

ΕΘΝΙΚΟ ΜΕΤΣΟΒΙΟ ΠΟΛΥΤΕΧΝΕΙΟ



Εργαστήριο Εμβιομηχανικής και Συστημικής Βιολογίας
Τομέας Μηχανολογικών Κατασκευών και Αυτομάτου Ελέγχου
ΣΧΟΛΗ ΜΗΧΑΝΟΛΟΓΩΝ ΜΗΧΑΝΙΚΩΝ

Διπλωματική Εργασία

Σχεδιασμός Ιδιοσυσκευής για Κατασκευή Ακριβείας Συσκευών Πορώδων Ικριωμάτων Κολλαγόνου

Λουκάς Μαυρίκας

Επιβλέπων: Λεωνίδας Αλεξόπουλος, Επ. Καθηγητής ΕΜΠ

Συνεργάτης: Δρ. Δημήτριος Τζεράνης, Ίδρυμα Τεχνολογίας και Έρευνας

Αθήνα 2018

Copyright © Μαυρίκας Λουκάς, 2018

Με επιφύλαξη παντός δικαιώματος. All rights reserved.

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

Ευχαριστίες

Ευχαριστώ τον κ. Λεωνίδα Αλεξόπουλο, Επίκουρο Καθηγητή ΕΜΠ για την επίβλεψη και τη δυνατότητα που μου έδωσε να γίνω μέλος του Εργαστηρίου Εμβιομηχανικής και Συστημικής Βιολογίας της σχολής Μηχανολόγων Μηχανικών ΕΜΠ και για όσα μου προσέφερε στην εκπόνηση της εργασίας.

Ένα μεγάλο «ευχαριστώ» στον Δρ. Δημήτρη Τζεράνη για τη δυνατότητα που μου έδωσε να συνεργαστούμε και να εκπονηθεί η συγκεκριμένη εργασία, με θυσίες από αμφότερους και παρ' όλες τις δυσκολίες.

Ένα μεγάλο «ευχαριστώ» και σε όλα τα άλλα μέλη του εργαστηρίου που συνυπάρξαμε, συχνά συνεργαστήκαμε και κυρίως που με βοήθησαν σε ό,τι τους χρειαζόμουν.

Το μεγαλύτερο «ευχαριστώ», φυσικά, το χρωστώ στις οικογένειές μου:

τη φυσική μου οικογένεια που με αγαπά και την αγαπώ, που με στήριξε και με στηρίζει με αυτοθυσίες και αγώνες και που είναι παντά εκεί για μένα

και τη δεύτερη οικογένειά μου, αυτή με την οποία επέλεξα να μοιραστώ συναισθήματα και εμπειρίες στη ζωή μου και η οποία ήταν και είναι εκεί για μένα σε όλες τις φάσεις της ζωής και της καθημερινότητας για να μου προσφέρουν ό,τι μπορούν και κυρίως την παρέα τους. Αυτούς που είναι τιμή μου να λέω φίλους μου.

Περιεχόμενα

Περίληψη.....	1
Abstract	3
Πίνακας Εικόνων	5
Πίνακας Πινάκων.....	9
1. Εισαγωγικές έννοιες.....	11
1.1. Τρισδιάστατες κυτταροκαλλιέργειες	11
1.2. Πορώδη ικρίσματα κολλαγόνου.....	13
1.3. Συσκευές με συστοιχίες από λεπτά Πορώδη Ικρίσματα Κολλαγόνου (ΠΙΚ)	14
1.3.1. Πλεονεκτήματα των συσκευών με συστοιχίες λεπτών ΠΙΚ	15
1.3.2. Λειτουργικές Προδιαγραφές ΠΙΚ	16
1.3.3. Σύνοψη διαδικασίας κατασκευής συσκευών με συστοιχίες από λεπτά ΠΙΚ.....	16
1.3.4. Εφαρμογές των λεπτών ΠΙΚ σε κυτταρικές μελέτες	19
1.4 Στόχοι της διπλωματικής εργασίας	20
2. Σχεδιασμός της Ιδιοσυσκευής.....	21
2.1. Λειτουργικές απαιτήσεις και περιορισμοί.....	21
2.2. Προδιαγραφές της ιδιοσυσκευής	22
2.3. Ενωσιολογικός σχεδιασμός.....	23
2.3.1. Περιορισμός των β.ε. των αντικειμένων πάνω στις βάσεις τους	24
2.3.2. Επιλογή ποιας βάσης θα βρίσκεται κάτω και ποιας θα οδηγείται από πάνω	27
2.3.3. Οδήγηση της βάσης των PDMS προς τη βάση των γυαλιών	29
2.4. Διάγραμμα ροής λήψης αποφάσεων εννοιολογικού σχεδιασμού.....	30
3. Ανάλυση, Σχεδιασμός και Κατασκευή Ιδιοσυσκευής	33
3.1. Ανάλυση ανοχών θέσης των εναιωρημάτων πάνω στα γυαλιά.....	33
3.2. Ανάλυση ανοχών των θέσεων των υπερκατασκευών PDMS.....	35
3.3. Ανάλυση ανοχών στη συναρμογή πύρων οδήγησης – οπών	35
3.4. Συνολικό σφάλμα θέσης των εναιωρημάτων και των πηγαδιών	35
3.5. Ανάλυση μεταφοράς θερμότητας κατά την λυοφιλοποίηση	36
3.6. Ανάλυση στιβαρότητας βάσης πύρων - Διαστασιολόγηση της βάσης των πύρων.....	46
3.7. Λεπτομερής Μηχανολογικός Σχεδιασμός & Κατασκευή	49
3.7.1. Βάση πύρων.....	49
3.7.2. Βάση γυαλιών.....	50

3.7.3.	Βάση υπερκατασκευών PDMS	51
3.7.4.	Συναρμολογημένη ιδιοσυσκευή	52
4.	Πειραματικός Χαρακτηρισμός Ιδιοσυσκευής	53
4.1.	Επίδραση της ιδιοσυσκευής στην ενεργοποίηση των επιφανειών των γυαλιών με plasma	53
4.2.	Επίδραση συναρμολόγησης γυαλιών – υπερκατασκευών PDMS με χρήση της ιδιοσυσκευής στο σφάλμα θέσης των βοθρίων ως προς τις θέσεις των ΠΙΚ.....	53
5.	Συμπεράσματα και Μελλοντική Εργασία	57
	Συμπεράσματα	57
	Προτάσεις για μελλοντική εργασία.....	57
	Βιβλιογραφία.....	59
	Παράρτημα Α: Ανάλυση μεταφοράς θερμότητας	61
	Μοντέλο συγκεντρωμένων στοιχείων	61
	Μοντέλο 1D Πεπερασμένων Στοιχείων (ΠΣ).....	68
	Παράρτημα Β: Καλούπι χύτευσης Υπερκατασκευής PDMS.....	73
	Πείραμα αξιολόγησης ενεργοποίησης των επιφανειών των υπερκατασκευών PDMS από plasma	74
	Παράρτημα Γ: Μηχανολογικά σχέδια	75

Περίληψη

Η ανάγκη ανάπτυξης και χρήσης βιοϋλικών στη βιολογική έρευνα και συγκεκριμένα σε τρισδιάστατες κυτταροκαλλιέργειες προήλθε από την ικανότητά τους να προσομοιώνουν καλύτερα τις *in vitro* συνθήκες ενός κυττάρου σε σχέση με τις συμβατικές διδιάστατες κυτταροκαλλιέργειες. Τα βιοϋλικά είναι πρωτίνες που βρίσκονται στην εξωκυττάρια μήτρα των κυττάρων στους ιστούς των οργανισμών και παίζουν καθοριστικό ρόλο στη ζωή και τις λειτουργίες τους. Ωστόσο, τα πορώδη ικρίωματα βιοϋλικών, ως υποκατηγορία των τρισδιάστατων κυτταροκαλλιεργειών, δεν έχουν μελετηθεί και βελτιστοποιηθεί, γι αυτό και η έρευνά τους έχει δυσκολίες και προβλήματα.

Αυτές τις δυσκολίες και προβλήματα υπόσχονται να ξεπεράσουν τα *λεπτά πορώδη ικρίωματα βιοϋλικών*. Πρόσφατα, στα πλαίσια του ευρωπαϊκού ερευνητικού προγράμματος H2020 Als-on-a-chip (Δρ. Δ.Τζεράνης) αναπτύχθηκε μια διαδικασία κατασκευής λεπτών πορώδων ικρίωμάτων πάνω σε επιφάνειες που επιτρέπουν οπτική απεικόνιση (γυαλιά) και διευκολύνουν τη μελέτη των κυτταροκαλλιεργειών μέσα τους. Σε συνεργασία και με το Εργαστήριο Εμβιομηχανικής και Συστημικής Βιολογίας της σχολής των Μηχανολόγων Μηχανικών του Εθνικού Μετσόβιου Πολυτεχνείου έχει γίνει έρευνα για να βελτιωθούν τα χαρακτηριστικά τους, αλλά και η διαδικασία κατασκευής τους.

Σκοπός της παρούσας διπλωματικής εργασίας είναι η σχεδίαση μιας ιδιοσυσκευής που έχει ως απώτερο στόχο τη βελτίωση της διαδικασίας κατασκευής συστοιχιών με λεπτά πορώδη ικρίωματα κολλαγόνου ως προς την ακρίβεια και την απαναληψιμότητα, καθώς και τη συμμόρφωση με διαδικασίες και πρωτόκολλα που χρησιμοποιούνται από τους ερευνητές ή που έχουν αναπτυχθεί ως βέλτιστα για τα χαρακτηριστικά των ικρίωμάτων.

Abstract

The need of development and use of biomaterials in biological researches and particularly in 3-dimensional cell cultures comes from their ability to simulate better the *in vitro* conditions of cells compared to conventional 2-dimensional cultures. Biomaterials are proteins that are located in the extracellular matrix of tissue cells of organisms and play an important role in their life and functions. However, porous biomaterials scaffolds, as a subcategory of 3-dimensional cell cultures, is not yet optimized and thus the research about them comes along with difficulties and problems.

Thin porous biomaterials scaffolds promise to deal with these difficulties. As part of the European research program H2020 Als-on-a-chip, Dr. Tzeranis's team developed a procedure for constructing thin porous scaffolds of biomaterials on surfaces that allow optical display (glass) and facilitate the study of cell cultures in them. In cooperation with Systems Biology Lab, Mechanical Engineering School, National Technical University of Athens, research has been made in improving their specifications and the procedures to construct them.

The goal of this thesis is the design of a device that aims to improve the procedure of construction of thin porous collagen scaffolds arrays in terms of precision and repeatability, as well as to be compatible with techniques and protocols that are already being used by the researches or have developed as optimum for the scaffolds' properties and specifications.

Πίνακας Εικόνων

Εικόνα 1: Συσκευή με συστοιχία 6 λεπτών ΠΙΚ. Φαίνονται τα τρία μέρη της: το γυαλί μικροσκοπίας (σαν βάση), η διαφανής υπερκατασκευή με 6 βοθρία (wells) κολλημένη από πάνω και τα 6 λευκά ΠΙΚ προσκολλημένα πάνω στο γυαλί στον πάτο κάθε βοθρίου.	15
Εικόνα 2: Τυπικά χρονικά προφίλ -κατά τη λυοφιλοποίηση- της θερμοκρασίας ραφιού και συμπυκνωτή του λυοφιλοποιητή, της θερμοκρασίας του προϊόντος της λυοφιλοποίησης και της πίεσης (κενού) στο θάλαμο του λυοφιλοποιητή	18
Εικόνα 3: Δομικό διάγραμμα διαδικασίας κατασκευής συσκευών με συστοιχίες λεπτών ΠΙΚ. Με μπλε περίγραμμα είναι οι διαδικασίες που δεν επηρεάζονται από την παρούσα εργασία. Με πορτοκαλί περίγραμμα είναι οι διαδικασίες, στις οποίες επεμβαίνει η προς σχεδιασμό ιδιοσυσκευή. Με πράσινο εκείνες, στις οποίες επεμβαίνει το προς σχεδιασμό καλούπι.....	20
Εικόνα 4: Εννοιολογικός σχεδιασμός της βάσης γυαλιών με ποκέτες	24
Εικόνα 5: Διαδικασία εισαγωγής και εξαγωγής των γυαλιών στη/από τη βάση τους.....	25
Εικόνα 6: Μοντέλο γυαλιού μικροσκοπίας και θέσεις ικριωμάτων πάνω του	25
Εικόνα 7: Πλάκα 96 βοθρίων του εμπορίου	26
Εικόνα 8: Εννοιολογικός σχεδιασμός της βάσης υπερκατασκευών PDMS, όπου οι υπερκατασλευές οριοθετούνται με ποκέτες.....	26
Εικόνα 9: Εννοιολογικός σχεδιασμός της βάσης υπερκατασκευών PDMS, όπου οι υπερκατασλευές οριοθετούνται με πύρους	27
Εικόνα 10: Περιοχές συγκράτησης του γυαλιού για την εναλλακτική που η βάση των γυαλιών οδηγείται από πάνω προς την βάση των PDMS που βρίσκεται κάτω.	28
Εικόνα 11: α) Εννοιολογικός σχεδιασμός μιας βάσης γυαλιών που θα οδηγείται ανάποδα προς τη βάση των υπερκατασκευών PDMS. β) Αναποδογύρισμα κατά τη συναρμολόγηση με τη βάση των υπερκατασκευών PDMS	28
Εικόνα 12: Εννοιολογικός σχεδιασμός της βάσης των υπερκατασκευών PDMS για την περίπτωση όπου αυτή κινείται από πάνω προς τη βάση των γυαλιών. Φαίνεται και η πλάκα πίεσης των υπερκατασκευών.....	29
Εικόνα 13: Οδήγηση της βάσης των PDMS προς τη βάση των γυαλιών με τη βοήθεια πύρων οδήγησης (κατά τη φάση της συναρμολόγησης γυαλιών-υπερκατασκευών PDMS).....	29
Εικόνα 14: Ευθυγράμμιση/οδήγηση της βάσης υπερκατασκευών PDMS προς τη βάση των γυαλιών με ποκέτα κατά τη φάση της της συναρμολόγησης γυαλιών-υπερκατασκευών PDMS	30
Εικόνα 15: Διάγραμμα ροής λήψης αποφάσεων για το σχεδιασμό. Με πορτοκαλί φαίνεται το μονοπάτι που τελικά ακολουθήθηκε, ενώ με μπλε φαίνονται οι εναλλακτικές που απορρίφθηκαν.....	31
Εικόνα 16: Τυπικές μεταβολές και φάσεις θερμοκρασιών και πιέσεων σε σημεία του λυοφιλοποιητή κατά τη λυοφιλοποίηση	37
Εικόνα 17: Μοντέλο μεταφοράς θερμότητας κατά τη λυοφιλοποίηση ικριωμάτων πάχους 3mm σε καλούπια (Harley, 2006)	37
Εικόνα 18: Επίδραση του ρυθμού ψύξης κατά τη λυοφιλοποίηση στο μέσο μέγεθος των πόρων ικριωμάτων CG πάχους 3mm (Harley, 2006)	38
Εικόνα 19: Υπολογισμένοι αναλυτικά και μετρημένοι από πειράματα χρόνοι πλήρους στερεοποίησης του ελαιωρήματος για ρυθμό ψύξης 1.4 οC/min και για 4 διαφορετικές τελικές θερμοκρασίες ψύξης (ελαιώρημα CG, πάχους 3mm). (Harley, 2006)	38

Εικόνα 20: Επίδραση της τελικής θερμοκρασίας ψύξης στο μέσο μέγεθος πόρων του εναιωρήματος για ρυθμό ψύξης 1.4 °C/min και για 4 διαφορετικές τελικές θερμοκρασίες ψύξης (εναιώρημα CG, πάχους 3mm). (Harley, 2006)	39
Εικόνα 21: Επίδραση τριών (3) διαφορετικών θερμοκρασιακών προφίλ στο μέσο μέγεθος πόρων λεπτών ικριωμάτων κολλαγόνου (C) και κολλαγόνου-γλυκοζαμινογλυκανών (CG).....	39
Εικόνα 22: Μοντέλο μονοδιάστατης μεταφοράς θερμότητας από το βιοϋλικό προς το ράφι (ψύξη).....	40
Εικόνα 23: Κανονικό δένδρο (μπλε γραμμή) και δεσμοί (γκρι γραμμή) για το μοντέλο αγωγής θερμότητας για τις φάσεις της μοντελοποίησης απολύτως υγρού (1) και απολύτως στερεού (3) εναιωρήματος.....	41
Εικόνα 24: Κανονικό δένδρο (μπλε γραμμή) και δεσμοί (γκρι γραμμή) για το μοντέλο αγωγής θερμότητας για τη φάση της μοντελοποίησης της αλλαγής φάσης του εναιωρήματος από υγρό σε στερεό (2).....	42
Εικόνα 25: Θερμοκρασιακό προφίλ ως είσοδος στο ράφι για την εκτίμηση του χρόνου στερεοποίησης του εναιωρήματος	43
Εικόνα 26: Απόκριση θερμοκρασιών βάσης, γυαλιού, πάνω και κάτω επιφάνειας εναιωρήματος στην θερμοκρασία ραφίου της Εικόνα 25	43
Εικόνα 27: Απόκριση θερμοκρασιών βάσης, γυαλιού, πάνω και κάτω επιφάνειας εναιωρήματος κατά την αλλαγή φάσης του εναιωρήματος (διάρκεια 20.55 sec). Λεπτομέρεια από την Εικόνα 26	43
Εικόνα 28: Ροή θερμότητας από τα δύο μέρη του εναιωρήματος (υγρό και στερεό) προς το μέτωπο στερεοποίησης κατά την αλλαγή φάσης του εναιωρήματος – συσκευή για λεπτά ικριώματα	44
Εικόνα 29: Ροή θερμότητας από τα δύο μέρη του εναιωρήματος (υγρό και στερεό) προς το μέτωπο στερεοποίησης κατά την αλλαγή φάσης του εναιωρήματος – καλούπι για παχιά ικριώματα του Harley ...	44
Εικόνα 30: Μετατόπιση σε mm κατά X για πλάκα πάχους 3 mm και πύρο μήκους 26 mm	47
Εικόνα 31: Μετατόπιση σε mm κατά Y για πλάκα πάχους 3 mm και πύρο μήκους 26 mm	47
Εικόνα 32: Μετατόπιση σε mm κατά Z για πλάκα πάχους 3 mm και πύρο μήκους 26 mm	47
Εικόνα 33: Μετατόπιση σε mm κατά X για πλάκα πάχους 10 mm και πύρο μήκους 33 mm	48
Εικόνα 34: Μετατόπιση σε mm κατά Y για πλάκα πάχους 10 mm και πύρο μήκους 33 mm	48
Εικόνα 35: Μετατόπιση σε mm κατά Z για πλάκα πάχους 10 mm και πύρο μήκους 33 mm	48
Εικόνα 36: Βάση των πύρων.....	50
Εικόνα 37: Βάση των γυαλιών.....	50
Εικόνα 38: Βάση των υπερκατασκευών PDMS	51
Εικόνα 39: Συναρμολογημένη ιδιοσυσκευή: κατά τη φάση της συναρμολόγησης γυαλιών – PDMS	52
Εικόνα 40: Εικόνα από το μικροσκόπιο JuliStage για ένα βοθρίο από τα control δείγματα. Οι κατακόρυφες γραμμές σκιαγραφούν τον κυκλικό δίσκο που προσομοιώνει το θεωρητικό ΠΙΚ πάνω στο γυαλί. Ο εξωτερικός, σκούρος κύκλος είναι η περίμετρος του κύκλου του βοθρίου της υπερκατασκευής PDMS. Με κόκκινο σημειώθηκαν τα σημεία δειγματοληψίας για τη μέτρηση της εκκεντρότητας πάνω στο όριο του θεωρητικού ΠΙΚ και με πράσινο τα σημεία δειγματοληψίας πάνω στο όριο του βοθρίου.	54
Εικόνα 41: Εικόνα από το μικροσκόπιο JuliStage για ένα βοθρίο από τα δείγματα προς μελέτη. Οι κατακόρυφες γραμμές σκιαγραφούν τον κυκλικό δίσκο που προσομοιώνει το θεωρητικό ΠΙΚ πάνω στο γυαλί. Ο εξωτερικός, σκούρος κύκλος είναι η περίμετρος του κύκλου του βοθρίου της υπερκατασκευής PDMS. Με κόκκινο σημειώθηκαν τα σημεία δειγματοληψίας για τη μέτρηση της εκκεντρότητας πάνω στο όριο του θεωρητικού ΠΙΚ και με πράσινο τα σημεία δειγματοληψίας πάνω στο όριο του βοθρίου.....	55
Εικόνα 42: Σφάλμα θέσης (εκκεντρότητα) βοθρίου PDMS- πρότυπου ΠΙΚ πάνω σε γυαλί στην περίπτωση που η συναρμολόγηση γίνει χωρίς και με τη χρήση της ιδιοσυσκευής που αναπτύχθηκε στην διπλωματική. Τα αποτελέσματα παρουσιάζονται σαν μέση τιμή \pm σφάλμα της μέσης τιμής για n=24 βοθρία (8 βοθρία ανά συσκευή, 3 συσκευές ανά πειραματική ομάδα). ***: P<0.5%.....	56
Εικόνα 43: Δομικό διάγραμμα για τη φάση του απολύτως υγρού εναιωρήματος	65

Εικόνα 44: Δομικό διάγραμμα για τη φάση της αλλαγής φάσης του εναιωρήματος.....	65
Εικόνα 45: Block “parameters calculation” του μοντέλου αλλαγής φάσης.....	66
Εικόνα 46: Δομικό διάγραμμα για τη φάση του απολύτως στερεού εναιωρήματος.....	66
Εικόνα 47: Συναρμολογημένο καλούπι χύτευσης PDMS.....	73

Πίνακας Πινάκων

Πίνακας 1: Λειτουργικές απαιτήσεις (functional requirements) της προς σχεδιασμό ιδιοσυσκευής με βάση τους στόχους που τέθηκαν και περιορισμοί για την ικανοποίηση των απαιτήσεων αυτών	21
Πίνακας 2: Διαστάσεις γυαλιών μικροσκοπίας (όλες οι μετρήσεις είναι σε mm)	33
Πίνακας 3: Επίδραση του πάχους της βάσης των γυαλιών στο χρόνο πλήρους στερεοποίησης του εναιωρήματος	45
Πίνακας 4: Γωνιακή μετατόπισης πύρου για μοναδιαίο φορτίο και 2 περιπτώσεις παχών της βάσης.....	49
Πίνακας 5: Σφάλμα θέσης (εκκεντρότητα) για κάθε ζεύγος θεωρητικού ΠΙΚ – βοθρίου και μέση τιμή και τυπική απόκλιση δειγμάτων control και δειγμάτων προς μελέτη (όλες οι τιμές είναι σε μm)	56
Πίνακας 6: Φυσικά χαρακτηριστικά και διαστάσεις των αντικειμένων του συστήματος.....	61

1. Εισαγωγικές έννοιες

Σκοπός της παρούσας εργασίας είναι ο σχεδιασμός και η αξιολόγηση μιας ιδιοσυσκευής που θα επιτρέψει την κατασκευή Πορωδών Ικτριωμάτων Κολλαγόνου (ΠΙΚ) πάνω σε οπτικά γυαλιά μικροσκοπίας με μεγάλη ακρίβεια και επαναληψιμότητα. Η εργασία αυτή βασίστηκε σε προηγούμενες εργασίες που έγιναν στο Εργαστήριο Εμβιομηχανικής και Συστημικής Βιολογίας (Σχολή Μηχανολόγων Μηχανικών, ΕΜΠ) και σε συνεργασία με το Ίδρυμα Τεχνολογίας και Έρευνας (ΙΤΕ), στις οποίες αναπτύχθηκαν διαδικασίες και πρωτόκολλα κατασκευής των ΠΙΚ. Οι εργασίες αυτές έλυσαν πολλά τεχνικά προβλήματα, έδειξαν όμως την ανάγκη βελτίωσης της διαδικασίας κατασκευής με απώτερο σκοπό την βελτίωση της επαναληψιμότητας και της ακρίβειας των παραγόμενων ΠΙΚ, καθώς και την ανάγκη αυτοματοποίησης διάφορων σταδίων της διαδικασίας κατασκευής των ΠΙΚ, ώστε να χρησιμοποιηθούν μελλοντικά σε εφαρμογές της βιοτεχνολογίας και να είναι συμβατά με τις σύγχρονες μεθόδους ανάλυσης (πρωτεομική, μικροσκοπία).

Ακολουθεί μια σύντομη αναφορά σε έννοιες από τη βιολογία, ώστε να φωτιστεί η χρησιμότητα της έρευνας που βασίζεται στα ΠΙΚ.

1.1. Τρισδιάστατες κυτταροκαλλιέργειες

Τα πορώδη ικτριώματα βιοϋλικών χρησιμοποιούνται σε εφαρμογές της αναγεννητικής ιατρικής (*in vivo*) ως βοηθητικό μέσο για την επούλωση δερματικών τραυμάτων και εγκαυμάτων (Yannas and Burke, 1980; Yannas *et al.*, 1982), αλλά και *in vitro* για την ανάπτυξη τεχνητού ιστού (Holy, Shoichet and Davies, 2000; Cooper *et al.*, 2005). Πλέον όμως γίνεται όλο και περισσότερη *in vitro* έρευνα πάνω στα ικτριώματα βιοϋλικών, προκειμένου να μελετηθούν και να βελτιωθούν, γιατί αποτελούν μία από τις μεθόδους για τρισδιάστατες (3D) *κυτταροκαλλιέργειες*, οι οποίες μπορούν να προσομοιώσουν καλύτερα την *in vivo* λειτουργία των κυττάρων σε σχέση με τις κλασσικές δισδιάστατες (2D) καλλιέργειες πάνω σε πλαστικές επιφάνειες.

Τα κύτταρα που χρησιμοποιούνται σε μια κυτταροκαλλιέργεια έχουν συνήθως την ανάγκη ενός στερεού υποβάθρου -όπως και πραγματικά συμβαίνει *in vivo*. Οι παραδοσιακές 2D κυτταροκαλλιέργειες πραγματοποιούνται σε πλαστικές φλάσκες και πλάκες πολλών βοθρίων (συνήθως από πολυστενίου ή πολυπροπυλένιο), των οποίων ο πάτος παρέχει στα κύτταρα την αναγκαία στήριξη, οπότε τα κύτταρα καταλαμβάνουν αυτό το επίπεδο και αποτελούν μία «*μονοστρωματική καλλιέργεια*». Αντίθετα, τα κύτταρα μέσα σε έναν οργανισμό ζουν και αναπτύσσονται σε έναν τρισδιάστατο χώρο, αλληλεπιδρούν με άλλα κύτταρα, καθώς και με την *εξωκυττάρια μήτρα* τους. Η εξωκυττάρια μήτρα (*extracellular matrix*) είναι το στερεό μη διαλυτό μέρος των ιστών, αποτελείται από διάφορες σημαντικές πρωτεΐνες, επιτελεί διαφορετικές λειτουργίες και προσδιορίζει σημαντικά τις φυσικές και χημικές ιδιότητες του συγκεκριμένου ιστού. Παραδείγματα πρωτεϊνών της εξωκυττάριας μήτρας:

- *Κολλαγόνο*: Είναι η βασική δομική πρωτεΐνη και η πιο διαδεδομένη της εξωκυττάριας μήτρας όλων των ειδών ιστών, ωστόσο συναντάται σε αυξημένες ποσότητες στους ιστούς του δέρματος, των τενόντων και των συνδέσμων. Έχει τη μορφή ινών.
- *Ελαστίνη*: Έχει επίσης τη μορφή ινών και παρέχει ελαστικότητα (αντίσταση σε εφελκυσμό) στους ιστούς.
- *Χονδροϊτίνη* και *αγκρεκάνη*: Συναντώνται κυρίως στην εξωκυττάρια μήτρα των χόνδρων και παρέχουν αντίσταση σε θλίψη.
- *Γαλουρονικό οξύ*: Συναντάται κυρίως σε συνδετικούς, επιθηλιακούς και νευρικούς ιστούς και συμβάλλει στον πολλαπλασιασμό των κυττάρων και στην κυτταρική μετακίνηση.

- *Φιμπρονεκτίνη* και *βιτρονεκτίνη*: Είναι πρωτεΐνες πρόσδεσης, δηλαδή πρωτεΐνες που προσδένονται τόσο σε άλλα μέρη της εξωκυττάριας μήτρας όσο και σε συγκεκριμένους υποδοχείς στην εξωτερική μεμβράνη των κυττάρων.

(Alberts, 2014)

Τα πορώδη ικρίωματα βιοϋλικών αποτελούν μία από τις κατηγορίες τρισδιάστατων κυτταροκαλλιιεργειών. Παρακάτω παρουσιάζεται μια σύντομη αναφορά σε όλες τις κατηγορίες τρισδιάστατων κυτταροκαλλιιεργειών που έχουν αναπτυχθεί έως σήμερα (3D Biomatrix™, no date; BioTek®, no date; Edmondson *et al.*, 2014),

- *Υδρογέλες (Hydrogels)*: Πρόκειται για ημίρευστα υλικά με μικρή ακαμψία. Αποτελούνται από πρωτεΐνες και βιοπολυμερή που συναντώνται στην εξωκυττάρια μήτρα των κυττάρων των ιστών (όπως ζελατίνη, κολλαγόνο και λαμινίνη). Μέσα τους τοποθετούνται τα κύτταρα προς καλλιέργεια. Αποτελούν μια συνήθη επιλογή προσομοίωσης της εξωκυττάριας μήτρας (3D Biomatrix™, no date; Justice, Badr and Felder, 2009).
- *Σφαιροειδή (Hanging drop spheroids)*: Πρόκειται για σταγόνες που βρίσκονται σε κατάσταση εκκρεμότητας από ειδικά σχεδιασμένες συσκευές με οπές και περιέχουν μέσα τους τα κύτταρα. Λόγω βαρύτητας, τα κύτταρα αυτοοργανώνονται μέσα στη σταγόνα, σχηματίζουν συσσωμάτωμα κυττάρων όπου τα κύτταρα συνθέτουν τη δική τους εξωκυττάρια μήτρα. Αποτελούν δημοφιλές εργαλείο μελέτης καρκινικών κυττάρων, βλαστοκυττάρων και κυτταροτοξικότητας (Burdett *et al.*, 2010; Tung *et al.*, 2011; Hsiao *et al.*, 2012).
- *Organ-on-a-chip*: Πρόκειται για ειδικά σχεδιασμένες μικροσυσκευές που κατασκευάζονται συνήθως με τεχνικές μικροφλουιδικής, παρόμοιες με αυτές που χρησιμοποιούνται στα ηλεκτρονικά μικροκυκλώματα (όπως λιθογραφία). Μέσα τους περιέχουν υδρογέλες ή σφαιροειδή όπου καλλιιεργούνται κύτταρα ενός συγκεκριμένου οργάνου (Baker, 2011; Huh, Hamilton and Ingber, 2011).
- *Organoids*: Αποτελούν μια απλουστευμένη προσομοίωση *in vitro* της διαδικασίας ανάπτυξης οργάνων κατά την εμβρυογένεση. Πρωτογενή ή βλαστοκύτταρα καλλιιεργούνται μέσα σε θρεπτικό (και ίσως σε συνδυασμό με βιοϋλικά ή γέλες) και αυτοοργανώνονται σε τρισδιάστατες δομές: επιζούν με τις ατομικές τους διαφοροποιήσεις, αλλά και οργανώνονται με βάση τους διαφορετικούς φαινότυπους των κυττάρων του οργάνου. Χρησιμοποιούνται για τη μελέτη βιολογικών διαδικασιών με έμφαση στην ανάπτυξη (Fatehullah, Tan and Barker, 2016).
- *Ικρίωματα*: Πρόκειται για αδιάλυτα πορώδη βιοϋλικά με ποικιλία στα χαρακτηριστικά του πορώδους και στις μηχανικές τους ιδιότητες. Το επιθυμητό μέγεθος των πόρων εξαρτάται από το μέγεθος των κυττάρων προς καλλιέργεια (Lee, Cuddihy and Kotov, 2008; Ng *et al.*, 2012). Κατασκευάζονται με πολλές μεθόδους:
 - ο *Λυοφιλοποίηση (Freeze Drying)*: Το βιοϋλικό βρίσκεται αρχικά σε κατάσταση εναιωρήματος. Στη συνέχεια πραγματοποιείται ένας θερμικός κύκλος ώστε το νερό πρώτα να κρυσταλλωθεί και μετά να εξαχνωθεί, αφήνοντας πόρους στις θέσεις των κρυστάλλων πάγου μέσα στο (στερεό τελικό) βιοϋλικό (3D Biomatrix™, no date; Geutjes *et al.*, 2006).
 - ο *Διήθηση άλατος (Salt Leaching)*: Το βιοπολυμερές εγχύεται μέσα σε καλούπι που περιέχει κρυστάλλους άλατος και στη συνέχεια προστίθεται διαλύτης για την απομάκρυνση του άλατος, δημιουργώντας το πορώδες (Sung *et al.*, 2004).
 - ο *Κρυογέλες (Cryogels)*: Πρόκειται για γέλες που ψύχονται σε θερμοκρασίες -12 °C, μετά τήκονται σε θερμοκρασία δωματίου αφήνοντας τελικά ένα πορώδες υλικό. Συνήθως

τοποθετούνται σε κυλινδρικό καλούπι και μετά τη δημιουργία του, το πορώδες υλικό τεμαχίζεται στο επιθυμητό πάχος και γεωμετρία (Jurga *et al.*, 2011).

- *Σωματίδια βιοανθρακικού αμμωνίου*: Το βιοπολυμερές αναμειγνύεται με χλωροφόρμιο και σωματίδια βιοανθρακικού αμμωνίου. Το μίγμα χυτεύεται σε καλούπια, το χλωροφόρμιο εξατμίζεται, το μίγμα θερμαίνεται για αρκετές ώρες ώστε τα σωματίδια βιοανθρακικού αμμωνίου να διασπαστούν σε αμμωνία, διοξείδιο του άνθρακα και νερό, που απομακρύνονται εύκολα. Έτσι δημιουργούνται τελικά οι πόροι στο υλικό (Cheng, Lai and Kisaalita, 2008).
- *Τρισδιάστατη εκτύπωση (3D printing)*: Το υλικό κατασκευάζεται σε στρώσεις. Σε κάθε στρώση τοποθετείται αρχικά σκόνη βιοπολυμερούς και στη συνέχεια εγχύεται συνδετικό διάλυμα στις επιθυμητές περιοχές με σκοπό τη δημιουργία του πορώδους. Η περισσευούμενη σκόνη και το περισσευούμενο διάλυμα απομακρύνονται πριν από κάθε επόμενη στρώση (Do *et al.*, 2015).
- *Ειδικές μέθοδοι για nano-scaffolds* (Ng *et al.*, 2012):
 - *Electrospinning*: Φορτισμένες ίνες (που σχηματίζονται σε μορφή δικτύου) του εναιωρήματος βιοπολυμερούς έλκονται με ηλεκτρικές δυνάμεις και αφήνουν πίσω τους το επιθυμητό πορώδες.
 - *Διαχωρισμός φάσεων*: Στο εναιώρημα βιοπολυμερούς-διαλύτη πραγματοποιούνται θερμοκρασιακές εναλλαγές που έχουν ως αποτέλεσμα το διαχωρισμό περιοχών υψηλής και χαμηλής συγκέντρωσης πολυμερούς. Στη συνέχεια ο διαλύτης αφαιρείται και μένει τελικά το πορώδες.
 - *Λιθογραφία*: όπως και στη συμβατική λιθογραφία, το βιοϋλικό υπόκειται σε επιφανειακή κατεργασία, ώστε να «τυπωθούν» γεωμετρικά μοτίβα.

Ανεξάρτητα από τη μέθοδο κατασκευής τους τα πορώδη ικρίωματα θα πρέπει να έχουν κάποια χαρακτηριστικά:

- ✓ Το μέγεθος των πόρων να επιτρέπει την μετακίνηση των κυττάρων και του θρεπτικού μέσα τους.
- ✓ Να είναι ανθεκτικά έναντι αποικοδόμησης από τα ένζυμα που εκλύουν τα κύτταρα για ικανό χρονικό διάστημα.
- ✓ Να είναι βιοσυμβατά, μη-κυτταροτοξικά και -ιδανικά- να αποτελούνται από συστατικά που συναντώνται στο *in vivo* περιβάλλον των κυττάρων.

1.2. Πορώδη ικρίωματα κολλαγόνου

Επειδή το κολλαγόνο είναι η κύρια πρωτεΐνη της εξωκυττάριας μήτρας, *in vitro* μοντέλα που βασίζονται στα ικρίωματα κολλαγόνου προσομοιώνουν πολύ καλά το εξωκυττάριο περιβάλλον που συναντούν πολλά είδη κυττάρων *in vivo*. Στα ικρίωματα κολλαγόνου χρησιμοποιείται κυρίως κολλαγόνο τύπου I, το κύριο συστατικό πολλών ιστών σε πολλά όργανα. Η αρχική, αλλά και πλέον, πιο συχνή εφαρμογή τους είναι η δημιουργία του «τεχνητού δέρματος» ενός είδους εμφυτεύματος που χρησιμοποιείται ευρέως σε κλινικό επίπεδο στην αναγέννηση δέρματος και περιφερειακών νεύρων (Yannas and Burke, 1980), (Yannas *et al.*, 2010).

Το εργαστήριο Εμβιομηχανικής και Συστημικής Βιολογίας της Σχολής Μηχανολόγων Μηχανικών του ΕΜΠ ανέπτυξε τεχνολογία και τεχνολογία για την καλλιέργεια κυττάρων σε πορώδη ικρίωματα κολλαγόνου I:

- ✓ Η Μαρίνα Ιωάννου στη διπλωματική της εργασία βελτιστοποίησε πρωτόκολλα καλλιέργειας ινοβλαστών σε ικρίωματα από κολλαγόνο πάχους 2-3 mm και μέσου μεγέθους πόρων $\approx 95 \mu\text{m}$ (Ιωάννου, 2015).

- ✓ Η Ιωάννα Πρέζα στη διπλωματική της εργασία σχεδίασε και κατασκεύασε μια συσκευή για αυτοματοποιημένη καλλιέργεια κυττάρων μέσα στα πορώδη ικρίσματα κολλαγόνου πάχους 2-3 mm και μέσου μεγέθους πόρου περίπου $\approx 95 \mu\text{m}$ (Πρέζα, 2015). Παρόλο που η διαδικασία καλλιέργειας κυττάρων των πορώδων ικριωμάτων κολλαγόνου έχει αναπτυχθεί σε ικανό επίπεδο, προέκυψαν κάποιες αδυναμίες και δυσκολίες :
 - Η διαδικασία εισαγωγής κυττάρων στα ικρίσματα είναι πολύπλοκη και πραγματοποιείται με χαμηλή επαναληψιμότητα, ειδικά σε σύγκριση με την 2D καλλιέργεια.
 - Τα κύτταρα συγκεντρώνονται κυρίως στην πάνω και κάτω επιφάνεια των ικριωμάτων και δυσκολεύονται να διεισδύσουν βαθύτερα από 100 μm .
 - Η ροή υγρών μέσα από τα ικρίσματα είναι πολύ αργή. Για παράδειγμα η πλήρης εναλλαγή υγρών με φυσική ροή μέσα από ένα ικρίωμα πάχους και διαμέτρου 3 mm διαρκεί περίπου 8 min.
 - Η εξαγωγή δεδομένων από τις καλλιέργειες, είτε με μικροσκοπία είτε με λύση των κυττάρων για εισαγωγή ουσιών-δεικτών, είναι πιο δύσκολη σε σχέση με τις κλασικές μεθόδους καλλιέργειας.

1.3. Συσκευές με συστοιχίες από λεπτά Πορώδη Ικρίσματα Κολλαγόνου (ΠΙΚ)

Στο εργαστήριο Εμβιομηχανικής και Συστημικής Βιολογίας και σε συνεργασία με το Ίδρυμα Τεχνολογίας και Έρευνας (ΙΤΕ), διεξήχθησαν μελέτες που είχαν ως στόχο τον σχεδιασμό και χαρακτηρισμό συσκευών που περιέχουν συστοιχίες από λεπτά ΠΙΚ, πάχους περίπου 100-200 μm , πάχος ικανοποιητικό για να προσδοθεί τρισδιάστατος χαρακτήρας στις καλλιέργειες, αλλά και αρκετά μικρό ώστε να ξεπεραστούν τα προαναφερθέντα προβλήματα των πιο παχίων ικριωμάτων:

- ✓ Η Μαρία Σαρκίρη εκτέλεσε αρχικά τα βήματα παρασκευής συσκευών με συστοιχίες από λεπτά ΠΙΚ (πάχους 100-200 μm και μέσου πορώδους 25 μm), χαρακτήρισε δομικά και μηχανικά τις συσκευές και τα ικρίσματα και τις εφάρμοσε σε καλλιέργεια καρκινικών κυττάρων του δέρματος για τη μελέτη φαρμάκων (Σαρκίρη, 2016).
- ✓ Ο Θεοχάρης Ιορδανίδης βελτίωσε και αυτοματοποίησε πολλά στάδια της διαδικασίας παρασκευής των συσκευών με συστοιχίες από λεπτά ΠΙΚ (πάχους 100-200 μm και μέσου πορώδους 25 μm). Οι συσκευές εφαρμόστηκαν σε συνεργασία με την διδακτορική φοιτήτρια Δανάη Ζαρείφη σε καλλιέργειες ηπατικών κυττάρων για Βιοϊατρική Έρευνα (Ιορδανίδης, 2017).

Στην Εικόνα 1 φαίνεται μία συσκευή με συστοιχία 6 λεπτών ΠΙΚ, όπως προέκυψε από τις εργασίες της Μ. Σαρκίρη και του Θ. Ιορδανίδη.



Εικόνα 1: Συσκευή με συστοιχία 6 λεπτών ΠΙΚ. Φαίνονται τα τρία μέρη της: το γυαλί μικροσκοπίας (σαν βάση), η διαφανής υπερκατασκευή με 6 βοθρία (wells) κολλημένα από πάνω και τα 6 λευκά ΠΙΚ προσκολλημένα πάνω στο γυαλί στον πάτο κάθε βοθρίου.

Επίσης, έχουν σχεδιαστεί (Ιορδανίδης, 2017) δύο προσαρμογείς (adaptors) που μπορούν να φέρουν πάνω τους 4 γυαλιά μικροσκοπίας (επομένως 4 συσκευές συστοιχιών από λεπτά ΠΙΚ), ώστε να τοποθετούνται σε δύο μηχανήματα του εργαστηρίου: ένας τοποθετείται σε ρομποτικό μηχάνημα διαχείρισης υγρών (TECAN EVO 150), που χρησιμοποιείται για την αυτόματη εναπόθεση του βιοϋλικού στις σωστές θέσεις πάνω στο γυαλί και ο άλλος σε μικροσκόπιο φθορισμού (JuliStage) και σε φασματοφωτόμετρο (Varioscan), που χρησιμοποιούνται για την παρακολούθηση των κυττάρων της καλλιέργειας (JuliStage) και μέτρηση διάφορων μεγεθών των πειραμάτων (Varioscan). Οι τελευταίες διαδικασίες φυσικά επιτυγχάνονται, επειδή οι συσκευές συστοιχιών με λεπτά ΠΙΚ κατασκευάζονται πάνω στα διαφανή γυαλιά μικροσκοπίας.

1.3.1. Πλεονεκτήματα των συσκευών με συστοιχίες λεπτών ΠΙΚ

Τα βασικά πλεονεκτήματα των συσκευών με συστοιχίες από λεπτά ΠΙΚ για κυτταρικές μελέτες σε σχέση με την χρήση των κλασικών ικριωμάτων (πάχους 2.5 mm) είναι τα εξής:

- Ομοιόμορφη κατανομή των κυττάρων σε όλο το ικρίωμα (έναντι συγκέντρωσης πάνω και κάτω στα κλασικά ικρίωματα), που συνεπάγεται καλύτερη πειραματική επαναληψιμότητα.
- Γρηγορότερη μεταφορά υγρών και θρεπτικών συστατικών και πρόσβαση σε όλα τα σημεία του.
- Δυνατότητα μελέτης των κυτταροκαλλιιεργειών μέσω μεθόδων μικροσκοπίας και πρωτεομικής που μετράνε μεγάλο αριθμό δειγμάτων (high throughput).
- Δυνατότητα προσομοίωσης καλλιέργειας σε πλάκες βοθρίων (well-plates), που σημαίνει ευκολότερη χρήση από τον ερευνητή.
- Οικονομική κατασκευή, λόγω της μικρής μάζας πρωτεΐνης που απαιτείται για την κατασκευή τους.

1.3.2. Λειτουργικές Προδιαγραφές ΠΙΚ

Οι βασικές λειτουργικές προδιαγραφές που καλύπτουν έως τώρα οι συσκευές με συστοιχίες από λεπτά ΠΙΚ είναι:

- Καταλληλότητα των λεπτών ΠΙΚ για κυτταροκαλλιέργεια
 - Χημική σύσταση: από βιοσυμβατά, μη-κυτταροτοξικά υλικά (κυρίως με βάση το κολλαγόνο τύπου I (collagen type I), αλλά και γλυκοζαμινογλυκάνες (glycosaminoglycan) (GAG))
 - Πάχος: 100-200 μm
 - Πόροι:
 - μέσο μέγεθος: ελεγχόμενο και πάνω από 25 μm (επιθυμητό: 50 μm)
 - ομοιογένεια σε όλο τον όγκο
 - Αντοχή έναντι ενζύμων αποδόμησης που εκκρίνονται από τα κύτταρα: για τουλάχιστον 14 ημέρες
- Συμβατές με διαδικασίες καλλιέργειας κυττάρων σε πλάκες 96 βοθρίων
 - Παροχή θρεπτικού: τουλάχιστον 150 μl
 - Βοθρίο:
 - Στεγανή συναρμολόγηση υπερκατασκευής - γυαλιού
 - Διάμετρος βοθρίου: 6 mm
 - Αποστάσεις μεταξύ βοθρίων: 9 mm
 - Προσαρμογείς με εξωτερικές διαστάσεις ίδιες με της πλάκας 96 βοθρίων: 127 x 86 mm.
- Απεικόνιση και μικροσκοπία
 - Χρήση γυαλιών μικροσκοπίας, άρα δυνατότητα προσέγγισης των ΠΙΚ από αντικειμενικούς φακούς μικροσκοπίας υψηλής μεγέθυνσης
 - Συμβατότητα με μηχανήματα απεικόνισης και μικροσκοπίας.
- Εργονομικά φιλικές προς τους χρήστες (που παρασκευάζουν ή που χρησιμοποιούν τις συστοιχίες λεπτών ΠΙΚ).

1.3.3. Σύνοψη διαδικασίας κατασκευής συσκευών με συστοιχίες από λεπτά ΠΙΚ

Συνοπτικά η διαδικασία παρασκευής των συσκευών με συστοιχίες λεπτών ΠΙΚ περιγράφεται παρακάτω:

- a. Καθαρισμός γυαλιών μικροσκοπίας.
- b. Ενεργοποίηση επιφάνειας γυαλιού μέσω κατεργασίας πλάσματος (*plasma etching*).
- c. Εναπόθεση εναιωρήματος βιοϋλικού πάνω του.
- d. *Λυοφιλοποίηση* (freeze-drying) του εναιωρήματος για τη δημιουργία του επιθυμητού πορώδους ικρίωματος.
- e. Χύτευση και πολυμερισμός υπερκατασκευής από PDMS.
- f. Ενεργοποίηση επιφάνειας υπερκατασκευής PDMS μέσω κατεργασίας *plasma etching*.
- g. Συναρμολόγηση της υπερκατασκευής PDMS με το γυαλί που φέρει τα ΠΙΚ.
- h. Δημιουργία *σταυροδεσμών* (crosslinking) μεταξύ των μορίων του κολλαγόνου στα ΠΙΚ.

Βιοϋλικά

Τα ικρίωματα αποτελούνται από βιοπολυμερή που βρίσκονται στην εξωκυττάρια μήτρα των ιστών. Τα ικρίωματα που κατασκευάζονται στην παρούσα εργασία αποτελούνται κυρίως από μικροϊνώδες κολλαγόνο τύπου I (collagen type I) (CI) ή εναλλακτικά από ζελατίνη (gelatin: μόρια κολλαγόνου αποδιατεταγμένα μέσω

θερμικής κατεργασίας). Επιπλέον, κατασκευάστηκαν ικρίωματα που αποτελούνται από μίγματα κολλαγόνου με διάφορα βιοπολυμερή:

- ο κολλαγόνο - γλυκοζαμινογλυκάνες (glycosaminoglycan) (CG)
- ο κολλαγόνο - κολλαγόνο τύπου IV (collagen type IV) (CI-CIV)
- ο κολλαγόνο - matrigel (C-Matr)
- ο κολλαγόνο - υαλουρονικό οξύ (hyaluronic acid) (C-HA)
- ο κολλαγόνο - ηπαρίνη (heparin) (C-Hep)

Οι πρώτες ύλες βρίσκονται αρχικά σε κατάσταση σκόνης (powder) από την οποία δημιουργούνται διαλύματα ή εναιωρήματα συνήθως σε όξινο pH (50 mM οξικό οξύ, pH=3.3). Η πρώτη ύλη κολλαγόνου είναι αρχικά σε μορφή ινιδίων, από τα οποία προκύπτει το βασικό εναιώρημα κολλαγόνου (πυκνότητας περίπου 0.5 mg/ml) μέσω ομογενοποίησης. Τα παραπάνω εναιωρήματα μιγμάτων βιοπολυμερών από τα οποία θα προκύψουν τα ικρίωματα μέσω λυοφιλοποίησης προκύπτουν αναμιγνύοντας τα διαλύματα των βιοπολυμερών με το εναιώρημα κολλαγόνου και ομογενοποιώντας το αποτέλεσμα. Όλα τα εναιωρήματα διατηρούνται σε ψυγείο στους 4 °C.

Γυαλιά μικροσκοπίας (cover glasses)

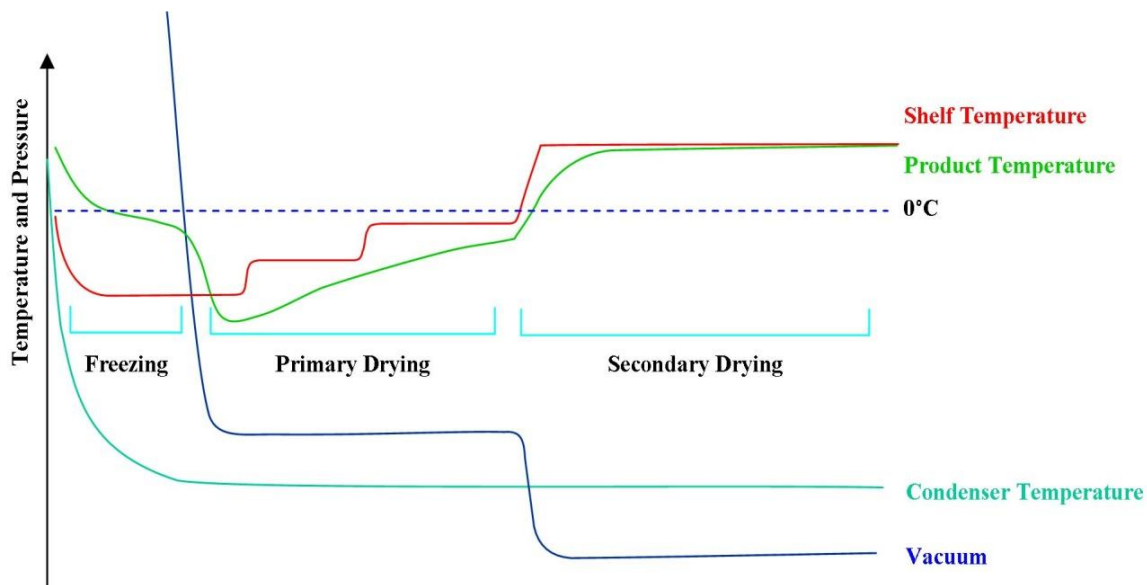
Με σκοπό την δυνατότητα απεικόνισης και μικροσκοπίας, τα βιοϋλικά εναποτίθενται πάνω σε γυαλιά μικροσκοπίας (cover glasses). Αρχικά τα γυαλιά καθαρίζονται με υπερήχους, ευρισκόμενα μέσα σε νερό τύπου Ι, καθώς και με αιθανόλη. Στη συνέχεια η επιφάνειά τους υπόκειται σε κατεργασία plasma etching, με σκοπό την αύξηση της υδροφοβικότητάς της. Έτσι, χρησιμοποιώντας όγκο περίπου 6 μl εναιωρήματος βιοϋλικού, πάνω στο γυαλί δημιουργείται μια κυκλική σταγόνα διαμέτρου περίπου 6 mm και πάχους περίπου 150 μm. Σκοπός είναι να εναποθεθούν πολλές σταγόνες πάνω σε συγκεκριμένες θέσεις στα γυαλιά μικροσκοπίας, ώστε να προσομοιωθούν οι θεωρητικές θέσεις των βοθρίων της πλάκας 96 βοθρίων.

Ρομποτικό μηχάνημα TECAN EVO 150

Χρησιμοποιείται για την αυτοματοποίηση της εναπόθεσης εναιωρήματος βιοϋλικού πάνω στο γυαλί. Προγραμματίζεται μέσω GUI ώστε να εκτελεί κινήσεις στον τρισδιάστατο χώρο, καθώς επίσης και να αναρροφά και να εναποθέτει υγρά από τα/στα επιθυμητά σημεία. Πάνω στην τράπεζα εργασίας του υπάρχει τοποθετημένη μία υποδοχή για τυποποιημένες πλάκες 96 βοθρίων, τις οποίες μπορεί να οριοθετεί με βάση τις εξωτερικές διαστάσεις τους (127 x 86 mm) και μπορεί να εναποθέτει την επιθυμητή ποσότητα υγρού στις θέσεις των βοθρίων της (αποστάσεις μεταξύ τους 9 mm). Για το σκοπό αυτό σχεδιάστηκε (Ιορδανίδης, 2017) ένα πρωτότυπο συσκευής-προσαρμογέα (adapter) με εξωτερικές διαστάσεις 127 x 86 mm και υποδοχές για 4 γυαλιά, ώστε οι επιθυμητές θέσεις των ικριωμάτων πάνω στα γυαλιά να συμπίπτουν με τις θεωρητικές θέσεις κάποιων βοθρίων μιας 96άρας πλάκας.

Λυοφιλοποίηση (Freeze-Drying)

Αμέσως μετά την εναπόθεση των εναιωρημάτων βιοϋλικών στα γυαλιά, αυτά τοποθετούνται στον λυοφιλοποιητή, ένα μηχάνημα που εφαρμόζει χρονικά προφίλ (πρωτόκολλα) θερμοκρασίας και πίεσης μέσω ελέγχου κλειστού βρόχου. Σκοπός είναι να επιτευχθούν αρχικά η κρυστάλλωση του νερού που βρίσκεται στο εναιώρημα (freezing) και στη συνέχεια η εξάχνωση των κρυστάλλων (drying) ώστε να απομείνει τελικά μόνο το ικρίωμα του βιοϋλικού (πορώδης μορφή). Διάφορα πρωτόκολλα δοκιμάζονται για κάθε διαφορετικό βιοϋλικό ή μίγματα αυτών, με σκοπό τη βελτιστοποίησή τους για τη δημιουργία του επιθυμητού πορώδους (50 μm). Στην Εικόνα 2 φαίνεται ένα ποιοτικό πρωτόκολλο θερμοκρασίας και πίεσης κατά τη λυοφιλοποίηση.



Εικόνα 2: Τυπικά χρονικά προφίλ -κατά τη λυοφιλοποίηση- της θερμοκρασίας ραφίου και συμπυκνωτή του λυοφιλοποιητή, της θερμοκρασίας του προϊόντος της λυοφιλοποίησης και της πίεσης (κενού) στο θάλαμο του λυοφιλοποιητή

Υπερκατασκευή PDMS

Για τη δημιουργία των βοθρίων επιθυμητού βάθους και θέσεων (στα πλαίσια της προσομοίωσης της πλάκας 96 βοθρίων) κατασκευάζεται με χύτευση μία υπερκατασκευή από PDMS (Polydimethylsiloxane) με οπές στις θέσεις των βοθρίων, η οποία κολλάται στεγανά στην επιφάνεια του γυαλιού ώστε οι θέσεις των βοθρίων και των ικριωμάτων να συμπίπτουν. Το μονομερές PDMS είναι αρχικά σε υγρή μορφή υψηλού ιξώδους και στην συνέχεια πολυμερίζεται με την προσθήκη θεραπευτικού παράγοντα (curing agent) και στερεοποιείται με αύξηση της θερμοκρασίας. Το στερεοποιημένο ελαστομερές PDMS υλικό είναι αρκετά ελαστικό και διαφανές. Έχουν σχεδιαστεί ως τώρα διάφορα καλούπια (Σαρκίρη, 2016; Ιορδανίδης, 2017) για χύτευση του PDMS, ώστε να επιτευχθεί ο σχηματισμός βοθρίων συγκεκριμένου βάθους (5 mm), να εξασφαλιστεί ο ομοιόμορφος πολυμερισμός όλων των υπερκατασκευών σε κάθε καλούπι, αλλά και να απομακρυνθεί ο εναπομείνας διαλύτης.

Συναρμολόγηση γυαλιού – υπερκατασκευής PDMS

Η συναρμολόγηση του γυαλιού με την υπερκατασκευή από PDMS γίνεται μετά από ενεργοποίηση μέσω κατεργασίας plasma etching της μίας επιφάνειας του PDMS και στη συνέχεια άσκηση μόνιμου, κάθετου στη διεπιφάνεια, φορτίου. Έτσι αναπτύσσονται ισχυρές δυνάμεις στη διεπιφάνεια και εξασφαλίζεται η στεγανότητα μεταξύ βοθρίων και μεταξύ βοθρίων-περιβάλλοντος.

Δημιουργία σταυροδεσμών (crosslinking)

Υλοποιείται μια μέθοδος ενίσχυσης της αντοχής του βιοϋλικού μέσω δημιουργίας σταυροδεσμών μεταξύ των πολυμερικών αλυσίδων του κολλαγόνου. Η μέθοδος που επιλέχθηκε ονομάζεται *Dehydrothermal Treatment (DHT)*, υλοποιείται με τη θέρμανση των βιοϋλικών υπό κενό και δημιουργεί ομοιοπολικούς δεσμούς μεταξύ χημικών ομάδων (π.χ. $-NH_2$, $-COOH$) που υπάρχουν στα βιοπολυμερή του βιοϋλικού. Η μέθοδος DHT υλοποιείται διατηρώντας το βιοϋλικό ξηρό και γι' αυτό προτιμήθηκε έναντι εναλλακτικών χημικών μεθόδων, οι οποίες, αντίθετα, χρησιμοποιούν χημικά (cross-linkers) μέσα σε κάποιο διάλυμα, συνήθως υδατικό.

Plasma Etching

Όπως έχει αναφερθεί, η ενεργοποίηση μέσω plasma χρησιμοποιείται για δύο λειτουργίες:

- για την αύξηση της υδροφοβικότητας στην επιφάνεια των γυαλιών, ώστε οι σταγόνες συγκεκριμένου όγκου βιοϋλικού που σχηματίζονται πάνω τους να έχουν επαναλήψιμα ίδιο πάχος και διάμετρο,
- για την ενεργοποίηση της επιφάνειας της υπερκατασκευής PDMS ώστε να κολληθεί στην επιφάνεια του γυαλιού.

Στο εργαστήριο Εμβιομηχανικής και Συστημικής Βιολογίας χρησιμοποιείται plasma ατμοσφαιρικού αέρα. Η ποιότητα της κατεργασίας εξαρτάται από την ισχύ του plasma, το χρόνο κατεργασίας και την πίεση στο θάλαμο του μηχανήματος. Το πρωτόκολλο που χρησιμοποιείται βελτιστοποιήθηκε μέσω δοκιμών (Ιορδανίδης, 2017).

1.3.4. Εφαρμογές των λεπτών ΠΙΚ σε κυτταρικές μελέτες

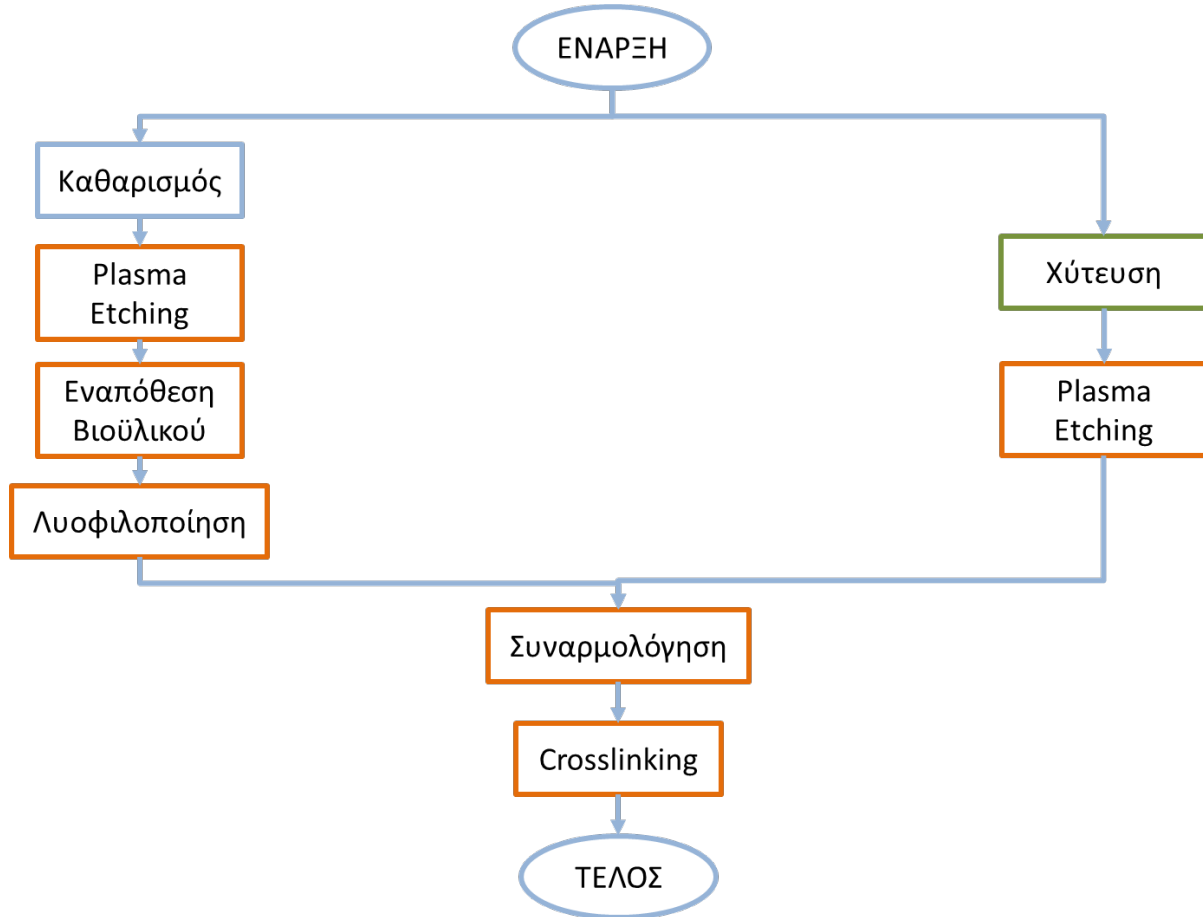
Οι εφαρμογές των ΠΙΚ καλύπτουν ένα ευρύ φάσμα πεδίων συμπεριλαμβανομένων της βιολογίας συστημάτων, της ανακάλυψης φαρμάκων και της νευροβιολογίας. Η Βιολογία Συστημάτων είναι μια επιστήμη που συνδυάζει γνώσεις από πολλά επιμέρους επιστημονικά πεδία (όπως μαθηματικά, φυσική, βιολογία, πληροφορική) για να αντιμετωπίσει σύνθετα βιολογικά προβλήματα μέσω αλληλεπιδράσεων στοιχείων (πρωτεΐνες, υποδοχείς, φάρμακα) ως μέρος ενός ευρύτερου βιολογικού συστήματος. Η λεπτομερής μελέτη τέτοιων πολύπλοκων συστημάτων απαιτεί νέες μεθόδους που θα παρέχουν μεγάλο όγκο δεδομένων (high throughput). Ο μεγάλος όγκος δεδομένων και η επεξεργασία τους απαιτούν προηγμένα μαθηματικά στατιστικά εργαλεία από τα πεδία των μαθηματικών και της πληροφορικής. Από την άλλη τα βιολογικά πειράματα και οι κλινικές μελέτες είναι ένα μέρος του συστήματος που απαιτεί πολύ κόπο και χρόνο και το οποίο απαιτείται να βελτιωθεί και να αυξηθούν οι δυνατότητές του. Νέες τεχνολογίες και ερευνητικές τεχνικές έχουν αρχίσει να εμφανίζονται, μία από τις οποίες είναι και οι τρισδιάστατες καλλιέργειες, σημαντική κατηγορία των οποίων αποτελούν τα ικριώματα βιοϋλικών, όπως έχει αναφερθεί.

Μελέτη φαρμάκων

Μία από τις πιο ευρέως χρησιμοποιούμενες εφαρμογές *in vitro* συστημάτων καλλιέργειας είναι η μελέτη φαρμάκων. Η πορεία που ακολουθείται για ένα νέο-ανακαλυφθέν φάρμακο μέχρι να βγει στην αγορά είναι μεγάλη και ακριβή. Ξεκινά από το ερευνητικό επίπεδο, όπου αν μια ουσία προταθεί ως υποσχόμενη και εγκριθεί σε *in vitro* κυτταρικά μοντέλα, περνάει σε δοκιμές σε ζώα, στην συνέχεια (αν εγκριθεί η αποτελεσματικότητα και η ασφάλεια της) προχωράει σε κλινικές δοκιμές σε ανθρώπους και τελικά (αν εγκριθεί) βγαίνει στην αγορά. Οι *in vitro* καλλιέργειες στο εργαστήριο χρησιμοποιούνται στα πρώτα στάδια της αξιολόγησης. Αυτή τη στιγμή τα υπάρχοντα *in vitro* μοντέλα ακόμα δεν μπορούν να ελέγξουν διάφορες πτυχές, όπως π.χ. η τοξικότητα, όπου ο μόνος τρόπος να ελεγχθούν είναι με δοκιμές σε ζώα και τέλος σε ανθρώπους (κλινικές δοκιμές). Παρόλα αυτά, υπάρχουν εκτενείς προσπάθειες για την ανάπτυξη καλύτερων *in vitro* μοντέλων κυτταροκαλλιιεργειών (όπως οι τρισδιάστατες καλλιέργειες) ώστε βελτιώνοντας τον τρόπο που προσομοιώνουν τις συνθήκες που επικρατούν στους ιστούς να βελτιωθεί η ικανότητα τους να προβλέψουν τις επιδράσεις των φαρμάκων (αποτελεσματικότητα, τοξικότητα) ώστε να μειωθούν οι πιθανότητες απόρριψης κατά τις δοκιμές σε ζώα ή ανθρώπους. Με αυτόν τον τρόπο, οι προηγμένες τεχνικές κυτταροκαλλιέργειας υπόσχονται να μειώσουν τον κίνδυνο βλάβης πάνω σε ζώα και ανθρώπους, τον χρόνο και το κόστος ανάπτυξης νέων φαρμάκων, και την χρήση πειραματόζων.

1.4 Στόχοι της διπλωματικής εργασίας

Η παρούσα διπλωματική εργασία στοχεύει να βελτιώσει την ποιότητα των παραγόμενων συστοιχιών με λεπτά ΠΙΚ, ως προς την ακρίβεια και την επαναληψιμότητα. Στο δομικό διάγραμμα της Εικόνα 3 φαίνεται περιληπτικά η διαδικασία που περιγράφηκε νωρίτερα και τα σημεία αυτής στα οποία επεμβαίνει η προς σχεδιασμό ιδιοσυσκευή.



Εικόνα 3: Δομικό διάγραμμα διαδικασίας κατασκευής συσκευών με συστοιχίες λεπτών ΠΙΚ. Με μπλε περίγραμμα είναι οι διαδικασίες που δεν επηρεάζονται από την παρούσα εργασία. Με πορτοκαλί περίγραμμα είναι οι διαδικασίες, στις οποίες επεμβαίνει η προς σχεδιασμό ιδιοσυσκευή. Με πράσινο εκείνες, στις οποίες επεμβαίνει το προς σχεδιασμό καλούπι.

Συγκεκριμένα, οι βασικοί στόχοι είναι:

- Ακρίβεια και επαναληψιμότητα της θέσης των ικρωμάτων πάνω στα γυαλιά.
- Ακρίβεια της θέσης των βοθρίων της υπερκατασκευής από PDMS: να συμπίπτουν με τις θέσεις των ικρωμάτων πάνω στο γυαλί.
- Ακρίβεια και επαναληψιμότητα στην ποιότητα της σύνδεσης γυαλιού-PDMS.

2. Σχεδιασμός της Ιδιοσυσκευής

2.1. Λειτουργικές απαιτήσεις και περιορισμοί

Οι λειτουργικές απαιτήσεις (*functional requirements*) της προς σχεδιασμό ιδιοσυσκευής απαντούν στην ερώτηση «ποιες είναι οι λειτουργίες που πρέπει να εκτελεί η ιδιοσυσκευή και σε τι βαθμό;». Η ιδιοσυσκευή πρέπει να υλοποιεί ή να υποστηρίζει διάφορα στάδια της διαδικασίας παρασκευής συσκευών που περιέχουν συστοιχίες ΠΙΚ:

	Λειτουργικές Απαιτήσεις	Περιορισμοί
1	Έδραση των γυαλιών με ΠΙΚ κατά τα διάφορα στάδια της κατασκευής.	Μετακίνηση από το ερευνητή. Με ταχύτητα, ασφάλεια και επαναληψιμότητα.
2	Δυνατότητα τοποθέτησης της ιδιοσυσκευής στο θάλαμο του plasma etcher χωρίς να επιδρά αρνητικά στην παραγωγή plasma.	Διαστάσεις θαλάμου: 140 x 130 x 90 mm.
3	Αυτοματοποιημένη εναπόθεση εναιωρήματος κολλαγόνου σε συγκεκριμένες θέσεις του γυαλιού.	Χρήση του ρομποτικού liquid handler TECAN EVO 150.
4	Τοποθέτηση στο λυοφιλοποιητή και σωστή μεταφορά θερμότητας από το εναιώρημα προς το ράφι κατά την διαδικασία της λυοφιλοποίησης.	1) Διαθέσιμος χώρος προς τοποθέτηση: 90 x 370 x 500 mm. 2) Χρήση συγκεκριμένων πρωτοκόλλων λυοφιλοποίησης που εγγυώνται σωστό πορώδες στο παραγόμενο ικρίωμα.
5	Συναρμολόγηση των γυαλιών (με συστοιχίες ΠΙΚ) με τις υπερκατασκευές PDMS.	Ακρίβεια και επαναληψιμότητα.
6	Άσκηση ομοιόμορφα κατανεμημένης δύναμης στο γυαλί και την υπερκατασκευή PDMS κατά την φάση της συναρμολόγησης.	Ακρίβεια και επαναληψιμότητα.
7	Δυνατότητα τοποθέτησης της ιδιοσυσκευής μέσα στον φούρνο κενού κατά την φάση δημιουργίας σταυροδεσμών.	Διαστάσεις θαλάμου: 240 x 240 x 285 mm.
8	Ακρίβεια στις θέσεις των γυαλιών πάνω στη συσκευή.	Σφάλμα ± 100 μm στους άξονες X, Y.
9	Ακρίβεια στις θέσεις των υπερκατασκευών PDMS σε σχέση με τα γυαλιά.	Σφάλμα ± 100 μm στους άξονες X, Y.

Πίνακας 1: Λειτουργικές απαιτήσεις (*functional requirements*) της προς σχεδιασμό ιδιοσυσκευής με βάση τους στόχους που τέθηκαν και περιορισμοί για την ικανοποίηση των απαιτήσεων αυτών

Με βάση την υπάρχουσα εμπειρία, πάρθηκαν μερικές πρώτες αποφάσεις για την υλοποίηση κάποιων βασικών απαιτήσεων. Από αυτές προέκυψαν μερικές επιπλέον λειτουργικές απαιτήσεις.

Γυαλιά μικροσκοπίας

Επιλέχθηκε η συσκευή να μπορεί να φέρει τέσσερα (4) γυαλιά μικροσκοπίας διαστάσεων 24 x 50 mm.

Οι διαστάσεις γυαλιών μικροσκοπίας είναι τυποποιημένες. Έως τώρα χρησιμοποιούνται γυαλιά διαστάσεων 24 x 50 mm (Ιορδανίδης, 2017) που μπορούν να φέρουν πάνω τους $2 \times 3 = 6$ ή, το πολύ, $2 \times 4 = 8$ ικρίωματα

το καθένα, σε αποστάσεις 9 mm μεταξύ τους. Για κάθε γυαλί χρειάζεται αντίστοιχα μια υπερκατασκευή PDMS με 6 ή 8 βοθρία. Δεν επιλέχθηκαν μεγαλύτερα γυαλιά διότι απαιτούν την κατασκευή μεγαλύτερων κομματιών PDMS, η οποία είναι αρκετά δύσκολη λόγω της αργής απομάκρυνσης του θεραπευτικού παράγοντα (curing agent) κατά τη χύτευση. Ο τελευταίος βοηθάει στον πολυμερισμό του PDMS, αλλά πρέπει να απομακρυνθεί επειδή εμποδίζει την ενεργοποίηση της επιφάνειας του PDMS μέσω πλάσματος, καθώς και για λόγους κυτταροτοξικότητας. Έτσι, η όλη διαδικασία και ο σχεδιασμός έχει στηθεί με τέτοιο τρόπο ώστε οι συσκευές με συστοιχίες από ΠΙΚ να κατασκευάζονται σε μερίδες των τεσσάρων: τοποθετώντας 4 τέτοιες συσκευές με συστοιχίες από ΠΙΚ στη σειρά πάνω σε σωστά σχεδιασμένες βάσεις (Ιορδανίδης, 2017) μπορούν να υλοποιηθούν έως και 32 από τα 96 βοθρία μιας 96άρας πλάκας, αριθμός αρκετά ικανοποιητικός.

Απόφαση υλοποίησης της συσκευής σε δύο μέρη

Αποφασίστηκε ότι η συσκευή θα αποτελείται από δύο κύρια μέρη (βάσεις):

1. μία βάση που θα φέρει τα γυαλιά με τα ικρίσματα
2. μία βάση που θα φέρει τις υπερκατασκευές από PDMS.

Η ανάγκη για δύο βάσεις προκύπτει από το γεγονός ότι τα γυαλιά και οι υπερκατασκευές PDMS απαιτούν αρχικά ανεξάρτητους χειρισμούς αλλά τελικά απαιτείται να συναρμολογηθούν μεταξύ τους. Οι βάσεις επιλέχθηκε να υλοποιηθούν ως πλάκες, ώστε 1) να εδράζονται στους διάφορους θαλάμους που αναφέρθηκαν στις λειτουργικές απαιτήσεις, και 2) να διευκολυνθεί η κατασκευή τους με μεγάλη ακρίβεια μέσω κατεργασίας σε δύο διαστάσεις.

Οδήγηση της μίας βάσης ως προς την άλλη

Κατά την φάση της συναρμολόγησης γυαλιών – υπερκατασκευών PDMS είναι κρίσιμος ο καθορισμός της θέσης και η σχετική οδήγηση της μίας βάσης σε σχέση με την άλλη. Η οδήγηση επιλέχθηκε να γίνει κατά την κατακόρυφη διεύθυνση (άξονας Z) και με φορά προς τα κάτω, ώστε να αξιοποιηθεί η βαρύτητα, απλοποιώντας το σχεδιασμό αφού έτσι δε χρειάζεται να σχεδιαστεί σύστημα μετάδοσης κίνησης.

Μεταφορά θερμότητας μέσα στον λυοφιλοποιητή

Η προδιαγραφή για τη σωστή μεταφορά θερμότητας από το βιοϋλικό προς το ράφι του λυοφιλοποιητή (αφού πρόκειται για ψύξη), προέκυψε ώστε να μπορέσουν να χρησιμοποιηθούν τα πρωτόκολλα λυοφιλοποίησης που εφαρμόζονταν και ως τώρα (Ιορδανίδης, 2017), βελτιστοποιημένα όπως περιγράφονται στο (Harley, 2006) για τη λυοφιλοποίηση ικριωμάτων κολλαγόνου πάχους 3 mm μέσα σε καλούπι (pan) από ανοξείδωτο χάλυβα. Στην παράγραφο 3.5 αναλύονται τα θερμικά χαρακτηριστικά της προς σχεδιασμό ιδιοσυσκευής, και συγκρίνεται η μεταφοράς θερμότητας στην ιδιοσυσκευή με αυτήν που περιγράφεται στην διατριβή του Harley.

2.2. Προδιαγραφές της ιδιοσυσκευής

Με βάση τις λειτουργικές απαιτήσεις και τις πρώτες σχεδιαστικές αποφάσεις προκύπτουν λεπτομερείς προδιαγραφές για την προς σχεδιασμό ιδιοσυσκευή:

- Βάση γυαλιών:
 - Να καθορίζει την θέση 4 γυαλιών διαστάσεων 24 x 50 mm στο οριζόντιο επίπεδο X-Y με σφάλμα $\pm 100 \mu\text{m}$.
 - Να επιτρέπει την σωστή και επαναλήψιμη τοποθέτηση εναιωρημάτων κολλαγόνου πάνω στα 4 γυαλιά μέσω του TECAN EVO 150.
 - Να μπορεί να τοποθετηθεί στον λυοφιλοποιητή και να επιτρέπει σωστή και επαναλήψιμη μεταφορά θερμότητας από το βιοϋλικό προς το ράφι του λυοφιλοποιητή, ομοιόμορφα στα 4 γυαλιά.

- Να μπορεί να τοποθετηθεί στο μηχάνημα plasma etcher και να επιτρέπει τη σωστή και επαναλήψιμη επεξεργασία των γυαλιών με plasma etching, ομοιόμορφα στα 4 γυαλιά.
- Να επιτρέπει την εύκολη τοποθέτηση και αφαίρεση των γυαλιών σε/από αυτή από το χρήστη.
- Βάση των υπερκατασκευών από PDMS:
 - Να καθορίζει την θέση 4 υπερκατασκευών στο οριζόντιο επίπεδο X-Y με σφάλμα ± 100 μm .
 - Να μπορεί να τοποθετηθεί στο μηχάνημα plasma etcher και να επιτρέπει τη σωστή και επαναλήψιμη επεξεργασία των υπερκατασκευών από PDMS με plasma etching, ομοιόμορφα στις 4 υπερκατασκευές.
 - Να επιτρέπει την εύκολη τοποθέτηση και αφαίρεση των υπερκατασκευών σε/από αυτή.
- Και για τις δύο βάσεις:
 - Να συγκρατούν τα φερόμενα αντικείμενα (γυαλιά ή υπερκατασκευές από PDMS) έναντι βαρύτητας (κατά Z), με τρόπο ώστε οι πλευρές τους που πρόκειται να συναρμολογηθούν να βρίσκονται αντικριστά η μία με την άλλη.
 - Να επιτρέπει την ακριβή συναρμολόγηση των γυαλιών (φέροντα τα λυοφιλοποιημένα ΠΙΚ) με τις αντίστοιχες υπερκατασκευές PDMS με τρόπο ακριβή, επαναλήψιμο και ομοιόμορφο στα 4 γυαλιά:
 - Οι δύο επιφάνειες προς συναρμολόγηση των τεσσάρων διατάξεων να έρχονται σε επαφή με μία προσπάθεια, για να μην καταστραφούν οι επιφανειακές ιδιότητες που έχουν προσδοθεί από το plasma etching στα κομμάτια.
 - Να οδηγείται η μία βάση σε σχέση με την άλλη, με τρόπο ώστε οι θέσεις των ικριωμάτων πάνω στα γυαλιά να συμπίπτουν με τις θέσεις των βοθρίων πάνω στις υπερκατασκευές από PDMS.
 - Να μπορούν να απομακρυνθούν εύκολα από τη συσκευή ως ένα συσσωμάτωμα.
 - Η ιδιοσυσκευή να επιτρέπει την δημιουργία σταυροδεσμών μέσω της διαδικασίας DHT με τρόπο επαναλήψιμο και ομοιόμορφο στις 4 συσκευές με συστοιχίες ΠΙΚ.
 - Αντοχή ιδιοσυσκευής σε φορτία που ασκούνται για τη σύνδεση γυαλιού – υπερκατασκευής PDMS και φορτία λόγω θερμοκρασιακών μεταβολών.
 - Να μην εισάγονται κίνδυνοι κυτταροτοξικότητας λόγω υλικών ή διαδικασιών.
 - Να επιτρέπουν εύκολη τοποθέτηση και αφαίρεση των αντικειμένων (γυαλιά, PDMS) από το χρήστη.

2.3. Εννοιολογικός σχεδιασμός

Εξωτερικές διαστάσεις βάσεων

Με βάση τις προδιαγραφές που τέθηκαν επιλέχθηκαν οι εξωτερικές διαστάσεις των δύο βάσεων:

- ✓ Η βάση των γυαλιών θα είναι μία πλάκα εξωτερικών διαστάσεων 127 x 86 mm ώστε να τοποθετείται και στην υποδοχή για 96άρα πλάκα του TECAN EVO 150.
- ✓ Η βάση των PDMS θα είναι μία πλάκα διαστάσεων μικρότερων από 140 x 130 mm ώστε να μπορεί να χωράει στο θάλαμο του plasma etcher (ο μικρότερος θάλαμος σε όλα τα μηχανήματα με τα οποία πρέπει να συνεργάζεται η βάση).

Η επιλογή για τα πάχη των δύο βάσεων απαιτεί πιο εκτενή εξέταση, καθώς εξαρτώνται από αρκετούς παράγοντες, και παρουσιάζεται σε επόμενη παράγραφο.

Βασικό υλικό κατασκευής

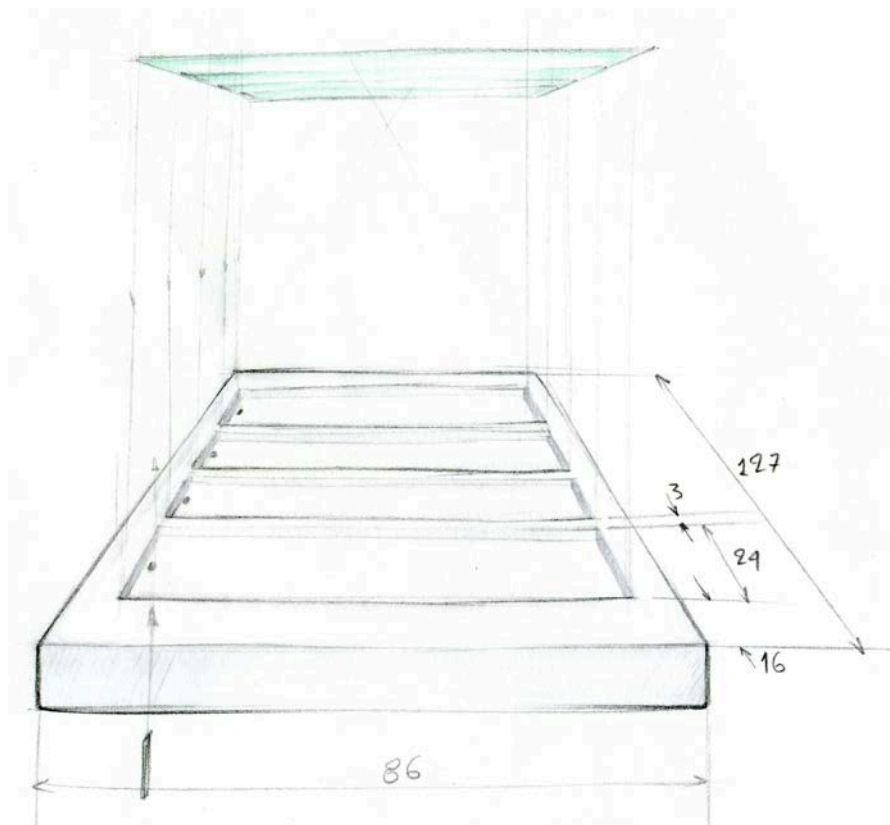
Ως βασικό υλικό κατασκευής των κομματιών επιλέχθηκε το αλουμίνιο διότι είναι φθηνό και ευκατέργαστο.

2.3.1. Περιορισμός των β.ε. των αντικειμένων πάνω στις βάσεις τους

Και για τις δύο βάσεις, πρέπει να περιορίζονται όλοι οι β.ε. των φερόμενων αντικειμένων στο χώρο εκτός από τη μεταφορική κίνηση κατά την κατακόρυφη διεύθυνση Z. Επιπλέον, για τη βάση που θα οδηγείται από πάνω προς την άλλη, που θα είναι κάτω σταθερή, θα πρέπει να περιορίζεται ακόμα και αυτός ο β.ε. (αυτό αναλύεται σε επόμενη παράγραφο).

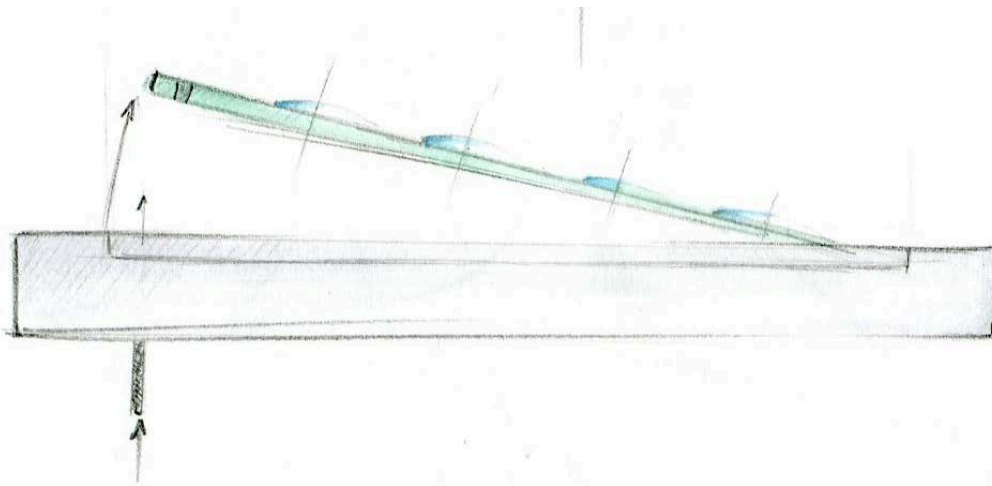
- Βάση των γυαλιών:

Με μια ποκέτα με σωστή ανοχή περιορίζονται όλοι οι β.ε. και ορίζεται η θέση των γυαλιών πάνω στη βάση, Εικόνα 4. Τα γυαλιά μικροσκοπίας έχουν συγκεκριμένες διαστάσεις, δεν μπορούν να κατεργαστούν και είναι πολύ λεπτά και εύθραυστα ώστε να μπορέσουν να εδραστούν με άλλον τρόπο σε κάποια βάση. Επομένως αυτή ήταν η μόνη εναλλακτική για την υλοποίηση αυτού του σχεδιαστικού ζητήματος.

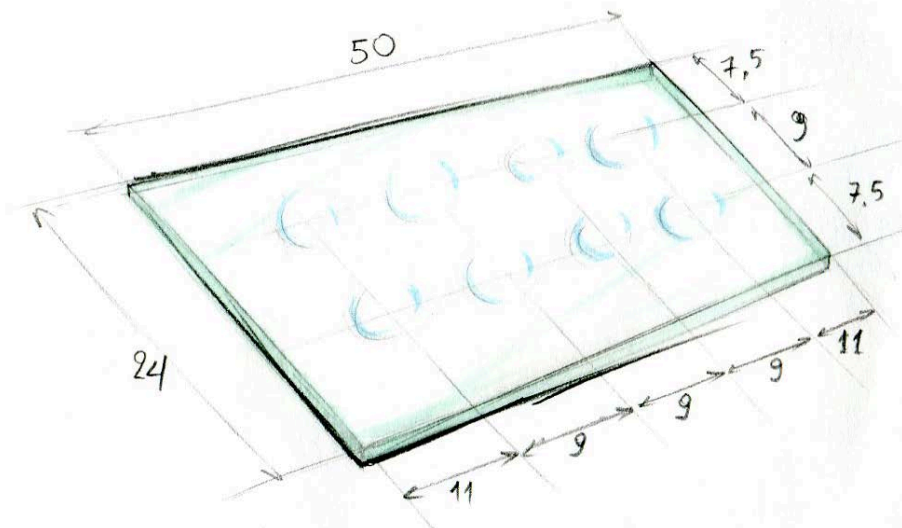


Εικόνα 4: Εννοιολογικός σχεδιασμός της βάσης γυαλιών με ποκέτες

Ο χρήστης για να τοποθετήσει τα γυαλιά θα σταθεροποιεί πρώτα την μικρή πλευρά (24 mm) και με μία κίνηση ρινοτ θα αφήνει ελεγχόμενα το γυαλί να μπει στην ποκέτα του. Για να τα αφαιρέσει θα σπρώχνει με ένα λεπτό αντικείμενο μέσα από την οπή στο κάτω μέρος της βάσης (βλ. Εικόνα 5).

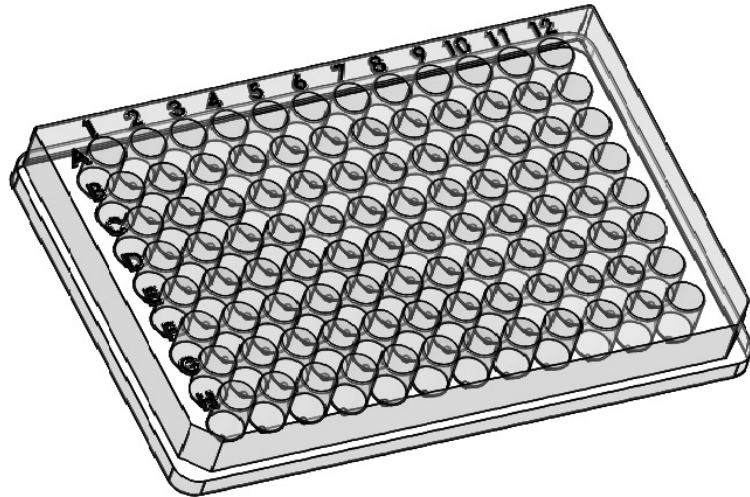


Εικόνα 5: Διαδικασία εισαγωγής και εξαγωγής των γυαλιών στη/από τη βάση τους



Εικόνα 6: Μοντέλο γυαλιού μικροσκοπίας και θέσεις ικριωμάτων πάνω του

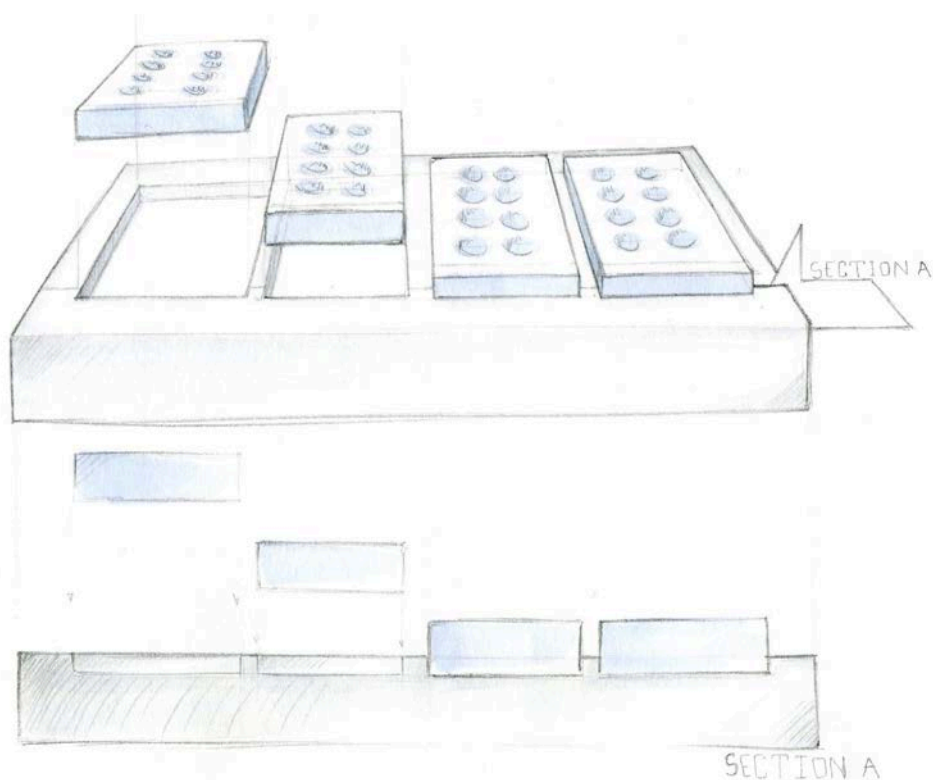
Με δεδομένες τις θέσεις των ικριωμάτων πάνω στα γυαλιά (Εικόνα 6), αν τα γυαλιά είναι συμμετρικά τοποθετημένα πάνω στη βάση ως προς Y , το πρώτο γυαλί απέχει 16 mm κατά X από τη μια άκρη και κάθε γυαλί 3 mm κατά X από το δίπλα του, τότε τα θεωρητικά βοθρία μιας πλάκας 96 βοθρίων του εμπορίου (Εικόνα 7) που προσομοιώνονται είναι τα C2-F3 (συμβολίζεται ο 4x2 πίνακας με βοθρία: C2, C3, D2, D3, E2, E3, F2, F3), C5-F6, C8-F9 και C11-F12.



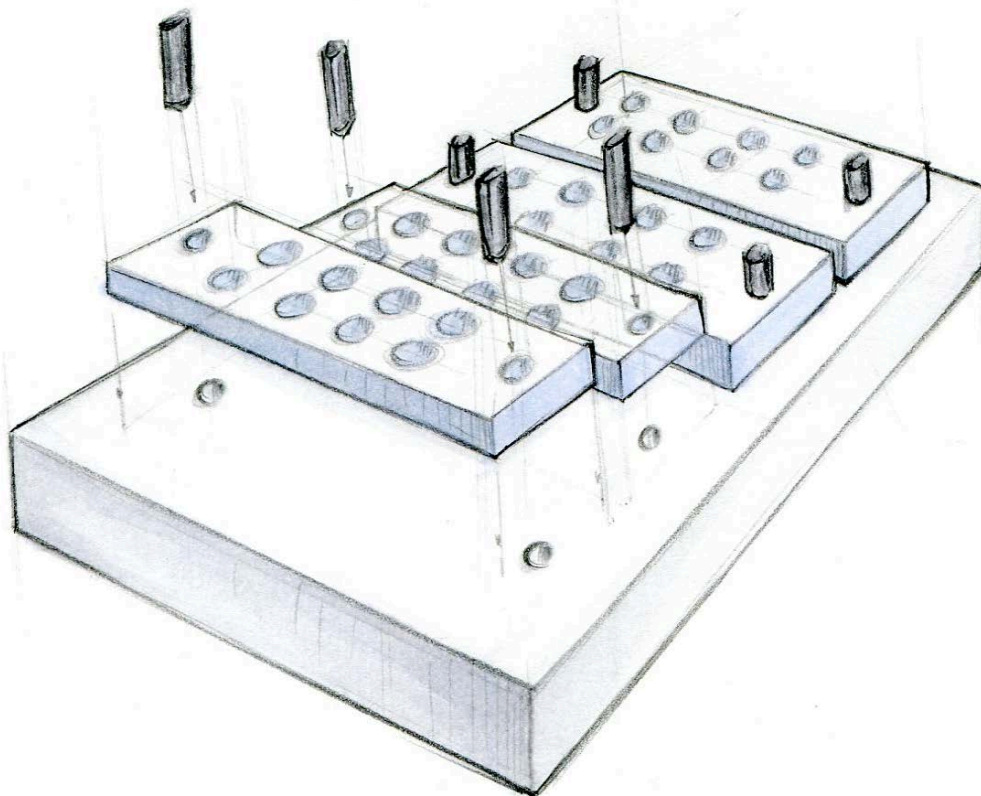
Εικόνα 7: Πλάκα 96 βοθρίων του εμπορίου

- Βάση των PDMS:

Εδώ υπήρχαν δύο εναλλακτικές επιλογές όσο αφορά τον ορισμό της θέσης των υπερκατασκευών PDMS. Η μία ήταν αντίστοιχη με τη βάση των γυαλιών, με ποκέτα, όπως φαίνεται στην Εικόνα 8. Επειδή οι υπερκατασκευές PDMS κατασκευάζονται με χύτευση, είναι δυνατόν, μέσω κατάλληλου σχεδιασμού του καλουπιού, να τους προσδοθούν διάφορα γεωμετρικά χαρακτηριστικά που θα βοηθούν την οριοθέτησή τους πάνω στη βάση τους. Έτσι, μια εναλλακτική ήταν η δημιουργία 2 οπών σε κάθε PDMS που θα ευθυγραμμίζονται σε 2 πύρους πάνω στη βάση PDMS, όπως φαίνεται στην Εικόνα 9.



Εικόνα 8: Εννοιολογικός σχεδιασμός της βάσης υπερκατασκευών PDMS, όπου οι υπερκατασκευές οριοθετούνται με ποκέτες



Εικόνα 9: Εννοιολογικός σχεδιασμός της βάσης υπερκατασκευών PDMS, όπου οι υπερκατασχευές οριοθετούνται με πύρους

Προτιμήθηκε η εναλλακτική με τους πύρους οριοθέτησης, γιατί είναι ευκολότερο κατασκευαστικά να προσδοθούν οι επιθυμητές ανοχές θέσης σε συνδεσμολογία πύρου σε σπή, παρά ορθογωνική περίμετρος σε ορθογωνική ποκέτα. Για τη δημιουργία των σπών στα PDMS σχεδιάστηκε καινούργιο καλούπι.

2.3.2. Επιλογή ποιας βάσης θα βρίσκεται κάτω και ποιας θα οδηγείται από πάνω

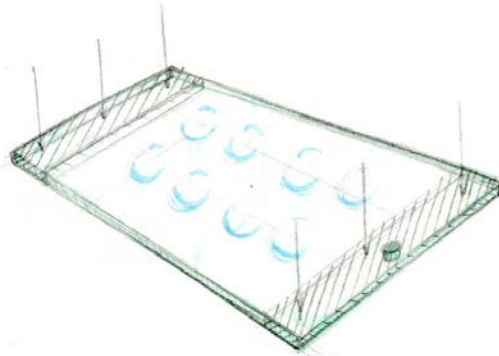
Υπάρχουν δύο εναλλακτικές επιλογές σχετικά με το αν η βάση των υπερκατασκευών PDMS θα βρίσκεται κάτω από την βάση των γυαλιών ή το ανάποδο. Σε κάθε περίπτωση η βάση που θα τοποθετηθεί από κάτω θα είναι ακίνητη ενώ η βάση που θα τοποθετηθεί από πάνω θα οδηγείται.

Η βάση που θα οδηγείται από πάνω θα πρέπει πρώτα να μπορεί να τοποθετείται στον πάγκο εργασίας για να τοποθετηθούν πάνω της τα φερόμενα αντικείμενα (γυαλιά ή υπερκατασκευές PDMS) με την "καλή" πλευρά τους προς τα πάνω και μετά να αναποδογυρίζει ώστε η «καλή» πλευρά να έρθει σε επαφή με το απέναντι αντικείμενο. Η πρόκληση σε αυτή τη διαδικασία είναι κυρίως η συγκράτηση έναντι βαρύτητας των πάνω αντικειμένων.

α) Η βάση των PDMS κάτω και η βάση των γυαλιών οδηγείται από πάνω

Για τη συγκράτηση ανεστραμμένων γυαλιών κατά Z (δηλ. με τα ικρίσματα να "κοιτάνε" προς τα κάτω) μπορούν να χρησιμοποιηθούν οι ζώνες του γυαλιού έξω από τη περιοχή που βρίσκονται τα ικρίσματα και προτιμητέα κοντά στις μικρές ακμές του (24 mm) όπως φαίνεται στην Εικόνα 10. Μια τέτοια βάση γυαλιών θα περιέχει μια ποκέτα (Εικόνα 4) όπου τα γυαλιά θα εισέρχονται συρταρωτά και ένα άνοιγμα που θα αφήνει ελεύθερη την περιοχή των ικριωμάτων, ώστε οι δύο περιοχές συγκράτησης να "πατάνε" σταθερά, Εικόνα 11. Ένας μικρός πύρος οριοθετεί το κομμάτι που εισέρχεται συρταρωτά στο άλλο ως προς X. Ως προς Y και Z η θέση των γυαλιών ορίζεται από τα εσωτερικά τοιχώματα της ποκέτας. Όταν αναποδογυρίσει η βάση για να οδηγηθεί, τα γυαλιά θα πρέπει να κινηθούν κατά Z για απόσταση όση η διαφορά του πάχους

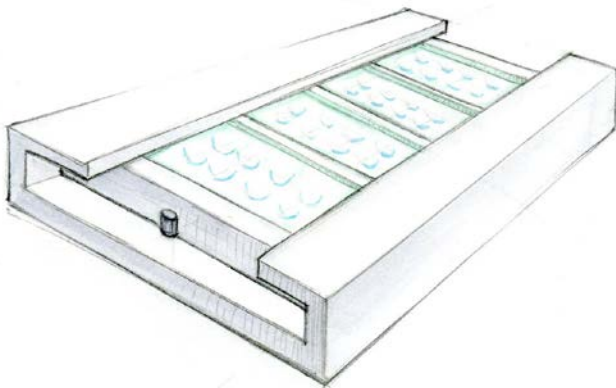
τους από το βάθος της ποκέτας. Οπότε, απαιτείται αρκετά ρηχή ποκέτα ώστε να ελαχιστοποιηθεί αυτή η κίνηση, αλλά αρκετά βαθιά ποκέτα ώστε να μπορεί να ορίσει σωστά την θέση τους στο επίπεδο XY.



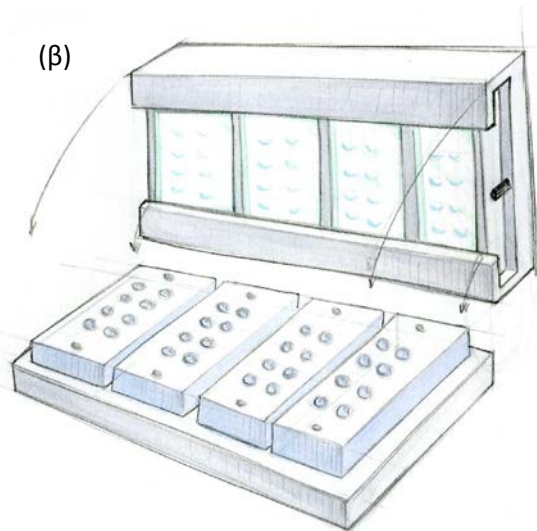
Εικόνα 10: Περιοχές συγκράτησης του γυαλιού για την εναλλακτική που η βάση των γυαλιών οδηγείται από πάνω προς την βάση των PDMS που βρίσκεται κάτω.

Ο εννοιολογικός σχεδιασμός της βάσης φαίνεται στην Εικόνα 11.

(α)



(β)

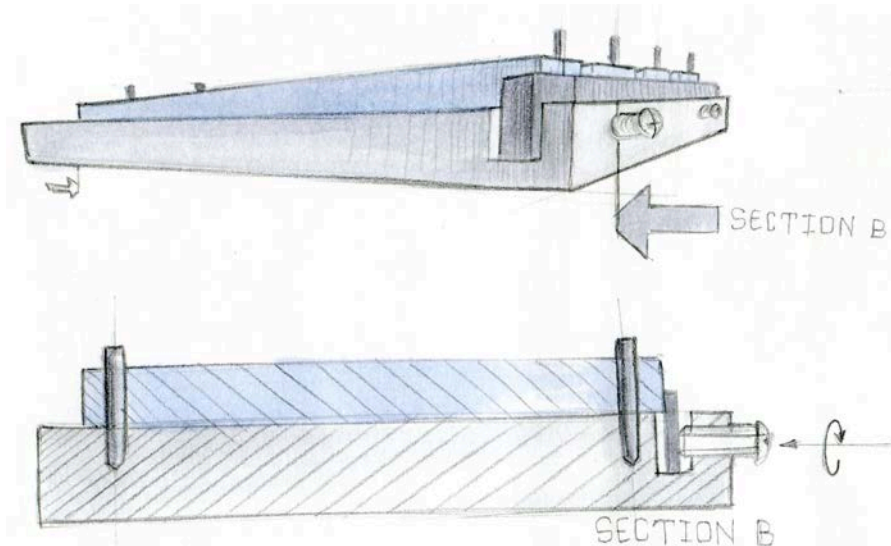


Εικόνα 11: α) Εννοιολογικός σχεδιασμός μιας βάσης γυαλιών που θα οδηγείται ανάποδα προς τη βάση των υπερκατασκευών PDMS. β) Αναποδογύρισμα κατά τη συναρμολόγηση με τη βάση των υπερκατασκευών PDMS

β) Η βάση των γυαλιών κάτω και η βάση των PDMS οδηγείται από πάνω

Για τη συγκράτηση των PDMS, υπάρχει η δυνατότητα εισαγωγής τριβής που θα συγκρατεί τα κομμάτια όταν αναποδογυρίσουν. Η τριβή μπορεί να εισαχθεί στις κυλινδρικές διεπιφάνειες μεταξύ των οπών του PDMS και των πύρων οριοθέτησης της βάσης. Οι άξονες αυτών των δύο προβλέπεται να μην είναι εντελώς συνευθειακοί, οπότε για την τοποθέτηση των PDMS, τα ίδια θα αναγκαστούν να παραμορφωθούν και να εισάγουν μια ακτινική δύναμη στον πύρο. Μια πηγή αβεβαιότητας έγκειται στο αν αυτή η δύναμη είναι αρκετή ώστε να συγκρατήσει τα κομμάτια PDMS έναντι της βαρύτητας. Γι' αυτό σχεδιάστηκε και επιπλέον διαμόρφωση, όπου ένα "λαμάκι" πιέζεται με κοχλίες και με τη σειρά του πιέζει τις παράπλευρες επιφάνειες των υπερκατασκευών PDMS ώστε να εισαχθεί επιπλέον ακτινική δύναμη στις διεπιφάνειες πύρων-οπών, Εικόνα 12.

Με βάση την παραπάνω ανάλυση, επιλέχθηκε η εναλλακτική (β) (τοποθέτηση της βάσης υπερκατασκευών PDMS από επάνω) κυρίως λόγω σχεδιαστικής απλότητας.

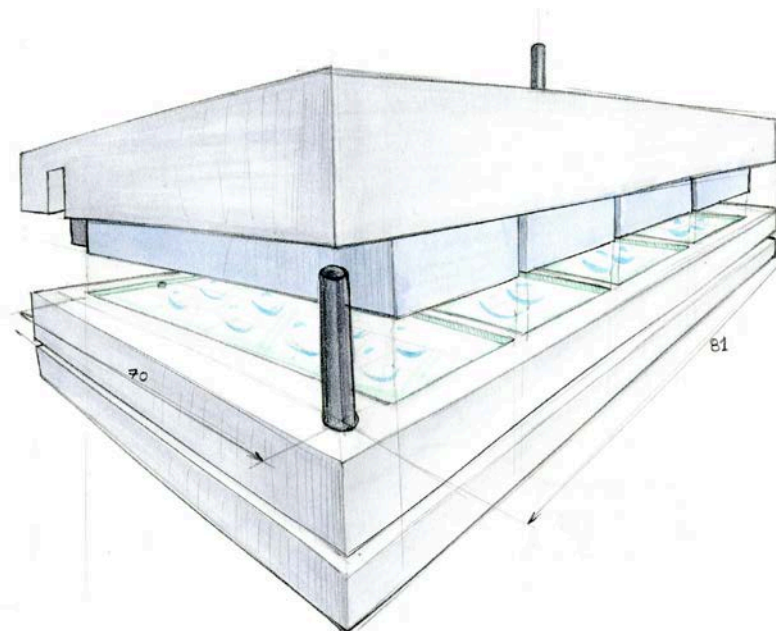


Εικόνα 12: Εννοιολογικός σχεδιασμός της βάσης των υπερκατασκευών PDMS για την περίπτωση όπου αυτή κινείται από πάνω προς τη βάση των γυαλιών. Φαίνεται και η πλάκα πίεσης των υπερκατασκευών

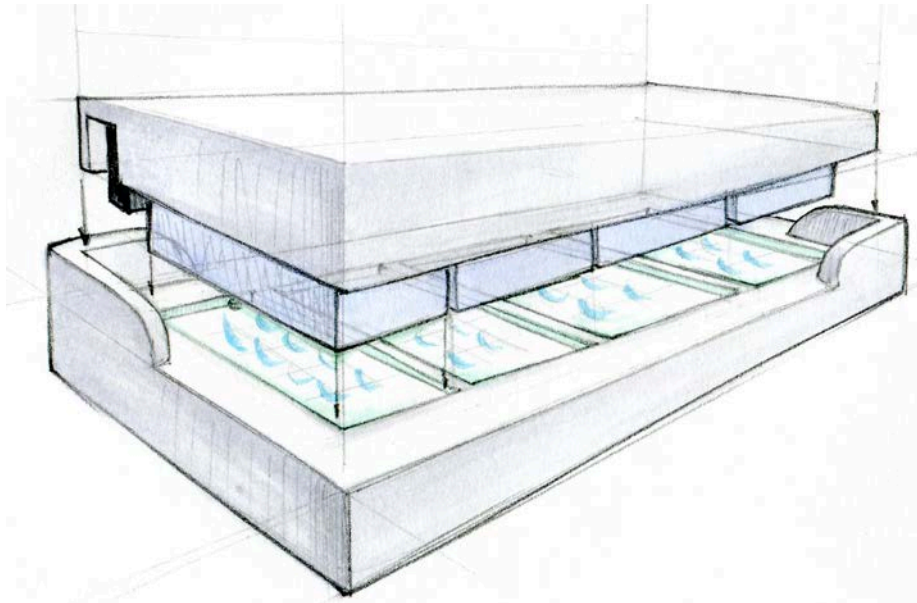
2.3.3. Οδήγηση της βάσης των PDMS προς τη βάση των γυαλιών

Αφού αποφασίστηκε ότι η βάση των PDMS θα τοποθετηθεί από πάνω και θα οδηγείται ως προς την βάση των γυαλιών, εξετάστηκαν οι τρόποι οδήγησης και καθορισμού της θέσης των δύο βάσεων.

- Μία εναλλακτική είναι η χρήση πίρων στους οποίους θα οδηγούνται οι οπές της βάσης των υπερκατασκευών PDMS. Επιλέχθηκε μία επιπλέον βάση να φέρει πάνω της σταθερούς τους πύλους ώστε οι βάσεις των γυαλιών και υπερκατασκευών PDMS να μπορούν να τοποθετηθεί εύκολα στο plasma etcher, τον λυοφιλοποιητή και το TECAN. Οι δύο βάσεις θα οδηγούνται μέσω των οπών τους στους δύο πύλους, Εικόνα 13.
- Μία δεύτερη εναλλακτική είναι η ευθυγράμμιση-οδήγηση της βάσης PDMS μέσα σε ορθογωνική ποκέτα στη βάση των γυαλιών, Εικόνα 14.



Εικόνα 13: Οδήγηση της βάσης των PDMS προς τη βάση των γυαλιών με τη βοήθεια πύλων οδήγησης (κατά τη φάση της συναρμολόγησης γυαλιών-υπερκατασκευών PDMS)

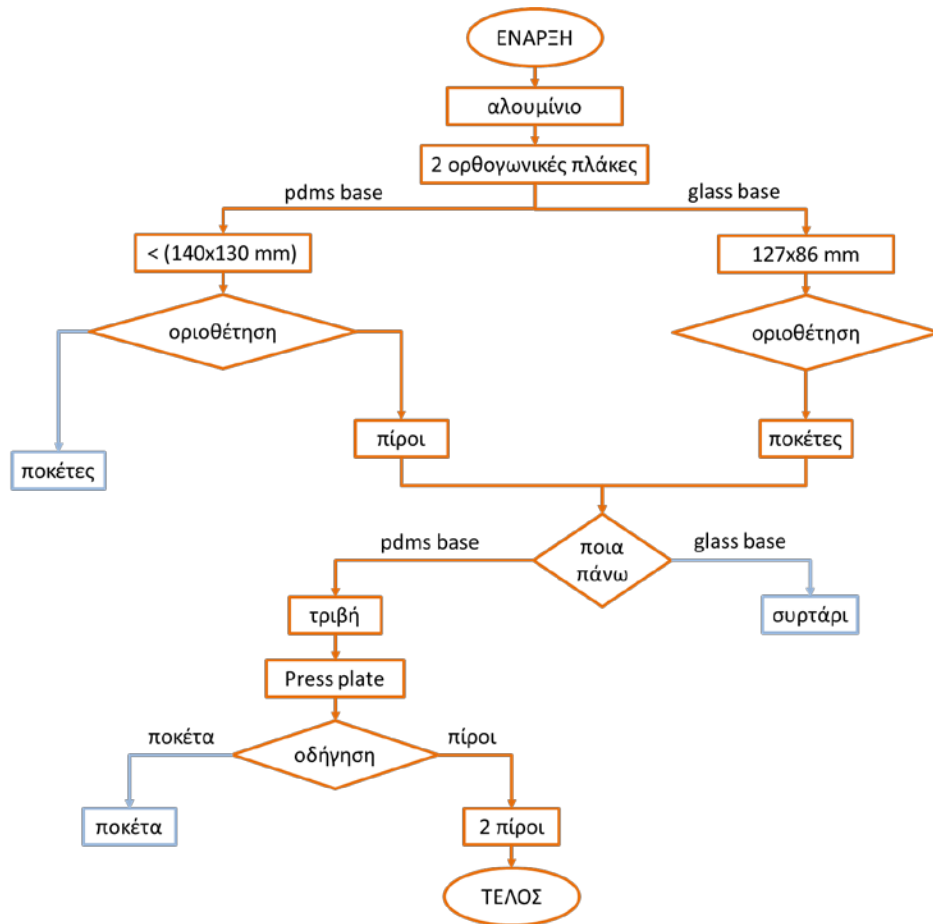


Εικόνα 14: Ευθυγράμμιση/οδήγηση της βάσης υπερκατασκευών PDMS προς τη βάση των γυαλιών με ποκέτα κατά τη φάση της της συναρμολόγησης γυαλιών-υπερκατασκευών PDMS

Προτιμήθηκε η απλή και εύκολη κατασκευαστικά εναλλακτική (α). Επιλέγοντας πύρους εμπορίου από ανοξείδωτο χάλυβα, προκύπτει ένα ρίσκο για διμεταλλική (γαλβανική) διάβρωση της περιοχής που θα έρχονται σε επαφή τα αλουμινένια κομμάτια με τους ανοξείδωτους πύρους. Για την αντιμετώπισή του, ο χρήστης πρέπει να αποφύγει την παρουσία υγρασίας.

2.4. Διάγραμμα ροής λήψης αποφάσεων εννοιολογικού σχεδιασμού

Στην Εικόνα 15 φαίνεται συνοπτικά η διαδικασία που λήφθηκαν οι αποφάσεις για τα σχεδιαστικά ζητήματα που αναλύθηκαν στο κεφάλαιο 2.3.



Εικόνα 15: Διάγραμμα ροής λήψης αποφάσεων για το σχεδιασμό. Με πορτοκαλί φαίνεται το μονοπάτι που τελικά ακολουθήθηκε, ενώ με μπλε φαίνονται οι εναλλακτικές που απορρίφθηκαν

3. Ανάλυση, Σχεδιασμός και Κατασκευή Ιδιοσυσκευής

Μέσω του εννοιολογικού σχεδιασμού αποφασίστηκαν τα βασικά γεωμετρικά και λειτουργικά χαρακτηριστικά της ιδιοσυσκευής. Για τον καθορισμό του λεπτομερούς σχεδιασμού και την υλοποίηση της κατασκευής απαιτείται η ανάλυση συγκεκριμένων ζητημάτων.:

- Οι ανοχές των διάφορων συναρμογών στη συσκευή, και συνεπώς η ακρίβεια της συσκευής.
- Η μεταφορά θερμότητας από τα εναιωρήματα πάνω στα γυαλιά προς το ράφι του λυοφιλοποιητή και η σύγκριση με την μεταφορά θερμότητας στα κλασσικά καλούπια ικρωμάτων πάχους 2-3mm.
- Η στιβαρότητα της συσκευής σε μηχανικά φορτία.

3.1. Ανάλυση ανοχών θέσης των εναιωρημάτων πάνω στα γυαλιά

Τα γυαλιά μικροσκοπίας θα εδράζονται πάνω στη βάση τους μέσα σε ποκέτες που θα κατασκευαστούν σε φρέζα. Για να επιτευχθεί η απαιτούμενη ακρίβεια στη θέση τους χρειάζεται σωστή επιλογή των ανοχών στις διαστάσεις αυτών των ποκετών.

Αρχικά μετρήθηκαν οι εξωτερικές διαστάσεις των γυαλιών (Fisherbrand™, της εταιρείας fisher scientific, catalogue number 12-544E) από ένα δείγμα 102 γυαλιών. Η μέση τιμή και η τυπική απόκλιση των μετρήσεων του μήκους L και του πλάτους W φαίνεται στον Πίνακα 2.

Διάσταση	Πλάτος W	Μήκος L
Ονομαστική τιμή (mm)	24	50
μέση τιμή (\bar{x})	23.96961	49.98039
τυπική απόκλιση (σ)	0.059352	0.078082
2σ	0.118703	0.156165

Πίνακας 2: Διαστάσεις γυαλιών μικροσκοπίας (όλες οι μετρήσεις είναι σε mm)

Για να αποφασιστούν οι ανοχές στις διαστάσεις των ποκετών θα ληφθούν υπόψη δύο αντικρουόμενες απαιτήσεις: αν οι ανοχές είναι πολύ στενές, τότε λιγότερα γυαλιά θα ανήκουν μέσα στο στενό πεδίο τιμών των διαστάσεών τους, αν οι ανοχές είναι πολύ χαλαρές για να «προκρίνονται» περισσότερα γυαλιά, τότε η ακρίβεια της θέσης τους θα είναι κακή. Υποθέτοντας ότι οι μεταβλητές L και W ακολουθούν κανονική κατανομή, τότε το 95.4% της κάθε διάστασης των γυαλιών περιέχεται στο διάστημα $[\bar{x} \pm 2\sigma]$. Το εύρος 2σ αντιστοιχεί σε 156 μm κατά μήκος και 119 μm κατά πλάτος. Επιλέγοντας διαστάσεις των ποκετών $W = 24_{+0.12}^{+0.15} mm$ και $L = 50_{+0.15}^{+0.18} mm$, το σφάλμα θέσης του γυαλιού θα κυμαίνεται:

κατά το πλάτους W από $\delta W_{min} = 24.12 - 24.09 mm = +0.030 mm$ μέχρι $\delta W^{max} = 24.15 - 23.85 mm = +0.300 mm$

$$\delta W_{glass} = \begin{matrix} +0.300 \\ +0.030 \end{matrix} mm \quad (1)$$

και κατά το μήκος L από $\delta L_{min} = 50.15 - 50.14 mm = +0.010 mm$ μέχρι $\delta L^{max} = 50.18 - 49.82 mm = +0.360 mm$

$$\delta L_{glass} = \begin{matrix} +0.360 \\ +0.010 \end{matrix} mm \quad (2)$$

Θεωρείται ότι οι ποκέτες των γυαλιών θα κατασκευαστούν με γεωμετρική ανοχή θέσης ως προς τα κέντρα των οπών της βάσης $\pm 0.050 mm$. Αν η θέση των εναιωρημάτων ορίζεται από το μηχάνημα TECAN EVO 150, (παρέχει σφάλμα $\pm 0.400 mm$ στο επίπεδο XY) το συνολικό σφάλμα θέσης των εναιωρημάτων πάνω στο γυαλί ως προς τις θεωρητικές τους θέσεις θα είναι:

$$\delta W_{susp} = \begin{matrix} +0.300 + 0.050 + 0.400 \\ +0.030 - 0.050 - 0.400 \end{matrix} mm = \begin{matrix} +0.750 \\ -0.420 \end{matrix} mm \quad (3)$$

$$\delta L_{susp} = \begin{matrix} +0.360 + 0.050 + 0.400 \\ +0.010 - 0.050 - 0.400 \end{matrix} mm = \begin{matrix} +0.810 \\ -0.440 \end{matrix} mm \quad (4)$$

Έλεγχος ανοχών κατά την ψύξη μέσα στον λυοφιλοποιητή

Η βάση των γυαλιών θα μπαίνει στον λυοφιλοποιητή φέρουσα τα γυαλιά με τα εναιωρήματα βιοϋλικού προς λυοφιλοποίηση. Πρέπει να ελεγχθεί επιπλέον αν οι ανοχές εξασφαλίζουν ασφαλή έδραση των γυαλιών στις ποκέτες μετά τις θερμικές παραμορφώσεις των σωμάτων λόγω θερμοκρασιακών μεταβολών. Η μεταβολή Δl στην διάσταση ενός σώματος λόγω θερμικής διαστολής (ή συστολής) είναι:

$$\Delta l = \alpha \cdot l \cdot \Delta T \quad (5)$$

Όπου l είναι το μήκος κατά τη φορά της διαστολής/συστολής και α είναι ο συντελεστής θερμικής διαστολής του υλικού [$m^{-1} \cdot K^{-1}$]. Η μεταβολή στις διαστάσεις της βάσης γυαλιών από αλουμίνιο είναι:

$$\Delta W_{Al}^{\theta} = \alpha_{Al} \cdot W \cdot \Delta T \quad (6)$$

$$\Delta L_{Al}^{\theta} = \alpha_{Al} \cdot L \cdot \Delta T \quad (7)$$

Η μεταβολή στις διαστάσεις ενός γυαλιού μικροσκοπίας από borosilicate glass:

$$\Delta W_g^{\theta} = \alpha_g \cdot W \cdot \Delta T \quad (8)$$

$$\Delta L_g^{\theta} = \alpha_g \cdot L \cdot \Delta T \quad (9)$$

Όπου $W = 24 mm$, $L = 50 mm$, $\alpha_{Al} = 12.7 \cdot 10^{-6} 1/m \cdot K$, $\alpha_g = 4.2 \cdot 10^{-6} 1/m \cdot K$ και $\Delta T = 20 - (-40) = 60 \text{ } ^\circ C$. Επειδή τα υλικά είναι ισότροπα, για μικρές μεταβολές στα μήκη, ο λόγος Poisson ν μπορεί να εκφραστεί με αρκετά καλή προσέγγιση ως:

$$\frac{\Delta l'}{\Delta l} = \nu \quad (10)$$

όπου Δl είναι η μεταβολή του μήκους κατά τη διεύθυνση φόρτισης [m] και $\Delta l'$ είναι η μεταβολή του μήκους κατά την κάθετη διεύθυνση λόγω φαινομένου Poisson [m]. Επομένως η τελική μεταβολή στα μήκη των πλευρών στην βάση των γυαλιών (αλουμίνιο) θα είναι:

$$\Delta W_{Al} = \Delta W_{Al}^{\theta} - \nu_{Al} \cdot \Delta L_{Al}^{\theta} = \alpha_{Al} \cdot \Delta T \cdot (W - \nu_{Al} \cdot L) = 0.0057 mm \quad (11)$$

$$\Delta L_{Al} = \Delta L_{Al}^{\theta} - \nu_{Al} \cdot \Delta W_{Al}^{\theta} = \alpha_{Al} \cdot \Delta T \cdot (L - \nu_{Al} \cdot W) = 0.0321 mm \quad (12)$$

ενώ στο γυαλί μικροσκοπίας (borosilicate glass) θα είναι:

$$\Delta W_g = \Delta W_g^{\theta} - \nu_g \cdot \Delta L_g^{\theta} = \alpha_g \cdot \Delta T \cdot (W - \nu_g \cdot L) = 0.0035 mm \quad (13)$$

$$\Delta L_g = \Delta L_g^{\theta} - \nu_g \cdot \Delta W_g^{\theta} = \alpha_g \cdot \Delta T \cdot (L - \nu_g \cdot W) = 0.0113 mm \quad (14)$$

Επομένως, η συνολική μείωση στο διάκενο ανάμεσα στην ποκέτα και το γυαλί κατά τις δύο διαστάσεις κατά την φάση ψύξης της λυοφιλοποίησης θα είναι:

$$\Delta W = |\Delta W_{Al} - \Delta W_g| = 0.0022 mm < \delta W_{min} \quad (15)$$

$$\Delta L = |\Delta L_{Al} - \Delta L_g| = 0.0208 mm > \delta L_{min} \quad (16)$$

Όπου δW_{min} , δL_{min} τα κάτω όρια του διακένου (σφάλματος θέσης) του γυαλιού στις δύο διευθύνσεις σε θερμοκρασία περιβάλλοντος, όπως υπολογίστηκαν πιο πάνω. Παρατηρείται ότι κατά το πλάτος W η μείωση

του διακένου είναι μικρότερη από το διαθέσιμο διάκενο που υπάρχει σε θερμοκρασία περιβάλλοντος, άρα το γυαλί παραμένει ασφαλώς μέσα στην ποκέτα. Αντίθετα, κατά το μήκος L η μείωση του διακένου είναι μεγαλύτερη από το διαθέσιμο διάκενο που υπάρχει σε θερμοκρασία περιβάλλοντος. Αυτό σημαίνει πως οι πλευρές του γυαλιού και της ποκέτας θα έρθουν σε επαφή και υπάρχει ένας κίνδυνος να σπάσει το γυαλί.

3.2. Ανάλυση ανοχών των θέσεων των υπερκατασκευών PDMS

Οι υπερκατασκευές PDMS θα οριοθετούνται πάνω στη βάση τους με 2 πύρους από ανοξείδωτο χάλυβα. Μετά από μια έρευνα αγοράς, λόγω διαθεσιμότητας και κόστους, αποφασίστηκε να χρησιμοποιηθούν δύο πύροι διαμέτρου 4mm για κάθε υπερκατασκευή, κατηγορίας g και ποιότητας 6 ($\emptyset 4g6_{-0.012}^{-0.004}$). Οι πύροι θα πρέπει να είναι σταθεροί πάνω στη βάση τους και γι' αυτό η συναρμογή με τις οπές της βάσης θα πρέπει να είναι σφιχτή. Αυτό επιτυγχάνεται αν οι οπές κατασκευαστούν ως $\emptyset 6M6_{-0.009}^{-0.001}$. Η γεωμετρική ανοχή στη θέση των οπών πάνω στη βάση εκτιμάται σε $\pm 0.050 \text{ mm}$.

Ταυτόχρονα, οι υπερκατασκευές PDMS θα πρέπει να σταθεροποιούνται έναντι της βαρύτητας λόγω της τριβής στη διεπιφάνεια πύρων-οπών. Έτσι, θα πρέπει να κατασκευάζονται (με χύτευση σε καλούπι) με ανοχή θέσης (εκκεντρότητα αξόνων πύρων και οπών) που να επιβάλει μια ελάχιστη παραμόρφωση κατά την τοποθέτηση των οπών στους πύρους της βάσης, με σκοπό την δημιουργία ακτινικών τάσεων πάνω στο σώμα των πύρων και κατ' επέκταση την επιθυμητή τριβή στη διεπιφάνεια. Οι αρσενικές γεωμετρικές του καλουπιού που θα δημιουργήσουν τις θηλυκές (οπές) στις παραγόμενες υπερκατασκευές PDMS θα είναι οι ίδιοι πύροι που αναφέρθηκαν πιο πάνω και θα τοποθετούνται πάνω στο καλούπι με γεωμετρική ανοχή θέσης $\pm 0.050 \text{ mm}$. Αυτή θα είναι και η ανοχή θέσης των παραγόμενων οπών πάνω στις υπερκατασκευές PDMS.

Τα ίδια θα ισχύουν και για τους πύρους του καλουπιού που ορίζουν τις θέσεις των πηγαδιών πάνω στην υπερκατασκευή. Από τη στιγμή που θα τοποθετηθούν οι υπερκατασκευές PDMS πάνω στη βάση τους, η ανοχή στη θέση τους θα ορίζεται από τους 2 πύρους οριοθέτησής τους. Οπότε τα όρια στο σφάλμα θέσης των πηγαδιών θα είναι

$$\delta D_{well} = \begin{matrix} +0.050 \\ -0.050 \end{matrix} \text{ mm} \quad (17)$$

3.3. Ανάλυση ανοχών στη συναρμογή πύρων οδήγησης – οπών

Για να οδηγούνται οι βάσεις των γυαλιών και των υπερκατασκευών PDMS μέσω των οπών τους στους πύρους της βάσης των πύρων, πρέπει μεταξύ τους να υπάρχει συναρμογή που να εξασφαλίζει την άνετη οδήγηση των πύρων μέσα στις οπές, και ταυτόχρονα να εξασφαλίζεται η επιθυμητή ακρίβεια. Μία τέτοια συναρμογή είναι η *αμφίβολη συναρμογή*. Με δεδομένους τους πύρους κατηγορίας g και ποιότητας 6 ($\emptyset 6g6_{-0.012}^{-0.004}$), απαιτείται η απόφαση για τις ανοχές των οπών των βάσεων των γυαλιών και των υπερκατασκευών PDMS, ώστε να επιτυγχάνεται η απαιτούμενη ακρίβεια και να εξασφαλίζεται η άνετη οδήγηση μέσα τους. Επιλέγοντας οπές $\emptyset 6H9_0^{+0.030}$, το διάκενο μεταξύ πύρων και οπών (σφάλμα θέσης) θα κυμαίνεται στα όρια: από $\delta D_{min} = |0 - 0.004| = 0.004 \text{ mm}$ έως $\delta D_{max} = |0.030 - 0.012| = 0.018 \text{ mm}$. Θεωρώντας ότι οι οπές θα κατασκευαστούν με γεωμετρική ανοχή θέσης (ως προς τις θεωρητικές θέσεις τους) $\pm 0.050 \text{ mm}$, το συνολικό σφάλμα θέσης των βάσεων ως προς τις θεωρητικές θέσεις τους θα είναι:

$$\delta D_{rod} = \begin{matrix} +0.050 + 0.018 \\ -0.050 + 0.004 \end{matrix} \text{ mm} = \begin{matrix} +0.068 \\ -0.046 \end{matrix} \text{ mm} \quad (18)$$

3.4. Συνολικό σφάλμα θέσης των εναιωρημάτων και των πηγαδιών

Με βάση τις παραπάνω εκτιμήσεις στις ανοχές διάφορων θέσεων και συναρμογών, μπορεί να υπολογιστεί το συνολικό σφάλμα θέσης των εναιωρημάτων (ως προς τις θεωρητικές τους θέσεις). Συνδυάζοντας τις σχέσεις (3), (4) με την (18), το σφάλμα θέσης των εναιωρημάτων θα είναι κατά πλάτους W

$$\delta X_{susp} = \delta W_{susp} = \begin{matrix} +0.750 + 0.068 \\ -0.420 - 0.046 \end{matrix} mm = \begin{matrix} +0.818 \\ -0.466 \end{matrix} mm \quad (19)$$

Και κατά τη μήκους (L) :

$$\delta Y_{susp} = \delta L_{susp} = \begin{matrix} +0.810 + 0.068 \\ -0.440 - 0.046 \end{matrix} mm = \begin{matrix} +0.878 \\ -0.486 \end{matrix} mm \quad (20)$$

Παρομοίως, για το σφάλμα θέσης των πηγαδιών, συνδυάζοντας τη σχέση (17) με την (18):

$$\delta X_{well} = \delta Y_{well} = \begin{matrix} +0.050 + 0.068 \\ -0.050 - 0.046 \end{matrix} mm = \begin{matrix} +0.118 \\ -0.096 \end{matrix} mm \quad (21)$$

3.5. Ανάλυση μεταφοράς θερμότητας κατά την λυοφιλοποίηση

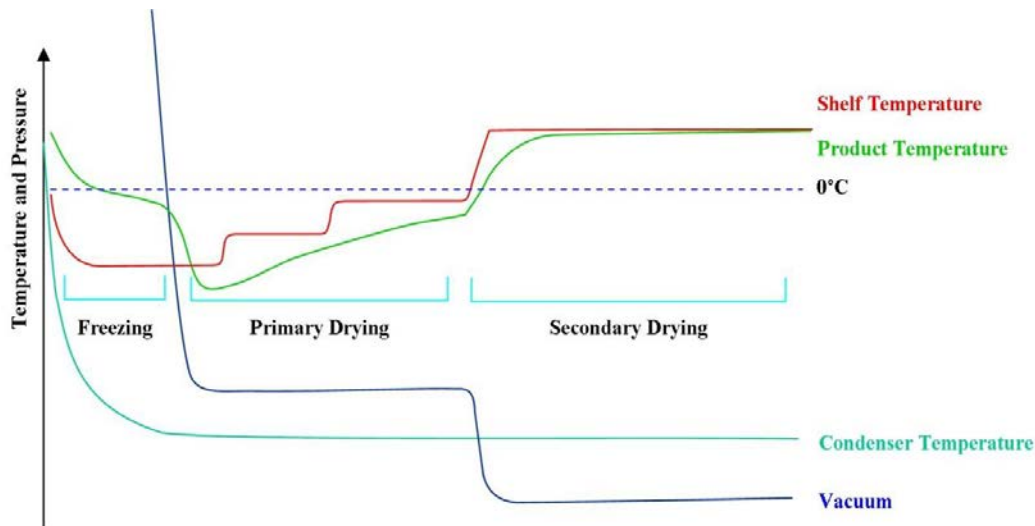
Η βάση των γυαλιών θα πρέπει να μπαίνει μέσα στο λυοφιλοποιητή, φέρουσα τα γυαλιά με τα εναιωρήματα βιοϋλικών προς λυοφιλοποίηση. Για την παραγωγή ικριωμάτων με το επιθυμητό, ομοιόμορφο μέγεθος πόρων, απαιτείται ελεγχόμενη μεταφορά θερμότητας από το εναιώρημα προς το περιβάλλον του κατά την ψύξη και τη στερεοποίηση του νερού μέσα στο διάλυμα του εναιωρήματος. Συγκεκριμένα, κατά την ψύξη δημιουργούνται κρύσταλλοι νερού, οι οποίοι στη συνέχεια εξαχνώνονται και αφήνουν στη θέση τους πόρους. Το μέγεθος των κρυστάλλων (και συνεπώς των πόρων) είναι αυτό που επηρεάζεται από το ρυθμό ψύξης (ή ισοδύναμα, από τη ροή θερμότητας). Πιο συγκεκριμένα, όσο μικρότερος είναι ο ρυθμός ψύξης (άρα και η ροή θερμότητας), τόσο μεγαλύτερο είναι το μέσο μέγεθος των πόρων. Αυτό επαληθεύτηκε υπολογιστικά και πειραματικά από τον Harley στη διδακτορική του διατριβή (Harley, 2006). Ο Harley μελέτησε τη διαδικασία της λυοφιλοποίησης και κυρίως τη φάση της ψύξης σε ικριώματα κολλαγονο-γλυκοζαμινογλυκανών (CG) πάχους 3mm, τα οποία χυτεύονται μέσα σε τετραγωνικό καλούπι από ανοξείδωτο χάλυβα (Εικόνα 17) και κάποια πρωτόκολλα θερμοκρασιών και πιέσεων που παράγουν ικριώματα με επιθυμητό μέγεθος πόρων. Η εργασία της Μ. Σαρκίρη (Σαρκίρη, 2016) και του Θ. Ιορδανίδη (Ιορδανίδη, 2017) τροποποίησαν τα πρωτόκολλα προσαρμόζοντάς τα στην παρασκευή συστοιχιών λεπτών ΠΙΚ, πάλι με γνώμονα την επίτευξη του επιθυμητού μεγέθους πόρων (τουλάχιστον 50 μm).

Στο εδάφιο αυτό αναλύεται η μεταφορά θερμότητας από το αιώρημα προς το ράφι του λυοφιλοποιητή διαμέσου της συσκευής και να διαπιστωθεί η επίδραση των διάφορων μερών της, ώστε να διαπιστωθεί αν τα πρωτόκολλα που προτάθηκαν από τους Σαρκίρη και Ιορδανίδη μπορούν να εφαρμοστούν όταν τα γυαλιά με το εναιώρημα βρίσκονται πάνω στην βάση των γυαλιών. Το πάχος της βάσης των γυαλιών είναι η μεταβλητή με τη μεγαλύτερη επίδραση στην απόκριση του συστήματος. Η ανάλυση γίνεται θεωρώντας πάχος της βάσης 5 mm.

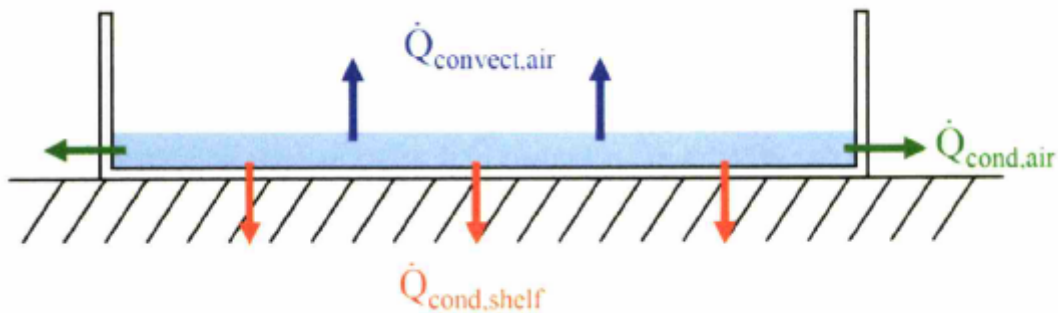
Γενικά, τα πρωτόκολλα που χρησιμοποιούνται για την στερεοποίηση (freezing) έχουν τις εξής κύριες φάσεις:

- Μείωση της θερμοκρασίας με σταθερό ρυθμό (της τάξης $1^\circ\text{C}/\text{min}$ μέχρι τελική θερμοκρασία $T_f < 0^\circ\text{C}$
- Διατήρηση σταθερής θερμοκρασίας T_f για περίπου 60 min
- Αύξηση της θερμοκρασίας μέχρι τους 0°C και εκκίνηση της φάσης της εξαχνωσης (drying)

Μεταξύ των βημάτων (1) και (2) μπορεί να παρεμβάλλεται ένα βήμα ανόπτωσης, όπου η θερμοκρασία αυξάνεται και διατηρείται σταθερή για λίγο μεταξύ T_f και 0°C . Μία τυπική μορφή ενός πρωτοκόλλου λυοφιλοποίησης φαίνεται στην Εικόνα 16.

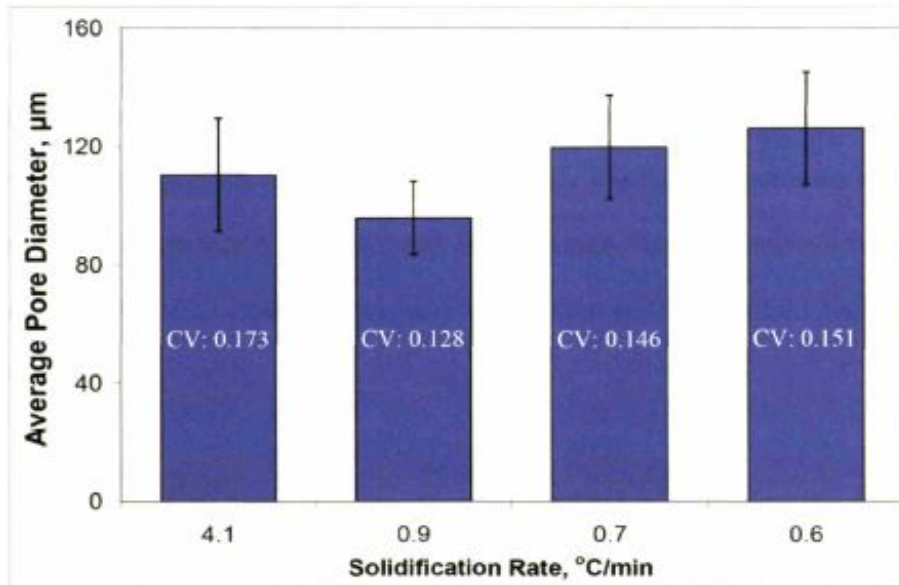


Εικόνα 16: Τυπικές μεταβολές και φάσεις θερμοκρασιών και πιέσεων σε σημεία του λυοφιλοποιητή κατά τη λυοφιλοποίηση



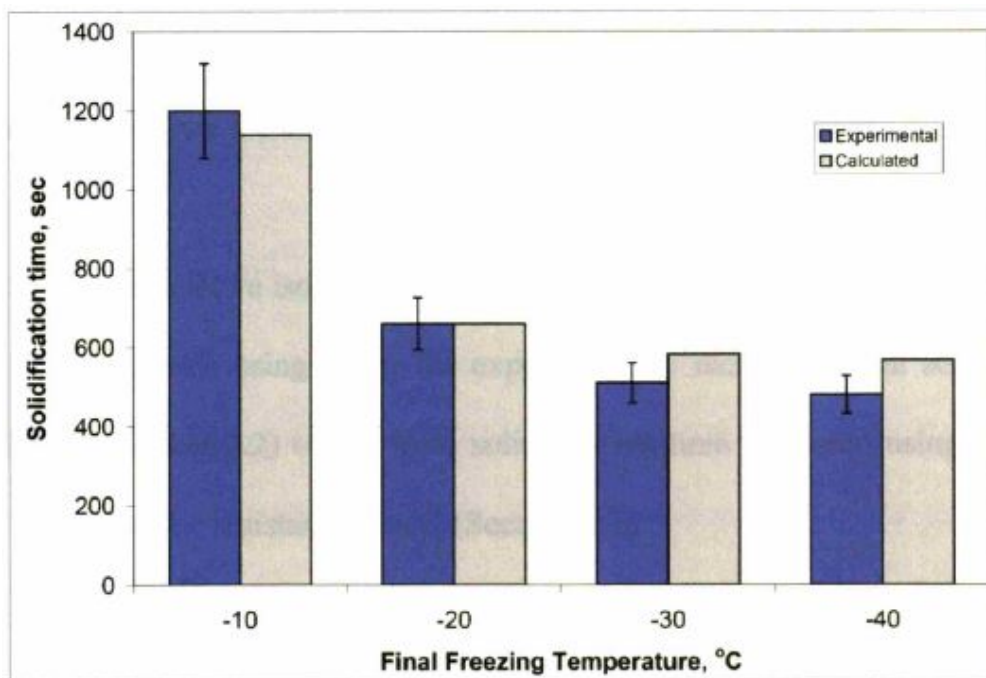
Εικόνα 17: Μοντέλο μεταφοράς θερμότητας κατά τη λυοφιλοποίηση ικριωμάτων πάχους 3mm σε καλούπια (Harley, 2006)

Η Εικόνα 17 παρουσιάζει ένα απλό μοντέλο μεταφοράς θερμότητας (Harley, 2006) που θεωρεί μονοδιάσταση αγωγή θερμότητας από το βιοϋλικό προς το ράφι του λυοφιλοποιητή μέσω του καλούπιού κατά τον κατακόρυφο άξονα. Η ροές θερμότητας από το καλούπι προς τον αέρα και από το βιοϋλικό προς τον αέρα μπορούν να αμεληθούν. Το μοντέλο μελετά τη διαδικασία αλλαγής φάσης του νερού στο εναιώρημα από υγρό σε στερεό και λαμβάνει υπόψη την μετατόπιση του μετώπου στερεοποίησης από τον πάτο του βιοϋλικού ως την πάνω επιφάνειά του. Σκοπός του μοντέλου ήταν η μελέτη της επίδρασης του ρυθμού ψύξης και της τελικής θερμοκρασίας ψύξης στο μέσο μέγεθος των πόρων. Τα πειράματα όντως έδειξαν ότι ο ρυθμός ψύξης επιδρά στο μέγεθος των πόρων του ικριώματος μέσω μιας αντιστρόφως ανάλογης σχέσης, δηλαδή όσο μειώνεται ο ρυθμός ψύξης, τόσο αυξάνεται το μέσο μέγεθος των πόρων του ικριώματος, Εικόνα 18.

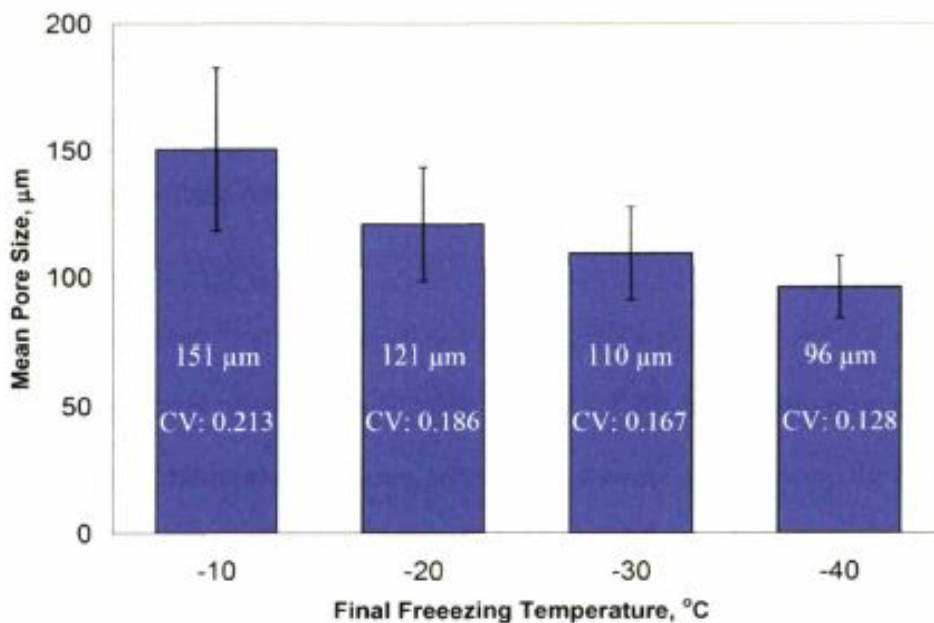


Εικόνα 18: Επίδραση του ρυθμού ψύξης κατά τη λυοφιλοποίηση στο μέσο μέγεθος των πόρων ικριωμάτων CG πάχους 3mm (Harley, 2006)

Στην Εικόνα 19 φαίνονται τα πειραματικά και αναλυτικά αποτελέσματα για την διάρκεια της στερεοποίησης του εναιωρήματος για ρυθμό ψύξης $1.4\text{ }^{\circ}\text{C}/\text{min}$ και διάφορες τελικές θερμοκρασίες ψύξης. Τα πειράματα αυτά έδειξαν ότι το απλό μοντέλο της Εικόνα 17 μπορούσε να εκτιμήσει την διάρκεια στερεοποίησης με ικανοποιητική ακρίβεια. Στην Εικόνα 20 φαίνεται η επίδραση της τελικής θερμοκρασίας ψύξης στο μέσο μέγεθος πόρων του παραγόμενου ικριώματος, για ρυθμό ψύξης $1.4\text{ }^{\circ}\text{C}/\text{min}$. Τα πειράματα έδειξαν ότι όσο μειώνεται η τελική θερμοκρασία ψύξης, τόσο μειώνεται ο χρόνος πλήρους στερεοποίησης και το μέσο μέγεθος των πόρων στο ικρίωμα.

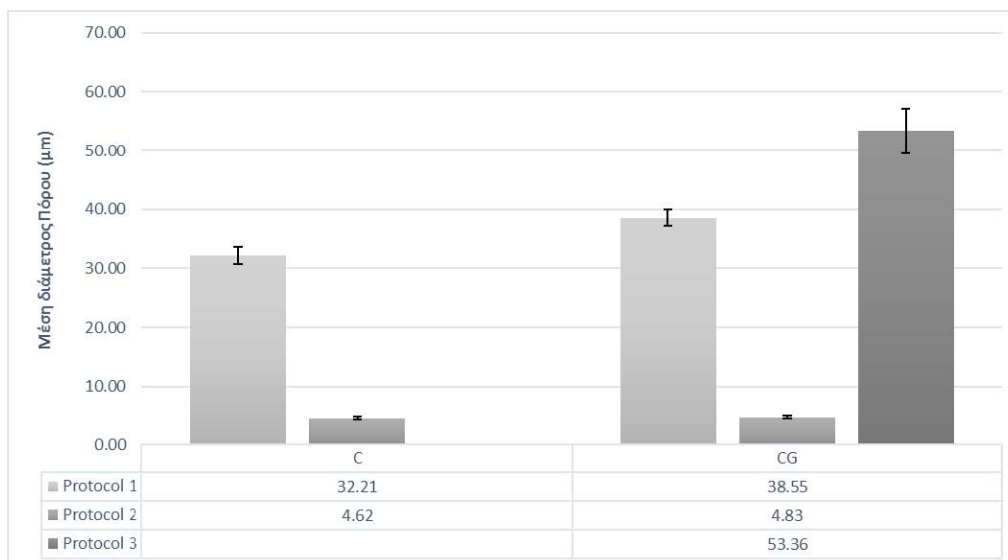


Εικόνα 19: Υπολογισμένοι αναλυτικά και μετρημένοι από πειράματα χρόνοι πλήρους στερεοποίησης του εναιωρήματος για ρυθμό ψύξης $1.4\text{ }^{\circ}\text{C}/\text{min}$ και για 4 διαφορετικές τελικές θερμοκρασίες ψύξης (εναιώρημα CG, πάχους 3mm). (Harley, 2006)



Εικόνα 20: Επίδραση της τελικής θερμοκρασίας ψύξης στο μέσο μέγεθος πόρων του εναιωρήματος για ρυθμό ψύξης 1.4 °C/min και για 4 διαφορετικές τελικές θερμοκρασίες ψύξης (εναιώρημα CG, πάχους 3mm). (Harley, 2006)

Οι εργασίες της Μ. Σαρκίρη και του Θ. Ιορδανίδη (Σαρκίρη, 2016; Ιορδανίδη, 2017) προσπάθησαν να βελτιστοποιήσουν το ρυθμό ψύξης και την τελική θερμοκρασία ψύξης για την περίπτωση λυοφιλοποίησης λεπτών ικριωμάτων κολλαγόνου πάνω σε γυαλιά μικροσκοπίας, με στόχο την επίτευξη ομοιόμορφου μεγέθους πόρων μέσης διαμέτρου τουλάχιστον 50 μm. Επιπλέον μελέτησαν την επίδραση ανόπτησης στο μέσο μέγεθος των πόρων. Χρησιμοποίησαν εναιωρήματα βιοϋλικών που βρίσκονται πάνω σε γυαλιά μικροσκοπίας, τα οποία τοποθετούνται πάνω σε μια πλάκα ανοξείδωτου χάλυβα πάχους 3 mm, η οποία τοποθετείται πάνω στο ράφι του λυοφιλοποιητή. Δοκιμάστηκαν τρία πρωτόκολλα (Εικόνα 21), ένα από τα οποία προσδίδει μέσο μέγεθος πόρων σε ικρίωματα C και CG πάνω από 32 μm και ένα άλλο προσδίδει μέσο μέγεθος πόρων σε ικρίωματα CG πάνω από 50 μm.

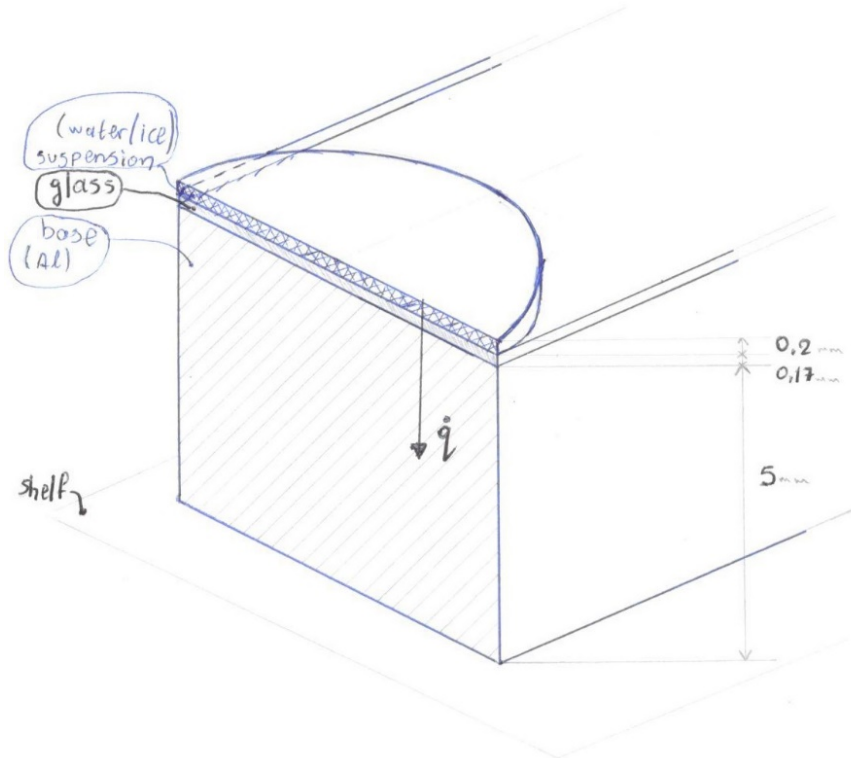


Εικόνα 21: Επίδραση τριών (3) διαφορετικών θερμοκρασιακών προφίλ στο μέσο μέγεθος πόρων λεπτών ικριωμάτων κολλαγόνου (C) και κολλαγόνου-γλυκοζαμινογλυκανών (CG)

Τα αποτελέσματα ήταν σαφώς βελτιωμένα και αρκετά ικανοποιητικά, γι' αυτό και το πρωτόκολλο που αποφασίστηκε να χρησιμοποιείται για την παρασκευή λεπτών πορώδων ικριωμάτων στο *Εργαστήριο Συστημικής Βιολογίας και Εμβιομηχανικής (protocol 1)* αποτελείται από τα εξής βήματα:

1. Ψύξη έως την θερμοκρασία $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ με ρυθμό $0.92\text{ }^{\circ}\text{C}/\text{min}$
2. Ανόπτηση για 2 h στην θερμοκρασία $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$
3. Ταχεία ψύξη έως την θερμοκρασία $-45\text{ }^{\circ}\text{C}$
4. Αφυδάτωση

Στην παρούσα εργασία δημιουργήθηκε ένα μοντέλο ανάλυσης μεταφοράς θερμότητας για να μελετηθεί η επίδραση της υπό σχεδιασμό ιδιοσυσκευής στη μεταφορά θερμότητας κατά την στερεοποίηση του εναιωρήματος. Αμελήθηκαν φαινόμενα ακτινοβολίας και συναγωγής. Το μοντέλο θεωρεί μία ροή θερμότητας λόγω αγωγής από το βιοϋλικό προς το ράφι (κατακόρυφα προς τα κάτω) μέσω των γυαλιών μικροσκοπίας και της βάσης τους (μονοδιάστατη ανάλυση). Εδώ αξίζει να σημειωθεί ότι θεωρήθηκε πως το εναιώρημα έχει ομοιόμορφο πάχος και πως το μέτωπο στερεοποίησης κατά την αλλαγή φάσης έχει κατακόρυφη κατεύθυνση από την κάτω επιφάνειά του προς την πάνω επιφάνειά του. Οπτική παρατήρηση της διαδικασίας, ωστόσο, έδειξε πως το μέτωπο αλλαγής φάσης ξεκινάει από την περίμετρο και πηγαίνει ακτινικά προς το κέντρο του εναιωρήματος. Στην Εικόνα 22 φαίνονται τα στρώματα που εισάγουν θερμικές αντιστάσεις και θερμοχωρητικότητες στο μοντέλο.



Εικόνα 22: Μοντέλο μονοδιάστατης μεταφοράς θερμότητας από το βιοϋλικό προς το ράφι (ψύξη)

Οι εξισώσεις που διέπουν την αγωγή θερμότητας και την θερμοχωρητικότητα είναι:

$$q = k \cdot A \cdot \frac{\Delta T}{b} \quad (22)$$

$$\frac{dT}{dt} = \frac{1}{C} \cdot q \quad (23)$$

Όπου q είναι η ροή θερμότητας [W], k είναι η θερμική αγωγιμότητα (thermal conductivity) [$W/m \cdot K$], T είναι η θερμοκρασία [K], b είναι το πάχος ενός υλικού [m], και C είναι η θερμοχωρητικότητα (heat capacity)

$[J/K]$. Για κάθε στρώμα υλικού πάχους b η θερμοχωρητικότητα C και η θερμική αντίσταση R (thermal resistance) $[K/W]$ λόγω αγωγής υπολογίζονται ως:

$$C = c \cdot \rho \cdot V = c \cdot \rho \cdot b \cdot A \quad (24)$$

$$R = \frac{b}{k \cdot A} \quad (25)$$

Όπου c είναι η ειδική θερμοχωρητικότητα (specific thermal capacity) $[J/kg \cdot K]$, ρ είναι η πυκνότητα του υλικού $[kg/m^3]$, $V = b \cdot A$ είναι ο όγκος του υλικού $[m^3]$, και A είναι η επιφάνεια συναλλαγής θερμότητας $[m^2]$. Έτσι, οι εξισώσεις (22) και (23) γίνονται:

$$q = \frac{1}{R} \cdot T \quad (26)$$

$$\frac{dT}{dt} = \frac{1}{C} \cdot q \quad (27)$$

Η διαδικασία της μεταφοράς θερμότητας στο σύστημα μοντελοποιήθηκε αρχικά μέσω των γραμμικών γράφων που παρουσιάζει η Εικόνα 23 και η Εικόνα 24. Ως είσοδος του συστήματος θεωρείται η θερμοκρασία του ραφίου $T_{sh}(t)$, η οποία καθορίζεται από τον χρήστη. Οι 4 μεταβλητές κατάστασης του συστήματος είναι:

T_b : μέση θερμοκρασία της βάσης (base) αλουμινίου (στο μέσο του πάχους της βάσης)

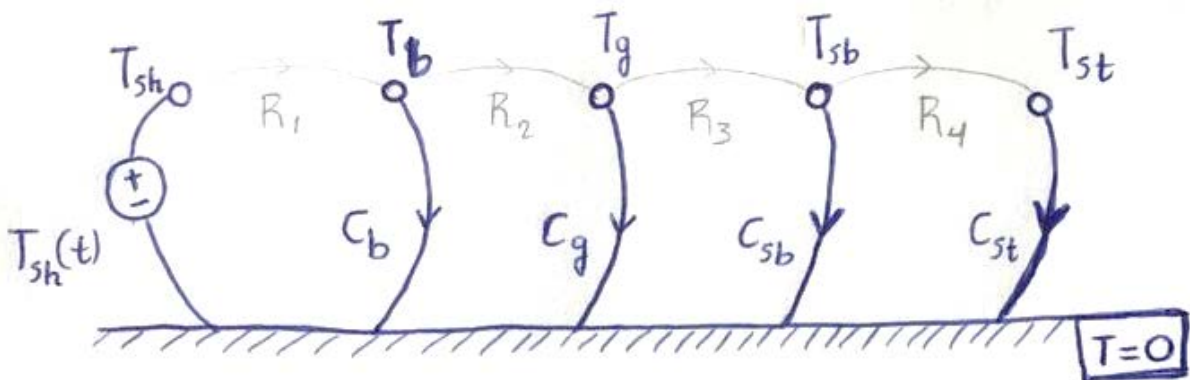
T_g : μέση θερμοκρασία του γυαλιού μικροσκοπίας (borosilicate glass) (στο μέσο του πάχους του γυαλιού)

T_{sb} : θερμοκρασία της κάτω επιφάνειας του εναιωρήματος (suspension bottom)

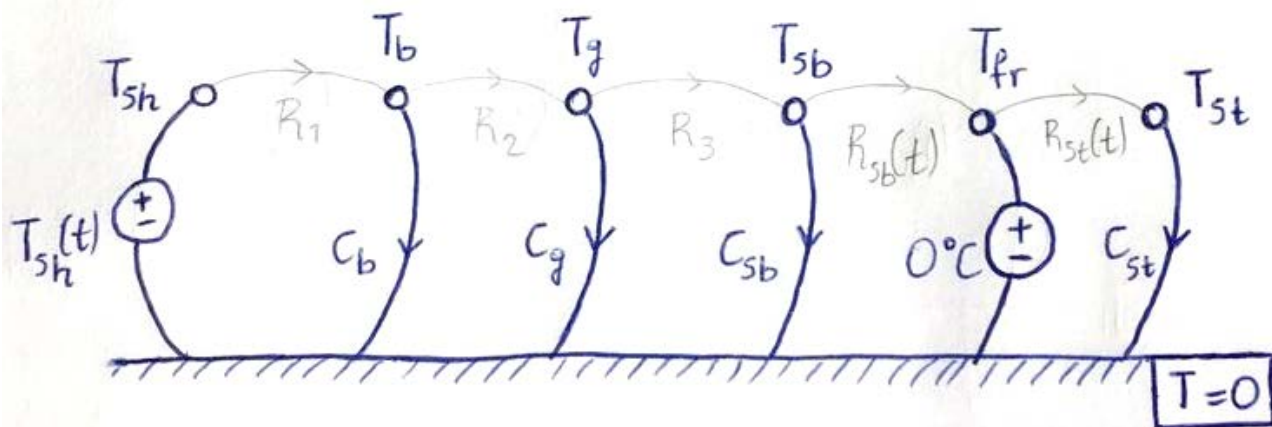
T_{st} : θερμοκρασία της πάνω επιφάνειας του εναιωρήματος (suspension top)

Καταστρώθηκαν 3 μοντέλα, ένα για κάθε μια κατάσταση του εναιωρήματος κατά την στερεοποίηση:

1. Ένα μοντέλο για όσο το εναιώρημα βρίσκεται σε απολύτως υγρή φάση ("liquid")
2. Ένα μοντέλο για όσο διαρκεί η αλλαγή φάσης του εναιωρήματος από υγρό σε στερεό ("freezing")
3. Ένα μοντέλο για όσο το εναιώρημα βρίσκεται σε απολύτως στερεή φάση ("solid").



Εικόνα 23: Κανονικό δένδρο (μπλε γραμμή) και δεσμοί (γκρι γραμμή) για το μοντέλο αγωγής θερμότητας για τις φάσεις της μοντελοποίησης απολύτως υγρού (1) και απολύτως στερεού (3) εναιωρήματος



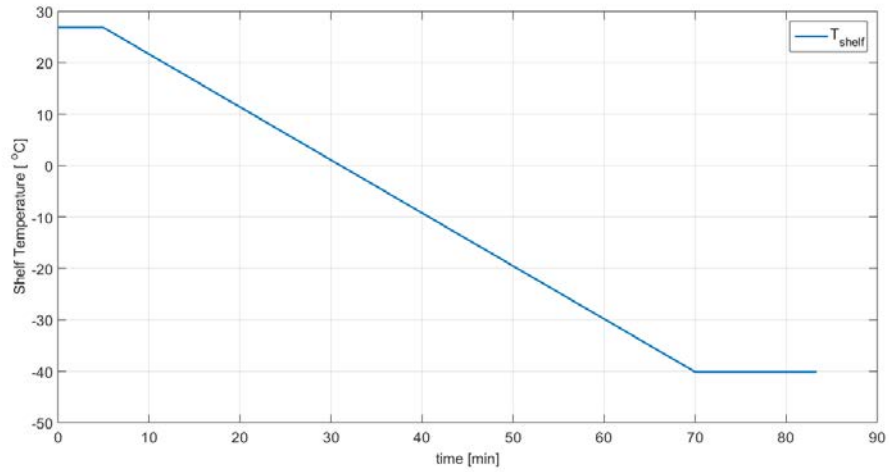
Εικόνα 24: Κανονικό δένδρο (μπλε γραμμή) και δεσμοί (γκρι γραμμή) για το μοντέλο αγωγής θερμότητας για τη φάση της μοντελοποίησης της αλλαγής φάσης του εναιωρήματος από υγρό σε στερεό (2)

Στα μοντέλα (1) και (3) το εναιώρημα βρίσκεται σε απολύτως υγρή ή απολύτως στερεή κατάσταση, υπάρχει μία σταθερή αντίσταση ανάμεσα στη θερμοκρασία της κάτω και της πάνω επιφάνειας του εναιωρήματος. Αντίθετα, κατά την αλλαγή φάσης το πάχος της υγρής και της στερεής φάσης μεταβάλλονται. Αρχικά όλο το εναιώρημα είναι υγρό, στη συνέχεια στερεοποιείται η κάτω επιφάνειά του, μετά η αμέσως πιο πάνω και έτσι το μέτωπο στερεοποίησης προχωράει προς τα πάνω. Για το λόγο αυτό εισάγεται μία μεταβλητή $y \in [0,1]$ που είναι το πάχος της στερεάς φάσης ανηγμένο ως προς το συνολικό πάχος του εναιωρήματος. Η τιμή $y = 0$ αντιστοιχεί στην εκκίνηση της αλλαγής φάσης (απολύτως υγρό) και η τιμή $y = 1$ στο πέρας (απολύτως στερεό). Η στερεοποίηση είναι μια εξώθερμη φυσική διεργασία, όπου το νερό έχει λανθάνουσα ειδική θερμότητα $E_{lw} = 333550 \text{ J/kg}$. Η θερμότητα που εκλύεται κατά την αλλαγή φάσης μοντελοποιείται ως μια πηγή θερμοκρασίας 0°C στη διεπιφάνεια υγρού και στερεού (όπως φαίνεται στο γραμμικό γράφο της Εικόνα 24). Ο υπολογισμός των τιμών των θερμικών αντιστάσεων $R_1, R_2, R_3, R_4, R_{sb}, R_{st}$ και των θερμοχωρητικότητας C_b, C_g, C_{sb}, C_{st} έγινε με βάση τα φυσικά χαρακτηριστικά των υλικών από τις σχέσεις (24) και (25). Οι υπολογισμοί παρουσιάζονται στο Παράρτημα Α, μαζί με την περιγραφή της μοντελοποίησης στο εργαλείο Simulink του Matlab.

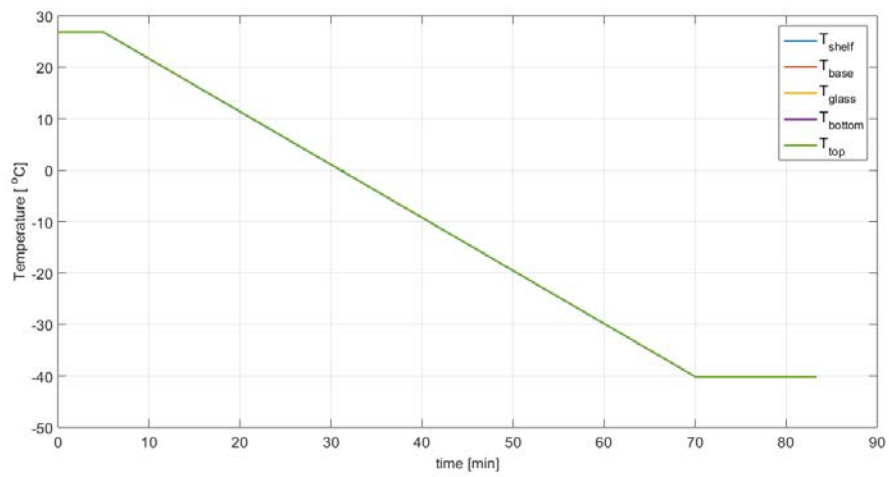
Προσομοίωση στερεοποίησης

Αρχικά έγινε μια προσομοίωση θεωρώντας σαν θερμοκρασία του ραφίου λυοφιλοποιητή $T_{sh}(t)$ το προφίλ της Εικόνα 25 για να εκτιμηθεί ο χρόνος στερεοποίησης του εναιωρήματος και η ροή θερμότητας ανά μονάδα εμβαδού προς το μέτωπο στερεοποίησης κατά την αλλαγή φάσης.

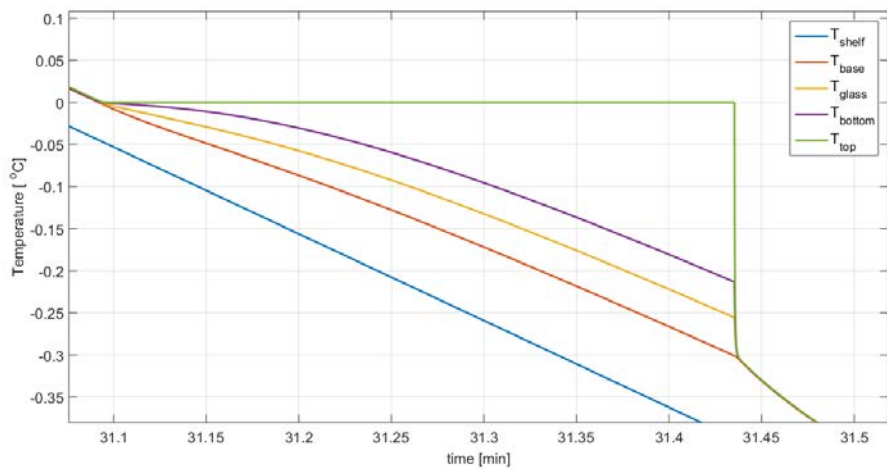
Η απόκριση του συστήματος φαίνεται στην Εικόνα 26 και στην Εικόνα 27 σε μεγέθυνση. Η προσομοίωση εκτίμησε την διάρκεια στερεοποίησης ως $\Delta T_{fr} = 20.55 \text{ sec}$. Από οπτικές παρατηρήσεις της λυοφιλοποίησης λεπτών ΠΙΚ έχει προκύψει μια εκτίμηση της διάρκειας στερεοποίησης σε $8 - 12 \text{ sec}$. Αυτή η διαφορά, κατά πάσα πιθανότητα, οφείλεται στην υπόθεση ότι το μέτωπο στερεοποίησης στο μοντέλο έχει κατακόρυφη κατεύθυνση από την κάτω προς την πάνω επιφάνεια του εναιωρήματος. Αντίθετα, οπτική παρατήρηση της διαδικασίας δείχνει ότι το μέτωπο κινείται από την περίμετρο του εναιωρήματος προς το κέντρο.



Εικόνα 25: Θερμοκρασιακό προφίλ ως είσοδος στο ράφι για την εκτίμηση του χρόνου στερεοποίησης του εναιωρήματος



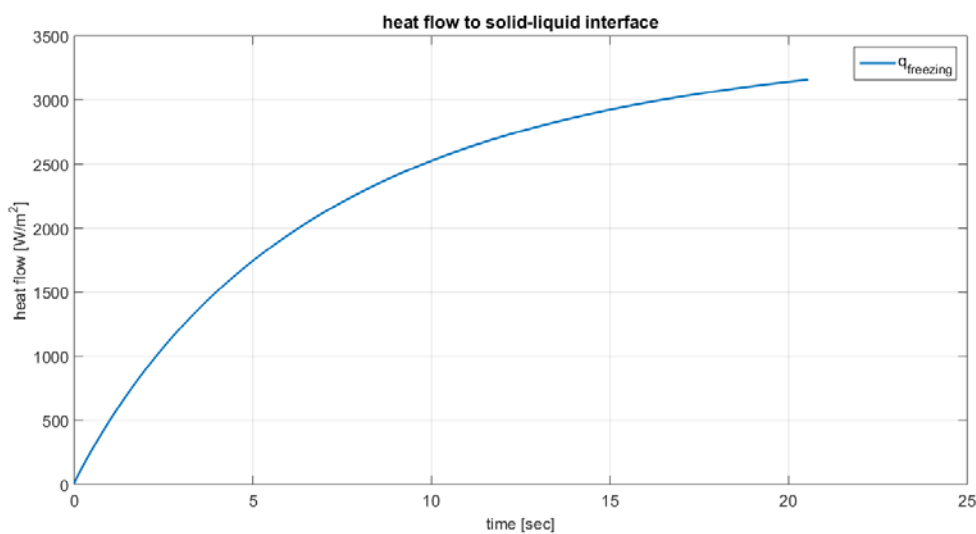
Εικόνα 26: Απόκριση θερμοκρασιών βάσης, γυαλιού, πάνω και κάτω επιφάνειας εναιωρήματος στην θερμοκρασία ραφίου της Εικόνα 25



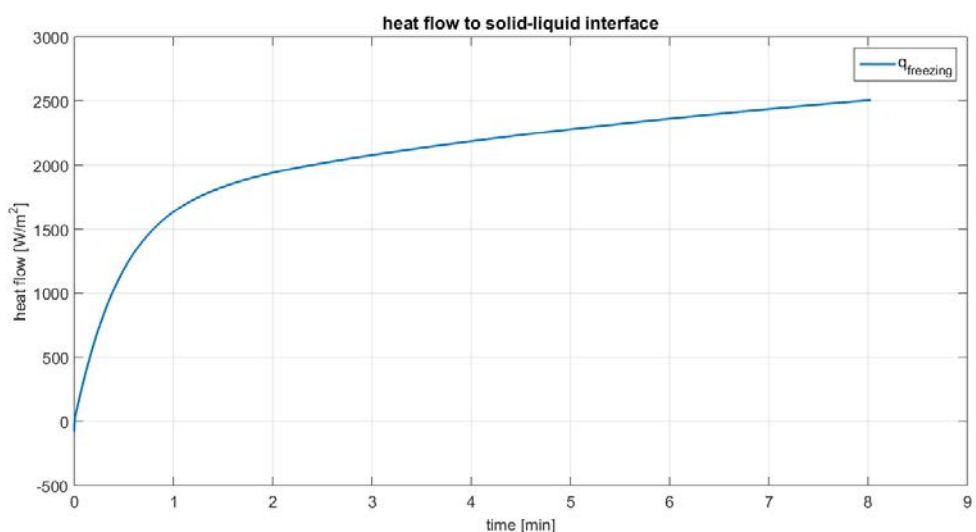
Εικόνα 27: Απόκριση θερμοκρασιών βάσης, γυαλιού, πάνω και κάτω επιφάνειας εναιωρήματος κατά την αλλαγή φάσης του εναιωρήματος (διάρκεια 20.55 sec). Λεπτομέρεια από την Εικόνα 26

Η ροή θερμότητας ανά μονάδα εμβαδού προς το μέτωπο στερεοποίησης από τα δύο μέρη του εναιωρήματος (υγρό και στερεό) κατά την αλλαγή φάσης παρουσιάζεται στην Εικόνα 28. Για σύγκριση παρατίθεται στην Εικόνα 29 το αντίστοιχο διάγραμμα ροής θερμότητας για την περίπτωση λυοφιλοποίησης κλασικών ικριωμάτων στο καλούπι από ανοξείδωτο χάλυβα του Harley. Όπως φαίνεται τις δύο εικόνες, στην περίπτωση του καλουπιού κλασικών ικριωμάτων η ροή θερμότητας από το στερεό μέρος του εναιωρήματος προς το μέτωπο στερεοποίησης αυξάνεται αρχικά και τελικά φτάνει την τιμή 2513.1 W/m^2 . Από την άλλη, στην περίπτωση της συσκευής για λεπτά ικριώματα η ροή θερμότητας αυξάνεται πιο ομοιόμορφα και φτάνει μέχρι την τιμή 3157.9 W/m^2 . Καθώς οι τιμές αυτές έχουν ίδια τάξη μεγέθους, αναμένεται ότι οι δύο διαδικασίες πρέπει να παρέχουν ικριώματα με παρόμοιο μέσο μέγεθος πόρων.

Τα αποτελέσματα των προσομοιώσεων προτείνουν ότι η απόκριση της συσκευής είναι ικανοποιητικά γρήγορη, πράγμα που σημαίνει ότι τα αποτελέσματα (χρόνος στερεοποίησης και τελικά μέγεθος πόρων) δε θα επηρεαστούν τόσο από τη συσκευή, όσο από τα πρωτόκολλα που θα χρησιμοποιηθούν.



Εικόνα 28: Ροή θερμότητας από τα δύο μέρη του εναιωρήματος (υγρό και στερεό) προς το μέτωπο στερεοποίησης κατά την αλλαγή φάσης του εναιωρήματος – συσκευή για λεπτά ικριώματα



Εικόνα 29: Ροή θερμότητας από τα δύο μέρη του εναιωρήματος (υγρό και στερεό) προς το μέτωπο στερεοποίησης κατά την αλλαγή φάσης του εναιωρήματος – καλούπι για παχιά ικριώματα του Harley

Επίδραση του πάχους της βάσης στο χρόνο στερεοποίησης

Με βάση το παραπάνω μοντέλο, δοκιμάστηκαν 11 διαφορετικές τιμές για το πάχος της βάσης και προέκυψαν οι χρόνοι πλήρους στερεοποίησης του εναιωρήματος. Τα αποτελέσματα φαίνονται στον Πίνακα 3. Επιβεβαιώνεται ότι το πάχος της βάσης δεν επιδρά σημαντικά στο χρόνο στερεοποίησης του εναιωρήματος, άρα ούτε και στο μέσο μέγεθος των πόρων του παραγόμενου ικρίωματος.

πάχος (mm)	χρόνος στερεοποίησης (sec)
0.5	20.69
1	20.68
3	20.61
5	20.55
10	20.39
15	20.28
20	20.20
25	20.17
30	20.16
35	20.19
40	20.22

Πίνακας 3: Επίδραση του πάχους της βάσης των γυαλιών στο χρόνο πλήρους στερεοποίησης του εναιωρήματος

Προσομοίωση 1D ΠΣ για υπολογισμό της σταθεράς χρόνου

Για να επιβεβαιωθούν τα βασικά ευρήματα από το παραπάνω απλό μοντέλο συγκεντρωμένων στοιχείων, χρησιμοποιήθηκε μια ανάλυση μονοδιάστατων (1D) πεπερασμένων στοιχείων (ΠΣ). Θεωρήθηκε ως διέγερση του συστήματος η θερμοκρασία του ραφιού και ως μεταβλητή ενδιαφέροντος η θερμοκρασία στην κάτω επιφάνεια του εναιωρήματος και υπολογίστηκε η χρονική σταθερά της κάθε συσκευής, ανεξάρτητα από το εναιώρημα και τη μοντελοποίηση της αλλαγής φάσης του.

Για το καλούπι του Harley για κλασικά παχιά ικρίωματα χρησιμοποιήθηκε ένα ΠΣ για να περιγράψει το πάχος του καλουπιού από ανοξείδωτο χάλυβα. Θεωρήθηκε συντελεστής θερμικής αγωγιμότητας $k_p = 16 \text{ W/m}\cdot\text{K}$, πάχος $t_p = 1.27 \text{ mm}$, ειδική θερμοχωρητικότητα $c_p = 500 \text{ J/kg}\cdot\text{K}$, πυκνότητα $\rho_p = 7700 \text{ kg/m}^3$ και εμβαδόν $A_p = 0.0156 \text{ mm}^2$.

Από την άλλη, για τη μελέτη της αλλαγής φάσης όταν τα γυαλιά βρίσκονται στην ιδιοσυσκευή της παρούσας εργασίας κατά την κατασκευή λεπτών ικριωμάτων χρησιμοποιήθηκαν 3 ΠΣ που αντιπροσωπεύουν το διάκενο μεταξύ του ραφιού και της βάσης των γυαλιών, τη βάση των γυαλιών από αλουμίνιο, και το γυαλί μικροσκοπίας. Οι τιμές των φυσικών χαρακτηριστικών και διαστάσεων των αντικειμένων φαίνονται στον Πίνακα 6 του Παραρτήματος Α. Συμπληρωματικά, αναφέρεται εδώ ότι η διεπιφάνεια έχει μηδενική θερμοχωρητικότητα. Οι υπολογισμοί των χρονικών σταθερών, καθώς και ο αντίστοιχος κώδικας Matlab, βρίσκονται στο Παράρτημα Α. Για το σύστημα με το καλούπι για κλασικά παχιά ικρίωματα, η χρονική σταθερά προέκυψε $\tau_{thick} = 0.388 \text{ sec}$. Για το σύστημα της συσκευής της παρούσας εργασίας για λεπτά ικρίωματα η χρονική σταθερά προέκυψε $\tau_{thin} = 5.015 \text{ sec}$. Παρατηρείται πως η χρονική σταθερά στη συσκευή για λεπτά ικρίωματα είναι μία τάξη μεγέθους μεγαλύτερη (πιο αργή) από αυτή στο καλούπι του

Harley. Αυτό οδηγεί στο συμπέρασμα ότι η συσκευή θα αργεί περισσότερο να αποκριθεί στις μεταβολές θερμοκρασίας στο ράφι. Ωστόσο, η τάξη μεγέθους της απόκρισης της συσκευής (5 sec) σε σχέση με τις θερμοκρασιακές μεταβολές στο ράφι (50 min) είναι κατά πάρα πολύ μικρότερη, που σημαίνει ότι στο εναιώρημα η θερμοκρασία θα εξισορροπείται πρακτικά άμεσα. Επομένως, τα θερμοκρασιακά προφίλ θα εφαρμόζονται στο εναιώρημα και θα δίνουν τα αναμενόμενα αποτελέσματα σχετικά με το μέγεθος των πόρων.

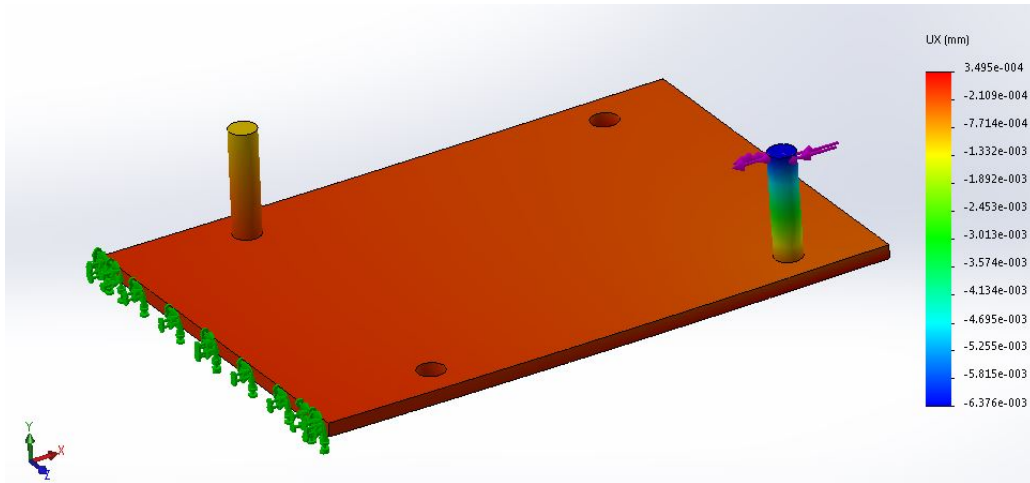
Γενικά συμπεράσματα

- Το μοντέλο συγκεντρωμένων στοιχείων αγωγής θερμότητας επαληθεύτηκε και από ανάλυση σε μονοδιάστατα ΠΣ.
- Το μικρό πάχος των ικριωμάτων βοηθάει στην πιο ομοιόμορφη ροή θερμότητας (χρονικά και χωρικά) κατά την αλλαγή φάσης, πράγμα που οδηγεί σε ομοιόμορφο μέγεθος πόρων στο παραγόμενο από τη λυοφιλοποίηση ικρίωμα.
- Η συσκευή έχει αρκετά καλή απόκριση, που δεν επηρεάζεται από τα επί μέρους κομμάτια της -και ιδιαίτερα από το πάχος της βάσης των γυαλιών που έχει τη μεγαλύτερη επίδραση σε σχέση με τα υπόλοιπα μέρη, στη χρονική απόκριση της συσκευής. Επομένως τα βελτιστοποιημένα πρωτόκολλα που αναπτύχθηκαν από τους Σαρκίρη και Ιορδανίδη μπορούν αν συνεχίσουν να χρησιμοποιούνται με ασφάλεια.
- Το πάχος της βάσης των γυαλιών αποφασίζεται να είναι τελικά 5 mm.
- Η πλήρης στερεοποίηση του εναιωρήματος εκτιμήθηκε ότι διαρκεί περίπου 20 sec.

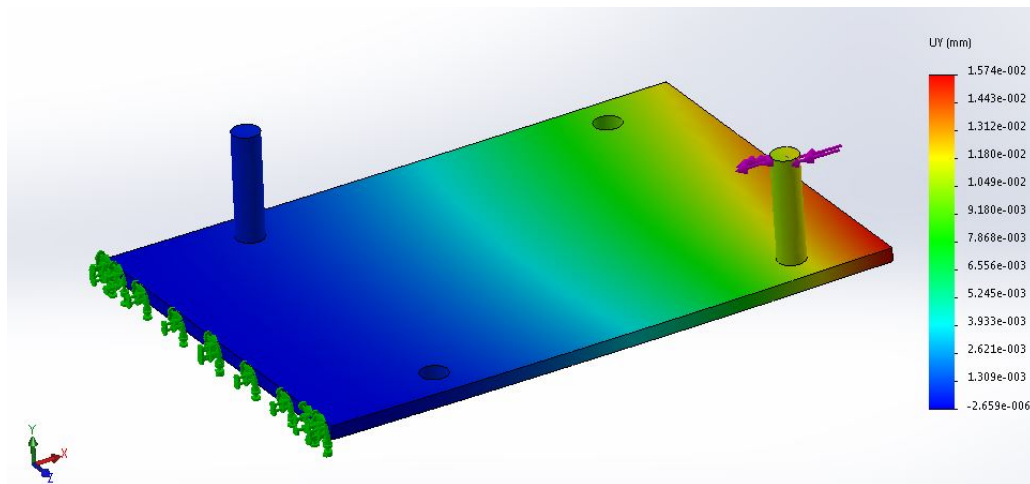
3.6. Ανάλυση στιβαρότητας βάσης πύρων - Διαστασιολόγηση της βάσης των πύρων.

Η οδήγηση των πύρων στις οπές τους απαιτεί μία ομοκεντρία στους άξονες των δύο και μία ευθύτητα στις κυλινδρικές επιφάνειες. Τυχαία φορτία που τυχόν θα ασκηθούν πάνω στους πύρους μπορεί να προκαλέσουν κάμψη στη βάση και στο σώμα των πύρων, επομένως γωνιακή απόκλιση του άξονά τους από αυτόν της οπής. Είναι ενδιαφέρον να εξεταστεί η στιβαρότητα του συστήματος βάση – πύροι απέναντι σε οριζόντια φορτία (στο επίπεδο XY) που ασκούνται στους πύρους. Για αυτό το λόγο εξετάστηκε υπολογιστικά ένα σενάριο φόρτισης μοναδιαίας δύναμης (1 N) στο πάνω μέρος του ενός απ' τους πύρους για 2 περιπτώσεις παχών της βάσης, έτσι ώστε να διαπιστωθεί πόσο μεταβάλλεται η στιβαρότητα με το πάχος. Οι τιμές για το πάχος της βάσης και το μήκος των πύρων επιλέχθηκε ώστε το ελεύθερο μήκος του πύρου να είναι το ίδιο. Έτσι τα ζεύγη πάχος βάσης – μήκος πύρων που επιλέχθηκαν είναι: 3mm - 26mm και 10mm – 33mm, και το ελεύθερο μήκος του πύρου είναι 23mm.

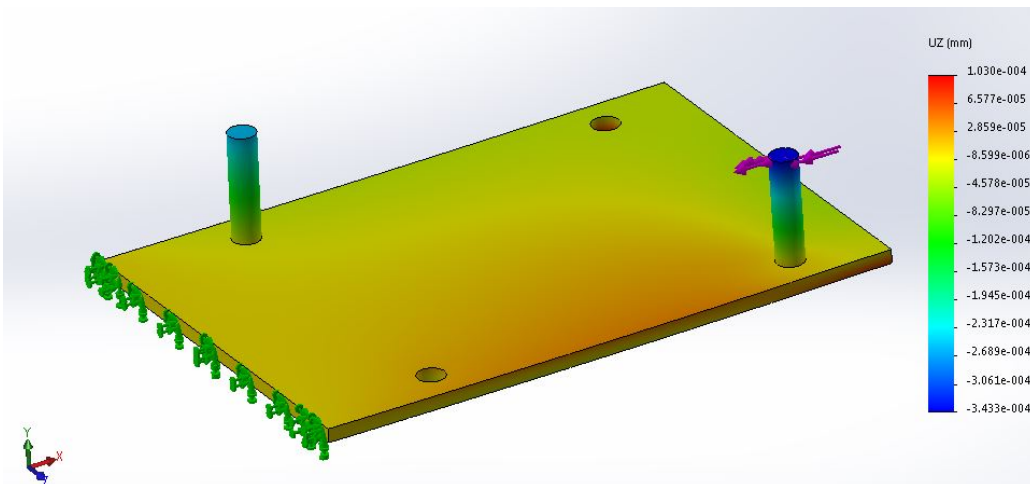
Η ανάλυση έγινε με το πρόγραμμα προσομοιώσεων του Solidworks. Θεωρήθηκε ότι η βάση πακτώνεται στη μία της πλευρά και το φορτίο ασκείται στο ανώτερο σημείο του πιο απομακρυσμένου πύρου κατά X. Τα οπτικά αποτελέσματα για τις προκύπτουσες μετατοπίσεις (displacement) στους 3 άξονες φαίνονται στις Εικόνα 30, Εικόνα 31, Εικόνα 32, Εικόνα 33, Εικόνα 34 και Εικόνα 35.



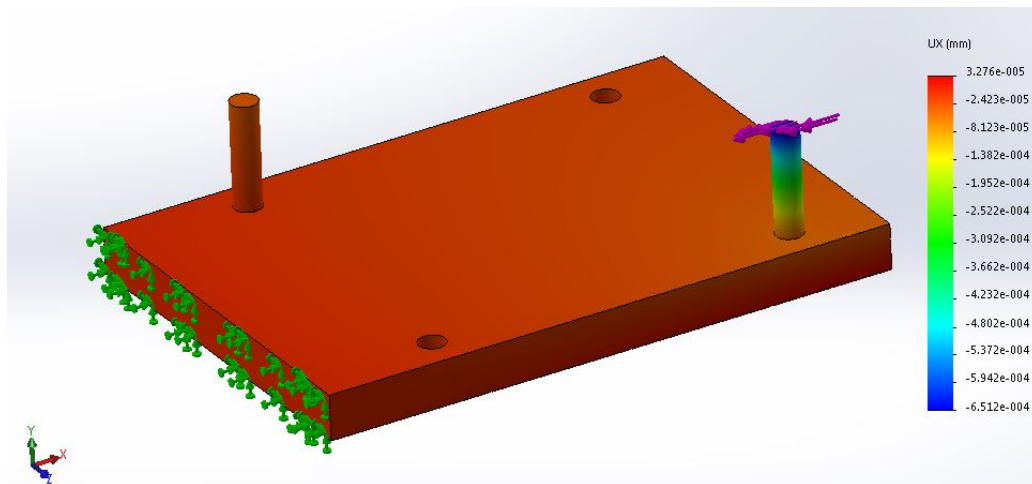
Εικόνα 30: Μετατόπιση σε mm κατά X για πλάκα πάχους 3 mm και πύρο μήκους 26 mm



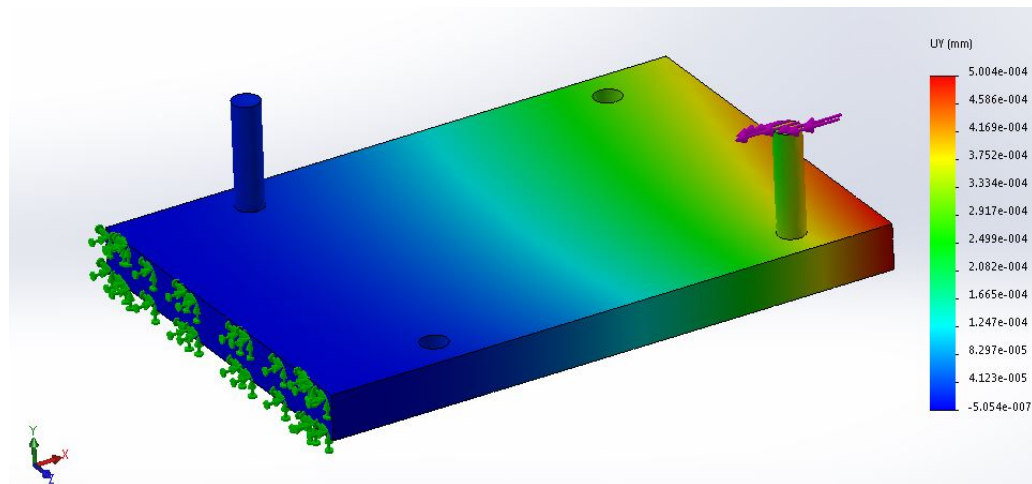
Εικόνα 31: Μετατόπιση σε mm κατά Y για πλάκα πάχους 3 mm και πύρο μήκους 26 mm



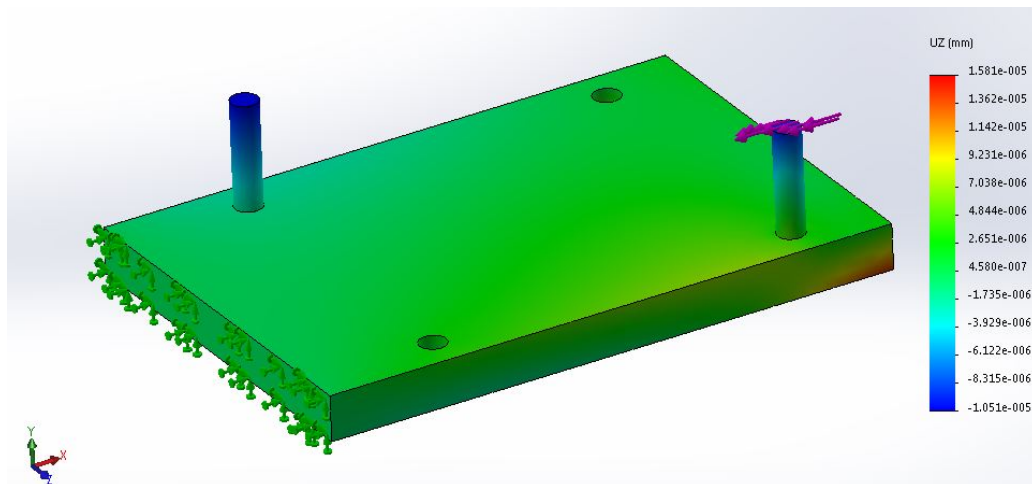
Εικόνα 32: Μετατόπιση σε mm κατά Z για πλάκα πάχους 3 mm και πύρο μήκους 26 mm



Εικόνα 33: Μετατόπιση σε mm κατά X για πλάκα πάχους 10 mm και πύρο μήκους 33 mm



Εικόνα 34: Μετατόπιση σε mm κατά Y για πλάκα πάχους 10 mm και πύρο μήκους 33 mm



Εικόνα 35: Μετατόπιση σε mm κατά Z για πλάκα πάχους 10 mm και πύρο μήκους 33 mm

Υπολογίστηκαν οι τιμές της μετατόπισης κατά X (mm) σε όλους τους κόμβους του πλέγματος και μετατράπηκαν σε γωνιακή μετατόπιση (μοίρες) με τον τύπο (28). Η γωνιακή μετατόπιση είναι ένα μέτρο για τη στιβαρότητα του συστήματος βάση – πύροι (όσο μικρότερη η γωνία φ , τόσο μεγαλύτερη η στιβαρότητα).

$$\varphi = \tan^{-1} \left(\frac{u_x^{bottom} - u_x^{top}}{l} \right) \quad (28)$$

Όπου u_x^{bottom} και u_x^{top} η μέση τιμή των μετατοπίσεων των κόμβων της κάτω και πάνω πλευράς του πύρου και l το μήκος του πύρου. Οι τιμές που εξήχθησαν από την προσομοίωση παρουσιάζονται στον Πίνακα 4. Παρατηρούμε ότι μειώνοντας το πάχος της βάσης από τα 10 mm στα 3 mm η στιβαρότητα μειώνεται πάνω από μία τάξη μεγέθους. Επιλέχθηκε πάχος 10 mm για τη βάση των πύρων.

	Βάση πάχους 3 mm	Βάση πάχους 10 mm
Μετατόπιση πάτου πύρου (u_x^{bottom}) (mm)	3.43E-04	3.26E-05
Μετατόπιση κορυφής πύρου (u_x^{top}) (mm)	-6.37E-03	-6.50E-04
φ (°)	0.014802	0.001186

Πίνακας 4: Γωνιακή μετατόπιση πύρου για μοναδιαίο φορτίο και 2 περιπτώσεις παχών της βάσης

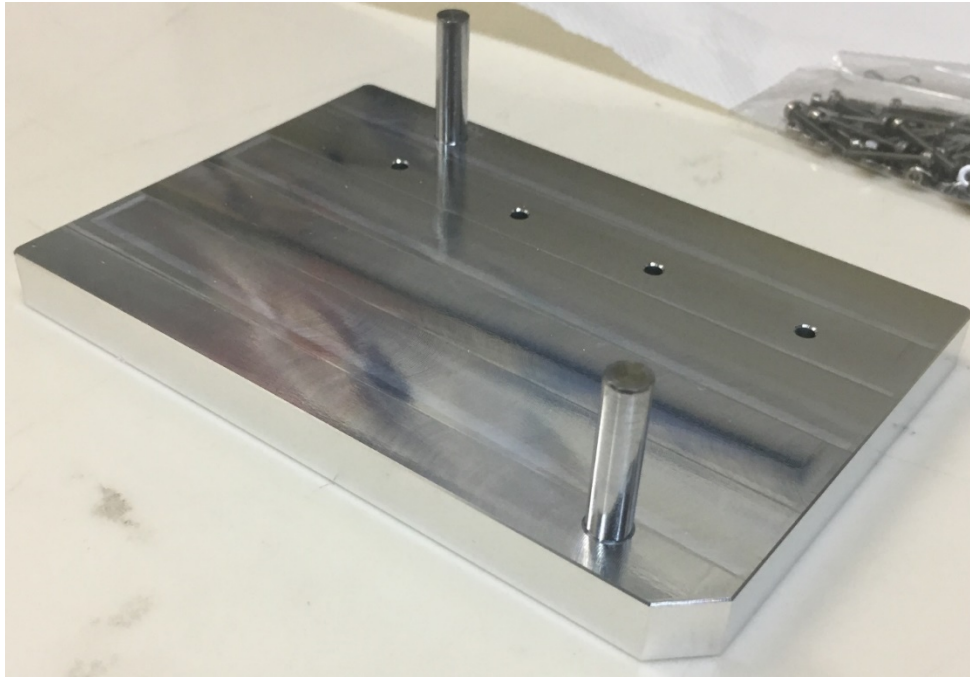
3.7. Λεπτομερής Μηχανολογικός Σχεδιασμός & Κατασκευή

Σε αυτό το εδάφιο θα περιγραφούν οι λεπτομέρειες που έδωσαν στην ιδιοσυσκευή την τελική της μορφή ως πρωτότυπο, καθώς και η μέθοδος κατασκευής τους.

Όπως έχει αναφερθεί, επιλέχθηκε ως υλικό κατασκευής των κομματιών της ιδιοσυσκευής το αλουμίνιο και των πύρων ο ανοξείδωτος χάλυβας. Όλα τα κομμάτια από αλουμίνιο κατεργάστηκαν σε φρέζα CNC στο μηχανουργείο του κου. Ιωάννη Αλεξόπουλου.

3.7.1. Βάση πύρων

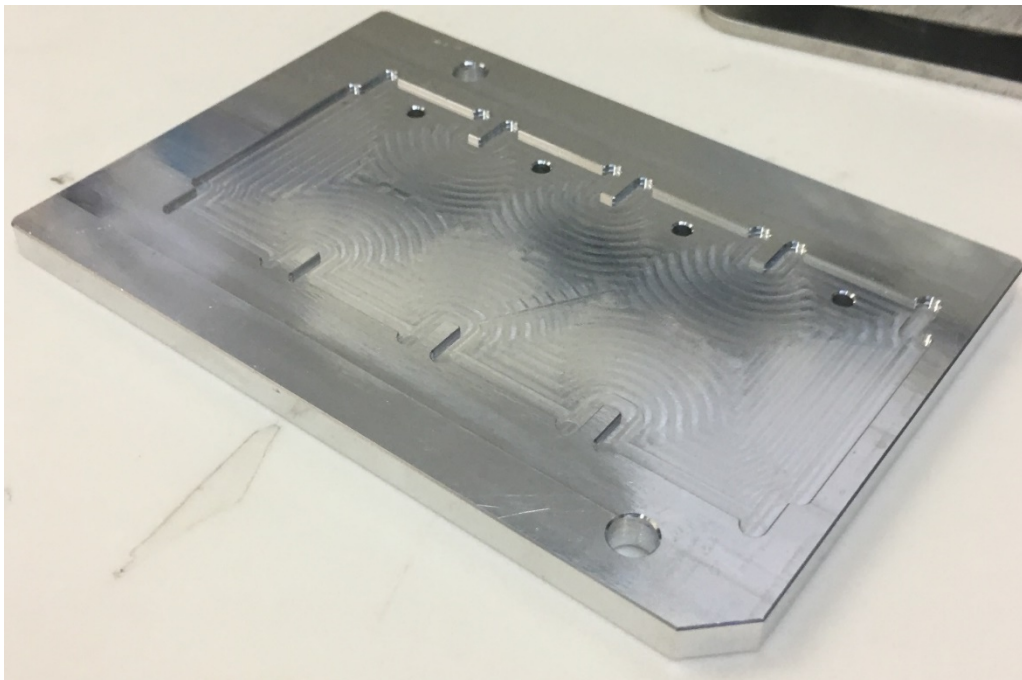
Η βάση των πύρων έχει πάχος 10 mm. Εκτός από τις δύο οπές για την είσοδο των πύρων, ανοίχθηκαν τέσσερις οπές για να βοηθήσουν στην απομάκρυνση των γυαλιών από τη βάση τους (υπάρχουν 4 αντίστοιχες οπές στις ίδιες θέσεις στη βάση των γυαλιών). Οι πύροι είναι σφηνωμένοι μόνιμα στη βάση με σφιχτή συναρμογή $\varnothing 6 \frac{M6}{g6}$.



Εικόνα 36: Βάση των πύρων

3.7.2. Βάση γυαλιών

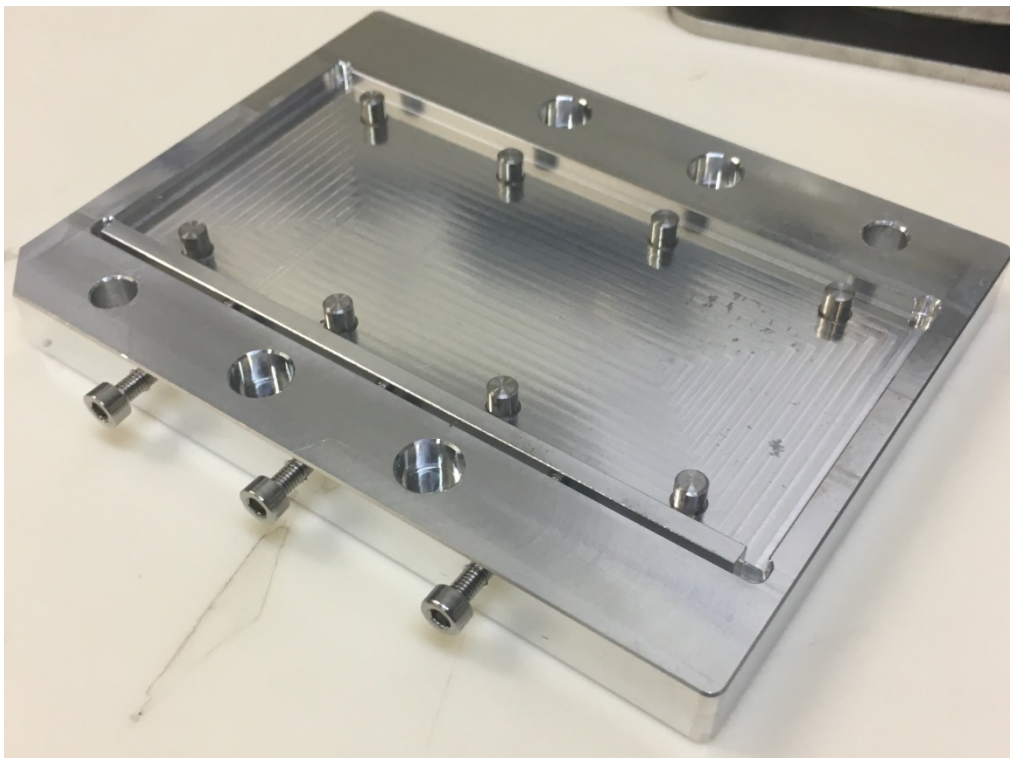
Ανοίχθηκαν τέσσερις οπές για στην απομάκρυνση των γυαλιών από τη βάση τους. Το φρεζάρισμα των ποκετών των γυαλιών έγινε με τις απαιτούμενες ανοχές θέσεις, διαστάσεων των πλευρών, αλλά και ποιότητας και επιπεδότητας επιφάνειας (στην Εικόνα 37 φαίνονται τα επιφανειακά ίχνη από το κοπτικό εργαλείο).



Εικόνα 37: Βάση των γυαλιών

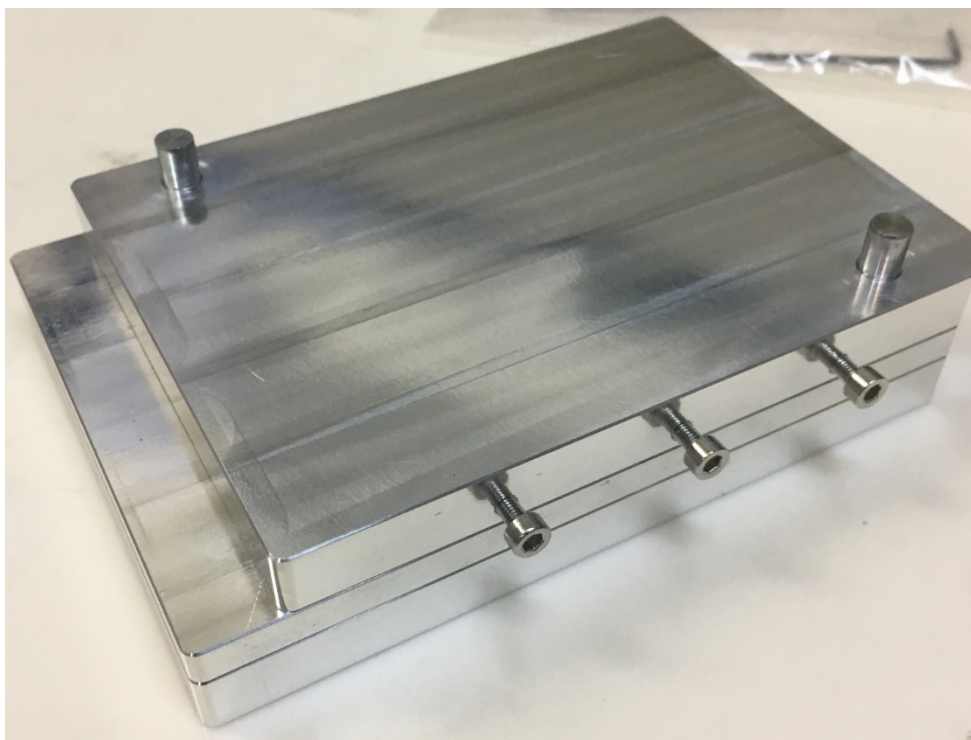
3.7.3. Βάση υπερκατασκευών PDMS

Το κόψιμο (chamfer) στην κάτω αριστερή γωνία της βάσης χρησιμεύει στον καθορισμό του σωστού προσανατολισμού της βάσης. Αυτό δείχνει τον τρόπο με τον οποίο πρέπει να αναποδογυρίσει η βάση και να οδηγηθεί στους δύο πύλους, ώστε να συναρμολογηθούν τα γυαλιά με τις υπερκατασκευές PDMS. Οι οκτώ (8) μικροί πύλοι είναι οι πύλοι οριοθέτησης των υπερκατασκευών (δύο για κάθε υπερκατασκευή) και είναι σφηνωμένοι μόνιμα στη βάση με σφιχτή συναρμογή $\varnothing 4 \frac{M6}{g6}$. Η πλάκα πίεσης των υπερκατασκευών θα ασκεί πίεση στις παράπλευρες επιφάνειες αυτών μέσω των τριών (3) κοχλιών M3. Το πάχος της είναι 3 mm. Οι τέσσερις (4) τυφλές οπές (counterbore) που φαίνονται στην Εικόνα 38 έγιναν για μελλοντικό design που ίσως θα περιλαμβάνει τέσσερις κοχλίες στη βάση των γυαλιών σε αντίστοιχες θέσεις και θα χρησιμεύουν για να «κρυφτούν» οι κεφαλές των κοχλιών αυτών όταν οι δύο βάσεις έρθουν σε επαφή κατά τη φάση της συναρμολόγησης γυαλιών – υπερκατασκευών PDMS. Η κεντρική ποκέτα βάθους 3mm δημιουργήθηκε ώστε οι πύλοι να βρίσκονται χαμηλότερα και να μην συγκρούονται με τη βάση των γυαλιών κατά τη συναρμολόγηση.



Εικόνα 38: Βάση των υπερκατασκευών PDMS

3.7.4. Συναρμολογημένη ιδιοσυσκευή



Εικόνα 39: Συναρμολογημένη ιδιοσυσκευή: κατά τη φάση της συναρμολόγησης γυαλιών – PDMS

4. Πειραματικός Χαρακτηρισμός Ιδιοσυσκευής

Εκτελέστηκαν δύο σειρές πειραμάτων ώστε να αξιολογηθεί η απόδοση και η επίδραση της ιδιοσυσκευής. Συγκεκριμένα, τα πειράματα απάντησαν δύο ερωτήσεις:

- *Επηρεάζει η παρουσία της ιδιοσυσκευής την ενεργοποίηση της επιφάνειας με plasma;*
- *Ποιά είναι η ακρίβεια της συναρμολόγησης των βοθρίων των υπερκατασκευών PDMS με τα ΠΙΚ πάνω στα γυαλιά που παρέχει η ιδιοσυσκευή;*

4.1. Επίδραση της ιδιοσυσκευής στην ενεργοποίηση των επιφανειών των γυαλιών με plasma

Τρία ($n = 3$) γυαλιά μικροσκοπίας (fisher scientific, Fisherbrand™ 12-544E) τοποθετήθηκαν στη βάση γυαλιών της ιδιοσυσκευής και αυτή με τη σειρά της στο θάλαμο του plasma etcher προς ενεργοποίηση των επιφανειών των τριών γυαλιών. Άλλα $n = 3$ ίδια γυαλιά χρησιμοποιήθηκαν ως control πείραμα, δηλαδή ενεργοποιήθηκαν στο θάλαμο του plasma etcher χωρίς χρήση της βάσης. Έξι (6) φύλλα PDMS πάχους 2mm τοποθετήθηκαν επίσης στο θάλαμο του plasma etcher προς ενεργοποίηση των επιφανειών τους. Για να διαπιστωθεί η επιτυχία ή αποτυχία του plasma etching, αμέσως μετά την έξοδό τους από το plasma etcher κάθε φύλλο PDMS ήρθε σε επαφή με ένα γυαλί και τους ασκήθηκε κάθετο φορτίο για 8 h. Στην συνέχεια αξιολογήθηκε αν τα γυαλιά κόλλησαν δυνατά με τα κομμάτια PDMS. Χρησιμοποιήθηκε το βελτιστοποιημένο πρωτόκολλο για plasma etching ατμοσφαιρικού αέρα (ισχύς Plasma 400 W, διάρκεια plasma 20 sec, πίεση θαλάμου 300 mTorr, (Ιορδανίδης, 2017))

Αποτελέσματα

- Όλα (100%) τα φύλλα PDMS κόλλησαν μόνιμα με τα γυαλιά στα τρία control δείγματα, δηλαδή χωρίς τη χρήση της ιδιοσυσκευής.
- Όλα (100%) τα φύλλα PDMS κόλλησαν μόνιμα με τα γυαλιά στα τρία δείγματα προς μελέτη, δηλαδή με χρήση της ιδιοσυσκευής.

Συμπεράσματα

- 1) Το γεγονός ότι τα control γυαλιά κόλλησαν στα κομμάτια PDMS επαληθεύουν ότι η διαδικασία ενεργοποίησης εκτελέστηκε σωστά.
- 2) Το γεγονός ότι τα γυαλιά που ενεργοποιήθηκαν πάνω στην βάση των γυαλιών κόλλησαν στα κομμάτια PDMS δείχνει ότι η βάση των γυαλιών δεν επιδρά αρνητικά στην ενεργοποίηση των επιφανειών των γυαλιών με plasma.

4.2. Επίδραση συναρμολόγησης γυαλιών – υπερκατασκευών PDMS με χρήση της ιδιοσυσκευής στο σφάλμα θέσης των βοθρίων ως προς τις θέσεις των ΠΙΚ

Για το πείραμα αυτό χρησιμοποιήθηκαν γυαλιά, στην επιφάνεια των οποίων προηγουμένως είχαν δημιουργηθεί με κατεργασία laser κυκλικοί δίσκοι διαμέτρου $\varnothing 6$ στις θεωρητικές θέσεις των ΠΙΚ, Εικόνα 6. Η ακρίβεια της κατεργασίας είναι της τάξης των νανομέτρων, οπότε θεωρήθηκε πως πρακτικά το σφάλμα θέσης τους πάνω στο γυαλί είναι μηδενικό.

Τρεις (3) υπερκατασκευές PDMS κολλήθηκαν με κόλλα στιγμής με τρία κατεργασμένα γυαλιά χωρίς τη χρήση της ιδιοσυσκευής, αποτελώντας τα control δείγματα. Τρεις υπερκατασκευές PDMS κολλήθηκαν με κόλλα στιγμής με τρία κατεργασμένα γυαλιά με χρήση της ιδιοσυσκευής, αποτελώντας τα δείγματα προς μελέτη. Στη συνέχεια τα δείγματα τοποθετήθηκαν στο JuliStage με σκοπό τη λήψη εικόνων και τη μέτρηση του σχετικού σφάλματος.

Για τη μέτρηση του σχετικού σφάλματος οι εικόνες που λήφθηκαν από το μικροσκόπιο εισήχθησαν σε πρόγραμμα επεξεργασίας εικόνας και για κάθε ζεύγος βοθρίου (well) – θεωρητικού ΠΙΚ (scaffold):

- λήφθηκαν οι συντεταγμένες σε pixels τεσσάρων ακραίων σημείων πάνω στα όρια κάθε κύκλου $A(x_A, y_A), B(x_B, y_B), \Gamma(x_\Gamma, y_\Gamma), \Delta(x_\Delta, y_\Delta)$, όπως φαίνεται στα παραδείγματα στις Εικόνα 40 και Εικόνα 41,
- υπολογίστηκαν οι συντεταγμένες του κέντρου κάθε κύκλου $K(x_K, y_K)$:

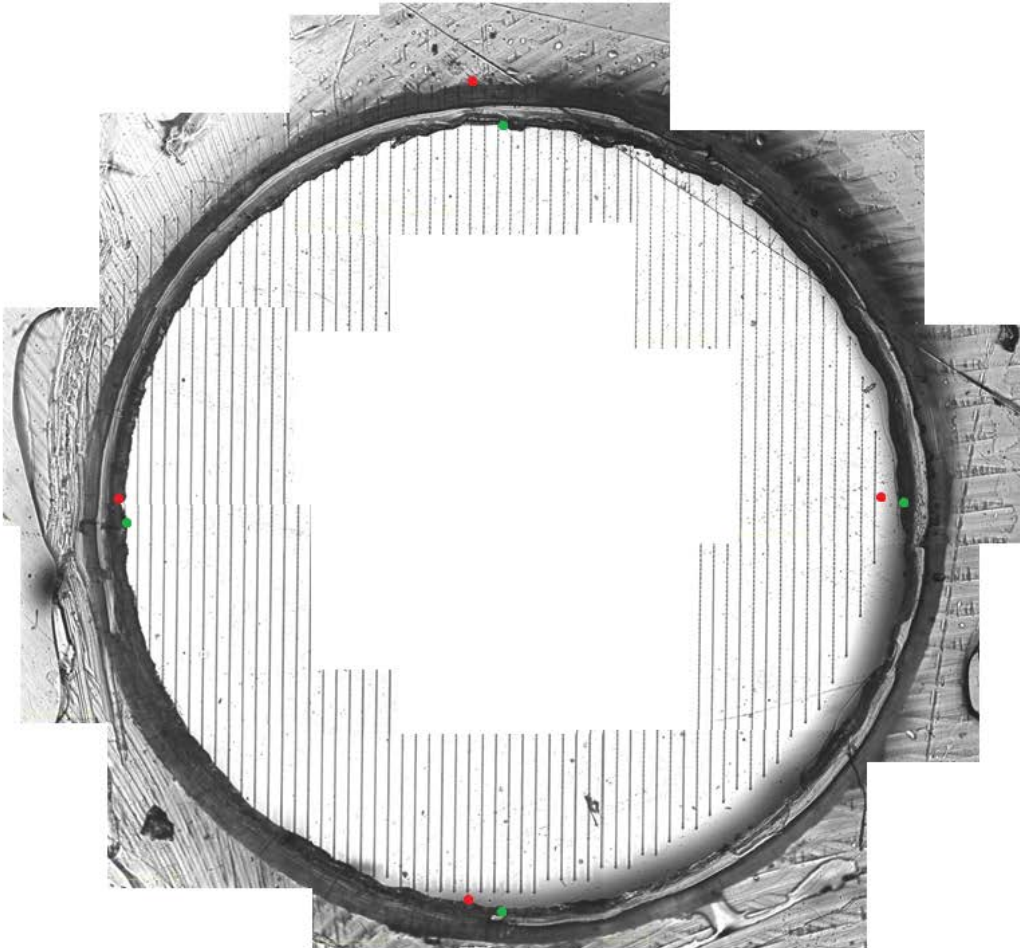
$$x_K = \frac{x_A + x_B + x_\Gamma + x_\Delta}{4} \quad (29)$$

$$y_K = \frac{y_A + y_B + y_\Gamma + y_\Delta}{4} \quad (30)$$

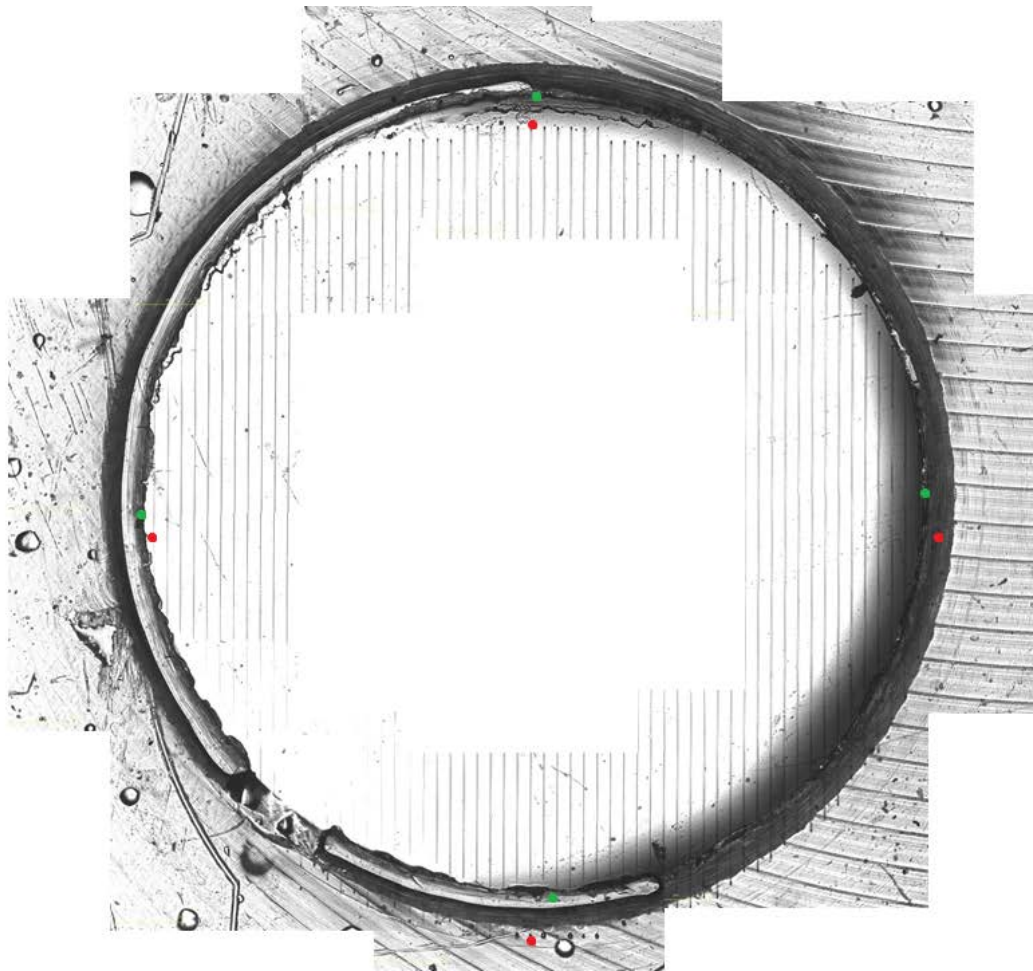
- και υπολογίστηκε η γεωμετρική απόσταση μεταξύ των δύο κύκλων (εκκεντρότητα), η οποία αποτελεί και το σχετικό σφάλμα θέσης μεταξύ των δύο κύκλων:

$$\varepsilon = \sqrt{(x_K^{well} - x_K^{scf})^2 + (y_K^{well} - y_K^{scf})^2} \quad (31)$$

- με βάση την κλίμακα από τις εικόνες του μικροσκοπίου υπολογίστηκε το μέγεθος του pixel και μετατράπηκαν οι μονάδες της εκκεντρότητας σε μm.



Εικόνα 40: Εικόνα από το μικροσκόπιο JuliStage για ένα βοθρίο από τα control δείγματα. Οι κατακόρυφες γραμμές σκιαγραφούν τον κυκλικό δίσκο που προσομοιώνει το θεωρητικό ΠΙΚ πάνω στο γυαλί. Ο εξωτερικός, σκούρος κύκλος είναι η περίμετρος του κύκλου του βοθρίου της υπερκατασκευής PDMS. Με κόκκινο σημειώθηκαν τα σημεία δειγματοληψίας για τη μέτρηση της εκκεντρότητας πάνω στο όριο του θεωρητικού ΠΙΚ και με πράσινο τα σημεία δειγματοληψίας πάνω στο όριο του βοθρίου.



Εικόνα 41: Εικόνα από το μικροσκόπιο JuliStage για ένα βοθρίο από τα δείγματα προς μελέτη. Οι κατακόρυφες γραμμές σκιαγραφούν τον κυκλικό δίσκο που προσομοιώνει το θεωρητικό ΠΙΚ πάνω στο γυαλί. Ο εξωτερικός, σκούρος κύκλος είναι η περίμετρος του κύκλου του βοθρίου της υπερκατασκευής PDMS. Με κόκκινο σημειώθηκαν τα σημεία δειγματοληψίας για τη μέτρηση της εκκεντρότητας πάνω στο όριο του θεωρητικού ΠΙΚ και με πράσινο τα σημεία δειγματοληψίας πάνω στο όριο του βοθρίου.

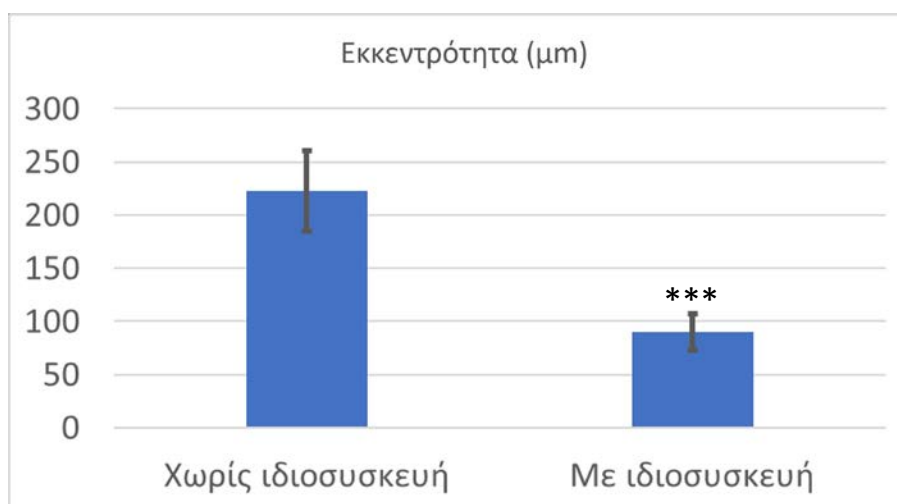
Ο Πίνακας 5 και η Εικόνα 42 παρουσιάζουν τα σφάλματα θέσης (εκκεντρότητα) για κάθε ένα από τα 8 βοθρία των 3 συσκευών κάθε πειραματικής ομάδας (χωρίς ή με την χρήση της ιδιοσυσκευής). Επίσης παρουσιάζει την μέση τιμή και την τυπική απόκλιση ανά συσκευή και ανά πειραματική ομάδα. Η μέση τιμή του σφάλματος θέσης σε ένα πηγάδι εκτιμάται ως $222.6 \pm 37.9 \mu\text{m}$ χωρίς τη χρήση της ιδιοσυσκευής και $90.5 \pm 17.0 \mu\text{m}$ με τη χρήση της ιδιοσυσκευής (μέση τιμή \pm σφάλμα μέσης τιμής). Μέσω ενός στατιστικού t-τεστ, αποδεικνύεται ότι η διαφορά αυτή είναι στατιστικά σημαντική σε επίπεδο σημαντικότητας 0.5% ($P=0.003269$, t-Test).

Συμπεράσματα

- Η χρήση της ιδιοσυσκευής μειώνει σημαντικά το σχετικό σφάλμα θέσης (εκκεντρότητα) των βοθρίων των υπερκατασκευών PDMS με τις θέσεις των ΠΙΚ πάνω στα γυαλιά σε σχέση με την υπάρχουσα πρακτική από $222.6 \pm 37.9 \mu\text{m}$ σε $90.5 \pm 17.0 \mu\text{m}$.
- Το σχετικό σφάλμα θέσης που παρέχει η ιδιοσυσκευή ικανοποιεί την προδιαγραφή που είχε τεθεί αρχικά σαν στόχος (σφάλμα $\pm 100 \mu\text{m}$).

	Χωρίς χρήση ιδιοσυσκευής			Με τη χρήση της ιδιοσυσκευής		
	Συσκευή 1	Συσκευή 2	Συσκευή 3	Συσκευή 1	Συσκευή 2	Συσκευή 3
Εκκεντρότητα	130.63	723.65	264.98	114.51	5.00	101.24
	218.40	446.61	135.09	36.40	41.38	43.16
	145.31	270.29	124.95	40.31	13.46	213.60
	54.97	360.67	29.26	82.50	185.00	29.15
	250.52	690.13	202.02	14.14	33.63	290.10
	230.10	373.92	191.21	40.70	120.00	168.54
	40.84	107.96	63.29	49.81	192.65	49.81
	74.89	169.85	42.72	18.20	255.20	32.60
μέση τιμή \bar{x} ανά συσκευή	143.21	392.89	131.69	49.57	105.79	116.03
Τυπ. απόκλιση σ ανά συσκευή	82.65	222.97	84.01	33.55	95.90	97.83
μέση τιμή \bar{x} ανά ομάδα	222.60			90.46		
τυπ. απόκλιση σ ανά ομάδα	185.77			83.34		

Πίνακας 5: Σφάλμα θέσης (εκκεντρότητα) για κάθε ζεύγος θεωρητικού ΠΙΚ – βοθρίου και μέση τιμή και τυπική απόκλιση δειγμάτων control και δειγμάτων προς μελέτη (όλες οι τιμές είναι σε μm)



Εικόνα 42: Σφάλμα θέσης (εκκεντρότητα) βοθρίου PDMS- πρότυπου ΠΙΚ πάνω σε γυαλί στην περίπτωση που η συναρμολόγηση γίνει χωρίς και με τη χρήση της ιδιοσυσκευής που αναπτύχθηκε στην διπλωματική. Τα αποτελέσματα παρουσιάζονται σαν μέση τιμή \pm σφάλμα της μέσης τιμής για $n=24$ βοθρία (8 βοθρία ανά συσκευή, 3 συσκευές ανά πειραματική ομάδα). ***: $P<0.5\%$

5. Συμπεράσματα και Μελλοντική Εργασία

Συμπεράσματα

- Στην εργασία αυτή σχεδιάστηκε, κατασκευάστηκε και αξιολογήθηκε πειραματικά μια ιδιοσυσκευή που επιτρέπει την κατασκευή συσκευών συστοιχιών λεπτών πορώδων ικριωμάτων κολλαγόνου.
- Η συσκευή αποτελείται από δύο μέρη (βάσεις). Η πρώτη βάση εδράζει τα γυαλιά, πάνω στα οποία φτιάχνονται τα ικρίσματα. Η άλλη εδράζει τις υπερκατασκευές PDMS.
 - o Η πρώτη (βάση γυαλιών) επιτρέπει την εύκολη ενεργοποίηση γυαλιών σε ένα θάλαμο plasma etching, την τοποθέτηση εναιωρημάτων μέσω ενός robotic liquid handler και την συναρμολόγηση με υπερκατασκευές PDMS που βρίσκονται στη βάση υπερκατασκευών PDMS.
 - o Η δεύτερη (βάση υπερκατασκευών PDMS) επιτρέπει την ενεργοποίηση υπερκατασκευών PDMS σε ένα θάλαμο plasma etching και την συναρμολόγηση με γυαλιά (που περιέχουν ικρίσματα) που βρίσκονται στην βάση γυαλιών.
- Πειραματικά δεδομένα έδειξαν ότι η βάση γυαλιών δεν επηρέασε αρνητικά την ενεργοποίηση των γυαλιών μέσω πλάσματος.
- Μέσω μιας κατασκευής ακριβείας και δύο πύρων οι δύο βάσεις επιτρέπουν την συναρμολόγηση των γυαλιών/ΠΙΚ με τις υπερκατασκευές. Τα πειραματικά αποτελέσματα έδειξαν ότι η ιδιοσυσκευή παρέχει ακρίβεια συναρμολόγησης κάτω από 100 μm ανά βοθρίο, 2,5 φορές περίπου μικρότερη από την ακρίβεια συναρμολόγησης με το χέρι (αυτό που γίνεται αυτή τη στιγμή)
- Η αναλυτική μελέτη της μεταφοράς θερμότητας κατά την λυοφιλοποίηση των ΠΙΚ στην ιδιοσυσκευή έδειξε
 - o η σταθερά χρόνου του καλούπιού (βάση γυαλιών-γυαλί) στην λυοφιλοποίηση των ΠΙΚ είναι μεγαλύτερη (5.015 sec) σε σχέση με το καλούπι των κλασικών ικριωμάτων (0.388 sec). Παρόλα αυτά, και οι δύο αντιστοιχούν σε θερμικά συστήματα πολύ γρήγορα σε σχέση με τις θερμοκρασιακές μεταβολές που εφαρμόζονται στο ράφι του λυοφιλοποιητή κατά την στερεοποίηση (1°C/min).
 - o Η θερμοκρασία μέσα στο εναιώρημα (<200 μm πάχος) κατά την λυοφιλοποίηση των ΠΙΚ είναι περίπου σταθερή. Αυτό διαφέρει από το θερμοκρασιακό προφίλ στα κλασικά καλούπια ικριωμάτων (3 mm πάχος) όπου η αλλαγή φάσης γίνεται κατά τον κατακόρυφο άξονα. Αντίθετα οπτικές παρατηρήσεις κατά την λυοφιλοποίηση των ΠΙΚ δείχνουν ότι η αλλαγή φάσης μοιάζει να γίνεται ακτινικά. Αυτός ο διαφορετικός μηχανισμός απαγωγής θερμότητας και κρυστάλλωσης του νερού ίσως εξηγεί 1) το γεγονός ότι το μοντέλο που αναπτύχθηκε εκτιμά χρόνο στερεοποίησης περίπου 25 sec, ενώ οι οπτικές παρατηρήσεις μετράνε περίπου 10 sec, 2) το γεγονός ότι τα ΠΙΚ έχουν μικρότερη μέση διάμετρο πόρων (περίπου 20-30 μm) σε σχέση με τα κλασικά ικρίσματα (90 μm).

Προτάσεις για μελλοντική εργασία

- Κατά τη χρήση της ιδιοσυσκευής παρατηρήθηκε δυσκολία στην απομάκρυνση των συναρμολογημένων συσκευών με λεπτά ΠΙΚ (γυαλί-υπερκατασκευή PDMS) ως συσσωμάτωμα. Έτσι προτείνεται ως μελλοντική βελτίωση του σχεδιασμού της ιδιοσυσκευής.
- Μία άλλη βελτίωση θα μπορούσε να γίνει σε σχέση με την άσκηση του βάρους, ώστε αυτό να ασκείται ομοιόμορφα στις τέσσερις συσκευές με επαναληψιμότητα. Αυτό περιλαμβάνει ίσως και βελτίωση του

σχεδιασμού του καλουπιού χύτευσης PDMS, ώστε να παράγονται υπερκατασκευές με επαναλήψιμο πάχος 5mm.

- Μετά τον καθαρισμό με νερό των κομματιών του καλουπιού που κατασκευάστηκε παρατηρήθηκε σκουριά σε σημεία πάνω στο κάτω μέρος (αλουμίνιο) του καλουπιού και κυρίως στα σημεία επαφής των ανοξειδωτων πίων με το κομμάτι αυτό (Παράρτημα Β). Κατά πάσα πιθανότητα ο λόγος είναι ότι υγρασία παρέμεινε για περισσότερο χρόνο στα σημεία αυτά. Αυτή η παρατήρηση επιβεβαιώνει το ρίσκο της διμεταλλικής επαφής μεταξύ αλουμινένιων και ανοξειδωτων κομματιών. Μία βελτίωση στο σχεδιασμό του καλουπιού ίσως είναι η αλλαγή του υλικού του κάτω κομματιού από αλουμίνιο σε κάποιο μη-μεταλλικό υλικό (πχ πολυκαρβονικό, όπως και το πάνω κομμάτι).
- Πειράματα που έγιναν για τη μελέτη της επίδρασης της ιδιοσυσκευής στην ενεργοποίηση των επιφανειών των υπερκατασκευών PDMS με plasma (Παράρτημα Β) έδειξαν την ανάγκη διερεύνησης της επίδρασης της τραχύτητας της επιφάνειας των υπερκατασκευών PDMS στην ποιότητα κόλλησής τους με τα γυαλιά, καθώς ίσως ευθύνεται για την αποτυχία αυτών των πειραμάτων.

Βιβλιογραφία

- 3D Biomatrix™ (no date) '3D Cell Culture 101: An Introduction to 3D Cell Culture Tools and Techniques'.
- Alberts, B. (2014) *Molecular biology of the cell*. 6th edn.
- Baker, M. (2011) 'A living system on a chip', *Nature*, 471(7340), pp. 661–665. doi: 10.1038/471661a.
- BioTek® (no date) '3D Cell Culture: A Review of Current Techniques'.
- Burdett, E. *et al.* (2010) 'Engineering Tumors: A Tissue Engineering Perspective in Cancer Biology', *Tissue Engineering Part B: Reviews*. Mary Ann Liebert, Inc. 140 Huguenot Street, 3rd Floor New Rochelle, NY 10801 USA , 16(3), pp. 351–359. doi: 10.1089/ten.teb.2009.0676.
- Cheng, K., Lai, Y. and Kisaalita, W. S. (2008) 'Three-dimensional polymer scaffolds for high throughput cell-based assay systems', *Biomaterials*. Elsevier, 29(18), pp. 2802–2812. doi: 10.1016/J.BIOMATERIALS.2008.03.015.
- Cooper, J. A. *et al.* (2005) 'Fiber-based tissue-engineered scaffold for ligament replacement: design considerations and in vitro evaluation', *Biomaterials*. Elsevier, 26(13), pp. 1523–1532. doi: 10.1016/J.BIOMATERIALS.2004.05.014.
- Do, A.-V. *et al.* (2015) '3D Printing of Scaffolds for Tissue Regeneration Applications', *Advanced Healthcare Materials*. Wiley-Blackwell, 4(12), pp. 1742–1762. doi: 10.1002/adhm.201500168.
- Edmondson, R. *et al.* (2014) 'Three-Dimensional Cell Culture Systems and Their Applications in Drug Discovery and Cell-Based Biosensors', *ASSAY and Drug Development Technologies*. Mary Ann Liebert, Inc. 140 Huguenot Street, 3rd Floor New Rochelle, NY 10801 USA, 12(4), pp. 207–218. doi: 10.1089/adt.2014.573.
- Fatehullah, A., Tan, S. H. and Barker, N. (2016) 'Organoids as an in vitro model of human development and disease', *Nature Cell Biology*. Nature Publishing Group, 18(3), pp. 246–254. doi: 10.1038/ncb3312.
- Geutjes, P. J. *et al.* (2006) 'From Molecules to Matrix: Construction and Evaluation of Molecularly Defined Bioscaffolds', in: Springer, Boston, MA, pp. 279–295. doi: 10.1007/978-0-387-34133-0_19.
- Harley, B. A. (2006) *Cell-Matrix Interactions: Collagen-GAG Scaffold Fabrication, Characterization, and Measurement of Cell Migratory and Contractile Behavior via Confocal Microscopy*. MIT.
- Holy, C. E., Shoichet, M. S. and Davies, J. E. (2000) 'Engineering three-dimensional bone tissue in vitro using biodegradable scaffolds: Investigating initial cell-seeding density and culture period', *J Biomed Mater Res*, 51, pp. 376–382.
- Hsiao, A. Y. *et al.* (2012) '384 hanging drop arrays give excellent Z-factors and allow versatile formation of co-culture spheroids', *Biotechnology and Bioengineering*. Wiley-Blackwell, 109(5), pp. 1293–1304. doi: 10.1002/bit.24399.
- Huh, D., Hamilton, G. A. and Ingber, D. E. (2011) 'From 3D cell culture to organs-on-chips', *Trends in Cell Biology*. Elsevier Current Trends, 21(12), pp. 745–754. doi: 10.1016/J.TCB.2011.09.005.
- Jurga, M. *et al.* (2011) 'The performance of laminin-containing cryogel scaffolds in neural tissue regeneration', *Biomaterials*. Elsevier, 32(13), pp. 3423–3434. doi: 10.1016/J.BIOMATERIALS.2011.01.049.
- Justice, B. A., Badr, N. A. and Felder, R. A. (2009) '3D cell culture opens new dimensions in cell-based assays', *Drug Discovery Today*. Elsevier Current Trends, 14(1–2), pp. 102–107. doi: 10.1016/J.DRUDIS.2008.11.006.
- Lee, J., Cuddihy, M. J. and Kotov, N. A. (2008) 'Three-Dimensional Cell Culture Matrices: State of the Art', *Tissue Engineering Part B: Reviews*. Mary Ann Liebert, Inc. 140 Huguenot Street, 3rd Floor New Rochelle, NY 10801 USA , 14(1), pp. 61–86. doi: 10.1089/teb.2007.0150.
- Ng, R. *et al.* (2012) 'Three-dimensional fibrous scaffolds with microstructures and nanotextures for tissue engineering', *RSC Advances*. Royal Society of Chemistry, 2(27), p. 10110. doi: 10.1039/c2ra21085a.
- Sung, H.-J. *et al.* (2004) 'The effect of scaffold degradation rate on three-dimensional cell growth and angiogenesis', *Biomaterials*. Elsevier, 25(26), pp. 5735–5742. doi: 10.1016/J.BIOMATERIALS.2004.01.066.
- Tung, Y.-C. *et al.* (2011) 'High-throughput 3D spheroid culture and drug testing using a 384 hanging drop

array', *The Analyst*. The Royal Society of Chemistry, 136(3), pp. 473–478. doi: 10.1039/C0AN00609B.

Yannas, I. V *et al.* (1982) 'Wound tissue can utilize a polymeric template to synthesize a functional extension of skin.', *Science (New York, N.Y.)*. American Association for the Advancement of Science, 215(4529), pp. 174–6. doi: 10.1126/SCIENCE.7031899.

Yannas, I. V *et al.* (2010) 'Biologically active collagen-based scaffolds: advances in processing and characterization.', *Philosophical transactions. Series A, Mathematical, physical, and engineering sciences*. The Royal Society, 368(1917), pp. 2123–39. doi: 10.1098/rsta.2010.0015.

Yannas, I. V. and Burke, J. F. (1980) 'Design of an artificial skin. I. Basic design principles', *Journal of Biomedical Materials Research*. Wiley-Blackwell, 14(1), pp. 65–81. doi: 10.1002/jbm.820140108.

Ιορδανίδης, Θ.-Ν. (2017) *Αυτοματοποίηση Κατασκευής Συσκευών με Συστοιχίες Λεπτών Πορώδων Ικριωμάτων για Βιολογικές Μελέτες*.

Ιωάννου, Μ. (2015) *Βελτιστοποίηση Καλλιέργειας Ινοβλαστών σε Ικριώματα από Κολλαγόνο για Προτεομικές Μελέτες Σηματοδότησης*. ΕΜΠ.

Πρέζα, Ι. (2015) *Σχεδιασμός και Κατασκευή Συσκευής για Αυτοματοποιημένη Μελέτη Κυττάρων Μέσω Τρισδιάστατης Καλλιέργειας σε Πορώδη Ικριώματα Κολλαγόνου*. ΕΜΠ.

Σαρκίρη, Μ. (2016) *Λεπτά Πορώδη Ικριώματα Κολλαγόνου: Παρασκευή, Χαρακτηρισμός και Εφαρμογή στη Μελέτη Φαρμάκων*. ΕΜΠ.

Παράρτημα Α: Ανάλυση μεταφοράς θερμότητας

Αρχικά παρατίθενται τα φυσικά χαρακτηριστικά των υλικών και οι διαστάσεις των αντικειμένων του συστήματος στον Πίνακα 6.

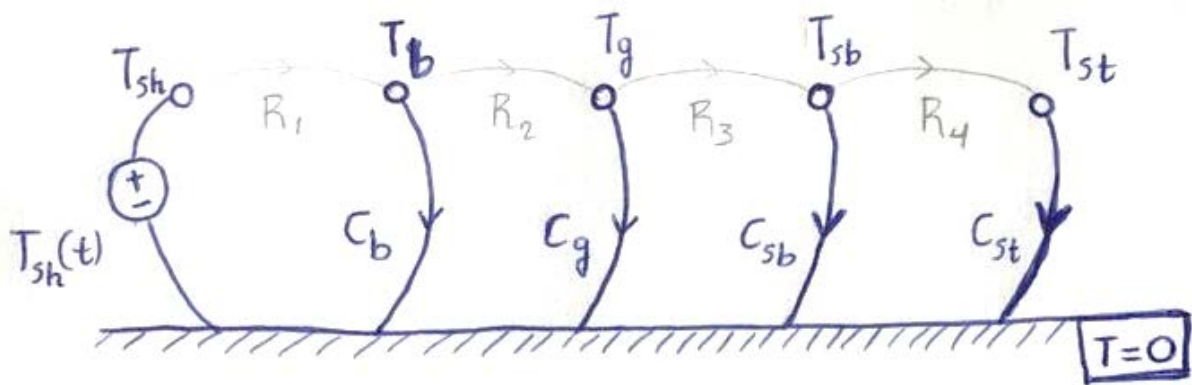
	μέγεθος	σύμβολο	τιμή	μονάδες
εναιώρημα	πάχος	t_susp	0.00015	m
	διάμετρος	d_susp	0.006	m
	εμβαδό	A_susp	2.827E-05	m ²
νερό (l)	πυκνότητα	ρ_w	1000	kg/m ³
	θερμική αγωγιμότητα	k_w	0.598	W/K/m
	ειδική θερμοχωρητικότητα (@ 0 οC)	c_w	4217	J/K/kg
πάγος (s)	πυκνότητα	ρ_i	916	kg/m ³
	θερμική αγωγιμότητα	k_i	2.22	W/K/m
	ειδική θερμοχωρητικότητα (@ 0 οC)	c_i	2050	J/K/kg
	θερμοκρασία τήξης νερού	T_fr	273.15	K
	λανθάνουσα θερμότητα τήξης νερού	E_l	333550	J/kg
γυαλί (borosilicate glass)	θερμική αγωγιμότητα	k_g	1.2	W/K/m
	ειδική θερμοχωρητικότητα	c_g	830	J/K/kg
	πυκνότητα	ρ_g	2400	kg/m ³
	πάχος	t_g	0.00017	m
	εμβαδό (24 mm x 50 mm)	A_g	0.0012	m ²
aluminum base	θερμική αγωγιμότητα	k_b	230	W/K/m
	ειδική θερμοχωρητικότητα	c_b	900	J/K/kg
	πυκνότητα	ρ_b	2700	kg/m ³
	πάχος	t_b	0.005	m
	εμβαδό (127 mm x 86 mm)	A_b	0.010922	m ²
διεπιφάνεια (interface)	πάχος	t_int	0.000005	m
	θερμική αγωγιμότητα	k_int	0.025	W/K/m

Πίνακας 6: Φυσικά χαρακτηριστικά και διαστάσεις των αντικειμένων του συστήματος

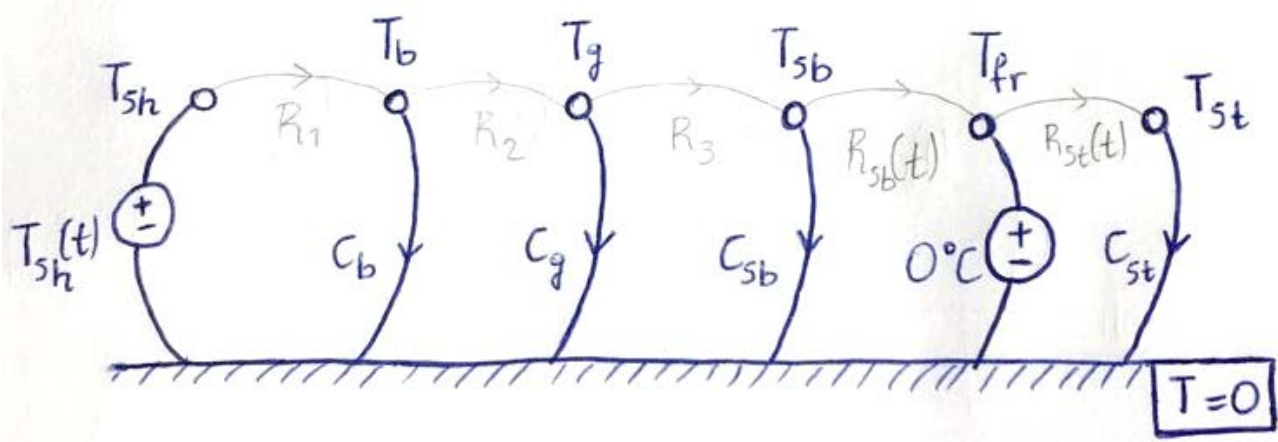
Μοντέλο συγκεντρωμένων στοιχείων

Για λόγους πληρότητας του παραρτήματος, επαναλαμβάνονται οι εικόνες με τους γραμμικούς γράφους που περιγράφουν τις φάσεις της μοντελοποίησης του συστήματος.

Εικόνα 23: Κανονικό δένδρο (μπλε γραμμή) και δεσμοί (γκρι γραμμή) για το μοντέλο αγωγής θερμότητας για τις φάσεις της μοντελοποίησης απολύτως υγρού (1) και απολύτως στερεού (3) εναιωρήματος:



Εικόνα 24: Κανονικό δένδρο (μπλε γραμμή) και δεσμοί (γκρι γραμμή) για το μοντέλο αγωγής θερμότητας για τη φάση της μοντελοποίησης της αλλαγής φάσης του εναιωρήματος από υγρό σε στερεό (2):



Με μεταβλητές κατάσταση:

T_b : μέση θερμοκρασία της βάσης (base) αλουμινίου (στο μέσο του πάχους της βάσης)

T_g : μέση θερμοκρασία του γυαλιού μικροσκοπίας (borosilicate glass) (στο μέσο του πάχους του γυαλιού)

T_{sb} : θερμοκρασία της κάτω επιφάνειας του εναιωρήματος (suspension bottom)

T_{st} : θερμοκρασία της πάνω επιφάνειας του εναιωρήματος (suspension top)

Και είσοδο: T_{sh}

Από τις σχέσεις (24) και (25) υπολογίζονται αρχικά τα μεγέθη για το νερό:

$$R_w = \frac{t_{susp}}{k_w \cdot (32 \cdot A_{susp})} = 0.2763 \text{ K/W}$$

$$R_i = \frac{t_{susp}}{k_i \cdot (32 \cdot A_{susp})} = 0.0721 \text{ K/W}$$

$$C_w = c_w \cdot \rho_w \cdot (32 \cdot A_{susp}) \cdot t_{susp} = 0.5662 \text{ J/K}$$

$$C_i = c_i \cdot \rho_i \cdot (32 \cdot A_{susp}) \cdot t_{susp} = 0.2422 \text{ J/K}$$

Στη συνέχεια οι θερμικές αντιστάσεις:

$$R_1 = \frac{t_b}{2 \cdot k_b \cdot A_b} + \frac{t_{int}}{k_{int} \cdot A_b} = 0.0193 \text{ K/W}$$

$$R_2 = \frac{t_b}{2 \cdot k_b \cdot A_b} + \frac{t_g}{2 \cdot k_g \cdot (4 \cdot A_g)} = 0.0158 \text{ K/W}$$

$$R_3 = \frac{t_g}{2 \cdot k_g \cdot (4 \cdot A_g)} = 0.0148 \text{ K/W}$$

και θερμοχωρητικότητες:

$$C_b = c_b \cdot \rho_b \cdot t_b \cdot A_b = 132.7023 \text{ J/K}$$

$$C_g = c_g \cdot \rho_g \cdot t_g \cdot (4 \cdot A_g) = 1.5103 \text{ J/K}$$

οι οποίες έχουν τις ίδιες τιμές σε όλες τις φάσεις της μοντελοποίησης. Ενώ, αντίθετα:

Για τη φάση του απολύτως υγρού εναιωρήματος:

$$R_4 = R_w = 0.2763 \text{ K/W}$$

$$C_{sb} = \frac{C_w}{2} = 0.2831 \text{ J/K}$$

$$C_{st} = \frac{C_w}{2} = 0.2831 \text{ J/K}$$

Για τη φάση του απολύτως στερεού εναιωρήματος:

$$R_4 = R_i = 0.0721 \text{ K/W}$$

$$C_{sb} = \frac{C_i}{2} = 0.1211 \text{ J/K}$$

$$C_{st} = \frac{C_i}{2} = 0.1211 \text{ J/K}$$

Για τη φάση της αλλαγής φάσης εισάγεται μία επιπλέον μεταβλητή y για το μέτωπο στερεοποίησης του εναιωρήματος, από την οποία εξαρτώνται οι $R_{sb}, R_{st}, C_{sb}, C_{st}$. Η διαφορική εξίσωση για το y προκύπτει ως εξής:

$$Q_l = E_l \cdot \rho \cdot A \cdot h \quad (32)$$

$$\frac{d}{dt} q_l = E_l \cdot \rho \cdot A \cdot \frac{dh}{dt} \quad (33)$$

Όπου

Q_l : λανθάνουσα θερμότητα [J], E_l : ειδική λανθάνουσα θερμότητα τήξης νερού (ανά μονάδα μάζας) [J/kg],
 q_l : ροή λανθάνουσας θερμότητας [J/s], $\rho = \rho_w$: πυκνότητα υγρού νερού [kg/m^3], $A = 32 \cdot A_{susp}$: εμβαδό εναιωρημάτων [m^2] και h : πάχος στερεοποιημένου εναιωρήματος [m]. Επίσης

$$y = -\frac{h}{b} \quad (34)$$

Όπου b είναι συνολικό πάχος εναιωρήματος, και επιπλέον

$$q_l = q_{sb} - q_{st} \quad (35)$$

Όπου:

$$q_{sb} = \frac{1}{R_{sb}(y)} \cdot (T_{sb} - T_{fr})$$

$$q_{st} = \frac{1}{R_{st}(y)} \cdot (T_{fr} - T_{st})$$

Όπου T_{fr} η θερμοκρασία τήξης του νερού

Επομένως, από τις (33),(34) και (35):

$$\frac{dy}{dt} = -\frac{q_{sb} - q_{st}}{E_l \cdot \rho_w \cdot (32 \cdot A_{susp})} \quad (36)$$

Ολοκληρώνοντας τη (36) λαμβάνουμε την τιμή του y .

Οι αντιστάσεις και θερμοχωρητικότητες υπολογίζονται ως συναρτήσεις του y ως εξής:

$$R_{sb}(y) = y \cdot R_i \quad (37)$$

$$R_{st}(y) = (1 - y) \cdot R_w \quad (38)$$

$$C_{sb}(y) = \begin{cases} y \cdot C_i + \left(\frac{1}{2} - y\right) \cdot C_w = (C_i - C_w) \cdot y + \frac{C_w}{2}, y < 0.5 \\ \frac{C_i}{2}, y \geq 0.5 \end{cases} \quad (39)$$

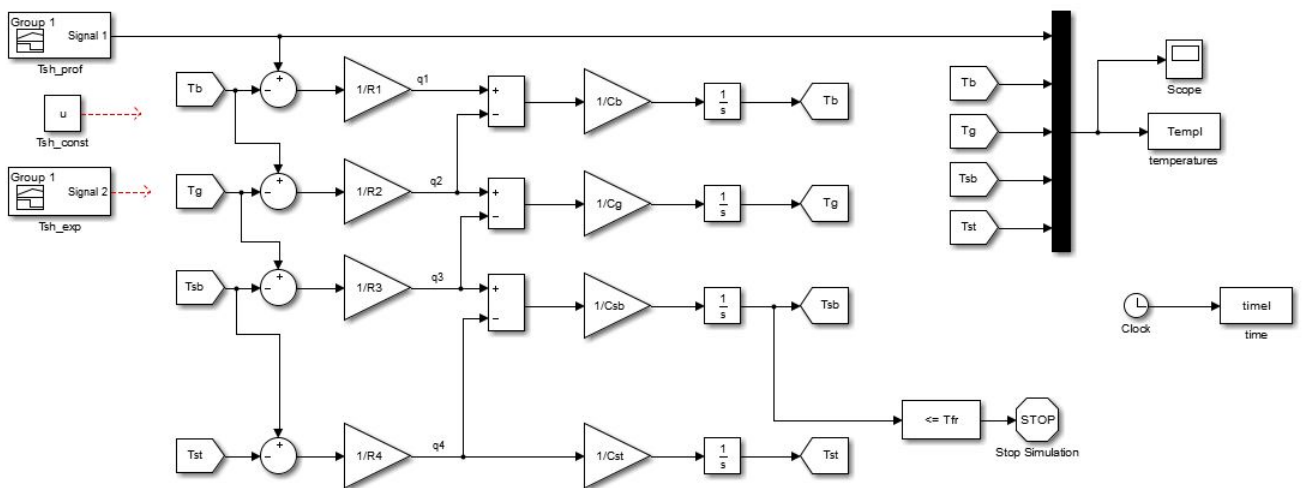
$$C_{st}(y) = \begin{cases} \frac{C_w}{2}, y < 0.5 \\ \left(y - \frac{1}{2}\right) \cdot C_i + (1 - y) \cdot C_w = (C_i - C_w) \cdot y + \left(C_w - \frac{C_i}{2}\right), y \geq 0.5 \end{cases} \quad (40)$$

Η διαδικασία προσομοιώθηκε επαναληπτικά με το εργαλείο Simulink του Matlab σε τρεις φάσεις, όπως έχουν αναφερθεί. Τα δομικά διαγράμματα που υλοποιούν τις διαφορικές σχέσεις του μοντέλου φαίνονται στις Εικόνα 43, Εικόνα 44 και Εικόνα 46. Η θερμοκρασία του ραφίου είναι η είσοδος του συστήματος και θεωρείται ότι έχει άμεση απόκριση σε σχέση με το θερμοκρασιακό προφίλ που προγραμματίζουμε το μηχάνημα να δημιουργήσει (μηδενικές εσωτερικές θερμοχωρητικότητες και θερμικές αντιστάσεις στο ράφι). Στο διάγραμμα μεταβλητών που μας ενδιαφέρει να εξετάσουμε περιλαμβάνονται οι θερμοκρασίες: ραφίου (shelf), βάσης (base), γυαλιού (borosilicate glass), κάτω πλευράς εναιωρήματος (suspension bottom), πάνω πλευράς εναιωρήματος (top suspension):

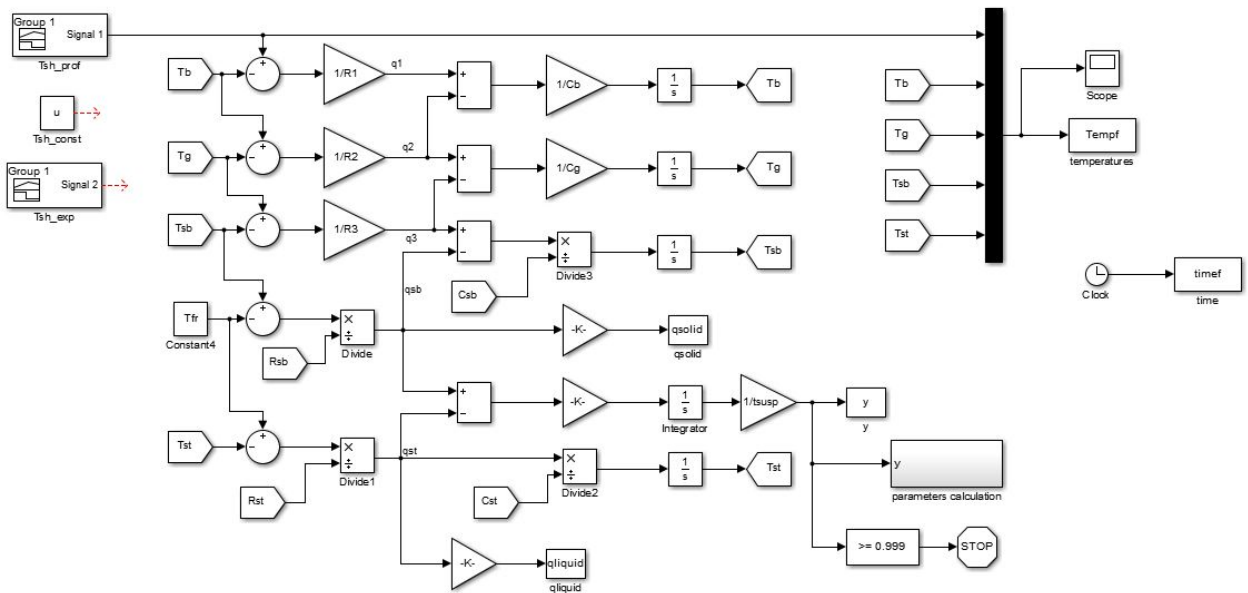
Tsh
Tb
Tg
Tsb
Tst

Στο μοντέλο της αλλαγής φάσης το υποσύστημα “parameters calculation” φαίνεται στην Εικόνα 45 και εκτελεί τους υπολογισμούς των θερμικών αντιστάσεων και θερμοχωρητικότητας, όπως περιγράφηκαν παραπάνω. Το κέρδος που πολλαπλασιάζει τα σήματα q_{sb}, q_{st} είναι το $1/(32 \cdot A_{susp})$ ώστε να εξάγουμε τις ροές θερμότητας *ανηγμένες ανά μονάδα εμβαδού*. Το κέρδος που πολλαπλασιάζει το σήμα $q_{sb} - q_{st}$ είναι το $-1/(E_l \cdot \rho_w \cdot 32 \cdot A_{susp})$ (εξίσωση (36)) για τον υπολογισμό του y .

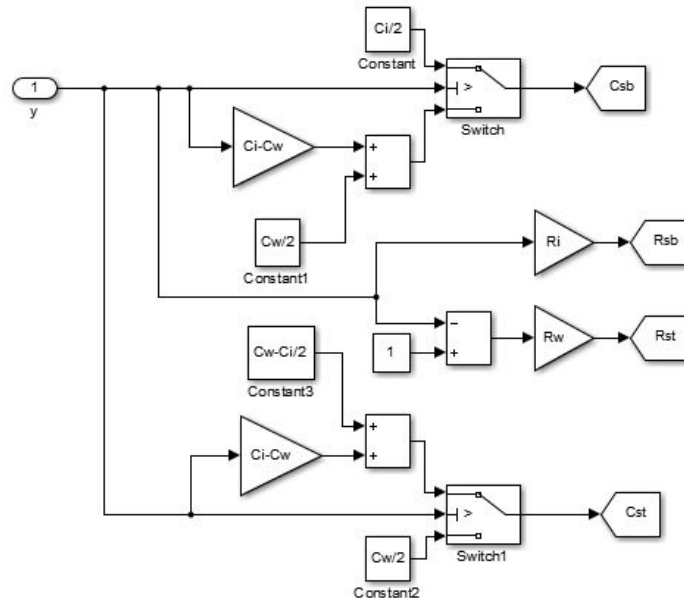
Το μοντέλο για *απολύτως υγρό* εναιώρημα τρέχει μέχρις ότου η θερμοκρασία της κάτω επιφάνειας του εναιωρήματος πάρει για πρώτη φορά τιμή κάτω από 0 °C. Στη συνέχεια τρέχει το μοντέλο για την *αλλαγή φάσης* μέχρι το y να πάρει τιμή ≈ 1 (για την ακρίβεια > 0.999). Τότε αρχίζει το μοντέλο για *απολύτως στερεό* εναιώρημα μέχρι τέλους.



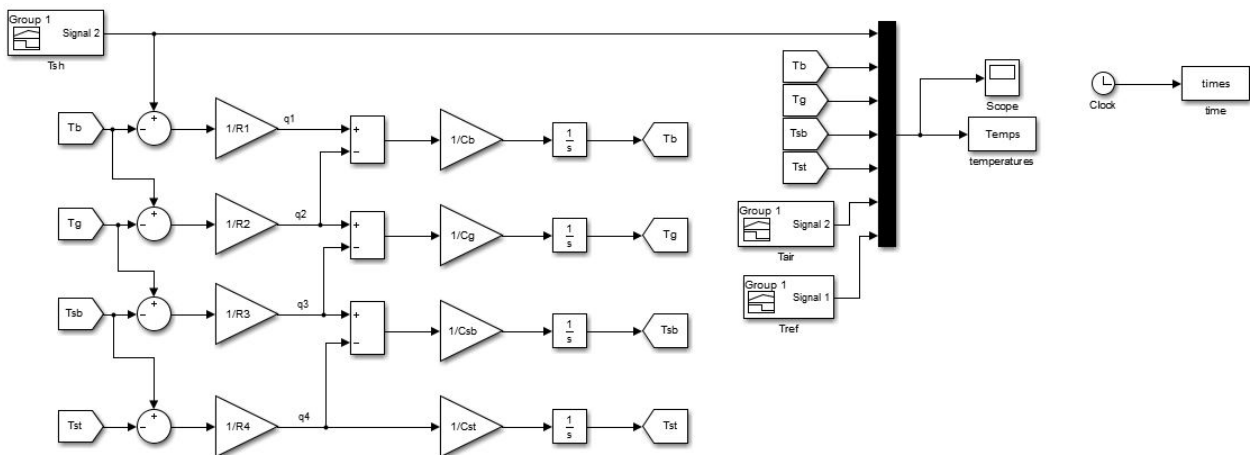
Εικόνα 43: Δομικό διάγραμμα για τη φάση του απολύτως υγρού εναιωρήματος



Εικόνα 44: Δομικό διάγραμμα για τη φάση της αλλαγής φάσης του εναιωρήματος



Εικόνα 45: Block “parameters calculation” του μοντέλου αλλαγής φάσης



Εικόνα 46: Δομικό διάγραμμα για τη φάση του απολύτως στερεού εναιωρήματος

Γράφηκε επίσης κώδικας σε Matlab που λειτουργεί συνεργατικά με το μοντέλο Simulink. Ο κώδικας φαίνεται παρακάτω:

```
clear all
clc

% --- suspension properties
tsusp = 0.15e-3; % suspension thickness [m]
dsusp = 6e-3; % suspension diameter [m]
Asusp = pi*dsusp^2/4; % suspension area [m^2]

% --- water (l)
rw = 1000; % water density [kg/m^3]
kw = 0.598; % water thermal conductivity [W/K/m]
cw = 4217; % water specific heat capacity [J/kg/K]
Rw = tsusp/kw/(32*Asusp); % [K/W]
Cw = tsusp*(32*Asusp)*rw*cw;% [J/K]
```

```

% --- ice (s)
ri = 916; % ice density [kg/m^3]
ki = 2.22; % ice thermal conductivity [W/K/m]
ci = 2050; % ice heat capacity [J/kg/K]
Ri = tsusp/ki/(32*Asusp); % [K/W]
Ci = tsusp*(32*Asusp)*ri*ci; % [J/K]

Tfr = 0 + 273.15; % water freezing temperature [K]
El = 333550; % water melting latent heat [J/kg]

% --- borosilicate glass properties
kg = 1.2; % glass conductivity [W/K/m]
cg = 830; % glass specific heat capacity [J/kg/K]
rg = 2200; % glass density [kg/m^3]
tg = 0.170e-3; % glass thickness [m]
Ag = 24e-3*50e-3; % glass area [m^2]

% --- base properties
kb = 230; % aluminum thermal conductivity [W/K/m]
cb = 900; % aluminum specific heat capacity [J/kg/K]
rb = 2700; % aluminum density [kg/m^3]
tb = 5e-3; % base thickness [m]
Ab = 127e-3*86e-3; % base area [m^2]

% --- interface between shelf and base
tint = 5e-6; % interface thickness [m]
kint = 0.025; % interface thermal conductivity [W/K/m]

%% === R, C in model
R1 = tb/2/kb/Ab + tint/kint/Ab; % [K/W]
R2 = tb/2/kb/Ab + tg/2/kg/(4*Ag); % [K/W]
R3 = tg/2/kg/(4*Ag); % [K/W]
Cb = cb*rb*Ab*tb; % [J/K]
Cg = cg*rg*(4*Ag)*tg; % [J/K]

%% ==== simulation
T0 = 27 + 273; % initial condition for temperature [K]
u = -40 + 273; % shelf temperature step input [K]

R4 = Rw;
Csb = Cw/2;
Cst = Cw/2;
sim('test_liquid_5', 5000)
timeliquid = timel(1:end-1)/60; % [min]
Templiquid = Temp(1:end-1,:)-273.15; % [oC]

% Rsb, Rst, Csb, Cst: time dependent (y dependent)
sim('test_freezing_5', [timel(end), 5000])
timefreezing = timef(1:end-1)/60; % [min]
Tempfreezing = Tempf(1:end-1,:)-273.15; % [oC]

R4 = Ri;
Csb = Ci/2;
Cst = Ci/2;
sim('test_solid_5', [timef(end), 5000])
timesolid = times(1:end-1)/60; % [min]
Tempsolid = Temps(1:end-1,:)-273.15; % [oC]

t=[timeliquid; timefreezing; timesolid];

```

```

Temp=[Templiquid; Tempfreezing; Tempsolid];

Dtfr = (timefreezing(end)-timefreezing(1))*60 % freezing time (duration)

%%
figure
plot(t, Temp, 'LineWidth', 2)
xlabel('time [min]','FontSize',14),
ylabel('Temperature [ ^oC]','FontSize',14)
lgd = legend('T_{shelf}','T_{base}','T_{glass}','T_{bottom}','T_{top}');
set(lgd, 'FontSize', 14), set(gca, 'fontsize', 14), grid on

figure
plot((timefreezing-timefreezing(1))*60,(abs(qsolid(1:end-1))-
abs(qliquid(1:end-1))), 'LineWidth', 2)
grid on
xlabel('time [sec]','FontSize',14),ylabel('heat flow [W/m^2]','FontSize',14)
lgd = legend('q_{freezing}');
set(lgd, 'FontSize', 14), set(gca, 'fontsize', 14)
title('heat flow to solid-liquid interface')

```

Για την επίλυση των μοντέλων Simulink χρησιμοποιήθηκε ο solver “ode23s (stiff/Mod. Rosenbrock)”, που χρησιμοποιεί μεταβαλλόμενο βήμα που τέθηκε στο εύρος $[10^{-3}, 10^{-2}]$ και ανοχή σχετικού σφάλματος σύγκλισης στο 10^{-3} .

Μοντέλο 1D Πεπερασμένων Στοιχείων (ΠΣ)

Η διαφορική εξίσωση που περιγράφει τη δυναμική της αγωγής θερμότητας μεταξύ των δύο κόμβων ενός μονοδιάστατου ΠΣ είναι:

$$[M] \cdot \dot{T} + [K] \cdot T = Q + r \quad (41)$$

Όπου

$[M]$ το μητρώο «μάζας» (θερμοχωρητικότητα: capacity matrix) για κάθε ΠΣ είναι:

$$[M] = c \cdot \rho \cdot A \cdot L \cdot \begin{bmatrix} 1 & 0 \\ 0 & 1 \end{bmatrix} \quad (42)$$

$[K]$ το μητρώο «στιβαρότητας» (αγωγιμότητα: conductivity matrix) για κάθε ΠΣ είναι:

$$[K] = \frac{A \cdot k}{L} \cdot \begin{bmatrix} 1 & -1 \\ -1 & 1 \end{bmatrix} \quad (43)$$

T το διάνυσμα θερμοκρασιών:

$$T = \begin{bmatrix} T_1 \\ T_2 \end{bmatrix}$$

Q είναι το διάνυσμα που περιγράφει εσωτερικές πηγές ή καταβόθρες θερμότητες, στην προκειμένη περίπτωση, καθώς δεν υπάρχουν τέτοιες:

$$Q = 0$$

r είναι το διάνυσμα που περιγράφει τις οριακές συνθήκες, αλλά καθώς στην προκειμένη περίπτωση αμελούνται τα φαινόμενα συναγωγής και ακτινοβολίας:

$$r = 0$$

L είναι το μήκος του ΠΣ, δηλαδή για κάθε ΠΣ i είναι το πάχος του: t_i

A είναι το εμβαδό διατομής, δηλαδή το εμβαδό της επιφάνειας κάθετης προς το ΠΣ, άρα για κάθε ΠΣ i : A_i

Επομένως, η εξίσωση (41) γίνεται:

$$c\rho AL \cdot \begin{bmatrix} 1 & 0 \\ 0 & 1 \end{bmatrix} \cdot \begin{bmatrix} \dot{T}_1 \\ \dot{T}_2 \end{bmatrix} + \frac{Ak}{L} \cdot \begin{bmatrix} 1 & -1 \\ -1 & 1 \end{bmatrix} \cdot \begin{bmatrix} T_1 \\ T_2 \end{bmatrix} = \begin{bmatrix} 0 \\ 0 \end{bmatrix} \quad (44)$$

Για το καλούπι του Harley για κλασικά, παχιά ικριώματα (“thick”):

Εδώ υπάρχει ένα μόνο ΠΣ, αυτό του καλουπιού (pan) από ανοξείδωτο χάλυβα. Οι αντίστοιχες ιδιότητες υλικού είναι: θερμική αγωγιμότητα $k_p = 16 \text{ W/m} \cdot \text{K}$, πάχος $t_p = 1.27 \text{ mm}$, ειδική θερμοχωρητικότητα $c_p = 500 \text{ J/kg} \cdot \text{K}$, πυκνότητα $\rho_p = 7700 \text{ kg/m}^3$ και εμβαδόν $A_p = 0.0156 \text{ mm}^2$.

Οι μεταβλητές: T_1 είναι η είσοδος (κάτω πλευρά του καλουπιού) και T_2 η μεταβλητή εξόδου.

Έτσι από τη μητρωική μορφή της εξίσωσης (44), διαγράφοντας την εξίσωση που αφορά την είσοδο (T_1), παίρνουμε τη μονοδιάστατη εξίσωση που αφορά την T_2 :

$$\dot{T}_2 = -\frac{k}{c\rho L^2} \cdot T_2 + \frac{k}{c\rho L^2} \cdot T_1 \quad (45)$$

Όπου ορίζουμε

$$a = -\frac{k}{c\rho L^2}$$

$$b = \frac{k}{c\rho L^2}$$

Και έτσι, η χρονική σταθερά προκύπτει:

$$\tau = -\frac{1}{a} = \frac{c\rho L^2}{k} \Rightarrow$$

$$\tau_{thick} = \frac{c_p \rho_p L_p^2}{k_p} = 0.388 \text{ sec}$$

Για τη συσκευή της παρούσας εργασίας για λεπτά ικριώματα (“thin”):

Εδώ θεωρήθηκαν τρία (3) ΠΣ και συγκεκριμένα:

1. το διάκενο μεταξύ του ραφιού και της βάσης των γυαλιών,
2. τη βάση των γυαλιών από αλουμίνιο,
3. το γυαλί μικροσκοπίας.

Οι τιμές των φυσικών χαρακτηριστικών και διαστάσεων των αντικειμένων φαίνονται στον Πίνακα 6 του Παραρτήματος Α. Συμπληρωματικά, η θερμοχωρητικότητα του διακένου είναι μηδενική: $c_{int} = 0$.

Η εξίσωση (44) θα ισχύει τοπικά και για τα 3 ΠΣ. Ωστόσο, θεωρώντας ως μεταβλητή T_1 την είσοδο (θερμοκρασία στην επιφάνεια του ραφιού), T_2 τη θερμοκρασία στον κοινό κόμβο διεπιφάνειας και βάσης γυαλιών (κάτω επιφάνεια της βάσης), T_3 θερμοκρασία στον κοινό κόμβο βάσης και γυαλιού (πάνω επιφάνεια βάσης – κάτω επιφάνεια γυαλιού) και T_4 τη μεταβλητή εξόδου, δηλαδή τη θερμοκρασία στην πάνω επιφάνεια του γυαλιού, τότε οι πίνακες θερμοχωρητικότητας και αγωγιμότητας για το συνολικό σύστημα διαφορικών εξισώσεων θα προκύψουν ως εξής:

$$[M] = \begin{bmatrix} 0 & 0 & 0 & 0 \\ 0 & c_b \rho_b A_b t_b & 0 & 0 \\ 0 & 0 & c_b \rho_b A_b t_b + c_g \rho_g A_g t_g & 0 \\ 0 & 0 & 0 & c_g \rho_g A_g t_g \end{bmatrix} \quad (46)$$

$$[K] = \begin{bmatrix} \frac{A_{int}k_{int}}{t_{int}} & -\frac{A_{int}k_{int}}{t_{int}} & 0 & 0 \\ -\frac{A_{int}k_{int}}{t_{int}} & \frac{A_{int}k_{int}}{t_{int}} + \frac{A_bk_b}{t_b} & -\frac{A_bk_b}{t_b} & 0 \\ 0 & -\frac{A_bk_b}{t_b} & \frac{A_bk_b}{t_b} + \frac{A_gk_g}{t_g} & -\frac{A_gk_g}{t_g} \\ 0 & 0 & -\frac{A_gk_g}{t_g} & \frac{A_gk_g}{t_g} \end{bmatrix} \quad (47)$$

Αν διαγράψουμε την εξίσωση που αντιστοιχεί στην είσοδο,

ορίσουμε το διάνυσμα μεταβλητών κατάστασης: $T = \begin{bmatrix} T_2 \\ T_3 \\ T_4 \end{bmatrix}$

την είσοδο: $u = T_1$

και τους πίνακες:

$$[M_1] = \begin{bmatrix} c_b\rho_b A_b t_b & 0 & 0 \\ 0 & c_b\rho_b A_b t_b + c_g\rho_g A_g t_g & 0 \\ 0 & 0 & c_g\rho_g A_g t_g \end{bmatrix} \quad (48)$$

$$[K_1] = \begin{bmatrix} -\frac{A_{int}k_{int}}{t_{int}} \\ 0 \\ 0 \end{bmatrix} \quad (49)$$

$$[K_2] = \begin{bmatrix} \frac{A_{int}k_{int}}{t_{int}} + \frac{A_bk_b}{t_b} & -\frac{A_bk_b}{t_b} & 0 \\ -\frac{A_bk_b}{t_b} & \frac{A_bk_b}{t_b} + \frac{A_gk_g}{t_g} & -\frac{A_gk_g}{t_g} \\ 0 & -\frac{A_gk_g}{t_g} & \frac{A_gk_g}{t_g} \end{bmatrix} \quad (50)$$

Τότε η εξίσωση (41) μπορεί να γραφεί ως:

$$[M_1] \cdot \begin{bmatrix} \dot{T}_2 \\ \dot{T}_3 \\ \dot{T}_4 \end{bmatrix} + [K_2] \cdot \begin{bmatrix} T_2 \\ T_3 \\ T_4 \end{bmatrix} = [K_1] \cdot u \quad (51)$$

Το σύστημα μπορεί να εκφραστεί πλέον ως *Γραμμικό Χρονικά Αμετάβλητο Σύστημα* στη γνωστή μορφή:

$$\begin{aligned} \dot{x} &= A \cdot x + B \cdot u \\ y &= C \cdot x + D \cdot u \end{aligned} \quad (52)$$

Όπου:

$$\begin{aligned} x &= T = \begin{bmatrix} T_2 \\ T_3 \\ T_4 \end{bmatrix} \\ y &= T_4 \\ u &= T_1 \\ A &= -[M_1]^{-1} \cdot [K_2] \\ B &= -[M_1]^{-1} \cdot [K_1] \\ C &= [0 \quad 0 \quad 1] \end{aligned}$$

$$D = 0$$

Αντικαθιστώντας τις τιμές των φυσικών χαρακτηριστικών και διαστάσεων των αντικειμένων της συσκευής, οι ιδιοτιμές του συστήματος υπολογίζονται ως:

$$\begin{bmatrix} \lambda_1 \\ \lambda_2 \\ \lambda_3 \end{bmatrix} = \begin{bmatrix} -0.1996 \\ -7.7575 \\ -22.8191 \end{bmatrix}$$

Η χρονική σταθερά για κάθε ιδιοτιμή είναι το αντίθετο αντίστροφό της, δηλαδή

$$\begin{bmatrix} \tau_1 \\ \tau_2 \\ \tau_3 \end{bmatrix} = \begin{bmatrix} -\frac{1}{\lambda_1} \\ \frac{1}{\lambda_2} \\ -\frac{1}{\lambda_3} \end{bmatrix} = \begin{bmatrix} 5.0105 \\ 0.1289 \\ 0.0438 \end{bmatrix}$$

Και τελικά η χρονική σταθερά που χαρακτηρίζει το σύστημα θα είναι η πιο αργή, δηλαδή:

$$\tau_{thin} = 5.0105 \text{ sec}$$

Παράρτημα Β: Καλούπι χύτευσης Υπερκατασκευής PDMS



Εικόνα 47: Συναρμολογημένο καλούπι χύτευσης PDMS

Οι πύροι για τη δημιουργία των πηγαδιών (wells) ($\varnothing 6$) και για τη δημιουργία των οπών οριοθέτησης των υπερκατασκευών PDMS πάνω στη βάση τους ($\varnothing 4$) είναι τοποθετημένοι μέσα σε τυφλές οπές (counterbore) με αμφίβρολη συναρμογή ($\varnothing 6 \frac{H9}{g6}$ και $\varnothing 4 \frac{H9}{g6}$), ενώ σταθεροποιούνται στη θέση τους με σύστημα κοχλίων – περικοχλίου M2 για τους $\varnothing 6$ και M1.6 για τους $\varnothing 4$. Τα δύο κομμάτια συσφίγγονται με 9 συστήματα κοχλιών - περικοχλίων M3 κατά τη συναρμολόγησή τους, ώστε να εξασφαλιστεί η στεγανότητα. Το PDMS ως πρώτη ύλη είναι αρκετά ιξώδες και έτσι η προένταση των κοχλιών είναι ικανοποιητική για τη στεγανότητα. Το κόψιμο (chamfer) στη μία εκ των γωνιών στις θηλυκές γεωμετρίες του πάνω κομματιού που ορίζουν το εξωτερικό σχήμα των υπερκατασκευών χρησιμεύει για τον προσδιορισμό του σωστού προσανατολισμού τους.

Το κάτω κομμάτι κατασκευάστηκε από αλουμίνιο, για να κατεργαστεί σε φρέζα και να προσδοθούν ανοχές στις τυφλές οπές των πύρων και ανοχές επιπεδότητας. Η κατεργασία έγινε στο μηχανουργείο του κου. Ιωάννη Αλεξόπουλου.

Το πάνω κομμάτι κατασκευάστηκε από πολυκαρβονικό και κόπηκε με υδροκοπή καθώς οι προδιαγραφές για το εξωτερικό σχήμα δεν είναι αυστηρές.

Μετά τον καθαρισμό με νερό και αιθανόλη των κομματιών του καλουπιού παρατηρήθηκε σκουριά σε σημεία πάνω στο κάτω μέρος (αλουμίνιο) του καλουπιού και κυρίως στα σημεία επαφής των ανοξειδωτων πύρων με το κομμάτι αυτό. Κατά πάσα πιθανότητα ο λόγος είναι ότι υγρασία παρέμεινε για περισσότερο

χρόνο στα σημεία αυτά. Αυτή η παρατήρηση επιβεβαιώνει το ρίσκο της διμεταλλικής επαφής μεταξύ αλουμινένιων και ανοξείδωτων κομματιών.

Πείραμα αξιολόγησης ενεργοποίησης των επιφανειών των υπερκατασκευών PDMS από plasma

Τρεις ($n = 3$) υπερκατασκευές PDMS που χυτεύθηκαν στο καλούπι που περιγράφεται στο Παράρτημα Β τοποθετήθηκαν στη βάση υπερκατασκευών PDMS της ιδιοσυσκευής και αυτή με τη σειρά της στο θάλαμο του plasma etcher προς ενεργοποίηση της επιφάνειας των υπερκατασκευών. Άλλες ($n = 3$) υπερκατασκευές τοποθετήθηκαν χωρίς τη χρήση της βάσης στο θάλαμο του plasma etcher προς ενεργοποίηση των επιφανειών τους ως δείγματα control. Τέλος, έξι (6) γυαλιά τοποθέτηθηκαν στο θάλαμο προς ενεργοποίηση των επιφανειών τους.

Χρησιμοποιήθηκε το ίδιο πρωτόκολλο για plasma etching που χρησιμοποιήθηκε και στο πείραμα της παραγράφου 4.1.

Αποτελέσματα

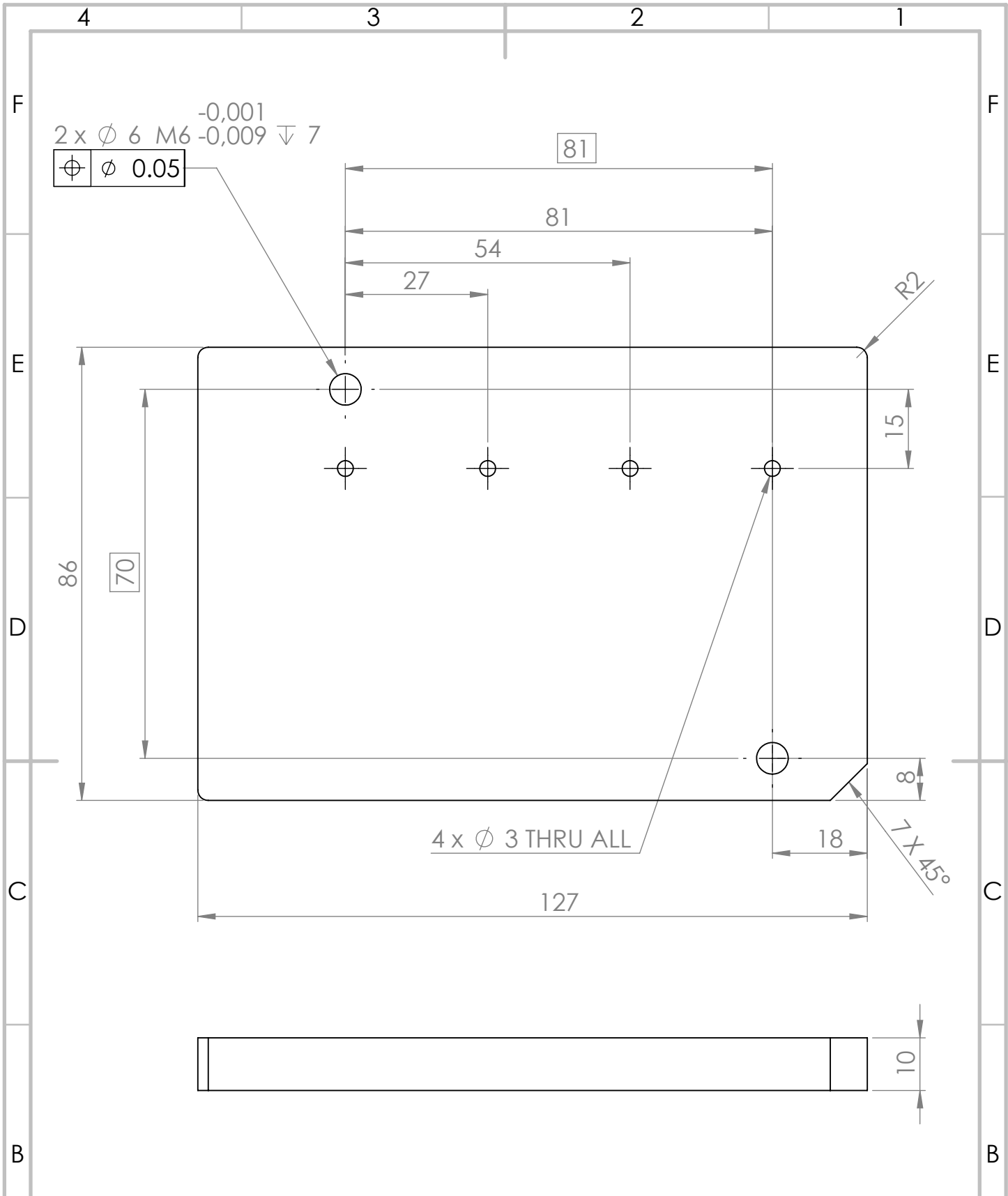
- Από τα τρία control δείγματα:
 - Σε ένα, οι δύο επιφάνειες κόλλησαν, αλλά με πολύ μικρή δύναμη συγκράτησης, καθώς αποκολλήθηκαν με ελάχιστη προσπάθεια.
 - Σε ένα, οι δύο επιφάνειες κόλλησαν στο μισό εμβαδό τους, επίσης με πολύ μικρή δύναμη συγκράτησης.
 - Στο τρίτο, δεν κόλλησαν καθόλου.
- Από τα τρία δείγματα προς μελέτη:
 - Στα δύο δείγματα οι δύο επιφάνειες κόλλησαν στο μισό εμβαδό τους και με ελάχιστη δύναμη συγκράτησης.
 - Στο τρίτο δεν κόλλησαν καθόλου.

Συμπεράσματα

- 1) Επειδή η διαδικασία δεν πέτυχε ούτε στα control δείγματα υπάρχουν δύο εξηγήσεις: 1) δεν ακολουθήθηκε σωστά η διαδικασία, 2) (πιο πιθανό) για την αποτυχία κόλλησης ευθύνεται η *τραχύτητα* της επιφάνειας των υπερκατασκευών, που κληρονομήθηκε από το κάτω μέρος του καλουπιού (που κατεργάστηκε με φρέζα).
- 2) Δεν μπορούμε να εξαγάγουμε ασφαλή συμπεράσματα για την επίδραση της βάσης των υπερκατασκευών PDMS στην ενεργοποίηση της επιφάνειάς τους αν χρησιμοποιηθεί το συγκεκριμένο πρωτόκολλο. Θα πρέπει πρώτα να διερευνηθεί η επίδραση της τραχύτητας της επιφάνειας των υπερκατασκευών στην ποιότητα κόλλησης.

Παράρτημα Γ: Μηχανολογικά σχέδια

Σε αυτό το παράρτημα παρατίθενται τα μηχανολογικά/κατασκευαστικά σχέδια για τα μέρη της συσκευής.



UNLESS OTHERWISE SPECIFIED:
 DIMENSIONS ARE IN MILLIMETERS
 SURFACE FINISH:
 TOLERANCES: +/- 0.100mm
 LINEAR:
 ANGULAR:

FINISH:

DEBURR AND
 BREAK SHARP
 EDGES

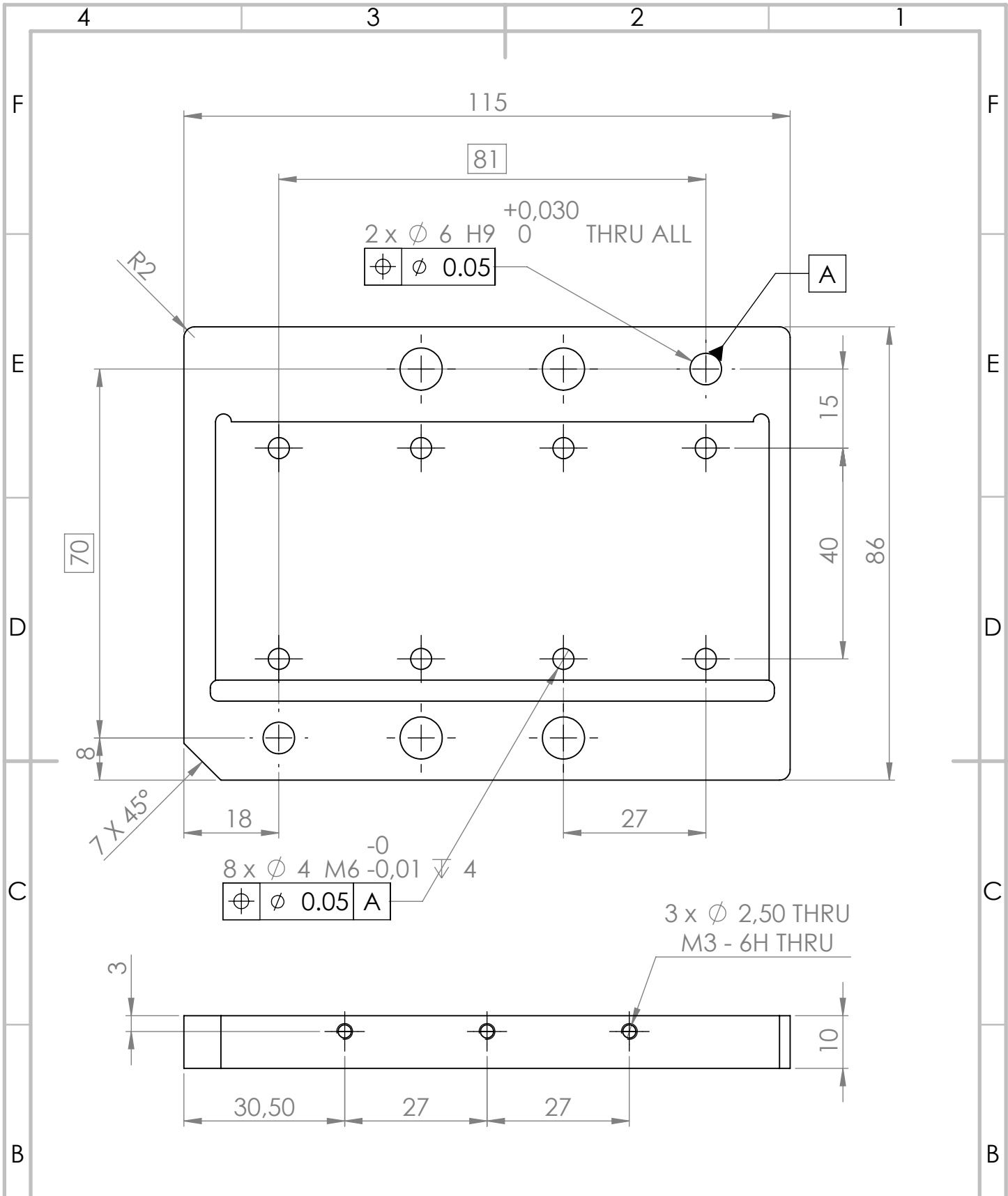
DO NOT SCALE DRAWING

REVISION

NAME	SIGNATURE	DATE
DRAWN		
CHK'D		
APPV'D		
MFG		
Q.A		

TITLE:	<h1>base</h1>
DWG NO.	
MATERIAL:	Aluminum
WEIGHT:	
SCALE: 1:1	SHEET 2 OF 2

A4



UNLESS OTHERWISE SPECIFIED:
 DIMENSIONS ARE IN MILLIMETERS
 SURFACE FINISH:
 TOLERANCES: +/- 0.100mm
 LINEAR:
 ANGULAR:

FINISH:

DEBURR AND
 BREAK SHARP
 EDGES

DO NOT SCALE DRAWING

REVISION

NAME	SIGNATURE	DATE
DRAWN		
CHK'D		
APPV'D		
MFG		
Q.A		

TITLE:
pdms base

MATERIAL:
 Aluminum

DWG NO.:

SCALE: 1:1

SHEET 2 OF 3

A4

4

3

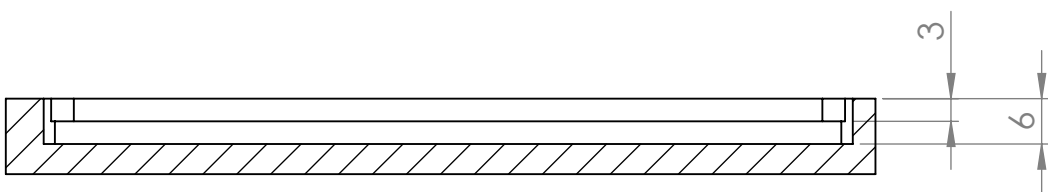
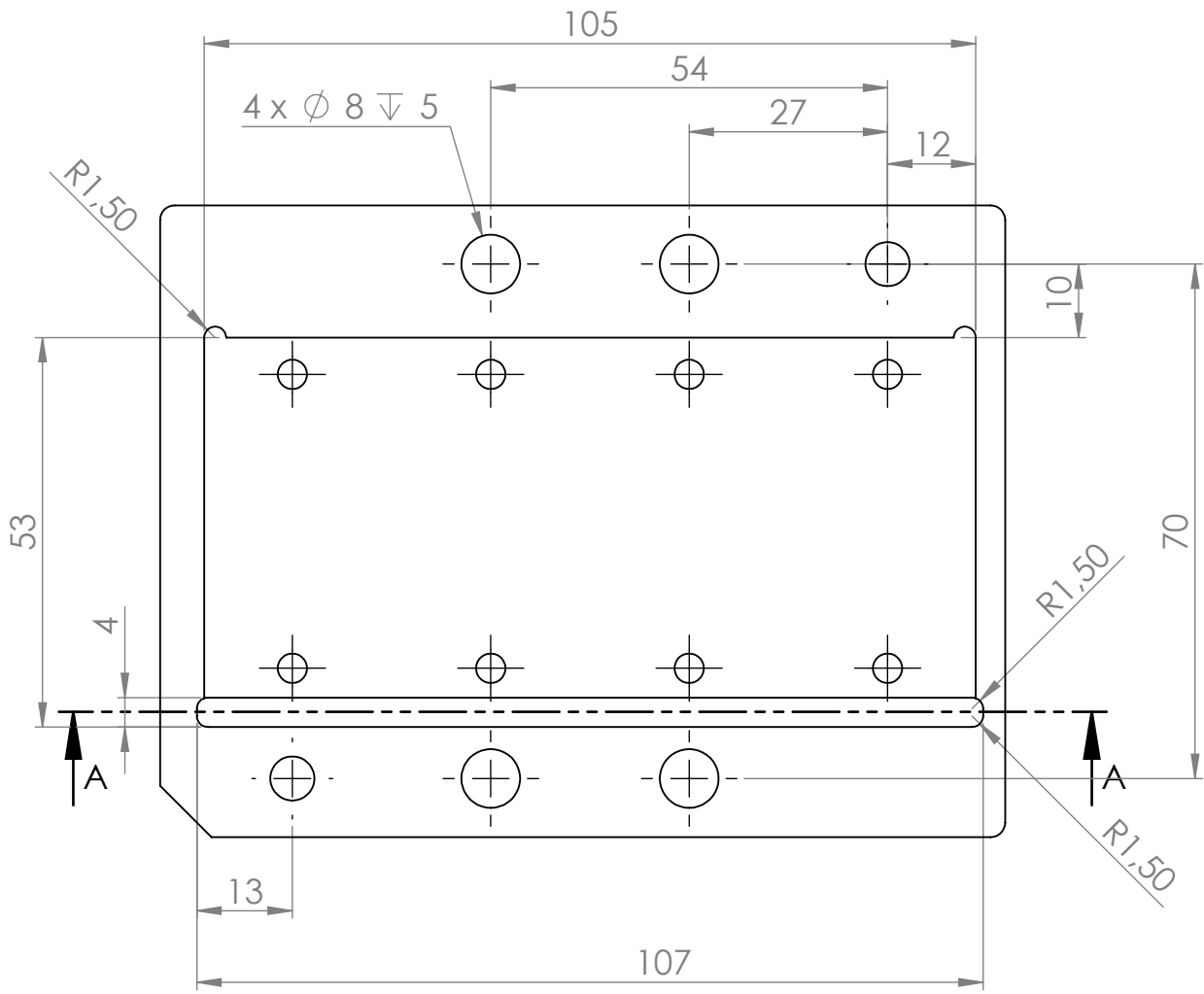
2

1

4 3 2 1

F

F



SECTION A-A

C

C

B

B

UNLESS OTHERWISE SPECIFIED:
DIMENSIONS ARE IN MILLIMETERS
SURFACE FINISH:
TOLERANCES: +/- 0.100mm
LINEAR:
ANGULAR:

FINISH:

DEBURR AND
BREAK SHARP
EDGES

DO NOT SCALE DRAWING

REVISION

NAME	SIGNATURE	DATE
DRAWN		
CHK'D		
APPV'D		
MFG		
Q.A		

TITLE:	<h1>pdms base</h1>	
DWG NO.		
MATERIAL:	Aluminum	A4
WEIGHT:	SCALE: 1:1	SHEET 3 OF 3

A

A

4 3 2 1

4

3

2

1

F

F

E

E

D

D

C

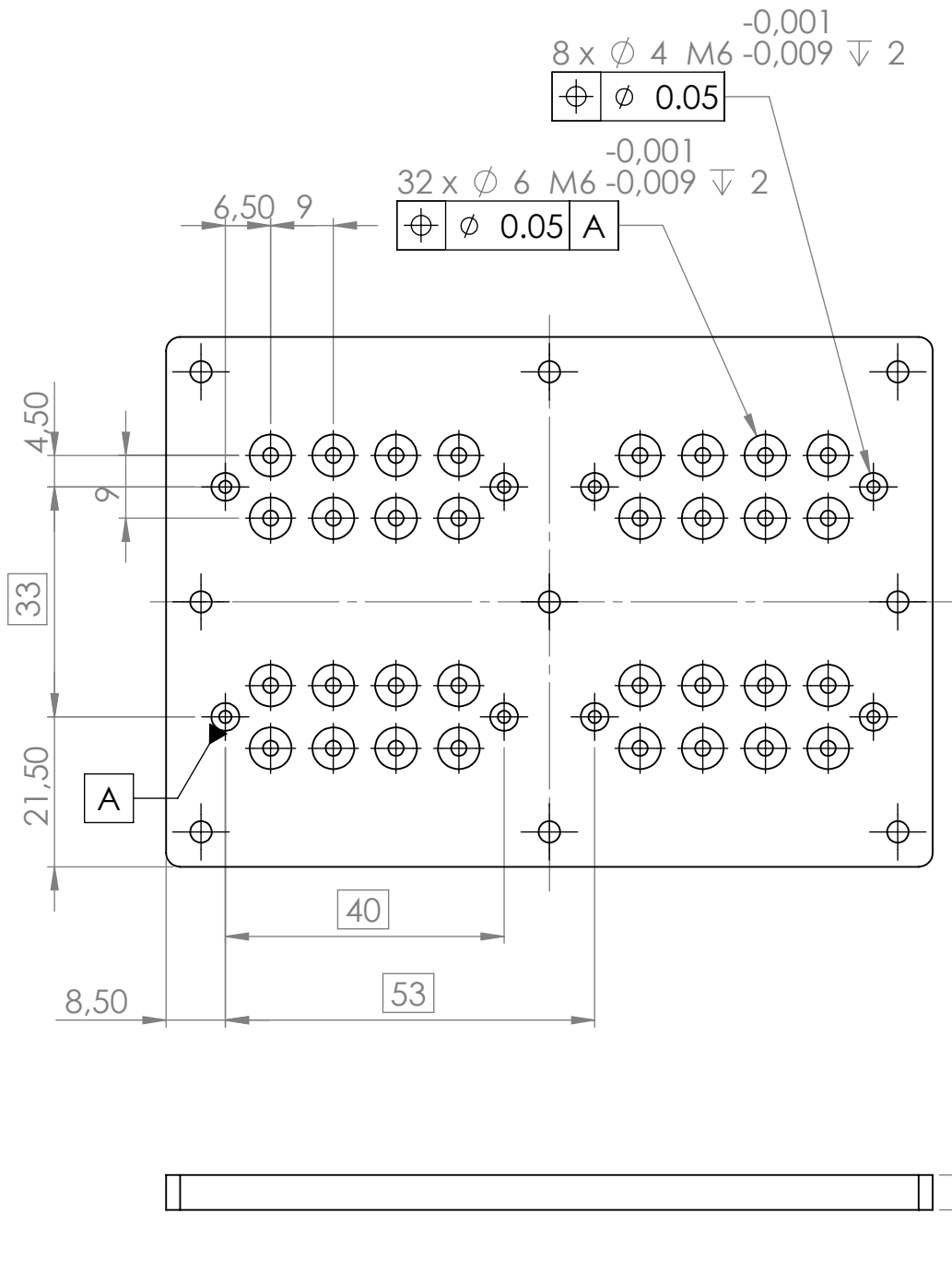
C

B

B

A

A



UNLESS OTHERWISE SPECIFIED:
 DIMENSIONS ARE IN MILLIMETERS
 SURFACE FINISH:
 TOLERANCES: +/- 0.100mm
 LINEAR:
 ANGULAR:

FINISH:

DEBURR AND
 BREAK SHARP
 EDGES

DO NOT SCALE DRAWING

REVISION

	NAME	SIGNATURE	DATE
DRAWN			
CHK'D			
APPV'D			
MFG			
Q.A			

TITLE:
Mold Bottom

DWG NO.
quantity: 2

MATERIAL:
polycarbonate

WEIGHT:

SCALE:1:1

SHEET 2 OF 2

4

3

2

1

4

3

2

1

F

F

E

E

D

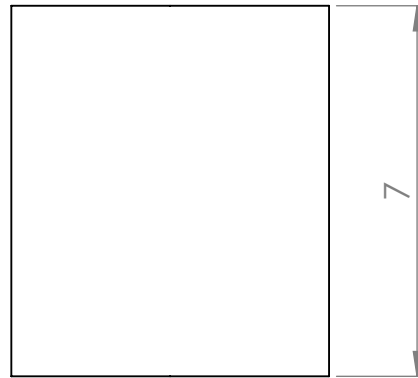
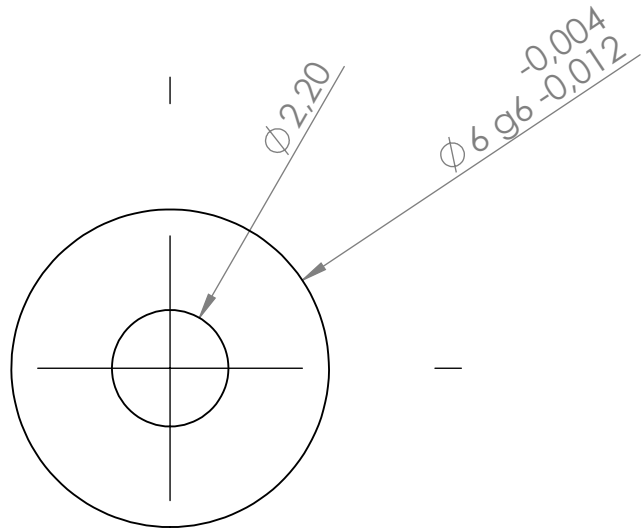
D

C

C

B

B



UNLESS OTHERWISE SPECIFIED:
 DIMENSIONS ARE IN MILLIMETERS
 SURFACE FINISH:
 TOLERANCES: +/- 0.100mm
 LINEAR:
 ANGULAR:

FINISH:

DEBURR AND
BREAK SHARP
EDGES

DO NOT SCALE DRAWING

REVISION

	NAME	SIGNATURE	DATE		
DRAWN					
CHK'D					
APPV'D					
MFG					
Q.A					

TITLE:

mold rod $\phi 6$

MATERIAL:

stainless steel

DWG NO.

quantity: 64

A4

WEIGHT:

SCALE:7:1

SHEET 1 OF 2

4

3

2

1

A

A

4

3

2

1

F

F

E

E

D

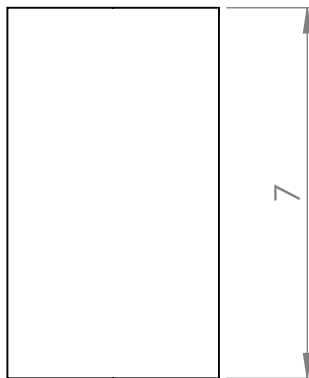
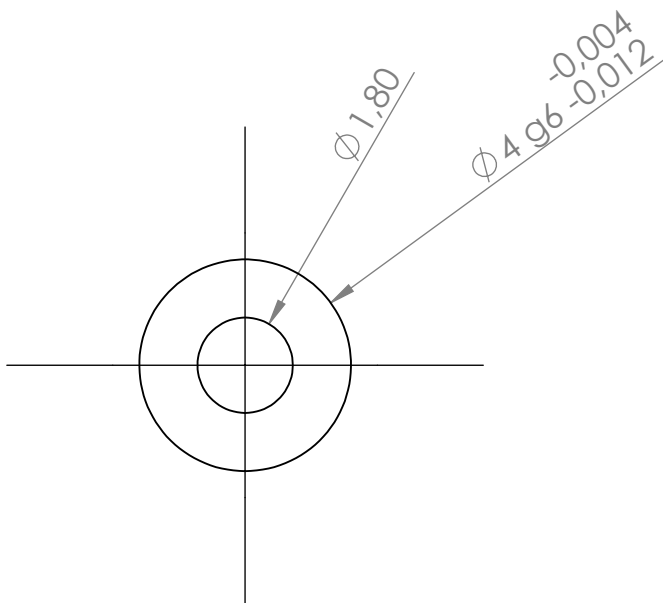
D

C

C

B

B



UNLESS OTHERWISE SPECIFIED:
 DIMENSIONS ARE IN MILLIMETERS
 SURFACE FINISH:
 TOLERANCES: +/- 0.100mm
 LINEAR:
 ANGULAR:

FINISH:

DEBURR AND
BREAK SHARP
EDGES

DO NOT SCALE DRAWING

REVISION

	NAME	SIGNATURE	DATE		
DRAWN					
CHK'D					
APPV'D					
MFG					
Q.A					

TITLE:

mold rod $\phi 4$

MATERIAL:

stainless steel

DWG NO.

quantity: 16

A4

WEIGHT:

SCALE:7:1

SHEET 2 OF 2

4

3

2

1

A

A

4

3

2

1

F

F

E

E

D

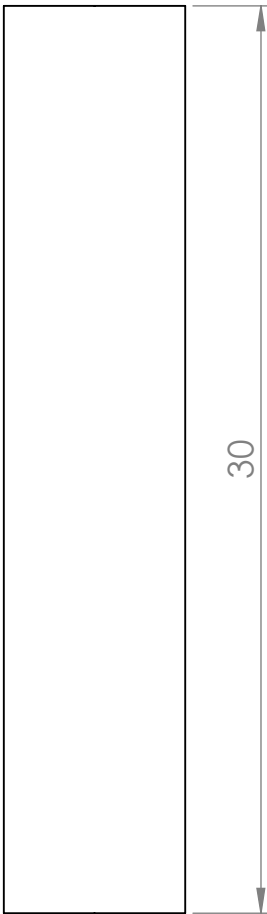
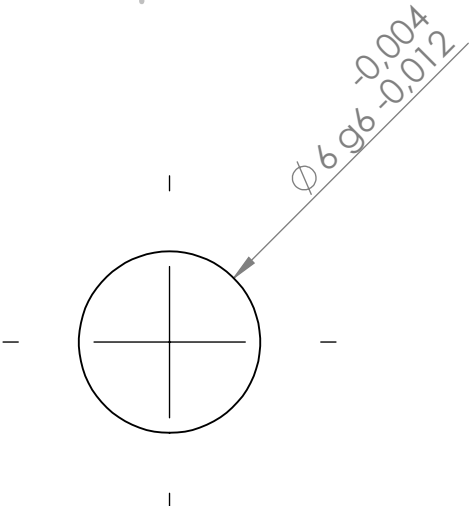
D

C

C

B

B



UNLESS OTHERWISE SPECIFIED:
 DIMENSIONS ARE IN MILLIMETERS
 SURFACE FINISH:
 TOLERANCES: +/- 0.100 mm
 LINEAR:
 ANGULAR:

FINISH:

DEBURR AND
BREAK SHARP
EDGES

DO NOT SCALE DRAWING

REVISION

	NAME	SIGNATURE	DATE	
DRAWN				
CHK'D				
APPV'D				
MFG				
Q.A				

TITLE:

rod $\phi 6$

MATERIAL:

stainless steel

DWG NO.

quantity: 2

A4

WEIGHT:

SCALE:4:1

SHEET 1 OF 2

4

3

2

1

A

A

4

3

2

1

F

F

E

E

D

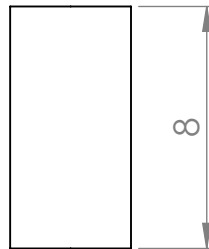
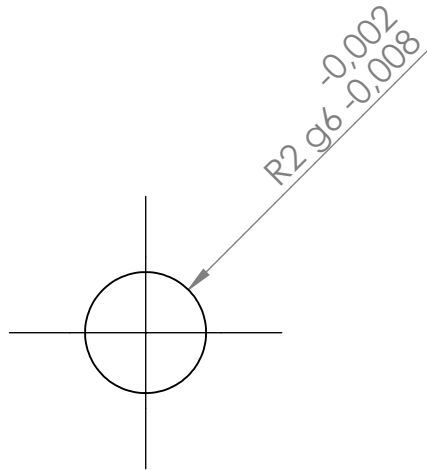
D

C

C

B

B



UNLESS OTHERWISE SPECIFIED:
 DIMENSIONS ARE IN MILLIMETERS
 SURFACE FINISH:
 TOLERANCES:
 LINEAR:
 ANGULAR:

FINISH:

DEBURR AND
 BREAK SHARP
 EDGES

DO NOT SCALE DRAWING

REVISION

	NAME	SIGNATURE	DATE		
DRAWN					
CHK'D					
APPV'D					
MFG					
Q.A					

TITLE:

rod $\phi 4$

MATERIAL:

DWG NO.

quantity: 8

A4

WEIGHT:

SCALE:4:1

SHEET 2 OF 2

4

3

2

1

A

A

