



ΕΘΝΙΚΟ ΜΕΤΣΟΒΙΟ ΠΟΛΥΤΕΧΝΕΙΟ
ΣΧΟΛΗ ΕΦΑΡΜΟΣΜΕΝΩΝ ΜΑΘΗΜΑΤΙΚΩΝ ΚΑΙ ΦΥΣΙΚΩΝ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ

ΔΙΑΤΜΗΜΑΤΙΚΟ ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΩΝ ΣΠΟΥΔΩΝ
«ΜΙΚΡΟΣΥΣΤΗΜΑΤΑ ΚΑΙ ΝΑΝΟΔΙΑΤΑΞΕΙΣ»

Εκτύπωση καρκινικών κυττάρων και οργανοειδών με τη χρήση της τεχνικής “Laser Induced Forward Transfer” με σκοπό την εναπόθεσή τους σε Organ-on-Chip πλατφόρμες.

ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ
της
Ελέζογλου Σταυρούλα (Εβίνα)

Επιβλέπουσα Καθηγήτρια: Ζεργιώτη Ιωάννα, Καθηγήτρια Ε.Μ.Π



ΕΘΝΙΚΟ ΜΕΤΣΟΒΙΟ ΠΟΛΥΤΕΧΝΕΙΟ
ΣΧΟΛΗ ΕΦΑΡΜΟΣΜΕΝΩΝ ΜΑΘΗΜΑΤΙΚΩΝ ΚΑΙ ΦΥΣΙΚΩΝ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ

ΔΙΑΤΜΗΜΑΤΙΚΟ ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΩΝ ΣΠΟΥΔΩΝ
«ΜΙΚΡΟΣΥΣΤΗΜΑΤΑ ΚΑΙ ΝΑΝΟΔΙΑΤΑΞΕΙΣ»

Εκτύπωση καρκινικών κυττάρων και οργανοειδών με τη χρήση της τεχνικής “Laser Induced Forward Transfer” με σκοπό την εναπόθεσή τους σε Organ-on-Chip πλατφόρμες.

ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ
της
Ελέζογλου Σταυρούλα (Εβίνα)

Επιβλέπουσα Καθηγήτρια: Ζεργιώτη Ιωάννα, Καθηγήτρια Ε.Μ.Π

Τριμελής Εξεταστική Επιτροπή

Ζεργιώτη Ιωάννα Καθηγήτρια ΕΜΠ	Ράπτης Ιωάννης Καθηγητής ΕΜΠ	Τσιγαρίδας Γεώργιος Επίκουρος Καθηγητής ΕΜΠ

©(2021) Εθνικό Μετσόβιο Πολυτεχνείο. All rights Reserved. Απαγορεύεται η αποθήκευση και διανομή της παρούσας διπλωματικής 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 παρών μήνυμα. Ερωτήματα που αφορούν την χρήση της εργασίας για κερδοσκοπικό σκοπό πρέπει να απευθύνονται στον συγγραφέα. Οι απόψεις και τα συμπεράσματα που περιέχονται σ αυτό το έγγραφο εκφράζουν τον συγγραφέα και δεν πρέπει να ερμηνευτεί ότι αντιπροσωπεύουν τις επίσημες θέσεις του Εθνικού Μετσόβιου Πολυτεχνείου.

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

Ευχαριστίες	8
Περίληψη	9
Abstract	11
Κεφάλαιο 1. Βίο-εκτύπωση	13
1.1 Εισαγωγή	13
1.2 Ιστορική αναδρομή τεχνικής βίο-εκτύπωσης με τη χρήση της τεχνικής Laser Induced Forward Transfer, LIFT	13
1.3 Μέθοδοι τρισδιάστατης βίο-εκτύπωσης	19
1.3.1 Βίο-εκτύπωση Inkjet	19
1.3.2 Microextrusion βίο-εκτύπωση	22
1.3.3 Βιοεκτύπωση με τη χρήση laser-LIFT	25
1.4 Μελέτη του πίδακα και της εναποτιθέμενης σταγόνας κατά την βιοεκτύπωση με LIFT	29
Κεφάλαιο 2. Ρεολογία βίο-μελανιών	32
2.1 Εισαγωγή στη ρεολογία	32
2.2 Ιξώδες ρευστού	32
2.3 Νευτώνεια και μη-Νευτώνεια ρευστά	33
2.4 Γενική συμπεριφορά του ιξώδους σε διαλύματα με σωματίδια (suspensions)	35
2.5 Ιξωδοελαστικότητα	35
2.5.1 Ρεολογικός χαρακτηρισμός ECM	37
2.6 Πρόσκρουση στερεού σε ρευστό υπόστρωμα	38
Κεφάλαιο 3. Βίο-Εκτύπωση σε συστήματα Organ-on-chip	41
3.1 Εισαγωγή	41

3.2	Συστήματα Organ-on-chip.....	41
3.3	Τοποθέτηση βίο-υλικών και κυττάρων στα ΟοC με τρισδιάστατη βίο-εκτύπωση	42
3.4	Δομές προς εναπόθεση σε ΟοC πλατφόρμες	44
3.4.1	Κύτταρα σε ΟοC πλατφόρμες	44
3.4.2	Οργανοειδή σε ΟοC πλατφόρμες	46
3.4.3	Ιστοί σε ΟοC πλατφόρμες	47
3.4.4	Όργανα σε ΟοC πλατφόρμες	48
Κεφάλαιο 4.	Πειραματικές διατάξεις & Πρωτόκολλα	50
4.1	Οπτικές διατάξεις.....	50
4.1.1	Τυπική διάταξη βίο-εκτυπωτή LIFT.....	50
4.1.2	Οπτικό σύστημα καταγραφής με κάμερα υψηλής ταχύτητας.....	52
4.1.3	Διάταξη εκτύπωσης οργανοειδών	54
4.2	Υλικά, βίο-μελάνια και υποστρώματα.....	56
4.2.1	Εξωκυτταρική Μήτρα (Extracellular Matrix, ECM).....	56
4.2.2	Υπόστρωμα Αποδέκτη.....	56
4.2.3	Πρωτόκολλα καλλιέργειας κυττάρων	57
Κεφάλαιο 5.	Πειραματικό μέρος.....	61
5.1	Μελέτη συνθηκών βίο-εκτύπωσης με Laser	61
5.1.1	Μελέτη επιλογής υποστρώματος αποδέκτη	61
5.1.2	Μελέτη συνθηκών απόστασης υποστρωμάτων δότη και αποδέκτη	63
5.1.3	Μελέτη πυκνοτήτων ενέργειας βίο-εκτύπωσης με laser	65
5.1.4	Μελέτη αριθμού κυττάρων σε σχέση με την ενέργεια ανά επιφάνεια του laser.....	68
5.2	Μελέτη του φαινομένου εκτύπωσης κυττάρων με τη μέθοδο LIFT	69

5.2.1	Μελέτη ανάπτυξης υγρού πίδακα με τη μέθοδο LIFT	69
5.2.2	Μελέτη τοποθέτησης κυττάρων στο εσωτερικό εξωκυτταρικής μήτρας με τη χρήση της τεχνικής LIFT	77
5.3	Εκτύπωση και ανάπτυξη οργανοειδών	79
5.3.1	Ανάπτυξη σφαιροειδών από εκτυπωμένα κύτταρα με τη μέθοδο LIFT .	79
5.3.2	Εκτύπωση δύο διαφορετικών κυττάρων στο εσωτερικό μιας ECM (co-bioprinting)	80
5.3.3	Απευθείας εκτύπωση οργανοειδών με τη μέθοδο LIFT	83
5.4	Εναπόθεση κυττάρων σε μικροροϊκές πλατφόρμες OoC με τη χρήση της τεχνικής βίο-εκτύπωσης LIFT	86
	Συμπεράσματα.....	88
	Μελλοντικές κατευθύνσεις.....	90
	Βιβλιογραφία	91

Ευχαριστίες

Κατά την διάρκεια αυτής της εργασίας μου δόθηκε η ευκαιρία να συνεργαστώ με επιστήμονες και ερευνητές, οι οποίοι συντέλεσαν καθοριστικό ρόλο για την διεξαγωγή της παρούσας διπλωματικής εργασίας.

Αρχικά, θα ήθελα να εκφράσω ένα μεγάλο ευχαριστώ στην επιβλέπουσα της παρούσας εργασίας, καθηγήτρια Ζεργιώτη Ιωάννα, για την εμπιστοσύνη που μου έδειξε, την καθοδήγησή της και την στήριξή της σε αυτό το απαιτητικό και ταυτόχρονα πολύ ενδιαφέρον ερευνητικό θέμα. Μέσα από αυτή την καθοδήγηση, με βοήθησε να αποκτήσω ευρύτερες γνώσεις και εμπειρίες που με βοήθησαν να ανταπεξέλθω στις δυσκολίες που παρουσιάστηκαν. Την ευχαριστώ για όλες τις ευκαιρίες που μου έδωσε αλλά και την εμπιστοσύνη που μου έδειξε μέσα σε αυτόν τον χρόνο.

Θα ήθελα, επιπλέον, να ευχαριστήσω θερμά τον Δρ. Κλινάκη Απόστολο, Α' Ερευνητή στο Ίδρυμα Ιατροβιολογικών Ερευνών της Ακαδημίας Αθηνών, όπου και διατηρεί το δικό του εργαστήριο, για την υποστήριξη, τις πολύτιμες συμβουλές και φυσικά για την διάθεση των εργαστηριακών εγκαταστάσεων ώστε να διεκπεραιωθεί η παρούσα εργασία.

Φυσικά από τις ευχαριστίες δεν θα μπορούσα να παραλείψω όλους του συναδέλφους του εργαστηρίου. Αρχικά, ευχαριστώ θερμά, την Δρ. Μαριαννέζα Χατζηπέτρου και τον Δρ. Συμεών Παπάζογλου για την πολύτιμη καθοδήγηση και τις συμβουλές τους. Ευχαριστώ πολύ, τον Δρ. Γιάννη Θεοδωράκο, για τις σημαντικές γνώσεις και συμβουλές που μοιράστηκε μαζί μου. Θα ήθελα επίσης, να πω ένα μεγάλο ευχαριστώ στην Υ.Δ Μαρία Χλιάρα, που από την πρώτη στιγμή που έδειξε αμέριστη εμπιστοσύνη, μοιράστηκε μαζί μου πολλές γνώσεις και ιδέες και με βοήθησε να διεκπεραιώσω την παρούσα εργασία. Επίσης ευχαριστώ πολύ τον Σπύρο Κανακάκη για την μεγάλη βοήθεια στον μηχανολογικό σχεδιασμό των εξαρτημάτων που χρειάστηκαν, τον Υ.Δ Χρήστο Κατοπόδη για την βοήθειά του στον σχεδιασμό των οπτικών συστημάτων και φυσικά όλα τα μέλη της ομάδας του εργαστηρίου για την άριστη συνεργασία και το όμορφο κλίμα που υπήρξε στον εργαστηριακό χώρο.

Επιπλέον, θα ήθελα να εκφράσω ένα μεγάλο ευχαριστώ στους ερευνητες της ομάδας του Δρ. Κλινάκη, στο Ίδρυμα Ιατροβιολογικών Ερευνών της Ακαδημίας Αθηνών. Συγκεκριμένα, στην Δρα. Τσιλλιγγίρη Κατερίνα, η οποία μου μετέδωσε όλες τις απαραίτητες βιολογικές γνώσεις που χρειάστηκα καθώς και για την συνδρομή της στα βιολογικά πειράματα που διεκπεραιώθηκαν.

Τέλος θα ήθελα να ευχαριστήσω τους γονείς μου για την αμέριστη υποστήριξη και συμπαράστασή τους όλα αυτά τα χρόνια.

Τα πειράματα της παρούσας εργασίας πραγματοποιήθηκαν στο εργαστήριο Μικροεπεξεργασίας Υλικών και Διατάξεων με Λέιζερ (Laser Printing and Materials Processing, LPMP), του τομέα Φυσικής, στο Εθνικό Μετσόβιο Πολυτεχνείο στο τμήμα Εφαρμοσμένων Μαθηματικών και Φυσικών Επιστημών, από τον Ιούλιο του 2021 έως τον Οκτώβρη του 2022.

Περίληψη

Τα τελευταία χρόνια, έχει προκύψει η ανάγκη αλληλεπίδρασης και συνεργασίας των επιστημονικών κλάδων, ώστε τα αποτελέσματα της έρευνας να είναι υλοποιήσιμα και να προσφέρουν αντίκτυπο στην κοινωνία. Η φυσική και η μηχανική, σε συνδυασμό με την βιολογία και την ιατρική, πρόσφατα, δημιούργησαν έναν κλάδο με πολλές εφαρμογές στον ανθρωπιστικό τομέα. Όπως θα αναφερθεί εκτενώς στην παρούσα διπλωματική εργασία, είναι επιτακτική η ανάγκη ενός καινοτόμου τρόπου για την διεξαγωγή της έρευνας όσον αφορά την θεραπεία των ασθενειών καθώς και την ηθική της ίδιας της έρευνας. Για αυτό τον λόγο, παρατηρείται μεγάλη άνοδος στην τεχνολογία των μικροροϊκών πλατφόρμων τύπου Organ-on-a-chip. Αυτή η τεχνολογία, ανοίγει έναν καινούριο δρόμο για την προσωποποιημένη ιατρική, για την έρευνα φαρμάκων και θεραπειών καθώς και για την παύση των πειραμάτων σε ζώα. Η τεχνολογία των ΟοC είναι άρρηκτα συνδεδεμένη με τα βίο-υλικά και τις τεχνικές βίο-εκτύπωσης. Ειδικά τα τελευταία χρόνια, έχει φανεί έντονα η ανάγκη ενός διαφορετικού τρόπου εναπόθεσης των κυττάρων σε αυτές τις πλατφόρμες. Έτσι στην παρούσα διπλωματική εργασία, τονίζεται η σημαντικότητα της χρήσης της βίο-εκτύπωσης με την τεχνική Laser Induced Forward Transfer, LIFT, για την εναπόθεση των εκάστοτε βίο-υλικών στο εσωτερικό των Organ-on-a-chip πλατφόρμων.

Στην παρούσα διπλωματική εργασία, γίνεται εκτενής μελέτη της βίο-εκτύπωσης με τη χρήση της τεχνικής Laser Induced Forward Transfer, με σκοπό την εκτύπωση κυττάρων και οργανοειδών στο εσωτερικό μικροροϊκών πλατφόρμων τύπου Organ-on-a-chip.

Στο 1^ο κεφάλαιο, γίνεται αναφορά στις τεχνικές βίο-εκτύπωσης. Συγκεκριμένα, περιγράφεται η πρόσφατη βιβλιογραφική αναφορά της τεχνικής LIFT μόνο για βιολογικά υλικά, έπειτα αναλύονται όλες οι τεχνικές βίο-εκτύπωσης και τέλος δίνεται έμφαση στην τεχνική LIFT και στον τρόπο που εξελίσσεται το φαινόμενο.

Στο 2^ο κεφάλαιο, παρατίθεται θεωρητική μελέτη για την ρεολογική συμπεριφορά των βίο-μελανιών. Η ρευστομηχανική είναι απολύτως συνδεδεμένη με τα βίο-υλικά αφού, για την χρήση τους είναι απαραίτητη η γνώση πολλών ρεολογικών παραμέτρων.

Στο 3^ο κεφάλαιο, παρουσιάζονται τα συστήματα Organ-on-a-chip και η σημασία τους για την εξέλιξη της έρευνας.

Έπειτα, στο 4^ο κεφάλαιο, γίνεται εκτενής αναφορά στις πειραματικές διατάξεις και στα πρωτόκολλα που δημιουργήθηκαν και χρησιμοποιήθηκαν σε αυτή την εργασία.

Στο τελευταίο κεφάλαιο, διατυπώνεται η ερευνητική μελέτη που πραγματοποιήθηκε κατά την διάρκεια της μεταπτυχιακής μου εργασίας. Αρχικά, έγινε μελέτη για την βελτιστοποίηση πολλών παραμέτρων για την διαδικασία βίο-εκτύπωσης με τη χρήση της τεχνικής LIFT. Μελετήθηκαν, το είδος του υποστρώματος αποδέκτη, η βέλτιστη απόσταση μεταξύ των δύο υποστρωμάτων, δότη και αποδέκτη αλλά και η ενέργεια ανά επιφάνεια του laser που χρειάζεται για είναι επιτυχημένη η εκτύπωση κυττάρων και οργανοειδών. Συγκεκριμένα, επειδή οι μικροροϊκές πλατφόρμες έχουν συνήθως θαλάμους αρκετά βαθύς (πάνω από 5 mm) για την εναπόθεση των κυττάρων, αυτό δημιούργησε πρόβλημα στην εκτύπωση με την χρήση laser. Οι συνηθέστερες αποστάσεις εκτύπωσης είναι μικρότερες από 1 mm, με αποτέλεσμα να χρειάζεται η

διερεύνηση της βίο-εκτύπωσης με laser και σε μεγαλύτερες αποστάσεις. Επιπλέον, μελετήθηκε ο αριθμός κυττάρων που εναποτίθενται ανάλογα την ενέργεια του laser.

Στη συνέχεια, πραγματοποιήθηκαν πειράματα με την χρήση υψηλής κάμερας ανάλυση για την παρατήρηση του φαινομένου βίο-εκτύπωσης πριν και μετά την είσοδο των κυττάρων στην εκάστοτε Εξωκυτταρική Μήτρα ECM. Μελετήθηκαν εκτενέστερα οι αποστάσεις εκτύπωσης, καθώς και βρέθηκαν τα σημεία ακινητοποίησης των κυττάρων στο εσωτερικό των ECM αναλόγως την ενέργεια του laser.

Τέλος, πραγματοποιήθηκε η ανάπτυξη οργανοειδών από εκτυπωμένα κύτταρα μέσα σε ECM, η εκτύπωση διαφορετικών ειδών κυττάρων σε μεμβράνη για την πιθανή μελέτη αλληλεπίδρασής τους, γεγονός που ανέδειξε την χρησιμότητα της βίο-εκτύπωσης με τη χρήση της τεχνικής LIFT για τη δημιουργία διαφορετικών σχηματισμών και εναπόθεσης κυττάρων.

Ένας από τους τελικούς στόχους αυτής της εργασίας ήταν η εκτύπωση καρκινικών οργανοειδών, κάτι το οποίο εξ'αρχής ήταν αρκετά δύσκολο να πραγματοποιηθεί κυρίως λόγω του μεγάλου μεγέθους τους και της μη παροχής της δυνατότητας συμπύκνωσής τους σε μικρό όγκο. Παρόλα αυτά, πραγματοποιήθηκε η εκτύπωσή του με επιτυχία. Τέλος, η εργασία αυτή ολοκληρώνεται με την επιτυχημένη εναπόθεση κυττάρων στο εσωτερικό των θαλάμων σε πλατφόρμα Organ-on-a-chip.

Abstract

The last few years, the need for interaction and collaboration of scientific fields is bigger than ever, so that the results of the research can be implementable and can have an impact to society. Physics and engineering, combined with biology and medicine, have recently created a field with many applications in the humanitarian sector. As it will be mentioned on this thesis, the need for an innovative way to conduct research for the treatment of diseases as well as the ethics of the research itself is imperative. For this reason, there is a great rise in the technology of Organ-on-a-chip microfluidic platforms. This technology opens a new way for personalized medicine, for the research of drugs and treatments as well as for the cessation of animal testing experiments. OoC technology is inextricably linked to biomaterials and bioprinting techniques. Especially, nowadays, the need for a different way of depositing cells on these platforms has been strongly demonstrated. Thus, in this thesis, it is highlighted the importance of bioprinting via Laser Induced Forward Transfer, LIFT technique, for the deposition of each biomaterial inside the Organ-on-a-chip platforms.

In this thesis, is carried out an extensive study of bio-printing using the Laser Induced Forward Transfer technique, with the aim of manufacturing cells and organoids inside Organ-on-a-chip-type microfluidic platforms.

In the 1st chapter, is reported to the bio-printing technique. Specifically, is being described the recent bibliographic reference of the LIFT technique only for printing biological materials, then all bioprinting techniques are analyzed and finally the emphasis is placed on the LIFT technique and how the printing phenomenon proceeds.

In the 2nd chapter, it is being presented a theoretical study on the rheological behavior of bio-inks. Fluid mechanics is absolutely connected with biomaterials, because for their usage it is essential the knowledge of many rheological parameters.

In the 3rd chapter, are presented Organ-on-a-chip systems and their importance for the development and the evaluation of research.

Then, in chapter 4, extensive reference is made to the experimental setups and protocols created and used in this work.

In the last chapter, is formulated the study during my postgraduate research. Initially, a study was made to optimize several parameters for the bioprinting process using the LIFT technique. It is being studied the type of receiver substrate, the optimal distance between the two substrates, donor and receiver, and the energy per surface area of the laser needed for a cell and organoid to be printed. In particular, because microfluidic platforms usually have chambers deep enough (over 5 mm) for cell deposition, this created a problem in laser assisted printing. The most common printing distances are less than 1 mm, so laser bioprinting at longer distances needs to be investigated. In addition, it was also studied the number of cells deposited depending on the laser energy.

Then, experiments were performed using a high-resolution camera to visualize the bioprinting phenomenon before and after the entry of cells into the ECM Extracellular Matrix. The printing distances were studied more extensively here, as well as the cell immobilization points inside the ECM depending on the laser energy were found.

Finally, it was performed the development of organoids from printed cells within ECM, the printing of

different kinds of cells on a membrane for the possible study of their interaction, which also demonstrated the utility of bioprinting using the LIFT technique to create different patterning and assignments of cells.

One of the final goals of this work was the printing of tumor organoids, which was initially quite difficult to achieve mainly due to their large size and the inability to condense them into small volumes. Nevertheless, it was successfully printed.

Finally, this research of this thesis is completed with the effectively deposition of cells inside the chambers on an Organ-on-a-chip platform.

Κεφάλαιο 1. Βίο-εκτύπωση

1.1 Εισαγωγή

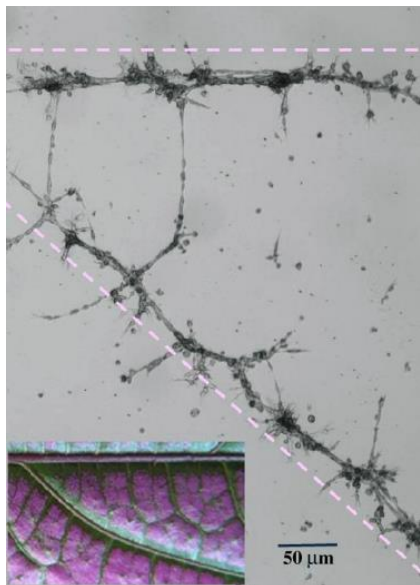
Τις τελευταίες δεκαετίες, παρατηρείται η άνοδος στην έρευνα που αφορά περισσότερες από μία επιστήμες. Συγκεκριμένα η βιολογία, η φυσική και η μηχανική έχουν δημιουργήσει ένα διατμηματικό κλάδο όπου γίνονται ποικίλες μελέτες πάνω στην εφαρμογή της έρευνας κυρίως στον κλάδο υγείας. Έτσι, ο κλάδος αυτός, της βιομηχανικής (bioengineering) και της βιοκατασκευής (biofabrication) είναι ένας σύγχρονος κλάδος στην έρευνα που οι εφαρμογές του έχουν και πρόκειται να έχουν μεγάλο αντίκτυπο στην ποιότητα ζωής των ανθρώπων όσον αφορά ασθένειες, δοκιμές φαρμάκων (drug testing), εξατομικευμένες και μη θεραπείες (personalized medicine), μέχρι και φορέσιμες συσκευές (wearable devices) για ελέγχους σε χρόνιες ασθένειες. Ένα άλλο σημαντικό κομμάτι που βρίσκει εφαρμογή αυτός ο κλάδος είναι η βελτίωση στην ηθική (bio ethics) της ίδιας της έρευνας, όπως η παύση των πειραμάτων σε ζώα. Συγκεκριμένα σύμφωνα με την United States Environmental Protection Agency (EPA), είναι ήδη κατοχυρωμένη η λήξη των πειραμάτων σε θηλαστικά μετά το 2035 [1]. Για όλα τα παραπάνω, το επιστημονικό ενδιαφέρον έχει στραφεί προς την καλλιέργεια των κυττάρων, την αλληλεπίδρασή τους με εξωκυτταρικές μήτρες, με τεχνητά βιο-υλικά σε αλληλεπίδραση με τεχνικές εκτύπωσης, μικροροϊκές πλατφόρμες, βιολογικούς αισθητήρες με σκοπό την πραγματοποίηση των παραπάνω εφαρμογών. Συγκεκριμένα η ανάπτυξη μικροροϊκών μικροσυσκευών, γνωστά ως Organ-on-a-chip (OoC) άνοιξαν έναν καινούριο δρόμο για την in vitro μελέτη. Με αυτή τη καινοτόμα και σύγχρονη προσθήκη στη τεχνολογία, μπορούν να πραγματοποιηθούν έρευνες αλληλεπίδρασης, έρευνες για φάρμακα, προσωποποιημένες μελέτες ασθενών για την εκάστοτε ασθένεια και φυσικά με τη χρήση τους επιτυγχάνεται η μείωση της χρήσης των ζώων στην έρευνα. Σε αυτό τον κλάδο παντρεύονται πολλές επιστήμες, όπως η ρευστομηχανική, η βιολογία, η ιατρική, η γενικότερη μηχανική. Συγκεκριμένα, κομβικό ρόλο σε αυτό το διακλαδικό τομέα έρευνας, έχουν τα βιοϋλικά καθώς και οι τεχνικές τρισδιάστατης βίο-εκτύπωσης. Με τα βιοϋλικά δίνεται η δυνατότητα δημιουργίας ικριωμάτων που προσομοιώνουν το σχήμα του οργάνου ή/και περιλαμβάνουν τα κύρια συστατικά ώστε να προσομοιώνουν το αυθεντικό μικροπεριβάλλον του εκάστοτε οργανισμού. Ουσιαστικά, τα βιοϋλικά αναπαράγουν τη βιολογική και μηχανική λειτουργία της φυσικής εξωκυτταρικής μήτρας (ECM) που βρίσκεται στους ιστούς του σώματος λειτουργώντας ως τεχνητό ECM. Κομβικό ρόλο σε αυτόν τον κλάδο έχει η τεχνολογία της τρισδιάστατης εκτύπωσης. Με την τεχνική της τρισδιάστατης εκτύπωσης επιτυγχάνεται κυρίως η εναπόθεση των βιοϋλικών, η ακινητοποίηση των κυττάρων και γενικότερα των υλικών που χρησιμοποιούνται, με αποτέλεσμα να χτίζονται ιστοί, οργανοειδή, μέχρι και ολόκληρα όργανα. Στην παρούσα διπλωματική, θα γίνει εκτενής ανάλυση της τρισδιάστατης εκτύπωσης με τη χρήση Laser, κυττάρων και οργανοειδών σε διάφορα υποστρώματα και βιοϋλικά και θα αναδειχθεί η σημαντικότητα της βιοεκτύπωσης στην τεχνολογία Organ-on-a-chip .

1.2 Ιστορική αναδρομή τεχνικής βίο-εκτύπωσης με τη χρήση της τεχνικής Laser Induced Forward Transfer, LIFT

Σήμερα, η τρισδιάστατη βιοεκτύπωση χρησιμοποιείται ευρέως στον διακλαδικό αυτό τομέα της βιομηχανικής. Μέσω της βιοεκτύπωσης επιτρέπεται στρώμα με στρώμα, είτε η δημιουργία μιας τρισδιάστατης μήτρας από βιοσυμβατά και βιοαπορροφήσιμα υλικά είτε η επιλεκτική εναπόθεση βιολογικών αντικειμένων (π.χ. κύτταρα, φάρμακα κλπ.). Οι τρέχουσες μέθοδοι βιοεκτύπωσης περιλαμβάνουν την παραγωγή εκτυπωμένων δομών που βασίζονται στη χρήση ή όχι ικριωμάτων τα οποία έχουν ήδη χρησιμοποιηθεί για υποκατάσταση ιστού και για τη δημιουργία πλατφόρμων Organ-on-a-chip[2]. Υπάρχουν τρεις βασικές μέθοδοι βίο-εκτύπωσης: Inkjet, microextrusion και laser assisted. Σε αυτό

το κεφάλαιο θα γίνει εκτενής αναφορά στην βιβλιογραφία της μεθόδου βίο-εκτύπωσης με laser που βασίζεται στην τεχνική Laser Induced Forward Transfer, LIFT.

Η πρώτη αναφορά της τεχνικής LIFT για εκτύπωση βιολογικών υλικών, έγινε από τους H. Esrom et al.[3] το 1995 όπου κατάφεραν να εκτυπώσουν οργανικές ενώσεις (palladium acetate) με τη χρήση της τεχνικής LIFT, δηλαδή η επίτευξη της μεταφοράς ενός οργανικού υλικού με την φωτο-αποδόμηση μέρους του. Έτσι ξεκίνησε μία διαδικασία βελτιστοποίησης της τεχνικής αυτής καθώς με τον τρόπο αυτό είναι πιθανό να επιφέρονται μη αναστρέψιμες αλλαγές στην σύνθεση των υλικών. Η λύση σε αυτό το πρόβλημα δόθηκε με την τοποθέτηση ενός ενδιάμεσου στρώματος απορρόφησης μεταξύ του υποστρώματος δότη και την τοποθέτηση του προς εκτύπωση υλικού[4][5]. Αυτό έχει ως αποτέλεσμα ο παλμός του laser να προσπίπτει στο υπόστρωμα του δότη-χαλαζία και στη συνέχεια να απορροφάται από αυτό το ενδιάμεσο υλικό με αποτέλεσμα, να μην επηρεάζει το οργανικό υλικό που πρέπει να τυπωθεί. Συγκεκριμένα, τη στιγμή που απορροφάται ο παλμός από το ενδιάμεσο φιλμ, παρατηρείται μία τοπική αύξηση της θερμοκρασίας η οποία οδηγεί στην αποδόμηση του υλικού και στη δημιουργία ενός θύλακα αερίων στη διεπιφάνεια ανάμεσα στο φιλμ απορρόφησης και στο υλικό προς εναπόθεση. Έπειτα λόγω των εσωτερικών πιέσεων που δημιουργούνται στο εσωτερικό του θύλακα αερίων, το υλικό αποκολλάται και εκτοπίζεται στο υπόστρωμα του αποδέκτη, όπου και τελικά ακινητοποιείται. Με αυτόν τον τρόπο, διασφαλίζεται η διατήρηση των ιδιοτήτων του εκάστοτε υλικού αφού πλέον δεν έρχεται σε άμεση επαφή με τον παλμό της δέσμης του laser. Δηλαδή, η τοπική αύξηση της θερμοκρασίας και η οπτική ακτινοβολία του παλμού δεν επηρεάζουν το υλικό που εκτυπώνεται. Αυτή η επέκταση της τεχνικής LIFT ονομάστηκε Laser Ablation (LAT) και έβαλε τα θεμέλια για την εκτύπωση βιολογικών υλικών με τη μέθοδο LIFT.



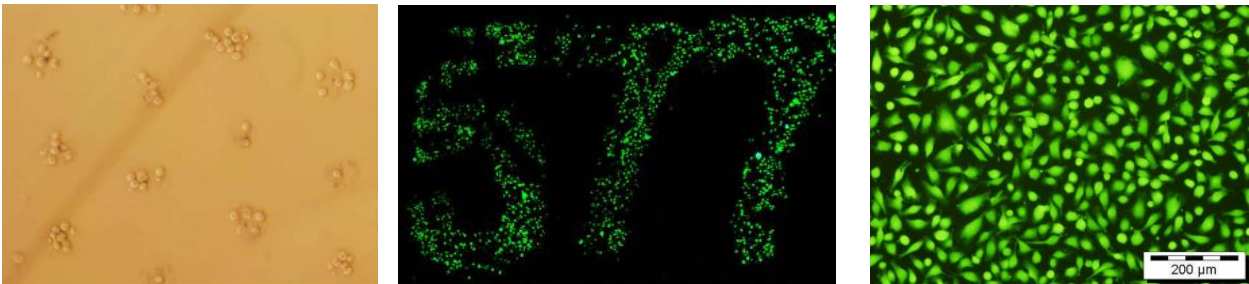
Εικόνα 1: 1^η ημέρα μετά την εκτύπωση HUVEC από τους Wu et al.[6].

Το 2001 οι Ringesein et al. [7] κατάφεραν να εκτυπώσουν βιομόρια με τη χρήση laser σε στερεή φάση, δείχνοντας ότι τα βιομόρια δεν μπορούν να απορροφήσουν ένα μεγάλο ποσοστό των μηκών κύματος εκπομπής των laser, με αποτέλεσμα να χρησιμοποιήσουν excimer laser ArF ($\lambda=193$ nm) και ενδιάμεσο στρώμα απορρόφησης μεταξύ δότη και βίο-υλικού. Παρόλου που η χρήση του excimer laser λύνει το πρόβλημα με την αντοχή των βίο-υλικών δημιουργεί μεγάλες απαιτήσεις όσον αφορά τη πολύ ακριβή διάταξη του συστήματος καθώς και τον μικρό χρόνο ζωής. Έπειτα από αυτό, οι P.K. Wu et al. [8] επιτυγχάνουν εκτύπωση κυττάρων, το 2002 με τη χρήση παλμικού laser εκτυπώνονται βακτηρίδια E. Coli,

ενώ οι Karaiskou et al.[9] εκτυπώνουν μικροσυστοιχίες DNA.

Όλες οι παραπάνω μελέτες αφορούν την εκτύπωση με excimer laser, βιομορίων, σε στερεή φάση, χωρίς τη χρήση ειδικού απορροφητικού φίλμ στο υπόστρωμα δότη. Από το 2005 και έπειτα γίνεται εκτενής έρευνα στα φίλμ απορρόφησης του παλμού που ενσωματώνονται στα υποστρώματα δότες και μπορούν να χρησιμοποιηθούν για την εκτύπωση βιομορίων (Au[10], Ti[11], TiO₂[12]), αφού δεν είναι επιβλαβή για τα μόρια που εκτυπώνονται. Το 2006 μάλιστα πραγματοποιήθηκε για πρώτη φορά εκτύπωση κυττάρων με τη χρήση πολυμερικού ενδιάμεσου στρώματος απορρόφησης, από τους Lippert et al.[13]. Έπειτα από δύο χρόνια, το 2008, εκτυπώνονται κύτταρα σε γραμμές μήκους 1mm και πλάτους 20μm με σκοπό τη δημιουργία τρισδιάστατων βιοδομών οι οποίες μετέπειτα θα εφαρμοστούν για την ανάπτυξη βιολογικών ιστών [14].

Έτσι μία νέα εφαρμογή της τεχνικής εκτύπωσης με laser ξεκίνησε. Συγκεκριμένα το 2012, οι Wu et al. [6] χρησιμοποιώντας laser με μήκος κύματος εκπομπής στα 248 nm κατάφεραν να εναποθέσουν σε υπόστρωμα υδρογέλης πρωταρχικά ενδοθηλιακά κύτταρα ποντικού που έχουν εξαχθεί από τα αγγεία. Σκοπός της έρευνας ήταν η κατασκευή ενός δικτύου από αγγεία, όμως οι διακλαδισμένες δομές που μοιάζουν με αυλό παρέμειναν ανέπαφες για τουλάχιστον 9 ημέρες. Έπειτα την ίδια χρονιά οι Guillemot et al. [15], με σκοπό την πρόταση της εφαρμογής της βιοεκτύπωσης με laser υψηλής απόδοσης για την κατασκευή τρισδιάστατων ιστών, κατάφεραν να εκτυπώσουν κύτταρα σε καλώς σχηματισμένο μοτίβο καθώς και ενοπόθεση νανοσωματιδίων σε γυαλάκια μικροσκοπίου (**Εικόνα 2**). Στη συνέχεια, οι Guillotin et al. [16], με υπέρυθρο laser που εκπέμπει στα 1064 nm και στρώμα δότη επικαλυμμένο με Τιτάνιο εκτύπωσαν κάποιες κυτταρικές σειρές και πάλι σε γυαλάκι μικροσκοπίου σκέτο ή μαζί με κάποιο ECM (Matrigel). Σε αυτή την περίπτωση επιτεύχθηκε εκτύπωση κυττάρων με ανάλυση στην μικροκλίμακα

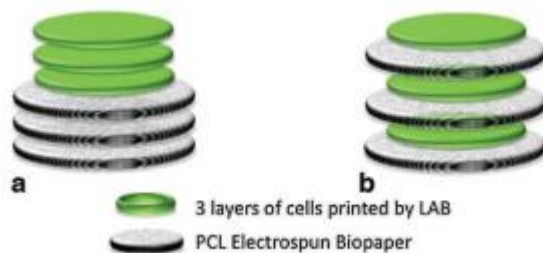


Εικόνα 2: Εκτύπωση κυττάρων με τη χρήση της τεχνικής LIFT, από τους Guillemot et al [15]

καθώς και δημιουργήθηκαν διατάξεις που μοιάζουν με ιστούς σε απαιτούμενη και πάλι ανάλυση. Κομβικό σημείο στην ιστορία της τεχνικής LIFT για βιολογικά υλικά, ήταν το 2010, όπου οι Koch et al. επιβεβαίωσαν πως η τεχνική αυτή βιο-εκτύπωσης είναι ασφαλής για εναπόθεση κυττάρων. Διερεύνησαν τις πιθανές επιπτώσεις που έχει η τεχνική για την βιωσιμότητα των κυττάρων, την αναπαραγωγή τους και την απόπτωση, χρησιμοποιώντας laser 1064 nm. Από τα αποτελέσματα, φάνηκε πως τα ποσοστά καταστροφής του DNA των κυττάρων, όταν αυτά εναποτίθενται με laser δεν διαφέρουν καθόλου από τα φυσιολογικά ποσοστά καταστροφής.

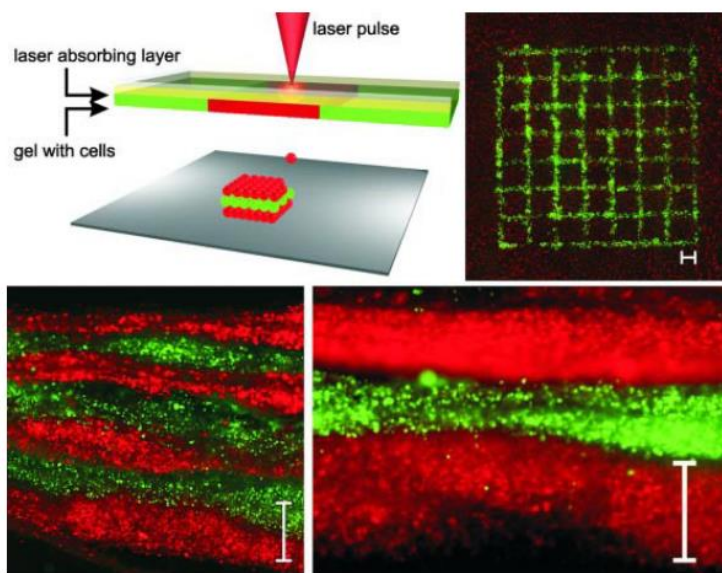
Έπειτα ακολούθησαν μια σειρά από έρευνες κυρίως από τους Gruene et al. , όπου με laser στα 1064 nm, διερευνήθηκε η συμπεριφορά των Μεσεγχυματικών βλαστοκυττάρων (MSC), και αν αυτά επηρεάζονται από την διαδικασία εκτύπωσης, όπου και βρέθηκε πως οι παράμετροι εκτύπωσης δεν δημιούργησαν κάποια διαφορά στην ποιότητα των κυττάρων[17][18]. Σε αντίθεση με τους παραπάνω οι Catros et al., βρήκαν πως οι συνθήκες εκτύπωσης επηρεάζουν σε μεγάλο βαθμό την βιωσιμότητα των Ενδοθηλιακών κυττάρων ανθρώπινης ομφαλικής φλέβας (HUVEC)[19]. Στην συνέχεια, η ίδια ομάδα, το 2011-2012,

ξεκίνησαν μία προσπάθεια για σχεδιασμό διαφορετικών μοτίβων στα υποστρώματα αποδέκτες, χτίζοντας δισδιάστατες και τρισδιάστατες δομές από αδενοκαρκίνομα πνεύμονα (HOPs), ώστε να τα συγκεντρώσουν σε διαφορετικά υποστρώματα[20] ενώ ταυτόχρονα, εισήγαγαν τη χρήση βιολογικών χαρτιών (biopapers) ως ενδιάμεσα στρώματα στην επιφάνεια που εκτυπώνονται τα κύτταρα για καλύτερη δόμηση της εναπόθεσης[21].



Εικόνα 3: Σχηματική απεικόνιση των δύο διαφορετικών τρόπων χρήσης βιολογικών χαρτιών για την εκτύπωση κυττάρων σε διαφορετικά στρώματα

Το 2012, οι Koch et al. εκτύπωσαν για πρώτη φορά δύο διαφορετικά είδη κυττάρων, ανθρώπινα κερατινοκύτταρα και ινοβλάστες ποντικού, με σκοπό την δημιουργία ιστού που να μιμείται τον αυθεντικό [22]. Όπως φαίνεται και στην **Εικόνα 4**, δημιούργησαν στρώματα από διαφορετικά εκτυπωμένα κύτταρα, όπου τα κόκκινα φθορίζοντα είναι κερατινοκύτταρα, ενώ τα πράσινα είναι ινοβλάστες, δημιουργώντας μία δομή που να μοιάζει με ιστό.



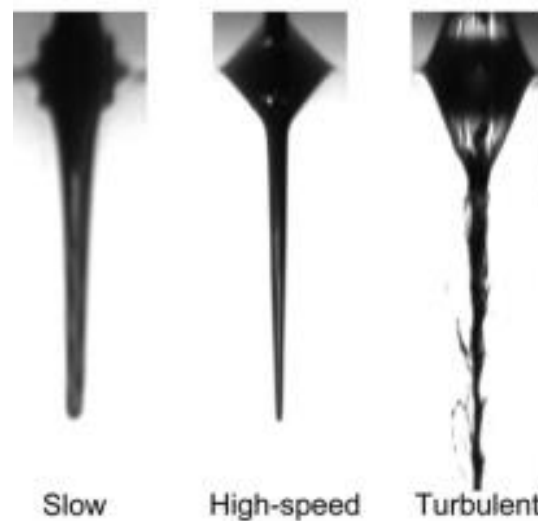
Εικόνα 4: Πάνω δεξιά φαίνεται η εκτύπωση του διαλύματος υδρογέλης αναμεμιγμένο με τα κύτταρα και αριστερά η δομή εκτύπωσης. Κάτω φαίνονται οι εκτυπωμένες δομές όπου έχουν διαστάσεις ύψους 2mm και καταλαμβάνουν 10 mm x 10 mm χώρο. Scale bar: 500 μm

Έπειτα από ένα χρόνο, το 2013, οι Kingsley et al [23]. χρησιμοποιώντας laser με μήκος κύματος εκπομπής

193 nm, και εκτύπωσαν καρκινικά κύτταρα σε συστοιχία από αλγινικά μικροσφαιρίδια. Έτσι φαίνεται ότι η βιοεκτύπωση με τη χρήση της τεχνικής LIFT, ξεκίνησε να έχει δυνατότητα σχεδίασης πολλαπλών μοτίβων. Στη συνέχεια, οι Dias et al. [24], έκαναν μία μελέτη, για ελεγχόμενη δημιουργία διαφορετικών μεγεθών, εμβρυϊκών σφεροειδών μεταβάλλοντας τις συστοιχίες εκτύπωσης και τη συγκεντρώσεις των κυττάρων προς εναπόθεση.

Την ίδια χρονιά, οι Ali et al. ξεκίνησαν ένα νέο τρόπο μελέτης της τεχνικής βιοεκτύπωσης με laser, χρησιμοποιώντας κάμερα υψηλής ανάλυσης για την καταγραφή του φαινομένου. Ανέλυσαν τον μηχανισμό του υγρού πίδακα για την εκτύπωση μεσεγχυματικών βλαστοκυττάρων, χρησιμοποιώντας laser στα 1064 nm. Έδειξαν ότι με αυξομειώσεις στην ενέργεια ανά επιφάνεια του laser, δημιουργούνται τρεις καταστάσεις στο πίδακα (**Εικόνα 5**). Οι αργοί πίδακες είναι αδιατάρακτοι, πιο σταθεροί και μπορούν να παράγουν κανονικές εκτυπώσεις, ενώ οι τυρβώδεις πίδακες δεν είναι η βέλτιστη επιλογή για βιοεκτύπωση. Χρησιμοποιώντας συνθήκες αργής εκτόξευσης, οι οποίες υποτίθεται ότι ελαχιστοποιούν την τάση διάτμησης εντός του πίδακα και της πρόσκρουσης των κυττάρων κατά την προσγείωση σταγονιδίων, εναποτίθενται με επιτυχία μεσεγχυματικά βλαστοκύτταρα με πολύ υψηλή βιωσιμότητα και υψηλή ανάλυση [25].

Το 2015, οι Xiong et al. [26] εκτύπωσαν ινοβλάστες ποντικού με αλγινικό με σκοπό την κατασκευή τρισδιάστατων αγγείων με σχήματα είτε κυκλικά είτε σε μορφή ύψιλον-Y. Αυτό το πραγματοποίησαν με την εκτύπωση στρωμάτων το ένα πάνω στο άλλο ώστε τελικά το τελικό προϊόν να είναι τρισδιάστατο. Τα κύτταρα έδειξαν βιωσιμότητα για ένα μικρό χρονικό διάστημα μίας ημέρας μετά την εκτύπωση, καθώς οι διατμητικές τάσεις που δέχθηκαν ήταν αρκετά υψηλές και προκάλεσαν προβλήματα.



Εικόνα 5: Είδη πίδακα που δημιουργούνται κατά την εκτύπωση κυττάρων με τη χρήση της τεχνικής LIFT[25].

Οι Bouget et al. [27], με σκοπό την αξιολόγηση της σχέσης μεταξύ των ενδοθηλιακών κυττάρων, HUVEC και των μεσεγχυματικών βλαστοκυττάρων, MSC, πραγματοποίησαν εκτύπωση και των δύο ειδών, όπου και αποδείχθηκε ότι τα MSC οδήγησαν τα HUVEC στην αυτοοργάνωση. Στη συνέχεια, επιτεύχθηκε εκτύπωση κυττάρων από νευρώνες DRG, από τους Curley et al. [28], με σκοπό την ταξινόμησή τους σε απομονωμένους κόμβους. Τα τυπωμένα DRG κύτταρα διατήρησαν υψηλή βιωσιμότητα και έδειξαν την ικανότητα ανάπτυξης του νευρικού δικτύου.

Το 2016, οι Dersus et al., πραγματοποίησαν έρευνα για την εκτύπωση κυττάρων με τη χρήση της τεχνικής LIFT, όμως αυτή τη φορά με χαμηλότερη ενέργεια/επιφάνεια του laser. Συγκεκριμένα την αυξομείωση της ενέργειας την πέτυχαν με την μετακίνηση του υποστρώματος (δότης) στο οποίο προσπίπτει η δέσμη του laser, στον άξονα z. Με αυτό τον τρόπο, η εκτύπωση δεν πραγματοποιείται όταν το laser συγκλίνει στην επιφάνεια του δότη, που σε αυτό το σημείο είναι η μεγαλύτερη δυνατή τιμή της ενέργειας, αλλά σε κάποιο άλλο σημείο z που η δέσμη απεστιάζει. Επιπλέον, διερεύνησαν και την προσφορά που έχει το ενδιάμεσο υπόστρωμα χρυσού, μεταξύ του δότη και του στρώματος βιομελανιού. Από αυτή τη μελέτη φάνηκε πως η χαμηλότερη ενέργεια εκτύπωσης παρέχει υψηλότερη βιωσιμότητα των κυττάρων και η παρουσία ενδιάμεσου στρώματος χρυσού φέρνει καλύτερα αποτελέσματα[29].

Στην ίδια λογική, οι Xiong et al. διερεύνησαν την χρήση ζελατίνης ως ενδιάμεσο απορροφητικό στρώμα μεταξύ του δότη και του βιομελανιού, όπου διαπιστώθηκε πως η ύπαρξή του, μειώνει τη σταγόνα του εναποτιθέμενου υλικού και έχει πολύ θετικά αποτελέσματα στην εξέλιξη του πίδακα και της ίδιας της εκτύπωσης[30]. Οι Zhang et al. επίσης έκαναν εκτενής μελέτη της τεχνικής βιοεκτύπωσης με LIFT για βιομελάνια με ή χωρίς κύτταρα αναμεμιγμένα με αλγινικό. Αυτοί, κυρίως μελέτησαν την επίδραση της ενέργειας ανά επιφάνεια laser στην εξέλιξη του πίδακα, το σημείο που σπάει ο πίδακας το μέγεθος της εναποτιθέμενης σταγόνας κ.λπ.[31].

Στη συνέχεια, οι Vinson et al., το 2017, εκτύπωσαν καρκινικά κύτταρα σε αλγινικό ή κολλαγόνο με σκοπό την κατασκευή μικροσφαιριδίων υδρογέλης φορτωμένων κυττάρων και τη μεταφορά τους στο υπόστρωμα που περιέχει το λιποκύτταρο. Αυτό, επέτρεψε τη διερεύνηση βιομιμητικών μοντέλων καρκίνου του μαστού [32].



Εικόνα 6: Χρήση ζελατίνης ως ενδιάμεσο στρώμα απορρόφησης του laser. Αριστερά: με ζελατίνη, Δεξιά: χωρίς ζελατίνη [30].

Το 2018, οι Koch et al. είναι στην αναζήτηση για μία πιο λειτουργική διάταξη βιοεκτυπωτή LIFT με τη χρήση ενδιάμεσου απορροφητικού στρώματος μέταλλο [33] και στη συνέχεια βρέθηκε από τους ίδιους πως για την βέλτιστη εκτύπωση βλαστοκυττάρων hiPSC, χρειάζεται μόνο η χρήση του θρεπτικού τους υλικού ως βιομελάνης και Matrigel ως υπόστρωμα συλλέκτη [34].

Τέλος, οι Zergioti et al., το 2022, πραγματοποίησαν μία μελέτη για την καταστροφή του DNA από τη χρήση ακατάλληλων μηκών κύματος εκπομπής laser (355nm), με αποτέλεσμα να είναι υποχρεωτική η χρήση laser με μήκος κύματος εκπομπής στο ορατό και συγκεκριμένα στο πράσινο (532 nm) [35].

Έτσι, λαμβάνοντας υπόψιν την παραπάνω σχετικά πρόσφατη ιστορική αναδρομή της τεχνικής LIFT ως μέθοδος βιοεκτύπωσης, φαίνεται πως η τεχνική αυτή είναι αποτελεσματική και έχει προκαλέσει μεγάλο ενδιαφέρον στον ερευνητικό χώρο. Έχει μεγάλα περιθώρια βελτίωσης σε πολλούς τομείς και πρόκειται να εξελιχθεί αρκετά περισσότερο στον κλάδο της βιοκατασκευής μέσα στα επόμενα χρόνια.

1.3 Μέθοδοι τρισδιάστατης βίο-εκτύπωσης

Ο όρος τρισδιάστατη εκτύπωση εισήχθη για πρώτη φορά το 1986 από τον Charles W. Hull, όπου αρχικά ονόμασε αυτή τη τεχνική ως «Στερεολιθογραφία». Με αυτή τη τεχνική λεπτά στρώματα ενός υλικού, που σκληραίνει με ακτινοβόληση υπεριώδους ακτινοβολίας, εναπόκεινται σε ένα υπόστρωμα διαδοχικά, μέχρι να σχηματιστεί μία τρισδιάστατη δομή [36]. Στη συνέχεια αυτή η τεχνική ξεκίνησε να εφαρμόζεται για την δημιουργία ικριωμάτων από βίο-συμβατή ρητίνη [37]. Η ανάπτυξη συστημάτων χωρίς διαλύτες, με βάση το νερό, επέτρεψε την άμεση εκτύπωση βιολογικών υλικών σε τρισδιάστατα ικριώματα που θα μπορούσαν να χρησιμοποιηθούν για μεταμόσχευση με ή χωρίς την προσθήκη κυττάρων.

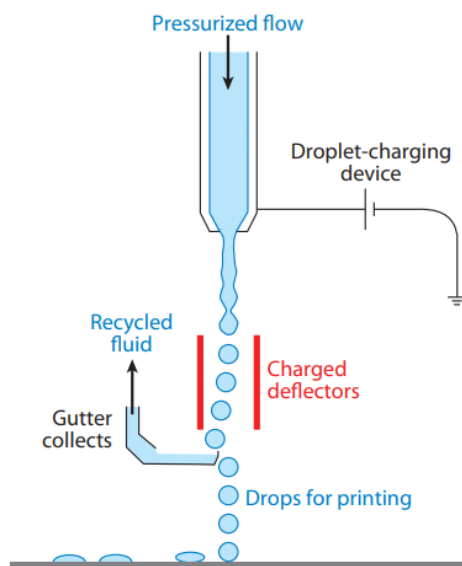
Οι κύριες τεχνολογίες που χρησιμοποιούνται για την εναπόθεση και τη διαμόρφωση μοτίβων βιολογικών υλικών είναι η εκτύπωση inkjet, η microextrusion και η εκτύπωση με τη βοήθεια laser. Οι τεχνικές αυτές διαφέρουν σε βασικές παραμέτρους που τις καθορίζουν επιτυχημένες, όπως η βιωσιμότητα των κυττάρων, οι ποικιλία των βίο-υλικών που μπορούν να εκτυπωθούν καθώς και πιο τεχνικά χαρακτηριστικά αναλόγως της εφαρμογής τους.

1.3.1 Βίο-εκτύπωση Inkjet

Οι εκτυπωτές inkjet είναι ίσως και οι πιο γνωστοί εκτυπωτές, τόσο για βιολογικά υλικών όσο και για μη βιολογικά. Με αυτή τη τεχνική ελεγχόμενοι όγκοι του εκάστοτε υγρού εναποτίθενται σε προκαθορισμένες θέσεις. Ουσιαστικά, οι πρώτοι inkjet εκτυπωτές που χρησιμοποιήθηκαν ήταν τροποποιημένοι δισδιάστατοι εκτυπωτές μόνο που στη θέση του ακροφύσιου που κανονικά τοποθετείται το μελάνι, τοποθετήθηκε το βίο-υλικό και η θέση του χαρτιού (υποστρώματος αποδέκτη) αντικαταστάθηκε από μία ηλεκτρονικά ελεγχόμενη βαθμίδα για να παρέχει τον έλεγχο της κίνησης στο άξονα z [38]. Σήμερα, οι βιοεκτυπωτές τύπου inkjet μπορούν και τυπώνουν βίο-υλικά με αρκετά υψηλή ανάλυση, ακρίβεια και ταχύτητα. Χωρίζονται σε δύο κατηγορίες: οι εκτυπωτές inkjet που χρησιμοποιούν θερμικές και αυτοί που χρησιμοποιούν ακουστικές δυνάμεις για να επιτευχθεί η εκτόξευση του υλικού στο υπόστρωμα αποδέκτη το οποίο θα διαμορφώσει το τελικό εκτυπωμένο προϊόν.

Υπάρχουν τριών ειδών βιοεκτυπωτές inkjet: οι (i) CIJ, (ii) DOD και (iii) EHD jetting.

- i. Οι συνεχής ψεκασμός μελάνης εκτυπωτές (Continuous-inkjet bioprinting, CIJ), Στη μέθοδο CIJ, μέσω ενός ακροφύσιου εκπέμπεται μια συνεχής έγχυση μελάνης και διαιρείται σε μια σφαιρική ροή σταγονιδίων μέσω επιφανειακών δυνάμεων τάσης, που καθιστούν τον κυλινδρικό πίδακα ασταθή (αστάθεια Plateau-Rayleigh). Αυτή η αστάθεια ελέγχεται μέσω της εφαρμογής μιας δόνησης στη ροή. Τα σταγονίδια φορτίζονται μεμονωμένα ηλεκτρικά με επαγωγή από ένα ηλεκτρόδιο και κατευθύνονται κατά την εκτύπωση με ηλεκτροστατικές δυνάμεις σε συγκεκριμένα σημεία της επιφάνειας του υποστρώματος αποδέκτη. Τα σωματίδια που δεν κατάφεραν να φορτιστούν περνάνε σε μία υδροροή, ώστε να επαναχρησιμοποιηθούν. Λόγω της ανακυκλοφορίας (βιο) μελανιού και του κινδύνου μόλυνσης υλικού που προκύπτει, η μέθοδος CIJ δεν χρησιμοποιείται στη βιοεκτύπωση [39].
- ii. Στη μέθοδο DOD (Drop on Demand), σε έναν θάλαμο γεμάτο υγρό, υπάρχει ένας ενεργοποιητής, ο οποίος με τη διάδοση ενός παλμού πίεσης, προκαλεί τη δημιουργία ενός μόνο σταγονιδίου. Αυτή η σταγόνα περνά μέσα από ένα ακροφύσιο και εναποτίθεται απευθείας στο υπόστρωμα αποδέκτη. Σε αυτή τη μπορούν να χρησιμοποιηθούν δύο ειδών ενεργοποιητές, είτε θερμικοί, είτε πιεζοηλεκτρικοί.

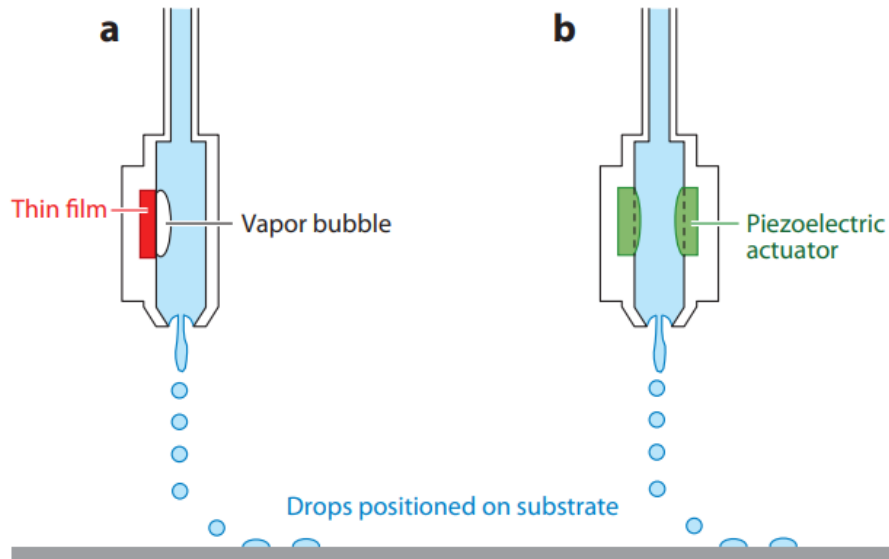


Εικόνα 7: Σχηματικό διάγραμμα που δείχνει την αρχή λειτουργίας ενός εκτυπωτή συνεχούς ψεκασμού (CIJ).[40]

Στους θερμικούς εκτυπωτές τύπου DOD, ένας μικροθερμαντήρας κοντά στο ακροφύσιο παράγει θερμότητα, το ρευστό έρχεται σε άμεση επαφή και θερμαίνεται με θερμοκρασία πάνω από το σημείο βρασμού για να σχηματίσει μια μικρή θήκη ατμών ή μία φυσαλίδα **(Εικόνα 8^α)**. Στη συνέχεια, η ταχεία διαστολή και κατάρρευση της φυσαλίδας δημιουργεί τον απαιτούμενο παλμό πίεσης, ώστε η φυσαλίδα που δημιουργείται μέσα από το ακροφύσιο να εναποτίθεται στο υπόστρωμα. Αρκετές μελέτες έχουν δείξει ότι αυτή η τοπική θέρμανση, η οποία μπορεί να κυμαίνεται από 200 °C έως 300 °C, δεν έχει ουσιαστική επίδραση ούτε στη σταθερότητα των βιολογικών μορίων, όπως το DNA [41],[42], ούτε στη βιωσιμότητα ή τη λειτουργία μετά την εκτύπωση κυττάρων[43]. Έχει αποδειχθεί ότι η σύντομη διάρκεια της θέρμανσης (~2 μs) οδηγεί σε συνολική αύξηση της θερμοκρασίας μόνο 4–10 °C στην κεφαλή του εκτυπωτή.

Στους πιεζοηλεκτρικούς βιοεκτυπωτές τύπου DOD, ένας πιεζοηλεκτρικός κρύσταλλος που δημιουργεί ένα ακουστικό κύμα μέσα στην κεφαλή εκτύπωσης, διαχωρίζει το υγρό σε σταγονίδια σε τακτά χρονικά διαστήματα [44]. Η εφαρμογή τάσης σε ένα πιεζοηλεκτρικό υλικό προκαλεί μια ταχεία αλλαγή στο σχήμα, η οποία με τη σειρά της δημιουργεί την πίεση που απαιτείται για την εκτόξευση σταγονιδίων από το ακροφύσιο [45] **(Εικόνα 8^β)**.

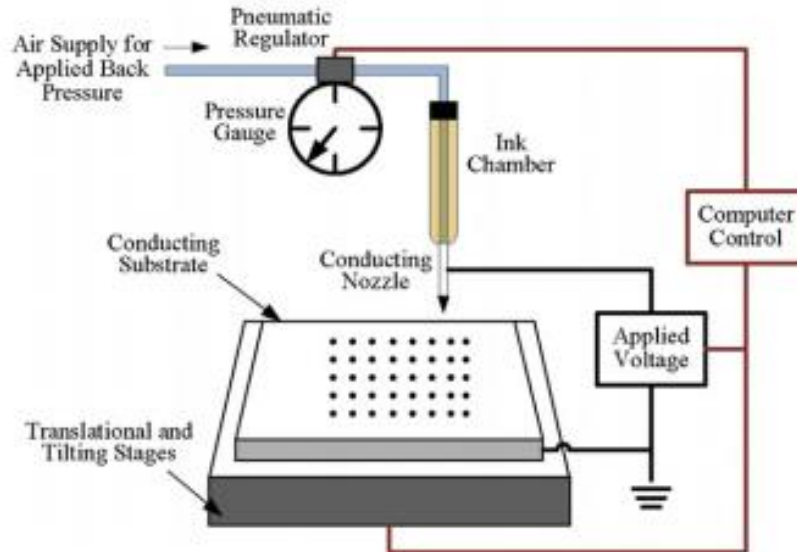
Οι πιεζοηλεκτρικοί inkjet εκτυπωτές είναι πιο δαπανηροί από τους αντίστοιχους θερμικούς κυρίως για κατασκευαστικούς λόγους. [46]. Τα βασικά πλεονέκτημα των θερμικών εκτυπωτών DOD είναι η υψηλή ταχύτητα εκτύπωσης, το χαμηλό κόστος και η ευρεία διαθεσιμότητά τους. Όμως, είναι γεγονός ότι υπάρχει αλλαγή στην τοπική θερμοκρασία στην επιφάνεια του δείγματος, χαμηλή κατευθυντικότητα, συχνά το ακροφύσιο είναι πιθανό να φράξει και το μέγεθος των εκτυπωμένων σταγόνων δεν είναι ομοιόμορφο.



Εικόνα 8: Σχηματικό διάγραμμα που δείχνει τις αρχές λειτουργίας ενός συστήματος εκτύπωσης inkjet drop-on-demand (DOD) με το σχηματισμό των σταγόνων να μπορεί να πραγματοποιηθεί με δύο τρόπους: a) θερμική έγχυση μελάνης και b) μηχανική ενεργοποίηση [40].

- iii. Η εκτύπωση EHD jetting είναι μια τεχνολογία εκτύπωσης υψηλής ανάλυσης όπου το τυπωμένο υγρό οδηγείται από ένα ηλεκτρικό πεδίο[46]. Η αρχή λειτουργίας αυτού του είδους εκτυπωτή είναι η εξής: Η έκθεση σε ηλεκτρικό πεδίο προκαλεί τη συσσώρευση κινητών ιόντων σε ένα πολωτικό υγρό στην επιφάνειά του. Οι απωθητικές δυνάμεις Coulomb μεταξύ των ιόντων προκαλεί την παραμόρφωση του μηνίσκου στο άκρο του ακροφυσίου σε κωνικό σχήμα, που ονομάζεται κώνος Taylor[47]. Όταν το ηλεκτρικό πεδίο υπερβαίνει ένα κρίσιμο όριο, η τάση από την απώθηση του επιφανειακού φορτίου στην κορυφή του κώνου υπερβαίνει την επιφανειακή τάση και μια σταγόνα ρευστού εκπέμπεται προς το γειωμένο υπόστρωμα. Τα εναποτιθέμενα σταγονίδια μπορεί να είναι τόσο μικρά όσο 240 nm με χωρική ακρίβεια εκατοντάδες nm[46]. Ο ρυθμός εναπόθεσης μπορεί να ελεγχθεί έως και 10 kHz με ανεξάρτητο έλεγχο μεγέθους σταγονιδίων χρησιμοποιώντας ένα σήμα παλμικής τάσης[48]. Με την τεχνική αυτή μπορεί να επιτευχθεί εκτύπωση ολιγονουκλεοτιδίων, οργανικών και ανόργανων διαλυμάτων με αγώγιμο πολυμερές, νανοσωλήνων άνθρακα μονού τοιχώματος και φωτοσκληρυνόμενων προπολυμερών[49].

Στην **Εικόνα 9** φαίνεται μια σχηματική απεικόνιση της διαδικασίας εκτύπωσης E-jet. Όπως φαίνεται, τα κύρια στοιχεία για την εκτύπωση E-jet περιλαμβάνουν έναν θάλαμο μελανιού, ένα ακροφύσιο με γυάλινο άκρο με επικάλυψη μετάλλου, υπόστρωμα και σύστημα τοποθέτησης. Οι ελεγχόμενες παράμετροι της διαδικασίας εκτύπωσης είναι η αντίθλιψη (pneumatic back pressure) που εφαρμόζεται στο θάλαμο μελάνης, το ύψος μετατόπισης μεταξύ του ακροφυσίου και του υποστρώματος και το δυναμικό εφαρμοζόμενης τάσης μεταξύ ενός αγώγιμου ακροφυσίου και του υποστρώματος. Επιπλέον το υπόστρωμα και το άκρο του ακροφυσίου είναι επικαλυμμένα με μέταλλο για να διασφαλιστεί η αγωγιμότητά τους[48].



Εικόνα 9: Σχηματική απεικόνιση μιας τυπικής πειραματικής διάταξης της e-jet [48]

Μια τάση που εφαρμόζεται στο άκρο του ακροφυσίου προκαλεί τη συσσώρευση κινητών ιόντων στο μελάνι κοντά στην επιφάνεια στο άκρο του ακροφυσίου. Η αμοιβαία απώθηση Coulomb μεταξύ των ιόντων εισάγει μια επαπτομενική τάση στην επιφάνεια του υγρού, παραμορφώνοντας έτσι τον μηνίσκο σε κωνικό σχήμα[46]. Σε κάποιο σημείο, η ηλεκτροστατική δύναμη υπερνικά την επιφανειακή τάση του μηνίσκου και τα σταγονίδια εκτοξεύονται από τον κώνο. Ανάλογα με τις ιδιότητες του ρευστού, καθώς αυξάνεται το εφαρμοζόμενο πεδίο, αυτή η εκκένωση ξεκινά ως παλμική ή διακοπτόμενη που μεταβαίνει σε σταθερό μονό πίδακα, πολλαπλούς ασταθείς πίδακες και τελικά γίνεται ψεκασμός για πολύ μεγάλες εντάσεις ηλεκτρικού πεδίου. Κάθε ένας από τους διαφορετικούς τρόπους εκτόξευσης (π.χ. παλμικός, σταθερός πίδακας, E-spray[50]) μπορεί να χρησιμοποιηθεί για την επίτευξη διαφόρων εφαρμογών εκτύπωσης/ψεκασμού.

1.3.2 Microextrusion βίο-εκτύπωση

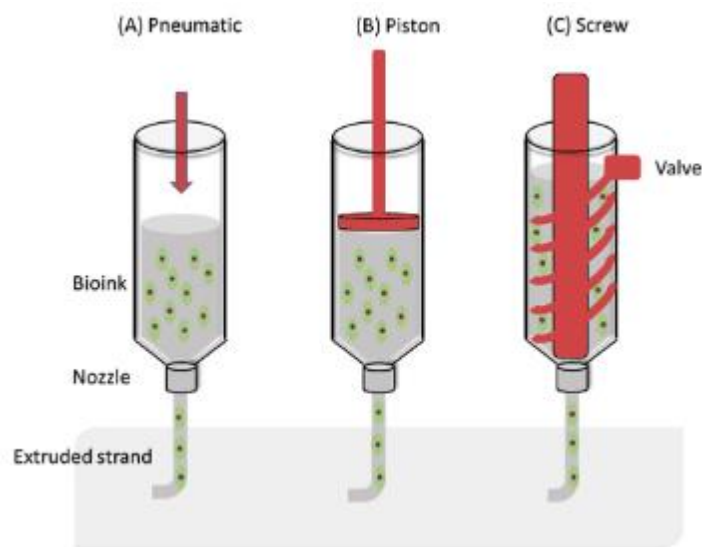
Η πιο γνωστή τεχνική τρισδιάστατης εκτύπωσης μη βιολογικών υλικών είναι αυτή της μικροεξώθησης. Οι βιοεκτυπωτές microextrusion, έχουν χρησιμοποιηθεί για την κατασκευή πολλαπλών τύπων ιστών, συμπεριλαμβανομένων των αορτικών βαλβίδων [51], των διακλαδισμένων αγγειακών δέντρων [52] και των in vitro φαρμακοκινητικών [53].

Συγκεκριμένα, οι βιολογικοί εκτυπωτές μικροεξώθησης αποτελούνται συνήθως από ένα ελεγχόμενο σύστημα χειρισμού και διανομής του υλικού με ένα επίπεδο το οποίο είναι ικανό να κινείται κατά μήκος των αξόνων x , y και z , μια πηγή οπτικών ινών για να φωτίζει την περιοχή εναπόθεσης ή/και για την ενεργοποίηση ενός φωτοεκκινητή. Επιπλέον περιλαμβάνει κάμερα για έλεγχο σε όλες τις διαστάσεις (x, y, z) και ένας πιεζοηλεκτρικό υγραντήρα. Μερικά συστήματα χρησιμοποιούν πολλαπλές κεφαλές εκτύπωσης για να διευκολύνουν τη σειριακή διανομή πολλών υλικών χωρίς νέα εργαλεία [54]

Οι microextrusion βιοεκτυπωτές λειτουργούν με τη ρομποτικά ελεγχόμενη εξώθηση ενός υλικού, το οποίο εναποτίθεται σε ένα υπόστρωμα από μια κεφαλή μικροεξώθησης. Από την κεφαλή μικροεξώθησης παράγονται συνεχή σφαιρίδια του υλικού, τα οποία εναποτίθενται σε δύο διαστάσεις, όπως αποδεικνύεται από το λογισμικό CAD-CAM. Η κεφαλή της μικροεξώθησης μετακινείται κατά μήκος του άξονα z και το πρώτο στρώμα που έχει εκτυπωθεί, χρησιμεύει ως βάση για το επόμενο που πρόκειται να

εναποτεθεί. Ένα μεγάλο ποσοστό των υλικών μπορεί να εκτυπωθεί με την τεχνική αυτή, όπως, οι υδρογέλες, βιοσυμβατά πολυμερή ακόμα και σφαιροειδή κυττάρων[55].

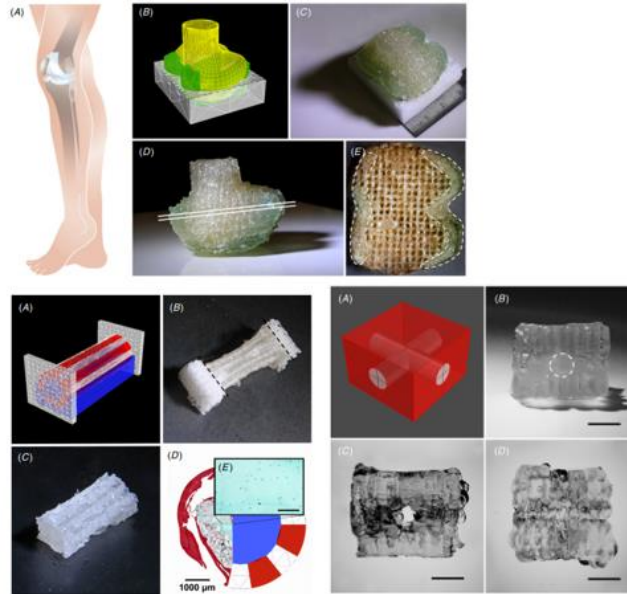
Οι πιο συνηθισμένες μέθοδοι εξώθησης βιολογικών υλικών για εφαρμογές τρισδιάστατης βιοεκτύπωσης είναι τα πνευματικά[56] ή τα μηχανικά (έμβολα ή βίδες) [57] συστήματα διανομής. Τα μηχανικά συστήματα διανομής ενδέχεται να παρέχουν πιο άμεσο έλεγχο στη ροή του υλικού λόγω της καθυστέρησης του όγκου του συμπιεσμένου αερίου στα πνευματικά συστήματα. Τα συστήματα που βασίζονται σε βίδες ενδέχεται να παρέχουν περισσότερο χωρικό έλεγχο και θεωρείται ότι είναι ωφέλιμα για τη διανομή υδρογέλης με υψηλότερα ιξώδη, αν και τα πνευματικά συστήματα θα μπορούσαν επίσης να είναι κατάλληλα για τη διανομή υλικών υψηλού ιξώδους [58]. Οι εκτυπωτές με πνευματική κίνηση έχουν το πλεονέκτημα ότι έχουν απλούστερα εξαρτήματα μηχανισμού κίνησης, με αποτέλεσμα να περιορίζεται μόνο από τις δυνατότητες πίεσης αέρα του συστήματος. Οι μηχανικοί μηχανισμοί έχουν μικρότερα και πιο πολύπλοκα εξαρτήματα, τα οποία παρέχουν μεγαλύτερο χωρικό έλεγχο αλλά συχνά με μειωμένες δυνατότητες μέγιστης δύναμης.



Εικόνα 10: Απεικόνιση των τριών ειδών microextrusion εκτύπωσης: Α) Πνευματική, Β) Μηχανική με έμβολο και Γ) μηχανική με βίδες.[59]

Ένα μεγάλο πλεονέκτημα αυτής της τεχνικής βιοεκτύπωσης είναι το πολύ ευρύ φάσμα ιδιοτήτων ρευστού που είναι συμβατές με τη διαδικασία. Πολλά από τα βίο-υλικά, ειδικά οι υδρογέλες γνωστές και ως εξωκυτταρικές μήτρες (ECM), έχουν πολύ μεγάλο ιξώδες και η ρεολογική τους συμπεριφορά είναι αρκετά περίπλοκη. Υλικά με ιξώδη που κυμαίνονται από 30 mPa/s έως $>6 \times 10^7$ mPa/s [60] έχει αποδειχθεί ότι είναι συμβατά με βιοεκτυπωτές μικροεξώθησης. Ταυτόχρονα, γίνεται η χρήση άλλων υλικών υψηλότερου ιξώδους για την παροχή δομικής υποστήριξης για την τυπωμένη κατασκευή και υλικά χαμηλότερου ιξώδους παρέχοντας ένα κατάλληλο περιβάλλον για τη διατήρηση της βιωσιμότητας και της λειτουργίας των κυττάρων. Γενικά στην βιοεκτύπωση microextrusion προτιμώνται βίο-υλικά τα οποία εύκολα να μπορούν να διασταυρωθούν θερμικά και να διαθέτουν καθαρές ιδιότητες αραίωσης. Πολλά υλικά μπορεί να είναι ρευστά σε θερμοκρασία δωματίου αλλά κατά τη διασταύρωσή τους με ένα σταθερό υλικό να αλλάζουν φάση. Αυτή η μη νευτώνεια συμπεριφορά υλικού προκαλεί μείωση του ιξώδους ως απόκριση στις αυξήσεις του ρυθμού διάτμησης [61]. Οι υψηλοί ρυθμοί διάτμησης που υπάρχουν στο ακροφύσιο κατά τη βιοεκτύπωση, επιτρέπουν σε αυτά τα υλικά να ρέουν μέσα από το ακροφύσιο και κατά την εναπόθεση, με αποτέλεσμα, ο ρυθμός διάτμησης να μειώνεται, προκαλώντας απότομη αύξηση του ιξώδους. Η υψηλή ανάλυση των συστημάτων μικροεξώθησης επιτρέπει στον βιοεκτυπωτή να

κατασκευάζει με ακρίβεια πολύπλοκες δομές σχεδιασμένες με χρήση λογισμικού CAD και στην και να διευκολύνει τη διαμόρφωση πολλαπλών τύπων κυττάρων. Συγκεκριμένα στην παρακάτω **Εικόνα 11**, φαίνεται ο σχεδιασμός και η εκτύπωση ενός ECM βίο-υλικού (gelMA-gellan) με σκοπό τη δημιουργία ενός μοσχεύματος [57].

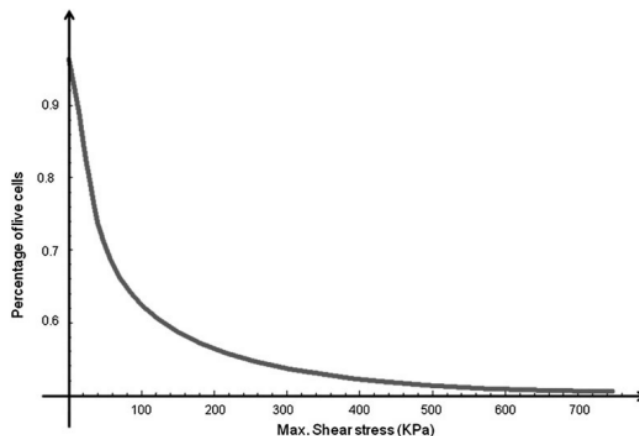


Εικόνα 11: Παραδείγματα εκτυπωμένων βίο-υλικών με σκοπό τη χρήση τους ως καλοτύπια-μοσχεύματα.[57]

Η βιωσιμότητα των κυττάρων μετά τη βιοεκτύπωση με μικροεξώθηση είναι χαμηλότερη από αυτή με τη βιοεκτύπωση με βάση inkjet. Τα ποσοστά επιβίωσης των κυττάρων είναι της τάξης του 40-86%, με το ποσοστό να μειώνεται με την αύξηση της πίεσης εξώθησης και την αύξηση του μετρητή ακροφυσίου[62]. Οι διατμητικές τάσεις που προκαλούνται από στα κύτταρα μέσα στα παχύρευστα βίο-υλικά φαίνεται να επηρεάζει και να μειώνει την βιωσιμότητα των κυττάρων που εναποτίθενται με αυτή τη τεχνική εκτύπωσης.

Η πίεση διανομής μπορεί να έχει πιο ουσιαστική επίδραση στη βιωσιμότητα των κυττάρων από τη διάμετρο του ακροφυσίου [63]. Όπως φαίνεται και στην παρακάτω γραφική παράσταση της **Εικόνα 12** από μια μελέτη που έγινε από τους Nair et.al [63], όσο αυξάνεται η διατμητική, τάση το ποσοστό βιωσιμότητας των κυττάρων μειώνεται.

Αν και η βιωσιμότητα των κυττάρων μπορεί να διατηρηθεί χρησιμοποιώντας χαμηλές πιέσεις και μεγάλα μεγέθη ακροφυσίων, το μειονέκτημα μπορεί να είναι η σημαντική απώλεια ανάλυσης και ταχύτητας εκτύπωσης. Η διατήρηση της υψηλής βιωσιμότητας είναι απαραίτητη για την επίτευξη της λειτουργικότητας των ιστών. Αν και πολλές μελέτες αναφέρουν τη διατήρηση της βιωσιμότητας των κυττάρων μετά την εκτύπωση, είναι σημαντικό για τους ερευνητές να αποδείξουν ότι αυτά τα κύτταρα όχι μόνο επιβιώνουν, αλλά εκτελούν επίσης τις βασικές τους λειτουργίες ώστε να διαμορφώσουν ιστούς.



Εικόνα 12: Γραφική παράσταση της βιωσιμότητας των κυττάρων σε σχέση με την διατμητική τάση.

Μία από τις κύριες προκλήσεις είναι η αύξηση της ταχύτητας και της ανάλυσης της βιοεκτύπωσης, καθώς οι microextrusion εκτυπωτές έχουν εύρος ανάλυσης 5-200 μm και εύρος γραμμικών ταχυτήτων 10-50 μm/s [64], που είναι αρκετές χαμηλές τιμές. Αυτό σε συνδυασμό με την χαμηλή βιωσιμότητα που προσφέρει η τεχνική είναι ένα από τα βασικά μειονεκτήματα. Παρόλα αυτά, εάν το προς εναπόθεση υλικό δεν εμπεριέχει κύτταρα και είναι μόνο για τη δημιουργία ικρωμάτων, η παράμετρος της αύξησης της ταχύτητας εκτύπωσης, δεν είναι μεγάλης σημασίας.

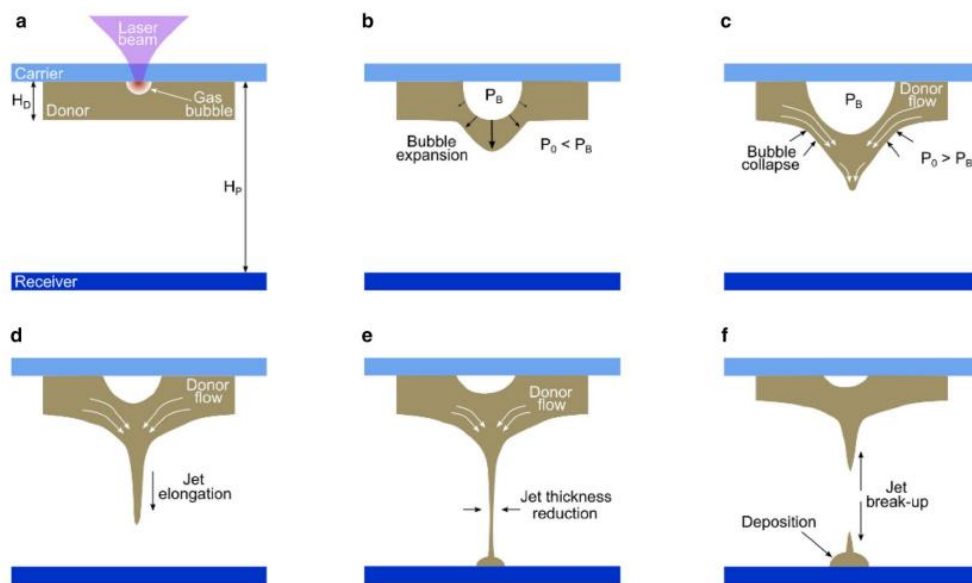
Έτσι, το βασικό πλεονεκτήματα της τεχνικής βιοεκτύπωσης microextrusion είναι η ικανότητα εναπόθεσης πολύ υψηλών πυκνοτήτων κυττάρων. Η επίτευξη φυσιολογικών κυτταρικών πυκνοτήτων σε όργανα που κατασκευάζονται από ιστούς είναι ένας σημαντικός στόχος για τον τομέα της βιοεκτύπωσης. Τα σφαιροειδή ιστού πιστεύεται ότι διαθέτουν ιδιότητες υλικού που μπορούν να αναπαράγουν τις μηχανικές και λειτουργικές ιδιότητες του ιστού ECM. Ανάλογα με τις ιξωδοελαστικές ιδιότητες των δομικών στοιχείων, τα προβλεπόμενα κυτταρικά συσσωματώματα συγχωνεύονται μεταξύ τους, σχηματίζοντας μια συνεκτική μακροσκοπική κατασκευή.

1.3.3 Βιοεκτύπωση με τη χρήση laser-LIFT

Η βιοεκτύπωση με laser (Laser Assisted Bioprinting, LAB) βασίζεται στην αρχή της εμπρόσθιας μεταφοράς που προκαλείται από την ακτινοβολία του laser. Η τεχνική αυτή ονομάζεται Laser Induced Forward Transfer, LIFT, όπου στο κεφάλαιο 1.2 έγινε εκτενής περιγραφή για την ιστορική αναδρομή της όσον αφορά βίο-υλικά. Αν και λιγότερο συνηθισμένη από τη βιοεκτύπωση inkjet ή microextrusion, η τεχνική LIFT χρησιμοποιείται όλο και περισσότερο για εφαρμογές στον κλάδο της μηχανικής ιστών και οργάνων.

Μια τυπική διάταξη LIFT αποτελείται από ένα παλμικού τύπου laser, ένα οπτικό σύστημα μεταφοράς και εστίασης της δέσμης, ένα σύστημα απεικόνισης-καταγραφής και από τα υποστρώματα του δότη και του αποδέκτη στο οποίο εναποτίθεται το εκάστοτε βίο-υλικό προς εκτύπωση. Το υπόστρωμα του δότη καλύπτεται από ένα στρώμα που απορροφά την ακτινοβολία του laser, στην βιβλιογραφία πιο συχνά συναντάται χρυσός ή τιτάνιο, και επάνω από αυτό τοποθετείται το υπό εκτύπωση βίο-υλικό. Η τεχνική αυτή λειτουργεί χρησιμοποιώντας εστιασμένους παλμούς laser οι οποίοι κατευθύνονται με ένα οπτικό σύστημα και εστιάζονται στην επιφάνεια του υποστρώματος δότη. Στη συνέχεια, κατά την απορρόφηση του παλμού laser από το υπόστρωμα αυτό, παρατηρείται τοπική εξάτμιση του υγρού στη διεπαφή του υποστρώματος και του προς εκτύπωση βίο-υλικού [65], λόγω αύξησης της θερμοκρασίας τοπικά, πάνω από το σημείο βρασμού του βίο-υλικού. Η εξάτμιση αυτή οδηγεί στη δημιουργία θύλακα

αερίων/φουσαλίδας στη διεπαφή (cavitation phenomenon). Η εσωτερική πίεση αυτού του θύλακα είναι πολύ μεγαλύτερη της εξωτερικής πίεσης του περιβάλλοντος, ατμοσφαιρικής πίεσης, και της επιφανειακής τάσης του βίο-υλικού [66], με αποτέλεσμα την αύξηση του όγκου του θύλακα. Καθώς η επέκταση της φουσαλίδας από την πλευρά του υποστρώματος δότη δεν είναι δυνατή, παρατηρείται επιμήκυνση της φουσαλίδας, μετατοπίζοντας την διεπιφάνεια υγρού-αέρα. Έτσι, η φουσαλίδα αυτή, ωθεί το βίο-υλικό ώστε αυτό να επιμηκύνεται και να μετατρέπεται πλέον σε πίδακα όπου τελικά εναποτίθεται στο υπόστρωμα του αποδέκτη. Στην παρακάτω **Εικόνα 13** φαίνεται η σχηματική απεικόνιση των φάσεων εξέλιξης της διαδικασίας βιοεκτύπωσης με τη χρήση laser. Αναλόγως τα χαρακτηριστικά του εκάστοτε βίο-υλικού που εκτυπώνεται η φάσεις της εκτύπωσης διαφέρουν. Μεγάλες διαφορές στην μορφολογία της εξέλιξης του πίδακα παρατηρείται όταν το ιξώδες του βίο-υλικού αυξάνεται κατά πολύ. Σε αυτές τις περιπτώσεις, ο πίδακας δεν εξελίσσεται το ίδιο ομαλά, το σημείο διάσπασης δεν είναι ευδιάκριτο και συνήθως γύρω από τον κύριο πίδακα που εξελίσσεται, δημιουργούνται πολλά επιπλέον σταγονίδια που εκτοξεύονται προς ακαθόριστες κατευθύνσεις (satellites)



Εικόνα 13: Σχηματική απεικόνιση των σταδίων εξέλιξης της βίο-μελάνης, από φουσαλίδα σε πίδακα. α) Δημιουργία φουσαλίδων αερίου υψηλής πίεσης (P_B) από την απορροφούμενη ενέργεια laser, β) διαστολή φουσαλίδων λόγω υψηλότερου P_B από την εξωτερική πίεση (P_0), γ) κατάρρευση φουσαλίδας και σχηματισμός πίδακα, δ) επιμήκυνση του πίδακα, ε) πίδακας σε επαφή με το υπόστρωμα του δέκτη, σχηματίζοντας ένα «κανάλι» μεταξύ του δότη και του αποδέκτη, ς) διάσπαση του πίδακα[67]

Η δυναμική των φουσαλίδων έχει μοντελοποιηθεί αναλυτικά, χρησιμοποιώντας την Rayleigh Plesset(1)) [68] και αριθμητικά [69] συμπεριλαμβάνοντας την επίδραση διαφορετικών ιδιοτήτων υλικού μέσου (π.χ. ιξώδες και επιφανειακή τάση).

Η εξίσωση Rayleigh Plesset είναι η παρακάτω:

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

Όπου,

- $R(t)$ η ακτίνα της φουσαλίδας,
- $p_i(t)$ η πίεση στο εσωτερικό της φουσαλίδας

- $p_{\infty}(t)$ η πίεση του περιβάλλοντος χώρου
- γ η επιφανειακή τάση του υγρού
- μ το ιξώδες

Στο αριστερό μέρος της παραπάνω εξίσωσης βρίσκονται οι αδρανειακές δυνάμεις οι οποίες εξισώνονται με το δεξί μέρος των εσωτερικών πιέσεων της φυσαλίδας, που την αναγκάζουν να διογκωθεί ενώ σε αυτή τη κατάσταση αντίσταση φέρει η εξωτερική πίεση του περιβάλλοντος μαζί με την επιφανειακή τάση και το ιξώδες του βίο-υλικού. Ως αποτέλεσμα, αποδείχθηκε ότι, ανάλογα με τη συμπιεστότητα του βίο-υλικού, το μέτωπο της φυσαλίδας φτάνει γρήγορα τη μέγιστη ταχύτητά του (έως 100 m/s, 100 ns μετά την επαγόμενη από το πλάσμα δημιουργία)[70] ενώ η μέγιστη ακτίνα φυσαλίδων R_{max} (που σημαίνει όταν αρχίζει η κατάρρευση) χρονικά καθυστερεί (1,2 μ s) [71]. Αυτές οι τιμές φάνηκε να μειώνονται αυξάνοντας το ιξώδες του μέσου, ενώ η δυναμική των φυσαλίδων αποδείχθηκε ότι δεν είναι ευαίσθητη στην επιφανειακή τάση[70].

Δεδομένου ότι το μέγεθος της φυσαλίδας που δημιουργείται κατά την πρόσπτωση της δέσμης laser στην επιφάνεια του δότη είναι αμελητέο σε σύγκριση με το πάχος του βίο-υλικού, η φυσαλίδα αλληλεπιδρά με την ελεύθερη επιφάνεια και ως εκ τούτου η επιφανειακή τάση πρέπει να λαμβάνεται υπόψη. Από αυτή την άποψη, έχει αποδειχθεί ότι, όταν η φυσαλίδα φτάσει στο R_{max} , αρχίζει να καταρρέει λόγω μιας περιοχής υψηλής πίεσης που δημιουργείται στην κορυφή της φυσαλίδας και μπορεί να σχηματιστεί ένας πίδακας σύμφωνα με την αδιάστατη απόσταση G , η οποία είναι ο λόγος μεταξύ της απόστασης, h (απόσταση μεταξύ του αρχικού κέντρου της φυσαλίδας ατμού και της ελεύθερης επιφάνειας) και του R_{max} [72].

$$G = \frac{h}{R_{max}} \quad (2)$$

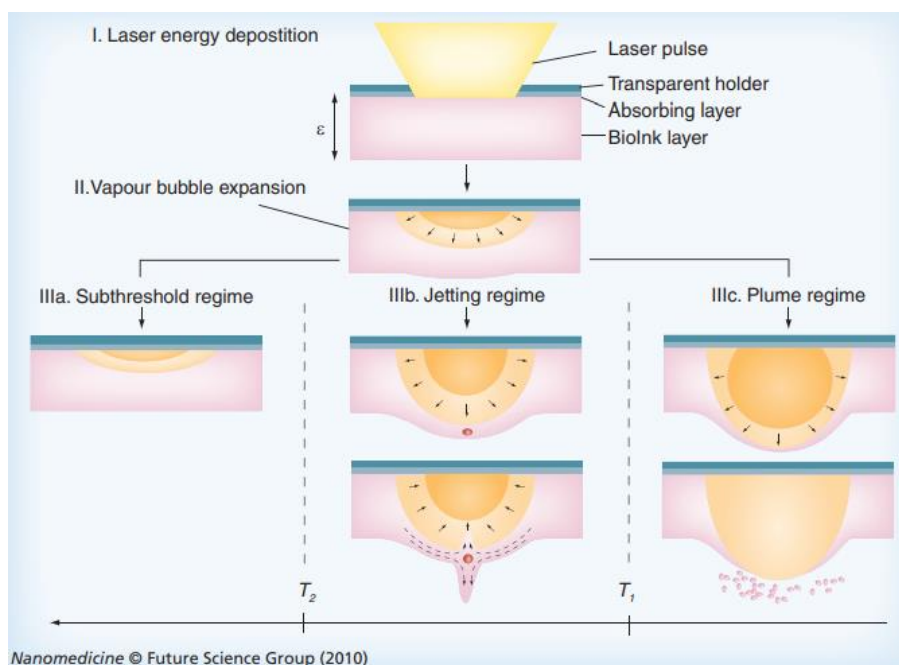
Συνεπώς, τα τρία προαναφερθέντα καθεστώτα δεν προκύπτουν μόνο από την ένταση της ενέργειας του laser, αλλά και από ρεολογικές ιδιότητες (π.χ. ιξώδες, μ , επιφανειακή τάση, γ και πάχος φιλμ, e) της βιομελάνης. Με άλλα λόγια, η εκτόξευση δεν συμβαίνει απλώς με βάση έναν μηχανισμό κατωφλίου ενέργειας [33] αλλά μάλλον με βάση έναν πολύπλοκο μηχανισμό κατωφλίου G (E , μ , γ , s). Σε μια δεδομένη ενέργεια laser για την οποία σχηματίζεται μια φυσαλίδα ατμού στη διεπιφάνεια του απορροφητικού στρώματος, μπορούν να περιγραφούν οι τρεις παρακάτω περιπτώσεις:

- 1) Εάν το G είναι υψηλότερο από μια τιμή κατωφλίου G_2 , η εκτόξευση σταγονιδίων δεν μπορεί να συμβεί καθώς η διαστολή της φυσαλίδας είναι πολύ ασθενής για να φτάσει στην ελεύθερη επιφάνεια. Αυτό ονομάζεται Subthreshold, στο οποίο δεν μπορεί να μεταφερθεί κανένα υλικό εκτός εάν το υπόστρωμα βρίσκεται σε άμεση γειτνίαση με τον δότη, δηλαδή να έχει μηδενικό πάχος, που στην περίπτωση τον βίο-μελανιών είναι πρακτικά αδύνατο. **(Εικόνα 14 IIIa)**
- 2) Εάν το G είναι μεταξύ G_1 και G_2 , η φυσαλίδα διαστέλλεται, τότε καταρρέει και τελικά σχηματίζεται ένας πίδακας. Αυτή είναι η ιδανική περίπτωση για να πραγματοποιηθεί εκτύπωση των βίο-υλικών και ονομάζεται Jetting. **(Εικόνα 14 IIIb)**
- 3) Όταν το G είναι χαμηλότερο από μια τιμή κατωφλίου G_1 , η επέκταση της φυσαλίδας γίνεται τόσο βίαια που υπερνικά την επιφανειακή τάση, με αποτέλεσμα το σκάσιμο των φυσαλίδων και, ως εκ τούτου, την ανομοιόμορφη εναπόθεση του υλικού πάνω στο υπόστρωμα. Αυτό λοιπόν ονομάζεται Plume **(Εικόνα 14 IIIc)**

Οι Duocastella et al., χρησιμοποιώντας απεικόνιση με χρονική ανάλυση, πρόσφατα έδειξαν ότι μέχρι να φτάσει στο υπόστρωμα του αποδέκτη, έχει αναπτυχθεί ένας μακρύς και ομοιόμορφος πίδακας, ο οποίος

προχωρά με σταθερή ταχύτητα (20-150 m/s), ανάλογα με τις πειραματικές συνθήκες [73]. Για την πρώτη από τις παραπάνω περιπτώσεις (Subthreshold), ο πίδακας μπορεί να υποχωρήσει πριν φτάσει στο υπόστρωμα. Ωστόσο, η μείωση της απόστασης του διακένου μεταξύ δότη και αποδέκτη, θα μπορούσε να οδηγήσει σε εναπόθεση υλικού στο υπόστρωμα του υποδοχέα. Σε υψηλότερες ροές, δηλαδή στις άλλες δύο περιπτώσεις (Jetting και Plume), η αδράνεια πίδακα είναι αρκετά υψηλή ώστε να ξεπερνά τη δύναμη ανάκρουσης που ασκείται από την επιφανειακή τάση και την ελαστικότητα του μελανιού. Όταν ένας πίδακας φτάσει σε ένα ορισμένο μήκος, γίνεται ασταθής και τελικά σπάει λόγω των επιπτώσεων της επιφανειακής τάσης στη λεγόμενη αστάθεια Rayleigh–Plateau.

Η τεχνική βιοεκτύπωσης με laser λόγω της λειτουργίας της χωρίς ακροφύσιο, έχει ένα τεράστιο πλεονέκτημα απέναντι στις άλλες δύο τεχνικές, καθώς αποφεύγεται το πρόβλημα απόφραξης. Επιπλέον, είναι μία τεχνική συμβατή με ένα μεγάλο εύρος ιξωδών και μπορούν να εκτυπωθούν κύτταρα με μεγάλη



Εικόνα 14: Σχηματική απεικόνιση των τριών περιπτώσεων εκτόξευσης της φυσαλίδας στην επιφάνεια του υποστρώματος δότη [70].

βιωσιμότητα. Συγκεκριμένα πρόσφατη μελέτη έδειξε πως η χρήση UV μήκους κύματος laser, καταστρέφει το DNA των εκάστοτε κυττάρων, με αποτέλεσμα τα μήκη κύματος εκπομπής των laser που χρησιμοποιούνται να πρέπει να ανήκουν στο φάσμα του ορατού, όπου είναι απόλυτα ασφαλές [35]. Η τεχνική LIFT, προσφέρει επίσης αρκετά υψηλές ταχύτητες εκτύπωσης, το οποίο ανοίγει ένα δρόμο για πολλές και ποικίλες εφαρμογές στην αναγεννητική ιατρική. Σε αντίθεση με τις άλλες τεχνικές βιοεκτύπωσης, η συγκεκριμένη έχει υψηλό κόστος για την κατασκευή του βιοεκτυπωτή, γεγονός όμως που τα τελευταία χρόνια αρχίζει και βελτιώνεται με σκοπό να μην αποτελεί αρνητικό στοιχείο για την μαζική χρήση της. Η εφαρμογή του LIFT για την κατασκευή ενός κυτταροποιημένου κατασκευάσματος δέρματος έδειξε τη δυνατότητα εκτύπωσης κλινικά σε ένα κατασκευάσμα ιστού με στρώματα [74]. Ουσιαστικά, η επαφή μεταξύ του υγρού και των στερεών επιφανειών της συσκευής εκτύπωσης μπορεί να προκαλέσει απόφραξη ή υποβάθμιση του υλικού μέσω σημαντικής διάτμησης ή επέκτασης. Αυτές οι τροποποιήσεις μπορεί να είναι επιθυμητές για ορισμένες τεχνικές εκτύπωσης. Η αραιώση διάτμησης είναι χρήσιμη για εκτύπωση inkjet και η παρουσία τάσης διαρροής είναι χρήσιμη για την επίστρωση λεπίδων. [75]. Ωστόσο, η υψηλή ευαισθησία των διαδικασιών εκτύπωσης τόσο στις ρευστές όσο και στις μηχανικές

ιδιότητες περιορίζει τη χρησιμότητα κάθε μεθόδου. Για αυτόν τον λόγο, η τεχνική βιοεκτύπωσης LIFT, αναμένεται να έχει μεγάλη εφαρμογή στον σύγχρονο κλάδο των μικροροϊκών πλατφόρμων τύπου Organ-on-a-chip.

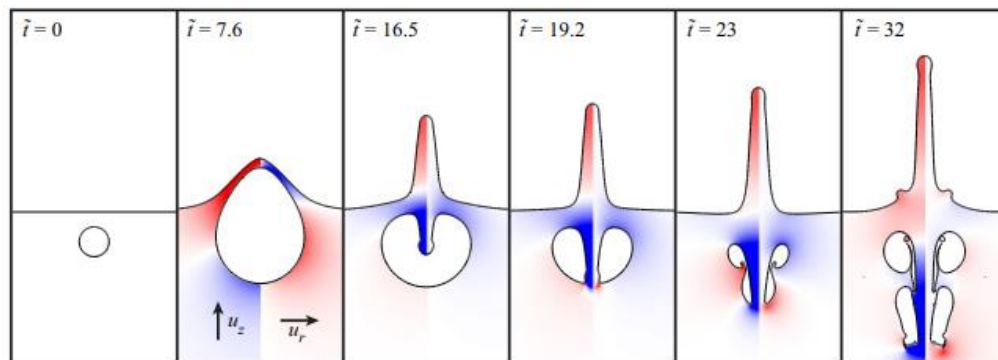
1.4 Μελέτη του πίδακα και της εναποτιθέμενης σταγόνας κατά την βιοεκτύπωση με LIFT

Όπως αναφέρθηκε εκτενώς στο παραπάνω κεφάλαιο, κατά την πρόσπτωση του laser στην επιφάνεια του δότη, δημιουργείται μία φυσαλίδα η οποία λόγω διαφοράς της εσωτερικής της πίεσης με την εξωτερική πίεση του περιβάλλοντος, σπάει και δημιουργείται ένας πίδακας ο οποίος εξελίσσεται προς την επιφάνεια του υποστρώματος αποδέκτη στο οποίο και εναποτίθεται δημιουργώντας μία σταγόνα. Η εξέλιξη αυτού του πίδακα χωρίζεται σε δύο στάδια:

- A. στη δημιουργία του πίδακα πρώτης φάσης (1st jet formation) και
- B. δεύτερης φάσης (2nd jet formation).

Το πρώτο στάδιο παράγει πολύ λεπτούς (~10 μm) και γρήγορους (~10 m/s) πίδακες, ενώ στο δεύτερο στάδιο, παράγεται ένας σχετικά παχύς (~100 μm) και αργός (~1ms/s) πίδακας. Ο πρώτος πίδακας μπορεί να χρησιμοποιηθεί για εκτύπωση υψηλής ανάλυσης εάν αποφευχθεί ο σχετικά παχύτερος δεύτερος πίδακας. Ωστόσο, ο πρώτος πίδακας είναι πολύ λεπτός για να είναι κατάλληλος για εκτύπωση λειτουργικών υλικών όπως είναι τα βίο-υλικά με κύτταρα, για τα οποία ο δεύτερος πίδακας είναι δυνητικά ικανός [75].

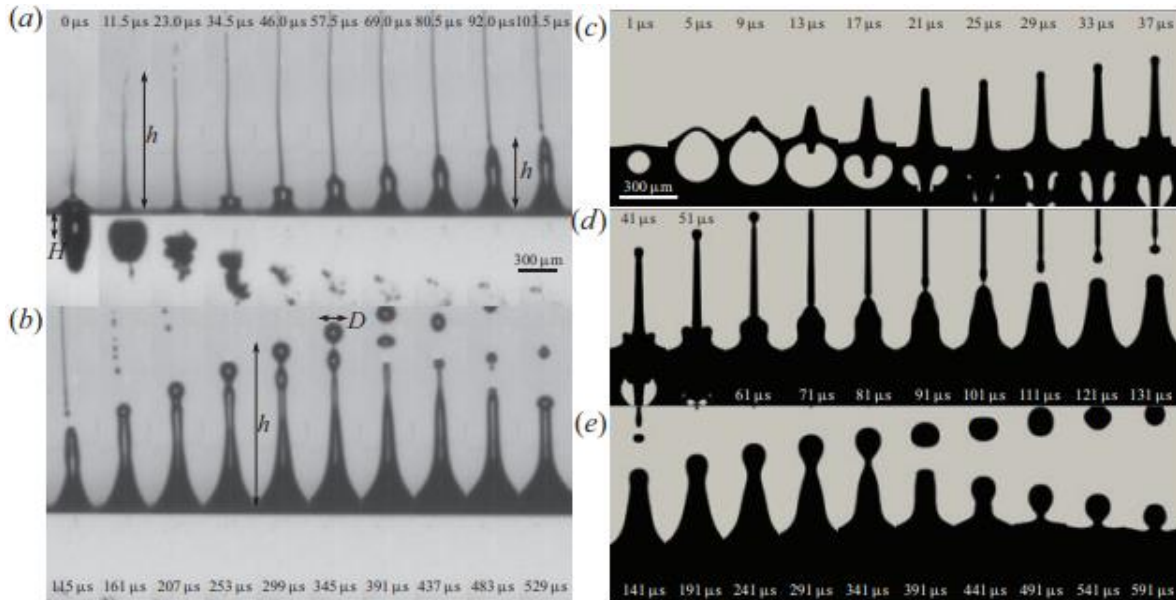
Επιπλέον, τα αποτελέσματα του σοκ που προκαλείται από τον πυρήνα της φυσαλίδας διαρκούν μόνο λίγα μικροδευτερόλεπτα μετά τη δημιουργία πυρήνων φυσαλίδων (Jalaal et al. 2019a), πολύ πριν από το σχηματισμό του δεύτερου πίδακα, και μια πρόσφατη παραμετρική μελέτη του σχηματισμού της κορώνας κατέληξε στο συμπέρασμα ότι το σοκ η πρόσκρουση του κύματος στην επιφάνεια δεν ευθύνεται για τη δημιουργία του στέμματος (crown formation) [76].



Εικόνα 15: Μια προσομοίωση εξέλιξης του πίδακα κατά την πρόσκρουση δέσμης laser σε μία επιφάνεια με υγρό. Για αυτήν την προσομοίωση, $Re \rightarrow \infty$, $We = 1000$, $Ma = 0,05$, $PR = 20$ και $\chi = 2$ [76].

Στην **Εικόνα 15**, φαίνεται μία μελέτη που έγινε από τους Saade et al., για τη δημιουργία του στέμματος (crown) που παρατηρείται όταν αρχίζει να εμφανίζεται ο 2^{ος} τάξεως πίδακας. Αυτό συμβαίνει λόγω μιας φυσαλίδας υπό πίεση στην περιοχή της ελεύθερης επιφάνειας. Για κάθε στιγμή, το αντίστοιχο στιγμιότυπο

χωρίζεται σε δύο μισά: στα αριστερά, το μέγεθος της κατακόρυφης ταχύτητας στο υγρό εμφανίζεται ως χρωματικός κώδικας, ενώ στα δεξιά παρουσιάζεται το μέγεθος της ακτινικής ταχύτητας. Το κόκκινο χρώμα σημαίνει θετική ταχύτητα, προς την κατεύθυνση των καθορισμένων βελών, ενώ το μπλε σημαίνει αρνητικές ταχύτητες και τα σημεία στασιμότητας φαίνονται με λευκό χρώμα [76].



Εικόνα 16: Αριστερά: στιγμιότυπα καταγραφής από κάμερα υψηλής ανάλυσης και Δεξιά: προσομοίωση του φαινομένου εξέλιξης του πίδακα, από τη στιγμή που δημιουργείται η φυσαλίδα στο εσωτερικό του υγρού [75].

Μετά τη σπηλαιώση (cavitation), δηλαδή τη δημιουργία της φυσαλίδας όπως φαίνεται στην **Εικόνα 16**, η φυσαλίδα διαστέλλεται γρήγορα, φτάνει στο μέγιστο μέγεθος και στη συνέχεια συστέλλεται και οπισθοχωρεί μακριά από τη διεπαφή. Παρά την παρουσία της διεπαφής και την ουσιαστική ασυμμετρία, η δυναμική των φυσαλίδων συμφωνεί με την προβλεπόμενη συμπεριφορά της εξίσωσης Rayleigh–Plesset (1) [77]. Η αρχική διαστολή της φυσαλίδας συσχετίζεται με το σχηματισμό του πρώτου γρήγορου πίδακα. Καθώς αυτός ο λεπτός πίδακας ανεβαίνει, η φυσαλίδα ξεφουσκώνει και οπισθοχωρεί στην επιφάνεια του δότη, που υπάρχει το βίο-υλικό. Λίγες στιγμές αργότερα ($t \sim 30 \mu\text{s}$) αναδύεται ένα δεύτερο εξόγκωμα από τη διεπαφή, που είναι ο πιο αργός, παχύτερος δεύτερος πίδακας. Κατά την ανάδυση αυτού του δεύτερου πίδακα, η φυσαλίδα έχει ξεφουσκώσει εντελώς καθώς οπισθοχωρεί μακριά από τη διεπαφή. Ενώ ο πρώτος πίδακας αποσυντίθεται σε ένα συρμό από σταγόνες που εξελίσσονται γρήγορα (μεγέθους $\sim 20 \mu\text{m}$), ο δεύτερος πίδακας γίνεται ασταθής στην άκρη και δημιουργεί σταγόνες πολύ μεγαλύτερου μεγέθους ($D \sim 100 \mu\text{m}$).

Έτσι, γίνεται κατανοητό ότι ο 1^{ος} πίδακας δημιουργείται από την ώθηση που λαμβάνει από την αρχική διαστολή της φυσαλίδας. Για την δημιουργία της 2^{ης} τάξεως πίδακα οι απόψεις δεν είναι σύμφωνες. Σύμφωνα με τους Patrascioiu et al. [78], συμβαίνει μία δευτερεύουσα διαστολή φυσαλίδων, η οποία ωθεί το ρευστό μακριά από την ελεύθερη επιφάνεια στον αέρα. Ωστόσο, σύμφωνα με τους Devillard et al., ο δεύτερος πίδακας αναδύεται όταν η φυσαλίδα εκρήγνυται και οπισθοχωρεί μακριά από τη διεπαφή, πριν αρχίσει η δεύτερη επέκτασή της. Εάν ο δεύτερος πίδακας ήταν το προϊόν της δεύτερης διαστολής φυσαλίδων, τότε θα ήταν αναμενόμενη μία καθυστέρηση ακόμη μεγαλύτερη από τα πολλά

μικροδευτερόλεπτα μεταξύ της πρώτης διαστολής φυσαλίδας και της πρώτης εκτόξευσης, καθώς η φυσαλίδα είναι ακόμη πιο μακριά από την επιφάνεια όταν ο δεύτερης τάξεως πίδακας αναδύεται. Η απουσία οποιασδήποτε καθυστέρησης δείχνει την αποτυχία του επιχειρήματος ότι ο δεύτερος πίδακας προκύπτει από τη δεύτερη επέκταση της φυσαλίδας στην επιφάνεια του υγρού.

Συνοψίζοντας, η τεχνική βιοεκτύπωσης LIFT κοντά σε μια διεπαφή υγρού-αέρα έχει ως αποτέλεσμα μια πολύπλοκη αλληλεπίδραση μεταξύ της δυναμικής μιας φυσαλίδας σπηλαίωσης που δημιουργείται από το πλάσμα που προκαλείται από laser και του σχήματος της διεπαφής. Η γρήγορη διαστολή και η επακόλουθη έκρηξη αυτής της φυσαλίδας κοντά στη διεπαφή δημιουργούν έναν αρχικό γρήγορο πίδακα καθώς και ισχυρές δευτερεύουσες ροές που δημιουργούν έναν δεύτερο πιο εμφανή πίδακα. Οι ιδιότητες αυτού του πίδακα μπορούν να συντονιστούν μεταβάλλοντας είτε τη θέση εστίασης της δέσμης λέιζερ σε σχέση με την επιφάνεια είτε την προσπίπτουσα ενέργεια του παλμού laser.

Κεφάλαιο 2. Ρεολογία βίο-μελανιών

2.1 Εισαγωγή στη ρεολογία

Η μελέτη και η έρευνα της βίο-εκτύπωσης με laser, LIFT είναι άρρηκτα συνδεδεμένη με την ρεολογική συμπεριφορά των βίο-υλικών που χρησιμοποιούνται προς εκτύπωση. Ειδικά στην παρούσα εργασία, όπου γίνεται η μελέτη της τεχνικής LIFT σε τρισδιάστατα ρευστά και πυκνά υποστρώματα, όπως είναι οι υδρογέλες, ECM αλλά και με βίο-υλικά μεγάλης συγκέντρωσης σε κύτταρα. Αυτά τα υλικά έχουν ιδιαίτερη ρεολογική συμπεριφορά και έχει μεγάλη σημασία η μελέτη των ρευστομηχανικών τους παραμέτρων (π.χ. ιξώδες). Αρχικά ορίζοντας την ρεολογία σαν κλάδο μελέτης, είναι η μελέτη της ροής και της παραμόρφωσης. Ουσιαστικά μελετά στον τρόπο που σχετίζεται η δύναμη και η παραμόρφωση των υλικών, κυρίως ρευστών. Η απλούστερη και πιθανώς πρώτη σχέση μεταξύ δύναμης και παραμόρφωσης είναι ο νόμος του Hooke, όπου η δύναμη είναι ανάλογη με την παραμόρφωση:

$$\tau = k\gamma_0$$

όπου,

- τ η δύναμη διάτμησης ανά μονάδα επιφανείας ή τάση (Pa)
- k η σταθερά ελαστικότητας (αδιάστατη)
- γ_0 η μεταβολή μήκους

2.2 Ιξώδες ρευστού

Για τα ρευστά, η απλούστερη σχέση είναι ο νόμος του Νεύτωνα, όπου η τάση είναι ανάλογη του ρυθμού διάτμησης:

$$\dot{\gamma} = \frac{d\gamma}{dt}$$

$$\tau = \eta\dot{\gamma}$$

όπου,

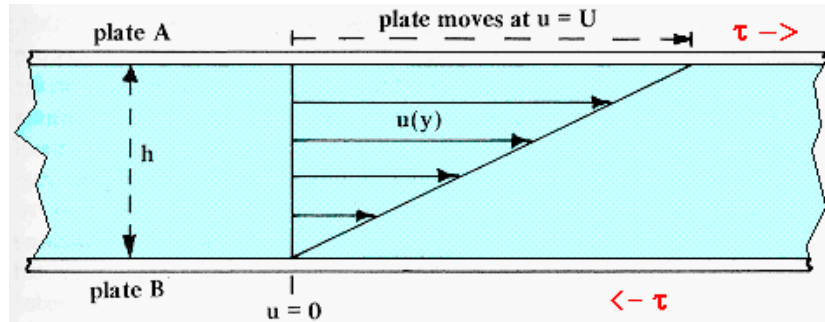
- η , το Νευτώνιο ιξώδες (αδιάστατο)

Συγκεκριμένα, Νευτώνεια ρευστά, ονομάζονται τα ρευστά τα οποία υπακούουν στο νόμο του Νεύτωνα για το ιξώδες. Το ιξώδες ενός ρευστού είναι το χαρακτηριστικό του μέγεθος, το οποίο καθορίζει την αντίστασή του σε διατμητική παραμόρφωση ή στη ροή. Η αντίσταση αυτή προκαλείται από μία διαμοριακή δύναμη συνοχής η οποία δημιουργεί μία δύναμη τριβής μεταξύ γειτονικών στρώσεων ρευστού, οι οποίες βρίσκονται σε σχετική κίνηση μεταξύ τους, καθώς αυτές ολισθαίνουν η μία πάνω στην άλλη.

Το ιξώδες εξαρτάται από την ελκτική δύναμη που ασκείται μεταξύ των μορίων και από την ανταλλαγή ορμής μεταξύ των μορίων γειτονικών στρώσεων του ρευστού κατά τη σχετική μεταξύ τους κίνηση. Επιπλέον εξαρτάται από τη θερμοκρασία, όμως με διαφορετικό τρόπο για τα υγρά και τα αέρια. Στα υγρά, το ιξώδες καθορίζεται από την μοριακή συνοχή. Με την αύξηση της θερμοκρασίας, τα μόρια τους υγρού αποκτούν μεγαλύτερη ενέργεια με αποτέλεσμα η συνεκτική τους δύναμη να μειώνεται και κατά συνέπεια και το ιξώδες. Αντιθέτως, στα αέρια, με την αύξηση της θερμοκρασίας το ιξώδες αυξάνεται καθώς σε αυτή

την περίπτωση το ιξώδες καθορίζεται από την μοριακή ανταλλαγή μεταξύ των γειτονικών στρωμάτων που βρίσκονται σε σχετική κίνηση.

Στην παρακάτω **Εικόνα 17**, παρουσιάζεται ο τρόπος προσδιορισμού του ιξώδους. Δύο παράλληλες πλάκες, ίδιας επιφάνειας A , βρίσκονται σε απόσταση h και ενδιάμεσο χώρο βρίσκεται το υπό μελέτη ρευστό. Η πάνω πλάκα κινείται προς τα δεξιά με μία ταχύτητα U , ενώ η κάτω πλάκα παραμένει σταθερή.



Εικόνα 17: Σχηματική αναπαράσταση ενός ρευστού ανάμεσα σε δύο πλάκες. Η πάνω πλάκα κινείται με ταχύτητα U . [79]

Στο όριο συνεχούς ροής, το ρευστό που έρχεται σε επαφή με κάθε πλάκα κινείται με την ίδια ταχύτητα με την πλάκα (μια κατάσταση μη ολίσθησης). Μεταξύ των δύο πλακών η ταχύτητα του ρευστού αυξάνεται από μηδέν στην πλάκα B σε U στην πλάκα A. Το διάγραμμα δείχνει μια συγκεκριμένη περίπτωση για την οποία η ταχύτητα του ρευστού αυξάνεται γραμμικά με την απόσταση h από την πλάκα: $u(y) = U(y/h)$. Πρέπει να εφαρμοστεί μια διατμητική τάση, $\tau = (F/A)$ στο σύστημα για να διατηρείται η πάνω πλάκα κινούμενη με σταθερή ταχύτητα U . Αυτή η τάση σχετίζεται με το ιξώδες, η , του ρευστού και τη βαθμίδα ταχύτητας ή τον ρυθμό παραμόρφωσης. Το κινηματικό ιξώδες ορίζεται ως ο λόγος του δυναμικού ιξώδους η ως προς την πυκνότητα του υγρού ρ και συνήθως συμβολίζεται ως $\nu = \eta/\rho$. Επιπλέον, ο λόγος U/h ονομάζεται λόγος της διατμητικής παραμόρφωσης, η βαθμίδα $\gamma = du/dy$ είναι η τοπική ταχύτητα διάτμησης ή ο ρυθμός παραμόρφωσης, ο οποίος έχει μονάδα μέτρησης τα s^{-1} .

2.3 Νευτώνεια και μη-Νευτώνεια ρευστά

Αρχικά χρειάζεται να ορίσουμε με μεγαλύτερη ακρίβεια τα Νευτώνεια ρευστά. Τα χαρακτηριστικά των Νευτώνειων ρευστών όταν αυτά χρησιμοποιούνται σε σταθερή θερμοκρασία και πίεση είναι τα ακόλουθα:

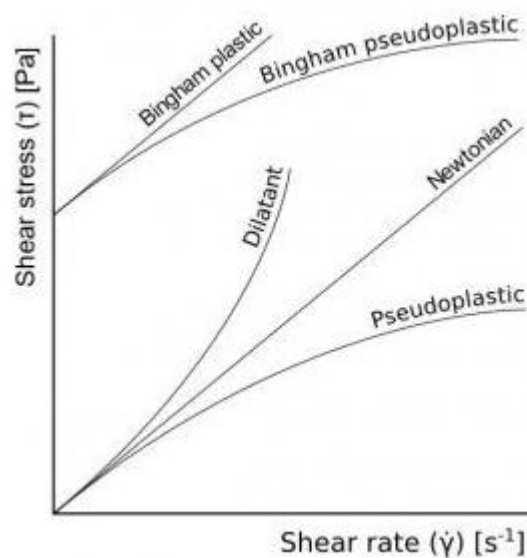
- 1) Η μόνη τάση που δημιουργείται στην απλή διατμητική ροή είναι η διατμητική τάση, σ , με τις δύο κανονικές διαφορές τάσεων να είναι μηδενικές. Στην περίπτωση ενός Νευτώνειου υγρού, η κατανομή τάσης για μια τέτοια ροή μπορεί να γραφτεί με τη μορφή:

$$\sigma_{21} = \eta \dot{\gamma}, \sigma_{13} = \sigma_{23} = 0, \quad \sigma_{11} - \sigma_{22} = 0, \quad \sigma_{22} - \sigma_{33} = 0$$

- 2) Το ιξώδες διάτμησης δεν μεταβάλλεται ανάλογα με το ρυθμό διάτμησης.
- 3) Το ιξώδες είναι σταθερό ως προς το χρόνο διάτμησης και η τάση στο υγρό πέφτει στο μηδέν αμέσως μετά τη διακοπή της διάτμησης[80].

Οποιαδήποτε απόκλιση από τα παραπάνω 3 χαρακτηριστικά, είναι αρκετή ώστε το ρευστό να πάψει να θεωρείται Νευτώνειο.

Ένα μη Νευτώνειο ρευστό είναι ένα ρευστό του οποίου το ιξώδες εξαρτάται από τη στιγμιαία ταχύτητα διάτμησης του ρευστού. Εάν το ιξώδες ορίζεται ως η αντίσταση που έχει ένα ρευστό στην παραμόρφωση, τότε ένα μη Νευτώνειο ρευστό είναι ένα ρευστό του οποίου η αντίσταση στην παραμόρφωση εξαρτάται από την ταχύτητα με την οποία συμβαίνει η εν λόγω παραμόρφωση. Από την άλλη πλευρά, ένα Νευτώνειο ρευστό είναι ένα ρευστό του οποίου το ιξώδες είναι σταθερό σε οποιαδήποτε ταχύτητα παραμόρφωσης. Οι κατηγορίες των μη Νευτώνειων ρευστών περιλαμβάνουν τα διασταλτικά, τα ψευδοπλαστικά, τα πλαστικά Bingham και τα ψευδοπλαστικά Bingham. Στα μη Νευτώνεια ρευστά περιλαμβάνονται ακόμη και εκείνα των οποίων το ιξώδες εξαρτάται από το ρυθμό διάτμησης του ρευστού, δηλαδή όταν το ιξώδες αλλάζει καθώς το ρευστό παραμορφώνεται με σταθερό ρυθμό. Επιπλέον, στα χρόνο-εξαρτώμενα ρευστά, η διατμητική τάση και ο ρυθμός παραμόρφωσης εξαρτώνται από την διάρκεια της διάτμησης και από την κινηματική του ρευστού. Στα χρόνο-ανεξάρτητα ρευστά ή αλλιώς στα καθαρά παχύρευστα, ανελαστικά ή γενικευμένα Νευτώνεια ρευστά, ο ρυθμός παραμόρφωσης καθορίζεται μόνο από την τιμή διατμητικής τάσης σε συγκεκριμένο σημείο και χρόνο.

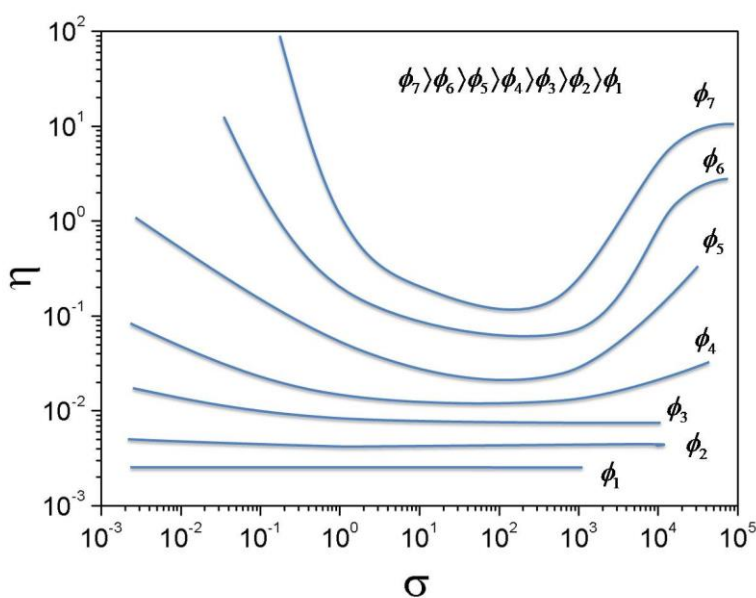


Εικόνα 18: Διάγραμμα διατμητικής τάσης έναντι ταχύτητας διάτμησης για ένα Νευτώνειο ρευστό και τέσσερα μη Νευτώνεια ρευστά[81].

Τέλος τα ιξωδοελαστικά ρευστά, εμφανίζουν συμπεριφορά συνδυασμού των ιδανικών ρευστών και των ελαστικών στερεών, με αποτέλεσμα να έχουν μερική ελαστική ανάκτηση μετά την παραμόρφωση. Επιπλέον υπάρχουν άλλες δύο κατηγορίες εκτός από τα παραπάνω που ανήκουν στη γενικευμένη κατηγορία των ψευδοπλαστικών. Τα διασταλτικά (Dilatant ή shear thickening) ρευστά, στα οποία το ιξώδες αυξάνει με την αύξηση του ρυθμού διάτμησης καθώς και τα πλαστικά Bingham τα οποία χρειάζονται μία πεπερασμένη τιμή διατμητικής τάσης για να αποκτήσουν ιδιότητες ρευστού.

2.4 Γενική συμπεριφορά του ιξώδους σε διαλύματα με σωματίδια (suspensions)

Η μελέτη και η γνώση της ρεολογικής συμπεριφοράς (π.χ. ιξώδες) των διαλυμάτων αναμεμιγμένων με διαφορετικές συγκεντρώσεις σωματιδίων είναι πάρα πολύ μεγάλης σημασίας, ειδικά για την παρούσα εργασία που τα βίο-υλικά που χρησιμοποιήθηκαν ήταν διαλύματα υψηλής συγκέντρωσης με κύτταρα. Στην παρακάτω γραφική παράσταση, φαίνεται, η σχέση εξάρτηση του ιξώδους, η , με τη διατμητική τάση, σ , για αυξανόμενες συγκεντρώσεις σωματιδίων/κυττάρων στο διάλυμα (suspension), ϕ . Το πρώτο Νευτώνειο οροπέδιο σε χαμηλούς ρυθμούς διάτμησης ακολουθείται από την περιοχή διατμητικής διάτμησης του νόμου δύναμης (σε μέτριες συγκεντρώσεις) και στη συνέχεια από ένα φαινόμενο επιπέδωσης έως ότου επιτευχθεί ένα δεύτερο Νευτώνειο οροπέδιο. Όταν αυξάνεται η συγκέντρωση, παρατηρείται αύξηση του ιξώδους των στερεών σωματιδίων σε διάλυμα. Η σημαντική παράμετρος είναι το ϕ , όπου συγκεκριμένα δηλώνει τον όγκο των σωματιδίων και ο λόγος για τον οποίο είναι σημαντικός, είναι διότι η ρεολογία, εξαρτάται σε μεγάλο βαθμό από τις υδροδυναμικές δυνάμεις που δρουν στην επιφάνεια των σωματιδίων ή των συσσωματωμάτων σωματιδίων.



Εικόνα 19: Γραφική παράσταση ιξώδους συναρτήσει της διατμητικής τάσης για διαφορετικές συγκεντρώσεις σωματιδίων στο διάλυμα[82].

Έτσι, στην **Εικόνα 19** φαίνεται ότι για αρκετά μεγάλες συγκεντρώσεις, το ιξώδες μπορεί να αυξηθεί με την ταχύτητα διάτμησης. Τέλος, δείχνει επίσης ότι για υψηλότερες συγκεντρώσεις, σε μικρές ταχύτητες διάτμησης (ή μεγάλο ιξώδες), η διατμητική τάση φθάνει σε οριακή τιμή που ονομάζεται τάση διαρροής [80].

2.5 Ιξωδοελαστικότητα

Στην κατηγορία αυτή των ιξωδοελαστικών ρευστών (viscoelastic fluids) υπάρχει μερική ανάκτηση της παραμόρφωσης που είχε επιβληθεί στο ρευστό. Τα ρευστά αυτά εμφανίζουν ταυτόχρονα ιδιότητες ρευστού (ιξώδη υλικά) και ελαστικές ιδιότητες που αρμόζουν σε στερεά υλικά. Παρατηρείται συνήθως σε

κολλοειδή συστήματα (αιωρήματα πρωτεϊνών και πολυσακχαριτών) και σύνθετα συστήματα πολλαπλών φάσεων, όπως οι υδρογέλες εξωκυτταρικής μήτρας, ECM, ή τα θρεπτικά υλικά που χρησιμοποιούνται για την καλλιέργεια κυττάρων. Στις περισσότερες περιπτώσεις ροής των ιξωδοελαστικών ρευστών υφίσταται ανομοιόμορφη κατανομή των διατμητικών τάσεων και πιο συγκεκριμένα εμφανίζονται τάσεις που επενεργούν κάθετα προς το επίπεδο της ροής του υλικού (normal stresses). Οι ιξωδοελαστικές ιδιότητες των διαλυμάτων προκύπτουν από αλληλεπιδράσεις σωματιδίων κάθε είδους. Η ελαστικότητα προέρχεται από την ελαστικότητα των παραμορφώσιμων σωματιδίων, ενώ τα ιξώδη φαινόμενα οφείλονται κυρίως στο διάμεσο υγρό. Εάν αυτά απαιτούν μια προτιμώμενη διάταξη των σωματιδίων σε ηρεμία προκειμένου να εκπληρωθεί κάποια ελάχιστη ενεργειακή απαίτηση, θα υπάρχει πάντα μια τάση για το εναιώρημα να επιστρέφει, ή να χαλαρώνει, σε αυτή τη διάταξη. Η επιστροφή αυτή οφείλεται στον χρόνο χαλάρωσης, χαρακτηριστικό χρόνο (λ) του συστήματος. Το συγκρίνουμε με έναν τυπικό πειραματικό χρόνο (t_{exp}):

- Όσο $t_{exp} \ll \lambda$ (ή σε μεγάλες συχνότητες) το σύστημα συμπεριφέρεται ελαστικά
- Όσο $t_{exp} \gg \lambda$ (ή σε μικρές συχνότητες) το σύστημα συμπεριφέρεται με ιξώδες τρόπο.

Ένας τρόπος για να μελετηθεί η δομική αναδιάταξη ενός πολύπλοκου ρευστού, χωρίς να υπάρξει σημαντική επέμβαση στη μικροδομή του, είναι να εφαρμοστούν μικρές διαταραχές σε αυτό. Συγκεκριμένα, μπορεί να επιβληθεί ταλαντωτική διάτμηση μικρού πλάτους, ώστε να μετρηθεί η συνδυασμένη απόκριση του υλικού. Η τάση που εφαρμόζεται είναι ημιτονοειδής:

$$\gamma = \gamma_0 \sin \omega t$$

Όπου για μικρές τιμές γ_0 η διατμητική τάση θεωρείται και αυτή ημιτονοειδής:

$$\sigma = \sigma_0 \sin (\omega t + \varphi)$$

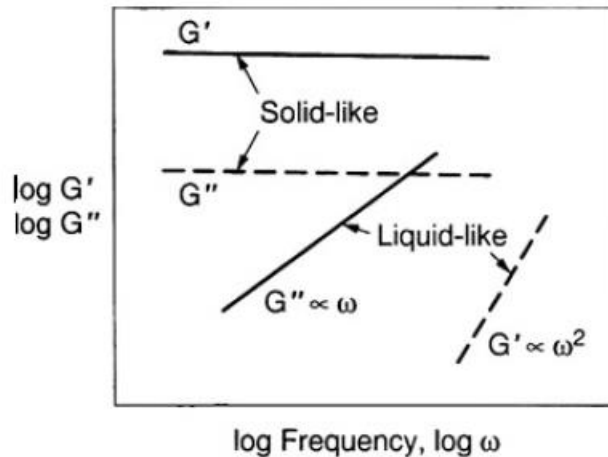
Η τελευταία εξίσωση με την σύνθεση δύο διατμητικών τάσεων, ημιτονοειδών κυμάτων με ίδια συχνότητα $\sin(\omega t)$ και 90° διαφορά φάσης $\cos(\omega t)$, μετατρέπεται στην παρακάτω:

$$\sigma(t) = \gamma_0 [G' \sin(\omega t) + G'' \cos(t)]$$

Η σύνθεση αυτή, φέρει δύο νέους συντελεστές G' , G'' .

- G' ονομάζεται ο συντελεστής αποθήκευσης (storage modulus) και
- G'' συντελεστής απώλειας (loss modulus).

Ουσιαστικά, ο G' είναι συντελεστής αποθήκευσης της ελαστικής ενέργειας, ενώ ο συντελεστής απώλειας, G'' , δείχνει τη συμπεριφορά ιξώδους αυτής της ενέργειας. Ο λόγος τους G''/G' , ονομάζεται εφαιπτομένη απωλειών $\tan\delta$, όπου για ρευστά υλικά παίρνει αρκετά μεγάλες τιμές ($\gg 1$), ενώ για πιο στερεά υλικά παίρνει μικρότερες τιμές ($\ll 1$).



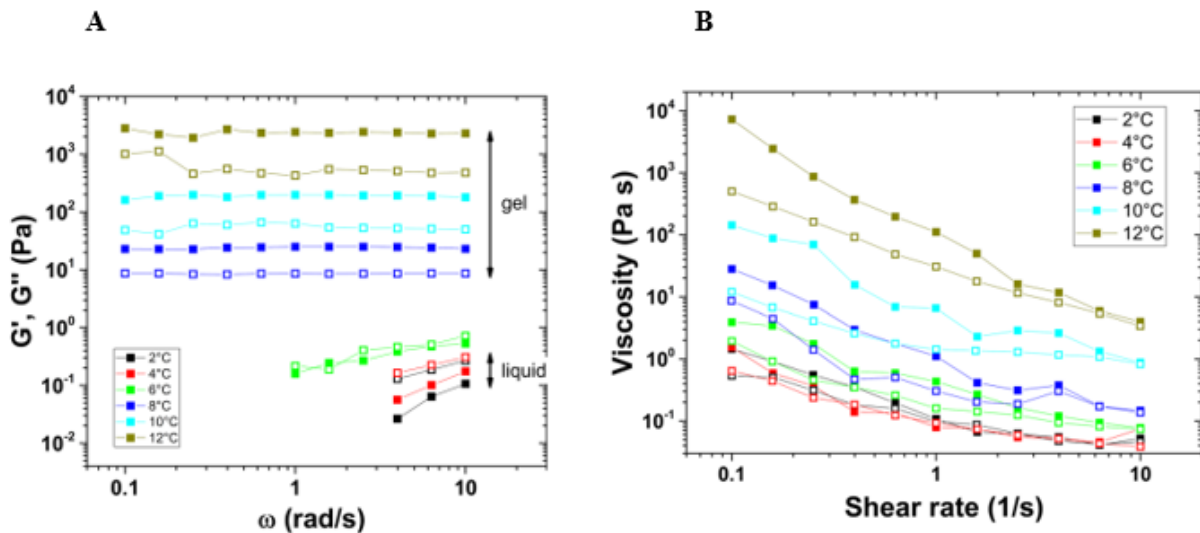
Εικόνα 20: Γραφική αναπαράσταση των συντελεστών G' , G'' συναρτήσει της συχνότητας ταλάντωσης των υλικών[82].

Στην **Εικόνα 20** φαίνονται οι συντελεστές αποθήκευσης και απώλειας G' και G'' για τα ρευστά και στερεά υλικά. Για τα ρευστά, ο συντελεστής αποθήκευσης είναι πολύ χαμηλότερος από τον συντελεστή απώλειας και κλιμακώνεται συναρτήσει της συχνότητας όσο το $G' \propto \omega^2$. Ο συντελεστής απώλειας είναι γραμμικός συναρτήσει της συχνότητας όσο $G'' \propto \omega$. Η περιοχή των ρευστών υλικών με χαμηλή συχνότητα, στην οποία τα G' και G'' υπακούουν σε αυτούς τους νόμους ισχύος ονομάζεται τερματική περιοχή (δηλαδή Νευτώνεια περιοχή). Για το στερεό ρευστό, το $G' \gg G''$ και το G' είναι σχεδόν ανεξάρτητο από τη συχνότητα. Για άλλους τύπους πολύπλοκων υλικών, όπως τα διαλύματα κυττάρων ή τις υδρογέλες ECM, μεγαλύτερη σημασία έχουν η τάξη μεγέθους των G' και G'' και οι κλίσεις των G' , G'' συναρτήσει της συχνότητας σε λογαριθμικό διάγραμμα[82][80].

2.5.1 Ρεολογικός χαρακτηρισμός ECM

Οι ρεολογικές ιδιότητες και η συγκέντρωση των ECM παίζουν πολύ σημαντικό ρόλο, καθώς κρίνουν αν το υλικό θα είναι σε μορφή υδρογέλης ή υγρού. Ο σχηματισμός της φάσης υδρογέλης μιας ECM είναι πολύ σημαντικός, καθώς μόνο με αυτή τη κατάσταση μπορεί να παρέχει δομική υποστήριξη, αλλιώς θα διαχέεται οπουδήποτε τοποθετηθεί. Επιπλέον, η ακαμψία της εκάστοτε ECM επηρεάζει διαφορετικά την λειτουργία των κυττάρων στο εσωτερικό της[83]. Ένας από τους παράγοντες που κάνει τις ECM τόσο περίπλοκα υλικά, είναι η μεταβολή της κατάστασής τους από εξωτερικούς παράγοντες. Για παράδειγμα, τα περισσότερα ECM που χρησιμοποιούνται, μεταβαίνουν στη φάση της υδρογέλης με την αύξηση της θερμοκρασίας τους ή άλλα με φωτοπολυμερισμό. Το γεγονός αυτό, κάνει τις ρεολογικές τους ιδιότητες πολύπλοκες, καθιστώντας τα αρκετά ιδιαίτερα ρευστά. Παρακάτω, στην Error! Reference source not found.Α φαίνεται το διάγραμμα των συντελεστών αποθήκευσης και απώλειας συναρτήσει της συχνότητας ταλάντωσης (Κεφάλαιο 2) από τις ρεολογικές μετρήσεις του ECM: Matrigel, υλικό το οποίο χρησιμοποιήθηκε αρκετά και στην παρούσα εργασία. Το Matrigel, όπως φαίνεται και από το διάγραμμα

$G', G'' = f(\omega)$, σε θερμοκρασίες 0-6°C βρίσκεται σε υγρή φάση, όπου αποδεικνύεται από την παρατήρηση ότι το ιξώδες μειώνεται με την αύξηση της θερμοκρασίας κάτω από τους των 6°C (Error! Reference source not found.B), κάτι που αναμένεται για τα υγρά, ενώ για θερμοκρασίες μεγαλύτερες των 6°C γίνεται υδρογέλη. Στους 6°C τέλος, το G' ισούται με G'' για όλες τις μετρούμενες συχνότητες. Αυτό δείχνει ότι η ζελατινοποίηση ξεκινά για $T_{gel} = 6^\circ\text{C}$. Για τη χρήση του Matrigel σε μικρορευστοποιητικές συσκευές, αυτό το πειραματικό αποτέλεσμα υποδεικνύει ότι είναι σημαντικό να ψύχεται η μικρορευστοποιητική συσκευή σε θερμοκρασία κάτω από το T_{gel} προκειμένου να αποφευχθεί η πρώιμη ζελατινοποίηση. Όλα τα παραπάνω υποδεικνύουν πως το ECM Matrigel έχει καθαρά μη-Νευτώνεια συμπεριφορά[84]. Γενικεύοντας την παραπάνω μελέτη, είναι γεγονός ότι τα περισσότερα ECM παρουσιάζουν αλλαγή φάσης από εξωτερικούς παράγοντες, με αποτέλεσμα το ιξώδες τους να μην συσχετίζεται γραμμικά με τον τοπικό ρυθμό παραμόρφωσής τους.



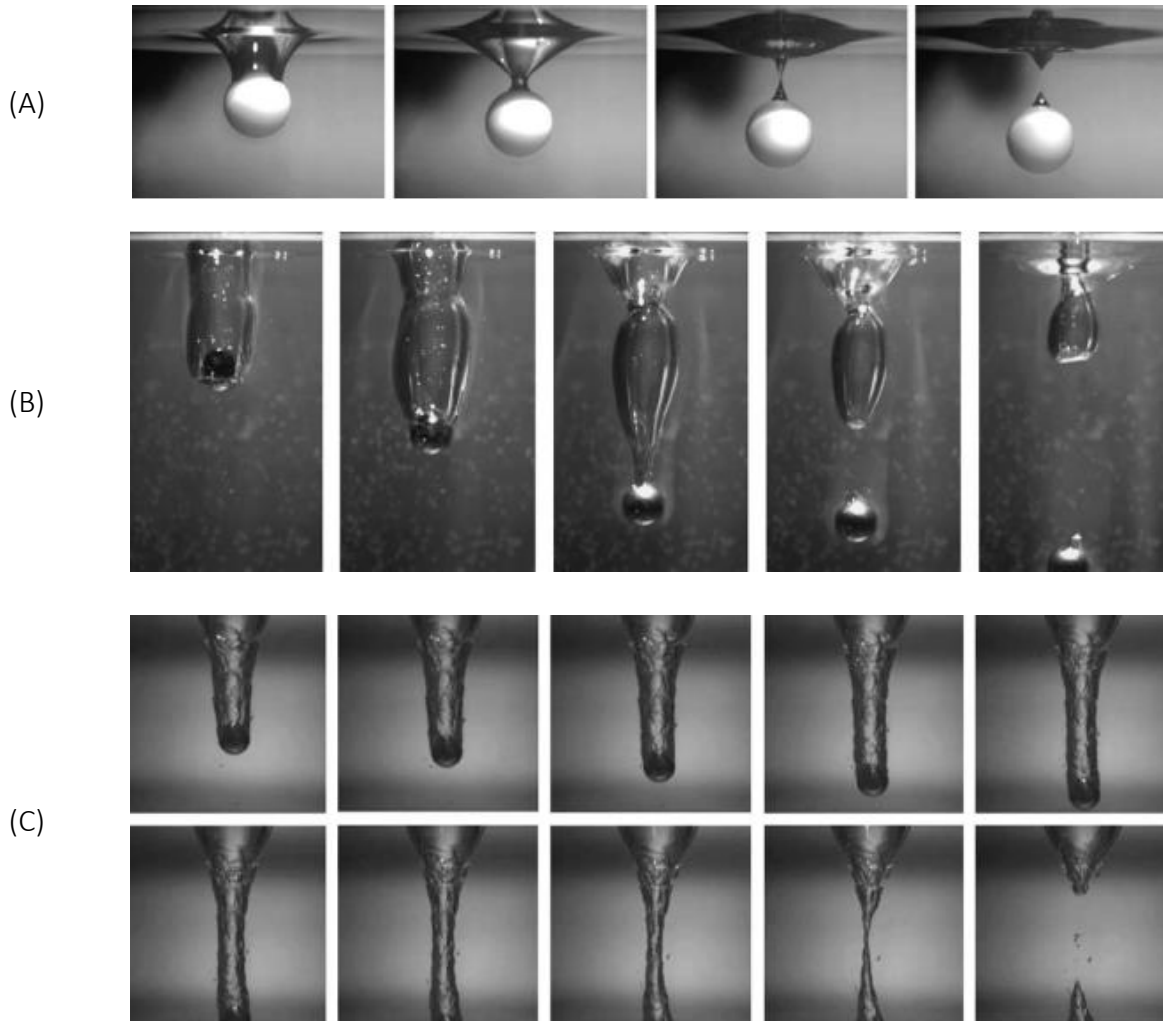
Εικόνα 21: Α) Γραφική παράσταση των συντελεστών αποθήκευσης και απώλειας συναρτήσει της συχνότητας ταλάντωσης και Β) του ιξώδους συναρτήσει της διατμητική τάσης για τις διάφορες θερμοκρασίες [85].

2.6 Πρόσκρουση στερεού σε ρευστό υπόστρωμα

Στην παρούσα διπλωματική γίνεται για πρώτη φορά ανάλυση του πίδακα όταν αυτός εισέρχεται σε μία υδρογέλη, όπως είναι τα ECM. Έτσι, είναι σημαντικό να γίνει μία ανάλυση του θεωρητικού υποβάθρου που περιγράφει αυτή την αλληλεπίδραση. Σε αυτό το επίπεδο, έχει γίνει μία παραδοχή πως ο πίδακας που εισέρχεται στο εσωτερικό του ECM, σε μορφή gel, είναι στερεό. Αυτή η παραδοχή έγινε καθώς αυτό που έρχεται πρώτο σε επαφή με την επιφάνεια του ECM είναι το μπροστινό μέτωπο του πίδακα όπου είναι σφαιρικό και προσκρούει με αρκετά μεγάλη ταχύτητα.

Έτσι, όταν ένα στερεό αντικείμενο ή ένα σταγονίδιο υγρού προσκρούει στην επιφάνεια μιας δεξαμενής υγρών, σχηματίζεται ένας πίδακας ή μια στήλη υγρού πάνω από την επιφάνεια του υγρού στόχου; αυτός ο πίδακας ή στήλη ονομάζεται "πίδακας Worthington". Ο Worthington [86] ήταν ο πρώτος που ερεύνησε αυτό το πίδακα και διεξήγαγε μια σειρά πειραμάτων για να μελετήσει αυτό το φαινόμενο πριν από περισσότερο από έναν αιώνα. Έκτοτε, πολλές μελέτες έχουν επικεντρωθεί στην κατανόηση των μηχανισμών παρόμοιων φαινομένων. Παρατηρήθηκε μια ενδιαφέρουσα αλληλουχία γεγονότων που συμβαίνουν μετά την πρόσκρουση στερεών αντικειμένων στην ελεύθερη επιφάνεια των υγρών. Αφού ένα αντικείμενο εισέλθει σε μια δεξαμενή υγρών, πρώτα σχηματίζεται μια κοιλότητα αέρα και στη συνέχεια

ένας πίδακας νερού βγαίνει από το υγρό. Οι Akers et al.[87] διερεύνησαν πειραματικά τον σχηματισμό κοιλότητας λόγω της πρόσκρουσης μιας στερεής σφαίρας στην επιφάνεια ενός ελεύθερου, ιξωδοελαστικού υγρού. Στην παρακάτω **Εικόνα 22**, φαίνεται η διαφορετική συμπεριφορά στην αλληλεπίδραση της σφαίρας με το υγρό στο οποίο προσκρούει αναλόγως την διάμετρο και την πυκνότητά της.



Εικόνα 22: Καταγραφή του φαινομένου πρόσκρουσης μιας σφαίρας σε υγρό. (A): σφαίρα διαμέτρου 2.54 cm που αφήνεται από 5 cm (B): 0.9 cm από 30 cm (C): 0.95 cm από 70 cm.[87]

Έτσι, κατά την κάθετη πρόσκρουση ενός στερεού υλικού (solid-like material) σε υγρό, φαίνεται να δημιουργείται μία κοιλότητα αέρα. Αρχικά, η «υφή» της κοιλότητας αέρα είναι αρκετά ομαλή, όσο όμως οι συνθήκες ρίψης του στερεού γίνονται πιο βίαιες, η κοιλότητα αποκτά πολλές ανωμαλίες στην επιφάνειά της. Αυτή η περίπτωση αντιστοιχεί σε πολύ μεγάλα ελαστικά φαινόμενα.

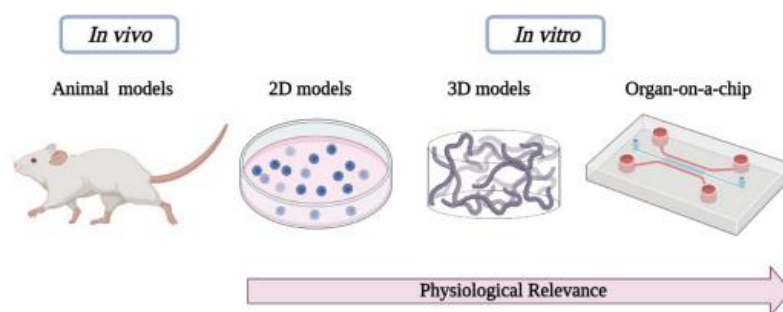
Υπάρχει μια ενδιαφέρουσα σύνδεση μεταξύ της κλιμάκωσης που παρατηρείται για το βάθος διείσδυσης, που είναι το σημείο στο οποίο η σφαίρα σταματά αρχικά από το ρευστό. Παρατηρείται ότι η σφαίρα σταματά αρχικά καθώς εισέρχεται στο ρευστό και αναπηδά μία ή περισσότερες φορές πριν φτάσει σε μια

κατάσταση σταθερής καθίζησης [87]. Φυσικά οι παράμετροι που καθορίζουν που θα ακινητοποιηθεί η σφαίρα είναι πολλοί, όπως το ιξώδες το ρευστού στο οποίο εισέρχεται, η ταχύτητα με την οποία εισέρχεται το στερεό, το βάρος του κ.λπ. Στην περίπτωση της παρούσας διπλωματικής, η σφαίρα που εισέρχεται στο ρευστό έχει στο εσωτερικό της κύτταρα. Έτσι κατά τον σχηματισμό αυτή της κοιλότητας αέρα μέσα στο μη-Νευτώνειο υλικό τύπου ECM η «σφαίρα» ακινητοποιείται στο εκάστοτε σημείο, αναλόγως με την ταχύτητα εισόδου και αφήνει στο σχήμα σφαίρα τα κύτταρα που εμπεριείχε. Θα αναλυθούν περισσότερο στα αντίστοιχα πειραματικά αποτελέσματα στο Κεφάλαιο 5.2.2.

Κεφάλαιο 3. Βίο-Εκτύπωση σε συστήματα Organ-on-chip

3.1 Εισαγωγή

Με τις τεράστιες εξελίξεις στη μικρο- και νάνο-κατασκευή, άνοιξε ένα νέο ερευνητικό πεδίο για επιστήμονες και μηχανικούς που ονομάζεται μικρο- ή νάνο-ρευσιτότητα (microfluidics). Όγκοι της τάξεως των πίκο-λίτρων (10^{-12}) φαίνονται ήδη πολύ μικροί, αλλά εξακολουθούν να είναι μεγάλοι σε σύγκριση με λειτουργικές οντότητες στη βιολογία και τη χημεία. Ο σχεδιασμός, η κατασκευή και η λειτουργία συσκευών που μπορούν να χειριστούν φάρμακα, σωματίδια και βιολογικά υλικά, όπως πρωτεΐνες και κύτταρα σε μικροσκοπικούς όγκους υγρών, μπορεί να θεωρηθεί ως κεντρικό θέμα της μικρορευσιτομηχανικής. Τέτοιες συσκευές γνωστές επίσης ως συστήματα Lab-on-a-chip (LOC), βιομικροηλεκτρομηχανικά συστήματα (BioMEMS) ή συστήματα Organ-on-a-chip, μας επιτρέπουν να γεφυρώνουμε το χάσμα μεταξύ όγκων που είναι γνωστοί στα κλασικά εργαστήρια. Εννέα στους δέκα υποψήφια φάρμακα αποτυγχάνουν στην διαδικασία έγκρισης κατά τη διάρκεια των κλινικών δοκιμών φάσης 1, 2 και 3, αφού έχουν εισέλθει σε κλινικές μελέτες [88]. Ζητήματα σε οποιοδήποτε στάδιο ανάπτυξης μπορεί να επιφέρουν τεράστιο οικονομικό κόστος και ακόμη και τα εγκεκριμένα φάρμακα μπορούν να δημιουργήσουν πολλά προβλήματα στην υγεία, που προκύπτουν από ανακριβή προκλινικά μοντέλα [89].



Εικόνα 23: Εξέλιξη των προκλινικών μοντέλων που χρησιμοποιούνται στη βιοϊατρική έρευνα.

Οι παραδοσιακές 2D και 3D κυτταρικές καλλιέργειες αποτυγχάνουν να αντιγράψουν το μικροπεριβάλλον και τα χαρακτηριστικά των ζωντανών οργάνων που είναι κρίσιμα για τη λειτουργία τους, ενώ παραμένουν κυρίως εξαρτημένες από χρονοβόρες και δαπανηρές μελέτες σε ζώα [90]. Ταυτόχρονα, τα πειράματα σε ζώα, πλέον, εγείρουν ηθικά ερωτήματα, είναι ελάχιστα προγνωστικά των ανθρώπινων αποτελεσμάτων και αποδεικνύονται αναξιόπιστα σε μια ευρεία κατηγορία ασθενειών [91]. Επιπλέον, η EPA (Environmental Protection Agency) των ΗΠΑ θα αποτρέψει τη διεξαγωγή και τη χρηματοδότηση πειραμάτων σε θηλαστικά πριν από το 2035 [1], υποστηρίζοντας ταυτόχρονα, εναλλακτικές μεθόδους σε σχέση με τις δοκιμές σε ζώα. Έτσι, προέκυψε η ανάγκη ανάπτυξης μιας διαφορετικής, πιο σύγχρονης τεχνολογίας για την έρευνα στην βιομηχανία των φαρμάκων, για θεραπείες, παρακολούθηση ασθενών ακόμα και για την προσωποποιημένη ιατρική.

3.2 Συστήματα Organ-on-chip

Οι παραπάνω ανάγκες, έφεραν στο φως τα συστήματα Organ-on-chip (OoC). Τα συστήματα OoC είναι μια ενδιαφέρουσα επιστημονική και τεχνολογική εξέλιξη στην οποία η βιολογία συνδυάζεται με τη

μικροτεχνολογία για να μιμηθεί βασικές πτυχές της ανθρώπινης φυσιολογίας [92]. Το τσιπ έχει τη μορφή μιας μικρορευστοποιημένης συσκευής που περιέχει δίκτυα μικροκαναλιών για την καθοδήγηση και το χειρισμό πολύ μικρών όγκων (πικολίτρα έως χιλιοστόλιτρα) του διαλύματος[93]. Το όργανο είναι ένας πιο συγγενής όρος που αναφέρεται στους μικροσκοπικούς ιστούς που αναπτύσσονται και βρίσκονται στα μικρορευστοποιημένα τσιπ, τα οποία μπορούν να ανακεφαλαιώσουν μία ή περισσότερες λειτουργίες που σχετίζονται με τον ιστό. Αν και είναι πολύ πιο απλά από τους εγγενείς ιστούς και όργανα, οι επιστήμονες ανακάλυψαν ότι αυτά τα συστήματα μπορούν συχνά να χρησιμεύσουν ως αποτελεσματικά μιμητικά της ανθρώπινης φυσιολογίας και ασθενειών. Τα OoCs περιλαμβάνουν προηγμένη τεχνολογία *in vitro* που επιτρέπει τον πειραματισμό με βιολογικά κύτταρα και ιστούς έξω από το σώμα. Αυτό επιτυγχάνεται με τον περιορισμό τους μέσα σε δοχεία (chambers) που είναι προσαρμοσμένα ώστε να διατηρούν μια λογική ομοιότητα του *in vivo* περιβάλλοντος, από βιοχημική και φυσική άποψη. Η εργασία στη μικροκλίμακα προσφέρει μια μοναδική ευκαιρία για την επίτευξη υψηλότερου επιπέδου ελέγχου στο μικροπεριβάλλον που εξασφαλίζει υποστήριξη της ζωής των ιστών, καθώς και ένα μέσο για την άμεση παρατήρηση της συμπεριφοράς των κυττάρων και των ιστών[94]. Η τεχνολογία OoC έχει επωφεληθεί αρκετά και από την πρόοδο του κλάδου της μηχανικής των ιστών (tissue engineering) σε συνδυασμό με την βιοκατασκευή (biofabrication). Συγκεκριμένα η μηχανική των κυττάρων και των ιστών έχει πλέον ξεφύγει από τις κλασικές 2D καλλιέργειες, προχωρώντας σε τρισδιάστατες πολύπλοκες καλλιέργειες με ιδιαίτερα βίο-υλικά. Μεγάλη έμφαση έχει δοθεί στο κυτταρικό μικροπεριβάλλον και στη γεωμετρική διάταξη, που επιτρέπει τον χειρισμό των κυττάρων για την επίτευξη της κατεύθυνσης των κυττάρων, ή/και της άμεσης αλληλεπίδρασης κυττάρου-κυττάρου καθώς και της διάδοση χημικής και ηλεκτρικής σηματοδότησης. Εκτός από πιο προηγμένες κυτταρικές σειρές, ο χειρισμός των πηγών πρωτογενών κυττάρων και η ενσωμάτωσή τους σε τεχνητές δομές για την προώθηση λειτουργιών που μοιάζουν με όργανα έχει γίνει πιο αξιόπιστος. Η εμφάνιση της τεχνολογίας επαγόμενων πολυδύναμων βλαστοκυττάρων (iPSC) θα μπορούσε να προσφέρει εξατομίκευση των OoCs, καθώς τα ειδικά για τον ασθενή κύτταρα μπορούν να διαφοροποιηθούν από τα iPSC που λαμβάνονται από μεμονωμένους δότες και ενσωματώνονται στα OoCs [95]. Αυτό επιτρέπει τη μελέτη των φαινοτύπων της εκάστοτε νόσου και των ανταποκρίσεων στα φάρμακα με έναν ειδικό για τον ασθενή τρόπο.

3.3 Τοποθέτηση βίο-υλικών και κυττάρων στα OoC με τρισδιάστατη βίο-εκτύπωση

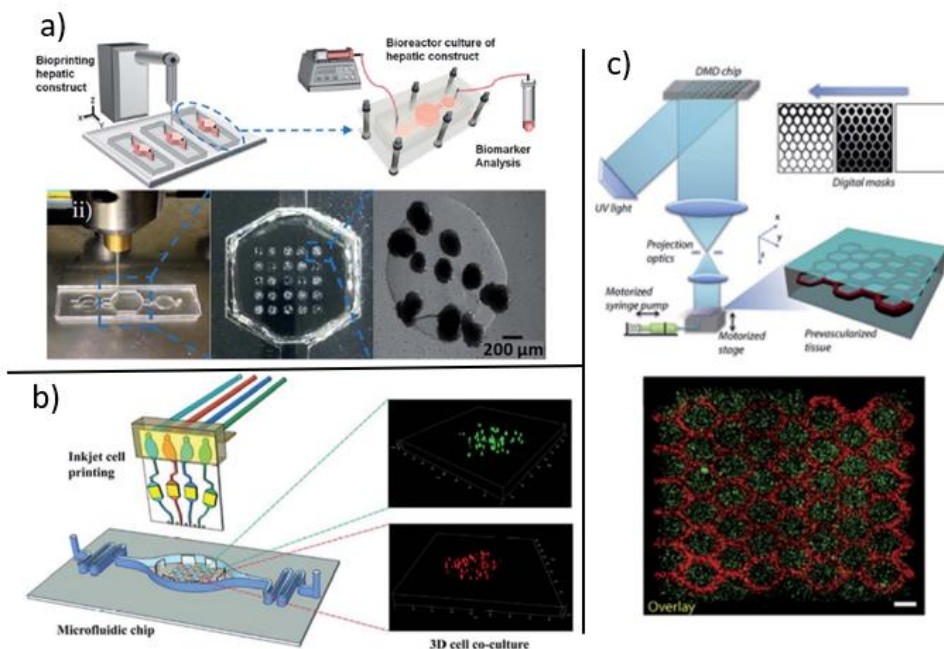
Παραδοσιακά, στον κλάδο της βιολογίας υπάρχουν συγκεκριμένοι τρόποι για την εναπόθεση των κυττάρων και *in vitro* μοντέλων καλλιέργειας. Συγκεκριμένα τα κύτταρα μπορούν να τοποθετηθούν με πιπέτα σε πιάτο καλλιέργειας, και αντίστοιχα στο εσωτερικό ενός OoC. Ο τρόπος αυτός όμως εμφανίζει αρκετά προβλήματα, κυρίως ως προς τον πλήρη έλεγχο της διαδικασίας εναπόθεσης. Με την χειροκίνητη εναπόθεση, ο έλεγχος της ποσότητας των κυττάρων είναι αδύνατος, δεν είναι εφικτή η άμεση ακινητοποίησή τους και δεν μπορεί να υπάρξει βιομιμητική συμπεριφορά.

Ο συνδυασμός της βιοεκτύπωσης με την τεχνολογία organ-on-a-chip μπορεί να επιτρέψει, από την άλλη, τη δημιουργία πολύπλοκων και βιομιμητικών *in vitro* μοντέλων για προσομοίωση και έρευνα. Σε μοντέλα OoC, κυτοκίνες, αυξητικοί παράγοντες, θρεπτικά συστατικά, συστατικά εξωκυτταρικής μήτρας (ECM) και πρωτεΐνες σύνδεσης μπορούν όλα να κατασκευαστούν [96][97]. Οι περισσότερες πλατφόρμες OoC δημιουργούνται για ερευνητικούς λόγους και μελέτες δοκιμών φαρμάκων. Αυτές οι πλατφόρμες απαιτούν συχνά τη χρήση εξελιγμένων διαδικασιών μικροκατασκευής. Η τεχνολογία βιοεκτύπωσης θα μπορούσε να αυτοματοποιήσει αυτές τις διαδικασίες και ενδεχομένως να αντιμετωπίσει τα ζητήματα απόδοσης και επαναληψιμότητας που αντιμετωπίζουν τα παραδοσιακά συστήματα OoC. Συνήθως τα OoC αποτελούνται από τρισδιάστατα μικροροϊκά κανάλια και πολύπλοκες δομές με σκοπό την προσομοίωση της αρχιτεκτονικής του εκάστοτε οργάνου που τίθεται υπό μελέτη. Ωστόσο, τα υλικά που χρησιμοποιούνται

για την δημιουργία του προς μελέτη μικροπεριβάλλοντος είναι αρκετά ευαίσθητα και ο χειρισμός τους αρκετά λεπτός. Με τη βιοεκτύπωση, επιτρέπεται η λεπτομερή ρύθμιση της μηχανικής ιδιότητας αυτών των υλικών, της μικροδομής και των μηχανισμών πολυμερισμού των ικρωμάτων υδρογέλης. Παρακάτω παρουσιάζονται επιγραμματικά τα πλεονεκτήματα της τρισδιάστατης βίο-εκτύπωσης στις πλατφόρμες OoC:

- a) Ικανότητα δημιουργίας ενός βιομιμητικού ετερογενούς μικροπεριβάλλοντος.
Στην πραγματικότητα, ο χώρος που αναπτύσσονται τα κύτταρα είναι στην εξωκυτταρική μήτρα, ECM, όπου σποτελείται από μια πολύ περίπλοκη οργάνωση πρωτεϊνών και αυξητικών παραγόντων που παράγουν βιοφυσικά, βιοχημικά και μηχανικά σήματα μεταξύ των κυττάρων. Ως εκ τούτου, η απευθείας εκτύπωση σκευασμάτων βιοϋλικών με συνέπεια, σε ένα μικροροϊκό τσιπ θα μπορούσε να αλλάξει το παιχνίδι για τη δημιουργία ενός βιομιμητικού μικροπεριβάλλοντος[98].
- b) Δυνατότητα άμεσης εκτύπωσης ή/και διαμόρφωσης μοτίβων σε μικροροϊκές συσκευές.
Η παραδοσιακή μέθοδος εναπόθεσης κυττάρων (σύριγγα, πιπέτα) είναι συνήθως αργή και μπορεί να περιλαμβάνει μια κουραστική και πολύπλοκη εγκατάσταση αντλιών, σωλήνων και ρευστών συνδέσεων. Επιπλέον, αν χρειάζεται να γίνει μελέτη των κυττάρων σε μεταγενέστερο χρόνο ζωής, αυτό απαιτεί τεράστιο χρόνο αναμονής, μέχρι τα κύτταρα να φτάσουν σε αυτό το σημείο. Ως εκ τούτου, η απευθείας βίο-εκτύπωση θα εξασφάλιζε μια παραγωγή υψηλής απόδοσης και υψηλής ακρίβειας επανλήψεων δομών χωρίς μεγάλη ανθρώπινη παρέμβαση[99].
- c) Δυνατότητα δημιουργίας πολύπλοκων τρισδιάστατων μικροδομών.
Τα παραδοσιακά μοντέλα in vitro καλλιέργειας δεν είναι σε θέση να αντανakλούν πλήρως το μικροπεριβάλλον του οργάνου. Αντίθετα, η ευελιξία των τρόπων βιοεκτύπωσης επιτρέπει την εναπόθεση κλώνων βιοϋλικού, σφαιροειδών και οργανοειδών, μέχρι και την κατασκευή ιστού [100] σε οποιοσδήποτε πολύπλοκες τρισδιάστατες δομές στο τσιπ, δημιουργώντας μοντέλα κυτταροκαλλιέργειας προσαρμοσμένα για μελέτη αλληλεπιδράσεις.
- d) Ικανότητα μοντελοποίησης των αγγείων και των βιολογικών φραγμών.
Η αγγείωση είναι ένας από τους σημαντικότερους παράγοντες για τη διατήρηση της δραστηριότητας των ιστών. Η επιτυχής αγγείωση ήταν μια σημαντική πρόκληση για την παραγωγή λειτουργικών ιστών για μοντέλα in vitro[101]. Τα αγγεία είναι σημαντικοί βιολογικοί φραγμοί που χωρίζουν διαφορετικά διαμερίσματα ιστού. Με προηγμένες τεχνικές βιοεκτύπωσης και υποβοήθηση από την μικρορευστομηχανική, μπορούν να δημιουργηθούν δίκτυα ροής με βάση τις υδρογέλες πολλαπλής κλίμακας με μορφές και λειτουργίες. Τα αγγειακά δίκτυα βιοεκτύπωσης θα μπορούσαν να διευκολύνουν τη ροή του υγρού για τη μεταφορά των θρεπτικών συστατικών, την ανταλλαγή αερίων και την απομάκρυνση των αποβλήτων[102].
- e) Δυνατότητα αυτοματοποίησης και δημιουργίας αποστειρωμένου περιβάλλοντος.

Τα τελευταία χρόνια, έχουν σημειωθεί, αν και λίγες, κάποιες εφαρμογές της βίο-εκτύπωσης σε μικροροϊκές πλατφόρμες. Συγκεκριμένα, με τη χρήση τεχνικών βίο-εκτύπωσης, πραγματοποιήθηκε από τους Atala et. al [103] και τους Moretti et. al [104] μελέτη ασθενειών στα κόκαλα σε τσιπ, έπειτα από τους Colosi et. al [105] για μελέτη της καρδιάς σε τσιπ, από τους Pi et. al [106] για ουροθηλιακού σε τσιπ και συγκεκριμένα για την εκτύπωση σωληνοειδών ιστών κ.ο.κ. Στην παρούσα διπλωματική εργασία έγινε μελέτη για την εκτύπωση καρκινικών κυττάρων και οργανοειδών του πνεύμονα του πνεύμονα σε τσιπ. Μερικά παραδείγματα φαίνονται και στην παρακάτω **Εικόνα 24**.



Εικόνα 24: Παραδείγματα τρισδιάστατης βίο-εκτύπωσης σε ΟοC πλατφόρμες. α) Ήπαρ-σε-τσιπ, εκτυπώνοντας ηπατικά σφαιροειδή, β) ελεγχόμενη βίο-εκτύπωση πολλαπλών κυττάρων σε μικροροϊκό τσιπ για έλεγχο φαρμάκων και γ) σχηματική αναπαράσταση βίο-εκτύπωσης με στερεολιθογραφία προαγγειοποιημένων ιστών[102].

3.4 Δομές προς εναπόθεση σε ΟοC πλατφόρμες

Οι πλατφόρμες organ-on-a-chip όπως έχει ήδη αναφερθεί, μπορούν να χρησιμοποιηθούν για ποικίλες μελέτες και με πολλούς τρόπους. Έτσι οι δομές που τοποθετούνται στο εσωτερικό τους διαφέρουν και κάθε μία αποτελεί και μία μελέτη.

3.4.1 Κύτταρα σε ΟοC πλατφόρμες

Οι πιο συνηθισμένες δομές που μελετώνται σε συστήματα ΟοC είναι τα κύτταρα. Συνήθως χρησιμοποιούνται κυτταρικές σειρές (cell lines), οι οποίες διατηρούνται «αθάνατες» (immortalized) σε συγκεκριμένες συνθήκες ψύξης (υγρό άζωτο) και με συγκεκριμένες ουσίες και παράγοντες (DMSO+FBFS) ώστε να διατηρείται οι λειτουργίες τους. Οι κυτταρικές σειρές είναι ουσιαστικά μία συλλογή κυττάρων που έχει προέλθει από ένα και μοναδικό κύτταρο και μέσα από συνεχείς διαιρέσεις πολλαπλασιάζονται και διατηρούνται σε πιάτα καλλιέργειας αιώνια. Οι κυτταρικές καλλιέργειες μπορεί να δημιουργηθούν με δύο τρόπους:

- 1) Μπορούν να αναπτυχθούν απευθείας από έναν ζωντανό οργανισμό (π.χ. έναν ασθενή ή ένα ζώο). Σε αυτή την περίπτωση, ένα μόνο κύτταρο μπορεί να διεγερθεί για να του επιτραπεί να επεκταθεί σε πολλαπλά κύτταρα. Αυτό μερικές φορές ονομάζεται "κλωνική επέκταση"(clonal expansion), αν και δεν χρησιμοποιείται κλωνοποίηση. Εδώ, το "κλωνικό" αναφέρεται στο γεγονός ότι τα κύτταρα είναι όλα κλώνοι το ένα του άλλου (δηλαδή, πανομοιότυπα).
- 2) Μπορούν να προέρχονται από ζωντανό οργανισμό, αλλά να διατηρούνται για πολλά χρόνια (π.χ.

μια κυτταρική σειρά που λαμβάνεται στο εμπόριο). Αυτά τα κύτταρα περνούν από περισσότερους γύρους κυτταρικής διαίρεσης για να δημιουργήσουν ένα σταθερό προφίλ για κάθε κυτταρική σειρά.

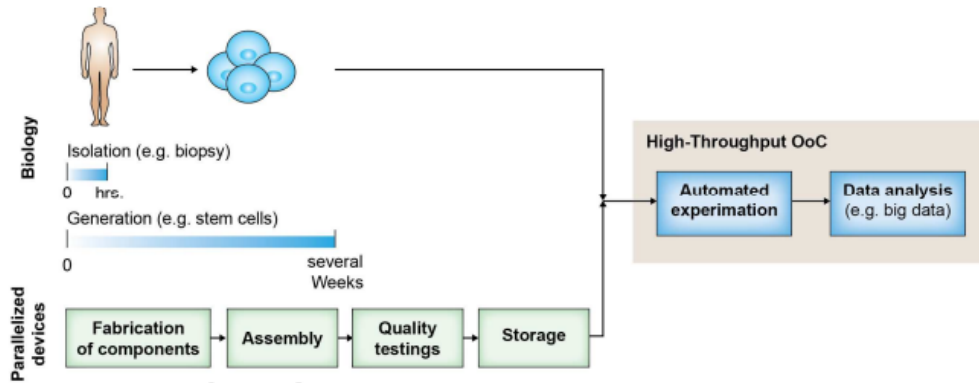
Με τη χρήση κυτταρικών σειρών υπάρχουν αρκετά πλεονεκτήματα:

- Κάθε κύτταρο έχει την ίδια απόκριση επειδή η γενετική διαφοροποίηση είναι ελάχιστη, με αποτέλεσμα οι διαφορές μεταξύ των ομάδων δοκιμής να είναι αρκετά ξεκάθαρες.
- Επειδή οι κυτταρικές σειρές είναι γενετικά ίδιες, είναι ευκολότερο να αναπαραχθούν πειράματα σε ερευνητικές ομάδες και σε πολλαπλά πειράματα σε ένα εργαστήριο, επιτρέποντας στους ερευνητές να επικυρώσουν καλύτερα τα αποτελέσματά τους.
- Οι κυτταρικές σειρές είναι συνήθως πιο εύκολο να αναπτυχθούν στο εργαστήριο σε σχέση με τα πρωτογενή κύτταρα και είναι ευκολότερο να ληφθεί ένας μεγάλος αριθμός κυττάρων από μια κυτταρική σειρά. Απαιτούνται μεγάλοι αριθμοί κυττάρων για πολλούς τύπους λειτουργικών και γενετικών πειραμάτων και χωρίς κυτταρικές σειρές, πολλά από αυτά τα πειράματα θα ήταν σχεδόν αδύνατα [107].
- Δίνουν τη δυνατότητα για προ κλινικές μελέτες, ώστε να πραγματοποιηθεί με ασφάλεια πρωταρχική έρευνα και στη συνέχεια να προχωρήσει σε πρωταρχικά κύτταρα του ίδιου του ασθενούς. Η μεγάλη διάρκεια ζωής των κυτταρικών σειρών δίνει ουσιαστικά την δυνατότητα απεριόριστου χρόνου για μελέτες και δοκιμές *in vitro* και στη συγκεκριμένη περίπτωση σε συστήματα ΟοC.

Φυσικά, ακριβώς επειδή οι κυτταρικές σειρές διατηρούνται αιώνια, επιφυλάσσονται αρκετοί κίνδυνοι για μολύνσεις από βακτήρια ή μικρο οργανισμούς, όπως το μυκόπλασμα, γεγονός που θέλει αρκετή προσοχή.

Άλλου είδους κύτταρα που χρησιμοποιούνται σε πλατφόρμες ΟοC είναι τα πρωταρχικά κύτταρα (primary cells). Τα πρωτογενή κύτταρα είναι κύτταρα που απομονώνονται απευθείας από τους ιστούς ζωντανών οργανισμών, συμπεριλαμβανομένου του αίματος και του μυελού των οστών. Έχουν καθιερωθεί ως σημαντικό εργαλείο για *in vitro* κυτταρικές δοκιμασίες ή για τη δημιουργία *in vivo* μοντέλων [108].

Οι επιστήμονες αναγνωρίζουν ότι οι βιολογικές αλλαγές που προκύπτουν από τη συνεχή διέλευση των κυτταρικών σειρών μπορεί να θέσουν σε κίνδυνο τη φυσιολογική τους σημασία στις μελέτες. Έτσι, η χρήση πρωτογενών κυττάρων αυξάνει τη φυσιολογική συνάφεια των δεδομένων που λαμβάνονται από συστήματα κυτταροκαλλιέργειας και αναγνωρίζονται όλο και περισσότερο για τη σημασία τους στη μελέτη βιολογικών διεργασιών, εξέλιξης της νόσου και ανάπτυξης φαρμάκων. Ειδικά στις ΟοC πλατφόρμες οι χρήσεις πρωταρχικών κυττάρων είναι πολύ σημαντική καθώς οι πλατφόρμες αυτές βρίσκουν εφαρμογή στην προσωποποιημένη ιατρική και θεραπεία, γεγονός που δεν θα μπορούσε να ερευνηθεί μόνο με κύτταρα του εμπορίου καθώς θα ήταν άστοχες οι μελέτες. Τα κύτταρα αυτά μπορούν να εξαχθούν από ζώα για πρωταρχικές βασικές μελέτες αλληλεπίδρασης με άλλα κύτταρα ή πιθανές ανακαλύψεις φαρμάκων και δίνεται η δυνατότητα αλλαγής γονιδίων για περαιτέρω παρατήρηση. Σε τελικό στάδιο πρωταρχικά κύτταρα μπορούν να ληφθούν με βιοψία από τους ίδιους τους ασθενείς (π.χ πρωταρχικά καρκινικά κύτταρα) και με τη τοποθέτησή τους σε ΟοC πλατφόρμες να γίνουν εξατομικευμένες μελέτες για την εύρεση της ιδανικής θεραπείας.

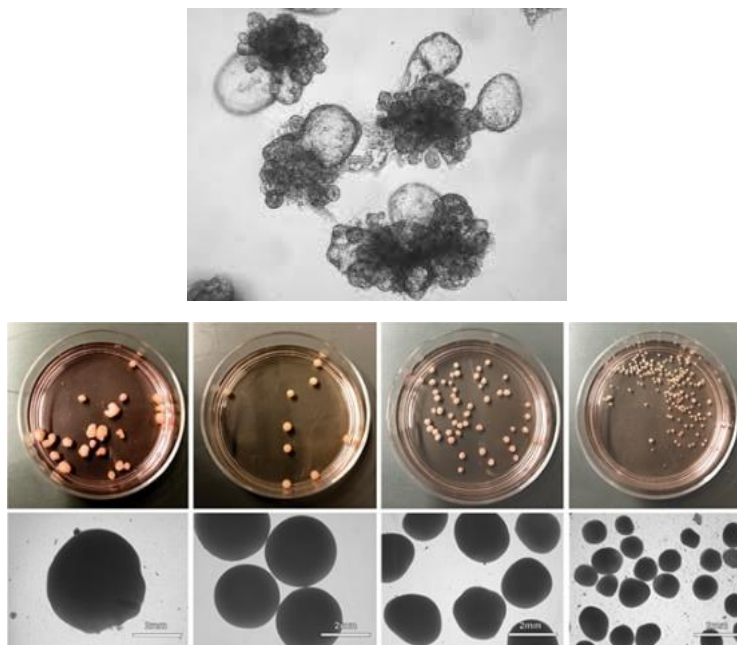


Εικόνα 25: Υψηλής απόδοσης OoC με τη χρήση κυττάρων που έχουν εξαχθεί από βιοψία.

3.4.2 Οργανοειδή σε OoC πλατφόρμες

Τα όργανα σε ένα τσιπ και τα οργανοειδή αντιπροσωπεύουν δύο θεμελιωδώς διαφορετικές αλλά συμπληρωματικές προσεγγίσεις προς τον ίδιο στόχο της πολυπλοκότητας των ανθρώπινων οργάνων in vitro. Η τεχνολογία OoC βασίζεται στις γνώσεις για τα ανθρώπινα όργανα για τη μηχανική κατασκευή ανθρωπογενών κατασκευών στις οποίες τα κύτταρα και το μικροπεριβάλλον τους ελέγχονται με ακρίβεια. Αντίθετα, τα οργανοειδή έχουν εγγενής αναπτυξιακές λειτουργίες και αυτοοργανώνονται για να αναπαράγουν τις βασικές δομικές και λειτουργικές ιδιότητες των in vivo ομολόγων οργάνων[109]. Έτσι, ο συνδυασμός των οργανοειδών σε μικροροϊκές πλατφόρμες είναι πάρα πολύ χρήσιμος, καθώς η μελέτη περνά σε μεγαλύτερης κλίμακας από αυτή των κυττάρων, με αποτέλεσμα να διευρύνεται το πεδίο μελέτης.

Το οργανοειδή είναι μια in vitro τρισδιάστατη (3D) τεχνολογία κυτταροκαλλιέργειας που συλλαμβάνει και μεταδίδει σταθερά τα γονιδιωματικά και φαινοτυπικά προφίλ των ανθρώπινων υγιών οργάνων και όγκων, έχουν τη δυνατότητα αυτοοργάνωσης και αναπτύσσονται από μεμονωμένα ή πολλαπλά κύτταρα ενσωματωμένα σε μια κατάλληλη 3D μήτρα ECM, όπως το Matrigel[110][111]. Τα οργανοειδή μπορούν να δημιουργηθούν για μια μεγάλη ποικιλία οργάνων, συμπεριλαμβανομένων, ενδεικτικά, του εντέρου, του στομάχου, των νεφρών, του ήπατος, του παγκρέατος, των μαστικών αδένων, του προστάτη, του θυρεοειδούς, του αμφιβληστροειδούς και του εγκεφάλου[112]. Έχουν τεράστιο εύρος διαστάσεων ξεκινώντας από κάποια δεκάδες μικρόμετρα σε διάμετρο, έως και κάποια χιλιοστά (Εικόνα 26).



Εικόνα 26: Διαφόρων μεγέθη οργανοειδή[113][114]

Τα πλεονεκτήματα που προσφέρουν τα οργανοειδή είναι αρκετά, όπως:

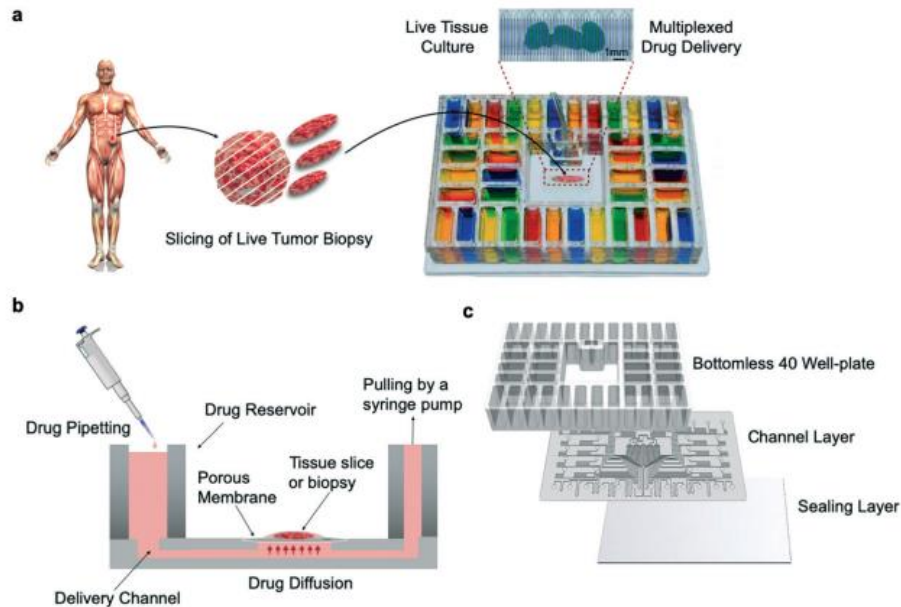
- Οι δομές των οργανοειδών είναι πιο κοντά στην πραγματική λειτουργία των οργάνων από ότι οι δισδιάστατες καλλιέργειες κυττάρων. Με τη χρήση οργανοειδών η μελέτη in vivo είναι πιο ρεαλιστική.
- Με τη χρήση οργανοειδών αποφεύγονται τα πειράματα σε ζώα. Τα ίδια τα οργανοειδή προσομοιώνουν τη λειτουργία του εκάστοτε οργάνου, οπότε για αρχικές μελέτες είναι αρκετά βοηθητικά και αντιπροσωπευτικά του οργάνου.
- Προσομοιώνουν την λειτουργία του οργάνου. Για παράδειγμα ένα οργανοειδές εγκεφάλου, θα φέρει τις νευρικές απολήξεις και τα αγγεία που θα υπήρχαν στον πραγματικό in vivo εγκέφαλο.
- Τα οργανοειδή αποτελούν τεράστια ευκαιρία μελέτης για δοκιμές φαρμάκων.

3.4.3 Ιστοί σε ΟοC πλατφόρμες

Μία επιπλέον εφαρμογή που έχουν τα ΟοC είναι η δυνατότητα τοποθέτησης κομματιού από ανθρώπινο ιστό στους θαλάμους του. Ένας από τους κύριους λόγους για τους οποίους το κόστος για την παραγωγή φαρμάκου για τον καρκίνο είναι το υψηλό, είναι οι προκλινικές μελέτες κυρίως σε ζώα, οι οποίες δεν προβλέπουν με ακρίβεια τις τοξικές δόσεις και τον μεταβολισμό φαρμάκων που παρατηρείται στους ανθρώπους[115]. Μια πρόσφατη μελέτη των ποσοστών επιτυχίας κλινικής ανάπτυξης φαρμάκων έδειξε ότι η ογκολογία είχε τη χαμηλότερη πιθανότητα έγκρισης από τη φάση 1[116]. Έτσι υπάρχει επείγουσα ανάγκη για καλύτερα και πιο λειτουργικά φάρμακα. Σε αυτό το τομέα η συνεισφορά των μικροροϊκών πλατφόρμων είναι πολύ μεγάλη, ειδικά σε συνδιασμό με την εναπόθεση κομματιών από ιστό που έχει μολυνθεί με καρκίνο του εκάστοτε ασθενή.

Κατά την εξαγωγή του όγκου από τον ασθενή με βιοψία, μπορεί να χρησιμοποιηθεί για μελέτες ώστε να βρεθεί κάποια προσωποποιημένη θεραπεία για το συγκεκριμένο τύπου καρκίνου. Έτσι ο όγκος τεμαχίζεται

σε φέτες και καλλιεργείται, όπως και οι κυτταρικές καλλιέργειες, με τα σωστά θρεπτικά συστατικά για να μιμείται το φυσικό περιβάλλον στο οποίο υπήρχε. Αυτό μετέπειτα τοποθετείται σε ΟοC πλατφόρμες και πραγματοποιούνται έρευνες για πιθανές θεραπείες.



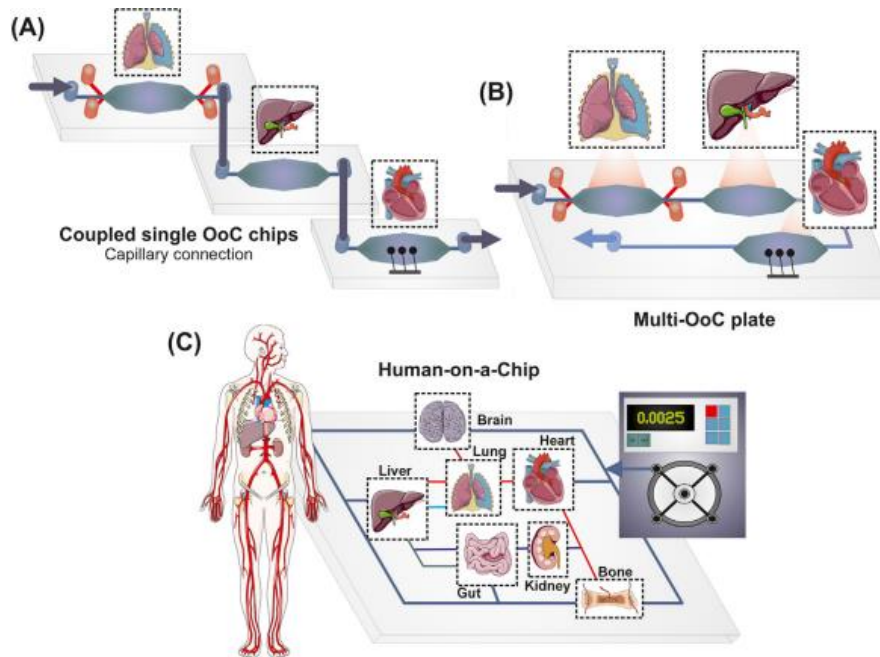
Εικόνα 27: Σχηματική απεικόνιση διαδικασίας τοποθέτησης ιστού από καρκίνο στο ήπαρ στο εσωτερικό πλατφόρμας ΟοC[117].

Στην **Εικόνα 27** φαίνεται σχηματικά η διαδικασία τοποθέτησης ενός ιστού σε μικροροϊκές πλατφόρμες[117].

3.4.4 Όργανα σε ΟοC πλατφόρμες

Τελικό στάδιο στις πλατφόρμες Organ-on-chip είναι η δημιουργία μιας πλατφόρμας που να προσομοιώνει την λειτουργία ολόκληρου του οργάνου, συνδυασμού οργάνων ή ακόμα και του ανθρώπινου σώματος (body-on-a-chip). Αυτό απαιτεί την κατασκευή μιας πολύπλοκης μικροροϊκής πλατφόρμας όπου θα αποτελείται από πολλούς θαλάμους ώστε να τοποθετείται στο καθένα από αυτό ένα διαφορετικό «όργανο» με την μορφή κυττάρων, οργανοειδών και ιστών, που αναφέρθηκαν παραπάνω και μέσω καναλιών να προσομοιωθούν οι αντίστοιχες αγγειώσεις.

Αν και τα όργανα διαχωρίζονται φυσικά in vivo, η επικοινωνία τους γίνεται μέσω της κυκλοφορίας του αίματος και της λέμφου (Lymph Node) από διάφορα σήματα (διαλυτοί παράγοντες, εξωσώματα, κύτταρα κ.λπ.) για τη διατήρηση της συνολικής βιωσιμότητας και ομοιόστασης. Για παράδειγμα, το ταξίδι των ουσιών που λαμβάνονται από το στόμα (θρεπτικά συστατικά, χημικές ουσίες, φάρμακα κ.λπ.) είναι καλά ενορχηστρωμένο και περιλαμβάνει διαφορετικά όργανα μέσω μιας συγκεκριμένης ακολουθίας στην οποία κάθε όργανο έχει μια συγκεκριμένη λειτουργία: το λεπτό έντερο απορροφά τις (χωνεμένες) ουσίες, το συκώτι τα μεταβολίζει, στη συνέχεια μεταφέρονται στα όργανα-στόχους μέσω της κυκλοφορίας του αίματος και τα νεφρά αποβάλλουν τα αντίστοιχα απόβλητα. Αυτή η πολύπλοκη διαδικασία απορρόφησης/κατανομής/μεταβολισμού/απέκκρισης/τοξικότητας επηρεάζει την κατανομή, την αποτελεσματικότητα και την πιθανή τοξικότητα εξωγενών ουσιών (π.χ. τρόφιμα, φάρμακα, πρόσθετα, περιβαλλοντικούς ρύπους)[118] μέσω ανεπιθύμητων παρενεργειών σε δευτερογενείς ιστούς[119].



Εικόνα 28: Σχηματική απεικόνιση πλατφόρμων πολλών οργάνων σε μικροροϊκές πλατφόρμες[119].

Κρίνεται λοιπόν απαραίτητο να συμπεριληφθεί η επικοινωνία μεταξύ των οργάνων και μια συστημική διάσταση, η οποία μέχρι τώρα έχει επιτευχθεί κυρίως με τη χρήση ζωικών μοντέλων. Ωστόσο, όπως έχει ήδη αναφερθεί στην εργασία αυτή, τα μοντέλα *in vivo* υποφέρουν από πολλούς περιορισμούς: υψηλό πειραματικό κόστος, περιορισμένη απόδοση, ηθικές ανησυχίες και διαφορές στο γενετικό υπόβαθρο. Επομένως, προηγμένες *in vitro* προσεγγίσεις που ενσωματώνουν πολλαπλά όργανα (βλ. **Εικόνα 28**) πρέπει να αναπτυχθούν για να μμηθούν πιστά την ανθρώπινη υγεία και παθοφυσιολογία[119].

Κεφάλαιο 4. Πειραματικές διατάξεις & Πρωτόκολλα

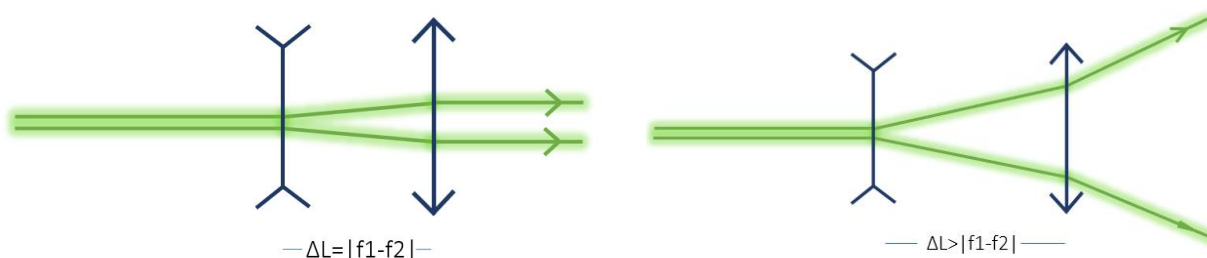
4.1 Οπτικές διατάξεις

4.1.1 Τυπική διάταξη βίο-εκτυπωτή LIFT

Η βασική διάταξη της εναπόθεσης βίο-υλικών με laser, που βασίζεται στην τεχνική LIFT, αποτελείται συνήθως από τρία βασικά υποσυστήματα:

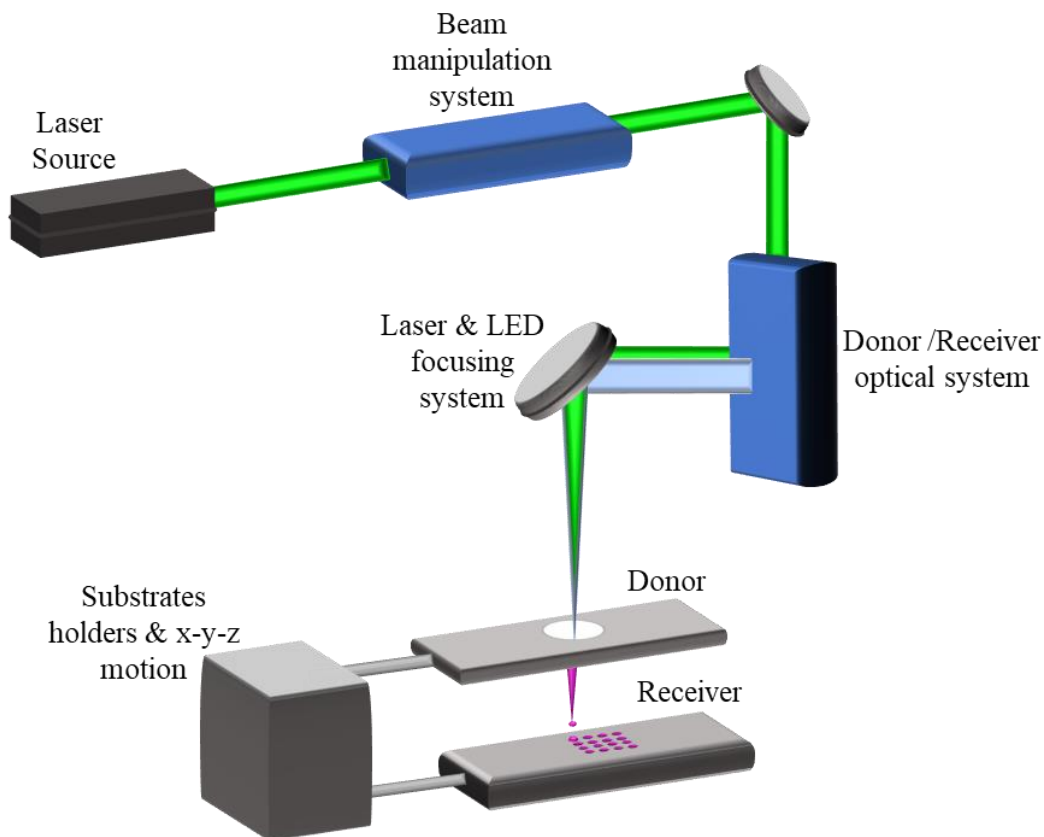
- 1) Το οπτικό σύστημα κατεύθυνσης και μορφοποίησης της δέσμης του λέιζερ,
- 2) Το σύστημα φωτισμού και απεικόνισης του φαινομένου εκτύπωσης και
- 3) Το σύστημα δειγματοφορέων για την κίνηση των δειγμάτων.

Συγκεκριμένα, στην παρούσα οπτική διάταξη χρησιμοποιείται ένα diode pumped Nd:YAG sub-nanosecond laser στερεάς κατάστασης από την Standa (STA-01SH-5), με μήκος κύματος στα 532 nm, μέγιστη ισχύ εξόδου 100 mW, ενέργεια ανά παλμό 100 μJ, συχνότητα λειτουργίας, από λειτουργία ενός παλμού έως 1 kHz, διάρκεια παλμού στα 500 ps και γκαουσιανό προφίλ δέσμης ($M^2 < 1.2$, TEM₀₀). Κατά την έξοδο του παλμού από το laser δύο καθρέφτες ορίζουν την κατεύθυνσή του και οδηγούν την δέσμη σε ένα πλακίδιο εξασθεניתή το οποίο είναι τοποθετημένο σε γωνιομετρική μηχανοκίνητη και χειροκίνητη βάση. Ένα ποσοστό της ακτινοβολίας ανακλάται από τον εξασθεניתή, ανάλογα με την γωνία του σε σχέση με την προσπίπτουσα δέσμη, δίνοντας την δυνατότητα ελέγχου της ενέργειας του παλμού που θα χρησιμοποιηθεί για την ακτινοβολήση του υποστρώματος δότη. Έπειτα, η ακτινοβολία που διέρχεται από τον εξασθεניתή, οδηγείται σε ένα σύστημα διαστολέα της δέσμης. Το σύστημα αυτό αποτελείται από έναν αποκλίνων ($f=-50$ mm) και ένα συγκλίνων ($f=100$ mm) φακό. Ο αποκλίνων φακός τοποθετείται κοντά στην πηγή του laser (περίπου 100-200 mm) και παραμένει σταθερός. Έπειτα, ο συγκλίνων φακός τοποθετείται στην αριθμητική διαφορά των εστιακών τους αποστάσεων, δηλαδή περίπου σε απόσταση 50 mm από τον αποκλίνων. Με την τοποθέτηση των δύο φακών στην διαφορά των εστιακών τους αποστάσεων επιτυγχάνεται μεγέθυνση της δέσμης κατά ένα παράγοντα 2 και παραλληλοποίηση. Όμως στη συγκεκριμένη διάταξη, χρειάζεται η ελευθερία στην αυξομείωση του spot του laser, οπότε για να συμβεί αυτό ο συγκλίνων φακός απομακρύνεται από τον αποκλίνων με αποτέλεσμα η εξερχόμενη δέσμη να μην είναι παραλληλοποιημένη. Με αυτόν τον τρόπο δίνεται η δυνατότητα ενός μεγάλου εύρους τιμών στο μέγεθος της δέσμης του laser, από 20μm έως 200μm. Στην παρακάτω **Εικόνα 29** φαίνεται η σχηματική απεικόνιση της διάταξης για την διαστολή της δέσμης.



Εικόνα 29: Σχηματική απεικόνιση των ακτινών για την διαμόρφωση της δέσμης του laser. Αριστερά φαίνεται η δέσμη να εξέρχεται παραλληλοποιημένη όταν οι δύο φακοί τοποθετούνται στην διαφορά των εστιακών τους αποστάσεων και αριστερά φαίνεται η δέσμη να διαστέλλεται όσο ο συγκλίνων απομακρύνεται από τον αποκλίνων φακό.

Εν συνεχεία, η δέσμη κατευθύνεται μέσω δύο κατόπτρων στο εσωτερικό ενός πύργου που συγκρατεί το σύστημα καταγραφής και φωτισμού. Αυτό χωρίζεται σε 3 επίπεδα. Στο 1^ο επίπεδο, το επίπεδο που κατευθύνεται η δέσμη του laser υπάρχει ένα διχροϊκό κάτοπτρο που επιτρέπει το μήκος κύματος του laser (532 nm) να διαπεράσει, ενώ όλα τα υπόλοιπα ανακλώνται. Στο 2^ο επίπεδο βρίσκεται το σύστημα φωτισμού, όπου το φως που εκπέμπεται από την πηγή LED συγκεντρώνεται με έναν συγκεντρωτικό φακό στην επιφάνεια του υποστρώματος του δότη, ώστε η εικόνα από τον σένσορα της κάμερας να είναι καθαρή. Το φως αυτό κατευθύνεται με ένα κάτοπτρο τοποθετημένο σε 45°. Στο 3^ο επίπεδο, βρίσκεται το σύστημα καταγραφής με μία κάμερα CMOS από την Basler (acA1920-40uc με IMX249 αισθητήρα, Res 1920 x 1200, 40 fps, color, USB 3.0), η οποία έχει αρχικώς ευθυγραμμιστεί με έναν προσοφθάλμιο φακό (f=150 mm) να εστιάζει στο άπειρο. Έπειτα από σύστημα αυτό, βρίσκεται ο αντικειμενικός φακός (f= 150 mm) για την εστίαση της δέσμης του laser στην επιφάνεια του δότη, στο στρώμα απορρόφησης (επικάλυψη από χρυσό, Au), το οποίο στηρίζεται σε μία μεταλλική βάση.



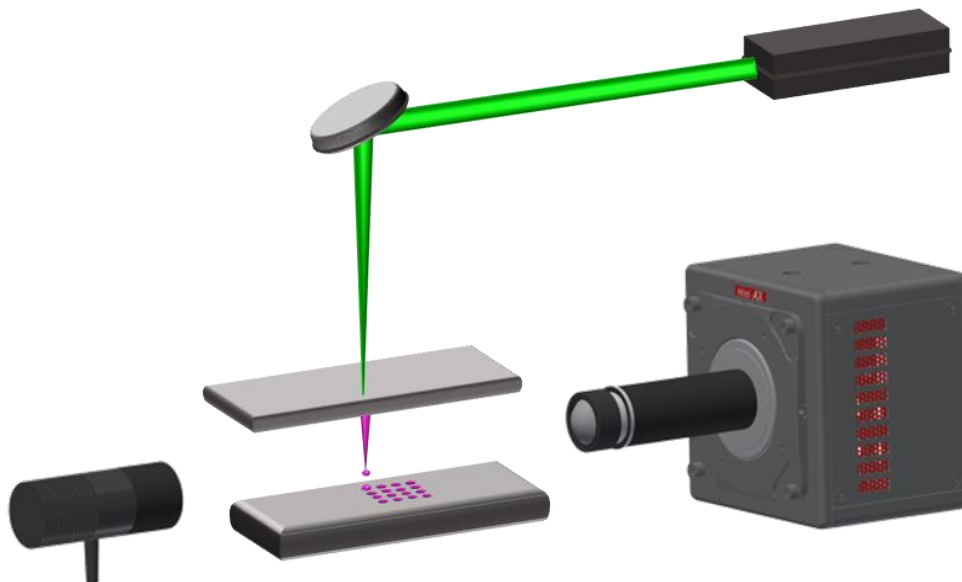
Εικόνα 30: Σχηματική απεικόνιση της διάταξης εκτύπωσης με τη χρήση της τεχνικής LIFT

Στη συνέχεια ο ίδιος αντικειμενικός φακός μαζεύει μέρος του σκεδαζόμενου από το δότη/αποδέκτη φωτός και το οδηγεί μέσα από τον ίδιο διαχωριστή δέσμης και μέσω του προσοφθάλμιου φακού στον αισθητήρα της κάμερας. Ο συνδυασμός f=150 mm αντικειμενικού με f=150 mm προσοφθάλμιου καταλήγει σε μία μεγέθυνση 1x στην κάμερα, με αποτέλεσμα να βλέπουμε στο πραγματικό τους μέγεθος τις περιοχές που απορροφά το laser στην επιφάνεια του χρυσού. Κάτω από το υπόστρωμα του δότη, βρίσκεται άλλο ένα υπόστρωμα, του αποδέκτη το οποίο επίσης στηρίζεται σε μία μεταλλική βάση. Τα υποστρώματα αυτά στηρίζονται πάνω σε πάνω σε συστήματα μικρομηχανικής κίνησης, αποτελούμενα από τρεις γραμμικές μικρομηχανικές πλατφόρμες κίνησης από την Standa (για τους x, y άξονες 8MT175-50 και για τον z άξονα

8MT173-30). Σε αυτό το σύστημα η δέσμη είναι σταθερή και η σάρωση του δότη ή του δείγματος επιτυγχάνεται με την κίνηση αυτών των μικρομηχανικών πλατφορμών. Με αυτόν τον τρόπο, δίνεται η δυνατότητα ανεξάρτητης κίνησης του δότη από τον αποδέκτη και στις τρεις διαστάσεις. Έτσι μπορούν να εκτυπωθούν και τρισδιάστατες δομές, η μία πάνω στην άλλη κρατώντας ακίνητο το υπόστρωμα του δότη και μετακινώντας μόνο τον αποδέκτη. Ο συγχρονισμός και ο έλεγχος τόσο της κίνησης των πλατφορμών όσο και της λειτουργίας του laser γίνεται με την βοήθεια κατάλληλων controllers αλλά και με τη χρήση συσκευής DAQ (data acquisition device), τα οποία συνδέονται σε ηλεκτρονικό υπολογιστή και ελέγχονται από ένα πρόγραμμα που αναπτύχθηκε στο εργαστήριο σε περιβάλλον LabVIEW. Όλα αυτά φαίνονται στην σχηματική απεικόνιση της **Εικόνα 30**.

4.1.2 Οπτικό σύστημα καταγραφής με κάμερα υψηλής ταχύτητας

Σε αυτό το κεφάλαιο γίνεται η περιγραφή του συστήματος καταγραφής της εξέλιξης του πίδακα από τη δημιουργία του στο υπόστρωμα δότη, μέχρι την κατάληξή του σε εκτυπωμένη σταγόνα πάνω στο υπόστρωμα του αποδέκτη, αλλά και μετέπειτα στο εσωτερικό ενός ρευστού βίο-υλικού μέσα στο οποίο και ακινητοποιείται. Η συνηθέστερη απόσταση μεταξύ των υποστρωμάτων δότη/αποδέκτη είναι 1mm, όπου το φαινόμενο είναι αρκετά ευκρινές και μπορεί εύκολα να γίνει η λήψη αρκετών δεδομένων. Όμως για την ακόμα καλύτερη μελέτη του φαινομένου αλλά και διαπίστωσης των συμπεριφορών της εξέλιξης του πίδακα σε άλλες συνθήκες, επιλέχθηκαν και μεγαλύτερες αποστάσεις (2, 3, 4 mm) μεταξύ δότη και αποδέκτη. Στην **Εικόνα 31**, Error! Reference source not found. απεικονίζεται η διάταξη, η θέση και η κατεύθυνση με την οποία τοποθετείται το σύστημα καταγραφής της εκτύπωσης.



Εικόνα 31: Σχηματική απεικόνιση της διάταξης εκτύπωσης και του συστήματος απεικόνισης της διαδικασίας εκτύπωσης με την κάμερα υψηλής ταχύτητας

Το οπτικό σύστημα που είναι απαραίτητο για την απεικόνιση της εξέλιξης ενός τόσο σύντομου φαινομένου, απαιτεί ένα σύστημα φακών με κατάλληλη μεγέθυνση ώστε κάθε φορά να μπορεί να είναι ευδιάκριτο το φαινόμενο, αλλά και να μην αλλοιώνεται η ανάλυση της εικόνας, αφού όσο η μεγέθυνση αυξάνεται, τόσο χάνεται μέρος της πληροφορίας λόγω χαμηλής ποιότητας. Η διάταξη περιλαμβάνει τη χρήση μιας κάμερας υψηλής καταγραφής, Photron FASTCAM (SA5, model: 775K-M1) με δυνατότητα

καταγραφής από 1000 έως 775000 εικόνες/sec (fps), και ανάλυση από 1024x1024 έως 128x24 pixel. Το συγκεκριμένο μοντέλο παρείχε την δυνατότητα λειτουργίας σε ταχύτητες καταγραφής έως και 540 kfps, με αναλύσεις οι οποίες θα επέτρεπαν την καταγραφή της διαδικασίας της εκτύπωσης. Ταυτόχρονα η κάμερα παρείχε την δυνατότητα χρήσης υπερταχέος κλείστρου, όπου για λειτουργία έως και 300 kfps μπορούσε να μείνει ανοιχτό μόνο για 1 μ s, κάτι που έδινε αρκετά ευδιάκριτα στιγμιότυπα.

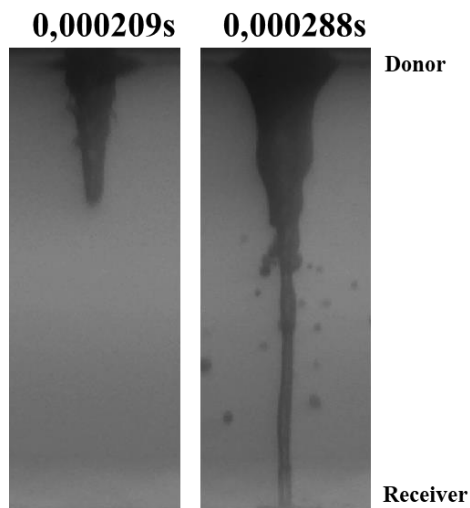
Το σύστημα φακών που χρησιμοποιήθηκε για την μεγέθυνση και την απεικόνιση του ειδώλου, αποτελείται από δύο συγκλίνοντες φακούς, ο πρώτος με εστιακή απόσταση $f=50$ mm και ο προσοφθάλμιος φακός με εστιακή απόσταση 150 mm. Έτσι δημιουργείται ένα είδωλο μεγενθυμένο κατά ένα παράγοντα 3. Συγκεκριμένα, στην παρούσα εργασία, χρησιμοποιήθηκε αντικειμενικός φακός εστιακής αποστάσεως 50 mm από την Edmund (#59-879, 50X EO M Plan Apo Long Working Distance Infinity Corrected) με μεγάλη απόσταση εργασίας στα 13 mm. Επιπρόσθετα, για να γίνει εφικτή η καταγραφή του φαινομένου ανάμεσα στο κενό μεταξύ των δύο υποστρωμάτων, οδηγήσαμε το φως ενός LED υψηλής ισχύος (840 mW) να περάσει μέσα από το κενό δότη/αποδέκτη, εστιάζοντας την δέσμη με ένα σύστημα φακών με μεγάλη εστιακή απόσταση, προσέχοντας το φαινόμενο να λαμβάνει χώρα μετά την εστία του συστήματος ώστε να φωτίζονται επαρκώς τα υποστρώματα του δότη και αποδέκτη.

Καθώς η ταχύτητα διάδοσης του υγρού πίδακα αυξάνεται, η παρατήρηση δυσκολεύει καθώς η διακριτική ικανότητα σε κάθε στιγμιότυπο χαλάει και έτσι δεν μπορεί να πραγματοποιηθεί ο ακριβής προσδιορισμός της ακριβούς θέσης του πίδακα. Για να παρατηρήσουμε το φαινόμενο σε μεγαλύτερες αποστάσεις μεταξύ δότη και αποδέκτη χρειάζεται να μειώσουμε την ταχύτητα του κλείστρου της κάμερας, με αποτέλεσμα η χρονική διαφορά μεταξύ δύο στιγμιότυπων να μεγαλώνει. Στον παρακάτω **Πίνακας 1** παρουσιάζονται οι ακριβείς συνθήκες που χρησιμοποιήθηκαν για την κάμερα ώστε να υπάρχει το επιθυμητό αποτέλεσμα καταγραφής.

Camera Speed (fps)	Time per Frame (μ s)
76500	13
61200	16
54000	18
45000	22

Πίνακας 1: Παραδείγματα χαρακτηριστικών μεγεθών ταχύτητας κλείστρου της κάμερας και χρονικής διαφοράς μεταξύ στιγμιότυπων που χρησιμοποιήθηκαν για την καταγραφή των φαινομένων.

Ένα κρίσιμο σημείο της διάταξης του οπτικού συστήματος καταγραφής είναι ο φωτισμός του φαινομένου σε συνδυασμό με την ευαισθησία του αισθητήρα. Χρησιμοποιώντας την μέγιστη ταχύτητα κλείστρου, με την οποία μένει ανοιχτό για 1 μ s, ένας μικρός αριθμός φωτονίων καταφέρνει να περάσει στον αισθητήρα της κάμερας, με αποτέλεσμα να μην είναι εφικτή η καταγραφή του φαινομένου. Επιπλέον, η διαδικασία αυτή γίνεται ακόμα πιο δύσκολη, λόγω της συνήθως μικρής απόστασης μεταξύ δότη και αποδέκτη, δηλαδή του σημείου καταγραφής και επειδή το φως που χρησιμοποιείται είναι ισχυρό με δέσμες μεγάλων διαμέτρων πολλών εκατοστών, το μεγαλύτερο ποσοστό αυτών δεν φωτίζει στην επιθυμητή περιοχή. Σε αυτό το πρόβλημα δίνει λύση, κατ' αρχήν, η καλή ευαισθησία του αισθητήρα της κάμερας (ISO 40000), καθώς χρειάζονται πολύ λιγότερα ηλεκτρόνια να διεγερθούν ανά pixel για να ανταποκριθεί ο αισθητήρας.



Εικόνα 32: Παράδειγμα καταγραφής του φαινομένου εκτύπωσης (76.500 fps)

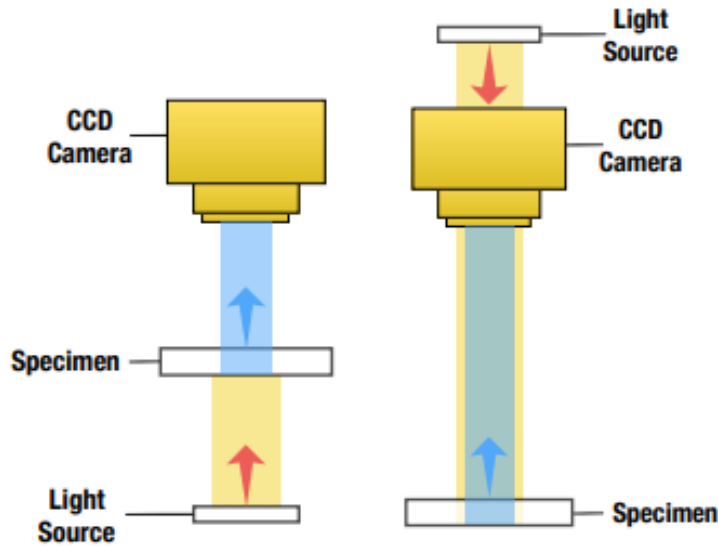
Με αυτό το τρόπο, καταφέρνουμε να εκμεταλλευτούμε μεγαλύτερο ποσοστό της δέσμης και να μπορεί να πραγματοποιηθεί η καταγραφή του φαινομένου. Στην **Εικόνα 32** φαίνεται ένα παράδειγμα εκτύπωσης κυττάρων με τη χρήση της τεχνικής LIFT, όπως αυτό καταγράφεται με τη διάταξη της κάμερας υψηλής ταχύτητας.

4.1.3 Διάταξη εκτύπωσης οργανοειδών

Μέχρι τώρα τα αντικείμενα που έχουν εκτυπωθεί επιτυχώς με τη μέθοδο της τεχνικής LIFT έχουν συνήθως μέγεθος κάποια δεκάδες μικρόμετρα, δηλαδή μέγεθος συγκρίσιμο με την διάμετρο της δέσμης του laser. Στην παρούσα εργασία έγινε προσπάθεια εκτύπωσης και μεγαλύτερων δομών. Συγκεκριμένα εκτυπώθηκαν οργανοειδή μεγέθους 50-150 μm . Για να πραγματοποιηθεί αυτή η διαδικασία χρειάστηκε μια διαφορετική προσέγγιση της τεχνικής εκτύπωσης.

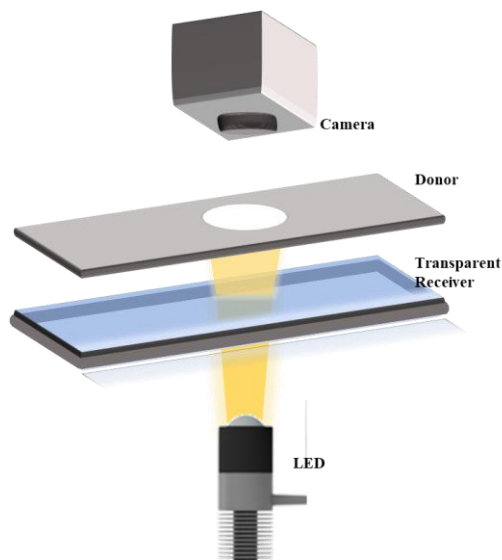
Όπως αναφέρθηκε παραπάνω η δέσμη του laser για την εκτύπωση καρκινικών κυττάρων, έχει συνήθως μέγεθος 50-65 μm . Για την εκτύπωση όμως αντικειμένων περίπου 10 φορές μεγαλύτερων σε διάμετρο από τα κύτταρα η δέσμη του laser χρειάζεται να μεγαλώσει αρκετά. Έτσι, η δέσμη του laser διαστέλλεται έως περίπου τα 200 μm , μεγαλώνοντας την απόσταση μεταξύ των δύο φακών στο σύστημα διαστολή της δέσμης, που αναφέρθηκε παραπάνω. Έπειτα, σε αντίθεση με την εκτύπωση των κυττάρων που μπορούν να τοποθετηθούν στο υπόστρωμα του δότη σε ποικίλες συγκεντρώσεις, με τα οργανοειδή δεν δίνεται η δυνατότητα μέτρησής τους ώστε να είναι γνωστή η συγκέντρωση με την οποία θα τοποθετηθούν στην επιφάνεια του δότη και συνήθως τοποθετούνται πολύ αραιά. Αυτό έχει ως αποτέλεσμα, η διαδικασία της εκτύπωσης να είναι τυχαία, καθώς η δέσμη του laser, είναι πιθανό να προσπίψει σε σημείο του δότη που να μην υπάρχει κανένα οργανοειδές. Η λύση σε αυτό το πρόβλημα δόθηκε με τη διαφοροποίηση της διάταξης του φωτισμού.

Η κλασική διάταξη φωτισμού (Epi-illumination system), δηλαδή αυτή όπου το φως και η κάμερα βρίσκονται από την ίδια πλευρά σε σχέση με το δείγμα, οι ανακλώμενες ακτίνες επιστρέφουν στον σένσορα της κάμερας με αποτέλεσμα να μην είναι δυνατή η απεικόνιση των αντικειμένων της κάτω επιφάνειας του δείγματος. Αυτή η διάταξη δεν προτιμάται για την απεικόνιση ενός δείγματος κάτω από μία υψηλά ανακλαστική επιφάνεια, όπως στην συγκεκριμένη περίπτωση είναι ο χρυσός. Αντιθέτως, αυτό μπορεί να πραγματοποιηθεί με την τοποθέτηση του φωτισμού και της κάμερας εκατέρωθεν του δείγματος (Trans-illumination system), όπως φαίνεται και στην **Εικόνα 33**.



Εικόνα 33: α) Διάταξη απεικόνισης του δείγματος τύπου trans-illumination όπου το δείγμα βρίσκεται ενδιάμεσα του φωτός και της κάμερας και β) τύπου epi-illumination system, όπου το δείγμα βρίσκεται μετά. [120]

Με αυτόν τον τρόπο το δείγμα φωτίζεται από την κάτω πλευρά και μέσω του αισθητήρα της κάμερας γίνεται δυνατή η απεικόνιση των οργανοειδών. Έτσι, η διαδικασία εκτύπωσης γίνεται πλήρως ελεγχόμενη, αφού η δέσμη του laser δεν προσπίπτει τυχαία στην επιφάνεια του δείγματος, αλλά αρχικά εντοπίζεται (targeting) το οργανοειδές με το καινούριο σύστημα φωτισμού/απεικόνισης, μετακινείται με την ανεξάρτητη κίνηση των δειγματοφορέων στο σημείο εκτύπωσης και τελικά, εναποτίθεται στο υπόστρωμα του αποδέκτη. Αυτό φυσικά μπορεί να πραγματοποιηθεί μόνο εάν η επιφάνεια του υποστρώματος του αποδέκτη είναι (μερικώς) διάφανη, ώστε να μπορεί να τη διαπερνά το φως. Στην **Εικόνα 34** φαίνεται η σχηματική αναπαράσταση πάνω στην διάταξη βίο-εκτύπωσης με τη χρήση της τεχνικής LIFT.



Εικόνα 34: Σχηματική απεικόνιση φωτισμού του δείγματος για ελεγχόμενη εκτύπωση οργανοειδών.

4.2 Υλικά, βίο-μελάνια και υποστρώματα

4.2.1 Εξωκυτταρική Μήτρα (Extracellular Matrix, ECM)

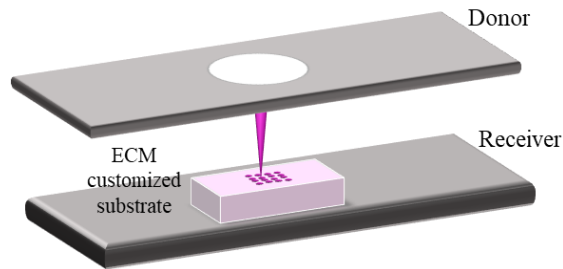
Μελέτες έχουν δείξει ότι η έγχυση κυττάρων απευθείας στην κοιλότητα της βλάβης (ειδικά για αναδόμηση εγκεφαλικών βλαβών) έχει ως αποτέλεσμα τη μετανάστευση τους στο υπάρχον παρέγχυμα με φτωχή επιβίωση[121]. Αυτά τα εξωγενώς τοποθετημένα κύτταρα από μόνα τους δεν αντικαθιστούν τον χαμένο ιστό. Για να μπορέσουν αυτά να συγκρατηθούν και να ξεκινήσουν να δημιουργούν ιστούς μετά την τοποθέτησή τους θα πρέπει το περιβάλλον να είναι ιδανικό ώστε να παρέχεται μία επιτρεπτή και λειτουργική δομική συμπεριφορά. Τέτοια υποστήριξη, παρέχεται από βίο-υλικά ειδικά σχεδιασμένα ώστε να είναι συμβατά με την εκάστοτε εφαρμογή για την οποία χρειάζεται να χρησιμοποιηθούν.

Η εξωκυτταρική μήτρα, ECM, λειτουργεί ουσιαστικά ως σκαλωσιά για κύτταρα, ιστούς και όργανα σε όλο το σώμα, διαδραματίζοντας ουσιαστικό ρόλο στη δομική και λειτουργική τους ακεραιότητα. Τα βασικά συστατικά του είναι οι μεγάλες, αδιάλυτες δομικές πρωτεΐνες από κολλαγόνο και ελαστίνη. Αρχικά θεωρήθηκε ότι οι ECM ήταν σχετικά αδρανή υλικά, πλέον είναι προφανές ότι με τη πάροδο του χρόνου υφίσταται βαθιές δομικές αλλαγές. Έχει αποδειχθεί ότι προάγουν τον φαινότυπο των μακροφάγων «εποικοδομητικής αναδιαμόρφωσης» M2, που χαρακτηρίζεται ως σάρωση υπολειμμάτων, προαγωγή αγγειογένεσης και στρατολόγηση κυττάρων που εμπλέκονται στην εποικοδομητική αναδιαμόρφωση ιστού [122]. Επομένως, οι υδρογέλες ECM μπορεί να παρέχουν αυξητικούς παράγοντες (factors), μηχανικές ιδιότητες ή/και μόρια σηματοδότησης για την υποστήριξη κυρίως των τρισδιάστατων καλλιέργειών, όπως είναι τα οργανοειδή.

4.2.2 Υπόστρωμα Αποδέκτη

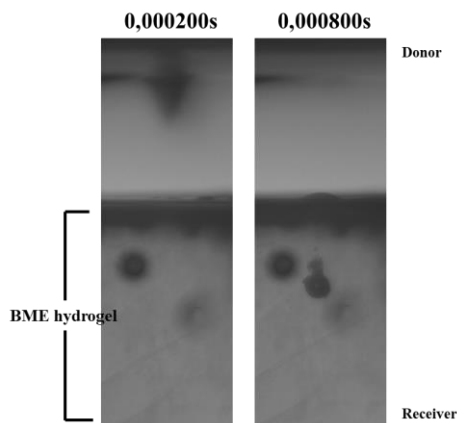
Ως υποστρώματα αποδέκτη χρησιμοποιήθηκαν καλυπτρίδες, γυαλάκια μικροσκοπίου και κυρίως υδρόφιλες μεμβράνες Polyester PET με 8 ή 1μm μέγεθος πόρων με ή χωρίς επικάλυψη διαλύματος ζελατίνης. Επιπλέον, ως υπόστρωμα αποδέκτη χρησιμοποιήθηκε τρισδιάστατη δομή υδρογέλης που ονομάζεται Εξωκυτταρική Μήτρα (Extracellular Matrix, ECM), συγκεκριμένα το Matrigel (Corning) και το BME (Cultrex, Type 2), η οποία αρχικά τοποθετήθηκε ως σταγόνα σε ένα γυαλάκι μικροσκοπίου. Σε αυτή την περίπτωση το υπόστρωμα του αποδέκτη είναι μία σταγόνα ενός ρευστού υλικού με μεγάλη καμπυλότητα, γεγονός που μεταβάλλει συνέχεια την γωνία πρόσπτωσης του υγρού πίδακα. Επιπλέον, η καμπυλότητα της σταγόνας, δημιουργεί πολλές και διαφορετικές γωνίες πρόσπτωσης του φωτός του LED που είναι απαραίτητο για την καταγραφή με την κάμερα υψηλής ανάλυσης, που αναφέρθηκε στο παραπάνω κεφάλαιο, με αποτέλεσμα να είναι αδύνατη η απεικόνιση οποιουδήποτε αντικειμένου στο εσωτερικό της.

Επίλυση για το πρόβλημα παρατήρησης στο εσωτερικό της υδρογέλης δόθηκε από την κατασκευή μιας διάφανης κυβέτας. Με αυτόν τον τρόπο δημιουργείται το φαινόμενο του ενιδρύου, όπου οι επιφάνειες τις οποίες διαπερνά το φως ώστε να εισέλθει στον αισθητήρα της κάμερας είναι διάφανες και έτσι η απεικόνιση είναι εφικτή (**Εικόνα 35**). Οπότε εστιάζοντας τον αντικειμενικό φακό της κάμερας στο εσωτερικό της εξατομικευμένης κυβέτας, στην οποία έχει τοποθετηθεί ποσότητα της υδρογέλης, που είναι επίσης ένα διάφανο βίο-υλικό, μπορεί πλέον να πραγματοποιηθεί ακριβής παρατήρηση του φαινομένου εκτύπωσης και στο εσωτερικό του υποστρώματος αποδέκτη.



Εικόνα 35: Σχηματική απεικόνιση της διάταξης δότη και εξατομικευμένου αποδέκτη για την εκτύπωση και την παρατήρηση σε τρισδιάστατο χώρο.

Όπως φαίνεται και στην παρακάτω **Εικόνα 36** δεν μπορεί να πραγματοποιηθεί ταυτόχρονη παρατήρηση της εξέλιξης του υγρού πίδακα πριν και μετά την είσοδό του στο υπόστρωμα του αποδέκτη. Κατά την είσοδο του βιοϋλικού στην υδρογέλη το αντικείμενο διαθλάται με αποτέλεσμα να εστιάζει σε άλλο σημείο, για αυτό και μελετάμε ξεχωριστά αυτές τις δύο φάσεις της εκτύπωσης. Εκτός από αυτό, η παρατήρηση και των δύο φαινομένων δεν θα μπορούσε να γίνεται ταυτόχρονα, καθώς και τα δύο φαινόμενα εξελίσσονται πολύ γρήγορα και το οπτικό πεδίο είναι αρκετά μεγάλο, με αποτέλεσμα η κάμερα να μη μπορεί να καλύψει και μεγάλο οπτικό (field of view) πεδίο και πολλά στιγμιότυπα (fps).



Εικόνα 36: Στιγμιότυπο καταγραφής της εκτύπωσης καρκινικών κυττάρων στο εσωτερικό της υδρογέλης

4.2.3 Πρωτόκολλα καλλιέργειας κυττάρων

Στην παρούσα εργασία έγινε η χρήση της καρκινικής κυτταρικής σειράς LLC, Lewis Lung Carcinoma, όπου είναι καρκινικά κύτταρα πνεύμονα που είχαν εξαχθεί από ποντίκι και διατηρούνται αιώνια σε συνθήκες υγρού αζώτου. Συγκεκριμένα η συγκεκριμένη σειρά μας δόθηκε σε cryovials από το Ίδρυμα Ιατροβιολογικών Ερευνών Ακαδημίας Αθηνών (BRFAA). Αυτά αποψύχθηκαν και συνέχισαν να καλλιεργούνται κατά τη διάρκεια όλων των πειραμάτων. Μετά από ανάπτυξη της καλλιέργειας, κάποια δείγματα ψύχθηκαν ξανά ώστε να μην υπάρξουν ελλείψεις στις αποθήκες. Παρακάτω περιγράφονται τα βασικά πρωτόκολλα που ακολουθήθηκαν για την διατήρηση των καλλιεργειών και για τη δημιουργία οργανοειδών ώστε να μπορούν να χρησιμοποιηθούν ως βίο-μελάνια προς εκτύπωση με την τεχνική LIFT.

(i) Παρασκευή θρεπτικού υλικού

Υλικά:

- 500mL DMEM high glucose, 4mM L-Glutamine, 4500mg/L Glucose, +Sodium Pyruvate
- 50mL FBS (Fetal bovine serum)
- 5.5mL Penicillin Streptomycin

Βήματα παρασκευής:

- 1) Απενεργοποίηση των ενζύμων από τον ορό FBS. Αυτό επιτυγχάνεται με την θέρμανση του ορού στους 56°C για 30 λεπτά
- 2) Φιλτράρισμα του ορού και του αντιβιοτικού pen strep από φίλτρο 0.2 μm.
- 3) Διάλυση των δύο παραπάνω στο DMEM

Όλα τα παραπάνω είναι απαραίτητα να πραγματοποιούνται σε καθαρό χώρο (Cell culture hood), ώστε να μην υπάρχουν μολύνσεις στην καλλιέργεια των κυττάρων.

(ii) Διαδικασία απόψυξης κυττάρων

Το κάθε δείγμα θερμαίνεται στους 37°C, αφού έχει βγει από το υγρό άζωτο στο οποίο αποθηκεύεται, και αφού γίνει και πάλι υγρό, επαναδιαλύεται σε 10 ml θρεπτικού υλικού και φυγοκεντρείται σε 250-300g. Μετά την φυγοκέντρηση, αφαιρείται το υπερκείμενο και προστίθεται όση ποσότητα χρειάζεται ώστε να γεμίσει ο επιθυμητός αριθμός τρυβλίων. Το κάθε τρυβλίο 100 mm διαμέτρου, χωράει 10 ml θρεπτικό υλικό. Συνήθως τη στιγμή της απόψυξης ενός δείγματος, αυτό επαναδιαλύεται σε 1 ή 2 τρυβλία και είναι απαραίτητο να περάσουν από τουλάχιστον δύο κύκλους διαιρέσεων μέχρι να χρησιμοποιηθούν εκ νέου.

(iii) Διαδικασία ψύξης κυττάρων

Υλικά:

- 1 ml θρεπτικό υλικό
- 500 μl FBS
- 500 μl DMSO

Βήματα παρασκευής:

- 1) Λήψη κυττάρων από το τρυβλίο καλλιέργειας (βλ. Πρωτόκολλο λήψης κυττάρων για εκτύπωση)
- 2) Φυγοκέντρηση σε 250 g για 5 λεπτά.
- 3) Αφαίρεση υπερκείμενου
- 4) Επαναδιάλυση του ιζήματος κυττάρων με τα παραπάνω υλικά
- 5) Τοποθέτηση του διαλύματος σε cryovials
- 6) Αποθήκευση για 24 ώρες στους -80°C
- 7) Αποθήκευση στο υγρό άζωτο.

(iv) Λήψη κυττάρων από την κυτταρική καλλιέργεια προς εκτύπωση με την τεχνική LIFT
Υλικά:

- Έτοιμο θρεπτικό υλικό
- 1 ml θρυψίνη
- 10 ml PBS/τρυβλίο

Βήματα:

- 1) Απομάκρυνση θρεπτικού υλικού με την αντλία κενού από τα ήδη υπάρχοντα τρυβλία.
- 2) Πλύση των κυττάρων με ρυθμιστικό διάλυμα, PBS, ώστε να απομακρυνθούν υπολείμματα πρωτεϊνών του θρεπτικού υλικού και στη συνέχεια απομάκρυνσή του.
- 3) Τοποθέτηση θρυψίνης στο τρυβλίο με τα κύτταρα, απλώνοντάς της σε όλη την επιφάνεια και αναμονή για 1-3 λεπτά μέχρι σπάσουν οι δεσμοί που αναπτύσσουν τα κύτταρα με τον πάτο του τρυβλίου.
- 4) Αναδιάλυση των κυττάρων στη θρυψίνη ώστε να αποκολληθούν τελείως από το τρυβλίο.
- 5) Αραίωση με θρεπτικό υλικό, τουλάχιστον την διπλάσια ποσότητα θρυψίνης, ώστε να απενεργοποιηθεί η λειτουργία της, ώστε να μην πεθάνουν τα κύτταρα.
- 6) Μέτρηση κυττάρων με τη μέθοδο Neubauer
- 7) Φυγοκέντρηση του υπόλοιπου διαλύματος κυττάρων με θρεπτικό υλικό σε 250 g για 5 λεπτά.
- 8) Απομάκρυνση του υπερκειμένου πάνω από το ίζημα κυττάρων.
- 9) Επαναδιάλυση σε όγκο που έχει υπολογιστεί σύμφωνα με τη επιθυμητή συγκέντρωση των κυττάρων.
- 10) Μεταφορά των κυττάρων σε πάγο.

(v) Διαδικασία παρασκευής οργανοειδών
Υλικά:

- Θρεπτικό υλικό
- Εξωκυτταρική μήτρα, ECM (π.χ. Matrigel ή BME)
- Τρυβλίο καλλιέργειας με 24 πηγάδια

Βήματα παρασκευής:

- 1) Βάζουμε τη φυγόκεντρο στους 4°C.
- 2) Τοποθέτηση του ECM σε πάγο, ώστε να μεταβεί σε υγρή μορφή.
- 3) Προκρύνουμε το θρεπτικό υλικό και ένα falcon.
- 4) Τοποθετούμε το τρυβλίο με τα 24 πηγάδια στον incubator για να είναι ζεστό

- 5) Συλλογή των κυττάρων από το πιάτο καλλιέργειας (βλ. Πρωτόκολλο για λήψη κυττάρων προς εκτύπωση)
- 6) Μέτρηση κυττάρων με τη μέθοδο Neubauer.
- 7) Φυγοκέντρηση σε 250g για 15 λεπτά.
- 8) Υπολογισμός όγκου των σταγόνων που θα στρωθούν. Κάθε σταγόνα πρέπει να έχει συνολικό όγκο 40 μl (20 μl θρεπτικό υλικό + κύτταρα και 20 μl της εκάστοτε ECM).
- 9) Υπολογισμός των κυττάρων ανά σταγόνα. Συνήθως τοποθετούνται σε συγκέντρωση 5.000 κύτταρα/μl.
- 10) Απομάκρυνση υπερκείμενου μετά την φυγοκέντρηση.
- 11) Επαναδιάλυση στους επιθυμητούς όγκους σύμφωνα με τα παραπάνω.
- 12) Ανάμιξη του διαλύματος θρεπτικού υλικού + κύτταρα με την εκάστοτε ECM σε ίση αναλογία όγκου.
- 13) Τοποθέτηση 40 μl από το τελικό διάλυμα σε κάθε πηγάδι του ήδη ζεσταμένου τρυβλίου, στο κέντρο κάθε πηγαδιού.
- 14) Το πιάτο τοποθετείται για 15 λεπτά στον incubator, ώστε η ECM να πάρει την μορφή γέλης.
- 15) Προσθήκη 600 μl θρεπτικού υλικού σε κάθε πηγάδι που περιέχει σταγόνα.

Κεφάλαιο 5. Πειραματικό μέρος

Στο κεφάλαιο αυτό παρουσιάζεται η μελέτη που διεξήχθη στα πλαίσια του μεταπτυχιακού, σχετικά με την εκτύπωση βιολογικών υλικών και συγκεκριμένα καρκινικών κυττάρων και οργανοειδών με τη χρήση της τεχνικής Laser Induced Forward Transfer και με σκοπό την εναπόθεσή τους στο εσωτερικό μικροροϊκών πλατφορμών Organ-on-chip (OoC).

5.1 Μελέτη συνθηκών βίο-εκτύπωσης με Laser

Στο κεφάλαιο αυτό παρουσιάζεται η μελέτη βελτιστοποίησης των συνθηκών βίο-εκτύπωσης με laser με σκοπό την επιτυχημένη εναπόθεσή τους στο εσωτερικό των OoC. Αρχικά μελετήθηκε το βέλτιστο υπόστρωμα αποδέκτη για το εκάστοτε προς εκτύπωση υλικό, στη συνέχεια η κατάλληλη πυκνότητα ενέργειας του laser και τέλος η βέλτιστη απόσταση δότη και αποδέκτη ώστε να μπορεί να πραγματοποιηθεί η εκτύπωση. Στα κύτταρα που χρησιμοποιήθηκαν στη παρούσα εργασία έχει προστεθεί ένα γονίδιο ώστε να μπορούν να φθορίζουν στο πράσινο και έτσι να είναι ορατά στο φθορίζον μικροσκόπιο. Έτσι όταν τα κύτταρα είναι νεκρά, το γονίδιο αυτό παύει να φθορίζει μετά από λίγες ώρες, με αποτέλεσμα αυτό να λειτουργεί ως τρόπος για επιβεβαίωση της βιωσιμότητας ή μη των κυττάρων, εκτός από το γεγονός ότι πολλαπλασιάζονται και αυξάνονται σε μέγεθος οι εκτυπωμένες δομές.

5.1.1 Μελέτη επιλογής υποστρώματος αποδέκτη

Η εφαρμογή της παρούσας εργασίας είναι, όπως προαναφέρθηκε, η εκτύπωση κυττάρων σε OoCs, οπότε, τα κύτταρα εναποτίθενται σε μεμβράνες διαφορετικών μεγεθών διαμέτρου πόρους ώστε να μπορούν να χρησιμοποιηθούν μετέπειτα για περαιτέρω μελέτες. Το αρχικό υπόστρωμα επομένως είναι Polyester PET υδρόφιλες μεμβράνες. Συγκεκριμένα έγινε η επιλογή των μεμβρανών με διάμετρο πόρων 8μm, διότι τα προς εκτύπωση κύτταρα έχουν διάμετρο 11-15μm και έτσι δεν θα υπήρχε η πιθανότητα να περάσουν στο κάτω μέρος της μεμβράνης μετά την εναπόθεσή τους.

Στη συνέχεια, πραγματοποιήθηκαν πειράματα εκτύπωσης σε μεμβράνες με ή χωρίς επικάλυψη ώστε για το εκάστοτε βίο-μελάνη να βρεθεί το ιδανικό υπόστρωμα. Στον παρακάτω Πίνακα 1 φαίνονται οι συνθήκες:

Βίο-μελάνι	Συγκέντρωση κυττάρων (κύτταρα/μl)	Απόσταση δότη/αποδέκτη (mm)	Πυκνότητα Ενέργειας (mJ/cm ²)
Καρκινική κυτταρική σειρά: LLC (Lewis Lung Carcinoma, mice)	70.000	1	400

Πίνακας 1: Πειραματικές συνθήκες για εύρεση βέλτιστου υποστρώματος αποδέκτη.

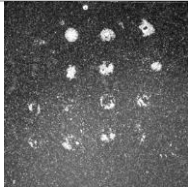
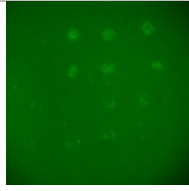
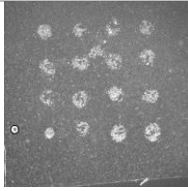
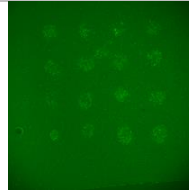
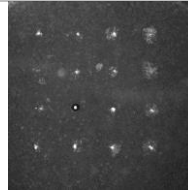
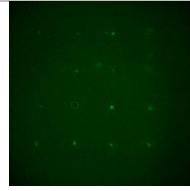
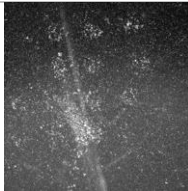
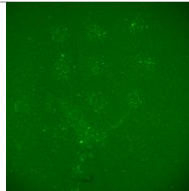
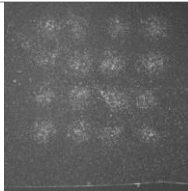
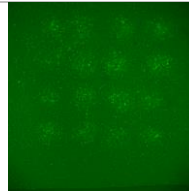
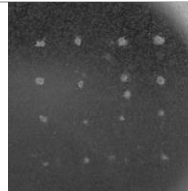

Αρχικά, τα κύτταρα τυπώθηκαν σε διάταξη 4x4 σταγόνες, με απόσταση 1000 μm, ώστε να υπάρχουν αρκετές εκτυπωμένες δομές προς παρατήρηση και με απόσταση μεταξύ τους τέτοια ώστε κατά τη

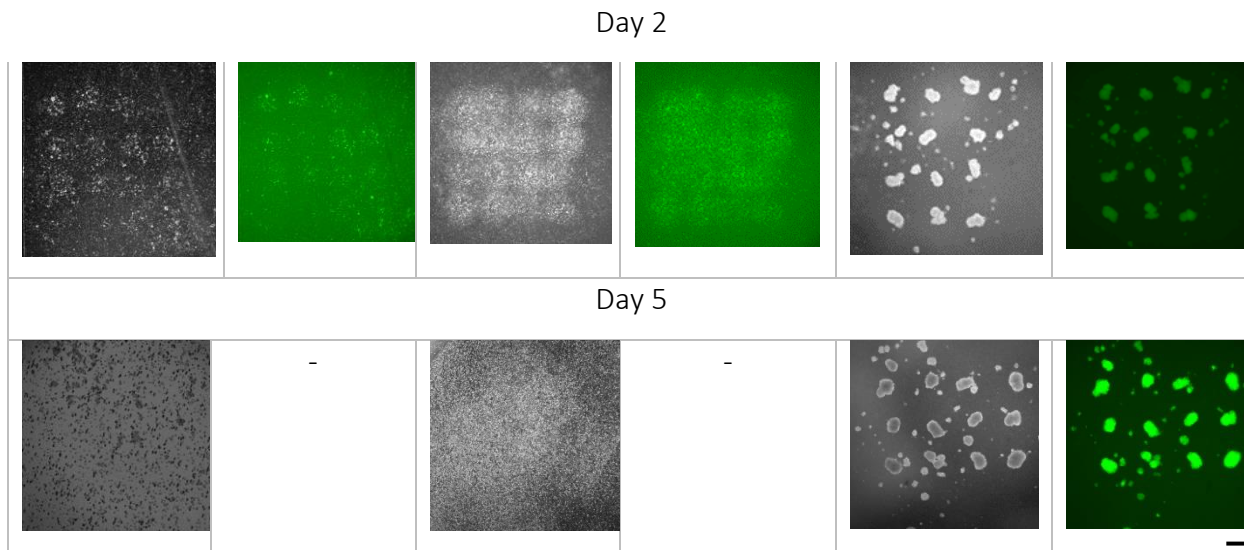
διαίρεση και κατά συνέπεια, επέκτασή τους να μην αλληλοκαλύπτονται. Στο συγκεκριμένο πείραμα, υπήρξαν τρεις διαφορετικές επικαλύψεις στο υπόστρωμα μεμβράνη:

- Χωρίς επικάλυψη (plain)
- Δισδιάστατη επικάλυψη με ζελατίνη (gelatin)
- Τρισδιάστατη σταγόνα εξωκυτταρικής μήτρα (ECM), Matrigel.

Συγκεκριμένα, για να πραγματοποιηθεί η επικάλυψη με ζελατίνη, οι μεμβράνες χρειάζεται να εμβαπτισθούν σε διάλυμα ζελατίνης και να παραμείνουν για 15 min. Στη συνέχεια αφαιρούνται από το διάλυμα και αφού στεγνώσουν είναι έτοιμες για χρήση. Η τρισδιάστατη σταγόνα ECM, δημιουργείται από την ανάμιξη Matrigel και θρεπτικού υλικού σε αναλογία 1:1, όπου μετά από 15 λεπτά σε συνθήκες incubator, πήζει παίρνοντας τη μορφή τζελ (βλ. Κεφάλαιο 4).

Παρακάτω φαίνονται οι φωτογραφίες από Inverted μικροσκόπιο, brightfield και fluorescence. Την ημέρα της εκτύπωσης, Day 0, οι δομές σχηματίστηκαν και στις τρεις περιπτώσεις υποστρώματος όπως φαίνεται στον **Πίνακα 2**. Παρακολουθώντας, όμως, την εξέλιξη του πειράματος για 5 μέρες, φαίνεται πως τα εκτυπωμένα κύτταρα στο υπόστρωμα επικαλυμμένο με ζελατίνη, έχουν προσκολληθεί καλύτερα και οι δομές τους έχουν μεγαλώσει τόσο, με αποτέλεσμα τη δημιουργία ένα ενιαίο στρώμα από εκτυπωμένα κύτταρα (monolayer) (βλ. Day2). Τα εκτυπωμένα στην σκέτη μεμβράνη κύτταρα, αντιθέτως, φαίνεται ότι ήδη από την 1^η ημέρα του πειράματος, τα περισσότερα έχουν αποκολληθεί και όσο παρέμειναν ακινητοποιημένα στη μεμβράνη πολλαπλασιάστηκαν, όμως όχι σε τέτοιο βαθμό, ώστε να μπορέσουν να συκρατηθούν ζωντανά για παραπάνω ημέρες. Στην περίπτωση του υποστρώματος με σταγόνα Matrigel, φαίνεται πως κάθε εκτυπωμένη δομή με κύτταρα, από την 1^η ημέρα σχημάτισε ένα οργανοειδές. Τις επόμενες ημέρες τα οργανοειδή μεγαλώνουν και πολλαπλασιάζονται σε μεγάλο βαθμό, σχεδόν

Day 0					
Plain		Gelatin		Matrigel	
Brightfield	Fluorescence	Brightfield	Fluorescence	Brightfield	Fluorescence
					
Day 1					
					

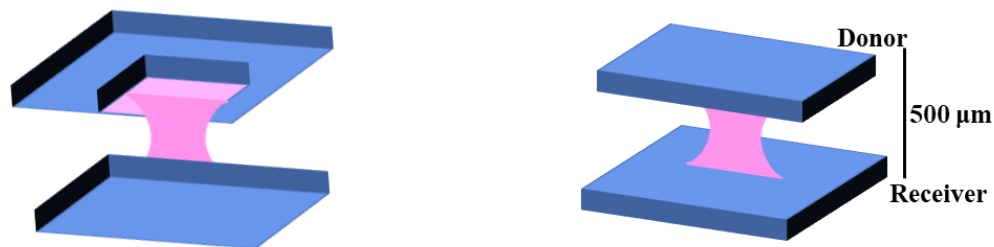


Πίνακας 2: Φωτογραφίες εκτυπωμένων κυττάρων για την εύρεση του βέλτιστου υποστρώματος εκτύπωσης. Scale bar: 500 μm .

διπλασιάζονται σε μέγεθος. Από τον παραπάνω πίνακα, φαίνεται πως κατάλληλο υπόστρωμα για εκτύπωση κυττάρων για τη δημιουργία τρισδιάστατων-επίπεδων δομών, είναι η μεμβράνη επικαλυμμένη με ζελατίνη. Φαίνεται πως την ημέρα 5 στην σκέτη μεμβράνη όλα τα κύτταρα έχουν αποκολληθεί και επιπλέουν νεκρά στο διάλυμα, ενώ στην μεμβράνη με ζελατίνη την ίδια ημέρα έχουν καλύψει όλη την επιφάνεια (confluent 100%). Συγκεκριμένα, η ζελατίνη, λόγω της σύστασής της σε γλυκίνη, προλίνη και υδροξυπρολίνη προσδίδει μεγαλύτερη σταθερότητα στα κύτταρα [123]. Επιπλέον, φαίνεται πως για την δημιουργία τρισδιάστατων δομών, οργανοειδών, ήδη από την 1^η ημέρα, τα κύτταρα είναι απαραίτητο να εκτυπωθούν σε κάποια εξωκυτταρική μήτρα. Αυτό συμβαίνει, αρχικά λόγω της σύστασης των ECM, όπως έχει αναφερθεί, σε πρωτεΐνες και παράγοντες που ευνοούν τη δημιουργία οργανοειδών και δεύτερων γιατί τα κύτταρα εκτυπώνονται σε τρισδιάστατο υπόστρωμα, με αποτέλεσμα να έχουν χώρο να πολλαπλασιαστούν σε όλες τις διαστάσεις.

5.1.2 Μελέτη συνθηκών απόστασης υποστρωμάτων δότη και αποδέκτη

Στην συνέχεια, αφού το βέλτιστο υπόστρωμα εκτύπωσης είχε καθοριστεί, πραγματοποιήθηκαν πειράματα για την εύρεση της βέλτιστης απόστασης μεταξύ των υποστρωμάτων δότη και αποδέκτη. Οι θάλαμοι (chamber) της πλατφόρμας OoC που χρησιμοποιήθηκε στην παρούσα εργασία έχουν βάθος 5 mm, με αποτέλεσμα να πρέπει να γίνει δοκιμή ποιας είναι η βέλτιστης απόστασης εκτύπωσης. Αρχικά δοκιμάστηκε εκτύπωση σε απόσταση 500 μm , όμως απορρίφθηκε άμεσα διότι το εναποτιθέμενο στον δότη βίο-υλικό δημιουργούσε ένα ενιαίο φιλμ μεταξύ των δύο υποστρωμάτων, με αποτέλεσμα να μη διαχωρίζονται τα δύο υποστρώματα (Εικόνα 37).



Εικόνα 37: Σχηματική απεικόνιση του βίο-υλικού όταν η απόσταση δότη και αποδέκτη είναι τόσο κοντινή ώστε το υλικό να προσκολλάει στην επιφάνεια του αποδέκτη.

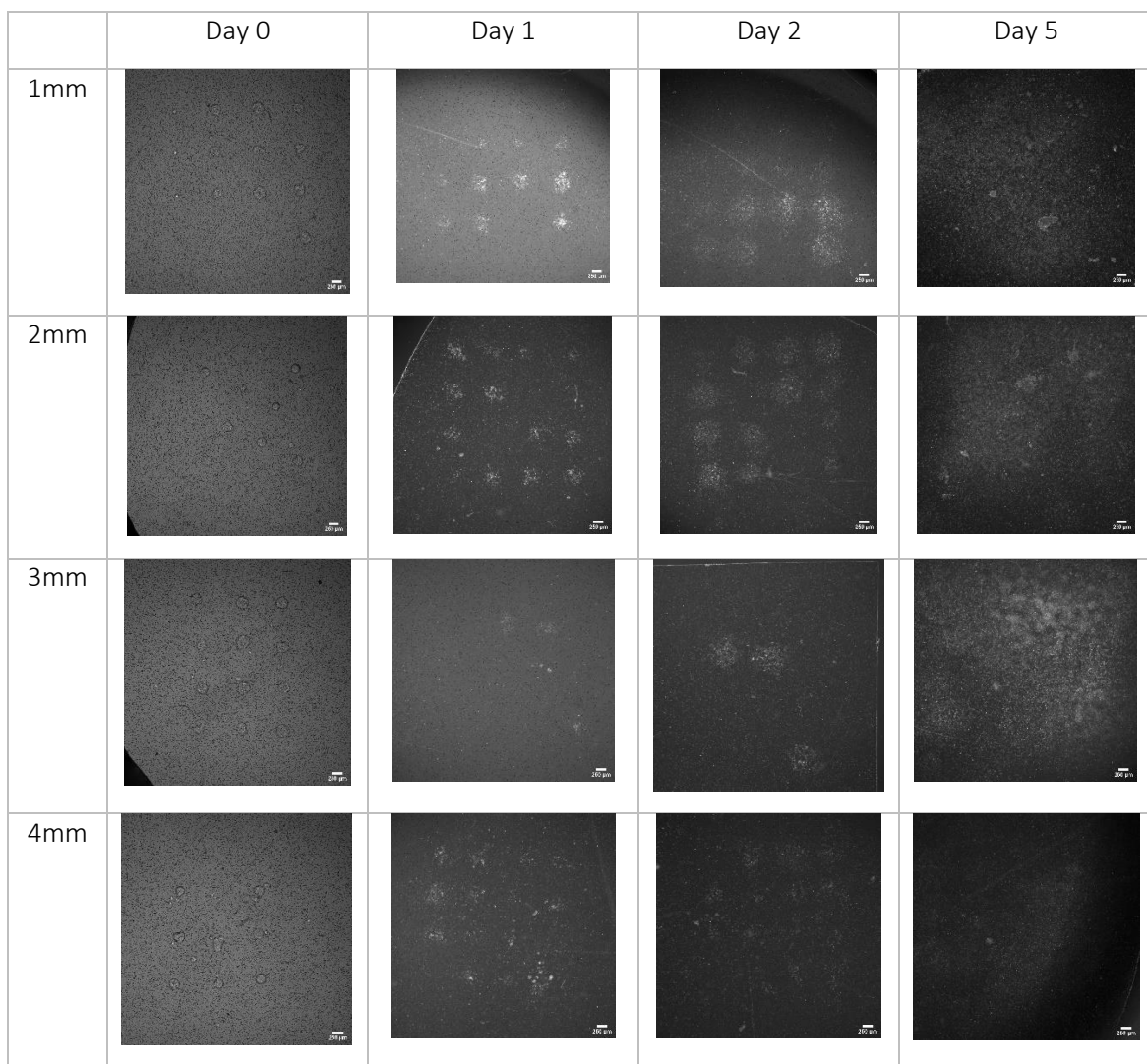
Για εκτύπωση βίο-υλικών αναμεμιγμένων με κύτταρα, αποστάσεις μικρότερες από 1 mm είναι αρκετά κοντινές για να μπορεί να πραγματοποιηθεί η διαδικασία εναπόθεσης. Έτσι οι αποστάσεις δότη-αποδέκτη που δοκιμάστηκαν ήταν 1, 2, 3, 4 mm.

Στο συγκεκριμένο πείραμα η μόνη παράμετρος που μεταβλήθηκε ήταν η απόσταση εκτύπωσης, κρατώντας σταθερή την ενέργεια ανά επιφάνεια του laser, όπως φαίνεται στον **Πίνακας 3**.

Βίο-μελάνι	Συγκέντρωση κυττάρων (κύτταρα/μl)	Πυκνότητα Ενέργειας (mJ/cm ²)
Καρκινική κυτταρική σειρά: LLC (Lewis Lung Carcinoma, mice)	70.000	500

Πίνακας 3: Πειραματικές συνθήκες για εύρεση βέλτιστου απόστασης εκτύπωσης.

Η εναπόθεση των κυττάρων πραγματοποιήθηκε και στις τέσσερις αποστάσεις εκτύπωσης, όπως φαίνεται από τις φωτογραφίες της ημέρας 0 του παρακάτω **Πίνακας 4**. Οι διαφορές μεταξύ των περιπτώσεων φαίνονται μετά την 1^η μέρα, όπου στις αποστάσεις εκτύπωσης 3 mm και 4 mm, τα εκτυπωμένα κύτταρα αποκολλήθηκαν από την μεμβράνη. Αυτό παρατηρείται, διότι, η ταχύτητα πρόσκρουσης του πίδακα ήταν αρκετά μικρότερη, ώστε να επιτευχθεί η ακινητοποίηση των κυττάρων. Στην περίπτωση της απόστασης δότη-αποδέκτη 1 και 2 mm, οι περισσότερες εκτυπωμένες δομές συνέχισαν να είναι ακινητοποιημένες στην επιφάνεια της μεμβράνης για πάνω από 5 ημέρες, ώσπου σχημάτισαν ένα ενιαίο στρώμα (monolayer) όπως ήταν αναμενόμενο. Για να επιτευχθεί ακινητοποίηση των κυττάρων σε μεγαλύτερες αποστάσεις εκτύπωσης, θα πρέπει να αυξηθεί η πυκνότητα ενέργειας του laser όσο αυξάνεται και η απόσταση. Εκτενέστερη ανάλυση για τη βέλτιστη πυκνότητα ενέργειας ώστε να μπορεί να πραγματοποιηθεί εκτύπωση και σε πιο μεγάλες αποστάσεις, γίνεται στο κεφάλαιο 5.2.1, όπου με τη χρήση κάμερας υψηλής ανάλυσης γίνεται η μελέτη των ταχυτήτων πρόσκρουσης και ποιοτική ανάλυση του πίδακα κατά τη διαδικασία εκτύπωσης.



Πίνακας 4: Φωτογραφίες εκτυπωμένων κυττάρων για την εύρεση της βέλτιστης απόστασης μεταξύ των υποστρωμάτων δότη-αποδέκτη. Scale bar: 250 μm

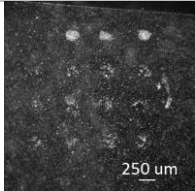
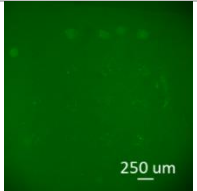
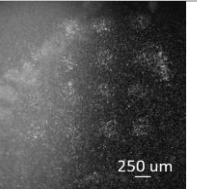
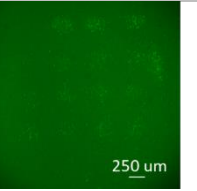
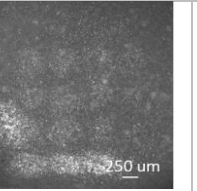
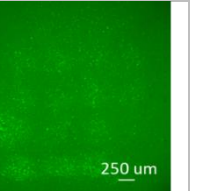
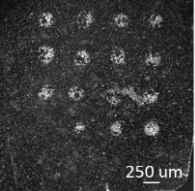
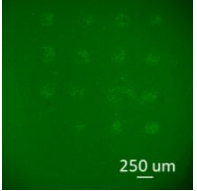
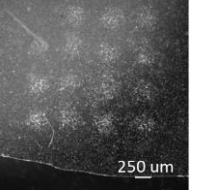
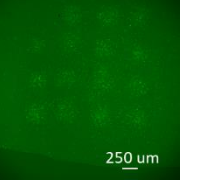
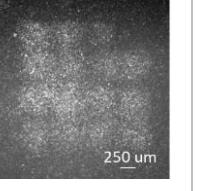
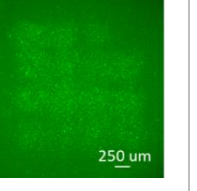
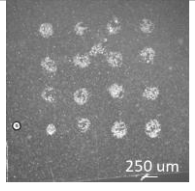
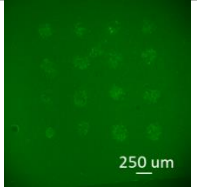
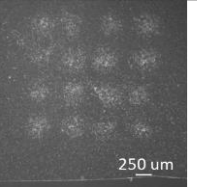
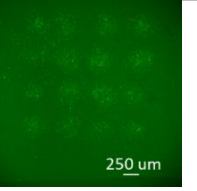
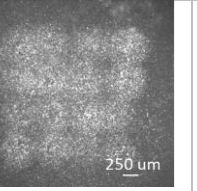
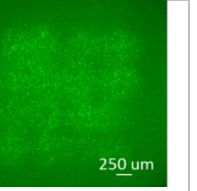
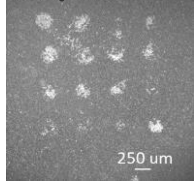
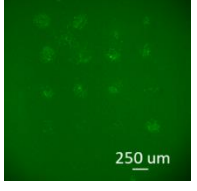
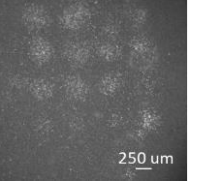
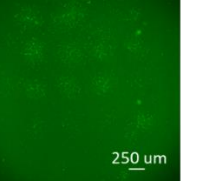
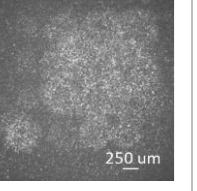
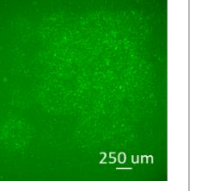
5.1.3 Μελέτη πυκνοτήτων ενέργειας βίο-εκτύπωσης με laser

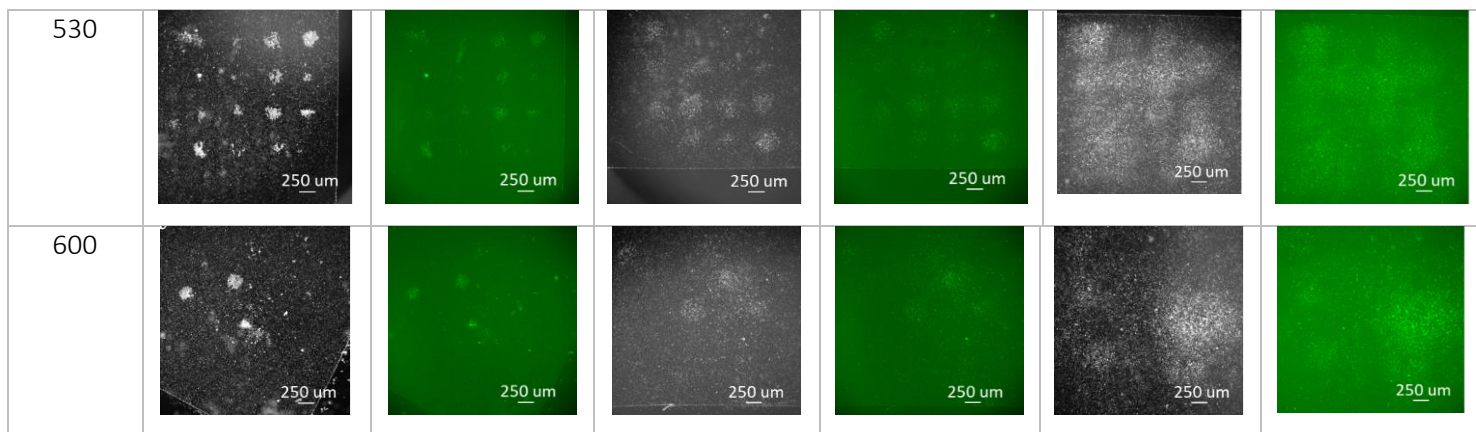
Τέλος, πραγματοποιήθηκαν πειράματα για την εύρεση της βέλτιστης ενέργειας ανά επιφάνεια του laser ώστε να πραγματοποιηθεί η εκτύπωση. Η απόσταση εκτύπωσης ήταν σταθερή (1mm) και οι μεμβράνες ήταν επικαλυμμένες με ζελατίνη, ώστε τα κύτταρα να πολλαπλασιάζονται μέσα στις ημέρες παρατήρησης του πειράματος.

Βίο-μελάني	Υπόστρωμα αποδέκτη	Συγκέντρωση κυττάρων (κύτταρα/μl)	Απόσταση δότη/αποδέκτη (mm)
Καρκινική κυτταρική σειρά: LLC (Lewis Lung Carcinoma, mice)	Μεμβράνη PET επικαλυμμένη με διάλυμα ζελατίνης	70.000	1

Πίνακας 5: Πειραματικές συνθήκες για εύρεση βέλτιστου ενέργειας ανά επιφάνεια εκτύπωσης.

Διερευνήθηκε ένα μεγάλο εύρος τιμών ενέργειας ανά επιφάνεια 250-600 mJ/cm². Στον παρακάτω Πίνακας 6 φαίνονται τα αποτελέσματα εκτύπωσης κυττάρων και εικόνες από την παρατήρησή τους για 5 ημέρες από μικροσκόπιο Inverted σε Brightfield και Fluorescence.

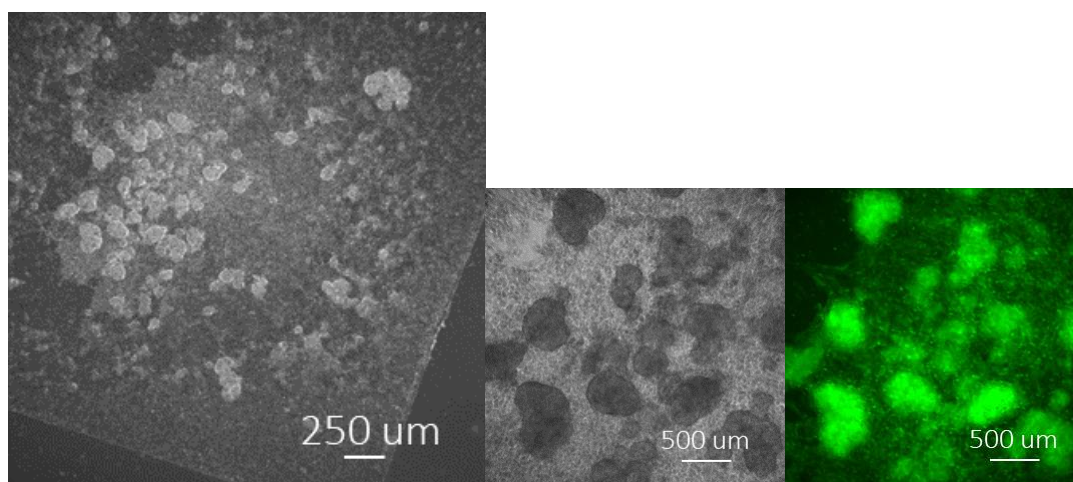
Fluence (mJ/cm ²)	Day 0		Day 1		Day 2	
250						
300						
430						
470						



Πίνακας 6: Αποτελέσματα πειράματος για εύρεση της βέλτιστης ενέργειας ανά επιφάνειας του laser εκτύπωσης.

Από τις εικόνες του παραπάνω πίνακα μπορεί να γίνει η λήψη ποιοτικών διαφορών μεταξύ των διαφορετικών ενεργειών ανά επιφάνεια του laser. Συγκεκριμένα, είναι φανερό από την ημέρα 0 (ημέρα εκτύπωσης) ότι δεν εκτυπώθηκαν όλες οι δομές στις μεγαλύτερες ενέργειες/επιφάνεια και ειδικά μετά τη βύθισή τους στο θρεπτικό τους υλικό πολλά από τα εκτυπωμένα σποτ, ξεκόλλησαν από την μεμβράνη, όπως φαίνεται και στην περίπτωση των 600 mJ/cm², όπου παρέμειναν μόνο τρεις εκτυπωμένες δομές. Το ίδιο φαίνεται να συνέβη και στην ενέργεια/επιφάνεια 250 mJ/cm² όπου οι δομές δημιουργήθηκαν στην μεμβράνη αλλά ο αριθμός των κυττάρων σε κάθε δομή είναι εμφανώς μικρότερος. Τα συμπεράσματα αυτά επιβεβαιώνονται με την παρατήρηση των δομών τις επόμενες ημέρες όπου σε σύγκριση με τις υπόλοιπες περιπτώσεις (400-500 mJ/cm²) τα κύτταρα είναι αρκετά λιγότερα. Έτσι, οι ενέργειες/επιφάνεια του laser από 300-500 mJ/cm² είναι ενδεικτικές για να πραγματοποιηθεί εκτύπωση κυττάρων σε υψηλή συγκέντρωση. Η βιωσιμότητα των κυττάρων είναι υψηλή, εφόσον στις εικόνες φθορισμού μπορούν να παρατηρηθούν, διατηρούν τη δομή τους και το αρχικό σχέδιο εκτύπωσης και με τη πάροδο των ημερών σχηματίζουν και πάλι ένα ενιαίο στρώμα (monolayer).

Συγκεκριμένα, για την ενέργεια/επιφάνεια του laser 470 mJ/cm², όπως φαίνεται στην **Εικόνα 38** παρατηρήθηκε ο σχηματισμός τρισδιάστατων δομών, οργανοειδών, στην επιφάνεια της μεμβράνης.



Εικόνα 38: Σχηματισμός οργανοειδών από εκτυπωμένα κύτταρα σε υπόστρωμα PET μεμβράνης επικαλυμμένο με ζελατίνη.

Το γεγονός αυτό, υποδεικνύει ίσως το συνδυασμό όλων των βέλτιστων συνθηκών εκτύπωσης (D-R: 1mm,

Fluence: 470 mJ/cm²), αφού για να σχηματιστούν σφαιροειδή και οργανοειδή σημαίνει πως τα κύτταρα βρίσκονται σε ιδανικό περιβάλλον και δεν έχουν υποστεί κάποια καταστροφή ή ταλαιπωρία από τη διαδικασία της εκτύπωσης, με αποτέλεσμα να μπορούν να πολλαπλασιάζονται σε τέτοιο βαθμό.

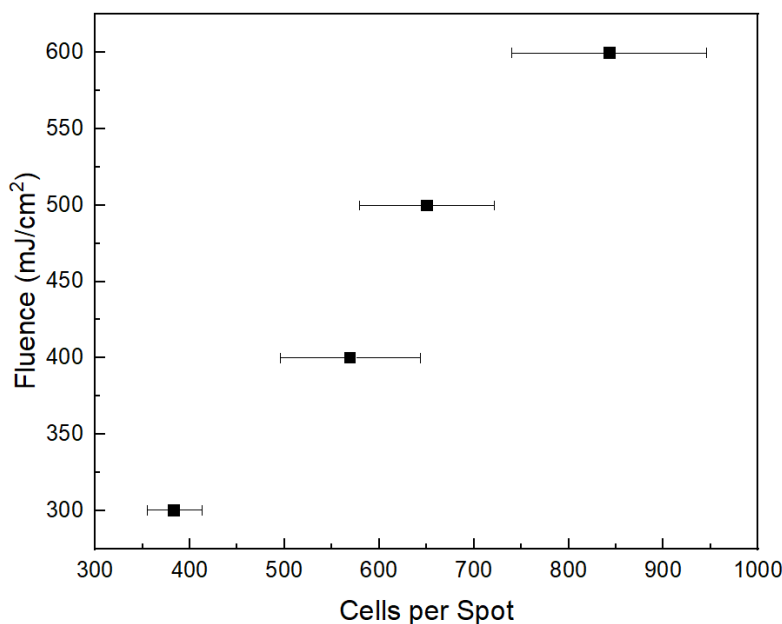
5.1.4 Μελέτη αριθμού κυττάρων σε σχέση με την ενέργεια ανά επιφάνεια του laser

Τέλος, πραγματοποιήθηκε πείραμα ώστε να είναι γνωστός ο αριθμός των κυττάρων που εναποτίθενται κατά την εκτύπωση αναλόγως την ενέργεια/επιφάνεια που χρησιμοποιείται. Έτσι σε απόσταση υποστρωμάτων δότη-αποδέκτη 1mm και για ενέργειες/επιφάνεια από 300-600 mJ/cm² εκτυπώθηκαν κύτταρα και στη συνέχεια μετρήθηκαν. Οι τιμές φαίνονται στον παρακάτω **Πίνακας 7**,

Fluence (mJ/cm ²)	300	400	500	600
Spot_1	387	360	569	952
Spot_2	275	408	682	532
Spot_3	410	505	700	831
Spot_4	274	552	424	980
Spot_5	353	650	347	746

Πίνακας 7: Αριθμός κυττάρων σε σχέση με την ενέργεια/επιφάνεια του Laser.

ενώ στην **Εικόνα 39** παρουσιάζεται το διάγραμμα του αριθμού των κυττάρων συναρτήσει της πυκνότητας ενέργειας του laser.



Εικόνα 39: Διάγραμμα αριθμού εναποτιθέμενων κυττάρων συναρτήσει της πυκνότητας ενέργειας του laser.

Παρατηρείται ότι με την αύξηση της ενέργειας ανά επιφάνεια, αυξάνεται και ο αριθμός των κυττάρων που εναποτίθενται. Φυσικά το σφάλμα, όπως φαίνεται από το διάγραμμα, είναι αρκετά μεγάλο όμως παρατηρείται η τάση αυξανόμενου εναποτιθέμενου αριθμού κυττάρων με την αύξηση της ενέργειας του laser.

5.2 Μελέτη του φαινομένου εκτύπωσης κυττάρων με τη μέθοδο LIFT

Σε αυτό το κεφάλαιο θα γίνει ανάλυση του φαινομένου εκτύπωσης, της εξέλιξης του πίδακα πριν την πρόσκρουση στο υπόστρωμα αποδέκτη, καθώς και μετά την είσοδο του βιομελανιού στο υπόστρωμα υδρογέλης, ECM. Η μελέτη αυτή, στοχεύει στον πλήρη έλεγχο της διαδικασίας βίο-εκτύπωσης με τη την τεχνική LIFT, γενικά σε οποιοδήποτε υπόστρωμα, ακόμα και σε τρισδιάστατη εξωκυτταρική μήτρα με σκοπό την εκτύπωση οργανοειδών. Αυτό οδηγεί στην ελεγχόμενη και όχι τυχαία, βίο-κατασκευή (bio fabrication) στο εσωτερικό των θαλάμων των πλατφόρμων OoC. Για τη μελέτη αυτή, είναι απαραίτητη η χρήση υπερταχέως κάμερας με υψηλή ανάλυση, αφού το φαινόμενο εκτύπωσης λαμβάνει χώρα για μερικά μικρά του δευτερολέπτου.

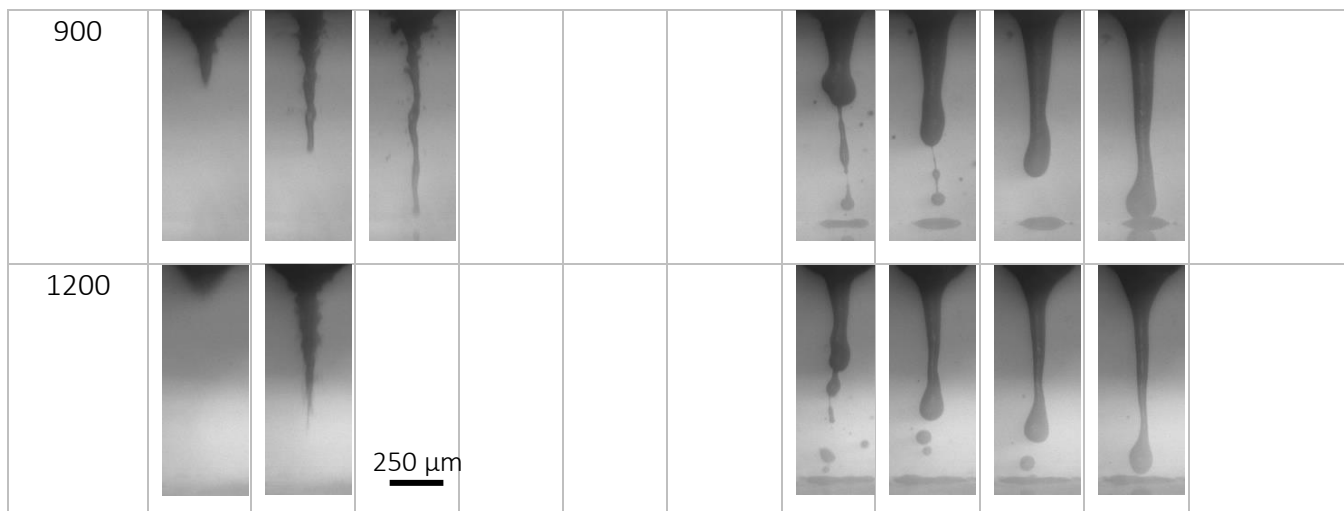
5.2.1 Μελέτη ανάπτυξης υγρού πίδακα με τη μέθοδο LIFT

Αρχικά, πραγματοποιήθηκαν πειράματα εκτύπωσης με ταυτόχρονη καταγραφή του φαινομένου εξέλιξης με τη χρήση της κάμερας Photron. Το υλικό προς εκτύπωση είναι διάλυμα κυττάρων στο θρεπτικό τους υλικό σε συγκέντρωση 75.000 κύτταρα/μl. Η συγκέντρωση αυτή έχει επιλεγεί καθώς έχει κριθεί ως η βέλτιστη ώστε να εναποτίθεται σε κάθε δομή ικανοποιητικός αριθμός κυττάρων. Η συγκέντρωση βέβαια αυτή των κυττάρων στο διάλυμα, καθιστά το βίο-μελάνι περίπλοκο ρευστό με άγνωστη συμπεριφορά. Συγκεκριμένα, δεν είναι γνωστές οι ρεολογικές του ιδιότητες (λ.χ. ιξώδες) με αποτέλεσμα να μη μπορεί να καταταχθεί στα Νευτώνεια ή μη Νευτώνεια ρευστά (πείραμα που έχει δρομολογηθεί για το επερχόμενο διδακτορικό). Παρόλα αυτά, δεδομένου της τόσο υψηλής περιεκτικότητας σε κύτταρα (75.000) ανά μικρόλιτρο και του μεγέθους του κάθε κυττάρου (~15 μm) εικάζουμε ότι το βίο-μελάνι αυτό έχει μη Νευτώνεια συμπεριφορά.

Έτσι, μελετήθηκαν ενέργειες του laser ανά επιφάνεια από 300-1200 mJ/cm² για αποστάσεις υποστρωμάτων δότη-αποδέκτη 1, 2, 3 mm. Σκοπός αυτού του πειράματος είναι η επιβεβαίωση πως η εκτύπωση σε απόσταση 1 ή 2 mm είναι η βέλτιστη, καθώς και ο χαρακτηρισμός του πίδακα για υψηλής συγκέντρωσης σε κύτταρα προς εναπόθεση υλικό.

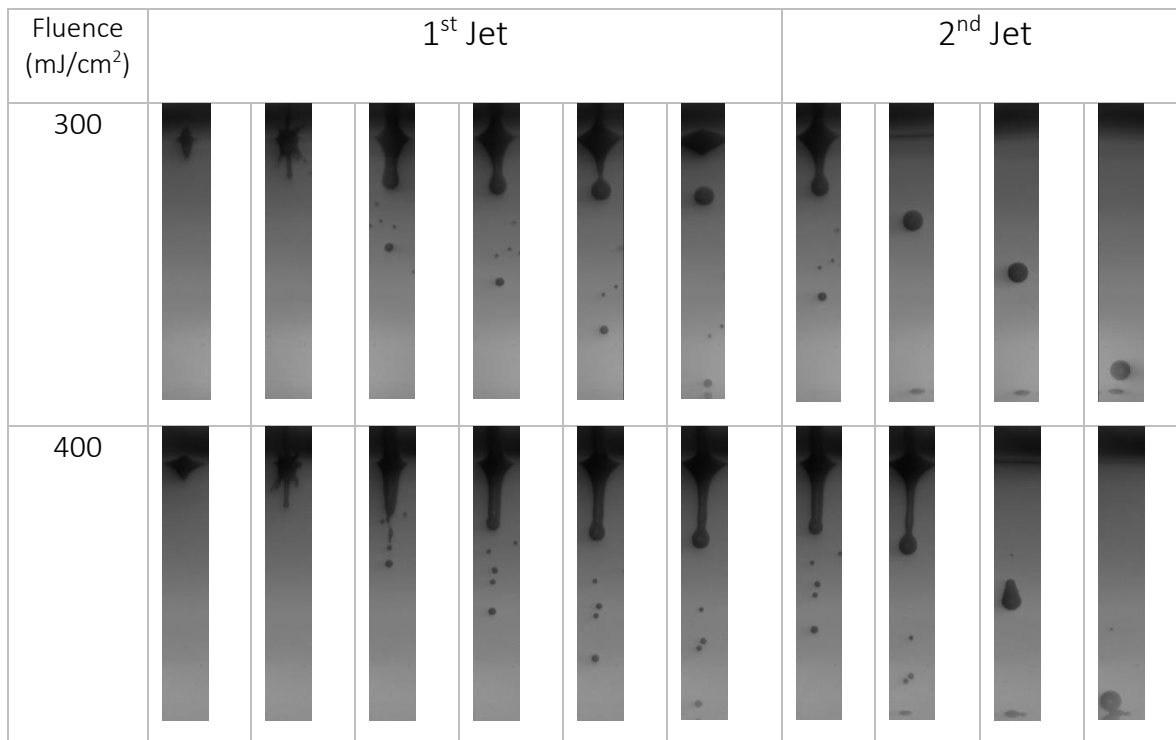
Στην **Εικόνα 40**, **Εικόνα 41** και **Εικόνα 42**, παρουσιάζονται τα στιγμιότυπα της εξέλιξης του φαινομένου εκτύπωσης, σε αποστάσεις 1,2 και 3 mm αντίστοιχα, μεταξύ των δύο υποστρωμάτων, τόσο για της 1^{ης} τάξεως πίδακα, όσο και για της 2^{ης} (1st, 2nd jet). Όπως αναφέρθηκε στο Κεφάλαιο 1.4, σε όλες τις περιπτώσεις παρατηρούνται δύο τάξεως πίδακες. Συγκεκριμένα, ο 1^{ης} τάξεως πίδακας παρατηρείται να «σπάει» σε πολύ αρχικό στάδιο, με αποτέλεσμα ως 1^{ης} τάξεως πίδακα να είναι μία σταγόνα η οποία προσκρούει στο υπόστρωμα του αποδέκτη. Στη συνέχεια οι υπόλοιπες σταγόνες του 1^{ου} πίδακα εναποτίθενται η μία πάνω στην άλλη με αποτέλεσμα να «κατασκευάζεται» ένα αρχικό ίχνος εκτυπωμένων κυττάρων στο υπόστρωμα. Το φαινόμενο αυτό, του αδύναμου, λεπτού και με μικρή πληροφορία πίδακα, επαναλαμβάνεται σχεδόν αυτούσια σε όλες τις περιπτώσεις ενεργειών/επιφάνεια και αποστάσεων.

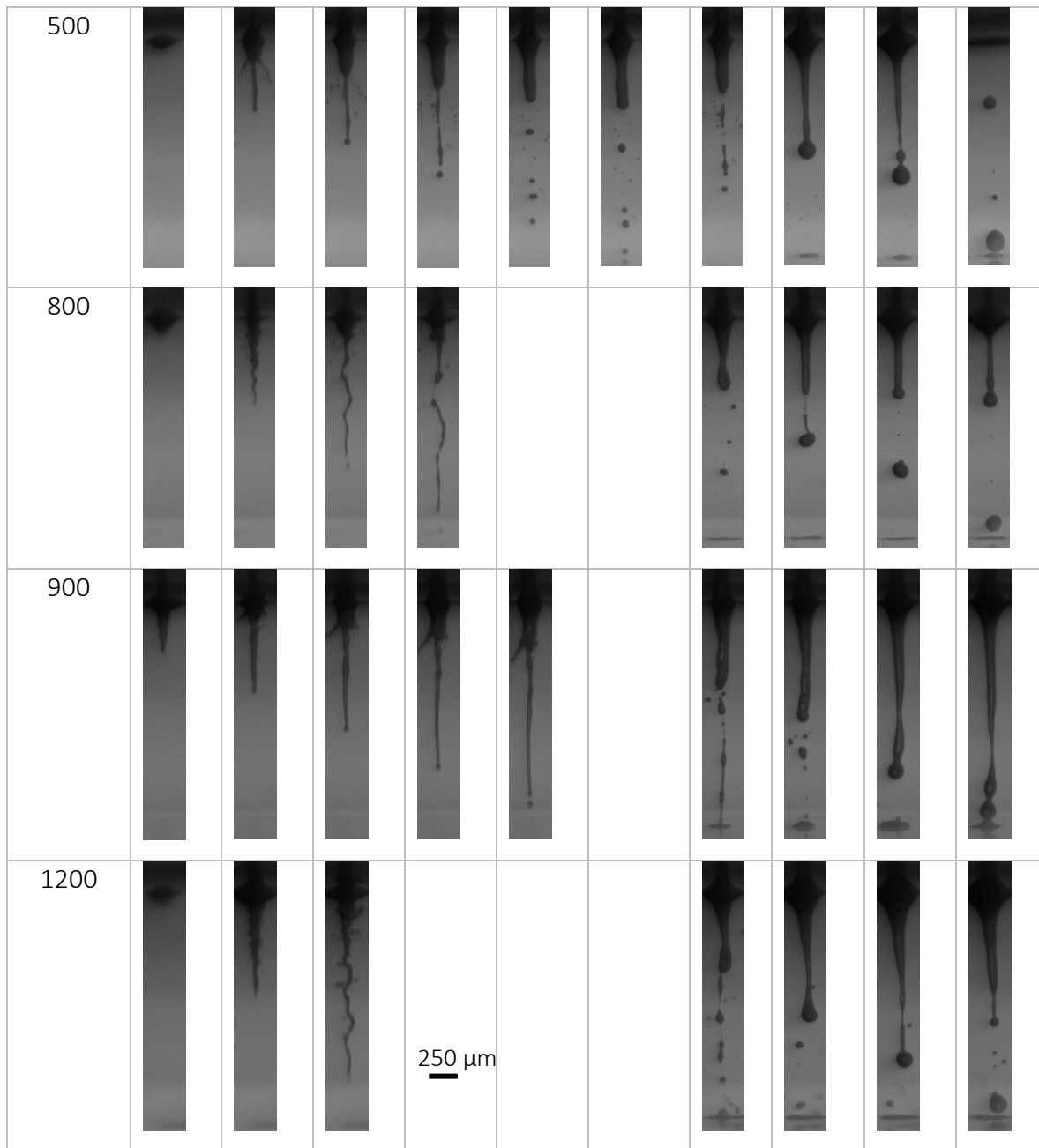
Fluence (mJ/cm ²)	1 st Jet						2 nd Jet				
300											Δότης
											Αποδέκτης
400											
500											
600											
700											
800											



Εικόνα 40: Στιγμιότυπα καταγραφής του φαινομένου εξέλιξης βίο-εκτύπωσης με τη τεχνική LIFT. Για την καταγραφή χρησιμοποιήθηκαν 76.500 fps. Παρουσιάζονται στα αριστερά της διαχωριστικής γραμμής ο 1^{ος} τάξης και στα δεξιά ο 2^{ος} τάξης πίδακας (1st & 2nd jet). Απόσταση Δότη-Αποδέκτη: 1 mm. Scale bar: 250 μm .

Έπειτα, παρατηρείται η εξέλιξη του 2^{ου} τάξεως πίδακα, όπου αξίζει μεγαλύτερη προσοχή σε σχέση με τον πρώτο. Ποιοτικά, σε όλες τις περιπτώσεις, φαίνεται πως είναι αρκετά πιο παχύς και ομοιόμορφος ακόμα και σε πολύ υψηλές ενέργειες, ενώ επιπλέον, σε ενδιάμεσες ενέργειες/επιφάνεια (400-800mJ/cm²) και για απόσταση δότη-αποδέκτη 1mm, ο πίδακας δεν κόβεται κατά τη διάρκεια της εξέλιξής του.



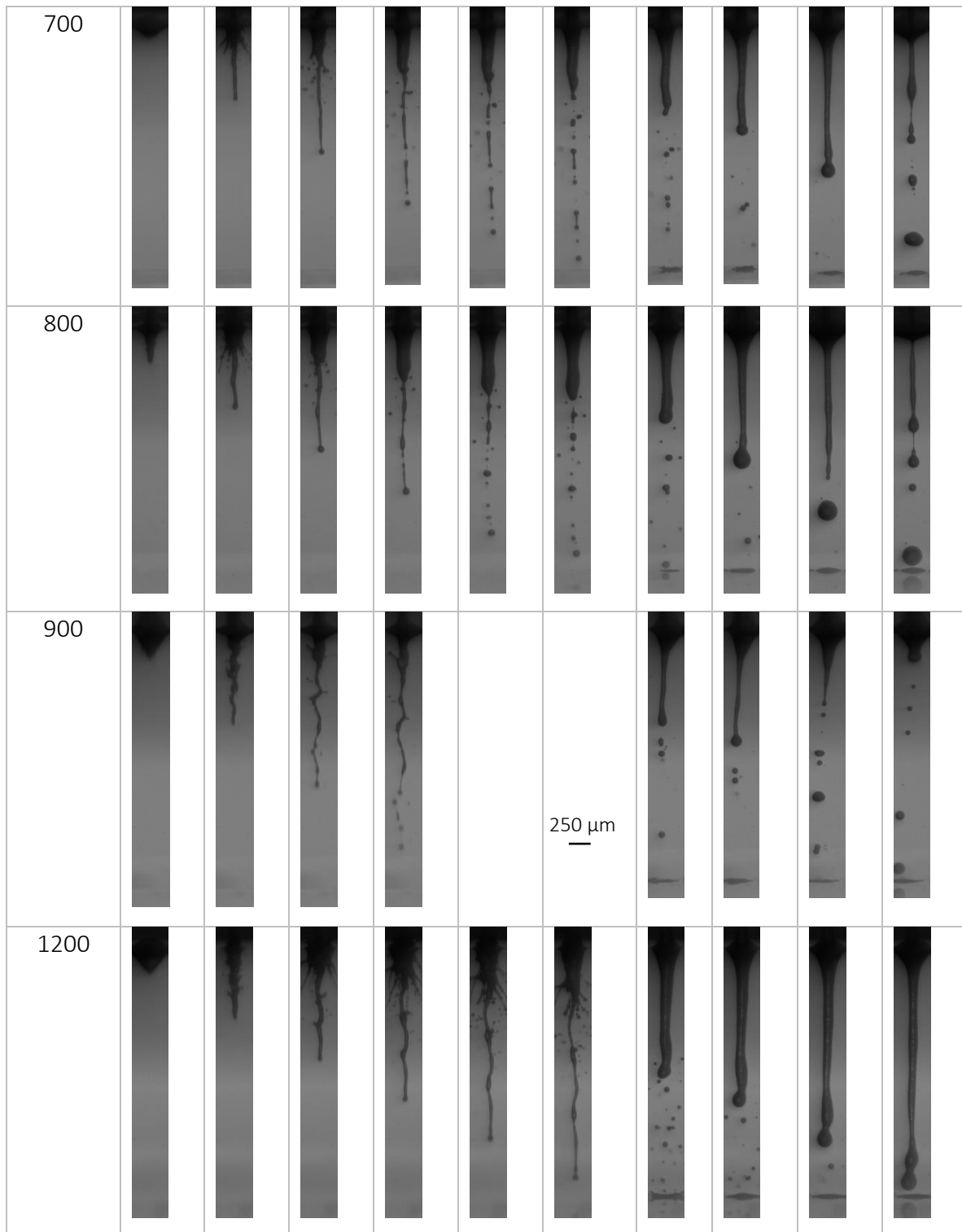


Εικόνα 41: Στιγμιότυπα καταγραφής του φαινομένου εξέλιξης βίο-εκτύπωσης με τη τεχνική LIFT. Για την καταγραφή χρησιμοποιήθηκαν 61.200 fps. Παρουσιάζονται στα αριστερά της διαχωριστικής γραμμής ο 1^{ος} τάξης και στα δεξιά ο 2^{ος} τάξης πίδακας (1st & 2nd jet). Απόσταση Δότη-Αποδέκτη: 2 mm. Scale bar: 250 μm

Όσον αφορά, την εκτύπωση σε μεγαλύτερες αποστάσεις, φαίνεται και από τα στιγμιότυπα από την κάμερα υψηλής ανάλυσης πως ο πίδακας εξασθενεί σε τυπικές ενέργειες/επιφάνεια που χρησιμοποιούνται για την εκτύπωση με την τεχνική LIFT, ενώ για μεγαλύτερες τιμές ενέργειας/επιφάνεια ο 1^{ος} πίδακας εξελίσσεται πάρα πολύ γρήγορα, δηλαδή έχει αρκετά υψηλή ταχύτητα πρόσκρουσης, και ο 2^{ος} τάξης πίδακας «κόβεται» σε πολύ αρχικό στάδιο, αλλά σε όλες τις περιπτώσεις δημιουργείται η εκτυπωμένη σταγόνα στο υπόστρωμα του αποδέκτη. Στην περίπτωση που η εκτύπωση γίνεται σε μεμβράνη, είναι μεγαλύτερες οι πιθανότητες οι υψηλές τιμές ενέργειας/επιφάνεια να προκαλέσουν καταστροφές στα

κύτταρα, μέχρι και να πεθάνουν σε μικρό χρονικό διάστημα από την τεράστια δύναμη που δέχθηκαν, όμως εάν τα κύτταρα, εκτυπώνονται σε μία τρισδιάστατη μήτρα ECM, έχει παρατηρηθεί πως δεν δημιουργείται κανένα πρόβλημα στη βιωσιμότητά τους, πιθανώς, λόγω του μικροπεριβάλλοντος της ECM που απορροφά τους κραδασμούς λόγω μεγάλης ελαστικότητας.

Fluence (mJ/cm ²)	1 st Jet						2 nd Jet			
300										
400										
500										
600										

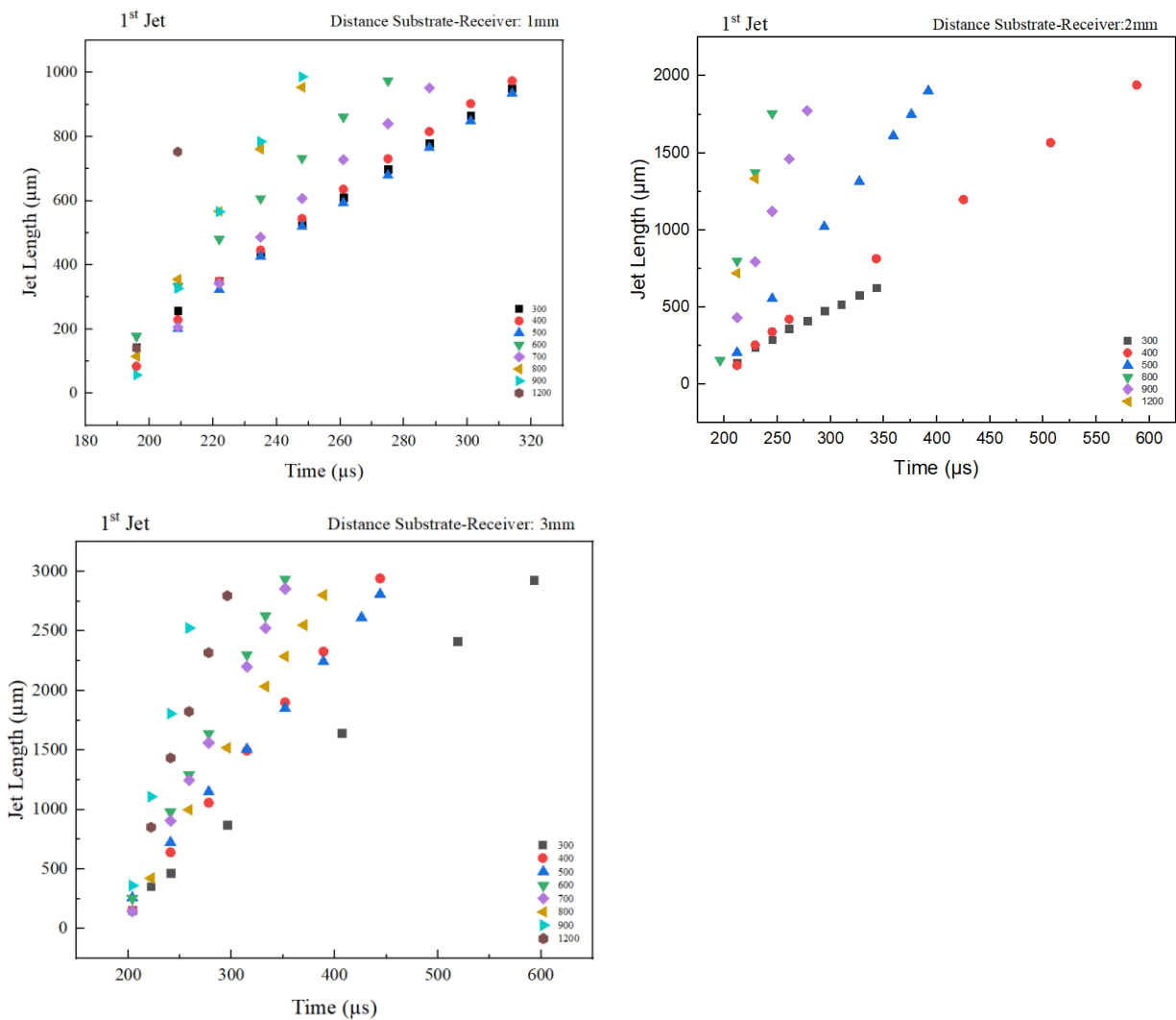


Εικόνα 42: Στιγμιότυπα καταγραφής του φαινομένου εξέλιξης βίο-εκτύπωσης με τη τεχνική LIFT. Για την καταγραφή χρησιμοποιήθηκαν 54.000 fps. Παρουσιάζονται στα αριστερά της διαχωριστικής γραμμής ο 1^{ης} τάξης και στα δεξιά ο 2^{ης} τάξης πίδακας (1st & 2nd jet). Απόσταση Δότη-Αποδέκτη: 3 mm. Scale bar: 250 μm

Στην Εικόνα 43 και Εικόνα 44 , φαίνονται τα διαγράμματα συσχέτισης του μήκους εξέλιξης του πίδακα

συναρτήσει του χρόνου τόσο για τον 1^{ης} όσο και για τον 2^{ης} τάξεως πίδακα.
 Στην περίπτωση της 1^{ης} τάξεως πίδακα παρατηρούνται τα εξής:

- Η εξάρτηση του μήκους του πίδακα με το χρόνο παρατηρείται να είναι γραμμική. Κάθε πίδακας της εκάστοτε ενέργειας/επιφάνεια έχει μία μέση ταχύτητα εξέλιξης, η οποία βρίσκεται από την κλίση της εκάστοτε ευθείας.
- Οι γραφικές της κάθε ενέργειας/επιφάνεια φαίνεται να μην εξελίσσονται η μία μετά την άλλη. Δηλαδή σε κάποια διαγράμματα η κλίση της ευθείας για 500 mJ/cm² είναι μικρότερη από την κλίση της ευθείας για 300 mJ/cm². Αυτό συμφωνεί το γεγονός ότι ο 1^{ης} τάξεως πίδακας έχει αρκετά μεγάλη τυχαιότητα και δεν ενδείκνυται για την εκτύπωση υψηλής συγκέντρωσης βίο-μελανιών [75]. Επιπλέον τα σημεία των διαγραμμάτων αφορούν το μπροστινό μέτωπο του 1^{ου} πίδακα, άρα όταν αυτός μετατρέπεται σε μία σταγόνα, ουσιαστικά

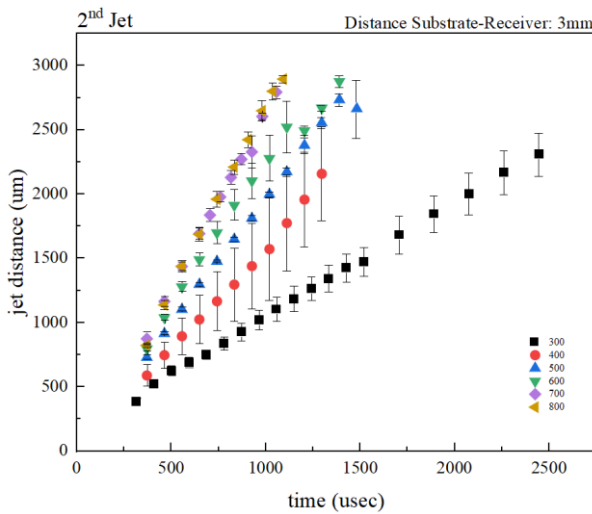
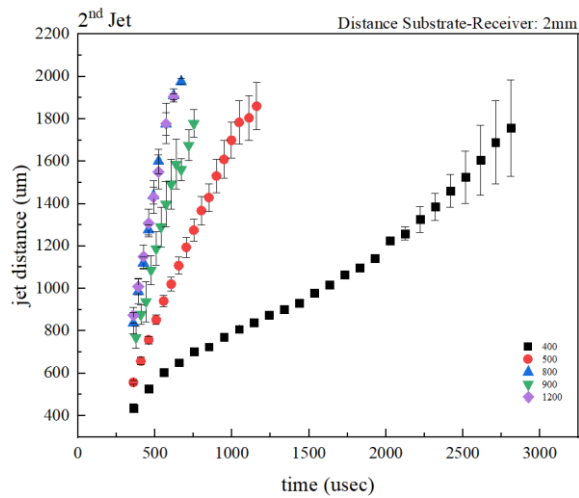
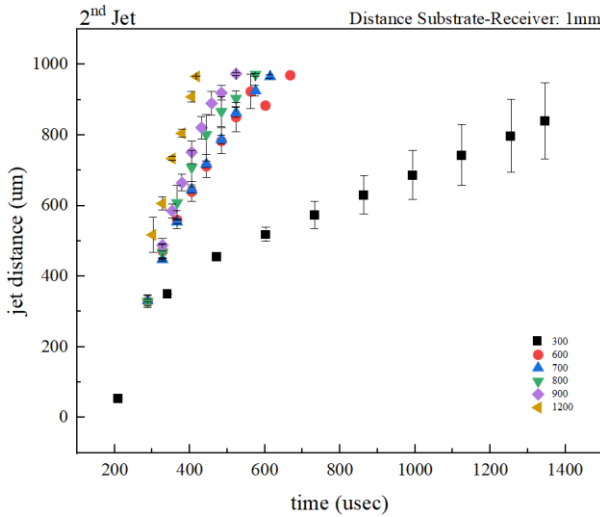


Εικόνα 43: Διαγράμματα συσχέτισης μήκους του 1ης τάξεως πίδακας συναρτήσει του χρόνου για όλες τις ενέργειες/επιφάνεια.

γίνεται η μέτρηση της μέσης ταχύτητας εξέλιξης μιας σταγόνας μεγέθους κάποιων δεκάδων μικρομέτρων.

Από τις γραφικές παραστάσεις του 2^{ης} τάξεως πίδακα παρατηρούνται τα εξής:

- Όσο αυξάνεται η ενέργεια/επιφάνεια αυξάνεται και η κλίση των ευθειών.
- Δεν υπάρχουν αλληλοεπικαλύψεις μεταξύ των γραφικών παραστάσεων, πράγμα που δηλώνει πως όσο αυξάνεται η ενέργεια/επιφάνεια αυξάνεται η ταχύτητα εξέλιξης του φαινομένου εκτύπωσης.

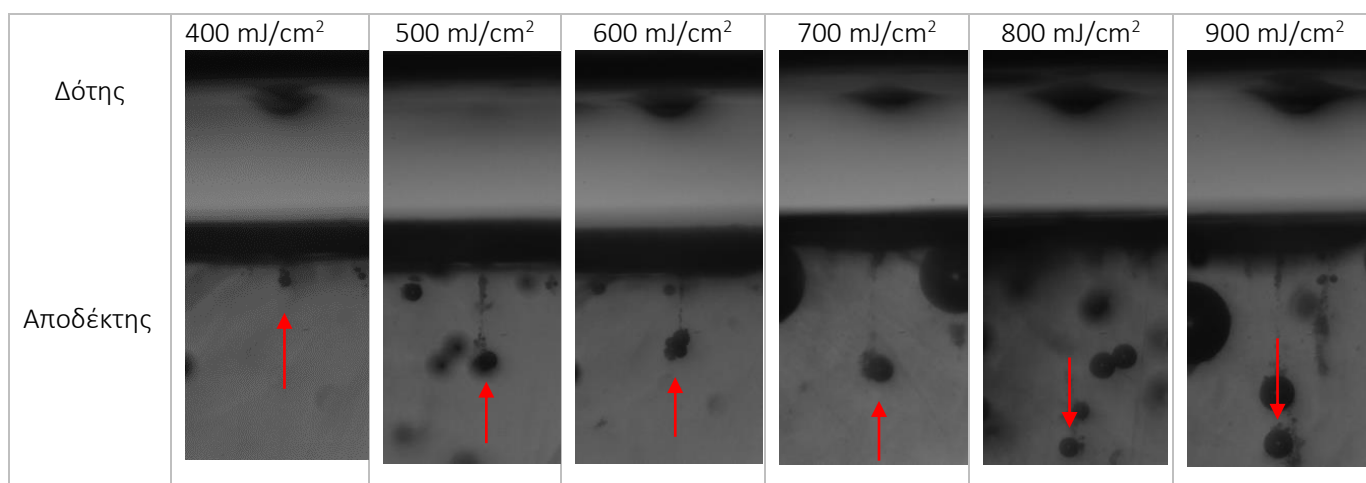


Εικόνα 44: Διαγράμματα συσχέτισης μήκους του 2^{ης} τάξεως πίδακα συναρτήσει του χρόνου για όλες τις ενέργειες/επιφάνεια.

Από τα παραπάνω, φαίνεται ότι το φαινόμενο που αξίζει μεγαλύτερη παρατήρηση είναι πράγματι, η εξέλιξη του 2^{ης} τάξεως πίδακα.

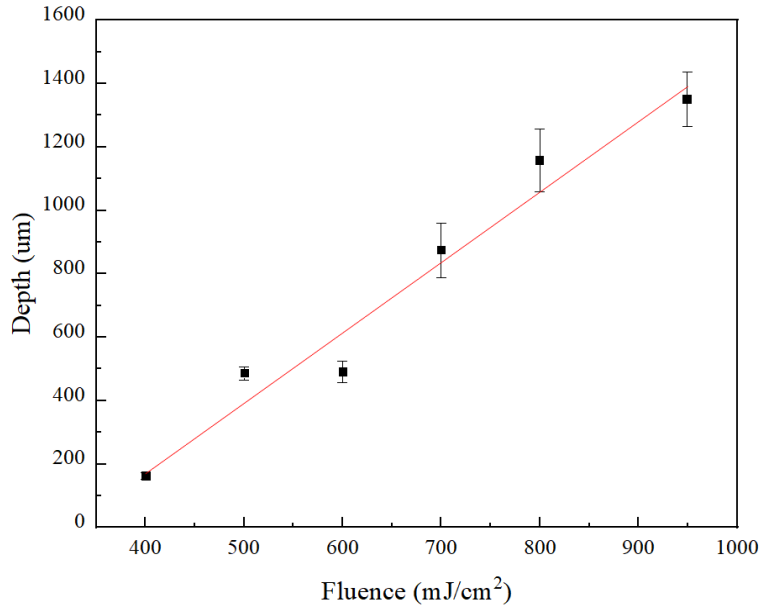
5.2.2 Μελέτη τοποθέτησης κυττάρων στο εσωτερικό εξωκυτταρικής μήτρας με τη χρήση της τεχνικής LIFT

Στη συνέχεια, πραγματοποιήθηκαν πειράματα τοποθέτησης κυττάρων στο εσωτερικό υδρογέλης με ταυτόχρονη παρατήρηση του φαινομένου με τη χρήση της υψηλής ανάλυσης κάμερα Photron. Η απόσταση μεταξύ των υποστρωμάτων δότη και αποδέκτη είναι 1 mm, το διάλυμα κυττάρων προς εκτύπωση σε συγκέντρωση 75.000 κύτταρα/μl και το υπόστρωμα αποδέκτης ήταν η εξωκυτταρικής μήτρα BME. Το BME όπως και το Matrigel είναι και τα δύο μη Νευτώνεια βιο-υλικά [84], στα οποία προσκρούει στην επιφάνειά τους ρευστό υψηλής συγκέντρωσης (πιθανός μη-Νευτώνειο). Στην **Εικόνα 45** φαίνονται στιγμιότυπα από τα εκτυπωμένα κύτταρα στο εσωτερικό του BME, για διάφορες ενέργειες/επιφάνεια, με τη χρήση της τεχνικής LIFT.



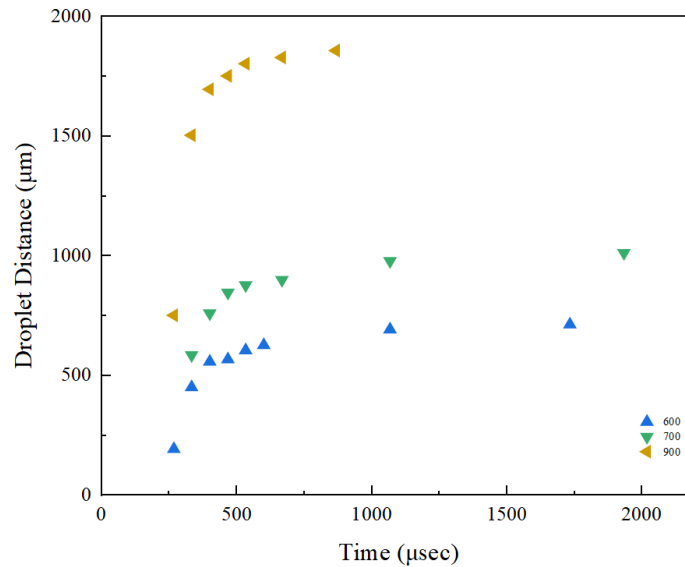
Εικόνα 45: Στιγμιότυπα εκτυπωμένων κυττάρων στο εσωτερικό του ECM, BME.

Συγκεκριμένα, παρατηρείται ότι όσο αυξάνεται η ενέργεια/επιφάνεια του laser, τόσο πιο βαθιά εμφυτεύονται τα κύτταρα. Όταν για παράδειγμα ο πίδακας εισέρχεται με ταχύτητα που αντιστοιχεί στην ταχύτητα πρόσκρουσης στην περίπτωση των 600 mJ/cm² (βλ. **Εικόνα 43** και **Εικόνα 44**), τα κύτταρα θα ακινητοποιηθούν σε βάθος περίπου 450 μm από την επιφάνεια της υδρογέλης. Αυτό παρουσιάζεται στην **Εικόνα 46**, όπου η γραφική παράσταση δείχνει την σχέση εξάρτησης της ενέργειας/επιφάνεια με το βάθος που ακινητοποιούνται (penetration depth) τα κύτταρα όταν βρίσκονται σε αρκετά πυκνή συγκέντρωση στο διάλυμα. Με αυτή την ανάλυση που έγινε στο παρόν κεφάλαιο, γίνεται δυνατή η αρχιτεκτονική και την κατασκευή δομών από κύτταρα στο εσωτερικό υδρογελών έχοντας έλεγχο το βάθος ακινητοποίησης.



Εικόνα 46: Γραφική παράσταση βάθους ακινητοποίησης των κυττάρων συναρτήσει της ενέργειας/επιφάνεια του Laser.

Επιπλέον, πραγματοποιήθηκε και σε αυτή την περίπτωση μελέτη της σχέσης εξέλιξης της εκτυπωμένης σταγόνας με το χρόνο όπου φάνηκε πως η σχέση εξάρτησης φθίνει, δημιουργώντας πλατό, αφού τα κύτταρα ακινητοποιούνται στο βίο-υλικό. Φαίνεται επιπλέον, ότι αυξάνοντας την ενέργεια/επιφάνεια η ταχύτητα διάδοσης του προς εκτύπωση υλικού αυξάνεται (**Εικόνα 47**).



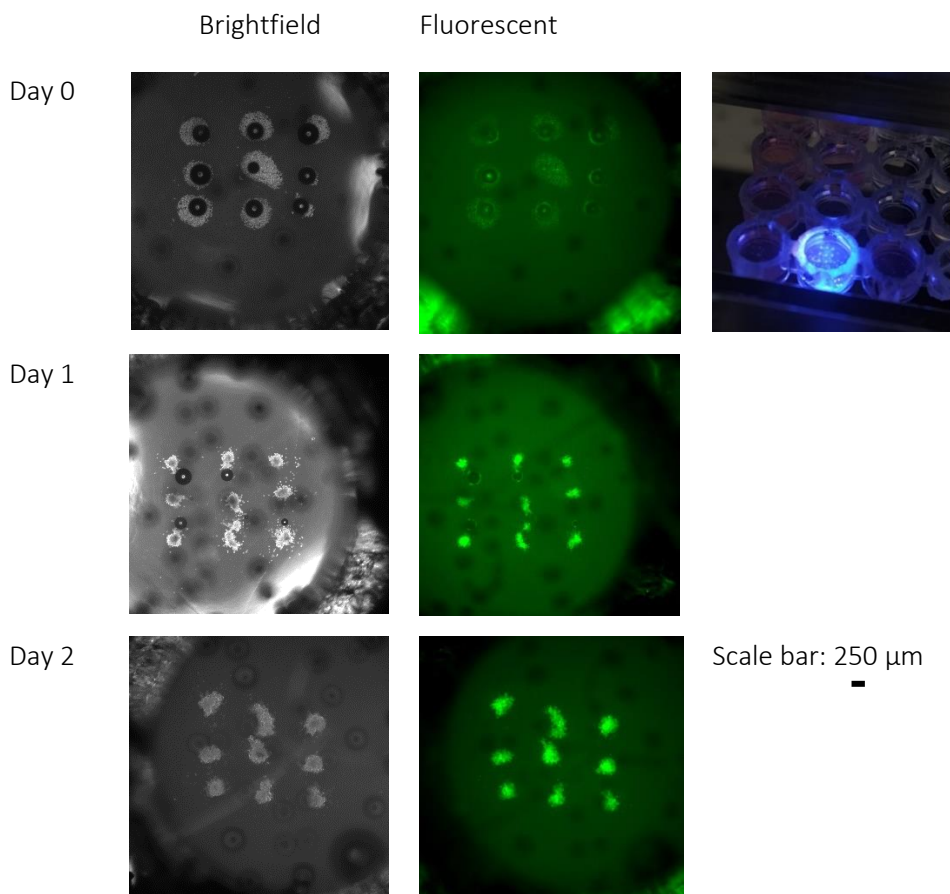
Εικόνα 47: Γραφική παράσταση της απόστασης που διανύει η προς εκτύπωση σταγόνα στο εσωτερικό της υδρογέλης συναρτήσει του χρόνου.

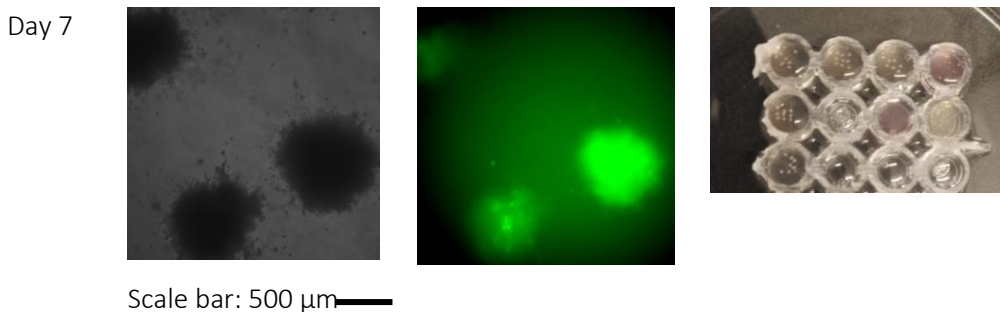
5.3 Εκτύπωση και ανάπτυξη οργανοειδών

Κύριος στόχος της παρούσας εργασίας ήταν η εκτύπωση οργανοειδών, κάτι το οποίο στην βιβλιογραφία δεν έχει πολλές αναφορές με κάποια από όλες τις τεχνικές βίο-εκτύπωσης και συγκεκριμένα με την τεχνική LIFT. Τα οργανοειδή όπως έχει αναφερθεί και στο Κεφάλαιο 3.4.2 είναι τρισδιάστατες δομές κυττάρων που φέρουν τις ιδιότητες του εκάστοτε οργάνου από το οποίο προέρχονται. Το κύριο πρόβλημα για την εναπόθεση τέτοιων τρισδιάστατων δομών είναι το μέγεθός τους. Τα οργανοειδή, ανάλογα με τη διάρκεια ζωής τους, έχουν διάμετρο μεγαλύτερη από 50 μm , συνήθως περίπου 150 μm . Φυσικά, αν διατηρηθούν σε καλλιέργεια για ένα μεγάλο χρονικό διάστημα (περίπου 1 χρόνο) μπορεί να φτάσουν σε μέγεθος κάποια δεκάδες χιλιοστά. Με τεχνικές εκτύπωσης που περιλαμβάνουν ακροφύσιο, εικάζεται ότι θα είναι δύσκολη η εκτύπωσή τους, αφού πιθανώς να βουλώνει από το μεγάλο μέγεθός τους. Με την τεχνική LIFT, όμως βρέθηκε ένας τρόπος ώστε η εκτύπωση οργανοειδών μεγέθους $\sim 150 \mu\text{m}$ να πραγματοποιηθεί.

5.3.1 Ανάπτυξη σφαιροειδών από εκτυπωμένα κύτταρα με τη μέθοδο LIFT

Σε ένα πρώτο στάδιο, πραγματοποιήθηκαν πειράματα εκτύπωσης κυττάρων υψηλής συγκέντρωσης (75.000 κύτταρα/ μm^3) στο εσωτερικό της εξωκυτταρικής μήτρας BME, ώστε να δημιουργηθούν οργανοειδή από εκτυπωμένα κύτταρα. Έτσι, μέσα σε ένα 96άρι πιάτο τοποθετήθηκαν 100 μl από το διάλυμα του ECM BME σε συγκέντρωση 1:1 με DMEM και αφέθηκε 15 λεπτά στον incubator ώστε να γίνει τζελ.





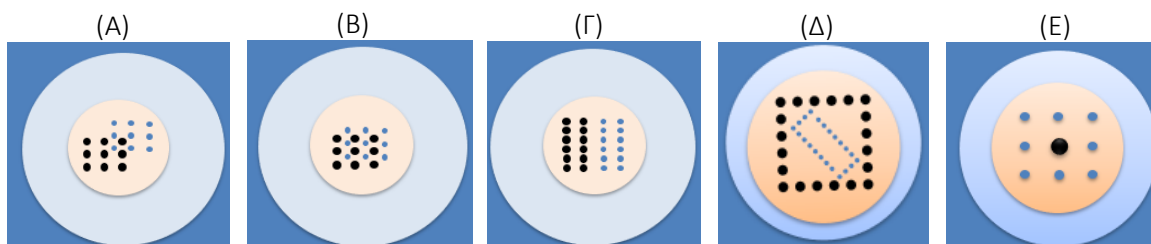
Πίνακας 8: Εκτυπωμένα κύτταρα σε ECM BME για την δημιουργία οργανοειδών.

Στον Πίνακα 8 φαίνονται τα αποτελέσματα της εκτύπωσης σε βάθος 7 ημερών. Συγκεκριμένα, παρατηρήθηκε ότι από την 1^η κιόλας μέρες μετά την εκτύπωση, κάθε εκτυπωμένη δομή έχει σχηματίσει ένα οργανοειδές. Έτσι κάθε οργανοειδές συνεχίζει να μεγαλώνει στο βάθος των ημερών τόσο ώσπου την ημέρα 7 μετά την εκτύπωση τα οργανοειδή είναι διακριτά με το μάτι και έχουν μέγεθος κάποια χιλιοστά. Αυτό έχει ως αποτέλεσμα να μειώνει το χρόνο δημιουργίας οργανοειδών, αφού η δημιουργία τους βιολογικά με την έγχυση κυττάρων σε ECM, χρειάζεται αναμονή κάποιων εβδομάδων ώστε να αποκτήσουν τέτοιο μέγεθος, εάν δεν σπάσει η σταγόνα του ECM λόγω της μεγάλης πυκνότητας των κυττάρων σε αυτή.

5.3.2 Εκτύπωση δύο διαφορετικών κυττάρων στο εσωτερικό μιας ECM (co-bioprinting)

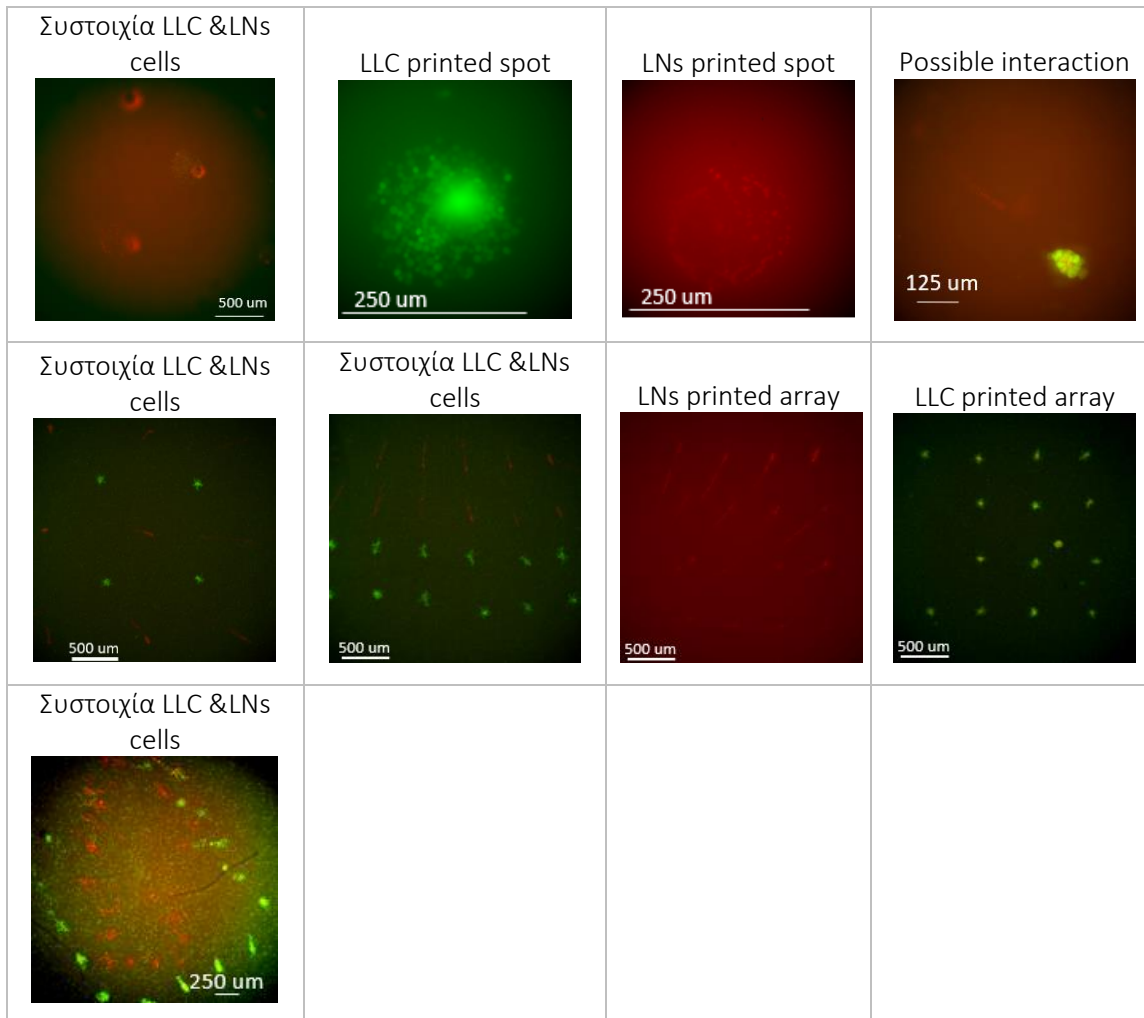
Το πείραμα αυτό μαζί με την γνώση της εξάρτησης βάθους εκτύπωσης συναρτήσει της ενέργειας/επιφάνεια του laser μπορεί να δώσει τη δυνατότητα εκτύπωσης συνδυασμού κυττάρων στο εσωτερικό μιας υδρογέλης για περαιτέρω χρήση στα συστήματα OoC. Συγκεκριμένα στην εργασία αυτή πραγματοποιήθηκαν πειράματα για την μελέτη αλληλεπίδρασης ή μη των εκτυπωμένων καρκινικών κυττάρων του πνεύμονα με πρωταρχικά κύτταρα του ανοσοποιητικού συστήματος (Lymph Node cells) που είχαν εξαχθεί από την σπλήνα ποντικίου. Η αρχική ιδέα είναι ότι με την βίο-εκτύπωση είναι εφικτή η δημιουργία οποιουδήποτε μοτίβου και αρχιτεκτονικής εκτυπωμένων κυττάρων.

Έτσι στο παρόν πείραμα για να εξετασθεί η αλληλεπίδραση μεταξύ των καρκινικών κυττάρων πνεύμονα LLC (Lewis Lung Carcinoma) και του ανοσοποιητικού δοκιμάστηκαν αρκετά σχέδια εκτύπωσης. Επιπλέον, τα κύτταρα είχαν υποστεί επεξεργασία ώστε τα μεν καρκινικά να φθορίζουν στο πράσινο και τα δε κύτταρα του ανοσοποιητικού στο κόκκινο, ώστε να μπορεί να γίνεται εφικτός ο διαχωρισμός τους στο μικροσκόπιο φθορισμού.



Εικόνα 48: Διαφορετικά σχέδια εκτύπωσης των δύο διαφορετικών κυττάρων, με σκοπό την εύρεσης ή μη αλληλεπίδρασής τους.

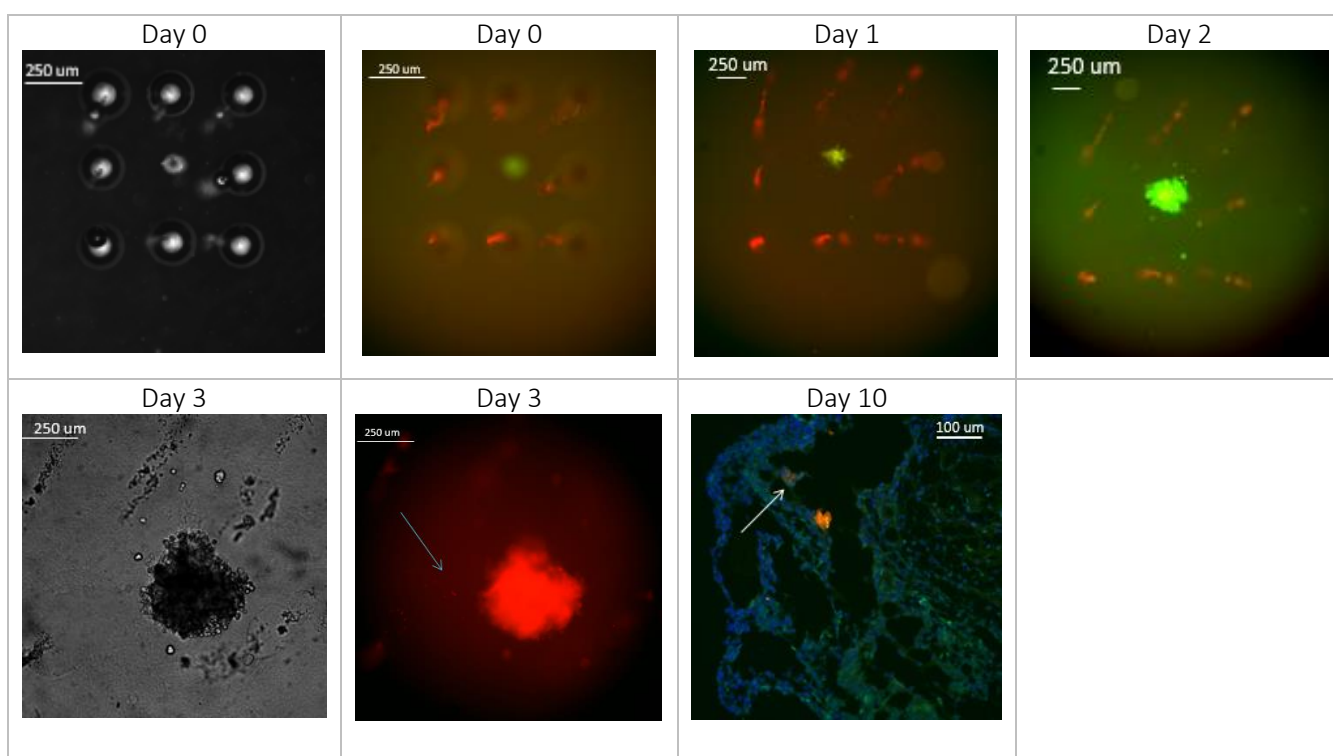
Αρχικά, τα δύο είδη κυττάρων εκτυπώθηκαν όπως φαίνεται στην **Εικόνα 48Α** και **Β**, όπου οι μαύρες τελείες συμβολίζουν τα καρκινικά κύτταρα LLC ενώ οι μπλε τα κύτταρα του ανοσοποιητικού, δηλαδή σε μία συστοιχία 3x3 το καθένα, όπου μπλέκονται μεταξύ τους ώστε να δημιουργούνται διαφορετικές αποστάσεις μεταξύ των δύο ειδών εκτυπωμένων κυττάρων. Στη συνέχεια, στην **Εικόνα 48 Γ**, εκτυπώθηκαν σε δύο κάθετες σειρές με σκοπό να παρατηρηθεί αλληλεπίδραση των πιο κοντινά εκτυπωμένων κυττάρων και όχι αυτών στην εξωτερική πλευρά του τζελ. Η μετάβαση σε αυτό το σχέδιο ήταν κυρίως για την ύπαρξη μιας πιο εύκολης συστοιχίας μεταξύ των δύο ειδών κυττάρων. Στην **Εικόνα 48Δ**, επιχειρήθηκε η εκτύπωση ενός πιο δύσκολου μοτίβου, ώστε να γίνει εφικτή η αξιολόγηση περισσότερων αποστάσεων για τυχόν αλληλεπίδραση μεταξύ των κυττάρων, ενώ τελικά το πείραμα κατέληξε στην μελέτη του τελευταίου μοτίβου της **Εικόνα 48Ε**, όπου εκτυπώθηκε μία κεντρική δομή από καρκινικά κύτταρα στο κέντρο της σταγόνας από Matrigel και γύρω του εκτυπώθηκε μία δομή 3x3 (χωρίς το κεντρικό) από κύτταρα του ανοσοποιητικού. Στην παρακάτω **Εικόνα 49** φαίνονται ενδεικτικά κάποιες φωτογραφίες από τα πειράματα που έγιναν σε φθορίζον μικροσκόπιο.



Εικόνα 49: Εκτυπωμένα καρκινικά κύτταρα πνεύμονα LLC και κύτταρα ανοσοποιητικού σε υπόστρωμα σταγόνας Matrigel σε διάφορα μοτίβα για την διερεύνηση πιθανής αλληλεπίδρασης.

Από τα πειράματα που έγιναν φαίνεται τα εκτυπωμένα κύτταρα του ανοσοποιητικού να έχουν μία πορεία προς τα καρκινικά κύτταρα, τα οποία σχημάτιζαν οργανοειδή την ημέρα μετά την εκτύπωση. Έτσι χρειάστηκε να πραγματοποιηθεί ένα πείραμα όπου να φαίνεται αν η κίνηση των κυττάρων του ανοσοποιητικού που παρατηρήθηκε είναι πράγματι προσανατολισμένη προς τα καρκινικά. Τα LLC κύτταρα ήταν σε διάλυμα συγκέντρωσης 70.000 κύτταρα/μl, ενώ τα κύτταρα του ανοσοποιητικού 1.000.000 κύτταρα/μl. Επιπλέον, η ενέργεια/επιφάνεια του laser ήταν 420 mJ/cm² και η απόσταση μεταξύ των υποστρωμάτων δότη και αποδέκτη 1mm.

Παρατηρήθηκε ότι τα εκτυπωμένα κύτταρα του ανοσοποιητικού της πάνω αριστερά γωνίας κατευθύνονται προς το καρκινικό οργανοειδές στο κέντρο, όμως τα υπόλοιπα ενώ θα ήταν αναμενόμενο να είχαν και αυτά προσανατολισμό προς το οργανοειδές έχουν όλα την ίδια φορά. Από αυτό βγαίνει το συμπέρασμα ότι τα κύτταρα του ανοσοποιητικού έχουν κατηφορική πορεία μέσα στο τρισδιάστατο ECM.



Εικόνα 50: Εικόνες εκτυπωμένων καρκινικών κυττάρων και κυττάρων του ανοσοποιητικού συστήματος.

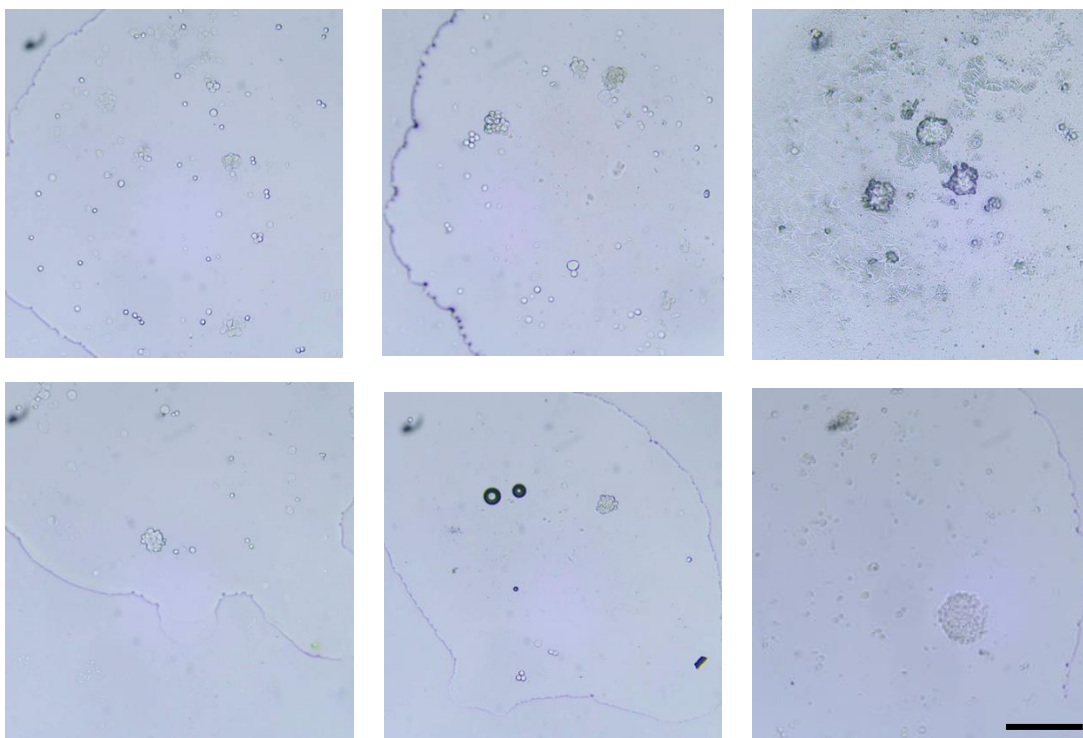
Την τρίτη ημέρα όμως μετά την εκτύπωση, κάποια κύτταρα του ανοσοποιητικού να αλλάζουν πορεία (Εικόνα 50) και να στρέφονται προς το οργανοειδές και πράγματι έπειτα από ανάλυση του καρκινικού οργανοειδούς βρέθηκε ότι κάποια κύτταρα φθόριζαν στο κόκκινο, επομένως ήταν κύτταρα του ανοσοποιητικού συστήματος. Το ποσοστό αυτών των κυττάρων που κατάφεραν να εισέλθουν στο καρκινικό οργανοειδές είναι πάρα πολύ μικρό ώστε να μπορεί να εξαχθεί κάποιο συμπέρασμα από αυτό, όμως αυτή η μελέτη πρόκειται να συνεχισθεί κάνοντας προσθήκη κάποιων ενζύμων που υποβοηθούν την λειτουργία των κυττάρων του ανοσοποιητικού (il-2).

5.3.3 Απευθείας εκτύπωση οργανοειδών με τη μέθοδο LIFT

Τέλος, για την απευθείας εκτύπωση οργανοειδών, όπως έχει ήδη αναφερθεί, υπήρχαν αρκετά προβλήματα στην διαδικασία. Το πρώτο πρόβλημα ήταν το μέγεθός τους (>80μm) ενώ, ένα από τα κύρια προβλήματα είναι η αδυναμία μέτρησής τους στο αιμοκυτταρόμετρο (Neubauer), λόγω του μεγέθους τους. Αυτό έχει ως αποτέλεσμα να μη δίνεται η δυνατότητα στο χειρισμό της συγκέντρωσής τους μέσα στο διάλυμα του βίο-μελανιού. Έτσι, η διαδικασία εκτύπωσης έχει μεγάλο ποσοστό τυχαιότητας για τον αν η δέσμη του laser θα προσκρούσει σε σημείο του υποστρώματος δότη που στην κάτω επιφάνειά του θα βρίσκεται ένα οργανοειδές. Στην περίπτωση εκτύπωσης κυττάρων αυτό το πρόβλημα δεν υπάρχει καθώς τα κύτταρα τοποθετούνται σε τόσο πυκνή συγκέντρωση στην επιφάνεια του δότη ώστε σε οποιοδήποτε σημείο προσπίψει η δέσμη του laser να εναποθέσει έναν ικανοποιητικό αριθμό κυττάρων.

Το πρώτο πρόβλημα λύθηκε με την προσαρμογή του μεγέθους της δέσμης του laser από το σύστημα τηλεσκοπίου όπως αναφέρθηκε στο Κεφάλαιο **Error! Reference source not found.** Συγκεκριμένα, η δέσμη διεστάλλει τόσο που η επιφάνεια που εκτοπίζεται το υλικό από το υπόστρωμα του δότη έφτασε 160 μm (συνήθως τα πειράματα γίνονται με spot size~ 65μm).

Έτσι, επιτεύχθηκε η πρώτη εκτύπωση οργανοειδών με την χρήση της τεχνικής LIFT όπου, όπως φαίνεται στην **Εικόνα 51** εναποτέθηκαν με τυχαίο τρόπο οργανοειδή στην επιφάνεια μια καλυπτρίδας.

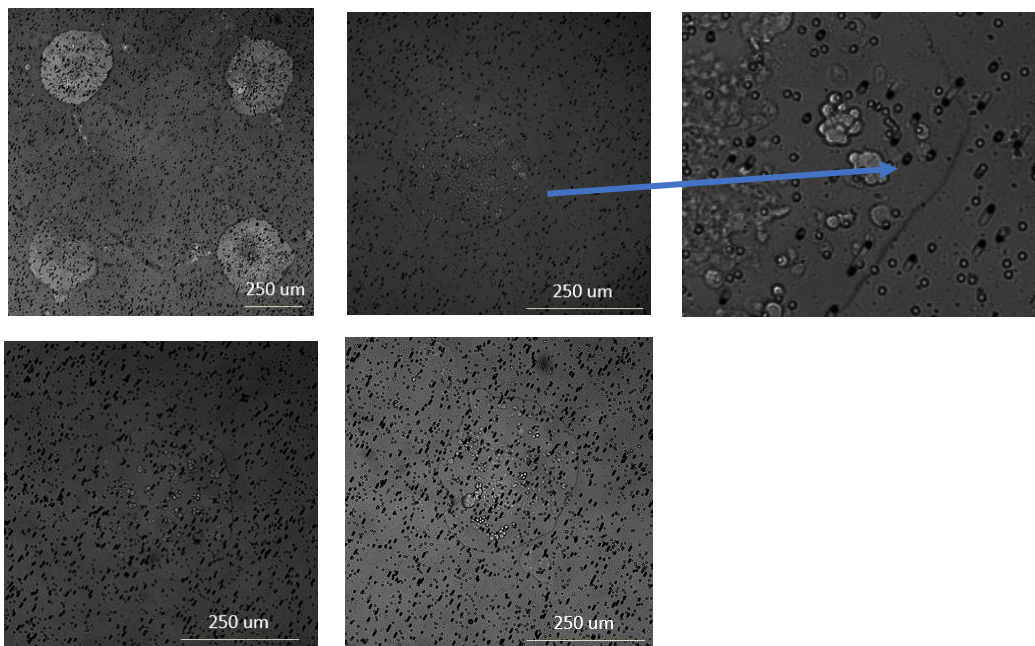


Εικόνα 51: 1^η εκτύπωση οργανοειδών με τη χρήση της τεχνικής LIFT. Scale bar: 150 μm.

Συγκεκριμένα για την εκτύπωση οργανοειδών αρχικά, χρειάζεται να δημιουργηθούν τα οργανοειδή. Έτσι σύμφωνα με το πρωτόκολλο του Κεφαλαίου 4.2.3 και έπειτα από συνήθως 5 ημέρες που θα έχουν σχηματιστεί τα οργανοειδή μέσα στην εκάστοτε εξωκυτταρική μήτρα, φυγοκεντρώνονται και

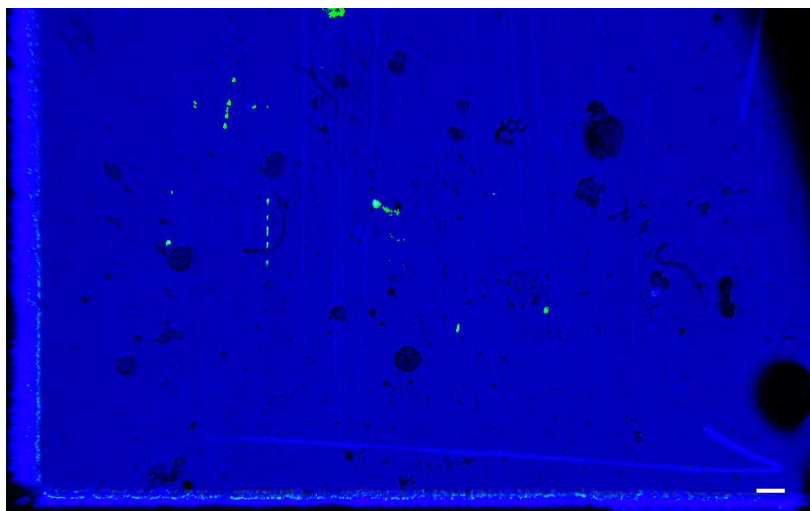
επαναδιαλύονται σε πολύ μικρό όγκο (λ.χ. 40 μ l) ώστε να είναι όσο πιο πυκνά γίνεται όταν εναποτίθενται στην επιφάνεια του υποστρώματος δότη. Όπως φαίνεται στην παραπάνω σε κάθε σταγόνας εκτύπωσης εναποτέθηκαν το πολύ 2-3 οργανοειδή, ενώ μπορεί σε κάποιες περιπτώσεις να μην εναποτέθηκε κανένα.

Σε ένα επόμενο πείραμα (Εικόνα 52), και πάλι εκτυπώθηκαν οργανοειδή με τον ίδιο τρόπο σε μεμβράνη PET αλλά αυτή τη φορά σε συστοιχία (array) 2x2 ενώ στη συνέχεια εμβαπτίστηκαν στο θρεπτικό τους υλικό. Σε αυτή την περίπτωση 2 στις 4 εκτυπωμένες δομές εμπεριείχαν οργανοειδή, γεγονός που δεν κάνει επιτυχημένη την εκτύπωση αυτή.



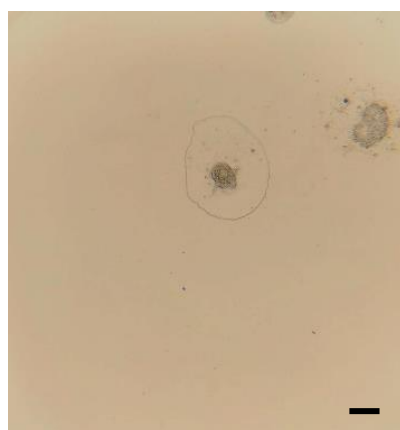
Εικόνα 52: 2^η προσπάθεια εκτύπωση οργανοειδών σε μεμβράνη PET σε συστοιχία 2x2.

Από τα παραπάνω έγινε κατανοητό πως για να εκτυπωθούν οργανοειδή με τη τεχνική LIFT, είναι απαραίτητο η διαδικασία να είναι πιο «διάφανη» στον χειρισμό της. Έτσι για την επίτευξη εκτύπωσής τους χρειάζεται να απεικονίζονται τα οργανοειδή στην επιφάνεια του δότη ώστε η διαδικασία εκτύπωσης να γίνει πλήρως ελεγχόμενη. Για αυτόν τον λόγο η διάταξη φωτισμού μετατράπηκε σε trans-illumination (Κεφάλαιο 4.1.3), δηλαδή το δείγμα μας βρίσκεται ανάμεσα στη λάμπα LED και στον σένσορα της κάμερας, με αποτέλεσμα τα οργανοειδή να απεικονίζονται στην επιφάνεια του δότη μέσα από το λογισμικό της κάμερας στην οθόνη του υπολογιστή και με τη χρήση των δειγματοφορέων, το προς εκτύπωση οργανοειδές, μεταφέρεται στο σημείο που θα προσπίψει η δέσμη του laser ώστε να εναποτεθεί στο εκάστοτε υπόστρωμα αποδέκτη.



Εικόνα 53: Απεικόνιση οργανοειδών στην επιφάνεια του υποστρώματος δότη. Scale bar: 100 μm .

Στην **Εικόνα 53**, φαίνεται η επιφάνεια του δότη με μερικά αραιά κατανομημένα οργανοειδή, όπως επιτεύχθηκε να απεικονισθεί. Με αυτόν τον τρόπο δίνεται επιπλέον η δυνατότητα εκτύπωσης οποιουδήποτε μεγέθους οργανοειδών, αφού μπορεί να γίνει στόχευση (targeting) του επιθυμητού και να εναποτεθεί στο υπόστρωμα.



Εικόνα 54: 1^η επιτυχημένη προσπάθεια στοχευμένης εκτύπωσης οργανοειδών με την χρήση της τεχνικής LIFT. Scale bar: 100 μm .

Στην **Εικόνα 54**, φαίνεται το οργανοειδές καρκίνου του πνεύμονα που εκτυπώθηκε στην επιφάνεια μιας καλυπτρίδας με τη χρήση της τεχνικής LIFT. Με την συνέχεια αυτής της μελέτης, θα επαναληφθούν τα πειράματα στοχευμένης εκτύπωσης ενός και μοναδικού οργανοειδούς, Single Organoid printing, και στη συνέχεια θα κρατηθούν σε συνθήκες καλλιέργειας.

5.4 Εναπόθεση κυττάρων σε μικροροϊκές πλατφόρμες ΟοC με τη χρήση της τεχνικής βίο-εκτύπωσης LIFT

Έπειτα από την βελτιστοποίηση όλων των απαραίτητων παραμέτρων βίο-εκτύπωσης (ύψος, ενέργεια/επιφάνεια/υπόστρωμα αποδέκτη) επιτεύχθηκε η εκτύπωση κυττάρων στο εσωτερικών των θαλάμων ενός ΟοC. Συγκεκριμένα, για να πραγματοποιηθεί η διαδικασία την εκτύπωσης, κατασκευάστηκε ένα διαφορετικό είδος υποστρώματος δότη, το οποίο δίνει την δυνατότητα εισχώρησης στο εσωτερικό του θαλάμου ώστε να επιτυγχάνεται η μικρότερη δυνατή απόσταση μεταξύ δότη και αποδέκτη, δηλαδή αυτή του 1 χιλιοστού, που έχει κριθεί η βέλτιστη για εκτύπωση.



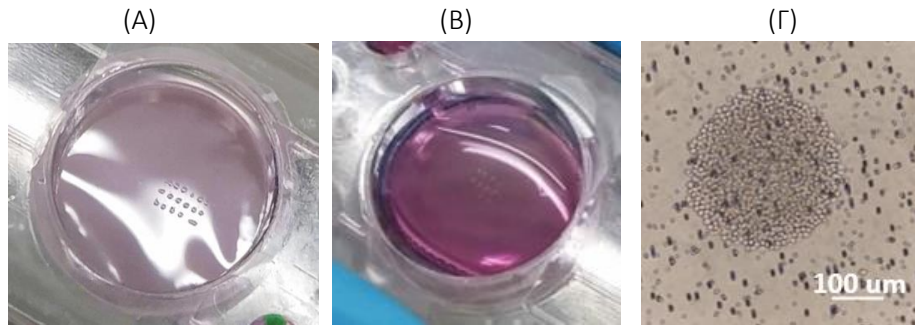
Εικόνα 55: Νέα κατασκευή δότη, που παρέχει τη δυνατότητα εκτύπωσης στο εσωτερικό των θαλάμων των μικροροϊκών πλατφόρμων.

Η κατασκευή αυτή, (**Εικόνα 55**) κρίθηκε απαραίτητη, διότι ο θάλαμος της μικροροϊκής πλατφόρμας που χρησιμοποιήθηκε έχει βάθος 5 mm, με αποτέλεσμα το υπόστρωμα του δότη να απέχει από το υπόστρωμα του αποδέκτη λίγο περισσότερο από 5 mm. Η κατασκευή αυτή έγινε με τη χρήση ενός τρισδιάστατου εκτυπωτή ρητίνης (3D-resin-printer).

Με αυτόν τον τρόπο, δόθηκε η δυνατότητα εκτύπωσης της καρκινικής κυτταρικής σειράς LLC στο εσωτερικό του ΟοC. Οι συνθήκες που χρησιμοποιήθηκαν ήταν οι εξής:

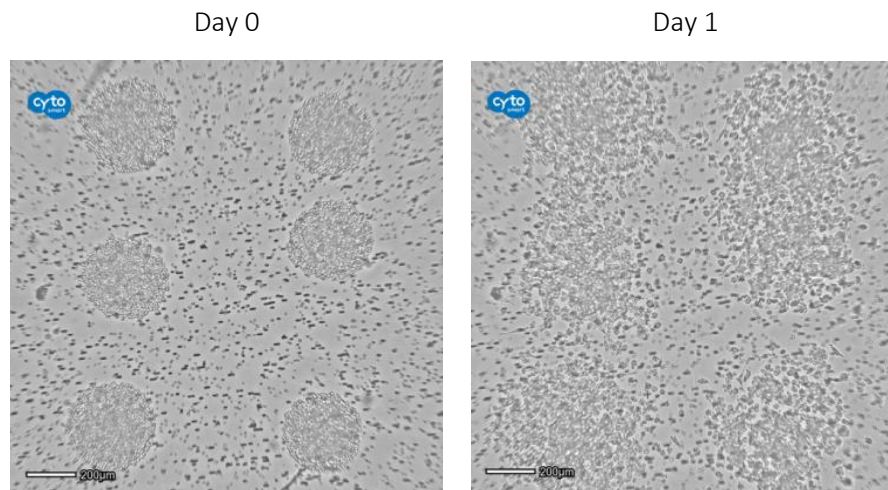
- Ενέργεια ανά επιφάνεια του laser: 500 mJ/cm²
- Απόσταση δότη-αποδέκτη: 1 mm
- Υπόστρωμα αποδέκτη: Μεμβράνη PET (8μm μέγεθος πόρων)
- Επικάλυψη υποστρώματος αποδέκτη: Κολλαγόνο (2D coating)
- Συγκέντρωση κυττάρων: 75.000 κύτταρα/μl

Εκτυπώθηκε επιτυχώς μια συστοιχία δομών 2x6 και στη συνέχεια η πλατφόρμα γέμισε με το θρεπτικό τους υλικό, τόσο κάτω (**Εικόνα 56A**) από την μεμβράνη όσο και από πάνω (**B**). Στην **Εικόνα 56Γ** φαίνεται μία από τις εκτυπωμένες δομές με κύτταρα στο εσωτερικό της μικροροϊκής πλατφόρμας.



Εικόνα 56: Εκτυπωμένα κύτταρα σε συστοιχία 2x6 στο εσωτερικό του θαλάμου ενός OoC. Α) Τοποθέτηση του θρεπτικού υλικού κάτω από την μεμβράνη, Β) έγχυση του θρεπτικού υλικού πάνω από την μεμβράνη στον θάλαμο και Γ) εκτυπωμένη δομή με κύτταρα από το μικροσκόπιο.

Επιπλέον, στο παρόν πείραμα, καταγράφηκε η εξέλιξη των εκτυπωμένων κυττάρων από μικροσκόπιο ζωντανής απεικόνισης (Live Imaging Microscope) της εταιρείας CytoSmart, τοποθετημένο στο εσωτερικό του incubator. Με αυτόν τον τρόπο, παρατηρήθηκαν τα κύτταρα να πολλαπλασιάζονται και οι δομές τους να γίνονται σχεδόν διπλάσιες, ήδη, μετά την 1^η μέρα της εκτύπωσης, όπως φαίνεται στην **Εικόνα 57**.



Εικόνα 57: Παρατήρηση των εκτυπωμένων δομών με κύτταρα με μικροσκόπιο ζωντανής απεικόνισης.

Συμπεράσματα

Το αντικείμενο της παρούσας μεταπτυχιακής εργασίας, αφορά την χρήση της τεχνικής εκτύπωσης με laser, LIFT, για την εκτύπωση κυττάρων και οργανοειδών σε μικροροϊκές πλατφόρμες Organ-on-a-chip. Η τεχνική εκτύπωσης με laser, LIFT είναι μια τεχνική απευθείας εγγραφής, στην οποία δυνατή η ανάπτυξη μικροδομών. Η αρχή λειτουργίας της τεχνικής βασίζεται στην ακτινοβολήση με ένα παλμό laser σε ένα υπόστρωμα δότη, στον οποίο επιστρώνεται το προς εναπόθεση υλικό. Η δυνατότητα απευθείας βιο-εκτύπωσης, ξεχωρίζει την τεχνική αυτή από τις υπόλοιπες, κυρίως για την μη αναγκαιότητα ύπαρξης ακροφύσιου, το οποίο δημιουργεί πολλά προβλήματα με υλικά υψηλότερου ιξώδους και με κυτταρικές δομές μεγαλύτερων μεγεθών καθώς αποφράζουν στην άκρη του ακροφύσιου. Έτσι, η τεχνική βιο-εκτύπωσης με τη χρήση της τεχνικής LIFT ξεχωρίζει για την εναπόθεση κυττάρων και οργανοειδών σε OoC πλατφόρμες. Συγκεκριμένα, στην παρούσα εργασία επιτεύχθηκε η βελτιστοποίηση όλων των παραμέτρων για εκτύπωση κυττάρων σε υψηλή συγκέντρωση (75.000 κύτταρα/μl). Η απόσταση μεταξύ δότη και αποδέκτη, το είδος του υποστρώματος, η ενέργεια ανά επιφάνεια του laser αλλά και ο αριθμός των κυττάρων που εναποτίθενται ανάλογα την ενέργεια του laser, είναι όλα παράμετροι που βρέθηκαν σε αυτή την εργασία. Συγκεκριμένα, βγήκε το συμπέρασμα ότι οι βέλτιστες συνθήκες για εκτύπωση κυττάρων σε δισδιάστατη επιφάνεια είναι: απόσταση εκτύπωσης: 1 mm, υπόστρωμα αποδέκτη: μεμβράνη με επικάλυψη από ζελατίνη και ενέργεια ανά επιφάνεια του laser: 400-600 mJ/cm². Για την εκτύπωση κυττάρων αλλά σε τρισδιάστατο χώρο, είναι απαραίτητη η χρήση ενός ECM ως υπόστρωμα αποδέκτη. Επιπλέον, βρέθηκε πως οι εκτυπωμένες δομές με κύτταρα σε ECM διαμορφώνουν οργανοειδή από την 1^η κιάλας μέρα μετά την εκτύπωση. Επιπλέον, πραγματοποιήθηκε εκτενής μελέτη της εξέλιξης του πίδακα εκτύπωσης με κάμερα υψηλής ανάλυσης, για κύτταρα υψηλής συγκέντρωσης και παρατηρήθηκε αστάθεια στις 1^{ης} τάξεως πίδακα όπως έχει σημειωθεί και στην βιβλιογραφία, καθώς και μεγαλύτερη συνοχή στον πίδακα 2^{ης} τάξεως. Φαίνεται ο πίδακας 2^{ης} τάξεως να είναι αυτός που εναποθέτει το μεγαλύτερο ποσοστό των κυττάρων, καθώς είναι πιο παχύς και συνεχόμενος σε σχέση με τον 1^ο πίδακα που «σπάει» αρκετά νωρίς και είναι πολύ λεπτός. Σε συνέχεια, η κάμερα υψηλής ανάλυσης αξιοποιήθηκε για την παρατήρηση του φαινομένου εκτύπωσης στο εσωτερικό των ECM. Εκεί, φάνηκε τα κύτταρα να ακινητοποιούνται σε διαφορετικό βάθος μέσα στο μάρτριξ, αναλόγως την ενέργεια ανά επιφάνεια του laser. Αυτό είναι αρκετά σημαντικό για την εργαλειοποίηση της τεχνικής καθώς μπορούν να «χτιστούν» στιβάδες εκτυπωμένων κυττάρων στο εσωτερικών υδρογελών με πλήρη έλεγχο της διαδικασίας. Σε συνέχεια των πειραμάτων, εκτυπώθηκαν κύτταρα υψηλής συγκέντρωσης σε ECM, όπου και καλλιεργήθηκαν για πάνω από 7 ημέρες και διαμόρφωσαν οργανοειδή μεγεθών μεγαλύτερα από 200 μm. Επίσης, επιτεύχθηκε εκτύπωση διαφορετικών κυττάρων για την έρευνα πιθανής αλληλεπίδρασης μεταξύ τους. Συγκεκριμένα, εκτυπώθηκαν καρκινικά κύτταρα του πνεύμονα με κύτταρα του ανοσοποιητικού (Lymph Node cells) σε διαφορετικές διατάξεις μεταξύ τους και παρατηρήθηκε η συμπεριφορά της πιθανής αλληλεπίδρασής τους. Ένας από τους μεγαλύτερους στόχους αυτής της εργασίας ήταν η εκτύπωση καρκινικών οργανοειδών, γεγονός που ήταν αρκετά περίπλοκο και δύσκολο, κυρίως λόγω του μεγάλου μεγέθους που έχουν και της μη δυνατότητας να μπορούν να συμπυκνωθούν σε μικρότερο όγκο ώστε σε οποιοδήποτε σημείο του δότη και να προσπίψει η δέσμη του laser να μπορέσει να εναποθέσει κάποιο. Το πρόβλημα αυτό λύθηκε, και η ελεγχόμενη εκτύπωση οργανοειδών πραγματοποιήθηκε με επιτυχία. Τέλος, με την βελτιστοποίηση όλων παραμέτρων και την έρευνα της εκτύπωσης σε μεμβράνες και σε άλλα υλικά, δημιουργήθηκε όλη η απαραίτητη γνώση για την επίτευξη της εκτύπωσης κυττάρων στο εσωτερικό των θαλάμων σε Organ-on-a-chip πλατφόρμες.

Μέσα από αυτή την εργασία, αναδεικνύεται η σημαντικότητα της βιο-εκτύπωσης με τη χρήση της τεχνικής LIFT σε μικροροϊκές πλατφόρμες, αλλά και γενικότερα φαίνεται η σημασία της βιο-εκτύπωσης στο διακλαδικό τομέα της βιο-μηχανικής. Με την τεχνική αυτή, δίνεται πλήρης έλεγχος της εναπόθεσης

μεγάλης ποικιλίας βίο-υλικών είτε με υψηλά ιξώδη, είτε με μεγάλα μεγέθη. Η τεχνική αυτή λόγω του μεγάλου εύρους στις ταχύτητες εναπόθεσης που έχει, αλλά και λόγω της γρήγορης διεκπεραίωσης της εκτύπωσης προσφέρει την ακινητοποίηση των κυττάρων σε οποιοδήποτε υπόστρωμα, καθώς και την εγκυρότητα της βιωσιμότητας των κυττάρων.

Μελλοντικές κατευθύνσεις

Στα πλαίσια της μεταπτυχιακής εργασίας, πραγματοποιήθηκαν ποικίλα πειράματα με τη χρήση της τεχνικής βίο-εκτύπωσης με laser, LIFT. Είναι πολύ σημαντικό να γίνει περαιτέρω ανάλυση της διαδικασίας βίο-εκτύπωσης όσον αφορά την ρευστομηχανική συμπεριφορά των βίο-μελανιών. Μέσα από αυτή την εργασία, ανοίγει ένα κεφάλαιο προς διερεύνηση με την αλληλεπίδραση των εκτυπωμένων κυττάρων στην εκάστοτε εξωκυτταρική μήτρα, ECM. Επιπλέον, η εκτύπωση οργανοειδών χρειάζεται αρκετή έρευνα στην εκ νέου βελτιστοποίηση όλων των παραμέτρων βίο-εκτύπωσης. Τέλος η εναπόθεση διαφορετικών ειδών κυττάρων με τη χρήση της τεχνικής LIFT είναι κάτι πολύ ενδιαφέρον με πιθανά αποτελέσματα, στο οποίο αξίζει να δοθεί σημασία. Ένα από τα βασικά μελλοντικά σχέδια, είναι και η περαιτέρω εκτύπωση κυττάρων και οργανοειδών σε πλατφόρμες OoC.

Βιβλιογραφία

- [1] “Grimm D, ‘U.S. EPA to eliminate all mammal testing by 2035.’ Accessed: Sep. 10, 2019. [Online]. Available: <https://www.science.org/content/article/us-epa-eliminate-all-mammal-testing-2035>”.
- [2] A. A. Antoshin *et al.*, “LIFT-bioprinting, is it worth it?,” *Bioprinting*, vol. 15, p. e00052, 2019, doi: 10.1016/j.bprint.2019.e00052.
- [3] H. Esrom, J. Y. Zhang, U. Kogelschatz, and A. J. Pedraza, “New approach of a laser-induced forward transfer for deposition of patterned thin metal films,” *Appl. Surf. Sci.*, vol. 86, no. 1–4, pp. 202–207, 1995, doi: 10.1016/0169-4332(94)00385-8.
- [4] 45. Tolbert WA, Lee IYS, Doxtader MM et al (1993), *J Imaging Sci Tech* 37:411–422, “No Title”.
- [5] “No Tolbert WA, Lee IYS, WenXet al (1993b), *J Imaging Sci Tech* 37:485–489 Title”.
- [6] P. K. Wu and B. R. Ringeisen, “Development of human umbilical vein endothelial cell (HUVEC) and human umbilical vein smooth muscle cell (HUVSMC) branch/stem structures on hydrogel layers via biological laser printing (BioLP),” *Biofabrication*, vol. 2, no. 1, 2010, doi: 10.1088/1758-5082/2/1/014111.
- [7] P. K. Wu *et al.*, “The deposition, structure, pattern deposition, and activity of biomaterial thin-films by matrix-assisted pulsed-laser evaporation (MAPLE) and MAPLE direct write,” in *Thin Solid Films*, 2001, vol. 398–399, pp. 607–614. doi: 10.1016/S0040-6090(01)01347-5.
- [8] H. D. Young, R. Modi, and M. Bucaro, “Generation of mesoscopic patterns of viable *Escherichia coli* by ambient laser transfer,” vol. 23, pp. 161–166, 2002.
- [9] A. Karaïskou, I. Zergioti, C. Fotakis, M. Kapsetaki, and D. Kafetzopoulos, “Microfabrication of biomaterials by the sub-ps laser-induced forward transfer process,” vol. 209, pp. 245–249, 2003, doi: 10.1016/S0169-4332(02)01396-X.
- [10] V. Dinca, M. Farsari, D. Kafetzopoulos, A. Popescu, M. Dinescu, and C. Fotakis, “Patterning parameters for biomolecules microarrays constructed with nanosecond and femtosecond UV lasers,” vol. 516, pp. 6504–6511, 2008, doi: 10.1016/j.tsf.2008.02.043.
- [11] P. Serra, J. M. Fernández-pradas, M. Colina, and M. Duocastella, “Laser-induced forward Transfer : a Direct-writing Technique for Biosensors Preparation,” vol. 1, no. 3, pp. 236–242, 2006, doi: 10.2961/jlmm.2006.03.0017.
- [12] J. A. Barron, H. D. Young, D. D. Dlott, M. M. Darfler, D. B. Krizman, and B. R. Ringeisen, “Printing of protein microarrays via a capillary-free fluid,” pp. 4138–4144, 2005, doi: 10.1002/pmic.200401294.
- [13] “Doraiswamy A, Narayan RJ, Lippert T et al (2006), *Appl Surf Sci* 252:4743–4747, 49”.
- [14] “Othon, C. M., Wu, X., Anders, J. J., & Ringeisen, B. R. (2008). *Biomedical Materials* (Bristol, England), 3(3), 034101.”.
- [15] F. Guillemot *et al.*, “High-throughput laser printing of cells and biomaterials for tissue engineering,” *Acta Biomater.*, vol. 6, no. 7, pp. 2494–2500, 2010, doi: 10.1016/j.actbio.2009.09.029.
- [16] B. Guillotin *et al.*, “Laser assisted bioprinting of engineered tissue with high cell density and microscale organization,” *Biomaterials*, vol. 31, no. 28, pp. 7250–7256, 2010, doi: 10.1016/j.biomaterials.2010.05.055.
- [17] “Gruene M, Pflaum M, Deiwick A, Koch L, Schlie S, Unger C, Wilhelmi M, Haverich A and Chichkov B N 2011 Adipogenic differentiation of laser-printed 3D tissue grafts consisting of human adipose-derived stem cells *Biofabrication* 3”.
- [18] “Gruene M, Deiwick A, Koch L, Schlie S, Unger C, Hofmann N, Bernemann I, Glasmacher B and Chichkov B 2011 Laser Printing of Stem Cells for Biofabrication of Scaffold-Free Autologous Grafts *Tissue Eng. Part C Methods* 17 79–87”.

- [19] “Catros S, Guillotin B, Bačáková M, Fricain J-C and Guillemot F 2011 Effect of laser energy, substrate film thickness and bioink viscosity on viability of endothelial cells printed by LaserAssisted Bioprinting Appl. Surf. Sci. 257 5142–7”.
- [20] S. Catros *et al.*, “Laser-assisted bioprinting for creating on-demand patterns of human osteoprogenitor cells and nano-hydroxyapatite,” *Biofabrication*, vol. 3, no. 2, 2011, doi: 10.1088/1758-5082/3/2/025001.
- [21] S. Catros *et al.*, “Layer-by-layer tissue microfabrication supports cell proliferation in vitro and in vivo,” *Tissue Eng. - Part C Methods*, vol. 18, no. 1, pp. 62–70, 2012, doi: 10.1089/ten.tec.2011.0382.
- [22] L. Koch *et al.*, “Skin tissue generation by laser cell printing,” *Biotechnol. Bioeng.*, vol. 109, no. 7, pp. 1855–1863, 2012, doi: 10.1002/bit.24455.
- [23] D. M. Kingsley, A. D. Dias, D. B. Chrisey, and D. T. Corr, “Single-step laser-based fabrication and patterning of cell-encapsulated alginate microbeads,” *Biofabrication*, vol. 5, no. 4, 2013, doi: 10.1088/1758-5082/5/4/045006.
- [24] A. D. Dias, A. M. Unser, Y. Xie, D. B. Chrisey, and D. T. Corr, “Generating size-controlled embryoid bodies using laser direct-write,” *Biofabrication*, vol. 6, no. 2, 2014, doi: 10.1088/1758-5082/6/2/025007.
- [25] M. Ali, E. Pages, A. Ducom, A. Fontaine, and F. Guillemot, “Controlling laser-induced jet formation for bioprinting mesenchymal stem cells with high viability and high resolution,” *Biofabrication*, vol. 6, no. 4, 2014, doi: 10.1088/1758-5082/6/4/045001.
- [26] R. Xiong, Z. Zhang, W. Chai, Y. Huang, and D. B. Chrisey, “Freeform drop-on-demand laser printing of 3D alginate and cellular constructs,” *Biofabrication*, vol. 7, no. 4, 2015, doi: 10.1088/1758-5090/7/4/045011.
- [27] J. M. Bourget *et al.*, “Patterning of Endothelial Cells and Mesenchymal Stem Cells by Laser-Assisted Bioprinting to Study Cell Migration,” *Biomed Res. Int.*, vol. 2016, 2016, doi: 10.1155/2016/3569843.
- [28] J. L. Curley, S. C. Sklare, D. A. Bowser, J. Saksena, M. J. Moore, and D. B. Chrisey, “Isolated node engineering of neuronal systems using laser direct write,” *Biofabrication*, vol. 8, no. 1, 2016, doi: 10.1088/1758-5090/8/1/015013.
- [29] H. Desrus *et al.*, “Laser assisted bioprinting using a femtosecond laser with and without a gold transductive layer: a parametric study,” *Opt. Interact. with Tissue Cells XXVII*, vol. 9706, p. 970600, 2016, doi: 10.1117/12.2209087.
- [30] R. Xiong, Z. Zhang, W. Chai, D. B. Chrisey, and Y. Huang, “Study of gelatin as an effective energy absorbing layer for laser bioprinting,” *Biofabrication*, vol. 9, no. 2, 2017, doi: 10.1088/1758-5090/aa74f2.
- [31] Z. Zhang, C. Xu, R. Xiong, D. B. Chrisey, and Y. Huang, “Effects of living cells on the bioink printability during laser printing,” *Biomicrofluidics*, vol. 11, no. 3, 2017, doi: 10.1063/1.4985652.
- [32] B. T. Vinson *et al.*, “Laser direct-write based fabrication of a spatially-defined, biomimetic construct as a potential model for breast cancer cell invasion into adipose tissue,” *Biofabrication*, vol. 9, no. 2, 2017, doi: 10.1088/1758-5090/aa6bad.
- [33] “Koch L, Brandt O, Deiwick A and Chichkov B 2017 Laser assisted bioprinting at different wavelengths and pulse durations with a metal dynamic release layer: A parametric study Int. J. Bioprinting 3 42–53”.
- [34] L. Koch *et al.*, “Laser bioprinting of human induced pluripotent stem cells - The effect of printing and biomaterials on cell survival, pluripotency, and differentiation,” *Biofabrication*, vol. 10, no. 3, 2018, doi: 10.1088/1758-5090/aab981.
- [35] P. Karakaidos, C. Kryou, N. Simigdala, A. Klinakis, and I. Zergioti, “Laser Bioprinting of Cells Using UV and Visible Wavelengths : A Comparative DNA Damage Study,” 2022.

- [36] S. Gabriel and C. W. Hull, "United States Patent (19)," no. 19, 1984.
- [37] M. Nakamura, S. Iwanaga, C. Henmi, K. Arai, and Y. Nishiyama, "Biomatrices and biomaterials for future developments of bioprinting and biofabrication," *Biofabrication*, vol. 2, no. 1, 2010, doi: 10.1088/1758-5082/2/1/014110.
- [38] R. J. Klebe, "Cytoscribing: A method for micropositioning cells and the construction of two- and three-dimensional synthetic tissues," *Exp. Cell Res.*, vol. 179, no. 2, pp. 362–373, 1988, doi: 10.1016/0014-4827(88)90275-3.
- [39] G. D. Martin, S. D. Hoath, and I. M. Hutchings, "Inkjet printing - The physics of manipulating liquid jets and drops," *J. Phys. Conf. Ser.*, vol. 105, no. 1, 2008, doi: 10.1088/1742-6596/105/1/012001.
- [40] B. Derby, "Inkjet printing of functional and structural materials: Fluid property requirements, feature stability, and resolution," *Annu. Rev. Mater. Res.*, vol. 40, pp. 395–414, 2010, doi: 10.1146/annurev-matsci-070909-104502.
- [41] T. Okamoto, T. Suzuki, and N. Yamamoto, "Microarray fabrication with covalent attachment of DNA using Bubble Jet technology," *Nat. Biotechnol.*, vol. 18, no. 4, pp. 438–441, 2000, doi: 10.1038/74507.
- [42] T. Goldmann and J. S. Gonzalez, "DNA-printing: Utilization of a standard inkjet printer for the transfer of nucleic acids to solid supports," *J. Biochem. Biophys. Methods*, vol. 42, no. 3, pp. 105–110, 2000, doi: 10.1016/S0165-022X(99)00049-4.
- [43] T. Xu, J. Jin, C. Gregory, J. J. Hickman, and T. Boland, "Inkjet printing of viable mammalian cells," *Biomaterials*, vol. 26, no. 1, pp. 93–99, 2005, doi: 10.1016/j.biomaterials.2004.04.011.
- [44] B. Derby, "Bioprinting: Inkjet printing proteins and hybrid cell-containing materials and structures," *J. Mater. Chem.*, vol. 18, no. 47, pp. 5717–5721, 2008, doi: 10.1039/b807560c.
- [45] E. Tekin, P. J. Smith, and U. S. Schubert, "Inkjet printing as a deposition and patterning tool for polymers and inorganic particles," *Soft Matter*, vol. 4, no. 4, pp. 703–713, 2008, doi: 10.1039/b711984d.
- [46] J. U. Park *et al.*, "High-resolution electrohydrodynamic jet printing," *Nat. Mater.*, vol. 6, no. 10, pp. 782–789, 2007, doi: 10.1038/nmat1974.
- [47] J. H. Pikul *et al.*, "High precision electrohydrodynamic printing of polymer onto microcantilever sensors," *IEEE Sens. J.*, vol. 11, no. 10, pp. 2246–2253, 2011, doi: 10.1109/JSEN.2011.2127472.
- [48] S. Mishra, K. L. Barton, A. G. Alleyne, P. M. Ferreira, and J. A. Rogers, "High-speed and drop-on-demand printing with a pulsed electrohydrodynamic jet," *J. Micromechanics Microengineering*, vol. 20, no. 9, 2010, doi: 10.1088/0960-1317/20/9/095026.
- [49] J. U. Park, J. H. Lee, U. Paik, Y. Lu, and J. A. Rogers, "Nanoscale patterns of oligonucleotides formed by electrohydrodynamic jet printing with applications in biosensing and nanomaterials assembly," *Nano Lett.*, vol. 8, no. 12, pp. 4210–4216, 2008, doi: 10.1021/nl801832v.
- [50] M. Cloupeau and B. Prunet-Foch, "Electrohydrodynamic spraying functioning modes: a critical review," *J. Aerosol Sci.*, vol. 25, no. 6, pp. 1021–1036, 1994, doi: 10.1016/0021-8502(94)90199-6.
- [51] B. Duan, L. A. Hockaday, K. H. Kang, and J. T. Butcher, "3D Bioprinting of heterogeneous aortic valve conduits with alginate/gelatin hydrogels," *J. Biomed. Mater. Res. - Part A*, vol. 101 A, no. 5, pp. 1255–1264, 2013, doi: 10.1002/jbm.a.34420.
- [52] C. Norotte, F. S. Marga, L. E. Niklason, and G. Forgacs, "Scaffold-free vascular tissue engineering using bioprinting," *Biomaterials*, vol. 30, no. 30, pp. 5910–5917, 2009, doi: 10.1016/j.biomaterials.2009.06.034.
- [53] R. Chang, J. Nam, and W. Sun, "Direct cell writing of 3D microorganism for in vitro pharmacokinetic model," *Tissue Eng. - Part C Methods*, vol. 14, no. 2, pp. 157–166, 2008, doi: 10.1089/ten.tec.2007.0392.
- [54] V. Mironov, R. P. Visconti, V. Kasyanov, G. Forgacs, C. J. Drake, and R. R. Markwald, "Organ printing: Tissue spheroids as building blocks," *Biomaterials*, vol. 30, no. 12, pp. 2164–2174, 2009,

- doi: 10.1016/j.biomaterials.2008.12.084.
- [55] S. M. Peltola, F. P. W. Melchels, D. W. Grijpma, and M. Kellomäki, "A review of rapid prototyping techniques for tissue engineering purposes," *Ann. Med.*, vol. 40, no. 4, pp. 268–280, 2008, doi: 10.1080/07853890701881788.
- [56] S. Khalil and W. Sun, "Biopolymer deposition for freeform fabrication of hydrogel tissue constructs," *Mater. Sci. Eng. C*, vol. 27, no. 3, pp. 469–478, 2007, doi: 10.1016/j.msec.2006.05.023.
- [57] J. Visser *et al.*, "Biofabrication of multi-material anatomically shaped tissue constructs," *Biofabrication*, vol. 5, no. 3, 2013, doi: 10.1088/1758-5082/5/3/035007.
- [58] C. C. Chang, E. D. Boland, S. K. Williams, and J. B. Hoying, "Direct-write bioprinting three-dimensional biohybrid systems for future regenerative therapies," *J. Biomed. Mater. Res. - Part B Appl. Biomater.*, vol. 98 B, no. 1, pp. 160–170, 2011, doi: 10.1002/jbm.b.31831.
- [59] S. Boularaoui, G. Al Hussein, K. A. Khan, N. Christoforou, and C. Stefanini, "An overview of extrusion-based bioprinting with a focus on induced shear stress and its effect on cell viability," *Bioprinting*, vol. 20, no. May, p. e00093, 2020, doi: 10.1016/j.bprint.2020.e00093.
- [60] M. Playground, "Biofab1," 2012.
- [61] M. Guvendiren, H. D. Lu, and J. A. Burdick, "Shear-thinning hydrogels for biomedical applications," *Soft Matter*, vol. 8, no. 2, pp. 260–272, 2012, doi: 10.1039/c1sm06513k.
- [62] C. M. Smith *et al.*, "Three-dimensional bioassembly tool for generating viable tissue-engineered constructs," *Tissue Eng.*, vol. 10, no. 9–10, pp. 1566–1576, 2004, doi: 10.1089/ten.2004.10.1566.
- [63] K. Nair *et al.*, "Characterization of cell viability during bioprinting processes," *Biotechnol. J.*, vol. 4, no. 8, pp. 1168–1177, 2009, doi: 10.1002/biot.200900004.
- [64] P. De Coppi *et al.*, "Isolation of amniotic stem cell lines with potential for therapy," *Nat. Biotechnol.*, vol. 25, no. 1, pp. 100–106, 2007, doi: 10.1038/nbt1274.
- [65] C. Unger, M. Gruene, L. Koch, J. Koch, and B. N. Chichkov, "Time-resolved imaging of hydrogel printing via laser-induced forward transfer," pp. 271–277, 2011, doi: 10.1007/s00339-010-6030-4.
- [66] M. Thoppey, "Bioprinting by laser-induced forward transfer for tissue engineering applications : jet formation modeling," 2010, doi: 10.1088/1758-5082/2/1/014103.
- [67] J. Mikšys and G. A. G. R. B. E. Römer, "Pico - to nanosecond pulsed laser - induced forward transfer (LIFT) of silver nanoparticle inks : a comparative study," *Appl. Phys. A*, vol. 125, no. 12, pp. 1–11, 2019, doi: 10.1007/s00339-019-3085-8.
- [68] W. Wang, "MSEC_ ICM & P2008-72 242," pp. 1–10, 2019.
- [69] C. Mézel *et al.*, "Self-consistent modeling of jet formation process in the nanosecond laser pulse regime Self-consistent modeling of jet formation process in the nanosecond laser," vol. 123112, no. 2009, 2014, doi: 10.1063/1.3276101.
- [70] B. Guillotin, "T echnology R eport Laser-assisted cell printing : principle , physical parameters versus cell fate and perspectives in tissue engineering T echnology R eport," pp. 507–515.
- [71] P. Serra, J. L. Morenza, M. Duocastella, M. Colina, and J. M. Ferna, "Study of the laser-induced forward transfer of liquids for laser bioprinting," vol. 253, pp. 7855–7859, 2007, doi: 10.1016/j.apsusc.2007.02.097.
- [72] A. Pearson, E. Cox, J. R. Blake, and S. R. Otto, "Bubble interactions near a free surface," vol. 28, pp. 295–313, 2004, doi: 10.1016/S0955-7997(03)00079-1.
- [73] M. Duocastella, J. L. Morenza, P. Serra, M. Duocastella, J. L. Morenza, and P. Serra, "Time-resolved imaging of the laser forward transfer of liquids Time-resolved imaging of the laser forward transfer of liquids," vol. 084907, no. 2009, 2013, doi: 10.1063/1.3248304.
- [74] S. Michael *et al.*, "Tissue Engineered Skin Substitutes Created by Laser- Assisted Bioprinting Form Skin-Like Structures in the Dorsal Skin Fold Chamber in Mice," vol. 8, no. 3, 2013, doi: 10.1371/journal.pone.0057741.

- [75] R. T. Cerbus, H. Chraibi, M. Tondusson, S. Petit, D. Soto, and R. Devillard, "Experimental and numerical study of laser-induced secondary jetting," 2022, doi: 10.1017/jfm.2021.1117.
- [76] Y. Saade, M. Jalaal, A. Prosperetti, and D. Lohse, "Crown formation from a cavitating bubble close to a free surface," *J. Fluid Mech.*, vol. 926, pp. 1–21, 2021, doi: 10.1017/jfm.2021.676.
- [77] W. Lauterborn and T. Kurz, "Physics of bubble oscillations," *Reports Prog. Phys.*, vol. 73, no. 10, 2010, doi: 10.1088/0034-4885/73/10/106501.
- [78] A. Patrascioiu, J. M. Fernández-Pradas, A. Palla-Papavlu, J. L. Morenza, and P. Serra, "Laser-generated liquid microjets: Correlation between bubble dynamics and liquid ejection," *Microfluid. Nanofluidics*, vol. 16, no. 1–2, pp. 55–63, 2014, doi: 10.1007/s10404-013-1218-5.
- [79] "Wegener, 'What Makes Airplanes Fly?' Springer-Verlag (1991)".
- [80] A. Luminita Iordan, "Rheological properties of biological materials : from cell suspensions to tissues Propriétés rhéologiques de matériaux biologiques : des suspensions cellulaires aux tissus," 2008.
- [81] "Non-Newtonian Fluids - AFT Applied Flow Technology".
- [82] "R.G. Larson, The structure and rheology of complex fluids, Oxford University Press, New York, 1999."
- [83] K. Saha *et al.*, "Substrate modulus directs neural stem cell behavior," *Biophys. J.*, vol. 95, no. 9, pp. 4426–4438, 2008, doi: 10.1529/biophysj.108.132217.
- [84] K. I. W. Kane *et al.*, "Determination of the rheological properties of Matrigel for optimum seeding conditions in microfluidic cell cultures," *AIP Adv.*, vol. 8, no. 12, 2018, doi: 10.1063/1.5067382.
- [85] K. I. W. Kane *et al.*, "Determination of the rheological properties of Matrigel for optimum seeding conditions in microfluidic cell cultures," *AIP Adv.*, vol. 8, no. 12, 2018, doi: 10.1063/1.5067382.
- [86] "The Royal Society is collaborating with JSTOR to digitize, preserve, and extend access to Proceedings of the Royal Society of London. ® www.jstor.org," *Society*.
- [87] B. Akers and A. Belmonte, "Impact dynamics of a solid sphere falling into a viscoelastic micellar fluid," *J. Nonnewton. Fluid Mech.*, vol. 135, no. 2–3, pp. 97–108, 2006, doi: 10.1016/j.jnnfm.2006.01.004.
- [88] A. Kumar, S. Sambandam, A. Ramalingam, R. Krishnamoorthy, D. Arumugam, and O. E. Oyenyin, "Synthesis, molecular docking of 3-(2-chloroethyl)-2,6-diphenylpiperidin-4-one: Hirshfeld surface, spectroscopic and DFT based analyses," *J. Mol. Struct.*, vol. 1262, p. 132993, 2022, doi: 10.1016/j.molstruc.2022.132993.
- [89] M. C. Koyilot *et al.*, "Breakthroughs and Applications of Organ-on-a-Chip Technology," *Cells*, vol. 11, no. 11, 2022, doi: 10.3390/cells11111828.
- [90] D. Huh, G. A. Hamilton, and D. E. Ingber, "From 3D cell culture to organs-on-chips," *Trends Cell Biol.*, vol. 21, no. 12, pp. 745–754, 2011, doi: 10.1016/j.tcb.2011.09.005.
- [91] A. Akhtar, "The Flaws and Human Harms of Animal Experimentation," *Cambridge Q. Healthc. Ethics*, vol. 24, no. 4, pp. 407–419, 2015, doi: 10.1017/S0963180115000079.
- [92] L. A. Low, C. Mummery, B. R. Berridge, C. P. Austin, and D. A. Tagle, "Organs-on-chips: into the next decade," *Nat. Rev. Drug Discov.*, vol. 20, no. 5, pp. 345–361, 2021, doi: 10.1038/s41573-020-0079-3.
- [93] G. M. Whitesides, "The origins and the future of microfluidics," *Nature*, vol. 442, no. 7101, pp. 368–373, 2006, doi: 10.1038/nature05058.
- [94] C. M. Leung *et al.*, "A guide to the organ-on-a-chip," *Nat. Rev. Methods Prim.*, vol. 2, no. 1, 2022, doi: 10.1038/s43586-022-00118-6.
- [95] A. P. Ramme *et al.*, "Autologous induced pluripotent stem cell-derived four-organ-chip," *Futur. Sci. OA*, vol. 5, no. 8, 2019, doi: 10.2144/fsoa-2019-0065.
- [96] F. Yu, N. D. Selva Kumar, D. Choudhury, L. C. Foo, and S. H. Ng, "Microfluidic platforms for modeling biological barriers in the circulatory system," *Drug Discov. Today*, vol. 23, no. 4, pp. 815–

- 829, 2018, doi: 10.1016/j.drudis.2018.01.036.
- [97] L. G. Griffith and M. A. Swartz, "Capturing complex 3D tissue physiology in vitro," *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*, vol. 7, no. 3, pp. 211–224, 2006, doi: 10.1038/nrm1858.
- [98] F. Yu and D. Choudhury, "Microfluidic bioprinting for organ-on-a-chip models," *Drug Discov. Today*, vol. 24, no. 6, pp. 1248–1257, 2019, doi: 10.1016/j.drudis.2019.03.025.
- [99] F. Yu and D. Choudhury, "Microfluidic bioprinting for organ-on-a-chip models," *Drug Discov. Today*, vol. 24, no. 6, pp. 1248–1257, 2019, doi: 10.1016/j.drudis.2019.03.025.
- [100] I. T. Ozbolat and Y. Yu, "Bioprinting toward organ fabrication: Challenges and future trends," *IEEE Trans. Biomed. Eng.*, vol. 60, no. 3, pp. 691–699, 2013, doi: 10.1109/TBME.2013.2243912.
- [101] J. Rouwkema and A. Khademhosseini, "Vascularization and Angiogenesis in Tissue Engineering: Beyond Creating Static Networks," *Trends Biotechnol.*, vol. 34, no. 9, pp. 733–745, 2016, doi: 10.1016/j.tibtech.2016.03.002.
- [102] J. Ma, Y. Wang, and J. Liu, "Bioprinting of 3D tissues/organs combined with microfluidics," *RSC Adv.*, vol. 8, no. 39, pp. 21712–21727, 2018, doi: 10.1039/c8ra03022g.
- [103] H. W. Kang, S. J. Lee, I. K. Ko, C. Kengla, J. J. Yoo, and A. Atala, "A 3D bioprinting system to produce human-scale tissue constructs with structural integrity," *Nat. Biotechnol.*, vol. 34, no. 3, pp. 312–319, 2016, doi: 10.1038/nbt.3413.
- [104] C. Arrigoni, M. Gilardi, S. Bersini, C. Candrian, and M. Moretti, "Bioprinting and Organ-on-Chip Applications Towards Personalized Medicine for Bone Diseases," *Stem Cell Rev. Reports*, vol. 13, no. 3, pp. 407–417, 2017, doi: 10.1007/s12015-017-9741-5.
- [105] C. Colosi *et al.*, "Microfluidic Bioprinting of Heterogeneous 3D Tissue Constructs Using Low-Viscosity Bioink," *Adv. Mater.*, vol. 28, no. 4, pp. 677–684a, 2016, doi: 10.1002/adma.201503310.
- [106] Q. Pi *et al.*, "Digitally Tunable Microfluidic Bioprinting of Multilayered Cannular Tissues," *Adv. Mater.*, vol. 30, no. 43, pp. 1–10, 2018, doi: 10.1002/adma.201706913.
- [107] "<https://www.researchsquare.com/blog/what-is-a-cell-line>".
- [108] "<https://www.stemcell.com/human-primary-and-cultured-cells-overview.html>".
- [109] S. E. Park, A. Georgescu, and D. Huh, "Organoid on a chip," *Science (80-.)*, vol. 965, no. June, pp. 960–965, 2019.
- [110] F. Schutgens and H. Clevers, "Human Organoids: Tools for Understanding Biology and Treating Diseases," *Annu. Rev. Pathol. Mech. Dis.*, vol. 15, pp. 211–234, 2020, doi: 10.1146/annurev-pathmechdis-012419-032611.
- [111] S. Jiang *et al.*, "An Automated Organoid Platform with Inter-organoid Homogeneity and Inter-patient Heterogeneity," *Cell Reports Med.*, vol. 1, no. 9, p. 100161, 2020, doi: 10.1016/j.xcrm.2020.100161.
- [112] M. Hofer and M. P. Lutolf, "Engineering organoids," *Nat. Rev. Mater.*, vol. 6, no. 5, pp. 402–420, 2021, doi: 10.1038/s41578-021-00279-y.
- [113] N. Petersen *et al.*, "Targeting development of incretin-producing cells increases insulin secretion," *J. Clin. Invest.*, vol. 125, no. 1, pp. 379–385, 2015, doi: 10.1172/JCI75838.
- [114] "<https://www.forhumanescience.org/blog/alternatives-series-organoids/>".
- [115] N. Shanks, R. Greek, and J. Greek, "Are animal models predictive for humans?," *Philos. Ethics, Humanit. Med.*, vol. 4, no. 1, pp. 1–20, 2009, doi: 10.1186/1747-5341-4-2.
- [116] R. K. Harrison, "Phase II and phase III failures: 2013-2015," *Nat. Rev. Drug Discov.*, vol. 15, no. 12, pp. 817–818, 2016, doi: 10.1038/nrd.2016.184.
- [117] A. D. Rodriguez *et al.*, "A microfluidic platform for functional testing of cancer drugs on intact tumor slices," *Lab Chip*, vol. 20, no. 9, pp. 1658–1675, 2020, doi: 10.1039/c9lc00811j.
- [118] F. Cheng *et al.*, "AdmetSAR: A comprehensive source and free tool for assessment of chemical ADMET properties," *J. Chem. Inf. Model.*, vol. 52, no. 11, pp. 3099–3105, 2012, doi: 10.1021/ci300367a.

- [119] N. Picollet-D'hahan, A. Zuchowska, I. Lemeunier, and S. Le Gac, "Multiorgan-on-a-Chip: A Systemic Approach To Model and Decipher Inter-Organ Communication," *Trends Biotechnol.*, vol. 39, no. 8, pp. 788–810, 2021, doi: 10.1016/j.tibtech.2020.11.014.
- [120] M. Abdellah, "In silico brain imaging," pp. 179–194, 2017.
- [121] M. Modo, R. P. Stroemer, E. Tang, S. Patel, and H. Hodges, "Effects of implantation site of stem cell grafts on behavioral recovery from stroke damage," *Stroke*, vol. 33, no. 9, pp. 2270–2278, 2002, doi: 10.1161/01.STR.0000027693.50675.C5.
- [122] B. M. Sicari, J. L. Dziki, B. F. Siu, C. J. Medberry, C. L. Dearth, and S. F. Badylak, "The promotion of a constructive macrophage phenotype by solubilized extracellular matrix," *Biomaterials*, vol. 35, no. 30, pp. 8605–8612, 2014, doi: 10.1016/j.biomaterials.2014.06.060.
- [123] P. Mogha, S. Iyer, and A. Majumder, "Extracellular Matrix protein gelatin provides higher expansion, reduces size heterogeneity, and maintains cell stiffness in a long-term culture of mesenchymal stem cells," *bioRxiv*, p. 2021.12.20.473506, 2021, [Online]. Available: <https://www.biorxiv.org/content/10.1101/2021.12.20.473506v1%0Ahttps://www.biorxiv.org/content/10.1101/2021.12.20.473506v1.abstract>