. Ως μερικώς αποδεκτή κόλληση τέθηκε η 1 καθώς με ευαίσθητους χειρισμούς η συσκευή παραμένει στεγανή και μπορεί να χρησιμοποιηθεί για πείραμα.

Μετά τον πρώτο κύκλο δοκιμάστηκε και μείωση της ισχύος στα $\frac{3}{4}$ της αρχικής. Ωστόσο ως αναμενόταν η επίδραση δεν ήταν ιδιαίτερος σημαντική, καθώς η συχνότητα της γεννήτριας δεν μπορεί να αλλάξει ώστε να βρίσκεται στο πεδίο 50W , 13.36 MHz.



Εικόνα 42: Απόδοση Κόλλησης για πλήρη ισχύ γεννήτριας σε πίεση 300/150 mTorr για χρόνους από 5 έως 60 δευτερόλεπτα



Εικόνα 43: Απόδοση Κόλλησης για πλήρη ισχύ γεννήτριας σε πίεση 300/150 mTorr για χρόνους από 5 έως 60 δευτερόλεπτα

3.6.4 Συμπεράσματα

Επιβεβαιώνεται πως κύρια παράμετρος ενδιαφέροντος είναι ο χρόνος κατεργασίας και έπειτα λιγότερο η ισχύς, τουλάχιστον για τον εξοπλισμό που διαθέτει το εργαστήριο.

Η περιοχή λειτουργίας καθορίζεται από 10 έως περίπου 23 δευτερόλεπτα για την πλήρη ισχύ και 15 με 27 για μικρότερη όπως αναμενόταν και σύμφωνα με τη φυσική διεργασία.

Προτείνεται η διατήρηση της γεννήτριας σε πλήρη ισχύ για το δυνατό μικρότερο χρόνο κατεργασίας και για αποφυγή σφαλμάτων λόγω ελλειπούς βαθμονόμησης του μηχανήματος.

Επίσης παρά τη φαινομενικά βέλτιστη τιμή χρόνου κατεργασίας των 15 με 17 δευτερολέπτων πρέπει να ληφθεί υπόψη πως σημαντικός εξωτερικός παράγων της ποιότητας της ατμόσφαιρας στο θάλαμο, άρα και του πλάσματος, είναι η αντλία κενού που την φέρνει στην καθορισμένη πίεση. Το πείραμα εκτελέστηκε μετά από συντήρηση και καθαρισμό της διάταξης και αυτή βρέθηκε στην βέλτιστη κατάστασή της.

Συνυπολογίζοντας την φθορά και την πτώση απόδοσης αντλίας και γεννήτριας πλάσματος με το χρόνο προτείνεται να παραμείνουν οι παράμετροι του πρωτοκόλλου ως έχουν καθώς για το σύνολο του χρόνου λειτουργίας μεταξύ συντηρήσεων (ειδικά αν αυτές καθυστερούν από το καθορισμένο χρονοδιάγραμμα) η τιμή των 20 δευτερολέπτων σε πλήρη ισχύ θα καλύπτει τις ανάγκες κόλλησης καθώς η περιοχή λειτουργίας θα μετατίθεται συνεχώς προς τα δεξιά του διαγράμματος με την πάροδο του χρόνου.

3.7 Δημιουργία Σταυροδεσμών στα Λεπτά Πορώδη Ικρίώματα

3.7.1 Φυσικές Αρχές

Για την αύξηση της μηχανικής αντοχής των ΛΠΙΚ και της αντοχής τους στην αποικοδόμηση είναι αναγκαία η δημιουργία σταυροδεσμών. Λόγω της δυσκολίας υλοποίησης (απομάκρυνση χημικών ουσιών crosslinking) σε συνδυασμό με πιθανή κυτταροτοξικότητα που επιφέρεται στο υλικό οι χημικές μέθοδοι αποφεύγονται.

Στην συγκεκριμένη μελέτη έχει επιλεγεί η μέθοδος DHT (Dehydrothermal Treatment), για τη φυσική δημιουργία σταυροδεσμών. Με αυτή τη μέθοδο το υλικό τίθεται σε υψηλή θερμοκρασία σε σχετικό κενό (105°C/50 m Torr) και δημιουργούνται ομοιοπολικοί δεσμοί μεταξύ των πολυμερικών αλυσίδων του κολλαγόνου. [28]

Φυσικά η αύξηση θερμοκρασιών και χρόνου έκθεσης ενισχύει το φαινόμενο, αλλά και το βαθμό μετουσίωσης του υλικού και την υδροφοβικότητα του ικριώματος. Εφόσον δεν κατασκευάζονται δομικά πολυμερή αλλά χρειάζονται οι ιδιότητες του κολλαγόνου και η δυνατότητα να απορροφούν το θεραπευτικό μέσο ψτα ικρίώματα, χρειάζεται ένας βέλτιστος συμβιβασμός ανάμεσα στην εξάπλωση των σταυροδεσμών και τη δομική ενίσχυση, αλλιώς αχρηστεύεται το ικρίωμα.

Η προσπάθεια βελτιστοποίησης του πρωτοκόλλου για αυτό το σκοπό παρουσιάζεται παρακάτω.

3.7.2 Βελτιστοποίηση & Χαρακτηρισμός

Πρίν την εκπόνηση αυτής της εργασίας η κοινή πρακτική στη βιβλιογραφία και στο Εργαστήριο ήταν η έκθεση φύλλων πορώδων ικριωμάτων κολλαγόνου (62x62x3mm) σε 105-120°C σε κενό για διαστήματα 8-24 ωρών. Οι επιπτώσεις σε κατασκευές κολλαγόνου και κολλαγόνου γλυκαμινογλυκάνων είναι σχετικά ανεξερεύνητες και εκτελούνται συνεχώς πειράματα για τη θεμελίωση των μηχανισμών που τις διέπουν.

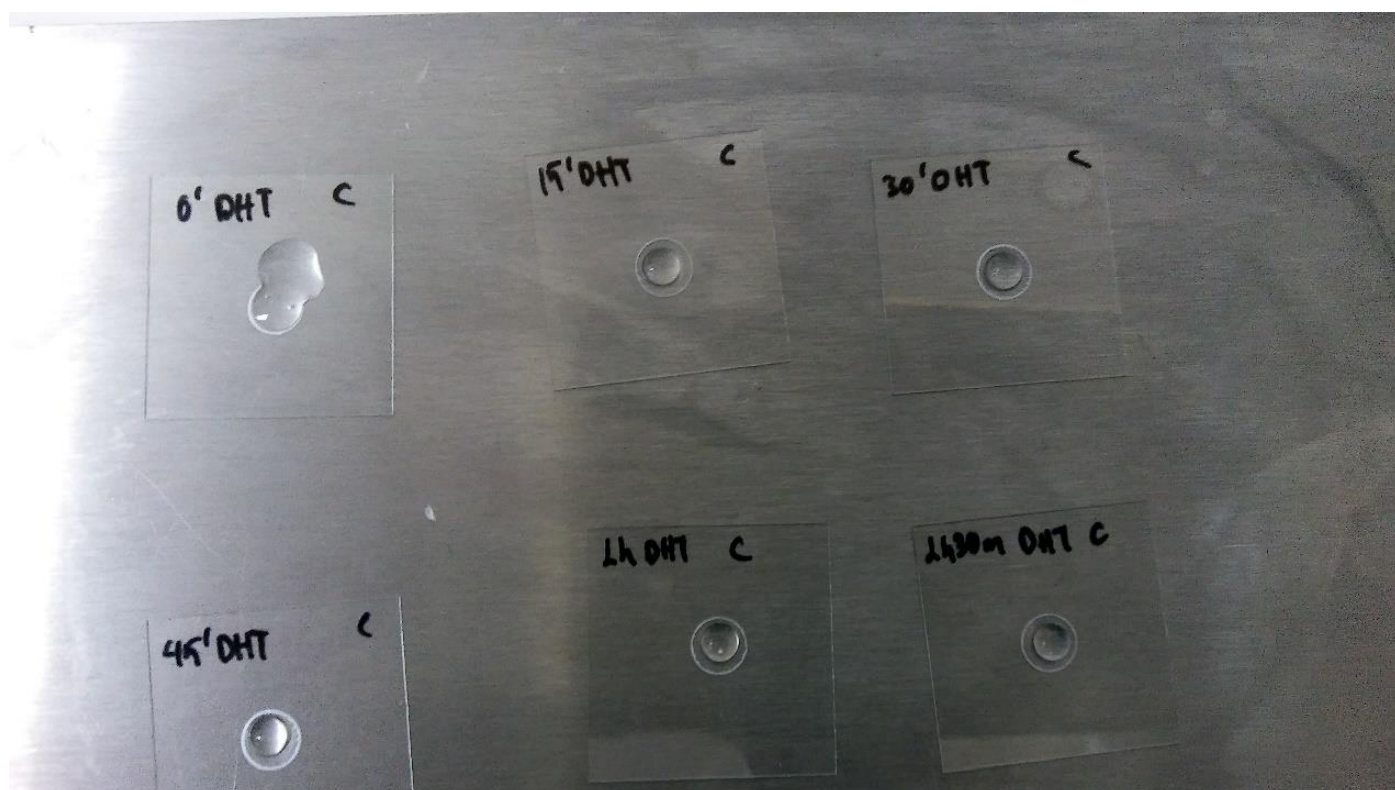
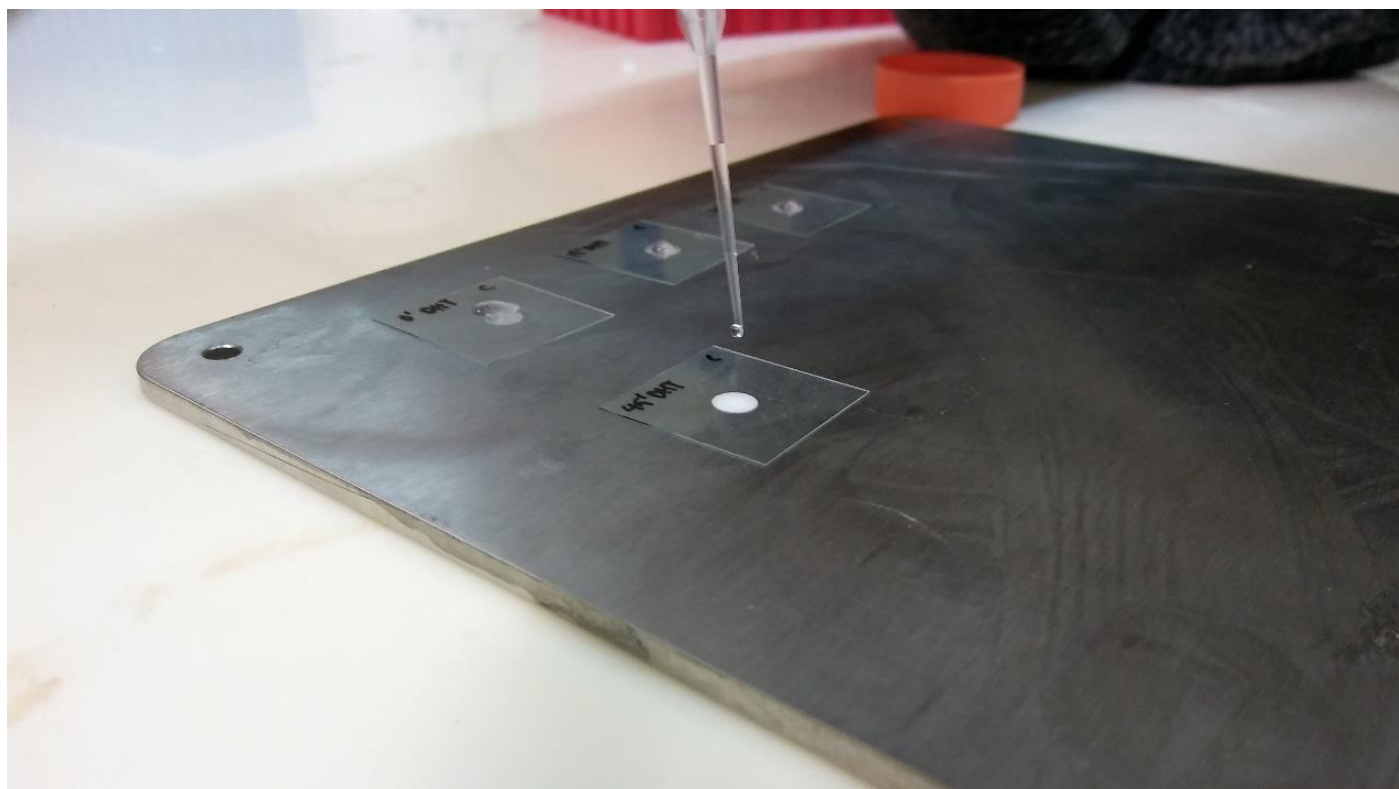
Στη συγκεκριμένη μελέτη παρατηρήθηκε μετά την έκθεση ΛΠΙΚ σε DHT για 3 ώρες σημαντική δυσκολία στην απορρόφηση ρευστών (swelling) από τα ΛΠΙΚ σε σημείο η καλλιέργεια να είναι περιορισμένη είτε από αδυναμία του θεραπευτικού μέσου, άρα και κυττάρων, να εισχωρήσουν βαθιά στο υλικό είτε από την αδράνεια στην εναλλαγή ρευστών (νέου με παλιό θεραπευτικό μέσο) με αποτέλεσμα να νεκρώνουν τα κύτταρα. Αρχικά επιλέχθηκε να μειωθεί η διάρκεια της DHT στα 15 λεπτά ώστε να έχουν τα ΛΠΙΚ σχεδόν μέγιστη υδροφιλικότητα. Ενώ όμως ενισχύθηκε το υλικό, για να ανεχτεί αποικοδόμηση 14 ημερών όπως τέθηκε στις προδιαγραφές, έπρεπε να υπάρχουν περιορισμοί στο πλήθος των κυττάρων προς καλλιέργεια ή ακόμη και να αποκλειστούν κάποια είδη (primary hepatocytes – αποικοδόμηση σε 4 ημέρες σε υψηλές συγκεντρώσεις).

3.7.3 Πειραματικά Αποτελέσματα - Εφύγρανση

Για να βρεθεί ο βέλτιστος χρόνος κατεργασίας εκτελέστηκε πείραμα:

Κατασκευάστηκαν ικρίωματα κολλαγόνου και εκτέθηκαν για διαφορετικούς χρόνους στο θάλαμο DHT σε συνθήκες 105°C/50 mTorr. Έπειτα εγχύθηκε όγκος PBS με πιπέτα και μετρήθηκε ο χρόνος μέχρι την πλήρη ενυδάτωση του ικριώματος, ώστε να υπάρχει ένας πρόχειρος υπολογισμός της σταθεράς εναλλαγής ρευστών μέσα στο ικρίωμα.

Παραθέτονται τα αποτελέσματα:



Εικόνες 44 & 45: Πείραμα Swelling

Πειραματικά Αποτελέσματα

Swelling experiment

DHT Time (105oC / Vac)	Scaffold	PBS Vol	Time to fully Hydrate
0 min	6ul 0.5C100	15 ul	Instant (2 sec)
15 min	6ul 0.5C100	10ul	10 sec
30 min	6ul 0.5C100	10ul	30 sec
45 min	6ul 0.5C100	10ul	50 sec
60 min	6ul 0.5C100	10ul	55 sec
90 min	6ul 0.5C100	10ul	60 sec
120 min	6ul 0.5C100	10ul	300 sec

Πίνακας 6: Πείραμα εφύγγρανσης swelling για βελτιστοποίηση πρωτοκόλλου DHT

Παρατηρούνται γενικά 3 τάξεις μεγέθους του χρόνου ενυδάτωσης:

- Τάχιστος (<1min)
- Μέσος (~1min)
- Μεγάλος (>5min)

Δεδομένης και της χρονικής σταθεράς εναλλαγής ρευστών στα παχύτερα ικρίωματα – ένα μειονέκτημα που γίνεται προσπάθεια να εξαλειφθεί- σόφρον είναι να εκτελείται η εναλλαγή ρευστών σε χρόνους μικρότερους των 2 λεπτών. Για χρηστικά ικρίωματα κρίνεται σωστή η επιλογή χρόνων 45-75 λεπτών ως ο μέγιστος δυνατός χρόνος DHT ώστε να διατηρούν τις ιδιότητές τους.

3.8 Συναρμολόγηση Εξαρτημάτων Συσκευών Λεπτών Πορώδων Ικτριωμάτων

Μετά την λήξη του κύκλου λυοφιλοποίησης, οι καλυπτρίδες με τα νέα ΛΠΙΚ αφαιρούνται από το ράφι. Οι υπερκατασκευές που χρειάζονται λαμβάνονται από την αποθήκευση τους και ενεργοποιούνται με πλάσμα.

Έπειτα με χρήση ενός απλού οδηγού από τεμάχιο PMMA πιέζεται η ενεργοποιημένη υπερκατασκευή στην ήδη ενεργοποιημένη καλυπτρίδα, κατά το δυνατόν ευθυγραμμισμένη ώστε οι οπές των βοθρίων στην υπερκατασκευή να αντιστοιχούν στα ΛΠΙΚ που φέρονται στην καλυπτρίδα. Μικρή πίεση τα πρώτα 5 δευτερόλεπτα της σύνδεσης και άφεση υπο βάρους (~0.5 kg / συσκευή) για τουλάχιστον 2 ώρες καταφέρνει ισχυρή σύνδεση και προσδίδει στεγανότητα, αν έχουν εκτελεστεί σωστά τα πρωτόκολλα έως αυτή τη στιγμή.

3.9 Συμπεράσματα

Για την εκπόνηση της παρούσας εργασίας έγιναν προσπάθειες για την δημιουργία μιας συσκευής συστοιχιών ΛΠΙΚ που έπρεπε να ικανοποιεί τόσο κατασκευαστικές όσο και βιο/χημικές προδιαγραφές.

- Ο τομέας παρασκευής ΛΠΙΚ βελτιώθηκε με την καλύτερη κατανόηση των φυσικών διεργασιών κατά τη λυοφιλοποίηση και τον καθορισμό των ορίων χρόνου για τα οποία η έκθεση σε DHT είναι ωφέλιμη. Συνεπώς υπάρχει πιά η δυνατότητα παραγωγής ΛΠΙΚ ικανών για τις βιολογικές εφαρμογές που προορίζονται όπως και η δυνατότητα ανάπτυξης νέων δομών μέσω κατάλληλης παραμετροποίησης των πρωτοκόλλων παρασκευής.
- Ο τομέας κατασκευής των συσκευών οφελήθηκε από την εισαγωγή αυτοματοποιημένης διαδικασίας εναπόθεσης του εναιωρήματος των βιοϋλικών και την εξακρίβωση των απαραίτητων συνθηκών για την ενεργοποίηση επιφανειών με πλάσμα. Όσον αφορά τώρα την υπερκατασκευή PDMS πολύτιμα μαθήματα ελήφθησαν για την διαδικασία πολυμερισμού της ουσίας και άνοιξε ο δρόμος προς την ανάπτυξη καλουπιών χύτευσης πιο πολύπλοκων μορφών για κάθε είδους εφαρμογή μικροφλοιδικής.

Κεφάλαιο 4: Εφαρμογές Συστοιχιών Λεπτών Πορώδων Ικτριωμάτων στην Βιοϊατρική Έρευνα

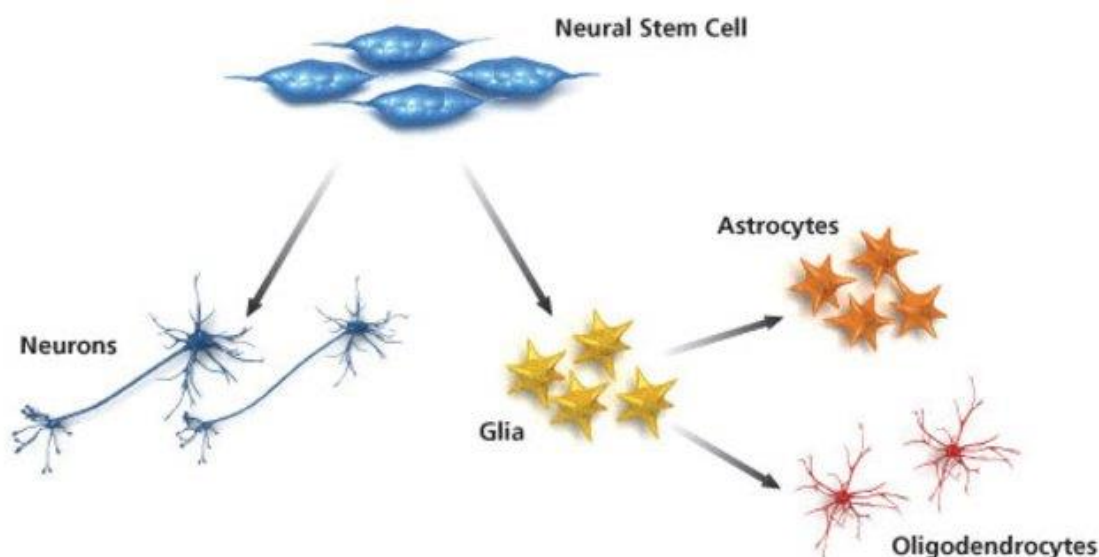
4.1 Περιεχόμενα

Οι παραγόμενες συσκευές συστοιχιών ΛΠΙΚ χρησιμοποιήθηκαν από ερευνητές για τις κυτταροκαλλιέργειές τους, ώστε να αναδειχθεί και πρακτικά η χρησιμότητα των προϊόντων αυτής της εργασίας. Συγκεκριμένα οι Δρ. Δημήτριος Τζεράνης και κα Δανάη Στέλλα Ζαρείφη υπήρξαν οι τελικοί αποδέκτες των συσκευών για τις κυτταρικές τους μελέτες στο ίδρυμα τεχνολογίας και έρευνας (ΙΤΕ) και στο εργαστήριο συστημικής βιολογίας και εμβιομηχανικής του ΕΜΠ αντίστοιχα. Αποτέλεσαν πολύτιμους συνεργάτες και παρέχουν πληροφορίες και δεδομένα από την χρήση των συσκευών, για τα οποία τους ευχαριστώ ιδιαίτερα και παρατίθενται στις επόμενες δύο παραγράφους:

4.2 Καλλιέργεια και διαφοροποίηση Νευρικών Βλαστοκυττάρων

Η ανάπτυξη φαρμάκων για νευροεκφυλιστικές ασθένειες απαιτεί την χρήση νευρικών κυττάρων και κυττάρων νευρογλοίας, δηλαδή αστροκυττάρων και ολιγοδενδροκυττάρων. Οι μελέτες πραγματοποιούνται συνήθως σε κύτταρα που έχουν απομονωθεί από ποντίκια, απαιτούν δηλαδή το ζώο να θυσιαστεί ώστε ο ερευνητής να απομονώσει τα κύτταρα αυτά από τον εγκέφαλο του ή από την σπονδυλική του στήλη. Επειδή όμως κύτταρα από ζώα δεν μπορούν ποτέ να περιγράψουν την παθολογία των ανθρώπινων κυττάρων, ιδανικά τα πειράματα αυτά πρέπει να γίνουν σε ανθρώπινους νευρώνες και ανθρώπινα γλοία. Προφανώς όμως αυτό δεν είναι δυνατόν διότι θα απαιτούσε την θανάτωση του δότη.

Τα τελευταία χρόνια έχουν αναπτυχθεί μέθοδοι δημιουργίας στο εργαστήριο νευρώνων και γλοίων διαφοροποιώντας νευρικά βλαστοκύτταρα (neural stem cells, NSC). Τα NSC είναι πολυδύναμα κύτταρα από τα οποία δημιουργούνται οι νευρώνες και τα γλοία κατά την ανάπτυξη του οργανισμού. Ανθρώπινα NSC μπορούν να δημιουργηθούν στο εργαστήριο με διάφορες τεχνολογίες (από εμβρυικά βλαστοκύτταρα ή από επαγόμενα πολυδύναμα βλαστικά κύτταρα).

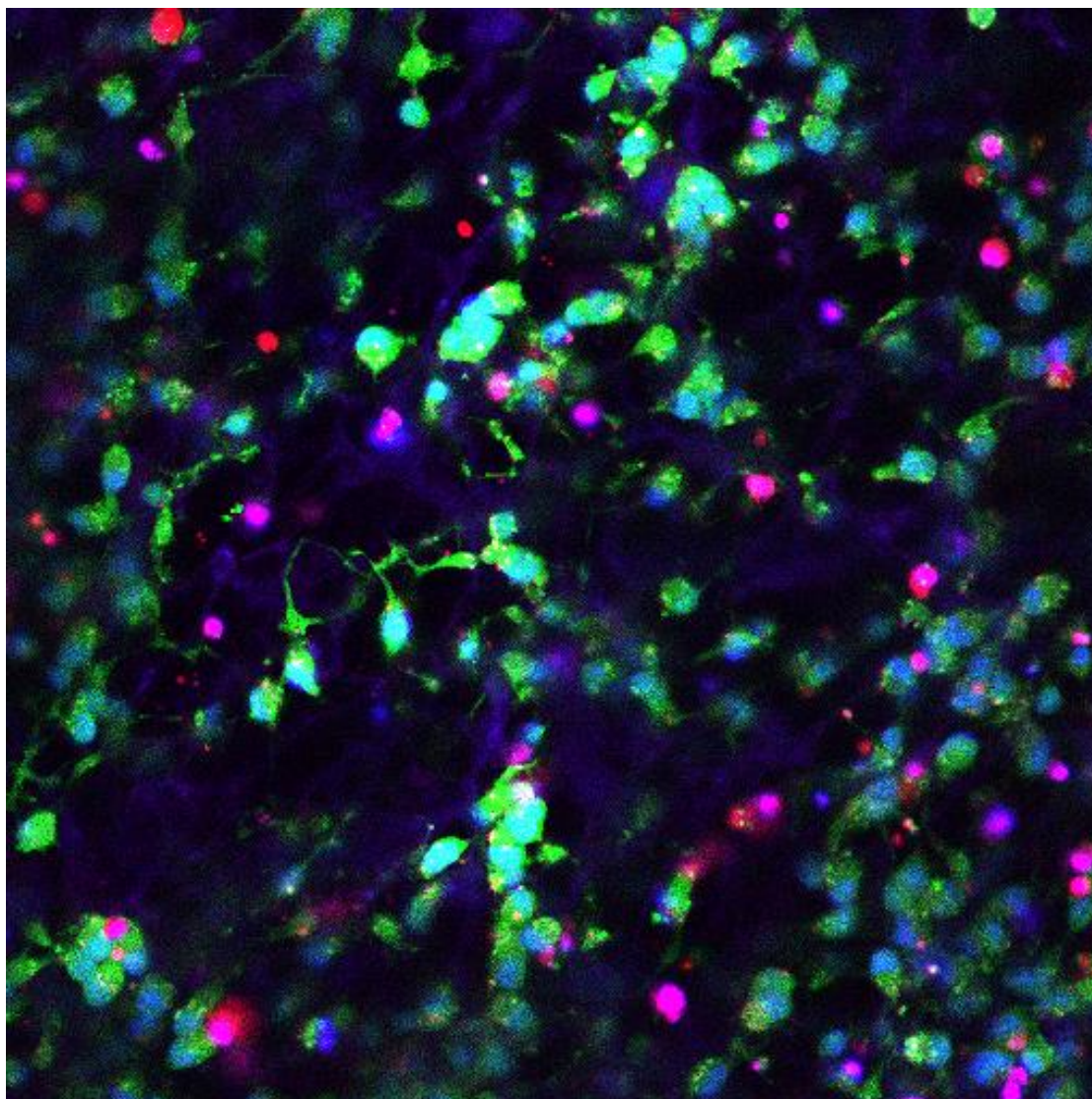


Σχήμα 2: Τα νευρικά βλαστικά κύτταρα (neural stem cells) μπορούν είτε να πολλαπλασιαστούν στον εαυτό τους, είτε να διαφοροποιηθούν προς νευρικά κύτταρα (neurons) ή δύο είδη νευρογλοίας, τα αστροκύτταρα (astrocytes) και τα ολιγοδενδροκύτταρα (oligodendrocytes). Πηγή: sigma aldrich

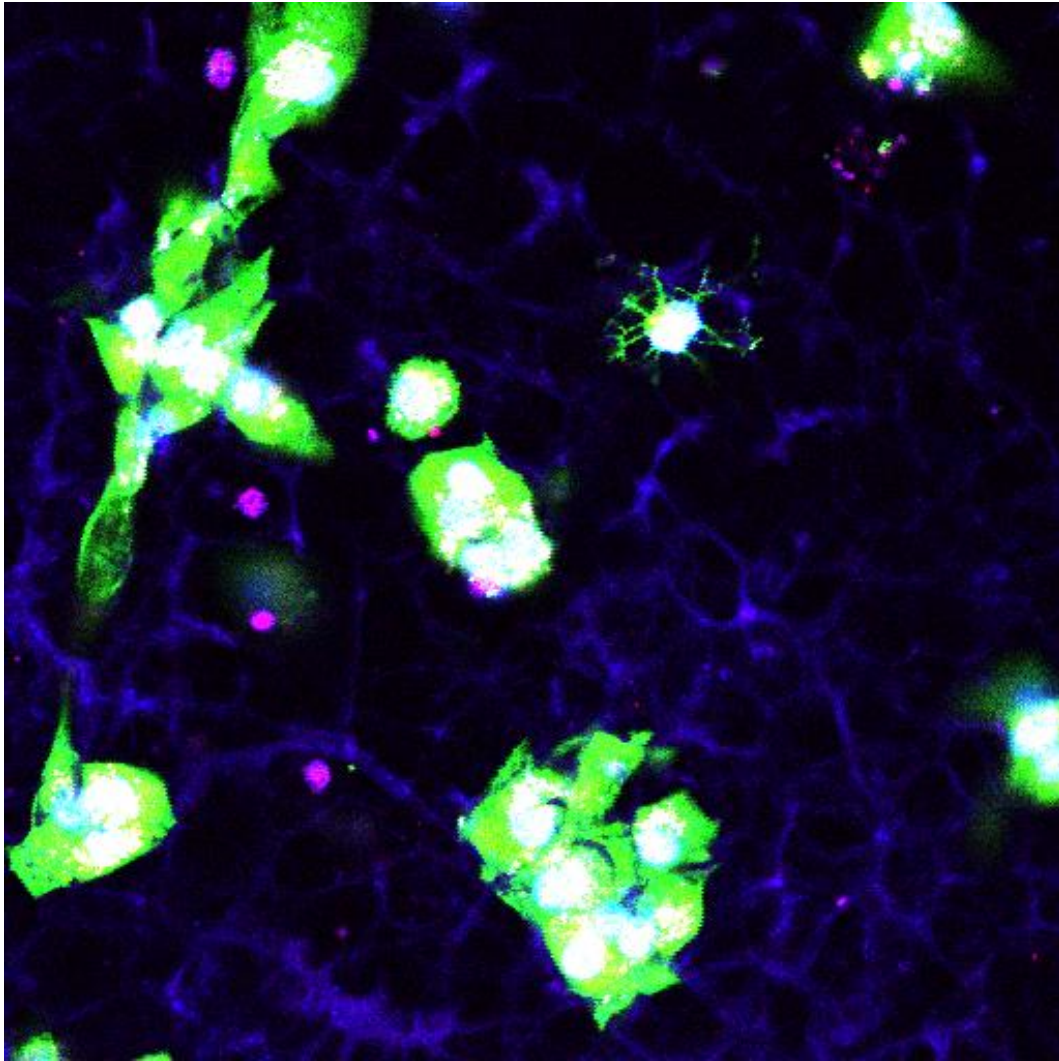
Οι συστοιχίες ΛΠΙΚ που δημιουργήθηκαν στην παρούσα εργασία χρησιμοποιούνται σε μια συνεργασία με το ίδρυμα τεχνολογίας και έρευνας (ΙΤΕ) για την διαφοροποίηση NSC από ποντίκια προς κινητικούς νευρώνες (Motor neurons) μέσα στα ΛΠΙΚ. Οι κινητικοί νευρώνες είναι οι νευρώνες της σπονδυλικής στήλης που

μεταδίδουν ηλεκτρικά σήματα στους μύες προκαλώντας την διέγερση τους. Η παθολογία των κινητικών νευρώνων προκαλεί διάφορες σοβαρές ασθένειες όπως η αμυοτροφική πλευρική σκλήρυνση (amyotrophic lateral sclerosis , ALS). Η δημιουργία κινητικών νευρώνων μέσα στα ΛΠΙΚ παρέχει ένα καινοτόμο μοντέλο κυτταρικής καλλιέργειας για την μελέτη της παθολογίας της ασθένειας και την αξιολόγηση πιθανών φαρμάκων.

Οι δύο παρακάτω εικόνες δείχνουν αντιπροσωπευτικά αποτελέσματα από κινητικούς νευρώνες και αστροκύτταρα που δημιουργήθηκαν μέσα σε ΛΠΙΚ διαφοροποιώντας NSC.



Εικόνα 46: Εικόνα φθορισμού από συνεστιακό μικροσκόπιο που δείχνει NSC που διαφοροποιήθηκαν σε κινητικούς νευρώνες μέσα σε ένα ΛΠΙΚ. Στο μπλε κανάλι φαίνονται οι πυρήνες των κυττάρων και (πιο αχνά) το ικρίωμα. Στο πράσινο κανάλι φαίνονται τα ζωντανά κύτταρα. Στο κόκκινο κανάλι φαίνονται οι πυρήνες των νεκρών κυττάρων. (Εικόνα: Δρ. Τζεράνης)



Εικόνα 47: Εικόνα φθορισμού από συνεστιακό μικροσκόπιο που δείχνει NSC που διαφοροποιήθηκαν σε αστροκύτταρα μέσα σε ένα ΛΠΙΚ. Στο μπλε κανάλι φαίνονται οι πυρήνες των κυττάρων και (πιο αχνά) το ικρίωμα. Στο πράσινο κανάλι φαίνονται τα ζωντανά κύτταρα. Στο κόκκινο κανάλι φαίνονται οι πυρήνες των νεκρών κυττάρων. (Εικόνα: Δρ. Τζεράνης)

Τα ΛΠΙΚ που περιέχουν κινητικούς νευρώνες ή αστροκύτταρα εφαρμόζονται αυτή τη στιγμή στην μελέτη νέων φαρμάκων για νευροεκφυλιστικές ασθένειες (όπως το ALS) που θα μπορούν να προφυλάξουν τους νευρώνες από κυτταρικό θάνατο, καθυστερώντας σημαντικά την πρόοδο της ασθένειας.

4.3 Μοντέλα Ήπατος

Επαγωγή μη αλκοολικής λιπώδους νόσου του ήπατος σε πρωτογενή ανθρώπινα ηπατοκύτταρα – Primary Human Hepatocytes pHH.

Η μη-αλκοολική λιπώδης νόσος του ήπατος (Non-Alcoholic Fatty Liver Disease; NAFLD) ανάγεται σταδιακά σε μείζων θέμα παγκόσμιας υγείας λόγω της αυξανόμενης εμφάνισης παχυσαρκίας σε παιδιά και ενήλικες. Η μη-αλκοολική λιπώδης νόσος του ήπατος είναι η ηπατική συνιστώσα του μεταβολικού συνδρόμου και ορίζεται ως η συσσώρευση λίπους στο ηπατικό παρέγχυμα χωρίς φλεγμονή, απουσία αυξημένης κατανάλωσης αλκοόλ (λιγότερο από 21 μονάδες στους άνδρες και 14 μονάδες στις γυναίκες). [38] Ο όρος NAFLD αναφέρεται σε ένα ευρύ φάσμα καταστάσεων, από απλή στεάτωση έως στεατοηπατίτιδα (Non-alcoholic Steatohepatitis; NASH), ίνωση, κύρωση και ηπατοκυτταρικό καρκίνωμα (Hepatocellular Carcinoma; HCC), με όλες τις κλινικές προεκτάσεις τους.[39] Σχετίζεται στενά με ανοχή στην ινσουλίνη και άλλους παράγοντες παχυσαρκίας, όπως ο διαβήτης, η κεντρική κοιλιακή παχυσαρκία και η δυσλιπιδαιμία. Αποτελεί επίσης ανεξάρτητο παράγοντα ρίσκου για καρδιοαγγειακές παθήσεις ανεξαρτήτως ηλικίας, φύλου και χοληστερίνης. Σχετίζεται με αυξημένο ρίσκο θνητότητας από κάθε αίτιο, στο οποίο συμβάλλουν τόσο παράγοντες που σχετίζονται με το ήπαρ όσο και δευτερογενείς παράγοντες, όπως κακοήθειες, διαβήτης και στεφανιαία νόσος.

Στα πλαίσια της εκπόνησης της διπλωματικής της εργασίας για το μεταπτυχιακό "Βιολογία Συστημάτων" της Γεωπονικής Σχολής Αθηνών η κα. Δανάη Ζαρείφη εκτέλεσε πειράματα επαγωγής μη αλκοολικής λιπώδους νόσου του ήπατος σε πρωτογενή ανθρώπινα ηπατοκύτταρα τα οποία καλλιεργήθηκαν σε συσκευές συστοιχίων ΛΠΙΚ κολλαγόνου γλυκαμινογλυκάνων.

Η καλλιέργεια pHH σε κλασσικές 2D καλλιέργειες αποτελεί αυτή τη στιγμή το gold-standard, καθώς οι λειτουργικές τους ιδιότητες είναι κοντά σε αυτές της *in vivo* κατάστασης. Ωστόσο σε 2D καλλιέργειες τα pHH χάνουν τη μορφολογία τους και τις ειδικές ηπατικές λειτουργίες, όπως η αποτοξίνωση, η ενεργότητα των ενζύμων της φάσης I και II του μεταβολισμού φαρμάκων και η παραγωγή πρωτεϊνών του πλάσματος, όπως η αλβουμίνη, σε 24-72 ώρες. Σε 3D συστήματα έχει επιτευχθεί βιωσιμότητα των ηπατοκυττάρων έως και 15 μέρες με σχετική βελτίωση της μορφολογίας και της μη-διαφοροποίησης τους.[40][41]

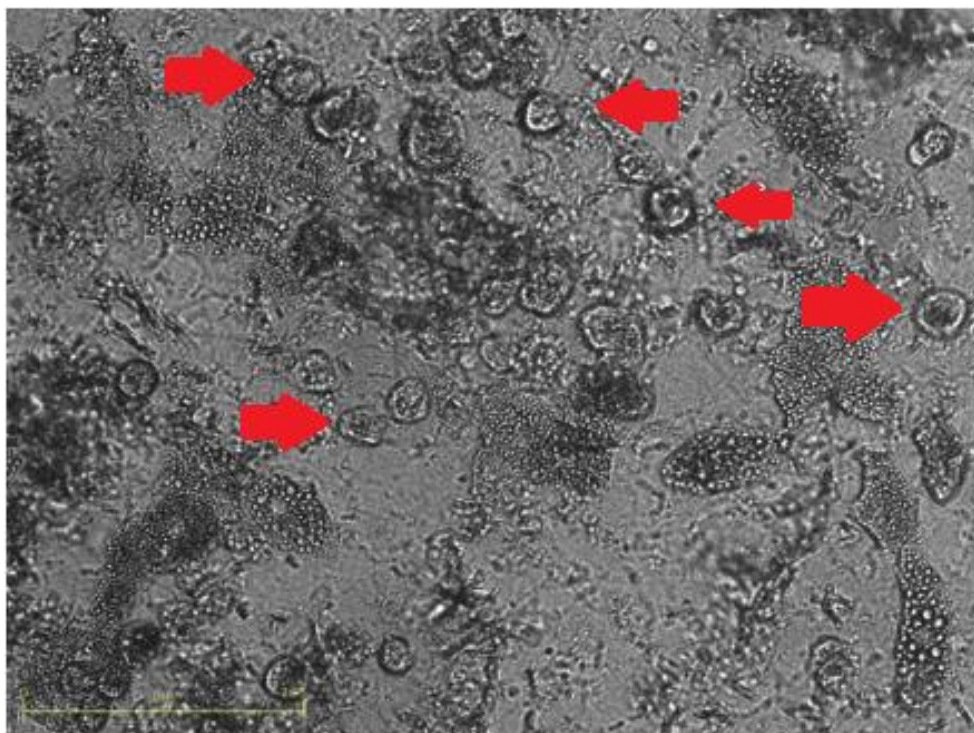
Το γεγονός πως δεν έχει μελετηθεί η καλλιέργεια των pHH σε ΛΠΙΚ και πως δεν υπάρχει στανταρ *in vitro* μοντέλο για NAFLD σε pHH λόγω μικρής βιωσιμότητας των κυττάρων άρα και μικρής περιόδου έκθεσης στις ουσίες που προκαλούν NAFLD, κάνουν τις συσκευές καλλιέργειας ΛΠΙΚ που κατασκευάζονται χρήσιμα εργαλεία για τη μελέτη και μοντελοποίηση της ασθένειας και των μεταβολικών μονοπατιών.

Όσον αφορά το πείραμα, Πρωτογενή Ανθρώπινα Ηπατοκύτταρα απομονώθηκαν από δείγματα βιοψίας ενήλικων ασθενών (Γενικό Πανεπιστημιακό Νοσοκομείο Αθηνών «Λαϊκό», Εθνικό και Καποδιστριακό Πανεπιστήμιο Αθηνών, ProtaVio Ltd) με διπλή αιμάτωση και διατηρήθηκαν σε υγρό άζωτο σύμφωνα με πρωτόκολλα της Biopredic International (Saint-Gregoire France). Τα κύτταρα παγολύθηκαν και επιστρώθηκαν σε ΛΠΙΚ CG σε πυκνότητα 50000 κύτταρα/well σε θρεπτικό υλικό της Biopredic International.

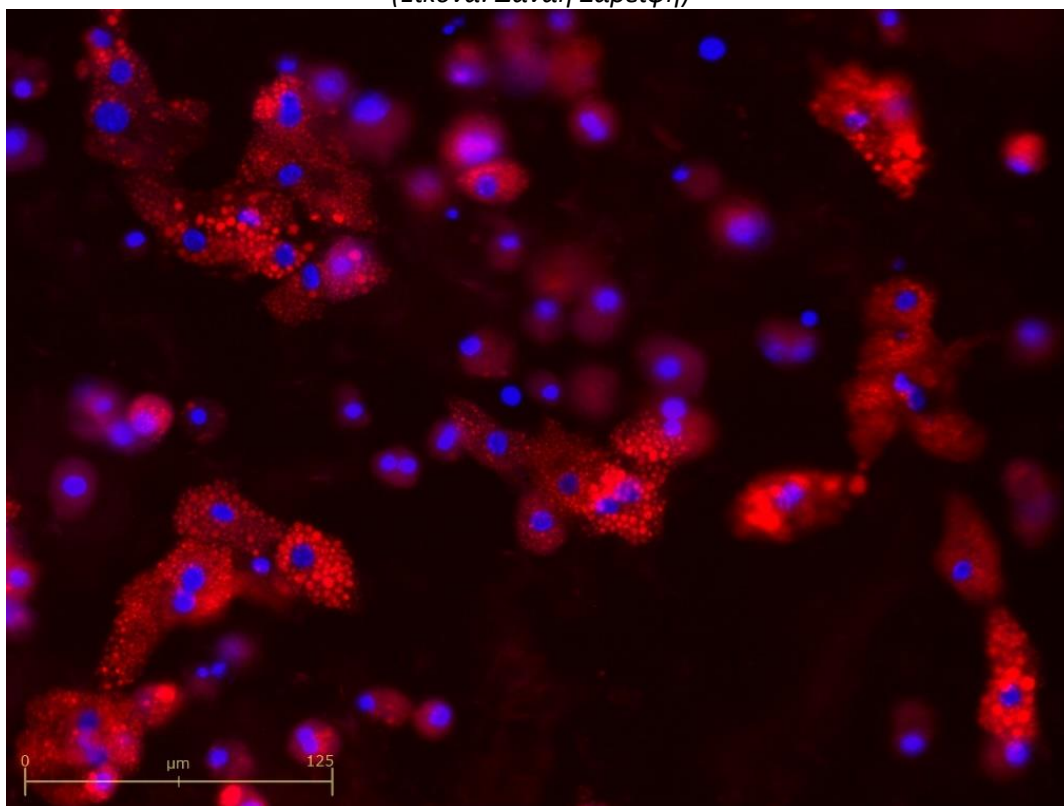
Η επαγωγή της μη αλκοολικής λιπώδους νόσου του ήπατος έγινε με κατεργασία των κυττάρων με μείγμα ολεικού και παλμιτικού οξέος σε μοριακή αναλογία 1:2 αντίστοιχα (Cayman Chemicals, 90260, 10006627) και σε τελική συγκέντρωση 600μM για 24 ώρες.

Το ενδοκυτταρικό φορτίο λίπους προσδιορίστηκε με μικροσκοπία φθορισμού μετά από χρώση των ενδοκυτταρικών σταγονιδίων λιπιδίων με την κόκκινη φθορίζουσα χρωστική Nile Red (Thermo Fisher Scientific, N1142). Ως αντιχρωματισμός χρησιμοποιήθηκε η μπλε φθορίζουσα χρωστική Hoechst 33342 (Thermo Fisher Scientific, H3570). Το Nile Red χρησιμοποιείται για τον εντοπισμό και την ποσοτικοποίηση λιπιδίων, ειδικά ουδέτερων σταγονιδίων λιπιδίων μέσα στο κύτταρο. Είναι σχεδόν μη-φθορίζον στο νερό και σε άλλους πολικούς διαλύτες αλλά φθορίζει σε μη-πολικά περιβάλλοντα σε μήκος κύματος διέγερσης 552nm και μήκος κύματος εκπομπής 636nm. Το Hoechst 33342 είναι κυτταρικά διαπερατή χρωστική που εκπέμπει μπλε φθορισμό όταν προσδεθεί στο dsDNA (μήκος κύματος διέγερσης 392nm και μήκος κύματος εκπομπής 440nm). Η λήψη των εικόνων έγινε με χρήση του JuLI™ Stage Real-Time CHR (Cell History Recorder)

(NanoEnTek), με χρήση των καναλιών DAPI (Excitation 390/40, Emission 452/45) και RFP (Excitation 525/50, Emission 580) και 20x οπτικού φακού.



Εικόνα 48: Εικόνα απο το *julistage* στο κανάλι *Bright*. Φαίνονται τα κύτταρα που αναπτύσσονται στο υλικό.
(Εικόνα: Δανάη Ζαρείφη)



Εικόνα 49: Εικόνα φθορισμού που δείχνει πρωτογενή ανθρώπινα ηπατοκύτταρα στα οποία έχει γίνει επαγωγή της μη αλκοολικής λιπώδους νόσου του ήπατος με εξωγενή χορήγηση ελεύερων λιπαρών οξέων 600μM. Στο μπλέ κανάλι φαίνονται οι πυρήνες των κυττάρων. Στο κόκκινο κανάλι φαίνονται τα σταγονίδια λιπιδίων που έχουν σχηματιστεί στο κυτταρόπλασμα των ηπατοκυττάρων. (Εικόνα: Δανάη Ζαρείφη)

4.4 Συμπεράσματα

Η δυνατότητα να προσομοιάζονται καλύτερα οι *in vivo* συνθήκες είναι αναγκαία εξέλιξη της κυτταροκαλλιέργειας ως μεθόδου βιολογικών μελετών. Συσκευές που παρέχουν τα ανάλογα εξωκυττάριας μήτρας για καλλιέργειες, σε συνδυασμό με τη δυνατότητα για μεγάλο όγκο πειραμάτων κατά την διαμόρφωση 96άρας πλάκας, φαίνεται πως δίνουν τη δυνατότητα να γίνει η τρισδιάστατη κυτταροκαλλιέργεια το νέο πρότυπο και να εξελιχθεί η μοντελοποίηση των βιολογικών διεργασιών. Η εξέλιξη των μοντέλων αυτών μπορεί να παρέχει γνώση καθώς και απτές βελτιώσεις στην Ιατρική στα προϊόντα φαρμακευτικής.

Κεφάλαιο 5: Σύνοψη και Μελλοντική Εργασία

5.1 Σύνοψη Εργασίας

Αποτελέσματα της παρούσας μελέτης ήταν η ανάπτυξη μιας μεθόδου για μαζική παραγωγή λεπτών πορώδων ικριωμάτων κολλαγόνου.

Επιτεύχθηκαν οι στόχοι της βελτίωσης της δομής και των φυσικών ιδιοτήτων των ΛΠΙΚ μέσω βελτίωσης των πρωτοκόλλων λυοφιλοποίησης και δημιουργίας σταυροδεσμών – τα ΛΠΙΚ είναι ικανά πορώδη για υγιή ανάπτυξη κυττάρων και ανθεκτικά σε φθορά από το περιβάλλον αποθήκευσης και καλλιέργειας.

Κατασκευάστηκε συσκευή συστοιχειών λεπτών πορώδων ικριωμάτων με δυνατότητες απεικόνισης σε μικροσκόπια. Για την επίτευξη αυτού του σκοπού έγινε χρήση ρομποτικής διάταξης για την ακριβή και επαναλήψιμη ρύθμιση της θέσεως των ικριωμάτων στην καλυπτρίδα απεικόνισης και σχεδιάστηκε καλούπι χύτευσης για να κατασκευαστεί η υπερκατασκευή PDMS που ήταν αναγκαία. Για την σωστή συναρμολόγηση των απαρτιών έγιναν προσαρμογές στα πρωτόκολλα προετοιμασίας – Παρασκευή PDMS & Ενεργοποίηση Επιφανειών με Πλάσμα.

Τέλος κατασκευάστηκε προσαρμογέας /βάση συσκευών που δίνει τη δυνατότητα 4 τέτοιες συσκευές να αποτελέσουν συνολικά μια 96άρα πλάκα καλλιέργειας και να θεωρηθούν ως ένα σύνολο για την ευκολότερη συνεργασία με μηχανήματα, είτε αυτό της εναπόθεσης (TECAN), είτε μετρητικά (μικροσκόπια κλπ).

5.2 Μελλοντική Εργασία

Επόμενο βήμα στην προσπάθεια να αποτελέσουν οι διατάξεις τρισδιάστατης κυτταροκαλλιέργειας με λεπτά πορώδη ικρίσματα κολλαγόνου πρότυπο είναι:

- Η προσπάθεια βελτίωσης της ακρίβειας εναπόθεσης περαιτέρω με εγκατάσταση του ανάλογου εξοπλισμού.
- Ο πειραματισμός με νέα βιολικά από τα οποία μπορούν να κατασκευαστούν λεπτά πορώδη ικρίσματα με τη διαδικασία αυτή, ώστε να πιστοποιηθούν.
- Ο σχεδιασμός ιδιοσυσκευών που μπορούν να ελέγξουν μηχανικά και άλλες πτυχές της διαδικασίας ώστε σε βάθος χρόνου η ανθρώπινη παρέμβαση να είναι μηδενική – για παράδειγμα ιδιοσυσκευή που συγκρατεί τις καλυπτρίδες στο θάλαμο πλάσματος, εισέρχεται μαζί τους στο λυοφιλοποιητή και συνεργάζεται με έταιρη ιδιοσυσκευή για τη μηχανική οδήγηση και ευθυγράμμιση υπερκατασκευής - καλυπτρίδας κατά τη συναρμολόγηση.

Βιβλιογραφία

Βιβλία & Παραδόσεις

- [1] Alberts, Molecular Biology of the cell 5th Ed
- [2] Λ.Χ. Μαργαρίτης, Βιολογία Κυττάρου 4^η Έκδοση

Εργασίες

- [3] Μ. Ιωάννου, Διπλωματική Εργασία: «Βελτιστοποίηση Καλλιέργειας Ινοβλαστών σε Ικρίωματα από Κολлагόνο για Προτεομικές Μελέτες Σηματοδότησης», ΕΜΠ Αθήνα 2015.
- [4] Ι. Πρέζα, Διπλωματική Εργασία: « Σχεδιασμός κα Κατασκευή Συσκευής για Αυτοματοποιημένη Μελέτη Κυττάρων Μέσω Τρισδιάστατης Καλλιέργειας σε Πορώδη Ικρίωματα Κολлагόνου», ΕΜΠ Αθήνα 2015.
- [5] Μ.Σαρκίρη «Λεπτά Πορώδη Ικρίωματα Κολлагόνου: Παρασκευή, Χαρακτηρισμός και Εφαρμογή στη Μελέτη Φαρμάκων», ΕΜΠ Αθήνα 2016.
- [6] Brendan A. Harley, Cell-Matrix Interactions: Collagen-GAG Scaffold Fabrication, Characterization, and Measurement of Cell Migratory and Contractile Behavior via Confocal Microscopy, MIT (2002), Harvard College (2000).
- [7] Shantanu Bhattacharya , Plasma Bonding Of Poly (Dimethyl) Siloxane And Glass Surfaces And Its Application To Microfluidics, A Thesis In Mechanical Engineering, Texas Tech University

Επιστημονικές Δημοσιεύσεις

- [8] Rasheena Edmondson, Jessica Jenkins Broglie, Audrey F. Adcock, and Liju Yang , Three-Dimensional Cell Culture Systems and Their Applications in Drug Discovery and Cell-Based Biosensors, Biomanufacturing Research Institute and Technology Enterprises (BRITE), and Department of Pharmaceutical Sciences, North Carolina Central University, Durham, North Carolina.
- [9] 3D Cell Culture: A Review of Current Techniques, Brad Larson, Senior Applications Scientist, Applications Department, BioTek Instruments, Inc., Winooski, VT.
- [10] Bradley A. Justice¹, Nadia A. Badr¹, Robin A. Felder², 3D cell culture opens new dimensions in cell-based assays,
- [11] 3D Biomatrix , 3D Cell culture 101
- [12] 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.
- [13] 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.
- [14] Marcin Jurga, Maia Dainiak, and Anna Sarnowska: The performance of laminincontaining cryogel scaffolds in neural tissue regeneration. Biomaterials 32 (2011) 3423-3434.
- [15] Ke Cheng, Yinzhi Lai, and William S Kisaalita: Three-dimensional polymer scaffolds for high throughput cell-based assay systems. Biomaterials 29 (2008) 2802-2812.
- [16] 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
- [17] 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.
- [18] Lee J, Cuddihy M and Kotov NA, Three-Dimensional Cell Culture Matrices: State of the Art, Tissue Engineering: Part B, Vol 14, Number 1 (2008), 61-86
- [19] Haycock JW (ed.), 3D Cell Culture: Methods and Protocols, Methods in Molecular Biology, Springer Science+Business Media, LLC , Vol 695 (2011), DOI 10.1007/978-1-60761-948-0_1.
- [20] Tung, YC, Hsiao, AY, Allen, SG, Torisawa, Y, Ho, M, Takayama, S, High throughput 3D spheroid culture and drug testing using a 384 hanging drop array, Analyst, 136(2011), 473-478
- [21] Hsiao, AY, Tung, YC, Qu, X, Patel, LR, Pienta, KJ and Takayama, S, 384 hanging drop arrays give excellent Z-factors and allow versatile formation of co-culture spheroids, Biotechnology and Bioengineering, 109 (2012), 1293-1304

- [22] Burdett E, Kasper FK, Mikos, AG and Ludwig, JA, Engineering Tumors: A Tissue Engineering Perspective in Cancer Biology, Tissue Engineering: Part B Vol 16, No. 3 (2010), 351-9
- [23] Huh D, Hamilton GA and Ingber DE, From 3D cell culture to organs-onchips, Trends in Cell Biology, Vol. 21, No. 12 (2011), 745-754
- [24] Baker M, A Living System on a Chip, Nature, Vol 471 (2011), 661-665
- [25] Aliya Fatehullah, Si Hui Tan, Nick Barker ,Organoids as an in vitro model of human development and disease, Nature Cell Biology 18, 246–254 (2016) doi:10.1038/ncb3312.
- [26] I. V. Yannas; J. F. Burke; D. P. Orgill; E. M. Skrabut , Wound Tissue Can Utilize a Polymeric Template to Synthesize a Functional Extension of Skin Science, New Series, Vol. 215, No. 4529. (Jan. 8, 1982), pp. 174-176
- [27] 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
- [28] 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
- [29] Mei Wei, Investigation of structural collapse in unidirectionally freeze cast collagen scaffolds ,Drew Clearfield, , J Mater Sci: Mater Med 2015
- [30] Dimitrios S. Tzeranis: Imaging Studies of Peripheral Nerve Regeneration Induced by Porous Collagen Biomaterials, published by Massachusetts Institute of Technology, 2013
- [31] 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.
- [32] Silicones: Preparation, Properties and Performance André Colas Dow Corning, Life Sciences
- [33] Casey C. Glick, Mitchell T. Srimongkol, Aaron Schwartz, William Zhuang, Joseph Lin, Roseanne Warren, Dennis Tekell, Panitan Satimalee, Judy Kim, Caroline Su, Kyungna Kim, and Liwei Lin, Fabrication of double-sided microfluidic structures via 3d printed transfer molding, University of California, Berkeley, USA
- [34] Christopher Moraes, Yu Sun and Craig A Simmons, Solving the shrinkage-induced PDMS alignment registration issue in multilayer soft lithography
- [35] S. Lopera and R. D. Mansano, Plasma-Based Surface Modification of Polydimethylsiloxane for PDMS-PDMS Molding
- [36] Ciprian Iliescu, Hayden Taylor, Marioara Avram, Jianmin Miao and Sami Franssila, A practical guide for the fabrication of microfluidic devices using glass and silicon
- [37] Kenny Chau, Brent Millare, Adam Lin, Srigokul Upadhyayula, Vicente Nun~ez, Hong Xu, Valentine I. Vullev, Dependence of the quality of adhesion between poly(dimethylsiloxane) and glass surfaces on the composition of the oxidizing plasma
- [38] Angulo P., Non-Alcoholic Fatty Liver Disease, N Eng J Med, 2002, 346:1221-1236
- [39] J.K. Dowman, J.W. Tomlinson, P.N. Newsome, Pathogenesis of non-alcoholic fatty liver disease, Qjm, 2010, 71-83
- [40] Nussler A.K. et al, 3D cultivation Techniques for Primary Human Hepatocytes, Microarrays, 2015, 4:64-23
- [41] Nussler A.K. et al, Long-term culture of primary hepatocytes: new matrices and microfluidic devices, Hepatology Int, 2014, 8:14-22
- [42] Anthony J. Genot, Teruo Fujii, Yannick Rondelez, In vitro regulatory models for systems biology
- [43] David D. Allen, Raúl Caviedes, Ana María Cárdenas, Takeshi Shimahara, Juan Segura-Aguilar & Pablo A. Caviedes, Cell Lines as In Vitro Models for Drug Screening and Toxicity Studies
- [44] Dongeun Huh, Yu-suke Torisawa, Geraldine A. Hamilton, Hyun Jung Kim and Donald E. Ingber, Microengineered physiological biomimicry: Organs-on-Chips,
- [45] St Johnston D (2015) The Renaissance of Developmental Biology. PLoS Biol 13(5): e1002149. doi:10.1371/journal.pbio.1002149

Ιστοσελίδες

[s1] <https://biotech-ntua.wikispaces.com/Freeze+dryer+protocol+and+temperature+control>

[s2]<http://www.elveflow.com/microfluidic-tutorials/soft-lithography-reviews-andtutorials/how-to-get-the-best-process/soft-lithography-glass-pdms-bonding/> [s3]<http://www.intechopen.com/books/advances-in-bioengineering/incorporation-of-primaryamines-via-plasma-technology-on-biomaterials>

[s4]<http://harrickplasma.com/applications/surface-adhesion>

[s5] <https://www.micro-shop.zeiss.com>

Παραρτημα Α: Πρωτόκολλα Κατασκευής Συσκευών

A.1 Καθαρισμός Καλυπτρίδων

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.

A.2 Χύτευση και Πολυμερισμός Υπερκατασκευών 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 curing agent με διαφορετική πιπέττα. Υπάρχουν δύο αναλογίες όγκου βάσης, curing agent:
 - 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 65-80 °C για 2-3h.
9. Όταν ο πολυμερισμός και η στερεοποίηση έχουν ολοκληρωθεί, αφαιρούνται τα σχηματιζόμενα ελαστικά κομμάτια PDMS με τη βοήθεια νυστεριού και σκεπάζονται με Scotch tape 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.

A.3 Επιφανειακή Κατεργασία PDMS με Πλάσμα και κόλληση με καλυπτρίδα

Υλικά

- Πολυμερισμένο φύλλο PDMS
- Plasma Etcher (Plasma Etch, # 775-883-1336)

Διαδικασία

1. Αφού ολοκληρωθεί διαδικασία της λυοφιλοποίησης, ένα κομμάτι PDMS το οποίο έχει διατηρηθεί στο καλούπι του ως την ώρα του bonding και έχει προστατευθεί με Scotchtape τα τελευταία λεπτά, εισάγεται στον θάλαμο του PlasmaEtcher.
2. Σκοπό αυτή τη φορά αποτελεί η ενεργοποίηση συγκεκριμένων χημικών ομάδων (SiOHgroups) 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: 1min
 - Χρόνος σταθεροποίησης αερίου: 10 sec
 - Χρόνος μέχρι την έναρξη συναγερμού κενού: 5 min 9.
3. Μετά την ολοκλήρωση της διεργασίας πρέπει να γίνει άμεση τοποθέτηση του κομματιού PDMS πάνω στο γυαλί με τα ικριώματα και άσκηση πίεσης για μερικά λεπτά ενώ για ασφάλεια του αποτελέσματος προτείνεται η άσκηση ελαφριάς πίεσης για τη διάρκεια μιας νύχτας.
4. Έπειτα εκτελείται η διαδικασία δημιουργίας σταυροδεσμών (Παράρτημα Α, χωρίο Α.6).
5. Προκύπτει τελικά μια τρισδιάστατη well-plate όπου στην παρούσα φάση φέρει εικοσιτέσσερα wells διαμέτρου 6 mm και βάθους 5 mm με ενσωματωμένα ικριώματα για καλλιέργεια κυττάρων
6. Η τρισδιάστατη well-plate φυλάσσεται ως την in vitro χρήση της σε petri dish μονωμένο με parafilm.

A.4 Τοποθέτηση Αιωρήματος Κολλαγόνου στις Καλυπτρίδες

Υλικά

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

Εξοπλισμός

- Plasma Etcher (Plasma Etch, # 775-883-1336)
- TECAN FREEDOM EVO 150
- Οδηγός βάση από PMMA
- Μεταλλικό κυλινδρικό δοχείο
- Γυάλινο δοχείο με νερό
- Petri-dishes για κυτταροκαλλιέργεια

Διαδικασία

1. Πρώτο βήμα αποτελεί η παρασκευή του εναιωρήματος κολλαγόνου και η φύλαξή του στους 4 οC.
2. Σε επόμενο στάδιο πρέπει να πραγματοποιηθεί το πρωτόκολλο καθαρισμού των λεπτών γυαλιών μικροσκοπίου. Το πρωτόκολλο παρατίθεται αναλυτικά στο Παράρτημα Α, χωρίο Α1.
3. Έπειτα οι καλυπτρίδες 25*75*0.17 τοποθετούνται στον θάλαμο πλάσματος. 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.
4. Εφόσον ολοκληρωθεί η διεργασία, τα κομμάτια γυαλί μαζί με το PDMS τοποθετούνται πάνω στην οδηγό βάση ανάλογο 96άρας πλάκας και τοποθετούνται στον φορέα του TECAN. Έπειτα εκτελείται το πρωτόκολλο εναπόθεσης σύμφωνα με το Παράρτημα Γ. 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 ιδιαιτέρως ιξώδους υφής του μπορεί να μεταφερθεί μικρότερος του επιθυμητού όγκου.
5. 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 συμπτυκνωτή. Το αναλυτικό πρωτόκολλο λειτουργίας ενός κύκλου λυοφιλοποίησης βρίσκεται στο Παράρτημα Α, χωρίο Α5.

A.5 Λυοφιλοποίηση

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 υπολογιστή ελέγχου του λυοφιλοποιητή.
4. 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. 59
 - 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 “γ” στην εμφανιζόμενη οθόνη.

- Αρχίζει η πραγμάτωση του πρωτοκόλλου λυοφιλοποίησης που περιγράφεται στην οθόνη “Freeze dry Screen”
- Τυπικά πρωτόκολλα λυοφιλοποίησης για λεπτά ικρίσματα διαρκούν 7 ώρες ενώ για παχύτερα ικρίσματα 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 oC/min, επιλέγεται το πλήκτρο “Cancel Current Cycle” στον πίνακα ENOCRE που εμφανίζεται δεξιά όλων των επιλεγόμενων οθόνων. Επιβεβαίωση επιλογής εισάγοντας “γ” στην εμφανιζόμενη οθόνη. 2. Επιλογή της οθόνης “Manual Tools” στο λογισμικό ENCORE και ενεργοποίηση του διακόπτη “Release Vacuum” και αποσφράγιση της θύρας του λυοφιλοποιητή
2. 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.
3. 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 oC/min, απενεργοποιείται ο διακόπτης “Defrost” στην οθόνη “Manual Tools”.
 - Σε αυτό το σημείο η θερμοκρασία του “interstate” συστήματος θα είναι μικρότερη των - 10 oC/min.
4. Αποσφράγιση της θύρας του συμπυκνωτή και αναμονή ώσπου να λιώσει όλος ο υπάρχον πάγος.
5. Με χρήση ενός στύλο 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 ικρίσματα, 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. 60
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, μπιμπ και να αναβοσβήνει στην οθόνη του πίνακα ένα τριγωνικό σήμα προσοχής με θαυμαστικό.
 - Απενεργοποίηση του διακόπτη “IN” (δεξιά στο πίσω μέρος της παροχής ρεύματος)

A.6 Δημιουργία Σταυροδεσμών Μέσω Θερμικής Κατεργασίας

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 oC/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 oC/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.
6. Μετά από διάστημα 15-90 λεπτών, 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.
7. Κλείσιμο της θύρας του κλιβάνου και σφράγισμά της με το ειδικό εξάρτημα.
8. Αποσύνδεση του εναλλασσόμενου ρεύματος μετατροπέα τάσης από την παροχή ρεύματος
9. Αποσύνδεση του ανεμιστήρα εναλλασσόμενου ρεύματος από την παροχή ρεύματος.

Παράρτημα Β: Αποτελέσματα Πειραματικών Πρωτόκολλων

Β.1 Απεικόνιση Ικριωμάτων στο Μικροσκόπιο Juli Stage

Protocol Ver 1	Material	C		
Pore Samples	Measurement 1	Measurement 2	Diameter Aggregate (pixels)	Diameter Aggregate
1	90	76	83	30.71
2	97	124	110.5	40.885
3	108	73	90.5	33.485
4	74	95	84.5	31.265
5	90	75	82.5	30.525
6	125	66	95.5	35.335
7	98	82	90	33.3
8	73	60	66.5	24.605
9	117	71	94	34.78
10	80	67	73.5	27.195
			MEAN	32.21
			SEM	1.43

Protocol Ver 1	Material	CG		
Pore Samples	Measurement 1	Measurement 2	Diameter Aggregate (pixels)	Diameter Aggregate
1	104	109	106.5	39.41
2	125	114	119.5	44.22
3	150	113	131.5	48.66
4	109	150	129.5	47.92
5	116	96	106	39.22
6	98	107	102.5	37.93
7	105	74	89.5	33.12
8	114	85	99.5	36.82
9	83	64	73.5	27.20
10	74	94	84	31.08
			MEAN	38.55
			SEM	2.21

Πίνακες 7&8: Ποσοτικοποίηση διαμέτρου πόρων ικριωμάτων τύπου C & CG ως μέση τιμή + τυπική απόκλιση του μέσου – Πρωτόκολλο 1

Protocol Ver 2	Material	C		
Pore Samples	Measurement 1	Measurement 2	Diameter Aggregate (pixels)	Diameter Aggregate
1	227	115	171	4.104
2	201	203	202	4.848
3	343	209	276	6.624
4	274	133	203.5	4.884
5	165	136	150.5	3.612
6	146	130	138	3.312
7	228	285	256.5	6.156
8	234	160	197	4.728
9	163	171	167	4.008
10	195	136	165.5	3.972
			MEAN	4.62
			SEM	0.34

Πίνακας 9: Ποσοτικοποίηση διαμέτρου πόρων ικτριωμάτων C ως μέση τιμή + τυπική απόκλιση του μέσου – Πρωτόκολλο 2

Protocol Ver 2	Material	CG		
Pore Samples	Measurement 1	Measurement 2	Diameter Aggregate (pixels)	Diameter Aggregate
1	200	280	240	5.76
2	293	210	251.5	6.036
3	146	241	193.5	4.644
4	92	244	168	4.032
5	145	184	164.5	3.948
6	166	124	145	3.48
7	201	234	217.5	5.22
8	259	175	217	5.208
9	115	317	216	5.184
10	233	165	199	4.776
			MEAN	4.83
			SEM	0.26

Πίνακας 10: Ποσοτικοποίηση διαμέτρου πόρων ικτριωμάτων CG ως μέση τιμή + τυπική απόκλιση του μέσου – Πρωτόκολλο 2

Protocol Ver 3	Material	CG		
Pore Samples	Measurement 1	Measurement 2	Diameter Aggregate (pixels)	Diameter Aggregate
1	327	327	327	73.58
2	288	259	273.5	61.54
3	214	235	224.5	50.51
4	216	232	224	50.40
5	308	328	318	71.55
6	190	238	214	48.15
7	212	240	226	50.85
8	146	188	167	37.58
9	210	241	225.5	50.74
10	181	163	172	38.70
			MEAN	53.36
			SEM	3.84

Πίνακας 11: Ποσοτικοποίηση διαμέτρου πόρων ικτριωμάτων CG ως μέση τιμή + τυπική απόκλιση του μέσου – Πρωτόκολλο 3

B.2 Πείραμα Αξιολόγησης Ακρίβειας TECAN

Dilutor Capacity	1000	Pipette volume	200	Liquid Class :Test Glyc
Cycle 1	Set ul	Actual g	Actual ul	ε%
Aspiration	50		50	0.00
Dispension	6	0.00985	8.42	40.28
	6	0.00739	6.31	5.21
3x 22x22 Coverslips	6	0.00739	6.31	5.21
				16.90
Cycle 2	Set ul	Actual g	Actual ul	ε%
Aspiration	50		50	0.00
Dispension	6	0.00734	6.27	4.56
	6	0.00734	6.27	4.56
3x 22x22 Coverslips	6	0.00734	6.27	4.56
				4.56
Cycle 4	Set ul	Actual g	Actual ul	ε%
Aspiration	50		50	0.00
Dispension	6	0.00743	6.35	5.79
	6	0.00743	6.35	5.79
3x 22x22 Coverslips	6	0.00743	6.35	5.79
				5.79
Cycle 4	Set ul	Actual g	Actual ul	ε%
Aspiration	50		50	0.00
Dispension	6	0.00732	6.26	4.27
	6	0.00732	6.26	4.27
3x 22x22 Coverslips	6	0.00732	6.26	4.27
				4.27
Cycle 5	Set ul	Actual g	Actual ul	ε%
Aspiration	50		50	0.00
Dispension	6	0.00740	6.33	5.42
	6	0.00740	6.33	5.42
3x 22x22 Coverslips	6	0.00740	6.33	5.42
				5.42
Cycle Cal	Set ul	Actual g	Actual ul	ε%
Aspiration	50		50	0.00
Dispension	5	0.0047	4.02	19.66
	10	0.0122	10.43	4.27
	25	0.03012	25.74	2.97
	50	0.058	49.57	0.85
	100	0.118	100.85	0.85
	150	0.1767	151.03	0.68
6xDev	36	0.04273	36.52	1.45
				4.39

Πίνακας 12: Μετρήσεις όγκων εναπόθεσης για πείραμα με διάλυμα γλυκερόλης

OFFSET	1ul	R	Default	New offset 1.2ul
Dilutor Capacity	1000	Pipette volume	200	Liquid Class: CG
Cycle 1	Set ul	Actual g	Actual ul	ε%
Aspiration	50		50	0.00
Dispension	6	0.00498	5.03	16.16
	6	0.00498	5.03	16.16
3x 22x22 Coverslips	6	0.00498	5.03	16.16
				16.16
Cycle 2	Set ul	Actual g	Actual ul	ε%
Aspiration	50		50	0.00
Dispension	6	0.005626667	5.68	5.27
	6	0.005626667	5.68	5.27
3x 22x22 Coverslips	6	0.005626667	5.68	5.27
				5.27
Cycle 4	Set ul	Actual g	Actual ul	ε%
Aspiration	50		50	0.00
Dispension	6	0.00600	6.06	1.07
	6	0.00600	6.06	1.07
3x 22x22 Coverslips	6	0.00600	6.06	1.07
				1.07
Cycle 4	Set ul	Actual g	Actual ul	ε%
Aspiration	50		50	0.00
Dispension	6	0.00572	5.78	3.65
	6	0.00572	5.78	3.65
3x 22x22 Coverslips	6	0.00572	5.78	3.65
				3.65
Cycle 5	Set ul	Actual g	Actual ul	ε%
Aspiration	50		50	0.00
Dispension	6	0.00567	5.73	4.55
	6	0.00567	5.73	4.55
3x 22x22 Coverslips	6	0.00567	5.73	4.55
				4.55
Cycle 5	Set ul	Actual g	Actual ul	ε%
Aspiration	50		50	0.00
Dispension	6	0.00560	5.66	5.67
	6	0.00560	5.66	5.67
3x 22x22 Coverslips	6	0.00560	5.66	5.67
				5.67
Cycle 5	Set ul	Actual g	Actual ul	ε%
Aspiration	50		50	0.00
Dispension	6	0.00569	5.75	4.21
	6	0.00569	5.75	4.21
3x 22x22 Coverslips	6	0.00569	5.75	4.21
				4.21

Πίνακας 13: Μετρήσεις όγκων για πείραμα με εναιώρημα CG

Παραρτημα Γ: Οδηγός Χρήσης TECAN

Το παρόν παράρτημα αποτελεί έναν βασικό οδηγό χρήσης. Είναι αναγκαία η μελέτη των εγγράφων οδηγιών που διατίθενται από την κατασκευάστρια για την ασφαλή και εύρυθμη λειτουργία της μηχανής.

Η Ρομποτική διάταξη TECAN - Περιγραφή δομής και Αρχές λειτουργίας

Το Εργαστήριο Συστημικής Βιολογίας και Εμβιομηχανικής του ΕΜΠ διαθέτει τη ρομποτική διάταξη TECAN FREEDOM EVO 150™. Πρόκειται για μια ρομποτική διάταξη που μπορεί να διαχειρίζεται πλάκες κυτταροκαλλιέργειας και ρευστά ώστε να εκτελεί αυτόματα σειρές βιολογικών πρωτοκόλλων. Αποτελεί σχεδίαση τύπου εύελικτης επιφάνειας εργασίας, όπου μπορούν να ενσωματωθούν συνδυασμοί οργάνων, φατνίων και ρομποτικών βραχιόνων που παρέχει η κατασκευάστρια ή ακόμη και ιδιοσκευεών, ώστε να προσαρμόζεται στις ανάγκες του χρήστη. Η συγκεκριμένη συσκευή που παρέχει το εργαστήριο διαθέτει τον ρομποτικό βραχίονα διαχείρισης ρευστών – Liquid Handler Arm (LiHa), βασικά φατνία πλακών καλλιέργειας και δοκιμαστικών σωλήνων και συσκευή RFID ώστε να μπορεί να διαχειρίζεται αυτόματα τα υλικά στην επιφάνεια εργασίας αν αυτά φέρουν barcode.

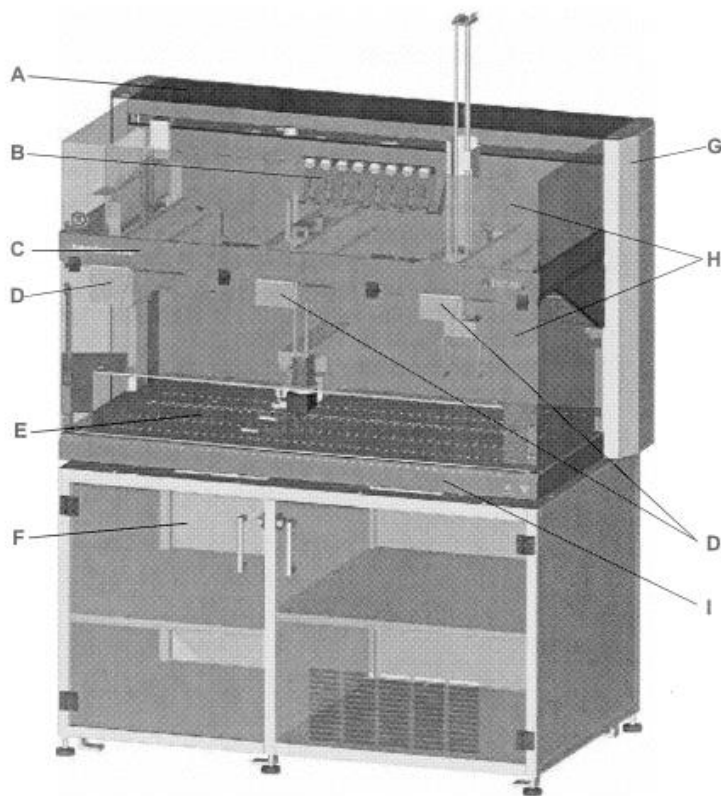


Fig. 4-1 Freedom EVO instrument overview

A	Housing	F	Cabinet, containing e.g. the system liquid container, the waste container, a centrifuge or readers
B	Diluters with syringes	G	Electronic boards behind lateral covers
C	Frame	H	Safety panels
D	Robotic arms	I	Front access panel
E	Worktable with positioning pins		

Εικόνα 50: Δομή της διάταξης TECAN (Source: TECAN Manual)

Τα ρομποτικά συστήματα της διάταξης ελέγχονται μέσω λογισμικού και γραφικού περιβάλλοντος σε ηλεκτρονικό υπολογιστή που συνδέεται με σειριακή θύρα με το TECAN. Το λογισμικό είναι ανεπτυγμένο με τη λογική του συσχετισμού κάθε εντολής προγραμματισμού, είτε του προγράμματος εντολών που περιγράφουν το πρωτόκολλο είτε των παραμέτρων των συσκευών της κατασκευάστριας, άλλης κατασκευάστριας του χώρου ή του χρήστη ως κατασκευαστή ιδιοσυσκευών, με βασικές παραμέτρους συστήματος απροσπέλαστες για τον απλό χρήστη:

- Θέτονται παράμετροι συστήματος ανάλογα με το μέγεθος της επιφάνειας εργασίας και τις συσκευές που διαθέτει (worktable range, LiHa, diluter volume).
- Αναφορικά με αυτές προγραμματίζονται οι διάφορες προσθήκες συσκευών από το χρήστη, π.χ. θέσης της ιδιοσυσκευής μας εκφρασμένης παραμετρικά ως απόσταση της από τους εγκατεστημένους πείρους ευθυγράμμισης. Έπειτα προγραμματισμός των σημείων εναπόθεσης των ικριωμάτων αντίστοιχα ως απόστασης από την γωνία της συσκευής και σύμφωνα με τις τυποποιημένες διαμορφώσεις (εμφωλευμένα offsets).
- Προγραμματισμός του πρωτοκόλλου από περιορισμένη προεπιλογή εντολών που ανακτούν παραμέτρους από τα ανωτέρω, είτε θέτουν το όργανο σε αναμονή ώστε να εκτελέσει τη λειτουργία της άλλης συσκευή κατασκευασμένη από το χρήστη (π.χ. magnetic trapper & shaker for ELISA, του φοιτητή Αλέξανδρου Πολέσιουκ).

Όσον αφορά τώρα το σύστημα διαχείρισης ρευστών, το υγρό συστήματος (system liquid – συνήθως απιονισμένο νερό) αντλείται ώστε να διαχυθεί στο σύνολο των σωληνώσεων της διάταξης. Έτσι δίνει τη δυνατότητα στα ρομποτικά ελεγχόμενα έμβολα (με κοχλίες στρεφόμενους από βηματικούς κινητήρες) στις 8 σύριγγες του συστήματος να πιπετάρουν εκμεταλλευόμενα το δημιουργούμενο διαφορικό πίεσης. Διατηρείται έτσι και η δυνατότητα πλύσης με ταχεία έκχυση του υγρού συστήματος. Η λειτουργία είναι παρόμοια με τις χειροκίνητες πιπέτες μόνο που αντί εκτοπίσματος αέρα χρησιμοποιείται το υγρό συστήματος.

Το κύριο όργανο ενδιαφέροντος του TECAN που εκτελεί και την διαχείριση του ρευστού και την εναπόθεση στις προγραμματισμένες θέσεις, το LiHa, θα αναλυθεί εκτενώς όσον αφορά τις δυνατότητες και την απόδοση του σε επόμενη παράγραφο που αφορά τον χαρακτηρισμό, τη ρύθμιση και την εφαρμογή του.

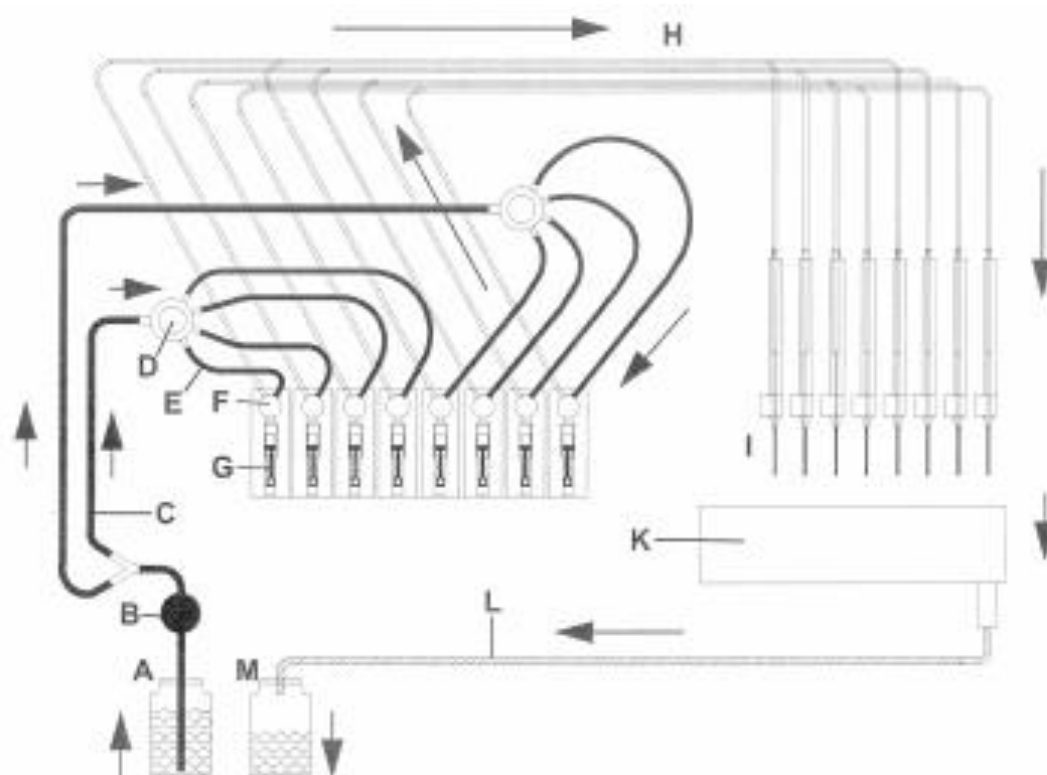


Fig. 4-18 Liquid system flow direction

Parts in contact with system liquid only

- A** System liquid container
- B** FaWa/MPO (optional)
- C** Aspirating tubing
- D** Distributor 1:4
- E** Interconnecting tubing
- F** 3-way valve
- G** Syringe

Parts in contact with system liquid and/or sample

- H** Pipetting tubing
- I** Tips
- K** Washstation
- L** Waste tubing
- M** Waste container

Εικόνα 51: Υδραυλικό σύστημα TECAN και διάγραμμα ροής των ρευστών (Source: TECAN Manual)

Όπως ήδη αναφέραμε ο έλεγχος του TECAN υλοποιείται μέσω επικοινωνίας του με ηλεκτρονικό υπολογιστή με σύνδεση σειριακής θύρας (Serial COM port) με χρήση 2 προγραμμάτων:

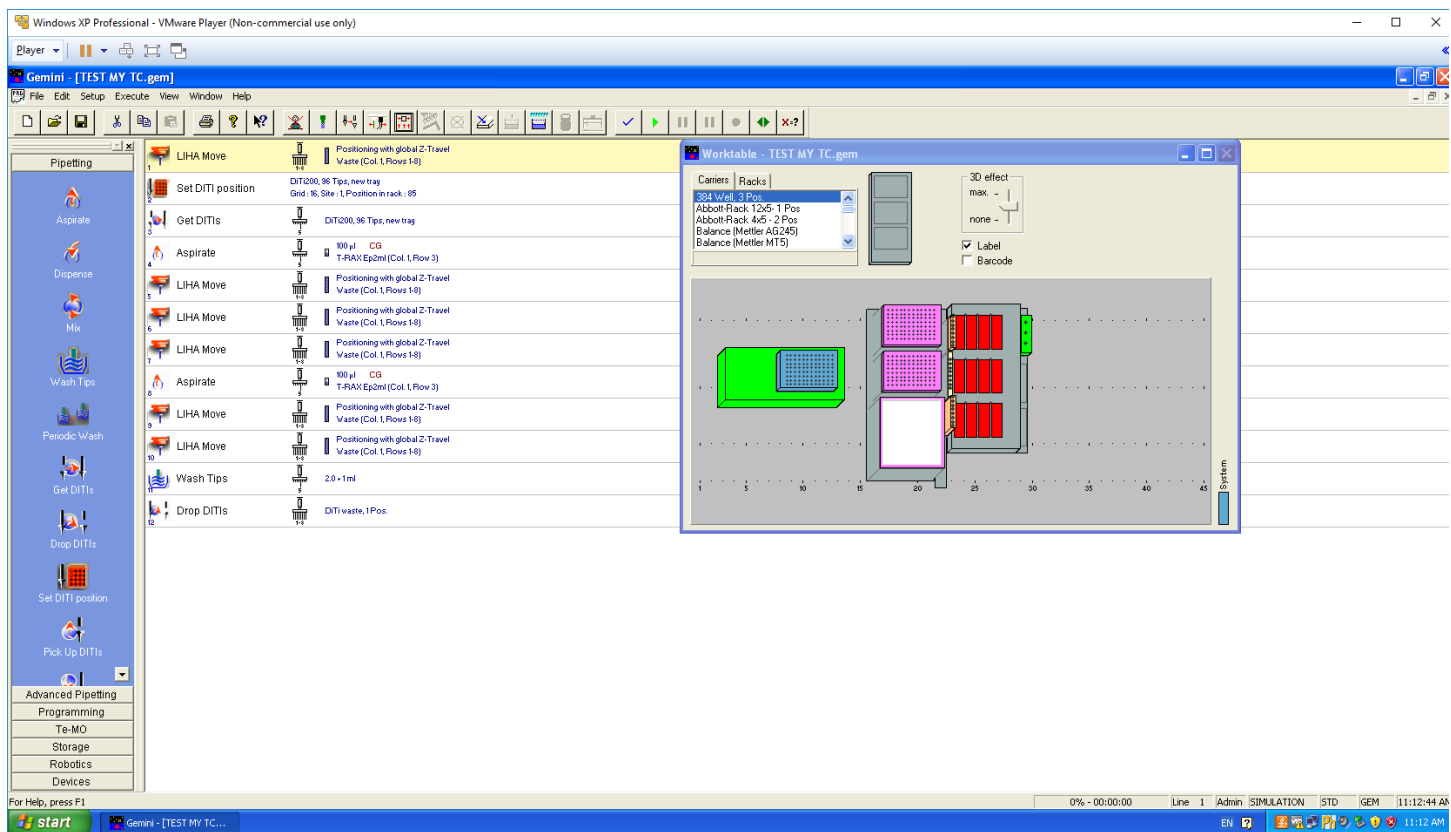
Βασικό πρόγραμμα ελέγχου κ συντήρησης της διάταξης με διαγνωστικές λειτουργίες. Κανονικά αποτελεί το κύριο περιβάλλον για έναν τεχνικό εγκατάστασης κ συντήρησης. Για τις ανάγκες της εργασίας χρησιμοποιήθηκε για:

- Αρχικοποίηση των ρομποτικών εξαρτημάτων πριν από κάθε κύκλο λειτουργίας
- Έλεγχος επιπέδου του υγρού συστήματος και των λειτουργιών του συνόλου των υδραυλικών συστημάτων – είτε ως τμήμα της διαδικασίας αρχικοποίησης είτε λόγω αλλαγής σωληνώσεων και συντήρησης
- Ευθυγράμμιση των άκρων του LiHa καθ' ύψος (Individual Z Calibration)



2. Gemini

Το βασικό πρόγραμμα ελέγχου του TECAN. Εδώ προγραμματίστηκαν οι οντότητες των ιδιοσυσκευών ώστε να συνεργάζονται με τη διάταξη, οι παράμετροι ελέγχου του πιπεταρίσματος και οι σταθερές των υγρών και φυσικά η αλληλουχία εντολών που αποτελεί το πρωτόκολλο εναπόθεσης.



Εικόνα 53: Gemini

Προγραμματισμός φορέων

Σύμφωνα και με την προηγούμενη παράγραφο του κεφαλαίου έπρεπε να προγραμματιστεί ο φορέας των καλυπτρίδων ως ανάλογο 96άρας πλάκας.

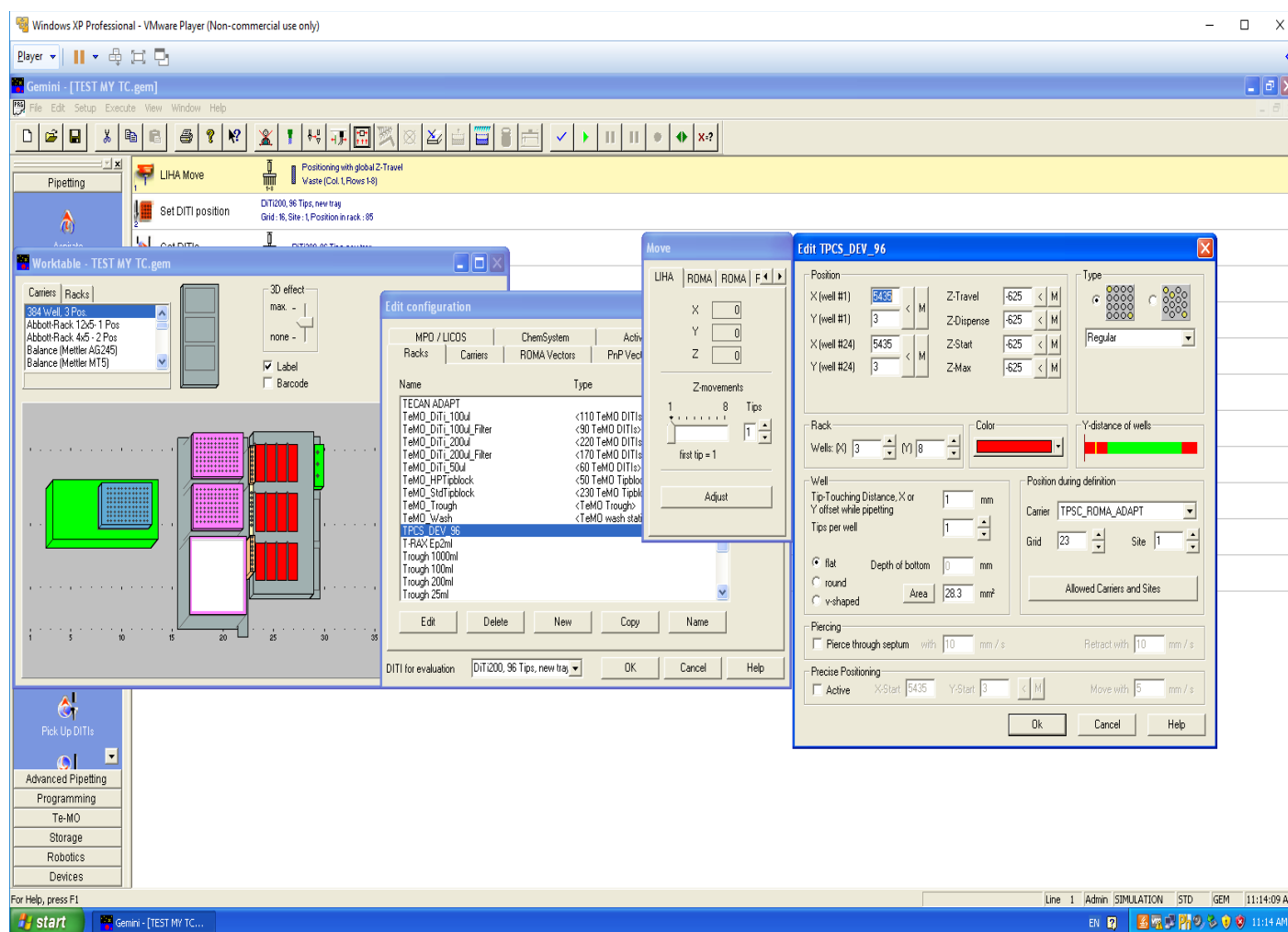
Ωστόσο λόγω της φύσης των συστοιχιών μας ήταν ανάγκη να θεωρηθούν ως 4 ξεχωριστά φατνία (racks) 24 πηγαδιών.

Γι' αυτό δίδονται στο πρόγραμμα οι διαστάσεις της καλυπτρίδας και θεωρείται ως εικονική πλάκα καλλιέργειας με βοθρία σε 8 σειρές και 3 στήλες. Δίδεται η θέση του πρώτου βοθρίου ως απόσταση κατά x και y από την άνω αριστερή γωνία της καλυπτρίδας, με την λειτουργία εκμάθησης: ο χρήστης χειροκίνητα κινεί μια πιπέτα ως δείκτη και την τοποθετεί στο σημείο που επιθυμεί να διδάξει την μηχανή, οπότε και αυτή αποθηκεύει τις XYZ συντεταγμένες σύμφωνα με τις παραμέτρους συστήματος που έχει. Η δήλωση του μοτίβου των 8 σειρών με 9mm απόσταση ανά βοθρίο και 3 σειρών με 8mm απόσταση ανά βοθρίο μας έχει καλύψει ήδη για τα υπόλοιπα βοθρία και η μηχανή γνωρίζει τις συντεταγμένες που πρέπει να προσεγγίσει όταν υπάρχει εντολή συνεργασίας με αυτή τη συσκευή.

Για να αναγνωριστεί όμως το φατνίο ως χρηστικό πρέπει να συνδέεται σε φορέα (carrier), που προγραμματίζεται εντελώς ανάλογα: τοποθετείται σε προϋπάρχοντες αριθμημένους πείρους ευθυγράμμισης και ο χρήστης δίνει τις διαστάσεις του φορέα και τις αποστάσεις κατά x και y από τον κοντινότερο στην άνω αριστερή γωνία του φορέα πείρο. Για την Z απόσταση που θα τεθεί το συνεργαζόμενο φατνίο μετράμε από την επιφάνεια εργασίας.

Με αυτό τον τρόπο οι συσκευές είναι παραμετροποιήσιμες, γίνεται να γίνει χρήση προεπιλεγμένων ρυθμίσεων και προσαρμογή σε περίπτωση αλλαγών στη συσκευή και φυσικά να γνωρίζει η μηχανή ακριβώς που πρέπει να προσεγγίζει το LiHa ακόμη και αν αλλάξουν θέσεις ο φορέας και το φαντίο θέση επάνω του (για φορείς με πολλαπλές θέσεις), απλά με αλλαγή του αριθμού του πείρου και της θέσης ή ακόμη και drag and drop στη γραφική αναπαράσταση της επιφάνειας εργασίας!

Στην περίπτωση μας καθώς μας παρέχεται ένας φορέας 3 θέσεων για 96αρές πλάκες από τον κατασκευαστή τον προσαρμόσαμε ώστε να θεωρείται ως φορέας το συσσωμάτωμα φορά και ιδιοσυσκευής και φαντίο οι 4 καλυπτριδες, με τις ανάλογες ρυθμίσεις που περιγράψαμε για θέση στο επίπεδο και ύψη πιπεταρίσματος αρκετά κοντά στην επιφάνεια ώστε να εναποτίθενται τελικά οι σταγόνες εναιωρήματος των δουλ.



Εικόνα 54: Παράθυρα προγραμματισμού της ιδιοσυσκευής

Προγραμματισμός διαχείρισης ρευστών

Τα υγρά που διαχειριζόμαστε είναι από τη φύση τους πολύ πιο ιξώδη από το νερό ή διαλύματα όπως το αίμα ή τα θρεπτικά μέσα που συνήθως διαχειρίζεται μια τέτοια μηχανή σε πρωτόκολλα πρωτεομικής.

Ότι υγρό και να τεθεί προς χρήση, πρέπει για το TECAN να αποτελεί καταχώρηση μιας βάσης δεδομένων από όπου ανακτώνται οι ρυθμίσεις για τη διαχείριση του - να αποτελεί μέρος μιας κλάσης υγρών ή μια κλάση από μόνο του, για πιο ιδιαίτερες εφαρμογές. Οι κλάσεις υγρών (liquid classes) προσφέρουν μια πληθώρα

ρυθμίσεων όπως τις ταχύτητες αναρόφησης κ εναπόθεσης, τους χρόνους αναμονής, ακόμη και τη δυνατότητα ένδειξης της στάθμης υγρού ή της ύπαρξης θρόμβων. Υπάρχουν πολλές προρυθμισμένες κλάσεις με τα πιο κοινά ρευστά (νερό, αίμα, DMEM κτλ) αλλά σε εφαρμογές όπως στη δική μας είναι ευτύχημα η δυνατότητα ρυθμίσεων λόγω ειδικών απαιτήσεων.

Οι ρυθμίσεις για κάθε κλάση χωρίζονται σε τρεις 4 επιλογές ανάλογα με τον όγκο και την πιπέτα που φέρει το LiHa:

- Αναλώσιμη 3-15 ul
- Αναλώσιμη 15-300 ul
- Αναλώσιμη για όλους τους όγκους
- Μόνιμη 3-15 ul
- Μόνιμη 15-300 ul
- Μόνιμη για όλους τους όγκους

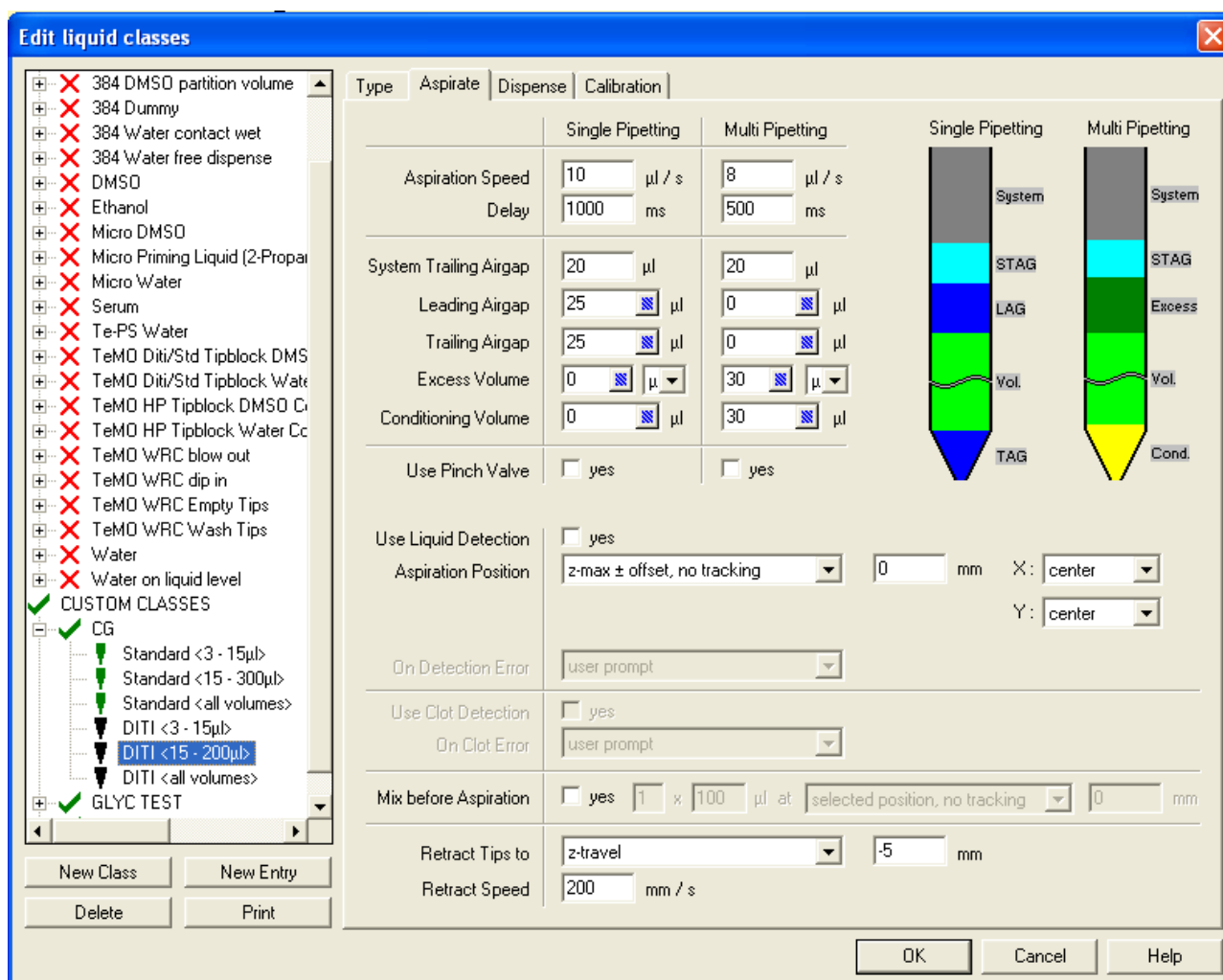
Κάθε φορά που αναροφά ή εναποθέτει το TECAN καλεί τις ρυθμίσεις από κάθε επιλογή ανάλογα με τον όγκο που του ζητούμε.

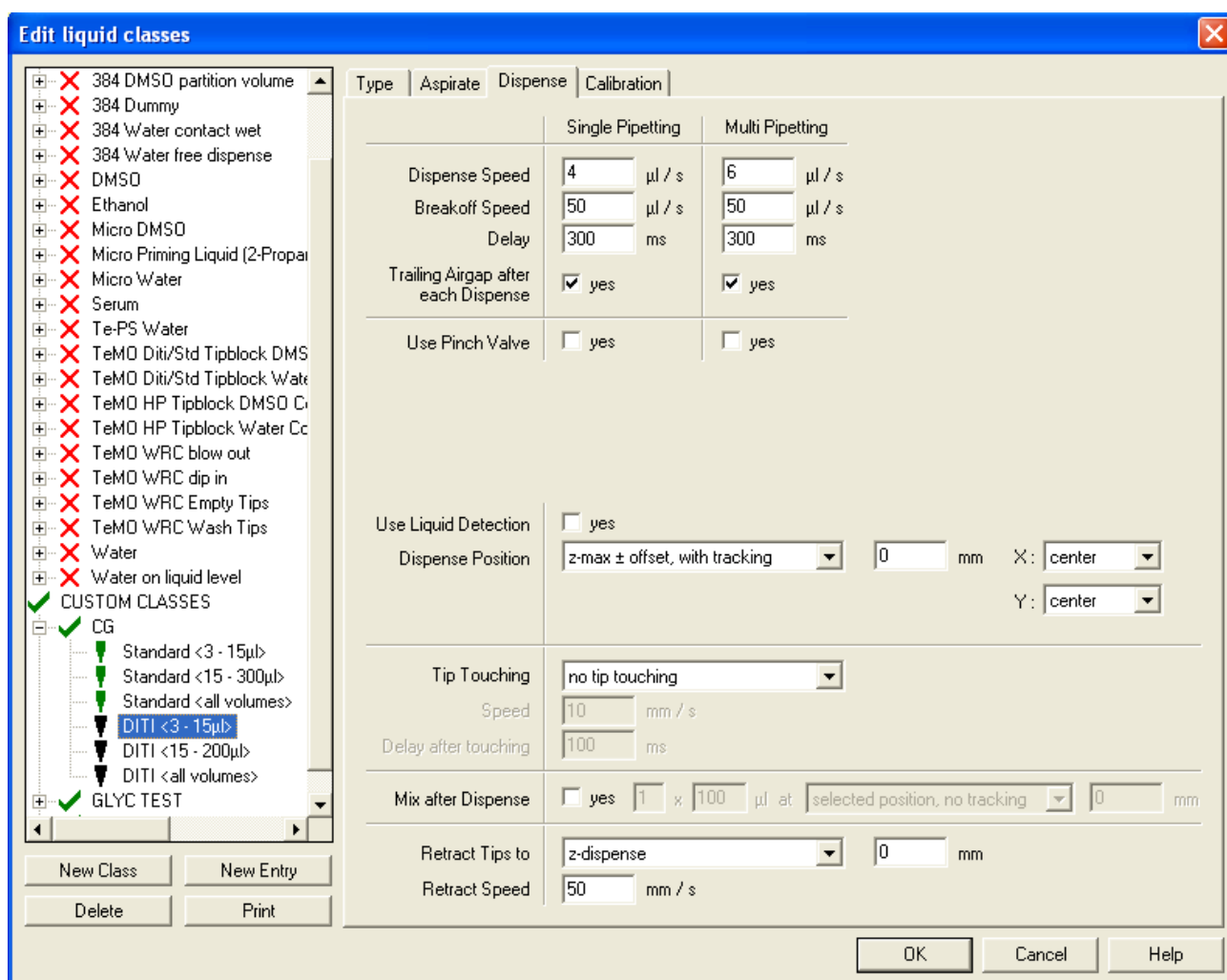
Για κάθε επιλογή τώρα οι ρυθμίσεις χωρίζονται σε 2 καρτέλες

- Αναρόφησης
- Εναπόθεσης

Συγκεκριμένα για την εφαρμογή μας, λόγω ιξώδους και ιδιοτήτων του υγρού, προσπαθήσαμε να μιμηθούμε τυποποιημένες πρακτικές χειρισμού αυτών των υγρών από τον άνθρωπο – εισάγωντας ουσιαστικά την σταθερότητα και την επαναληψιμότητα:

- Ρυθμισαμε τις ταχύτητες αναρόφησης και εναπόθεσης ώστε να είναι αρκετά χαμηλές για να είναι διαχειρίσιμη η αδράνεια του ρευστού και να μη δημιουργούνται φυσαλίδες.
- Ορίσαμε συγκεκριμένα κενά αέρος (Trailing airgap TAG , Lagging Airgap LAG, System Trailing Airgap STAG) που αναροφά ή διάταξη ώστε να μειώσουμε την εμφάνιση μηνίσκων και να εμποδίσουμε την φραγή του στομίου από σωματίδια που έχει το διάλυμά μας.
- Ορίσαμε χρόνο αναμονής μετά την αναρόφηση και εκτός σωλήνα Eppendorf για να καταλήξει ξανά εκεί λόγω βαρύτητας η σταγόνα που μπορεί να σχηματίζεται από υγρό που φέρει η πιπέτα στο εξωτερικό της.





Εικόνα 56: Ρυθμίσεις εναπόθεσης για όγκους 3 – 15 μl (για εμάς 6) με την πιπέτα 200 μl της κλάσης Collagen - GAG

Ακόμη αναφέρεται η ρύθμιση της ανίχνευσης υγρού, που υλοποιείται ως μέτρηση της μεταβολής της χωρητικότητας του υγρού που αντιλαμβάνεται η μηχανή, εφόσον χρησιμοποιεί πιπέτες από αγωγίμο υλικό.

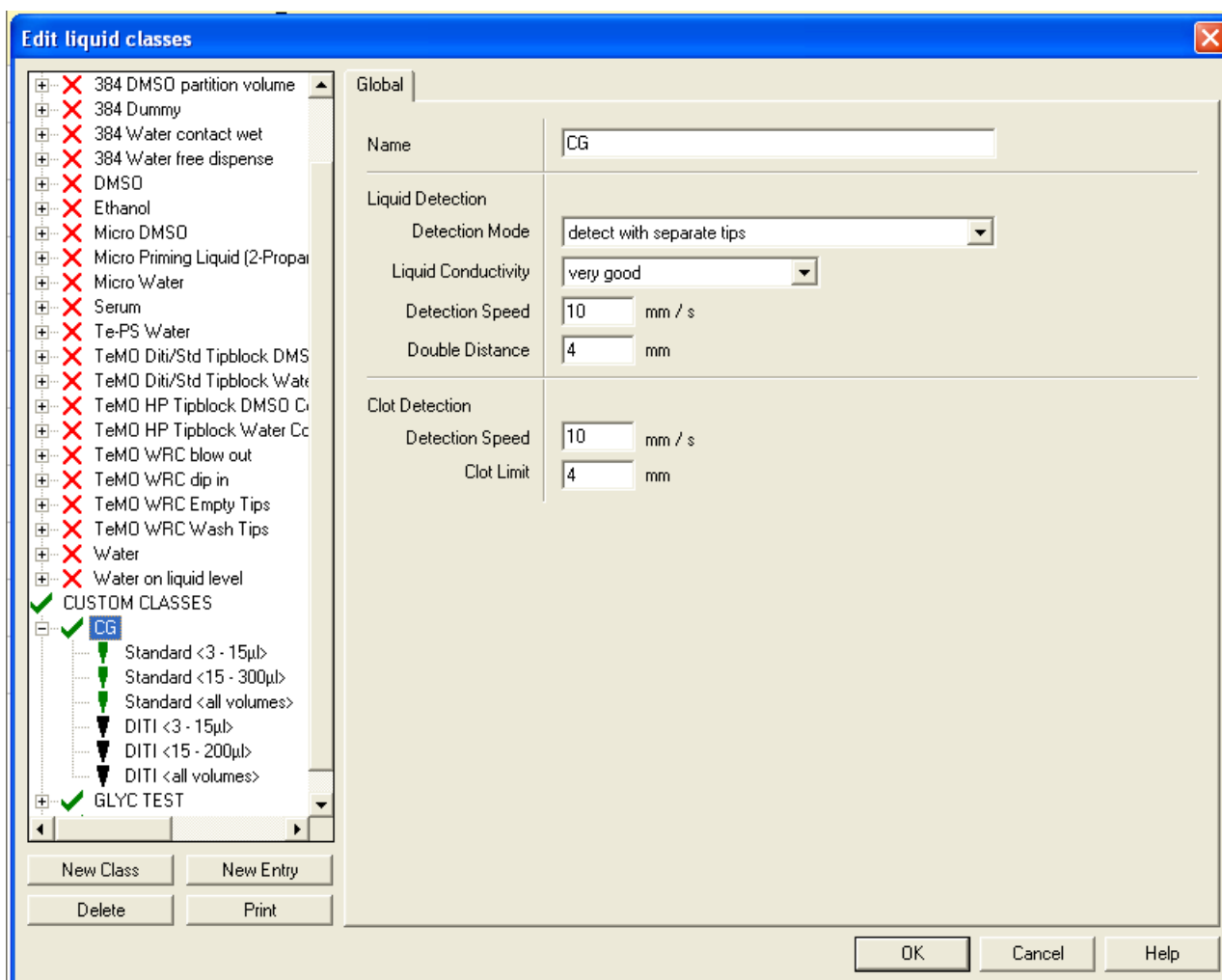
Οι επιλογές ανάγονται σε ποιοτικές – πολύ καλή, μέτρια, κακή αγωγιμότητα- στο περιβάλλον των ρυθμίσεων , με το νερό (μη απιονισμένο) να θεωρείται πως έχει μέτρια αγωγιμότητα.

Με χρήση πολύμετρου μετρήσαμε τις σχετικές αντιστάσεις διαλυμάτων με τα ηλεκτρόδια πάντα στην ίδια απόσταση μεταξύ τους (2cm):

Liquid	Type I water	Tap water	PBS	Collagen Slurry	Glycerol 70vol
Resistance $k\Omega$	1500	500	150	130	3400

Πίνακας 14: Πίνακας μετρήσεων αντίστασης υγρών που χρησιμοποιήθηκαν στο TECAN

Αντιλαμβανόμαστε πως τα υλικά που χρησιμοποιούμε είναι πολύ καλοί αγωγοί, όπως και αναμενόταν λόγω φορτισμένων σωματιδίων στα διαλύματα. Συνεπώς οι ρυθμίσεις στην κλάση είναι ανάλογες:



Εικόνα 57: Γενικές ρυθμίσεις κλάσης Collagen -GAG

Εντολές που υλοποιούν το πρωτόκολλο εναπόθεσης εναιωρήματος

Δεδομένου του τρόπου λειτουργίας του TECAN το τελικό βήμα της υλοποίησης του προγράμματος προς εκτέλεση φαίνεται απλοϊκό. Αποτελείται από βασικές εντολές των οποίων οι παράμετροι επιλέγονται από το σύνολο των προρυθμίσεων που δείξαμε στις προηγούμενες παραγράφους. Συγκεκριμένα για το πρωτόκολλο μας χρησιμοποιήσαμε τις πολύ βασικές επιλογές:

- της κίνησης του βραχίονα (LiHa move)
- του ορισμού θέσεις φορέα αναλωσίμων πιπέτων (Set DiTi position)
- της ανάληψης πιπέτας από το βραχίονα (Get DiTis)
- της αναρρόφησης (Aspirate)
- της εναπόθεσης (Dispense)
- και της πλύσης και εκτίναξης χρησιμοποιημένης πιπέτας (wash tip & eject tip)

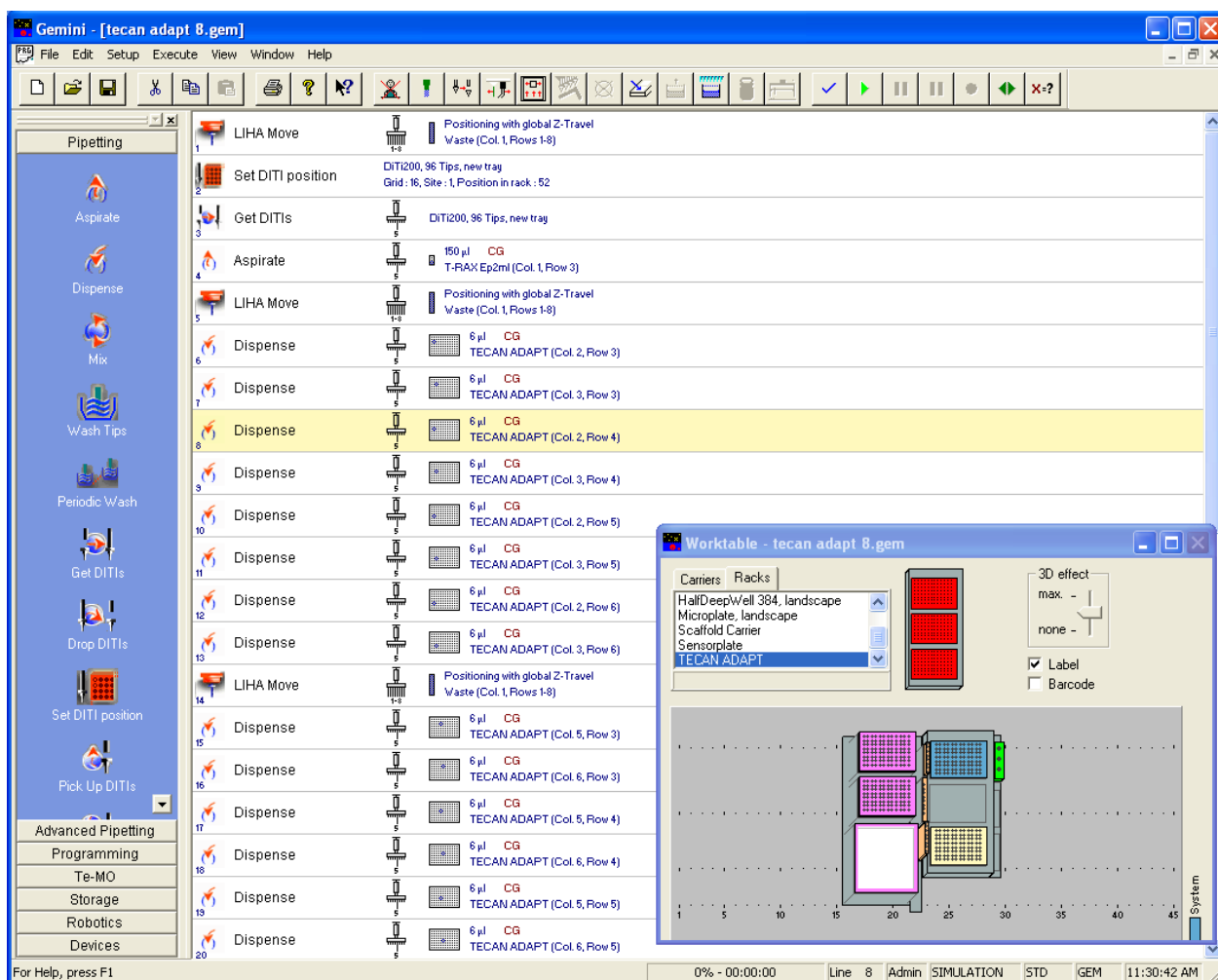
Ο ορισμός της θέσης του φορέα αναλωσίμων γίνεται απλά με επιλογή του στην γραφική αναπαράσταση αφού η θέση του είναι αποθηκευμένη στο σύστημα (grid & carrier position). Αναλόγως είναι ορισμένη και η θέση κάθε πιπέτας αφού είναι αντιστοιχισμένες σε διαμόρφωση 96άρας πλάκας (96 πιπέτες φέρονται σε κάθε φατνίο του φορέα). Ορίζουμε ποιές πιπέτες θα αναλάβουν μύτες και ορίζουμε και από ποια θέση θα ξεκινήσει η ανάληψη.

Η αναρρόφηση γίνεται από σωλήνα Eppendorf των 2 ml σε ανάλογο φορέα του οποίου η θέση είναι ρυθμισμένη με τον γνωστό τρόπο, όπως και το βάθος και η μορφή των σωλήνων που φέρει και υλοποιείται 100 μ l τη φορά – οι μύτες που διαθέτουμε έχουν συνολική χωρητικότητα 200 μ l αλλά χρησιμοποιούμε και τα κενά αέρος που αναφέραμε παραπάνω. Η ταχύτητα αναρρόφησης, τα κενά αέρος, η χρονοκαυστήρηση για διαχείριση αδράνειας του ρευστού και η ανίχνευση του είναι όλα προορισμένα από την κλάση. Η εντολή χρειάζεται μόνο να της ορίσουμε το εξάρτημα και τη σχετική του θέση (carrier/rack ID on grid ID) τον όγκο και την κλάση ρευστού.

Η εναπόθεση ακριβώς όμοια ορίζεται να γίνει στις θέσεις των εικονικών βοθρίων πάνω στις καλυπτρίδες που θέτουμε στη συσκευή και ο ζητούμενος όγκος ορίζει και τις ρυθμίσεις που ανακαλούνται από την κλάση.

Οι κινήσεις του βραχίονα μετά από κάθε αναρρόφηση ορίζονται ως ταχείες και άνω από την περιοχή πλύσης ώστε με την δύναμη που ασκείται λόγω επιβράδυνσης να απορρίπτονται τυχόν σταγόνες που δεν απορρίφθηκαν στο βήμα της χρονοκαυστήρησης πάνω από τον σωλήνα Eppendorf.

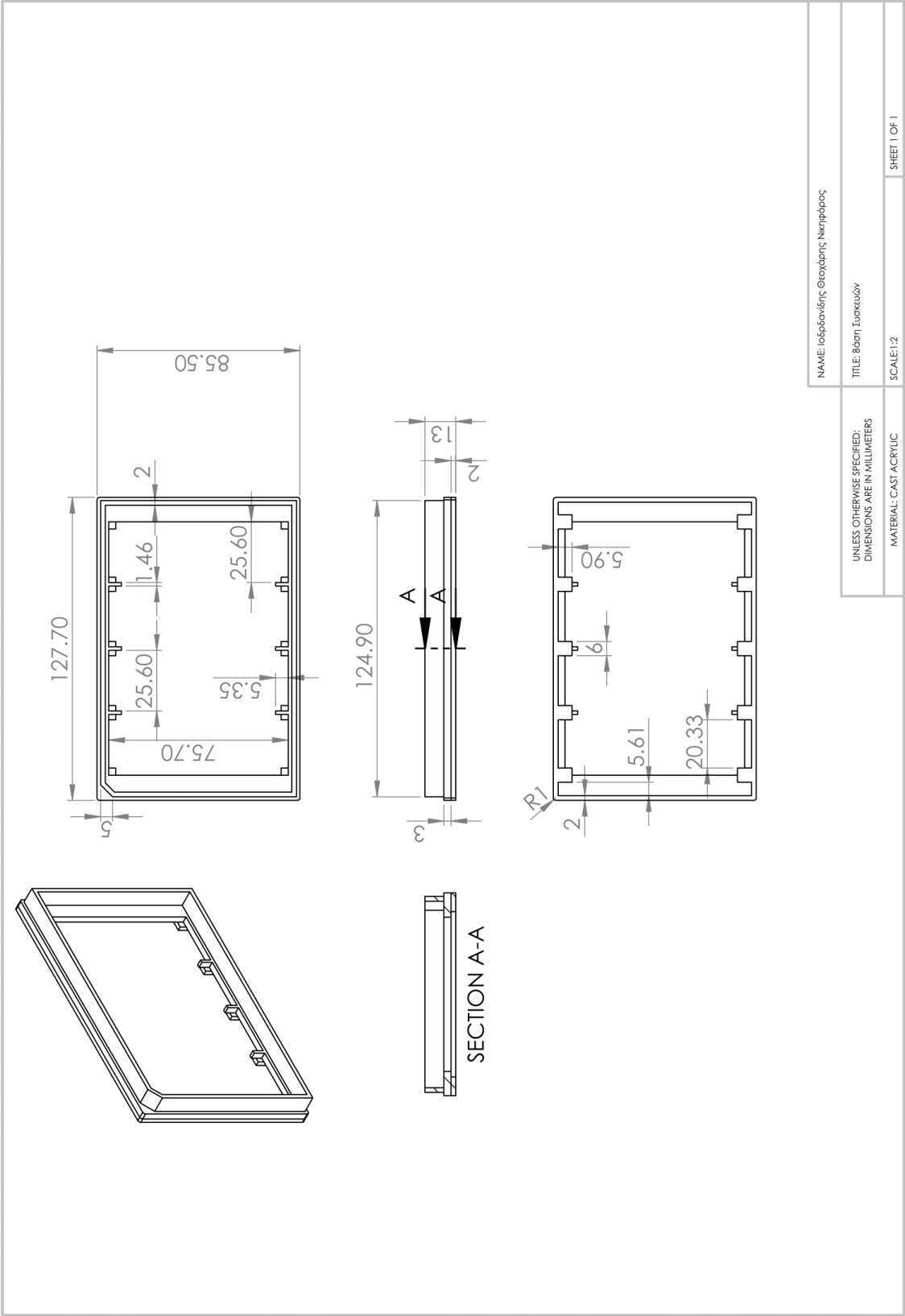
Η πλύση και απόρριψη της πιπέτας γίνεται για λόγους καθαριότητας.



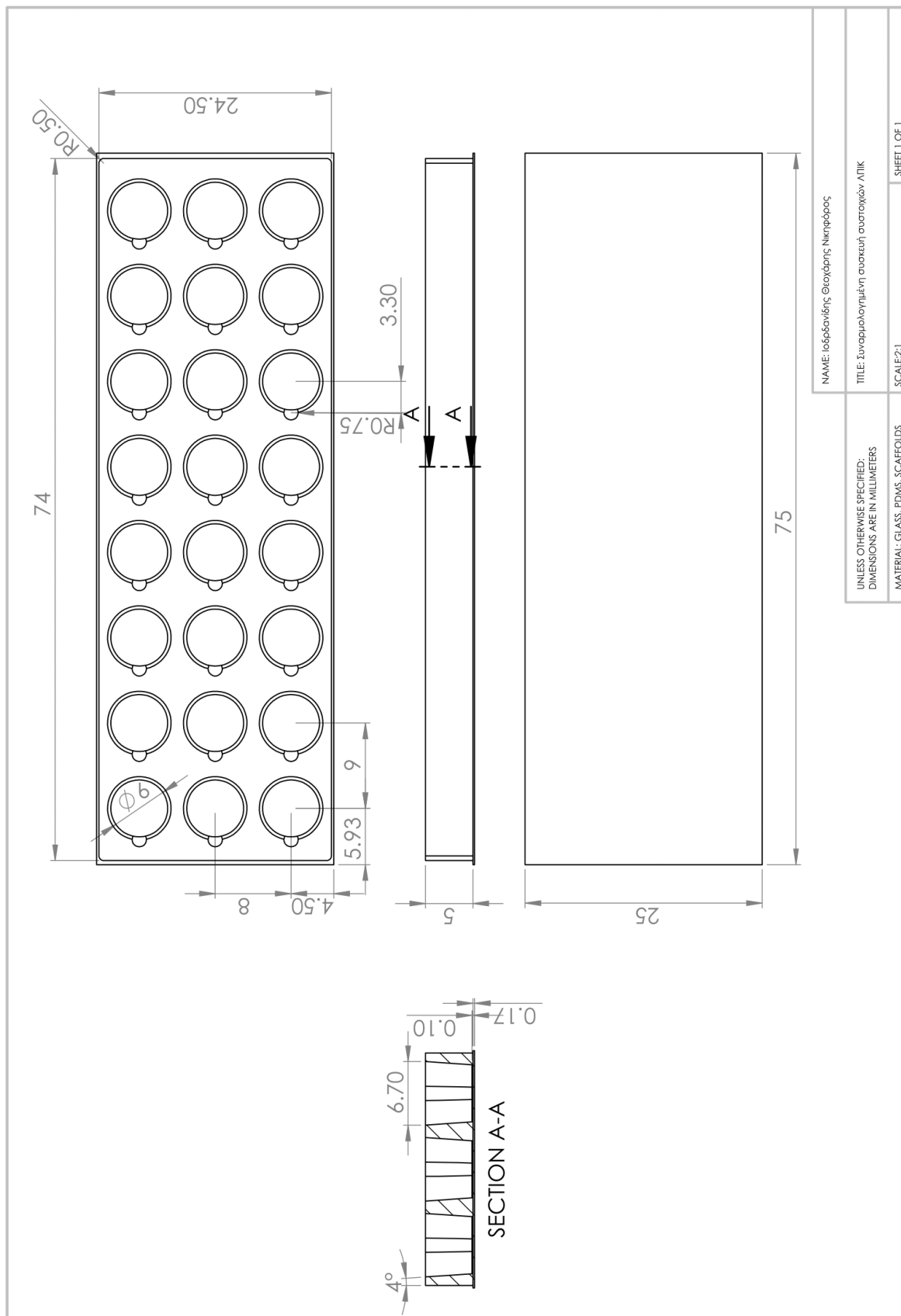
Εικόνα 58: Απόσπασμα από το πρόγραμμα

Παράρτημα Δ: Κατασκευαστικά Σχέδια

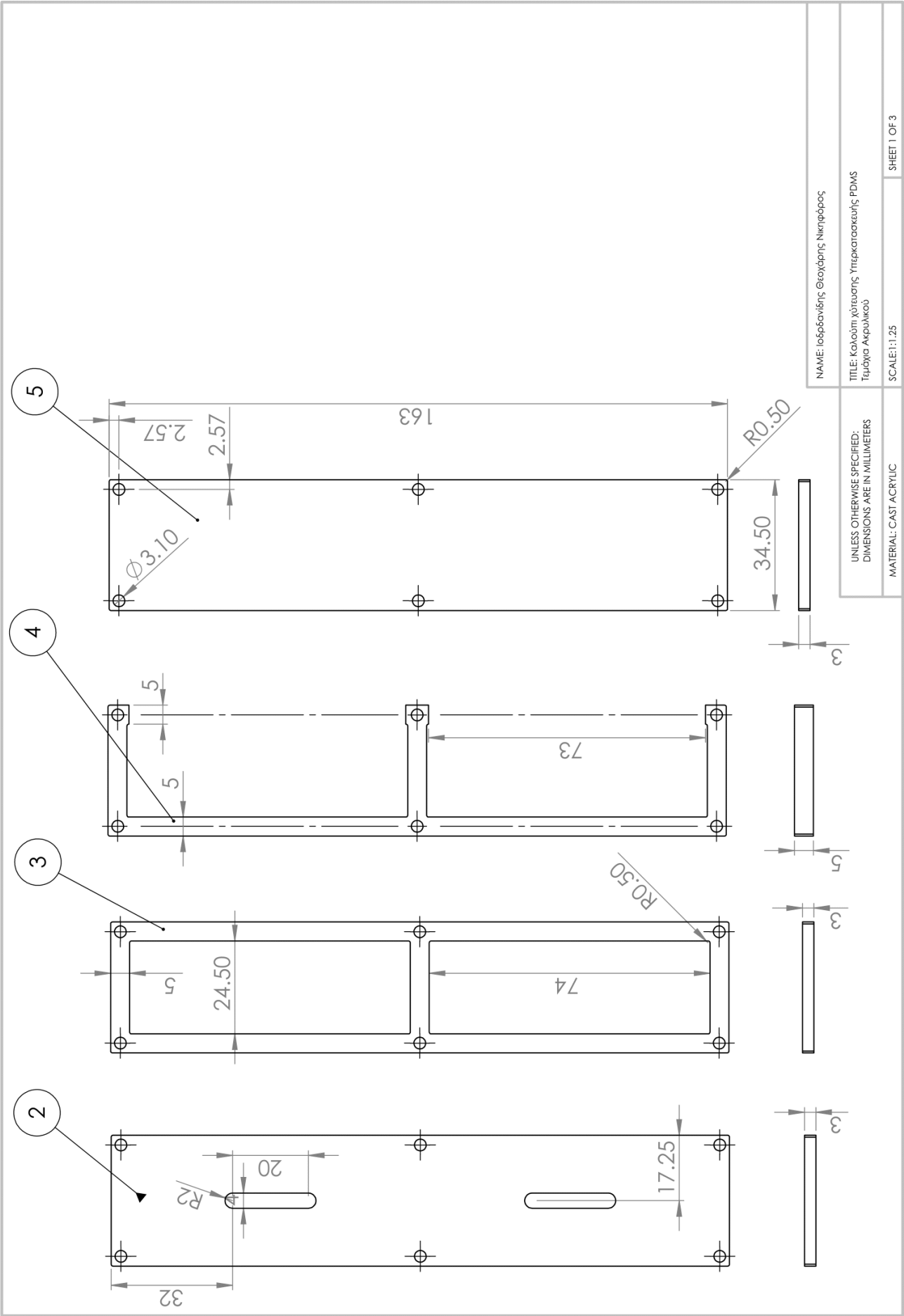
Δ.1 Βάση συσκευών

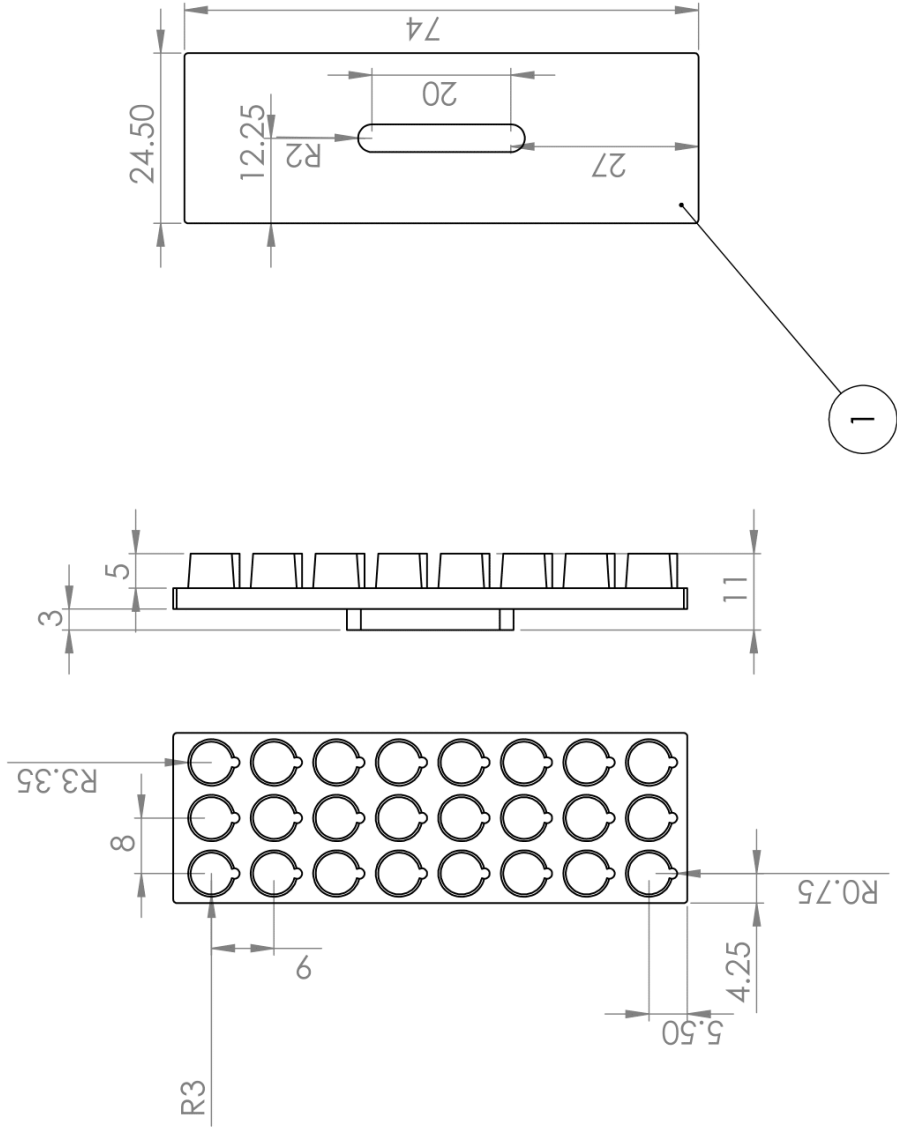


Δ.2 Συσκευή συστοιχίων ΛΠΙΚ

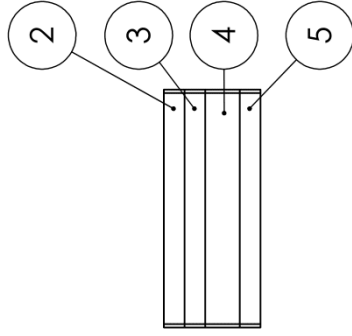
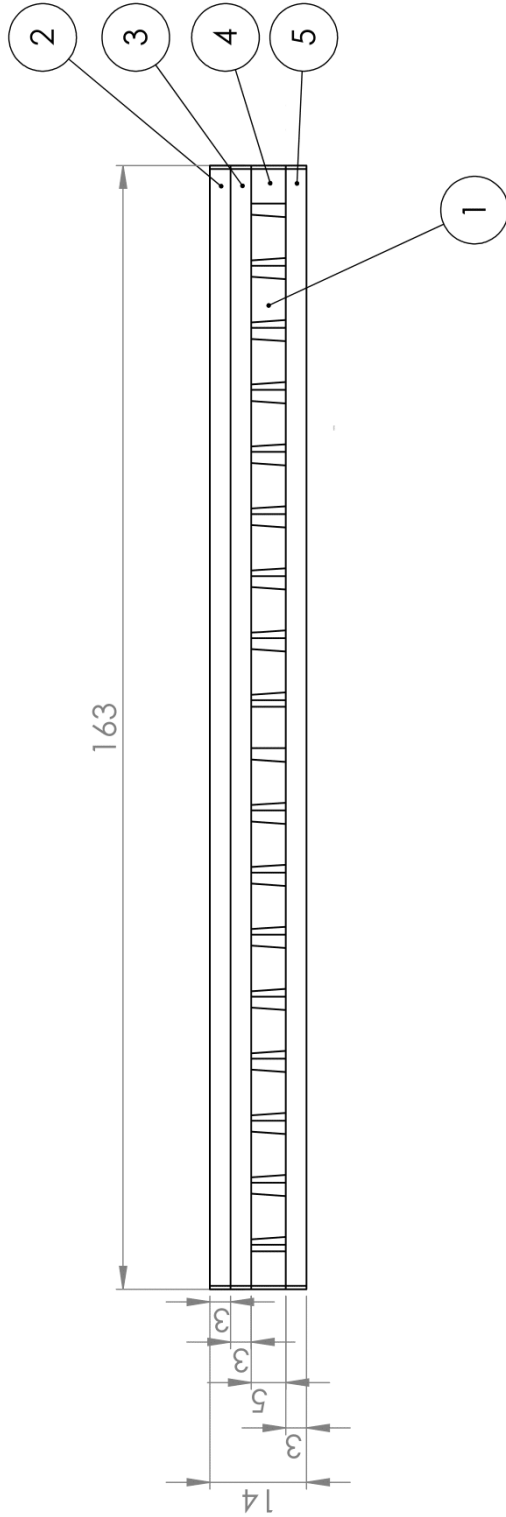
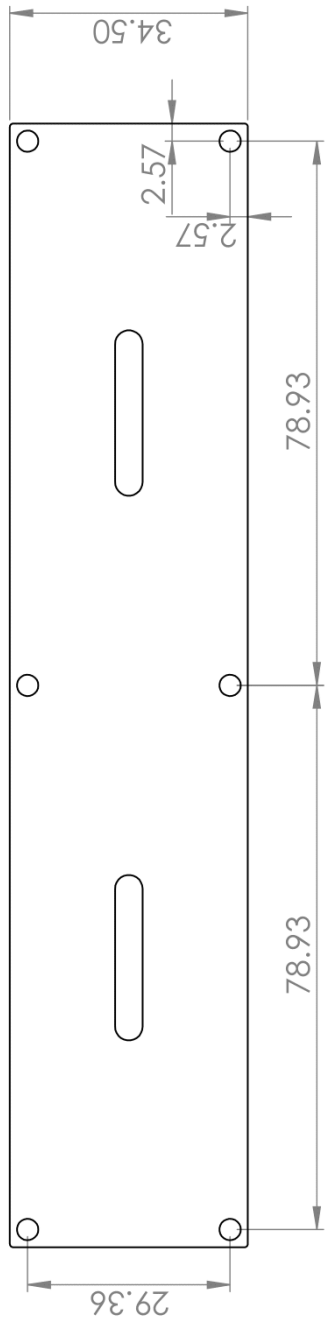


Δ.3 Καλούπι Χύτευσης PDMS (Υπερκατασκευή 25 X 75 mm)



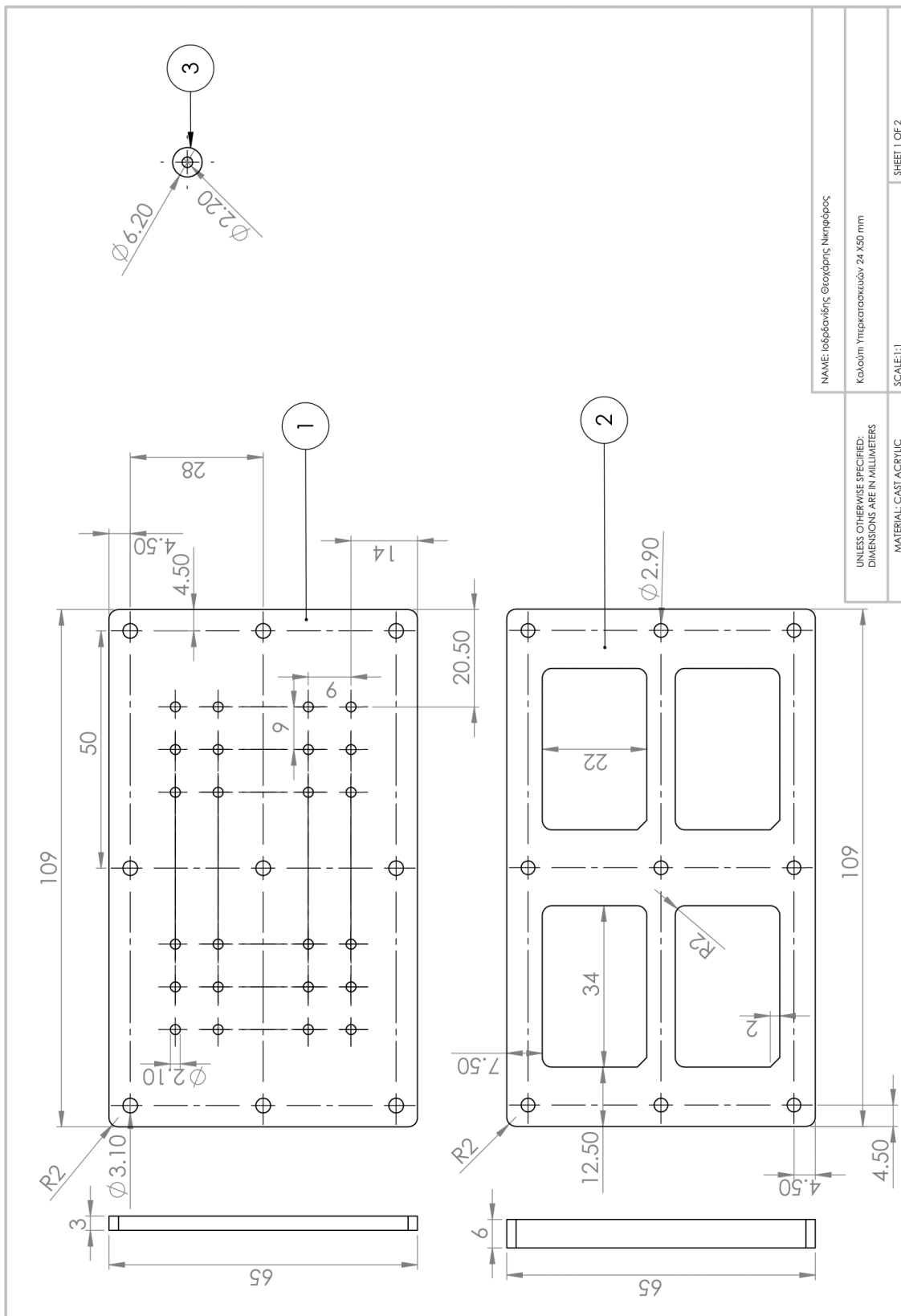


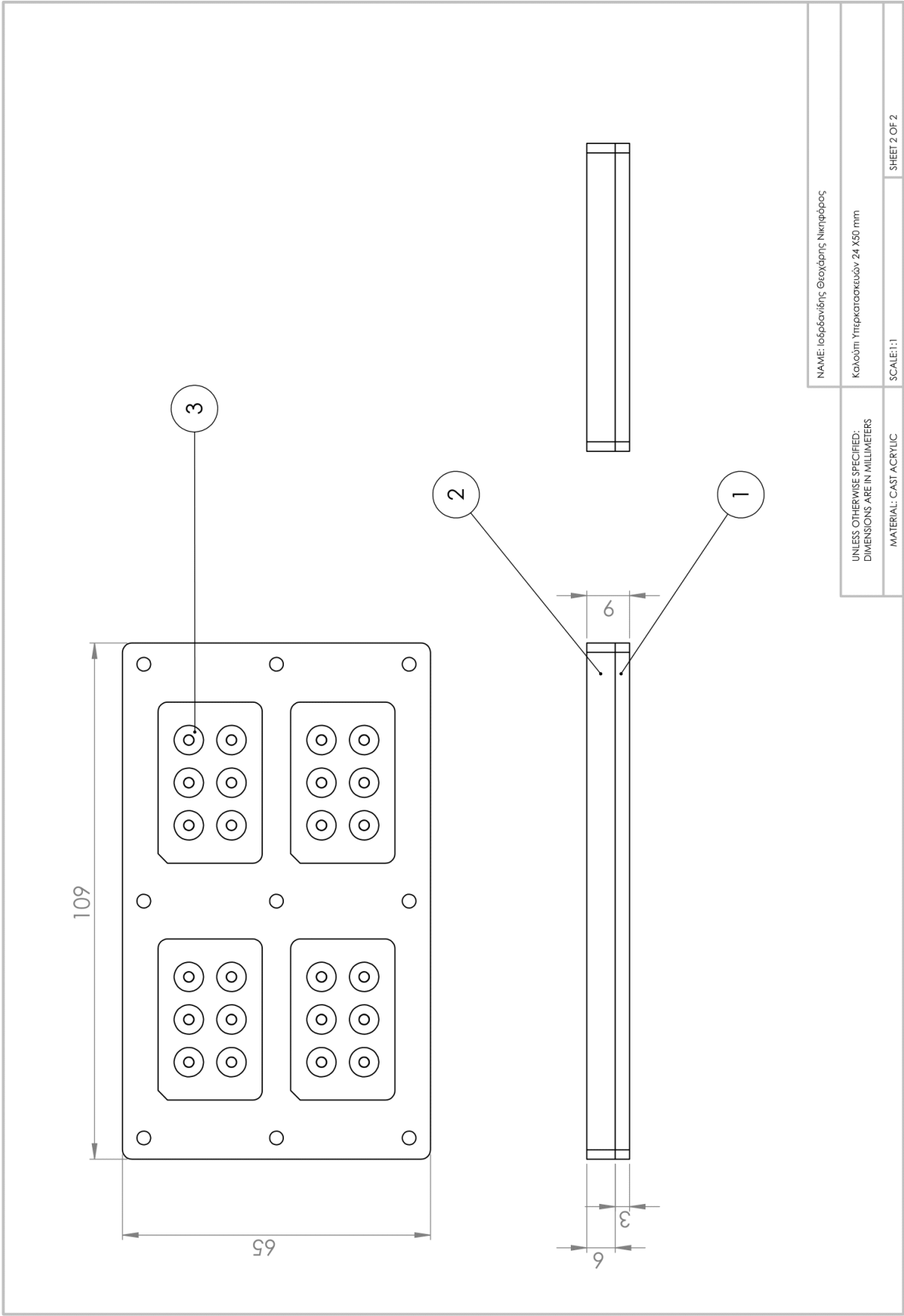
NAME: Ιωάννης Θεόδωρος Νικηφόρος	
UNLESS OTHERWISE SPECIFIED: DIMENSIONS ARE IN MILLIMETERS	TITLE: Καλούπι χύτευσης Υπερκατασκευής PDMS Όψεις Τεμαχίου 3D Print
MATERIAL: ABS	SCALE: 1:1
SHEET 2 OF 3	



NAME: Ιωάννης Θεοφάνης Νικηφόρος	
UNLESS OTHERWISE SPECIFIED: DIMENSIONS ARE IN MILLIMETERS	TITLE: Καλούπι χύτευσης Υπερκατασκευής PDMS Συμμετοχολογμένο
MATERIAL: CAST ACRYLIC	SCALE: 1:1
SHEET 3 OF 3	

Δ.4 Καλούπι Χύτευσης PDMS (Καλούπι Υπερκατασκευής 24 X 50 mm)

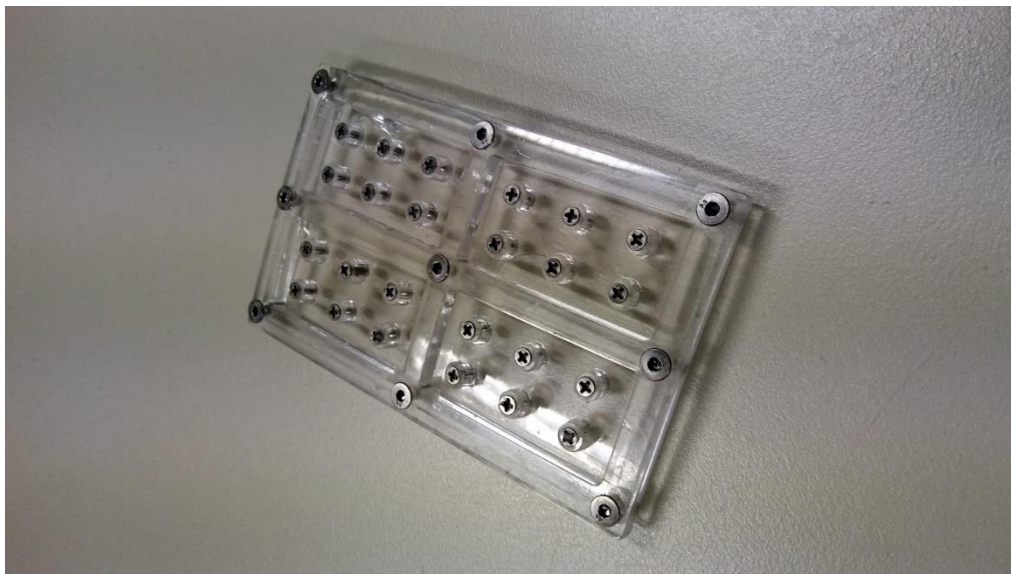




Παράρτημα Ε : Αναδρομή Κατασκευών Καλουπιών Χύτευσης PDMS

- **Μοντέλο 1 - Μ. Σαρκίρη / Δρ. Δ. Τζεράνης [5]**

Πρόκειται για καλούπι που συναρμολογείται από 2 φύλλα PMMA: Την κάτω επίπεδη επιφάνεια (πάχος 3mm) και τα όρια που καθορίζουν τις XYZ διαστάσεις των υπερκατασκευών (πάχος 3mm). Τα βοηθία καθορίζονται από κυλίνδρους PMMA. Όλα τα εξαρτήματα συσφίγγονται με κοχλίες. Η άνω επιφάνεια είναι ελεύθερη (επαφή με αέρα) καθώς δεν αφορά επιδρά η επιτεδότητα της για στη συναρμογή με τις καλυπτρίδες και είναι επαρκής για την εξάτμιση του διαλύτη. Τα βοηθία δεν αντιστοιχούν σε αυτά της 96άρας πλάκας. Οι υπερκατασκευές σχεδιάστηκαν για συναρμολόγηση με καλυπτρίδες 24*50*0.17.



Εικόνα 59: Καλούπι Μοντέλο 1

- **Μοντέλο 2 -- Μ. Σαρκίρη / Δρ. Δ. Τζεράνης [5]**

Το συγκεκριμένο μοντέλο είναι σχεδιασμένο για καλυπτρίδες 24*50 mm αλλά αυτή τη φορά κάθε υπερκατασκευή διαθέτει 8 βοηθία που ακολουθούν τη διαμόρφωση της 96άρας πλάκας – τα κέντρα τους έχουν απόσταση 9mm μεταξύ τους. Αποτελείται από την επίπεδη βάση (πάχος 3mm) όπου είναι κολλημένοι οι κύλινδροι που ορίζουν τα βαθρία (αυξημένα κατασκευαστικά σφάλματα), την περίμετρο που ορίζει τις XYZ διαστάσεις (πάχος 4mm) και ένα επιπλέον ανώτερο κομμάτι (πάχος 3mm) που προσπάθησε να ορίσει και την άνω επιφάνεια των υπερκατασκευών, με αποτέλεσμα βέβαια να δυσκολεύει την χύτευση του παχύρευστου PDMS από τα μικρότερα κενά.



Εικόνα 60: Καλούπι Μοντέλο 2

- **Μοντέλο 3**

Πρόκειται για την πρώτη κατασκευή αυτής της εργασίας. Αποτέλεσε προσπάθεια βελτίωσης του μοντέλου 1. Αυξήθηκε το ύψος των υπερκατασκευών από 3 σε 5/6 mm σύμφωνα με τις προδιαγραφές όγκου βοθρίων ενώ οι κοχλίες σύσφιξης των εξαρτημάτων



Εικόνα 61: Καλούπι Μοντέλο 3

μετατράπηκαν σε περαστούς καθώς παρατηρήθηκε φθορά στο μοντέλο 1 τόσο από την αρχική διάνοιξη σπειρωμάτων όσο και από την διόγκωση των ρωγμών λόγω των πλύσεων με ισοπροπανόλη για καθαρισμό.

Μια επιτυχημένη εφαρμογή και το πρότυπο καλούπι για χρήση συσκευών βασισμένων σε καλυπτρίδες 24*50.

Με τα επόμενα μοντέλα έγινε η προσπάθεια να μετατραπούν σε κλείστα τα καλούπια χύτευσης για καλύτερο ορισμό των διαστάσεων των υπερκατασκευών σε συνδυασμό με τη χρήση μορφών κατασκευασμένων σε 3D Printer.

Στο σημείο αυτό θα ήθελα να ευχαριστήσω τους Δρ. Χριστόφορο Προβατίδη (Καθηγητής ΕΜΠ και υπεύθυνος εργαστηρίου) και Δρ. Σταμάτη Πολύδωρα (ΕΔΙΠ) του Εργαστηρίου Ταχείας Κατασκευής Πρωτοτύπων και Εργαλείων του ΕΜΠ για παροχή της δυνατότητας να κατασκευαστούν τα απάρτια στην μηχανή 3D Printing Stratasys Fortus MC360 και για την άψογη συνεργασία και βοήθεια στον σχεδιασμό και χειρισμό του λογισμικού της μηχανής.

- **Μοντέλο 4**

Πειραματικό καλούπι που παράγει μονή υπερκατασκευή για καλυπτρίδα 24*50 mm. Αποτελεί προσπάθεια για μια κλειστή εκδοχή του μοντέλου 3 με χρήση 3 printed διαμόρφωσης ώστε να μειωθεί ο όγκος PDMS που χρησιμοποιείται. Αφέθηκαν οπές για τη χύτευση.

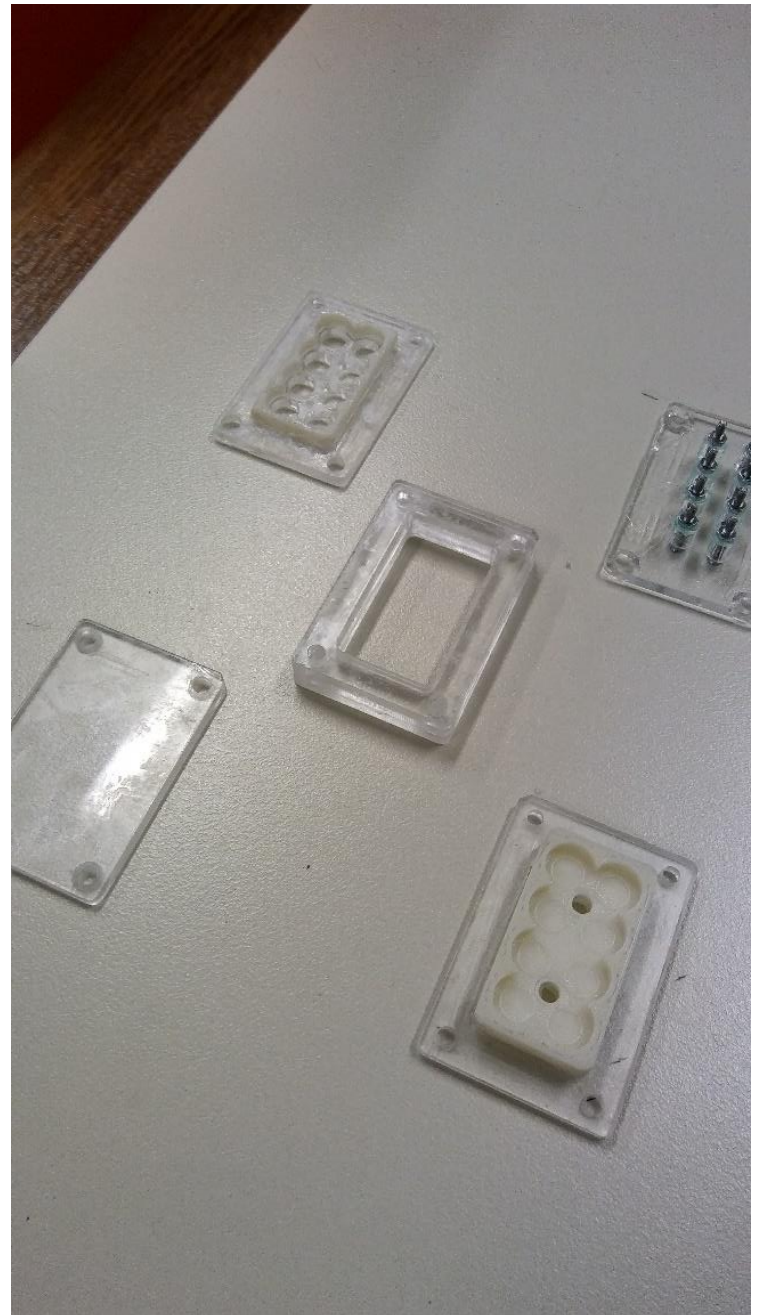
- **Μοντέλο 5**

Όμοια με το μοντέλο 4, αλλά αφαιρέθηκαν οι κύλινδροι για να ευκολιά εξαγωγή της υπερκατασκευής από το καλούπι. Το καλούπι ορίζει αυλακώσεις που καθοδηγούν την κοπή από εργαλείο βιοψίας για την δημιουργία των βοθρίων

Εικόνα 62: Μοντέλα 4&5. Αλλάζει η 3D Printed μορφή:

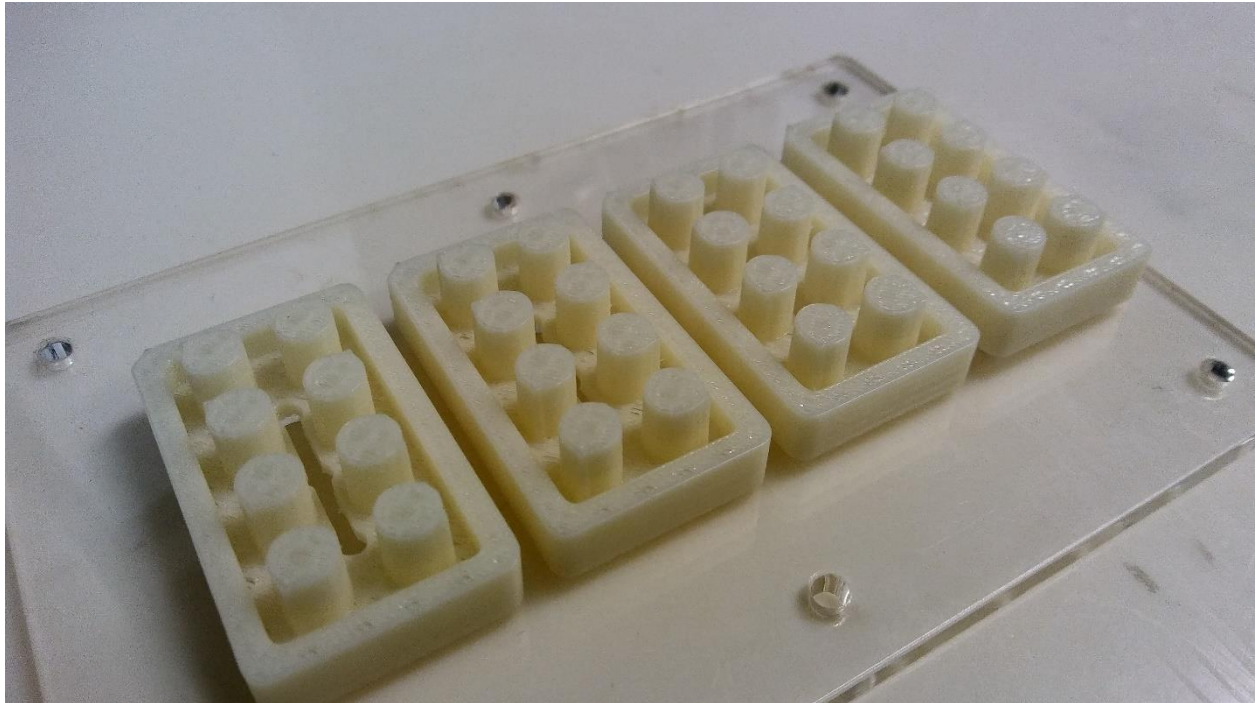
4 Ανω αριστερά και δεξιά

5 Κάτω Δεξιά

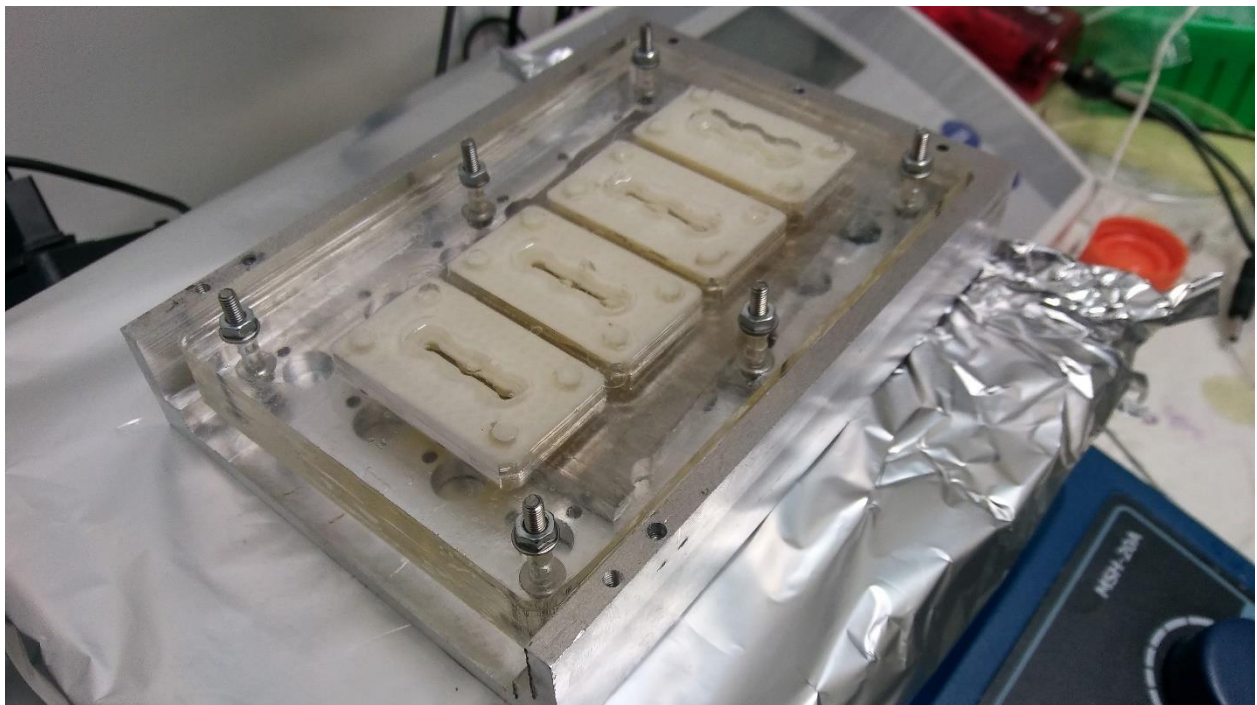


- **Μοντέλο 6**

Το μοντέλο 6 εισήγαγε τις 3D printed μορφές που καθορίζουν και τα βοηθία, για αποφυγή της επίπονης κοπής και συναρμολόγησης κυλίνδρων με τη βάση όπως στο μοντέλο 3. Επίσης αυξήθηκε και η οπή χύτευσης.



Εικόνα 63: 3D Printed απάρτια μοντέλου 6



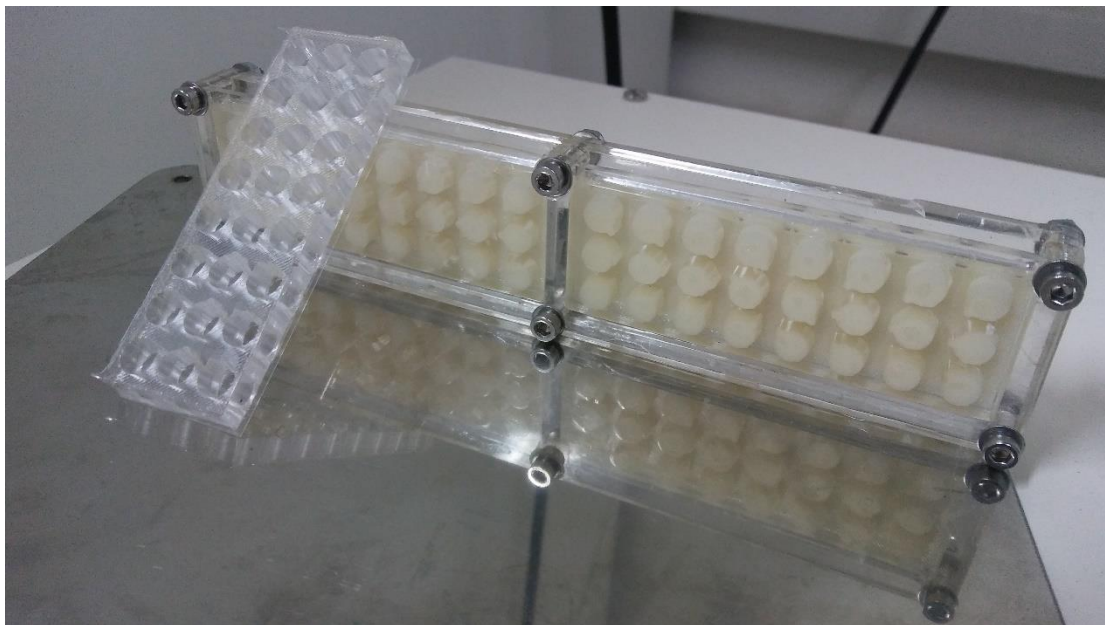
Εικόνα 64: Καλούπι Μοντέλο 6 συναρμολογημένο και τοποθετημένο σε θερμάστρα για την θερμοσκλήρυνση του PDMS

Μέχρις εδώ όλα τα καλούπια τοποθετούνταν σε θερμάστρα και αφηνόταν για αρκετές ώρες (12-24) σε θερμοκρασία 40 °C σύμφωνα με τη βαθμονόμηση της θερμάστρας. Προφανώς όμως ένα τέτοιο σύστημα ανοικτού βρόγχου δεν μπορεί να παράγει ιδιαίτερα επαναλήψιμα αποτελέσματα ενώ περιορίζει και την διαδικασία χρονικά, καθώς είναι επικίνδυνο να αυξήσουμε τη ρύθμιση θερμοκρασίας λόγω κινδύνου τήξης του υλικού καλουπιού.

Ειδικά για τα κλειστά καλούπια, σε ανεπίτρεπτα μεγάλο ποσοστό των εφαρμογών ο πολυμερισμός δεν συντελούνταν επαρκώς και αυτό έκανε την κατεργασία πλάσματος άρα και την κόλληση τους με την καλυπτρίδα ανεπαρκή. Αυτό συνέβη διότι η άξηση του μεγέθους των κομματιών PMMA που περιέκλειαν πιά συνολικά την υπερκατασκευή σημαίνει και την αύξηση της μονωτικής συμπεριφοράς (μείωση συναγωγής). Σε συνδυασμό με τις μικρές οπές από όπου μπορούσε να εξατμιστεί ο διαλύτης είχαμε την μεγάλη πιθανότητα να μην καταφέρνει να θερμανθεί στην προδιαγεγραμμένη θερμοκρασία το PDMS και να συγκεντρώνεται διαλύτης στις επιφάνειες της υπερκατασκευής. Αυτό ήταν φανερό αφή ως κολλώδης επιφάνεια, και προκαλούσε αποτυχία της κατεργασίας πλάσματος και της κόλλησης στο γυαλί. Ήταν προφανής η ανάγκη για διαφορετική προσέγγιση του σχεδιασμού του καλουπιού όσο και της θέρμανσης του. Καταλήξαμε έτσι στο μοντέλο 7, το οποίο πια θερμαίνεται σε ειδικό κλίβανο ρητινών με σύστημα ελέγχου θερμοκρασίας της Nabertherm που διαθέτει το εργαστήριο.

- **Μοντέλο 7**

Πρόκειται για καλούπι με ελαχιστοποιημένα τα πάχη των κομματιών PMMA και ελεύθερη πλήρως την κατα μήκος επιφάνεια των υπερκατασκευών για χύτευση και απαγωγή διαλύτη. Οι δοκιμές του παρήγαγαν ικανοποιητικά αποτελέσματα και έτσι κατασκευάστηκε και για τις υπερκατασκευές των ζητούμενων διαστάσεων που συναρμολογούνται με την καλυπτρίδα 72*25*0.17. Λόγω περιορισμών χώρου όμως ήταν αναγκαίο να μεταφερθούν οι θέσεις των βοθρίων των σειρών 1 & 3 σε κάθε συσκευή 1 mm προς το εσωτερικό καθώς αν ακολουθήσουμε πλήρως τη διαμόρφωση 96 άρας πλάκας θα έρεπε να έχουμε διατομή πάχους 350 μm στις οριακές επιφάνειες της υπερκατασκευής – έως και αδύνατο κατασκευαστικά, σίγουρα αδύνατο να παρέχει στεγανότητα.



*Εικόνα 65: Καλούπι Μοντέλο 7 και υπερκατασκευή κολλημένη σε καλυπτρίδα 25*75*