



ΕΘΝΙΚΟ ΜΕΤΣΟΒΙΟ ΠΟΛΥΤΕΧΝΕΙΟ

ΣΧΟΛΗ ΧΗΜΙΚΩΝ ΜΗΧΑΝΙΚΩΝ

ΤΟΜΕΑΣ ΙV: ΣΥΝΘΕΣΗΣ ΚΑΙ ΑΝΑΠΤΥΞΗΣ
ΒΙΟΜΗΧΑΝΙΚΩΝ ΔΙΑΔΙΚΑΣΙΩΝ

«Ανάπτυξη *in vitro* μοντέλου πρόβλεψης της φαρμακοεπαγόμενης ηπατοτοξικότητας
σε πορώδη ικρίωματα κολλαγόνου»

ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ

του

ΦΟΙΒΟΥ ΧΑΤΖΗΔΗΜΗΤΡΙΟΥ

Επιβλέποντες Καθηγητές:

Λεωνίδας Αλεξόπουλος

Δημήτριος Κέκος

Αθήνα

Ιούνιος 2017

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Η παρούσα διπλωματική εργασία εκπονήθηκε στο εργαστήριο Εμβιομηχανικής και Συστημικής Βιολογίας, στη Σχολή Μηχανολόγων Μηχανικών, υπό την επίβλεψη του επίκουρου καθηγητή κύριου Λεωνίδα Αλεξόπουλου και συνεπίβλεψη του καθηγητή Δημήτριου Κέκου από τη Σχολή Χημικών Μηχανικών. Η διπλωματική αυτή εργασία δεν θα είχε ολοκληρωθεί επιτυχώς αν δεν είχαν συμβάλει σε αυτήν μία πλειάδα ανθρώπων. Θέλω να ευχαριστήσω θερμά τον κύριο Λεωνίδα Αλεξόπουλο που μου έδωσε την ευκαιρία και τους πόρους να ασχοληθώ με ένα θέμα που ακουμπούσε στα ενδιαφέροντα και τις γνώσεις μου, όπως και τον κύριο Δημήτριο Κέκο για τη συνεπίβλεψη και τη παροχή βοήθειας όποτε τη χρειάστηκα. Ευχαριστώ ιδιαίτερα τον κύριο Δημήτριο Τζεράνη, χωρίς την καθοδήγηση και βοήθεια του οποίου δεν θα είχα ανταπεξέλθει στις απαιτήσεις της ερευνητικής διαδικασίας. Επίσης θέλω να ευχαριστήσω τη Δανάη Ζαφείρη για τη βοήθειά της στα βιολογικά πειράματα και ακόμα τους Γεωργία Διακούδη, Jan Rozanc, Βίκυ Πλιάκα και Αγγελική Μήνια για την εκπαίδευση στην καλλιέργεια κυττάρων και την εφαρμογή βιολογικών τεχνικών. Σχετικά με το κατασκευαστικό κομμάτι, ευχαριστώ για τη συμβολή και τη συνεργασία τους τον Θεοχάρη – Νικηφόρο Ιορδανίδη και τον Λουκά Μαυρικά. Ακόμα, ευχαριστώ τον καθηγητή Δημήτρη Τσουκαλά από τη Σχολή Εφαρμοσμένων Μαθηματικών και Φυσικών Επιστημών που μου επέτρεψε να χρησιμοποιήσω τον εξοπλισμό ηλεκτρονικής μικροσπίας σάρωσης (SEM) και τον κύριο Λάμπρο Πατσιούρα για την εκπαίδευση στη χρήση του και τη συνεργασία. Τέλος, ευχαριστώ την οικογένεια και τους φίλους μου για τη στήριξή τους.

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Μία από τις σημαντικότερες προκλήσεις σήμερα για τις φαρμακοβιομηχανίες και την ανθρώπινη υγεία είναι η φαρμακοεπαγόμενη τοξικότητα του ήπατος. Πρόκειται για το συνηθέστερο λόγω απόσυρσης φαρμάκων και αποτυχίας νέων σε στάδιο κλινικών δοκιμών, με 1 στους 10 που θα την εμφανίσουν να οδηγούνται στο θάνατο. Καθώς δεν μπορεί να προβλεφθεί αποτελεσματικά, ο *in vitro* έλεγχος της τοξικότητας αποτελεί το βασικότερο μέσο μελέτης της πιθανότητας ανάπτυξης της και του μηχανισμού της. Η χρήση ηπατοκυττάρων σε τέτοιες εφαρμογές απαιτεί την αποτελεσματική προσομοίωση του *in vivo* περιβάλλοντος, κάτι που επιτυγχάνεται κυρίως μέσω καλλιέργειάς τους σε δομές πρωτεϊνών της εξωκυττάριας μήτρας. Στο πλαίσιο της παρούσας διπλωματικής δημιουργήθηκε μία βιβλιοθήκη υλικών από μίγματα κολλαγόνου με θειική χονδροϊτίνη, υαλουρονικό οξύ, matrigel ή φαϊμπρονεκτίνη, τα οποία χρησιμοποιήθηκαν για τη δημιουργία πορωδών ικτριωμάτων μέσω ξήρανσης με κατάψυξη. Μία μεθοδολογία εφαρμογής τεσσάρων πρωτοκόλλων λυοφιλοποίησης οδήγησε στη δημιουργία πορωδών ικτριωμάτων με μέση διάμετρο πόρου 15,3-28,9 μm αναλόγως τη σύσταση του υλικού. Τα υλικά χαρακτηρίστηκαν ως προς τα μορφολογικά τους χαρακτηριστικά μέσω ηλεκτρονιακής μικροσκοπίας σάρωσης (SEM). Τα νέα ικτριώματα αξιοποιήθηκαν σε ένα πείραμα *in vitro* ελέγχου της φαρμακοεπαγόμενης τοξικότητας σε κύτταρα HepG2 από υψηλή δόση (20 mM) παρακεταμόλης (APAP). Η ποιοτική ανάλυση των εικόνων μικροσκοπίας φθορισμού (χρωστικές Calcein AM, PI, mBCI) οδήγησε σε ενδείξεις πως η καλλιέργεια των κυττάρων στα ικτριώματα επιφέρει μεγαλύτερη ευαισθησία στην τοξικότητα και συνεπώς τα νέα αυτά βιοϋλικά μπορεί να αποτελούν ένα νέο χρήσιμο εργαλείο στην ανάπτυξη καλύτερων τρισδιάστατων *in vitro* μοντέλων ασθενειών.

ABSTRACT

Drug induced liver injury (DILI) is currently a major challenge and concern for the pharmaceutical industry and the clinical practice. It is the most common reason for drug withdrawal and failure during clinical trials, while 1 in 10 that are diagnosed with DILI will eventually die. As there is no efficient method to preclinically assess it, *in vitro* toxicity testing is the fundamental mean to study the mechanism and possibility to develop DILI. Using hepatocytes in such applications requires effective simulation of the *in vivo* environment of the cells, something that is usually met through culturing cells in structures of extracellular matrix proteins (ECM). In the context of this diploma thesis, a novel materials library was established based on collagen mixtures with chondroitin sulfate, hyaluronic acid, matrigel or fibronectin, that were used to create porous scaffolds through freeze drying. A methodology to apply four lyophilization protocols led to the creation of scaffolds with mean pore diameter of 15,3-28,9 μm , according to biomaterial's composition. Scaffolds were characterized by scanning electron microscopy (SEM) for morphological features. These novel biomaterials were used in an experiment of *in vitro* testing of drug induced toxicity in HepG2 cells, caused by paracetamol (APAP) overdose (20 mM). Qualitative analysis of fluorescence microscopy images (dyes Calcein AM, PI, mBCI) led to indications that cell culture on these scaffolds cause greater sensitivity to the toxic effect and, therefore, it is believed that they may be an effective cell environment for more efficient 3D *in vitro* disease models.

Περιεχόμενα

1.1 Εισαγωγή.....	13
1.2 Ήπαρ και Μεταβολισμός.....	15
1.2.1 Παράγοντες που επηρεάζουν τον μεταβολισμό των φαρμάκων	16
1.2.2 Κύρια ένζυμα κατά το μεταβολισμό των φαρμάκων	17
1.2.3 Μεταβολική φάση I.....	17
1.2.4 Μεταβολική φάση II.....	18
1.3 Γενικοί μηχανισμοί τοξικότητας	19
1.3.1 Μιτοχονδριακή τοξικότητα	19
1.3.2 Οξειδωτικό στρες και ελεύθερες ρίζες	19
1.3.3 Ενεργοί μεταβολίτες.....	20
1.3.4 Τοξικότητα κατά τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό	21
1.3.5 Απόπτωση.....	21
1.3.6 Νέκρωση.....	22
1.3.7 Αυτοφαγία	22
1.3.8 Γενοτοξική και μη καρκινογένεση	22
1.3.9 Φωσφολιπιδίωση	23
1.4 Ηπατοειδικοί μηχανισμοί τοξικότητας.....	24
1.4.1 Στεάτωση.....	24
1.4.2 Βλάβη μιτοχονδριακής λειτουργίας	24
1.4.3 Χολόσταση	25
1.5 Κλινικοί μηχανισμοί DILI.....	27
1.5.1 Κυτταρική προσέγγιση της DILI.....	27
1.5.2 Η περίπτωση της παρακεταμόλης	28
Κεφάλαιο 2: Πορώδη κριώματα ως <i>in vitro</i> μοντέλο ηπατικών εφαρμογών	35
2.1 Το περιβάλλον των ηπατοκυττάρων	35
2.1.1 Συνάψεις πρόσδεσης	35
2.1.2 Αποφρακτικές συνάψεις.....	36
2.1.3 Συνάψεις επικοινωνίας	36
2.1.4 Διακυτταρική επικοινωνία στο ήπαρ.....	37
2.3 <i>In vitro</i> μοντέλα και μέθοδοι πρόβλεψης της DILI.....	38
2.3.1 Η κυτταρική σειρά HepG2	38
2.3.2 Ο ρόλος των συνάψεων στα <i>in vitro</i> μοντέλα τοξικότητας ήπατος.....	39
2.4 3D ηπατικά μοντέλα.....	40

2.4.1 Διάκριση 2D και 3D	41
2.4.2 Ικριώματα και υδρογέλες	43
2.4.3 Σφαιρίδια	44
2.4.4 Μικροροϊκές συσκευές.....	44
2.5 Σχεδιασμός ικριωμάτων	45
2.5.1 Βιβλιοθήκη υλικών.....	46
2.5.2 Ξήρανση με κατάψυξη	48
2.5.3 Σχεδιασμός ξήρανσης με κατάψυξη.....	52
Κεφάλαιο 3: Πειραματικό μέρος.....	55
3.1 Υλικά και μέθοδοι	55
3.1.1 Δημιουργία κατασκευών τρισδιάστατης καλλιέργειας σε πορώδη ικριώματα	55
3.1.2 Καλλιέργεια κυττάρων HepG2 και επίδραση παρακεταμόλης ως συνθήκη DILI.	57
3.2 Πειραματικές ενδείξεις.....	58
Κεφάλαιο 4: Αποτελέσματα	71
4.1 Παραγωγή ικριωμάτων μέσω ξήρανσης με κατάψυξη.....	71
4.2 Χαρακτηρισμός νέων ικριωμάτων	76
4.3 Βιολογική εφαρμογή - Επαγωγή τοξικότητας από παρακεταμόλη	79
Κεφάλαιο 5: Συμπεράσματα	85
5.1 Συμπεράσματα διαδικασίας παραγωγής νέων υλικών	85
5.2 Ποιοτική ανάλυση αποτελεσμάτων βιολογικού πειράματος.....	86
5.3 Μελλοντική έρευνα.....	87
5.4 Σύνοψη	88
Βιβλιογραφία.....	91
Παράρτημα Α: Αναλυτικά αποτελέσματα πειραμάτων και στατιστική επεξεργασία	97
Παράρτημα Β: Πρωτόκολλα πειραματικών διαδικασιών	103
A.1 Καθαρισμός γυαλιών μικροσκοπίας.....	103
A.2 Χύτευση και πολυμερισμός υπερκατασκευών PDMS	103
A.3 Επιφανειακή κατεργασία πλαισίων PDMS με πλάσμα και κόλληση με γυαλί μικροσκοπίας.....	105
A.4 Τοποθέτηση αιωρήματος κολλαγόνου σε γυαλιά μικροσκοπίας.....	105
A.5 Λυοφιλοποίηση	106
A.6 Δημιουργία σταυροδεσμών μέσω θερμικής κατεργασίας	109
A.7 Χρήση της χρωστικής Monochlorobimane (mBCI) σε καλλιέργειες κυττάρων	110
A.8 Δημιουργία επιστρωμένων πλακών καλλιέργειας με κολλαγόνο	111

A.9 Καλλιέργεια κυττάρων μεταξύ δύο στρωμάτων πρωτεϊνών εξωκυττάριας μήτρας
(sandwich) 111

Κεφάλαιο 1: Φαρμακοεπαγόμενη τοξικότητα και ήπαρ

1.1 Εισαγωγή

Η φαρμακοεπαγόμενη τοξικότητα του ήπατος (Drug Induced Liver Injury – DILI) είναι ένα σημαντικό ζήτημα υγείας που απασχολεί τον ιατρικό κόσμο, τις φαρμακευτικές εταιρίες και τους ρυθμιστικούς φορείς και αρχές. Ενδεικτικά, η DILI είναι υπεύθυνη για το 50% των οξειών ηπατικών ανεπαρκειών, με το 39% αυτών των περιπτώσεων να οφείλονται στην υπερκατανάλωση παρακεταμόλης και το 13% σε ιδιοσυγκρασιακές ηπατικές βλάβες προκαλούμενες από άλλες δραστικές ουσίες^{1-2,i}. Τα υψηλά επίπεδα νοσηρότητας και θνησιμότητας που σχετίζονται με DILI έχουν οδηγήσει τους αρμόδιους ρυθμιστικούς φορείς στην αναστολή της κυκλοφορίας ορισμένων σκευασμάτων και στην εισαγωγή ανάλογων ενδείξεων (“black box” warnings) σε άλλα³. Ενδεικτικό της επίπτωσης της DILI για τη βιομηχανία φαρμάκων είναι πως για κάθε νέα φαρμακευτική ένωση που φτάνει να γίνει εμπορικά διαθέσιμο προϊόν απαιτούνται κατά μέσο όρο 1,15 δισεκατομμύρια δολάρια και 12,5 χρόνια σχεδιασμού και έρευναςⁱⁱ.

Η εκδήλωση DILI έχει συχνότητα της τάξης της 1 περίπτωσης στις 10.000-100.000^{1-2,4-6}. Αυτή η χαμηλή συχνότητα αποτελεί έναν από τους λόγους που η προκαλούμενη ηπατοτοξικότητα από ορισμένα φάρμακα δεν εντοπίζεται στη διάρκεια κλινικών δοκιμών, καθώς το πλήθος των ατόμων στο τελευταίο (και εκτενέστερο) στάδιο κλινικής έρευνας κυμαίνεται από 2.000 έως 5.000 άτομα. Έχει τεκμηριωθεί πως για να ελεγχθεί άμεσα η πιθανότητα πρόκλησης DILI από ένα φάρμακο σε κλινική έρευνα (και για διάστημα εμπιστοσύνης 95%) θα απαιτούταν η συμμετοχή 30.000 ατόμων⁶⁻⁸. Η DILI αποτελεί το συνηθέστερο μεμονωμένο λόγο απόσυρσης φαρμακευτικών σκευασμάτων από την αγορά για λόγους ασφαλείας τα τελευταία 50 χρόνια (iproniazid, ticrynafen, benoxaprofen, bromfenac, troglitazone, nefazodone) καθώς επίσης και του περιορισμού των όρων χρήσης ορισμένων (isoniazid, labetalol, trovafloxacin, tolcapone και felbamate)³. Τα ισχυρότερα ηπατοτοξικά προκαλούν ηπατοκυτταρικές βλάβες εντοπίσιμες από την αυξημένη εκροή αμινοτρανσφερασών (ALT, AST) χωρίς προϋπάρχουσα (χολοστατική) αιτία, και μόνο στην περίπτωση αυτή είναι δυνατός ο εντοπισμός τους σε στάδιο κλινικών δοκιμών. Η φαρμακοεπαγόμενη ηπατική διαταραχή όμως μπορεί να έχει και άλλες μορφές, καθιστώντας αδύνατη την εμφάνισή της σε μικρό δείγμα πληθυσμού έρευνας⁸.

Τα περισσότερα φαρμακευτικά προϊόντα προκαλούν σπανίως ηπατικές βλάβες, με το μοτίβο των περιστατικών που προκύπτουν να διαφέρει ανά φάρμακο και φαρμακευτική κλάση. Οι αμιγώς ηπατοτοξικοί παράγοντες, όπως ο τετραχλωράνθρακας, το χλωροφόρμιο και το μεθυλοχλωρίδιο, είναι τοξικοί για οποιονδήποτε λάβει μία αρκετά μεγάλη δόση και συνεπώς φάρμακα που προκαλούν τέτοιες προβλέψιμες και δοσοεξαρτώμενες βλάβες εντοπίζονται και

απορρίπτονται εγκαίρως στους προκλινικούς ελέγχους. Δυσκολότερα εντοπίσιμοι είναι οι παράγοντες που προκαλούν ηπατική βλάβη χωρίς δυνατότητα πρόβλεψης και άμεση εξάρτηση από τη χορηγούμενη δόση, συχνά σε δόσεις ασφαλείς για το γενικό πληθυσμό των ασθενών. Στην περίπτωση αυτή η προκαλούμενη τοξικότητα έγκειται περισσότερο σε ατομικά χαρακτηριστικά και ευαισθησίες, δύσκολα εντοπίσιμες και συσχετίσιμες^{1-4,8}. Συχνά, η αναπτυσσόμενη ηπατοτοξικότητα είναι δοσοεξαρτώμενη, όπως στην περίπτωση της παρακεταμόλης και συνεπώς η χορηγούμενη δόση είναι ο καθοριστικός παράγοντας της πιθανότητας ανάπτυξης ή όχι DILI^{8,9}. Οι ιδιοσυγκρασιακές αντιδράσεις στη χορήγηση ενός σκευάσματος χαρακτηρίζονται από μία λανθάνουσα περίοδο, που μπορεί να κυμαίνεται μεταξύ 5 – 90 ημερών από την αρχική λήψη του φαρμάκου και οδηγούν στο θάνατο εφόσον συνεχιστεί η χορήγηση⁹⁻¹². Σε αντίθεση με αυτή την περίπτωση, άλλες δραστικές ενώσεις προκαλούν ήπιες ηπατικές βλάβες που εξαλείφονται παράλληλα με τη συνέχιση της λήψης τους. Άλλοι παράγοντες που σχετίζονται με την τελική ανάπτυξη φαρμακοεπαγόμενης ηπατικής τοξικότητας είναι το φύλο, η ηλικία, το σωματικό βάρος αλλά και συγκυριακοί/προσωρινοί παράγοντες όπως οι τροφές που καταναλώνει ο ασθενής, οι αλληλεπιδράσεις με άλλα φάρμακα, η ύπαρξη άλλων ασθενειών και η εγκυμοσύνη^{1-3,9-12}.

Φάρμακα που προκαλούν ηπατοτοξικές επιδράσεις θα προκαλέσουν ηπατική ανεπάρκεια περίπου στο 10% εκείνων που θα εμφανίσουν ίκτερο λόγω της πρόσληψης κάποιου φαρμάκου^{2,5-6}. Πλέον, κάθε τέτοια περίπτωση στη διάρκεια κλινικών ερευνών αποτελεί λόγο για περαιτέρω έρευνα σχετικά με το υποψήφιο φάρμακο και συχνά τον αποκλεισμό του από την αγορά. Μετά την κυκλοφορία του φαρμάκου, ένα μεγαλύτερο και διαφορετικών χαρακτηριστικών κοινό θα εκτεθεί σε αυτό από ότι στο τελευταίο στάδιο των κλινικών δοκιμών. Όταν το σκεύασμα γίνει διαθέσιμο στο ευρύ κοινό, αυτό θα χορηγηθεί σε διάφορες δόσεις, για ποικίλα χρονικά διαστήματα και σε ένα πλήθος ασθενών που θα περιλαμβάνει ομάδες υψηλού κινδύνου που πιθανώς δεν υπήρχαν στις κλινικές έρευνες όπως άτομα με νεφρική, ηπατική ή καρδιακή ανεπάρκεια, φορείς του HIV και ασθενείς του AIDS, έγκυες και λεχώνες, υπερήλικες και παιδιά. Μόλις επιτραπεί από την αντίστοιχη ελεγκτική αρχή η κυκλοφορία ενός σκευάσματος, άμεσα περιγράφονται και οι αντενδείξεις που αυτό φέρει, αναφέροντας κάθε συνέπεια από τη λήψη του φαρμάκου που μπορεί να έχει ως αποτέλεσμα τη νοσηλεία, την ανάπτυξη ασθένειας ή αναπηρίας και το θάνατο. Μετά και από αυτό το στάδιο, κάθε ηπατική βλάβη που προκληθεί από ένα φάρμακο, και δεν έχει περιγραφεί στις παρενέργειες που αυτό μπορεί να έχει, αποτελεί λόγο για αναστολή της κυκλοφορίας του^{3,iii}.

Οι φαρμακευτικές ενώσεις προκαλούν ηπατικές βλάβες κλινικά ανάλογες με όλες τις γνωστές ηπατικές νόσους και δεν υπάρχουν παθολογικά ευρήματα, ακόμα και σε επίπεδο βιοψίας, που να εξασφαλίζουν την αποτελεσματική διάγνωση της DILI. Οι μεταβολές των επιπέδων των αμινοτρανσφερασών, που θεωρούνται ο βασικότερος βιοδείκτης για την εκδήλωση DILI, δεν

προβλέπουν αξιόπιστα την πιθανότητα ένα φάρμακο να προκαλέσει DILI σε ανθρώπους. Πολλά σκευάσματα που προκαλούν αύξηση αυτών των ενζύμων στο πλάσμα δεν οδηγούν σε κλιμακούμενη ή οξεία φαρμακοεπαγόμενη τοξικότητα, ακόμα και αν δεν διακοπεί η χορήγηση του φαρμάκου που την προκαλεί. Μόνο εκείνα τα σκευάσματα που δύνανται να προκαλέσουν αρκετά εκτεταμένη ηπατική βλάβη ώστε να μειωθεί η συνολική λειτουργικότητα του ήπατος και η ικανότητά του να απομακρύνει τη χολερυθρίνη από το πλάσμα ή να αυξηθεί η παραγωγικότητα προθρομβίνης και άλλων πηκτικών παραγόντων είναι υπεύθυνα για τη DILI. Συμπερασματικά, τα σκευάσματα που αποδεδειγμένα προκαλούν DILI σε άτομα δεν έχουν απαραίτητα το ίδιο αποτέλεσμα σε πειραματόζωα, δεν έχουν δοσοεξαρτώμενη τοξική επίδραση στο ήπαρ, προκαλούν σπάνια θανατηφόρα περιστατικά και η ιδιοσυγκρασιακή τοξικότητα που προκαλούν δεν είναι ξεκάθαρο αν σχετίζεται με εγγενείς ή επίκτητους παράγοντες του ατόμου. Συνεπώς, καθώς κανένας δείκτης ή μηχανισμός δεν είναι αρκετά αξιόπιστος για την έγκαιρη και έγκυρη διάγνωση και πρόβλεψη της φαρμακοεπαγόμενης ηπατικής τοξικότητας, επείγει η αναζήτηση και σχεδιασμός νέων μέσων για το σκοπό αυτό^{1,4-8}.

1.2 Ήπαρ και Μεταβολισμός

Το ήπαρ είναι το βασικότερο όργανο του μεταβολισμού τόσο των φυσικά σχηματιζόμενων ουσιών όσο και των ξενοβιοτικών, όπως τα φάρμακα, με τον όρο αυτό να περιγράφει κάθε ουσία που δεν ενσωματώνεται στον μεταβολισμό του κυττάρου για την παραγωγή ενέργειας. Η κυριαρχία του ήπατος στις βιοχημικές διεργασίες του μεταβολισμού έγκειται στα υψηλότερα επίπεδα μεταβολικών ενζύμων συγκριτικά με άλλα όργανα και ιστούς που συμμετέχουν σε αυτόν όπως είναι ο εντερικός βλεννογόμος, οι νεφροί, οι πνεύμονες, το δέρμα, ο πλακούντας και το αίμα (πλάσμα και λευκοκύτταρα). Για φάρμακα που χορηγούνται από το στόμα, σημαντικό ρόλο μπορεί να παίξει και η εντερική χλωρίδα. Ο μεταβολισμός των ξενοβιοτικών οδηγεί κατά κανόνα σε περισσότερο υδατοδιαλυτά παράγωγα, με την προσθήκη ιονιζόμενων ομάδων στο μόριό τους. Εξαιτίας του γεγονότος αυτού οι μεταβολίτες χάνουν την ικανότητα να διαχέονται παθητικά μέσα από βιολογικές μεμβράνες, απεκκρίνονται με ενεργητικούς μηχανισμούς μεταφοράς και δεν επαναρροφώνται από το πρόοιρο^{13,v,vi}.

Οι αντιδράσεις βιομετασχηματισμού μπορεί να μεταβολίσουν ένα ενεργό ή ανενεργό φάρμακο προς αδρανή, ενεργά ή συνδυασμό αυτών προϊόντα. Οι μεταβολικές αντιδράσεις που συμμετέχουν στη βιομετατροπή των ξενοβιοτικών διακρίνονται σε δύο μεγάλες ομάδες:

- A. Οξειδώσεις, αναγωγές και υδρολύσεις (Μεταβολική φάση I/Ομάδα I)
- B. Συζεύξεις ή συνθετικές αντιδράσεις (Μεταβολική φάση II/Ομάδα II)

Το λείο ενδοπλασματικό δίκτυο (μικροσωμάτια) των κυττάρων του ήπατος είναι το σημείο όπου επιτελούνται οι σημαντικότερες αντιδράσεις οξειδωσης και σύζευξης. Αυτό οφείλεται κυρίως στη λιπιδική φύση των μεμβρανών του δικτύου, όπου και εγκλωβίζονται όλες οι λιποδιαλυτές ουσίες κατά τη διέλευσή τους από το ήπαρ. Ακόμα, αποτελεί την κύριο σημείο των μεταβολικών ενζύμων, τόσο στη φάση I (κυτόχρωμα P450, φλαβινο-μονοξειγενάση, αλδεϋδοξειδάση, καρβοξυλεστεράση, εποξυ-υδρολάση, προσταγλανδική συνθάση, εστεράση) όσο και στη φάση II (ουρική διφωσφορική γλυκουρονοσυλτρασφεράση, S-τρασφεράση της γλουταθειόνης, ένζυμα σύζευξης αμινοξέων). Ακόμα, ένα σημαντικό μέρος των αντιδράσεων επιτελείται στο ηπατικό κυτταρόπλασμα (Φάση I: αλκοολική αφυδρογενάση, αλδεϋδική αναγάση, αλδεϋδική αφυδρογονάση, υποξειδική υδρολάση, εστεράση, Φάση II: θειική τρασφεράση, S-τρασφεράση της γλουταθειόνης, N-ακετυλο-τρασφεράση, μεθυλοτρασφεράση της κατεχόλης, ένζυμα σύζευξης αμινοξέων) και σε μικρότερο βαθμό στα μιτοχόνδρια (Φάση I: μονοαμιδική οξειδάση, αλδεϋδική αφυδρογονάση, κυτόχρωμα P450, Φάση II: N-ακετυλο-τρασφεράση, ένζυμα σύζευξης αμινοξέων), τον πυρήνα (Φάση II: διφωσφορική γλυκουροσυλτρασφεράση της ουρίας) και τα λυσοσωμάτια (Φάση I: πεπτιδάση). Από τα παραπάνω βγαίνει το συμπέρασμα πως η πρώτη φάση των αντιδράσεων δεν οδηγεί πάντοτε σε αδρανοποίηση ενός φαρμάκου. Συνήθως, πραγματική εξουδετέρωση γίνεται μόνο μέσω των αντιδράσεων της σύζευξης^{13,v,vi}.

1.2.1 Παράγοντες που επηρεάζουν τον μεταβολισμό των φαρμάκων

Η χημική δομή της ενεργούς φαρμακευτικής ουσίας είναι ο βασικότερος παράγων που ρυθμίζει τη μεταβολική οδό που αυτή θα ακολουθήσει και συνεπώς και το βαθμό αδρανοποίησης και τους μηχανισμούς και οδούς αποβολής. Μία ουσία μπορεί να κατανεμηθεί σε περισσότερες από μια μεταβολικές οδούς και οι μεταβολίτες κάθε οδού βιομετατροπής μπορούν να έχουν περισσότερους από έναν μηχανισμούς αποβολής. Ο συνδυασμός της προσλαμβάνουσας δόσης και της συχνότητας χορήγησης ενός φαρμάκου εμπειρεύουν δυνητικά την πιθανότητα πρόκλησης κορεσμού των μεταβολικών οδών και την επαγωγή (αυξημένη σύνθεση και δραστηριότητα) των ενζύμων που συμμετέχουν σε αυτές. Σε ότι αφορά στην οδό χορήγησης, ιδιαίτερα σχετικά με την από του στόματος χορήγηση, μεταβολική αδρανοποίηση ενός φαρμάκου συμβαίνει άμεσα λόγω της υποχρεωτικής διέλευσης της φαρμακευτικής ουσίας από τον εντερικό βλεννογόνο και το ήπαρ («φαινόμενο αρχικής διάβασης»). Ακόμα, γενετικοί παράγοντες που καθορίζουν τα επίπεδα έκφρασης διαφόρων ενζύμων καθορίζουν την αντοχή ή ευαισθησία ενός τόμου σε έναν ξενοβιοτικό παράγοντα, ενώ διαφορές έχουν παρατηρηθεί στο μεταβολισμό τους μεταξύ των φύλων. Επίσης, η ηλικία και τα εθνολογικά χαρακτηριστικά σε ορισμένες περιπτώσεις διαφοροποιούν τα επίπεδα των μεταβολικών διαδικασιών, ενώ και η διατροφή μπορεί να επηρεάσει τις διαδικασίες μεταβολισμού ενός φαρμάκου. Τέλος, παθολογικές καταστάσεις

και ειδικά αν αφορούν στο ήπαρ τείνουν να επιβραδύνουν τις μεταβολικές διεργασίες με αποτέλεσμα την ευκολότερη ανάπτυξη τοξικότητας^{1-2,5,10,v,vi}.

1.2.2 Κύρια ένζυμα κατά το μεταβολισμό των φαρμάκων

Τα περισσότερα φάρμακα βιομετατρέπονται από ένζυμα που παρουσιάζουν εξειδίκευση κυρίως προς κατηγορίες χημικών μορίων παρά προς τη μορφή της εκάστοτε δραστικής ουσίας ενός φαρμάκου. Η βασική κατηγοριοποίηση των ενζύμων αυτών γίνεται βάσει της παρουσίας τους ή μη στο ενδοπλασματικό δίκτυο, σε μικροσωμικά ένζυμα και μη μικροσωμικά. Το ενδοπλασματικό δίκτυο και κυρίως το λείο τμήμα του στα ηπατοκύτταρα και κύτταρα άλλων ιστών περιέχει μία ευρεία γκάμα ενζύμων όπως οι μονοεξυγενάσες και η γλυκουρονοτρανσφεράση, που ανήκουν στα μικροσωμικά ένζυμα. Πρόκειται για λεπτά και σφαιρικά κυστίδια, που καταλύουν την γλυκουρονική σύζευξη, τις περισσότερες μεταβολικές οξειδωτικές αντιδράσεις και ορισμένες αναγωγικές και υδρολυτικές. Σχετικά με τα μη μικροσωμικά ένζυμα, πρόκειται για τα ένζυμα που εντοπίζονται σε άλλα σημεία και οργανίδια των κυττάρων πέραν του ενδοπλασματικού δικτύου, όπως το κυτταρόπλασμα και τα μιτοχόνδρια και υπάρχουν κυρίως στο ήπαρ, τη γαστρεντερική οδό και το πλάσμα. Συνήθως, έχουν μη εξειδικευμένη δράση και καταλύουν περιορισμένο αριθμό οξειδωτικών αντιδράσεων, ορισμένες αναγωγικές και υδρολυτικές και όλες τις αντιδράσεις σύζευξης (φάση II) πέραν της γλυκουρονιδίωσης. Κανένα από αυτά τα ένζυμα που συμμετέχουν στο μεταβολισμό των φαρμάκων δεν εκφράζεται προσαρμοστικά ως προς τα επίπεδα της ουσίας που βιομετατρέπει^{1-2,5,13,v,vi}.

1.2.3 Μεταβολική φάση I

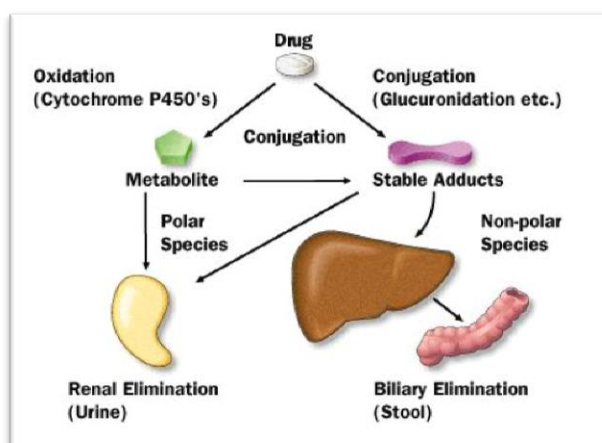
Η φάση αυτή περιλαμβάνει αντιδράσεις υδρόλυσης, αναγωγής και οξειδωσης. Αποτέλεσμα των αντιδράσεων αυτών είναι η εισαγωγή ή η αντικατάσταση στο μόριο της ξενοβιοτικής ουσίας κάποιας από τις πολικές ομάδες -OH, -COOH, -NH₂, -SH, αυξάνοντας μερικώς την υδροφιλία της ουσίας. Οι χαρακτηριστικές αυτές ομάδες αποτελούν συνήθως τα σημεία δράσης της μεταβολικής Φάσης II. Οι οξειδώσεις, που αποτελούν συχνότερα το κύριο είδος αντιδράσεων στη Φάση I, περιλαμβάνουν αρωματική και αλειφατική υδροξυλίωση, οξειδωση ατόμων αζώτου και θείου και αποσπάσεις αλκαλίων από αυτά. Η τελευταία αντίδραση επιτυγχάνεται με αρχική υδροξυλίωση της αλκυλομάδας σε α-θέση ως προς το ετεροάτομο και ακολουθεί λύση του δεσμού (άνθρακα – θείου ή άνθρακα – αζώτου αναλόγως το στοιχείο). Αναγωγές νιτρικών ή καρβονυλικών ενώσεων οδηγούν στον σχηματισμό των πιο υδατοδιαλυτών αμινών και αλκοολών και αντιστοίχως η υδρόλυση εστέρων και αμιδίων δίνει τα πιο υδατοδιαλυτά καρβοξυλικά οξέα, αλκοόλες και αμίνες.

Ο όρος μονοεξυγενάσες χρησιμοποιείται για τα ένζυμα της πρώτης φάσης του μεταβολισμού αφού αποδίδουν ένα μόνο άτομο οξυγόνου στα οργανικά υποστρώματα με ταυτόχρονη αναγωγή ενός δευτέρου ατόμου οξυγόνου σε νερό. Τα σημαντικότερα στελέχη

πολυλειτουργικών οξειδασών (MFOs) είναι εκείνα του κυτοχρώματος P-450, καθώς ενεργοποιούν άμεσα άτομα οξυγόνου κατά την πρόσδεσή τους σε υποστρώματα. Είναι κυρίαρχα στις μεταβολικές διαδικασίες κάθε ζωικού οργανισμού και διαφοροποιούνται σε επιμέρους ομάδες αναλόγως το ισοένζυμο που περιέχουν, με τα βασικότερα στον άνθρωπο να είναι τα CYP3A, CYP2C και CYP2D. Επίσης, το γεγονός πως απαντώνται σε διάφορα όργανα τα καθιστούν το σημαντικότερο σύνολο ενζύμων στο μεταβολισμό των φαρμάκων^{1-2,5-10,v,vi}.

1.2.4 Μεταβολική φάση II

Η δεύτερη μεταβολική φάση των φαρμακευτικών ουσιών αποτελείται κυρίως από τις αντιδράσεις εκείνες που οδηγούν στην προσθήκη κάποιου υδατοδιαλυτού μορίου στη φαρμακευτική ένωση, με τη μορφή που αυτή έχει μετά τη δράση των ενζύμων στη φάση I. Στις αντιδράσεις σύζευξης υπάγεται η προσθήκη γλυκουρονικού οξέος, θειικού οξέος, αμινοξέων, γλουταθειόνης, ακετυλίου και μεθυλίου. Η σύζευξη με κάποια από αυτές τις φυσιολογικές ενώσεις θα γίνει, εάν το μόριο του φαρμάκου περιέχει υδροξυλομάδα, καρβοξυλομάδα, πρωτοταγή ή δευτεροταγή αμινομάδα ή σουλφυδρύλιο. Όπως είναι ευνόητο, αν μία φαρμακευτική ενεργή ουσία περιέχει εξ αρχής μία ή περισσότερες από αυτές τις ομάδες, μπορεί να εισέλθει κατ' ευθείαν στη δεύτερη μεταβολική φάση, χωρίς να προηγηθεί η πρώτη, αφού και αυτή αποσκοπεί στη δημιουργία εστιών για αντιδράσεις σύζευξης. Εκτός από τη φαρμακολογική αδρανοποίηση, οι αντιδράσεις σύζευξης καθιστούν το φάρμακο λιγότερο λιποδιαλυτό, δηλαδή επιταχύνουν την απομάκρυνσή του από τον οργανισμό, χωρίς να αποκλείονται εξαιρέσεις, καθώς τα συνθετικά αυτά προϊόντα μπορεί να διατηρούν ορισμένες σημαντικές φαρμακολογικές ιδιότητες ή να είναι λιγότερο υδατοδιαλυτά μόρια από τις αντίστοιχες πρωτογενείς ενώσεις. Οι αντιδράσεις αυτής της φάσης (σύζευξης) έχουν υψηλότερες ενεργειακές απαιτήσεις και αξιοποιούν ένζυμα με υψηλότερη εξειδίκευση.



Εικόνα 1 Αναπαράσταση φάσεων I, II του μεταβολισμού ξεοβιοτικών στο ήπαρ

Το στάδιο αυτό ακολουθείται τόσο από ενδογενείς όσο και εξωγενείς ουσίες. Οι ενδογενείς που προορίζονται για σύζευξη προκύπτουν κυρίως από υδατάνθρακες ή αμινοξέα, που συνήθως έχουν μεγάλο μοριακό βάρος. Το μοριακό βάρος του τελικού συμπλόκου/μεταβολίτη είναι καθοριστικό για την οδό αποβολής του, με τα υψηλού μοριακού βάρους σύμπλοκα να εκκρίνονται κυρίως στη χολή και τα χαμηλότερου στην ουρία. Γενικά, είναι ισχυρά πολικής ή ιοντικής φύσης ώστε να καθίσταται το υπόστρωμα των μεταβολικών αντιδράσεων υδατοδιαλυτό. Καθώς η διαθεσιμότητα ενδογενών συζευκτικών ουσιών είναι ορισμένη, υπάρχει πιθανότητα κορεσμού της διαδικασίας της σύζευξης με αποτέλεσμα την πρόκληση τοξικότητας από την παρουσία του ασύζευκτου φαρμάκου/μεταβολίτη^{1-3,5,10,v,vi}.

1.3 Γενικοί μηχανισμοί τοξικότητας

1.3.1 Μιτοχονδριακή τοξικότητα

Τα μιτοχόνδρια είναι μεμβρανώδη οργανίδια και σε αυτά δημιουργείται η τριφωσφορική αδενοσίνη (ATP). Πέρα από τον ενεργειακό τους ρόλο συμμετέχουν στους μηχανισμούς απόπτωσης, μεταφοράς ασβεστίου, ρύθμισης του κυτταρικού μεταβολισμού και πολλαπλασιασμού, σύνθεσης της αίμης και των στεροειδών. Επίσης το μιτοχονδριακό γενετικό υλικό (mtDNA) κωδικοποιεί τη σύνθεση πρωτεϊνών που συμμετέχουν στην οξειδωτική φωσφορυλίωση και τη σύνθεση ATP με τις κυριότερες ομάδες αυτών να είναι οι αφυδρογονάσες του NADH (complex I), οι αφυδρογονάσες του βουτανοδικού (ηλεκτρικού) οξέος (complex II), η αφυδρογονάση του κυττοχρώματος c (complex III), η οξειδάση του κυτοχρώματος c (complex IV) και η συνθετάση του ATP (complex V).

Οι φαρμακευτικές ουσίες προκαλούν τοξικότητα στα μιτοχόνδρια μέσω πλήθους μηχανισμών. Διάφορες δραστικές ουσίες αναστέλλουν κάποιο πρωτεϊνικό σύμπλεγμα από αυτά που αναφέρθηκαν, με αποτέλεσμα τη διαταραχή της σύνθεσης ATP ή διαταράσσουν τη μεταφορά ηλεκτρονίων κατά τη διάρκειά της. Άλλοι μηχανισμοί τοξικότητας στα μιτοχόνδρια σχετίζονται με την παρεμπόδιση διαμεμβρανικών μεταφορέων, αναστολή των ενζύμων του κύκλου του Krebs και του μεταβολισμού των λιπαρών οξέων και αναστολή της αντιγραφής και έκφρασης του μιτοχονδριακού DNA (mtDNA). Τέλος, η τοξικότητα μπορεί να εκδηλωθεί με ανάπτυξη οξειδωτικού στρες (κυκλική οξειδοαναγωγή, εξάντληση αντιοξειδωτικών, δραστικές οξειδωτικές μορφές) ή μη αντιστρεπτή μεταβολή της διαπερατότητας των μιτοχονδριακών μεμβρανών¹⁴⁻¹⁶.

1.3.2 Οξειδωτικό στρες και ελεύθερες ρίζες

Οι δραστικές οξειδωτικές μορφές (Reactive Oxygen Species – ROS) προκύπτουν από το μοριακό οξυγόνο και απαντώνται είτε υπό τη μορφή ριζών είτε όχι, δεχόμενες ηλεκτρόνια από αντιοξειδωτικά ή αναγωγικούς παράγοντες, με τη διαταραχή αυτού του ισοζυγίου (υπέρ των ROS) να οδηγεί σε τοξικότητα. Στόχοι των μορφών αυτών είναι οι λιπιδιακές μεμβράνες,

που καταστρέφονται λόγω υπεροξειδωσής των λιπαρών, τα μόρια DNA που δέχονται τροποποιήσεις των δομικών τους λίθων και δεσμών και οι πρωτεΐνες μέσω διαφοροποιήσεων στην τριτοταγή και τεταρτοταγή δομή τους. Επίσης, οι ROS επηρεάζουν τα μονοπάτια κινάσων που ενεργοποιούν αποπτωτικές ή επιβιωτικές λειτουργίες και τους αντιοξειδωτικούς παράγοντες¹⁷⁻¹⁸.

1.3.3 Ενεργοί μεταβολίτες

Καθώς το ήπαρ είναι το κεντρικό όργανο του μεταβολισμού, οι χημικοί ενεργοί μεταβολίτες επιφέρουν τοξικές επιδράσεις συχνότερα σε αυτό. Συχνά, φάρμακα χορηγούνται υπό μορφή πρόδρομων μορίων και υφίστανται κατά τον μεταβολισμό βιοενεργοποίηση για να επιφέρουν την επιδιωκόμενη κλινική μεταβολή. Αν οι μετέπειτα αποτοξικοποίηση και απομάκρυνσή τους δεν συμβούν αποτελεσματικά, οι ενεργοί μεταβολίτες συνδέονται ομοιοπολικά με βιολογικά μακρομόρια και τελικά προκαλούν τοξικότητα. Παρά την περιορισμένη γνώση για τους μηχανισμούς ανάπτυξης αυτού του είδους τοξικότητας, οι επιδράσεις μεταγραφικών παραγόντων, μηχανισμών αλληλεπίδρασης, νέκρωσης και απόπτωσης, όπως και η ενεργοποίηση της πρωτογενούς και δευτερογενούς ανοσοβιολογικής απόκρισης έχουν καθοριστικό ρόλο^{5-7,v,vi}.

Αναλυτικότερα, σε ένα προτεινόμενο μοντέλο εξήγησης της δημιουργούμενης φαρμακοεπαγόμενης τοξικότητας, τα μικρού μεγέθους φαρμακευτικά μόρια συνδέονται με άλλα μεγαλύτερα για να προκαλέσουν μία ανοσολογική απόκριση. Τα σύμπλοκα αυτά όμως μεταξύ των ενεργών μεταβολιτών και των βιολογικών μακρομορίων συχνά αναγνωρίζονται από τον ανθρώπινο οργανισμό ως αντιγόνα και προκαλείται η παραγωγή εξειδικευμένων κυτταρικών προϊόντων (T λεμφοκύτταρα) για την καταστροφή τους. Η διαδικασία αυτή μπορεί να οδηγήσει τελικά στην αντιμετώπιση του ίδιου του αρχικού βιομορίου – φορέα ως αντιγόνου. Το κατά πόσο θα συμβεί κάτι τέτοιο εξαρτάται από το ισοζύγιο κιτοκινών. Η διαταραχή της παραγωγής τους μπορεί να οφείλεται σε άμεση κυτταρική βλάβη από το φαρμακευτικό μόριο ή μεταβολίτες του, την απενεργοποίηση σχετικών με τη δράση του ενζύμων, μεταβολές στη σύνθεση DNA, RNA και πρωτεϊνών, μείωση των επιπέδων των θειολών και άλλες μορφές κυτταρικού στρες όπως υπάρχουσες βακτηριακές και ιικές μολύνσεις. Ενδεικτικά αναφέρεται πως η φαρμακοεπαγόμενη ηπατοτοξικότητα έχει συσχετιστεί με χαμηλότερα επίπεδα λιποσακχαριτών (LPS)^{19,v,vi}.

Μία διαφορετική προσέγγιση του μηχανισμού τοξικότητας βασίζεται στην άμεση ενεργοποίηση T λεμφοκυττάρων, άσχετα από τις διαδικασίες του μεταβολισμού. Στην ανάλυση αυτή, τα ενεργά λεμφοκύτταρα θεωρούνται ικανά να αναγνωρίσουν τα χαμηλού μοριακού βάρους φαρμακευτικά μόρια, προσδεδεμένα μη ομοιοπολικά σε ιστοσυμβατά

σύμπλοκα, που βρίσκονται εκτεθειμένα στην επιφάνεια μακροφάγων και αντιμετωπίζονται ως αντιγόνα^{19,v,vi}.

1.3.4 Τοξικότητα κατά τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό

Καθώς ένα κύτταρο διέρχεται διαδοχικά από συγκεκριμένες διεργασίες που έχουν ως τελικό αποτέλεσμα τη δημιουργία δύο νέων βάσει του αρχικού, παρουσιάζονται σημεία πιθανής διακοπής αυτής της διαδικασίας λόγω τοξικότητας. Πρόκειται ουσιαστικά για τους μηχανισμούς ελέγχου των κυττάρων που εξασφαλίζουν τη διακριτή λήξη και έναρξη κάθε σταδίου διαδοχικά (και τον εντοπισμό και αντιμετώπιση βλαβών στο DNA του κυττάρου) προκαλώντας υστέρηση ή λήξη της μεταγραφής του DNA και απόπειρα αποκατάστασής τους κατά τη μίτωση. Κεντρικό ρόλο στη ρύθμιση αυτών των διεργασιών παίζουν οι κυκλοεξαρτούμενες κινάσες (CDKs) και οι κυκλοπρωτεΐνες. Οι πρώτες ενεργοποιούνται τόσο με φωσφορυλίωση όσο και με πρόσδεση σε αυτές των δεύτερων, με διαφορετικές κυκλοπρωτεΐνες να παράγονται σε κάθε στάδιο, δίνοντας έτσι το απαραίτητο σήμα για τη συνέχεια του κύκλου διαίρεσης του κυττάρου^{10,20-21}.

1.3.5 Απόπτωση

Με τον όρο αυτό αναφέρεται η προγραμματισμένη διαδικασία θανάτου του κυττάρου. Η μορφολογία των κυττάρων που βρίσκονται σε φάση απόπτωσης χαρακτηρίζεται από δομική και γενετική διαφοροποίηση. Σχετικά με τη δομή τους, παρατηρείται συρρίκνωση και απώλεια επαφής με γειτονικά κύτταρα λόγω διάσπασης του πρωτεϊνικού κυτταροσκελετού από τις κασπάσες, «πύκνωση» του κυτοπλάσματος και μείωση των αποστάσεων των οργανιδίων, ενώ σε άλλες περιπτώσεις η κυτταρική μεμβράνη διογκώνεται υπέρμετρα. Σε ό,τι αφορά στο γονιδίωμα του κυττάρου, κατά την απόπτωση η χρωματίνη του πυρήνα συρρικνώνεται και εντοπίζεται ως συμπαγείς επιστρώσεις στην επιφάνεια της πυρηνικής μεμβράνης και το DNA καταταμείται. Χημικές ουσίες όπως φαρμακευτικές ενώσεις ενεργοποιούν συνήθως εξωγενή μονοπάτια κασπασών, με αποτέλεσμα την αύξηση της δράσης κασπασών (τύπου 3 αρχικά και τύπου 8 στη συνέχεια) και τη διάσπαση μορφών πολυμερασών (PARP). Όλα τα παραπάνω έχουν ως αποτέλεσμα τη διάσπαση του αποπτωτικού κυττάρου σε άλλα, μικρότερα μέρη (αποπτωτικά σωμάτια), τα οποία εγκολλώνονται άμεσα από φαγοκύτταρα και απομακρύνονται, πριν το αρχικό περιεχόμενο των αποπτωτικών κυττάρων επηρεάσει δυσμενώς τα γειτονικά υγιή κύτταρα. Οι μεταβολές αυτές οφείλονται σε χαρακτηριστικές μοριακές και βιοχημικές επιδράσεις, όπως η ενεργοποίηση πρωτεολυτικών ενζύμων που συντελεί στην καταστροφή του DNA και διαφόρων εξειδικευμένων υποστρωμάτων.

Η διαδικασία της απόπτωσης είναι σύνθετη και ελέγχεται από ποικίλους ενδοκυτταρικούς και εξωκυτταρικούς παράγοντες, οι οποίοι δύνανται να την προωθήσουν ή εμποδίσουν. Οι πρώτοι είναι κυρίως τοξίνες, ορμόνες, αυξητικοί παράγοντες, οξειδία του αζώτου και

κυτοκίνες, ενώ οι δεύτεροι σχετίζονται κυρίως με την ανάπτυξη κυτταρικού στρες λόγω της ενεργοποίησης πυρηνικών υποδοχέων ή υψηλών ενδοκυτταρικών επιπέδων ασβεστίου. Δύο είναι οι γνωστοί αποπτωτικοί μηχανισμοί, με τον ένα να είναι ενδογενής και να αφορά στα μιτοχόνδρια και τον άλλο να είναι εξωγενής και να σχετίζεται με συγκεκριμένους υποδοχείς, με τους δύο μηχανισμούς συχνά να αλληλεπιδρούν^{4-6,22-23}.

1.3.6 Νέκρωση

Πρόκειται για μία μη προγραμματισμένη κυτταρική διεργασία, κατά την οποία συμβαίνει διόγκωση του κυττάρου και διάρρηξη των οργανιδίων του λόγω απώλειας της ιοντικής ομοιόστασης που προκαλεί η δυσλειτουργία των μιτοχονδρίων και η εξάντληση του διαθέσιμου ATP. Προκαλείται συνεπώς πρόιμος θάνατος των αντίστοιχων κυττάρων και των ιστών που αυτά αποτελούν. Βασική διαφορά της από την απόπτωση είναι πως στη νέκρωση το κυτταρικό περιεχόμενο απελευθερώνεται ανεξέλεγκτα με αποτέλεσμα την πρόκληση βλαβών στα γειτονικά κύτταρα και την πρόκληση έντονης φλεγμονώδους αντίδρασης. Η νέκρωση αρχικά θεωρούνταν μία συμπτωματική μορφή κυτταρικού θανάτου, χωρίς έλεγχο. Τελικά, έχει τεκμηριωθεί πως η σύνδεση TNF-1/TNFR σε στελέχη της κυτταρικής σειράς L929, η αναστολή της απόπτωσης (με αναστολείς κασπασών) και η εξάντληση του διαθέσιμου ATP ενεργοποιούν το αποπτωτικό μονοπάτι, επιφέροντας κυτταρική διάλυση και νέκρωση. Ο πιο συχνός τύπος προκαλούμενης από φάρμακα νέκρωσης είναι η ζωνική νέκρωση. Στη συγκεκριμένη παθολογική κατάσταση, η βλάβη εστιάζεται σε μία περιοχή του ηπατικού λοβού και οδηγεί σε αύξηση των επιπέδων της ALT, σοβαρή διαταραχή της ηπατικής λειτουργίας και τελικά οξεία ηπατική βλάβη και ανεπάρκεια^{6-7,10,23}.

1.3.7 Αυτοφαγία

Η αυτοφαγία είναι η εγγενής διαδικασία κυτταρικού θανάτου που συντελεί στον έλεγχο του ισοζυγίου μεταξύ της παραγωγής κυτταρικών στοιχείων και της διάσπασης κατεστραμμένων ή άχρηστων οργανιδίων και κυτταρικών συστατικών. Η διαδικασία αυτή ελέγχεται κυρίως από τα λυσοσώματα. Είναι ο ομοιοστατικός μηχανισμός μέσω του οποίου παλαιά ενδοκυτταρικά στοιχεία ή στοιχεία που έχουν υποστεί βλάβες αποσυντίθενται. Κατά τη διαδικασία αυτή, τα στοιχεία που επιδιώκεται να απομακρυνθούν εγκοιλώνονται από διμεμβρανικά κιστίδια (αυτοφαγοσώματα), τα οποία ενώνονται με λυσοσώματα προς σχηματισμό αυτοφαγολυσοσωμάτων. Η αποδόμηση των στοιχείων γίνεται από τις υδρολάσες του λυσοσωμικού οξέος^{6-7,10}.

1.3.8 Γενοτοξική και μη καρκινογένεση

Η διάκριση των καρκινογόνων ουσιών σε γενοτοξικές και μη αναφέρεται στο αν ο μηχανισμός δράσης τους σχετίζεται με την καταστροφή του κυτταρικού DNA. Οι γενοτοξικές (ή κάποιος μεταβολίτης τους) επιδρούν στο DNA και τους μηχανισμούς που ελέγχουν την «πιστότητα» του γονιδιώματος, όπως οι τοποϊσομεράσες, ενώ οι μη γενοτοξικές

προκαλούν το ίδιο αποτέλεσμα χωρίς να βλάπτεται το γονιδίωμα, κάνοντάς τες ακόμα περισσότερο δύσκολα προβλέψιμες. Οι δύο αυτοί μηχανισμοί μαζί μπορούν να αλλάξουν τα σηματοδοτικά μονοπάτια, οδηγώντας σε γενετική αστάθεια, μεταλλάξεις, απώλεια ελέγχου του πολλαπλασιασμού και αντίσταση στην απόπτωση, κύρια γνωρίσματα των καρκινικών κυττάρων²⁴.

1.3.9 Φωσφολιπιδίωση

Πρόκειται για διαταραχή της λειτουργίας των λυσοσωμάτων που χαρακτηρίζεται από εκτεταμένη κατακράτηση ενδοκυτταρικών λιπιδίων στους αντίστοιχους ιστούς και λαμβάνει χώρα κυρίως σε όργανα όπως το ήπαρ, οι νεφροί, ο εγκέφαλος και οι πνεύμονες. Κύρια ένδειξη φωσφολιπιδίωσης αποτελεί η παρατήρηση εσωτερικών (μυελοειδών) σωμάτων. Σε αυτή την περίπτωση τοξικότητας, τα αμφιφιλικά φάρμακα με θετικό φορτίο (CADs) έχουν συσχετιστεί με αυξημένη πιθανότητα ανάπτυξης φωσφολιπιδίωσης. Οι ασθενείς βασικές ιδιότητες αυτών των μορίων έχουν ως αποτέλεσμα την πρωτονίωση τους όταν βρεθούν στο περιβάλλον χαμηλού pH στο εσωτερικό των λυσοσωμάτων. Η ιοντισμένη μορφή του φαρμάκου τότε παγιδεύεται αφού δε μπορεί να διαχυθεί από τη φωσφολιπιδική διεπιφάνεια. Τα όργανα στα οποία εκδηλώνεται η φωσφολιπιδίωση συχνά παρουσιάζουν φλεγμονώδεις αντιδράσεις και ιστοπαθολογικές μεταβολές όπως η συσσώρευση στοιχείων των μακροφάγων στο εσωτερικό τους και η ίνωση. Η κλινική πρόβλεψη της φωσφολιπιδίωσης στις περιπτώσεις που αυτή προκαλείται από τη χορήγηση ενός φαρμάκου είναι σύνθετη και όχι πλήρως κατανοητή, με τους μηχανισμούς τοξικότητας και τις αντίστοιχες βλάβες να διαφέρουν ανάλογα με το φάρμακο που τις εγείρει.

Οι γνωστοί μηχανισμοί ανάπτυξης φαρμακοεπαγόμενης φωσφολιπιδίωσης αναφέρονται στην αναστολή των φωσφολιπιδασών, τη σύνδεση φωσφολιπιδίων και ενεργών ουσιών και την αναστολή της αυτοφαγίας. Στην πρώτη, φαρμακευτικά μόρια επιδρούν άμεσα σε διάφορες κατηγορίες φωσφολιπιδασών με αποτέλεσμα την αύξηση των φωσφολιπιδίων στο εσωτερικό των λυσοσωμάτων και τη διαταραχή των διεργασιών αποσύνθεσης των μεμβρανών (αυτοφαγία). Στη δεύτερη, τα ενεργά μόρια (όπως CADs) προσδένονται σε φωσφολιπίδια δημιουργώντας σύμπλοκα αδιάλυτα από τις φωσφολιπιδάσες, με αποτέλεσμα τη συσσώρευσή τους μέσα στα λυσοσώματα. Στην τρίτη, προκαλείται αναστολή της αυτοφαγίας, καθώς λυσοσωματοτροπικά στοιχεία αυξάνουν το pH μέσα στα λυσοσώματα με αποτέλεσμα την αλλοίωση των υδρολασών του λυσοσωμικού οξέος και την αναστολή της αποσύνθεσης των αυτοφαγολυσοσωμάτων²⁵⁻²⁶.

1.4 Ηπατοειδικοί μηχανισμοί τοξικότητας

1.4.1 Στεάτωση

Η ηπατική στεάτωση αναφέρεται στην ενδοκυτταρική κατακράτηση λιπιδίων και το σχηματισμό λιπιδιακών σταγονιδίων μέσα στα ηπατοκύτταρα, με αποτέλεσμα την αύξηση του μεγέθους του ήπατος. Αν αυτή συνοδεύεται και από φλεγμονή τότε πρόκειται για μη αλκοολική στεατοηπατίτιδα (NASH) ενώ γενικά απαντάται στη μη αλκοολική λιπώδη νόσο του ήπατος (NAFLD) καθώς και στην ίνωση και την κίρρωση του λιπώδους ήπατος. Η εξέλιξη της στεάτωσης σε στεατοηπατίτιδα περιλαμβάνει την παραγωγή οξειδωτικών παραγόντων (ROS), την ανάπτυξη οξειδωτικού στρες και ηπατική βλάβη, προκαλούμενη από κιτοκίνες. Βασικοί παράγοντες ανάπτυξης οξειδωτικού στρες σε αυτή την περίπτωση είναι διαφοροποιήσεις στην αναπνευστική αλυσίδα των μιτοχονδρίων, οξειδώσεις λιπαρών οξέων σε διάφορα οργανίδια των κυττάρων και επιδράσεις στα κυτοχρώματα P-450²⁷. Η στεάτωση σχετίζεται με την υπερτριγλυκεριδημία, την παχυσαρκία και την αντίσταση στην ινσουλίνη, ενώ όταν προκαλείται ως αποτέλεσμα της αλληλεπίδρασης με κάποιο φάρμακο διακρίνεται σε τέσσερις βασικές περιπτώσεις:

1.4.2 Βλάβη μιτοχονδριακής λειτουργίας

Η φαρμακοεπαγόμενη βλάβη στα μιτοχόνδρια έχει συχνά ως αποτέλεσμα την αναστολή της οξειδωσης των λιπαρών οξέων σε αυτά, κάτι που αποτελεί το συχνότερα απαντώμενο φαινόμενο λόγω ενδοκυτταρικής συσσώρευσης λιπιδίων. Τα διάφορα φάρμακα που αποδεδειγμένα μπορεί να προκαλέσουν στεάτωση (νουκλεοσιδικοί αναστολείς της αντίστροφης μεταγραφάσης, γλυκοκορτικοειδή, κ.α.) μέσω πλήθους μηχανισμών διαταραχής της δράσης ορισμένων ενζύμων και γονιδίων. Συχνά ο μηχανισμός σχετίζεται με την άμεση αναστολή των μιτοχονδριακών ενζύμων που οξειδώνουν τα λιπαρά οξέα ή τη μείωση των επιπέδων συνενζύμων ή προσθετικών ομάδων αυτών των ενζύμων, μέσω μεταβολής της σύνθεσης συνενζύμου A και εστέρων της L-καρνιτίνης. Ένας άλλος μηχανισμός βασίζεται στην αναστολή της μιτοχονδριακής αναπνευστικής αλυσίδας που ανάγει τα συνένζυμα FAD και FAD⁺ που απαιτούνται στις προαναφερθείσες αντιδράσεις, με την αλλοίωσή της να συμβαίνει και με μείωση των επιπέδων του mtDNA μέσω ενός διαφορετικού μηχανισμού τοξικότητας^{16,27-28}.

Διαταραχή της σύνθεσης και έκκρισης λιποπρωτεϊνών πολύ χαμηλής πυκνότητας (VLDLs)

Κατά την ομαλή λειτουργία του ήπατος, τα επίπεδα λιπαρών οξέων ελέγχονται και μέσω της μετατροπής των περιττών σε τριγλυκερίδια μέσω εστεροποίησης, σε λιποπρωτεΐνες πολύ χαμηλής πυκνότητας (VLDLs) και έκκρισή τους στο πλάσμα. Η διαταραχή αυτής της λειτουργίας λόγω κάποιας δραστικής ουσίας έγκειται στην αναστολή της μεταφορικής πρωτεΐνης των τριγλυκεριδίων²⁷⁻²⁸.

Αντίσταση στην ινσουλίνη

Η αλλοίωση των μονοπατιών της ινσουλίνης μπορεί να έχει ως αποτέλεσμα την ανάπτυξη αντίστασης σε αυτή, μία κλινική κατάσταση κατά την οποία τα φυσιολογικά επίπεδα της ορμόνης δεν αρκούν για την αποτελεσματική μεταφορά της γλυκόζης στα κύτταρα. Μείωση της ευαισθησίας στην ινσουλίνη μπορεί να οδηγήσει σε προβληματική σύνθεση VLDLs και μειωμένη οξείδωση λιπιδίων, με συνέπεια τελικά την ηπατική συσσώρευση λίπους και τη στεάτωση²⁷⁻²⁸.

Ενεργοποίηση μεταγραφικών παραγόντων στην ηπατική λιπογένεση

Ηπατοτοξικά φάρμακα έχει φανεί ότι προκαλούν λιπιδική σύνθεση στο ήπαρ. Η ακριβής διαδικασία σύνθεσης δεν είναι γνωστή, έχει όμως συσχετιστεί με την ενεργοποίηση λιπογενών μεταγραφικών παραγόντων (όπως οι SREBP-1c, ChREBP, PXR, PPARγ)²⁷⁻²⁸.

1.4.3 Χολόσταση

Γενικά, η χολοστατική ηπατική βλάβη χαρακτηρίζεται κλινικά από αυξημένα επίπεδα αλκαλικής φωσφατάσης, γ-γλουταμυλο-τρανσπεπτιδάση και συζευγμένης χολερυθρίνης στον ορό. Συχνά, η φαρμακοεπαγόμενη χολόσταση στο ήπαρ ξεπερνιέται με διακοπή της χορήγησης του φαρμάκου που την προκαλεί ενώ σε κάποιες περιπτώσεις η εκτεταμένη δυσλειτουργία των χοληφόρων αδένων μπορεί να οδηγήσει σε χρόνια ηπατική νόσο και τελικώς σε ανεπάρκεια. Η χολόσταση μπορεί να οφείλεται σε ενδοηπατικούς παράγοντες όπως η αδυναμία έκκρισης χολής ή σε εξωηπατικούς όπως μηχανικές παρεμποδίσεις των χοληφόρων αδένων. Η εκδήλωση χολόστασης θεωρείται συνέπεια διαφόρων παραγόντων και μπορεί να επιδεινωθεί λόγω προδιάθεσης ή παράλληλων κλινικών καταστάσεων, με διαφορετικές μορφές χολόστασης να προκύπτουν από διαφορετικό μηχανισμό ηπατοτοξικότητας^{10,29}.

Αλληλεπίδραση μεταφορέων

Η κλασική κλινική χολόσταση (απουσία ηπατίτιδας) συνήθως αποτελεί συνέπεια της (ημιτονοειδούς) πρόσληψης της χολής στο ήπαρ ή της ενδοκυτταρικής και ενδοκαναλιακής μεταφοράς της. Οι μεταφορείς που ρυθμίζουν την ημιτονοειδή ηπατική πρόσληψη χολής (NTCP, OATP1B1, 1B3, 2B1, OCT1, OAT2) καθορίζουν και την πρόσληψη φαρμάκων από το αίμα. Αντίστοιχα, οι διακαναλιακοί μεταφορείς (MDR1, P-gp, MDR3, MRP2, BSEP) είναι σημαντικοί για την εξάλειψη των φαρμακευτικών ενώσεων και των χολικών οξέων στις μεμβράνες της χολής. Από αυτούς τους μεταφορείς, τρεις είναι εκείνοι που θεωρούνται περισσότερο σημαντικοί, κυρίως λόγω της διαπίστωσης πως μεταλλάξεις των γονιδίων που ορίζουν τη λειτουργία τους οδηγούν σε κληρονομήσιμες σοβαρές χολοστατικές διαταραχές²⁹⁻

30,v,vi

Πρόκειται για:

BSEP: ορίζει την έκκριση χολικών οξέων από τη χολή (ρυθμίζοντας την αντλία εξαγωγής χολικού άλατος) και αλλοιώσεις σε αυτόν μπορεί να οδηγήσουν σε ενδοκυτταρική (κυρίως στα μιτοχόνδρια και ενδοπλασματικό δίκτυο) και ενδοηπατική συσσώρευση χολικών οξέων και τελικά σε τοξικότητα.

MDR3: ορίζει την έκκριση φωσφολιπιδίων από τη χολή, συμπεριλαμβανομένης και της φωσφατιδυχολίνης, η οποία σχηματίζει μικκύλια με τα χολικά οξέα, μία διαδικασία που προστατεύει τα ηπατοκύτταρα από τους καθαριστικούς παράγοντες που απομακρύνουν τα χολικά οξέα.

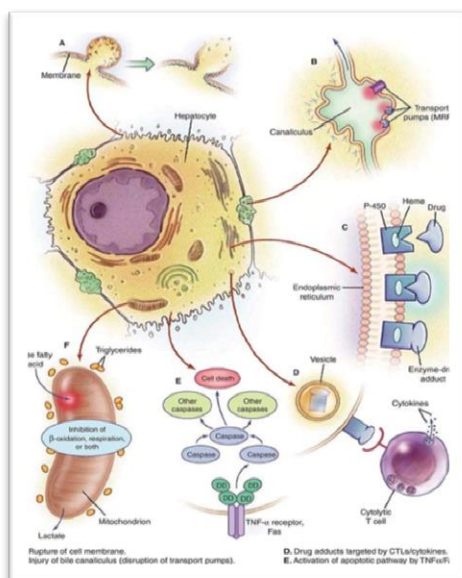
MRP2: ορίζει την έκκριση γλουταθειόνης και συζευγμένων μορφών της στη χολή, με τη γλουταθειόνη να αποτελεί σημαντικό ρυθμιστικό παράγοντα της ανεξάρτητης από τα χολικά οξέα μεταφοράς της χολής.

Ανοσολογικές αντιδράσεις

Η ταυτόχρονη χολόσταση και ηπατίτιδα γενικά προκαλούνται από ένα κοινό ανοσοαλλεργικό μηχανισμό, συχνά ενεργοποιούμενο από αντιδράσεις υπερευαισθησίας. Οι αντιδράσεις αυτές μπορεί να προκληθούν από ένα φάρμακο ή ενεργούς μεταβολίτες του που συνδέονται ομοιοπολικά σε ηπατοειδικές πρωτεΐνες^{29,30}.

Χολολιθίαση

Η περίπτωση της φαρμακοεπαγόμενης ανάπτυξης χολόλιθων στην περιοχή των αυλών της χολής δεν είναι απόλυτα κατανοητή, θεωρείται όμως άμεσα συνδεδεμένη με τη διακοπή της λειτουργίας της χοληδόχου κύστης και την επαυξημένη έκκριση χοληστερόλης στη χολή³⁰.



Εικόνα 2 Κύριοι κυτταροτοξικοί μηχανισμοί στη φαρμακοεπαγόμενη τοξικότητα του ήπατος (WM Lee: *Drug-induced hepatotoxicity. N Engl J Med 349:474, 2003*)

1.5 Κλινικοί μηχανισμοί DILI

1.5.1 Κυτταρική προσέγγιση της DILI

Το γεγονός ότι το ήπαρ αποτελεί το κεντρικό όργανο του μεταβολισμού το καθιστά πρωταρχικό στόχο για τους ενεργούς μεταβολίτες των δραστικών ουσιών. Στις περισσότερες περιπτώσεις οι φαρμακευτικές ουσίες ή μεταβολίτες τους αποτοξικοποιούνται μέσω της δεύτερης φάσης σύζευξης (γλυκουρονίωση, ακετυλίωση, σουλφυλίωση, γλουταδιονική σύζευξη κα) και αποβάλλονται από το κύτταρο μέσω της πρωτεΐνης διασταυρούμενης αντοχής (multi-drug resistance associated protein MRP) στην τρίτη φάση. Οι δραστικοί μεταβολίτες παράγονται μέσω οξειδοαναγωγικών δράσεων από το κυτόχρωμα P450 στην πρώτη φάση. Το ισοζύγιο μεταξύ παραγωγής δραστικών μεταβολιτών, αποτοξικοποίησης και μεταφοράς τους είναι ο παράγοντας που καθορίζει τις προϋποθέσεις ανάπτυξης DILI, δηλαδή την έκθεση των υγιών ηπατοκυττάρων σε οριακά επίπεδα δραστικών ενώσεων. Η δραστική δόση του φαρμακευτικού σκευάσματος και η λιποφιλία της δραστικής ουσίας (που αναλογικά αυξάνει την κατανομή της στο ήπαρ) είναι αντίστοιχα σημαντικοί παράγοντες για την ανάπτυξη ηπατοκυτταρικής βλάβης.

Πέρα από τους προαναφερθέντες μηχανισμούς ανάπτυξης τοξικότητας, ένα πλήθος παραγόντων φαίνεται πως ενισχύουν διαδοχικά την καταπόνηση (stress) των κυττάρων λόγω των μεταβολών που προκαλεί η πρόσληψη μίας φαρμακευτικής ένωσης στο ήπαρ. Συγκεκριμένες κινάσες όπως η JNK (C-Jun-N-terminal kinase), που ανήκει στις κινάσες σερίνης/θρεονίνης (MAPK), ενεργοποιείται από τον παράγοντα TNF- α , ο οποίος αυξάνεται λόγω της μεταγραφής των πρωτεϊνών NF- κ B από επιβιωτικά γονίδια. Παρά το ότι δεν είναι τοξική, η παρατεταμένη ενεργοποίησή της είναι καταστροφική για το κύτταρο. Η ενεργοποίηση της JNK και των αναλόγων της προκαλείται και από άλλους παράγοντες όπως οι οξειδωτικές μορφές (ROS), η υπεριώδης ακτινοβολία (UV) και η δράση κιτοκινών, με τη δράση τους να επηρεάζει άμεσα τα μιτοχόνδρια, καθώς προσδένονται στις μεμβρανικές τους πρωτεΐνες και εμποδίζουν την ηλεκτρονιομεταφορά^{6-7,10,30}.

Οι μηχανισμοί απόπτωσης και νέκρωσης που αναλύθηκαν παραπάνω συνεπιδρούν στα μιτοχόνδρια, με την απελευθέρωση κυτοχρώματος C, αποπτωτικού παράγοντα (AIF) και μιτοχονδριακής πρωτεΐνης Smac. Αυτοί ενεργοποιούν τις κασπάσες και προκαλούν:

- Απόπτωση, παρουσία επαρκούς ATP, λόγω αύξησης της διαπερατότητας της εξωτερικής μιτοχονδριακής μεμβράνης (OMM).
- Νέκρωση, λόγω μεταβολής της διαπερατότητας των μιτοχονδρίων (MPT) που καθορίζεται από το τασιενεργό ανιοντικό κελί (VDAC) της εξωτερικής μεμβράνης (OMM), την αδενινονουκλεοτιδική τρανσλοκάση (ANT) από την εσωτερική μεμβράνη (IMM) και την κυκλοφιλίνη D (CypD) στον ενδιάμεσο χώρο (matrix). Η

διαστολή αυτή προκαλεί διάχυση, διαταράσσοντας τη βαθμίδα πρωτονίων και του δυναμικού της μεμβράνης, σταματώντας την παραγωγή ATP.

Η προγραμματισμένη νέκρωση είναι πρακτικά μία «αναβληθείσα» απόπτωση καθώς όταν μία εγγενής ανοσοβιολογική απόκριση ενεργοποιείται από ένα λιποσακχαρίτη (LPS), ο παράγοντας TNF- α απελευθερώνεται και προσδένεται σε υποδοχείς της μεμβράνης του κυττάρου, ενεργοποιώντας μονοπάτια κυτταρικού θανάτου όπως του JNK. Η νέκρωση λαμβάνει χώρα όταν το μονοπάτι καταλήξει σε σύνδεση με υποδοχείς της πλασματικής μεμβράνης (TNF- α /TNFR) και παράλληλη παρεμπόδιση της απόπτωσης λόγω αναστολής των κασπασών^{3,23,v,vi}.

1.5.2 Η περίπτωση της παρακεταμόλης

Όπως προαναφέρθηκε, η φαρμακοεπαγόμενη ηπατοτοξικότητα που προκαλείται από την παρακεταμόλη (Ακεταμινοφαίνη - APAP) είναι η συχνότερα προκύπτουσα μορφή DILI σχετιζόμενη με συγκεκριμένη ενεργή φαρμακευτική ουσία. Η τοξική της επίδραση έχει ως βάση την υπερκατανάλωση και συνεπώς ενώ θεωρείται ασφαλής η χορήγησή της σε συγκεκριμένο εύρος δόσεων, πέραν αυτών προκαλείται συχνά κεντρολοβιακή ηπατική ανεπάρκεια και τελικά θάνατος. Η μέγιστη συνιστώμενη δόση παρακεταμόλης ανά 24ωρο είναι 4 g στους ενήλικες και 60 mg/kg στα παιδιά. Σε ότι αφορά στη φαρμακευτική της δράση, η παρακεταμόλη έχει αντιπυρετική, αναλγητική και αντιφλεγμονώδη δράση. Πιο συγκεκριμένα, αρχικά ελαττώνει τον πυρετό αναστέλλοντας το σχηματισμό και την απελευθέρωση προσταγλανδινών (όπως PGH) από τα καθορισμένα θερμορρυθμιστικά κέντρα του υποθαλάμου του εγκεφάλου, με την υπεροξειδική μοίρα της κυκλοοξυγενάσης - 3 (COX-3 - cyclooxygenase-3) να θεωρείται ο ενζυματικός στόχος της αντιπυρετικής δράσης. Ακόμα, επιφέρει δόσοεξαρτώμενη μείωση του πόνου ενισχύοντας τις κατιούσες ανασταλτικές οδούς του και επιδρώντας σε ένα κεντρικό σεροτονινεργικό σύστημα. Σχετικά με την αντιφλεγμονώδη δράση της, αυτή είναι εκλεκτική και ασθενέστερη καθώς οφείλεται σε αναστολή της υπεροξειδωτικής λειτουργίας της κυκλοοξυγενάσης - 2 (COX-2 - cyclooxygenase-2), ενζύμου που συμμετέχει στη σύνθεση των προσταγλανδινών, που είναι μεσολαβητές του μηχανισμού της φλεγμονής³¹⁻³⁴.

1.5.2.1 Μεταβολισμός

Σχετικά με το μεταβολισμό της παρακεταμόλης, αυτός λαμβάνει χώρα κατά κύριο λόγο μέσω των οδών της γλυκουρονιδίωσης, της σύζευξης με θειική ομάδα και της οξειδωσης. Η γλυκουρονιδίωση και η οξειδωση παρουσιάζουν κινητική πρώτης τάξης, δηλαδή η συγκέντρωση της παρακεταμόλης στο ήπαρ ελαττώνεται ανάλογα με τη συγκέντρωσή της που μεταβολίζεται. Η σύζευξη με θειική ομάδα ακολουθεί κινητική Michaelis - Menten και συνεπώς από τη στιγμή που η συγκέντρωση της παρακεταμόλης υπερβεί ένα επίπεδο κορεσμού, το ποσοστό που μεταβολίζεται παραμένει σταθερό. Κυριότερη μεταβολική οδός

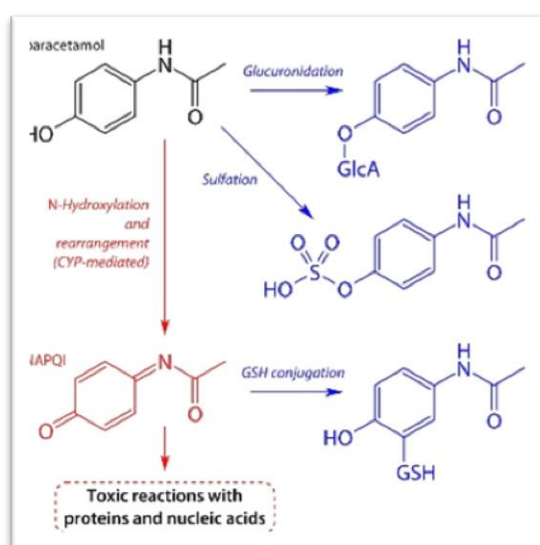
είναι η γλυκουρονιδίωση όπου γίνεται σύζευξη του 47-62% της θεραπευτικής δόσης με γλυκουρονίδια, με τα σύμπλοκα να είναι ανενεργά, να εκκρίνονται στη χολή και τελικώς να απεκκρίνονται με τα ούρα. Η δεύτερη βασική μεταβολική οδός είναι η σύζευξη με θειική ρίζα όπου 25-36% της δόσης αλληλεπιδρά με θειικά ιόντα, με τα προϊόντα της σύζευξης να είναι ανενεργοί, μη τοξικοί θειικοί εστέρες. Η θείωση γίνεται μέσω σουλφοτρανσφερασών, μία ετερογενή ομάδα ενζύμων του κυτοσολίου με συνένζυμο την φωσφορική αδενosίνη, που καταλύουν τη μεταφορά θεικών ομάδων από μόρια – δότες σε αλκοόλες ή αμίνες (δέκτες), με το ρυθμό της αντίδρασης να ελέγχεται από την ενεργότητα των ενζύμων αυτών σε κάθε άτομο. Η τρίτη μεταβολική οδός είναι η οξείδωση κατά την οποία το 5-8% της ακεταμινοφαίνης μεταβολίζεται από το σύστημα του κυτοχρώματος P450 και κυρίως από τα ισoenζυμα CYP2E1 και CYP4A, τα οποία σχηματίζουν έναν εξαιρετικά δραστικό μεταβολίτη, την N-ακέτυλο-p- βενζοκινονιμίνη (N-acetylbenzo-p-quinone imine – NAPQI). Το NAPQI υπό φυσιολογικές συνθήκες δεν συσσωρεύεται στο ήπαρ και απενεργοποιείται ταχέως από τα ηπατοκυτταρικά αποθέματα της γλουταθειόνης (GSH) προς σχηματισμό προϊόντων σύζευξης, με τελικό σχηματισμό μερκαπτουρικού οξέος που είναι ανενεργό, μη τοξικό και απεκκρίνεται στα ούρα. Η τέταρτη μεταβολική οδός είναι η σύζευξη με κυστεΐνη σε ποσοστό 3% που οδηγεί στην παραγωγή αβλαβών και ανενεργών μεταβολιτών³¹⁻³⁴.

1.5.2.2 Ενδοκυτταρικές ομοιοπολικές και μη αλληλεπιδράσεις

Δεδομένου ότι το NAPQI είναι μία κίνη-ιμίνη, δηλαδή έχει ισχυρή οξειδωτική και ηλεκτρονιόφιλη δράση, μπορεί να προκαλέσει το σχηματισμό ομοιοπολικών και μη ενώσεων κατά την αλληλεπίδρασή της με άλλα κυτταρικά συστατικά. Σε επίπεδο ιστού, η ομοιοπολική πρόσδεση στις ηπατοκυτταρικές πρωτεΐνες γίνεται στα ηπατοκύτταρα της κεντρολοβιακής ζώνης, με την πρόσδεση αυτή να προηγείται της ανάπτυξης κυτταρικής νέκρωσης των ηπατοκυττάρων της περιοχής. Η ομοιοπολική πρόσδεση της NAPQI φαίνεται να γίνεται κυρίως, αν και όχι αποκλειστικά, μέσω κυστεΐνης αλλά και, σε μικρότερο βαθμό, μέσω λυσίνης ή άλλων αμινοξέων, με αποτέλεσμα συχνά την ελάττωση της καταλυτικής δραστηριότητας των αντίστοιχων πρωτεϊνών. Από τη στιγμή που ελαττώνεται η δράση των κυτταρικών πρωτεϊνών, μεταξύ των οποίων και σημαντικές δεϋδρογονάσες, διαμορφώνεται μία οξειδωτική κατάσταση στα κύτταρα με αποτέλεσμα τη διαταραχή της διαδικασίας σύνθεσης του ATP³¹⁻³⁴.

Η μιτοχονδριακή λειτουργία είναι κύριος στόχος της ηπατοτοξικότητας από παρακεταμόλη, με τη διαταραχή της μιτοχονδριακής ομοιόστασης να θεωρείται σχεδόν υποχρεωτική για την ανάπτυξη ηπατικής βλάβης. Στα μιτοχόνδρια, παρατηρείται σημαντική αύξηση των επιπέδων των πρωτεϊνικών συμπλεγμάτων μετά από υπερδοσολογία παρακεταμόλης ενώ παρουσιάζουν μορφολογικές και λειτουργικές αλλοιώσεις κατά τα πρώιμα στάδια της ηπατοτοξικότητας. Η

ομοιοπολική πρόσδεση της NAPQI στις μιτοχονδριακές πρωτεΐνες προκαλεί δυσλειτουργία των μιτοχονδρίων με αποτέλεσμα αναστολή της αναπνευστικής λειτουργίας, ελάττωση του ρυθμού σύνθεσης και των συγκεντρώσεων του ATP, εστιασμένη οξειδωτική καταπόνηση των μιτοχονδρίων και απελευθέρωση δραστικών μεταβολιτών με αποτέλεσμα τη διαταραχή της διαπερατότητας της εσωτερικής τους μεμβράνης, τη διαταραχή του δυναμικού της και την πρόκληση ογκωτικής νέκρωσης. Η βλάβη διαφοροποιείται ανάλογα με τη χρησιμοποιηθείσα δόση ακεταμινοφαΐνης, ανάλογα με τον τύπο του πειραματικού μοντέλου, αλλά και το χρονικό σημείο της παρατήρησης. Η ακεταμινοφαΐνη προκαλεί ελάττωση των αποθεμάτων της ενδομιτοχονδριακής γλουταθειόνης και των αδένινο-νουκλεοτιδίων με αναδιανομή των επιπέδων ασβεστίου ενώ διαπιστώνεται αύξηση των μεταβολικών ρυθμών.



Εικόνα 3 Μεταβολικές οδές που ακολουθεί το φαρμακευτικό μόριο της παρακεταμόλης *in vivo* (“Acetaminophen Metabolism”, Wikimedia Commons, Web 8 Oct 2010)

Παράλληλα, η NAPQI επηρεάζει και μέσω μη ομοιοπολικών επιδράσεων τις κυτταρικές πρωτεΐνες με αποτέλεσμα τη μείωση των επιπέδων τους. Χωρίς να είναι σαφής ο μηχανισμός αυτής της αλληλεπίδρασης, συμπλέγματα NAPQI με ομάδες θειόλης αντιδρούν προς σχηματισμό S-θειολικών πρωτεϊνών με τροποποιημένες δραστηριότητες, γεγονός που παραλληλίζεται με τη διαπίστωση πως η NAPQI προκαλεί αναστολή των εξαρτώμενων από τα κατιόντα ασβεστίου υδρολασών (συμμετοχή στη μετατροπή ATP σε ADP), απουσία ομοιοπολικών συνδέσεων. Ανάλογη επίπτωση έχει διαπιστωθεί και σε άλλες πρωτεΐνες όπως η αντλία νατρίου – καλίου και φωσφατάσες και συνθετάσες που οδηγούν σε μείωση των επιπέδων του ακέτυλου συνενζύμου A και καταστολή της μεταβολικής οδού της β-οξειδωσης³¹⁻³⁴.

1.5.2.3 Παθολογία

Τα παθολογικά γεγονότα σε μοριακό και κυτταρικό επίπεδο αλληλεπικαλύπτονται και πλέον θεωρείται πως σε κυτταρική κλίμακα δεν κινητοποιείται μία προκαθορισμένη εκφυλιστική διαδικασία που θα οδηγήσει σε κυτταρικό θάνατο, αλλά αποκρίσεις που εντάσσονται σε μία απόπειρα διατήρησης της κυτταρικής δομής και ομοιόστασης. Η θεωρία αυτή που προάγει την κυτταρική αντίδραση με σκοπό την προστασία από την ξενοβιοτική δράση έναντι της παλαιότερης οπτικής που βασιζόταν στον κοινό κυτταρικό θάνατο στηρίζεται από την αύξηση των πρωτεϊνών θερμικής καταπόνησης (μεταλλοθειονεΐνη, ισομορφές της τρανσφεράσης της γλουταθειόνης, οξυγενάση της αίμης) κατά την τοξική δράση της NAPQI. Παράλληλα, διαπιστώνεται αύξηση των επιπέδων ινικής και του αναστολέα ενεργοποίησης του πλασμινογόνου (PMG) 2 έως 6 ώρες μετά τη χορήγηση της τοξικής δόσης με αποτέλεσμα την παρεμπόδιση των μηχανισμών αναδιάταξης του εξωκυττάρου υλικού.

Η τοξική επίπτωση της παρακεταμόλης επηρεάζει χρονικά άμεσα και στα ανώτερα επίπεδα οργάνωσης. Περίπου 6 ώρες μετά την χορήγηση της τοξικής δόσης και την έναρξη της βλάβης, ο αριθμός των μιτοχονδρίων αυξάνεται σημαντικά εντός των ηπατοκυττάρων. Στις 24 ώρες, τα μιτοχόνδρια αποκτούν μία άτυπη μορφολογία και περιβάλλονται από κενοτόπια διπλής μεμβράνης, στοιχεία ενδεικτικά μίας καταβολικής διαδικασίας αποσύνθεσης και ανακύκλωσης των κυτταρικών συστατικών που καλείται μακροαυτοφαγία. Η αυτοφαγία γενικά θεωρείται ένας αμυντικός μηχανισμός των κυττάρων σε δυσμενείς εξωτερικές συνθήκες με σκοπό την έκτακτη εξασφάλιση ενεργειακών πόρων. Οι αντιαποπτωτικές πρωτεΐνες BCL-2 αναστέλλουν την αυτοφαγία, κάτι που έχει ως συνέπεια την πρόκληση κυτταρικού θανάτου μέσω απόπτωσης. Αν οι μηχανισμοί της απόπτωσης (κασπάσες) δεν επαρκούν λειτουργικά, ο κυτταρικός θάνατος είναι νεκρωτικός. Συγκεκριμένα η παρακεταμόλη απενεργοποιεί εκλεκτικά την καταλάση, επάγει αυτοφαγικές διαδικασίες, αναστέλλει την ενεργοποίηση των κασπασών και αυξάνει το σχηματισμό δραστικών ριζών οξυγόνου (ROS – Reactive Oxygen Species).

Συνεπώς, σε ανώτερο επίπεδο, οι περιγραφείσες θανατοαφετηριακές διαδικασίες οδηγούν στην απώλεια της κυτταρικής ακεραιότητας, με συνέπεια την απελευθέρωση ενδοκυττάρων πρωτεϊνών, συμπεριλαμβανομένων εκείνων στις οποίες έχει προσδεθεί η NAPQI. Οι πρωτεΐνες αυτές έχουν προφλεγμονώδη και πρωτεολυτική δράση (όπως TNF, Fas, IL-6, IL-8, IL-11, MIP-2 και άλλων), συντελώντας στην ενεργοποίηση της ανοσοβιολογικής απόκρισης. Το γεγονός αυτό διασταυρώνει την αρχική ενδοκυτταρική βλάβη με την κινητοποίηση διαμεσολαβητών κυτταροκινών και χημειοκινών από τα μη παρεγχυματικά κύτταρα, τα οποία προκαλούν μία έντονη φλεγμονώδη αντίδραση συνολικά στο ήπαρ, με ταυτόχρονη κινητοποίηση των μακροφάγων. Τα μη παρεγχυματικά κύτταρα απαντώνται σε ποσοστό 35% (ενδοθήλιο, κύτταρα Kupffer, αστροκύτταρα). Διαμορφώνεται τελικώς μία συνολική,

επιταχυνόμενη επιβάρυνση του ήπατος, που εντείνεται από τη διαρκή παροχή του τοξικού παράγοντα μέχρι πλήρους μεταβολισμού του, την κατακράτηση κυτταρικών προϊόντων όπως χολής και την απομείωση του κυτταρικού δυναμικού που αντιμετωπίζει τις εστίες παθογένειας λόγω (κυρίως) νέκρωσης και απόπτωσης, με τελικό αποτέλεσμα την ηπατική ανεπάρκεια και συχνά το θάνατο.

Παρά τη συμβολή πολλών ουσιών ως αντιδότην στην τοξικότητα από παρακεταμόλη, η Ν-ακετυλοκυστεΐνη (NAC), το Ν-ακετυλιωμένο παράγωγο της L-κυστεΐνης, είναι η ένωση με την ευρεία κλινική χρήση για το σκοπό αυτό. Η σουλφυδρυλική ομάδα (-SH) του μορίου θεωρείται υπεύθυνη για τη θεραπευτική της δράση, συμβάλλοντας στην αποκατάσταση των αποθεμάτων γλουταθειόνης, γεγονός που αναστέλλει την τελική δράση του μεταβολίτη NAPQI. Η δράση της NAC ενισχύεται από παράλληλα αποτελέσματα της λήψης της, όπως η πρόκληση αγγειοδιαστολής, η αύξηση της πρόσληψης οξυγόνου στους ιστούς, η αντιοξειδωτική δράση και η καταστολή του TNF- α ³¹⁻³⁴.

1.6 Βιοδείκτες και πρόβλεψη της DILI

Σήμερα, η διάγνωση της φαρμακοεπαγόμενης ηπατοτοξικότητας στους ανθρώπους γίνεται κυρίως με τον εντοπισμό διαφοροποιημένων βιοχημικών διεργασιών στο ήπαρ, μέσω διαφόρων βιοδεικτών που συσχετίζονται με την έκταση της ηπατοκυτταρικής νέκρωσης και της χολόστασης. Βασικότεροι δείκτες για ηπατική βλάβη θεωρούνται η αλανινική τρανσαμινάση (ALT) και η ασπαρτική τρανσαμινάση (AST), που μαζί με τη χολερυθρίνη ορού αποτελούν τη βάση της υπόθεσης του Hy (Hy's Law), που προβλέπει την πιθανότητα ένα φάρμακο να προκαλέσει θάνατο μέσω DILI, απουσία άλλων επιβαρυντικών παραγόντων. Η υπόθεση αυτή βασίζεται σε άτομα με υγιές ήπαρ που εμφανίζουν ηπατική βλάβη από τη χορήγηση ενός φαρμάκου, η οποία εντοπίζεται ως υπερτριπλασιασμός της ALT και υπερδιπλασιασμός της χολερυθρίνης ορού. Το 10% όσων θα εμφανίσουν DILI βάσει αυτής της υπόθεσης, ισούται με όσους θα έχαναν τη ζωή τους από DILI, στην περίπτωση ευρείας κυκλοφορίας του φαρμάκου αυτού. Η υπόθεση του Hy αποτελεί σήμερα, το βασικό μέτρο ελέγχου της DILI από τις διάφορες ρυθμιστικές αρχές. Αντίθετα, ακόμα και η βασική *in vitro* ένδειξη που παρέχεται από τη μέτρηση της ALT θεωρείται πρακτικά αναξιόπιστη αφού έχει χαμηλή ευαισθησία, χαμηλή εξειδίκευση και πολλά ισομερή, κάτι που ενισχύει την ανάγκη για ερευνητικές λύσεις^{5-7,12,35}.

Από πλήθος ερευνητικών εργασιών και βιβλιογραφικών πηγών διάφορες ουσίες έχουν συσχετιστεί επιτυχώς σε εργαστηριακά μοντέλα πρόβλεψης της DILI με την πιθανότητα πρόκλησής της από ένα φάρμακο. Οι κυριότεροι πιθανοί βιοδείκτες που αυτή τη στιγμή αναγνωρίζονται ως περισσότερο υποσχόμενοι από την επιστημονική κοινότητα παρατίθενται παρακάτω.

Αμινοτρανσφεράσες ορού - Αλανινική και Ασπαρτική αμινοτρανσφεράση (ALT και AST αντίστοιχα), Αλκαλινή φωσφατάση (ALP)

Πρόκειται για τους βασικότερους και καλύτερα μελετημένους βιοδείκτες ηπατικής βλάβης μέχρι σήμερα, με την ALT να εντοπίζεται κυρίως στο ήπαρ και την AST να βρίσκεται επίσης στο μυοκάρδιο και τους νεφρούς. Η πρώτη καταλύει την αντιστρεπτή μεταφορά της αμινομάδας της αλανίνης στο α-κετογλουταρικό οξύ προς πυροσταφυλικό οξύ και γλουταμινικό οξύ και η δεύτερη καταλύει τη δημιουργία οξαλοξικού και γλουταμικού οξέος από α-κετογλουταρικό. Η ALP είναι μία φωσφατάση που συμμετέχει στην αποφωσφορυλίωση. Ο λόγος των συγκεντρώσεων των ALT και AST αποτελεί το βασικότερο βιοδείκτη για ηπατικές διαταραχές και φαρμακοεπαγόμενη ηπατοτοξικότητα. Παρά ταύτα, παρουσιάζουν διαφορετική φυσιολογική τιμή και εύρος μεταβολής ανά άτομο και δεν συσχετίζονται πλήρως με τις λειτουργίες των ηπατικών κυττάρων σε συνθήκες τοξικότητας^{1,5,36}.

Συνολική Χολερυθρίνη ορού (TBL)

Πρόκειται για προϊόν του καταβολισμού της αίμης και συσχετίζεται με ηπατικές διαταραχές, παρουσιάζοντας υψηλή ευαισθησία. Επηρεάζεται όμως σημαντικά από αιματικές διαταραχές λόγω του ρόλου της αίμης στην αιμογλοβίνη και δεν έχει ανάλογο στατιστικά σημαντικό ρόλο σε *in vitro* εφαρμογές³⁶.

Πρωτεϊνικό σύμπλοκο υψηλής κινητικότητας (HMGB1)

Πρόκειται για πρωτεΐνη πρόσδεσης στη χρωματίνη, αποδεσμεύεται παθητικά από κύτταρα που βρίσκονται σε φάση νέκρωσης και λειτουργεί ως παράγοντας πρόκλησης ανοσοβιολογικών δράσεων, στοχεύοντας σε συγκεκριμένους υποδοχείς. Ακόμα, εκκρίνεται ενεργητικά από τα κύτταρα σε υπερακετυλιωμένη μορφή (Acetyl-HMGB1) κατά την ενεργοποίηση φλεγμονώδους αντίδρασης λόγω φαρμακοεπαγόμενης τοξικότητας^{36,37}.

Γλουταμινική αφυρογονάση (GLDH)

Βρίσκεται στο εσωτερικό των μιτοχονδρίων των ηπατοκυττάρων, καταλύει τη μετατροπή του γλουταμινικού οξέος σε α-κετογλουταρικό οξύ και παρουσιάζει σχετική εξειδίκευση στο ήπαρ (πολύ μικρότερη σε καρδιά και σκελετικούς μύες) και αποτελεί ένδειξη της διαρροής ενδομιτοχονδριακών υλών. Ακόμα, βρίσκεται σε υψηλότερες συγκεντρώσεις στην κεντρική λοβική περιοχή και απελευθερώνεται στην περίπτωση νέκρωσης στην περιοχή (centrolobular necrosis)^{36,38-39}.

Κερατίνη-18 (K18)

Είναι κυτοκερατίνη τύπου I των ενδιάμεσων νηματοειδών δομών, που εκφράζεται στους επιθηλιακούς ιστούς. Απελευθερώνεται παθητικά στη νέκρωση και τμήματά της στην απόπτωση λόγω διάτμησης από τις κασπάσες. Έχει συσχετιστεί με ιδιαίτερους τύπους κίρρωσης του ήπατος³⁶⁻³⁹.

MicroRNA-122 (miR-122)

Αποτελεί το 70% του συνολικού miRNA στο ήπαρ και σχετίζεται με το μεταβολισμό των ελευθέρων λιπαρών οξέων, στην ηπατίτιδα C και την ηπατική καρκινογένεση. Είναι κλινική ένδειξη φαρμακοεπαγόμενης ηπατοκυτταρικής νέκρωσης σε περιπτώσεις λήψης παρακεταμόλης^{36,38-39,41}.

α-Γλουταθειονική-S-τρανσφεράση (α-GST)

Είναι ενδοκυτταρικό ένζυμο με αποτοξικοποιητική δράση στη φάση II του μεταβολισμού, με έως 5% συγκέντρωση στα ηπατοκύτταρα. Είναι ευαίσθητος και εξειδικευμένος παράγοντας ηπατοτοξικότητας και οι μεταβολές των επιπέδων του είναι ενδεικτικές ηπατοκυτταρικής νέκρωσης⁴⁰.

Πρωτεΐνη F ορού

Πρόκειται για πρωτεΐνη του καταβολισμού της τυροσίνης, με ευαισθησία και εξειδίκευση στο ήπαρ και ένδειξη ηπατοκυτταρικής βλάβης και νέκρωσης⁴¹.

Αφυδρογονάση της σορβιτόλης (SDH)

Είναι κυτοσολικό ένζυμο που έχει ως ρόλο την οξειδοαναγωγή της σορβιτόλης, της φρουκτόζης και του συνενζύμου NADH. Η διαταραχή της ενεργότητάς του είναι ένδειξη προβληματικής ενεργειακής συμπεριφοράς του κυττάρου και συνεπώς θεωρείται ενδεικτική νεκρωτικών διαδικασιών⁴².

Καρβαμοϋλοτρανσφεράση της ορνιθίνης (OCT)

Πρόκειται για μιτοχονδριακή πρωτεΐνη που εκφράζεται πρωτίστως στο ήπαρ και ενδεικτικό παράγοντα βλαβών στα ηπατοκύτταρα^{36,38}.

Κεφάλαιο 2: Πορώδη ικριώματα ως *in vitro* μοντέλο ηπατικών εφαρμογών

2.1 Το περιβάλλον των ηπατοκυττάρων

Οι ηπατικοί ιστοί σε αντίθεση με άλλους επιθηλιακούς ιστούς του ανθρώπινου οργανισμού, περιέχουν μικρότερες ποσότητες υλικών εξωκυττάριας μήτρας. Η εξωκυττάρια μήτρα μεταξύ των ηπατοκυττάρων αποτελείται κυρίως από φαϊμπρονεκτίνη, κολλαγόνο τύπου I και μικροποσότητες από άλλους τύπους κολλαγόνου (III, IV, V και VI). Κύριος ομοιοστατικός μηχανισμός του ήπατος είναι η διαδικασία αναγέννησής του, κατά τη διάρκεια της οποίας συντίθεται λαμινίνη. Η διατήρηση των συνδέσεων των κυττάρων μεταξύ τους και με τη μήτρα είναι ο βασικότερος παράγοντας υστέρησης της διαφοροποίησης και διατήρησης των λειτουργιών των κυττάρων. Οι συνδέσεις (διακυτταρικές συνάψεις) των κυττάρων μπορούν να είναι συνάψεις πρόσδεσης, αποφρακτικές συνάψεις ή συνάψεις επικοινωνίας⁴³⁻⁴⁴.

2.1.1 Συνάψεις πρόσδεσης

Οι συνάψεις πρόσδεσης (adherens junctions - AJs) αποτελούν σημεία πρόσφυσης ή πάκτωσης (desmosomes - DMs) στοιχείων του κυτταροσκελετού, τόσο μεταξύ μεμονωμένων κυττάρων όσο και των κυττάρων με την εξωκυττάρια μήτρα, δημιουργώντας ένα ισχυρό διακυτταρικό δίκτυο. Η σύνδεση μεταξύ δύο γειτονικών κυττάρων έγκειται στα νημάτια του κυτταροσκελετού τους (μικρονημάτια ακτίνης και ενδιάμεσα νημάτια) που ενώνονται μέσω ενδοκυτταρικών συνδετικών πρωτεϊνών, οι οποίες με τη σειρά τους συνδέουν τα νημάτια σε διαμεμβρανικές συνδετικές πρωτεΐνες. Η σύνδεση των διαμεμβρανικών πρωτεϊνών στο μεσοκυττάριο διάστημα γίνεται μέσω πρόσθετων μεσοκυτταρικών πρωτεϊνών ή ιόντων ασβεστίου (Ca^{++}). Η παρουσία τους σε δομές ηπατοκυττάρων *in vitro* έχει φανεί να ενισχύει τη λειτουργικότητά τους, ειδικότερα σε ό,τι αφορά την έκκριση αλβουμίνης, την αποτοξικοποίηση της αμμωνίας, τη γλυκογενόλυση και την έκκριση χολής. Μαζί με τις συνάψεις επικοινωνίας επηρεάζουν την παραγωγή CYP3A4 και CYP2B6 κατά την παρουσία φαρμάκων. Στις συνάψεις αυτές βασικό δομικό στοιχείο είναι και η E-καντερίνη (E-cadherin), με γνωστή προστατευτική δράση έναντι παθογόνων παραγόντων.

Οι συνάψεις πρόσδεσης έχουν κοινή δομή και αποτελούνται από διαμεμβρανικά και κυττοσολικά συστατικά, με τα πρώτα να είναι κυρίως καντερίνες (με κύριες τις E-καντερίνη και N-καντερίνη) στα σημεία πρόσφυσης και δεσμοσωμικές καντερίνες (δεσμογλείνες και δεσμοκολλίνες) στα δεύτερα. Στο κυττοσολικό κέντρο οι καντερίνες συνδέονται με τον κυττοσκελετό μέσω διαφόρων συνδετικών πρωτεϊνών και συγκεκριμένα μέσω κατενινών στα σημεία πρόσφυσης και μέσω πρωτεϊνών Armadillo και δεσμοκολλινών στα δεσμοσώματα. Οι συνάψεις πρόσδεσης συμμετέχουν στην προσκόλληση των κυττάρων μεταξύ τους. Για την πραγμάτωση αυτού πρέπει να πληρούνται τρεις συνθήκες:

1. Τα διαμεμβρανικά συστατικά πρέπει να σχηματίζουν διμερή, τόσο σε cis-διαμόρφωση (στο εσωτερικό του κυττάρου) όσο και trans- (μεταξύ γειτονικών κυττάρων). Σε αυτή τη βάση, οι κλασσικές καντερίνες σχηματίζουν ομοδιμερή ενώ οι δεσμοσωμικές καντερίνες εντοπίζονται σε μορφή ετεροδιμερών.
2. Απαιτείται η παρουσία κατιόντων ασβεστίου καθώς είναι απαραίτητα για τη διατήρηση της ακεραιότητας της μορφής των καντερινών.
3. Πρέπει να αναπτυχθεί διακυτταρική σύνδεση μεταξύ των συνάψεων πρόσδεσης και του κυττοσκελετού, κάτι που συντελείται με σύνδεση των σημείων πρόσδεσης σε μικροϊνίδια (F-ακτίνης) και των δεσμοσωμάτων μέσω ενδιάμεσων ινιδίων (κυτοκερατίνες)^{43,45}.

2.1.2 Αποφρακτικές συνάψεις

Αποφρακτικές (ή στενές) συνάψεις λέγονται εκείνες οι οποίες δομούνται από κύτταρα των οποίων οι εξωτερικές μεμβράνες βρίσκονται πολύ κοντά, χωρίς να υπάρχει κάποια μεσοκυττάρια ουσία. Αποτελούν ένα φραγμό έναντι της διείσδυσης μορίων στον μεσοκυττάριο χώρο, περιορίζουν την πλευρική μετακίνηση εξειδικευμένων πρωτεϊνών των κυτταρικών μεμβρανών με αποτέλεσμα τον έλεγχο της περιοχής της επιφάνειας του κυττάρου που συμμετέχει στην απορρόφηση συστατικών και συμμετέχουν στην ενεργητική μεταφορά ουσιών (π.χ. ιόντα). Έχουν ως ρόλο την περικύκλωση των κυττάρων στο κύριο κορυφαίο μεμβρανικό μέρος από άλλα μέρη του περιβάλλοντός τους όπως το επιθήλιο και το ενδοθήλιο. Αποτελούνται από ένα εκτενές και διαρκώς διευρυνόμενο πλήθος πρωτεϊνών που κατηγοριοποιούνται κυρίως στις διαμεμβρανικές (οκλουδίνη, κλωντίνες, μόρια κομβικής προσκόλλησης - JAMs), τους υποδοχείς CAR (Coxsackie-Adenovirus Receptor) και τις κυτοσολικές πρωτεΐνες. Οι τελευταίες διακρίνονται σε εκείνες που φέρουν το τμήμα PDZ (postsynaptic density protein-95/disc large protein/zonula occludens-1 – PDZ) στην πρωτοταγή δομή τους, όπως οι πρωτεΐνες στενοσυνδέσμων (zonula occludens – ZO) και ελαττωματικής διαμέρισης (partitioning-defective proteins – PARs) και σε εκείνες που δεν το περιλαμβάνουν, όπως η συμπλεκίνη και η κινγκουλίνη^{43,45}.

2.1.3 Συνάψεις επικοινωνίας

Οι συνάψεις επικοινωνίας (ή χασματικές) επιτρέπουν τη διάχυση μορίων μεταξύ γειτονικών κυττάρων διευκολύνοντας την άμεση επικοινωνία μεταξύ τους και συμμετέχουν σε διαδικασίες πολλαπλασιασμού, αναγνώρισης και διαφοροποίησης. Κάθε τέτοια σύναψη αποτελείται από κυκλικές δομές που στο κέντρο έχουν πόρους. Οι σχηματισμοί αυτοί καλούνται συνδετήρες (connexons) και καθένας αποτελείται από εξαμερή διαμεμβρανικά πρωτεϊνικά μόρια (connexins) (κατά 90% Cx32, δηλαδή εκείνος με μοριακό βάρος 32 kDa) που διασχίζουν τις κυτταρικές μεμβράνες. Οι πόροι των γειτονικών κυττάρων είναι ευθυγραμμισμένοι, αποτελώντας ένα δίαυλο επικοινωνίας μεταξύ των κυττάρων. Οι δίαυλοι

αυτοί χρησιμοποιούνται για την παθητική μεταφορά μικρών μεταβολιτών (<1 kD) και υδρόφιλων στοιχείων, όπως η κυκλική μονοφωσφορική αδενοσίνη (cAMP), η τριφωσφορική ινοσιτόλη (IP3) και ιόντα. Ελέγχονται από την ενδοκυττάρια συγκέντρωση Ca^{++} , όπου με αύξησή της μειώνεται η διάμετρός τους. Η διαταραχή του ισοζυγίου των ιόντων ασβεστίου είναι χαρακτηριστικό γνώρισμα του κυτταρικού θανάτου και συνεπώς η προαναφερθείσα λειτουργία των αυλών λειτουργεί ως μηχανισμός απομόνωσης των κυττάρων που βρίσκονται σε φάση θανάτου. Για την περιγραφή της ρύθμισης της λειτουργίας των συνάψεων επικοινωνίας έχουν προταθεί δύο μοντέλα με κριτήριο τη χρονική τάξη μεγέθους. Το μοντέλο γρήγορου ελέγχου αναφέρεται σε χρόνους της τάξης των milliseconds και περιλαμβάνει τη ρύθμιση πλήθους βιοχημικών διεργασιών, όπως η φωσφορύλιωση των συνδετήρων. Αντίστοιχα, το μοντέλο του μακροχρόνιου ελέγχου αναφέρεται σε χρόνους της τάξης της ώρας και επικεντρώνεται στη ρύθμιση γονιδιακών διεργασιών^{43,45}.

2.1.4 Διακυτταρική επικοινωνία στο ήπαρ

Το ήπαρ αποτελείται από διάφορους τύπους κυττάρων και η αλληλεπίδραση τους οδηγεί στα ειδικευμένα λειτουργικά χαρακτηριστικά του. Η προσκόλληση των κυττάρων και η επικοινωνία μεταξύ τους είναι οι καθοριστικότεροι παράγοντες της διατήρησης της λειτουργικότητας των ηπατικών ιστών. Τα μη παρενγγυμικά ηπατικά κύτταρα βρίσκονται σε συνδετοκρινή (juxtacrine) ή παρακρινή (paracrine) επαφή μεταξύ τους και με τις άλλες ομάδες κυττάρων.

Σπάνια παρουσιάζονται σαφώς καθορισμένες διακυτταρικές συνδέσεις μεταξύ παρενγγυμικών κυττάρων, παρά το γεγονός ότι ορισμένα εξ αυτών εκφράζουν συναπτικές πρωτεΐνες. Ενδεικτικά, τα κύτταρα Kupffer, που πρακτικά πρόκειται για τα μακροφάγα του ήπατος, παράγουν β-κατενίνη και συνδετήρες (Cx-43, Cx-61, Cx-62) χωρίς να αναπτύσσονται παρά ταύτα συνάψεις πρόσδεσης ή επικοινωνίας. Τα ηπατικά ενδοθηλιακά κύτταρα βρίσκονται σε χαλαρή επαφή μεταξύ τους περιφερειακά ενώ μεταξύ των ηπατικών λεμφοκυττάρων (Pit cells) απουσιάζουν φυσικές αλληλεπιδράσεις. Τα αστεροειδή κύτταρα (που είναι υπεύθυνα για την αποθήκευση της βιταμίνης A) συνδέονται με συνάψεις πρόσδεσης και επικοινωνίας, χωρίς όμως να εμφανίζουν άλλα συναπτικά χαρακτηριστικά. Αντίθετα, τα ηπατοκύτταρα φέρουν πολλές συνάψεις και αυτό εξηγεί τη συνεργατική τους λειτουργία και τη σημασία της μεταξύ τους επαφής για τη διατήρηση της ηπατικής λειτουργικότητας. Οι συνάψεις επικοινωνίας αποτελούν περίπου το 3% της ηπατοκυτταρικής μεμβράνης, οι οποίες αποτελούνται κυρίως από Cx-32 και Cx-26 και στο ήπαρ απαντώνται τέσσερις τύποι συμπλόκων καντερίνης/κατενίνης (E-καντερίνη/β-κατενίνη, E-καντερίνη/α-κατενίνη, N-καντερίνη/β-κατενίνη/α-κατενίνη και N-καντερίνη/γ-κατενίνη/α-κατενίνη) με τα περισσότερα να βρίσκονται στα ηπατοκύτταρα^{43,45}.

2.3 *In vitro* μοντέλα και μέθοδοι πρόβλεψης της DILI

Καθώς η χρήση πειραματόζωων έχει μικρή προβλεπτική ικανότητα, υψηλό κόστος και εγείρει ζητήματα βιοηθικής, ένα πλήθος εργαστηριακών μοντέλων έχει αναπτυχθεί τα τελευταία χρόνια, με σκοπό την αύξηση της προβλεπτικής ικανότητας σχετικά με την ανάπτυξη DILI. Τα συστήματα αυτά βασίζονται στη χρήση βιολογικού υλικού που μπορεί να είναι από λίγα κύτταρα μέχρι τμήματα ιστών και οι τοξικολογικές μελέτες συνδυάζοντας και τις τεχνικές μεγάλου όγκου δεδομένων (High Throughput Assays) γίνονται σταδιακά περισσότερο αποτελεσματικές. Την αύξηση της διάρκειας ζωής των κυττάρων σε εργαστηριακές συνθήκες και την ανάπτυξη πιο σύνθετων δομών και αλληλεπιδράσεων μεταξύ τους έρχεται να πετύχει η ανάπτυξη περισσότερο σύνθετων μοντέλων, με χρήση βιολογικών ή μικροσυσκευών. Παραδείγματα τέτοιων εφαρμογών είναι η ανάπτυξη σφαιριδίων, δομών μεικτών ή παράλληλων καλλιέργειών διαφορετικών ειδών κυττάρων σε κατάλληλες διατάξεις και αντιδραστήρων με συνεχή ροή θρεπτικού, που προσομοιάζουν καλύτερα την *in vivo* κατάσταση.

Τα μοντέλα αυτά σε ορισμένες περιπτώσεις χρησιμοποιούν τμήματα ηπατικού ιστού από αντίστοιχες επεμβάσεις και πρωτογενή ανθρώπινα ηπατοκύτταρα (PHH), τα οποία αν και αποτελούν το βέλτιστο σύστημα εργασίας έχουν πολύ μικρή διάρκεια ζωής σε απλή καλλιέργεια και χάνουν σύντομα τη λειτουργικότητά τους. Για το λόγο αυτό, δημοφιλείς σε τέτοιες εφαρμογές είναι διάφορες κυτταρικές σειρές. Οι αθανατοποιημένες κυτταρικές σειρές HepG2, Huh7 και HepRG είναι πολύ ευκολότερες στη χρήση έναντι των πρωτογενών κυττάρων, δεν έχουν όμως ανάλογες λειτουργίες σε ό,τι αφορά στην έκφραση πολλών γονιδίων, την παρουσία ορισμένων ενζύμων και αρκετών υποδοχέων. Σημειώνεται πως ειδικά η σειρά HepRG είναι περισσότερο εξελιγμένη και φέρει επίπεδα CYP ενζύμων ανάλογα με εκείνα των πρωτογενών ηπατοκυττάρων. Τα (προερχόμενα από κύτταρα) ηπατικά βλαστοκύτταρα (iPS) αξιολογούνται σε ανάλογες εφαρμογές καθώς μπορούν να διαφοροποιηθούν σε διάφορα είδη κυττάρων, δεν μπορούν να παρουσιάσουν όμως φαινοτύπους ωρίμων ηπατοκυττάρων που έχουν καθοριστικό ρόλο στην ανάπτυξη τοξικότητας^{43,46-47}.

2.3.1 Η κυτταρική σειρά HepG2

Πρόκειται για αθανατοποιημένη κυτταρική σειρά, δηλαδή για πληθυσμό κυττάρων που λόγω μίας φέρουσας μετάλλαξης διατηρεί την ικανότητά του να πολλαπλασιάζεται χωρίς τη φυσιολογική έκπτωση αυτής της λειτουργίας λόγω γήρανσης. Για το λόγο αυτό, οι διάφορες κυτταρικές σειρές που έχουν δημιουργηθεί αποτελούν το βασικότερο εργαλείο στα πρώτα στάδια έρευνας μίας βιολογικής υπόθεσης. Η συγκεκριμένη σειρά είναι ανθρώπινη καρκινική σειρά και τα μητρικά κύτταρα που την αποτελούν έχουν προέλθει από βιοψία ήπατος ενός δεκαπεντάχρονου Καυκάσιου Αμερικανού με έντονα διαφοροποιημένη ηπατοκυτταρική

κακοήθεια. Τα κύτταρα της σειράς αυτής είναι επιθηλιακά από μορφολογική άποψη και εκκρίνουν ένα πλήθος σημαντικών πρωτεϊνών χαρακτηριστικών για τα ηπατοκύτταρα όπως η αλβουμίνη, η τρανσφερίνη, το ινιδιογόνο, η α2-μακρογλοβουλίνη, η α1-αντιτρυσίνη, η τρανσφερίνη και το πλασμινογόνο, ενώ ανταποκρίνονται στην επίδραση αυξητικών παραγόντων σε αυτά.

Τα κύτταρα HepG2 αποτελούν το περισσότερο χρησιμοποιούμενο *in vitro* μοντέλο ηπατικής τοξικότητας καθώς προσομοιάζει ικανοποιητικά τα υγιή πρωτογενή ηπατοκύτταρα και τη χαρακτηριστική πολικότητα και κυτταροσκελετική μορφολογία τους. Σε κατάλληλες συνθήκες καλλιέργειας, παρουσιάζουν έντονη και επαναλήψιμη μορφολογική και λειτουργική διαφοροποίηση και η κυτταροσκελετική δομή τους είναι ανάλογη εκείνης των πρωτογενών ηπατοκυττάρων με κορυφαίες και πλαγιοβασικές περιοχές, ανάλογη με εκείνη της κατάστασης *in vivo*. Τα παραπάνω τα καθιστούν κατάλληλα για τη μελέτη του ενδοκυτταρικού ισοζυγίου των πρωτεϊνών και λιπιδίων των χοληφόρων δικτύων και των επιθηλιακών μεμβρανών των ηπατοκυττάρων, γεγονός σημαντικό για τη μελέτη διαφόρων ασθενειών και επιδράσεων παραγόντων.

Παρά τα παραπάνω ευνοϊκά χαρακτηριστικά που τα καθιστούν χρήσιμα για εργαστηριακές εφαρμογές, παρουσιάζουν και σημαντικούς περιορισμούς στη χρήση τους. Η πολύ περιορισμένη λειτουργική έκφραση πρακτικά του συνόλου των κυττοχρωμάτων P450 και άλλων ενδοκυτταρικών πρωτεϊνών των ηπατοκυττάρων περιορίζει την αποτελεσματική πρόβλεψη σε μοντέλα τοξικότητας και τις πηγές πειραματικών ενδείξεων^{43,48}.

2.3.2 Ο ρόλος των συνάψεων στα *in vitro* μοντέλα τοξικότητας ήπατος

Η απόδοση των συνδέσεων μεταξύ των κυττάρων *in vitro* είναι βασικό κριτήριο της αποτελεσματικότητας ενός μοντέλου αξιολόγησης των ηπατοτοξικών επιδράσεων. Οι ξενοβιοτικοί παράγοντες συνήθως διαταράσσουν τις ηπατικές λειτουργίες μέσω επίδρασης στις διακυτταρικές συνάψεις. Συγκεκριμένα, υποβάθμιση των συναπτικών διαμορφώσεων οδηγεί σε οξεία ηπατική βλάβη και η μακροχρόνια έκθεση σε ηπατοτοξικούς παράγοντες αναστέλλει τις συνάψεις αυτές με αποτέλεσμα την πρόκληση χρόνιας ηπατικής νόσου, ίνωσης, κίρρωσης ή ηπατίτιδας. Στο ήπαρ, τα ηπατοκύτταρα βρίσκονται σε επαφή με πλήθος πρωτεϊνών της εξωκυττάριας μήτρας (ECM) όπως διάφοροι τύποι κολλαγόνου, γλυκοπρωτεΐνες, πρωτεογλυκάνες και γλυκοαμινογλυκάνες. Αυτές οι ουσίες ελέγχουν την ηπατοκυτταρική ομοίωση μέσω του καθοδηγούμενου από την ιντεγκρίνη μονοπατιού σηματοδότησης. Γίνεται αντιληπτό, πως η ανάπτυξη περιβαλλόντων καλλιέργειας ηπατοκυττάρων που περιέχουν αυτές τις ουσίες μπορεί να συμβάλει στη διατήρηση του *in vivo* φαινοτύπου, καθώς η παρουσία ECM πρωτεϊνών σε βιοϋλικά καλλιέργειας προάγει την ηπατοειδική λειτουργικότητα και ενισχύει το σχηματισμό συνάψεων.

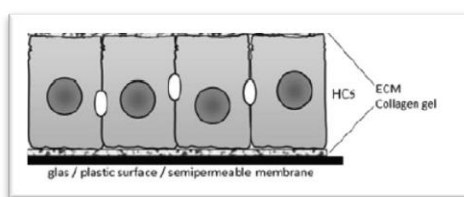
Οι ουσίες που προαναφέρθηκαν έχει τεκμηριωθεί πως ενισχύουν την έκφραση πρωτεϊνών συνδετήρων και επικοινωνιακών συνάψεων. Η καλλιέργεια των κυττάρων σε στρώμα από αυτές τις πρωτεΐνες αύξησε τη διάρκεια ζωής των κυττάρων από τρεις ημέρες σε μόλις πέντε. Παρά ταύτα, η προσθήκη και δεύτερου στρώματος ECM πρωτεϊνών στην καλλιέργεια (με τα κύτταρα να βρίσκονται μεταξύ των δύο στρωμάτων – «sandwich») ή η ακινητοποίησή τους σε γέλες κολλαγόνου επιτρέπει την επιβίωση και διατήρηση λειτουργιών των κυττάρων όπως η έκκριση αλβουμίνης και η βιομετατροπή ξενοβιοτικών παραγόντων τουλάχιστον για δύο μήνες. Η αυξημένη διάρκεια ζωής και λειτουργικότητα οφείλονται στη διατήρηση *in vivo* χαρακτηριστικών που σχετίζονται με τη μορφολογία των κυττάρων, όπως οι προαναφερθείσες βασικές μορφές συνάψεων^{43,45,47}.

2.4 3D ηπατικά μοντέλα

Σε *in vivo* συνθήκες, τα κύτταρα έχουν τρισδιάστατη μορφολογία και οργάνωση και όσο καλύτερα προσομοιαστεί αυτή η συνθήκη εργαστηριακά τόσο περισσότερο διατηρούνται τα γνωρίσματα και οι λειτουργίες που αυτά φέρουν. Συγκεκριμένα, τα ηπατοκύτταρα επηρεάζονται ιδιαίτερα από τις συνθήκες καλλιέργειας καθώς είναι πολυγωνικά κύτταρα και φορτισμένα έτσι ώστε να παρουσιάζουν τουλάχιστον δύο πλαγιοβασικές και δύο κορυφαίες περιοχές στην πλασματική τους μεμβράνη. Αυτά λειτουργούν καθοριστικά για την αλληλεπίδρασή τους με άλλα είδη κυττάρων (π.χ. επιθηλιακά) και τη δομή των ιστών που συμμετέχουν και η διατήρησή τους επηρεάζει την αποτελεσματικότητα των εργαστηριακών ελέγχων τοξικότητας. Σε συνθήκες απλής μονοστρωματικής καλλιέργειας, τα ηπατοκύτταρα διαφοροποιούνται άμεσα και χάνουν πολλές από τις φυσιολογικές λειτουργίες τους, όπως την ικανότητα αποτοξικοποίησης (ένζυμα φάσεων I και II) και την παραγωγή πρωτεϊνών (όπως αλβουμίνη). Σημαντικός παράγοντας που ελέγχει τη διατήρηση των λειτουργιών των ηπατοκυττάρων είναι και η εξωκυττάρια μήτρα (ECM). Οι πρωτεΐνες της μήτρας συντελούν στην πάκτωση των κυττάρων και προάγουν τα ενδοκυτταρικά σηματοδοτικά μονοπάτια που επιτρέπουν στα κύτταρα να αλληλεπιδρούν με το περιβάλλον τους και να προσαρμόζονται σε αυτό.

Στο παρελθόν, τα περισσότερα μοντέλα καλλιέργειας ηπατοκυττάρων ήταν μονοστρωματικά, σε επιφάνειες με επιστρώσεις από πρωτεΐνες εξωκυττάριας μήτρας. Τα μοντέλα αυτά αδυνατούσαν να προσομοιάσουν τα βασικά βιολογικά γνωρίσματα των ηπατικών ιστών και να έχουν επαναλήψιμα αποτελέσματα. Ο λόγος για αυτό είναι πως η δισδιάστατη καλλιέργεια επιβάλλει στα κύτταρα να τροποποιήσουν την εξωτερική δομή τους προς μια περισσότερο επίπεδη, κάτι που λόγω της ανάλογης μεταβολής της πολικότητάς τους οδηγεί σε απώλεια καθοριστικών υποδοχέων της πλασματικής μεμβράνης. Συνεπώς τα πρωτογενή κύτταρα στις συνθήκες αυτές διατηρούνταν λειτουργικά για λίγες μόνο μέρες (έως 3) και μετέβαιναν άμεσα σε διαφοροποιημένους φαινοτύπους.

Σήμερα, η συχνότερα εφαρμοζόμενη μέθοδος καλλιέργειας ηπατοκυττάρων είναι η λεγόμενη “sandwich”, όπου τα κύτταρα καλλιεργούνται μεταξύ πορωδών στρωμάτων από πρωτεΐνες εξωκυττάριας μήτρας. Η διαμόρφωση αυτή έχει ως αποτέλεσμα τη διατήρηση της κυτταροσκελετικής διαμόρφωσης και της λειτουργικότητας των κυττάρων, με αυξημένη διάρκεια ζωής, αυξημένα επίπεδα ενζύμων και καλύτερα δίκτυα μεταφοράς χολής. Επιτυγχάνονται υψηλότερα επίπεδα έκφρασης γονιδίων σχετικών με τις ηπατικές λειτουργίες όπως τα HNF4α AKR1C1, EPHX1, LTB4DH, υψηλά επίπεδα αλβουμίνης και έκκρισης γλυκόζης και άλλων παραγόντων όπως τα ένζυμα CYP1A1, CYP1A2, CYP3A4, CYP2B1, CYP2B2, CYP2B6, ECOD, UGT, MRP2 και οι μεταφορικές πρωτεΐνες OATPs, MDR2 και BSEP.



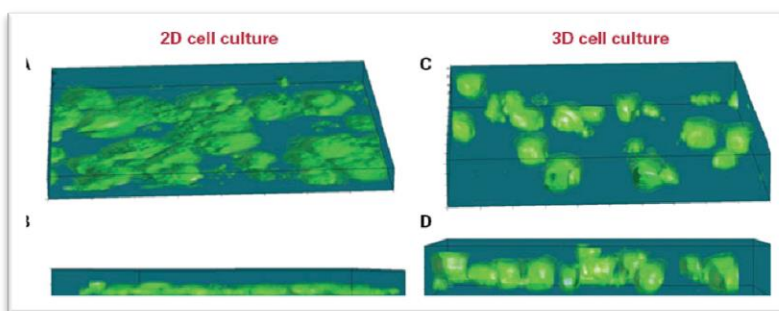
Εικόνα 4 Καλλιέργεια κυττάρων ανάμεσα σε στρώματα πρωτεϊνών εξωκυττάριας μήτρας (Godoy et al., 2015)

Η αναζήτηση για περισσότερο αξιόπιστα και μεγαλύτερης διάρκειας ζωής συστήματα καλλιέργειας ωθεί στην ανάπτυξη τρισδιάστατων μοντέλων για πλήθος εφαρμογών, από το σχεδιασμό νέων φαρμακευτικών μορίων μέχρι τους συμβατικούς ελέγχους τοξικότητας. Καθώς τα κύτταρα στα θηλαστικά έχουν καθορισμένες θέσεις και προσανατολισμό σε σύνθετες δομές και δίκτυα, με διαρκή παροχή θρεπτικών υλών και οξυγόνου, η διατήρησή τους *in vitro* σε 3D συνθήκες παραμένει πρόκληση. Οι τρεις βασικές μορφές 3D μοντέλων καλλιέργειας αναλύονται παρακάτω^{43,46-47}.

2.4.1 Διάκριση 2D και 3D

Τα κύτταρα σε *in vivo* περιβάλλον έχουν τρισδιάστατη διαμόρφωση τόσο από άποψη μορφολογικών χαρακτηριστικών όσο και οργάνωσης. Η αποδιαφοροποίηση (dedifferentiation) των ηπατοκυττάρων σε μονοστρωματική κυτταρική καλλιέργεια (2D) είναι άμεση και συνεπάγεται την έκπτωση βασικών ηπατικών λειτουργιών όπως η αποτοξικοποίηση, λόγω μειωμένης έκφρασης των ενζύμων των φάσεων I και II ή την παραγωγή πρωτεϊνών του πλάσματος όπως η αλβουμίνη. Όπως τεκμηριώθηκε προηγουμένως, η μορφολογία και η πολικότητα των ηπατοκυττάρων καθορίζεται από τις συνάψεις που θα μπορέσουν να αναπτύξουν. Η διατήρηση πλήρως λειτουργικών ηπατοκυττάρων είναι καθοριστικής σημασίας για την ανάπτυξη αποτελεσματικών συστημάτων πρόβλεψης τοξικότητας, για την ανάπτυξη ιστών και την μεταμόσχευσή τους σε ασθενείς και την εδραίωση βιοσυμβατών συσκευών ήπατος.

Η αύξηση της διατηρησιμότητας των ηπατοκυττάρων αρχικά βασίστηκε στην ενίσχυση των θρεπτικών μέσων με κυτοκίνες, διμεθυλοσουλφοξείδιο (Dimethylsulfoxide - DMSO) και ενισχυτικούς παράγοντες. Ιδιαίτερη βάση δόθηκε στο περιβάλλον της εξωκυττάριας μήτρας. Παλαιότερα, τα περισσότερα ηπατοκυτταρικά μοντέλα δομούνταν ως μονοστρωματικές καλλιέργειες σε επιφάνειες που είχαν επιστρωθεί με πρωτεΐνες της εξωκυττάριας μήτρας. Παρά τα σημαντικά πλεονεκτήματα αυτών των εφαρμογών, σύντομα διαπιστώθηκε η αδυναμία τους να προσομοιώσουν αποτελεσματικά και να διατηρήσουν βασικές ηπατικές διαδικασίες *in vitro*. Η δισδιάστατη διαμόρφωση στην οποία οδηγούσαν αυτά τα μοντέλα επέβαλε στα ηπατοκύτταρα να μεταβάλλουν τον κυτταροσκελετό τους, λαμβάνοντας μία περισσότερο λειασμένη εξωτερική διαμόρφωση. Αυτό περιορίζει τις αλληλεπιδράσεις των κυττάρων μεταξύ τους όσο και με την εξωκυττάρια μήτρα (επίστρωση) με συνέπεια τη μείωση της πολικότητας των κυττάρων, τη μείωση του σχηματισμού χοληφόρων οδών και την απώλεια της λειτουργίας σημαντικών σηματοδοτικών μονοπατιών, καθοριστικών για την ορθή ηπατική λειτουργία. Όλα τα παραπάνω, καθιστούσαν δυνατή τη διατήρηση των ηπατοκυττάρων σε συνθήκες καλλιέργειας μόλις για μερικές μέρες, με άμεση έκπτωση των λειτουργιών τους.



Εικόνα 5 Αναπαράσταση κυτταροσκελετικής διαμόρφωσης σε μονοστρωματικό (αριστερά) και τρισδιάστατο (δεξιά) περιβάλλον καλλιέργειας (<http://reinnervate.com/alvetex/about-alvetex/what-is-alvetex>)

Σήμερα, βασικότερη εφαρμοζόμενη τεχνική καλλιέργειας είναι εκείνη όπου τα κύτταρα καλλιεργούνται ανάμεσα σε δύο επίπεδα στρώματα από κάποια πρωτεΐνη της εξωκυττάριας μήτρας ή μίγμα αυτών (όπως το εμπορικό προϊόν Matrigel). Παρά το ότι πρόκειται τυπικά για δισδιάστατη δομή καλλιέργειας, η ύπαρξη των δύο στρωμάτων επιτρέπει στα ηπατοκύτταρα να διατηρήσουν σε μεγαλύτερο βαθμό τα αρχικά κυτταροσκελετικά χαρακτηριστικά τους και τον προσανατολισμό τους, με αποτέλεσμα την αύξηση της διάρκειας ζωής τους και την καθυστέρηση της αποδιαφοροποίησης. Τα παραπάνω έχουν επιπλέον θετική συνεισφορά στην ανάπτυξη χοληφόρων οδών και διατήρηση CYP ενζύμων.

Όπως προαναφέρθηκε, τα τρισδιάστατα μοντέλα (3D) βασίζονται στην ανάπτυξη των κυττάρων και στους τρεις άξονες του χώρου και πρόκειται κυρίως για υδρογέλες, συνθετικά

ικριώματα και σφαιρίδια. Η διάκριση μεταξύ 2D και 3D διαμόρφωσης βασίζεται στις δομές που αναπτύσσουν τα κύτταρα, ανάλογα με τις συνθήκες καλλιέργειας στις οποίες αυτά εκτίθενται. Ανεξάρτητα από άλλα μέρη που μπορεί να αποτελέσουν ένα *in vitro* κυτταρικό περιβάλλον (όπως πρωτεΐνες της εξωκυττάριας μήτρας), κριτήριο για τη διάκριση των καλλιιεργειών σε 2D και 3D είναι το αν στις συνθήκες αυτές τα κύτταρα μπορούν να σχηματίσουν ενιαίες πολυστρωματικές δομές. Στην περίπτωση που κύτταρα βρεθούν σε ένα περιβάλλον που αδυνατούν να αναπτύξουν τέτοιες δομές, τότε άμεσα χάνουν τη χαρακτηριστική εξωτερική δομή τους που καθορίζει την ανάπτυξη των συνάψεων με γειτονικά κύτταρα, προκαλώντας άμεση αποδιαφοροποίησή τους και μείωση της διάρκειας ζωής τους. Αν όμως τα κύτταρα βρεθούν σε ένα περιβάλλον που ευνοεί τη δόμηση στρωμάτων κυττάρων, εκείνα άμεσα αξιοποιούν τα μορφολογικά χαρακτηριστικά της επιφάνειάς τους για τη διασύνδεσή τους με γειτονικά κύτταρα, με αποτέλεσμα την εδραίωση συνάψεων μεταξύ τους και διατήρηση των ηπατοειδικών λειτουργιών⁴³⁻⁴⁸.

2.4.2 Ικριώματα και υδρογέλες

Πρόκειται για φυσικά ή συνθετικά πολυμερή που αξιοποιούνται για την κατασκευή πορωδών ικριωμάτων, με την καλλιέργεια κυττάρων στο εσωτερικό τους να έχει σημαντικά πλεονεκτήματα όπως αυξημένη διάρκεια ζωής, καθυστέρηση της αποδιαφοροποίησης και υψηλά επίπεδα σύνθεσης ενζύμων και προϊόντων. Η τελική μορφή των δημιουργηθέντων υλικών μπορεί να είναι επίπεδη, σφαιρική ή ινώδης ώστε να προσομοιάζει θεωρητικά καλύτερα την *in vivo* διαμόρφωση. Ως πολυμερικά υλικά χρησιμοποιούνται τύποι κολλαγόνου, ζελατίνη, χιτοζάνη, το πολύ (γαλακτικό-γλυκολικό) οξύ (poly(lactic-co-glycolic acid – PLGA) και το πολυμεθακρυλικό μεθύλιο (poly(methyl methacrylate – PMMA) και μίγματά τους με πρωτεΐνες και άλλους ενισχυτικούς για τα κύτταρα παράγοντες.

Τα υλικά αυτά έχουν χρησιμοποιηθεί ευρέως για τη δημιουργία ικριωμάτων, δομών ανοιχτού πορώδους με άνοιγμα πόρων τέτοιο ώστε να επιτρέπεται η διέλευση των κυττάρων στο εσωτερικό του υλικού και η παραμονή και ανάπτυξή τους σε αυτό. Έχουν χρησιμοποιηθεί κυρίως για εφαρμογές αναγεννητικής ιατρικής και με πολλές επιτυχείς εφαρμογές *in vivo*. Τα περισσότερα εξ αυτών παράγονται με ξήρανση με κατάψυξη, με κρυστάλλωση και εξάχνωση του διαλύτη ενώ δημοφιλείς τεχνικές είναι και η συγκόλληση ινών, η έκπλυση σωματιδίων, η υγρή χύτευση και η διαμόρφωση μέσω αφρού. Ένα ικρίωμα κατάλληλο για βιολογικές εφαρμογές πρέπει να ισορροπεί μεταξύ των καλύτερων μηχανικών ιδιοτήτων μίας λιγότερο πορώδους δομής και της απαίτησης για αρκετά μεγάλους πόρους ώστε να φτάνουν στα κύτταρα τα θρεπτικά υλικά και οι διάφοροι δραστικοί παράγοντες. Ακόμα, ο ρυθμός που τα ικριώματα αποικοδομούνται από τα κύτταρα πρέπει να είναι όσο μικρότερος γίνεται ώστε να υπάρχει αρκετό χρονικό διάστημα για τα κύτταρα να δημιουργήσουν δομές και να συντονίσουν τις βιοχημικές τους διαδικασίες.

Οι υδρογέλες που δημιουργούνται από τέτοια πολυμερικά υλικά είναι κυρίως διασπορές πολυμερικών αλυσίδων σε υδατική φάση και δομούν δίκτυα στο εσωτερικό των οποίων ακινητοποιούνται τα κύτταρα. Η ικανότητά τους να απορροφούν νερό έγκειται στις πλευρικές ομάδες των πολυμερικών αλυσίδων ενώ η παρεμπόδιση της διάλυσης της δομής βασίζεται στην ανάπτυξη σταυροδεσμών μεταξύ τους. Κατά τον τρόπο αυτό επιτυγχάνεται η προστασία των κυττάρων από μηχανικές καταπονήσεις και η ευκολότερη διαχείριση τους για εργαστηριακές εφαρμογές. Μειονεκτήματα των υδρογελών είναι οι χαμηλοί συντελεστές μεταφοράς θρεπτικών και ξενοβιοτικών ουσιών στα κύτταρα καθώς και η δυσκολία απομόνωσης των κυττάρων.

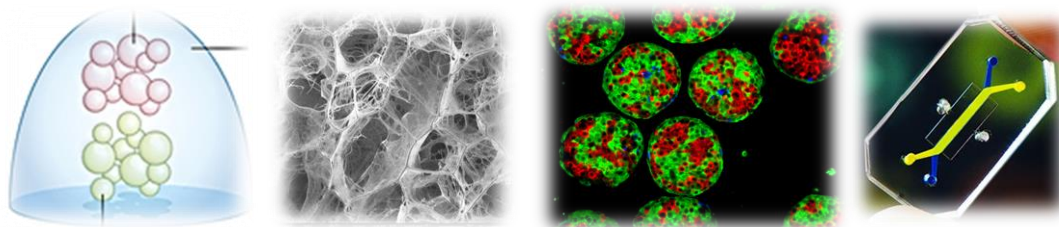
2.4.3 Σφαιρίδια

Πέρα από τις προαναφερθείσες μορφές σφαιριδίων που βασίζονται σε υδρογέλες ή ικρίωματα για την απόκτηση της 3D διαμόρφωσης, τα ηπατοκύτταρα μπορούν ενεργητικά να ανασυνταχθούν σε σφαιρικές δομές υπό κατάλληλες συνθήκες. Η μέθοδος βασίζεται στη διαπίστωση πως μεμονωμένα πρωτογενή κύτταρα, μικροτμήματα ιστών και κύτταρα από κυτταρικές σειρές είναι ικανά να διαμορφώσουν τρισδιάστατες δομές αν παρεμποδιστεί η προσκόλλησή τους στον φορέα καλλιέργειας. Το πλεονέκτημα αυτής της μεθόδου είναι πως τα σφαιρίδια κυττάρων διατηρούν τις περισσότερες από τις *in vivo* αλληλεπιδράσεις μεταξύ των κυττάρων και μεταξύ τους και των πρωτεϊνών της μήτρας, καθώς τα κύτταρα είναι πολύ κοντά. Τα σφαιρίδια δημιουργούνται με παραμονή σε φορείς όπου εμποδίζεται η προσκόλληση των κυττάρων σε στατικές συνθήκες, με ανακίνηση σε αναδευόμενες καλλιέργειες και βιοαντιδραστήρες και με τη μέθοδο της «κρεμάμενης σταγόνας» (hanging drop). Ειδικά η τελευταία, έχει μικρότερη διακύμανση στα μεγέθη των τελικών σφαιριδίων και είναι η περισσότερο επαναλήψιμη. Έτσι, συγκεκριμένα μοντέλα που έχουν αναπτυχθεί τόσο με πρωτογενή κύτταρα (ανθρώπου, ποντικού, αρουραίου) όσο και με κυτταρικές σειρές όπως HepG2, HepRG, HuH7 εμφανίζουν φυσιολογικά κυτταροσκελετικά χαρακτηριστικά, υψηλότερους μεταβολικούς ρυθμούς και αργότερη διαφοροποίηση⁴³⁻⁵⁰.

2.4.4 Μικρορροϊκές συσκευές

Η τεχνικά εύκολη παραγωγή μικροδιατάξεων από βιοπολυμερή αποτελεί σήμερα βασικό λόγω διάδοσης των μικρορροϊκών συστημάτων, τα οποία έχουν φέρει μεγάλη πρόοδο στις καλλιέργειες κυττάρων και στις εφαρμογές τοξικότητας. Η δυνατότητα για διαρκή παροχή θρεπτικού υλικού στα κύτταρα αυξάνει τη διάρκεια ζωής τους, επιτρέπει τη διατήρηση των ορμονών και των ξενοβιοτικών παραγόντων σε χαμηλά και σταθερά επίπεδα και αυξάνει τη μεταβολική δραστηριότητα των ηπατοκυττάρων. Η ροή θρεπτικού εξασφαλίζει και καλύτερη μεταφορά οξυγόνου στα κύτταρα που αποτελεί στις συμβατικές καλλιέργειες βασικό παράγοντα απόκλισης από την *in vivo* κατάσταση. Επιπρόσθετο πλεονέκτημα αυτής της τεχνικής είναι η δυνατότητα για *in vitro* αναπαράσταση ενός συγκεκριμένου τμήματος ενός

οργάνου, σε κλίμακα και συνθήκες ροής όμοιες με τις πραγματικές. Ακόμα, σε τέτοια συστήματα γίνεται εύκολα συνδυασμός πολλών διαφορετικών τύπων κυττάρων, τα οποία μπορούν να επανασυλλεγούν χωρίς τους περιορισμούς των υδρογελών και ικριωμάτων⁴³⁻⁵⁰.



Εικόνα 6 (Από αριστερά προς τα δεξιά) Γέλες, πορώδη ικριώματα, σφαιρίδια, μικροροϊκές συσκευές (Millipor™, Sashai Yoshiki 2013, nanalyze.com)

2.5 Σχεδιασμός ικριωμάτων

Οι κατάλληλες μηχανικές ιδιότητες ενός ικριώματος ισοσταθμίζονται από την ανάγκη για βιοσταθερότητα της μήτρας του υλικού, που εξαρτάται από παράγοντες όπως η τάση, η ελαστικότητα και η ρόφηση μέσω της εξωτερικής επιφάνειάς του και της χημικής του αποσύνθεσης. Όπως προαναφέρθηκε, η διατήρηση ή βιομίμηση των δυνάμεων στήριξης από συνδέσεις ακτίνης – μυοσίνης που αντισταθμίζουν τις μηχανικές καταπονήσεις που δέχονται τα κύτταρα και η διαίλιση στο εσωτερικό του κυττοσκελετού είναι βασικοί παράγοντες για τη λειτουργία του βιοϋλικού. Έχουν καθοριστική σημασία για την εξωτερική διαμόρφωση των κυττάρων και λειτουργίες όπως ο πολλαπλασιασμός, η διαφοροποίηση, η κινητικότητα και η μετανάστευσή τους. Συνεπώς, η αντιστοίχιση των μηχανικών ιδιοτήτων ενός ικριώματος με εκείνες της φυσικής εξωκυττάριας μήτρας εξασφαλίζει τη βέλτιστη ανάπτυξη ενός ιστού ή διατήρηση μίας καλλιέργειας κυττάρων. Οι μηχανικές ιδιότητες (αντοχή, σκληρότητα, μέτρο ελαστικότητας και ολκιμότητα) ενός ικριώματος καθορίζονται από τη δομή του (μακροδομή, μικροδομή και νανοδομή) και τις ιδιότητες του υλικού. Πέραν της ξήρανσης με κατάψυξη που θα αναλυθεί περισσότερο παρακάτω, άλλες τεχνικές δημιουργίας ικριωμάτων για βιολογικές εφαρμογές είναι η διήθηση άλατος, η τεχνική υδρογελών, η προσθήκη σωματιδίων βιοανθρακικού αμμωνίου και χλωροφορμίου με θερμική επεξεργασία του μίγματος του πολυμερούς και η τρισδιάστατη εκτύπωση. Ειδικά για εφαρμογές της τάξης των μικρομέτρων ή νανομέτρων εφαρμόζονται σήμερα και άλλες τεχνικές, όπως η τεχνική της ηλεκτροστατικής ινοποίησης (electrospinning), μέθοδοι διαχωρισμού φάσεων αιωρημάτων και η λιθογραφία.

Κρίσιμη παράμετρος σχεδιασμού των πορώδων ικριωμάτων θεωρείται το μέγεθος των πόρων, με απαραίτητη προϋπόθεση αυτοί να είναι ανοιχτοί, ώστε να είναι δυνατή η ανάπτυξη κυτταρικών δομών επί αυτού και ο σχηματισμός ιστού. Η παράμετρος αυτή καθορίζει τη

διαπερατότητα του υλικού σε θρεπτικά μέσα, ξеноβιοτικούς παράγοντες και κυτταρικά προϊόντα. Το κατάλληλο μέγεθος πόρων αποτελεί συγκερασμό της ανάγκης για αρκετά μεγάλους πόρους ώστε να μπορούν τα κύτταρα να εισέλθουν στο υλικό και να φτάσουν σε όλο τον όγκο του και παράλληλα να διατηρούνται αρκετά μικροί ώστε να υπάρχει αρκετή πυκνότητα υποδοχέων για κυτταρική προσκόλληση στο υλικό. Συνεπώς, το βέλτιστο μέγεθος των πόρων ενός ικρίωματος προκύπτει από το είδος των κυττάρων που θα φιλοξενήσει και τα χαρακτηριστικά της εφαρμογής στην οποία θα χρησιμοποιηθεί. Ενδεικτικά, ενδοθηλιακά κύτταρα αναπτύσσονται βέλτιστα σε υλικά με άνοιγμα πόρων 20 – 80 μm ενώ αντίστοιχα οι οστεοβλάστες απαιτούν πόρους μεγαλύτερους από 100 μm για το σχηματισμό οστικού ιστού^{43,47-48,51}.

2.5.1 Βιβλιοθήκη υλικών

Ως βιοϋλικά για εφαρμογές ιστομηχανικής χρησιμοποιούνται πολλές βασικές δομικές πρωτεΐνες του ανθρώπινου οργανισμού όπως οι διάφοροι τύποι κολλαγόνου και γλυκοαμινογλυκάνες. Οι γλυκοαμινογλυκάνες είναι αρνητικά φορτισμένοι πολυσακχαρίτες και αποτελούν φυσικά συστατικά της εξωκυττάριας μήτρας. Εντοπίζονται στους ηπατικούς ιστούς όπου επηρεάζουν τον πολλαπλασιασμό και διαφοροποίηση των ηπατοκυττάρων αλληλεπιδρώντας με άλλα συστατικά της μήτρας και δεσμεύοντας αυξητικούς παράγοντες. Ο ρόλος τους ως προσθέτου σε διάφορους τύπους βιοϋλικών και ειδικότερα σε ηπατικές εφαρμογές έχει εκτιμηθεί θετικά. Παρακάτω αναφέρονται τα βασικότερα χαρακτηριστικά ορισμένων πρωτεϊνών και γλυκοαμινογλυκάνων με πλήθος εφαρμογών, που αξιοποιήθηκαν και στο πλαίσιο της παρούσας διπλωματικής εργασίας^{43-44,51,a}.

Κολλαγόνο τύπου I

Είναι ο βασικότερος τύπος κολλαγόνου στο ανθρώπινο σώμα και το κυριότερο αδιάλυτο συστατικό της εξωκυττάριας μήτρας και των συνδετικών ιστών. Εντοπίζεται στο δέρμα, τα όργανα, τα οστά, τα αγγεία και τον ουλώδη ιστό. Αποτελείται από τρεις περιτυλισσόμενες υπομονάδες, αποτελούμενες από 1050 αμινοξέα έκαστος, δημιουργώντας τριπλή έλικα. Σχηματίζει μακριές, ηωσινοφιλικές ίνες, με κάθε μία να έχει μήκος περίπου 300 nm και διάμετρο περίπου 1,5 nm, που δομούν συσσωματώματα με τελική διάμετρο 50-200 nm και οι οποίες με τη λαμινίνη αποτελούν τα βασικά συστατικά των παρεγχυμικών δομών. Τα συστατικά της μήτρας έχουν καθοριστικό ρόλο για τα ηπατικά προγεννητικά κύτταρα, με το κολλαγόνο I να προωθεί τη διαφοροποίηση των ηπατικών βλαστοκυττάρων και σε ορισμένες συνθήκες καλλιέργειας να επηρεάζει την αντοχή των ηπατοκυττάρων έναντι αποπτωτικών διαδικασιών (απόπτωση επαγόμενη από TGF-b).

Η βιοσύνθεση του κολλαγόνου είναι ανάλογη των υπολοίπων εκκρινόμενων πρωτεϊνών. Μεγαλύτερου μήκους πρόδρομα μόρια (προκολλαγόνα) τροποποιούνται στο αδρό

ενδοπλασματικό δίκτυο και στο σύμπλεγμα Golgi, μέσω διεργασιών γλυκοσυλίωσης, προσθήκης μονοσακχαρίτων (γλυκόζη, γαλακτόζη) και ολιγοσακχαρίτων και υδροξυλίωσης μορίων προλίνης και λυσίνης στο μέσω των δημιουργούμενων αλυσίδων. Τα παραπάνω έχουν ως αποτέλεσμα τη δημιουργία της τριπλής έλικας μέσω διάταξης και ανάπτυξης δισουλφιδικών δεσμών μεταξύ των αλυσίδων. Το προκολλαγόνο στη συνέχεια εκκρίνεται στον εξωκυττάριο χώρο όπου μετατρέπεται σε (τροπο)κολλαγόνο υπό την επίδραση εξειδικευμένων πεπτιδασών^{43-44,51,a}.

Matrigel

Το εμπορικό προϊόν Matrigel προσομοιάζει το σύνθετο εξωκυτταρικό περιβάλλον που απαντάται σε διάφορους τύπους ιστών και χρησιμοποιείται ευρέως ως υλικό σε καλλιέργειες κυττάρων. Η ικανότητα του υλικού να ενισχύει σύνθετες κυτταρικές λειτουργίες έγκειται στην ετερογενή του σύσταση, καθώς αποτελείται από δομικές πρωτεΐνες (λαμινίνη, κολλαγόνο, εντακτίνη, θεικές ηπατικές πρωτεογλυκάνες), αλληλουχίες συγκολλητικών πεπτιδίων και αυξητικούς παράγοντες (TGF- β , EGF). Το σύνθετο υλικό προσφέρει κατάλληλες δομές για την ανάπτυξη των κυττάρων, καθυστερεί τη διαφοροποίησή τους και ενισχύει τον πολλαπλασιασμό τους, όταν αυτός είναι δυνατός *in vitro*^{43,52}.

Φαϊμπρονεκτίνη

Η φαϊμπρονεκτίνη είναι μία διμερής γλυκοπρωτεΐνη της εξωκυττάριας μήτρας και προσδέεται σε πρωτεΐνες σύνδεσης μεμβρανών (ιντεγκρίνες) ή σε άλλα συστατικά της όπως το κολλαγόνο, η φαϊμπρίνη και οι θεικές πρωτεογλυκάνες της ηπαρίνης. Η φαϊμπρονεκτίνη και το κολλαγόνο τύπου I κυριαρχούν στους παρεγχυμικούς ιστούς, με μικρότερες ποσότητες κολλαγόνου τύπου III. Έχει βασικό ρόλο στην προσκόλληση των κυττάρων, στην ανάπτυξή τους, στη μετανάστευση και διαφοροποίησή τους. Στους σπονδυλωτούς οργανισμούς εντοπίζεται σε δύο διαφορετικές μορφές:

- Την διαλυτή στο πλάσμα φαϊμπρονεκτίνη (C1g) που είναι βασικό συστατικό του πλάσματος (300 $\mu\text{g/ml}$) και παράγεται από τα ηπατοκύτταρα
- Την αδιάλυτη κυτταρική φαϊμπρονεκτίνη που είναι βασικό συστατικό της εξωκυττάριας μήτρας, δημιουργώντας ένα αδιάλυτο δίκτυο το οποίο στηρίζει και διαχωρίζει διάφορα όργανα και ιστούς και παράγεται κυρίως από ινοβλάστες (αρχικά σε διαλυτή μορφή που τροποποιείται από διεργασίες του κυττάρου)^{43,53,a}.

Υαλουρονικό οξύ

Το υαλουρονικό οξύ είναι η μοναδική μη θεική γλυκοαμινογλυκάνη, παράγεται στην πλασματική μεμβράνη των κυττάρων αντί του συμπλέγματος Golgi, έχει αρνητικό φορτίο και αποτελεί σημαντικό συστατικό των συνδετικών, επιθηλιακών και νευρικών ιστών. Ως βασικό συστατικό της εξωκυττάριας μήτρας ενισχύει τον πολλαπλασιασμό και τη μετανάστευση των κυττάρων και ενισχύει την ανθεκτικότητα των χόνδρων, δημιουργώντας προστατευτικό μανδύα γύρω από κάθε κύτταρο. Ένας συγκεκριμένος τύπος ινοβλαστών θεωρείται υπεύθυνος για σύνθεση μήτρας πλούσιας σε υαλουρονικό οξύ, με πιθανή σημασία για τη λίπανση μεταξύ μυϊκών ιστών. Επίσης, αλληλεπιδρά με διάφορους υποδοχείς (CD44, RHAMM) και αποτελεί παράγοντα ενεργοποίησης της ανοσοβιολογικής απόκρισης μέσω των υποδοχέων TLR2 και TLR4 των μακροφάγων και των δενδριτικών κυττάρων. Ως πρόσθετο σε ικρίωματα αυξάνει τη διάρκεια ζωής του σε εφαρμογές καλλιεργειών και επιμηκύνει τη λειτουργικότητα των ηπατοκυττάρων, όπως συμβαίνει και με τη γαλακτοζυλιωμένη μορφή του. Αντίστοιχα, σε ικρίωματα με υαλουρονικό οξύ ή τη συζευγμένη του μορφή με ηπαρίνη, τα ηπατικά κύτταρα έδειξαν σταθερή παραγωγή ουρίας και παρατεταμένη ικανότητα μεταβολισμού ξеноβιοτικών^{43,54,a}.

Θεική χονδροϊτίνη

Η θεική χονδροϊτίνη είναι μία θειωμένη γλυκοαμινογλυκάνη, αποτελούμενη από μία αλυσίδα εναλλάξ σύνδεσης N-ακετυλ-D-γαλακτοσαμίνης (GalNAc) και D-γλυκουρονικού οξέος (GlcA) (σάκχαρα). Βρίσκεται συχνά προσκολλημένη σε πρωτεΐνες ως τμήμα πρωτεογλυκανών και είναι σημαντικό συστατικό του χόνδρου και ενισχυτικός παράγοντας για την αντοχή του στις μηχανικές καταπονήσεις (κυρίως συμπίεση). Ακόμα η θεική χονδροϊτίνη συμμετέχει στις σηματοδοτικές διαδικασίες διαφόρων χημειοκινών και αυξητικών παραγόντων όπως εκείνοι των αιμοπεταλίων (PDGFs), των ινοβλαστών (FGFs) και της επιδερμίδας (EGFs) και άλλοι (όπως οι TGF-βs). Έχει προστατευτικό ρόλο για τους αυξητικούς παράγοντες καθώς αποτρέπει την ταχεία αποδόμησή τους, επηρεάζοντας την αποδέσμευση, κατανομή και δράση τους⁵⁵⁻⁵⁸.

2.5.2 Ξήρανση με κατάψυξη

Η ξήρανση με κατάψυξη (ή διαφορετικά λυοφιλοποίηση) είναι μία βασική φυσική διεργασία, που σκοπό έχει την εξάτμιση του διαλύτη από ένα μίγμα. Καθώς επιτρέπει την απομάκρυνση του διαλύτη χωρίς να απαιτεί υψηλές θερμοκρασίες, αποτελεί βασική μέθοδο που χρησιμοποιείται για φαρμακευτικές και βιολογικές εφαρμογές. Σημαντικό χαρακτηριστικό αυτής της μεθόδου ξήρανσης που καθορίζει και το εύρος και είδος εφαρμογών της αποτελεί η τελική ανάπτυξη πορωδών δομών στα υλικά που εκτίθενται στις ανάλογες συνθήκες. Τα

τελικά προϊόντα αυτής της διεργασίας θεωρούνται ιδιαίτερα σταθερά και εύκολα στο χειρισμό.

Σχετικά με τα στάδια της διεργασίας, αρχικά το δοκίμιο ψύχεται σε χαμηλή θερμοκρασία, σε ατμοσφαιρική πίεση. Η ψύξη και ο ρυθμός μεταβολής της θερμοκρασίας του μίγματος κάτω από τη θερμοκρασία ισορροπίας του καθορίζουν τους όρους έναρξης και διάδοσης της πυρηνογένεσης, την συνεπακόλουθη κρυστάλλωση και την τελική μετάβαση του δείγματος σε στερεή κατάσταση. Εφόσον το δοκίμιο ψυχθεί για αρκετό διάστημα (ανάλογα με τις διαστάσεις του) ακολουθεί το στάδιο της ξήρανσης, όπου η θερμοκρασία αρχικά παραμένει σταθερή και η πίεση πέφτει κάτω από την τάση ατμών του νερού, ώστε με αύξηση της θερμοκρασίας να γίνεται εξάχνωση του κρυσταλλωμένου διαλύτη. Το στάδιο αυτό αποτελείται από δύο επιμέρους βήματα, την πρωτογενή ξήρανση όπου μετά την επίτευξη του κενού γίνεται με συγκεκριμένο ρυθμό η αύξηση της θερμοκρασίας στο θάλαμο και τη δευτερογενή που ακολουθεί από τη στιγμή που σταθεροποιείται η θερμοκρασία του θαλάμου στην τιμή στόχο και εξισωθεί η θερμοκρασία του δοκιμίου με αυτή. Συχνά και για το πλαίσιο αυτής της διπλωματικής εργασίας, η διαδικασία της εξάχνωσης των κρυστάλλων θα αναφέρεται συνολικά ως ξήρανση^b.

Αναλυτικότερα, οι παραπάνω μακροσκοπικές μεταβολές που υφίσταται το δοκίμιο καθορίζονται από φυσικοχημικά φαινόμενα που επάγονται από τη μεταβολή της θερμοκρασίας και της πίεσης. Αρχικά, παρά τα τυπικά σημεία πήξης των διαφόρων ουσιών και μιγμάτων, η πραγματική θερμοκρασία στην οποία ένα μίγμα θα αλλάξει φάση είναι πάντα χαμηλότερη και καθορίζεται από τη διαδικασία της "υπέρψυξης". Με τον όρο αυτό αναφέρεται η θερμοκρασιακή διαφορά μεταξύ της θεωρητικής θερμοκρασίας ισορροπίας (αλλαγής φάσης) μίας καθαρής ουσίας ή ενός μίγματος και εκείνης όπου τελικά σε δεδομένες συνθήκες διεργασίας ξεκινά η πυρηνογένεση και καθορίζεται τόσο από τη σύσταση όσο και από τη διεργασία. Η "υπέρψυξη" είναι μία εκτός ισορροπίας, μετασταθής φάση και έχει το ρόλο της "ενέργειας ενεργοποίησης" για την κρυστάλλωση. Καθώς ο διαλύτης είναι σχεδόν πάντα νερό ή υδατικά διαλύματα, κατά την υπέρψυξη τα μόρια του νερού σχηματίζουν δομές (clusters) λόγω των μεταβολών της πυκνότητας από γεωμετρικές κινήσεις Brown*. Οι δομές αυτές είναι παρόμοιες με τη στερεά κρυσταλλική δομή του νερού σε στερεά μορφή, καταρρέουν όμως λόγω του γεγονότος ότι είναι ενεργειακά δυσμενείς. Γενικά, η πυρηνογένεση των κρυστάλλων θεωρείται ένα στοχαστικό φαινόμενο αφού τυχαίοι παράγοντες καθορίζουν την ακριβή στιγμή και το σημείο του μίγματος όπου θα αναπτυχθεί ο πρώτος κρύσταλλος. Παρά ταύτα, χαμηλότερες θερμοκρασίες ψύξης, περιορίζουν τις σχετικές κινήσεις των μορίων, διευκολύνοντας την κρυστάλλωση. Έτσι, για το καθαρό νερό, η θερμοκρασία ομογενούς πυρηνογένεσης θεωρούνται οι -40 βαθμοί Κελσίου, καθώς σε αυτή τη θερμοκρασία θα έχει αναπτυχθεί με βεβαιότητα τουλάχιστον ένας κρύσταλλος. Η

θερμοκρασία αυτή διακρίνεται από την αντίστοιχη στην περίπτωση που το δείγμα έρχεται σε επαφή με κάποια ξένη επιφάνεια ή έχει επιμολύνει, καθώς σε αυτές τις περιπτώσεις η ετερογένεια ευνοεί την ανάπτυξη κρυστάλλων, με αποτέλεσμα να συμβαίνει σε συγκριτικά υψηλότερες θερμοκρασίες (ετερογενής πυρηνογένεση). Εφόσον αναπτυχθούν οι πρώτοι κρύσταλλοι, νέοι κρύσταλλοι δομούνται σε επαφή με τους αρχικούς. Παρά ταύτα μόνο ένα μέρος του συνολικού διαλύτη θα κρυσταλλωθεί άμεσα καθώς ειδικά για το υπερψυγμένο νερό, μόνο 15cal/g θερμότητας μπορούν να απαχθούν από αυτό από τα 79cal/g που εκλύονται κατά την εξώθερμη κρυστάλλωση. Συνεπώς, όταν ξεκινά η κρυστάλλωση, η θερμοκρασία του δοκιμίου αυξάνεται άμεσα και φτάνει κοντά στη θεωρητική θερμοκρασία ισορροπίας του μίγματος. Η περαιτέρω ψύξη του δοκιμίου απάγει σταδιακά την εκλυόμενη θερμότητα και οδηγεί σε ολοκλήρωση της κρυστάλλωσης του διαλύτη, με αύξηση του μεγέθους των αρχικών κρυστάλλων. Η ανάπτυξη των κρυστάλλων ελέγχεται συνεπώς από την εκλυόμενη λανθάνουσα θερμότητα και το ρυθμό ψύξης του δοκιμίου, με αυτόν να είναι πρακτικά ο χρόνος μεταξύ της πλήρους πυρηνογένεσης και της απομάκρυνσης της λανθάνουσας θερμότητας. Η ψύξη ολοκληρώνεται όταν η θερμοκρασία του δοκιμίου εξισορροπείται με αυτή του μέσου ψύξης – ραφίου. Ο αριθμός των σχηματιζόμενων κρυστάλλων, ο ρυθμός ανάπτυξης του στερεού νερού και το μέγεθος των κρυστάλλων αυτών εξαρτώνται από την έκταση της υπέρψυξης. Όσο υψηλότερη είναι η υπέρψυξη τόσο υψηλότερος ο ρυθμός πυρηνογένεσης και τόσο αποτελεσματικότερη η ψύξη, με συνέπεια τη δημιουργία περισσότερων και μικρότερων πόρων^{59-63,b}.

Όπως προαναφέρθηκε οι δημιουργούμενοι κρύσταλλοι στο στάδιο της ψύξης είναι που καθορίζουν τη μορφολογία των δημιουργούμενων πόρων στο τελικό προϊόν της λυοφιλοποίησης. Μέχρι σήμερα, έχουν εντοπιστεί 10 πολυμορφισμοί του νερού σε στερεή κατάσταση. Παρά ταύτα, σε συνθήκες αντίστοιχες με αυτές που επικρατούν σε μία συνήθη διεργασία ξήρανσης με κατάψυξη, επικρατεί μία σταθερή κρυσταλλική διαμόρφωση, του εξαγωνικού τύπου, όπου κάθε άτομο οξυγόνου περιβάλλεται τετραεδρικά από άλλα τέσσερα άτομα οξυγόνου. Γενικά, τρεις είναι οι διακριτοί τρόποι ανάπτυξης των κρυστάλλων γύρω από τους πυρήνες σε ένα μίγμα. Σε ομαλές μεταβολές συνθηκών, τα μόρια έχουν τον απαραίτητο χρόνο ώστε να δομήσουν εξαγωνικούς κρυστάλλους, που ονομάζονται δενδρίτες. Στην περίπτωση που τα μόρια τοποθετούνται σε τυχαίες θέσεις στην κρυσταλλική δομή λόγω ταχύρυθμων μεταβολών των συνθηκών, τότε προκύπτουν διαμορφώσεις αξονικών στηλών που έχουν ως αφετηρία τον αρχικό πυρήνα. Στην τρίτη περίπτωση, σε συνθήκες υψηλών ρυθμών ψύξης προκύπτουν δομές πάγου χωρίς πλευρικές διαμορφώσεις, οι λεγόμενοι σφαιρουλίτες. Οι τελικοί κρύσταλλοι που θα προκύψουν επηρεάζονται και από άλλες επιμέρους βαθμίδες που αναπτύσσονται στη διάρκεια της διεργασίας όπως βαθμίδα

θερμοκρασίας ή συγκέντρωση. Ενδεικτικά, η κατευθυνόμενη ψύξη του δοκιμίου ωθεί στην ανάπτυξη κατευθυνόμενων μακρόστενων πόρων.

Παρά το γεγονός πως πολλές διαλυμένες ουσίες επηρεάζουν ελάχιστα ή καθόλου τους κρυστάλλους που θα προκύψουν από το αρχικό διάλυμα, άλλες επηρεάζουν όχι μόνο τη μορφολογία τους αλλά και τις φυσικές τους ιδιότητες. Βάσει του νόμου του Raoult, η παρουσία διαλυμένων ουσιών σε υψηλές συγκεντρώσεις οδηγεί σε ταπείνωση του σημείου πήξης του διαλύματος και σε ταχύτερη κρυστάλλωση, λόγω της προώθησης φαινομένων ετερογενούς κρυστάλλωσης, που προκαλούν πολύ χαμηλότερου βαθμού υπέρψυξη. Υψηλότερη συγκέντρωση στερεών (ίδιου μοριακού βάρους) οδηγεί σε μικρότερους κρυστάλλους και τελικώς σε μικρότερους πόρους.

Η εξαγωνική αυτή δομή του νερού σε στερεή φάση είναι καθοριστικής σημασίας για τις εφαρμογές της λυοφιλοποίησης, καθώς στους δημιουργούμενους κρυστάλλους δεν «χωράνε» οι περισσότερες διαλυτές ουσίες. Συνεπώς, οι συγκεντρώσεις των διαλυμένων συστατικών της αρχικής σύνθεσης ενός διαλύματος αυξάνονται στις περιοχές μεταξύ των αναπτυσσόμενων κρυστάλλων, με το φαινόμενο να αναφέρεται ως κρυοσυγκέντρωση (cryoconcentration). Αν αυτός ο διαχωρισμός δεν εκδηλωθεί, δημιουργείται σταδιακά ένα στερεό διάλυμα με αυξημένες συγκεντρώσεις των αρχικών διαλυτών συστατικών, με πολύ χαμηλότερη τάση ατμών, με αποτέλεσμα την παρεμπόδιση της λυοφιλοποίησης του δοκιμίου. Η συνολική συγκέντρωση στερεών αυξάνεται άμεσα με την πρόοδο της κρυστάλλωσης και εξαρτάται από τη θερμοκρασία ψύξης-κρυστάλλωσης, χωρίς να παρουσιάζει εξάρτηση από την αρχική τους συγκέντρωση. Το φαινόμενο αυτό αναφέρεται ως Mullins – Sekerka αστάθεια και βάσει αυτού οι κρυσταλλικές δομές στερεού διαλύτη εξαρτώνται από τη δημιουργούμενη βαθμίδα ασταθούς συγκέντρωσης διαλυτών ουσιών στις διεπιφάνειες των κρυστάλλων με το υπόλοιπο υλικό και την επιφανειακή ενέργεια που εμποδίζει την ανάπτυξή τους. Μία χαρακτηριστική ιδιότητα των υδατικών διαλυμάτων και ειδικότερα εκείνων με τουλάχιστον ένα πολυμερές συστατικό είναι ο διαχωρισμός των υγρών φάσεων κατά την ψύξη σε δύο (ή περισσότερες) υγρές φάσεις με αυξημένη παρουσία ενός συστατικού σε κάθε μία. Ειδικότερα, σε μία κρίσιμη συγκέντρωση της διαλυτής ουσίας οι ενθαλπικά δυσμενείς αλληλεπιδράσεις μεταξύ των διαλυμένων ουσιών υπερσχύουν της εντροπικής τάσης για διάλυμα πλήρους διαλυτότητας. Πιθανά σε αυτή τη συμπεριφορά να συμβάλλουν οι επιδράσεις των διαλυμένων ουσιών στην κρυσταλλική δομή του νερού^{59-61,63}.

**Γεωμετρικές κινήσεις Brown – Brownian motion: με τον όρο αυτό περιγράφεται η τυχαία κίνηση στερεών σωματιδίων που βρίσκονται σε ένα ρευστό λόγω συγκρούσεων με τα μόρια του ρευστού. Παρατηρήθηκε από τον Brown και τεκμηριώθηκε επιστημονικά από τον Einstein.*

2.5.3 Σχεδιασμός ξήρανσης με κατάψυξη

Με βάση την ανάλυση που προηγήθηκε σκιαγραφούνται οι παράμετροι που ελέγχουν τις τελικές συνθήκες πραγμάτωσης μίας διεργασίας ξήρανσης με κατάψυξη για την απόδοση επιθυμητών ιδιοτήτων σε ένα δοκίμιο. Οι κρίσιμότεροι περιορισμοί για την επιλογή των κατάλληλων τιμών για τις μεταβλητές σχεδιασμού ορίζονται από τη θερμοκρασία κατάρρευσης της σύνθεσης, τη σταθερότητα βάσει της απομάκρυνσης της υγρασίας που επιδιώκεται να έχει και τις ουσίες που αποτελούν το μίγμα. Η βασική παράμετρος που καθορίζει τις θερμοκρασίες επεξεργασίας του δείγματος είναι η θερμοκρασία κατάρρευσης. Αν το διάλυμα εμπεριέχει πολυμερή, τότε αυτή ισούται με τη θερμοκρασία υαλώδους μετάβασης του αυξημένη κατά δύο βαθμούς Κελσίου, μία πειραματικά εντοπίσιμη τιμή θερμοκρασίας πάνω από την οποία ένα μίγμα πολυμερούς μεταβαίνει σε μία περισσότερο εύπλαστη – ελαστική διαμόρφωση συγκριτικά με την αρχική του. Σε κάθε περίπτωση μίγματος η τιμή της θερμοκρασίας θεωρείται ίση με το ευτηκτικό σημείο της σύνθεσης, δηλαδή την υψηλότερη θερμοκρασία που η σύνθεση παραμένει σε στερεή κατάσταση βάσει της φύσης και της αναλογίας των συστατικών της. Συνεπώς, αν η θερμοκρασία του σταδίου ψύξης είναι υψηλότερη από τη θερμοκρασία υαλώδους μετάβασης το δοκίμιο υφίσταται μακροσκοπική κατάρρευση, χάνοντας τα χαρακτηριστικά δομής του. Στην περίπτωση που η θερμοκρασία ψύξης είναι πολύ κοντά σε αυτό παρατηρείται μία ενδιάμεση κατάσταση που αναφέρεται ως μικροκατάρρευση (microcollapse), η οποία προκύπτει από κατάρρευση της άμορφης πολυμερικής φάσης στην επιφάνεια των κρυστάλλων, που της παρέχουν μηχανική υποστήριξη. Γίνεται επομένως σαφές πως οι παράμετροι λυοφιλοποίησης ενός μίγματος κρυσταλλικής και άμορφης φάσης καθορίζονται από την κρυσταλλική.

2.5.3.1 Ψύξη

Η προαναφερθείσα υπέρψυξη και πρακτικά η πραγματική θερμοκρασία που θα κρυσταλλωθεί το νερό ή ο διαλύτης σε ένα δοκίμιο μπορεί να είναι 10-25 °C χαμηλότερη από τη θερμοκρασία ισορροπίας μετάβασης στη στερεή κατάσταση και καθορίζεται για δεδομένη σύνθεση κυρίως από το ρυθμό ψύξης. Ενδεικτικά, οι υψηλοί ρυθμοί ψύξης οδηγούν σε εκτενέστερη υπέρψυξη, με αποτέλεσμα τη δημιουργία περισσότερων και μικρότερων κρυστάλλων και άρα μεγαλύτερη ειδική επιφάνεια στερεού διαλύτη. Παρά ταύτα η επίδραση του ρυθμού ψύξης στην υπέρψυξη περιορίζεται βάσει του ορίου για ρυθμό ψύξης περίπου 2 °C/min που απαιτείται για λόγους ομοιογένειας στο δοκίμιο. Τελικώς, ένας μέσος ρυθμός ψύξης κοντά στον 1 °C/min επιφέρει μέση υπέρψυξη και την επιθυμητή ομοιογένεια. Αντίστοιχα, η τελική θερμοκρασία ψύξης του δοκιμίου επηρεάζει αμεσότερα την υπέρψυξη του δείγματος και τα μορφολογικά χαρακτηριστικά των τελικώς σχηματιζόμενων κρυστάλλων. Η θερμοκρασία τελικής ψύξης θα πρέπει να είναι χαμηλότερη από το σημείο υαλώδους μετάβασης (ή το ευτηκτικό σημείο) και να κρατηθεί σταθερή για αρκετό διάστημα ώστε ολόκληρο το αρχικό μίγμα να έχει στερεοποιηθεί. Ενδεικτικά, εφαρμόζονται τελική

θερμοκρασία ψύξης $-40\text{ }^{\circ}\text{C}$ όταν οι κρίσιμες θερμοκρασιακές παράμετροι είναι υψηλότερες από $-38\text{ }^{\circ}\text{C}$ ή διαφορετικά $2\text{ }^{\circ}\text{C}$ χαμηλότερη όταν αυτές είναι χαμηλότερες. Ανάλογα, η διάρκεια σταθερής ψύξης του δοκιμίου πρέπει να είναι μέχρι 1 ώρα όταν το αξονικό βάθος διάδοσης της θερμότητας κάθετα στην επιφάνειά του είναι μέχρι 1 cm και τουλάχιστον 2 ώρες αν είναι περισσότερο από αυτό.

2.5.3.2 Ανόπτηση

Το στάδιο αυτό αναφέρεται στη διαδικασία διατήρησης του δοκιμίου σε μία θερμοκρασία υψηλότερη της τελικής θερμοκρασίας ψύξης μετά το τέλος του προηγούμενου σταδίου για ένα χρονικό διάστημα, που σκοπό έχει την ανακρυστάλλωση του διαλύτη και άλλων πιθανώς κρυσταλλικών συστατικών. Η ανόπτηση μειώνει τη διακύμανση του μεγέθους των κρυστάλλων και αποτελεί μία επιπλέον παράμετρο ελέγχου του μεγέθους τους πέραν του ρυθμού και της θερμοκρασίας ψύξης. Η θερμοκρασία που επιλέγεται για το στάδιο αυτό είναι υψηλότερη από το σημείο υαλώδους μετάβασης (ή το ευτηκτικό σημείο) αλλά χαμηλότερη από το σημείο πήξης του διαλύτη. Οι περιορισμοί αυτοί έχουν ως αποτέλεσμα την τήξη ορισμένων κρυστάλλων, βάσει της συμπεριφοράς του συστήματος (καμπύλη ισορροπίας). Η αυξημένη ενεργότητα νερού και η υψηλότερη θερμοκρασία (συγκριτικά με το στάδιο της ψύξης) αυξάνουν την κινητικότητα των άμορφων (μη κρυσταλλικών) συστατικών και των υλών που εμπεριέχονται σε αυτά, με αποτέλεσμα τη μετάβαση σε φυσικές καταστάσεις χαμηλότερης ελεύθερης ενέργειας. Βάσει της σχέσης του Kelvin, κρύσταλλοι μικρότερης διαμέτρου θα τήξουν εκλεκτικά λόγω υψηλότερης ελεύθερης ενέργειας υπέρ μεγαλύτερων κρυστάλλων. Μέσω της ωρίμανσης κατά Ostwald (Ostwald ripening) η ανόπτηση έχει ως αποτέλεσμα την ανάπτυξη κρυστάλλων μεγαλύτερης διαμέτρου, αξιοποιώντας τους αρχικούς μεγαλύτερους κρυστάλλους ως κέντρα κρυστάλλωσης. Το μέσο μέγεθος των κρυστάλλων που θα προκύψουν είναι ανάλογο της κυβικής ρίζας του χρόνου ανόπτησης. Ακόμα, οι αυξημένου μεγέθους πόροι μειώνουν την αντίσταση απομάκρυνσης της υγρασίας του δοκιμίου στο στάδιο της ξήρανσης με αποτέλεσμα την ανάγκη για μικρότερους χρόνους ξήρανσης.

2.5.3.3 Ξήρανση

Οι συνθήκες ξήρανσης καθορίζονται από τη θερμοευαισθησία του δοκιμίου προς ξήρανση και τα φαινόμενα μεταφοράς που λαμβάνουν χώρα, ανάλογα το ρυθμό και την τελική θερμοκρασία ξήρανσής του. Η διαφορά της τελικής θερμοκρασίας ξήρανσης και της ανώτερης θερμοκρασίας ασφαλούς επεξεργασίας του υλικού (ή κρίσιμης) αναφέρεται ως το θερμοκρασιακό εύρος ασφαλείας και προτείνεται να είναι κοντά στους $5\text{ }^{\circ}\text{C}$. Όσο υψηλότερη είναι η θερμοκρασία ξήρανσης τόσο μικρότερος είναι ο χρόνος που απαιτείται για την πραγματοποίησή της, με κάθε $1\text{ }^{\circ}\text{C}$ αύξησής της να επιφέρει μείωση 13% στον απαιτούμενο χρόνο ξήρανσης. Καθώς η απομάκρυνση του νερού (ή άλλου διαλύτη) βασίζεται στην

εξάχνωσή του, η επίτευξη της ξήρανσης βασίζεται στην επίτευξη κατάλληλων συνθηκών πίεσης. Συνεπώς, η πίεση του θαλάμου λυοφιλοποίησης πρέπει να είναι 10-30% της τάσης ατμών του νερού στις συνθήκες ψύξης του δοκιμίου. Για το στάδιο αυτό, προτείνονται πιέσεις λειτουργίας 50-200 mTorr, με το διάστημα 100-150 mTorr να θεωρείται κατάλληλο για βέλτιστη ομοιογένεια. Χωρίς να είναι απόλυτα τεκμηριωμένος ο ρόλος του ρυθμού αύξησης της θερμοκρασίας στο στάδιο της ξήρανσης, ένας ήπιος ρυθμός μεταβολής της θερμοκρασίας, κοντά στους 0,15 °C/min θεωρείται ο βέλτιστος, ειδικά για τις περιπτώσεις που κρίσιμο χαρακτηριστικό ποιότητας του τελικού προϊόντος είναι το μέγεθος των πόρων^{59-64,b}.

Κεφάλαιο 3: Πειραματικό μέρος

3.1 Υλικά και μέθοδοι

Η πραγματοποίηση των πειραματικών διαδικασιών που περιγράφονται στην παρούσα διπλωματική εστιάζονται στην παρασκευή και χαρακτηρισμό των ικριωμάτων καλλιέργειας, της δημιουργίας των τελικών κατασκευών για την καλλιέργεια των κυττάρων και οι τεχνικές μέτρησης διαφόρων δεικτών από τα κύτταρα σε συνθήκες καλλιέργειας.

3.1.1 Δημιουργία κατασκευών τρισδιάστατης καλλιέργειας σε πορώδη ικριώματα

Προετοιμασία γυαλιών μικροσκοπίας

Αρχικά και σε ότι αφορά στα υλικά, πρώτο βήμα για την παρασκευή τους είναι η προετοιμασία των γυαλιών μικροσκοπίας και των παραλληλεπίπεδων τμημάτων PDMS με τις 6 κυκλικές οπές, ανάλογες της διαμόρφωσης μίας πλάκας 96 πηγαδιών. Για το σκοπό αυτό γυαλιά μικροσκοπίας διαστάσεων 24X50×(0,16-0,19) mm (Fisher Scientific UK Ltd, Loughborough, UK) πλένονται αρχικά με αποστειρωμένο νερό (Type 1 water - ProtAtOnce Ltd, Athens, Greece) σε λουτρό υπερήχων για 20 λεπτά, στη συνέχεια με αιθανόλη 70% (AppliCHem GmbH, Darmstadt, Germany/PanReac Quimica SLU, Barcelona, Spain) για ακόμα 20 λεπτά και αφήνονται εκτεθειμένα σε ατμοσφαιρικές συνθήκες μέχρι πλήρους εξάτμισής της (για 24 ώρες).

Παραγωγή πλαισίων ποδιμεθυλοσιλοξάνης

Ακόμα, μίγμα πολυδιμεθυλοσιλοξάνης (Sylgard 184 Silicone elastomer base, Dow Corning Corporation, MI, USA) και διεγέρτη (Sylgard 184 Silicone elastomer curing agent, Dow Corning Corporation, MI, USA) σε αναλογία 1:10 αναδεύεται δια χειρός και αφήνεται σε ξηραντή υπό κενό (αντλία: KNF Neuberger, Freiburg, Germany) για 20 λεπτά με σκοπό την απομάκρυνση φυσαλίδων αέρα από το μίγμα και χυτεύεται σε κατάλληλα σχεδιασμένα καλούπια από Plexiglass. Αφού η διάταξη με το πολυμερές τοποθετηθεί στον ξηραντή για ακόμα 20 λεπτά, τοποθετείται σε θερμαινόμενο θάλαμο (Nabertherm GmbH, Lilienthal/Bremen, Germany), θερμοκρασίας 75 (±7) °C, για 4 ώρες με διατήρηση της θύρας ανοιχτής.

Επίδραση με πλάσμα στα γυαλιά μικροσκοπίας

Μετά το πέρας των δύο αυτών βημάτων ελέγχεται οπτικά ότι τα γυαλιά μικροσκοπίας είναι καθαρά και εν συνεχεία γίνεται επίδραση με πλάσμα (Plasma Etch, NV, USA) σε αυτά σε πίεση 300 mTorr για 20 δευτερόλεπτα, με σκοπό την ενίσχυση της υδροφιλίας της επιφάνειάς τους. Αμέσως μετά το πλάσμα, σταγόνες 6μl από τα αιωρήματα κολλαγόνου τοποθετούνται σε θέσεις με ανάλογες με αυτές σε μία πλάκα 96 πηγαδιών.

Παραγωγή αιωρημάτων κολλαγόνου τύπου I και μιγμάτων του

Τα αιωρήματα παράγονται με ανάμιξη υδατικού διαλύματος ακετικού οξέος 50 mM (AppliCHem GmbH, Darmstadt, Germany/PanReac Quimica SLU, Barcelona, Spain) με ίνες μικροϊνόδους κολλαγόνου τύπου I σε αναλογία 5 mg/ml με εξοπλισμό ανάμιξης Ika Turrex T18 (IKA Werke GmbH & Co. KG, Staufen, Germany), παρουσία πάγου και διατήρηση της θερμοκρασίας μέχρι τους 10 °C. Εφόσον το μίγμα θεωρηθεί ομογενές, θεωρηθεί ομογενές, σε τμήμα του προστίθεται θευική χονδροϊτίνη (Sigma Aldrich, St Louis, MI, USA), υαλουρονικό οξύ (Sigma Aldrich, St Louis, MI, USA), Matrigel (BD Biosciences, NJ, USA), φαϊμπρονεκτίνη (Sigma Aldrich, St Louis, MI, USA) ή ηπαρίνη (Sigma Aldrich, St Louis, MI, USA). Σε όλες τις περιπτώσεις τελικό στάδιο αποτελεί η απομάκρυνση των παγιδευμένων φυσαλίδων αέρα κενό 100 mbar για 30min. Τα μίγματα αποθηκεύονται στους 4 °C.

Διεργασία ξήρανσης με κατάψυξη (λυοφιλοποίηση)

Για την ανάπτυξη των ικριωμάτων, τα γυαλιά μικροσκοπίας με τις σταγόνες αιωρήματος τοποθετούνται στα ράφια εξοπλισμού ξήρανσης με κατάψυξη (SP Scientific - Virtis, NY, USA). Οι συνθήκες του θαλάμου ρυθμίζονται μέσω του λογισμικού EnCore, με το κύριο πρωτόκολλο να αποτελείται από ψύξη σε θερμοκρασία -45 °C, με ρυθμό ψύξης 1 °C/min και χρόνο σταθερής θερμοκρασίας ψύξης 1 ώρα, στη συνέχεια παραμονή 2 ωρών στους -20 °C για το στάδιο της ανόπτησης και 20 °C με ρυθμό θέρμανσης 1 °C/min για το στάδιο της ξήρανσης. Η πίεση στο εσωτερικό του θαλάμου στο στάδιο της ξήρανσης είναι 150 mTorr, και η θερμοκρασία του συμπυκνωτή στους -85 °C.

Χαρακτηρισμός ικριωμάτων με ηλεκτρονική μικροσκοπία σάρωσης (SEM)

Μετά το τέλος της διεργασίας της ξήρανσης τα παραχθέντα υλικά χαρακτηρίζονται ως προς το ανοιχτό, το μέγεθος και την ομοιογένεια των πόρων μέσω ηλεκτρονικής μικροσκοπίας σάρωσης (FEI Nova NanoSEM 230 Scanning Electron Microscope) με εκπομπή πεδίου (field emission). Η εξέταση των δειγμάτων έγινε με ανιχνευτή Everhart-Thornley (ETD), σε κενό με μίγμα αζώτου – διοξειδίου του άνθρακα.

Συγκόλληση γυαλιών μικροσκοπίας με πλαίσια πολυδιμεθυλοσιλοξάνης

Εφόσον τα χαρακτηριστικά των παραχθέντων βιοϋλικών θεωρηθούν αποδεκτά, επόμενο βήμα είναι η συγκόλληση του πλαισίου πολυδιμεθυλοσιλοξάνης με το γυαλί μικροσκοπίας που φέρει τα βιοϋλικά. Για το σκοπό αυτό, η κλειστή πλευρά των πλαισίων όταν αυτά βρίσκονταν στα καλούπια εκτίθεται στο πλάσμα στις ίδιες συνθήκες με αυτές που χρησιμοποιήθηκαν προηγουμένως για τα γυαλιά. Εφόσον συμβεί αυτό, τα πλαίσια PDMS τοποθετούνται πάνω στα γυαλιά, με τις αντίστοιχες πλευρές που έχουν εκτεθεί στο πλάσμα

να βρίσκονται σε επαφή και τα βιοϋλικά να περιβάλλονται (κατά το δυνατό) από τις οπές των πλαισίων. Η συνολική διάταξη τοποθετείται σε ανοιχτό δοχείο Petri με βάρος στην άνω πλευρά της ώστε να ενισχυθεί η συγκόλληση. Μετά από 48 ώρες, οι κατασκευές τοποθετούνται σε θερμαινόμενο θάλαμο κενού (Fisher Scientific, NH, USA) για τη δημιουργία σταυροδεσμών σε συνθήκες 110 °C, πίεση 28 bar, για 45 λεπτά. Μετά το πέρας αυτού του σταδίου οι κατασκευές είναι έτοιμες για χρήση και αν δεν χρησιμοποιηθούν άμεσα, συσκευάζονται σε κλειστά δοχεία Petri με μονωτική ταινία.

3.1.2 Καλλιέργεια κυττάρων HepG2 και επίδραση παρακεταμόλης ως συνθήκη DILI

Επίστρωση και καλλιέργεια κυττάρων σε πλάκα 96 κελιών και ικρίωματα

Αρχικά κρυοδιατηρημένα κύτταρα της σειράς HepG2 καλλιεργήθηκαν σε φλάσκα καλλιέργειας 75 ml και κατάλληλο θρεπτικό μέσο (Roswell Park Memorial Institute medium (RPMI), Biosera) σε συνήθεις συνθήκες (37 °C, 5.0% CO₂, 90% υγρασία). Με αλλαγή του θρεπτικού μέσου ανά δύο ημέρες και μετά από δύο εβδομάδες με χρήση οπτικού μικροσκοπίου βεβαιώθηκε πως τα κύτταρα είχαν καλύψει πρακτικά το 100% της επιφάνειας της φλάσκας καλλιέργειας και συνεπώς κατάλληλο ρυθμό πολλαπλασιασμού ώστε να χρησιμοποιηθούν σε βιολογικά πειράματα. Τα κύτταρα επιστρώθηκαν σε πλάκα καλλιέργειας 96 κελιών (20.000 κύτταρα ανά 100 μl ανά κελί) και στα πέντε διαφορετικά ικρίωματα που παρασκευάστηκαν στην ίδια πυκνότητα. Μετά από 48 ώρες και εφόσον και πάλι τα κύτταρα είχαν αναπτυχθεί αρκετά ώστε να καλύψουν πλήρως την επιφάνεια των κελιών της πλάκας 96 κελιών τα κύτταρα εκτέθηκαν σε υψηλά επίπεδα παρακεταμόλης. Πιο συγκεκριμένα, 60,5 mg παρακεταμόλης διαλύθηκαν σε φωσφορικό διάλυμα άλατος με pH=7,4 (Dulbecco's Phosphate Buffered Saline, Biosera) υπό θέρμανση στους 80 °C, δημιουργώντας διάλυμα παρακεταμόλης συγκέντρωσης 80 mM. Μετά το πέρας χρονικού διαστήματος αρκετού ώστε το διάλυμα παρακεταμόλης να έρθει σε θερμοκρασία περιβάλλοντος, διήλθε από φίλτρο 0,2 μm στο θάλαμο νηματικής ροής, ώστε να καταστεί στείρο. Απομακρύνθηκε το θρεπτικό στις καλλιέργειες κυττάρων και αντικαταστάθηκε από 100 μl ανά κελί μίγματος θρεπτικού μέσου – διαλύματος παρακεταμόλης σε αναλογία 3:1 και συνεπώς τελική συγκέντρωση 20 mM για δύο ώρες. Μετά το διάστημα αυτό το διάλυμα απομακρύνθηκε, έγινε πλύση των κελιών με φωσφορικό διάλυμα άλατος με pH=7,4 (Dulbecco's Phosphate Buffered Saline, Biosera) και στη συνέχεια ακολούθησε εφαρμογή χρωστικών και μικροσκοπία φθορισμού, για τη μελέτη των αποτελεσμάτων της επίδρασης της παρακεταμόλης.

Προσδιορισμός της ενδοκυτταρικής περιοχής, των νεκρών κυττάρων και της ενδοκυτταρικής γλουταθειόνης μέσω των εμπορικών χρωστικών Calcein AM, Propidium iodide (PI) και Monochlorobimane (mBCI) αντίστοιχα

Η χρωστική Calcein AM μπορεί και διέρχεται της κυτταρικής μεμβράνης των περισσότερων ευκαριωτικών κυττάρων και γίνεται φθορίζουσα με χαρακτηριστική (πράσινη) χρώση μετά

από υδρόλυση του ακετοξυμεθυλικού εστέρα στο μόριό της από τις ενδοκυτταρικές εστεράσες. Χρησιμοποιήθηκε στα κύτταρα σε τελική συγκέντρωση 1 μM .

Η χρωστική Propidium iodide έχει πλήθος εφαρμογών στη μικροσκοπία φθορισμού και εν προκειμένω χρησιμοποιήθηκε για τον εντοπισμό των νεκρών κυττάρων. Το μόριο της χρωστικής μπορεί και εισχωρεί μόνο σε νεκρά κύτταρα και εκεί προσδένεται στις αζωτούχες βάσεις του γενετικού τους υλικού (DNA), με τη σύνδεση αυτή να αποδίδει έντονη κόκκινη χρώση κατά τη διέγερση. Η χρωστική χρησιμοποιήθηκε σε τελική συγκέντρωση 1 μM .

Η χρωστική mBCI ενδείκνυται για τον άμεσο ενδοκυτταρικό προσδιορισμό μέσω φθορισμού των ελεύθερων ανηγμένων θειολών σε άθικτα κύτταρα. Καθώς η ανηγμένη γλουταθειόνη αποτελεί το μεγαλύτερο ποσοστό των ελεύθερων ανηγμένων θειολών στο εσωτερικό των κυττάρων, η παρούσα τεχνική αποτελεί μία αποτελεσματική έμμεση μέθοδο προσδιορισμού της. Η χρωστική εφαρμόστηκε κατευθείαν στα κύτταρα, σε τελική συγκέντρωση 20 μM .

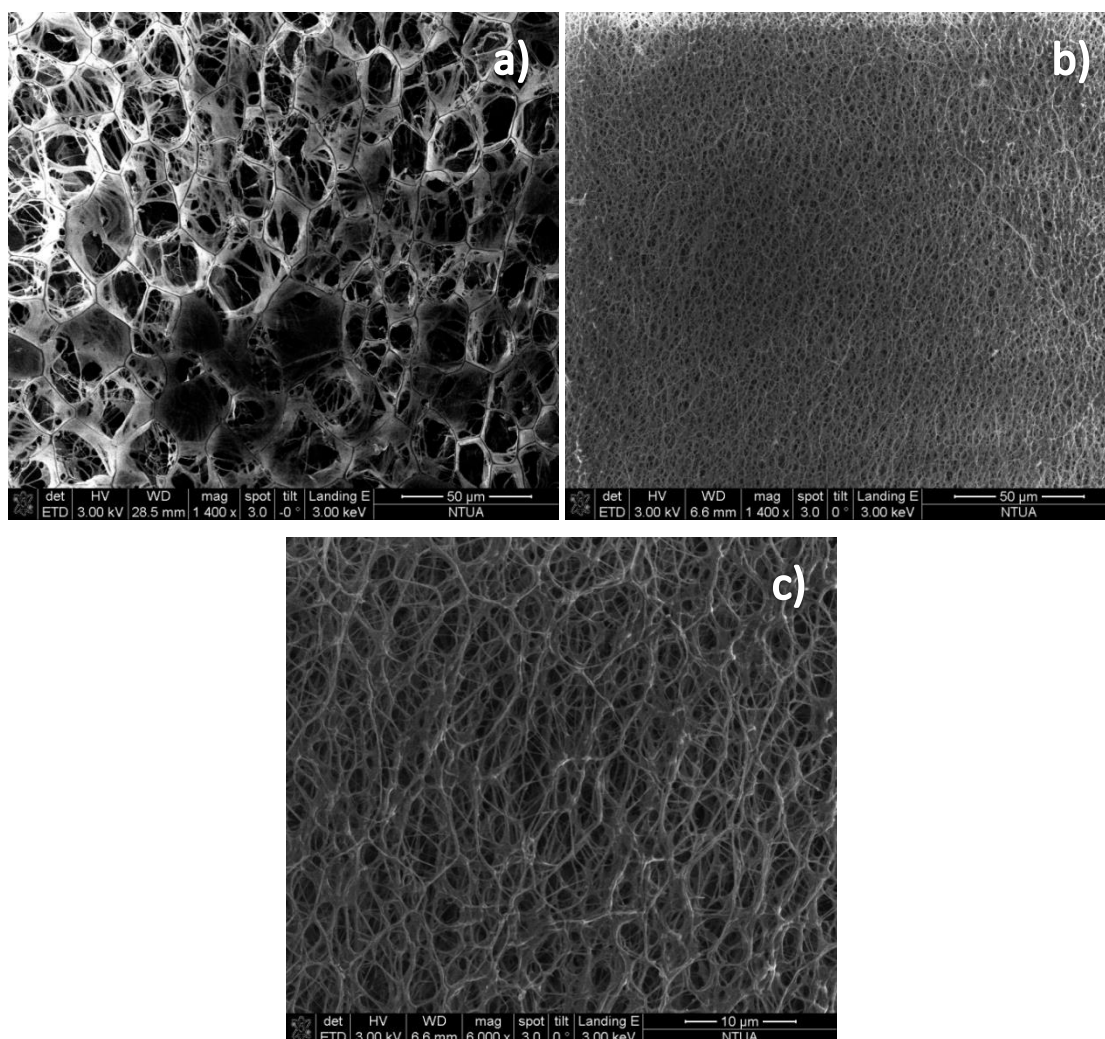
Όλες οι χρωστικές αραιώθηκαν σε ρυθμιστικό διάλυμα (ελεύθερο θειολών) και ακολούθησε επώαση για 30 λεπτά. Μετά το πέρας αυτών το ρυθμιστικό με τη χρωστική απομακρύνθηκε και αντικαταστάθηκε από ίσου όγκου θρεπτικό υλικό και εφαρμόζεται μικροσκοπία φθορισμού (JuLI™ Stage Real-Time CHR, NanoEntek Ltd, South Korea).

3.2 Πειραματικές ενδείξεις

Για το σκοπό της κατασκευής λεπτών πορωδών ικριωμάτων που θα μπορούν να χρησιμοποιηθούν για εφαρμογές τοξικότητας χρησιμοποιήθηκαν ως βάση αραιά αιωρήματα κολλαγόνου τύπου I (5 mg/ml) και μίγματος κολλαγόνου τύπου I και θεικής χονδροϊτίνης (5,44 mg/ml). Οι ερευνητές του εργαστηρίου είχαν δημιουργήσει ένα πρωτόκολλο ξήρανσης με κατάψυξη πάνω στο οποίο επιχειρήθηκαν βελτιώσεις και τροποποιήσεις με τελικό στόχο τη βαθύτερη κατανόηση των φαινομένων που καθορίζουν τις κρίσιμες παραμέτρους ποιότητας των ικριωμάτων και την επίτευξη επιθυμητών ιδιοτήτων σε αυτά. Οι αρχικές πειραματικές διαδικασίες και τα αποτελέσματά τους που θα αναφερθούν παρακάτω επηρέασαν τις κατευθυντήριες οδούς που καθόρισαν την πορεία της εν λόγω πειραματικής εργασίας και επικεντρώθηκαν (i) στη μελέτη της επίδρασης των μεταβλητών σχεδιασμού όπως η θερμοκρασία κατά την ξήρανση με κατάψυξη των ικριωμάτων και τη διατηρησιμότητά τους, (ii) στο ρόλο της συγκέντρωσης και των προσθέτων στο τελικό μέγεθος των πόρων των ικριωμάτων και (iii) στις συνθήκες ανάπτυξης των κυττάρων σε διάφορες συνθήκες καλλιέργειας 2D και 3D.

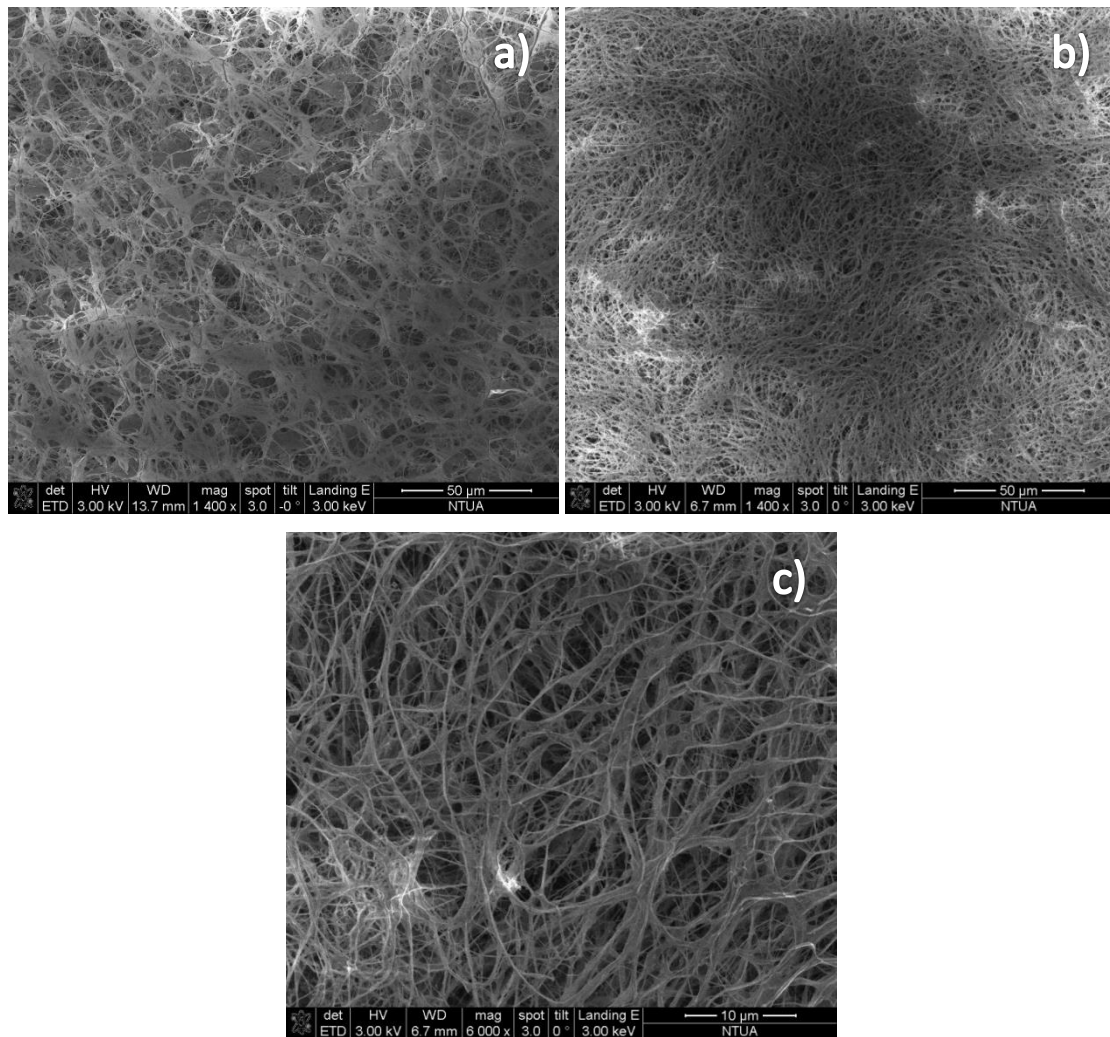
Αρχικά επιχειρήθηκε η ανάλυση της συμπεριφοράς του υλικού κατά την επίδραση διαφορετικών τελικών θερμοκρασιών ψύξης, της κρίσιμότερου παραμέτρου για τον έλεγχο του μεγέθους των πόρων των ικριωμάτων, που όπως αναλύθηκε προηγουμένως ελέγχει το

κατά πόσο τα κύτταρα μπορούν να εισέλθουν στο υλικό. Σημειώνεται πως για την ύπαρξη πλήρους εικόνας σχετικά με τη συμπεριφορά των πολυμερών και των μειγμάτων τους βάσει του σημείου υαλώδους μετάβασής τους ο ορθολογικότερος τρόπος μελέτης είναι η διαφορική θερμιδομετρία σάρωσης. Καθώς η ερευνητική μελέτη των εν λόγω υλικών είναι ακόμα σε αρχικό στάδιο, θεωρήθηκε πρακτικότερη η παρακολούθηση της επίδρασης διαφορετικών πρωτοκόλλων ξήρανσης σε αυτά, σε πραγματικές συνθήκες ξήρανσης στον εξοπλισμό του εργαστηρίου. Η επιλογή αυτή στηρίζεται από τη γενική αρχή πως οι ίδιες συνθήκες ξήρανσης σε διαφορετικούς ή διαφορετικής κλίμακας εξοπλισμούς συχνά επιφέρουν διαφορετικά αποτελέσματα. Επιλέχθηκε η ψύξη των αιωρημάτων σε κοινή θερμοκρασία αρχικής ψύξης (θερμοκρασία πριν την ανόπτηση, $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$) και διαφορετικές τελικές θερμοκρασίες ψύξης (θερμοκρασία μετά την ανόπτηση, $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ και $-40\text{ }^{\circ}\text{C}$) και στη συνέχεια ελέγχθηκε το μέγεθος των αναπτυχθέντων πόρων και η ομοιογένεια με ηλεκτρονική μικροσκοπία σάρωσης (SEM).



Εικόνα 7 Εικόνες χαρακτηρισμού μέσω ηλεκτρονικής μικροσκοπίας σάρωσης (SEM) ικρωμάτων κολλαγόνου που έχουν παραχθεί με τελική θερμοκρασία ψύξης $-40\text{ }^{\circ}\text{C}$ (a, 1400x) και $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ (b, 1400x και c, 6000x)

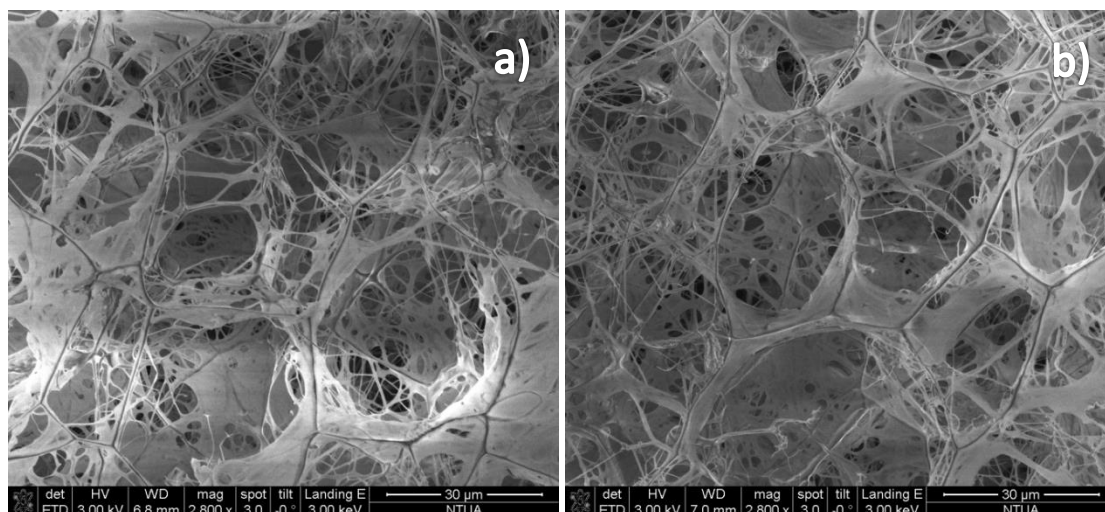
Όπως προέκυψε από τον χαρακτηρισμό των δοκιμίων η υψηλότερη τελική θερμοκρασία ψύξης (-20 °C) οδήγησε σε μη γραμμική μείωση του μεγέθους των πόρων των ικριωμάτων ($p < 0.0001$). Η παρατήρηση αυτή συνάδει με τη θερμοκρασία υαλώδους μετάβασης αιωρημάτων κολλαγόνου που εντοπίζεται στην περιοχή των -35 °C. (*) Κάτω από τη θερμοκρασία αυτή το πολυμερές παρουσιάζει κρυσταλλική συμπεριφορά και συνεπώς η εξάχνωση των κρυστάλλων οδηγεί στη δόμηση αντίστοιχου όγκου πόρων ενώ πάνω από αυτήν, το υλικό διατηρεί την ελαστικότητά του και συνεπώς οι τελικοί πόροι είναι πολύ μικρότεροι των σχηματιζόμενων κρυστάλλων κατά την ολοκλήρωση της ψύξης. Το γεγονός πως ακόμα και πάνω από τη θερμοκρασία υαλώδους μετάβασης το υλικό δεν καταρρέει αλλά διατηρεί μία μικροπορώδη δομή επιβεβαιώνει τη θεωρία πως σε ένα εύρος θερμοκρασιών πάνω από τη θερμοκρασία υαλώδους μετάβασης το εκάστοτε υλικό δεν καταρρέει άμεσα αλλά διέρχεται από μία κατάσταση που αναφέρεται ως «μικροκατάρρευση» (microcollapse) όπου το μέγεθος των πόρων είναι πολύ μικρό ($< 10 \mu\text{m}$). Αντίστοιχη συμπεριφορά παρουσίασε και το αιώρημα κολλαγόνου τύπου I - θεικής χονδροϊτίνης όπως προκύπτει από τα παρακάτω ευρήματα ($p < 0.0001$).



Εικόνα 8 Εικόνες χαρακτηρισμού μέσω ηλεκτρονικής μικροσκοπίας σάρωσης (SEM) ικριωμάτων μίγματος κολλαγόνου – θειικής χονδροϊτίνης που έχουν παραχθεί με τελική θερμοκρασία ψύξης -40°C (a, 1400x) και -20°C (b, 1400x και c, 6000x)

Καθώς η παραγωγή των τελικών κατασκευών απαιτεί εκ παραλλήλου τη δημιουργία των ικριωμάτων στην επιφάνεια των γυαλιών μικροσκοπίας και τη δημιουργία των πλαισίων από πολυδιμεθυλοσιλοξάνη (PDMS), συχνά απαιτείται η προσωρινή φύλαξη των γυαλιών με τα ικριώματα. Η φύλαξη τους σε αυτή την περίπτωση γίνεται σε κατάλληλου μεγέθους δοχεία Petri με κατάλληλη μονωτική ταινία (duct tape) στην περιφέρειά τους. Για τον έλεγχο του κατά πόσο αυτή η διαδικασία προστατεύει αποτελεσματικά τα ικριώματα, ικριώματα κολλαγόνου τύπου I αφήθηκαν για διάστημα 26 ημερών σε περιβαλλοντικές συνθήκες αερισμού, υγρασίας και θερμοκρασίας, με σκοπό τον έλεγχο των χαρακτηριστικών της δομής τους πριν και μετά το πέρας του διαστήματος αυτού. Σημειώνεται πως η υγρασία είναι ο βασικότερος παράγοντας αλλοίωσης των κρίσιμων χαρακτηριστικών των προϊόντων ξήρανσης και για το λόγο αυτό η παραμονή σε περιβαλλοντικές συνθήκες επιλέχθηκε ως ένα περιβάλλον επιταχυνόμενης καταπόνησης του υλικού συγκριτικά με την επιλεγμένη μέθοδο

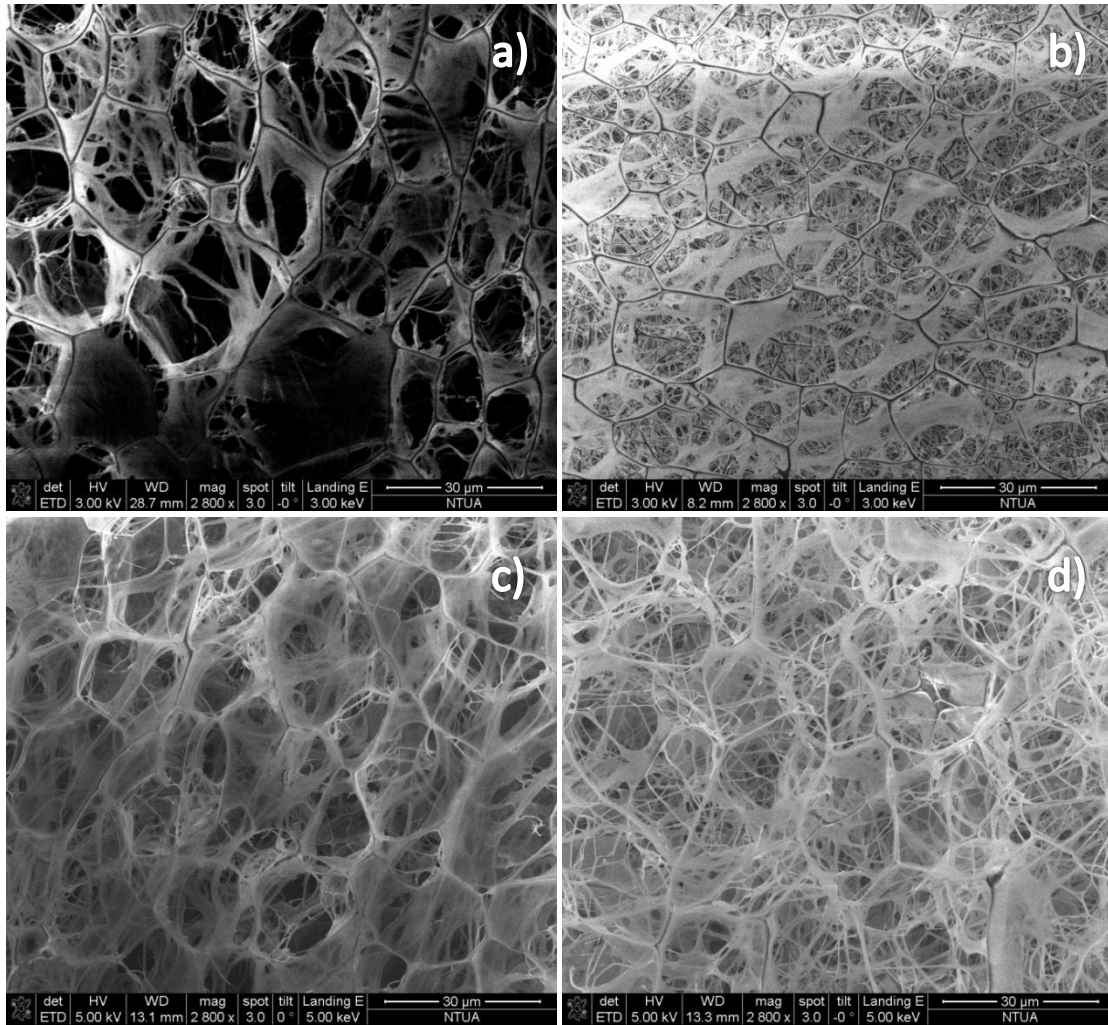
προστασίας. Οι ληφθείσες εικόνες μέσω ηλεκτρονικής μικροσκοπίας σάρωσης παρατίθενται παρακάτω.



Εικόνα 9 Εικόνες χαρακτηρισμού μέσω ηλεκτρονικής μικροσκοπίας σάρωσης (SEM) ικριωμάτων μίγματος κολλαγόνου – θεικής χονδροϊτίνης για χρόνο παραμονής σε ατμοσφαιρικές συνθήκες $t=0$ ημέρες (a, 2800x) και $t=26$ ημέρες (b, 2800x)

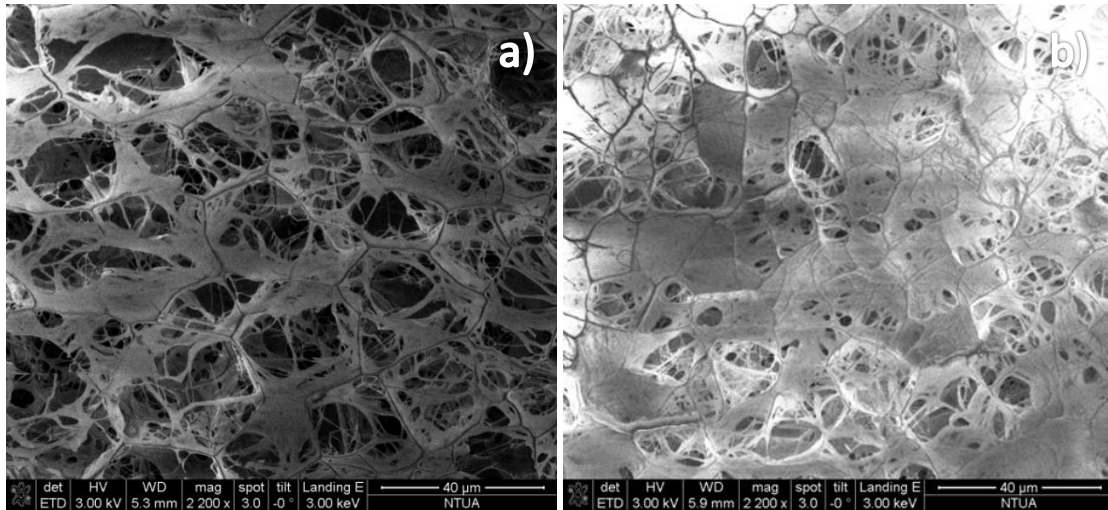
Παρατηρείται πως οι πόροι διατηρούν το μέγεθός τους και οι παρατηρούμενες δομές δεν παρουσιάζουν καθόλου καμπυλότητα, γεγονός που θα θεωρούταν ένδειξη αλλοίωσης. Συνεπώς, η διαπίστωση πως η παραμονή των ικριωμάτων σε περιβαλλοντικές συνθήκες για 26 ημέρες δεν επιφέρει αλλοίωση ($p>0.05$) των κρίσιμων χαρακτηριστικών της δομής τους διασφαλίζει πως αυτά μπορούν να διατηρούνται σε κατάλληλες συνθήκες αποθήκευσης για διάστημα μεγαλύτερο του ενός μηνός.

Καθώς σημαντική πρόκληση για το σχεδιασμό λειτουργικών ικριωμάτων είναι η δυνατότητα δημιουργίας ικριωμάτων με μέση διάμετρο πόρου μέχρι και 120 μm , ελέγχθηκε ο ρόλος της συγκέντρωσης του αιωρήματος σε αυτήν. Για το λόγο αυτό τρία διαφορετικής συγκέντρωσης αιωρήματα κολλαγόνου τύπου I (5 και 2,5 mg/ml) εκτέθηκαν στις ίδιες συνθήκες ξήρανσης. Όπως προκύπτει άμεσα από το χαρακτηρισμό των ικριωμάτων, περαιτέρω μείωση της συγκέντρωσης του κολλαγόνου τύπου I στο αιώρημα δεν επηρεάζει στατιστικά σημαντικά ($p>0.05$) το μέγεθος των πόρων, αλλάζει όμως την πυκνότητα και το πάχος των νηματοειδών δομών που τους δομούν. Στην περίπτωση του αιωρήματος κολλαγόνου τύπου I – θεικής χονδροϊτίνης, χαμηλότερη συγκέντρωση οδηγεί και σε οριακά μεγαλύτερους πόρους ($p,0,05$). Το τελευταίο εύρημα συμφωνεί με τη διαπίστωση πως πυκνότερα διαλύματα συνήθως οδηγούν σε μικρότερους κρυστάλλους και τελικά μικρότερης μέσης διαμέτρου πόρους.



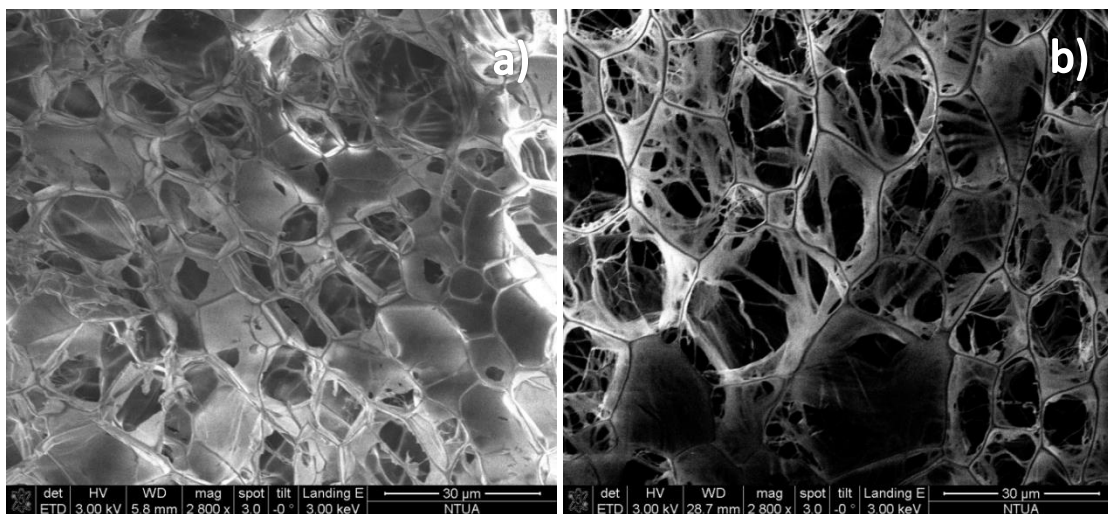
Εικόνα 10 Εικόνες χαρακτηρισμού μέσω ηλεκτρονικής μικροσκοπίας σάρωσης (SEM) ικριωμάτων κολλαγόνου συγκέντρωσης 5 mg/ml (a, 2800x) και 2,5 mg/ml (b, 2800x) και μίγματος κολλαγόνου – θεϊκής χονδροϊτίνης συγκέντρωσης 5,44 mg/ml (c, 2800x) και 2,72 mg/ml (d, 2800x)

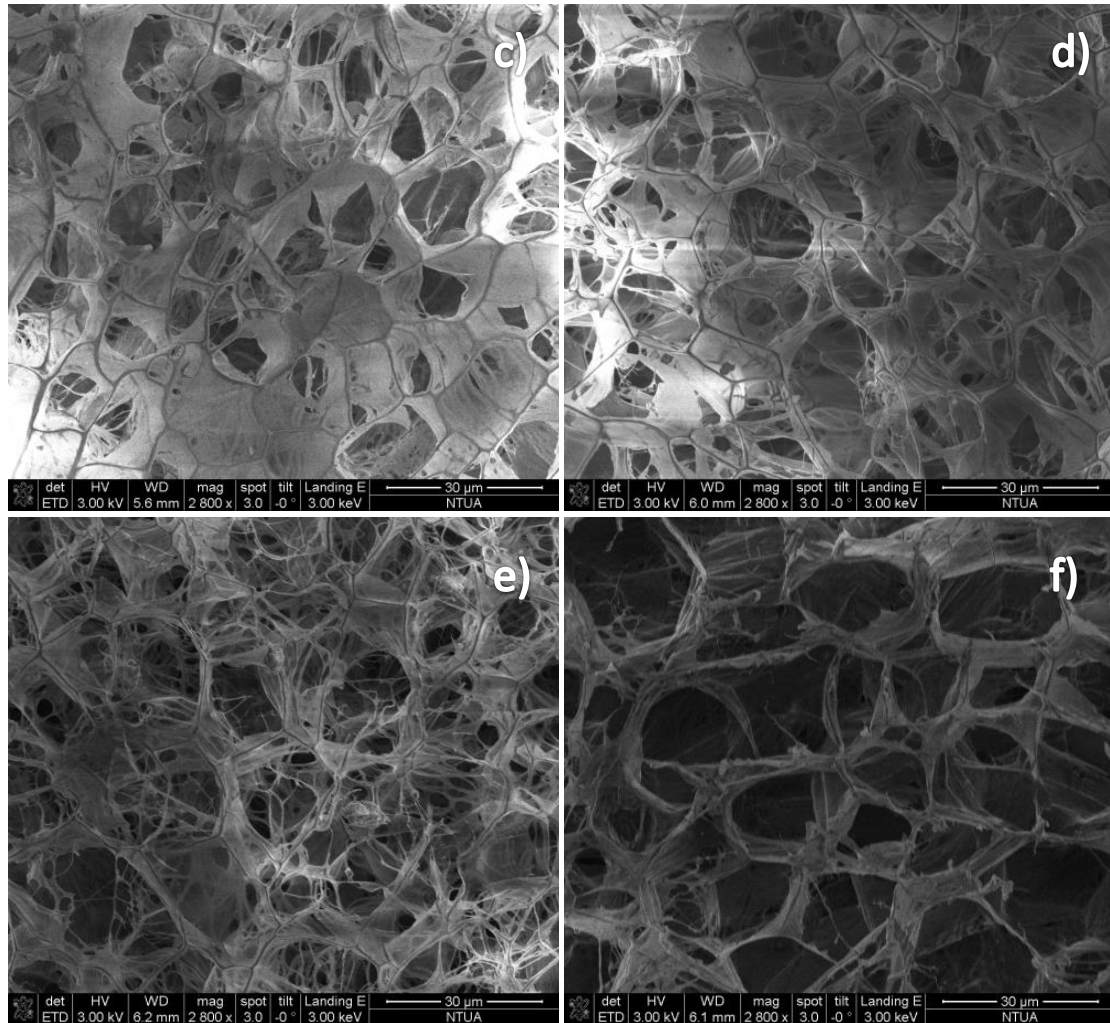
Η παραπάνω πειραματική παρατήρηση επιβεβαιώθηκε ($p > 0.0001$) από την αντιθετοαντίστροφη συμπεριφορά του αιωρήματος κολλαγόνου τύπου I – θεϊκής χονδροϊτίνης, όπου πυκνότερο αιώρημα (9,4 mg/ml) είχε μικρότερους και συχνά κλειστούς πόρους στις ίδιες συνθήκες ξήρανσης με το βασικό αιώρημα (5,44 mg/ml). Το πυκνότερο αιώρημα παρασκευάστηκε με φυγοκέντριση του βασικού αιωρήματος (5,44 mg/ml) (10000 στροφές, 5 λεπτά) και απομάκρυνση του υπερκείμενου υδατικού διαλύματος ακετικού οξέος.



Εικόνα 11 Εικόνες χαρακτηρισμού μέσω ηλεκτρονιακής μικροσκοπίας σάρωσης (SEM) ικριωμάτων μίγματος κολλαγόνου – θειικής χονδροϊτίνης συγκέντρωσης 5,44 mg/ml (a, 2200x) και 9,40 mg/ml (b, 2200x)

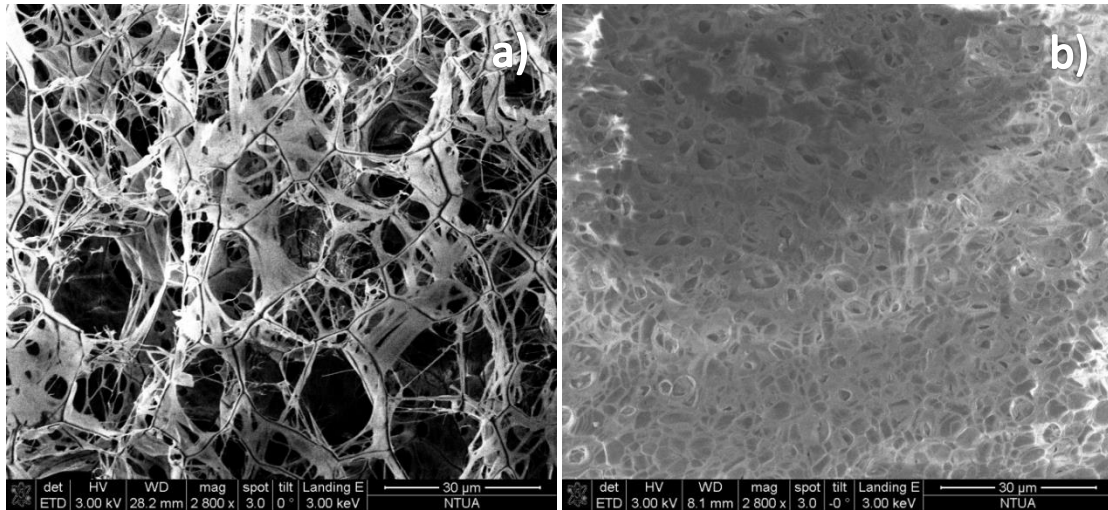
Όπως τεκμηριώθηκε στο θεωρητικό μέρος της παρούσας εργασίας, η επιτυχείς προσομοίωση της εξωκυττάριας μήτρας από ένα βιολογικό απαιτεί την αξιοποίηση ενός μίγματος πρωτεϊνών και γλυκοαμινογλυκανών που (μεταξύ άλλων) αποτελούν το περιβάλλον των κυττάρων *in vivo*. Συνεπώς οι επιθυμητές ιδιότητες των υλικών θα πρέπει να επιτυγχάνονται όχι μόνο στα υπάρχοντα αιωρήματα (κολλαγόνο τύπου I και μίγμα με θειική χονδροϊτίνη) αλλά και σε άλλα που θα προκύψουν σε επόμενα στάδια έρευνας. Θεωρήθηκε συνεπώς σκόπιμη η εξέταση του ρόλου της ζελατίνης (θερμικά μετουσιωμένο κολλαγόνο τύπου I) ως προσθέτου στις υπάρχουσες συνθέσεις. Το συγκεκριμένο πρόσθετο επιλέχθηκε βάσει της ευρείας του απήχησης ως υλικό για εφαρμογές ιστομηχανικής. Το γεγονός αυτό οφείλεται στα επιπλέον σημεία πρόσδεσης (GxOGER και RGD) για τα κύτταρα που επιφέρει η παρουσία της ζελατίνης σε ένα ικρίωμα, ειδικά για εφαρμογές οστεοβλαστών, με σημαντική συμβολή όπως έχει φανεί στην ανάπτυξη και διατήρηση του κατάλληλου φαινοτύπου.





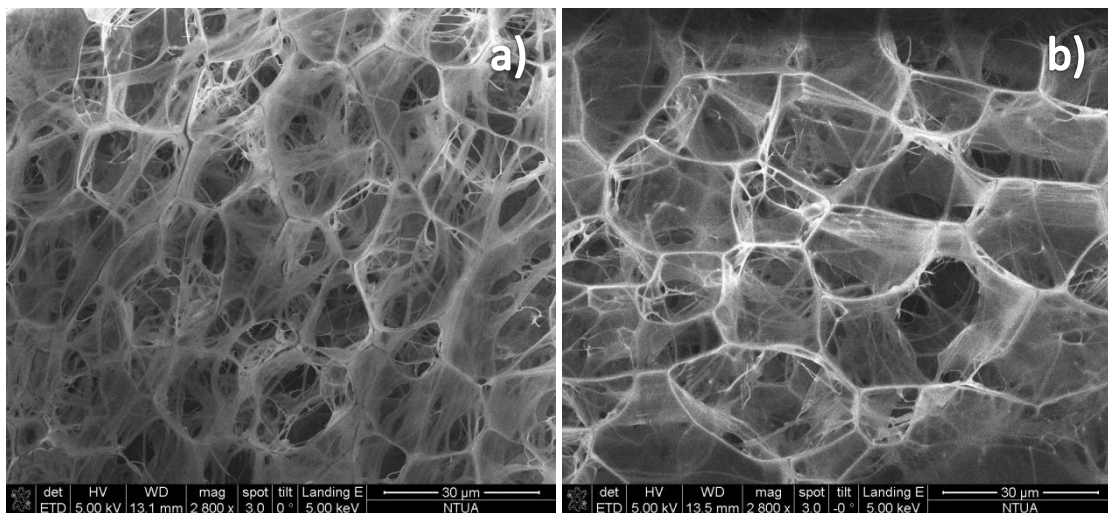
Εικόνα 12 Εικόνες χαρακτηρισμού μέσω ηλεκτρονικής μικροσκοπίας σάρωσης (SEM) ικριωμάτων ζελατίνης (α, 2800x), κολλαγόνου (β, 2800x) και μιγμάτων ζελατίνης – κολλαγόνου σε αναλογία 0,5:0,5 (ε, 2800x), 0,4:0,6 (ε, 2800x), 0,25:0,75 (δ, 2800x) και 0,1:0,9 (ε, 2800x), παραχθέντων στις ίδιες συνθήκες ξήρανσης

Η ζελατίνη προστέθηκε στα δύο βασικά αιωρήματα, στα οποία παρατηρήθηκε ότι επηρεάζει αντίστοιχα τη συμπεριφορά του καθενός. Το μίγμα κολλαγόνου τύπου I – ζελατίνης είχε μειούμενης μέσης διαμέτρου πόρους κατά την αύξηση της συγκέντρωσης της ζελατίνης στο αιώρημα ($p < 0,01$). Αντίστοιχα, και το αιώρημα κολλαγόνου τύπου I - θευκής χονδροϊτίνης παρουσίασε σημαντικά μικρότερους πόρους λόγω της προσθήκης ζελατίνης ($p < 0,01$), όπως φαίνεται και στις παρακάτω εικόνες.



Εικόνα 13 Εικόνες χαρακτηρισμού μέσω ηλεκτρονικής μικροσκοπίας σάρωσης (SEM) ικριωμάτων μίγματος κολλαγόνου – θειικής χονδροϊτίνης συγκέντρωσης 5,44 mg/ml (a, 2800x) και μίγματος κολλαγόνου – θειικής χονδροϊτίνης και ζελατίνης σε αναλογία 1:1 (b, 2800x), σε ίδιες συνθήκες ξήρανσης

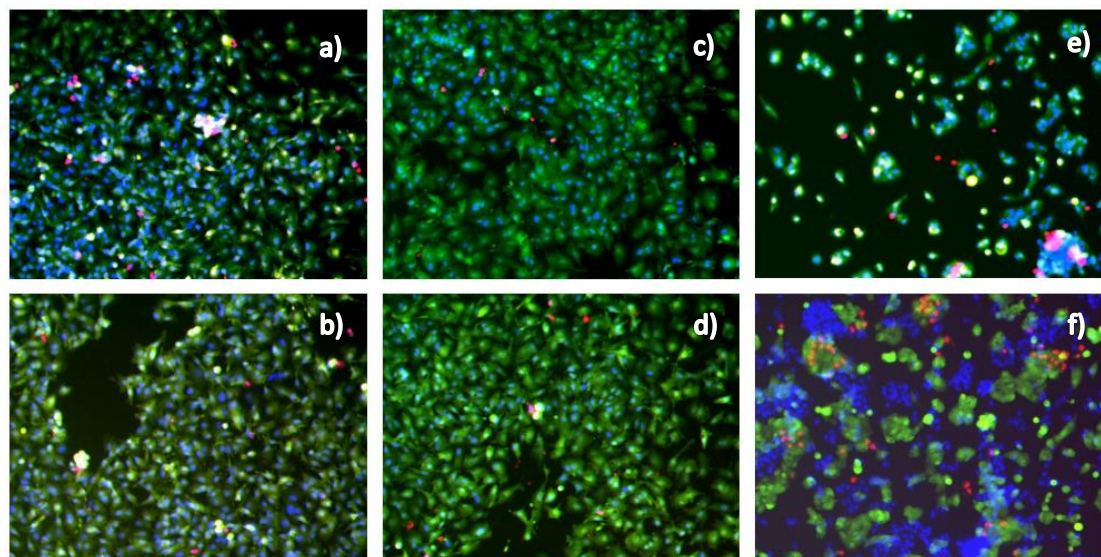
Τονίζεται πως η συμπεριφορά αυτή δεν συνεπάγεται σε καμία περίπτωση πως το ίδιο πρόσθετο αν προστεθεί σε αραιότερη ή πυκνότερη μορφή του αρχικού αιωρήματος θα έχει ανάλογη συνεισφορά στο μέγεθος των πόρων και τη μορφολογία του ικριώματος. Συγκεκριμένα, η προσθήκη της ζελατίνης σε αιώρημα μίγματος κολλαγόνου – θειικής χονδροϊτίνης συγκέντρωσης 2,72 mg/ml δεν επηρέασε στατιστικά σημαντικά τη μέση διαμέτρο των πόρων.



Εικόνα 14 Εικόνες χαρακτηρισμού μέσω ηλεκτρονικής μικροσκοπίας σάρωσης (SEM) ικριωμάτων μίγματος κολλαγόνου – θειικής χονδροϊτίνης συγκέντρωσης 2,72 mg/ml (a, 2800x) και μίγματος κολλαγόνου – θειικής χονδροϊτίνης και ζελατίνης σε αναλογία 1:1 (b, 2800x), σε ίδιες συνθήκες ξήρανσης

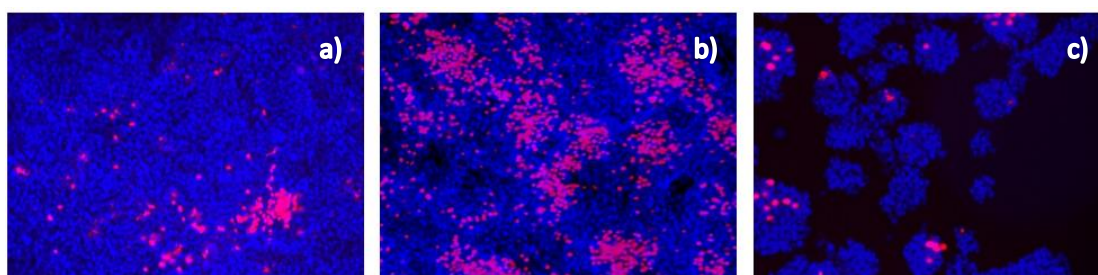
Πέραν της κατανόησης του ρόλου των συνθηκών ξήρανσης με κατάψυξη και της σύστασης των αιωρημάτων για την τελική διαμόρφωση των ικριωμάτων, ανάλογης σημασίας είναι και η τεκμηρίωση της θετικής επίδρασης των πρωτεϊνών της εξωκυττάριας μήτρας και των δομών τους για τα ίδια τα κύτταρα *in vitro*. Για το σκοπό αυτό αρχικά πληθυσμοί κυττάρων

της καρκινικής σειράς HepG2 καλλιιεργήθηκαν σε πλάκα 96 πηγαδίων απουσία πρωτεϊνικής επίστρωσης (coating), παρουσία πρωτεϊνικής επίστρωσης κολλαγόνου τύπου I (τύπου rat tail) (BD Biosciences, NJ, USA) και παρουσία πρωτεϊνικής επίστρωσης κολλαγόνου τύπου IV (BD Biosciences, NJ, USA). Με εφαρμογή της μεθοδολογίας Live/Dead προέκυψαν οι παρακάτω εικόνες με χρήση του εξοπλισμού JuLI™ Stage (NanoEntek Ltd, South Korea).



Εικόνα 15 Απεικόνιση μέσω φθορισμού χρωστικών (μεθοδολογίας Live/Dead, φακός Nikon 10x) HepG2 κυττάρων μετά από παραμονή 24 ωρών σε συνθήκες καλλιέργειας (αρχική συγκέντρωση 20.000 κύτταρα ανά κελί πλάκας 96 κελιών, 100 μl θρεπτικού μέσου στο καθένα) σε επιφάνεια επιστρωμένη με κολλαγόνου τύπου I (a, b), με κολλαγόνο τύπου IV (c, d) και χωρίς επίστρωση (e, f)

Όπως προέκυψε η επίστρωση κολλαγόνου επηρέασε άμεσα τη μορφή της καλλιέργειας των κυττάρων, τα οποία δημιούργασαν μονοστρωματική καλλιέργεια στην επιστρωμένη επιφάνεια, ενώ στην περίπτωση της απουσίας επίστρωσης τα κύτταρα παρουσίασαν τη χαρακτηριστική συμπεριφορά της σειράς HepG2 σχηματισμού συσσωματωμάτων που οδηγεί σε οριακή μείωση της βιοσημότητάς τους.

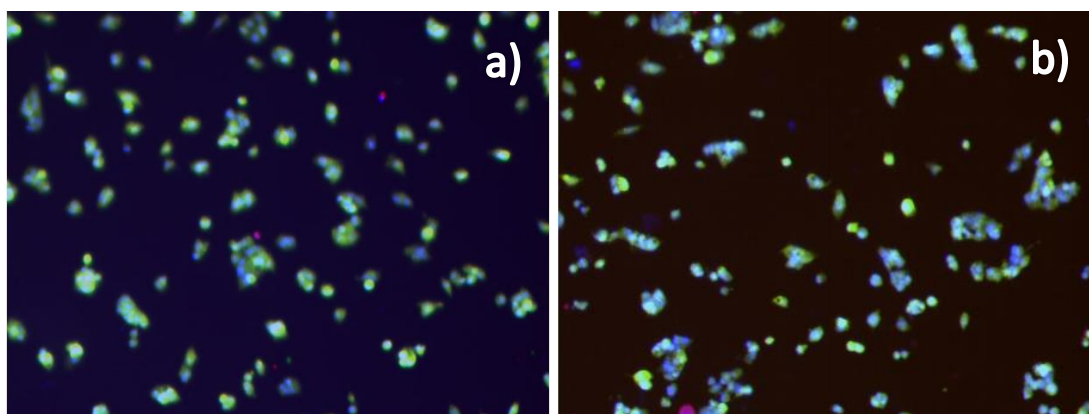


Εικόνα 16 Απεικόνιση μέσω φθορισμού χρωστικών (χρωστικές Propidium iodide, Hoechst, φακός Nikon 10x) HepG2 κυττάρων μετά από παραμονή 36 ωρών σε συνθήκες καλλιέργειας (αρχική συγκέντρωση 10.000 κύτταρα ανά κελί πλάκας 96 κελιών, 100 μl θρεπτικού μέσου στο καθένα) σε ενδιάμεση καλλιέργεια (Sandwich) μεταξύ στρώματος κολλαγόνου τύπου I και Matrigel (a), κολλαγόνου τύπου IV και Matrigel και σε επιφάνεια χωρίς καμία επίστρωση –απλή μονοστρωματική καλλιέργεια στην επιφάνεια του κελιού- (c)

Ακόμα, κύτταρα της ίδιας ηπατικής σειράς καλλιιεργήθηκαν ανάμεσα σε επίστρωση κολλαγόνου τύπου I τύπου rat tail (BD Biosciences, NJ, USA) και στρώματος μίγματος κολλαγόνου, εντακτικής, λαμινίνης και πρωτεογλυκανών θεικής ηπαρίνης (εμπορικό σκεύασμα Matrigel – BD Biosciences, NJ, USA). Η τελευταία περίπτωση καλλιέργειας αποτελεί τη βιβλιογραφικά καταλληλότερη μέθοδο καλλιέργειας για πρωτογενή ηπατοκύτταρα και εφαρμογές τοξικότητας σε αυτά.

Μετά από τρεις ημέρες καλλιέργειας χωρίς αλλαγή θρεπτικού μέσου παρατηρείται ότι η βέλτιστη συνθήκη καλλιέργειας σε όρους βιοσημότητας είναι η ενδιάμεση καλλιέργεια. Ο επαυξημένος κυτταρικός θάνατος στις περιπτώσεις της απλής επίστρωσης και της μη επιστρωμένης επιφάνειας οφείλεται σε δύο διαφορετικές καταστάσεις. Στην πρώτη, τα κύτταρα άμεσα δομούν μονοστρωματική καλλιέργεια ανάλογα με εκείνη που παρατηρήθηκε προηγούμενα και στη συνέχεια ο πολλαπλασιασμός των κυττάρων οδηγεί σε δόμηση επιπλέον στρωμάτων κυττάρων στην επιφάνεια των αρχικών. Η ταχεία αύξηση του αριθμού των κυττάρων και η περιγραφείσα ανάπτυξη δομών έχει ως αποτέλεσμα την αύξηση και του κυτταρικού θανάτου λόγω μεταβολικών και υποξείας. Στη δεύτερη, ο ρυθμός πολλαπλασιασμού είναι πολύ χαμηλότερος ενώ δομούνται τα τυπικά συσσωματώματα. Στην περίπτωση της ενδιάμεσης καλλιέργειας τα κύτταρα οθούνται στην πλήρη μονοστρωματική κάλυψη του ενδιάμεσου χώρου μεταξύ των δύο στρωμάτων. Η διαδικασία αυτή συγκρατεί προστατευμένα τα κύτταρα ενώ τους επιτρέπει να διατηρήσουν περισσότερο την αρχική κυτταροσκελετική τους διαμόρφωση, με αποτέλεσμα μικρότερη θνησιμότητα των κυττάρων.

Μετά από την παρακολούθηση της συμπεριφοράς των κυττάρων στις παραπάνω συνθήκες καλλιέργειας ελέγχθηκε η συμπεριφορά τους σε ικρίωματα κολλαγόνου τύπου I και μίγματος κολλαγόνου τύπου I – θεικής χονδροϊτίνης.



Εικόνα 17 Απεικόνιση μέσω φθορισμού χρωστικών (μεθοδολογία Live/Dead, φακός Nikon 4x) HepG2 κυττάρων μετά από παραμονή 2 ωρών σε συνθήκες καλλιέργειας (αρχική συγκέντρωση 10.000 κύτταρα ανά κελί πλάκας 96 κελιών, 100 μl θρεπτικού μέσου στο καθένα) στα ικρίωματα κολλαγόνου (a) και μίγματος κολλαγόνου – θεικής χονδροϊτίνης

Τα κύτταρα όπως παρατηρήθηκε εισήλθαν στις εσωτερικές δομές του ικριώματος (καθώς σε αντίθετη περίπτωση θα διμούσαν επιφανειακά μονοστρωματική καλλιέργεια), διατηρώντας τρισδιάστατη διαμόρφωση. Η συμπεριφορά αυτή ήταν αντίστοιχη και στους δύο τύπους ικριωμάτων.

Κεφάλαιο 4: Αποτελέσματα

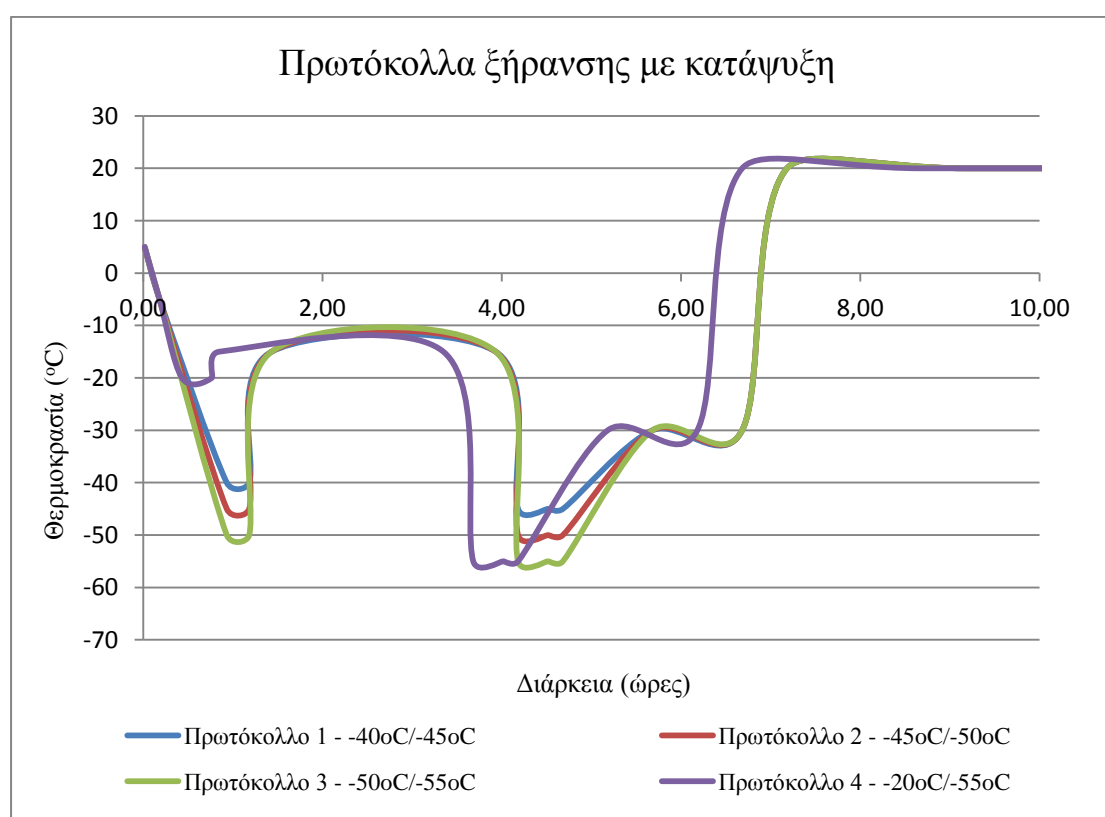
4.1 Παραγωγή ικριωμάτων μέσω ξήρανσης με κατάψυξη

Πέραν των βασικών δύο αιωρημάτων που χρησιμοποιήθηκαν επιτυχώς για τη δημιουργία ικριωμάτων, θεωρήθηκε σκόπιμη η δημιουργία μίας βιβλιοθήκης υλικών βασιζόμενων σε προσθήκη πρωτεϊνών ή γλυκοαμινογλυκανών αιώρημα κολλαγόνου που θα μπορούσαν να χρησιμοποιηθούν τόσο σε μελέτες τοξικότητας όπως η παρούσα όσο και σε άλλες εργαστηριακές τεχνικές όπως η διαφοροποίηση βλαστοκυττάρων. Για το σκοπό αυτό το βασικό αιώρημα κολλαγόνου ενισχύθηκε με αιωρήματα υαλουρονικού οξέος, φαϊμπρονεκτίνης και του εμπορικού σκευάσματος Matrigel και ελέγχθηκε η ικανότητα του τελικού μίγματος να δομήσει πορώδεις δομές σε συνθήκες ξήρανσης με κατάψυξη. Όπως τεκμηριώθηκε στο θεωρητικό μέρος η βασικότερη παράμετρος, ειδική για κάθε δοκίμιο πολυμερούς, είναι η θερμοκρασία υαλώδους μετάβασης η οποία καθορίζει τη θερμοκρασία ψύξης πριν την μεταβολή της πίεσης, ώστε στη μετάβαση αυτή το πολυμερές να συμπεριφέρεται ως κρυσταλλικό.

Η καταλληλότερη μέθοδος για τον προσδιορισμό του σημείου υαλώδους μετάβασης είναι η διαφορική θερμιδομετρία σάρωσης (Differential Scanning Calorimetry - DSC) κατά την οποία υπολογίζεται η διαφορά στη ροή θερμότητας μεταξύ του υπό εξέταση δείγματος και μιας ουσίας αναφοράς, συναρτήσει της θερμοκρασίας, όταν οι δύο ουσίες υπόκεινται σε κοινό ελεγχόμενο πρόγραμμα θέρμανσης ή/και ψύξης. Μέσω ενός λογισμικού οι διάφορες μεταβολές απεικονίζονται σε διαγράμματα μεταβολής θερμοκρασίας δείγματος – θερμοκρασίας έκθεσης (για σταθερό ρυθμό μεταβολής θερμοκρασίας), με τα διαγράμματα που λαμβάνονται να παρουσιάζουν κορυφές απορρόφησης ή έκλυσης θερμότητας σε ορισμένες θερμοκρασίες. Οι θερμοκρασίες αυτές αποτελούν τις θερμοκρασίες στις οποίες συμβαίνει μετάβαση φάσης και τα εμβαδά των αντίστοιχων κορυφών επιτρέπουν τον υπολογισμό της ενθαλπίας της εκάστοτε μετάβασης.

Λόγω του μεγάλου αριθμού δειγμάτων θεωρήθηκε περισσότερο σφώφρων ο έλεγχος του σημείου υαλώδους μετάβασης του εκάστοτε μίγματος να γίνει έμμεσα. Για το σκοπό αυτό όλα τα δημιουργηθέντα μίγματα εκτέθηκαν σε τρεις διαφορετικές συνθήκες ξήρανσης μειούμενης θερμοκρασίας ψύξης (Πρωτόκολλα 1 – 3), με σκοπό την παρατήρηση της τελικής μορφολογίας των λυοφιλοποιημένων δοκιμίων και την εξαγωγή συμπερασμάτων σχετικά με τη θερμοκρασία αλλαγής φάσης. Ο εντοπισμός θερμοκρασίας στην οποία το κάθε αιώρημα αποδίδει πορώδεις δομές ισοδυναμεί με την εύρεση θερμοκρασίας στην οποία το αιώρημα πολυμερούς συμπεριφέρεται ως κρυσταλλικό υλικό –αφού η οι πόροι που δημιουργούνται από την εξάχνωση των κρυστάλλων διατηρούνται ανοιχτοί- και άρα οριοθετεί τις προς

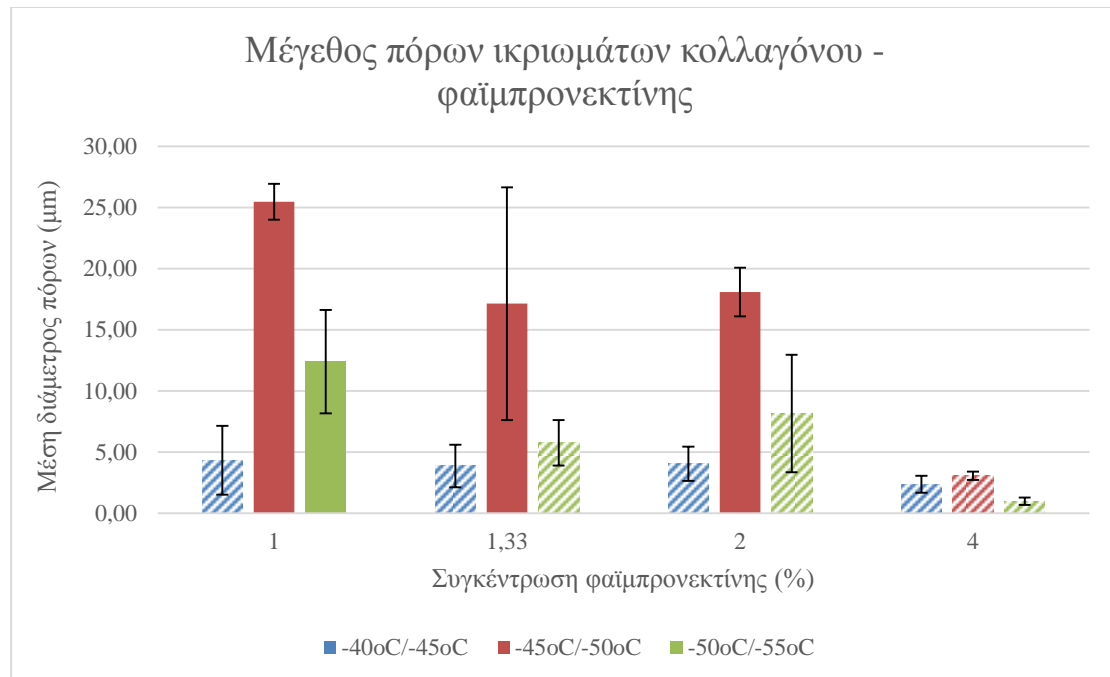
επιλογή συνθήκες ξήρανσης. Η αύξηση (με σταθερό βήμα 5 °C) τόσο της αρχικής θερμοκρασίας ψύξης (θερμοκρασία ψύξης πριν την ανόπτηση) όσο και της τελικής θερμοκρασίας ψύξης (θερμοκρασία μετά την ανόπτηση) έγινε με σκοπό τη μακροσκοπική διασφάλιση της δομής του ικριώματος μέσω της δημιουργίας περισσότερων και μικρότερων πόρων και τη δόμηση ανοιχτών πόρων σε μικρο- κλίμακα επιδιώκοντας την κρυσταλλική συμπεριφορά των μιγμάτων αντίστοιχα. Τα συγκεκριμένα τρία ζεύγη θερμοκρασιών ψύξης (αρχική – τελική) προέκυψαν βάσει των βιβλιογραφικών αναφορών για τα σημεία υαλώδους μετάβασης των ενισχυτικών παραγόντων που χρησιμοποιήθηκαν (όπως το υαλουρονικό οξύ, -44 °C*), που χωρίς να επηρεάζουν γραμμικά την αντίστοιχη θερμοκρασία του μίγματος αποτέλεσαν ένδειξη της κατεύθυνσης στην οποία πιθανά αυτή θα μεταβαλλόταν.



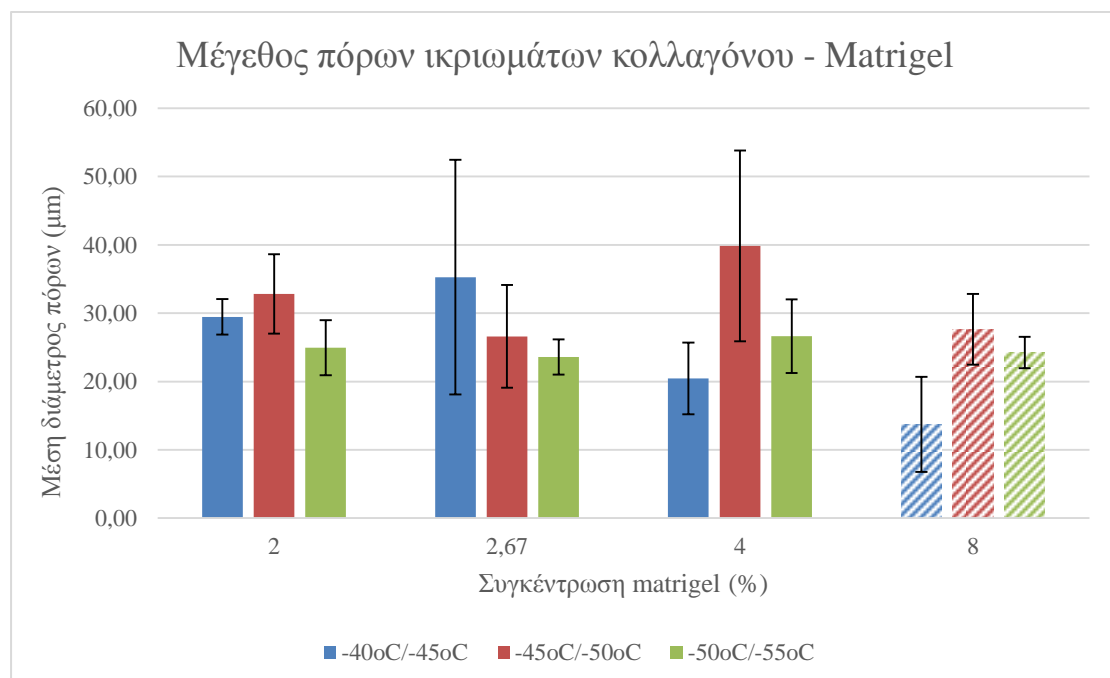
Εικόνα 18 Απεικονιστικό διάγραμμα των τεσσάρων διαφορετικών πρωτοκόλλων θερμοκρασίας ανά χρονική στιγμή στη διεργασία ξήρανσης με κατάψυξη

Η επιλογή αυτή εκ των υστέρων κρίθηκε ως σωστή καθώς ορισμένα μίγματα σε υψηλότερες θερμοκρασίες ψύξης παρουσίαζαν κατάρρευση ενώ σε χαμηλότερες δημιούργησαν πορώδεις δομές. Αντίστοιχα προς αυτή τη συμπεριφορά, ορισμένα μίγματα παρουσίασαν μεγαλύτερους πόρους στο μεσαίο εύρος θερμοκρασιών (εκ των τριών), γεγονός που σημαίνει πως σε αυτό το εύρος επιτυχανόταν καλύτερος συγκερασμός μεταξύ της μείωσης της διαμέτρου των πόρων που προκαλεί η χαμηλότερη αρχική θερμοκρασία ψύξης και της μειωμένης πλαστικότητας (ή αυξημένης κρυσταλλικότητας) που οφείλεται σε χαμηλότερη τελική

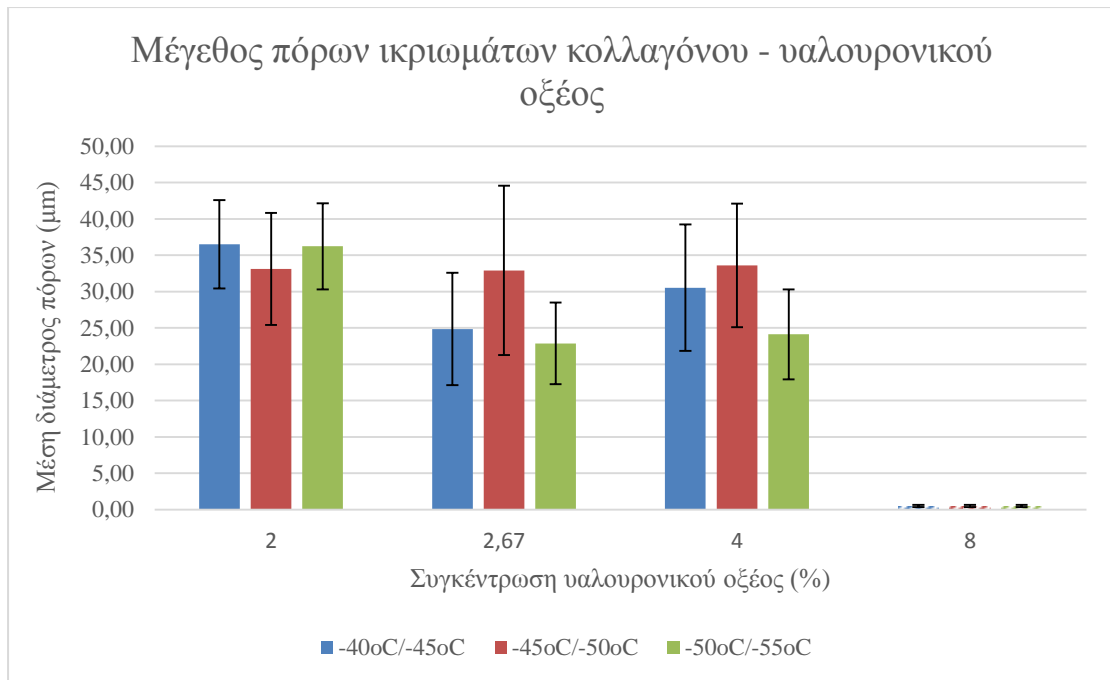
θερμοκρασία ψύξης. Τα αποτελέσματα που προέκυψαν ανά μίγμα κολλαγόνου και του εκάστοτε ενισχυτικού παράγοντα φαίνονται παρακάτω.



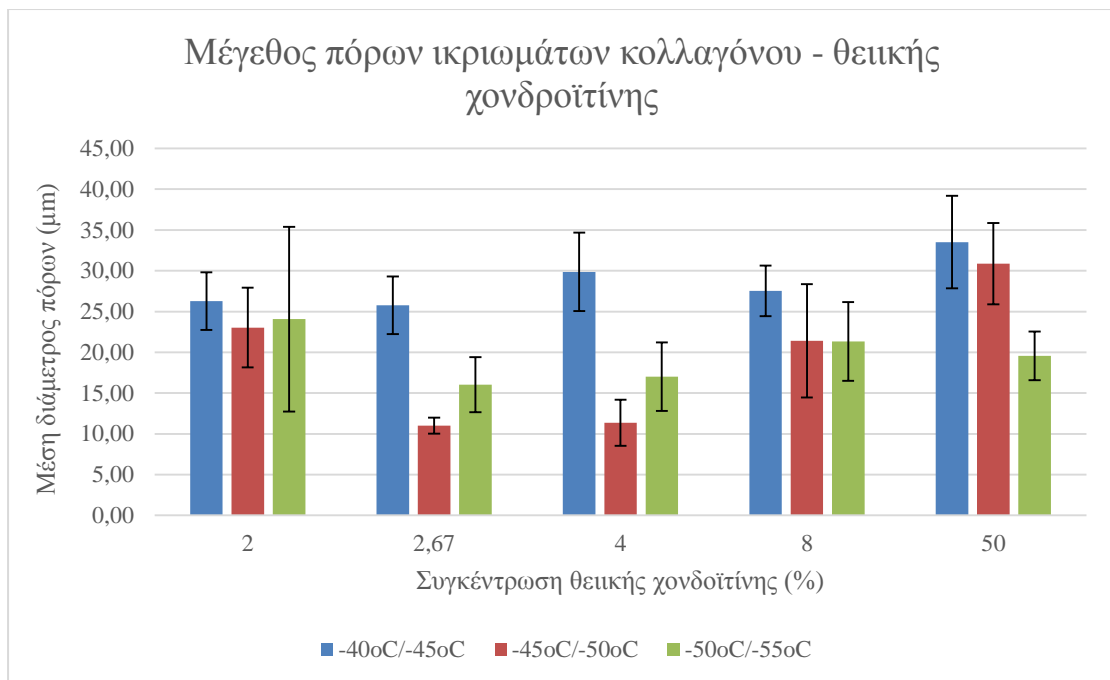
Εικόνα 19 Διάγραμμα μέσης διαμέτρου πόρου ικτριώματος κολλαγόνου – φαϊμπρονεκτίνης ανά ποσοστιαία συγκέντρωση φαϊμπρονεκτίνης (1%, 1,33%, 2%, 4%) στο τελικό μίγμα και ανά θερμοκρασιακό ζεύγος επεξεργασίας (-40 °C/-45 °C, -45 °C/-50 °C, -50 °C/-55 °C) – μοτίβο διαγραφής ισοδυναμεί με κλειστούς πόρους



Εικόνα 20 Διάγραμμα μέσης διαμέτρου πόρου ικτριώματος κολλαγόνου – Matrigel ανά ποσοστιαία συγκέντρωση Matrigel (2%, 2,67%, 4%, 8%) στο τελικό μίγμα και ανά θερμοκρασιακό ζεύγος επεξεργασίας (-40 °C/-45 °C, -45 °C/-50 °C, -50 °C/-55 °C) – μοτίβο διαγραφής ισοδυναμεί με κλειστούς πόρους



Εικόνα 21 Διάγραμμα μέσης διαμέτρου πόρου κριώματος κολλαγόνου – υαλουρονικού οξέος ανά ποσοστιαία συγκέντρωση υαλουρονικού οξέος (2%, 2,67%, 4%, 8%) στο τελικό μίγμα και ανά θερμοκρασιακό ζεύγος επεξεργασίας (-40 °C/-45 °C, -45 °C/-50 °C, -50 °C/-55 °C) – μοτίβο διαγραφής ισοδυναμεί με κλειστούς πόρους



Εικόνα 22 Διάγραμμα μέσης διαμέτρου πόρου κριώματος κολλαγόνου – θειικής χονδροϊτίνης ανά ποσοστιαία συγκέντρωση θειικής χονδροϊτίνης (2%, 2,67%, 4%, 8%, 13,5%) στο τελικό μίγμα και ανά θερμοκρασιακό ζεύγος επεξεργασίας (-40 °C/-45 °C, -45 °C/-50 °C, -50 °C/-55 °C) – μοτίβο διαγραφής ισοδυναμεί με κλειστούς πόρους

Στα συνολικά δεδομένα από τον χαρακτηρισμό των κριωμάτων με ηλεκτρονική μικροσκοπία σάρωσης (SEM) έγινε στατιστική επεξεργασία με ανάλυση διακύμανσης χωρίς αλληλεπίδραση, με σκοπό τον έλεγχο της επίδρασης των ανεξάρτητων μεταβλητών

(θερμοκρασία ψύξης, είδος προσθέτου, αναλογία προσθέτου) στις εξαρτημένες (μέση διάμετρος πόρων, τυπική απόκλιση, ανοιχτό ή κλειστό πορώδες). Τα αποτελέσματα της στατιστικής ανάλυσης παρουσιάζονται παρακάτω. Σημειώνεται πως λόγω σταθερής σχέσης μεταξύ των θερμοκρασιών αρχικής και τελικής ψύξης σε κάθε πρωτόκολλο (1-3), στη στατιστική επεξεργασία συμπεριλήφθη μόνο η τελική θερμοκρασία ψύξης.

Πίνακας 1 Αποτελέσματα ανάλυσης διακύμανσης μίας κατεύθυνσης (one-way ANOVA) ανά ανεξάρτητη και εξαρτημένη μεταβλητή στα αποτελέσματα χαρακτηρισμού των ικριωμάτων που προέκυψαν από την εφαρμογή των πρωτοκόλλων 1 – 3.

		Εξαρτημένες μεταβλητές		
		Μέση διάμετρος πόρων	Τυπική απόκλιση	Ανοιχτό ή κλειστό πορώδες
Ανεξάρτητες μεταβλητές	Θερμοκρασία ψύξης	<0,0001	<0,0001	<0,0001
	Είδος προσθέτου	<0,0001	<0,0001	<0,0001
	Αναλογία προσθέτου	<0,0001	>0,05	<0,001

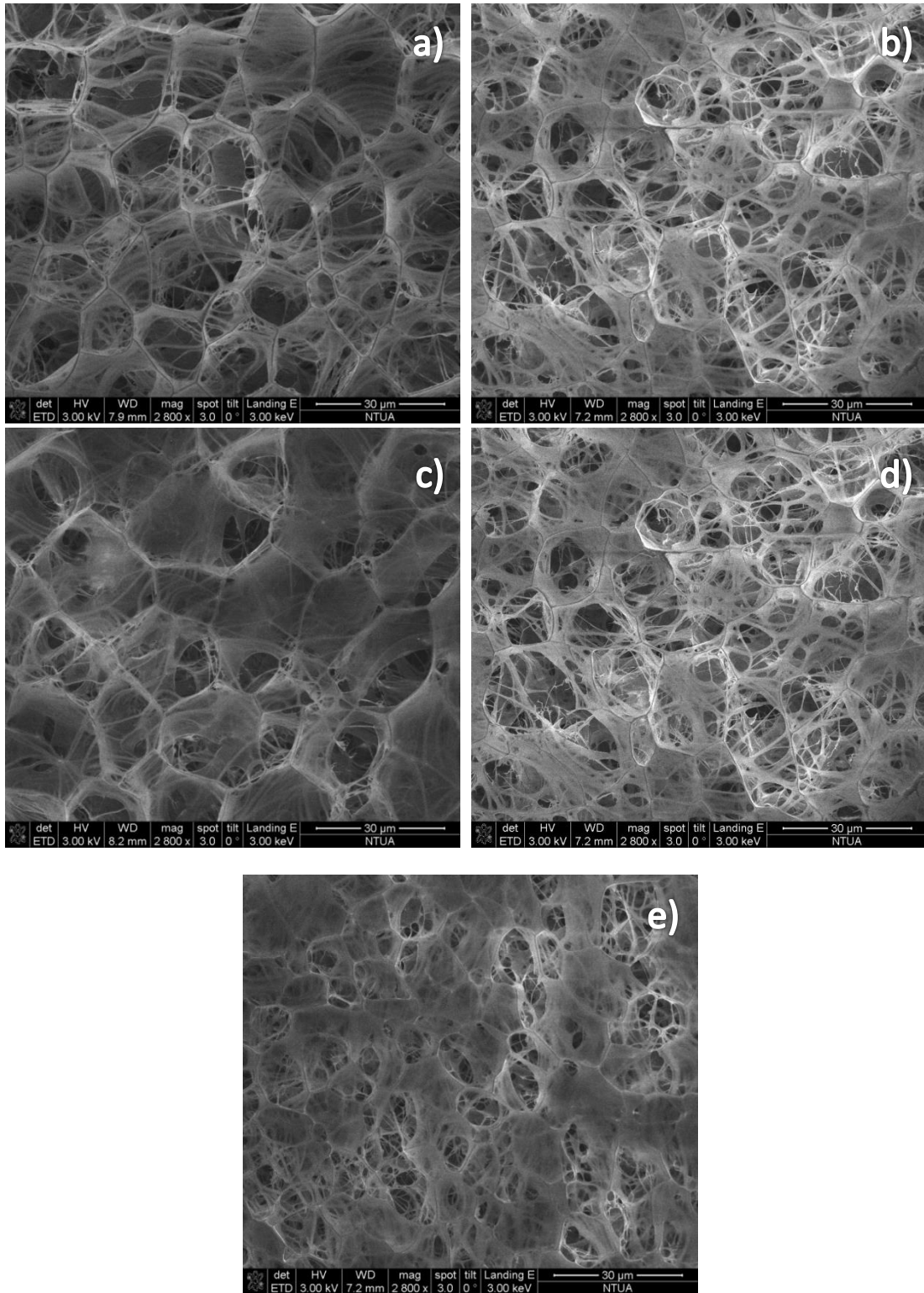
Όπως προέκυψε από τη στατιστική επεξεργασία, η τελική θερμοκρασία ψύξης των αιωρημάτων, το είδος και η αναλογία του προσθέτου επηρέασαν στατιστικά σημαντικά τη μέση διάμετρο των πόρων και το κατά πόσο είναι ανοιχτοί ή κλειστοί οι πόροι, με την τυπική απόκλιση να μην επηρεάζεται από την αναλογία του προσθέτου. Ειδικότερα, χαμηλότερη τελική θερμοκρασία ψύξης οδήγησε σε δημιουργία πορώδους δομής σε μίγματα που σε υψηλότερη θερμοκρασία δεν παρουσίαζαν ανοιχτούς πόρους. Αντίστοιχα, το είδος του προσθέτου διαφοροποίησε την τελική δομή των ικριωμάτων για ίδιες συνθήκες ξήρανσης και αναλογίες προσθέτων, όπως στην περίπτωση του υαλουρονικού οξέος που σε αναλογία 8% στο τελικό μίγμα δεν κατέστη δυνατό να δημιουργήσει πορώδη δομή. Ακόμα, μειωμένη αναλογία προσθέτου στο τελικό μίγμα οδήγησε σε ανοιχτούς και μεγαλύτερους πόρους στις ίδιες συνθήκες ξήρανσης σε πρακτικά όλες τις περιπτώσεις μιγμάτων.

Από τα τρία πρωτόκολλα λυοφιλοποίησης που εφαρμόστηκαν επιλέχθηκε ένα μίγμα ανά ενισχυτικό παράγοντα, με κριτήριο το μέγιστο μέγεθος των πόρων, την ελάχιστη διακύμανση του μεγέθους τους και τη μέγιστη ποσότητα ενισχυτικού παράγοντα. Συμμετοχή στην τελική επιλογή έλαβε και η σύγκριση της συμπεριφοράς των διαφορετικών μιγμάτων στην ίδια θερμοκρασία. Βάσει των παραπάνω, τα μίγματα που επιλέχθηκαν ήταν το μίγμα κολλαγόνου – φαϊμπρονεκτίνης 1%, το μίγμα κολλαγόνου – matrigel 2,67%, το μίγμα κολλαγόνου – υαλουρονικού οξέος 2,67% και το διάλυμα κολλαγόνου – θευκής χονδροϊτίνης 8,67%, που μαζί με αιώρημα αποκλειστικά κολλαγόνου εκτέθηκαν σε ένα νέο πρωτόκολλο (4) ξήρανσης με κατάψυξη με αρχική θερμοκρασία ψύξης -20 °C και τελική -50 °C. Η επιλογή της πρώτης

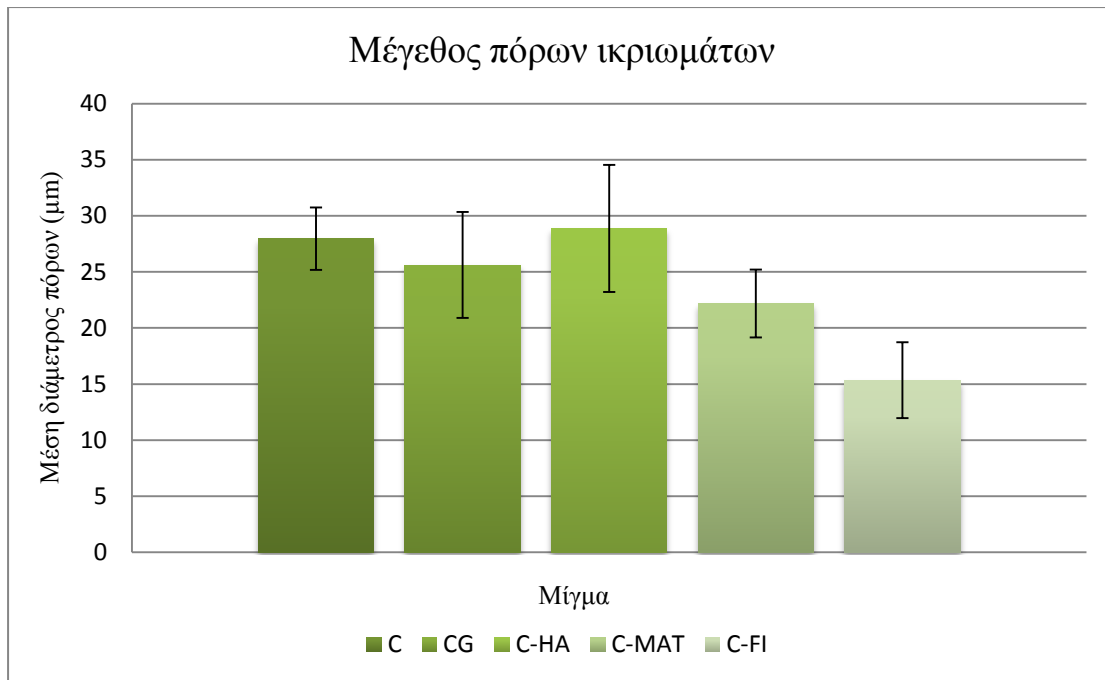
έγινε μέσω συγκερασμού της γενικής αρχής σε ανάλογες διεργασίες λυοφιλοποίησης όπου υψηλότερη αρχική θερμοκρασία ψύξης οδηγεί σε λιγότερους και μεγαλύτερους κρυστάλλους (και συνεπώς τελικώς μεγαλύτερους πόρους και της θερμοκρασίας στερεοποίησης των υδατικών διαλυμάτων νερού – ακετικού οξέος, που ήταν ο διαλύτης σε όλες τις περιπτώσεις μιγμάτων. Η τελική θερμοκρασία ψύξης επιλέχθηκε βάσει των αποτελεσμάτων των πρωτοκόλλων 1 – 3 αφού σε αυτή φάνηκε ότι εξασφαλίζεται η συμπεριφορά των επιλεγθέντων μιγμάτων πολυμερών ως κρυσταλλικά, επιτρέποντας συνεπώς τη δημιουργία πορώδους δομής. Γενικότερα, επιδιώκεται η επίτευξη των επιθυμητών ιδιοτήτων πορώδους στα ικρίωματα στην υψηλότερη δυνατή θερμοκρασία (δεδομένου ότι αυτή θα είναι κάτω από 0 °C) για οικονομικούς και ενεργειακούς λόγους.

4.2 Χαρακτηρισμός νέων ικριωμάτων

Τα επιλεγθέντα ως περισσότερο υποσχόμενα μίγματα εκτέθηκαν στις συνθήκες του μοντέλου 4 και τα παραχθέντα ικρίωματα χαρακτηρίστηκαν ως προς το ανοιχτό του πορώδους τους, το μέγεθος και την ομοιογένεια (τυπική απόκλιση διαμέτρου) των πόρων τους μέσω ηλεκτρονικής μικροσκοπίας σάρωσης. Τα αποτελέσματα φαίνονται παρακάτω.



Εικόνα 23 Αποτελέσματα χαρακτηρισμού των ικριωμάτων που παρασκευάστηκαν με το πρωτόκολλο 4 μέσω ηλεκτρονικής μικροσκοπίας σάρωσης (SEM) – Ικρίωμα κολλαγόνου (a), κολλαγόνου - θεϊκής χονδροϊτίνης (b), κολλαγόνου – υαλουρονικού οξέος (c), κολλαγόνου – Matrigel (d), κολλαγόνου – φαϊμπρονεκτίνης (e)



Εικόνα 24 Μέση διάμετρος πόρων ικριωμάτων κολλαγόνου (C), κολλαγόνου – θεϊκής χονδροϊτίνης (CG), κολλαγόνου – υαλουρονικού οξέος (C-HA), κολλαγόνου – Matrigel (C-MAT), κολλαγόνου – φαϊμπρονεκτίνης (C-FI) που παρασκευάστηκαν με το πρωτόκολλο 4 – Χαρακτηρισμός μέσω ηλεκτρονιακής μικροσκοπίας σάρωσης (SEM)

Όπως προέκυψε από τον χαρακτηρισμό των ικριωμάτων οι πόροι των επιλεχθέντων μιγμάτων για την Παρασκευή νέων βιοϋλικών απέδωσε πόρους μικρότερης διαμέτρου από ό,τι αρχικά αναμενόταν. Καθώς η υψηλότερη αρχική θερμοκρασία ψύξης θα οδηγούσε σε αύξηση του μεγέθους των πόρων συγκριτικά με τα αποτελέσματα των πειραματικών μεθοδολογιών που εφαρμόστηκαν στα πρωτόκολλα 1 – 3 και αντίστοιχα η τελική θερμοκρασία ψύξης των -50°C θα έβγυχε αποτελεσματικά τα δοκίμια ώστε να συμπεριφερθούν ως κρυσταλλικά, οι σχετικά μικροί πόροι αποδίδονται στις επιδράσεις περιβαλλοντικών παραγόντων στη διάρκεια του πειράματος. Ειδικότερα, οι περιβαλλοντικές συνθήκες που επικρατούν επιδρούν άμεσα στην ποιότητα του πλάσματος που χρησιμοποιείται για την ανάπτυξη υδροφιλίας στην επιφάνεια των γυαλιών μικροσκοπίας, καθώς αυτό είναι ατμοσφαιρικό. Συνεπώς, ημέρες με υψηλότερη θερμοκρασία, υπάρχει υψηλότερη απόλυτη υγρασία στον ατμοσφαιρικό αέρα με αποτέλεσμα τη χαμηλότερη απόδοση της διεργασίας του πλάσματος. Η χαμηλότερη υδροφιλία της επιφάνειας που έχει αυτό ως συνέπεια, οδηγεί σε μικρότερη εφάπλωση της σταγόνας του εκάστοτε αιωρήματος επάνω στο γυαλί με αποτέλεσμα τη διαφοροποίηση του αναγκαίου βάθους εισχώρησης της ψύξης. Παρά το ότι οι διαφορές σε επίπεδο διαστάσεων είναι πολύ μικρές, το γεγονός πως η τάξη μεγέθους των δοκιμίων είναι μερικών μικρόλιτρων καθιστά σημαντικά τέτοια φαινόμενα. Στο πλαίσιο αυτό, οι υψηλότερες θερμοκρασίες που επικρατούν κατά τους θερινούς μήνες εντείνουν το ρυθμό εξάτμισης των σταγόνων των αιωρημάτων άπαξ και αυτές έχουν τοποθετηθεί στα γυαλιά μικροσκοπίας. Ο παράγοντας αυτός φάνηκε να έχει στατιστικά σημαντική επίδραση στη μέση διάμετρο των πόρων των

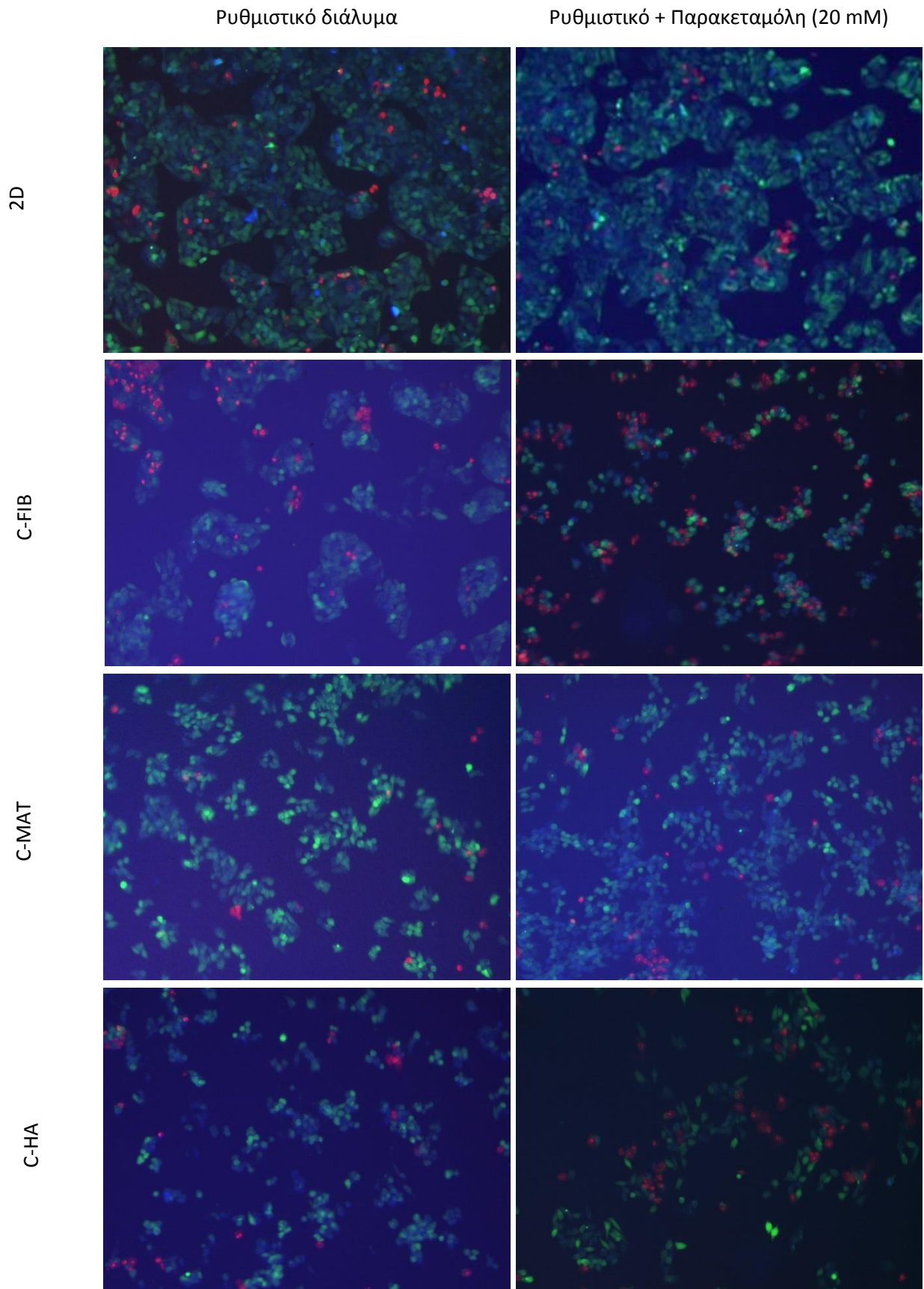
ικριωμάτων ($p < 0,0001$), στο κατά πόσο οι πόροι είναι ανοιχτοί ή κλειστοί ($p < 0,0001$) και στην ομοιογένεια των πόρων (τυπική απόκλιση μέσης διαμέτρου) ($p < 0,001$) στη διάρκεια της πειραματικής διαδικασίας των πρωτοκόλλων 2-3 (Πιν. 12).

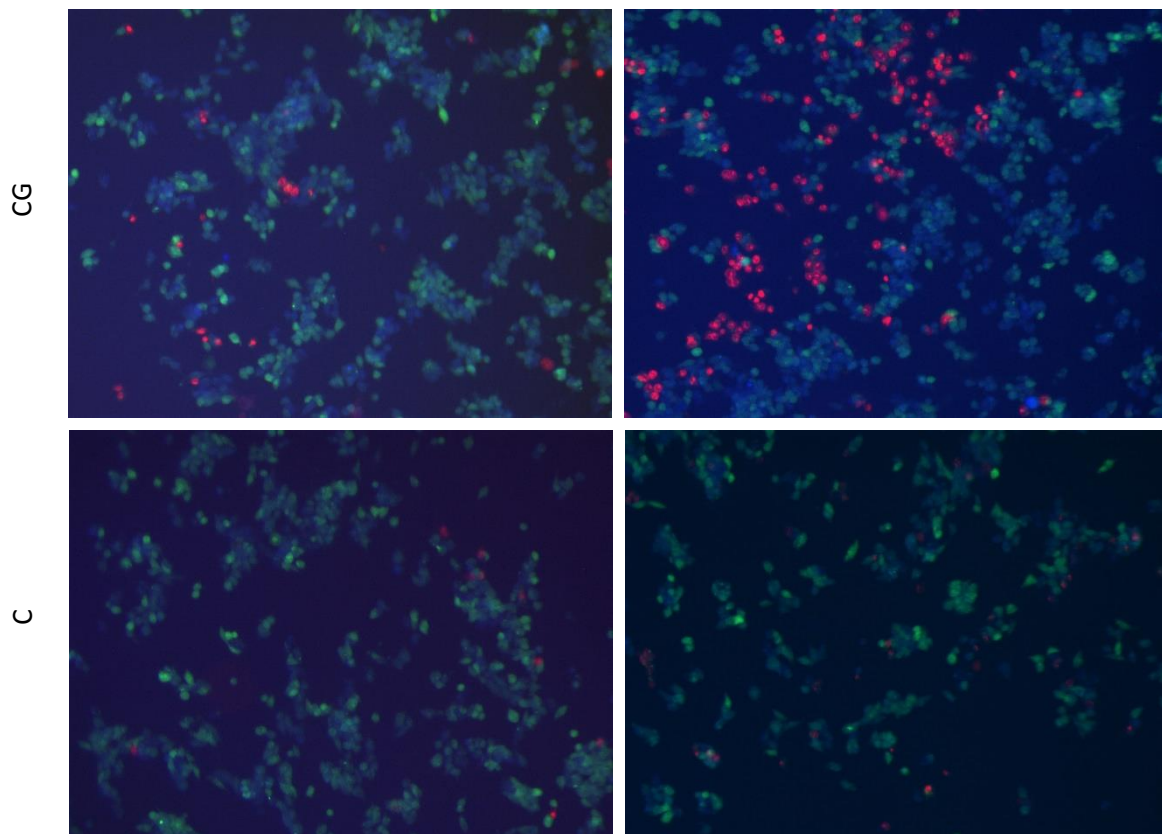
4.3 Βιολογική εφαρμογή - Επαγωγή τοξικότητας από παρακεταμόλη

Τα πορώδη ικριώματα κολλαγόνου και μιγμάτων του εκτέθηκαν σε υπεριώδη ακτινοβολία ώστε να αποστειρωθούν χρησιμοποιήθηκαν για την πραγματοποίηση πειραματικού ελέγχου των αποτελεσμάτων της επαγωγής τοξικότητας από παρακεταμόλη σε κύτταρα της σειράς HepG2. Τα κύτταρα εφόσον επιστρώθηκαν σε πλάκα 96 κελιών αφέθηκαν για 48 ώρες να αναπτυχθούν και στη συνέχεια εκτέθηκαν σε τοξική δόση παρακεταμόλης για 2 ώρες. Για κάθε περίπτωση συνθήκης καλλιέργειας κρατήθηκε και αρνητικός μάρτυρας, όπου απουσίαζε η παρακεταμόλη και είχε προστεθεί αποκλειστικά ρυθμιστικό διάλυμα σε ίδια αναλογία ως προς το θρεπτικό μέσο. Καθώς κατά την πειραματική διαδικασία φάνηκε πως δεν ήταν δυνατή η ταυτόχρονη παρατήρηση σε μία εικόνα (μέσω επαλληλίας) των σημάτων των χρωστικών Calcein AM και mBCI παρατίθενται ξεχωριστά οι αντίστοιχες εικόνες, με παρόν και στις δύο περιπτώσεις το σήμα της χρωστικής Propidium iodide. Αμέσως μετά ακολούθησε μικροσκοπία φθορισμού με κατάλληλες χρωστικές. Καθώς δεν κατέστη δυνατό οι εικόνες που ελήφθησαν από τη μικροσκοπία φθορισμού να αναλυθούν με κατάλληλα υπολογιστικά μέσα και να προκύψουν ποσοτικά δεδομένα, η ανάλυσή τους είναι ποιοτική.

Τα κύτταρα σε όλες τις περιπτώσεις ικριωμάτων μπόρεσαν να εισέλθουν στο εσωτερικό τους και αναπτυχθούν εντός αυτού. Οι καρκινικές σειρές ηπατοκυττάρων έχουν ως συνήθη συμπεριφορά *in vitro* να πολλαπλασιάζονται ταχύρρυθμα όταν υπάρχει μεγάλη κυτταρική πυκνότητα. Σε όλες τις περιπτώσεις ικριωμάτων η κυτταρική πυκνότητα ήταν μικρότερη στα ικριώματα συγκριτικά με το κελί της πλάκας 96 κελιών μετά από 48 ώρες από τη διοχέτευση των κυττάρων σε αυτά. Η παρατήρηση αυτή δικαιολογείται από το γεγονός πως τα κύτταρα δεν κατανεμήθηκαν μόνο στην επιφάνεια του κελιού αλλά και στις τρεις διαστάσεις του χώρου στο εσωτερικό του ικριώματος, πράγμα που πρακτικά αύξησε τις επιφάνειες προσκόλλησης των κυττάρων και τελικά τις αποστάσεις μεταξύ τους, μειώνοντας το ρυθμό πολλαπλασιασμού τους. Ακόμα, τα κύτταρα που καλλιεργήθηκαν στα ικριώματα παρουσίασαν μία πιο συνεκτική και σφαιρική εξωτερική διαμόρφωση σε τρεις διαστάσεις ενώ εκείνα που βρίσκονταν στη μονοστρωματική καλλιέργεια είτε υιοθέτησαν διαμόρφωση παράλληλη στην επιφάνεια του κελιού ή δόμησαν μεγάλης διαμέτρου συσσωματώματα, βασικό χαρακτηριστικό της εν λόγω σειράς. Το τελευταίο έχει ως αποτέλεσμα τη δημιουργία συνθηκών υποξείας για τα κύτταρα που βρίσκονται στο εσωτερικό των συσσωματωμάτων

και παράλληλη απομόνωσή τους από τον ξενοβιοτικό παράγοντα και συνεπώς είναι ανεπιθύμητη συνήθως σε in vitro εφαρμογές.

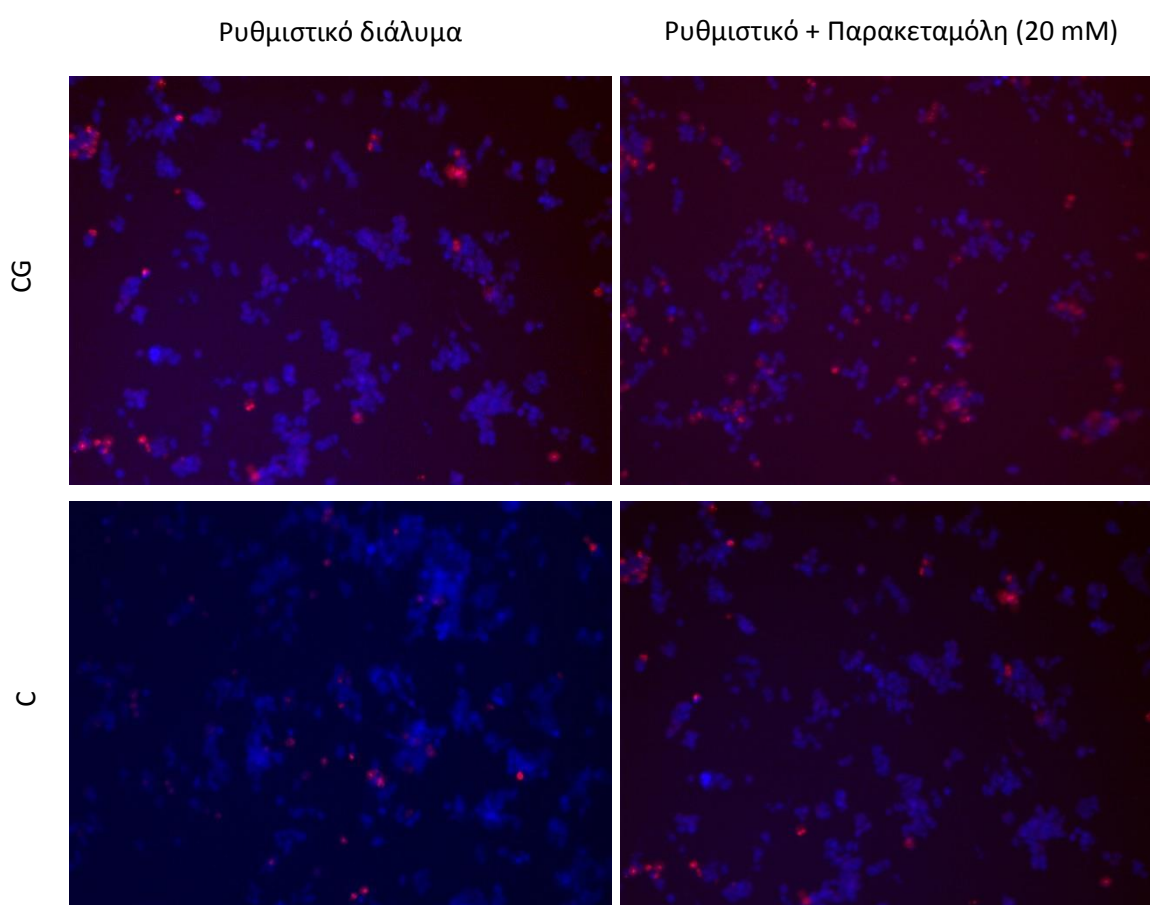




Εικόνα 25 Απεικόνιση μέσω των χρωστικών PI, Choist AM, της επίδρασης παρακεταμόλης έναντι αρνητικού μάρτυρα σε κοινή μονοστρωματική καλλιέργεια πλάκας 96 κελιών και σε ικριωμάτων κολλαγόνου (C), κολλαγόνου – θειικής χονδροϊτίνης (CG), κολλαγόνου – υαλουρονικού οξέος (C-HA), κολλαγόνου – Matrigel (C-MAT), κολλαγόνου – φαίμπρονεκτίνης (C-FI) που παρασκευάστηκαν με το πρωτόκολλο 4

Στη δισδιάστατη μονοστρωματική καλλιέργεια, τα κύτταρα δεν παρουσίασαν ορατές μεταβολές λόγω της έκθεσής τους σε τοξική ποσότητα παρακεταμόλης καθώς δεν παρουσιάστηκε αυξημένη θνησιμότητα συγκριτικά με τον αρνητικό μάρτυρα. Η συμπεριφορά αυτή δικαιολογείται πιθανά από το γεγονός πως πρόκειται για καρκινικά κύτταρα και συνεπώς παρουσιάζουν αυξημένη αντοχή συγκριτικά με τα υγιή που διαταράσσονται από τα υψηλά επίπεδα παρακεταμόλης με αποτέλεσμα ηπατικές βλάβες *in vivo*. Σε αντίθεση με τη μονοστρωματική καλλιέργεια, η καλλιέργεια σε πορώδη ικρίωματα φάνηκε να αυξάνει την ευαισθησία των κυττάρων HepG2 στην επίδραση της παρακεταμόλης, με αποτέλεσμα την εκδήλωση μεγαλύτερης θνησιμότητας σε αυτά. Καθώς οι παρατηρήσεις επί των αποτελεσμάτων είναι ποιοτικού χαρακτήρα δεν μπορούν να εξαχθούν ασφαλή συμπεράσματα για το αν το είδος και η ποσότητα των προσθέτων στα μίγματα κολλαγόνου επηρέασαν τη δράση της παρακεταμόλης και του μεταβολίτη NAPQI σε αυτά. Υπάρχει μία σαφής ένδειξη πως το ικρίωμα που αποτελούταν αποκλειστικά από κολλαγόνο παρουσίασε χαμηλή ευαισθησία στην παρακεταμόλη, μία συμπεριφορά αντίστοιχη της μονοστρωματικής καλλιέργειας και αντίρροπη εκείνης των υπολοίπων ικριωμάτων που είχαν προκύψει από μίγματα. Αυτό αποτελεί πιθανή ένδειξη πως πρωτεΐνες και γλυκοαμινογλυκάνες ως πρόσθετα σε ικρίωματα ενισχύουν τη ευαισθησία καρκινικών κυττάρων σε ξενοβιοτικούς παράγοντες,

με αποτέλεσμα να έχουν συμπεριφορά κοντινότερη στα υγιή κύτταρα και το φαινότυπό τους. Το γεγονός πως τα ικρίωματα που χρησιμοποιήθηκαν είχαν διαφορετικό μέγεθος πόρων μεταξύ τους (ανάλογα τη σύσταση του αιωρήματος από το οποίο προέκυψαν) θα μπορούσε θεωρητικά να εξηγεί τη διαφορά στη θνησιμότητα μεταξύ των κυττάρων στο ικρίωμα κολλαγόνου και στα υπόλοιπα. Μικρότεροι πόροι οδηγούν σε μικρότερη ροή θρεπτικού και διάχυση του τοξικού μεταβολίτη NAPQI. Όμως το γεγονός πως τα τρία ικρίωματα με τους μεγαλύτερους πόρους (C, CG, C-HA) παρουσιάζουν σημαντικές διαφορές στη θνησιμότητα των κυττάρων που φέρουν καθιστά λιγότερο πιθανή μία τέτοια συσχέτιση. Τέλος, μετά το πέρας των δύο ημερών κανένα υλικό δεν φάνηκε να έχει επηρεαστεί από τα κύτταρα, ούτε να υπάρχουν σημάδια χημικής αποσύνθεσης.



Εικόνα 26 Απεικόνιση των ενδοκυτταρικών ανηγμένων θειολών και νεκρών κυττάρων από τις χρωστικές mBCEI και PI αντίστοιχα, σε κύτταρα HepG2 υπό τη δράση παρακεταμόλης και απουσία της, σε πορώδη ικρίωματα κολλαγόνου (C) και κολλαγόνου - θειικής χονδροϊτίνης (CG).

Σχετικά με τα αποτελέσματα της απεικόνισης των ενδοκυτταρικών ανηγμένων θειολών μέσω της χρωστικής mBCEI, που θεωρείται έμμεση μέθοδος παρατήρησης των μεταβολών της ενδοκυτταρικής γλουταθειόνης, προέκυψαν δυσκολίες στην ταυτόχρονη απεικόνιση της με την χρωστική Calcein AM, καθώς και οι δύο δρουν στον ενδοκυττάριο χώρο. Παρά ταύτα θεωρείται σκόπιμη η συνοπτική παρουσίαση της απεικόνισης των ενδοκυττάρων ανηγμένων

θειολών στα κύτταρα που καλλιεργήθηκαν στα ικρίωματα κολλαγόνου και κολλαγόνου - θειικής χονδροϊτίνης υπό τη δράση της παρακεταμόλης, κυρίως για λόγους μελλοντικής έρευνας. Όπως προέκυψε στην περίπτωση του ικρίωματος κολλαγόνου, παρά τη μη αύξηση της θνησιμότητας των κυττάρων παρά την παρουσία του ξενοβιοτικού, μειώθηκαν οι ανηγμένες θειόλες και συνεπώς και η γλουταθειόνη στο εσωτερικό των κυττάρων. Αντίστοιχη συμπεριφορά παρουσίασε η γλουταθειόνη και στην περίπτωση των κυττάρων που καλλιεργήθηκαν σε πορώες ικρίωμα κολλαγόνου – θειικής χονδροϊτίνης, με παράλληλη αύξηση των νεκρών κυττάρων. Η μείωση της γλουταθειόνης και στις δύο περιπτώσεις πιθανολογείται ότι οφείλεται στη δράση του τοξικού μεταβολίτη NAPQI που συζεύγνυται με αυτήν.

Κεφάλαιο 5: Συμπεράσματα

5.1 Συμπεράσματα διαδικασίας παραγωγής νέων υλικών

Αρχικά, κατά το στάδιο της ανάμιξης του βασικού αιωρήματος κολλαγόνου τύπου I με άλλες πρωτεΐνες ή γλυκοαμινογλυκάνες παρουσιάστηκε σημαντική δυσκολία, καθώς το κολλαγόνο δημιουργούσε άμεσα συσσωματώματα με τους διαφορετικούς παράγοντες μόλις έρχονταν σε επαφή, φράζοντας τον εξοπλισμό και καθιστώντας αδύνατη τη δημιουργία ομοιογενούς αιωρήματος. Το φαινόμενο αυτό παρουσιάστηκε σε διάφορες θερμοκρασίες και αναλογίες ανάμιξης, όπως και οξύτερες διαλύτη και παρά τη σημαντική τεχνική δυσκολία που επέφερε το γεγονός αυτό στον πειραματικό σχεδιασμό, αποτέλεσε μία πρώτη σημαντική απόδειξη (στο πλαίσιο της παρούσας έρευνας) ότι τα υλικά αυτά που βιβλιογραφικά έχει τεκμηριωθεί πως απαντώνται στην εξωκυττάρια μήτρα, αλληλεπιδρούν σχηματίζοντας συνδετικές δομές και *in vitro*. Με κατάλληλο εξοπλισμό (Ika Turrex T18 υπό τη δράση υπερήχων) ξεπεράστηκε το εμπόδιο αυτό και έγινε δυνατή η δημιουργία των μιγμάτων στις αναφερθείσες αναλογίες. Επίσης, σε όλες τις περιπτώσεις ο διαλύτης ψύχθηκε επιτυχώς αφού κανένα αιώρημα δεν εξατμίστηκε στη διάρκεια της ξήρανσης ενώ αντίθετα ο εξοπλισμός ξήρανσης με κατάψυξη είχε ως όριο χαμηλότερης ψύξης τους $-54,7\text{ }^{\circ}\text{C}$, θερμοκρασία που δεν στάθηκε ικανή ώστε όλα τα μίγματα να συμπεριφερθούν ως κρυσταλλικά.

Για την εξαγωγή χρήσιμων συμπερασμάτων από τα αποτελέσματα του πειραματικού σχεδιασμού πραγματοποιήθηκε στατιστική ανάλυση των αποτελεσμάτων του και προέκυψαν συσχετίσεις εξαρτημένων και ανεξάρτητων μεταβλητών. Το γεγονός πως και οι τρεις ανεξάρτητες μεταβλητές επηρέασαν στατιστικά σημαντικά (σχεδόν) όλες τις εξαρτημένες αποτελεί επιβεβαίωση της ορθότητας του πειραματικού σχεδιασμού.

Αναλυτικότερα, επιβεβαιώθηκε ο ρόλος της θερμοκρασίας ψύξης (αρχικής και τελικής) ως μεταβλητής σχεδιασμού στο τελικό κρίσιμο χαρακτηριστικό της μέσης διαμέτρου πόρων των ικριωμάτων σε όλες τις περιπτώσεις των μιγμάτων. Βάσει όσων αναφέρθηκαν και στο θεωρητικό μέρος, το εύρημα αυτό εξηγείται από το ρόλο της θερμοκρασίας υαλώδους μετάβασης, καθώς τα δοκίμια μπορούν να παρουσιάσουν πορώδη δομή με το πέρας της λυοφιλοποίησης μόνο στην περίπτωση που τελικώς έχουν ψυχθεί κάτω από τη θερμοκρασία αλλαγής φάσης του πολυμερούς, με την αρχική θερμοκρασία ψύξης να ελέγχει το μέγεθος των σχηματιζόμενων πόρων και όσο χαμηλότερη είναι αυτή τόσο μεγαλύτερη είναι η τελική μέση διάμετρός τους. Ακόμα, η θερμοκρασία ψύξης επηρέασε στατιστικά σημαντικά την τυπική απόκλιση των πόρων των ικριωμάτων, η οποία λογίζεται ως η ποσοτικοποιημένη έκφραση του παράγοντα της ομοιογένειας του μεγέθους των πόρων, που χωρίς να έχει αυστηρό εύρος ανοχής, οφείλεται να λαμβάνεται υπόψη για λόγους ισοτροπίας του τελικού

υλικού. Όπως τεκμηριώθηκε προηγουμένως, χαμηλότερη αρχική θερμοκρασία ψύξης οδηγεί σε περισσότερους και μικρότερους κρυστάλλους στο στάδιο της κρυστάλλωσης, κάτι που τελικά οδηγεί στην αύξηση των εστιών ετερογένειας ως προς το μέγεθος των πόρων. Ακόμα, η τελική θερμοκρασία ψύξης καθορίζει βάσει θερμοκρασίας υαλώδους μετάβασης το κατά πόσο το υλικό συμπεριφέρεται ως κρυσταλλικό ή μη. Όσο μικρότερη είναι η πρώτη της δεύτερης τόσο μεγαλύτερη πλαστικότητα διατηρεί το υλικό, με αποτέλεσμα τη μείωση της διαμέτρου των πόρων ή και στο κλείσιμό τους κατά το στάδιο της εξάχνωσης.

Ο παράγοντας της αναλογίας μεταξύ κολλαγόνου και ενισχυτικού παράγοντα φάνηκε πως επηρέασε στατιστικά σημαντικά τη μέση διάμετρο των πόρων και το κατά πόσο το πορώδες των ικριωμάτων ήταν ανοιχτό ή κλειστό ενώ δεν είχε επίδραση στην ομοιογένεια των πόρων (τυπική απόκλιση). Μειωμένη συγκέντρωση ενισχυτικού παράγοντα οδήγησε σε μεγαλύτερη επικράτηση των φυσικοχημικών χαρακτηριστικών του κολλαγόνου και υψηλότερες θερμοκρασίες υαλώδους μετάβασης για τα αντίστοιχα μίγματα. Το γεγονός αυτό είχε ως αποτέλεσμα τη δημιουργία μεγαλύτερων πόρων σε αραιότερα μίγματα, καθώς αυτά είχαν υψηλότερη θερμοκρασία υαλώδους μετάβασης και άρα στις ίδιες συνθήκες συμπεριφέρονταν περισσότερο ως κρυσταλλικά. Οι συσχετισμοί αυτοί επηρέασαν στατιστικά σημαντικά όπως είναι επόμενο και το αν οι πόροι θα είναι ανοιχτοί.

Το είδος του προσθέτου είχε καθοριστική επίδραση και στις τρεις εξαρτημένες μεταβλητές. Παρά το γεγονός πως και η αναλογία του ενισχυτικού παράγοντα επηρεάζει το σημείο υαλώδους μετάβασης του τελικού μίγματος και άρα τη μορφολογία των ικριωμάτων, εντονότερη επίδραση σε αυτήν έχει το είδος του. Εξήγηση αυτής της πειραματικής παρατήρησης αποτελεί η διαπίστωση πως διαφορετικές ουσίες δύνανται να έχουν σημεία υαλώδους μετάβασης που να απέχουν στη θερμοκρασιακή κλίμακα (Κελσίου) μέχρι και πάνω από 100 °C, ενώ η διαφορετική αναλογία ανάμιξης παρά το ότι επηρεάζει μη γραμμικά το σημείο αλλαγής φάσης δεν οδηγεί σε ανάλογη διακύμανση. Όπως έγινε δε αντιληπτό στην περίπτωση του υαλουρονικού οξέος (8%) σε συγκεκριμένες αναλογίες ανάμιξης για ορισμένα είδη προσθέτων δύναται να δημιουργηθούν συσσωματώματα με πολύ ισχυρές συνδέσεις μεταξύ τους, τόσο ώστε να μην είναι δυνατή η δημιουργία πορώδους δομής κατά την εξάχνωση των κρυστάλλων του διαλύτη.

5.2 Ποιοτική ανάλυση αποτελεσμάτων βιολογικού πειράματος

Τα ικρίωματα που δημιουργήθηκαν μέσω ξήρασης με κατάψυξη επιδιώκεται να χρησιμοποιηθούν σε *in vitro* εφαρμογές βελτιώνοντας τις λειτουργίες και τις αποκρίσεις των κυττάρων στις συνθήκες αυτές. Με το πείραμα που πραγματοποιήθηκε στο πλαίσιο της παρούσας διπλωματικής εργασίας έγιναν κάποιες βασικές ποιοτικές παρατηρήσεις για την

επίδραση που έχει η καλλιέργεια των κυττάρων σε αυτά σε συνθήκες φαρμακοεπαγόμενης τοξικότητας. Η καλλιέργεια των κυττάρων σε ένα τρισδιάστατο περιβάλλον όπως αυτό των ικριωμάτων συγκράτησε το ρυθμό πολλαπλασιασμού των καρκινικών κυττάρων HepG2, προσεγγίζοντας συνεπώς περισσότερο τη συμπεριφορά των υγείων κυττάρων. Οι συνήθεις έλεγχοι τοξικότητας σε εργαστηριακό επίπεδο σε αντίστοιχες κυτταρικές σειρές διαρκούν μέρες (0-7 ημέρες), καθώς τα κύτταρα δεν επηρεάζονται άμεσα από τις τοξικές δόσεις παρακεταμόλης. Παρά ταύτα, ο έλεγχος της τοξικότητας σε καλλιέργεια κυττάρων στα συγκεκριμένα ικριώματα αποτελεί σοβαρή ένδειξη πως ένα τέτοιο *in vitro* περιβάλλον μπορεί να επηρεάσει την ευαισθησία των καρκινικών κυττάρων σε τοξικούς παράγοντες, προσομοιάζοντας καλύτερα την επίδραση ξενοβιοτικών *in vivo*. Ακόμα, πέραν της θνησιμότητας, η καλλιέργεια κυττάρων σε πορώδη ικριώματα επιτρέπει στα κύτταρα να διατηρήσουν την κυτταροσκελετική διαμόρφωσή τους και να αναπτύξουν συνάψεις μεταξύ τους και με τις πρωτεΐνες της εξωκυττάριας μήτρας. Ο συνδυασμός των δύο αυτών στοιχείων θα ενισχύσει τη διατήρηση των χαρακτηριστικών διαφοροποίησης των κυττάρων και τελικά την αποδοτικότερη συμπεριφορά σε εργαστηριακές εφαρμογές.

5.3 Μελλοντική έρευνα

Τα συμπεράσματα και οι ενδείξεις που προέκυψαν από τις πειραματικές διαδικασίες στο πλαίσιο της παρούσας διπλωματικής αποτελούν τη βάση της μελλοντικής έρευνας που θα πραγματοποιηθεί. Βασικό ζήτημα που πρέπει να διερευνηθεί είναι ποιες διαδικασίες και συνθήκες μπορούν να μειώσουν τις περιβαλλοντικές επιδράσεις στη διαδικασία απόθεσης των σταγόνων των ικριωμάτων στην επιφάνεια των γυαλιών μικροσκοπίας. Η διακύμανση των τελικών ιδιοτήτων των ικριωμάτων λόγω του πλάσματος και της εξάτμισης είναι ανεπιθύμητη και η μακροπρόθεσμη χρήση των υλικών απαιτεί την αντιμετώπισή της. Ακόμα, η μεθοδολογία που αναπτύχθηκε και βασίζεται σε μειούμενης θερμοκρασίας ψύξης διεργασίες ξήρανσης με κατάψυξη μπορεί να εφαρμοστεί για την παραγωγή όχι μόνο των συγκεκριμένων υλικών αλλά και μιγμάτων τριών συστατικών ή παραπάνω από αυτά που χρησιμοποιήθηκαν, για την ανάπτυξη εκτενέστερων βιβλιοθηκών υλικών, βάσει των αναγκών της εκάστοτε βιολογικής εφαρμογής. Σαφώς, και πρόσθετα που δεν συμπεριλήφθηκαν στην παρούσα έρευνα μπορούν να αξιοποιηθούν για το σκοπό αυτό. Η μεθοδολογία που εφαρμόστηκε κρίθηκε αποτελεσματική για το σκοπό της παραγωγής πορωδών ικριωμάτων, επιδέχεται όμως βελτιώσεων. Ειδικότερα, τα στάδια της διάρκειας αρχικής ψύξης και η ανόπτηση είναι τα κύρια σημεία στα οποία νέοι πειραματικοί σχεδιασμοί μπορούν να οδηγήσουν σε νέα, αποτελεσματικότερα πρωτόκολλα και αύξηση της μέσης διαμέτρου των πόρων των ικριωμάτων. Η χρήση εναλλακτικών διαλυτών για τα

αιωρήματα και προσθέτων δημιουργίας μεγαλύτερων κρυστάλλων είναι επίσης ζητήματα που παρουσιάζουν επιστημονικό ενδιαφέρον και αξίζει να μελετηθούν μελλοντικά.

Η φαρμακοεπαγόμενη τοξικότητα του ήπατος αποτελεί ένα μείζον θέμα για το σχεδιασμό νέων φαρμάκων και κλινικής πράξης. Συνηθέστερο και καλύτερα μελετημένο παράδειγμα ξενοβιοτικού που προκαλεί DILI είναι η παρακεταμόλη, η οποία μέσω ενός αρκετά μελετημένου δοσοεξαρτούμενου μηχανισμού εγείρει ηπατοκυτταρικές βλάβες, με τον τοξικό μεταβολίτη NAPQI να έχει πρωταγωνιστικό ρόλο. Κύτταρα HepG2, που είχαν καλλιεργηθεί στα νέα ικρίωματα που δημιουργήθηκαν, φάνηκε να είναι περισσότερο ευαίσθητα στην επίδραση υψηλής δόσης παρακεταμόλης από ότι τα ίδια αν είχαν καλλιεργηθεί σε μονοστρωματική καλλιέργεια. Βάσει αυτών, σε πρώτη φάση θεωρείται σκόπιμη η πραγματοποίηση ενός νέου ελέγχου τοξικότητας από παρακεταμόλη σε μεγαλύτερο εύρος συγκεντρώσεων και η μελέτη της επίδρασής της και σε άλλες σειρές κυττάρων όπως HepRG και Huh7 και σε πρωτογενή ανθρώπινα ηπατοκύτταρα (PHH). Καθώς σκοπός της ευρύτερης μελέτης της φαρμακοεπαγόμενης τοξικότητας είναι η κατανόηση των μηχανισμών ανάπτυξης της από πλήθος φαρμακευτικών παραγόντων θεωρείται σκόπιμη η πραγματοποίηση με εκτενές πλήθος φαρμάκων που συχνά έχουν βλαπτική δράση στο ήπαρ όπως αναλγητικά, μη νουκλεοσιδικοί αναστολείς, κυτταροτοξικά και συμπληρώματα διατροφής. Η μικροσκοπία φθορισμού παρέχει σημαντικές πληροφορίες αλλά δεν αρκεί για την σε βάθος μελέτη των αποτελεσμάτων της τοξικής δράσης στα κύτταρα. Προτείνεται συνεπώς η χρήση εργαλείων πρωτεομικής και φωσφοπρωτεομικής ανάλυσης για την αναζήτηση βιοδεικτών στο πλαίσιο της περιγραφείσας *in vitro* έρευνας.

5.4 Σύνοψη

Η παρούσα διπλωματική εργασία είχε ως στόχο την ανασκόπηση της διεθνούς βιβλιογραφίας σχετικά με την φαρμακοεπαγόμενη τοξικότητα και την *in vitro* μελέτη της καθώς και το σχεδιασμό καινοτόμων ικριωμάτων για το σκοπό αυτό. Στο πλαίσιο αυτό, μελετήθηκαν σε βάθος οι γενικοί και ηπατοειδικοί μηχανισμοί ανάπτυξης τοξικότητας από ενεργές φαρμακευτικές ουσίες. Ιδιαίτερη έμφαση δόθηκε στα τρισδιάστατα μοντέλα καλλιέργειών κυττάρων που θεωρούνται καταλληλότερα για την προσομοίωση του *in vivo* περιβάλλοντος. Με βάση τις πληροφορίες που προέκυψαν κατά το στάδιο αυτό, κατανοήθηκαν τα χαρακτηριστικά που πρέπει να έχει ένα πορώδες ικρίωμα για να συνεισφέρει σε εργαστηριακούς ελέγχους τοξικότητας. Το μέγεθος των πόρων και η σύστασή του είναι καθοριστικής σημασίας για τις συνάψεις που θα αναπτύξουν τα κύτταρα με αυτό και μεταξύ τους, επηρεάζοντας κατ' αυτόν τον τρόπο τη διατήρηση των χαρακτηριστικών διαφοροποίησης, κύρια πρόκληση στις εφαρμογές ηπατοκυττάρων. Ο σχεδιασμός

κατάλληλων πρωτοκόλλων ξήρανσης με κατάψυξη αποτελεί το βασικό μέσο δημιουργίας ικριωμάτων από μίγματα πρωτεϊνών που απαντώνται στην εξωκυττάρια μήτρα. Η θερμοκρασία αρχικής και τελικής ψύξης, η σύσταση και το είδος του προσθέτου σε αιωρήματα κολλαγόνου είναι οι κύριες παράμετροι που καθορίζουν το κρίσιμο χαρακτηριστικό του μεγέθους των πόρων. Η εφαρμογή πρωτοκόλλων μειούμενης θερμοκρασίας ψύξης πριν και μετά την ανόπτηση οδηγεί σε ψύξη των αιωρημάτων κάτω από το σημείο υαλώδους μετάβασης και τελικά, στις περισσότερες περιπτώσεις, καθιστά δυνατή τη δημιουργία νέων βιοϋλικών, χωρίς τη διεξαγωγή μετρήσεων θερμοδομετρίας σάρωσης για κάθε υποψήφιο δείγμα. Τα ικριώματα μιγμάτων κολλαγόνου με πρωτεΐνες ή γλυκοαμινογλυκάνες συνέβαλαν στη μεταβολή της συμπεριφοράς των καρκινικών κυττάρων HepG2 προς εκείνη των υγιών κυττάρων, καθώς παρουσίασαν ευαισθησία σε υψηλές δόσεις παρακεταμόλης για μικρό χρόνο επίδρασης, κάτι που συνήθως δεν ισχύει για τέτοια κύτταρα. Συνεπώς, τα εν λόγω υλικά είναι πολλά υποσχόμενα για ανάλογες βιολογικές εφαρμογές.

Βιβλιογραφία

Επιστημονικά άρθρα

1. Lee, William M. "Drug-induced hepatotoxicity." *New England Journal of Medicine* 349.5 (2003): 474-485
2. De Abajo, Francisco J., et al. "Acute and clinically relevant drug induced liver injury: a population based case control study." *British journal of clinical pharmacology* 58.1 (2004): 71-80.
3. Lasser, Karen E., et al. "Timing of new black box warnings and withdrawals for prescription medications." *Jama* 287.17 (2002): 2215-2220.
4. Chalasani, Naga, et al. "Causes, clinical features, and outcomes from a prospective study of drug-induced liver injury in the United States." *Gastroenterology* 135.6 (2008): 1924-1934.
5. Kaplowitz, Neil. "Drug-induced liver injury." *Clinical Infectious Diseases* 38.(2004): S44-S48.
6. Holt, Michael P., and Cynthia Ju. "Mechanisms of drug-induced liver injury." *The AAPS journal* 8.1 (2006): E48-E54.
7. Yuan, Liyun, and Neil Kaplowitz. "Mechanisms of drug-induced liver injury." *Clinics in liver disease* 17.4 (2013): 507-518.
8. Davern, Timothy J., and Naga Chalasani. "Drug-induced liver injury in clinical trials: as rare as hens' teeth." *The American journal of gastroenterology* 104.5 (2009): 1159-1161.
9. Lee, William M. "Acute liver failure." *New England Journal of Medicine* 329.25 (1993): 1862-1872.
10. Russmann, Stefan, Gerd A. Kullak-Ublick, and Ignazio Grattagliano. "Current concepts of mechanisms in drug-induced hepatotoxicity." *Current medicinal chemistry* 16.23 (2009): 3041-3053.
11. Andrade, Raúl J., et al. "Outcome of acute idiosyncratic drug induced liver injury: Long-term follow up in a hepatotoxicity registry." *Hepatology* 44.6 (2006): 1581-1588.
12. Hussaini, S. Hyder, and Elizabeth A. Farrington. "Idiosyncratic drug-induced liver injury: an overview." *Expert opinion on drug safety* 6.6 (2007): 673-684.
13. Remmer, H. "The role of the liver in drug metabolism." *The American journal of medicine* 49.5 (1970): 617-629.
14. Nadanaciva, Sashi, and Yvonne Will. "Investigating mitochondrial dysfunction to increase drug safety in the pharmaceutical industry." *Current drug targets* 12.6 (2011): 774-782.
15. Wojtczak, L. E. C. H., and Zabioccki K. "Basic mitochondria physiology in cell viability and death." *Drug-induced Mitochondria Dysfunction. John Wiley & Sons, Inc., New Jersey* (2008): 3-36.
16. Nadanaciva, Sashi, et al. "High-content screening for compounds that affect mtDNA-encoded protein levels in eukaryotic cells." *Journal of biomolecular screening* 15.8 (2010): 937-948.
17. Kohen, Ron, and Abraham Nyska. "Invited review: Oxidation of biological systems: oxidative stress phenomena, antioxidants, redox reactions, and methods for their quantification." *Toxicologic pathology* 30.6 (2002): 620-650.

18. Deavall, Damian G., et al. "Drug-induced oxidative stress and toxicity." *Journal of toxicology* 2012 (2012).
19. Park, B. Kevin, et al. "Managing the challenge of chemically reactive metabolites in drug development." *Nature Reviews Drug Discovery* 10.4 (2011): 292-306.
20. Kaufmann, William K. "Initiating the uninitiated: replication of damaged DNA and carcinogenesis." *Cell Cycle* 6.12 (2007): 1459-1466.
21. Barabasz, Amy, et al. "The use of high-content screening for the discovery and characterization of compounds that modulate mitotic index and cell cycle progression by differing mechanisms of action." *Assay and drug development technologies* 4.2 (2006): 153-163.
22. Elmore, Susan. "Apoptosis: a review of programmed cell death." *Toxicologic pathology* 35.4 (2007): 495-516.
23. Kilbride, S. M., and J. H. M. Prehn. "Central roles of apoptotic proteins in mitochondrial function." *Oncogene* 32.22 (2013): 2703-2711.
24. Hernández, Lya G., et al. "Mechanisms of non-genotoxic carcinogens and importance of a weight of evidence approach." *Mutation Research/Reviews in Mutation Research* 682.2 (2009): 94-109.
25. Anderson, Nora, and Jürgen Borlak. "Drug- induced phospholipidosis." *FEBS letters* 580.23 (2006): 5533-5540.
26. Halliwell, William H. "Cationic amphiphilic drug-induced phospholipidosis." *Toxicologic pathology* 25.1 (1997): 53-60.
27. Anderson, Nora, and Jürgen Borlak. "Molecular mechanisms and therapeutic targets in steatosis and steatohepatitis." *Pharmacological reviews* 60.3 (2008): 311-357.
28. Begriche, Karima, et al. "Drug-induced toxicity on mitochondria and lipid metabolism: mechanistic diversity and deleterious consequences for the liver." *Journal of hepatology* 54.4 (2011): 773-794.
29. Padda, Manmeet S., et al. "Drug- induced cholestasis." *Hepatology* 53.4 (2011): 1377-1387.
30. Pauli Magnus, Christiane, and Peter J. Meier. "Hepatobiliary transporters and drug-induced cholestasis." *Hepatology* 44.4 (2006): 778-787.
31. James, Laura P., Philip R. Mayeux, and Jack A. Hinson. "Acetaminophen-induced hepatotoxicity." *Drug metabolism and disposition* 31.12 (2003): 1499-1506.
32. Larson, Anne M., et al. "Acetaminophen- induced acute liver failure: results of a United States multicenter, prospective study." *Hepatology* 42.6 (2005): 1364-1372.
33. Lee, Susanna ST, et al. "Role of CYP2E1 in the hepatotoxicity of acetaminophen." *Journal of Biological Chemistry* 271.20 (1996): 12063-12067.
34. Lancaster, Elizabeth M., Jonathan R. Hiatt, and Ali Zarrinpar. "Acetaminophen hepatotoxicity: an updated review." *Archives of Toxicology. Archiv für Toxikologie* 89.2 (2015): 193.
35. Temple, Robert. "Hy's law: predicting serious hepatotoxicity." *Pharmacoepidemiology and drug safety* 15.4 (2006): 241-243.
36. Robles-Díaz, Mercedes, et al. "Biomarkers in DILI: one more step forward." *Frontiers in pharmacology* 7 (2016).
37. Antoine, Daniel J., et al. "Molecular forms of HMGB1 and keratin-18 as mechanistic biomarkers for mode of cell death and prognosis during clinical acetaminophen hepatotoxicity." *Journal of hepatology* 56.5 (2012): 1070-1079.
38. Shi, Qiang, et al. "Circulating mitochondrial biomarkers for drug-induced liver injury." *Biomarkers* 9.11 (2015): 1215-1223.

39. Thulin, Petra, et al. "Keratin-18 and microRNA-122 complement alanine aminotransferase as novel safety biomarkers for drug-induced liver injury in two human cohorts." *Liver international* 34.3 (2014): 367-378.
40. Fernández, Virginia Leiro, et al. "Glutathione Stransferase M1 and T1 null genotypes increase susceptibility to drug-induced liver injury." *Hepatology* 49.5 (2009): 1777-1777.
41. Starkey Lewis, P. J., et al. "Serum microRNA biomarkers for drug-induced liver injury." *Clinical Pharmacology & Therapeutics* 92.3 (2012): 291-293.
42. Ozer, Josef S., et al. "Recommendations to qualify biomarker candidates of drug-induced liver injury." *Biomarkers* 4.3 (2010): 475-483.
43. Godoy, Patricio, et al. "Recent advances in 2D and 3D in vitro systems using primary hepatocytes, alternative hepatocyte sources and non-parenchymal liver cells and their use in investigating mechanisms of hepatotoxicity, cell signaling and ADME." *Archives of toxicology* 87.8 (2013): 1315.
44. Byrne, Elaine M., et al. "Gene expression by marrow stromal cells in a porous collagen–glycosaminoglycan scaffold is affected by pore size and mechanical stimulation." *Journal of Materials Science: Materials in Medicine* 19.11 (2008): 3455-3463.
45. Vinken, Mathieu, et al. "Involvement of cell junctions in hepatocyte culture functionality." *Critical reviews in toxicology* 36.4 (2006): 299-318.
46. Huh, Dongeun, Geraldine A. Hamilton, and Donald E. Ingber. "From 3D cell culture to organs-on-chips." *Trends in cell biology* 21.12 (2011): 745-754.
47. Griffith, Linda G., and Melody A. Swartz. "Capturing complex 3D tissue physiology in vitro." *Nature reviews Molecular cell biology* 7.3 (2006): 211-224.
48. Wilkening, Stefan, Frank Stahl, and Augustinus Bader. "Comparison of primary human hepatocytes and hepatoma cell line Hepg2 with regard to their biotransformation properties." *Drug metabolism and disposition* 31.8 (2003): 1035-1042.
49. Thompson, Richard A., et al. "In vitro approach to assess the potential for risk of idiosyncratic adverse reactions caused by candidate drugs." *Chemical research in toxicology* 25.8 (2012): 1616-1632.
50. Goldring, Chris, et al. "Mechanism-based markers of drug-induced liver injury to improve the physiological relevance and predictivity of in vitro models." *Applied in Vitro Toxicology* 1.3 (2015): 175-186.
51. Freyman, T. M., I. V. Yannas, and L. J. Gibson. "Cellular materials as porous scaffolds for tissue engineering." *Progress in Materials Science* 46.3 (2001): 273-282.
52. Dewitt, Daniel D., et al. "Collagen I-matrigel scaffolds for enhanced Schwann cell survival and control of three-dimensional cell morphology." *Tissue Engineering Part A* 15.10 (2009): 2785-2793.
53. Koide, Akiko, et al. "The fibronectin type III domain as a scaffold for novel binding proteins." *Journal of molecular biology* 284.4 (1998): 1141-1151.
54. Park, Si-Nae, et al. "Characterization of porous collagen/hyaluronic acid scaffold modified by 1-ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl) carbodiimide cross-linking." *Biomaterials* 23.4 (2002): 1205-1212.
55. Taipale, Jussi, and Jorma Keski-Oja. "Growth factors in the extracellular matrix." *The FASEB Journal* 11.1 (1997): 51-59.

56. Fthenou, E., et al. "Chondroitin sulfate prevents platelet derived growth factor mediated phosphorylation of PDGF- R β in normal human fibroblasts severely impairing mitogenic responses." *Journal of cellular biochemistry* 103.6 (2008): 1866-1876.
57. Sirko, Svetlana, et al. "Chondroitin sulfates are required for fibroblast growth factor 2 dependent proliferation and maintenance in neural stem cells and for epidermal growth factor- dependent migration of their progeny." *Stem cells* 28.4 (2010): 775-787.
58. Hintze, V., et al. "Sulfated hyaluronan and chondroitin sulfate derivatives interact differently with human transforming growth factor- β 1 (TGF- β 1)." *Acta biomaterialia* 8.6 (2012): 2144-2152.
59. Qian, Lei, and Haifei Zhang. "Controlled freezing and freeze drying: a versatile route for porous and micro/nano structured materials." *Journal of chemical technology and biotechnology* 86.2 (2011): 172-184.
60. Kasper, Julia Christina, and Wolfgang Friess. "The freezing step in lyophilization: physico-chemical fundamentals, freezing methods and consequences on process performance and quality attributes of biopharmaceuticals." *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics* 78.2 (2011): 248-263.
61. Geidobler, R., and G. Winter. "Controlled ice nucleation in the field of freeze-drying: fundamentals and technology review." *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics* 85.2 (2013): 214-222.
62. Tang, Xiaolin Charlie, and Michael J. Pikal. "Design of freeze-drying processes for pharmaceuticals: practical advice." *Pharmaceutical research* 21.2 (2004): 191-200.
63. Butler, Michael F. "Freeze concentration of solutes at the ice/solution interface studied by optical interferometry." *Crystal growth & design* 2.6 (2002): 541-548.
64. Haugh, Matthew G., Ciara M. Murphy, and Fergal J. O'Brien. "Novel freeze-drying methods to produce a range of collagen-glycosaminoglycan scaffolds with tailored mean pore sizes." *Tissue Engineering Part C: Methods* 16.5 (2009): 887-894.
65. Bai, Hua, et al. "Aligned three-dimensional microstructures of conducting polymer composites." *Polymer* 48.18 (2007): 5259-5267.

Ακαδημαϊκά Συγγράμματα

- a. Lodish H, Berk A, Zipursky SL, et al. *Molecular Cell Biology*. 4th edition. New York: W. H. Freeman; 2000. Section 22.3, Collagen: The Fibrous Proteins of the Matrix
- b. McCabe, Warren Lee, Julian Cleveland Smith, and Peter Harriott. *Unit operations of chemical engineering*. Vol. 5. New York: McGraw-Hill, 1993.

Εργασίες

- Μ. Ιωάννου, Διπλωματική Εργασία: «Βελτιστοποίηση Καλλιέργειας Ινοβλαστών σε Ικρίωματα από Κολλαγόνο για Προτεομικές Μελέτες Σηματοδότησης», ΕΜΠ Αθήνα 2015.
- Ι. Πρέζα, Διπλωματική Εργασία: « Σχεδιασμός κα Κατασκευή Συσκευής για Αυτοματοποιημένη Μελέτη Κυττάρων Μέσω Τρισδιάστατης Καλλιέργειας σε Πορώδη Ικρίωματα Κολλαγόνου», ΕΜΠ Αθήνα 2015.
- Μ.Σαρκίρη «Λεπτά Πορώδη Ικρίωματα Κολλαγόνου: Παρασκευή, Χαρακτηρισμός και Εφαρμογή στη Μελέτη Φαρμάκων», ΕΜΠ Αθήνα 2016.

- Θ. Ν. Ιορδανίδης «Αυτοματοποίηση Κατασκευής Συσκευών με Συστοιχίες Λεπτών Πορώδων Ικτιωμάτων για Βιολογικές Μελέτες», ΕΜΠ Αθήνα 2017.

Άλλες πηγές

- i. <http://emedicine.medscape.com/article/169814-overview>
- ii. <http://www.pharmaceutical-journal.com/publications/tomorrows-pharmacist/drug-development-the-journey-of-a-medicine-from-lab-to-shelf/20068196.article>
- iii. Guidance for Industry Drug-Induced Liver Injury: Premarketing Clinical Evaluation U.S., Department of Health and Human Services, Food and Drug Administration, Center for Drug Evaluation and Research (CDER), Center for Biologics Evaluation and Research (CBER), July 2009, Drug Safety
- iv. https://repository.kallipos.gr/bitstream/11419/4248/1/02_chapter_2.pdf
- v. https://repository.kallipos.gr/bitstream/11419/4252/2/00_master_document_final_27_1_2016-KOY.pdf

Παράρτημα Α: Αναλυτικά αποτελέσματα πειραμάτων και στατιστική επεξεργασία

Πίνακας 2 Στατιστική επεξεργασία δεδομένων που μερικώς παρουσιάζονται στην Εικόνα 1 – Επίδραση της αρχικής θερμοκρασίας ψύξης αιωρημάτων κολλαγόνου στο μέγεθος των πόρων των τελικών κριωμάτων

Τελική θερμοκρασία ψύξης (°C)	Διάμετρος πόρου (μm)	
-40	36,95	P value = 2,38E-05
-40	26,35	
-40	22,98	
-40	32,45	
-40	23,92	
-40	30,88	F = 48,47335 > Fcritical = 4,84433567
-20	5,42	
-20	4,91	
-20	7,88	
-20	3,63	
-20	3,22	
-20	4,08	
-20	4,08	

Πίνακας 3 Στατιστική επεξεργασία δεδομένων που μερικώς παρουσιάζονται στην Εικόνα 2 – Επίδραση της αρχικής θερμοκρασίας ψύξης αιωρημάτων κολλαγόνου – θεϊκής χονδροϊτίνης στο μέγεθος των πόρων των τελικών κριωμάτων

Τελική θερμοκρασία ψύξης (°C)	Διάμετρος πόρου (μm)	
-40	39,98	P value = 5,5E-05
-40	44,71	
-40	35,62	
-40	33,68	
-40	34,81	
-40	29,71	F = 40,22774 > Fcritical = 4,84433567
-20	6,44	
-20	3,31	
-20	5,71	
-20	2,87	
-20	3,32	
-20	3,84	
-20	3,84	

Πίνακας 4 Στατιστική επεξεργασία δεδομένων που μερικώς παρουσιάζονται στην Εικόνα 3 – Επίδραση του χρόνου παραμονής σε ατμοσφαιρικές συνθήκες θερμοκρασίας και υγρασίας σε ικρίωματα κολλαγόνου – θευκικής χονδροϊτίνης

Διάμετρος πόρου (μm) - 0 ημέρες	Διάμετρος πόρου (μm) - 26 ημέρες	P value = 0,831079
23,54	33,69	
31,22	31,25	F = 0,05057 < Fcritical = 6,607891
36,54	40,83	
27,85	41,23	
39,61	23,65	
40,1	20,74	

**η αξιολόγηση των ικριωμάτων για λόγους διατηρησιμότητας έγινε και μέσω της ποιοτικής αξιολόγησης της διάταξης των νηματοιειδών δομών (βλ. αντίστοιχο χωρίο ενότητας «Πειραματικές ενδείξεις»)*

Πίνακας 5 Στατιστική επεξεργασία δεδομένων που μερικώς παρουσιάζονται στην Εικόνα 4 (a,b) – Επίδραση της αραίωσης του αρχικού αιωρήματος στο μέγεθος των πόρων ικριωμάτων κολλαγόνου

Συγκέντρωση κολλαγόνου (mg/ml)	Διάμετρος πόρου (μm)	P value = 0,265765
5	26,22	
5	24,06	
5	29,42	
5	28,39	
5	23,92	F = 1,568853 < Fcritical = 6,60789097
5	32,97	
2,5	28,56	
2,5	29,47	
2,5	23,86	
2,5	18,61	
2,5	21,24	
2,5	24,98	

Πίνακας 6 Στατιστική επεξεργασία δεδομένων που μερικώς παρουσιάζονται στην Εικόνα 4 (c,d) – Επίδραση της αραίωσης του αρχικού αιωρήματος στο μέγεθος των πόρων ικτιωμάτων κολλαγόνου – θεϊκής χονδροϊτίνης

Συγκέντρωση κολλαγόνου - θεϊκής χονδροϊτίνης (mg/ml)	Διάμετρος πόρου (μm)	P value = 0,040721
5,44	35,21	
5,44	22,34	
5,44	19,62	
5,44	25,32	
5,44	31,24	F = 7,51565 > Fcritical = 6,60789097
5,44	36,22	
2,72	36,08	
2,72	30,00	
2,72	33,50	
2,72	40,13	
2,72	29,36	
2,72	52,33	

Πίνακας 7 Στατιστική επεξεργασία δεδομένων που μερικώς παρουσιάζονται στην Εικόνα 5 – Επίδραση της συμπύκνωσης του αρχικού αιωρήματος στο μέγεθος των πόρων ικτιωμάτων κολλαγόνου – θεϊκής χονδροϊτίνης

Συγκέντρωση κολλαγόνου - θεϊκής χονδροϊτίνης (mg/ml)	Διάμετρος πόρου (μm)	P value = 0,000306
5	33,36	
5	28,56	
5	39,68	
5	35,22	
5	22,98	F = 78,32816 > Fcritical = 6,60789097
5	36,33	
9,4	5,89	
9,4	14,62	
9,4	9,73	
9,4	10,22	
9,4	6,37	
9,4	9,87	

Πίνακας 8 Στατιστική επεξεργασία δεδομένων που μερικώς παρουσιάζονται στην Εικόνα 6 – Επίδραση της προσθήκης αιωρήματος ζελατίνης (συγκέντρωση 5 mg/ml) στο μέγεθος των πόρων ικτιωμάτων κολλαγόνου

Ποσοστό ζελατίνης ως προσθέτου σε αιώρημα κολλαγόνου (%)	Διάμετρος πόρου (μm)	P value = 0,001087
10	33,14	
10	28,53	
10	29,74	
25	25,21	F = 22,99163 > Fcritical = 4,75706266
25	30,33	
25	24,53	
40	16,96	
40	11,42	
40	19,22	
50	13,25	
50	10,22	
50	12,28	

Πίνακας 9 Στατιστική επεξεργασία δεδομένων που μερικώς παρουσιάζονται στην Εικόνα 7 – Επίδραση της προσθήκης αιωρήματος ζελατίνης (συγκέντρωση 5 mg/ml) στο μέγεθος των πόρων ικτιωμάτων κολλαγόνου – θεικής χονδροϊτίνης

Ποσοστό ζελατίνης ως προσθέτου σε αιώρημα κολλαγόνου - θεικής χονδροϊτίνης (%)	Διάμετρος πόρου (μm)	P value = 0,003171
0	41,02	
0	35,78	
0	34,96	F = 313,878 > Fcritical = 18,5128205
50	3,99	
50	5,22	
50	2,05	

Πίνακας 10 Στατιστική επεξεργασία δεδομένων που μερικώς παρουσιάζονται στην Εικόνα 8 – Επίδραση της προσθήκης αιωρήματος ζελατίνης (συγκέντρωση 5 mg/ml) στο μέγεθος των πόρων ικτιωμάτων αραιωμένου αιωρήματος κολλαγόνου – θεικής χονδροϊτίνης

Ποσοστό ζελατίνης ως προσθέτου σε αιώρημα κολλαγόνου - θεικής χονδροϊτίνης 2,72 mg/ml (%)	Διάμετρος πόρου (μm)	P value = 0,231764
0	32,33	
0	35,69	
0	29,87	F = 2,880271 > Fcritical = 18,5128205
50	36,92	
50	28,96	
50	39,63	

Πίνακας 11 Αναλυτική παρουσίαση των αποτελεσμάτων που μερικώς παρουσιάζονται στον Πίνακα 1 της ανάλυσης διακύμανσης μίας κατεύθυνσης (one-way ANOVA) μεταξύ κάθε ζεύγους εξαρτημένης και ανεξάρτητης μεταβλητής

Συσχέτιση παραγόντων		p value	F	F critical
Θερμοκρασία ψύξης	Μέση διάμετρος πόρων	5,98E-44	2032,566	4,023017
Θερμοκρασία ψύξης	Τυπική απόκλιση	3,03E-56	6015,663	
Θερμοκρασία ψύξης	Ανοιχτό ή κλειστό πορώδες	2,44E-59	7886,462	
Είδος προσθέτου	Μέση διάμετρος πόρων	4,38E-17	450,0767	
Είδος προσθέτου	Τυπική απόκλιση	6,86E-05	18,6722	
Είδος προσθέτου	Ανοιχτό ή κλειστό πορώδες	3,48E-24	322,2973	
Αναλογία προσθέτου	Μέση διάμετρος πόρων	1,53E-09	53,15825	
Αναλογία προσθέτου	Τυπική απόκλιση	4,83E-01	18,6722	
Αναλογία προσθέτου	Ανοιχτό ή κλειστό πορώδες	2,70E-04	15,23734	

Πίνακας 12 Ανάλυσης διακύμανσης μίας κατεύθυνσης (one-way ANOVA) μεταξύ των εξαρτημένων μεταβλητών και της σειράς απόθεσης (ως ανάλογης της έκθεσης σε περιβαλλοντικές συνθήκες εξάτμισης) του εκάστοτε είδους αιωρήματος στο γαλί μικροσκοπίας κατά τη διαδικασία πριν την εφαρμογή των πρωτοκόλλων 2 και 3

	Μέση διάμετρος πόρων	Ανοιχτό ή κλειστό πορώδες	Τυπική απόκλιση
p value	1,49E-10	3,4E-11	0,000795
F	87,76478	99,51218	13,82159
F critical	4,159615	4,159615	4,159615

Παράρτημα Β: Πρωτόκολλα πειραματικών διαδικασιών

A.1 Καθαρισμός γυαλιών μικροσκοπίας

Υλικά

- 70% αιθανόλη μετουσιωμένη με κετόνες (Applichem #A0565)
- Νερό τύπου 1 (Type-1)
- Γυαλιά μικροσκοπίας 24×50mm, t=0.16-0.19mm (Fisherbrand #12303148, Coverslip No. 1.5 borosilicate glass)

Εξοπλισμός

- Λουτρό υπερήχων
- Θήκη κατακόρυφης τοποθέτησης και διατήρησης γυαλιών μικροσκοπίας

Διαδικασία

1. Τα γυαλιά μικροσκοπίας τοποθετούνται κατακόρυφα σε θήκη, προστίθεται νερό τύπου 1 (Type-1) μέχρι πλήρους κάλυψης της επιφάνειας των γυαλιών και η θήκη τοποθετείται στο λουτρό υπερήχων, όπου εκτίθεται σε υπερήχους για 30'.
2. Στη συνέχεια αφαιρείται το νερό, η θήκη στεγνώνεται εσωτερικά με κοινό χαρτί και προστίθεται αιθανόλη (70%) έως πλήρους κάλυψης της επιφάνειας των γυαλιών, με την εμβάπτιση στην αιθανόλη να διαρκεί 20'.
3. Ακολουθεί αφαίρεση της αιθανόλης (70%) και η θήκη αφήνεται εκτεθειμένη σε ατμοσφαιρικές συνθήκες ώστε να επιτευχθεί εξάτμιση της αιθανόλης από τα γυαλιά.
4. Τα γυαλιά φυλάσσονται στη θήκη (κλειστή) μέχρι να χρησιμοποιηθούν.

A.2 Χύτευση και πολυμερισμός υπερκατασκευών PDMS

Υλικά

- Ελαστομερές πολυδιμεθυλοσιλοξάνης (PDMS) (Dow corning, Sylgard 184)
- Παράγοντα σκλήρυνσης πολυδιμεθυλοσιλοξάνης (PDMS) (Dow corning, Sylgard 184)

Εξοπλισμός

- Αντλία κενού (N035AN.18, KNF NEUBERGER)
- Ζυγαριά (Mettler Toledo NewClassic MS)
- Σύριγγες
- Καλούπια από πολυμεθακρυλικό μεθύλιο (poly(methyl methacrylate) - PMMA)
- Πιπέττες Pasteur
- Νυστέρι (No 22, Huian Tianda Medical Instruments CO, LTD)
- Μέσο ανάδευσης
- Scotch tape

- Ισοπροπανόλη (Applichen #131090.1211)

Διαδικασία

1. Το ρύγχος μιας σύριγγας χωρητικότητας τουλάχιστον 15 ml και καλύτερα πάνω από 25 ml κλείνεται με κολλητική ταινία.
2. Η σύριγγα τοποθετείται σε βάση στήριξης και γίνεται ζύγιση σε αναλυτικό ζυγό και μηδενισμός της ένδειξης.
3. Με χρήση μίας πιπέττας Pasteur γίνεται έγχυση ποσότητας ελαστομερούς και στη συνέχεια με μία δεύτερη πιπέττα Pasteur έγχυση του παράγοντα σκλήρυνσης βάσει μίας εκ των δύο αναλογιών ανάμιξης (σημειώνεται πως στο πλαίσιο της παρούσας διπλωματικής όλα τα πλαίσια που χρησιμοποιήθηκαν παρασκευάστηκαν βάσει της αναλογίας 10:1):
 - 10:1 (περισσότερο ελαστικό πλαίσιο PDMS)
 - 7:1 (σκληρότερο πλαίσιο PDMS)
4. Μετά την ζύγιση των κατάλληλων ποσοτήτων των δύο συστατικών και το σχηματισμό μίγματος, γίνεται ισχυρή ανάδευση. Το στάδιο αυτό είναι σημαντικό, καθώς πλημμελής ανάμιξη θα οδηγήσει σε ετερογένειες κατά τον πολυμερισμό και τελικά σε υλικό εκτός προδιαγραφών. Καθώς το ιξώδες μίγμα αναδεύεται εγκλείονται φυσαλίδες ατμοσφαιρικού αέρα με αποτέλεσμα τη μακροσκοπική ανάπτυξη θολερότητας. Το μίγμα θεωρείται πλήρως αναμεμειγμένο όταν πλέον μακροσκοπικά μοιάζει λευκό. Η διαδικασία απαιτεί χρονικό διάστημα 5 – 15 λεπτών συνεχούς ανάδευσης, κριτήριο πλήρους ανάμιξης αποτελεί όμως μόνο η οπτική παρατήρηση.
5. Έπειτα η σύριγγα με τη βάση στήριξης τοποθετείται σε έναν ξηραντή κενού για την απομάκρυνση των εγκλεισμένων φυσαλίδων, ο οποίος συνδέεται με την αντλία κενού. Η διαδικασία ξεκινάει με την έναρξη του κενού και διαρκεί έως ότου οι φυσαλίδες απομακρυνθούν πλήρως και το μίγμα είναι οπτικά διαυγές και ομοιογενές. Η διαδικασία απαιτεί χρονικό διάστημα 25 ± 5 λεπτών παραμονής στον ξηραντή υπό κενό, κριτήριο λήξης της παραμονής σε αυτόν αποτελεί όμως μόνο η οπτική επιβεβαίωση.
6. Το πλαίσιο από PMMA τοποθετείται στον αναλυτικό ζυγό και γίνεται μηδενισμός της ένδειξής του.
7. Το διαυγές και ομοιογενές μίγμα εγχέεται μέσω της σύριγγας, από την οποία έχει αφαιρεθεί η ταινία από το ρύγχος της, στους κενούς χώρους των καλουπιών (3 ml ανά κενό χωρίο).
8. Εφόσον πληρωθούν και τα 4 κενά χωρία ενός καλουπιού PMMA, αυτό τοποθετείται και πάλι στον ξηραντή υπό κενό για αφαίρεση τυχόν εγκλεισμένων φυσαλίδων, για ανάλογο χρονικό διάστημα και με ανάλογο κριτήριο παραμονής με προηγούμενος.
9. Για την στερεοποίηση και τον ολοκληρωμένο πολυμερισμό προτείνονται δύο εναλλακτικές:
 - Έκθεση του καλουπιού σε θερμοκρασία δωματίου για τουλάχιστον 48 ώρες.
 - Τοποθέτηση του καλουπιού σε θερμαινόμενο θάλαμο $75 \text{ }^\circ\text{C}$ ($\pm 5 \text{ }^\circ\text{C}$) για 4 ώρες, με διατήρηση της θύρας ανοιχτής.
10. Όταν ο πολυμερισμός και η στερεοποίηση έχουν ολοκληρωθεί, αφαιρούνται τα σχηματιζόμενα πλαίσια PDMS με τη βοήθεια νυστεριού και φυλάσσονται σε δοχεία Petri με μονωτική ταινία στην περιφέρειά τους, μέχρι τη χρήση τους.

11. 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 και στη συνέχεια το καλούπι πλένεται με αιθανόλη και απομακρύνονται με τσιμπίδα ή/και χαρτί τυχόν παραμείναντα υπολείμματα PDMS.

A.3 Επιφανειακή κατεργασία πλαισίων PDMS με πλάσμα και κόλληση με γυαλί μικροσκοπίας

Υλικά

- Πλαίσιο PDMS
- Θάλαμος επίδρασης με πλάσμα Plasma Etcher (Plasma Etch, # 775-883-1336)

Διαδικασία

1. Αφού ολοκληρωθεί η διαδικασία της λυοφιλοποίησης, ένα πλαίσιο PDMS το οποίο έχει φυλαχθεί κατάλληλα εισάγεται στον θάλαμο επίδρασης με πλάσμα, με σκοπό την ανάπτυξη ενεργοποίηση ομάδων πυριτίου στην επιφάνεια που επιδιώκεται να κολληθεί χημικά στο γυαλί μικροσκοπίας.
2. Ο θάλαμος σφραγίζεται και από την οθόνη επιλογών ρυθμίζονται οι συνθήκες κατεργασίας με πλάσμα των πλαισίων PDMS. Οι συνθήκες που επιλέγονται (Set Up) είναι:
 - Χρόνος επίδρασης με πλάσμα: 20 sec
 - Πίεση: 300,9 mTorr
 - Χρόνος ατμοσφαιρικού εξαερισμού: 1 min
 - Χρόνος απομάκρυνσης αέρα: 1 min
 - Χρόνος σταθεροποίησης αερίου: 10 sec
 - Χρόνος μέχρι την έναρξη συναγερμού κενού: 5 min
3. Μετά την ολοκλήρωση της διεργασίας, τα πλαίσια PDMS απομακρύνονται από το θάλαμο και τοποθετούνται άμεσα επάνω στο γυαλί μικροσκοπίας (με την επιφάνεια του πλαισίου στην οποία επέδρασε το πλάσμα να είναι σε επαφή με το γυαλί) κατά τέτοιο τρόπο ώστε κατά το δυνατόν να μη θίγονται τα λυοφιλοποιημένα ικρίσματα αιωρημάτων κολλαγόνου.
4. Οι κατασκευές τοποθετούνται σε απόλυτα λεία μεταλλική επιφάνεια και τοποθετείται βάρος άνωθεν τους για 48 ώρες.
5. Οι κατασκευές φυλάσσονται σε δοχεία Petri με μόνωση της περιφέρειάς τους ή οδηγούνται στο στάδιο της ανάπτυξης σταυροδεσμών.

A.4 Τοποθέτηση αιωρήματος κολλαγόνου σε γυαλιά μικροσκοπίας

Υλικά

- Ελαιώρημα βιοϋλικού
- Λεπτό γυαλί μικροσκοπίας (διαστάσεις: 24×50 mm, πάχους 16-19 μm)

Εξοπλισμός

- Θάλαμος επίδρασης με πλάσμα Plasma Etcher (Plasma Etch, # 775-883-1336)
- Πιπέττα με εύρος διαχειρίσιμων όγκων 2-20 μl και αναλώσιμα ακροφύσια (tips)

Διαδικασία

1. Γυαλιά μικροσκοπίας καθαρισμένα κατά το πρωτόκολλο του χωρίου A1 τοποθετούνται στον θάλαμο επίδρασης με πλάσμα, με σκοπό την ανάπτυξη υδροφιλίας στα γυαλιά μικροσκοπίας.
2. Οι συνθήκες που επιλέγονται (Set Up) είναι οι εξής:
 - Χρόνος διεργασίας Πλάσματος: 40 sec
 - Πίεση: 300,9 mTorr
 - Χρόνος ατμοσφαιρικού εξαερισμού: 1 min
 - Χρόνος απομάκρυνσης αέρα: 1 min
 - Χρόνος σταθεροποίησης αερίου: 10 sec
 - Χρόνος μέχρι την έναρξη συναγερμού κενού: 5 min
3. Εφόσον ολοκληρωθεί η διεργασία, τα γυαλιά μικροσκοπίας τοποθετούνται επάνω σε λεία επιφάνεια και με τη βοήθεια ενός πλαισίου PDMS ως οδηγό, γίνεται απόθεση 6 σταγόνων όγκου 6 μl έκαστος στην επιφάνεια κάθε γυαλιού κατά τέτοιο τρόπο ώστε να σχηματίζουν παραλληλεπίπεδο (2×3), παράλληλου προς την επιφάνεια του γυαλιού.
4. Τα γυαλιά μικροσκοπίας οδηγούνται κατευθείαν στο θάλαμο λυοφιλοποίησης ο οποίος έχει προψυχθεί ($5\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 0.5\text{ }^{\circ}\text{C}$).

A.5 Λυοφιλοποίηση

Εξοπλισμός

- Λυοφιλοποιητής, Virtis Genesis 25E
- Υπολογιστής ελέγχου του λυοφιλοποιητή μέσω του λογισμικού “ENCORE” που ελέγχει και αναφέρει τις συνθήκες λειτουργίας του λυοφιλοποιητή.
- Παροχή Ρεύματος, Sentinel Power Green SPH 10, 10 kVA

Διαδικασία

- A. Ενεργοποίηση του λυοφιλοποιητή
1. Εισαγωγή του κλειδιού άδειας χρήσης του υπολογιστή στην κατάλληλη θύρα.
 2. Ενεργοποίηση της παροχής ρεύματος:
 - i. Ενεργοποίηση του διακόπτη “IN” (τριπλός διακόπτης άκρα δεξιά σε άποψη της μονάδας παροχής ρεύματος)
 - ii. Συνεχόμενη πίεση του πλήκτρου “ON” στον μπροστινό πίνακα της παροχής ρεύματος μέχρι να ακουστεί χαρακτηριστικός ηλεκτρονικός ήχος επιβεβαίωσης.
 - iii. Έλεγχος των ρυθμίσεων στην οθόνη του μπροστινού πίνακα της παροχής ρεύματος:
 - Η τάση εισόδου της παροχής ρεύματος πρέπει να είναι περίπου 230 (± 10) Volts
 - Η τάση εξόδου και η συχνότητα της παροχής ρεύματος πρέπει να είναι περίπου 230 Volts και 60 Hz, αντίστοιχα.

- Έλεγχος ότι το ημιτονοειδές στην οθόνη του μπροστινού πίνακα της παροχής ρεύματος αναβοσβήνει.
- iv. Ενεργοποίηση του διακόπτη “OUT” (τριπλός διακόπτης άκρα αριστερά σε άποψη της μονάδας παροχής ρεύματος).
- 3. Ενεργοποίηση του διακόπτη που θέτει σε λειτουργία τον λυοφιλοποιητή (διακόπτης στο πίσω αριστερό και κάτω τμήμα του λυοφιλοποιητή).
- 4. Ενεργοποίηση του υπολογιστή ελέγχου του λυοφιλοποιητή.
- 5. Αναμονή μέχρι τη φόρτωση του λογισμικού “Encore” (το οποίο ανοίγει αυτόματα με την ενεργοποίηση του υπολογιστή και του λυοφιλοποιητή) και επιλογή της οθόνης “Synoptic” όπου γίνεται έλεγχος ότι οι παράμετροι έχουν λογικές τιμές.

B. Επιλογή και έναρξη πρωτοκόλλου λυοφιλοποίησης

1. Επιλογή του επιθυμητού πρωτοκόλλου για να πραγματοποιηθεί :
 - i. 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”.
 - ii. Στην οθόνη “Freeze dry Screen” στο λογισμικό ENCORE, επιλέγεται το “Shelf Load” οπότε και αρχίζει η ψύξη του συμπυκνωτή.
 - iii. Όταν τα δείγματα είναι έτοιμα να λυοφιλοποιηθούν, τοποθετούνται στα ράφια του λυοφιλοποιητή:
 - Επιλογή της οθόνης “Manual Tools” στο λογισμικό ENCORE και ενεργοποίηση του διακόπτη “Release Vacuum” και αποσφράγιση της θύρας του λυοφιλοποιητή
 - Αναμονή ώσπου η πίεση μέσα στον λυοφιλοποιητή να ισορροπήσει με την πίεση του περιβάλλοντος και άνοιγμα της θύρας του λυοφιλοποιητή μόλις γίνει αυτό.
 - Τοποθέτηση των δειγμάτων στα ράφια του λυοφιλοποιητή και καλό κλείσιμο της θύρας.
 - Στην οθόνη “Manual Tools” απενεργοποιείται ο διακόπτης “Release Vacuum”.
 - iv. Επιβεβαίωση ότι η θύρα του λυοφιλοποιητή και η θύρα του συμπυκνωτή είναι πολύ καλά κλειστές.
 - v. Επιλογή της οθόνης “Freeze dry Screen” στο λογισμικό ENCORE και επιλογή του πλήκτρου “Start Cycle”. Επιβεβαίωση επιλογής εισάγοντας “y” στο εμφανιζόμενο παράθυρο. Αρχίζει η πραγμάτωση του πρωτοκόλλου λυοφιλοποίησης που περιγράφεται στην οθόνη “Freeze dry Screen”
 - vi. Έλεγχος ότι στο στάδιο της πρωτοταγούς αφυδάτωσης η αντλία κενού επιτυγχάνει κενό 150 mTorr. Σε περίπτωση που αυτό δε συμβεί, οι πιθανές αιτίες είναι δύο:
 - Το λάδι της αντλίας κενού χρειάζεται αλλαγή
 - Η θύρα του λυοφιλοποιητή ή του συμπυκνωτή δεν είναι καλά κλειστή.

Και στις δύο περιπτώσεις η λειτουργία του λυοφιλοποιητή πρέπει να διακοπεί άμεσα.

C. Διακοπή κύκλου λυοφιλοποίησης και απομάκρυνση λυοφιλοποιημένων δειγμάτων

1. Μετά από τουλάχιστον 2 ώρες δευτεροταγούς αφυδάτωσης στους 20 οC, επιλέγεται το πλήκτρο “Cancel Current Cycle” στον πίνακα ENOCRE που εμφανίζεται δεξιά όλων των επιλεγόμενων οθόνων.

2. Επιβεβαίωση επιλογής εισάγοντας “y” στην εμφανιζόμενη οθόνη. 2. Επιλογή της οθόνης “Manual Tools” στο λογισμικό ENCORE και ενεργοποίηση του διακόπτη “Release Vacuum” και αποσφράγιση της θύρας του λυοφιλοποιητή.
3. Αποσφράγιση της θύρας του λυοφιλοποιητή και αναμονή ώσπου η πίεση μέσα στον λυοφιλοποιητή να ισορροπήσει με την πίεση του περιβάλλοντος οπότε και ανοίγει η θύρα.
4. Αφαίρεση των δειγμάτων από τα ράφια του λυοφιλοποιητή και καλό κλείσιμο της θύρας.

D. Απενεργοποίηση Λυοφιλοποιητή

1. Στην οθόνη “Manual Tools” απενεργοποιείται ο διακόπτης “Release Vacuum” και ενεργοποιείται ο διακόπτης “Deforst” 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 “interstage” 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 στυλό πραγματοποιείται απαλά πίεση της βαλβίδας αποστάγγισης νερού που βρίσκεται στα αριστερά της θύρας του συμπυκνωτή με σκοπό την απομάκρυνση τυχόν νερού. Στην περίπτωση που το δείγμα είναι λεπτά ικρίωματα, τότε το υπάρχον νερό είναι ελάχιστο ως μηδαμινό.
6. Αναμονή ώσπου η θερμοκρασία και του “interstage” συστήματος και του συμπυκνωτή να φτάσουν τη θερμοκρασία περιβάλλοντος.
7. Απενεργοποίηση του διακόπτη του λυοφιλοποιητή (διακόπτης στο πίσω τμήμα του λυοφιλοποιητή)
8. Απενεργοποίηση του υπολογιστή που ελέγχει τον λυοφιλοποιητή (μέσω πληκτρολόγησης της επιλογής “Windows start” στο πληκτρολόγιο και μετέπειτα επιλογή της εντολής “Shut down”)

E. Απενεργοποίηση της παροχής ρεύματος

1. Απενεργοποίηση του διακόπτη “OUT” (διπλός διακόπτης άκρα δεξιά σε άποψη της μονάδας παροχής ρεύματος)
2. Συνεχόμενη πίεση της επιλογής “standby” στον μπροστινό πίνακα της παροχής ρεύματος ώσπου να ακουστεί διακοπτόμενος χαρακτηριστικός ηλεκτρονικός ήχος και να αναβοσβήνει στην οθόνη του πίνακα ένα τριγωνικό σήμα με θαυμαστικό.
3. Απενεργοποίηση του διακόπτη “IN” (τριπλός διακόπτης άκρα δεξιά σε άποψη της μονάδας παροχής ρεύματος)

A.6 Δημιουργία σταυροδεσμών μέσω θερμικής κατεργασίας

Εξοπλισμός

- Μετατροπέας τάσης εναλλασσόμενου ρεύματος από 230 σε 115 Volts, 3000 kVA, 550 W, IP21 (RitaTransformers)
- Κλίβανος κενού (Fisher Isotemp, Model 201)
- Αντλία κενού (Welch ChemStar, 1400N)
- Ανεμιστήρας εναλλασσόμενου ρεύματος (SUNON DP201A)

Διαδικασία

1. Σύνδεση του εναλλασσόμενου ρεύματος μετατροπέα τάσης στην εναλλασσόμενη παροχή ρεύματος. Τα δύο βύσματα εξόδου 115 Volts του μετασχηματιστή είναι πάντα συνδεδεμένα με τις εισόδους τροφοδοσίας της αντλίας κενού και του κλιβάνου κενού. Προσοχή για την αποφυγή ηλεκτρικού σοκ.

2. Παρατηρείται ότι η θερμοκρασία εντός του κλιβάνου αρχίζει να αυξάνεται και μέσα σε περίπου 30 λεπτά θα σταθεροποιηθεί περίπου στους 110 °C. Η παρατήρηση της θερμοκρασίας μπορεί να γίνει με τη βοήθεια ενός θερμοστοιχείου. Η τελική θερμοκρασία του κλιβάνου ορίζεται στον δείκτη που υπάρχει στο μπροστά μέρος του κλιβάνου

3. Όταν η θερμοκρασία σταθεροποιηθεί στους 110 °C, η θύρα του κλιβάνου ανοίγει και τα δείγματα τοποθετούνται στο εσωτερικό.

- 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

- i. Απενεργοποίηση της βαλβίδας “Purge”
- ii. Ενεργοποίηση της βαλβίδας “Vacuum”
- iii. Ενεργοποίηση του διακόπτη λειτουργίας της αντλίας κενού. Καθώς η αντλία τραβάει κενό, η πίεση γίνεται 28 bar μέσα σε 1 λεπτό.

5. 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 της ανάπτυξης σταυροδεσμών τερματίζεται:

- i. Απενεργοποίηση του διακόπτη λειτουργίας της αντλίας κενού.
- ii. Απενεργοποίηση της βαλβίδας “Vacuum”.
- iii. Ενεργοποίηση της βαλβίδας “Purge”. Καθώς ατμοσφαιρικός αέρας εισέρχεται στον θάλαμο του κλιβάνου, η πίεση μειώνεται.
- iv. Αποσφράγιση του εξαρτήματος που συγκρατεί κλειστή την θύρα του κλιβάνου και άνοιγμα αυτής μόλις η πίεση του κλιβάνου ισορροπήσει με την πίεση περιβάλλοντος.

7. Πολύ γρήγορη αφαίρεση των δειγμάτων και φύλαξή τους σε κλειστό δοχείο ώστε να μην έρθουν σε επαφή με σκόνη του περιβάλλοντος.
8. Κλείσιμο της θύρας του κλιβάνου και σφράγισμά της με το ειδικό εξάρτημα.
9. Αποσύνδεση του εναλλασσόμενου ρεύματος μετατροπέα τάσης από την παροχή ρεύματος.
10. Αποσύνδεση του ανεμιστήρα εναλλασσόμενου ρεύματος από την παροχή ρεύματος.

A.7 Χρήση της χρωστικής Monochlorobimane (mBCI) σε καλλιέργειες κυττάρων

Υλικά

- Πλάκα καλλιέργειας κυττάρων 96 κελιών με κύτταρα (εν προκειμένω της σειράς HepG2)
- Monochlorobimane (mBCI)
- Θρεπτικό μέσο
- Διμεθυλοσουλφοξείδιο (Dimethylsulfoxide - DMSO)
- Ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών αλάτων (Phosphate-buffered saline – PBS)

Διαδικασία

1. Αμέσως πριν τη χρήση της χρωστικής στα κύτταρα, δημιουργείται το αραιωμένο διάλυμά της στην τελική συγκέντρωση που θα χρησιμοποιηθεί. Για το σκοπό αυτό, λαμβάνεται κατάλληλος όγκος από τη χρωστική αρχικής συγκέντρωσης 20 mM, ο οποίος αραιώνεται με PBS έως τελικής συγκέντρωσης χρωστικής στο νέο διάλυμα 20 μM. (Ενδεικτικά, για εφαρμογή μικροσκοπίας φθορισμού σε πλάκα καλλιέργειας 96 κελιών χρειάζονται 12 ml διαλύματος χρωστικής, τα οποία προκύπτουν από ανάμιξη 12 μl χρωστικής σε 12 ml PBS).
2. Απομακρύνεται το θρεπτικό μέσο από τα κύτταρα της καλλιέργειας και κάθε κελί ξεπλένεται δύο φορές με PBS (100 μl/ανά κελί).
3. Το PBS απομακρύνεται και σε κάθε κελί προσθέτονται 100 μl διαλύματος χρωστικής (12 μM) και ακολουθεί επώαση 30 λεπτών (37 °C, 5.0% CO₂, 90% υγρασία).
4. Με το πέρας του χρόνου επώασης, το διάλυμα της χρωστικής απομακρύνεται και αντικαθίσταται από θρεπτικό μέσο (προτείνεται - Dulbecco's Modified Eagle Medium – DMEM, χαμηλής γλυκόζης) ή καθαρό PBS.
5. Η πλάκα καλλιέργειας τοποθετείται στον εξοπλισμό μικροσκοπίας φθορισμού για απεικόνιση της χρωστικής - εν προκειμένω JuLI™ Stage Real-Time CHR (NanoEntek Ltd, South Korea), φίλτρο DAPI.

A.8 Δημιουργία επιστρομένων πλακών καλλιέργειας με κολλαγόνο

Υλικά

- Πλάκες καλλιέργειας 96 κελιών
- Κολλαγόνο I (rat tail)
- Πυκνό διάλυμα ακετικού οξέος
- Υπερκαθαρό νερό
- Ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών αλάτων (Phosphate-buffered saline – PBS)
- Μονωτική ταινία ή αλουμινόχαρτο

Διαδικασία

1. Ακετικό οξύ και νερό αναμειγνύονται μέχρι τελικής συγκέντρωσης του πρώτου 0,1 M (ενδεικτικά, ανάμιξη 58 μl ακετικού οξέος 17 M σε 10 ml νερό).
2. Το υδατικό διάλυμα ακετικού οξέος που παρασκευάστηκε αφήνεται για τουλάχιστον 15 λεπτά σε θερμοκρασία 2-8 °C.
3. Στη συνέχεια το διάλυμα αυτό χρησιμοποιείται για την αραιώση ποσότητας κολλαγόνου I (rat tail) αρχικής συγκέντρωσης 3,54 mg/ml σε τελική συγκέντρωση 10 μg/ml (ενδεικτικά, 288 μl κολλαγόνου σε 10 ml υδατικού διαλύματος ακετικού οξέος 0,1 M).
4. Το διάλυμα αναδεύεται έντονα και στη συνέχεια τοποθετούνται 100 μl ανά κελί αποστειρωμένης πλάκας 96 κελιών.
5. Ο χρόνος παραμονής εξαρτάται από τις συνθήκες και ο πειραματιστής επιλέγει μεταξύ δύο διαφορετικών αλλά ισοδύναμων τεχνικών:
 - Ολονύχτια παραμονή σε θερμοκρασία 2 – 8 °C
 - 3 ώρες σε συνθήκες επώασης (37 °C, 5.0% CO₂, 90% υγρασία)και στις δύο περιπτώσεις με το κάλυμμα της πλάκας να έχει αφαιρεθεί.
6. Μετά το πέρας αυτού του σταδίου (και στις δύο περιπτώσεις) το διάλυμα που έχει απομείνει (λόγω εξάτμισης) απομακρύνεται και γίνεται πλύση κάθε κελιού με 100 μl PBS δύο φορές.
7. Στη συνέχεια η πλάκα αφήνεται χωρίς κάλυψη σε περιβαλλοντικές συνθήκες για τουλάχιστον 15 λεπτά ώστε να εξατμιστεί τυχόν ποσότητα PBS που έχει απομείνει.
8. Τοποθετείται το κάλυμμα της πλάκας και με μονωτική ταινία καλύπτονται τα άκρα της ή καλύπτεται ολόκληρη με αλουμινόχαρτο.
9. Συντηρείται σε θερμοκρασία 2-8 °C μέχρι τη χρήση της.

A.9 Καλλιέργεια κυττάρων μεταξύ δύο στρωμάτων πρωτεϊνών εξωκυττάριας μήτρας (sandwich)

Υλικά

- Κρυοδιατηρημένη κυτταρική σειρά (εν προκειμένω HepG2)
- Κατάλληλο θρεπτικό μέσο (εν προκειμένω DMEM low glucose)
- Ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών αλάτων (Phosphate-buffered saline – PBS)

- Πλάκες καλλιέργειας 96 κελιών επιστρωμένες με κολλαγόνο I (rat tail) (κατά A.8)
- Παγωμένα ακροφύσια (tips) πιπέτας
- Μίγμα πρωτεϊνών/γλυκοαμινογλυκανών εξωκυττάριας μήτρας (εμπορικό προϊόν Matrigel)
- Παγωμένα φιαλίδια

Διαδικασία

1. Το φιαλίδιο με τα κρυοδιατηρημένα κύτταρα τοποθετείται σε υδατόλουτρο θερμοκρασίας 37 °C έως ότου μακροσκοπικά δεν παρατηρούνται κρύσταλλοι πάγου. Προτείνεται στο στάδιο αυτό να μην ανακινείται το φιαλίδιο και να απομακρύνεται και επανατοποθετείται στο υδατόλουτρο, καθώς ενδέχεται μείωση του αριθμού των ζωντανών κυττάρων.
2. Παράλληλα τοποθετείται ποσότητα τουλάχιστον 20 ml κατάλληλου θρεπτικού μέσου βάσει της κυτταρικής σειράς που θα χρησιμοποιηθεί (Dulbecco's Modified Eagle Medium – DMEM, χαμηλής γλυκόζης για κύτταρα της σειράς HepG2) σε κλειστό φιαλίδιο και αφήνεται στο υδατόλουτρο για θέρμανση.
3. Στη συνέχεια το φιαλίδιο ψεκάζεται με αιθανόλη (70%) και τοποθετείται στον θάλαμο νηματικής ροής (laminar flow hood).
4. Ο συνολικός όγκος του περιεχομένου του φιαλιδίου κρυοδιατήρησης (1,8-2 ml) απομακρύνεται και τοποθετείται σε νέο φιαλίδιο με 10 ml νέο θρεπτικό μέσο. Προτείνεται η πλύση του φιαλιδίου κρυοδιατήρησης με επιπλέον θρεπτικό για την παραλαβή του συνόλου των κυττάρων.
5. Το θρεπτικό μέσο με τα κύτταρα μέσα στο φιαλίδιο εφόσον αυτό είναι καλά κλεισμένο εισάγονται σε θάλαμο φυγοκέντρησης στις 1500 στροφές ανά λεπτό για 5 λεπτά (Σημειώνεται πως αν πρόκειται για αυξημένης ευαισθησίας κυτταρική σειρά ή πρωτογενή ανθρώπινα κύτταρα, οι συνθήκες φυγοκέντρησης σχετικά με τις στροφές ανά λεπτό δεν πρέπει να ξεπερνούν τις 1000).
6. Το φιαλίδιο ψεκάζεται και εισάγεται στο θάλαμο νηματικής ροής.
7. Απομακρύνεται το υπερκείμενο και το ίζημα στο οποίο βρίσκονται τα κύτταρα επαναδιαλυτοποιείται με νέο θρεπτικό μέσο (προτείνεται 1 ml ανά εκατομμύριο κυττάρων) και υπολογίζεται ο αριθμός των κυττάρων με χρωστική ή μετρητή.
8. Για τη δημιουργία της ενδιάμεσης καλλιέργειας τα κύτταρα εισάγονται με πυκνότητα 10000 κύτταρα/100 μl/κελί πλάκας 96 κελιών στα κελιά πλάκας που έχει επίστρωση κολλαγόνου I (rat tail) (Πρωτόκολλο A.8) και αφήνονται σε συνθήκες συνθήκες επώασης (37 °C, 5.0% CO₂, 90% υγρασία).
9. Τα κύτταρα καλλιεργούνται σε αυτές τις συνθήκες με ανανέωση του θρεπτικού μέσου κάθε δύο μέρες έως ότου ο πληθυσμός των κυττάρων καλύπτει το 70-80% της επιφάνειας του κελιού. Για τη σειρά HepG2 αυτό χρειάστηκε 3 ημέρες και μία αλλαγή θρεπτικού.
10. Εφόσον ικανοποιηθεί η παραπάνω συνθήκη το θρεπτικό απομακρύνεται και τα κύτταρα ξεπλένονται με PBS (100μl/κελί) θερμοκρασίας 0 – 2 °C.
11. Εφόσον αφαιρεθεί το PBS, θρεπτικό υλικό σε θερμοκρασία 0 – 2 °C χρησιμοποιείται για την αραιώση ποσότητας του εμπορικού σκευάσματος Matrigel από αρχική συγκεντρωση 9 mg/ml σε τελική 0,25 mg/ml (ενδεικτικά 140 μl Matrigel σε 5 ml θρεπτικό). Το εμπορικό σκευάσμα Matrigel διατηρείται σε στερεή μορφή σε συνθήκες κατάψυξης και γίνεται υγρό σε θερμοκρασίες 0 – 4 °C. Πάνω από αυτό το εύρος το προϊόν υφίσταται αργά μη αντιστρεπτή ζελοποίηση και καταστρέφεται. Συνεπώς κάθε εξοπλισμός που έρχεται σε επαφή με αυτό πρέπει να έχει ανάλογη θερμοκρασία και οι αναμίξεις να

γίνουν άμεσα. Για τη μετατροπή του προϊόντος από στερεό σε υγρό προτείνεται η ολονύχτια παραμονή του σε συνθήκες ψυγείου.

12. Το τελικό διάλυμα Matrigel – θρεπτικού μέσου διοχετεύεται (100μl/κελί) στα κύτταρα όπου και αφήνεται σε συνθήκες επώασης για 3 μέρες χωρίς αλλαγή του θρεπτικού. Σημειώνεται πως αν η κυτταρική σειρά που θα χρησιμοποιηθεί παρουσιάζει σημαντικούς ρυθμούς πολλαπλασιασμού *in vitro* το διάστημα αυτό μπορεί να μεταβληθεί, δεν πρέπει να είναι λιγότερο όμως από 1 ημέρα.
13. Μετά το πέρας του διαλύματος αυτού, το θρεπτικό απομακρύνεται και κάθε κελί ξεπλένεται με 100 μl PBS και ανανεώνεται το θρεπτικό ή εφαρμόζεται κάποια τεχνική μικροσκοπίας μέσω χρωστικών.