



ΕΘΝΙΚΟ ΜΕΤΣΟΒΙΟ ΠΟΛΥΤΕΧΝΕΙΟ
ΣΧΟΛΗ ΕΦΑΡΜΟΣΜΕΝΩΝ ΜΑΘΗΜΑΤΙΚΩΝ ΚΑΙ ΦΥΣΙΚΩΝ
ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ
ΔΙΑΤΜΗΜΑΤΙΚΟ ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΩΝ ΣΠΟΥΔΩΝ
«ΜΙΚΡΟΣΥΣΤΗΜΑΤΑ ΚΑΙ ΝΑΝΟΔΙΑΤΑΞΕΙΣ»

ΕΚΤΥΠΩΣΗ ΚΥΤΤΑΡΩΝ ΜΕ LASER ΜΕ ΤΗΝ ΤΕΧΝΙΚΗ LASER INDUCED
FORWARD TRANSFER (LIFT)

ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ

της

Λέβα Χρυσοβαλάντου Βασιλικής

Επιβλέπων: Αν. Καθηγήτρια Ιωάννα Ζεργιώτη

Αθήνα

2017



ΕΘΝΙΚΟ ΜΕΤΣΟΒΙΟ ΠΟΛΥΤΕΧΝΕΙΟ
ΣΧΟΛΗ ΕΦΑΡΜΟΣΜΕΝΩΝ ΜΑΘΗΜΑΤΙΚΩΝ ΚΑΙ ΦΥΣΙΚΩΝ
ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ
ΔΙΑΤΜΗΜΑΤΙΚΟ ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΩΝ ΣΠΟΥΔΩΝ
«ΜΙΚΡΟΣΥΣΤΗΜΑΤΑ ΚΑΙ ΝΑΝΟΔΙΑΤΑΞΕΙΣ»

ΕΚΤΥΠΩΣΗ ΚΥΤΤΑΡΩΝ ΜΕ LASER ΜΕ ΤΗΝ ΤΕΧΝΙΚΗ LASER INDUCED
FORWARD TRANSFER (LIFT)

ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ

της

Λέβα Χρυσοβαλάντου Βασιλικής

Ερευνητικός Επιβλέπων:

Ακαδημαϊκός Επιβλέπων:

Εγκρίθηκε από την τριμελή εξεταστική επιτροπή την

.....

Αθήνα

2017

.....

Χρυσοβαλάντου Βασιλική Λέβα

© (2017) Εθνικό Μετσόβιο Πολυτεχνείο. All rights Reserved. Απαγορεύεται η αντιγραφή, αποθήκευση και διανομή της παρούσας εργασίας, εξ ολοκλήρου ή τμήματος αυτής, για εμπορικό σκοπό. Επιτρέπεται η ανατύπωση, αποθήκευση και διανομή για σκοπό μη κερδοσκοπικό, εκπαιδευτικής ή ερευνητικής φύσης, υπό την προϋπόθεση να αναφέρεται η πηγή προέλευσης και να διατηρείται το παρόν μήνυμα. Ερωτήματα που αφορούν τη χρήση της εργασίας για κερδοσκοπικό σκοπό πρέπει να απευθύνονται προς το συγγραφέα. Οι απόψεις και τα συμπεράσματα που περιέχονται σ' αυτό το έγγραφο εκφράζουν το συγγραφέα και δεν πρέπει να ερμηνευτεί ότι αντιπροσωπεύουν τις επίσημες θέσεις του Εθνικού Μετσόβιου Πολυτεχνείου.

Ευχαριστίες

Η παρούσα μεταπτυχιακή εργασία εκπονήθηκε στο Εργαστήριο laser του τμήματος Φυσικής της σχολής εφαρμοσμένων Μαθηματικών και Φυσικών επιστημών του ΕΜΠ υπό την επίβλεψη της Αν. καθηγήτριας Ιωάννας Ζεργιώτη σε συνεργασία με το Εργαστήριο Εμβιομηχανικής & Συστημικής Βιολογίας του Επ. καθηγητή Λεωνίδα Αλεξόπουλου του τμήματος Μηχανολόγων Μηχανικών .

Θα ήθελα αρχικά να ευχαριστήσω θερμά την κ. Ζεργιώτη για την ανάθεση της εργασίας, την συνεχή καθοδήγηση και υποστήριξη της. Επίσης, θα ήθελα να ευχαριστήσω τον κ. Αλεξόπουλο για την άριστη συνεργασία σε όλη την διάρκεια της μεταπτυχιακής μου εργασίας. Τέλος, ευχαριστώ τον Κ. Τσουκαλά που δέχτηκε να είναι στην τριμελή μου επιτροπή.

Θερμές ευχαριστίες οφείλω στον Δρ. Δημήτρη Τζεράνη τόσο για την πολύ καλή συνεργασία όσο και για την βοήθεια του σε όλες τις δυσκολίες που αντιμετώπισα στον βιολογικό τμήμα της παρούσας εργασίας. Επίσης, πολλές ευχαριστίες στην Δρ. Μαριαννέζα Χαντζηπέτρου για τις πολύτιμες συμβουλές της και την συνολική της συμβολή ώστε να ολοκληρωθεί η μεταπτυχιακή μου εργασία. Επίσης , θα ήθελα να ευχαριστήσω πολύ την Μαρίνα Μακρύγιαννη καθώς και τους Γιάννη Θεοδωράκο και Αγαμέμνονα Καλαιτζή για την συμβολή τους σε ένα μέρος των πειραμάτων , όπως και την Χριστίνα Κρύου και το Συμεών Παπάζογλου.

Τους Θεοχάρη Ιορδανίδη, Φοίβο Χαντζηκωνσταντινίου και Λούκα Μαυρίκα για την κατασκευή των υλικών, καθώς επίσης και την Δανάη Ζαρείφη για την βοήθεια της στο βιολογικό κομμάτι της εργασίας .

Ακόμη, ευχαριστώ όλα τα μέλη του εργαστηρίου Λέιζερ, καθώς και τα μέλη του εργαστηρίου Εμβιομηχανικής & Συστημικής Βιολογίας του τμήματος Μηχανολόγων Μηχανικών για την βοήθεια και την υποστήριξη που μου προσέφεραν ο καθένας με τον δικό του τρόπο.

Τέλος, ένα ιδιαίτερο ευχαριστώ τους γονείς μου , την αδερφή μου Χρηστίνα για την υποστήριξη που μου παρέχουν σε κάθε βήμα μου. Ευχαριστώ ,ιδιαίτέρως την φίλη μου Ευδοκία και φυσικά το φιλικό μου περιβάλλον για την συνεχή στήριξη τους.

Contents

1	Τεχνικές εκτύπωσης κυττάρων και εφαρμογές.....	15
1.1	Τεχνικές εξώθησης με τη χρήση ακροφυσίου για την εκτύπωση κυττάρων 16	
1.2	Τεχνικές εκτύπωσης κυττάρων χωρίς την χρήση ακροφυσίου	17
1.2.1	Τεχνική εκτύπωσης κυττάρων με laser	17
1.2.2	Τεχνική εκτύπωσης με τη χρήση ακουστικών κυμάτων.....	23
1.2.3	Τεχνικές εξώθησης για την εκτύπωση κυττάρων.....	23
1.3	Αναφορές	26
2	Εκτύπωση καρκινικών υπατικών κυττάρων (Huh7) με laser	31
2.1	Πειραματική διάταξη της τεχνικής εκτύπωσης κυττάρων με laser.....	32
2.1.1	Εκτύπωση καρκινικών υπατικών κυττάρων με τη χρήση ns παλμών laser μήκους κύματος 355 nm σε υποστρώματα καλυπτρίδων.	33
2.1.2	Εκτύπωση καρκινικών υπατικών κυττάρων με τη χρήση ns παλμών laser μήκους κύματος 532 nm	34
2.2	Συμπεράσματα	35
2.3	Αναφορές	40
3	Μελέτη μηχανισμού εκτύπωσης κυττάρων με laser	43
3.1	Μηχανισμοί εκτύπωσης κυττάρων με laser	43

3.2	Πειραματική διάταξη χρόνο-εξαρτώμενης απεικόνισης εκτύπωσης κυττάρων με laser	46
3.3	Αναφορές	59
4	Εκτύπωση κυττάρων σε πορώδη ικρίωματα κολλαγόνου	63
4.1	ΙΚρίωματα κολλαγόνου και η χρήση τους σε κυτταρικές καλλιέργειες	64
4.2	Απεικόνιση εκτυπωμένων κυττάρων μέσω μικροσκοπίας φθορισμού	65
4.3	Συμπεράσματα	73
4.4	Αναφορές	76

Περίληψη

Η παρούσα μεταπτυχιακή εργασία έχει ως αντικείμενο την εκτύπωση καρκινικών κυττάρων με την τεχνική εκτύπωσης **LIFT (laser induced forward transfer)** στο εσωτερικό ικριωμάτων που αποτελούνται από κολλαγόνου τύπου I και γλυκοζαμινογλυκάνες (CG devices) πάχους 100-200 μm . Μέσω της τεχνικής LIFT μπορούμε να τυπώσουμε απευθείας (direct write) από ένα υπόστρωμα δότη σε ένα υπόστρωμα αποδέκτη υγρά ή στερεά δείγματα με παλμούς πολύ μικρής χρονικής διάρκειας (ns) . Επίσης, η τεχνική LIFT έχει βασική εφαρμογή στον τομέα της ιστοτεχνολογίας (Tissue engineering). Με τον όρο αυτό περιγράφουμε μια σειρά από εργαλεία στην διεπιφάνεια των βιοιατρικών και τεχνολογικών επιστημών που χρησιμοποιεί ζωντανά κύτταρα, με σκοπό να βοηθήσει στην δημιουργία ιστού ή στην αναγέννηση για διαγνωστικούς ή θεραπευτικούς σκοπούς. Η βιο –εκτύπωση με την βοήθεια του λέιζερ (laser assisted bio-printing) είναι γενικά μια νέα τεχνολογία στο πεδίο της ιστοτεχνολογίας που αποβλέπει σε βιο-μιμητικές εφαρμογές. Οι μέθοδοι εκτύπωσης με λέιζερ (LAB) είναι πολλά υποσχόμενοι σε ότι αφορά την επεξεργασία ζωντανών ιστών με φυσική βιο-μιμητική λειτουργικότητα .

Στο πρώτο κεφάλαιο πραγματοποιήθηκε μια βιβλιογραφική ανασκόπηση των τεχνικών εκτύπωσης που χρησιμοποιούνται στην εκτύπωση καρκινικών κυττάρων και κάποιες εφαρμογές τους. Στο δεύτερο κεφάλαιο, έγινε παρουσίαση της πειραματικής διάταξης LIFT και παρουσιάστηκε μια διερεύνηση σχετικά με τις παραμέτρους εκτύπωσης της καρκινικής κυτταρικής σειράς huH7. Τα πειράματα διεξήχθησαν με την δεύτερη και Τρίτη αρμονική του laser (532nm-8ps,355nm-10ns) και το υπόστρωμα αποδέκτη ήταν καλυπτρίδα 22x22mm. Επίσης στο παρόν κεφάλαιο παραθέτονται αποτελέσματα απορρόφησης του κυτταρικού διαλύματος και υπολογισμοί απορρόφησης από το υλικό του δότη. Στο τρίτο κεφάλαιο , πραγματοποιήθηκε μια θεωρητική ανάλυση των μηχανισμών εκτύπωσης κυττάρων με την τεχνική LIFT η οποία συνδυάστηκε με τα αποτελέσματα της χρονο-εξαρτώμενης απεικόνισης της εκτύπωσης των κυττάρων με την βοήθεια μιας συμπαγής κάμερας υψηλής ταχύτητας (540000 fps). Τέλος , στο τέταρτο κεφάλαιο παρουσιάζονται τα αποτελέσματα από την εκτύπωση καρκινικών ηπατοκυττάρων σε ικρίσματα κολλαγόνου με γλυκοζαμινογλυκάνες (CG) και πραγματοποιήθηκε ο έλεγχος της βιωσιμότητας τους με το μικροσκόπιο φθορισμού JuLIstage.

Λέξεις κλειδιά: εκτύπωση, laser, κύτταρα, ικρίσματα, μικροδομές

Abstract

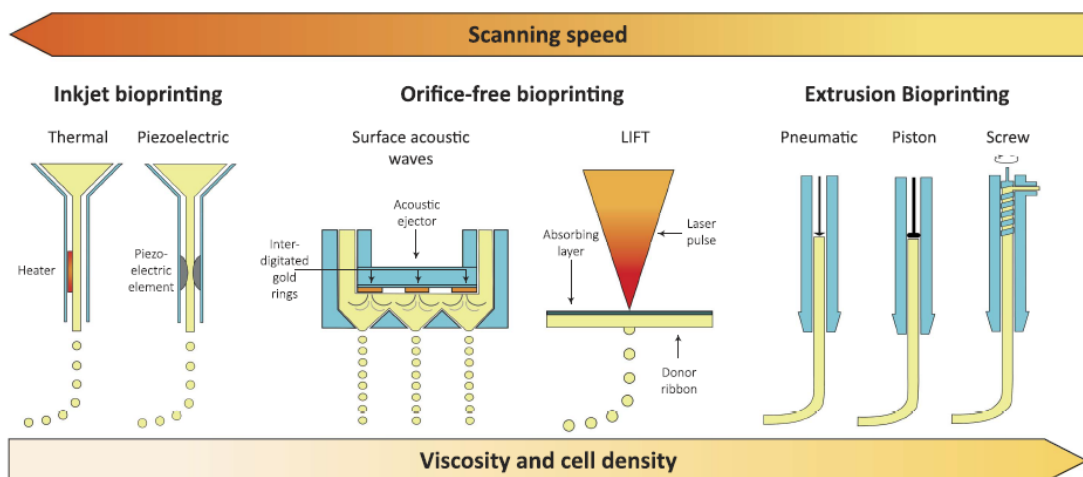
In this master thesis we present the use of a laser printing technique called laser induced forward transfer (LIFT) for the printing of cells in internal scaffolds composed of type I collagen and 100-200 μm of glycosaminoglycans (CG devices). With LIFT we can print directly from a donor substrate to a receiver substrate liquid or solid samples with a great variety of materials. Also, LIFT has a key application in the field of tissue engineering due to the fact that LIFT is a direct write technique in which there is no need of any pre-treatment of the samples to be deposited, meaning that we can print very delicate biomaterials such as cells in their medium without harming them. Laser-assisted bio-printing is a relatively new technology in the field of biomedical tissue engineering research field. Laser printing methods (LAB) are promising for the processing of living tissues with natural biomimetric functionality.

In the first chapter we present a literature review of the printing techniques used for the printing of cancer cells and some of their applications. Moving to the second chapter, we present the experimental setup for the laser printing of cells, while we also depict the optimum laser printing parameters for the printing of huh7 tumor cells. In the third chapter, we investigate the laser printing mechanisms with the use of a high speed camera (max 540000 fps). Finally, in the last chapter we present the results from a cell microarray made of the laser printing of cancerous hepatocyte cells in collagen scaffolds with glycosaminoglycans (CG).

Keywords: laser, printing, direct write, cells, cell printing, scaffolds

1 Τεχνικές εκτύπωσης κυττάρων και εφαρμογές

Η κατασκευή τρισδιάστατων κυτταρικών δομών με την χρήση τεχνολογιών πρόσθετης κατασκευής (Additive Manufacturing Technologies -AMT), έχει πιθανές εφαρμογες στον τομέα της μηχανικής ιστών για την αποκατάσταση, αντικατάσταση και αναγέννηση ελαττωματικών ιστών [1,2]. Για την κατασκευή τρισδιάστατων κυτταρικών δομών, τεχνικές εκτύπωσης βιολογικών υλικών όπως κύτταρα και βιολικά, που αναφέρονται ως βιομελάνια (bioinks), μπορούν να εναποθεθούν ταυτόχρονα για την ανάπτυξη βιοδομών[3,4]. Η χρήση τεχνικών βιο-εκτύπωσης οδηγεί σε καινοτόμες κυτταρικές δομές, καθώς παρακάμπτει την τυχαία εναπόθεση κυττάρων, όπως συνέβαινε με την εναπόθεση κυττάρων σε κριώματα που χρησιμοποιούνται στην κλασική ιστοτεχνολογία (tissue engineering). Επιπλέον, οι τεχνικές αυτές παρέχουν την δυνατότητα εκτύπωσης πολλαπλών ειδών κυττάρων σε συγκεκριμένες θέσεις [3,5,6]. Για να επιτευχθεί η επιθυμητή δομή ενός ιστού, ελέγχονται οι ιδιότητες του εκτυπωμένου βιολικού και προσδιορίζονται οι βασικοί παράμετροι, όπως η πυκνότητα κυττάρων, η γεωμετρία και η δυσκαμψία, καθώς αυτές επηρεάζουν την ανάπτυξη των ιστών και την λειτουργικότητά τους. Οι τεχνικές βιο-εκτύπωσης μπορούν να διαιρεθούν σε τρεις κατηγορίες, τις τεχνικές εκτύπωσης κυττάρων με την χρήση ακροφυσίων (inkjet Bioprinting) τις τεχνικές εκτύπωσης χωρίς την χρήση ακροφυσίων (LIFT, printing by surface acoustic waves) και τις τεχνικές εξώθησης (extrusion Bioprinting). Στην Εικόνα 1. 1 παρουσιάζεται μια σχηματική αναπαράσταση όλων των μεθόδων και οι βασικές παράμετροι που παίζουν σημαντικό ρόλο στην εκτύπωση.



Εικόνα 1. 1: Παρουσίαση μεθόδων και των παραμέτρων που είναι κρίσιμες για την εκτύπωση [7]

1. 1 Τεχνικές εξώθησης με τη χρήση ακροφυσίου(Ink jet) για την εκτύπωση κυττάρων

Στην εκτύπωση κυττάρων με τη χρήση ακροφυσίων, παράγονται μικρά σταγονίδια από το βιολογικό υγρό (1-100 μL , $d=10-50\mu\text{m}$) [8,9], τα οποία τοποθετούνται επιλεκτικά σε προκαθορισμένες θέσεις ενός υποστρώματος. Οι δυο ευρέως χρησιμοποιούμενες μέθοδοι εκτύπωσης με ακροφύσιο γίνεται με τη χρήση πιεζοηλεκτρικών και θερμικών ακροφυσίων [6,10,11].

Στην θερμική εκτόξευση βιολογικού υγρού, χρησιμοποιείται ένα στοιχείο θέρμανσης για την δημιουργία και την εκτόξευση σταγονιδίων μέσω ενός στομίου εσωτερικής διαμέτρου 20-300 μm [12]. Κατά την παραγωγή σταγονιδίων για θερμική εκτόξευση μελάνης ένα κύκλωμα οδήγησης χρησιμοποιείται για την δημιουργία παλμού θέρμανσης ,ο οποίος πολύ γρήγορα (millisecond) αυξάνει την θερμοκρασία του στοιχείου θέρμανσης ,κατά συνέπεια η θερμότητα μεταφέρεται στην περιοχή του υγρού κοντά στην επιφάνεια του στοιχείου και έτσι δημιουργούνται φυσαλίδες , καθώς η θερμική διάχυση μπορεί να θερμάνει σημαντικά το περιβάλλον του υγρού. Κάτω από κατάλληλες συνθήκες, η αύξηση της πίεσης από την φυσαλίδα κατευθύνει μια ελεγχόμενη ποσότητα από το στόμιο ως πίδακα υγρού στο υπόστρωμα. Μετά τον παλμό και την κατάρρευση του υγρού η δεξαμενή τραβάει το υγρό πίσω ώστε να δημιουργηθεί ένα σταγονίδιο.

Η πιεζοηλεκτρική εκτόξευση βιολογικού υγρού γίνεται με παρόμοιο τρόπο , με την διαφορά ότι σε αυτή την περίπτωση χρησιμοποιείται πιεζοηλεκτρικό στοιχείο για την εκτόξευση του υγρού. Ένας ελεγχόμενος παλμός τάσης εφαρμόζεται στο πιεζοηλεκτρικό στοιχείο ώστε να αλλάζει σχήμα με αποτέλεσμα την εκτόξευση ελεγχόμενης ποσότητας υγρού από το στόμιο. Καθώς το πιεζοηλεκτρικό στοιχείο χαλαρώνει προκαλείται επαναφορά του αρχικού σχήματος και η δεξαμενή ξαναγεμίζει.

Στις τεχνικές εκτύπωσης με τη χρήση ακροφυσίων, η ποιότητα της εκτυπωμένης δομής εξαρτάται κατά κύριο λόγο από ιδιότητες του βιολογικού υγρού, όπως η επιφανειακή τάση. Η επιφανειακή τάση είναι το αποτέλεσμα των συνεκτικών δυνάμεων που υπάρχουν μεταξύ των μορίων του υγρού. Όταν τα ηλεκτρικά φορτία την επιφάνεια του βιολογικού υγρού είναι ασθενέστερα από την επιφανειακή τάση, γίνεται εκτύπωση με την μορφή σταγονιδίων . Όταν ισχύει το αντίθετο παράγεται ένας πίδακας υγρού, ο οποίος μεταφέρει μια σταγόνα βιολογικού υγρού στο υπόστρωμα αποδέκτη.

Η επιφανειακή τάση μειώνεται με την αύξηση της συγκέντρωσης των κυττάρων στο βιολογικό υγρό επειδή προσροφώνται περισσότερα κύτταρα στην διεπιφάνεια υγρού-αερίου. Έτσι η συνολική ελεύθερη ενέργεια μειώνεται με αποτέλεσμα μείωση της επιφανειακής τάσης [13].

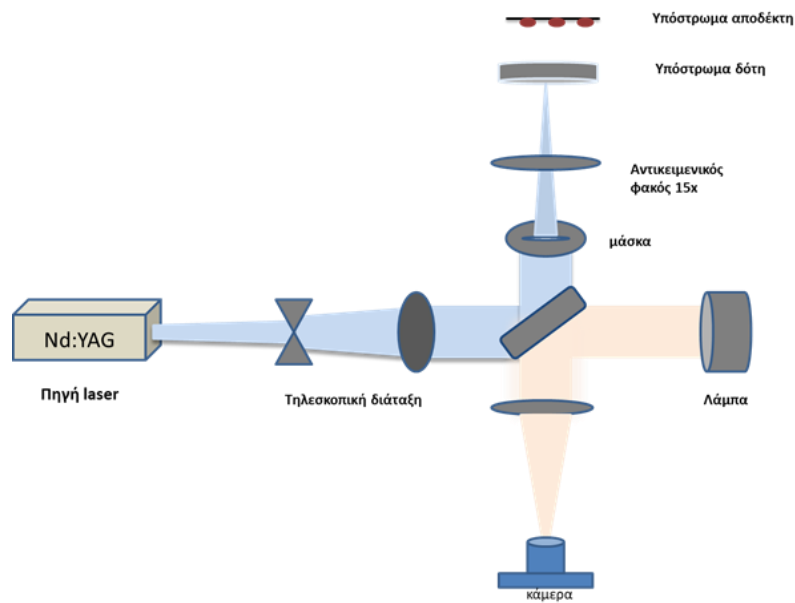
Ένας δεύτερος παράγοντας που έχει καθοριστικό ρόλο στην εκτύπωση βιολογικών υγρών με τη χρήση τεχνικών με ακροφύσια, είναι το ιξώδες του υγρού. Τα προ εκτύπωση βιολογικά υγρά θα πρέπει να παρουσιάζουν χαμηλά ιξώδη (<10 mPa s) και χαμηλή κυτταρική πυκνότητα (<10⁶ κύτταρα/ml) [14,15,16] για την αποφυγή φραγής του ακροφύσιου. Αυτές οι συνθήκες θέτουν περιορισμούς στην διαδικασία εκτύπωσης. Παρά τους περιορισμούς που περιγράφονται παραπάνω, οι εκτυπωτές με τη χρήση ακροφυσίων χρησιμοποιούνται ευρέως [10,14,17] για την εκτύπωση κυττάρων διακριτικής ικανότητας 10-50μm [10,18,19].

1. 2 Τεχνικές εκτύπωσης κυττάρων χωρίς την χρήση ακροφυσίου

1.2.1 Τεχνική εκτύπωσης κυττάρων με laser

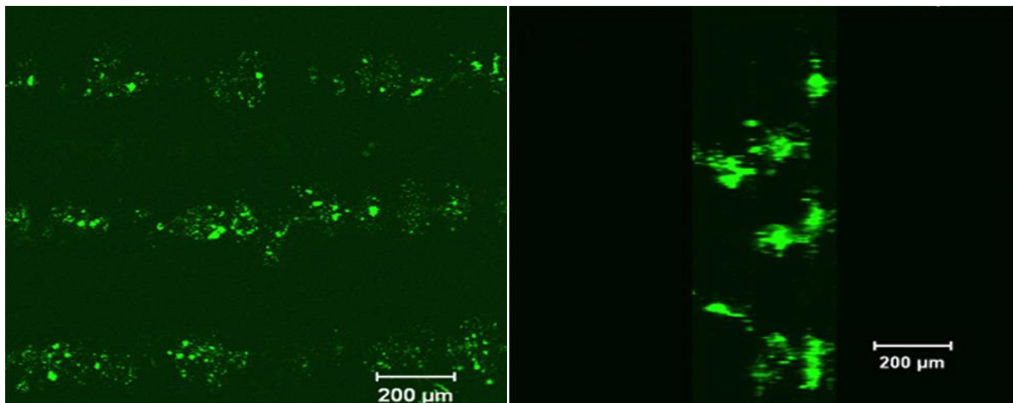
Η βιο-εκτύπωση υποβοηθούμενη από laser (Laser Assisted Bio-printing –LAB) είναι μια αναδυόμενη τεχνολογία στον τομέα της μηχανικής ιστών. Σύμφωνα με την τεχνική εκτύπωσης με laser, οι κυτταρικές βιοδομές είναι αποτέλεσμα του συνδυασμού των παραμέτρων της ακτινοβολίας laser που χρησιμοποιείται και των ιδιοτήτων του βιολογικού υγρού, όπως το ιξώδες. Οι τεχνολογίες εκτύπωσης νέας γενιάς όπως είναι και η τεχνική LIFT σε συνδυασμό με την ήδη υπάρχουσα τεχνολογία ικριωμάτων, αναμένεται να οδηγήσει σε καινοτόμα αποτελέσματα, καθώς γίνεται επιλεκτική τοποθέτηση των κυττάρων και κατά συνέπεια αναπτύσσονται απόλυτα ελεγχόμενες κυτταρικές δομές. Τα ικριώματα που χρησιμοποιούνται ήδη στην ιστοτεχνολογία, εξασφαλίζουν την δημιουργία περιβάλλοντος όμοιου με αυτό των ιστών, όπως αφορά των θρεπτικών υλικών για την ανάπτυξη των κυττάρων και των μηχανικών ιδιοτήτων των ιστών, ενώ ταυτόχρονα διευκολύνουν και την προσκόλληση κυττάρων στην επιφάνεια και την τρισδιάστατη δομή τους.

Μια ενδεικτική πειραματική διάταξη της τεχνικής (**Εικόνα 1. 2**) αποτελείται από μια πηγή laser, το υπόστρωμα που φέρει το προς εκτύπωση υγρό (donor) καθώς και το υπόστρωμα του αποδέκτη (receiver) όπου γίνεται η ελεγχόμενη εναπόθεση μετά την ακτινοβολία του υποστρώματος δότη. Αυτά τα δυο υποστρώματα τοποθετούνται παράλληλα σε απόσταση 100-1000 μm [20]. Επιπρόσθετα, το υπόστρωμα δότη, συχνά φέρει ένα λεπτό μεταλλικό υμένιο το οποίο απορροφά την ακτινοβολία του λέιζερ (DRL-dynamic Release Layer).



Εικόνα 1. 2: Πειραματική διάταξη της τεχνικής LIFT που χρησιμοποιείται στην εκτύπωση κυττάρων[20]

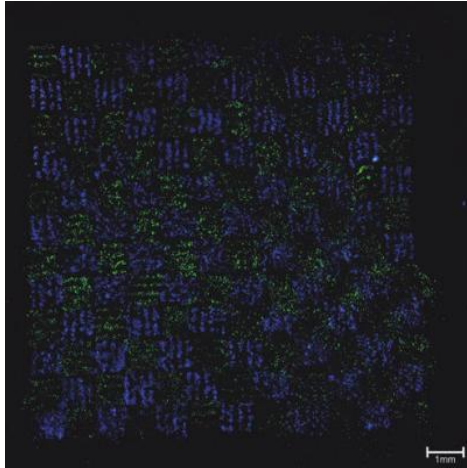
Η πρώτη καταγραφή χρήσης της τεχνικής LIFT στην εκτύπωση κυττάρων έγινε το 2008 από τους Othon et al. (Εικόνα 1.3) όπου έγινε εκτύπωση σε γραμμές μήκους 1 mm και πλάτους 20 μm , όσο και το μέγεθος του κυττάρου σε ένα πολυστρωματικό ικρίωμα υδρογέλης. Για την εκτύπωση χρησιμοποιήθηκε η κύτταροσειρά Olfactory ensheathing cells (OECs) με σκοπό την δημιουργία τρισδιάστατων βιοδομών οι οποίες αργότερα εφαρμόστηκαν και για την ανάπτυξη βιολογικών ιστών [21].



Εικόνα 1. 3: Απεικόνιση με συνεστίαση μικροσκόπιο του εκτυπωμένου ικριώματος, A ενός στρώματος του 3D ικριώματος, B απεικόνιση του ικριώματος κατά μήκος του Z. (Z stack)[21]

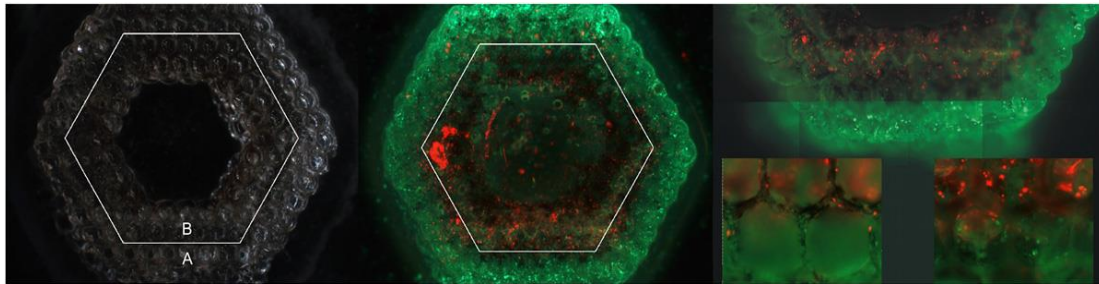
Το 2010 οι Koch et al. πραγματοποίησαν εκτύπωση κυτταρικών σειρών δέρματος (ινοβλάστες και κερατινοκύτταρα) και μεσεγχυματικών βλαστοκυττάρων (hMSC) με την μέθοδο LIFT όπου αξιολογήθηκε η επίδραση της τεχνικής στα κύτταρα. Επιβεβαιώθηκε πως τα κύτταρα του δέρματος επιβιώνουν σε ποσοστό $98\% \pm 1\%$ και τα βλαστοκύτταρα σε ποσοστό $90\% \pm 10\%$. Χρησιμοποιήθηκε ένα Nd:YAG λέιζερ με

μήκος κύματος 1064nm, χρονικής διάρκειας παλμού 8-9 ns στα 20Hz. Δημιουργήθηκε ένα pattern το οποίο αποτελούνταν από 2 είδη κυττάρων (NIH3T3-green, HaCaT-blue) και το αποτέλεσμα φαίνεται στην Εικόνα 1.4 από μικροσκόπιο φθορισμού. Επίσης, αξιολογήθηκε ο ρυθμός πολλαπλασιασμού των κύτταρων μετά την εκτύπωση(σε διάστημα 4 ημερών) και των τριών κυτταρικών σειρών και δεν προέκυψε μεγάλη διαφορά σε σχέση με τα μη εκτυπωμένα κύτταρα.[22]



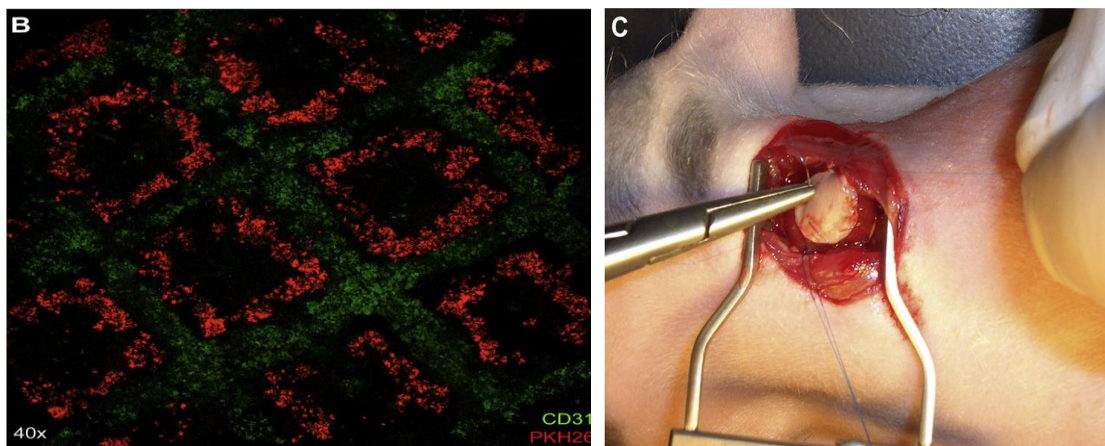
Εικόνα 1. 4: Απεικόνιση με μικροσκόπιο φθορισμού ινοβλαστών (NIH3T3,χρώση με CFDA-πράσινο) και κερατινοκυττάρων(HaCaT, χρώση με Hoechst-μπλε) σε σχήμα σκακιέρας με την τεχνική LIFT[22]

Την ίδια χρονιά, οι A Ovsianikov et al. χρησιμοποίησαν την τεχνική 2-Photon-Polymerization (2PP) με σκοπό να κατασκευάζουν scaffolds από το μονομερές acrylated poly(ethylene glycol), στα οποία έγινε η εμφύτευση των κυττάρων με την τεχνική LIFT. Με αυτή την τεχνική εναπόθεσης κυττάρων μέσα στο ικρίωμα μπόρεσαν να εκτυπώσουν είτε μεμονωμένα κύτταρα ή ομάδες κυττάρων . Χρησιμοποίησαν δυο κυτταρικές σειρές, τα λεία μυϊκά κύτταρα (vascular smooth muscle-like cells, vSMC) και επιθηλιακά κύτταρα (ECs). Το ικρίωμα δημιούργησαν είχε εξαγωνικό σχήμα , τα vSMC εκτυπώθηκαν στην εξωτερική περιοχή του scaffold , ενώ τα ECs στην εσωτερική .Με αυτή τη μέθοδο μπόρεσαν να ελέγξουν την πυκνότητα καθώς και την θέση που τοποθετήθηκαν τα κύτταρα. Στην Εικόνα 1.5 το πράσινο σήμα φθορισμού προέρχεται από τα vSMC με (χρώση με CALCEIN) και το πορτοκαλί σήμα από τα ECs (χρώση με Tamra-5). Από τις εικόνες παρατηρείται έχει μεταφερθεί μικρότερη ποσότητα επιθηλίων σε σχέση με τα vSMC και ότι αμέσως μετά την εκτύπωση τα κύτταρα συνδέονται στο ικρίωμα [23]. Παρατηρείται πως σε όλο το πάχος του ικρίωματος (scaffold) υπάρχει απότομη μετάβαση μεταξύ των δυο περιοχών.



Εικόνα 1. 5: Απεικόνιση ικρίωματος μετά την εκτύπωση των κυττάρων με LIFT :α)εικόνα σκοτεινού πεδίου , στην περιοχή A έχει πραγματοποιηθεί εναπόθεση της κυτταρικής σειράς vSMCs και στην B της ECs β) εικόνα φθορισμού που δείχνει την θέση των διαφορετικών κυτταρικών σειρών στο ικρίωμα μετά την εκτύπωση γ)Λεπτομερής εικόνα του ικρίωματος.[23]

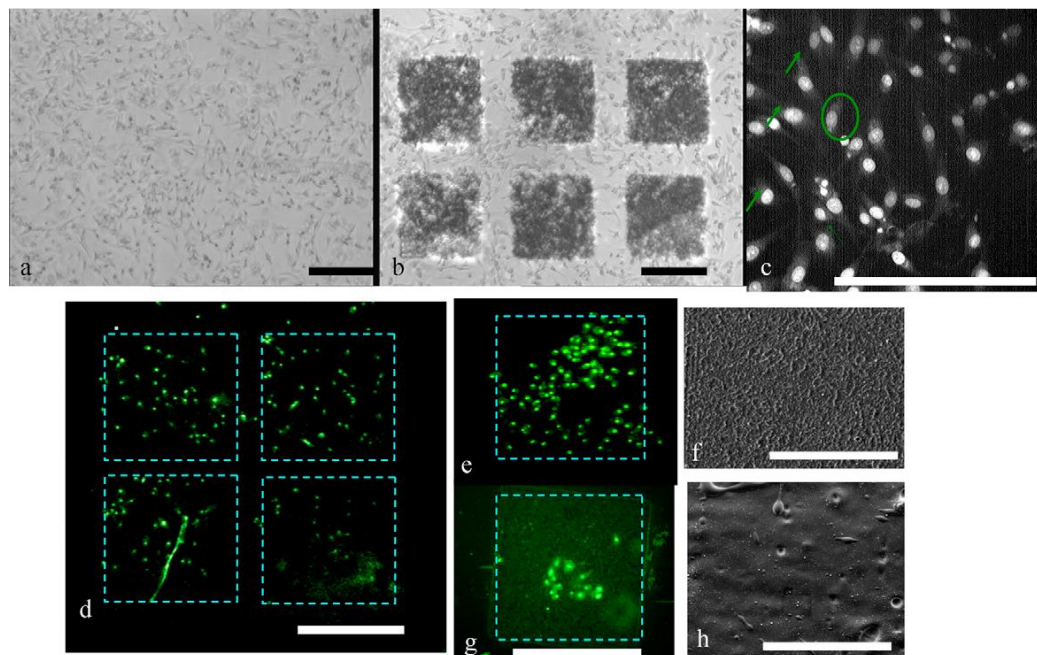
Το 2011 υπάρχει η πρώτη καταγεγραμμένη προσπάθεια εκτύπωσης τρισδιάστατων βιοδομών για την ανάπτυξη ιστών από τους R. Gaebel et al. Οι κυτταρικές σειρές που χρησιμοποιήθηκαν για την εκτύπωση ήταν ενδοθηλιακά κύτταρα (HUVEC) και μεσεγχυματικά βλαστοκύτταρα (hMSC) σε πολυεστερικούς δίσκους διαμέτρου 8 mm και πάχους 100 μm με σκοπό την δημιουργία καρδιακού επιθέματος. Το επίθεμα αυτό εφαρμόστηκε σε εργαστηριακά ποντίκια [24].



Εικόνα 1. 6: A) Πειραματική διάταξη της τεχνικής LIFT για την δημιουργία του καρδιακού επιθέματος B) Διάταξη των κυττάρων 24 ώρες σε σχήμα σκακιάρας C) *in vivo* εμφύτευση του καρδιακού επιθέματος ραμμένο στην περιοχή του φλεγμονώδους μυοκαρδίου[24]

Το 2013 οι S. Michael et al. δημιούργησαν ένα πολυστρωματικό κυτταροποιημένο ισοδύναμο δέρματος για θεραπεία εγκαυμάτων. Αυτό δοκιμάστηκε *in vivo* ώστε να αποδειχθεί η ικανότητα σχηματισμού ιστού και η κυτταρική συμπεριφορά των τυπωμένων κυττάρων. Χρησιμοποιήθηκαν 2 κυτταρικές σειρές (ινοβλάστες και

κερατινοκύτταρα). Το προς εκτύπωση διάλυμα περιείχε κολλαγόνο και κύτταρα και εκτυπώθηκε στρώμα-στρώμα (layer-by-layer) σε ένα υπόστρωμα γυαλιού [13]. Την ίδια χρονιά οι V. Dinca et al. τύπωσαν με την τεχνική LIFT πολυμερές τριαζενίου (TP) σε καλυπτρίδες και σε μαλακά υποστρώματα (Thermanox) σχηματίζοντας δομές με συγκεκριμένα μορφολογικά χαρακτηριστικά (Εικόνα 1.9). Το συγκεκριμένο πολυμερές έπαιξε το ρόλο του ενδιάμεσου απορροφητικού στρώματος κατά την διαδικασία της εκτύπωσης. Οι δομές αυτές χρησιμοποιήθηκαν για να μελετηθεί *in vitro* η επίδραση των μορφολογιών στην κυτταρική συμπεριφορά 2 κυτταρικών σειρών (L929 mouse fibroblast, oligodendrocytes). Επίσης, παρατηρήθηκε η επίδραση της πυκνότητας ενέργειας στην μορφολογία των δομών που εκτυπώθηκαν. Η βασική εφαρμογή αυτών των δομών είναι για την καθοδήγηση και την συνδεσιμότητα των κυττάρων για την δημιουργία ιστών. Τα αποτελέσματα παρουσιάζονται στην εικόνα 6. Τα αποτελέσματα που εξήχθησαν ήταν τα εξής: Καθώς η πυκνότητα ενέργειας μειώνεται από την τιμή 650 mJ/cm^2 στα 460 mJ/cm^2 αυξάνεται η πρόσφυση (adhesion) του αριθμού των κυττάρων στις δομημένες επιφάνειες. Η μεγαλύτερη ποσότητα OLN cells στις δομές παρατηρήθηκε στα 380 mJ/cm^2 . Στην περίπτωση των ινοβλαστών δεν μπορούν να εξαχθούν παρόμοια αποτελέσματα [25].

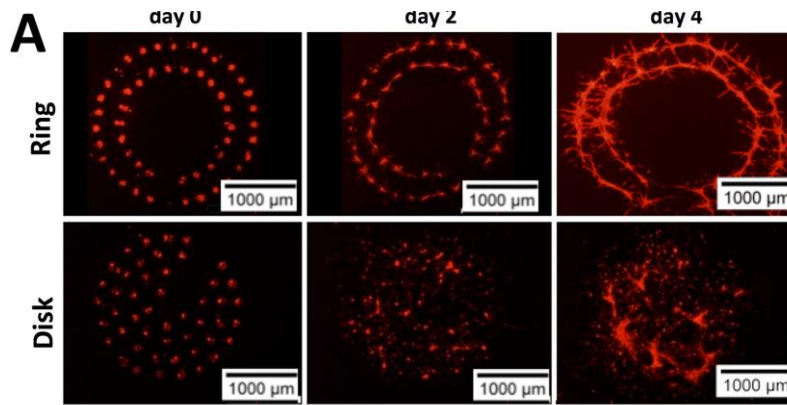


Εικόνα 1. 7: a) επιφάνεια αναφοράς με κύτταρα b) επιφάνεια Thermanox μετά την εκτύπωση των PEI εικονοστοιχείων μαζί με τα κύτταρα μετά από 48 ώρες. c) Εικόνα φθορισμού των κυττάρων στην επιφάνεια αναφοράς. d) Εικόνες φθορισμού μετά την εκτύπωση του PEI και με πυκνότητα ενέργειας 380 mJ/cm^2 στην καλυπτρίδα (e) και 250 mJ/cm^2 στο Thermanox (g). Στις δυο τελευταίες παρουσιάζεται η μορφολογία των PEI pixel χωρίς την προσθήκη κυττάρων.[25]

Το 2017 οι Zhang et al. πραγματοποίησαν μια απεικόνιση της χρονική ανάλυση του σχηματισμού πίδακα/σταγόνας και εναπόθεσης κατά την διαδικασία εκτύπωσης

βιομελανιών με και χωρίς κύτταρα για διαφορετικές πυκνότητες ενέργειας του λέιζερ. Παρουσιάζουν εικόνες χρονικής απεικόνισης της σταγόνας και την διαδικασίας εναπόθεσης της στο υπόστρωμα. Το βασικό συμπέρασμα ήταν πως καθώς αυξάνεται η πυκνότητα ενέργειας υπάρχουν τρία βασικά στάδια εκτόξευσης κατά την διαδικασία σχηματισμού του πίδακα : σε χαμηλές τιμές του fluence δεν γίνεται μεταφορά υλικού. Σε ενδιάμεσες πραγματοποιείται, εκτόξευση ομοιόμορφου πίδακα χωρίς περιφερειακά σταγονίδια .Σε πολύ μεγάλες τιμές του fluence παρατηρήθηκε δημιουργία νεφελώματος που οδηγεί στην δημιουργία πολλαπλών σταγόνων [26]. Οι Deng et al. χρησιμοποίησαν την τεχνική LIFT ώστε να απομονώσουν μεμονωμένα κύτταρα (single cell) με την χρήση ενός κλειστού θαλάμου από PDMS εμβαπτισμένο σε medium για την αποφυγή μόλυνσεων και την διατήρηση της υγρασίας. Χρησιμοποιήθηκαν Hela cells για την μελέτη των κατάλληλων παραμέτρων του laser και προέκυψαν στατιστικά αποτελέσματα σχετικά με το ποσοστό πολλαπλασιασμού και τον αριθμό των κυττάρων. Στο διάλυμα προς εκτύπωση προστέθηκε γλυκερόλη με σκοπό την αύξηση του ιξώδους και στο υπόστρωμα αποδέκτη προστέθηκε ένα στρώμα από αλγινίνη. Συμπερασματικά, αυτό που επηρεάζει την βιωσιμότητα είναι το πάχος του DRL (ενδιάμεσο στρώμα απορρόφησης) καθώς και η πυκνότητα ενέργειας του λέιζερ αφού επηρεάζουν την ενέργεια που εισάγεται στην διαδικασία [27].

Οι Keriquel et al. χρησιμοποιώντας την τεχνική LIFT τύπωσαν MSCs με διαφορετικές κατανομές (κύκλος, δίσκος), (Εικόνα 1.10) σε συνδυασμό με την εκτύπωση κολλαγόνου nHA ,ώστε να μπορέσουν να κατευθύνουν την *in vivo* αναγέννηση ιστού με βιο-εκτύπωση και να εξετάσουν την καταλληλότερη γεωμετρία για την εφαρμογή. Στόχος είναι χρησιμοποιώντας την τεχνική να γίνει αναγέννηση *in situ* σε ένα οστικό έλλειμμα κρίσιμου μεγέθους (*critical size bone defect*) με την εκτύπωση διαφορετικών βιολογικών συστατικών και μεσεγχυματικών στρωματικών(MSCs) κυττάρων με καθορισμένο τρόπο. Αρχικά πραγματοποιηθήκαν *in vitro* δοκιμές ώστε να καθοριστούν οι συνθήκες και η κυτταρική απόκριση, ενώ στο πείραμα *in situ* χρησιμοποιήθηκαν ποντίκια. [28]



Εικόνα 1. 8: Εικόνες απεικόνισης φθορισμού των 2 κατανομών (δακτυλίου και κύκλου) την 1^η, την 2^η και την 4^η μέρα.[28]

1.2.2 Τεχνική εκτύπωσης με τη χρήση ακουστικών κυμάτων

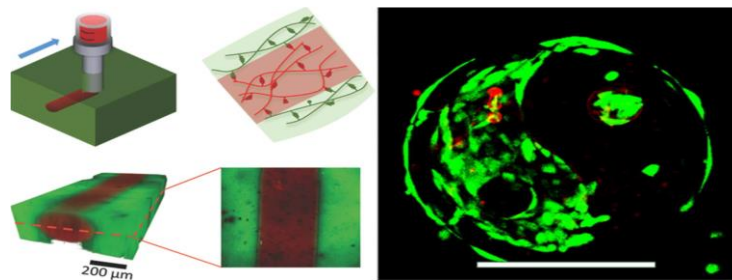
Άλλη μια τεχνική βιο-εκτύπωσης χωρίς ακροφύσια βασίζεται σε επιφανειακά ακουστικά κύματα [29,30]. Η εκτύπωση βασίζεται σε μια συσκευή μικρορροϊκού που χρησιμοποιεί γεννήτριες ακουστικών κυμάτων για την παραγωγή κυμάτων κατά μήκος της συσκευής. Ο σχεδιασμός της επιτρέπει την οδήγηση των παραγόμενων κυμάτων, ώστε να συναντηθούν σε κάθε έναν απ τους τρεις άξονες. Στα σημεία συνάντησης τα κύματα σχηματίζουν έναν τρισδιάστατο κόμβο που “πιάνει” μεμονωμένα κύτταρα. Με αυτό τον τρόπο οδηγούν τα κύματα να μετακινήσουν τα κύτταρα και να τα τοποθετήσουν στο σημείο εναπόθεσης. Επίσης, η συσκευή μπορεί να τοποθετήσει ομάδες κυττάρων σε προεπιλεγμένες θέσεις (patterns), με σκοπό την δημιουργία ιστών διαφόρων οργάνων.[31] Το γεγονός ότι τα κύτταρα δεν εκτίθενται στην γεωμετρία των ακροφυσίων και σε υψηλές τιμές πίεσης και θερμότητας έχει ως αποτέλεσμα μεγάλα ποσοστά κυτταρικής βιωσιμότητας (>89,8%). Επιπλέον, τα βιολογικά υγρά μπορούν να εκτυπωθούν σε διάφορες τιμές επιφανειακών τάσεων και ιώδη [29,30].

1.2.3 Τεχνικές εξώθησης για την εκτύπωση κυττάρων

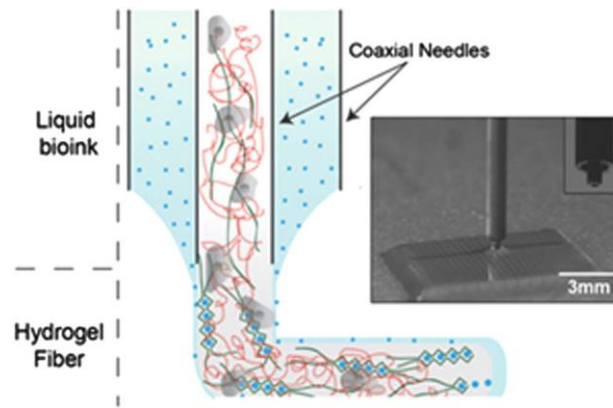
Σύμφωνα με τη βιβλιογραφία, οι τεχνικές μικροεξώθησης είναι οι πιο διαδεδομένες μέθοδοι κατασκευής τρισδιάστατων δομών με κύτταρα [32,33]. Στις τεχνικές μικροεξώθησης, τα βιολογικά υγρά ωθούνται από πλαστικές σύριγγες μιας χρήσης στο υπόστρωμα αποδέκτη [34]. Σε αντίθεση με την τεχνική LIFT και τον εκτυπωτή με ακροφύσιο, ο εκτυπωτής εξώθησης δεν εκτυπώνει μικρά σταγονίδια από το βιολογικό υγρό αλλά μεγαλύτερες σταγόνες (διαμέτρου περίπου 150-300μm) [8,35-36]. Σύμφωνα με τις τεχνικές αυτές, είτε γίνεται χρήση εμβόλου, το οποίο παρέχει άμεσα τον έλεγχο της ροής του βιολογικού υγρού, είτε γίνεται χρήση βίδας (Screw-based deposition), η οποία χρησιμοποιείται για υγρά με μεγαλύτερο ιώδες [37]. Ωστόσο σε αυτή την μέθοδο οι πιέσεις που ασκούνται στα κύτταρα, μπορεί να είναι επιβλαβής

καθώς οδηγούν στη διάσπαση των κυτταρικών μεμβρανών και κατά συνέπεια στον κυτταρικό θάνατο [38].

Πλεονεκτήματα της βιο-εκτύπωσης με μικρο-εξώθηση είναι η δυνατότητα εκτύπωσης παχύρευστων υγρών ($30 - 6 \times 10^7$ mPa*s) με πολύ υψηλές πυκνότητες κυττάρων και σφαιροειδών κυττάρων στο εσωτερικό ικριωμάτων [17,39]. Τα μειονεκτήματα της τεχνικής είναι η χαμηλή διακριτική ικανότητα εκτύπωσης (200-1000μm), και το μειωμένο ποσοστό βιωσιμότητας των εκτυπωμένων κυττάρων λόγω της διατμητικής τάσης [37,17,40].



Εικόνα 1. 9 (αριστερά) Εξώθηση βιολογικού υγρού με διατμητική διάσπαση μέσα στην υποστηρικτική υδρογέλη που επιτρέπει την εκτύπωση υψηλής ανάλυσης και την δημιουργία πολυμορφικών δομών που περικλείουν τα κύτταρα[41](δεξιά)Βιο-εκτύπωση χρησιμοποιώντας ομοαξονικό σύστημα βελόνας. [42]



Εικόνα 1. 10 Πολλαπλασιασμός κυττάρων σε μια κατασκευή τυπωμένη με πολυμερισμό δυο φωτονίων, σε κλίμακα 200 μ m [43].

Στην παρούσα μεταπτυχιακή εργασία έχει ως αντικείμενο έρευνας την εκτύπωση καρκινικών κυττάρων σε ικρίωματα κολλαγόνου με γλυκοζαμινογλυκάνες (CG devices). Για το σκοπό αυτό χρησιμοποιείθηκε τα καρκινικά ηπατοκύτταρα HuH7 τα οποία ακτινοβολήθηκαν με πηγή λέιζερ και εναποτέθηκαν στο εσωτερικό των ικριωμάτων σε προκαθορισμένες μικροσυστοιχίες. Ένα από τα βασικά πλεονεκτήματα της παραπάνω έρευνας είναι πως δίνεται η δυνατότητα εναπόθεσης των κυττάρων σε συγκεκριμένες θέσεις μέσα στο ικρίωμα, επιπλέον δίνεται η δυνατότητα εκτύπωσης παραπάνω από μια κυτταρικών σειρών.

Στο πρώτο κεφάλαιο έγινε μια βιβλιογραφική ανασκόπηση των τεχνικών που είναι ευρέως γνωστές στην εκτύπωση κυττάρων , καθώς επίσης και μια ιστορική αναδρομή που αφορά την τεχνική LIFT. Στο δεύτερο κεφάλαιο παρουσιάζονται τα πρώτα αποτελέσματα εκτύπωσης κυττάρων σε καλυπτρίδες και μια μελέτη σχετικά με τους μηχανισμούς απορρόφησης της ακτινοβολίας από το βιολογικό υγρό. Στο τρίτο κεφάλαιο έγινε μια παρουσίαση των αποτελεσμάτων σχετικά με τους μηχανισμού εκτύπωσης κυττάρων με laser. Στο τέταρτο κεφάλαιο παρουσιάζονται μια σειρά από αποτελέσματα εκτύπωσης καρκινικών ηπατοκυττάρων σε ικρίωματα κολλαγόνου και κάποια συμπεράσματα που εξάγονται από τα αποτελέσματα απεικόνισης .

1.3 Αναφορές

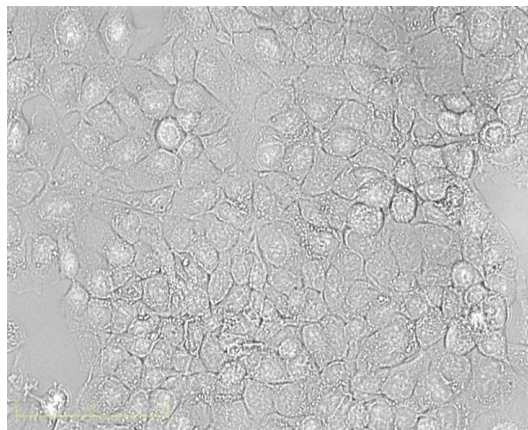
-
- [1] Chan B P and LeongKW 2008, Scaffolding in tissue, engineering: general approaches and tissue-specific, considerations Eur. Spine J. 17 467–79
- [2] Langer R and TirrellDA 2004 Designing materials for biology, and medicine Nature 428 487–92
- [3] Mironov V, ReisNand Derby B 2006, Review: bioprinting: a beginning Tissue Eng. 12 631–4
- [4] Groll J et al 2016, Biofabrication: reappraising the definition of an evolving field Biofabrication 8 13001
- [5] AtalaA and Yoo J J 2015, Essentials of 3DBiofabrication and Translation (London: Elsevier)
- [6] Campbell ,PGand ,Weiss L E (2007), Tissue engineering with the aid of inkjet printers Expert Opin. Biol. Ther. 7 1123–7
- [7]KHölzl et al, Bioink properties before, during and after 3D bioprinting, Biofabrication 8, (2016) 032002 doi:10.1088/1758-5090/8/3/032002
- [8] Pereira R F and Bártolo P J 2015 3D bioprinting of photocrosslinkable hydrogel constructs J. Appl. Polym. Sci. 132 n/a-n/a
- [9] NakamuraM,KobayashiA, Takagi F,WatanabeA,HirumaY, Ohuchi K, Iwasaki Y,Horie M, Morita I and Takatani S 2005, Biocompatible inkjet printing technique for designed seeding of individual living cells Tissue Eng. 11 1658–66
- [10] Saunders R E and Derby B 2014, Inkjet printing biomaterials for tissue engineering: bioprinting Int. Mater. Rev. 59 430–48
- [11] Calvert P and Boland T 2012, Biopolymers and Cells Inkjet Technology for Digital Fabrication ed IMHutchings and GDMartin (New York: Wiley) pp 275–305
- [12] Van Dam, D., Clerc, C., Experimental study of the impact of an impact of an ink-jet droplet of a solid substrate. *Phys. Fluids* 2004, 16, 3403–3414.
- [13] Xu C, Zhang M, Huang Y, Ogale A, Fu J and Markwald R R 2014, Study of droplet formation process during drop-on-demand Inkjetting of living cell-laden bioink Langmuir 30 9130–8
- [14] Xu T, Jin J, Gregory C, Hickman J J and BolandT2005, Inkjet printing of viable mammalian cells Biomaterials 26 93–9
- [15] Calvert P 2001 Inkjet printing for materials and devices Chem. Mater. 13 3299–305
- [16] Kim JD, Choi J S, Kim B S, Chan Choi Y and Cho YW2010 Piezoelectric inkjet printing of polymers: stem cell patterning on polymer substrates Polymer 51 2147–54
- [17] Murphy SV and AtalaA 2014 3D bioprinting of tissues and organs Nat. Biotechnol. 32 773–85

-
- [18]Phillippi J A, Miller E, Weiss L, Huard J, Waggoner A and Campbell P ,2008 Microenvironments engineered by inkjet bioprinting spatially direct adult stem cells toward muscle and bone-like subpopulations *Stem Cells* 26 127–34
- [19]Campbell PG, Miller ED, Fisher GW, Walker LM and Weiss L E 2005 Engineered spatial patterns of FGF-2 immobilized on fibrin direct cell organization *Biomaterials* 26 6762–70
- [20]Barron, J., Young, H., Dlott, D., Darfler, M. *et al.*, Printing of protein microarrays via a capillary-free fluid jetting mechanism. *Proteomics* 2005, 5, 4138–4144.
- [21]Othon CM1, Wu X, Anders JJ, Ringeisen BR. Single-cell printing to form three-dimensional lines of olfactory ensheathing cells, *Biomed Mater.* (3):034101, 2008. doi: 10.1088/1748-6041/3/3/034101
- [22] Koch L, Kuhn S, Sorg H, Gruene M, Schlie S, Gaebel R, Polchow B, Reimers K, Stoelting S, Ma N, Vogt PM, Steinhoff G, Chichkov B. Laser printing of skin cells and human stem cells. *Tissue Eng Part C Methods.* 16(5):847-54, 2010. doi: 10.1089/ten.TEC.2009.0397.
- [23] Ovsianikov A, Gruene M, Pflaum M, Koch L, Maiorana F, Wilhelmi M, Haverich A, Chichkov B. Laser printing of cells into 3D scaffolds. *Biofabrication.* 2(1):014104, 2010. doi: 10.1088/1758-5082/2/1/014104.
- [24] Gaebel R, Ma N, Liu J, Guan J, Koch L, Klopsch C, Gruene M, Toelk A, Wang W, Mark P, Wang F, Chichkov B, Li W, Steinhoff G. Patterning human stem cells and endothelial cells with laser printing for cardiac regeneration. *Biomaterials.* 32(35):9218-30, 2011. doi: 10.1016/j.biomaterials.2011.08.071.
- [25]Michael S, Sorg H, Peck CT, Koch L, Deiwick A, Chichkov B, Vogt PM, Reimers K. Tissue engineered skin substitutes created by laser-assisted bioprinting form skin-like structures in the dorsal skin fold chamber in mice. *PLoS One.* 2013;8(3):e57741. doi : 10.1371/journal.pone.0057741.
- [26]Zhang Z, Xu C, Xiong R, Chrisey DB, Huang Y. Effects of living cells on the bioink printability during laser printing. *Biomicrofluidics.* 2017 Jun 15; 11(3):034120. doi: 10.1063/1.4985652.
- [27] Deng Y, Renaud P, Guo Z, Huang Z, Chen Y. Single cell isolation process with laser induced forward transfer. *J Biol Eng.* 2017 Jan 13; 11:2. Doi: 10.1186/s13036-016-0045-0. ECollection 2017.
- [28] Keriquel V, Oliveira H, Rémy M, Ziane S, Delmond S, Rousseau B, Rey S, Catros S, Amédée J, Guillemot F, Fricain JC. In situ printing of mesenchymal stromal cells, by laser-assisted bioprinting, for in vivo bone regeneration applications. *Sci Rep.* 2017 May 11; 7(1):1778. doi: 10.1038/s41598-017-01914-x.
- [29] Tasoglu S and Demirci U (2013), Bioprinting for stem cell research *Trends Biotechnol.* 31 10–9
- [30] Demirci U and Montesano G, 2007 Single cell epitaxy by acoustic picolitre droplets *Lab. Chip* 7 1139

-
- [31] Guo et al. 2015, Three-dimensional manipulation of single cells using surface acoustic waves, PNAS Early Edition
- [32] Guillotin B et al 2010 Laser assisted bioprinting of engineered tissue with high cell density and microscale organization, Biomaterials 31 7250–6
- [33] Chung JHY, Naficy S, Yue Z, Kapsa R, Quigley A, Moulton S E and Wallace GG 2013 Bio-ink properties and printability for extrusion printing living cells Biomater. Sci. 1 763
- [34] Ozbolat I T and Hospodiuk M, 2016 Current advances and future perspectives in extrusion-based bioprinting, Biomaterials 76 321–43
- [35] Shor L, Güçeri S, Chang R, Gordon J, Kang Q, Hartsock L, An Y and Sun W, 2009 Precision extruding deposition (PED) fabrication of polycaprolactone (PCL) scaffolds for bone tissue engineering Biofabrication 1 15003
- [36] Campos DF D, Blaeser A, Weber M, Jäkel J, Neuss S, Wilhelm J-D and Fischer H, 2013 Three-dimensional printing of stem cell-laden hydrogels submerged in a hydrophobic high-density fluid Biofabrication 5 15003
- [37] Malda J, Visser J, Melchels F P, Jüngst T, Hennink WE, Dhert WJ A, Groll J and Huttmacher DW, 2013 25th anniversary article: engineering hydrogels for biofabrication Adv. Mater. 25 5011–28
- [38] Dababneh AB and Ozbolat I T 2014, Bioprinting technology: a current state-of-the-art review J. Manuf. Sci. Eng. 136 61016
- [39] Peltola SM, Melchels F P W, Grijpma DW and Kellomäki M 2008, A review of rapid prototyping techniques for tissue engineering purposes Ann. Med. 40 268–80
- [40] Chang R, Nam J and Sun W 2008, Effects of dispensing pressure and nozzle diameter on cell survival from solid free form fabrication–based direct cell writing Tissue Eng. A 14 41–8
- [41] Highley CB, Rodell CB and Burdick J A 2015 Direct 3d printing of shear-thinning hydrogels into self-healing hydrogels Adv. Mater. 27 5075–9
- [42] Wu W, De Coninck A J and Lewis J A 2011, Omni directional printing of 3d microvascular networks Adv. Mater. 23 H178–83
- [43] Ovsianikov A et al 2014 Laser photofabrication of cell-containing hydrogel constructs Langmuir 30 3787–94

2 Εκτύπωση καρκινικών ηπατικών κυττάρων (Huh7) με laser

Σε αυτό το κεφάλαιο παρουσιάζονται αποτελέσματα σχετικά με την επίδραση του μήκους κύματος του laser στην βιωσιμότητα των κυττάρων αμέσως μετά την εκτύπωση. Για το σκοπό αυτό χρησιμοποιήθηκε ένα αραιώμα καρκινικών ηπατοκυττάρων (Huh7) πυκνότητας 5000cells/μL στο οποίο έχει προστεθεί η χρωστική trypan blue σε αναλογία 1:5(1 μέρος TB άνα 5 μέρη κυτταρικού αραιώματος). Η συγκεκριμένη χρωστική βάφει τα νεκρά κύτταρα ώστε να είναι ευδιάκριτα στο οπτικό μικροσκόπιο και μπορεί να γίνει διαχωρισμός των νεκρών κυττάρων από τα ζωντανά. Η παρούσα μελέτη έχει επίσης ως σκοπό την εύρεση των κατάλληλων παραμέτρων για την εκτύπωση κυττάρων .Με βάση τα αποτελέσματα των εικόνων παραθέεται και μια μελέτη απορρόφησης ακτινοβολίας από το βιολογικό υγρό. Η παρατήρηση των εκτυπωμένων σταγόνων έγινε με οπτικό μικροσκόπιο και το υπόστρωμα αποδέκτης ήταν καλυπτρίδες 22x22mm.Για την παραπάνω διερεύνηση χρησιμοποιήθηκαν ηπατικά καρκινικά κύτταρα. Τα HuH7 είναι μια καλά διαφοροποιημένη κυτταρική σειρά υπατοκυτταρικού καρκινώματος που προέρχονται από κύτταρα τα οποία έχουν ληφθεί από όγκο ήπατος ενός 57 χρόνου άντρα ιαπωνικής καταγωγής το 1982 από τους Nakabayshi, H. και Sato, J [44]. Είναι μια πολύ σημαντική αθανατοποιημένη κυτταρική σειρά επιθηλιακών ομοιογενών ογκογονικών κυττάρων. Τα κύτταρα αυτά προσκολλώνται στις επιφάνειες καλλιέργειας και συνήθως αναπτύσσονται σε δισδιάστατα στρώματα. Επίσης ,περιέχουν σημαντικές μεταλλάξεις , με την πιο σημαντική στο γονίδιο p53, και ο χρόνος διπλασιασμού τους είναι οι 24 ώρες.

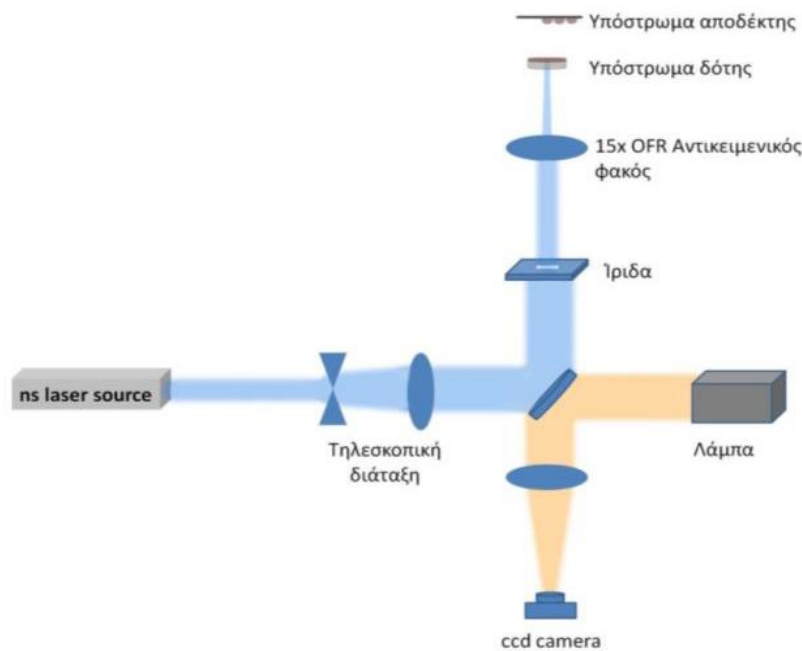


Εικόνα 2. 1: Παρουσίαση της μορφολογίας των καρκινικών ηπατοκυττάρων (HuH7) μικροσκοπίου φθορισμού (φωτογραφία: Δ.Ζαρείφη)

2.1 Πειραματική διάταξη της τεχνικής εκτύπωσης κυττάρων με laser

Στα πλαίσια της παρούσας μεταπτυχιακής εργασίας χρησιμοποιήθηκαν δυο πηγές laser του τομέα Φυσικής, με διαφορετική χρονική διάρκεια παλμού (ns και ps) ένα laser Nd:YAG (neodymium-doped yttrium aluminium garnet, $\text{Nd:Y}_3\text{Al}_5\text{O}_{12}$) laser της Litron lasers (μοντέλο NANO-L-200-10) και ένα Passat laser (COMPILER 1064/532-200I) ,με σκοπό την μελέτη των παραμέτρων εκτύπωσης κυττάρων με την τεχνική LIFT. Τα χαρακτηριστικά των πηγών αναφέρονται στον παρακάτω πίνακα .

Laser	ns laser	ps laser
	NANO-L-200-10 Litron	COMPILER 1064/532-200I
Wavelength	355 nm	532 nm
Pulse duration	10 ns	8 ps
Repetition rate	2 Hz	2 Hz
Energy output	105 μJ	40 mJ



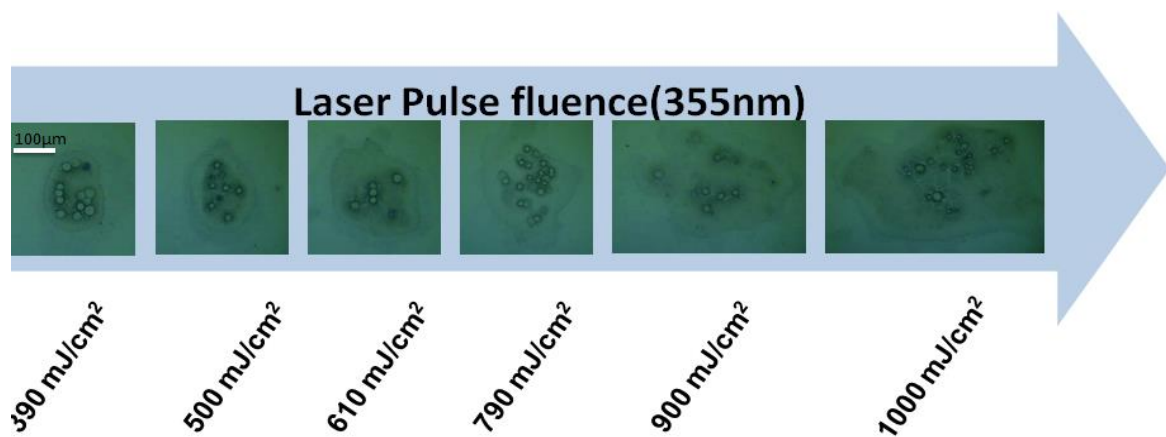
Πειραματική διάταξη της τεχνικής LIFT

Η δέσμη μετά την έξοδο της από τη κοιλότητα του laser συναντά ένα σύστημα 2 καθρεφτών που ορίζουν την κατεύθυνση της και την οδηγούν σε έναν αποκλίνων φακό ($f=-100\text{mm}$) και στην συνέχεια σε ένα συγκλίνων ($f=200\text{mm}$), που αποτελούν μια τηλεσκοπική διάταξη. Ο ρόλος του τηλεσκοπίου είναι να διπλασιάζει την δέσμη του laser. Στην συνέχεια, η διευρυμένη δέσμη οδηγείται σε ένα πλακίδιο εξασθετιστή (attenuator) ο οποίος είναι τοποθετημένος σε γωνιομετρική μηχανοκίνητη βάση που ελέγχεται από το πρόγραμμα LabVIEW 2011. Εν συνεχεία, η δέσμη περνά από ένα

σύστημα κατόπτρων ώστε τελικά να οδηγηθεί στο υπόστρωμα του δότη. Το υπόστρωμα δότη αποτελείται από ένα πλακίδιο χαλαζία το οποίο είναι διάφανο στο μήκος κύματος της ακτινοβολίας που χρησιμοποιείται και ένα λεπτό στρώμα μετάλλου (Τι ή Au) το οποίο απορροφά το μεγαλύτερο μέρος της ακτινοβολίας laser. Για να γίνει η απεικόνιση της ίριδας στο υπόστρωμα του δότη χρησιμοποιείται ένα αντικειμενικός φακός μικροσκοπίου (thorlabs OFR objective 15x). Παράλληλα στο υπόστρωμα του δότη τοποθετείται το υπόστρωμα του αποδέκτη πάνω σε μια μικρομετρική βάση ώστε να ρυθμίζεται η απόσταση των δυο υποστρωμάτων. Και τα δύο υποστρώματα δότη και αποδέκτη είναι τοποθετημένα σε δυο βηματικούς κινητήρες (Standa) που κινούνται στους άξονες x,y μέσω ενός προγράμματος LabVIEW. Για την απεικόνιση της διαδικασίας εκτύπωσης χρησιμοποιείται ένα σύστημα μικροσκοπίου το οποίο αποτελείται από μια λάμπα, έναν αχρωματικό φακό και μία ccd κάμερα (unibrain).

2. 1. 1 Εκτύπωση καρκινικών υπατικών κυττάρων με τη χρήση ns παλμών laser μήκους κύματος 355 nm σε υποστρώματα καλυπτρίδων.

Για την εκτύπωση κυττάρων με ns παλμούς laser χρησιμοποιήθηκε το Nd:YAG Laser της Litron Lasers με μήκος κύματος της κεντρικής αρμονικής στα 1064nm και ενέργεια παλμού 200mJ. Με την προσαρμογή κρυστάλλων διπλασιασμού και τριπλασιασμού της συχνότητας δίνεται η δυνατότητα χρήσης παλμών laser τεσσάρων διαφορετικών μηκών κύματος (2ω-532 nm, 3ω- 355nm, 4ω-266 nm). Η εκτύπωση πραγματοποιήθηκε με την τρίτη αρμονική, ενώ η χρονική διάρκεια του παλμού είναι 10 ns. Για την εκτύπωση των κυττάρων τοποθετήθηκε κυτταρικό αιώρημα όγκου 10μL και πυκνότητας 5000cells/μl, πάνω σε ένα λεπτό στρώμα τιτανίου πάχους 40nm. Κατά την εκτύπωση η απόσταση μεταξύ υποστρώματος δότη και αποδέκτη ρυθμίζεται στα 500 μm, ενώ η διάμετρος του ίχνους της δέσμης στο υπόστρωμα δότη (spot) της δέσμης είναι 67μm.



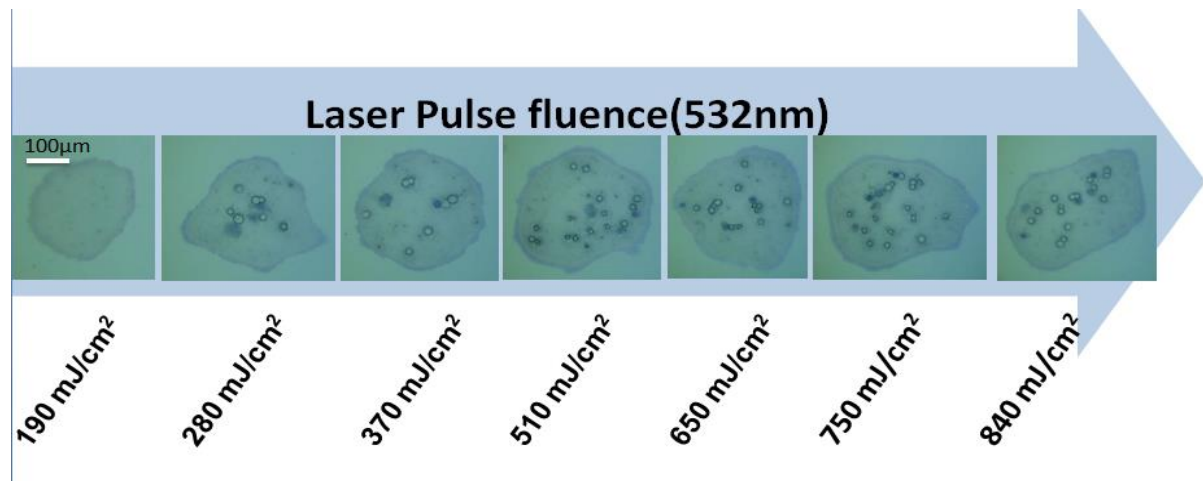
Εικόνα 2. 2: Εκτυπωμένες σταγόνες κυττάρων με ns laser

Στην Εικόνα 2. 2 παρατηρείται η μελέτη εκτύπωσης σταγόνων διαλύματος κυττάρων με ns laser μήκους κύματος 355 nm. Η μελέτη αυτή έχει σκοπό την ανεύρεση των βέλτιστων συνθηκών εκτύπωσης βιολειτουργικών κυττάρων. Για το σκοπό αυτό εξετάστηκε η εκτύπωση σταγόνων κυτταρικού διαλύματος σε διαφορετικές πυκνότητες ενέργειας των παλμών του laser. Το κυτταρικό διάλυμα αποτελείται από το θρεπτικό (media, DMEM) και το pellet των κυττάρων. Στα πλαίσια αυτής της μελέτης, εξετάστηκαν πυκνότητες ενέργειας από 200 mJ/cm² έως 1000 mJ/cm², επιτυχής εκτύπωση σταγόνων βιολογικού διαλύματος παρατηρήθηκε για πυκνότητες ενέργειας πάνω από 390 mJ/cm². Η Εικόνα 2. 2 παρουσιάζει την μορφολογία των σταγόνων καθώς αυξάνεται η πυκνότητα ενέργειας που ακτινοβολείται το υπόστρωμα δότης. Καθώς αυξάνεται η πυκνότητα ενέργειας, όπως είναι αναμενόμενο αυξάνεται και το μέγεθος των εκτυπωμένων σταγόνων και κατά συνέπεια ο αριθμός των εκτυπωμένων κυττάρων. Από τις εικόνες του οπτικού μικροσκοπίου παρατηρείται ότι η εκτύπωση των κυττάρων με τις συνθήκες εκτύπωσης που προαναφέρονται δεν οδηγεί σε κυτταρικό θάνατο. Το συμπέρασμα αυτό βγαίνει καθώς στο μεγαλύτερο ποσοστό των κυττάρων δεν είναι χρωματισμένο με τη χρωστική ουσία trypan blue, αποτέλεσμα που θα συνέβαινε μόνο στη περίπτωση που η χρωστική διαπερνούσε το κυτταρικό τοίχωμα του κυττάρου που συμβαίνει κατά τον κυτταρικό θάνατο. Οι φωτογραφίες που παρουσιάζονται στην Εικόνα 2. 2, έχουν καταγραφεί με τη βοήθεια οπτικού μικροσκοπίου και η λήψη των εικόνων έγινε με το πρόγραμμα Pylon σε φακό μεγέθυνσης 20x.

2. 1. 2 Εκτύπωση καρκινικών υπατικών κυττάρων με τη χρήση ps παλμών laser μήκους κύματος 532 nm

Στην δεύτερη πειραματική διάταξη ως πηγή φωτός χρησιμοποιήθηκε ένα Passat laser (COMPILER 1064/532-2001) με μήκος κύματος στην κεντρική αρμονική 1064 nm. Για τα πειράματα χρησιμοποιήθηκε η δεύτερη αρμονική στα 532 nm με χρονική διάρκεια παλμού 8 ps. Τα υποστρώματα δότη και αποδέκτη τοποθετήθηκαν στην βάση ενός μεταλλικού κελιού και η απόσταση τους ρυθμίζεται από ένα μικρομετρικό που είναι ενσωματωμένο με αυτό. Η απόσταση μεταξύ των 2 υποστρωμάτων είναι 500 μm και η διάμετρος του ίχνους της δέσμης στο υπόστρωμα δότη είναι 50 μm. Ως υπόστρωμα δότη χρησιμοποιείται ένα quartz με επίστρωση χρυσού πάχους 60 nm στο οποίο γίνεται επίστρωση του βιολογικού διαλύματος. Ο όγκος του βιολογικού υλικού που επιστρώνεται είναι 10 μL και το εύρος των ενεργειών που επιλέχθηκαν σε αυτή την μελέτη είναι από 190 mJ/cm²- έως 840 mJ/cm². Αρχικά όσον αφορά την μορφολογία των σταγόνων, παρατηρούνται ομοιόμορφες σταγόνες σε όλες τις τιμές ενέργειας η διάμετρος των οποίων αυξάνεται με την αύξηση της ενέργειας. Η καλύτερη μορφολογικά σταγόνα παρατηρείται στα 370 mJ/cm². Επίσης και στην περίπτωση των ps παλμών, όσο αυξάνεται η πυκνότητα ενέργεια παρατηρείται αύξηση των εκτυπωμένων κυττάρων (Εικόνα 2. 2). Στην περίπτωση εκτύπωσης κυττάρων με ps

παλμούς στα 532 nm δεν παρατηρείται αντίστοιχη μείωση της διαμέτρου των κυττάρων όσο αυξάνεται η πυκνότητα ενέργεια, γεγονός που θα σχολιαστεί στην επόμενη παράγραφο.

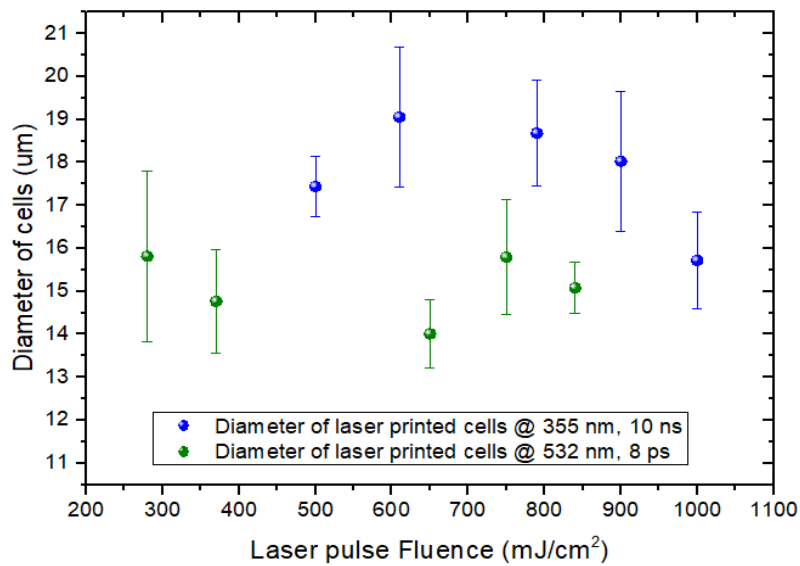


Εικόνα 2.2 : Εκτυπωμένες σταγόνες κυττάρων με το Passat laser

2.2 Συμπεράσματα

Από τα παραπάνω αποτελέσματα των εικόνων μπορούν να εξαχθούν μερικά συμπεράσματα σχετικά με την επίδραση του μήκους κύματος και της χρονικής διάρκειας του παλμού laser στην βιωσιμότητα των κυττάρων HuH7 την πρώτη μέρα εκτύπωσης τους. Στην Εικόνα 2. 3 παρουσιάζεται ένα συγκριτικό διάγραμμα της διαμέτρου των εκτυπωμένων κυττάρων στις δύο διαφορετικές διατάξεις εκτύπωσης που χρησιμοποιήθηκαν στα πλαίσια αυτής της μεταπτυχιακής εργασίας. Για το σκοπό αυτό έγινε εκτύπωση προ βαμμένων κυττάρων HUH7, με τη χρωστική trypan blue, με τις διατάξεις που προαναφέρονται στο Κεφάλαιο 2, σε υποστρώματα καλυπνιδίων. Εν συνεχεία καταγράφηκαν φωτογραφίες οπτικής μικροσκοπίας και με βάση τις φωτογραφίες αυτές έγινε μια διερεύνηση σχετικά με το μέγεθος της διαμέτρου των εκτυπωμένων κυττάρων. Οι εικόνες αναλύθηκαν μέσω του προγράμματος ImageJ και προέκυψε το παρακάτω διάγραμμα που συσχετίζει τις διαμέτρους σε σχέση με την πυκνότητα ενέργειας για τις διατάξεις εκτύπωσης που χρησιμοποιήθηκαν (Εικόνα 2. 3).

Στην περίπτωση εκτύπωσης κυττάρων με ps παλμούς laser, στα 532 nm, η διάμετρος των κυττάρων δεν παρουσιάζει μεγάλη διακύμανση καθώς αυξάνεται η πυκνότητα ενέργειας του παλμού. Αντίθετα κατά την εκτύπωση κυττάρων με nsπαλμούς στα 355 nm παρατηρείται μια μικρή μείωση της διαμέτρου καθώς οι διάμετροι των κυττάρων που εκτυπώνονται με πυκνότητα ενέργειας 500 mJ/cm^2 μετρήθηκαν $17.4 \pm 0.7 \mu\text{m}$ ενώ στη περίπτωση εκτύπωσης με πυκνότητα ενέργειας 1 J/cm^2 οι διάμετροι των κυττάρων μειώνονται κατά ποσοστό $\sim 10\%$ ($15.4 \pm 1 \mu\text{m}$).



Εικόνα 2. 3: Διάγραμμα πυκνότητας ενέργειας με την διάμετρο των κυττάρων για τα 2 μήκη κύματος

Η επεξήγηση του παραπάνω αποτελέσματος μπορεί να οφείλεται είτε στην χρονική διάρκεια του παλμού ακτινοβολίας είτε στο μήκος κύματος του παλμού.

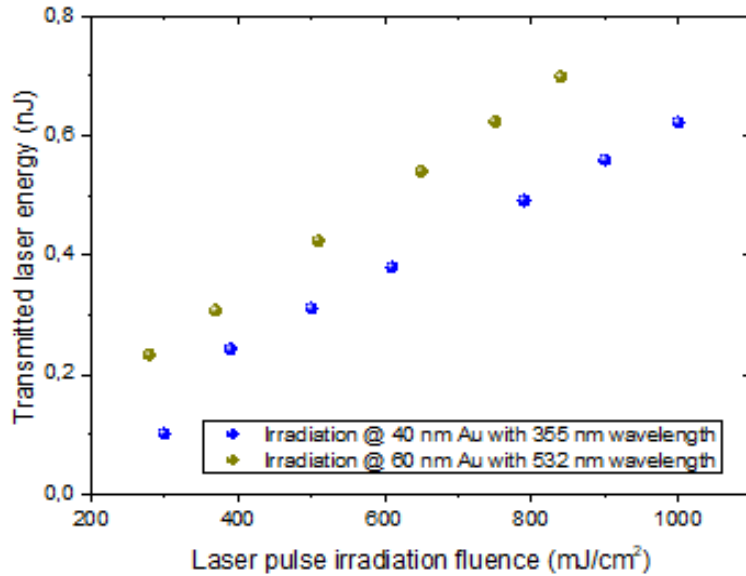
Καθώς η ακτινοβολία laser έρχεται σε επαφή με ένα υλικό, ένα ποσοστό της ακτινοβολίας θα ανακλαστεί, ενώ η υπόλοιπη ακτινοβολία θα εισέρθει στο υλικό. Κατά την ακτινοβολία ενός υλικού παρατηρούνται γραμμικά και μη γραμμικά φαινόμενα. Στην περίπτωση γραμμικών φαινομένων, ο συντελεστής απορρόφησης του υλικού καθορίζει την αλληλεπίδραση της ακτινοβολίας με το υλικό. Εάν ο συντελεστής απορρόφησης είναι ψηλός, το μεγαλύτερο ποσοστό της απορρόφησης του παλμού γίνεται στην επιφάνεια του υλικού, ενώ για μικρούς συντελεστές απορρόφησης η ακτινοβολία εισχωρεί σε μεγαλύτερα βάθη στο εσωτερικό του υλικού. Όταν η ένταση της ακτινοβολίας είναι πολύ μεγάλη, παρατηρούνται μη γραμμικά φαινόμενα [45] πολυ-φωτονικής απορρόφησης και δημιουργία πλάσματος τα οποία μπορούν να μειώσουν σημαντικά την απορρόφηση του υλικού [46]. Μη γραμμικά φαινόμενα παρατηρούνται στις περισσότερες περιπτώσεις που χρησιμοποιούνται fs παλμοί laser. Εφόσον το φως βρεθεί στο εσωτερικό του στερεού, η ένταση της ακτινοβολίας μειώνεται, με ρυθμό εξαρτώμενο από τον συντελεστή απορρόφησης $a=4\pi k/\lambda$. Η μείωση της έντασης της οπτικής ακτινοβολίας στο εσωτερικό του στερεού δίνεται σύμφωνα με το νόμο Beer-Lambert: $I(z) = I_0 e^{-az}$, όπου I_0 είναι η ένταση της οπτικής ακτινοβολίας μόλις το φως μπαίνει στο υλικό (έχοντας λάβει υπόψη μόνο τις απώλειες λόγω ανακλαστικότητας).

Το οπτικό βάθος διείσδυσης της ακτινοβολίας στο μέσο, $\delta=1/a$ (m), εκφράζει το βάθος στο οποίο η ακτινοβολία θα έχει μειωθεί κατά ένα παράγοντα $1/e$ από την αρχική

ένταση της ακτινοβολίας I_0 . Στην περίπτωση των πειραμάτων που διεξάχθηκαν στα πλαίσια αυτής της μεταπτυχιακής εργασίας, υπολογίζεται το οπτικό βάθος διείσδυσης της ακτινοβολίας καθώς αυτή έρχεται σε επαφή με του στόχους τιτανίου (40 nm) και χρυσού (60 nm).

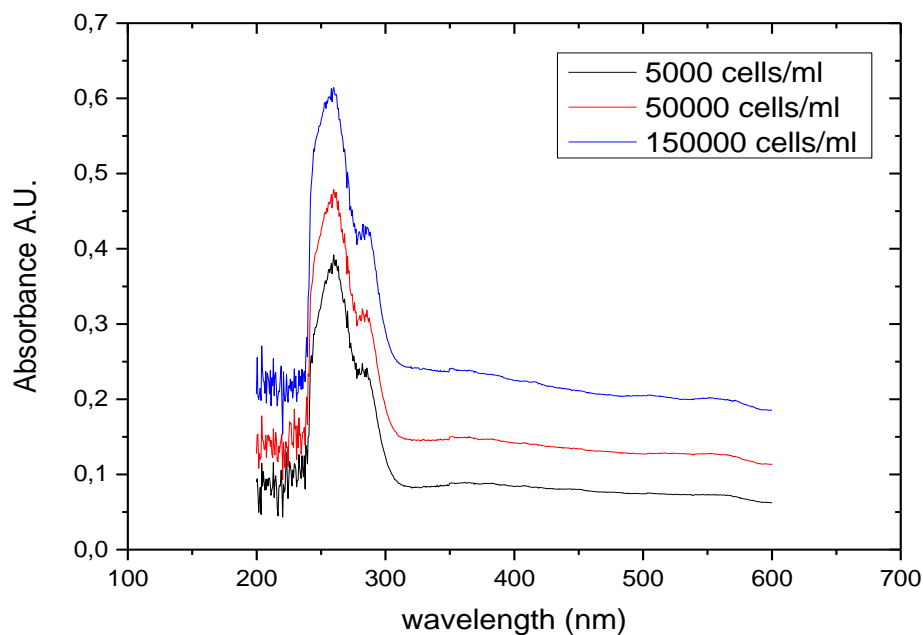
	Ti:40nm, $\lambda=355\text{nm}$	Au:60nm, $\lambda=532\text{nm}$
α (cm^{-1})	$1.0167 \cdot 10^6$	$5.2695 \cdot 10^5$
δ (nm)	9.8	18,9

Στην συνέχεια έγινε μια διερεύνηση σχετικά με την ενέργεια που διαπερνά σε κάθε περίπτωση το υλικό και φτάνει στον προς εκτύπωση υγρό. Για κάθε μήκος κύματος είναι γνωστές οι τιμές των πυκνοτήτων ενέργειας. Ως πυκνότητα ενέργειας, ορίζεται η ενέργεια του παλμού φωτός που εκπέμπεται ανά επιφάνεια ενός cm^2 κάθετης τομής της δέσμης του laser. Μπορεί να υπολογιστεί η ισχύς του παλμού διαιρώντας την ενέργεια ανά την χρονική διάρκεια του παλμού. Έτσι η ένταση της αρχικής ακτινοβολίας μπορεί να υπολογιστεί εάν διαιρεθεί η τιμή της ισχύος με το εμβαδόν του spot. Από το νόμο Beer-Lambert, έχοντας τις τιμές του συντελεστή απορρόφησης, το πάχος του μεταλλικού στρώματος και το I_0 υπολογίζεται η ένταση του φωτός (W/m^2). Διαιρώντας αυτή την τιμή της ακτίνας του spot, υπολογίζεται η ισχύς. Τελικά, για τον υπολογισμό της ενέργειας η τιμή της ισχύος πολλαπλασιάζεται με την χρονική διάρκεια του παλμού του laser. Στο παρακάτω διάγραμμα φαίνεται η διερχόμενη ενέργεια σε σχέση με την πυκνότητα ενέργειας. Υπολογίστηκε πως η διερχόμενη ενέργεια είναι μεγαλύτερη στα 532nm με σχέση με τα 355nm. Άρα παρ ότι χρησιμοποιείται το ενδιάμεσο απορροφητικό υπόστρωμα, με σκοπό την προστασία του βιολογικού υλικού από την ακτινοβολία που μπορεί να επιφέρει μη αναστρέψιμες αλλαγές στα κύτταρα, ένα μέρος αυτή καταφέρνει να περάσει.



Εικόνα 2. 4: Διάγραμμα ενέργειας της ακτινοβολίας που διαπερνά τα υποστρώματα δότη (χρυσού και τιτανίου) σε σχέση με την πυκνότητα ενέργειας που ακτινοβολεί τα υποστρώματα για τα δύο διαφορετικά μήκη κύματος που χρησιμοποιήθηκαν (355 και 532 nm).

Σε συνέχεια της διερεύνησης αυτής έγιναν μετρήσεις απορρόφησης της ακτινοβολίας με φασματοφωτόμερο και έγινε λήψη φασμάτων απορρόφησης για τρεις συγκεντρώσεις κυττάρων.



Εικόνα 2. 5: Φάσματα απορρόφησης του διαλύματος των κυττάρων HUH7.

Από τα παραπάνω φάσματα παρατηρείται πως παρουσιάζεται αυξημένη απορρόφηση των κυττάρων σε μήκη κύματος ακτινοβολίας που αντιστοιχούν στην υπεριώδη ακτινοβολία. Από την μπάντα απορρόφησης που παρατηρείται, η μέγιστη απορρόφηση παρατηρείται για ακτινοβολία στα 258 nm ενώ η απορρόφηση είναι μεγαλύτερη κατά 20% στην περίπτωση της ακτινοβολίας με 355nm, απ' ότι στην περίπτωση της ακτινοβολίας με 532nm. Οι τιμές απορρόφησης θα μπορούσαν να αποτελούν επεξήγηση για την μείωση της διαμέτρου των κυττάρων κατά την εκτύπωσή τους με παλμούς laser στα 355 nm, παρόλα αυτά είναι εξίσου σημαντική και η διαφορά στους μηχανισμούς ακτινοβολίας με παλμούς laser διαφορετικής χρονικής διάρκειας, καθώς η εκτύπωση των κυττάρων με UV ακτινοβολία έγινε με τη χρήση ns παλμών laser.

Στην περίπτωση χρήσης ps παλμών, η χρονική διάρκεια του παλμού είναι μικρότερη του χρόνου που χρειάζεται για να επέλθει τοπική θερμοδυναμική ισορροπία στο υλικό που αλληλοεπιδρά με την ακτινοβολία, η απορρόφηση της ενέργειας των φωτονίων και η θέρμανση του υλικού είναι δυο διακριτά στάδια, που διέπονται από διεργασίες μη γραμμικής απορρόφησης. Για ns παλμούς, όπου η χρονική διάρκεια του παλμού είναι μεγαλύτερη από το χρόνο κρούσεων επικρατούν θερμικές διεργασίες κατά την αλληλεπίδραση, με αποτέλεσμα να θεωρείται ότι καθώς απορροφάται η ακτινοβολία από το υλικό, μετατρέπεται απευθείας σε θερμότητα. Ωστόσο το γεγονός ότι δεν παρατηρείται κυτταρικός θάνατος μετά την εκτύπωση με laser των κυττάρων δεν οδηγεί απαραίτητα στο συμπέρασμα ότι τα κύτταρα είναι πλήρως λειτουργικά καθώς παρατηρείται μια μικρή μείωση στη διάμετρο των κυττάρων που δηλώνει ότι τα κύτταρα στρεσάρονται.

2.3 Αναφορές

[44] Nakabayashi H, Taketa K, Yamane T, Miyazaki M, Miyano K, Sato J., Phenotypical stability of a human hepatoma cell line, HuH-7, in long-term culture with chemically defined medium, *Gan*. 1984 Feb; 75(2):151-8.

[45] N. Ghofraniha, C. Conti, G. Ruocco, S. Trillo, (2007) *Phys. Rev. Lett.* 99(4)

[46] W. Staudt, S. Borneis, K.D. Pippert, (1998) *Phys. Status Solidi A Appl. Res.* 166(2): 743

3 Μελέτη μηχανισμού εκτύπωσης κυττάρων με laser

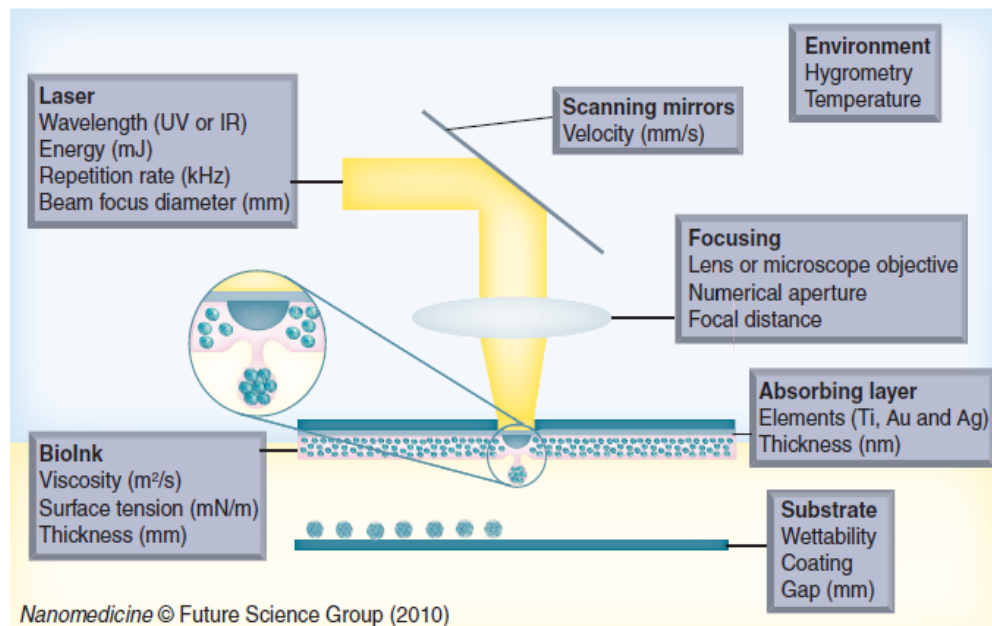
Στο κεφάλαιο αυτό θα γίνει μελέτη των μηχανισμών εκτύπωσης διαλύματος κυττάρων πυκνότητας 5000 κύτταρα ανά μικρό-λίτρο σε θρεπτικό υλικό DMEM με 10% FBS και 1% P/S. Για το σκοπό αυτό έγιναν πειράματα εκτύπωσης κυττάρων με τη χρήση 0,6 ns παλμών laser σε διάφορες πυκνότητες ενέργειας του παλμού του laser και η διαδικασία εκτύπωσης καταγράφηκε με τη χρήση μιας κάμερας υψηλής ταχύτητας.

Όταν το υπόστρωμα του δότη ακτινοβολείται με μια δέσμη laser επικρατούν διάφορες φυσικές διεργασίες, ώστε να επιτευχθεί η εκτύπωση των κυττάρων. Σε αυτό το κεφάλαιο θα γίνει αναφορά στις διεργασίες αλληλεπίδρασης της ακτινοβολίας με τα υλικά για την ανάπτυξη πίδακα υγρού. Για να κατανοηθεί η διαδικασία ανάπτυξης του πίδακα υγρού, ο οποίος επεκτείνεται ώστε να δημιουργήσει την σταγόνα στο υπόστρωμα αποδέκτη, πραγματοποιήθηκαν πειράματα απεικόνισης της συμπεριφοράς του πίδακα του προς εκτύπωση βιολογικού υγρού. Τα πειραματικά αποτελέσματα θα αξιολογηθούν ώστε να εξαχθούν συμπεράσματα τόσο για την μορφολογία του πίδακα όσο και για τις παραμέτρους που το χαρακτηρίζουν και πως αυτές επηρεάζουν την διαδικασία εκτύπωσης.

3.1 Μηχανισμοί εκτύπωσης κυττάρων με laser

Μια τυπική πειραματική διάταξη της τεχνικής Laser Induced Forward Transfer (LIFT) αποτελείται από μια παλμική πηγή laser, ένα στόχο που στο οποίο εναποθέτεται το προς εκτύπωση υγρού και ένα υπόστρωμα αποδέκτη. Οι πρώτες αναφορές εκτύπωσης με την χρήση της τεχνικής καταγράφονται το 1999 από τους Nakata et al. [47] για την εκτύπωση στερεών, ενώ ακολούθησαν το 2000 οι Papazoglou et al. [48] και οι Sano et al. [49]. Στην συνέχεια, το 2001 και 2002 έγιναν οι πρώτες αναφορές στην απεικόνιση της εκτύπωσης υγρών από τους Young et al. [50]. Ακολούθησαν κάποιες μελέτες σχετικά με την ρεολογική ανάλυση του πίδακα υγρού, που δημιουργείται από τον θύλακα υγρού, ενώ λίγες είναι οι αναφορές στην περίπτωση δημιουργίας πίδακα υγρού από λεπτό φιλμ υγρού, ύψους 1-100 μm, όπου οι δυνάμεις συνοχής του υγρού παίζουν σημαντικό ρόλο στην ανάπτυξη και την εξέλιξη του πίδακα. Κατά την ακτινοβολήση ενός υγρού με laser προκαλούνται ποικίλα αποτελέσματα λόγω της εντοπισμένης παροχής ενέργειας και της τοπικής αύξησης της θερμοκρασίας. Ένα σύνολο παραμέτρων που σχετίζονται με τα χαρακτηριστικά του παλμού του laser (διάρκεια παλμού, μήκος κύματος, πυκνότητα ενέργειας) σε συνδυασμό με τα χαρακτηριστικά του βιολογικού υγρού, την τοπογραφία και τις οπτικές ιδιότητες του υποστρώματος δότη είναι αυτές που καθορίζουν τελικά τις διεργασίες που θα πραγματοποιηθούν κατά την αλληλεπίδραση του laser με το υγρό. Το παρακάτω σχήμα εστιάζει στο κομμάτι της πειραματικής διάταξης που περιλαμβάνει τα δυο παράλληλα υποστρώματα. Μπορεί να παρατηρηθεί πως κατά την ακτινοβολήση του δότη, στον αποδέκτη φτάνουν οι σταγόνες του βιολογικού

υγρού που αποτελούνται από το θρεπτικό (medium) και τα κύτταρα. Ενώ, παρουσιάζονται σχηματικά όλες οι παράμετροι ο συνδυασμός των οποίων καθορίζουν την μορφολογία της σταγόνας.



Εικόνα 3.1 Παρουσίαση όλων των παραμέτρων που επηρεάζουν την εναπόθεση [55]

Όταν ο παλμός του laser ακτινοβολεί το υπόστρωμα δότη, το λεπτό μεταλλικό στρώμα του υποστρώματος δότη (υπόστρωμα Ti, Au) απορροφά την ακτινοβολία με αποτέλεσμα την τοπική αύξηση της θερμοκρασίας. Στη διεπιφάνεια μεταξύ του μεταλλικού στρώματος και του υγρού προς εναπόθεση προκαλείται τοπική εξάτμιση μέρους του στρώματος του υλικού μεταφοράς, λόγω της αύξησης της θερμοκρασίας η οποία περνά τοπικά το σημείο βρασμού του υλικού. Στη συνέχεια από τα αέρια του εξατμισμένου υλικού δημιουργείται ένας θύλακας αερίων [51]. Η εσωτερική πίεση του θύλακα είναι μεγαλύτερη από την εξωτερική (ατμοσφαιρική πίεση) και της επιφανειακής τάσης του υγρού με αποτέλεσμα την αύξηση του όγκου του θύλακα [52] για την εκτόνωσή του. Καθώς ο θύλακας επιμηκύνεται, η εσωτερική του πίεση αρχίζει να μειώνεται. Όταν η τιμή της πίεσης γίνει ίση με την ατμοσφαιρική πίεση ο θύλακας καταρρέει και το υγρό που βρίσκεται κάτω από αυτόν εγκαταλείπει το υπόστρωμα του δότη με την μορφή κατευθυντικού jet.

Για να γίνει κατανοητός ο τρόπος εξέλιξης του θύλακα, θα πρέπει να γίνει θεωρητική προσέγγιση της δυναμικής του θύλακα αερίων.

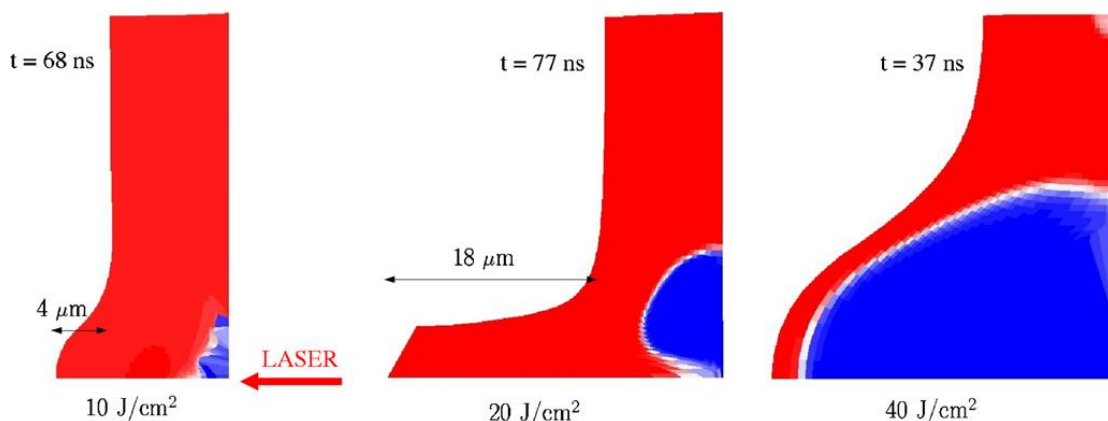
Η εξίσωση Rayleigh-Plesset είναι αυτή που περιγράφει την δυναμική εξέλιξη του θύλακα, όπου $R(t)$ είναι η ακτίνα της φυσαλίδας, $\rho_i(t)$ είναι η πίεση στο εσωτερικό της φυσαλίδας, ρ_∞ είναι η πίεση του περιβάλλοντος χώρου,

$$R\ddot{R} + \frac{3}{2}(\dot{R})^2 = \frac{1}{\rho}(\rho_i - \rho_\infty - \frac{2\gamma}{R} - \frac{4\mu}{R}\dot{R}) \quad (1)$$

Η υδροστατική πίεση είναι πολύ υψηλή όταν η φυσαλίδα βρίσκεται στην διεπιφάνεια υγρού-αέρα και είναι υπεύθυνη για την δημιουργία δυο συμμετρικών πιδάκων, έναν στο εσωτερικό της φυσαλίδας και έναν εξωτερικό που κατευθύνεται προς το στρώμα αέρα. Όταν εξισωθεί η εσωτερική πίεση με την πίεση του αέρα αυτή η φυσαλίδα καταρρέει [53]. Η παράμετρος γ είναι αυτή που καθορίζει την συμπεριφορά και των δυο πιδάκων η οποία δίνεται από τον παρακάτω τύπο :

$$\gamma = \frac{|z|}{R_{\max}} \quad (2)$$

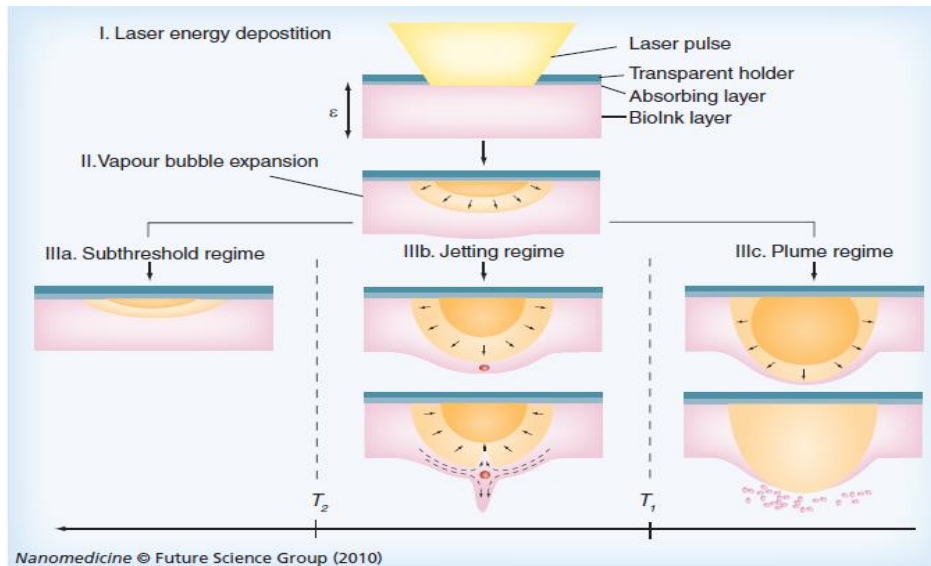
Όπου z είναι το βάθος παραγωγής της φυσαλίδας και R_{\max} είναι η μέγιστη ακτίνα της παραγόμενης φυσαλίδας. Για μεγάλες τιμές της παραμέτρου γ παρατηρούνται στενοί πίδακες, ενώ όσο αυτή η τιμή μειώνεται παρατηρούνται πίδακες με μεγάλο πάχος. Το γ είναι ο παράγοντας είναι ένα αδιάστατο μέγεθος που καθορίζει την δημιουργία ή όχι ενός jet. Έτσι συμπεραίνεται πως σημαντικό ρόλο για την δημιουργία του jet παίζουν τρεις παράμετροι : πάχος του υγρού φιλμ, η πυκνότητα ενέργειας του laser και οι ρεολογικές ιδιότητες του υγρού. Οι Mézel et al. πραγματοποίησαν μια ολοκληρωμένη προσέγγιση δημιουργία του jet με χρήση ενός μονοδιάστατου μοντέλου για την ποιοτική ερμηνεία, αλλά και ενός δυσδιάστατου υδροδυναμικού υπολογιστικού πακέτου για την προσομοίωση του jet. Στο παρακάτω σχήμα φαίνεται σχηματικά η αναπαράσταση δημιουργίας του jet συναρτήσει του χρόνου για τρεις διαφορετικούς συνδυασμούς παραμέτρων [54].



Εικόνα 3.2 Σχηματική αναπαράσταση εξέλιξης πίδακα για διαφορετικές τιμές πυκνοτήτων ενέργειας και χρονικές στιγμές

Σύμφωνα με το παραπάνω σχήμα, εάν συνδυαστεί η τιμή του παράγοντα γ , δηλαδή η τιμή του πάχους του φιλμ, με τις τιμές των πυκνοτήτων ενέργειας, μπορεί να γίνει κατηγοριοποίηση της μορφολογίας του jet. Για μεγάλες τιμές του γ και μικρές τιμές

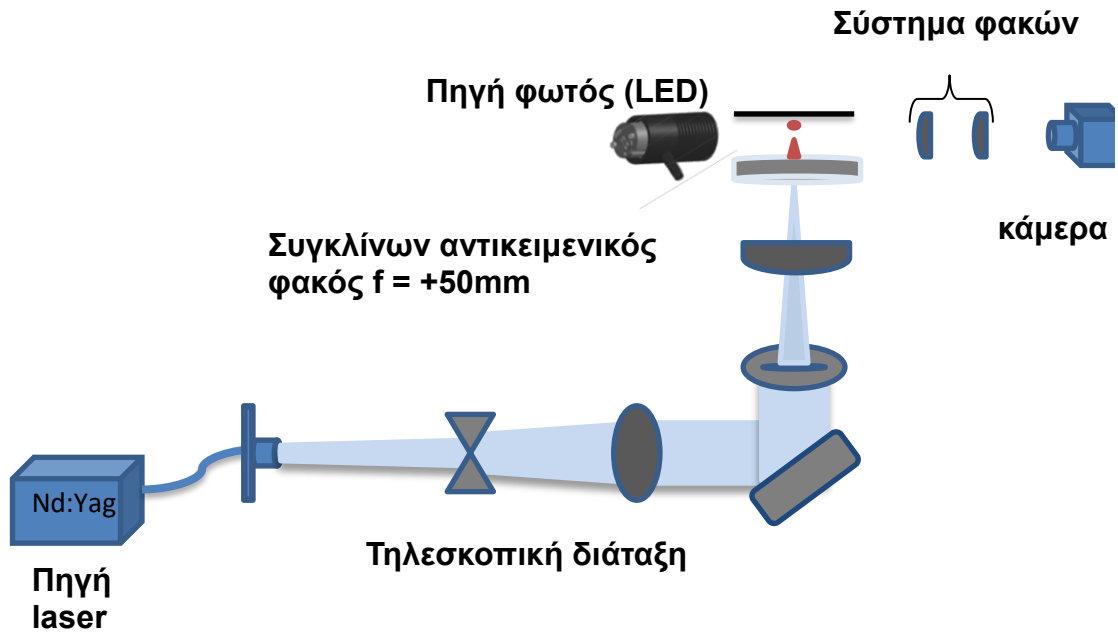
πυκνότητας ενέργειας δεν παρατηρείται σταγόνα εκτύπωσης(sub threshold regime). Για μικρότερες τιμές του πάχους σε συνδυασμό με μεγαλύτερες τιμές πυκνότητας ενέργειας πάνω από την κρίσιμη τιμή, παρατηρείται η δημιουργία του πίδακα (jetting regime). Για μικρές τιμές του γ και μεγαλύτερες τιμές της πυκνότητας ενέργειας ο πίδακας εκτονώνεται βίαια με την παραγωγή περιφερειακών σταγονιδίων (plume regime)[55].



Εικόνα 3.3: I) Παρουσίαση του τρόπου που εστιάζεται η δέσμη στον δότη και η μορφολογία του. II) Εξάτμιση του απορροφητικού στρώματος και δημιουργία του θύλακα φυσαλίδας. III α) Δημιουργία φυσαλίδας χωρίς κατάρρευση β) Δημιουργία jet χωρίς περιφερειακά σταγονίδια γ) Δημιουργία νεφελώματος με περιφερειακά σταγονίδια για υψηλές πυκνότητες ενέργειας.

3.2 Πειραματική διάταξη χρόνο-εξαρτώμενης απεικόνισης εκτύπωσης κυττάρων με laser

Για να γίνει η μελέτη απεικόνισης της εξέλιξης του πίδακα υγρού και να εξαχθούν αποτελέσματα σχετικά με την μορφολογία του για διαφορετικές τιμές της πυκνότητας ενέργειας χρησιμοποιήθηκε μια πειραματική διάταξη LIFT για την απεικόνιση της διαδικασίας εκτύπωσης. Για το σκοπό αυτό χρησιμοποιήθηκε ένα Micro Laser Diode Pumped Nd:Yag Solid-State της εταιρίας Standa στα 532 nm και χρονικής διάρκειας 600 ps (sub-nanosecond). Η πειραματική διάταξη του πειράματος απεικόνισης φαίνεται στο παρακάτω σχήμα.



Εικόνα 3.4: Σχηματική απεικόνιση της πειραματικής διάταξης της απεικόνισης του πίδακα συναρτήσει του χρόνου

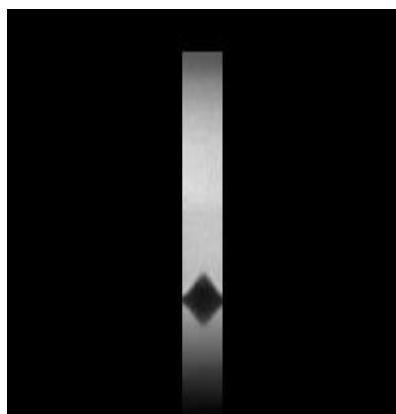
Για την απεικόνιση χρησιμοποιήθηκε μια συμπαγής κάμερα υψηλής ταχύτητας (μοντέλο FASTCAM Mini AX) της εταιρίας Photron με δυνατότητα λήψης εικόνων με 540000 εικόνες ανά δευτερόλεπτο (frames per second). Όπως φαίνεται στην σχηματική απεικόνιση η κάμερα τοποθετείται στα δεξιά της διάταξης και ευθυγραμμίζεται μέσω ενός συστήματος οπτικών, ώστε να απεικονίζεται το διάκενο μεταξύ της των δυο υποστρωμάτων δότη και αποδέκτη για την καταγραφή της δημιουργίας και εξέλιξης του πίδακα κατά την διαδικασία εκτύπωσης σταγόνων διαλύματος κυττάρων. Η χρονική στιγμή $t=0$, είναι η στιγμή στην οποία ο παλμός του laser φτάνει στην ελεύθερη επιφάνεια του δότη. Ο συγχρονισμός του παλμού με την αρχή καταγραφής της κάμερας γίνεται μέσω του προγράμματος LabVIEW.



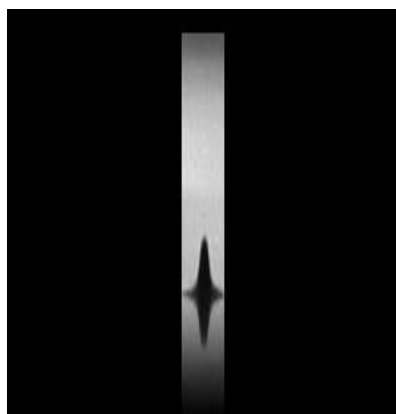
Εικόνα 3.5: High-speed κάμερα υψηλής ευαισθησίας

Σκοπός των πειραμάτων ήταν να εξαχθούν αποτελέσματα της μορφολογίας του jet που προέρχεται από διάλυμα κύτταρων και θρεπτικού καθώς και να συσχετιστούν οι ταχύτητες του jet με τις αντίστοιχες τιμές των πυκνοτήτων ενέργειας. Το υπόστρωμα δότης που χρησιμοποιήθηκε ήταν quartz με επίστρωση χρυσού πάχους 60 nm και ο αποδέκτης ήταν ένα scaffold κολλαγόνου (CG device), πάχους περίπου 200 μm . Τα δυο υποστρώματα τοποθετήθηκαν παράλληλα, σε απόσταση 700 μm . Η δέσμη λέιζερ ευθυγραμμίζεται με ένα σύστημα καθρεπτών, περνάει από μια τηλεσκοπική διάταξη και οδηγείται σε ένα πλακίδιο εξασθενητή, ο οποίος κινείται μέσω του προγράμματος LabVIEW ώστε να ανακλά ένα μέρος της ολικής δέσμης που προσπίπτει σε αυτόν με σκοπό τον έλεγχο της πυκνότητας ενέργειας του παλμού που φτάνει το υπόστρωμα δότη. Η δέσμη στη συνέχεια οδηγείται με ένα σύστημα οπτικών σε μια ίριδα η οποία καθορίζει το μέγεθος και το σχήμα του παλμού του laser που θα ακτινοβολήσει την ελεύθερη επιφάνεια του υποστρώματος δότη. Η ακτινοβολήση του υποστρώματος δότη πάνω από μια κρίσιμη τιμή πυκνότητας ενέργειας (πυκνότητα ενέργειας κατωφλίου) οδηγεί στην δημιουργία πίδακα ικανού να φτάσει στο υπόστρωμα του αποδέκτη που στα πειράματα που παραθέτονται στο κεφάλαιο αυτό είναι υποστρώματα ικριωμάτων κολλαγόνου.

Πειραματικά, συλλέχθηκαν δεδομένα για τέσσερις τιμές πυκνότητας ενέργειας. Αρχικά έγινε μια διερεύνηση σχετικά με την τιμή της ενέργειας στην οποία ξεκινάει να παρατηρείται η δημιουργία πίδακα και η εναπόθεση της σταγόνας πάνω στο υπόστρωμα του αποδέκτη. Κάτω από την τιμή της πυκνότητας ενέργειας κατωφλίου (300 mJ/cm^2) δεν παρατηρήθηκε εκτύπωση. Καθώς αυξάνεται η τιμή της πυκνότητας ενέργειας παρατηρείται η δημιουργία ενός ομοιόμορφου πίδακα και μικρότεροι πίδακες που οδηγούν στην εναπόθεση περιφερειακών σταγονιδίων. Στους παρακάτω πίνακες παραθέτονται οι εικόνες εξέλιξης του πίδακα για διαφορετικές πυκνότητες ενέργειας.



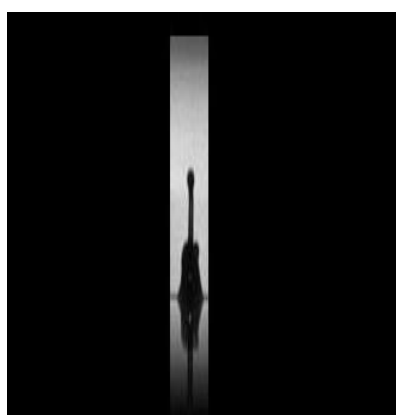
5.8 μs



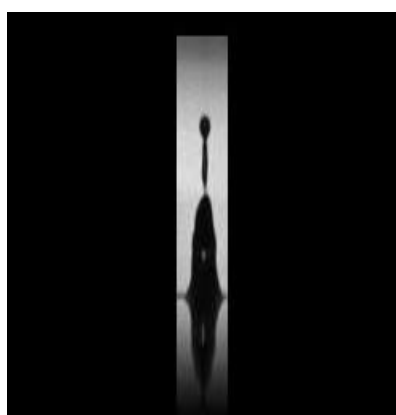
11.6 μs



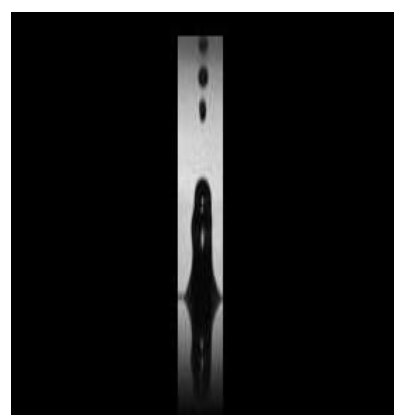
17.5 μs



41 μs



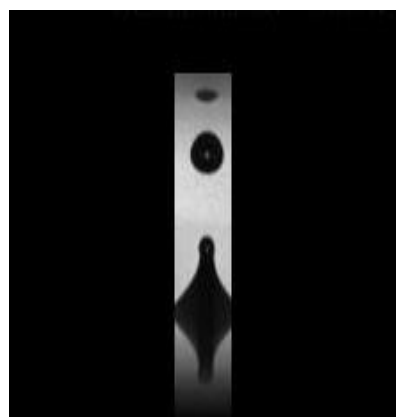
52.8 μs



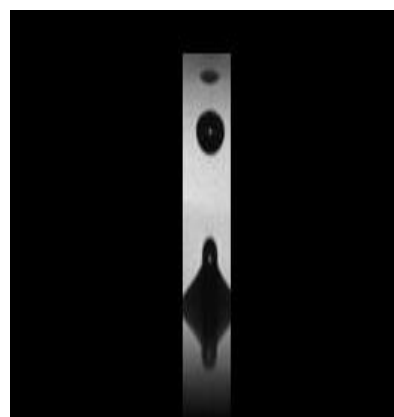
76.3 μs



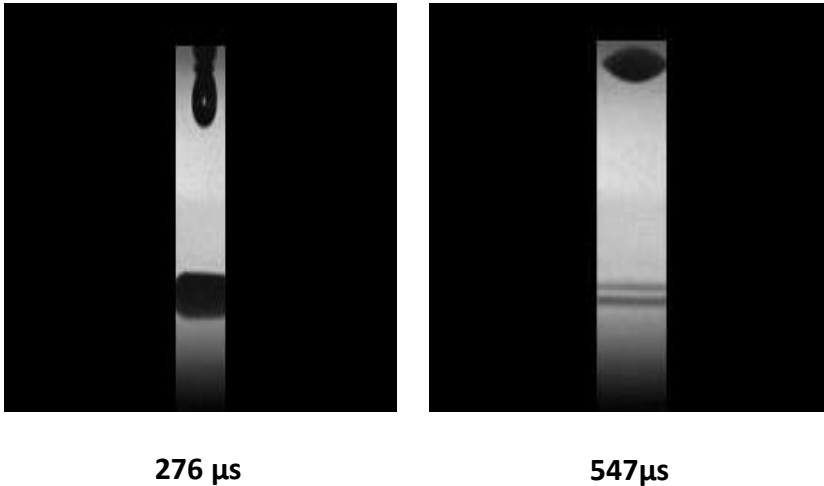
94 μs



217 μs



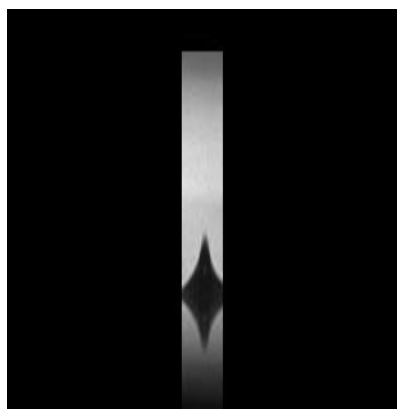
229 μs



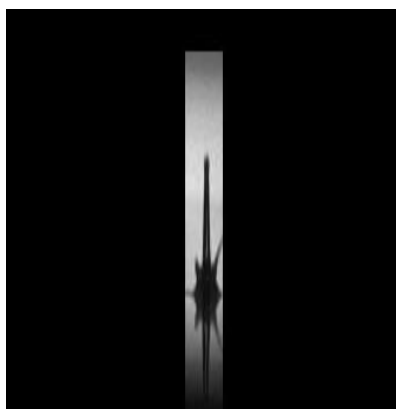
Πίνακας 3.1: Απεικόνιση της χρονικής εξέλιξης δημιουργίας του πίδακα βιολογικού υγρού και εναπόθεσης του στο ικρίωμα κολλαγόνου για τιμές της πυκνότητας ενέργειας $330\text{mJ}/\text{cm}^2$

Από την διερεύνηση σχετικά με την τιμή ακτινοβολήσης ενός υποστρώματος δότη πάνω από την οποία η εξέλιξη της φυσαλίδας που δημιουργείται στο εσωτερικό του υγρού προς εναπόθεση οδηγεί σε πίδακα αυτή προσδιορίστηκε στα $330\text{mJ}/\text{cm}^2$ (Πίνακας 3.1). Για τιμές πυκνοτήτων ενέργειας μικρότερες από αυτή παρατηρήθηκε μια παραμόρφωση του υποστρώματος λόγω της τοπικής αύξησης της θερμοκρασίας από την ακτινοβολήση άλλα η ενέργεια δεν ήταν αρκετή ώστε να δημιουργηθεί θύλακας αερίων μεγάλης πίεσης.

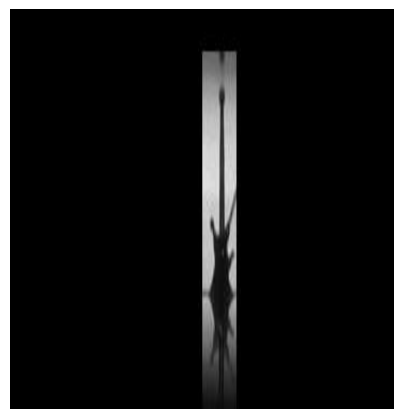
Στον Πίνακα 3.1 παρατηρείται η μορφολογία του υγρού πίδακα για την τιμή $330\text{mJ}/\text{cm}^2$. Η δημιουργία της φυσαλίδας πραγματοποιείται στα $5,8\ \mu\text{s}$ στην διεπιφάνεια υγρού-αερίου του οποίου η πίεση αρχίζει να αυξάνεται. Η δυναμική επέκταση της φυσαλίδας πραγματοποιείται την χρονική στιγμή $11,6\ \mu\text{s}$, όπου έχει την μέγιστη παραμόρφωση της και δημιουργείται ο πίδακας. Στα $17,5\ \mu\text{s}$ παρατηρείται η παραμόρφωση του θύλακα, καθώς το μέγεθός του από αυτή τη χρονική στιγμή και έπειτα μειώνεται. Ενώ ο θύλακας καταρρέει μεγαλύτερο μέρος του υγρού συνεχίζει την πορεία προς το υπόστρωμα αποδέκτη, λόγω επιφανειακής τάσης του υγρού. Πρώτη φορά στα $52,8\ \mu\text{s}$ παρατηρείται η διάσπαση του πίδακα σε δύο μέρη, ένα από τα οποία θα συνεχίσει την πορεία προς το υπόστρωμα αποδέκτη και θα πάρει τη μορφή σταγόνας και ένα άλλο μέρος θα επιστρέψει στο υπόστρωμα δότη και θα ισορροπήσει. Στα $94\ \mu\text{s}$ παρατηρείται η δεύτερη διάσπαση του πίδακα σε σταγόνα μεγαλύτερης διαμέτρου η οποία θα εναποτεθεί στο ίδιο σημείο με την πρώτη σταγόνα στα $276\ \mu\text{s}$. Ενώ η χρονική διάρκεια για την ανάπτυξη του πίδακα είναι της τάξεως των $20\ \mu\text{s}$ παρατηρούμε ότι η συνολική διάρκεια εξέλιξης του πίδακα και εναπόθεσης της σταγόνας στο υπόστρωμα αποδέκτη είναι της τάξεως των $500\ \mu\text{s}$.



5.8 μs



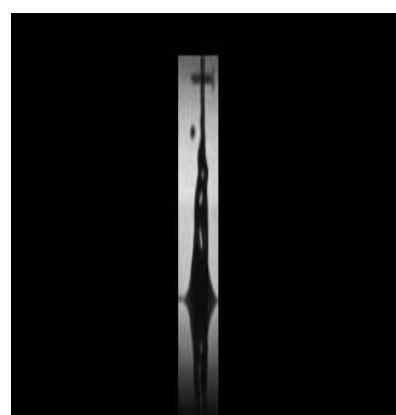
17.6 μs



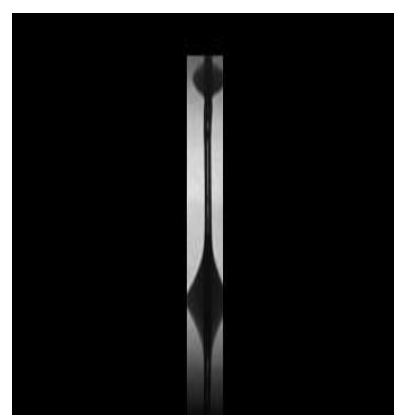
29.3 μs



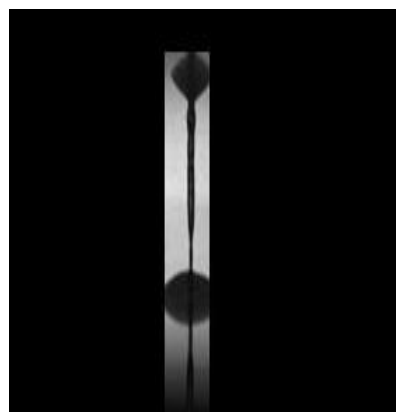
35.2 μs



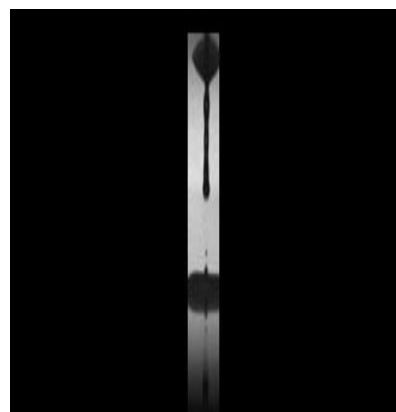
64.6 μs



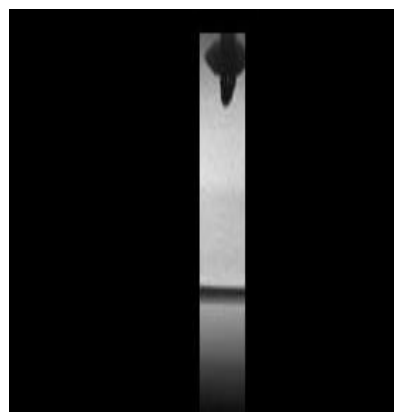
205.8 μs



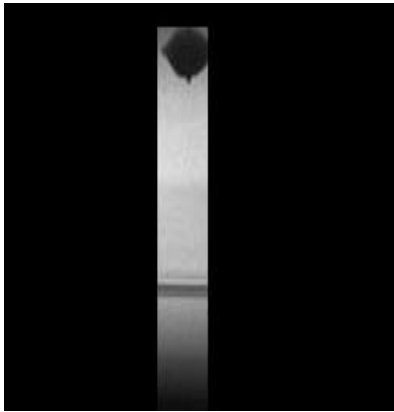
263 μs



287 μs



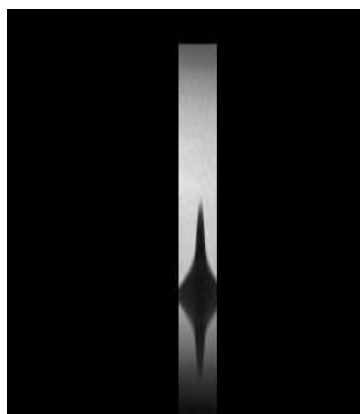
400 μs



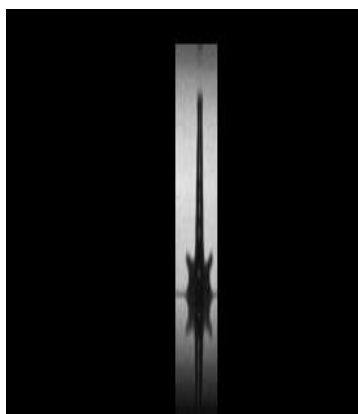
480 μ s

Πίνακας 3.2: Χρονική εξέλιξη του φαινομένου της φυσαλίδας και εναπόθεσης της σταγόνας των κυττάρων με πυκνότητα ενέργειας $420\text{mJ}/\text{cm}^2$

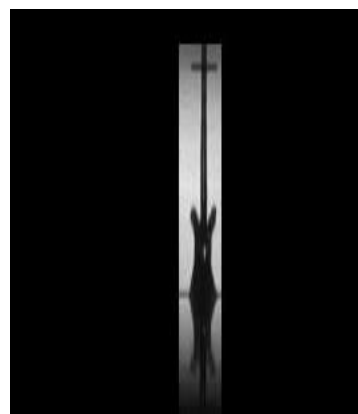
Καθώς αυξάνεται η πυκνότητα ενέργειας (Πίνακας 3.2) αυξάνεται η τιμή της θερμοκρασίας στην διεπιφάνεια χρυσού-υγρού και η παραμόρφωση του υποστρώματος δότη πραγματοποιείται τη χρονική στιγμή $5,8 \mu\text{s}$. Με την αύξηση της θερμοκρασίας τοπικά δημιουργείται στην διεπιφάνεια του υποστρώματος και του υγρού η φυσαλίδα αερίων υψηλής πίεσης. Καθώς η φυσαλίδα επεκτείνεται παρατηρείται η δημιουργία ενός στενού κατευθυντικού πίδακα υγρού ο οποίος την χρονική στιγμή $17,6 \mu\text{s}$ έχει καλύψει το μεγαλύτερο μέρος της απόστασης μεταξύ υποστρώματος δότη κι αποδέκτη. Καθώς αυτός εξελίσσεται παρατηρείται η εμφάνιση δευτερευόντων πιδάκων στην περιφέρεια του κεντρικού ($29,3 \mu\text{s}$). Την χρονική στιγμή $35,2 \mu\text{s}$ ο πίδακας έχει ακουμπήσει την επιφάνεια του αποδέκτη. Την χρονική στιγμή $64,6 \mu\text{s}$ παρατηρείται αύξηση στην διάμετρο του πίδακα, ο οποίος λόγω αδράνειας οδηγείται προς την ελεύθερη επιφάνεια του αέρα. Καθώς το υγρό εναποτίθεται στο υπόστρωμα, απορροφάτε από το ικρίωμα και απλώνει στο εσωτερικό του με την μορφή δίσκου. Την χρονική στιγμή $205,8 \mu\text{s}$,το μέγεθος της σταγόνας αρχίζει να αυξάνει και η διάμετρος του jet αρχίζει να μειώνεται. Το φαινόμενο αυτό σταματάει να συμβαίνει μέχρι την χρονική στιγμή $263 \mu\text{s}$ που ο πίδακας είναι έτοιμος να σπάσει. Στα $287 \mu\text{s}$ το υγρό έχει αποκοπεί τελείως από την επιφάνεια του δότη και κινείται προς τον αποδέκτη και την χρονική στιγμή $400 \mu\text{s}$ η σταγόνα έχει εναποτεθεί στο υπόστρωμα και στα $480 \mu\text{s}$ ηρεμεί. Η δημιουργία του πίδακα πραγματοποιήθηκε στα πρώτα $11 \mu\text{s}$, ενώ το φαινόμενο στην περίπτωση των $420\text{mJ}/\text{cm}^2$ διήρκησε $470 \mu\text{s}$.



5.8μs



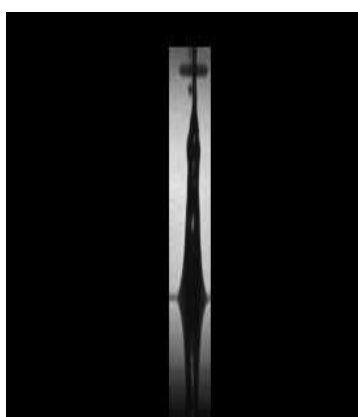
17.5μs



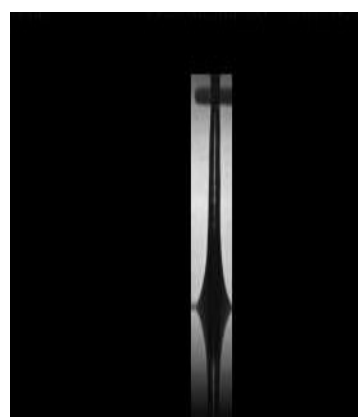
29.3μs



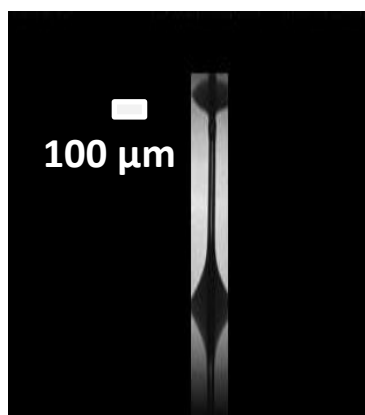
46.9μs



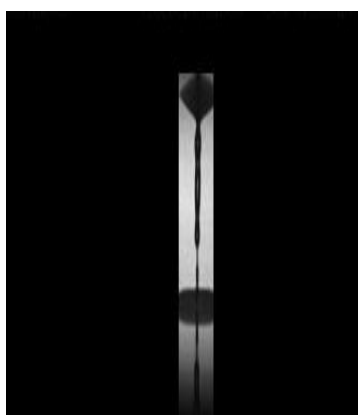
58.7μs



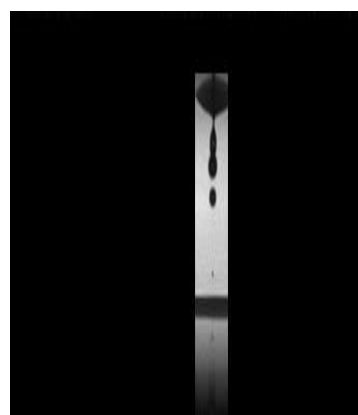
117.5μs



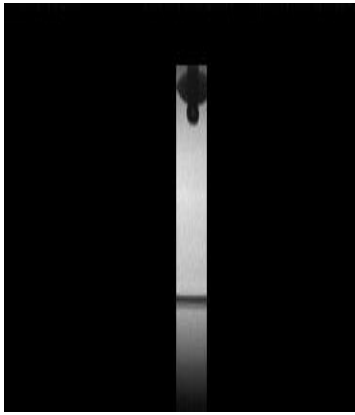
229μs



300μs



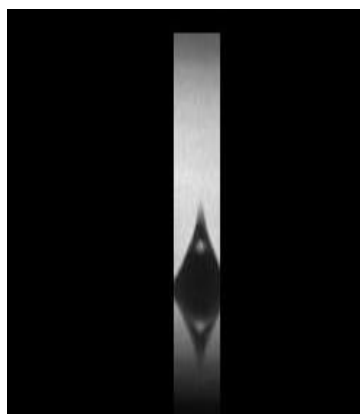
341μs



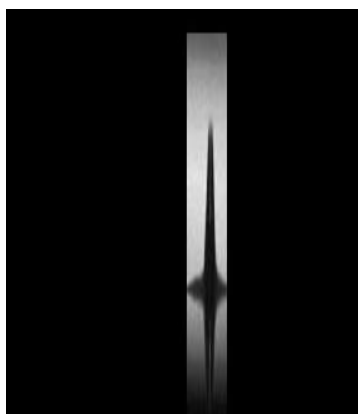
417 μ s

Πίνακας 3.3: Απεικόνιση της χρονικής εξέλιξης του πίδακα υγρού για πυκνότητα ενέργειας 500 mJ/cm²

Στην περίπτωση των 500 mJ/cm² παρατηρείται η δημιουργία του πίδακα υγρού ενός αρκετά στενού πίδακα στα πρώτα 5,8 μ s ο οποίος έχει μεγαλύτερο ύψος σε αυτήν την πυκνότητας ενέργειας σε σχέση με τους πίδακες που σχηματίζονται στις δύο προηγούμενες περιπτώσεις. Στα πρώτα 11 μ s έχει διανύσει την μεγαλύτερη απόσταση του διάκενου μεταξύ υποστρώματος δότη και αποδέκτη και πριν την χρονική στιγμή 29,3 μ s έχει ακουμπήσει την επιφάνεια του ικρίωματος. Καθώς ο παλμός μεγαλύτερης ενέργειας φτάνει στο υπόστρωμα του δότη η θερμοκρασία αυξάνεται και η φυσαλίδα μετά την δημιουργία της έχει μεγαλύτερη εσωτερική πίεση από τις προηγούμενες περιπτώσεις, με αποτέλεσμα την δημιουργία πίδακα υγρού που ταξιδεύει με μεγαλύτερη ταχύτητα. Στα 46,9 μ s ο πίδακας οδηγείται στην ελεύθερη επιφάνεια του διάκενου και είναι αρκετά κατευθυντικός χωρίς περιφερειακά σταγονίδια. Η διάμετρος του αυξάνεται έως την χρονική στιγμή 58,7 μ s ενώ στη συνέχεια μειώνεται σταδιακά από την χρονική στιγμή 117,5 μ s έως την στιγμή 229 μ s. Από αυτή τη στιγμή και μετά, οδηγείται στην οριστική αποκοπή του από το υπόστρωμα του δότη, που πραγματοποιείται από τα 300 μ s και στα 341 μ s το μεγαλύτερο μέρος του υγρού έχει φτάσει στο υπόστρωμα του αποδέκτη και παρατηρείται πως το τελευταίο κομμάτι του υγρού σπάει σε μικρές σταγόνες που πιο αργά από το υπόλοιπο βιολογικό υγρό, φτάνουν στο ικρίωμα την στιγμή 417 μ s, και η συνολική σταγόνα ηρεμεί. Συμπεραίνεται πως με την αύξηση της τιμής της πυκνότητας ενέργειας παρατηρείται μείωση του χρόνου που χρειάζεται το φαινόμενο εξέλιξης του πίδακα και ο χρόνος εναπόθεσης της σταγόνας στο ικρίωμα κολλαγόνου.



5.8μs



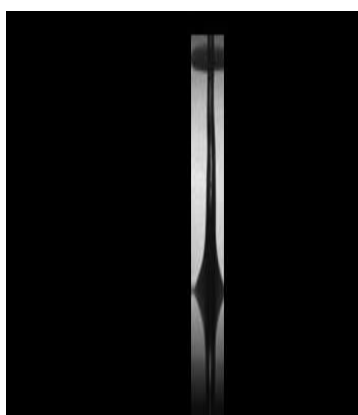
11,6μs



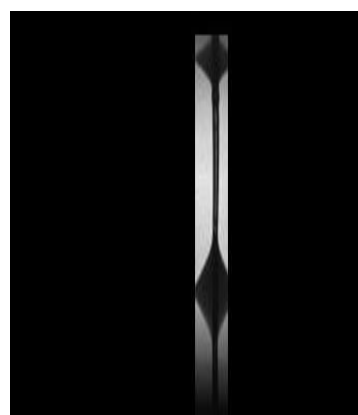
17.5μs



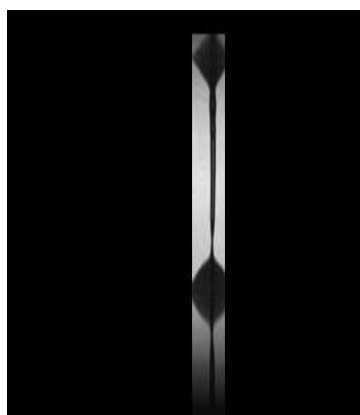
41μs



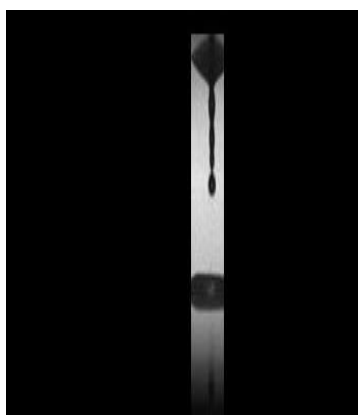
136μs



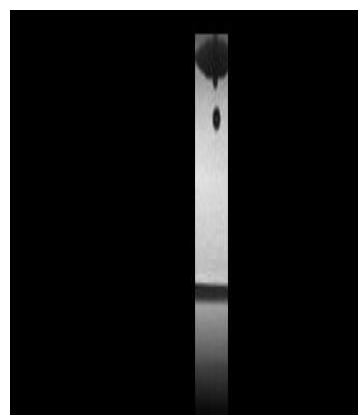
217μs



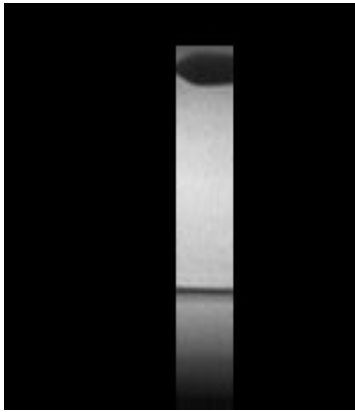
247μs



276μs



341μs



400μs

Πίνακας 3.4 : Απεικόνιση της χρονικής εξέλιξης του πίδακα υγρού που εναποτίθεται σε ικρίωμα κολλαγόνου με πυκνότητα ενέργειας 530 mJ/cm²

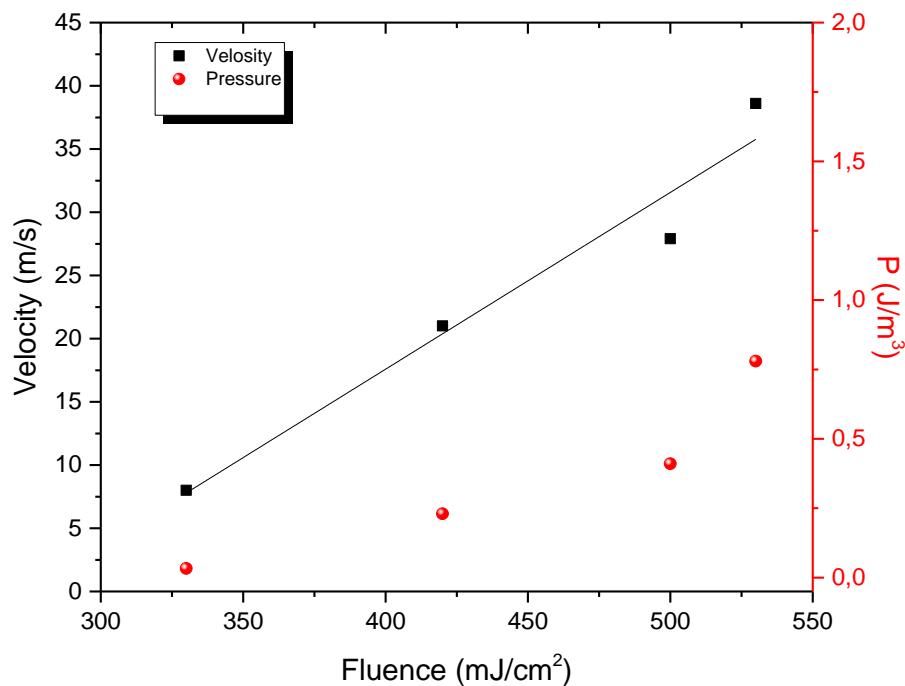
Τέλος, στα 530 mJ/cm², από τα πρώτα 5,8 μs δημιουργείται θύλακας μεγάλου ύψους, ο οποίος καταρρέει και παρατηρείται ένας κωνικός κατευθυντικός πίδακας υγρού. Η βίαιη ώθηση του προς την ελεύθερη επιφάνεια του αέρα συμβαίνει λόγω της ταχείας αύξησης της θερμοκρασίας του υποστρώματος δότη. Την χρονική στιγμή 17,5 μs ο πίδακας έχει διανύσει όλη την απόσταση του διάκενου (700μm). Ενώ τη χρονική στιγμή 41 μs, η εξέλιξη του πίδακα συνοδεύεται από την δημιουργία πολλών περιφερειακών δευτερεύοντων πιδάκων στην περιφέρεια του κεντρικού. Στα 217 μs η διάμετρος του έχει μειωθεί κατά πολύ και ο όγκος του υγρού στην επιφάνεια του υποστρώματος έχει αυξηθεί. Στα 247 μs πραγματοποιείται η διάσπαση του πίδακα και το υγρό κατευθύνεται στο υπόστρωμα του αποδέκτη μέχρι την χρονική στιγμή 400 μs όπου η ταλάντωση του υγρού που εναποτέθηκε έχει σταματήσει και η σταγόνα θα έχει σχηματιστεί στο ικρίωμα.

Για τις παραπάνω τιμές πυκνοτήτων ενέργειας του παλμού του laser υπολογίστηκε η ταχύτητα πρόσκρουσης του υγρού στο υπόστρωμα του αποδέκτη και η πίεση πρόσκρουσης της κάθε σταγόνας στο υπόστρωμα του ικρίωματος κολλαγόνου. Γνωρίζοντας την τιμή της πυκνότητας του υγρού εκτύπωσης (1040 kg/m³) μπορεί να υπολογιστεί η πίεση πρόσκρουσης του βιολογικού υγρού μέσω της εξίσωσης της δυναμικής πίεσεως ρευστών: $P = \frac{1}{2} \rho u^2$.

Στο παρακάτω πίνακα παραθέτονται τα αποτελέσματα των τιμών της ταχύτητας πρόσκρουσης και της πίεσης πρόσκρουσης των σταγόνων στα υποστρώματα αποδέκτες.

Laser pulse fluence (mJ/cm ²)	Velocity (m/s)	P (J/m ³)
330	8	0.033
420	21	0.23
500	27.9	0.41
530	38.6	0.78

Με βάση τον παραπάνω πίνακα έγινε η συνοπτική γραφική παράσταση που φαίνεται στην παρακάτω εικόνα 3.5 και συσχετίζει την ταχύτητα εξέλιξης του πίδακα που δημιουργείται κατά την ακτινοβολήση του υποστρώματος δότη με παλμούς laser σε σχέση με την πυκνότητα ενέργειας του παλμού.



Εικόνα 3.5 : Καταγραφή της ταχύτητας εξέλιξης του υγρού πίδακα (medium +cells)

Από το διάγραμμα παρατηρείται πως καθώς αυξάνεται η πυκνότητα ενέργειας αυξάνεται η ταχύτητα πρόσκρουσης του πίδακα στο ικρίωμα. Στη πρώτη περίπτωση όπου η ταχύτητα του πίδακα είναι 8 m/s ο πίδακας δημιουργείται, αλλά δεν διανύει την απόσταση μεταξύ υποστρώματος δότη και αποδέκτη και η εναπόθεση γίνεται με

την μορφή σταγόνας που σχηματίζεται πριν την επαφή του υγρού με το ικρίωμα κολλαγόνου. Αυτό φαίνεται και από τα αποτελέσματα της χρονικής απεικόνισης, ένα μέρος του πίδακα φτάνει στο υπόστρωμα με την μορφή μικρών σταγόνων και μετά από 150 μs δημιουργείται μια δεύτερη ομοιόμορφη σταγόνα που εναποτίθεται στο ίδιο σημείο. Για την τιμή 420 mJ/cm^2 παρατηρείται η δημιουργία ενός κατευθυντικού πίδακα με περιφερειακά σωματίδια. Για μεγαλύτερη ταχύτητα και τιμή πυκνότητας ενέργειας στα 500 mJ/cm^2 παρατηρείται πίδακας στρωτής ροής, χωρίς περιφερειακά σωματίδια και παρόμοιας μορφολογία με τον πίδακα της προηγούμενης ενέργειας. Τέλος, στην περίπτωση των 530 mJ/cm^2 λόγω της μεγάλης ταχύτητας πρόσκρουσης ο πίδακας που δημιουργείται είναι σε ένα μεγάλο μέρος του αποτελείται από περιφερειακά σταγονίδια τα οποία είναι ευδιάκριτα στα 41 μs . Η ταχύτητα επιδρά επίσης και στην διάμετρο του jet καθώς παρατηρείται πως στις τιμές 420 mJ/cm^2 και 500 mJ/cm^2 η διάμετρος του πίδακα την στιγμή της πρόσκρουσης και λίγο μετά είναι μικρότερη σε σχέση με την περίπτωση των 530 mJ/cm^2 . Σε όλες τις περιπτώσεις η μορφολογία του jet κάποια στιγμή εξομαλύνεται λίγο πριν σπάσει και περάσει στην φάση της εναπόθεσης στον αποδέκτη [56].

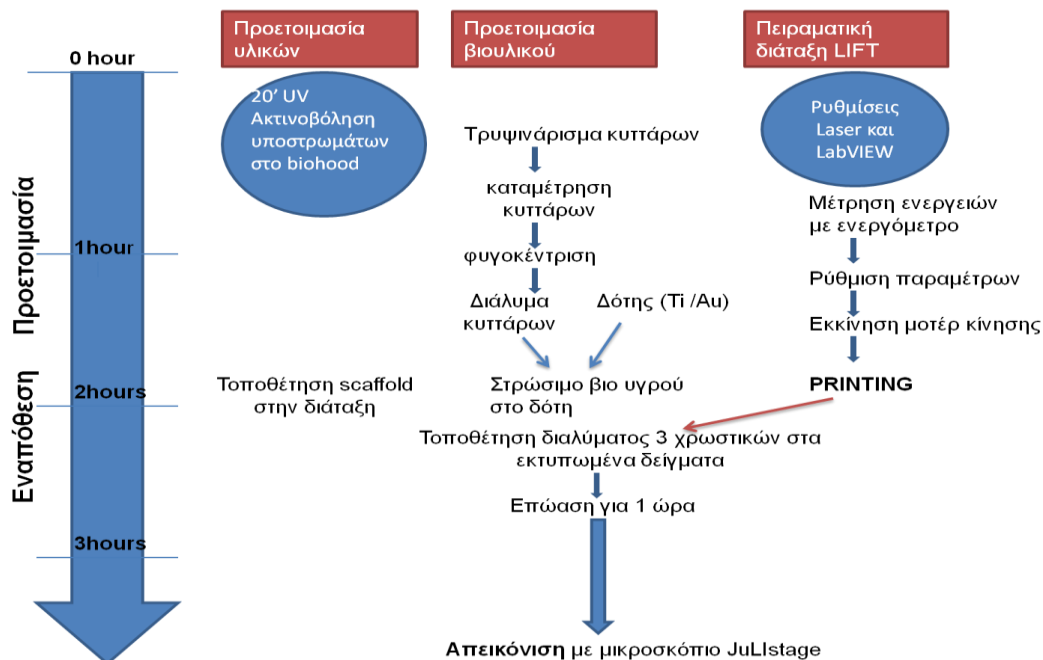
Συμπερασματικά, πραγματοποιώντας πειράματα χρονικής εξέλιξης εκτύπωσης κυττάρων και εξαχθήκαν κάποια σημαντικά αποτελέσματα για την μορφολογία του πίδακα, συγκριτικά με την ταχύτητα πρόσκρουσης του στην επιφάνεια του ικρίωματος. Στα παραπάνω πειράματα η διάμετρος της δέσμης είναι 40 μm , η απόσταση των δυο υποστρωμάτων είναι 700 μm και χρησιμοποιείται διάλυμα με κυτταρικό αραίωμα 5000 cells/ μl . Αυτοί οι παράμετροι παραμείναν σταθεροί καθώς μεταβάλλονταν η πυκνότητα ενέργειας του παλμού του laser. Αν συνδυάσουμε αυτές τις τιμές με την πυκνότητα ενέργειας του laser παρατηρείται αρχικά πως όσο αυξάνεται η πυκνότητα ενέργειας του laser τόσο μειώνεται ο χρόνος κατάρρευσης του πίδακα και υπάρχει μείωση συνολικά του χρόνου ολοκλήρωσης του φαινομένου, από την στιγμή που η κορυφή του πίδακα ακουμπάει το ικρίωμα μέχρι την στιγμή που η σταγόνα θα ισορροπήσει στο υπόστρωμα. Καθώς αυξάνεται η ενέργεια ο πίδακας καταρέει πιο γρήγορα λόγω της υψηλής θερμοκρασία που επικρατεί στην διεπιφάνεια υγρού- υλικού και η εσωτερική πίεση της φυσαλίδας μειώνεται με την ταυτόχρονη επέκταση του jet. Επίσης, για κάποιες τιμές της πυκνότητας ενέργειας εμφανίζονται περιφερειακά σωματίδια τα οποία συνοδεύουν τον κεντρικό πίδακα καθ όλη την εξέλιξη του και εναποτίθενται μαζί του στην επιφάνεια του αποδέκτη. Γνωρίζοντας αυτές τις τιμές μπορούν να επιλεγθούν οι κατάλληλες τιμές εκτύπωσης, ομοιόμορφων σταγόνων με συγκεκριμένο αριθμό κυττάρων και κατά συνέπεια και καλύτερων δομών.

3.3 Αναφορές

- [47] Nakata Y, Okada T (1999), Appl. Phys A 69:S275–S278
- [48] Papazoglou DG, Karaiskou A, Zergioti I et al (2002), Appl. Phys Lett 81:1594–1596
- [49] Sano T, Yamada H, Nakayama T et al (2002), Appl. Surf Sci 186:221–226
- [50] Young D, Auyeung RCY, Piqué A et al (2001), Appl. Phys Lett 78:3169–3171
- [51] C. Unger, M. Gruene, L. Koch, J. Koch, and B. N. Chichkov, (2010) Appl. Phys. A, 103(2): 271–277.
- [52] C. M, “Bioprinting by laser-induced forward transfer for tissue engineering applications: jet formation modeling,” vol. 014103, 2010.
- [53] C. Unger, M. Gruene, L. Koch, J. Koch, and B. N. Chichkov, (2010) Appl. Phys. A, 103(2): 271–277.
- [54] C.Mezel et al, Bioprinting by laser-induced forward transfer for tissue engineering applications: jet formation modeling, Biofabrication 2 (2010) 014103 (7pp).
- [55] Guillemot et al , Laser-assisted cell printing: principle, physical parameters versus cell fate and perspectives in tissue engineering, Nanomedicine (2010) 5(3)
- [56] Claudia Unger ,Martin Gruene, Lothar Koch, Juergen Koch, Boris N. Chichkov, Time-resolved imaging of hydrogel printing via laser-induced forward transfer , Appl Phys A (2011) 103: 271–277, DOI 10.1007/s00339-010-6030-4

4 Εκτύπωση κυττάρων σε πορώδη ικρίσματα κολλαγόνου

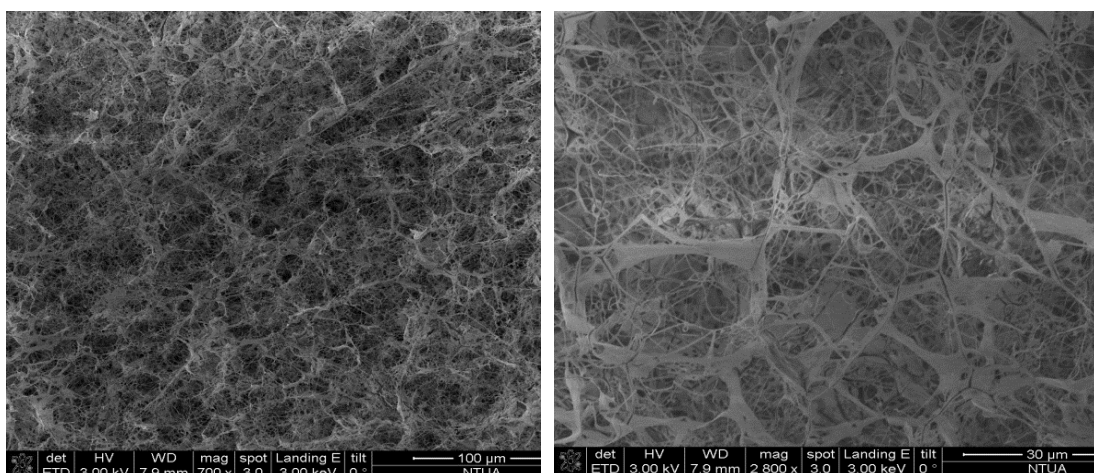
Σε αυτό το κεφάλαιο θα παρουσιαστεί ο τελικός στόχος της παρούσας μεταπτυχιακής εργασίας, δηλαδή την εκτύπωση κύτταρων σε ικρίσματα κολλαγόνου και τον έλεγχο της βιωσιμότητας τους αμέσως μετά την εκτύπωση. Αρχικά, για να επιτευχθεί ο σκοπός αυτός πρέπει να τηρούνται στείρες συνθήκες κατά τον χειρισμό των κυττάρων τα οποία περιγράφονται αναλυτικά στο παράρτημα της μεταπτυχιακής εργασίας. Στην συνέχεια, είναι αναγκαίο να απαντηθούν ερωτήματα σχετικά το συνδυασμό των παραμέτρων του laser ώστε να γίνει επιτυχής εκτύπωση των κυττάρων σε καθορισμένες δομές (arrays) και να επαληθευτεί η επαναληψιμότητα των πειραμάτων. Αυτό θα είχε ως συνέπεια την επιλεκτική εκτύπωση διαφόρων κυτταροσειρών σε καθορισμένες θέσεις του ικρίματος. Τέλος, θα έπρεπε να είναι δυνατή η καλλιέργεια των κυττάρων μετά την εκτύπωση ώστε να διαπιστωθεί εάν το laser τους προκαλεί κάποια βλάβη ή αν τα σκοτώνει μερικές ώρες μετά την εκτύπωση. Θα πραγματοποιηθεί η παρουσίαση των υλικών που χρησιμοποιήθηκαν για την διεξαγωγή των πειραμάτων και στην συνέχεια θα παρουσιαστούν οι μέθοδοι χαρακτηρισμού των αποτελεσμάτων και παρουσίαση αυτών. Για να γίνει κατανοητή η συνολική διαδικασία του πειράματος παραθέτουμε μια σχηματική αναπαράσταση της ροής εργασιών που ακολουθήθηκε σε κάθε πείραμα.



Εικόνα 4.6 : Σχηματική αναπαράσταση της πειραματικής διαδικασίας

4.1 Ικρίώματα κολλαγόνου και η χρήση τους σε κυτταρικές καλλιέργειες

Ικρίωμα (scaffold) ονομάζεται ένα σπογγώδες βιολικό το οποίο φέρει συγκεκριμένες ιδιότητες (πορόσιμότητα, διαπερατότητα) και χρησιμοποιείται τόσο σε *in vivo* εφαρμογές, ως μόσχευμα για την ανάπλαση δερματικών ιστών, όσο και σε *in vitro* πειράματα καθώς λειτουργεί σαν ανάλογο της εξωκυττάριας μήτρας ιστών και οργάνων [57]. Στην παρούσα μεταπτυχιακή εργασία χρησιμοποιήθηκαν λεπτά ικρίωματα κολλαγόνου πάχους 100-200μm και μεγέθους πόρων περίπου 30μm, τα οποία βρίσκουν βασική εφαρμογή στην αναγεννητική ιατρική για την επούλωση πληγών ή εγκαυμάτων. Το κολλαγόνο τύπου I αποτελεί κύριο χαρακτηριστικό της εξωκυττάριας μήτρας και βασικό συστατικό της δερμίδας. Τα ικρίωματα λόγω της σύνθεσης τους, είναι βιοσυμβατά με τα κύτταρα, μπορούν να προσφέρουν ένα περιβάλλον παρόμοιο με αυτό που αναπτύσσονται και πολλαπλασιάζονται και κατά συνέπεια χρησιμοποιούνται στην τρισδιάστατη καλλιέργεια κυττάρων. Επίσης, κάποια από τα βασικά τους πλεονεκτήματα είναι η οστεοσυμβατότητα, ο συνδυασμός τους με άλλα υλικά και η εύκολη εισχώρηση του θρεπτικού (medium) στο εσωτερικό τους. Στην περίπτωση καλλιέργειας καρκινικών κυττάρων το τρισδιάστατο περιβάλλον είναι απαραίτητο ώστε να παρατηρηθεί η αλληλεπίδραση με την εξωκυττάρια μήτρα, η φυσιολογική απόκριση τους και η πιστή αναπαράσταση της αναπαραγωγής τους. Στα πειράματα, χρησιμοποιήθηκαν ικρίωματα κολλαγόνου-γλυκοζαμινογλυκάνων (CG) τα οποία κατασκευάστηκαν στο εργαστήριο Συστημικής Βιολογίας και Εμβιομηχανικής του ΕΜΠ από τον Δρ. Δημήτριο Τζεράνη με την μέθοδο της λυοφιλοποίησης. Τα υλικά αυτά χρησιμοποιήθηκαν ως υποστρώματα αποδέκτες μέσα στα οποία εκτυπώθηκαν τα καρκινικά κύτταρα.



Εικόνα 4.7: Εικόνες χαρακτηρισμού ικριωμάτων με κολλαγόνου Ι-γλυκοζαμινογλυκάνων (CG) με ηλεκτρονική μικροσκοπία σάρωσης (700x,2800x) [58]

4.2 Απεικόνιση εκτυπωμένων κυττάρων μέσω μικροσκοπίας φθορισμού

Τα πειραματικά αποτελέσματα που αξιολογήθηκαν είναι αποτέλεσμα εκτύπωσης με Passat Laser μήκους κύματος 532nm και χρονικής διάρκειας 8 ps. Χρησιμοποιήθηκε συνδυασμός παραμέτρων του laser και παραμέτρων που αφορούν τα κύτταρα και τα υλικά, που θεωρούνται οι καλύτεροι δυνατοί για την εκτύπωση και μη τοξικοί για τα υλικά.

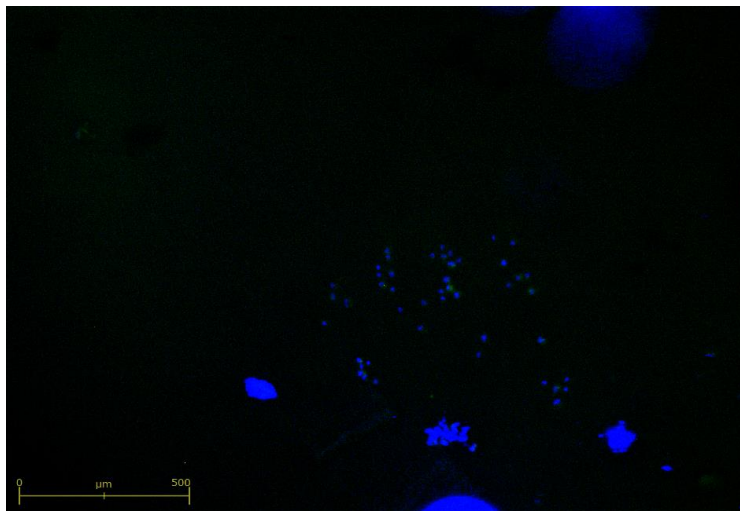
Για να παρατηρηθεί η μορφολογία των ικριωμάτων με τα εκτυπωμένα κύτταρα χρησιμοποιήθηκε ένα μικροσκόπιο φθορισμού, όπου η απεικόνιση γίνεται με την μέθοδο βαφής των κυττάρων με διάλυμα τριών χρωστικών ουσιών, όπου η κάθε μια από αυτές προσδένεται απευθείας σε συγκεκριμένα συστατικά του κυττάρου. Η χρωστική Hoechst 33342 (Thermo Fisher Scientific, μήκος κύματος διέγερσης 392nm και μήκος κύματος εκπομπής 440nm) βάφει τον πυρήνα των κυττάρων, καθώς προσδένεται στο DNA, έτσι ορίζει την ύπαρξη τους μέσα στο υλικό. Η ουσία PI (Thermo Fisher Scientific, μήκος κύματος διέγερσης 535nm και μήκος κύματος εκπομπής 617nm) έχει την ιδιότητα να βάφει τα νεκρά κύτταρα, επειδή ο κυτταρικός θάνατος συνεπάγεται σπάσιμο της κυτταρικής μεμβράνης με αποτέλεσμα αυτή να εισχωρεί στο εσωτερικό τους. Τέλος, η χρωστική Calcein AM (Thermo Fisher Scientific, μήκος κύματος διέγερσης 360nm και μήκος κύματος εκπομπής 449nm) προσδένεται στο DNA και βάφει το κυτταρόπλασμα και τον πυρήνα των κυττάρων με πράσινο χρώμα. Στον παρακάτω πίνακα αναφέρονται τα χαρακτηριστικά των βαφών που χρησιμοποιήθηκαν.

Calcein AM	Χρώση κυτταροπλάματος και πυρήνα
Propidium iodide(PI)	Χρώση πυρήνων σε νεκρά κύτταρα
Hoechst	Χρώση του πυρήνα των κυττάρων

Μετά την επώαση των κυττάρων με το διάλυμα των χρωστικών, γίνεται απεικόνιση των ικριωμάτων με το JUIstage μικροσκόπιο του εργαστηρίου Εμβιομηχανικής και Συστημικής Βιολογίας της σχολής Μηχανολόγων Μηχανικών. Το μικροσκόπιο διαθέτει μια πηγή LED, τρία διαφορετικά φίλτρα όπου αντιστοιχούν στα κανάλια απεικόνισης φθορισμού και 3 αντικειμενικούς φακούς διαφορετικών μεγεθύνσεων [59].

- ❖ Κανάλι bright : Απεικόνιση δομής του ικρίωματος με την μορφή ασπρόμαυρης εικόνας.
- ❖ Κανάλι GFP : Απεικόνιση με πράσινη χρώση τα ζωντανά κύτταρα (Calcein AM)
- ❖ Κανάλι RFP : Απεικόνιση νεκρών κυττάρων , με βαφή των πυρήνων με την χρωστική PI
- ❖ Κανάλι DAPI : Απεικόνιση του πυρήνα των κυττάρων με μπλε χρώμα με την βαφή Hoechst.

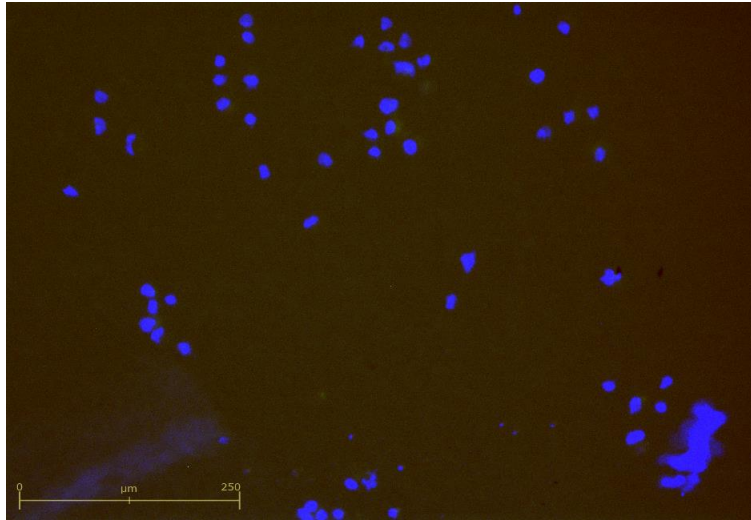
Στα παρακάτω πειράματα χρησιμοποιήθηκε ένα αρκετά πυκνό διάλυμα κυττάρων σε θρεπτικό (medium) με κυτταρικό αραιώμα 5000 cells/μl, 20 μl του οποίου επιστρώθηκαν στο υπόστρωμα του δότη ο οποίος διαθέτει ένα λεπτό στρώμα χρυσού πάχους 60 nm. Πριν την διαδικασία εκτύπωσης έγινε διερεύνηση ώστε να προσδιοριστεί η τιμή της ενέργειας κατωφλίου. Κάτω από την πυκνότητα ενέργειας του παλμού του laser 235 mJ/cm^2 δεν παρατηρήθηκαν εκτυπωμένα κύτταρα στον ικρίωμα. Στις παρακάτω εικόνες παρουσιάζονται τα πρώτα αποτελέσματα στην μικρότερη τιμή της πυκνότητας ενέργειας στην οποία παρατηρείται επιτυχής εκτύπωση των κυττάρων (235 mJ/cm^2) και ο έλεγχος της βιωσιμότητας ήταν θετικός.



Εικόνα 4.8 : Απεικόνιση εκτυπωμένων κυττάρων σε ικρίωμα(4x) και με τη χρήση των τριών φίλτρων του μικροσκοπίου φθορισμού.

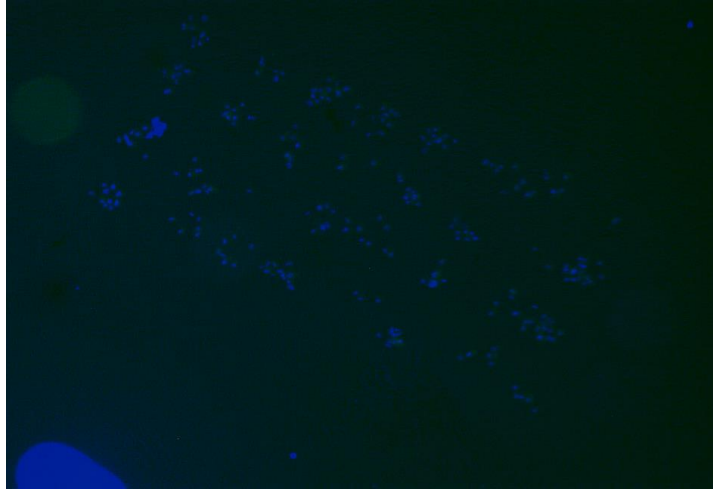
Με την χρήση του φακού μεγέθυνσης 4x μπορεί να παρατηρηθεί το σχήμα που αποτυπώνεται πάνω στο ικρίωμα. Το 4x4 array που εκτυπώθηκε δεν είναι ευδιάκριτο καθώς η πυκνότητα ενέργειας 235 mJ/cm^2 αποτελεί την πυκνότητα ενέργειας κατωφλίου για την επιτυχή εκτύπωση των κυττάρων, με αποτέλεσμα την πιθανή επιτυχή εκτύπωση μέρους του array. Για την ευκολότερη μελέτη βιωσιμότητας των κυττάρων έγινε απεικόνιση της εκτυπωμένης δομής κυττάρων με μεγαλύτερη μεγέθυνση στην Εικόνα 4.9 **Απεικόνιση της ίδιας περιοχή μετά την εκτύπωση και με τη χρήση των τριών φίλτρων του μικροσκοπίου φθορισμού (10x)(10x)**. Είναι ευδιάκριτο πως οι σταγόνες δεν είναι ομοιόμορφες και δεν μπορεί να εξαχθεί

συμπέρασμα σχετικά με τον αριθμό των κυττάρων που τυπώνονται/σταγόνα. Αυτό που είναι πολύ σημαντικό να τονιστεί παρ' όλα αυτά, είναι πως στο κόκκινο κανάλι δεν εμφανίζεται καθόλου σήμα, δηλαδή δεν υπάρχουν καθόλου νεκρά κύτταρα στα τυπωμένα.



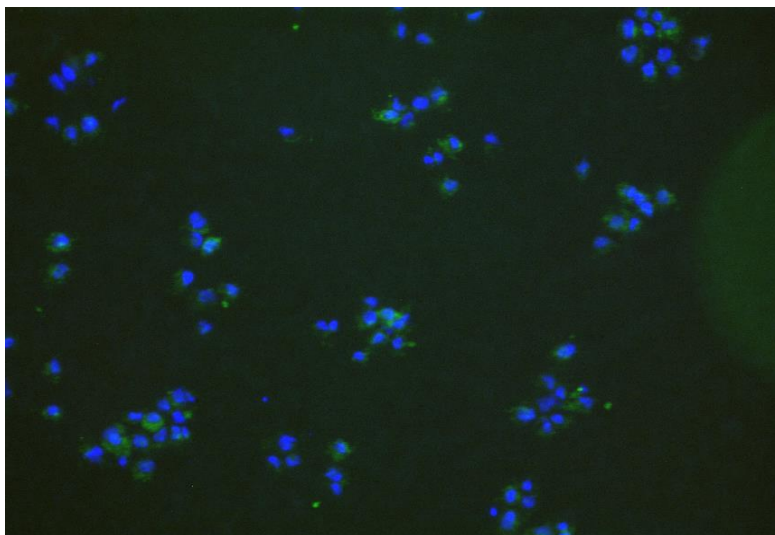
Εικόνα 4.9 Απεικόνιση της ίδιας περιοχής μετά την εκτύπωση και με τη χρήση των τριών φίλτρων του μικροσκοπίου φθορισμού (10x)

Στην συνέχεια, η τιμή της πυκνότητας ενέργειας αυξήθηκε, με σκοπό την δημιουργία καλύτερης δομής κυττάρων μετά την εκτύπωση, με ευδιάκριτες σταγόνες ως προς το σχήμα και την κατανομή των κυττάρων μέσα σε αυτές. Για τιμή 331 mJ/cm^2 , πραγματοποιήθηκαν 2 πίνακες 4×4 στο ικρίωμα κολλαγόνου, με απόσταση σταγόνων ρυθμισμένη στα $200 \mu\text{m}$, ενώ η απόσταση μεταξύ των υποστρωμάτων δότη και αποδέκτη είναι $400 \mu\text{m}$.



Εικόνα 4.10 Απεικόνιση μέσω μικροσκοπίας φθορισμού και με τα τρία φίλτρα (4x) εκτυπωμένων κυττάρων με laser

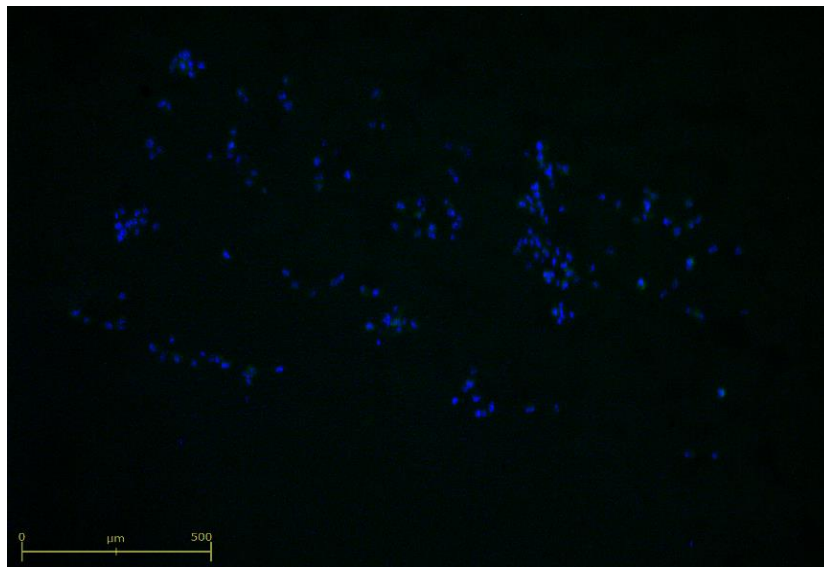
Στην Εικόνα 4.10 Απεικόνιση μέσω μικροσκοπίας φθορισμού και με τα τρία φίλτρα (4x) παρατηρούνται οι εκτυπωμένες δομές με συνδυασμό και των τριών φίλτρων του μικροσκοπίου φθορισμού. Οι σχηματισμένες δομές είναι σαφώς βελτιωμένες, καθώς παρατηρούνται ομοιόμορφες σταγόνες διαμέτρου 100 μm , η κάθε μία εκ των οποίων περιέχει 8-10 κύτταρα/ σταγόνα. Η καταμέτρηση των κυττάρων ανά σταγόνα πραγματοποιήθηκε με τη χρήση του προγράμματος imageJ για την εικόνα που φαίνεται παρακάτω (Εικόνα 4.11) η οποία έχει καταγραφεί με μεγαλύτερη μεγέθυνση.



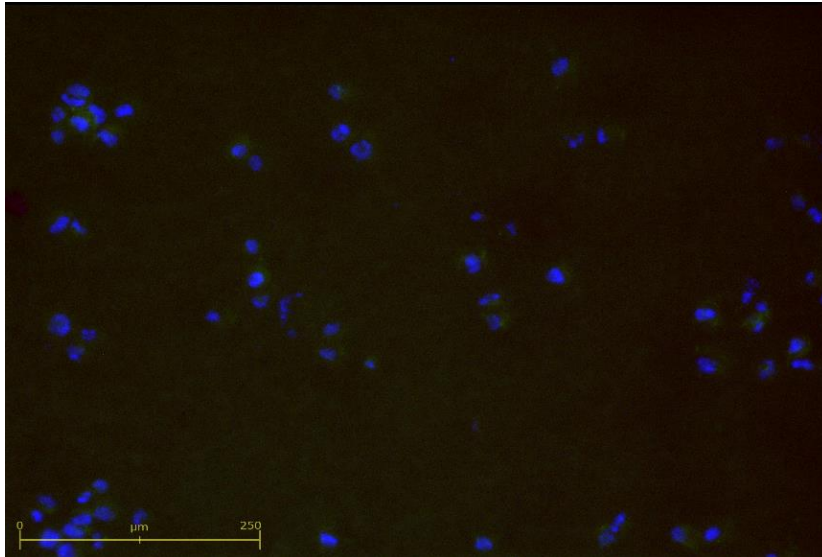
Εικόνα 4.11: Απεικόνιση της βιωσιμότητας των εκτυπωμένων κυττάρων με φακό 10x

Παρατηρείται πως ο αριθμός των κυττάρων είναι μικρότερος από τον αναμενόμενο καθώς κάθε σταγόνα αντιστοιχεί σε διάλυμα όγκου 4 nL (όπως έχει υπολογιστεί). Σύμφωνα με την αρχική συγκέντρωση των κυττάρων (5000 κύτταρα/1 μL) η συγκέντρωση των κυττάρων θα έπρεπε να είναι 20 κύτταρα/ σταγόνα. Πιθανή εξήγηση για την συγκέντρωση των εκτυπωμένων κυττάρων είναι η πιθανή ανομοιομορφία του υποστρώματος δότη καθώς έγινε η επίστρωση με το διάλυμα κυττάρων μέσα σε θρεπτικό υλικό. Εν συνεχεία θα πρέπει να τονιστεί πως παρατηρείται 100% βιωσιμότητα των εκτυπωμένων κυττάρων, καθώς στο φίλτρο PFP το οποίο απεικονίζει τα κύτταρα που είναι βαμμένα με τη χρωστική PI η οποία βάφει τα νεκρά κύτταρα. στο κανάλι του κόκκινου που δεν παρατηρείται καθόλου σήμα.

Αυξάνοντας περαιτέρω την πυκνότητα ενέργειας του παλμού του laser, στα 363 mJ/cm^2 και διατηρώντας την απόσταση των δυο υποστρωμάτων στα 400 μm , προέκυψαν τα αποτελέσματα των εικόνων Εικόνα 4.12 Απεικόνιση εκτυπωμένων κυττάρων με πυκνότητα ενέργειας 363 mJ/cm^2 και Εικόνα 4.13 Απεικόνιση περιοχής με φακό 10x εκτυπωμένων κυττάρων. Παρατηρείται πως οι σταγόνες που εναποτέθηκαν δεν έχουν ομοιόμορφο σχήμα καθώς η πυκνότητα ενέργειας του παλμού είναι υψηλή. Παρόλο που η μορφολογία της εκτυπωμένης κυτταρικής δομής δείχνει πως η πυκνότητα ενέργειας του παλμού είναι μεγάλη για την δημιουργία ενός καλώς σχηματισμένου και οριοθετημένου πίνακα κυττάρων, η βιωσιμότητα των κυττάρων που εκτυπώθηκαν είναι 100%, όπως παρατηρείται από τις παρακάτω εικόνες 4.7 και 4.8.

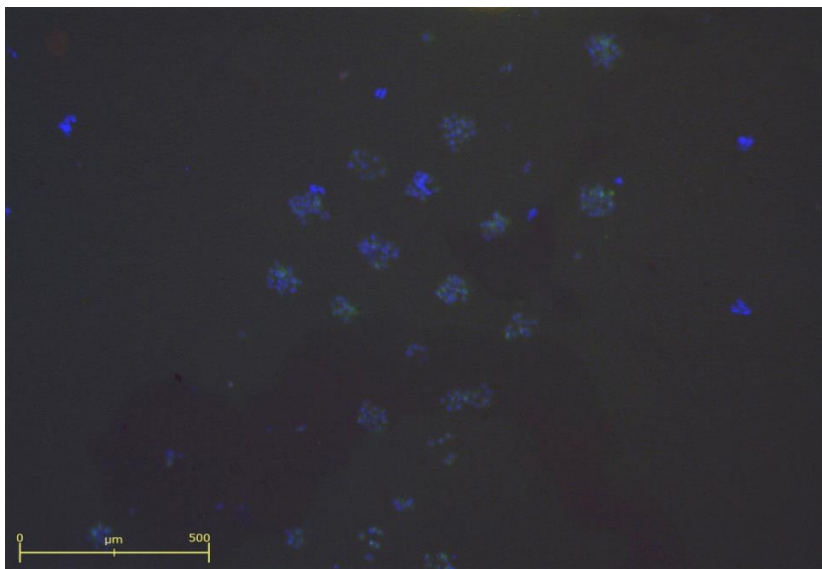


Εικόνα 4.12 Απεικόνιση εκτυπωμένων κυττάρων με πυκνότητα ενέργειας 363 mJ/cm^2

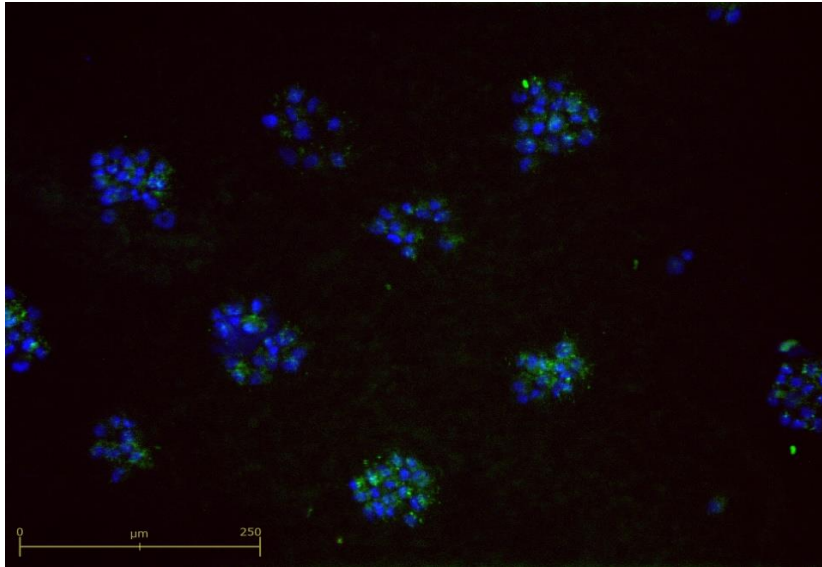


Εικόνα 4.13 Απεικόνιση περιοχής με φακό 10x εκτυπωμένων κυττάρων

Για να γίνει η βελτιστοποίηση των εκτυπωμένων κυτταρικών δομών αυξήθηκε η απόσταση των δυο υποστρωμάτων από 400 μm σε 500 μm . Η πυκνότητα ενέργειας που επιλέχθηκε ήταν τα 280 mJ/cm^2 σύμφωνα με τα παραπάνω αποτελεί τη βέλτιστη πυκνότητα ενέργειας εκτύπωσης. Επίσης, η ποσότητα του προς εκτύπωση υγρού μειώθηκε από 20 μl σε 10 μl (συνολικός αριθμός κυττάρων στο υπόστρωμα του δότη 50.000 cells/10 μL) και σε συνδυασμό με τις υπόλοιπες παραμέτρους εξαχθήκαν τα παρακάτω αποτελέσματα.



Εικόνα 4.14: Απεικόνιση του ικρίωματος μετά την εκτύπωση των κυττάρων με πυκνότητα ενέργειας 280 mJ/cm^2 και με τα τρία φίλτρα, μεγέθυνση 4x.



Εικόνα 4.15 Απεικόνιση του ικριώματος μετά την εκτύπωση των κυττάρων με πυκνότητα ενέργειας 280 mJ/cm^2 και με τα τρία φίλτρα, μεγέθυνση 10x.

Από την Εικόνα 4.15 Απεικόνιση του ικριώματος μετά την εκτύπωση των κυττάρων με πυκνότητα ενέργειας 280 mJ/cm^2 και με τα τρία φίλτρα, μεγέθυνση 10x. με φακό μεγέθυνσης 4x παρατηρείται πως η τυπωμένη δομή είναι αρκετά βελτιωμένη σε σχέση με τις προηγούμενες και οι σταγόνες απέχουν $200 \mu\text{m}$ είναι ομοιόμορφες και έχουν διάμετρο περίπου $100 \mu\text{m}$. Ακόμη μπορεί να εξαχθεί στο συμπέρασμα πως σε κάθε σταγόνα υπάρχουν 16-20 κύτταρα, αποτέλεσμα αναμενόμενο λαμβάνοντας υπόψη την συγκέντρωση των κυττάρων στο αρχικό διάλυμα ($5000 \text{ κύτταρα/1 } \mu\text{L}$) και τον όγκο της κάθε εκτυπωμένης σταγόνας ($2-4 \text{ nL}$) ο αριθμός των κυττάρων αναμένεται να είναι έως 20 κύτταρα/ σταγόνα. Επίσης, και σε αυτή την περίπτωση δεν παρουσιάζεται σήμα στο κανάλι RFP του μικροσκοπίου φθορισμού, ενώ παρουσιάζεται σήμα στα κανάλια DAPI και GFP. Συμπεραίνοντας έτσι ότι η βιωσιμότητα των εκτυπωμένων κυττάρων είναι 100%. Ο συνδυασμός των παραπάνω παραμέτρων, της πυκνότητας ενέργειας, της διαμέτρου του σποτ, του όγκου του φίλμ και της απόστασης των δυο υποστρωμάτων οδηγεί σε πετυχημένη εκτύπωση βιώσιμων κυττάρων σε καλά καθορισμένη δομή.

4.3 Συμπεράσματα

Τα δυο βασικά ερωτήματα που πρέπει να απαντηθούν είναι : 1) ποιος είναι ο κατάλληλος συνδυασμός παραμέτρων του laser για να υπάρξουν καλά ορισμένες δομές 2) να πληρείται το κριτήριο της βιωσιμότητας των κυττάρων. Σε πρώτη φάση έπρεπε να ελεγχθεί η τιμή της πυκνότητας ενέργειας για συγκεκριμένη απόσταση υποστρωμάτων και για συγκεκριμένη διάμετρο της δέσμης, η κρίσιμη τιμή στην οποία πραγματοποιείται η εκτύπωση. Παρατηρήθηκε πως στην τιμή 235 mJ/cm^2

έγινε εκτύπωση αλλά η δομή δεν ήταν ικανοποιητική και δεν μπορούσαν να εξαχθούν συμπεράσματα σχετικά με το σχήμα των σταγόνων και τον αριθμό των κυττάρων που αυτές περιέχουν. Ο έλεγχος βιωσιμότητας μέσω του φθορισμού έδειξε πως τα εκτυπωμένα κύτταρα είναι όλα ζωντανά. Για να βελτιωθεί η εκτυπωμένη δομή και να πληροί τα παραπάνω κριτήρια, έγιναν δοκιμές σε μεγαλύτερες πυκνότητες ενέργειας και τα συμπεράσματα που εξάγονται είναι πως από άποψη βιωσιμότητας τα αποτελέσματα είναι ικανοποιητικά αλλά οι δομές και ο συνδυασμός των παραμέτρων δεν μας επιτρέπει να απαντήσουμε ικανοποιητικά στο πρώτο ερώτημα που τέθηκε. Παρατηρείται πως σε πολλές περιπτώσεις οι σταγόνες δεν είναι ευδιάκριτες, έτσι μεταβλήθηκε η απόσταση δότη αποδέκτη και μειώθηκε το πάχος του εκτυπωμένου υγρού στο υπόστρωμα του δότη. Αυτό συνδυάστηκε και με μια τιμή της πυκνότητας ενέργειας ($280\text{mJ}/\text{cm}^2$) που είναι πάνω από την ενέργεια κατωφλίου αλλά δεν είναι στο εύρος των τιμών που το jet δεν είναι ομοιόμορφο, ώστε να μας δώσει σαν αποτέλεσμα μια σταγόνα ακαθόριστου μεγέθους. Ο έλεγχος της βιωσιμότητας αμέσως μετά την εκτύπωση επιβεβαίωσε πως τα εκτυπωμένα κύτταρα είναι ζωντανά σε ποσοστό 100%, μιας και στο κανάλι RFP δεν υπάρχει καθόλου σήμα.

Τα αποτελέσματα αυτά είναι κάποια πρώτα αποτελέσματα και μια προσπάθεια να προσδιοριστεί ο συνδυασμός των κατάλληλων παραμέτρων εκτύπωσης καρκινικών κυττάρων σε ικρίωματα κολλαγόνου με laser. Μελλοντικά, είναι απαραίτητο να πραγματοποιηθούν δοκιμές και σε άλλες κυτταρικές σειρές, ενώ θα πρέπει να ελεγχθεί η βιωσιμότητα των κυττάρων κάποιες μέρες μετά την εκτύπωση. Απαραίτητη είναι η καλλιέργεια των εκτυπωμένων κυττάρων και ο προσδιορισμός των κατάλληλων συνθηκών για κάθε κυτταροσειρά. Επίσης, βασικός μελλοντικός στόχος είναι η συγκαλλιέργεια κυτταρικών σειρών που έχουν εκτυπωθεί με την τεχνική LIFT, ώστε σε συνδυασμό να χρησιμοποιηθούν σε διάφορες εφαρμογές.

4.4 Αναφορές

[57] Robin Ng, Ru Zang, Kevin K. Yang, Ning Liu and Shang-Tian Yang, Three-dimensional fibrous scaffolds with microstructures and nanotextures for tissue engineering, RSC Adv., 2012, 2, 10110–10124, DOI: 10.1039/c2ra21085a

[58] Διπλωματική εργασία “Ανάπτυξη in vitro μοντέλου πρόβλεψης της φαρμακοεπαγόμενης ηπατοτοξικότητας σε πορώδη ικριώματα κολλαγόνου”, Φοίβος Χατζηδημητρίου, Αθήνα 2017

[59] JuLI Stage, Real Time Cell History Recorder, User Manual

5 Παράρτημα

1.Αποκόλληση κυττάρων από φλάσκα καλλιέργειας και διαίρεση κυττάρων σε περισσότερες φλάσκες

Υλικά

- Trypsin EDTA
- PBS sterile
- Cell culture medium DMEM High Glucose w/o L-Glutamine w/o Sodium Pyruvate LM-D1108 500ml (+10% FBS+1%P/S)
- 70% ethanol

Εξοπλισμός

- Cell incubator (5% CO₂, 37° C, υγρασία > 90%)
- Bio Hood –Laminar flow
- UV lamp (φορητή)
- Aspirator
- Μικροσκόπιο
- Φυγόκεντρος
- Μικροσκόπιο
- Αιμακυτταρόμετρο (Neubeaur Chamber)
- Tryban blue
- Πιπέτες
- Eppendorfs
- 15ml Conical tubes
- Φλάσκες 75cm²

Πριν εισαχθεί οτιδήποτε από τα παραπάνω στο biohood τα ψεκάζεται πολύ καλά με αιθανόλη.

Διαδικασία

1. Γίνεται έλεγχος της φλάσκας και αν το confluency είναι 80% και πάνω ξεκινάει η αποκόλληση και διαίρεση των κυττάρων.
2. Τοποθέτηση της λάμπας UV στο bio hood για 20min
3. Θέρμανση τριών βασικών συστατικών που χρησιμοποιούνται : EDTA, PBS,DMEM σε υδατόλουτρο ,ρυθμισμένο στους 37° C.
4. Μετά το πέρας των 20 λεπτών ακτινοβολήσης του hood γίνεται πολύ καλός καθαρισμός με αιθανόλη, προσθέεται σακούλα απορριμμάτων και τα 3 συστατικά αφού ψεκαστούν καλά.

5. Εισάγουμε την φλάσκα στο hood και αφαιρούμε με το aspirator το θρεπτικό προσέχοντας να μην ακουμπήσουμε την επιφάνεια στην οποία έχουν αναπτυχθεί τα κύτταρα.
6. Προσθέτουμε στην φλάσκα 5ml PBS με προσοχή στην επιφάνεια των κυττάρων και γίνεται προσεκτική ανακίνηση ώστε να καθαριστεί η επιφάνεια από υπολείμματα.
7. Στην συνέχεια αφαιρείται το PBS και προσθέτονται 3ml τρυψίνη, η οποία επωάζεται μαζί με τα κύτταρα για 3 λεπτά, ώστε να αποκολληθούν από την επιφάνεια.
8. Μετά το πέρας των 3 λεπτών η φλάσκα ελέγχεται ώστε να επιβεβαιωθεί πως έχουν αποκολληθεί τελείως.
9. Η φλάσκα μεταφέρεται στο biohood και σε αυτή προσθέτονται τουλάχιστον 6ml θρεπτικό, ώστε να απενεργοποιηθεί η δράση της τρυψίνης. Αυτό το ένζυμο μπορεί να σκοτώσει τα κύτταρα αν μείνει με αυτά για πάνω από 5 λεπτά.
10. Με την χρήση της πιπέτας πραγματοποιούνται up-and-downs ώστε να αφαιρεθούν εξ ολοκλήρου όλα τα κύτταρα και να διαλυθεί το κυτταρικό αραίωμα στο θρεπτικό. Το συνολικό διάλυμα μεταφέρεται σε ένα 15ml tube.
11. Από τον συνολικό όγκο αφαιρούνται 100μl και τοποθετούνται σε ένα erpendorf. Εκτός hood προσθέτονται 100μl της χρωστικής trypan blue, η οποία βάφει τους πυρήνες των κυττάρων.
12. Για την καταμέτρηση των κυττάρων χρησιμοποιούνται 15μl από το παραπάνω διάλυμα το οποίο τοποθετείται στο αιματοκυτταρόμετρο, μεταξύ της πλάκας και της καλυπτρίδας.
13. Με την χρήση του οπτικού μικροσκοπίου, μετρούνται τα κύτταρα τα οποία βρίσκονται στο εσωτερικό 4 τεταρτημορίων το καθένα εκ των οποίων περιέχει 16 τετραγώνια. Τελικά υπολογίζεται ο μέσος όρος των κυττάρων. Ο τελικός αριθμός υπολογίζεται από τον παρακάτω τύπο:

$$N = ((x_1+x_2+x_3+x_4)/4) * 2 * 10^4 = \text{αριθμός κυττάρων/ml}$$

Όπου x_1, x_2, x_3, x_4 είναι ο αριθμός των κυττάρων σε κάθε τεταρτημόριον και για να προκύψει ο αριθμός των κυττάρων πολλαπλασιάζουμε την παραπάνω τιμή με τον τελικό όγκο, συνήθως $V=9\text{ml}$.

14. Γίνεται φυγοκέντριση του κυτταρικού αραιώματος για 5min σε 2500 rpm. Επίσης προσθέτουμε conical tube για αντίβαρο ίδιου όγκου, 9ml.
15. Μετά την φυγοκέντριση το tube μεταφέρεται στο biohood, όπου αφαιρείται το υπερκείμενο με προσοχή ώστε να μην επηρεαστεί το ίζημα και το pellet διαλύεται σε όγκο θρεπτικού ώστε το κυτταρικό αραίωμα να είναι 2000-2500cells/μL.

16. Πραγματοποιούνται up-and-downs προσεκτικά ώστε να διαλυθεί το ίζημα στο θρεπτικό και στην συνέχεια χωρίζουμε τα κύτταρα και τα τοποθετούμε σε νέες φλάσκες , συνήθως 2ml από τον τελικό όγκο σε κάθε φλάσκα με 6ml νέο θρεπτικό. Η τιμή των 2ml μπορεί να τροποποιηθεί ανάλογα με τον αριθμό των κυττάρων και τις ανάγκες του πειράματος.
17. Οι νέες φλάσκες αφού ελεγχθούν για τελευταία φορά στο μικροσκόπιο , τοποθετούνται στον επωαστή .
18. Τέλος , προσθέεται χλωρίνη στο tube των κυττάρων, στην σακούλα των απορριμμάτων και αυτά πετάγονται .
19. Το hood καθαρίζεται με αιθανόλη , αφαιρούνται όλα τα υλικά τα οποία επιστρέφονται στο ψυγείο και το hood ακτινοβολείται για 20min με την λάμπα UV.

Σημείωση: Ανάλογα με τις ανάγκες των πειραμάτων η καλλιέργεια μπορεί να πραγματοποιηθεί σε άλλα δοχεία καλλιέργειας, απλά τροποποιούνται οι όγκοι των συστατικών.

2.Αποκόλληση κυττάρων για την πραγματοποίηση πειράματος εκτύπωσης

Η διαδικασία που ακολουθείται είναι η ίδια μέχρι το βήμα 15 , με την διαφορά ότι το ίζημα διαλύεται σε κατάλληλο όγκο θρεπτικού ώστε το κυτταρικό αραιώμα να είναι 5000cells/μL.

- Για τις ανάγκες της εκτύπωσης χρησιμοποιούνται 500μl από τον τελικό όγκο του tube ,ενώ ο όγκος που απομένει διαλύεται σε επιπλέον θρεπτικό και τοποθετείται σε φλάσκες ,ώστε τα κύτταρα που έχουν απομείνει να καλλιεργηθούν για επόμενο πείραμα.

3. Καθαρισμός γυαλιών μικροσκοπίου

Υλικά

- Type I water
- 70% αιθανόλη μετουσιωμένη με κετόνες
- Γυαλάκια 22x22mm

Εξοπλισμός

- Θήκη κατακόρυφης τοποθέτησης των γυαλιών
- Bath Sonicator

Διαδικασία

1. Τοποθέτηση γυαλιών κατακόρυφη σε βάση στο κουτί και προσθήκη νερού μέχρι η στάθμη του να καλύψει όλη την επιφάνεια των γυαλιών. Η θήκη υποβάλλεται σε sonicating για 30 λεπτά.
2. Μετά το τέλος της διαδικασίας το νερό αφαιρείται και η θήκη στεγνώνεται με χαρτί κουζίνας πολύ καλά.
3. Στην συνέχεια τα γυαλάκια τοποθετούνται στην θήκη και προστίθεται αιθανόλη μέχρι να καλυφθεί η επιφάνεια τους για 20 λεπτά.
4. Αφαίρεση της αιθανόλης από το κουτί και εξάτμιση της από τα γυαλάκια

4. Μεταφορά υλικών

Υλικά

- ddH₂O
- Medium DMEM high Glucose

Εξοπλισμός

- Χαρτί
- Petridish
- Parafilm

Διαδικασία

1. Αμέσως μετά την εκτύπωση το γυαλάκι αφαιρείται με προσοχή από την διάταξη .
2. Σε ένα petridish τοποθετείται ένα κομμάτι χαρτί με νερό ddH₂O και τα υλικά τοποθετούνται με προσοχή πάνω σε αυτό ,για να βρίσκονται σε ένα περιβάλλον με υγρασία.
3. Σε κάθε ικρίωμα προσθέτονται 10μl θρεπτικό.
4. Το petridish κλείνεται με parafilm και μεταφέρεται με προσοχή.

5. Καθαρισμός επιφάνειας δότη

Υλικά

- 70 % Αιθανόλη
- Προπανόλη
- ddH₂O

Εξοπλισμός

- Χαρτί

Διαδικασία

1. Ο δότης καθαρίζεται προσεκτικά με αιθανόλη και χαρτί και αφού στεγνώσει καλά ακολουθεί και μια πλύση με προπανάλη. Τέλος καθαρίζεται καλά ddH₂O .
2. Για να απομακρυνθούν τα υπολείμματα του χαρτιού και το νερό , ο donor στεγνώνεται με αέρα και τοποθετείται σε petridish με paraflim , ώσπου να χρησιμοποιηθεί.
3. Πριν από το πείραμα το υπόστρωμα του δότη και του αποδέκτη ακτινοβολούνται με την λάμπα UV για 20 λεπτά μέσα στο Biohood.

6. Βαφή και απεικόνιση κυττάρων με μικροσκόπιο φθορισμού

Υλικά

- Calcein AM αποθηκευμένη στους -20° C , διάλυμα 100μM σε DMSO
- Hoechst αποθηκευμένη στους +4° C σε συγκέντρωση 1mg/mL
- Propidium Iodide αποθηκευμένη στους +4° C σε συγκέντρωση 0,1mg/mL
 - Για τις ανάγκες του πειράματος οι χρωστικές αραιώθηκαν και οι τελικές τιμές είναι οι παρακάτω :
 - ✓ Calcein AM 50μM
 - ✓ Hoechst 50 μg/ml
 - ✓ PI 35μg/ml
- Cell culture medium DMEM High Glucose w/o L-Glutamine w/o Sodium Pyruvate LM-D1108 500ml (+10% FBS+1%P/S)

Εξοπλισμός

- Biohood-Laminar flow
- Μικροσκόπιο JUi stage
- Πιπέτες
- Incubator
- Αντάπτορας με θέσεις τοποθέτησης των γυαλιών στη βάση του μικροσκοπίου.

Διαδικασία

1. Το petridish με τα υλικά τοποθετείται στο Biohood και αφαιρείται το θρεπτικό από κάθε ικρίωμα.
2. Σε κάθε ικρίωμα προστίθενται 20μl από διάλυμα των χρωστικών (47μl medium+1μl Calcein AM+1μl Hoechst+1μl PI). Επειδή οι χρωστικές είναι φωτοευαίσθητες η διαδικασία γίνεται με σβηστό το φως του Biohood .
3. Τα υλικά επωάζονται για 1 ώρα στον επωαστή κυττάρων
4. Μετά το πέρας της 1 ώρας το διάλυμα των χρωστικών απομακρύνεται από κάθε ικρίωμα και στο κάθε ένα προσθέτονται 20 μl θρεπτικό.

5. Το κάθε γυαλάκι τοποθετείται στον αντάπτορα ο οποίος τοποθετείται στην βάση του μικροσκοπίου για απεικόνιση. Για την απεικόνιση χρησιμοποιούνται οι φακοί 4x και 10x και η εστίαση έγινε στο κανάλι DAPI .
6. Κάθε υλικό σαρώθηκε στο σύνολο του στο brightfield , εντοπίστηκαν οι περιοχές στις οποίες υπήρχαν εκτυπωμένα κύτταρα και τραβηχτήκαν έγχρωμες εικόνες που είναι συνδυασμός των τριών καναλιών (DAPI-> Μπλε , RFP ->κόκκινο , GFP->πράσινο)

6 Ακρωνύμια

LIFT: Laser induced forward transfer

LAB: Laser Assisted Bio-printing

In situ: επί τόπου

In vivo: εν ζωή

In vitro: σε δοκιμαστικό σωλήνα

CG: Collagen Glycosaminoglycan

DMEM: Dulbecco's Modified Eagle Medium

FBS: Fetal bovine serum

P/S: Penicillin Streptomycin

GFP: Green Fluorescent Protein

RFP: Red Fluorescent Protein

PBS: Phosphate-Buffered Saline

T/E:Trypsin/EDTA

