

ΕΘΝΙΚΟ ΜΕΤΣΟΒΙΟ ΠΟΛΥΤΕΧΝΕΙΟ ΣΧΟΛΗ ΕΦΑΡΜΟΣΜΕΝΩΝ ΜΑΘΗΜΑΤΙΚΩΝ ΚΑΙ ΦΥΣΙΚΩΝ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ

ΔΙΑΤΜΗΜΑΤΙΚΟ ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΟ ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΩΝ ΣΠΟΥΔΩΝ «**ΜΙΚΡΟΣΥΣΤΗΜΑΤΑ ΚΑΙ ΝΑΝΟΔΙΑΤΑΞΕΙΣ**»

ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗ ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ

ΒΑΛΑΔΩΡΟΥ ΔΗΜΗΤΡΑ

Ενσωμάτωση αισθητήρων σε μικρορευστονικές διατάξεις οργάνου σε ψηφίδα

Sensors integrated in Organ-on-a-Chip microfluidic platforms

ΕΠΙΒΛΕΠΟΥΣΑ: ΑΓΓΕΛΙΚΗ ΤΣΕΡΕΠΗ, ΔΙΕΥΘΥΝΤΡΙΑ ΕΡΕΥΝΩΝ, ΙΝΝ, ΕΚΕΦΕ ΔΗΜΟΚΡΙΤΟΣ

ΤΡΙΜΕΛΗΣ ΕΠΙΤΡΟΠΗ

Αγγελική Τσερέπη, Ερευνήτρια Α΄, ΙΝΝ, ΕΚΕΦΕ «Δ»

Σταύρος Χατζανδρούλης, Ερευνητής Α΄, ΙΝΝ, ΕΚΕΦΕ «Δ»

Γεώργιος Κόκκορης, Αν. Καθηγητής, Σχολή Χημικών Μηχ., ΕΜΠ

AOHNA, 2023

Πρόλογος - Ευχαριστίες

Η παρούσα πτυχιακή εργασία διεξήχθη στο Ινστιτούτο Νανοεπιστήμης & Νανοτεχνολογίας (INN) σε συνεργασία με το Ινστιτούτο Πυρηνικών και Ραδιολογικών Επιστημών και Τεχνολογίας, Ενέργειας και Ασφάλειας (IIIPETEA) του ΕΚΕΦΕ "Δημόκριτος", στα πλαίσια του διατμηματικού μεταπτυχιακού προγράμματος σπουδών «Μικροσυστήματα και Νανοδιατάξεις» της σχολής Σχολή Εφαρμοσμένων Μαθηματικών και Φυσικών Επιστημών του Εθνικού Μετσόβιου Πολυτεχνείου, κατά το ακαδημαϊκό έτος 2022-2023, υπό την επίβλεψη της ερευνήτριας κυρίας Αγγελικής Τσερέπη. Έναυσμα για την διπλωματική υπήρξε η ολοένα αυξανόμενη ζήτηση για ενσωμάτωση βιοαισθητήρων σε μικρορευστονικές πλατφόρμες οργάνου σε ψηφίδα για συνεχή και σε πραγματικό χρόνο παρακολούθηση των κυτταρικών καλλιεργειών. Αυτές οι συσκευές βρίσκουν εφαρμογή στην φαρμακοβιομηχανία για δοκιμές φαρμάκων σε ανθρώπινα κύτταρα αλλά και στον ταχέως αναπτυσσόμενο τομέα της εξατομικευμένης ιατρικής καθώς φάρμακα μπορούν να εφαρμοστούν στα ίδια τα κύτταρα του ασθενούς και να προβλέψουν την βέλτιστη θεραπεία.

Θα ήθελα αρχικά να ευχαριστήσω βαθύτατα την επιβλέπουσα καθηγήτριά μου Δρ. Αγγελική Τσερέπη που με την πολύτιμη βοήθεια και καθοδήγησή της υλοποιήθηκε αυτή η ερευνητική διπλωματική εργασία, σε ένα θέμα που ανέκαθεν με γοήτευε και αποτέλεσε σταθμό στην φοίτηση μου στο μεταπτυχιακό και στην μετέπειτα εξέλιξή μου. Θερμές και εκ βαθέων ευχαριστίες οφείλονται για τη καθοριστική της συνεισφορά στην Δρ. Παναγιώτα Πέτρου που με καθοδήγησε στην πρωτόγνωρη για μένα εργαστηριακή εμπειρία με τις ανοσοαναλύσεις. Επιπλέον θα ήθελα να ευχαριστήσω θερμά τον Δρ. Σταύρο Χατζανδρούλη και την συνεργαζόμενη ερευνήτρια Δρ. Μυρτώ Φιλιππίδου για την πολύτιμη βοήθεια, καθοδήγηση και το χρόνο που μου αφιέρωσαν στα ζητήματα των βιοαισθητήρων. Ιδιαίτερες ευχαριστίες θα ήθελα να απευθύνω και στην μεταδιδακτορική ερευνήτρια Δήμητρα Τσουνίδη και την υποψήφια διδάκτορα Διονυσία Κεφαλληνού για τη συνεχή και συνεπή ενασχόληση και υποστήριξή τους σε όλη τη διάρκεια εκπόνησης της εργασίας. Τέλος, ευχαριστώ τα μέλη της ομάδας του Δρ. Νεχαγιά για την 3D εκτύπωση μητρών καθώς και τις μετρήσεις βάθους του καναλιού με οπτική προφιλομετρία.

.....

Βαλαδώρου Δήμητρα

© (2023) Εθνικό Μετσόβιο Πολυτεχνείο. All rights Reserved. Απαγορεύεται η αντιγραφή, αποθήκευση και διανομή της παρούσας εργασίας, εξ ολοκλήρου ή τμήματος αυτής, για εμπορικό σκοπό. Επιτρέπεται η ανατύπωση, αποθήκευση και διανομή για σκοπό μη κερδοσκοπικό, εκπαιδευτικής ή ερευνητικής φύσης, υπό την προϋπόθεση να αναφέρεται η πηγή προέλευσης και να διατηρείται το παρόν μήνυμα. Ερωτήματα που αφορούν τη χρήση της εργασίας για κερδοσκοπικό σκοπό πρέπει να απευθύνονται προς το συγγραφέα. Οι απόψεις και τα συμπεράσματα που περιέχονται σ'αυτό το έγγραφο εκφράζουν το συγγραφέα και δεν πρέπει να ερμηνευτεί ότι αντιπροσωπεύουν τις επίσημες θέσεις του Εθνικού Μετσόβιου Πολυτεχνείου.

Table of Contents

| Πρόλογος - Ευχαριστίες | i |
|--|---|
| Περίληψην | ĺ |
| Abstractvii | |
| Κεφάλαιο 1 – Εισαγωγή | |
| 1.1 Μικρορευστονική | |
| 1.1.1 Τα πλεονεκτήματα της σμίκρυνσης στη Μικρορευστονική | |
| 1.1.2 Ιστορική εξέλιξη της τεχνολογίας και των εφαρμογών της | |
| 1.2 Organ-on-a-Chip 5 | |
| 1.2.1 Πλεονεκτήματα μικρορευστονικών κυτταροκαλλιεργιών | |
| 1.2.2 Τεχνολογίες κατασκευής οργάνων σε ψηφίδα7 | |
| 1.2.3 Εφαρμογές10 | |
| 1.3 Kidney-on-a-chip12 | |
| 1.3.1 Ανατομία – Λειτουργικότητα – Παθολογία Νεφρού13 | |
| 1.3.2 Κατηγορίες μοντέλων νεφρού15 | |
| 1.3.3 Organ-on-chip αισθητήρες20 | |
| 1.3.4 Εφαρμογές νεφρού σε ψηφίδα22 | |
| 1.4 Βιοαισθητήρες22 | |
| 1.4.1 Ανοσοχημικοί βιοαισθητήρες και αντισώματα23 | |
| 1.4.2 Τεχνικές ακινητοποίησης των βιομορίων αναγνώρισης | |
| 1.4.3 Ηλεκτροχημικοί βιοαισθητήρες γραφενίου26 | l |
| 1.4.4 Μήκος Debye28 | |
| 1.4.5 Βιο-αισθητήρες ενσωματωμένοι σε ΟοC31 | |
| 1.5 Ιντερλευκίνη 6 (IL-6)32 | |
| 1.5.1 Δομή33 | |
| 1.5.2 Λειτουργικός ρόλος της IL-6 στο νεφρό34 | |
| 1.5.3 Αισθηήρες IL-635 | |
| 1.6 Σκοπός της εργασίας36 | 1 |
| Κεφάλαιο 2. Υλικά – Μέθοδοι - Εξοπλισμός38 | |
| 2.1 Υλικά φωτολιθογραφίας38 | |
| 2.2 Υλικά μαλακής λιθογραφίας και κατασκευής ΟοC38 | ļ |
| 2.3 Υλικά για την ανίχνευση της IL-640 | |
| 2.4 Κατασκευή μήτρας - Φωτολιθογραφία ξηρής ρητίνης40 | |
| 2.5 Μαλακή λιθογραφία PDMS41 | |
| 2.6 Συγκόλληση | |

| 2.7 Μέθοδος ELISA | 41 |
|--|----|
| 2.8 Μετρήσεις στο βιοαισθητήρα | 43 |
| 2.9 Εξοπλισμός για την κατασκευή της μήτρας | 43 |
| 2.10 Εξοπλισμός μαλακής λιθογραφίας | 45 |
| 2.11 Εξοπλισμός συγκόλλησης | 46 |
| 2.12 Εξοπλισμός δομικού χαρακτηρισμού της διάταξης | 48 |
| 2.13 Εξοπλισμός ανίχνευσης IL-6 | 49 |
| Κεφάλαιο 3- Κατασκευή μικρορευστονικής πλατφόρμας ΟοC και ενσωμάτωση βιοαισθητήρων | 51 |
| 3.1 Μέθοδος κατασκευής ψηφίδας | 51 |
| 3.1.1 Κατασκευή τμήματος με μικροκανάλι καλλιέργειας κυττάρων | 51 |
| 3.1.2 Κατασκευή τμήματος PDMS σαν δεξαμενή τροφοδοσίας θρεπτικού υγρού | 52 |
| 3.1.3 Συγκόλληση διάταξης | 53 |
| 3.2 Δομικός έλεγχος της μήτρας | 53 |
| 3.3 Έλεγχος συγκόλλησης και επιλογή μεμβράνης | 54 |
| 3.4 Μέτρηση μέσου βάθους καναλιού | 55 |
| 3.5 Έλεγχος αντοχής και υπολογισμός πτώσης πίεσης στο μικροκανάλι | 55 |
| 3.6 Ενσωμάτωση αισθητήρα στο μικρορευστονικό chip τύπου ΟοC | 57 |
| Κεφάλαιο 4 – Ανίχνευση πρωτεΐνης IL-6 σε αισθητήρες rGO | 63 |
| 4.1 ELISA | 63 |
| 4.1.1 Βιστινυλίωση | 63 |
| 4.1.2 Πρωτόκολλο ανοσοανάλυσης | 64 |
| 4.1.3 Βέλτιστη συγκέντρωση αντισωμάτων δέσμευσης και ανίχνευσης | 65 |
| 4.1.4 Βελτιστοποίηση συγκέντρωσης αντισώματος ανίχνευσης | 66 |
| 4.1.5 Βελτιστοποίηση χρόνου επώασης αντισώματος-αντιγόνου | 67 |
| 4.1.6 Βελτιστοποίηση σύστασης διαλυμάτων | 69 |
| 4.1.7 Έκλπυση με διάλυμα υδροχλωρίου (HCl) για επαναχρησιμοποίηση της επιφάνειας | 71 |
| 4.1.8 Σταθερότητα ανοσοχημικού προσδιορισμού στο χρόνο | 72 |
| 4.1.9 Πείραμα σε επιφάνειες $\mathrm{Si}/\mathrm{SiO}_2/\mathrm{rGO}$ για επιβεβαίωση της ακινητοποίησης αντισώματος | 73 |
| 4.2 Πειράματα ανίχνευσης IL-6 στον αισθητήρα | 74 |
| 4.2.1 Μέτρηση υπό στατικές συνθήκες και ανοιχτό κανάλι | 76 |
| 4.2.2 Μέτρηση υπό ροή σε διάλυμα φωσφορικών 5μM pH 5,5 | 77 |
| 4.2.3 Μέτρηση υπό ροή σε διαλύματα φωσφορικών διαφορετικών συγκεντρώσεων και pH | 79 |
| 4.2.4 Ανίχνευση με σύμπλοκο στρεπταβιδίνης-βιοτίνης σε υψηλότερες συγκεντρώσεις IL-6 | 80 |
| Κεφάλαιο 5: Συμπεράσματα, σχολιασμός και μελλοντικές προοπτικές | 84 |
| Παράρτημα 1 | 87 |

| Παράρτημα 2 | 89 |
|--------------|----|
| Βιβλιογραφία | |

Οι προκλινικές μελέτες για την ανάπτυξη φαρμάκων περιλαμβάνουν δύο είδη πειραμάτων: κυτταροκαλλιέργεια και μελέτες σε ζώα. Δυστυχώς τα αποτελέσματα των δύο αυτών μεθόδων παρουσιάζουν θεμελιώδεις περιορισμούς ως προς την ομοιότητα του κυτταρικού μικροπεριβάλλοντος έναντι αυτού στον ανθρώπινο οργανισμό με αποτέλεσμα να μην μπορούν να προβλέπουν πάντα τις ανθρώπινες κυτταρικές αποκρίσεις. Το όργανο σε ψηφίδα (organ-onchip - OoC) μπορεί να είναι μια καλή λύση καθώς χρησιμοποιεί ανθρώπινα κύτταρα, όπως ένα πραγματικό ανθρώπινο όργανο, και προσομοιάζει το μικρορευστονικό περιβάλλον στο οποίο βρίσκονται. Η τεχνολογία OoC είναι πολλά υποσχόμενη στη μίμηση της πολυπλοκότητας των ιστών και για τον λόγο αυτό είναι αναγκαία και πολύτιμη η συνεχής σε πραγματικό χρόνο παρακολούθηση των κυττάρων. Ωστόσο, ένας από τους μεγαλύτερους περιορισμούς της OoC τεχνολογίας είναι η έλλειψη βιοαισθητήρων ενσωματωμένων πάνω στην μικρορευστονική ψηφίδα οι οποίοι να παρέχουν συνεχώς πληροφορίες για αλλαγές στο περιβάλλον των κυττάρων. Απώτερος στόχος αυτής της εργασίας είναι η άρση αυτού του περιορισμού.

Ένα όργανο που συχνά επηρεάζεται από τα φάρμακα είναι τα νεφρά, που αποτελούν το δεύτερο στόχο φαρμάκων και χημικών μετά το ήπαρ, καθώς εκεί γίνεται η αποβολή των φαρμάκων από τον ανθρώπινο οργανισμό. Για τον λόγο αυτό εστιάσαμε σε μελέτες σχετικές σε μικρορευστονικά συστήματα νεφρού σε ψηφίδα και κατασκευάσαμε μικρορευστονική διάταξη εμπνευσμένη από αυτές τις μελέτες με την μέθοδο της μαλακής λιθογραφίας σε PDMS, με μήτρα κατασκευασμένη με τη μέθοδο της φωτολιθογραφίας σε PCB. Πιο συγκεκριμένα, η κατασκευασμένη από PDMS ψηφίδα αποτελείται από ένα μικροκανάλι όπου θα γίνεται η καλλιέργεια των νεφρικών κυττάρων και από μια δεξαμενή θρεπτικού μέσου που διαχωρίζονται από μια πορώδη πολυεστερική μεμβράνη πάνω στην οποία μπορούν να καλλιεργηθούν τα κύτταρα.

Η ενσωμάτωση του βιοαισθητήρα γίνεται σε μικροκανάλι PDMS το οποίο μπορεί να συνδεθεί σε σειρά με την OoC πλατφόρμα ώστε να αποφευχθεί διατάραξη των κυττάρων. Έτσι, το θρεπτικό υγρό που θα περνάει από την OoC πλατφόρμα και συνεπώς από τα κύτταρα στη συνέχεια θα διέρχεται από το μικροκανάλι του βιοαισθητήρα, καθιστώντας δυνατή την άμεση και σε πραγματικό χρόνο ανίχνευση πρωτεϊνών που εκκρίνονται από τα κύτταρα στο θρεπτικό μέσο.

Ο βιοαισθητήρας που μελετάται ανήκει στην ομάδα των ηλεκτροχημικών ανοσοαισθητήρων και στοχεύει στην ανίχνευση πρωτεϊνών, όπως η ιντερλευκίνη 6 (IL-6). Η πρωτεΐνη αυτή, που ανιχνεύουμε για πρώτη φορά με αυτούς τους αισθητήρες, αποτελεί γνωστό βιοδείκτη φλεγμονής στα ανθρώπινα βιολογικά υγρά. Στην εργασία αυτή, αρχικά έγινε βελτιστοποίηση του πρωτοκόλλου ανίχνευσης της ιντερλευκίνης 6 με ενζυμική ανοσοχημική μέθοδο προσδιορισμού (ELISA). Στην συνέχεια, ο προσδιορισμός μεταφέρθηκε στον ηλεκτροχημικό ανοσοαισθητήρα το τσιπ του οποίου αποτελείται από μικροκανάλι με ενσωματωμένα τρία ζεύγη ηλεκτροδίων όπου και γίνεται η ανίχνευση της IL-6, μέσω μέτρησης της αντίστασης. Το τσιπ σχεδιάζεται στο INN και κατασκευάζεται κατά μεγάλο μέρος στη βιομηχανία PCBs, ενώ στο εργαστήριο προσθέτουμε αναγμένο οξείδιο του γραφενίου (rGO) μεταξύ των ηλεκτροδίων. Πάνω στο rGO, ακινητοποιείται αντίσωμα (σαν βιοχημικός

υποδοχέας) έναντι της IL-6 με δύο μεθόδους: α) με απευθείας προσρόφησή του στην επιφάνεια και β) με χρήση του συμπλόκου στρεπταβιδίνης-βιοτίνης. Οι πρωτεΐνες ακόμα και σε πολύ χαμηλές συγκεντρώσεις εμφανίζουν υψηλή εξειδίκευση έναντι των αντισωμάτων που έχουν αναπτυχθεί για αυτές, επομένως είναι δυνατή η ειδική δέσμευση και ανίχνευση της IL-6 στην επιφάνεια του αισθητήρα, μέσω μέτρησης της μεταβολής της αντίστασης του rGO. Συστηματική πτώση της αντίστασης ανάλογη της συγκέντρωσης της IL-6 στο διάλυμα παρατηρήθηκε για συγκεντρώσεις IL-6 της τάξης των μg/ml. Ωστόσο, για να γίνει εφικτή η ανίχνευση της IL-6 σε συγκεντρώσεις που είναι διαγνωστικά χρήσιμες (της τάξης των pg/ml) απαιτείται περαιτέρω βελτιστοποίηση της ευαισθησίας του βιοαισθητήρα.

Λέξεις Κλειδιά. Όργανο-σε-ψηφίδα, PCB, PDMS, ανοσοαισθητήρες, ηλεκτροχημικοί βιοαισθητήρες, ιντερλευκίνη 6.

Abstract

Preclinical studies for drug development include two types of experiments: cell culture and animal studies. Both of these methods have fundamental limitations in imitating the cellular microenvironment compared to the human body, and as a result they cannot always predict human cellular responses. Organ-on-a-chip (OoC) may be a good solution to overpass this limitation as it uses human cells, like a real human organ, and simulates their physiological microfluidic environment. Although OoC technology is promising in mimicking the complexity of tissues, continuous real-time monitoring of cells is lacking. Thus, one of the biggest limitations of the OoC technology is the lack of biosensors integrated on the microfluidic platform that could provide information about changes in the cell environment upon stimuli. The ultimate target of this work is the relief of this limitation.

An organ often affected by drugs is the kidney, which is the second major target of drugs and chemicals, after the liver. For this reason, in this thesis we focused on studies of microfluidic kidney-on-a-chip platforms and fabricated a microfluidic device by soft lithography of PDMS using a mold fabricated by photolithography on PCB. More specifically, the chip made of PDMS consisted of a microchannel and a medium reservoir separated by a porous polyester membrane on which human cells can be cultured.

The biosensor is integrated in series with the OoC platform to avoid cell disruption. A PDMS segment with an embedded microchannel is soldered onto the sensor microchannel sealing it. The bonding is done using a thin layer of liquid PDMS interposed between the two parts. Hence, the nutrient fluid that passes through the OoC platform and thus the cells then passes through the microchannel of the biosensor enabling the direct and real-time detection of proteins secreted by the cells into the medium.

The protein we chose to detect for the first time with these sensors is interleukin 6 (IL-6), which is a known biomarker of inflammation in human body fluids. First, the interleukin 6 detection protocol was optimized by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). The biosensor used belongs to the group of electrochemical immunosensors, and aims to detect proteins in a solution. The biosensor chip consists of a microchannel with integrated three pairs of electrodes where IL-6 is detected. The chip was designed at INN and manufactured in the PCBs industry, while in the lab we added reduced graphene oxide (rGO) between the electrodes. Then, the anti-IL-6 antibody was immobilized on rGO by two methods: a) direct adsorption on the surface and b) using the streptavidin-biotin complex. The proteins even at very low concentrations show high specificity against the antibodies developed for them, so IL-6 is specifically bound and detected on the surface of the sensor, by measuring its resistance change. A systematic drop in resistance proportional to the concentration of IL-6 in the solution was observed for IL-6 concentrations in the order of $\mu g/ml$. However, to enable the detection of IL-6 at concentrations that are diagnostically relevant (pg/ml) further optimization of the sensitivity of the biosensor is required.

Keywords. Organ-on-chip, PCB, PDMS, immunosensors, electrochemical biosensors, interleukin 6

1.1 Μικρορευστονική

Ως μικρορευστομηχανική ορίζεται η επιστήμη σχεδιασμού και η τεχνολογία κατασκευής διατάξεων και διεργασιών χειρισμού μικροσκοπικών ποσοτήτων ρευστού. Αντίστοιχα, μικρορευστονικές διατάξεις αποκαλούνται οι επίπεδες μονολιθικές μικροδιατάξεις για έλεγχο ροής μικρών ποσοτήτων υγρών ή αερίων κινουμένων μέσα σε μικροσκοπικά κανάλια με μικρότερη διάσταση της τάξης μερικών ή δεκάδων μm [1]. Μερικά από τα κυριότερα πλεονεκτήματα των μικρορευστονικών συστημάτων είναι η σμίκρυνση των συσκευών οι οποίες γίνονται φορητές, η μείωση του χρόνου ανάλυσης και η εύκολη μαζική παραγωγή τους. Επιπλέον, ελαχιστοποιείται ο απαιτούμενος όγκος δείγματος, ενώ ταυτόχρονα προσφέρουν την δυνατότητα παραλληλοποίησης των διεργασιών. Οι μικρορευστονικές διατάξεις επέφεραν επανάσταση σε πολλούς τομείς όπως αυτοί της ιατρικής, της βιοτεχνολογίας και της φαρμακευτικής καθώς η βιοχημική ανάλυση δεν απαιτεί πλέον εργαστήριο αλλά μπορεί να πραγματοποιηθεί στο σημείο που απαιτείται (Point of Care, Point of Need).

1.1.1 Τα πλεονεκτήματα της σμίκρυνσης στη Μικρορευστονική

Για να κατανοήσουμε πλήρως τα οφέλη αυτών των μικροσκοπικών συστημάτων, είναι σημαντικό να κατανοήσουμε πρώτα τη φυσική των ρευστών σε αυτήν την κλίμακα και πώς επηρεάζει τη συμπεριφορά τους. Αρχικά, ο λόγος των αδρανειακών δυνάμεων προς τις ιξώδεις δυνάμεις σε ένα ρευστό σύστημα περιγράφεται από τον αδιάστατο αριθμό Reynolds (Re) που δίνεται από τη σχέση:

$$R_e = \frac{\rho v L}{\mu}$$
 Eξ. 1

Όπου ρ η πυκνότητα του υγρού, ν η ταχύτητα, L η χαρακτηριστική διάσταση του συστήματος και μ το ιξώδες. Από αυτή την εξίσωση, είναι προφανές ότι καθώς μειώνονται οι χαρακτηριστικές διαστάσεις του συστήματος, μειώνεται και ο αριθμός του Reynold, δηλαδή η αδράνεια γίνεται αμελητέα, ενώ η εσωτερική τριβή (ιξώδες) σημαντική. Καθώς ο αριθμός Reynolds πέφτει κάτω από το 2000, το σύστημα μεταβαίνει σε στρωτή ροή που έχει αρκετές διαφορές σε σχέση με την τυρβώδη ροή με Re > 4000 (Σχ. 1). Πρώτον, η στρωτή ροή είναι εξαιρετικά προβλέψιμη που σημαίνει ότι η μαθηματική μοντελοποίηση αυτών των συστημάτων είναι ευκολότερη. Επιπλέον, η μοριακή μεταφορά στη στρωτή ροή διαφέρει από αυτή στη τυρβώδη καθώς δεν υπάρχει ανάμιξη, παρά μόνο διάχυση, η οποία οδηγεί και πάλι σε εξαιρετικά προβλέψιμες κινήσεις των μορίων. Στα μικρορευστονικά συστήματα, ο Re βρίσκεται σχεδόν πάντα στη στρωτή ροή [2].



Σχήμα 1. a) Γραμμές στρωτής ροής, b) γραμμές τυρβώδους ροής [3].

Εκτός από τον αριθμό Reynolds, ο αριθμός Péclet (Εξ. 2) δίνει επίσης πληροφορίες για τη μεταφορά μάζας ενός ρευστού.

$$P_e = \frac{\nu L}{D}$$
 Eξ. 2

Όπου, D είναι ο συντελεστής διάχυσης και ο P_e περιγράφει τον λόγο μεταφοράς μάζας με κατευθυνόμενη ροή προς τη μεταφορά λόγω διάχυσης. Από την εξ. 2, η μείωση των διαστάσεων ενός συστήματος οδηγεί σε μείωση του αριθμού Péclet. Όπως και με τον αριθμό Reynolds, αυτό σημαίνει ότι η κινητική ενός συστήματος είναι πιο προβλέψιμη και κύριος μηχανισμός μεταφοράς γίνεται η διάχυση [4].

Η επιφανειακή τάση είναι άλλο ένα σημαντικό χαρακτηριστικό στα μικρορευστονικά συστήματα. Η μικρή ποσότητα υγρών και ο μεγάλος λόγος επιφάνειας προς όγκο έχει ως αποτέλεσμα στα μικρορευστονικά συστήματα να αναπτύσσονται ασήμαντες βαρυτικές και αδρανειακές δυνάμεις και σημαντικές επιφανειακές αλληλεπιδράσεις όπως για παράδειγμα οι τριχοειδείς δυνάμεις [5].

Τέλος, οι χρόνοι αντίδρασης στα μικρορευστονικά συστήματα είναι πολύ ταχύτεροι από ότι στις συμβατικές συσκευές. Αυτό οφείλεται στις μικρότερες διαστάσεις των συστημάτων που οδηγούν σε μικρότερο χρόνο διάχυσης για οποιοδήποτε μόριο. Μια προσέγγιση για το χρόνο διάχυσης παρέχεται από την Εξ. 3:

Όπου x είναι η απόσταση που διανύει ένα μόριο διαλυμένης ουσίας κατά μήκος ενός άξονα μετά την πάροδο χρόνου t και D είναι ο συντελεστής διάχυσης της διαλυμένης ουσίας. Από την παραπάνω εξίσωση προκύπτει ότι:

$$t \propto x^2$$
 E§. 4

Ως εκ τούτου, καθίσταται σαφές ότι καθώς μειώνονται οι χαρακτηριστικές διαστάσεις ενός συστήματος, ο χρόνος που απαιτείται για τη διάχυση των μορίων στο εν λόγω σύστημα μειώνεται, οδηγώντας έτσι σε ταχύτερους χρόνους αντίδρασης. Αυτό αποκτάει ακόμα μεγαλύτερη σημασία για μεγάλου μεγέθους μόρια με χαμηλό συντελεστή διάχυσης, όπως το DNA [6].

Τα πλεονεκτήματα από την σμίκρυνση βέβαια, δεν περιορίζονται μόνο στη μείωση του χρόνου ανάλυσης. Με την μείωση του μεγέθους, οι συσκευές έγιναν φορητές και προσβάσιμες στον τελικό χρήστη. Η λήψη των αποτελεσμάτων της χημικής ανάλυσης είναι άμεση και απλή χωρίς την ανάγκη αποστολής του δείγματος σε εργαστήριο. Ο απαιτούμενος όγκος δείγματος είναι ο ελάχιστος δυνατός, πράγμα εξαιρετικά σημαντικό σε πολλές κλινικές δοκιμές και στη βιοϊατρική έρευνα όπου συνήθως είναι διαθέσιμοι πολύ μικροί όγκοι δειγμάτων ασθενών ενώ παράλληλα μειώνονται δραστικά τα κόστη για πολύ ακριβά δείγματα. Λίγα μόνο μικροσταγονίδια αίματος, πλάσματος, σάλιου, δακρύων, ούρων ή ιδρώτα έχουν τη δυνατότητα να αναλυθούν σε αυτές τις μικροσκοπικές πλατφόρμες για ιατρική διάγνωση [7]. Επιπλέον, είναι εύκολη η παραγωγή τους σε πολύ μεγάλες ποσότητες, ενώ ταυτόχρονα προσφέρουν την δυνατότητα παράλληλης επεξεργασίας δειγμάτων και συνεχή παρακολούθησή τους. Μερικά παραδείγματα τέτοιων συσκευών είναι τα τεστ εγκυμοσύνης, τα τεστ προσδιορισμού της συγκέντρωσης γλυκόζης στο αίμα για τους διαβητικούς και τα τεστ ανάλυσης νερού και εδάφους [1].

1.1.2 Ιστορική εξέλιξη της τεχνολογίας και των εφαρμογών της

υπάρχουν Aν παραδείγματα μικρορευστονικών συσκευών τύπου και μικροηλεκτρομηγανικών συστημάτων (MEMS, Microelectromechanical systems) πριν το 1990, όπως αυτή των Terry et al. το 1979 η πρώτη μικροαναλυτική διάταξη σε πυρίτιο [8], παρουσιάστηκε στο πρωτοποριακό paper των Manz et al. [9] το 1990 που καθιέρωσε το πεδίο των μικροσυστημάτων ολικής χημικής ή βιοχημικής ανάλυσης (μTAS). Η έννοια του μTAS είναι μια επέκταση της έννοιας του συστήματος ολοκληρωμένης ανάλυσης (TAS, total analysis system), η οποία παρουσιάστηκε στις αρχές της δεκαετίας του 1980 για να περιγράψει την αυτοματοποίηση των μεθόδων στην αναλυτική χημεία [10]. Η ιδέα των TAS βασίζεται στην πλήρη ενσωμάτωση αναλυτικών διαδικασιών σε συστήματα ροής υγρών, όπου ρευστά αντικαθιστούν το ανθρώπινο γέρι στη μεταφορά δειγμάτων μεταξύ των διαφόρων σταδίων διαχείρισης του δείγματος. Το μΤΑS είναι μια μικρότερη και ταχύτερη εκδοχή του ΤΑS, με αναλύσεις που λαμβάνουν χώρα σε συστήματα ροής όγκου της τάξης των μL με αποτέλεσμα την επίτευξη χρόνων αντιδράσεων της τάξης των δευτερολέπτων. Το ενδιαφέρον για αυτή την τεχνολογία αυξάνεται ραγδαία, με ερευνητές από πολλούς κλάδους να στρέφουν την προσογή τους στα μΤΑS ως τρόπο ανάπτυξης νέων ερευνητικών εργαλείων για χημικές και βιολογικές εφαρμογές. Αυτό έχει επίσης ως αποτέλεσμα την εισαγωγή νέων ορολογιών και εννοιών όπως αυτή της «Μικρορευστονικής» και του «Lab-on-a-chip» (LOC), ονομασίες που γρησιμοποιούνται όλο και περισσότερο στη θέση του μΤΑS ως γενικοί ορισμοί για το πεδίο [11].

Τις δεκαετίες που προηγήθηκαν της δεκαετίας του '90, ο προσδιορισμός της αλληλουχίας του DNA βασιζόταν στην ηλεκτροφόρηση σε πλάκα γέλης [12]. Καθώς η παρασκευή αυτών των πλακών ήταν επίπονη και χρονοβόρα, η διεξαγωγή των διαχωρισμών ήταν δύσκολο να αυτοματοποιηθεί και επομένως η ηλεκτροφόρηση πλάκας γέλης ήταν κατάλληλη μόνο για ερευνητικές εφαρμογές μικρής κλίμακας. Οι ερευνητές, λοιπόν, άρχισαν να εφαρμόζουν τις αρχές της μικρορευστονικής για τη δημιουργία μιας πιο εύχρηστης μεθόδου προσδιορισμού της αλληλουχίας DNA. Το 1990, οι Swerdlow και Gesteland έδειξαν ότι ένας τριχοειδείς σωλήνας από διοξείδιο του πυριτίου διαμέτρου 75 μm γεμάτος με γέλη ηλεκτροφόρησης θα μπορούσε να αντικαταστήσει την πλάκας γέλης, δημιουργώντας έτσι την μέθοδο τριχοειδούς ηλεκτροφόρησης (CE, capillary electrophoresis) [13]. Την ίδια περίοδο, η αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (PCR, Polymerase chain reaction), που είχε αρχίσει να επιβάλλεται ως η μέθοδος επιλογής για την ανίχνευση DNA, αλλά που είχε τις ίδιες δυσκολίες αυτοματοποίησης με την ηλεκτροφόρηση σε πλάκας γέλης, παρακίνησε τους Northrup et al. το 1993 για την ανάπτυξη της πρώτης διάταξης για ενίσχυση DNA με PCR [14].



Σχήμα 2. Η αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (PCR, Polymerase chain reaction) επιτυγχάνει την εκθετική ενίσχυση βραχέων τμημάτων μιας αλυσίδας DNA. Ο κάθε κύκλος PCR περιλαμβάνει τα τρία στάδια θερμικής κατεργασίας για τον διαχωρισμό των αλυσίδων του DNA, τον υβριδισμό (πρόσδεση) την εκκινητών και την επιμήκυνση της αλυσίδας με τη δράση της πολυμεράσης [15].

Άλλη μία εργασία σταθμός για την μικρορευστονική είναι αυτή των Whitesides et al. που δημοσιεύτηκε το 2007 και αφορά την κατασκευή του πρώτου μικρορευστονικού συστήματος σε χαρτί (PAD, paper analytical device) για την εκτέλεση μιας ανάλυσης σε ένα δείγμα [16]. Τα βασικά πλεονεκτήματα των PADs είναι το μικρό κόστος παραγωγής και η έλλειψη αντλιών για μεταφορά των διαλυμάτων αφού αυτή εξυπηρετείται από τριχοειδή φαινόμενα που λαμβάνουν χώρα στο χαρτί. Τα PADs χρησιμοποιούνται σε ένα μεγάλο φάσμα εφαρμογών όπως: τεστ για ελονοσία, για τη διάγνωση της φυματίωσης, ως αισθητήρες pH, τεστ εγκυμοσύνης, αλλά και στην για την ανίχνευση της παρουσίας ενός αντισώματος ή ενός αντιγόνου σε ένα δείγμα με μέθοδο ELISA (enzyme linked immunosorbent assays) [6].



Σχήμα 3. Το πρώτο μικρορευστονικό σε χαρτί από τον Whitesides et al. 2007: a) αρνητικός έλεγχος ύπαρξης γλυκόζης (αριστερά) και πρωτεΐνης (δεξιά) σε διάλυμα τεχνητών ούρων, b) θετικός έλεγχος ύπαρξης γλυκόζης (αριστερά) και πρωτεΐνης (δεξιά) σε διάλυμα τεχνητών ούρων [16].

Το Lab-on-a-Chip (LOC) είναι ένας όρος που εμφανίζεται ολοένα και περισσότερο τα τελευταία χρόνια για να περιγράψει μικρορευστονικές πλατφόρμες που ενσωματώνουν πολλαπλές λειτουργίες σε μια ενιαία ψηφίδα (τσιπ) μεγέθους μόνο μερικών τετραγωνικών χιλιοστών έως λίγων τετραγωνικών εκατοστών. Ένα παράδειγμα που καταδεικνύει την αρχή του LOC είναι μια φορητή συσκευή εξέτασης αίματος η οποία απαιτεί μόνο μια σταγόνα αίματος του ασθενούς και ολόκληρη η ανάλυση πραγματοποιείται εντός της συσκευής επιτρέποντας να γίνει η διάγνωση σε λίγα μόνο λεπτά [17]. Άλλες σύγχρονες βιοϊατρικές εφαρμογές των LOC είναι η ανίχνευση πρωτεϊνών και DNA, η ανίχνευση ορμονών καθώς και η ανίχνευση παθογόνων μικροοργανισμών [18].

Ο πιο ταχέως αναπτυσσόμενος τομέας της μικρορευστονικής αυτή τη στιγμή είναι τα συστήματα organ-on-a-chip. Αυτά τα συστήματα είναι μικρορευστονικές διατάξεις όπου καλλιεργούνται κύτταρα τα οποία διατηρούνται ζωντανά σε συνθήκες οι οποίες προσομοιώνουν αυτές στους ιστούς των ανθρώπινων οργάνων. Οι πρώτες έρευνες επικεντρώθηκαν στην κατασκευή μεμονωμένων θαλάμων έγχυσης με έναν τύπο κυττάρων, ωστόσο, καθώς προχώρησε η γνώση, αναπτύχθηκαν πιο περίπλοκα συστήματα που ενσωματώνουν πολλαπλούς τύπους κυττάρων για να αναδημιουργήσουν τις διεπαφές μεταξύ κυττάρων και ιστών, με αποτέλεσμα τα τελευταία χρόνια να μιλάμε για συστήματα οργάνων [19] ή ακόμα και human-on-a-chip [20].

1.2 Organ-on-a-Chip

Η πρόοδος στη μικρορευστονική και τα lab-on-a-chip (LOC), οδήγησε τα τελευταία χρόνια σε μια νέα βιοϊατρική εφαρμογή δημιουργώντας ψηφίδες μικρορευστονικής καλλιέργειας κυττάρων. Αυτές οι μικροσυσκευές, γνωστές ως organ-on-a-chip (OoC), μιμούνται το in vivo μικροπεριβάλλον των οργάνων στο ανθρώπινο σώμα και προσφέρουν in vitro μοντέλα ανθρώπινων οργάνων [21]. Κατά συνέπεια, η έρευνα σχετικά με τα OoC έχει κερδίσει μεγάλη προσοχή από ερευνητές σε όλο τον κόσμο καθώς αναμένεται να προσφέρει ισχυρά εργαλεία για βιοϊατρικές έρευνες, συμπεριλαμβανομένης της μοντελοποίησης ασθενειών, της ανάπτυξης φαρμάκων, της εξατομικευμένης ιατρικής, της μεταφοράς φαρμάκων κ.λπ. [22].



Σχήμα 4. Μικρορευστονική διάταξη πνεύμονα σε ψηφίδα [23].

Κατά την ανάπτυξη νέων φαρμάκων, οι υποψήφιες ουσίες ελέγχονται σε τρία διαφορετικά στάδια: προκλινικό, κλινικό και μετεγκριτικό. Οι προκλινικές μελέτες περιλαμβάνουν δύο είδη πειραμάτων: μελέτες σε κυτταροκαλλιέργειες και μελέτες σε ζώα. Οι μέθοδοι κυτταρικής καλλιέργειας συνίστανται στην καλλιέργεια ζωντανών κυττάρων σε

τρυβλία, χωρίς ροή αίματος/βιολογικών υγρών και επομένως οι συνθήκες είναι διαφορετικές από αυτές σε ένα πραγματικό όργανο. Επιπλέον, τα δεδομένα από μελέτες σε ζώα δεν προβλέπουν πάντα τις ανθρώπινες αποκρίσεις καθώς έχουν θεμελιώδεις διαφορές όπως διαφορετική φυσιολογία και διαφορετικές κυτταρικές λειτουργίες. Επιπλέον η κύρια αιτία αποτυχίας ενός φαρμάκων είναι αυξημένη τοξικότητα των νεφρών. Μόνο το 2% των επιβλαβών για τα νεφρά φαρμάκων αναγνωρίζονται στο προκλινικό στάδιο ενώ οι σοβαρές ανεπιθύμητες ενέργειες ανακαλύπτονται μόνο μετά τα κλινικά στάδια για ποσοστό μεγαλύτερο από 20% των νέων φαρμάκων. Λόγω αυτών των περιορισμών είναι επιτακτική η ανάγκη για συσκευές που προσομοιάζουν τα ανθρώπινα όργανα καλύτερα από τα ζωικά μοντέλα. Το organ-on-a-chip μπορεί να είναι μια λύση προς αυτή τη κατεύθυνση, καθώς χρησιμοποιεί πρωτεύοντα ανθρώπινα κύτταρα και όχι ζωικά, όπως ένα πραγματικό ανθρώπινο όργανο [24].

1.2.1 Πλεονεκτήματα μικρορευστονικών κυτταροκαλλιεργιών

Όπως αναφέρθηκε παραπάνω, οι πλατφόρμες μικρορευστονικής κυτταροκαλλιέργειας ΟοC παρέχουν σε ένα δυναμικό μικροπεριβάλλον και ακριβή έλεγχό τους μιας μικρής ποσότητας κυττάρων, προσφέροντας έτσι μοναδικά πλεονεκτήματα έναντι των παραδοσιακών τεχνικών κυτταροκαλλιέργειας (π.χ. καλλιέργεια σε τρυβλία) και στα στατικά μοντέλα 3D κυτταροκαλλιέργειας.

Οι συμβατικές δισδιάστατες κυτταροκαλλιέργειες δεν είναι σε θέση να μιμηθούν την τρισδιάστατη δομή, τις μηχανικές ιδιότητες και το βιοχημικό μικροπεριβάλλον που βιώνουν τα κύτταρα σε ένα ζωντανό όργανο, αφού οι κυτταρικές αλληλεπιδράσεις σε τρεις διαστάσεις επηρεάζουν σημαντικά τις κυτταρικές αποκρίσεις σε περιβαλλοντικά ερεθίσματα [20]. Αντίστοιχα, αν και τα στατικά μοντέλα τρισδιάστατης κυτταροκαλλιέργειας αναπτύχθηκαν για να ξεπεραστούν οι περιορισμοί που σχετίζονται με τη δισδιάστατη κυτταροκαλλιέργεια και αυτά με τη σειρά τους αποτυγχάνουν να μιμηθούν το δυναμικό μικροπεριβάλλον που συνήθως βιώνουν τα κύτταρα in vivo. Τα μικρορευστονικά συστήματα παρέχουν έναν πιο εξελιγμένο τρόπο κυτταροκαλλιέργειας καθώς μιμούνται τις διατμητικές τάσεις που δέχονται τα κύτταρα in vivo [25] και αναπαράγουν με μεγάλη ακρίβεια τις δυναμικές, φυσικοχημικές, βιοχημικές ιδιότητες του μικροπεριβάλλοντος των ζωντανών οργάνων. Επιπλέον πλεονεκτήματα των μικρορευστονικών διατάξεων είναι η ελαχιστοποίηση της κατανάλωσης αντιδραστηρίων, ο μικρός όγκος δειγμάτων, η μείωση του κινδύνου μόλυνσης και η εύκολη αναπαραγωγή τους [26].

Το βασικό λοιπόν πλεονέκτημα των κυτταροκαλλιεργειών σε μικρορευστονικές πλατφόρμες είναι η εφαρμογή διατμητικής τάσης στα κύτταρα. Η ροή του αίματος μέσω του καρδιαγγειακού συστήματος πέρα από ανταλλαγή ουσιών επιβάλλει επίσης μηχανικές δυνάμεις στα κύτταρα με υδροστατική πίεση και διατμητική τάση. Αυτές οι δυνάμεις, που αναφέρονται ως αιμοδυναμικές, επηρεάζουν τα κύτταρα και το κυτταρικό περιβάλλον, ειδικά τα ενδοθηλιακά κύτταρα που καλύπτουν το εσωτερικό των αιμοφόρων αγγείων. Αρκετές από τις λειτουργίες των ενδοθηλιακών κυττάρων επηρεάζονται από την ασκούμενη διατμητική τάση που εφαρμόζεται όταν το αίμα περνά από τα κύτταρα. Η στρωτή ροή έχει προστατευτικό ρόλο στα ενδοθηλιακά κύτταρα έναντι της αθηροσκλήρωσης (στένωση του αιμοφόρου αγγείου λόγω φλεγμονής του τοιχώματός του). Η μεμβράνη των ενδοθηλιακών κυττάρων καταλαμβάνεται από ιντεγκρίνες και υποδοχείς που μαζί με τη λιπιδική διπλοστιβάδα, δρουν ως αισθητήρας διατμητικής τάσης. Επιπλέον, εάν η διατμητική τάση είναι αρκετά υψηλή, επηρεάζεται η μορφολογία των πυρήνων των ενδοθηλιακών κυττάρων με αποτέλεσμα να μεγαλώνει το μέγεθος τους και να χάνουν το στρογγυλό σχήμα τους [27].

1.2.2 Τεχνολογίες κατασκευής οργάνων σε ψηφίδα

Τα υλικά που χρησιμοποιούνται συνήθως για την κατασκευή οργάνων σε ψηφίδα μπορούν να χωριστούν σε δύο κατηγορίες: υλικά που χρησιμοποιούνται για τη ψηφίδα και βιοϋλικά που χρησιμοποιούνται στην κατασκευή ιστών. Το πολυδιμεθυλσιλοξάνιο (PDMS) είναι ένα υλικό που έχει χρησιμοποιηθεί ευρέως ως υλικό κατασκευής ψηφίδων οργάνων. Όσον αφορά τα βιοϋλικά που χρησιμοποιούνται στις πλατφόρμες OoC είναι συχνά βιοδιασπώμενα και έχουν πορώδεις δομές και προέρχονται είτε από συνθετικά υλικά ή από φυσικά υλικά (π.χ. ινώδες και κολλαγόνο) ή υβριδικά υλικά [28].

Το Σχήμα 5 παρουσιάζει τη γενική διαδικασία που ακολουθείται για την κατασκευή μιας μικρορευστονικής πλατφόρμας OoC. Αφού εξεταστούν διάφορες παράμετροι για την προσομοίωση του μικροπεριβάλλοντος ενός συγκεκριμένου οργάνου, το επιθυμητό σχέδιο θα καταρτιστεί με ένα σχεδιαστικό λογισμικό (π.χ. AutoCAD, CATIA). Έπειτα, θα χρησιμοποιηθεί μια κατάλληλη τεχνική μικροκατασκευής (π.χ. φωτολιθογραφία, 3D εκτύπωση, SU-8) για την κατασκευή της μήτρας πάνω στην οποία θα χυτευτεί ένα ελαστομερές ώστε να πάρει το επιθυμητό σχήμα. Τέλος, η κυτταρική καλλιέργεια ή η καλλιέργεια ιστού θα πραγματοποιηθεί στη βιοψηφίδα πάνω με μία μεμβράνη προκειμένου να μιμηθεί τη λειτουργικότητα ενός συγκεκριμένου οργάνου και να πραγματοποιηθούν βιοχημικές ή βιοφυσικές αναλύσεις και δοκιμές φαρμάκων [7]. Στην OoC τεχνολογία για την κατασκευή της ψηφίδας συνήθως επιλέγεται η μέθοδος της μαλακής λιθογραφίας που κατασκευάζεται συνήθως με τη τεχνική της οπτικής λιθογραφίας.



Σχήμα 5. Διαδικασία ανάπτυξης organ-on-a-chip [7].

Η οπτική λιθογραφία ή αλλιώς φωτολιθογραφία (Σχ. 6) εφαρμόζεται εκτενώς στη βιομηχανία των ημιαγωγών για κατασκευή των ολοκληρωμένων κυκλωμάτων (integrated circuits) αλλά και στην κατασκευή μικροηλεκτρομηχανικών διατάξεων (Microelectromechanical systems, MEMS) και λαμβάνει χώρα σε εργαστήρια υψηλής καθαρότητας που είναι γνωστά με τον όρο καθαροί χώροι. Η αρχή της φωτολιθογραφίας είναι η εξής: το φως προβάλλει την εικόνα του σχεδίου της μάσκας πάνω στη φωτοευαίσθητη ρητίνη με αποτέλεσμα ορισμένα μέρη της ρητίνης να φωτίζονται ενώ άλλα παραμένουν σκοτεινά και καθώς η ρητίνη αλλάζει τη διαλυτότητά της στο σημείο όπου φωτίζεται, μετά την εμφάνιση, το μοτίβο της μάσκας αποτυπώνεται στη ρητίνη [29]. Η επικάλυψη του υποστρώματος γίνεται είτε με χρήση υγρής ρητίνης που απλώνεται ομοιόμορφα πάνω στο υπόστρωμα με περιστροφή ή ψέκασμα ή βύθιση, είτε με την χρήση ξηρής ρητίνης που επικολλάται στο υπόστρωμα με τη βοήθεια συσκευής ελασματοποίησης. Το κάθε είδος ρητίνης έχει πλεονεκτήματα και μειονεκτήματα, η επικάλυψη με υγρή ρητίνη δεν διασφαλίζει ότι το πάχος της ρητίνης θα είναι το ίδιο σε όλη την επιφάνεια του υποστρώματος και επιπλέον για να στερεοποιηθεί χρειάζεται ένα επιπλέον βήμα, συνήθως ψήσιμο, αντίθετα η ξηρή ρητίνη έχει παντού το ίδιο πάχος αλλά θέλει πολύ προσεχτικό χειρισμό ώστε να εφαρμοστεί ομοιόμορφα στο υπόστρωμα χωρίς να δημιουργηθούν πτυχώσεις. Οι ρητίνες χωρίζονται σε θετικού και αρνητικού τόνου. Οι ρητίνες θετικού τόνου καθίστανται διαλυτές όταν φωτιστούν με υπεριώδες φως και απομακρύνονται κατά την εμφάνιση. Αντίθετα, οι αρνητικού τόνου ρητίνες καθίστανται αδιάλυτες στις φωτιζόμενες περιοχές και κατά την εμφάνιση απομακρύνονται από τις αφώτιστες περιοχές. Ανάλογα, λοιπόν, με το είδος της ρητίνης δίνεται και το ανάλογο σχέδιο στη μάσκα. Μετά την τοποθέτηση της μάσκας πάνω στο επικαλυμμένο με ρητίνη υπόστρωμα ακολουθεί έκθεση σε υπεριώδη ακτινοβολία, απομάκρυνση της ρητίνης με βύθιση του δείγματος σε κατάλληλο διαλύτη (εμφανιστή), και ψήσιμο [30].



Σχήμα 6. Σχηματική αναπαράσταση φωτολιθογραφίας για θετικού και αρνητικού τόνου ρητίνη [31].

Η μαλακή λιθογραφία (soft lithography) είναι μια μη φωτολιθογραφική μέθοδος για την αναπαραγωγή ενός σχεδίου σε ένα ελαστομερές υπόστρωμα. Είναι μέθοδος χαμηλού κόστους, εύκολη στην εκμάθηση, απλή στην εφαρμογή και προσβάσιμη σε ένα ευρύ φάσμα χρηστών. Παρακάμπτει τους περιορισμούς περίθλασης που υπεισέρχονται στη φωτολιθογραφία, ενώ δημιουργεί τρισδιάστατα σχέδια και δομές σε μη επίπεδες επιφάνειες και μπορεί να εφαρμοστεί σε μεγάλη ποικιλία υλικών και χημικών επιφανειών. Αρχικά κατασκευάζεται μια μήτρα με τα σχέδια που πρόκειται να αποτυπωθούν και η ελαστομερής δομή παρασκευάζεται με χύτευση. Για τον σκοπό αυτό, προπολυμερές του ελαστομερούς αναμιγνύεται με τον παράγοντα σκλήρυνσης και χυτεύεται στη μήτρα που φέρει την ανάγλυφη δομή στην επιφάνειά της. Ακολουθεί θέρμανση σε υψηλές θερμοκρασίες οπότε η δομή σκληραίνει και αποκολλάται από τη μήτρα [32]. Μία σχηματική αναπαράσταση της διαδικασίας φαίνεται στο Σχήμα 7.



Σχήμα 7. Σχηματική αναπαράσταση της διαδικασίας μαλακής λιθογραφίας σε PDMS [33].

Η κάθε μικρορευστονική διάταξη μετά την κατασκευή της απαιτεί την συγκόλληση δύο ή περισσότερων τμημάτων ώστε να σχεδιαστεί η κατάλληλη για την κάθε εφαρμογή τελική διάταξη. Ανάλογα με τον τύπο και την εφαρμογή της κάθε διάταξης η μέθοδος συγκόλλησης ποικίλει. Γενικά το στάδιο της συγκόλλησης – στεγανοποίησης είναι κρίσιμο καθώς μπορεί εύκολα να επηρεάσει τα γεωμετρικά χαρακτηριστικά των μικροδομών [34]. Μεταξύ των διαφόρων τρόπων συγκόλλησης, ο πιο κατάλληλος επιλέγεται ανά περίπτωση με βάση το είδος και τις ιδιότητες των επιφανειών που πρέπει να συγκολληθούν. Μερικές από τις πιο διαδεδομένες μεθόδους αναλύονται παρακάτω [35]:

- Η έμμεση συγκόλληση με PDMS είναι από τις πιο διαδεδομένες μεθόδους κατά την οποία μία ενδιάμεση στρώση από PDMS επιστρώνεται μεταξύ των υποστρωμάτων και χρησιμοποιείται ώστε να σφραγιστούν οι δύο επιφάνειες. Αυτό επιτυγχάνεται με σκλήρυνση της ενδιάμεσης στρώσης του PDMS μέσω ψησίματος ώστε οι επιφάνειες να συγκολληθούν χωρίς να παρουσιάζουν διαρροές.
- Η τροποποίηση των επιφανειών με πλάσμα οξυγόνου πολλές φορές αποτελεί ιδανική μέθοδο συγκόλλησης. Χρησιμοποιείται για τη συγκόλληση του PDMS με άλλα υποστρώματα, όπως το γυαλί, το πυρίτιο ή το ίδιο το PDMS. Η μέθοδος οδηγεί σε μη αναστρέψιμη σύνδεση, η οποία είναι εξαιρετικά χρήσιμη για την παραγωγή μικρορευστονικών συστημάτων χωρίς διαρροές.
- Άλλη μία μέθοδος είναι η χρήση φωτοπολυμερών ως ενδιάμεσο στρώμα μεταξύ των επιφανειών. Το κύριο πλεονέκτημα της χρήσης φωτοπολυμερών είναι η ευκολία διαμόρφωσης των περιοχών πρόσφυσης. Σε αυτή την περίπτωση, η σφράγιση γίνεται αφού καλυφθεί η περιοχή πρόσφυσης με κατάλληλη ρητίνη και στη συνέχεια εκτεθεί σε υπεριώδη ακτινοβολία. Καθώς δεν εμπλέκεται υγρό, η μέθοδος αυτή μπορεί να θεωρηθεί ως μέθοδος ξηρής συγκόλλησης. Ως εκ τούτου, η παραμόρφωση και το σφράγισμα του καναλιού μπορούν να αποφευχθούν.

Μεταξύ των διαφορετικών τύπων φωτοπολυμερικών υλικών, το SU-8 είναι από τα πιο δημοφιλή.

- Η θερμική επεξεργασία είναι μια άλλη οικονομικά αποδοτική μέθοδος για τη συγκόλληση θερμοπλαστικών υλικών, ειδικά για μαζική παραγωγή. Ωστόσο, το κύριο πρόβλημα με αυτή τη μέθοδο είναι ο ανεπαρκής έλεγχος ακριβείας της θερμοκρασίας τήξης των θερμοπλαστικών, ώστε να επανέλθουν στη στερεά τους κατάσταση. Επιπλέον, οι υψηλές τιμές θερμοκρασίες και πίεσης που εφαρμόζονται κατά τη συγκόλληση μπορεί να οδηγήσουν σε παραμόρφωση των καναλιών και ενδεχόμενη σφράγισή τους.
- Η συγκόλληση με διαλύτη είναι μια ακόμη απλή προσέγγιση για τη σφράγιση μικρορευστονικών δομών σε πλακέτες κυκλωμάτων με εξαιρετικά σύντομους χρόνους επεξεργασίας. Αυτή η στρατηγική μπορεί να οδηγήσει σε συγκόλληση του με υψηλή μηχανική αντοχή. Στα αρνητικά της μεθόδου είναι η μεγάλη πιθανότητα παραμόρφωσης των καναλιών λόγω χρήσης ρευστών διαλυτών.
- Μια τελευταία εναλλακτική μέθοδος για την τροποποίηση της επιφάνειας των τμημάτων που πρόκειται να συγκολλήσουν είναι η τροποποίησή τους με χημική εναπόθεση (CVD). Εξαιρετικά λεπτά στρώματα πολυμερών με πάχος της τάξης της νανοκλίμακας επικαλύπτονται μέσω CVD στην μία ή και στις δύο προς σφράγιση επιφάνειες πριν από τη συγκόλληση. Αυτή η μέθοδος παρέχει συγκόλληση χωρίς διαρροές για πολλά οργανικά και ανόργανα επίπεδα υποστρώματα. Η μέθοδος έχει ως στόχο να δημιουργήσει ένα ισχυρό στρώμα σφράγισης συνδέοντας δύο συμπληρωματικές επικαλύψεις, οι οποίες αντιδρούν μεταξύ τους με υψηλή συγγένεια οδηγώντας στην κόλληση των δύο επιφανειών μετά την κατεργασία σε υψηλές θερμοκρασίες (περίπου 140 °C).

1.2.3 Εφαρμογές

Μερικά παραδείγματα Organ-on-a-Chip που έχουν κατασκευαστεί και κυκλοφορήσει στην αγορά είναι:

- Πνεύμονας: Ένα OoC πνεύμονα μπορεί να βοηθήσει στη μοντελοποίηση πνευμονικών ασθενειών (π.χ. μολυσματικές ασθένειες), την ανάπτυξη φαρμάκων και τις δοκιμές τοξικότητας. Η κύρια λειτουργία του πνεύμονα είναι η ανταλλαγή αερίων μεταξύ του εισπνεόμενου αέρα και του αίματος, αλλά το πιο ιδιαίτερο χαρακτηριστικό του είναι η δυναμική και περιοδική μηχανική κίνησή του δηλαδή η αναπνοή. Για να αναπαραχθεί η αναπνοή in vitro, συνήθως στα μικρορευστονικά συστήματα χρησιμοποιείται πλευρικό κενό που τεντώνει περιοδικά μια λεπτή πορώδη εύκαμπτη μεμβράνη PDMS που λειτουργεί ως η διεπαφή μεταξύ των πνευμονικών μικροαγγειακών κυττάρων και των κυψελιδικών επιθηλιακών κυττάρων [36].
- Καρδιαγγειακό σύστημα: Ο καρδιακός μυϊκός ιστός αποτελείται από οργανωμένα καρδιακά μυϊκά κύτταρα (ή μυοκάρδιο) και ινοβλάστες. Τα αιμοφόρα αγγεία έχουν επίσης πολύπλοκες δομές, καθώς περιλαμβάνουν μυϊκά και ενδοθηλιακά κύτταρα και επιπλέον εισέρχεται η ροή του αίματος η οποία έχει ως αποτέλεσμα τη διατμητική τάση και παραμόρφωση των αγγείων. Τα OoC είναι σε θέση να εφαρμόζουν διατμητική τάση στα κύτταρα που καλλιεργούνται στο σύστημα, συνήθως με τη χρήση αντλιών και

βαλβίδων on-chip για να μιμηθούν το in vivo μικροπεριβάλλον των αιμοφόρων αγγείων [37].

- Εγκέφαλος: Ο εγκέφαλος είναι ένα από τα πιο εξελιγμένα όργανα του ανθρώπινου οργανισμού και αποτελείται από μια μεγάλη ποικιλία κυττάρων. Η γενετική και οι λειτουργίες του ανθρώπινου εγκεφάλου διαφέρουν σημαντικά από τα ζώα. Επομένως, τα ζωικά μοντέλα δεν μπορούν να μας δώσουν μια αντιπροσωπευτική εικόνα των εγκεφαλικών λειτουργιών και ασθενειών. Ως εκ τούτου έχουν αναπτυχθεί μικρορευστονικά μοντέλα εγκεφάλου σε ψηφίδες τα οποία μιμούνται τις in vivo συνθήκες, συμπεριλαμβανομένων των χημικών, ηλεκτρικών και φυσικών συνθηκών του ανθρώπινου εγκεφάλου [38].
- Συκώτι: Το ήπαρ με τις κρίσιμες λειτουργίες του όπως ο μεταβολισμός, η αποτοξίνωση του αίματος από διάφορους μεταβολίτες, και η παραγωγή βιομορίων που συμμετέχουν σε λειτουργίες άλλων οργάνων, είναι ένα από τα πιο ζωτικά όργανα του ανθρώπινου οργανισμού. Δεδομένου ότι η τοξικότητα του ήπατος είναι μία από τις κύριες αιτίες της μη καταλληλότητας ενός φαρμάκου, ένα in vitro μοντέλο του ήπατος που μπορεί να μιμηθεί το in vivo μικροπεριβάλλον είναι ζωτικής σημασίας για τις διαδικασίες ανάπτυξης φαρμάκων. Δεδομένου ότι η έγχυση υγρού είναι το κύριο χαρακτηριστικό του ήπατος, τα σχετικά ΟοC παρέχουν συνθήκες έγχυσης που μιμούνται τη λειτουργία του ήπατος καθιστώντας τα την πιο αξιόπιστη μέθοδο κυτταροκαλλιέργειας [39].
- Νεφρός: Ο νεφρός είναι ένα από τα πιο δύσκολα όργανα για αναπαραγωγή καθώς αποτελείται από πολλούς ιστούς. Ο νεφρός είναι ζωτικό όργανο για τον ανθρώπινο οργανισμό λόγω των λειτουργιών του, όπως η κάθαρση του αίματος, η απομάκρυνση τοξινών, και η διατήρηση της ισορροπίας των ηλεκτρολυτών. Μία από τις πιο συνήθης ανεπιθύμητες παρενέργειες κατά τη διαδικασία ανάπτυξης ενός φαρμάκου είναι η νεφροτοξικότητα [40].
- Έντερο: Τα ανθρώπινα in vitro μοντέλα εντέρου είναι πολύ σημαντικά στις φαρμακοκινητικές μελέτες καθώς η απορρόφηση πολλών φαρμακευτικών ουσιών λαμβάνει χώρα στο έντερο. Τα συμβατικά in vitro μοντέλα αποτυγχάνουν να αναπαράγουν το μικροπεριβάλλον του ανθρώπινου εντέρου. Ως εκ τούτου, τα OoC παρέχουν ένα in vitro μοντέλο εντέρου που μιμείται πληρέστερα το in vivo μικροπεριβάλλο για δοκιμές φαρμάκων [41].
- Δέρμα: Το δέρμα θεωρείται ως το όργανο με την μεγαλύτερη έκταση στο ανθρώπινο οργανισμό αλλά και με πολλές συγκεκριμένες λειτουργίες, όπως ρύθμιση της θερμοκρασίας του σώματος και η πρόληψη της αφυδάτωσης ενώ αποτελεί και τη πρώτη ασπίδα για την προστασία άλλων οργάνων από περιβαλλοντικούς στρεσογόνους παράγοντες (βιολογικούς, φυσικούς ή/και χημικούς). Τα μοντέλα δέρματος είναι ζωτικής σημασίας, για τις τοξικολογικές δοκιμές νέων ενώσεων από τις φαρμακευτικές και χημικές βιομηχανίες αλλά και για τις βιομηχανίες καλλυντικών [42].

Σημαντικές προσπάθειες γίνονται για την κατασκευή μίας πλατφόρμας πολλαπλών OoC ή μιας πλατφόρμες body-on-a-chip δηλαδή in vitro μοντέλα που μιμούνται τις αλληλεπιδράσεις μεταξύ δύο ή περισσοτέρων ανθρώπινων οργάνων μέσα σε ένα μικρορευστονικό σύστημα. Αυτές οι πολύπλοκες μικρορευστονικές πλατφόρμες μπορούν να χρησιμοποιηθούν για την προσομοίωση αλληλεπιδράσεων μεταξύ διαφορετικών οργάνων, για ανακάλυψη φαρμάκων, δοκιμές τοξικότητας κ.λπ. Για την ανάπτυξη αυτών των συνδυαστικών διατάξεων υπάρχουν ορισμένες βιολογικές προκλήσεις που πρέπει να ληφθούν υπόψη, όπως η χρήση θρεπτικού μέσου κατάλληλου για όλους τους τύπους κυττάρων, η αποφυγή σχηματισμού φυσαλίδων, η βελτιστοποίηση των φυσιολογικών παραμέτρων για διαφορετικά όργανα κ.α.

Άλλη μία σημαντική εφαρμογή που μπορούν να βρουν τα OoC είναι η εξατομικευμένη ιατρική. Δεδομένου ότι η μοντελοποίηση ασθενειών και ο έλεγχος φαρμάκων είναι οι δύο κύριοι στόχοι των OoC, χρησιμοποιώντας δείγματα που προέρχονται από ασθενείς (κύτταρα, βιοψίες ιστών κ.λπ.) σε αυτές τις πλατφόρμες, είναι δυνατό να αναπτυχθούν μοντέλα για μεμονωμένους ασθενείς σε ψηφίδες. Πράγματι, οι εξατομικευμένες πλατφόρμες OoC που προέρχονται από ασθενείς έχουν τη δυνατότητα να επιταχύνουν τις χρονοβόρες και δαπανηρές διαδικασίες ανακάλυψης φαρμάκων όπως και την εύρεση της καλύτερης προσέγγισης για θεραπεία για άτομα με γενετικές διαφορές.

Οι πλατφόρμες OoC έχουν τη δυνατότητα να διαδραματίσουν κρίσιμο ρόλο στο μέλλον για την προώθηση συνδυαστικής θεραπείας και στοχευμένων δοκιμών χορήγησης φαρμάκων ειδικά για ασθένειες με καρκίνο όπου ο χρόνος είναι κρίσιμος και δεν υπάρχει χώρος για δοκιμή και λάθος στη θεραπεία. Η άμεση και εντοπισμένη χορήγηση των μορίων του φαρμάκου σε συγκεκριμένους ιστούς ή όργανα στο σώμα στοχεύει στο να ενισχύσει την επιθυμητή θεραπευτική συγκέντρωση στον στοχευόμενο ιστό και παράλληλα να ελαχιστοποιήσει τις συστηματικές παρενέργειες του φαρμάκου. Στη συνδυαστική θεραπεία, οι κλινικοί γιατροί συνδυάζουν δύο ή περισσότερους θεραπευτικούς παράγοντες ή προσεγγίσεις για να ανακαλύψουν τη βέλτιστη θεραπεία ενός ασθενούς.

Η εύρεση νέων θεραπευτικών μέσων για σπάνιες ασθένειες, που επηρεάζουν έναν μικρό πληθυσμό, είναι άλλη μία πιθανή μελλοντική εφαρμογή για συσκευές OoC. Το μικρό μέγεθος της αγοράς και οι υψηλές δαπάνες που απαιτούνται για την ανάπτυξη νέων θεραπειών για σπάνιες ασθένειες είναι οι κύριοι λόγοι για τους οποίους οι περισσότερες φαρμακευτικές εταιρείες δεν ενδιαφέρονται να επενδύσουν για την ανάπτυξη θεραπειών για σπάνιες ασθένειες. Ωστόσο, τα τελευταία χρόνια, οι εξελίξεις στις βιοϊατρικές τεχνολογίες έχουν αυξήσει την προσοχή των κυβερνήσεων και της φαρμακευτικής βιομηχανίας σχετικά με την ανακάλυψη φαρμάκων για σπάνιες ασθένειες. Οι εξατομικευμένες συσκευές OoC θα χρησιμοποιούν δείγματα ασθενών επιτρέποντας τη διεξαγωγή δοκιμών σε αυτές στοχευμένα και με μικρό κόστος ώστε να αντιμετωπιστούν οι προκλήσεις της ανακάλυψης θεραπειών για σπάνιες ασθένειες.

1.3 Kidney-on-a-chip

Το Kidney-on-a-chip είναι μια μικρορευστονική συσκευή που επιτρέπει την καλλιέργεια ζωντανών νεφρικών κυττάρων σε τρισδιάστατα κανάλια. Η μικρορευστονική συσκευή είναι σε θέση να μιμηθεί την περίπλοκη τρισδιάστατη δομή του νεφρού που επιτρέπει την ανάπτυξη των σωληναρίων, τη διαμερισματοποίηση, προσφέρει σταθερή ροή που οδηγεί σε διατμητική τάση και μπορεί να περιλαμβάνει πολλούς διαφορετικούς τύπους κυττάρων. Με την αναδημιουργία του μικροπεριβάλλοντος των νεφρικών σωληναρίων, οι in vitro κυτταρικές αποκρίσεις είναι πιο πιθανό να προσεγγίσουν περισσότερο την in vivo κατάσταση σε σύγκριση με τα 2D ή τα στατικά 3D συστήματα. Αυτό θα βελτίωνε τις μελέτες φαρμάκων καθώς ο νεφρός αποτελεί το κύριο όργανο απομάκρυνσης φαρμάκων από τη κυκλοφορία του αίματος [43]. Ο νεφρός είναι το δεύτερο πιο ευάλωτο όργανο σε φάρμακα και χημικά, μετά το συκώτι. Τα βαρέα μέταλλα, οι χημικές ουσίες, οι τοξίνες από μύκητες και τα φάρμακα μπορεί να προκαλέσουν νεφροτοξικότητα, οδηγώντας σε οξεία νεφρική βλάβη που συχνά σχετίζεται με αυξημένη νοσηρότητα και θνησιμότητα. Το 20% της οξείας νεφρικής βλάβης πιστεύεται ότι σχετίζεται με νεφροτοξικότητα που προκλήθηκε από φάρμακα [44]. Αυτά τα φάρμακα μπορεί να περιλαμβάνουν αντιφλεγμονώδεις ενώσεις, αντιβιοτικά, χημειοθεραπευτικούς παράγοντες και παράγοντες ραδιοσκιαγραφίας. Η οξεία νεφρική βλάβη αντιπροσωπεύει το 5%-7% των νοσηλειών στις Ηνωμένες Πολιτείες, ενώ παγκοσμίως το κόστος για τη νοσηλεία ασθενών με νεφρικές βλάβες αυξήθηκε μεταξύ 1988 και 2003, προφανώς λόγω της αύξησης της συνταγογράφησης φαρμάκων που προκαλούν νεφροτοξικότητα [40].

1.3.1 Ανατομία - Λειτουργικότητα - Παθολογία Νεφρού

Οι νεφροί είναι τα όργανα που είναι υπεύθυνα για την απομάκρυνση ουσιών, συμπεριλαμβανομένων των φαρμάκων, από το αίμα μέσω της διαδικασίας της διήθησης μέσω της παραγωγής ούρων [45]. Κάθε νεφρός αποτελείται από 1 εκατομμύριο περίπου νεφρώνες, οι οποίοι αποτελούν την μικρότερη ανεξάρτητη ανατομική και λειτουργική μονάδα του νεφρού. Μεταξύ των νεφρώνων παρεμβάλλεται ο διάμεσος νεφρικός ιστός [46].

Ο νεφρώνας αποτελείται από το νεφρικό σωμάτιο ή σωμάτιο του Bowman και από ένα σωληναριακό τμήμα που ξεκινά από το νεφρικό σωμάτιο όπως φαίνεται στο Σχήμα 8. Το νεφρικό σωμάτιο αποτελείται από το σπείραμα (glomerulus) και ένα επιθηλιακό έλυτρο την κάψα Bowman. Τα νεφρικά σωμάτια βρίσκονται αποκλειστικά στο νεφρικό φλοιό και προσδίδουν σε αυτόν τη χαρακτηριστική κοκκώδη εμφάνισή του [47].

Το σωληναριακό τμήμα ξεκινά από το εγγύς εσπειραμένο σωληνάριο (proximal tubule), συνεχίζει ως αγκύλη του Henle με το ανιόν και το κατιόν σκέλος της, ακολουθεί το άπω εσπειραμένο σωληνάριο (distal convoluted tubule) που τελικά καταλήγει στο αθροιστικό σωληνάριο (collecting duct). Περισσότεροι από ένας νεφρώνες εκβάλλουν στο ίδιο αθροιστικό σωληνάριο μέσω του συνδετικού σωληναρίου που αποτελεί επέκταση του άπω εσπειραμένου σωληναρίου. Τα γειτονικά αθροιστικά σωληνάρια στη συνέχεια συναθροίζονται και εκβάλλουν στις νεφρικές θηλές [47]. Η αποστολή των νεφρικών σωληναρίων δεν περιορίζεται μόνον στην επανάκτηση νατρίου και νερού που διηθούνται στο σπείραμα, αλλά και στην επαναρρόφηση απαραίτητων συστατικών του πλάσματος, όπως οργανικών μορίων και ηλεκτρολυτών, που διαπερνούν το σπειραματικό ηθμό. Παράλληλα τα σωληνάρια αποβάλλουν ενεργητικά ενδογενή ή εξωγενή οργανικά μόρια, όπως τοξίνες και φάρμακα, τα οποία επιβάλλεται να αποβληθούν σε μεγαλύτερες ποσότητες από αυτές που διηθούνται στα σπειραματικά τριχοειδή [48].



Σχήμα 8. Σχηματική αναπαράσταση νεφρώνα [49].

Το 25% της καρδιακής παροχής κατευθύνεται στους νεφρούς με αποτέλεσμα περίπου 180 L σπειραματικού διηθήματος να εισέρχονται στα νεφρικά σωληνάρια καθημερινά. Κατά συνέπεια, τα επιθηλιακά κύτταρα που επενδύουν το νεφρικό σωληνάριο εκτίθενται σε διατμητική τάση υγρού που υπολογίζεται ότι είναι περίπου 1 dyn/cm² [50]. Σε φυσιολογικές συνθήκες οι νεφροί παράγουν περίπου 150 L διηθήματος το εικοσιτετράωρο στα νεφρικά σωμάτια. Το 99% του διηθήματος επαναρροφάται κατά τη διάβασή του από τα νεφρικά σωληνάρια και τελικά αποβάλλεται μόνον το 1% (~ 1,5 L) με τη μορφή ούρων [48].

Το σπείραμα εντός της κάψας του Bowman είναι η μονάδα φιλτραρίσματος του νεφρού και αποτελείται από ένα δίκτυο τριχοειδών και εξαιρετικά διαφοροποιημένων επιθηλιακών κυττάρων, τα ποδοκύτταρα, τα οποία ρυθμίζουν το επιλεκτικό φιλτράρισμα (διήθηση) του αίματος σε ένα υπερδιήθημα (πρόουρο) που θα γίνει τελικά ούρα [51].

Ο μεγαλύτερος όγκος υπερδιηθήματος που προέρχεται από την κάψα του Bowman επαναρροφάται από το εγγύς εσπειραμένο νεφρικό σωληνάριο, το οποίο επαναρροφά σχεδόν όλα τα οργανικά μόρια, το 80% των διηθούμενων διττανθρακικών, το 60% του χλωριούχου νατρίου, το 70% του νερού και τη μεγαλύτερη ποσότητα των διηθούμενων φωσφορικών. Το εγγύς εσπειραμένο σωληνάριο παρουσιάζει σημαντική εκκριτική ικανότητα οργανικών ανιόντων, όπως ουρικού οξέος και φαρμάκων [48].

Το άπω εσπειραμένο σωληνάριο παίζει κρίσιμο ρόλο στην ομοιόσταση του νατρίου, καλίου και δισθενών κατιόντων, επαναρροφώντας 5%-10% του φιλτραρισμένου νατρίου και χλωρίου, συμμετέχοντας στην έκκριση κατιόντων καλίου και διατηρώντας τη συστηματική ομοιόσταση ασβεστίου και μαγνησίου [52].

Το αθροιστικό σωληνάριο αποτελεί το τελευταίο ανατομικό τμήμα του νεφρώνα και σχηματίζεται από την συμβολή περισσοτέρων του ενός συνδετικών σωληναρίων, τα οποία εκβάλλουν από κοινού στην νεφρική θηλή [48]. Σημαντικός είναι ο ρόλος του αθροιστικού

σωληναρίου στην οξινοποίηση των ούρων, την επαναρρόφηση διττανθρακικών, την αποβολή καλίου, την επαναρρόφηση νατρίου και νερού, την επαναρρόφηση ουρίας, και την πύκνωση των ούρων.

Οι κυριότερες παθήσεις των νεφρών είναι η οξεία νεφρική βλάβη και η χρόνια νεφρική νόσος με τη συχνότητα και των δύο να έχει αυξηθεί με την πάροδο του χρόνου. Η οξεία νεφρική βλάβη μπορεί να οδηγήσει σε μόνιμη νεφρική βλάβη, οδηγώντας στην ανάπτυξη ή επιδείνωση χρόνιων νεφρικών παθήσεων. Η οξεία νεφρική βλάβη εκδηλώνεται όταν διακόπτεται η παροχή αίματος στο νεφρό ή όταν εμποδίζεται η ροή των ούρων. Αυτά τα συμβάντα μπορεί να οδηγήσουν σε διαταραχή της ροής αίματος στους νεφρούς και σε φλεγμονώδεις διεργασίες που μειώνουν τον ρυθμό της σπειραματικής διήθησης. Επίσης, η οξεία νεφρική βλάβη μπορεί να προέλθει από τραυματισμούς στα διάφορα μέρη του νεφρού, όπως τα σωληνάρια, το σπείραμα και το αγγειακό σύστημα [53].

1.3.2 Κατηγορίες μοντέλων νεφρού

Έχουν αναπτυχθεί μοντέλα σπειράματος, εγγύς και περιφερικών σωληναρίων, αλλά η δημιουργία μιας πλήρους πλατφόρμας νεφρώνα σε ψηφίδα που ενσωματώνει αυτά τα συστατικά δεν έχει ακόμη επιτευχθεί.

Glomerulus-on-a-chip

Η ανάπτυξη ενός in vitro συστήματος που μιμείται τη σπειραματική λειτουργία παρουσιάζει μεγάλο ερευνητικό ενδιαφέρον. Οι Zhou et al. (2016) [54] ανέπτυξαν ψηφίδα με κανάλια που προσμοιάζουν με τη δομή του σπειράματος (Σχ. 9). Χρησιμοποίησαν ανθρώπινα σπειραματικά ενδοθηλιακά κύτταρα και πρόδρομα κύτταρα ποδοκυττάρων ποντικού, τοποθετημένα σε στρώματα που φέρουν κανάλια για να μοντελοποιήσουν την υπερτασική νεφροπάθεια.



Σχήμα 9. Διάταξη που αναπτύχθηκε από τους Zhou et al. (2016) και περιλαμβάνει a) δεκαέξι θαλάμους καλλιέργειας ενσωματωμένους σε ένα τσιπ που αποτελείται από δύο στρώματα PDMS (άνω και κάτω) και ένα πολυανθρακικό στρώμα ενδιάμεσα. Τα τρία στρώματα ευθυγραμμίστηκαν και συνδέθηκαν μη αναστρέψιμα για να σχηματίσουν δύο σετ μικροκαναλιών που χωρίζονται από μια πορώδη μεμβράνη (πάχους 10μm) που περιλαμβάνει μια σειρά οπών με ενεργή διάμετρο 10 μm. b) Εικόνα της συσκευής glomerulus-on-a-chip [54].

Οι Wang et al. (2017) [55] ανέπτυξαν ένα τσιπ με σπειραματικά ενδοθηλιακά κύτταρα αρουραίου και ποδοκύτταρα. Το μοντέλο περιγράφει τη διαβητική νεφροπάθεια και φαίνεται στο Σχήμα 10.



Illustration of the glomerular-filtration-barrier (GFB)



Σχήμα 10. Διάταξη που αναπτύχθηκε από τους Wang et al. (2017): a) ο φραγμός σπειραματικής διήθησης αποτελείται από σπειραματικά ενδοθηλιακά κύτταρα, ποδοκύτταρα και μια μεμβράνη, η οποία είναι επιλεκτικά διαπερατή από μικρά μόρια και νερό, b) ο σχεδιασμός και η πραγματική εικόνα του glomerulus-on-a-chip. Η ψηφίδα αποτελείται από τριχοειδή κανάλια, κανάλια γέλης και κανάλια συλλογής, τα οποία αντιπροσωπεύουν τα τριχοειδή αγγεία σπειραματικών ενδοθηλιακών κυττάρων, τη σπειραματική μεμβράνη και την κάψα Bowman, αντίστοιχα. Το τριχοειδές κανάλι διαποτίστηκε με ροή υγρού για να προσομοιάσει τη φυσιολογική ροή in vivo [55].

Οι Musah et al. (2017) [56] ανέπτυξαν glomerulus-on-a-chip που μιμείται τη διεπαφή ιστού-ιστού και τις ιδιότητες μοριακής διήθησης του σπειραματικού τριχοειδούς τοιχώματος. Η έκθεση στη δοξορουμπικίνη προκάλεσε θάνατο ποδοκυττάρων και πρωτεϊνουρία, παρόμοια με τη νεφροτοξικότητα που παρατηρήθηκε in vivo για την συγκεκριμένη ουσία (Σχ.11).



Σχήμα 11. Διάταξη που αναπτύχθηκε από τους Musah et al. (2017), a) σχηματική αναπαράσταση σπειραματικού τριχοειδούς τοιχώματος με ποδοκύτταρα και ενδοθηλιακά κύτταρα διαχωρισμένα από τη σπειραματική μεμβράνη. Το βέλος δείχνει την κατεύθυνση ροής των μορίων. b) Ο σχεδιασμός και η πραγματική εικόνα του glomerulus-on-a-chip με μικροκανάλια που αναπαράγουν τα ουροποιητικά και τριχοειδή διαμερίσματα του σπειράματος. Η σπειραματική μεμβράνη προσομοιάζεται χρησιμοποιώντας μια πορώδη και εύκαμπτη μεμβράνη PDMS. Κυκλική μηχανική τάση εφαρμόστηκε σε κυτταρικές στοιβάδες τεντώνοντας την εύκαμπτη μεμβράνη από PDMS με την εφαρμογή κενού [56].

Proximal tubule-on-a-chip

Η διατμητική τάση υγρού είναι υπεύθυνη για την πόλωση των νεφρικών κυττάρων, η οποία συμβαίνει μέσω της διαφορικής έκφρασης των γονιδίων και της επακόλουθης κυτταροσκελετικής αναδιοργάνωσης [57]. Τα εγγύς σωληναριακά επιθηλιακά κύτταρα (Proximal tubule epithelial cells, PTECs) υπόκεινται συνεχώς σε διεπιθηλιακή οσμωτική βαθμίδα και διατμητική τάση υγρού. Ο μηχανισμός αίσθησης των μεταβολών ροής στον άπω νεφρώνα εντοπίζεται στις ιδιότητες των βλεφαρίδων των κυττάρων. Οι Praetorius και Spring [58] έδειξαν ότι η κάμψη της βλεφαρίδας των κυττάρων Madin-Darby canine kidney cells (MDCK), ως αποτέλεσμα αυξημένης ροής υγρού ή εφαρμογής αρνητικής πίεσης μέσω μικροπιπέτας προκαλεί αύξηση του ενδοκυττάριου ασβεστίου. Αυτή μεταδίδεται και στα γειτονικά κύτταρα και δεν αποτελεί μεμονωμένο φαινόμενο αντίδρασης ενός κυττάρου αλλά προσαρμογή ολόκληρου του ιστού στις μεταβολές ροής. Πιστεύεται σήμερα ότι οι βλεφαρίδικοί σχηματισμοί των ευκαρυωτικών κυττάρων λειτουργούν ως αισθητήρες μηχανικών ερεθισμάτων όπως η μηχανική ροπή στη βάση της βλεφαρίδας. Δημιουργούν έτσι λειτουργικές μεταβολές των πρωτεϊνών της βλεφαρίδας και του κυτταροσκελετού με αποτέλεσμα την ενεργοποίηση διαύλων ασβεστίου προκαλώντας αύξηση του ενδοκυττάριου ασβεστίου [48].

Το εγγύς εσπειραμένο σωληνάριο είναι το κύριο σημείο της κάθαρσης των φαρμάκων, ως εκ τούτου έχει πρωταρχική σημασία στην προκλινική αξιολόγηση των υποψήφιων ενώσεων. Προκειμένου να προσομοιωθεί το εγγύς εσπειραμένο σωληνάριο αναπτύχθηκε ένα proximal tubule-on-a-chip στο οποίο χρησιμοποιήθηκαν κοίλες ίνες. Ένα είδος proximal tubule-on-a-chip χρησιμοποιούν κοίλες ίνες. Για παράδειγμα οι Ng et al. (2013) [59] καλλιέργησαν ανθρώπινα εγγύς σωληναριακά επιθηλιακά κύτταρα (PTECs) στην εσωτερική επιφάνεια κοίλων ινών επικαλυμμένων με υδρογέλη, δημιουργώντας μια μονοστιβάδα (Σχ. 12).



Σχήμα 12. Η διάταξη που αναπτύχθηκε από τους Ng et al. (2013) a) σχηματική αναπαράσταση της διάταξης και φωτογραφία της διάταξης b) Σχηματική αναπαράσταση λειτουργίας διάταξης c) Λειτουργικότητα της κοίλης ίνας κυττάρων όπως αξιολογείται με ανοσοφθορισμό. Εγκάρσια όψη και διατομή κοίλης ίνας [59].

Οι Jang et al. (2013) [60] ανέπτυξαν μια οικονομική και αποδοτική συσκευή proximal tubule-on-a-chip με ανθρώπινα PTECs που είχαν κατανεμηθεί ομοιόμορφα στην πάνω επιφάνεια μιας πολυεστερικής πορώδους μεμβράνης που τοποθετήθηκε μεταξύ ενός άνω μικροκαναλιού με ροή υγρού καλλιέργειας και μίας κάτω δεξαμενής στατικού υγρού καλλιέργειας. Βρέθηκε ότι τα κύτταρα που εκτέθηκαν σε διατμητική τάση υγρού σε αυτό το σύστημα απέκτησαν πολικότητα,

πρωτογενείς βλεφαρίδες και λειτουργικούς μεταφορείς, σε αντίθεση με τα κύτταρα που καλλιεργήθηκαν υπό στατικές συνθήκες. Στο ίδιο σύστημα αξιολογήθηκε η νεφροτοξικότητα της σισπλατίνης εισάγοντάς την στον κάτω θάλαμο και παρακολουθήθηκαν τα κύτταρα για 24 ώρες ώστε να προσδιοριστεί η κυτταρική βλάβη που προκαλείται από τη σισπλατίνη. Βρέθηκε επίσης ότι η διατμητική τάση διευκόλυνε την ανάρρωση των τραυματισμένων κυττάρων και την αποκατάσταση των επιπέδων των σχετικών βιοδεικτών σε χρονικό διάστημα 72 ωρών.



Σχήμα 13. Η διάταξη που αναπτύχθηκε από τους Jang et al. (2013), a) το proximal tubule-on-a-chip αποτελείται από ένα άνω κανάλι που διαχωρίζεται από μια δεξαμενή με μια πορώδη μεμβράνη πάνω στην οποία καλλιεργούνται επιθηλιακά κύτταρα ανθρώπινου εγγύς σωληναρίου παρουσία ροής υγρού στο άνω κανάλι. Αυτός ο σχεδιασμός μιμείται τη φυσική κυτταρο-αρχιτεκτονική, τη διεπαφή ιστού-ιστού και το δυναμικό μικροπεριβάλλον in vivo. b) Συναρμολόγηση συσκευής: το άνω μέρος, η πορώδης μεμβράνη από πολυεστέρα και το κάτω μέρος συνδέονται μεταξύ τους μέσω της επεξεργασίας με πλάσμα [60].

Η ομάδα των Sciancalepore et al. (2014) καλλιέργησε ανθρώπινα νεφρικά κύτταρα σε ένα μικρορευστονικό σύστημα (Σχ. 14) και έδειξαν ότι κάτω από διατμητική τάση, τα κύτταρα πολώθηκαν και μείωσαν τη διαπερατότητα της ουρίας και της κρεατινίνης, σε αντίθεση με τα κύτταρα που καλλιεργήθηκαν υπό στατικές συνθήκες [61].



Σχήμα 14. Η διάταξη που αναπτύχθηκε από τους Sciancalepore et al. (2014), a) το proximal tubule-on-a-chip, αποτελείται από δύο επικαλυπτόμενα στρώματα PDMS, που φέρουν μικροκανάλια. Τα κανάλια διαχωρίζονται από πορώδη μεμβράνη PC και τροφοδοτούνται συνεχώς με υγρό καλλιέργειας. Η συσκευή παρουσιάζει δύο θύρες εισόδου και δύο θύρες εξόδου,

καθεμία συνδεδεμένη με πλαστικούς σωλήνες και αντλίες για έλεγχο υγρών. b) Φωτογραφία του proximal tubule-on-a-chip [61].

Οι Weber et al. (2016) καλλιέργησαν ανθρώπινα PTECs σε μια μικρορευστονική συσκευή που αποτελούνταν από σωληνοειδείς δομές που περιβάλλονταν από ένα θάλαμο και έδειξαν ότι λαμβάνει χώρα σχηματισμός κυτταρικών σωληνωτών δομών, πόλωση των κυττάρων, αλλαγή της κυτταρικής μορφολογίας και μεταφορά ουσιών. Η βιωσιμότητα των κυττάρων διατηρήθηκε έως και 4 εβδομάδες [62].

Η βιοεκτύπωση είναι μια εναλλακτική τεχνική για τη διαμόρφωση των δομών ενός proximal tubule-on-a-chip. Οι Homan et al. (2016) [63] χρησιμοποίησαν τη βιοεκτύπωση για να κατασκευάσουν μια σύνθετη σωληνοειδή δομή καλυμμένη εσωτερικά με PTECs (Σχ. 15). Τα ανθρώπινα PTECs επικάλυψαν τους εσωτερικούς σωλήνες και παρουσίασαν βελτιωμένη μορφολογία σε σύγκριση με τα κύτταρα που καλλιεργήθηκαν σε δισδιάστατες δομές. Επιπλέον, τα κύτταρα ανταποκρίθηκαν κατά τρόπο εξαρτώμενο από τη συγκέντρωση κατά την έκθεση τους σε κυκλοσπορίνη Α. Αυτό το σύστημα ήταν σταθερό για δύο μήνες, υποδεικνύοντας δυνητικά βελτιωμένες δυνατότητες για συσκευές βιοεκτύπωσης σε σχέση με άλλους τρόπους κατασκευής. Οι King et al. το 2017 χρησιμοποίησαν τη βιοεκτύπωση για να σχεδιάσουν ένα εγγύς σωληνάριο που περιλάμβανε νεφρικούς ινοβλάστες, ενδοθηλιακά κύτταρα και επιθηλιακά κύτταρα. Αυτό το μοντέλο ήταν σταθερό για τουλάχιστον 30 ημέρες [64].



Σχήμα 15. Η διάταξη που αναπτύχθηκε από τους Homan et al. (2016) για προσομοίωση τρισδιάστατου εγγύς εσπειραμένου νεφρικού σωληναρίου σε ψηφίδα. a) Σχηματική αναπαράσταση νεφρώνα όπου υποδεικνύεται το εγγύς εσπειραμένο σωληνάριο, (b, c) σχέδια και οι αντίστοιχες εικόνες διαφορετικών σταδίων στην κατασκευή τρισδιάστατων εγγύς σωληναρίων [63].

Distal tubule-/Collecting duct-on-a-chip

Λίγες ομάδες προσπάθησαν να αναπτύξουν ένα μοντέλο περιφερικού άπω εσπειραμένου σωληναρίου ή αθροιστικού σωληναρίου σε ψηφίδα. Οι Baudoin et al. (2007) [65] καλλιέργησαν νεφρικά κύτταρα άπω εσπειραμένου σωληναρίου σε μικροκανάλια. Αυτά τα κύτταρα μπόρεσαν να προσκολληθούν, να πολλαπλασιαστούν και να σχηματίσουν τρισδιάστατες δομές καλύπτοντας τα μικροκανάλια. Ωστόσο, οι ροή του υγρού 50 ml/min οδήγησε σε εξασθενημένο κυτταρικό πολλαπλασιασμό και αυξημένο κυτταρικό θάνατο, υποδηλώνοντας ότι τα κύτταρα δεν είναι συνηθισμένα στους συγκεκριμένους ρυθμούς ροής. Οι Jang και Suh (2010) [66] κατασκεύασαν μία λειτουργική διάταξη από PDMS με μικροκανάλι διατμητικής τάσης (1 dyn/cm²) όπως φαίνεται στο Σχήμα 16. Κύτταρα αθροιστικού σωληναρίου ποντικού καλλιεργήθηκαν πάνω σε μία πορώδη μεμβράνη εντός του καναλιού και η επιτυχία της διάταξης επαληθεύεται από την πόλωση που εμφάνισαν τα κύτταρα και την μοριακή μεταφορά.



Σχήμα 16. Η διάταξη που αναπτύχθηκε από τους Jang και Suh (2010), a) η πολυστρωματική συσκευή αποτελείται από ένα κανάλι από PDMS, μια πορώδη μεμβράνη πολυεστέρα και μία δεξαμενή από PDMS, b) φωτογραφία της διάταξης τοποθετημένης σε ένα δίσκο καλλιέργειας που περιέχει θρεπτικό μέσο, c) σχηματική απεικόνιση της συσκευής σε ένα δίσκο καλλιέργειας που περιέχει θρεπτικό μέσο, c) σχηματική απεικόνιση της συσκευής σε ένα δίσκο καλλιέργειας που περιέχει θρεπτικό μέσο, c) σχηματική απεικόνιση της συσκευής σε ένα δίσκο καλλιέργειας που περιέχει θρεπτικό μέσο, c) σχηματική απεικόνιση της συσκευής σε ένα δίσκο καλλιέργειας που περιέχει θρεπτικό μέσο, c) σχηματική απεικόνιση της συσκευής σε ένα δίσκο καλλιέργειας που περιέχει θρεπτικό μέσο, c) σχηματική απεικόνιση της συσκευής σε ένα δίσκο καλλιέργειας που περιέχει θρεπτικό μέσο, c) σχηματική απεικόνιση της συσκευής σε ένα δίσκο καλλιέργειας που περιέχει θρεπτικό μέσο, c) σχηματική απεικόνιση της συσκευής σε ένα δίσκο καλλιέργειας που περιέχει θρεπτικό μέσο, c) σχηματική απεικόνιση της συσκευής σε ένα δίσκο καλλιέργειας που περιέχει θρεπτικό μέσο, c) σχηματική απεικόνιση της συσκευής σε ένα δίσκο καλλιέργειας που περιέχει θρεπτικό μέσο, c) σχηματική απεικόνιση της συσκευής σε ένα δίσκο καλλιέργειας [66].

1.3.3 Organ-on-chip αισθητήρες

Πολλές ομάδες έχουν ενσωματώσει στα kidney-on-a-chip ηλεκτρόδια για την μέτρηση της διεπιθηλιακής ηλεκτρικής αντίστασης (transepithelial electrical resistance, TEER). Οι μετρήσεις TEER χρησιμοποιούνται ευρέως ως δείκτες της λειτουργίας του επιθηλιακού και ενδοθηλιακού φραγμού. Είναι μία τεχνική που δίνει αποτελέσματα σε πραγματικό χρόνο και είναι μη καταστροφική για την καλλιέργεια [67].

Οι Asif et al. παρουσίασαν ένα proximal tubule-on-a-chip με ενσωματωμένους αισθητήρες για παρακολούθηση της κυτταρικής ανάπτυξης. Για τον σκοπό αυτό, σχεδιάστηκε μια μικρορευστονική ψηφίδα με βάση το γυαλί με ενσωματωμένα διαφανή ηλεκτρόδια για παρακολούθηση της ηλεκτρικής αντίστασης. Για την εκτύπωση των διαφανών ηλεκτροδίων χρησιμοποιήθηκε οξείδιο του κασσίτερου (ITO) ώστε να είναι δυνατή η απεικόνιση των κυττάρων σε πραγματικό χρόνο μέσω του ενσωματωμένου μικροσκοπίου [68]. Επιπλέον, ένας οπτικός αισθητήρας pH και ένα μικροσκόπιο προστέθηκαν στην πλατφόρμα για παρακολούθηση του ιστού σε πραγματικό χρόνο, καθώς η ανάπτυξη ενός συνεχούς όξινου περιβάλλοντος μπορεί να συνδεθεί με τη φλεγμονή των κυττάρων. Αυτό το μοντέλο έχει τη δυνατότητα να μελετήσει την απορρόφηση και τον μεταβολισμό ενός φαρμάκου καθώς και να εκτιμήσει την τοξικότητά του.



Σχήμα 17. Η διάταξη που αναπτύχθηκε από τους Asif et al. (2020), σχηματική αναπαράσταση του proximal tubule-on-achip με ενσωματωμένους τους αισθητήρες TEER και pH [68].

Παρόμοια δουλειά παρουσίασαν και οι Ferrell et al., οι οποίοι ανέπτυξαν ένα μικρορευστονικό βιοαντιδραστήρα με ενσωματωμένα ηλεκτρόδια TEER για τη μελέτη των νεφρικών επιθηλιακών κυττάρων. Το σύστημα μέτρησης TEER χρησιμοποιήθηκε για την αξιολόγηση του σχηματισμού μιας πολωμένης μονοστοιβάδας κυττάρων [69].



Σχήμα 18. Η διάταξη που αναπτύχθηκε από τους Ferrell et al. 2010 a) ανοιγμένο σχέδιο του βιοαντιδραστήρα, b) σχηματική απεικόνιση της διαμόρφωσης ηλεκτροδίου TEER που αποτελείται από ένα ηλεκτρόδιο Ag/AgCl και ένα ηλεκτρόδιο Ag σε κάθε πλευρά της μεμβράνης, c) ηλεκτρονική μικρογραφία σάρωσης διατομής του βιοαντιδραστήρα (κλίμακα 200 mm) [69].

1.3.4 Εφαρμογές νεφρού σε ψηφίδα

Τα νέα φάρμακα πρέπει να αξιολογούνται ως προς την αποτελεσματικότητα και την ασφάλεια τους πριν από την κλινική χρήση και συνήθως οι πρώτες δοκιμές για νεφροτοξικότητα πραγματοποιούνται σε ζώα. Ωστόσο, οι μελέτες σε ζώα είναι ακριβές και χρονοβόρες, και συχνά αποτυγχάνουν στο να προβλέψουν την νεφροτοξικότητα στους ανθρώπους, ενώ παράλληλα συνδέονται με ηθικούς προβληματισμούς ως προς τη χρήση ζώων. Λόγω των υψηλών ενεργειακών τους αναγκών, τα νεφρικά κύτταρα είναι ιδιαιτέρως ευαίσθητα στην τοξικότητα των φαρμάκων, καθιστώντας την ανάπτυξη in vitro μοντέλων εγγύς σωληναριακής λειτουργίας ελκυστική για τους κατασκευαστές φαρμάκων. Επιπλέον οι υψηλοί ρυθμοί απορρόφησης και μεταφοράς μορίων που χαρακτηρίζουν τα νεφρικά κύτταρα επιτρέπουν σε φάρμακα και χημικές ουσίες να συσσωρεύονται στα κύτταρα αυτά καθώς και στον μεσοκυττάριο χώρο [70].

Έτσι, ενώ η ανάπτυξη της τεχνολογίας νεφρών σε ψηφίδα στοχεύει προς το παρόν για εφαρμογή σε τοξικολογικές και φαρμακολογικές μελέτες, μπορεί να χρησιμοποιηθεί και για την κατασκευή λειτουργικών μονάδων στους βιοτεχνητούς νεφρούς. Η θεραπεία νεφρικής υποκατάστασης με αιμοκάθαρση εφαρμόζεται στην κλινική εδώ και πολλά χρόνια, βελτιώνοντας δραστικά την πρόγνωση ασθενών με οξεία και χρόνια νεφρική νόσο. Ωστόσο, η τρέχουσα αιμοκάθαρση αντικαθιστά μόνο τη σπειραματική διήθηση και ενώσεις γνωστές ως ουραιμικές τοξίνες συσσωρεύονται σε ασθενείς που πάσχουν από χρόνια νεφρική νόσο. Απαιτείται επομένως βελτίωση της τρέχουσας θεραπείας αιμοκάθαρσης για την οποία διερευνάται η ανάπτυξη συσκευών βιοτεχνητού νεφρού. Ένα μικρορευστονικό βιοτεχνητό νεφρό σε συνδυασμό με ένα μικρορευστονικό φίλτρο θα επέτρεπε την απέκκριση ουραιμικών διαλυμένων ουσιών και την συνεχή κάθαρση. Ως εκ τούτου, η τεχνολογία νεφρών [71].

1.4 Βιοαισθητήρες

Όπως αναφέρθηκε παραπάνω, η αυτοματοποίηση και η ενσωμάτωση συσκευών OoC με διαφορετικούς αισθητήρες για συλλογή δεδομένων in situ και σε πραγματικό χρόνο μειώνουν τις παρεμβολές των χρηστών και διευκολύνουν τη λειτουργία της συσκευής. Έτσι, οι ενσωματωμένες πλατφόρμες πολλαπλών οργάνων σε μια ψηφίδα για ασθενείς παρέχουν τη δυνατότητα να χρησιμοποιηθούν από κλινικούς γιατρούς και ασθενείς για εφαρμογές POC. Όπως αναλύθηκε παραπάνω, σε αυτές τις πλατφόρμες απαιτείται η μίμηση της πολυπλοκότητας των ζωντανών οργάνων και των αλληλεπιδράσεων οργάνου-οργάνου, διατηρώντας παράλληλα τη συσκευή απλή για εύκολη στη λειτουργία της [7].

Βιοαισθητήρας σύμφωνα με την Διεθνή Ένωση Καθαρής και Εφαρμοσμένης Χημείας (International Union of Pure and Applied Chemistry, IUPAC) ορίζεται μία συσκευή η οποία χρησιμοποιεί ειδικές βιοχημικές αντιδράσεις που λαμβάνουν χώρα μεταξύ απομονωμένων ενζύμων, ανοσοαντιδραστηρίων, ιστών, οργανιδίων ή ακόμη και ολόκληρων κυττάρων για την ανίχνευση χημικών ουσιών που αντιδρούν με αυτά συνήθως μέσω ηλεκτρικών, θερμικών ή οπτικών μετταλακτών σήματος [72]. Πρόκειται για ολοκληρωμένες συσκευές που παρέχουν ποσοτική ή ημιποσοτική αναλυτική πληροφορία χρησιμοποιώντας ένα βιολογικό στοιχείο αναγνώρισης (βιοχημικός υποδοχέας) ακινητοποιημένο στον μεταλλάκτη σήματος (βιοδραστική επιφάνεια), το οποίο όταν αλληλεπιδρά εξειδικευμένα με την προς ανάλυση ουσία (δείγμα) προκαλεί μεταβολή μιας φυσικοχημικής παραμέτρου (π.χ. θερμότητα, φως, ήχος, πίεση ή μαγνητισμός). Τη μεταβολή αυτή, ο μεταλλάκτης μετατρέπει σε μετρήσιμο ηλεκτρικό σήμα ανάλογο της συγκέντρωσης της προς ανάλυση ουσίας, το οποίο μέσω του ανιχνευτή οδηγείται στη μονάδα επεξεργασίας [73].

Οι βιοαισθητήρες συνδυάζουν την ευαισθησία των χημικών αισθητήρων με την επιλεκτικότητα των βιολογικών μηχανισμών αναγνώρισης. Παρέχουν μετρήσεις σε πραγματικό χρόνο, προσδιορισμούς χωρίς τη χρήση ιχνηθετών και κατά περίπτωση ταυτόχρονο προσδιορισμό αναλυτών στο ίδιο δείγμα. Τα δύο βασικά τους πλεονεκτήματα όμως που τους καθιστούν ιδανικούς υποψηφίους για την κατασκευή φορητών διατάξεων με στόχο τη μεταφορά κλασσικών αναλυτικών τεχνικών από το χώρο του εργαστηρίου στο πεδίο (Point of Need application, PoN) είναι η σμίκρυνση της οργανολογίας σε συνδυασμό με την απλοποίηση της αναλυτικής διαδικασίας [74].

Πρωτοπόροι στην κατασκευή βιοαισθητήρων υπήρξαν οι Clark και Lyons, οι οποίοι με την δημοσίευσή τους το 1962 ανέφεραν πρώτοι την κατασκευή ενός ενζυμικού βιοαισθητήρα για τον προσδιορισμό γλυκόζης, χρησιμοποιώντας ηλεκτρόδιο οξυγόνου σε συνδυασμό με ημιπερατές μεμβράνες για τον εγκλεισμό οξειδάσης της γλυκόζης [75].

Με βάση το είδος του βιολογικού στοιχείου αναγνώρισης οι βιοαισθητήρες χωρίζονται σε:

- Βιοαισθητήρες κατάλυσης: όταν η προσδιοριζόμενη ουσία είναι υπόστρωμα ενζύμου (ενζυμικοί βιοαισθητήρες) ή κάποια ειδική κυτταρική πρωτεΐνη (βιοαισθητήρες κυττάρων-ιστών-μικροοργανισμών).
- Βιοαισθητήρες συγγένειας: όταν η προσδιοριζόμενη ουσία είναι κάποια συμπληρωματική αλληλουχία βάσεων (βιοαισθητήρες DNA, RNA), ή ένα αντίσωμα, ή ένα αντιγόνο (ανοσοχημικοί βιοαισθητήρες).

Ανάλογα με τον μεταλλάκτη σήματος που χρησιμοποιείται κάθε φορά, οι βιοαισθητήρες κατηγοριοποιούνται σε:

- Θερμικούς
- Πιεζοηλεκτρικούς ή ακουστικούς
- Οπτικούς
- Ηλεκτροχημικούς

1.4.1 Ανοσοχημικοί βιοαισθητήρες και αντισώματα

Στους ανοσοχημικούς βιοαισθητήρες ή ανοσοαισθητήρες ως βιομόριο αναγνώρισης χρησιμοποιείται κάποιο αντίσωμα ή αντιγόνο. Ο προσδιορισμός γίνεται με μέτρηση κάποιας παραμέτρου που σχετίζεται με την αλληλεπίδραση αντιγόνου-αντισώματος, όπως η μεταβολή του δείκτη διάθλασης στην επιφάνεια του αισθητήρα ή η αλλαγή στην αγωγιμότητά του, είτε με παρακολούθηση της αντίδρασης αντιγόνου-αντισώματος με χρήση κατάλληλα σημασμένων μορίων. Τα αντισώματα και πιο συγκεκριμένα οι ανοσοσφαιρίνες G είναι μεγάλου μοριακού βάρους πρωτεϊνικά μόρια, σχήματος Y (Σχήμα 19), τα οποία χρησιμοποιούνται από το ανοσοποιητικό σύστημα για να αναγνωρίσει και να αδρανοποιήσει «εισβολείς», όπως είναι τα βακτήρια και οι ιοί. Πιο συγκεκριμένα τα αντισώματα είναι γλυκοπρωτεΐνες με μοριακό βάρος ≈150 kDa, ισοηλεκτρικό σημείο 8-9, και μοριακές διαστάσεις περίπου 10 nm [76]. Αποτελούνται από τέσσερις πολυπεπτιδικές αλυσίδες: δύο πανομοιότυπες βαριές αλυσίδες και δύο πανομοιότυπες ελαφρές αλυσίδες ενωμένες με δισουλφιδικούς δεσμούς [77]. Τα μεταβλητά μέρη του αντισώματος είναι η περιοχή V ενώ τα σταθερά η περιοχή C. Το αντίσωμα αναγνωρίζει ένα μοναδικό τμήμα του εισβολέα που ονομάζεται αντιγόνο. Κάθε αντίσωμα διαθέτει δύο θέσεις δέσμευσης του αντιγόνου οι οποίες ονομάζονται παράτοποι και εντοπίζονται στα άκρα των μεταβλητών περιοχών. Έτσι, αν και η γενικότερη δομή όλων των αντισωμάτων είναι παρόμοια, η περιοχή σύνδεσης του αντιγόνου είναι εξαιρετικά ποικιλόμορφη επιτρέποντας την ύπαρξη εκατομμυρίων μοναδικών συνδυασμών αντισώματος-αντιγόνου.



Σχήμα 19. Σχηματική παράσταση της δομής ενός αντισώματος στις οποίες φαίνονται οι δύο «βαριές» αλυσίδες (μπλε) και δύο «ελαφριές» αλυσίδες (κίτρινο), ενώ υποδεικνύονται τα μεταβλητά μέρη του αντισώματος, η σταθερή περιοχή και η θέση πρόσδεσης του αντιγόνου [78].

1.4.2 Τεχνικές ακινητοποίησης των βιομορίων αναγνώρισης

Οι τεχνικές ακινητοποίησης των βιομορίων αναγνώρισης χωρίζονται σε τρεις βασικές κατηγορίες, τις φυσικές, τις χημικές και τις υβριδικές τεχνικές, οι οποίες είναι συνδυασμός των δύο προηγούμενων. Στις φυσικές μεθόδους δεν λαμβάνει χώρα σχηματισμός δεσμού μεταξύ βιομορίου και βιοδραστικής επιφάνειας και η ακινητοποίηση γίνεται μέσω φυσικής προσρόφησης ή εγκλεισμό. Αντίθετα, στις χημικές μεθόδους μεταξύ των βιομορίων αναγνώρισης και της επιφάνειας του αισθητήρα σχηματίζονται ομοιοπολικοί δεσμοί.

Η μέθοδος που θα επιλεγεί για την ακινητοποίηση των αντισωμάτων στους αισθητήρες καθορίζεται αρχικά από τη φύση του συστήματος ανάλυσης και από το υπόστρωμα που χρησιμοποιείται. Υπάρχουν, ωστόσο, κοινές πτυχές των διαδικασιών ακινητοποίησης που επηρεάζουν την ευαισθησία του αισθητήρα. Μία σημαντική παράμετρος είναι ο προσανατολισμός των αντισωμάτων μετά την ακινητοποίηση ώστε οι θέσεις δέσμευσης αντιγόνου να είναι προσβάσιμες σε αυτό (Σχήμα 20). Πολλαπλές μελέτες έχουν δείξει ότι τα σωστά προσανατολισμένα αντισώματα, με τις θέσεις δέσμευσης αντιγόνου τους καλά εκτεθειμένες, εμφανίζουν υψηλότερη ικανότητα δέσμευσης του αντιγόνου σε σύγκριση με τα

τυχαία προσανατολισμένα αντισώματα. Η αλληλεπίδραση αντισώματος-αντιγόνου σε ένα στερεό υπόστρωμα επηρεάζεται επίσης από τη φύση των μορίων σύνδεσης μεταξύ του δεσμευμένου αντισώματος και της στερεής επιφάνειας. Όταν τα αντισώματα συζευγνύονται απευθείας στην επιφάνεια, η ανίχνευση αντιγόνου συχνά παρεμποδίζεται από στερεοχημικούς παράγοντες και την περιορισμένη κινητικότητα των δεσμευμένων αντισωμάτων. Αντίθετα, αντισώματα που ακινητοποιούνται μέσω ενός εύκαμπτου μορίου σύνδεσης «συλλαμβάνουν» τα αντισώματα [79].



Σχήμα 20. a) Τυχαίος προσανατολισμός αντισωμάτων, b) βέλτιστος προσανατολισμός και c) έμμεση ακινητοποίηση αντισώματος μέσω δεσμευτικής πρωτεΐνης.

Προσρόφηση

Η προσρόφηση αντισωμάτων σε στερεά επιφάνεια είναι μακράν η ευκολότερη μέθοδος ακινητοποίησης αντισωμάτων. Οφείλεται σε μια ποικιλία υδρόφιλων, υδρόφοβων, van der Waals και π-π αλληλεπιδράσεων, μεταξύ των αντισωμάτων και των στερεών υποστρωμάτων. Όπως συζητήθηκε προηγουμένως, ωστόσο, τα προσροφημένα αντισώματα είναι τυχαία προσανατολισμένα με αποτέλεσμα λιγότερο από το 10% των ακινητοποιημένων αντισωμάτων παραμένουν ενεργά για δέσμευση αντιγόνου μετά από παθητική προσρόφηση [80]. Εκτός από τον τυχαίο προσανατολισμό, τα ακινητοποιημένα αντισώματα μπορούν εύκολα να απομακρυνθούν από την επιφάνεια παρουσία άλλης πρωτεΐνης που έχει υψηλότερο φορτίο ή μεγαλύτερο αριθμό υδρόφοβων θυλάκων. Αυτό αποδίδεται στις σχετικά αδύναμες και αναστρέψιμες αλληλεπιδράσεις στις οποίες βασίζεται η προσρόφηση. Παρά το μειονέκτημα του τυχαίου προσανατολισμού, η μέθοδος προτιμάται σε πολλές εφαρμογές όπως για την ακινητοποίηση αντισωμάτων σε πλακίδια ELISA και ανοσοαισθητήρες λόγω της απλότητας της διαδικασίας (δεν απαιτούνται τροποποιήσεις των αντισωμάτων) και της επαρκούς ικανότητας δέσμευσης των ακινητοποιημένων αντισωμάτων. Βελτιστοποίηση της μεθόδου μπορεί αν επιτευχθεί με προσανατολισμένη προσρόφηση αντισωμάτων χρησιμοποιώντας διαφορετική επεξεργασία είτε στα αντισώματα είτε στα υποστρώματα, συμπεριλαμβανομένων των κατεργασιών με υπεριώδες φως ή την εφαρμογή ηλεκτρικού πεδίου [81].

Ομοιοπολική πρόσδεση

Η ομοιοπολική σύνδεση αντισωμάτων σε χημικά ενεργοποιημένες στερεές επιφάνειες είναι η πιο κοινή μέθοδος ακινητοποίησης αντισωμάτων. Οι ελεύθερες αμινομάδες (κυρίως εαμινομάδες λυσίνης) στο μόριο του αντισώματος μπορούν εύκολα να συζευχθούν με ενεργές ομάδες, όπως αλδεΰδες ή ενεργούς εστέρες που έχουν εισαχθεί σε στερεές επιφάνειες. Αν και η ακινητοποίηση με ομοιοπολική σύνδεση οδηγεί σε εξαιρετική σταθερότητα όσον αφορά την απομάκρυνση των ακινητοποιημένων αντισωμάτων από άλλες πρωτεΐνες, τα ομοιοπολικά συνδεδεμένα μέσω αμινομάδων αντισώματα έχουν επίσης τυχαίο προσανατολισμό [82]. Έτσι, έχει αναφερθεί ότι η ικανότητα δέσμευσης αντιγόνου των τυχαία συζευγμένων αντισωμάτων είναι 2-3 φορές χαμηλότερες σε σύγκριση με την ικανότητα δέσμευσης των καλά προσανατολισμένων αντισωμάτων [83]. Στα μειονεκτήματα της μεθόδου είναι επίσης ότι απαιτεί χημική επεξεργασία των αντισωμάτων ή/και των επιφανειών πριν από την ακινητοποίηση.

Μέθοδοι έμμεσης ακινητοποίησης αντισωμάτων

Στις μεθόδους αυτές χρησιμοποιούνται πρωτεΐνες που δεσμεύουν αντισώματα όπως η πρωτεΐνη G και η πρωτεΐνη A, οι οποίες συνδέονται ειδικά στην μη μεταβλητή περιοχή (περιοχή Fc) ενός αντισώματος. Τα αντισώματα που ακινητοποιούνται σε επιφάνειες επικαλυμμένες με τις πρωτεΐνες αυτές είναι, επομένως, κατάλληλα προσανατολισμένα για βέλτιστη δέσμευση αντιγόνου. Επιπλέον, καθώς δεν απαιτείται τροποποίηση των αντισωμάτων για την ακινητοποίηση, τα δεσμευμένα αντισώματα διατηρούν πλήρως τις ικανότητές τους δέσμευσης [79].

Η σχεδόν μη αναστρέψιμή μη ομοιπολική αλληλεπιδράση μεταξύ της πρωτεΐνης στρεπταβιδίνης και της βιοτίνης (Kd = 10^{-15} M) [84] έχει επίσης χρησιμοποιηθεί για την ακινητοποίηση αντισωμάτων. Για τον σκοπό αυτό τα αντισώματα τροποποιούνται με ομοιοπολική πρόσδεση μορίων βιοτίνης. Η μέθοδος αυτή δεν προσφέρει προσανατολισμένη ακινητοποίηση αντισωμάτων αλλά διατηρεί σε μεγάλο βαθμό την ενεργότητα των αντισωμάτων λόγω απομάκρυνσης τους από την επιφάνεια.

Τα τελευταία χρόνια αναφέρονται ολοένα και περισσότερες μελέτες που κάνουν χρήση κατευθυνόμενης από DNA ακινητοποίησης αντισωμάτων. Για τον σκοπό αυτό παρασκευάζονται σύμπλοκα μονοκλωνικού DNA-αντισώματος τα οποία αλληλεπιδρούν με ακινητοποιημένες στην επιφάνεια συμπληρωματικές αλυσίδες DNA, ευνοώντας έτσι τον βέλτιστο προσανατολισμό των αντισωμάτων, ενώ παράλληλα το μήκος και η ευκαμψία του DNA βοηθάει την δέσμευση των αντιγόνων [79].

1.4.3 Ηλεκτροχημικοί βιοαισθητήρες γραφενίου

Οι ηλεκτροχημικοί βιοαισθητήρες παρουσιάζουν μεγάλο ερευνητικό ενδιαφέρον τις τελευταίες δεκαετίες καθώς προσφέρουν υψηλή ευαισθησία ανίχνευσης, επαναληψιμότητα, χαμηλό κόστος οργανολογίας, σε συνδυασμό με γρήγορα και αξιόπιστα αποτελέσματα. Στις ηλεκτροχημικές τεχνικές ανίχνευσης, οι φυσικές ιδιότητες που αξιοποιούνται για την μέτρηση αναλυτικού σήματος και οι αντίστοιχες ονομασίες των τεχνικών είναι: η ένταση ηλεκτρικού ρεύματος για τις αμπερομετρικές τεχνικές και η μέτρηση της αλλαγής της ηλεκτρικού φορτίου για τις βολταμετρικές τεχνικές και η μέτρηση της αλλαγής της ηλεκτρικής αγωγιμότητας του μέσου μεταξύ δύο ηλεκτροδίων για τις αγωγιμομετρικές τεχνικές. Κατά αναλογία οι ηλεκτροχημικοί αισθητήρες διακρίνονται κυρίως σε αμπερομετρικούς, βολταμετρικούς και αισθητήρες εμπέδησης. Ανάλογα με την αρχή λειτουργία τους οι ηλεκτροχημικοί αισθητήρες βασίζονται σε ηλεκτρόδια από διαφορετικά υλικά, όπως ευγενή μέταλλα, χρυσό ή λευκόχρυσο, ή υλικά με βάση τον άνθρακα σε διάφορες μορφές συμπεριλαμβανομένου του γραφενίου.

Το γραφένιο ξεχωρίζει για τις εξαιρετικές ιδιότητές του όπως η υψηλή μηχανική αντοχή, η ελαστικότητα, η θερμική και ηλεκτρική του αγωγιμότητα, ενώ παράλληλα είναι οικονομικό και με χαμηλό περιβαλλοντικό αποτύπωμα. Λόγω των ενδιαφερόντων ιδιοτήτων του, το γραφένιο
έχει βρει εφαρμογή σε μια μεγάλη ποικιλία βιοαισθητήρων. Έχει χρησιμοποιηθεί σε τρανζίστορ επίδρασης πεδίου (FET), ηλεκτροχημικούς βιοαισθητήρες, βιοαισθητήρες σύνθετης αντίστασης, βιοαισθητήρες ηλεκτροχημιφωταύγειας και φθορισμού.

Στον φυσικό γραφίτη, τα στρώματα γραφενίου συνδέονται μεταξύ τους μέσω πολλαπλών π-π αλληλεπιδράσεων. Οι δύο πιο διαδεδομένες μέθοδοι για την παραγωγή γραφενίου είναι η χημική εναπόθεση (CVD) και η μηχανική απολέπιση (mechanical exfoliation) του γραφίτη με τη χρήση κολλητικής ταινίας (scotch tape method). Με αυτές τις μεθόδους, όμως, είναι δύσκολη η παραγωγή γραφενίου σε μεγάλη κλίμακα και για τον λόγο αυτό συνήθως προτιμάται οξείδωση του γραφίτη από ισχυρά οξειδωτικά μέσα σε οξείδιο του γραφίτη [85].

Το οξείδιο του γραφενίου (GO) προκύπτει με αποκόλληση των οξειδωμένων πλεγμάτων του οξειδίου του γραφίτη, η οποία συνήθως λαμβάνει χώρα με κατεργασία σε λουτρό υπερήχων τόσο σε υδατικά όσο και σε οργανικά διαλύματα. Το οξείδιο του γραφενίου GO παρασκευάστηκε για πρώτη φορά από τον Benjamin C. Brodie με επεξεργασία του γραφίτη με χλωρικό κάλιο παρουσία νιτρικού οξέος. Αργότερα, προτάθηκε από τους Hummers και Offeman, η πιο συχνά χρησιμοποιούμενη και λιγότερο επικίνδυνη μέθοδος, η οποία περιλαμβάνει την οξείδωση του γραφίτη μέσω επεξεργασίας του με ένα μείγμα θεικού οξέος, νιτρικού νατρίου και υπερμαγγανικού καλίου. Αυτή είναι η πιο δημοφιλής χημική οδός σύνθεσης αναγμένου GO στις μέρες μας [86]. Κατά την οξείδωση του γραφέτη οδός σύνθεσης οξυγονούχες ομάδες, όπως υδροξύλια, εποξείδια, καρβονύλια και καρβοξύλια, οι οποίες δημιουργόυνται στις δύο πλευρές των δισδιάστατων πλεγμάτων του γραφενίου τα οποία αποτελούν το γραφίτη. Ως εκ τούτου, το GO είναι μονωτικό και δεν παρουσιάζει τις καλές ηλεκτρικές ιδιότητες του γραφενίου. Επομένως, για να αποκατασταθεί η ηλεκτρική αγωγιμότητα του γραφενίου, απαιτείται αναγωγή (με χημική ή θερμική οδό) για την απομάκρυνση των οξυγονούχων ομάδων [87].

Η θερμική αναγωγή επιτυγχάνει την απομάκρυνση των οξυγονούχων ομάδων από τον κρύσταλλο του οξειδίου του γραφενίου μέσω θέρμανσης. Η μέθοδος αυτή παρόλο που είναι εξαιρετικά απλή, μειονεκτεί λόγω του μικρού μεγέθους των παραγόμενων φύλλων rGO και των στρεβλώσεων που εμφανίζουν, λόγω του ότι η απελευθέρωση των οξυγονούχων ομάδων συχνά οδηγεί και στην απομάκρυνση ατόμων άνθρακα, η οποία προκαλεί σπάσιμο των επιπέδων του γραφενίου εναλλακτικά, έχει βρεθεί ένας μεγάλος αριθμός χημικών αντιδραστηρίων τα οποία έχουν εφαρμοστεί με ιδιαίτερη επιτυχία για την αναγωγή του οξειδίου του γραφενίου προς γραφενίου. Η αναγωγή λοιπόν του οξειδίου του γραφενίου προς σχηματισμό αναγμένου οξειδίου του γραφενίου καθορίζει κατά πόσο το παραγόμενο rGO προσεγγίζει από την άποψη της δομής το καθαρό γραφένιο [88].



Σχήμα 21. Σχηματική απεικόνιση της αναγωγής του οξειδίου του γραφενίου σε φύλλο γραφενίου [86].

Ακινητοποίηση βιομορίων σε επιφάνειες GO/rGO

Για την ακινητοποίηση πρωτεϊνών σε μια επιφάνεια μέσω προσρόφησης παίζουν ρόλο η ενεργή επιφάνεια σε σχέση με την προβαλλόμενη και οι χημικές ομάδες της επιφάνειας που μπορούν να αλληλεπιδρούν με ομάδες στο μόριο της πρωτεΐνης. Τα GO και rGO έχουν μεγάλη ενεργή επιφάνεια και χημικές ομάδες που περιέχουν οξυγόνο, η παρουσία των οποίων καθιστά τα GO και rGO υδρόφιλα. Αυτά τα χαρακτηριστικά των GO και rGO επιτρέπουν την άμεση ακινητοποίηση της πρωτεΐνης χωρίς την ανάγκη τροποποίησης της επιφάνειας ή τη χρήση αντιδραστηρίων σύζευξης [89].

Συγκεκριμένα το GO περιέχει ομάδες όπως καρβονύλια, καρβοξυλια, υδροξύλια και αλκοξύ ομάδες μέσω των οποίων μπορεί να αναπτύξει ηλεκτροστατικές αλληλεπιδράσεις ή δεσμούς υδρογόνου με πρωτεΐνες. Αντίθετα στο rGO οι περισσότερες από τις ομάδες αυτές έχουν απομακρυνθεί, με αποτέλεσμα συνήθως μεταξύ πρωτεΐνης και rGO να κυριαρχούν οι υδρόφοβες αλληλεπιδράσεις [89].

Αυτές οι αλληλεπιδράσεις μεταξύ GO/rGO και πρωτεϊνών επηρεάζουν τη διαμόρφωση, τη δραστικότητα και τη σταθερότητα της ακινητοποιημένης πρωτεΐνης. Αρκετές μελέτες αποκάλυψαν ότι η ακινητοποίηση πρωτεΐνης είχε ως αποτέλεσμα την απώλεια της δραστικότητας της λόγω αλλαγών στη φυσική δομή της που προκλήθηκαν κατά την ακινητοποίηση της σε επιφάνειες. Σε σύγκριση με το rGO, το GO προκαλεί μεγαλύτερη μείωση της δραστικότητας των ακινητοποιημένων πρωτεϊνών που μπορεί να οφείλεται στην ισχυρή ηλεκτροστατική αλληλεπίδραση που αναπτύσσεται στο GO σε σχέση με το rGO [90].

1.4.4 Μήκος Debye

Σε πολλούς ηλεκτροχημικούς βιοαισθητήρες, η ανίχνευση σε διαλύματα ηλεκτρολυτών επηρεάζεται σε μεγάλο βαθμό από το μήκος Debye που προκαλείται από την ηλεκτροστατική αλληλεπίδραση μεταξύ των φορτισμένων βιομορίων και της επιφάνειας του αισθητήρα. Η απόσταση ανίχνευσης από την επιφάνεια του αισθητήρα ορίζεται ως μήκος debye (λ_D), που αντιπροσωπεύει το ύψος του διπλού στρώματος (EDL) των ιόντων που συσσωρεύονται κοντά στα βιομόρια και δίνεται από την σχέση [91]:

$$\lambda_D = \sqrt{\frac{\varepsilon_0 \varepsilon_r K_B T}{2N_a e^2 I}}$$
 Eξ. 5

Όπου, $\varepsilon_0 \varepsilon_r$ είναι οι διηλεκτρικές σταθερές του κενού και του διαλύματος αντίστοιχα, K_B η σταθερά Boltzmann, T η θερμοκρασία, N_a ο αριθμός Avogadro, e το φορτίο του ηλεκτρονίου και I η συγκέντρωση του ιοντικού φορτίου. Σύμφωνα με την εξίσωση το λ_D είναι ανάλογο της ρίζας της θερμοκρασίας, επομένως το λ_D αυξάνεται με την αύξηση της θερμοκρασίας και αντιστρόφως ανάλογο με την συγκέντρωση του ιοντικού φορτίου, δηλαδή αυξάνεται με την μείωση της συγκέντρωσης του διαλύματος.

Για ιόντα και νουκλεϊκά οξέα σε διάλυμα με χαμηλή συγκέντρωση ιοντικού φορτίου, η ανίχνευση είναι εύκολη λόγω του μικρού τους μεγέθους. Αντίθετα, η ανίχνευση μεγαλύτερων μορίων όπως οι πρωτεΐνες (~10 nm) και τα κύτταρα (~μm) είναι πιο περίπλοκη καθώς το λ_D υπό φυσιολογικές συνθήκες το μήκος debye είναι κοντά στο 1 nm [92].

Η βασική στρατηγική που ακολουθείται για την αλλαγή του λ_D είναι η μεταβολή της κατανομής φορτίου στην επιφάνεια του αισθητήρα ή στο διάλυμα. Διάφορες μέθοδοι έχουν αναπτυχθεί μερικές από τις οποίες παρουσιάζονται παρακάτω: α) αλλαγή της συγκέντρωσης ιόντων του διαλύματος, β) προσθήκη πολυμερικού στρώματος στον αισθητήρα, γ) αλλαγή της μορφολογίας του αισθητήρα, δ) μείωση της απόστασης του βιομορίου αναγνώρισης από την επιφάνεια ή ε) προκαλώντας μία ηλεκτρική διαταραχή [92].

Αραίωση συγκέντρωσης διαλύματος

Η αραίωση της συγκέντρωσης ιόντων μπορεί να αυξήσει σημαντικά το λ_D . Για παράδειγμα οι Chen et al. χρησιμοποίησαν μία συσκευή αφαλάτωσης πριν την μέτρηση ενός αντιγόνου στο αίμα και με αυτό τον τρόπο κατάφεραν να αυξήσουν την ευαισθησία του αισθητήρα, αυξάνοντας το μήκος Debye [93]. Ωστόσο, αυτή η μέθοδος ενέχει κινδύνους καθώς η μεγάλη αραίωση μπορεί να μειώσει την αλληλεπίδραση του μορίου αναγνώρισης με το μόριο στόχο και μπορεί να αλλάξει τις βιοφυσικές τους ιδιότητες [92].

Προσθήκη πολυμερικού στρώματος στο κανάλι

Πολλές είναι οι αναφορές που προτείνουν την προσθήκη μορίων πολυ(αιθυλενογλυκόλης) (PEG) στην επιφάνεια. Με τον τρόπο αυτό κατέστη δυνατή η ανίχνευση ενός αντιγόνου σε ρυθμιστικά διαλύματα υψηλής ιοντικής συγκέντρωσης. Χωρίς την επίστρωση PEG, η ευαισθησία ανίχνευσης για τον ίδιο αισθητήρα μειώθηκε 5 φορές. Ωστόσο, αυτό το κέρδος σε ευαισθησία έχει κόστος: η κινητική δέσμευσης μεταξύ του αισθητήρα και της αναλυόμενης ουσίας είναι εμφανώς πιο αργή όταν χρησιμοποιείται η επίστρωση PEG επειδή τα βιομόρια πρέπει να διαχυθούν μέσω των πυκνών μορίων PEG για να ανιχνευθούν. Ως αποτέλεσμα ο χρόνος της ανίχνευσης αυξάνεται από ~3 σε ~15 λεπτά [94].



Σχήμα 22. α) Σχηματική απεικόνιση μιας συσκευής FET χωρίς (επάνω) και με τροποποίηση της επιφάνειας του αισθητήρα με PEG(κάτω). β) Ανίχνευση PSA σε πραγματικό χρόνο σε διαφορετικές συγκεντρώσεις χρησιμοποιώντας την προηγούμενη διάταξη με τροποποίηση του αισθητήρα με PEG σε διάλυμα φωσφορικών 100 mM, pH 6 [95].

Ανάλογη προσέγγιση ακολούθησαν οι Jang et al. σε έναν OFET βιοαισθητήρα ενσωματώνοντας ένα αντίσωμα κορτιζόλης σε ένα πολυμερές. Το ενσωματωμένο αντίσωμα δεσμεύει τα μόρια κορτιζόλης κοντά στην επιφάνεια ανίχνευσης αυξάνοντας έτσι την ευαισθησία του αισθητήρα με αποτέλεσμα να επιτευχθούν ιδιαίτερα χαμηλά όρια ανίχνευσης από 10 fg mL⁻¹ έως 1 ng mL⁻¹ χρησιμοποιώντας ρυθμιστικά διαλύματα υψηλής ιοντικής ισχύος [96].



Σχήμα 23. Σχηματική αναπαράσταση αντισωμάτων κορτιζόλης χωρίς επικάλυψή (αριστερά) και με επικάλυψη με πολυμερικό στρώμα PSMA (δεξιά) [96].

Αλλαγή της μορφολογίας του αισθητήρα

Τα υπολογιστικά μοντέλα προβλέπουν ότι το λ_D εξαρτάται από τη μορφολογία του αισθητήρα, με την τιμή του λ_D να αυξάνεται όταν αντί για επίπεδη επιφάνεια έχουμε επιφάνεια με κοιλότητες. Έτσι η καμπύλωση της επιφάνειας του αισθητήρα φαίνεται να αυξάνει την ευαισθησία του [97].



Σχήμα 24. Σχηματική αναπαράσταση αισθητήρα FET γραφενίου, οι μπλε κουκκίδες αντιστοιχούν στο όριο του λ_Dγια a) επίπεδη επιφάνεια γραφενίου και b) τραχεία επιφάνεια γραφενίου [97].

Προσαρμογή της απόστασης βιομορίου αναγνώρισης από την επιφάνεια

Μία κοινή τεχνική για να επιτευχθεί προσαρμογή της απόστασης του βιομορίου αναγνώρισης από την επιφάνεια είναι η αντικατάσταση ενός μεγάλου μορίου ανίχνευσης (π.χ., αντισώματος) από ένα μικρότερου μεγέθους (π.χ., απταμερές) όπου αυτό είναι δυνατό [69]. Μία ακόμα πολλά υποσχόμενη μέθοδος για την ανίχνευση μικρών μορίων όπως η γλυκόζη που έχουν μικρό αντίκτυπο στην ηλεκτρογωγιμότητα των αισθητήρων και είναι επομένως δύσκολο να ανιχνευθούν είναι η αλλαγή της αρχικής διαμόρφωσης του δεσμευτικού μορίου, π.χ., ενός απταμερούς, όταν το μικρό μόριο δεσμεύεται προκαλώντας διακύμανση των δυναμικών κοντά στην επιφάνεια του αισθητήρα [99].

Ηλεκτρική διαταραχή

Η ανίχνευση σε συνεχές ρεύμα (dc) έχει υλοποιηθεί σε ένα ευρύ φάσμα συσκευών. Ωστόσο, ο μηχανισμός ανίχνευσης που βασίζεται στη μέτρηση των αλλαγών στην αγωγιμότητα συνεχούς ρεύματος αποτυγχάνει σε υψηλές συγκεντρώσεις άλατος, καθώς η ευαισθησία των συσκευών μειώνεται δραστικά λόγω της υψηλής ιοντικής συγκέντρωσης. Σε πολλές μελέτες πειραματικές και θεωρητικές προτείνεται ότι αυτό μπορεί να ξεπεραστεί χρησιμοποιώντας ένα FET ως βιοαισθητήρα υψηλής συχνότητας. Σε συνεχή ή χαμηλή συχνότητα, τα ιόντα στο διάλυμα κινούνται ακολουθώντας το ηλεκτρικό πεδίο και σχηματίζουν EDL. Ωστόσο, σε αρκετά υψηλές συχνότητες η δύναμη του εναλλασσόμενου ρεύματος δεν μπορεί πλέον να υπερνικήσει την αντίσταση του διαλύματος και τα ιόντα στο διάλυμα δεν έχουν επαρκή χρόνο για να σχηματίσουν EDL, έτσι τα δίπολα του μορίου-στόχου υπό εναλλασσόμενη διέγερση μπορούν να επηρεάσουν το δυναμικό της επιφάνειας [100].

1.4.5 Βιο-αισθητήρες ενσωματωμένοι σε ΟοC

Τα Organs-on-chip (OoC) είναι εξελιγμένα in vitro εργαλεία ικανά να αναπαράγουν βασικές λειτουργίες των ανθρώπινων οργάνων. Για το σκοπό αυτό, πρέπει να αξιολογηθούν διάφορες παράμετροι (π.χ., χημικές, φυσικές). Επί του παρόντος, οι περισσότερες προσεγγίσεις βασίζονται σε τεχνικές ανάλυσης (π.χ., τεχνολογία ELISA) και απεικόνισης off-chip. Ωστόσο, η αυξανόμενη ζήτηση για συνεχή, μη επεμβατική και σε πραγματικό χρόνο παρακολούθηση της ανάπτυξης των ιστών και της απόκρισής τους σε ερεθίσματα (π.χ. χορήγηση φαρμάκου) απαιτεί την άμεση ενσωμάτωση αισθητήρων που να καταγράφουν τις ακόλουθες παραμέτρους [101].

Θερμοκρασία: Η θερμοκρασία αποτελεί έναν παράγοντα που επηρεάζει άμεσα τα κύτταρα και την ανάπτυξή τους και για τον λόγο αυτό έχουν γίνει πολλές προσπάθειες ενσωμάτωσης αισθητήρων θερμοκρασίας στις OoC πλατφόρμες. Ένα πρόσφατο παράδειγμα είναι ο έξυπνος αισθητήρας CMOS που αναπτύχθηκε από τους da Ponte et al. [102] για μέτρηση σε πραγματικό χρόνο της θερμοκρασίας εντός του OoC.

pH: Η μέτρηση του pH γίνεται με διάφορα είδη αισθητήρων, όπως μια φωτοδίοδο που μετράει την αλλαγή του χρώματος του θρεπτικού μέσου λόγω της μεταβολής του pH [103], τα ηλεκτρόδια pH [104], και ποτενσιομετρικοί αισθητήρες [105].

Οξυγόνωση: Τα επίπεδα οξυγόνου μπορούν να μετρηθούν χρησιμοποιώντας οπτικές μεθόδους όπως βιοαισθητήρες οξυγόνου που βασίζονται σε φωσφορισμό [106], ή φωταύγεια [107].

Αισθητήρες διεπιθηλιακής ηλεκτρικής αντίστασης (TEER): για την παρακολούθηση του κυτταρικού φραγμού σε πραγματικό χρόνο. Οι μετρήσεις γίνονται με την χρήση βιοαισθητήρων αντίστασης [102].

Ανίχνευση βιοδεικτών: Για την ανίχνευση βιοδεικτών, έχουν διερευνηθεί διάφορες προσεγγίσεις σε πρόσφατες μελέτες. Οι Cruz et al. [108] χρησιμοποίησαν ένα μικρό ποτενσιοστάτη σε συνδυασμό με ένα μονοκλωνικό αντίσωμα έναντι της κορτιζόλης, ακινητοποιημένο σε μια μονοστιβάδα μικροηλεκτροδίων χρυσού, για την ηλεκτροχημική ανοσοανίχνευση της κορτιζόλης. Οι Panraksa et al. [109] ενσωμάτωσαν νανοσωματίδια χρυσού επικαλυμμένα με μονοκλωνικά αντισώματα για την ανίχνευση πρωτεΐνης σε μια μικρορευστονική πλατφόρμα.

1.5 Ιντερλευκίνη 6 (IL-6)

Τα κύτταρα του ανοσοποιητικού μας συστήματος επικοινωνούν μεταξύ τους κατά τη διάρκεια της ανοσολογικής απόκρισης εκκρίνοντας διάφορους διαβιβαστές, που ονομάζονται κυτοκίνες, όπως οι ιντερλευκίνες που παράγονται από πολλούς τύπους κυττάρων συμπεριλαμβανομένων των λευκών αιμοσφαιρίων. Η ιντερλευκίνη 6 (IL-6), η οποία ταυτοποιήθηκε για πρώτη φορά στα μέσα της δεκαετίας του 1980, είναι μια πλειοτροπική γλυκοπρωτεΐνη που παράγεται από ένα ευρύ φάσμα κυττάρων ως απόκριση σε μια μεγάλη ποικιλία ερεθισμάτων και ρυθμίζει ποικιλία γεγονότων, όπως την ανοσολογική απόκριση, την αιμοποίηση, τη φλεγμονή, την κυτταρική διαίρεση και διαφοροποίηση, την επιβίωση, αλλά και την απόπτωση κυττάρων [110]. Τα βρέφη παρουσιάζουν συγκεντρώσεις IL-6 από 18 έως 26 pg/mL που μειώνονται όμως προοδευτικά κατά τα πρώτα χρόνια της ζωής. Σε υγιείς ενήλικες, οι συγκεντρώσεις της IL-6 στο πλάσμα είναι <10 pg/mL, ενώ η παραγωγή της αυξάνεται απότομα κατά τη διάρκεια οξέων φλεγμονωδών αντιδράσεων που σχετίζονται με τραυματισμό, στρες, λοίμωξη, εγκεφαλικό θάνατο και άλλα [111]. Η συγκέντρωση μπορεί να φτάσει μερικά ng/ml σε αυτοάνοσα νοσήματα και μg/ml κατά τη διάρκεια σηπτικής καταπληξίας [112].

Ένα κοινό χαρακτηριστικό πολλών από τα ερεθίσματα που ενεργοποιούν την IL-6 είναι ότι συνδέονται με βλάβη ή οξειδωτικό στρες στους ιστούς (π.χ., έκθεση σε UV ακτινοβολία, μικροβιακά προϊόντα, ιούς ή άλλες προφλεγμονώδεις κυτοκίνες). Οι αυξημένες συγκεντρώσεις της IL-6 σχετίζονται με αρκετές φλεγμονώδεις ασθένειες και κακοήθειες. Ενώ παράλληλα, η περίσσεια αυτής της κυτοκίνης και/ή του υποδοχέα της συμβάλλει στην παθογένεση ορισμένων φλεγμονωδών ασθενειών, ενώ ο αποκλεισμός του υποδοχέα IL-6 (IL-6R) έχει αποδειχθεί επιτυχής θεραπεία συγκεκριμένων φλεγμονωδών ασθενειών φλεγμονωδών ασθενειών φλεγμονωδών ασθενειών μοι με αρκετές φλεγμονωδων ασθενειών και της συμβάλλει στην παθογένεση ορισμένων φλεγμονωδών ασθενειών συ μαλαλεισμός του υποδοχέα IL-6 (IL-6R) έχει αποδειχθεί επιτυχής θεραπεία συγκεκριμένων φλεγμονωδών ασθενειών [113].



Σχήμα 25. Αναπαράσταση της κρυσταλλικής δομής της IL-6. Οι τέσσερις έλικες φέρουν τις ετικέτες Α, Β, C και D. Η επιπλέον έλικα στον τελικό μακρύ βρόχο φέρει την ένδειξη Ε [114].

1.5.1 Δομή

Η ανθρώπινη IL-6 (21 kDa) αποτελείται από τέσσερις κύριες έλικες (A, B, C και D) και μία μικρότερου μεγέθους έλικα E, οι κύριες έλικες είναι διατεταγμένες έτσι ώστε οι A και οι B έλικες να έχουν την ίδια κατεύθυνση και οι C και D αντίθετη κατεύθυνση (Σχήμα 25). Η σύνδεση των ελίκων σε αυτή τη διάταξη καθίσταται δυνατή με έναν μακρύ βρόχο που ενώνει τις έλικες A και B, έναν μικρότερου μήκους μεταξύ B και Γ και τέλος άλλον έναν μακρύ βρόχο μεταξύ C και D [114]. Το ισοηλεκτρικό της σημείο, κυμαίνεται μεταξύ του 5 και του 6. Η IL-6 συνδέεται ειδικά με τον υποδοχέα της (IL-6R, 80-kDa), σχηματίζοντας το σύμπλοκο IL-6/IL-6R που δεσμεύεται από δύο μόρια gp130, μια πρωτεΐνη δεσμευμένη στη μεμβράνη των κυττάρων [115]. Σε αντίθεση με τον IL-6R, η γλυκοπρωτεΐνη gp130 (130 kDa) συνδέεται επίσης με άλλους υποδοχείς κυτοκίνης για να μεσολαβήσει στις κυτταρικές αποκρίσεις που προκαλούνται από τις κυτοκίνες αυτές. Τόσο ο IL-6R όσο και η γλυκοπρωτεΐνη gp130 περιέχουν μία διαμεμβρανική περιοχή και ένα εξωκυττάριο άκρο. Όπως προκύπτει από μελέτες η IL-6 σε μοριακό επίπεδο δρα κυρίως μέσω δύο οδών για την ενεργοποίηση των οποίων απαιτείται η δημιουργία ενός δραστικού εξαμερούς στην κυτταρική μεμβράνη, το οποίο προκύπτει από την σύνδεση της ιντερλευκίνης-6 στους υποδοχείς της, IL-6R και gp130 [116].

Η πρώτη οδός (άμεση) παρατηρείται σε κύτταρα που διαθέτουν την IL-6R στην μεμβράνη τους. Η δέσμευση της IL-6 με την IL-6R και η επακόλουθη σύνδεση με το gp130 ξεκινά τη μετάδοση του σήματος. Η δεύτερη οδός (έμμεση) ακολουθείται σε κύτταρα που δεν διαθέτουν την IL-6R στην μεμβράνη τους. Για να δράσει σε αυτά τα κύτταρα η IL-6 συνδέεται με μια διαλυτή μορφή του υποδοχέα IL-6R (sIL-6R), η οποία έχει ανιχνευθεί σε σωματικά υγρά όπως το αίμα και τα ούρα. Στη συνέχεια, το σύμπλεγμα IL-6/sIL-6R μπορεί να ενεργοποιήσει

την gp130, που εκφράζεται σε όλα τα κύτταρα, και να ενεργοποιηθεί η μετάδοση του σήματος [113].



Σχήμα 26. (a) Μια αναπαράσταση των IL-6, IL-6r και gp130. Η κρυσταλλική δομή της IL-6 φαίνεται με πράσινο, η IL-6r με μπλε και η gp130 με κόκκινο. Επισημαίνονται οι προτεινόμενες θέσεις δέσμευσης. Η θέση 1 είναι η θέση των αλληλεπιδράσεων IL-6/IL-6r. Η θέση 2 είναι η περιοχή όπου η IL-6 αλληλεπιδρά με την gp130 στο τριμερές. Η θέση 3 είναι η θέση των αλληλεπιδράσεων IL-6/IL-6r. Η θέση 2 είναι η περιοχή όπου η IL-6 αλληλεπιδρά με την gp130 στο τριμερές. Η θέση 3 είναι η θέση των αλληλεπιδράσεων IL-6/IL-6r. Η θέση 2 είναι η περιοχή όπου η IL-6 αλληλεπιδρά με την gp130 στο τριμερές. Η θέση 3 είναι η θέση των αλληλεπιδράσεων IL-6/IL-6 στα τριμερή. Η θέση 4 είναι η θέση των αλληλεπιδράσεων IL-6/IL-6 στα τριμερή. (b) Αναπαράσταση της IL-6 με εξωτερικές πλευρικές αλυσίδες των οποίων ο χώρος έχει γεμίσει με άτομ α. Μεταλλάξεις σε αυτές τις πλευρικές αλυσίδες τροποποιούν τον δεσμό της IL-6r (θέση 1) ή της gp130 (θέση 2 ή 3) [114].

1.5.2 Λειτουργικός ρόλος της ΙL-6 στο νεφρό

Πρόσφατες μελέτες έδειξαν ότι η αύξηση της IL-6 στο ορό του αίματος μπορεί να οφείλεται και σε νεφρικά αυτοάνοσα και φλεγμονώδη νοσήματα. Τα νεφρικά κύτταρα, συμπεριλαμβανομένων των ποδοκυττάρων, των ενδοθηλιακών κυττάρων, των μεσαγγειακών κυττάρων και των σωληναριακών επιθηλιακών κυττάρων (TECs) μπορούν να εκκρίνουν την IL-6 κάτω από συγκεκριμένες συνθήκες. Τα ποδοκύτταρα είναι τα μόνα που εκφράζουν τον υποδοχέα IL-6R και μπορούν να ανταποκριθούν άμεσα στην IL-6, ενώ τα υπόλοιπα κύττρα χρησιμοποιούν το σύμπλεγμα IL-6/sIL-6R [117].

Αυξημένη παραγωγή της IL-6 στο αίμα και στα ούρα έχει παρατηρηθεί σε διάφορα νεφρικά νοσήματα όπως η νεφροπάθεια IgA (IgA Nephropathy, IgAN), η νεφρίτιδα του λύκου και η διαβητική νεφροπάθεια. Παράλληλα, η IL-6 μπορεί να χρησιμοποιηθεί ως βιοδείκτης και θεραπευτικός στόχος στην οξεία νεφρική βλάβη (Acute Kidney Injury, AKI) και την χρόνια νεφρική νόσο (Chronic Kidney Disease, CKD). Επίσης, η παραγωγή της IL-6 αυξήθηκε στο νεφρό κατά 113 φορές σε περιπτώσεις επαγόμενης από νεφροτοξίνες AKI, κυρίως στα νεφρικά TECs, και συσχετίστηκε ισχυρά με τη νεφρική βλάβη [117]. Τέλος, αυξημένα επίπεδα IL-6 στο πλάσμα παρατηρούνται συνήθως σε ασθενείς με CKD, ενώ η μειωμένη κάθαρσή της λόγω μειωμένης νεφρικής λειτουργίας συμβάλλει στη συσσώρευσή της, οδηγώντας στην εξέλιξη της ασθένειας και την πρόκληση επιπλοκών [118].

1.5.3 Αισθητήρες IL-6

Τα τελευταία χρόνια έχουν κατασκευαστεί πολλών ειδών αισθητήρες για την ανίχνευση της IL-6. Ένας πολύ πρόσφατος τύπος αισθητήρα αναπτύχθηκε από τους Laliberte et al. [119] και βασίζεται στην αρχή λειτουργίας ενός τρανζίστορ επίδρασης πεδίου με βάση το γραφένιο (GFET). Πρόκειται για έναν φορητό και εύκαμπτο αισθητήρα, όπου το γραφένιο ενεργοποιείται με ένα απταμερές ολιγονουκλεοτίδιο το οποίο έχει υψηλού βαθμού συγγένεια με την IL-6. Το εύρος συγκεντρώσεων ανίχνευσης με τον συγκεκριμένο αισθητήρα κυμαινόταν από 10 pM έως 100 nM.

Μία ακόμα ερευνητική εργασία δημοσιεύτηκε από τους Malhotra et al. [120] στην οποία μονοφλοιϊκοί νανοσωλήνες άνθρακα ακινητοποιήθηκαν πάνω σε επιφάνεια ηλεκτροδίου και τροποποιήθηκαν με ειδικό έναντι της IL-6 ώστε να πραγματοποιηθεί ο ποσοτικός προσδιορισμός της με ανοσοχημική μέθοδο μη ανταγωνιστικού τύπου χρησιμοποιώντας για την ανίχνευση ένα βιοτινυλιωμένο ειδικό αντίσωμα σε συνδυασμό με στρεπταβιδίνη σημασμένη με το ένζυμο υπεροξειδάση (Σχ. 27).



Σχήμα 27. Σχηματική παράσταση μεθόδου ανίχνευσης ΙL-6 με ανοσοανάλυση μη ανταγωνιστικού τύπου σε μονοφλοιϊκούς νανοσωλήνες άνθρακα [120].

Στη μελέτη των Russel et al. [121], κατασκευάστηκαν συστοιχίες οκτώ (r=25 μm) μικροηλεκτροδίων σε υποστρώματα πυριτίου σε σχήμα βελόνας τα οποία ενεργοποιήθηκαν με ένα αντίσωμα έναντι της IL-6. Βρέθηκε ότι βέλτιστη μέθοδος μέτρησης ήταν η διαφορική παλμική βολταμετρία (DPV) με την οποία επιτεύχθηκε προσδιορισμός της IL-6 σε φυσιολογικά επίπεδα (pg/mL) με χρόνους ανάλυσης μικρότερους όσο 2,5 λεπτά.

Άλλος ένας βιοαισθητήρας από τους Yang et al. [122] κατασκευάστηκε με ηλεκτροχημική εναπόθεση νανοσωματιδίων Au σε οριζόντια ευθυγραμμισμένη συστοιχία μονοφλοιϊκών νανοσωλήνων άνθρακα σε υπόστρωμα SiO₂/Si. Ο ανοσοαισθητήρας βασιζόταν σε φασματοσκοπία ηλεκτρικής αντίστασης (EIS) και ήταν σε θέση να ανιχνεύσει την IL-6 στον ανθρώπινο ορό με όριο ανίχνευσης 0,01 fg/mL.



Σχήμα 28. Ανίχνευση της IL-6 σε ηλεκτρόδια με νανοσωματίδια Au σε οριζόντια ευθυγραμμισμένη συστοιχία μονοφλοιϊκών νανοσωλήνων άνθρακα [122].

Ένας ακόμα αισθητήρας με βάση το οξείδιο του γραφενίου (GO) παρουσιάστηκε στην εργασία των Huang et al. [123], ο οποίος βασίζεται στην αρχή λειτουργίας ενός τρανζίστορ επίδρασης πεδίου (FET). Διαπιστώθηκε ότι η επικάλυψη από οξείδιο του γραφενίου σε υπόστρωμα SiO₂ δεν ήταν σταθερή κατά τις εκπλύσεις και επιπλέον παρατηρήθηκαν ανεπιθύμητες αλληλεπιδράσεις με το υποκείμενο στρώμα 3-(αμινοπροπυλο)τριαιθοξυσιλανίυ (APTES). Προτάθηκε λοιπόν η εναπόθεση άνθρακα στις άκρες του GO χρησιμοποιώντας χημική εναπόθεση από ατμούς αιθανόλης (CVD) με αποτέλεσμα να βελτιωθεί η ευαισθησία του αισθητήρα και να επιτευχθεί όριο ανίχνευσης 4,7pg/mL.

1.6 Σκοπός της εργασίας

Σκοπός της παρούσας εργασίας είναι η ενσωμάτωση βιοαισθητήρα για την ανίχνευση της πρωτεΐνης IL-6 σε μικρορευστονική διάταξη κατασκευασμένη σύμφωνα με τα πρότυπα των οργάνων σε ψηφίδα. Έναυσμα υπήρξε η φανερή έλλειψη στην βιβλιογραφία σχετικά με αναφορές για on-chip αισθητήρες για την άμεση και σε πραγματικό χρόνο παρακολούθηση κυτταροκαλλιεργειών. Ο ηλεκτροχημικός βιοαισθητήρας που αναπτύχθηκε μπορεί να χρησιμοποιηθεί μελλοντικά και για την ανίχνευση διαφορετικών πρωτεϊνών ανάλογα με τις ανάγκες της κάθε κυτταροκαλλιέργειας.

Όσον αφορά τον σχεδιασμό του οργάνου σε ψηφίδα, και συγκεκριμένα ένα μοντέλο νεφρού σε ψηφίδα, επιλέχθηκαν οι διατάξεις που έχουν προταθεί από τους Jang et al. (2013) [60] και τους Jang και Suh (2010) [66], οι οποίες αποτέλεσαν την βασική ιδέα για να κατασκευάσουμε την μικρορευστονική μας πλατφόρμα με τρόπο εύκολο, γρήγορο και οικονομικό. Πιο συγκεκριμένα, η μικρορευστονική διάταξη οργάνου σε ψηφίδα θα αποτελείται από δύο τμήματα κατασκευασμένα από PDMS, το άνω τμήμα φέρει μικροκανάλι, το κάτω δεξαμενή θρεπτικού μέσου ενώ μεταξύ τους παρεμβάλλεται πορώδης μεμβράνη κατάλληλη για κυτταροκαλλιέργεια. Για τη δημιουργία του μικροκαναλιού ροής θρεπτικού μέσου (1 mm πλάτος, 10 mm μήκος, 90 μm ύψος) χρησιμοποιήθηκε μήτρα κατασκευασμένη με φωτολιθογραφία ξηρής ρητίνης Ordyl σε επιφάνεια υποστρώματος τυπωμένων κυκλωμάτων (PCB) και ακολούθησε χύτευση του PDMS στη μήτρα. Η δεξαμενή καταδλι και δεξαμενή

υποβλήθηκαν σε επεξεργασία με πλάσμα για να διευκολυνθεί η συγκόλληση της πορώδους μεμβράνης κυτταροκαλλιέργειας μεταξύ των δύο τμημάτων.



Σχήμα 29. Σχηματική αναπαράσταση της διάταξης οργάνου σε ψηφίδα που υλοποιήθηκε στην παρούσα εργασία.

Ο αισθητήρας συνδέεται σε σειρά με την διάταξη OoC όπως φαίνεται στο Σχήμα 30. Ο αισθητήρας τοποθετείται σε μικροκανάλι PDMS μέσα από το οποίο θα διασφαλιστεί η ροή του θρεπτικού υγρού από την OoC πλατφόρμα στον αισθητήρα. Με αυτή την σύνδεση πλατφόρμας OoC-αισθητήρα αποφεύγεται η διατάραξη των κυττάρων από την παρουσία του αισθητήρα ενώ παράλληλα μπορεί να διασφαλιστεί σε πραγματικό χρόνο ανίχνευση των πρωτεϊνών που εκκρίνονται από τα κύτταρα στο θρεπτικό υγρό.



Σχήμα 30. Σχηματική αναπαράσταση της σύνδεσης σε σειρά του OoC με τον αισθητήρα.

Η πρωτεΐνη που επιλέγεται προς ανίχνευση είναι η IL-6. Αρχικά, θα γίνουν πειράματα ELISA για την βελτιστοποίηση του πρωτοκόλλου ανίχνευσής της και θα ακολουθήσουν πειράματα ανίχνευσης με ηλεκτροχημικό βιοαισθητήρα στον οποίο χρησιμοποιείται rGO όπου ακινητοποιούνται αντισώματα έναντι της IL-6. Η IL-6 θα μετρηθεί μέσω της μεταβολής της αντίστασης του βιοαισθητήρα κατά την ροή της IL-6 μέσα από το μικροκανάλι του αισθητήρα.

Κεφάλαιο 2. Υλικά – Μέθοδοι - Εξοπλισμός

2.1 Υλικά φωτολιθογραφίας

Για την κατασκευή της μήτρας θα χρησιμοποιηθεί φωτολιθογραφία με φωτοευαίσθητη ξηρή ρητίνη Ordyl SY 300 πάνω σε υπόστρωμα πλακέτες PCB.

Το Ordyl είναι μία ξηρή φωτοευαίσθητη ρητίνη που χρησιμοποιείται στην φωτολιθογραφία ειδικά για εφαρμογές MEMS. Είναι βιοσυμβατό, υψηλής ανάλυσης, παραμένει μόνιμα στο υπόστρωμα μετά το ψήσιμο, είναι ευαίσθητο στο i-line, και με εξαιρετική θερμική και χημική σταθερότητα. Διατίθεται σε πάχη 10 μm, 20 μm, 30 μm, 55 μm, 90μm και 125 μm και είναι κατάλληλο για υποστρώματα όπως γυαλί, πυρίτιο, Kapton και Mylar. Το Ordyl παρέχεται σε μορφή φιλμ μεταξύ δύο προστατευτικών μεμβρανών.



Σχήμα 31. Ordyl SY 300 [124].

Τα PCB χρησιμοποιούνται στην ηλεκτρική και ηλεκτρονική μηχανική για τη σύνδεση ηλεκτρονικών εξαρτημάτων μεταξύ τους με ελεγχόμενο τρόπο. Πρόκειται για μια δομή αποτελούμενη από αγώγιμα και μονωτικά στρώματα, οικονομική και εμπορικά διαθέσιμη. Διαθέτει λείες, μονωτικές και θερμικά και χημικά ανθεκτικές εξωτερικές επιφάνειες που την καθιστούν ιδανικό υποψήφιο ως υπόστρωμα λιθογραφίας.

2.2 Υλικά μαλακής λιθογραφίας και κατασκευής ΟοC

Η κατασκευή της διάταξης έγινε χρησιμοποιώντας PDMS που προμηθευτήκαμε από την εταιρεία SYLGARDTM 184 Silicone Elastomer Kit και πολυεστερικές μεμβράνες κυτταροκαλλιέργειας ipCELLCULTURETM της εταιρείας ip4it.

Το πολυ(διμεθυλοσιλοξάνιο) (PDMS) είναι ένα πολυμερές που γίνεται ολοένα και πιο δημοφιλές για μικρορευστονικές εφαρμογές επειδή οι δομές που κατασκευάζονται από αυτό το υλικό είναι φθηνές, εύκολες στον χειρισμό, και κατασκευάζονται εκτός καθαρού χώρου [11]. Οι πολυ(διμεθυλοσιλοξάνες) έχουν έναν μοναδικό συνδυασμό ιδιοτήτων που προκύπτει από την παρουσία ανόργανης σιλοξάνης και οργανικών μεθυλ-ομάδων συνδεδεμένων με το πυρίτιο. Έχουν πολύ χαμηλές θερμοκρασίες υαλώδους μετάβασης και ως εκ τούτου είναι ρευστές σε θερμοκρασία δωματίου. Αυτά τα ρευστά υλικά μπορούν εύκολα να μετατραπούν σε διασταυρωμένα στερεά ελαστομερή. Τα προπολυμερή και οι σκληρυντικοί παράγοντες διατίθενται στο εμπόριο από διάφορες εταιρείες [125].

Το PDMS έχει μια σειρά από ιδιότητες που το καθιστούν ενδιαφέρον για μικρορευστικές εφαρμογές. Είναι, για παράδειγμα, οπτικά διαφανές στην ορατή και υπεριώδη ακτινοβολία, από 230 έως 700 nm [126]. Η διαπερατότητα του PDMS από αέρια επιτρέπει στις φυσαλίδες που δημιουργούνται μέσα στα κανάλια να διασκορπίζονται στο υλικό αλλά και τα αέρια που απαιτούνται για τις καλλιέργειες κυττάρων μπορούν να διεισδύσουν στο PDMS και να εισέλθουν στις δομές μικροκαναλιών, καθιστώντας το κατάλληλο υλικό για εφαρμογές που χρησιμοποιούν ζωντανά κύτταρα [127]. Η χαμηλή επιφανειακή ενέργεια του PDMS συνεπάγεται την εύκολη ροή του σε μικρές δομές, ενώ η απελευθέρωσή του από τη μήτρα είναι απλή. Αυτό με τη σειρά του σημαίνει ότι δομές με διαστάσεις κάτω των 0,1 μm μπορούν να χυτευτούν με ευκολία. Τέλος, το ελαστομερές αυτό χαρακτηρίζεται από χαμηλή τοξικότητα, η χημική αδράνεια, ευέλικτη χημεία επιφανειών και μηχανική ευκαμψία και ανθεκτικότητα [128].

Το PDMS αν και ιδανικό για την μαλακή λιθογραφία παρουσιάζει επίσης μια σειρά από τεχνικά προβλήματα. Πρώτον, το PDMS συρρικνώνεται κατά ~ 1% κατά τη σκλήρυνση και το σκληρυμένο PDMS μπορεί εύκολα να διογκωθεί από μια ποικιλία μη πολικών οργανικών διαλυτών όπως το τολουόλιο και το εξάνιο. Δεύτερον, η ελαστικότητα και η θερμική διαστολή του PDMS καθιστούν δύσκολη την υψηλή ακρίβεια στην κατασκευή με αποτέλεσμα να περιορίζεται η χρησιμότητα της μαλακής λιθογραφίας για εφαρμογές σε πολυστρωματική κατασκευή ή νανοκατασκευή [32]. Τέλος, το σημαντικότερο μειονέκτημα του PDMS όσον αφορά τις βιοεφαρμογές είναι ότι απορροφά μικρές οργανικές ενώσεις όπως τα φάρμακα, γεγονός που δημιουργεί προβλήματα στις τοξικολογικές και φαρμακολογικές μελέτες καθώς η συγκέντρωση στην οποία εκτείθενται τα κύτταρα μπορεί να είναι διαφορετική από την επιθυνητή [129].

Οι μεμβράνες αγοράστηκαν από την εταιρία it4ip και επιλέχθηκαν λόγω της καταλληλότητας τους για κυτταροκαλλιέργειες (ipCELLCULTURETM track-etched membrane filters). Το υλικό κατασκευής τους είναι ο πολυαιθυλενοτερεφθαλικός εστέρας (polyethylene terephthalate, PET), η διάμετρος των πόρων τους 0,4 μm και το πάχος τους 12 μm. Επιλέχθηκαν δύο είδη μεμβρανών, διαφανείς υδρόφοβες (parallel pores, hydrophobic) και ημιδιαφανείς υδρόφιλες (crossed pores, hydrophilic). Οι πρώτες έχουν μικρή πυκνότητα παράλληλων πόρων και ενδείκνυνται για παρατήρηση των κυττάρων σε οπτικό μικροσκόπιο, ενώ οι δεύτερες διαθέτουν υψηλή πυκνότητα διασταυρωμένων πόρων και προτιμώνται σε κυτταρικές μελέτες φαινομένων μεταφοράς (Σχ. 32).



Σχήμα 32. Φωτογραφία και σχηματική αναπαράσταση [130] των: a) διαφανών μεμβρανών και b) ημιδιαφανών μεμβρανών.

2.3 Υλικά για την ανίχνευση της IL-6

Ανθρώπινη ιντερλευκίνη 6 (CUSAg, Wuhan, Κίνα) και δύο μονοκλωνικά αντισώματα έναντι της IL-6 με κωδικούς CSB-DA436EmN-2 (CUSAg, Wuhan, Κίνα) και 2706 (Medix Biochemica, Espoo, Φινλανδία) χρησιμοποιήθηκαν για την ανάπτυξη της μεθόδου ELISA και τα πειράματα στον αισθητήρα.

2.4 Κατασκευή μήτρας - Φωτολιθογραφία ξηρής ρητίνης

Η κατασκευή της φωτολιθογραφικής μάσκας έγινε με τη δημιουργία του κατάλληλου σχεδίου στο σχεδιαστικό πρόγραμμα autoCAD το οποίο στη συνέχεια τυπώθηκε από εκτυπωτή υψηλής ανάλυσης σε διαφάνεια. Η ρητίνη είναι αρνητικού τύπου επομένως η μάσκα αποτελείται από σκοτεινές στα σημεία που θέλουμε να απομακρυνθεί η ρητίνη και διαφανείς περιοχές όπου θέλουμε να απομακρυνθεί η ρητίνη και διαφανείς περιοχές όπου θέλουμε να απομακρυνθεί η ρητίνη και διαφανείς περιοχές όπου θέλουμε να παραμείνει και να σκληρυνθεί. Το υπόστρωμα επικαλύπτεται με φωτοευαίσθητη ρητίνη με τη βοήθεια του laminator (Σχ. 36) προσέχοντας να μην δημιουργηθούν πτυχώσεις. Στη συνέχεια, η μάσκα τοποθετείται πάνω στο υπόστρωμα που έχει επικαλυφθεί με την φωτοευαίσθητη ρητίνη και εκτίθεται σε υπεριώδη ακτινοβολία. Μετά την έκθεση η ρητίνη έχει πολυμεριστεί στις περιοχές που έχουν εκτεθεί μέσω της μάσκα, και ακολουθεί το βήμα της εμφάνισης, για την απομάκρυνση της μη εκτεθειμένης ρητίνης και την τελική αποτύπωση του επιθυμητού σχήματος. Η εμφάνιση γίνεται με την βύθιση του δείγματος σε διαλύτη, με τον χρόνο της εμφάνισης και το είδος του διαλύτη να καθορίζονται από τη ρητίνη.

2.5 Μαλακή λιθογραφία PDMS

Η αποτύπωση ενός σχεδίου στην επιφάνεια του PDMS μπορεί εύκολα να γίνει με την μέθοδο της μαλακής λιθογραφίας. Το προπολυμερές του PDMS αναμιγνύεται με τον παράγοντα σκλήρυνσης, αναδεύονται καλά, και αφαιρούνται οι φυσαλίδες σε ξηραντήρα. Ακολουθεί χύτευση του μίγματος στη μήτρα που φέρει ανάγλυφη δομή στην επιφάνειά της και θέρμανση σε υψηλές θερμοκρασίες. Μετά από κατάλληλο χρόνο ψησίματος το PDMS έχει σκληρύνει, και αποκολλάται από τη μήτρα έχοντας σχηματιστεί η επιθυμητή δομή.

2.6 Συγκόλληση

Για την κατασκευή της μικρορευστονικής πλατφόρμας απαιτείται η συγκόλληση δύο τμημάτων από PDMS. Αυτό πραγματοποιείται με τροποποίηση των επιφανειών με πλάσμα οξυγόνου. Η μέθοδος αυτή προκαλεί επιφανειακή οξείδωση του PDMS, δηλαδή δημιουργία ομάδων σιλανόλης (Si–OH) απομακρύνοντας μεθύλια (CH₃) από το PDMS και μετασχηματίζοντας το υπόστρωμα σε μια επιφάνεια με υδρόφιλες ιδιότητες. Ως αποτέλεσμα, η συγκέντρωση των ομάδων υδροξυλίου αυξάνεται, σχηματίζοντας τελικά ισχυρούς διαμοριακούς δεσμούς κατά την επαφή.

Για την συγκόλληση υποστρωμάτων από διαφορετικά υλικά χρησιμοποιήθηκε η έμμεση συγκόλληση με παρεμβολή μεταξύ των δύο επιφανειών μίας λεπτής στρώσης από PDMS. Το ρευστό PDMS χυτεύεται ομοιόμορφα σε μία από τις δύο επιφάνειες δημιουργώντας μία λεπτή στρώση, οι οποίες στη συνέχεια έρχονται σε επαφή και ψήνονται σε υψηλή θερμοκρασία ώστε να σκληρύνει το PDMS και να συνδέσει ισχυρά τις δύο αυτές επιφάνειες.

2.7 Μέθοδος ELISA

Η πιο ευρέως διαδεδομένη ανοσοχημική μέθοδος για τον ποσοτικό προσδιορισμό ενός μορίου σε ένα δείγμα βασίζεται στην ποσοτική ανίχνευση της αντιδράσης αντιγόνουαντισώματος με μέτρηση της απορρόφησης ενός έγχρωμου προϊόντος που λαμβάνεται με τη χρήση ενός υποστρώματος ενζύμου που έχει συζευχθεί είτε με το αντίσωμα είτε με το αντιγόνο. Η μέθοδος πραγματοποιείται σε πλακίδια πολυστυρενίου 96 φρεατίων και είναι γνωστή ως enzyme-linked immunosorbent assay ή ELISA).

Οι ανοσοχημικές μέθοδοι βασίζονται στο γεγονός ότι τα μόρια που επιθυμούμε να ανιχνεύσουμε σε ένα δείγμα όπως πεπτίδια/πρωτεΐνες, ορμόνες, βιταμίνες και φάρμακα, συνδέονται ειδικά με τα αντισώματα που έχουν αναπτυχθεί για αυτά. Έτσι, αυτή η μέθοδος μπορεί να χρησιμοποιηθεί για τη μέτρηση ουσιών σε πολύ χαμηλές συγκεντρώσεις σε πολύπλοκα δείγματα, με σχεδόν κανέναν κίνδυνο παρεμβολής από άλλα συστατικά του δείγματος. Όπως τα αντισώματα, τα ένζυμα είναι πρωτεΐνες που δεσμεύουν συγκεκριμένα μόρια και δρουν ως καταλύτες συγκεκριμένων αντιδράσεων. Το μόριο που δεσμεύεται από το ένζυμο σε μια ενζυμικά καταλυμένη αντίδραση ονομάζεται υπόστρωμα. Για την χρήση τους σε ανοσοχημικούς προσδιορισμούς, τα ένζυμα συνδυάζονται με κατάλληλα υπόστρωματα τα οποία μπορεί να οδηγούν σε έγχρωμα, φθορίζονται ή χημειοφωταυγή προϊόντα τα οποία μπορούν να προσδιοριστούν από κατάλληλο οπτικό ή ηλεκτρονικό εξοπλισμό [131].



Σχήμα 33. Σχηματική αναπαράσταση των τεσσάρων διαφορετικών τύπων ELISA [132].

Η άμεση μέθοδος ELISA είναι κατάλληλη για τον προσδιορισμό της ποσότητας αντιγόνων υψηλού μοριακού βάρους. Η επιφάνεια των πλακιδίων πολυστυρενίου επικαλύπτεται απευθείας με το αντιγόνο και χρησιμοποιείται αντίσωμα σημασμένο με ένα ένζυμο το οποίο δεσμεύεται στο ακινητοποιημένο αντιγόνο. Ακολουθεί εκπλύση η οποία απομακρύνει τα μη δεσμευμένα αντιγόνα ή αντισώματα. Στη συνέχεια, προστίθεται το κατάλληλο ενζυμικό υπόστρωμα για να παραχθεί ένα έγχρωμο προϊόν και μετράται η οπτική απορρόφηση για να προσδιοριστεί η ποσότητα του αντιγόνου.

Στην έμμεση μέθοδος η μέτρηση του αντιγόνου δεν γίνεται από το ειδικό αντίσωμα, αλλά χρησιμοποιείται ένα αντίσωμα που αναγνωρίζει το ειδικό αντίσωμα και το οποίο είναι σημασμένο με το ένζυμο. Στη συνέχεια, προστίθεται το υπόστρωμα του ενζύμου για να παραχθεί το έγχρωμο προϊόν και να προσδιοριστεί η συγκέντρωση που αντιγόνου. Αυτή είναι η μέθοδος που χρησιμοποιείται πιο συχνά στην ενδοκρινολογία για την αναγνώριση αντιγόνων.

Στη μέθοδο τύπου sandwich ή μη ανταγωνιστικού τύπου ανοσοανάλυση, τα πλακίδια πολυστυρενίου επικαλύπτονται με ένα ειδικό κατά του αντιγόνου αντίσωμα (αντίσωμα επικάλυψης) και επωάζεται με αντιγόνο και ένα αντίσωμα ανίχνευσης που είναι συνήθως δεσμευμένο με το ένζυμο. Η μέθοδος αυτή είναι γενικά 2-5 φορές πιο ευαίσθητες από τις άλλες ELISA, αλλά είναι κατάλληλη μόνο για μόρια μεγάλου μοριακού βάρους τα οποία διαθέτουν τουλάχιστον δύο επιτόπους έναντι των οποίων μπορούν να αναπτυχθούν δύο αντισώματα.

Στην ανταγωνιστική ανοσοχημική μέθοδο, η επιφάνεια των πλακιδίων επικαλύπτεται με το αντιγόνο ή κατάλληλο παράγωγο του αντιγόνου. Ακολουθεί επώαση με το δείγμα που περιέχει το αντιγόνο και το ειδικό αντίσωμα προσδεμένο με το κατάλληλο ένζυμο. Το αντιγόνο του δείγματος ανταγωνίζεται με το ακινητοποιημένο αντιγόνο για την δέσμευση από το ειδικό αντίσωμα. Έτσι όταν προστεθεί το υπόστρωμα και παραχθεί το έγχρωμο προϊόν, η τιμή της οπτικής απορρόφησης είναι αντιστρόφως ανάλογη της συγκέντρωσης της ως προς μελέτη ουσίας. Με άλλα λόγια, όταν η ποσότητα του προς μελέτη αντιγόνου είναι χαμηλή, λαμβάνεται υψηλή τιμή απορρόφησης, ενώ οι μεγαλύτερες συγκεντρώσεις οδηγούν σε χαμηλότερες τιμές απορρόφησης.

2.8 Μετρήσεις στο βιοαισθητήρα

Καθώς τα αντισώματα και οι πρωτεΐνες είναι μεγάλα μόρια, προκειμένου να επιτευχθεί η ανίχνευση των ανοσοχημικών αντιδράσεων με τον αισθητήρα ήταν απαραίτητο να επιλεχθούν ρυθμιστικά διαλύματα ανοσοαντίδρασης αρκετά χαμηλής συγκέντρωσης για να αυξηθεί το μήκος Debye (λ_D). Πιο συγκεκριμένα, οι διαστάσεις της IL-6 είναι της τάξης των 1,8 nm, ενώ το ύψος των αντισωμάτων είναι ~10 nm, επομένως θέλουμε μήκος Debye μεγαλύτερο των 10 nm. Γενικά, ένα διάλυμα φωσφορικών έχει λ_D περίπου 21, 6,65 και 2,11 nm για συγκεντρώσεις 0.1, 1 και 10 mM αντίστοιχα [133]. Ως εκ τούτου για την διεξαγωγή των μετρήσεων επιλέχθηκαν φωσφορικά διαλύματα με συγκέντρωση μικρότερη από 1 mM. Άλλη μία παράμετρος που επηρεάζει τις μετρήσεις με τον αισθητήρα είναι τα ισοηλεκτρικά σημεία αντιγόνου και αντισώματος. Για να έχουμε υψηλή ευαισθησία στην ανίχνευση θα πρέπει το pH του διαλύματος κατά την μέτρηση να είναι όσο πιο κοντά γίνεται στο ισοηλεκτρικό σημείο του αντισώματος και μακριά από το αντίστοιχο του αντιγόνου [134].



Σχήμα 34. Μήκος Debye συναρτήσει της συγκέντρωσης διαλύματος φωσφορικών [134].

2.9 Εξοπλισμός για την κατασκευή της μήτρας

Τα όργανα που χρησιμοποιήθηκαν για την κατασκευή της μήτρας με τη μέθοδο της φωτολιθογραφίας αποτελούνται από τον laminator, τον mask aligner (και την μάσκα).

Πρόκειται για μια συσκευή η οποία έχει την δυνατότητα να συγκολλά το φιλμ ξηρής ρητίνης με το υπόστρωμα. Αποτελείται από δύο περιστρεφόμενους κυλίνδρους οι οποίοι με κατάλληλη πίεση και θερμοκρασία συγκολλούν το φιλμ στην επιφάνεια. Οι βασικοί παράμετροι για την επιτυχή εφαρμογή του φιλμ ξηρής ρητίνης είναι η θερμοκρασία της συγκόλλησης και η ταχύτητα με την οποία κινείται τόσο το φιλμ ως προς το υπόστρωμα. Μία σχηματική του αναπαράσταση φαίνεται στο ακόλουθο σχήμα.



Σχήμα 35. Σχηματική αναπαράσταση της μεθόδου εφαρμογής της ξηρής ρητίνης. Η ξηρή ρητίνη είναι σε μορφή φιλμ με μία προστατευτική μεμβράνη σε κάθε πλευρά. Η μία μεμβράνη αφαιρείται ώστε να προσκολληθεί η ρητίνη στο υπόστρωμα, το οποίο τοποθετείται πάνω σε μία οριζόντια βάση. Η βάση με το υπόστρωμα διέρχεται μέσα από τον laminator, δηλαδή από έναν ή δύο θερμαινόμενους κυλίνδρους που εφαρμόζουν ομοιόμορφα τη ρητίνη στο δείγμα [135].

Η συσκευή ελασματοποίησης που χρησιμοποιήθηκε στον καθαρό χώρο του ΕΚΕΦΕ Δημόκριτος «Dry Film Roll Laminator (Model 305, Fortex)» φαίνεται στην ακόλουθη εικόνα.



Σχήμα 36. Dry Film Roll Laminator (Model 305, Fortex) for foils and dry photoresists (equipment borrowed from INRASTES, NCSR "Demokritos").

Για την φωτολιθογραφία χρησιμοποιήθηκε μια συσκευή έκθεσης (mask aligner) της Karl-Suss (Karl-Suss MJB 3 STD). Το υπόστρωμα εισάγεται στην τράπεζα του mask aligner και η μάσκα με το επιθυμητό σχέδιο τοποθετείται πάνω από το υπόστρωμα. Υπεριώδες φως με μήκη κύματος έκθεσης μεταξύ 350–500 nm φωτίζει το υπόστρωμα μέσω της μάσκας για συγκεκριμένο χρόνο. Το φως μεταδίδεται μόνο μέσω των διαφανών περιοχών στο σχέδιο της μάσκας επιτρέποντας στις αντίστοιχες περιοχές της ρητίνης να σκληρυνθούν ή να μαλακώσουν ανάλογα το είδος της. Ο MJB 3 STD Mask Aligner είναι εξοπλισμένος με λυχνία υδραργύρου βραχέος τόξου 200W που συνοδεύεται από σύστημα οπτικής επαφής που υπό τις βέλτιστες συνθήκες, μπορεί να επιτύχει ανάλυση διαστήματος/γραμμής 1.5μm και ακρίβεια ευθυγράμμισης 0.2μm.



Σχήμα 37. Karl-Suss MJB 3 STD Mask Aligner.

Η μάσκα κατασκευάστηκε με την χρήση του προγράμματος AutoCAD και τυπώθηκε με εκτυπωτή υψηλής ανάλυσης πάνω σε διαφάνεια. Στόχος μας είναι η κατασκευή μίας προεξοχής στο υπόστρωμα στο μέγεθος του μικροκαναλιού. Λαμβάνοντας υπ' όψιν ότι η ρητίνη είναι αρνητικού τόνου η μάσκα αποτελείται από μαύρη επιφάνεια με διαφανείς τις περιοχές που ορίζουν δύο κανάλια ίδιου μεγέθους με το μικροκανάλι (1 mm x 10 mm) και με στρογγυλεμένες άκρες για την αποφυγή ατελειών που παρατηρούνται κατά τη φωτολιθογραφία στις γωνίες.



Σχήμα 38. Μεγέθυνση 300% της μάσκας που χρησιμοποιήθηκε. Αποτελείται από δύο κανάλια για την ταυτόχρονη λιθογραφία δύο διατάξεων.

2.10 Εξοπλισμός μαλακής λιθογραφίας

Τα όργανα που χρησιμοποιήθηκαν για την κατασκευή της ψηφίδας μέσω μαλακής λιθογραφίας είναι ο ξηραντήρας κενού για απομάκρυνση φυσαλίδων από το ρευστό PDMS, ο φούρνος για την σκλήρυνση του PDMS και το σύστημα πλάσματος για συγκόλληση των τριών τμημάτων. Για την απομάκρυνση των φυσαλίδων από το PDMS χρησιμοποιήθηκε ο γυάλινος ξηραντήρας κενού του εργαστηρίου BioMEMS ΕΚΕΦΕ Δημόκριτος.



Σχήμα 39. Γυάλινος ξηραντήρας κενού, εργαστηρίου BioMEMS ΕΚΕΦΕ Δημόκριτος.

Για την θέρμανση της μήτρας με το PDMS χρησιμοποιήθηκε ο φούρνος του εργαστηρίου BioMEMS της εταιρίας Nabertherm Muffle Furnaces.



Σχήμα 40. Nabertherm Muffle Furnaces, εργαστήριο BioMEMS ΕΚΕΦΕ Δημόκριτος.

2.11 Εξοπλισμός συγκόλλησης

Για την συγκόλληση τμημάτων PDMS εφαρμόζεται τροποποίηση με πλάσμα, ενώ για την συγκόλληση των τμημάτων PDMS στο PCB χρησιμοποιείται η έμμεση συγκόλληση με ενδιάμεση λεπτή στρώση από PDMS. Η λεπτή στρώση PDMS δημιουργείται ομοιόμορφα την

επιφάνεια με τη χρήση περιστροφικού επιστρωτή, ενώ παράλληλα απομακρύνεται από τα μικροκανάλια.

Ο περιστρωφικός επιστρωτής WS-400/500B LITE SERIES SPIN PROCESSOR της εταιρίας Laurell που χρησιμοποιήθηκε φαίνεται στην ακόλουθη εικόνα:



Σχήμα 41. WS-400/500B LITE SERIES SPIN PROCESSOR της εταιρίας Laurell, εργαστηρίου BioMEMS ΕΚΕΦΕ Δημόκριτος [136].

Για την συγκόλληση των δύο τμημάτων από PDMS χρησιμοποιήθηκε covance multipurpose plasma system (Femto Science Inc., Korea), ισχύος 100 W, αρχική πίεση 5×10^{-2} Torr (πίεση 8.27×10^{-1} Torr μετά την εισαγωγή του αερίου), ροή αέρα 50 sccm και χρόνος 1 min.



Σχήμα 42. Covance multi-purpose plasma system, εργαστηρίου BioMEMS ΕΚΕΦΕ Δημόκριτος (Femto Science Inc., Korea).

2.12 Εξοπλισμός δομικού χαρακτηρισμού της διάταξης

Για την αξιολόγηση των διατάξεων που κατασκευάστηκαν χρησιμοποιήθηκε οπτικό μικροσκόπιο Olympus MX51 Microscope με ενσωματωμένη ψηφιακή κάμερα (Olympus DP71 3.3 RTV, Qimaging). Το λογισμικό που χρησιμοποιήθηκε για την λήψη της εικόνας είναι το ImagePro Express (Media Cybernetics, Inc., USA).



Σχήμα 43. Olympus MX51 Microscope, στον καθαρό χώρο του ΕΚΕΦΕ Δημόκριτος [137].

Για τον υπολογισμό του ύψους των δομών πάνω στο υπόστρωμα χρησιμοποιήθηκε το προφιλόμετρο του καθαρού χώρου του ΕΚΕΦΕ «Δημόκριτος», όπως και το 3D προφιλόμετρο που για την λήψη τρισδιάστατης εικόνας του βάθους του καναλιού.



Σχήμα 44. Profilm3D[®] της εταιρίας Filmetrics[®] [138].

Για τον έλεγχο αντοχής του μικροκαναλιού χρησιμοποιήθηκε η αντλία LabSmith που απεικονίζεται στο Σχήμα 45:



Σχήμα 45. Αντλία LabSmith SPS01 programmable syringe pump.

2.13 Εξοπλισμός ανίχνευσης ΙL-6

Η ανίχνευση της IL-6 έγινε με δύο μεθόδους: α) με ενζυμική ανοσοχημική μέθοδο ELISA στην οποία οι μετρήσεις απορρόφησης έγιναν με κατάλληλο φασματοφωτόμετρο και β) με τη χρήση βιοαισθητήρα και το σύστημα μέτρησης της αντίστασης που παρουσιάζεται παρακάτω.

Η μέτρηση της απορρόφησης στα πλακίδια ELISA πραγματοποιήθηκε με φασματοφωτόμετρο Labsystems Multiskan RC Spectrophotometer Model 351 μέσω του προγράμματος genesis.



Σχήμα 46. Labsystems Multiskan RC Spectrophotometer.

Για την διακίνηση των διαλυμάτων εντός του μικροκαναλιού του βιοαισθητήρα χρησιμοποιείται περισταλτική αντλία (INSTECH P.625 / 900,143) η οποία είναι τοποθετημένη στην είσοδο του μικροκαναλιού κα. Μετά τη διέλευση των διαλυμάτων από το μικροκανάλι αυτά αποβάλλονται σε εξωτερική δεξαμενή αποβλήτων. Το σύστημα μέτρησης της μεταβολής της αντίστασης του βιοαισθητήρα αποτελείται από μία πλακέτα που περιέχει κύκλωμα από ηλεκτρονόμους για την ταυτόχρονη μέτρηση οκτώ αισθητήρων και διαθέτει δύο υποδοχές για τη σύνδεση BNC καλωδίων που στη συνέχεια συνδέονται με το όργανο μέτρησης Digital Multimeter HP34401. Τα ηλεκτρόδια της ψηφίδας του αισθητήρα συνδέονται με PCB του οποίου το ένα άκρο τοποθετείται στην υποδοχή της πλακέτας με τους ηλεκτρονόμους και η παρακολούθηση της απόκρισης των αισθητήρων γίνεται μέσω λογισμικού Labview.



Σχήμα 47. Σύστημα μέτρησης αντίστασης αισθητήρα: a) πλακέτα υποδοχής του βιοαισθητήρα και χρήση chip-holder για είσοδο και έξοδο υγρών χωρίς διαρροές, b) αντλία για είσοδο και έξοδο υγρών.

Κεφάλαιο 3- Κατασκευή μικρορευστονικής πλατφόρμας ΟοC και ενσωμάτωση βιοαισθητήρων

3.1 Μέθοδος κατασκευής ψηφίδας

Η κατασκευή της ψηφίδας OoC έγινε με την μέθοδο της μαλακής λιθογραφίας. Η διάταξη αποτελείται από δύο κομμάτια PDMS ένα με το μικροκανάλι για καλλιέργεια κυττάρων και ένα που λειτουργεί ως δεξαμενή τροφοδοσίας θρεπτικού υγρού στα κύτταρα. Για τον λόγο αυτό κατασκευάστηκαν δύο είδη μήτρας, μία που φέρει το προεξέχων μικροκανάλι και κατασκευάστηκε με φωτολιθογραφία και μία με λείο πάτο για τον σχηματισμό συμπαγών δοκιμίων από τα οποία αφαιρέθηκε με κοπίδι το ορθογώνιο τμήμα της δεξαμενής.

3.1.1 Κατασκευή τμήματος με μικροκανάλι καλλιέργειας κυττάρων

Η κατασκευή της μήτρας έγινε με την μέθοδο της φωτολιθογραφίας στον καθαρό χώρο του Ινστιτούτου Νανοεπιστήμης και Νανοτεχνολογίας του ΕΚΕΦΕ Δημόκριτος με στόχο να αποτυπωθεί η μήτρα του μικροκαναλιού στο υπόστρωμα. Ως υποστρώματα χρησιμοποιήθηκαν ορθογώνια κομμάτια PCB μήκους 7 cm, πλάτους 2 cm και πάχους 1,5 mm. Οι διαστάσεις τους επιλέχθηκαν ώστε να αποτυπωθούν δύο μικροκανάλια και να κατασκευάζονται δύο ψηφίδες από κάθε μήτρα. Τα υποστρώματα επικαλύφθηκαν με Ordyl SY 300 πάχους 90μm στον laminator, σε θερμοκρασία 105°C, ταχύτητα 3 και πίεση 3, αφού πρώτα είχε αφαιρεθεί από την ρητίνη η μία προστατευτική μεμβράνη. Στη συνέχεια, τα δοκίμια εκτέθηκαν σε υπεριώδη ακτινοβολία στον mask aligner για 0,8 min αποτυπώνοντας το σχήμα της μάσκας στη ρητίνη. Ύστερα, αφαιρέθηκε και η δεύτερη προστατευτική μεμβράνη και απομακρύνθηκε η μη πολυμερισμένη ρητίνη εμβαπτίζοντας τα δοκίμια στον εμφανιστή για 10 λεπτά. Τέλος, ακολούθησε ψήσιμο για την σταθεροποίησή τους στους 120°C για 35 λεπτά (Σχήμα 48, α). Τα υποστρώματα με το αποτύπωμα των μικροκαναλιών συγκολλήθηκαν (με τη χρήση κολλητικής ταινίας διπλής όψεως) στο εσωτερικό μήτρας αλουμινίου (73 mm μήκος, 22 mm πλάτος και 5 mm ύψους) που κατασκευάστηκε στο μηχανουργείο του ΕΚΕΦΕ Δημόκριτος (Σχήμα 48, b).



Σχήμα 48. a) PCB με το αποτύπωμα δύο μικροκαναλιών από Ordyl, b) το PCB με το αποτύπωμα δύο μικροκαναλιών μετά την τοποθέτησή του στο εσωτερικό μήτρας αλουμινίου.

Το προπολυμερές του PDMS αναμείχθηκε με τον παράγοντα σκλήρυνσης σε αναλογία 10:1 και το μίγμα αναδεύτηκε για αρκετή ώρα ώστε να ομογενοποιηθεί. Ακολούθησε απομάκρυνση των φυσαλίδων σε ξηραντήρα για περίπου μισή ώρα. Στη συνέχεια, το PDMS χυτεύτηκε στην μήτρα και ψήθηκε στους 100°C για τουλάχιστον 60 λεπτά. Μετά το ψήσιμο το PDMS έχει σκληρύνει μέσα στη μήτρα από την οποία απομακρύνεται με τη χρήση κοπιδιού στα πλαϊνά τοιχώματα (Σχήμα 49). Τέλος το PDMS κόβεται στις κατάλληλες διαστάσεις και ανοίγονται οι οπές στις δύο άκρες του μικροκαναλιού για την είσοδο και την έξοδο των υγρών.



Σχήμα 49. Τμήμα PDMS με το μικροκανάλι καλλιέργειας κυττάρων.

3.1.2 Κατασκευή τμήματος PDMS σαν δεξαμενή τροφοδοσίας θρεπτικού υγρού

Για την κατασκευή του τμήματος που φέρει την δεξαμενή χρησιμοποιήθηκε για μήτρα πυρίμαχο δισκίο πάνω στο οποίο κολλήθηκε δισκίδιο πυριτίου ώστε να διασφαλιστεί λεία επιφάνεια στον πάτο του δισκίου (Σχήμα 50). Η συγκόλληση του δισκιδίου του πυριτίου με το πυρίμαχο σκεύος έγινε με τη χρήση PDMS. Πιο συγκεκριμένα, μίγμα PDMS με τον παράγοντα σκλήρυνσης σε αναλογία 10:1 χύθηκε στον πάτο του πυρίμαχου σκεύους και από πάνω τοποθετήθηκε το δισκίδιο πυριτίου ώστε να δισκίδιο πυριτίου με το λισκίδιο πυριτίου με το δισκίδιο πυριτίου με το πυρίμαχο σκεύος.



Σχήμα 50. Πυρίμαχο δισκίο συγκολλημένο με δισκίδιο πυριτίου μέσω λεπτής στρώσης PDMS.

Ακολουθώντας την ίδια διαδικασία, προστίθεται το PDMS στην μήτρα, ψήνεται και προκύπτει ένα μεγάλο τμήμα από λείο PDMS απ' όπου μπορούν να κόβονται τμήματα στο μέγεθος του ψηφίδας. Η δεξαμενή σε αυτά τα κομμάτια κατασκευάζεται εύκολα με την απομάκρυνση ενός ορθογώνιου τμήματος (1,1 mm πλάτος, 1,1 cm μήκος) με κοπίδι.



Σχήμα 51. Τμήμα PDMS που φέρει δεξαμενή θρεπτικού μέσου.

3.1.3 Συγκόλληση διάταξης

Ανάμεσα στα δύο κομμάτια του PDMS τοποθετείται η πορώδης πολυεστερική μεμβράνη και με επεξεργασία πλάσματος συγκολλούνται τα τρία τμήματα μεταξύ τους. Η τελική διάταξη παρουσιάζεται στο Σχήμα 52.



Σχήμα 52. Φωτογραφία ψηφίδας αποτελούμενη από δύο τμήματα PDMS που φέρουν μικροκανάλι και δεξαμενή μεταξύ των οποίων υπάρχει διαφανής πορώδης μεμβράνη κυτταροκαλλιέργειας.

Έγιναν δοκιμές συγκόλλησης των μεμβρανών στο PDMS με επεξεργασία πλάσματος και επιβεβαιώθηκε ότι κανένα από τα δύο είδη μεμβρανών (διαφανής και ημιδιαφανής) δεν συγκολλάται μόνιμα με το PDMS. Επομένως, η μεμβράνη συγκρατείται μεταξύ των δύο κομματιών PDMS λόγω της μεταξύ τους συγκόλλησης και όχι λόγω δικής της συγκόλλησης σε αυτά.

3.2 Δομικός έλεγχος της μήτρας

Όπως αναφέρθηκε και στο κεφάλαιο 3.1.1, η κατασκευή της μήτρας έγινε με τη μέθοδο της φωτολιθογραφίας και η επιτυχία κατασκευής των μικροκαναλιών ελέγχθηκε με παρατήρηση σε οπτικό μικροσκόπιο ώστε να διαπιστωθούν τυχόν ατέλειες που δημιουργούνται κυρίως κατά την διαδικασία ελασματοποίησης.



Σχήμα 53. Εικόνες από οπτικό μικροσκόπιο αποτυπώματος της μήτρας μικροκαναλιού, a) αριστερό άκρο, b) κεντρικό τμήμα c) δεξί άκρο.

Επίσης προσδιορίστηκε το ύψος των δομών με μετρήσεις με προφιλόμετρο και βρέθηκε ότι η μέση τιμή του ύψους των δομών ήταν 78.6 ± 0.6 μm και μία ενδεικτική εικόνα από την μέτρηση φαίνεται στο Σχήμα 54. Είναι αναμενόμενο η τιμή αυτή να διαφέρει από το αρχικό πάχος του Ordyl (90 μm) διότι είναι σύνηθες το πάχος κατά το ψήσιμο να συρρικνώνεται κατά ένα μικρό ποσοστό.



3.3 Έλεγχος συγκόλλησης και επιλογή μεμβράνης

Χρωματισμένο νερό διοχετεύτηκε στο μικροκανάλι των δύο ψηφίδων με διαφορετικό είδος μεμβράνης (διαφανείς και ημιδιαφανείς) ώστε να ελεγχθεί η στεγανότητα της διάταξης. Από τις φωτογραφίες που παρουσιάζονται στο Σχήμα 55, είναι φανερό ότι διαρροές παρατηρήθηκαν μόνο στην ημιδιαφανή μεμβράνη ενώ όχι στην διαφανή. Αυτό πιθανόν να οφείλεται στην υδροφοβικότητα της διαφανούς και την υδροφιλικότητα της ημιδιαφανούς μεμβράνης.



Σχήμα 55. Έλεγχος διαρροών σε ψηφίδες με διοχέτευση χρωματισμένου νερό στο μικροκανάλι, αριστερά ημιδιαφανής υδρόφιλη και δεξιά διαφανής υδρόφοβη μεμβράνη.

3.4 Μέτρηση μέσου βάθους καναλιού

Από τις μετρήσεις με προφιλόμετρο υπολογίστηκε ότι η μέση τιμή βάθους του μικροκαναλιού στο PDMS ήταν 73,21±1,74μm. Το γεγονός ότι το ύψος του καναλιού είναι ελαφρώς μικρότερο από την μέση τιμή του ύψους της μήτρας μπορεί να αποδοθεί στην μικρή συρρίκνωση που υφίσταται το PDMS κατά το ψήσιμο.

3.5 Έλεγχος αντοχής και υπολογισμός πτώσης πίεσης στο μικροκανάλι

Για τον έλεγχο της αντοχής λόγω ροής στο μικροκανάλι χρησιμοποιήθηκε αντλία LabSmith με τη βοήθεια της οποίας δοκιμάστηκαν διάφορες τιμές ταχύτητας παροχής υγρού στο μικροκανάλι. Για τον σκοπό αυτό χρησιμοποιήθηκαν οι ψηφίδες με την διαφανή μεμβράνη και δοκιμάστηκαν τιμές παροχής υγρού από 1 έως 1.400 μL/min. Δεν παρατηρήθηκαν διαρροές για καμία τιμή ταχύτητας παροχής των υγρών. Αυτό είναι ικανοποιητικό, δεδομένου ότι οι συνήθεις ροές σε πλατφόρμες OoC είναι πολύ μικρότερες, της τάξης λίγων δεκάδων μL/min (δηλ. 2 τάξεις μεγέθους μικρότερες της μέγιστης ροής που δοκιμάστηκε). Επιπλέον, για μέγιστη τιμή παροχής, υπολογίστηκε η πτώση της πίεσης όπως περιγράφεται παρακάτω.

Η πτώση πίεσης σε αγωγό δίνεται από τη σχέση:

$$\Delta p = rgh_f$$

Όπου ρ η πυκνότητα του νερού (897.0089 kg/m³), g η επιτάχυνση της βαρύτητας (9.81 m/s²) και h_f το ύψος τριβών. Το ύψος τριβών δίνεται από τη σχέση,

$$h_{f} = f \frac{l}{d_{h}} \frac{v^{2}}{2g}$$

Όπου f είναι ο συντελεστής τριβής, l το μήκος του αγωγού, d_h η υδραυλική του διάμετρος και υ η μέση ταχύτητα του ρευστού. Για αγωγό διατομής 80 x 1000μm² και μήκους 10000 μm η μέση ταχύτητα του νερού για παροχή 1400 μL/min = $1400 \frac{10^{-9}}{60} \frac{m^3}{s}$ είναι,

$$\upsilon = \frac{\dot{V}}{A} = 1400 \, \frac{10^{-9}}{60} \frac{1}{80 \cdot 1000 \cdot 10^{-12}} \frac{m^3}{s} \frac{1}{m^2} = 0.291667 \text{ m/s}$$

Η υδραυλική διάμετρος για αγωγό ορθογωνικής διατομής είναι,

$$d_{\rm h} = \frac{2 {\rm ab}}{{\rm a} + {\rm b}} = \frac{2 \cdot 80 \cdot 1000}{80 + 1000} = 148.15 \ \mu{\rm m}$$

Ο αριθμός Reynolds είναι,

$$R_{e} = \frac{\upsilon d_{h}}{\upsilon} = \frac{0.291667}{10^{-6}} \cdot 148.15 \cdot 10^{-6} = 43.2 < 2000$$

Επιβεβαιώνεται στρωτή ροή στο μικροκανάλι σε αυτές τις ογκομετρικές παροχές. Στη παραπάνω εξίσωση, ν είναι το κινηματικό ιξώδες του νερού. Ο συντελεστής τριβής f υπολογίζεται από τον τύπο:

$$f = \frac{C}{R_e}$$

Επειδή η ροή είναι στρωτή, η σταθερά C υπολογίζεται αναλυτικά και υπάρχει σε πίνακες. Για λόγο a/b=80/1000=0.08, η σταθερά C=84.7. Άρα, f = 1.9602.

Και συνεπώς το ύψος τριβών είναι,

$$h_{f} = f \frac{1}{d_{h}} \frac{v^{2}}{2g} = 1.9602 x \frac{10^{-2}}{148.1481 x 10^{-6}} \frac{0.291667^{2}}{2x9.81} = 0.573692 m$$

Άρα, η πτώση πίεσης υπολογίστηκε,

$$\Delta p = rgh_f = 997.0089 \cdot 9.81 \cdot 0.573692 = 5611 \text{ N}/m^2$$

Στον παραπάνω υπολογισμό της σταθεράς «C» χρησιμοποιήθηκε ο ακόλουθος πίνακας:

Rectangular

| b a | |
|-------|----------------------|
| b/a | $f\mathbf{Re}_{D_h}$ |
| 0.0 | 96.00 |
| 0.05 | 89.91 |
| 0.1 | 84.68 |
| 0.125 | 82.34 |
| 0.167 | 78.81 |
| 0.25 | 72.93 |
| 0.4 | 65.47 |
| 0.5 | 62.19 |
| 0.75 | 57.89 |
| 1.0 | 56.91 |

Πίνακας 1. Πίνακας υπολογισμού της σταθεράς «C», που προκύπτει από τον λόγο του ύψους προς το βάθος του μικροκαναλιού [139].

3.6 Ενσωμάτωση αισθητήρα στο μικρορευστονικό chip τύπου OoC.

Ο τρόπος που προτείνουμε για την ενσωμάτωση του βιοαισθητήρα στην OoC πλατφόρμα είναι η σε σειρά (Σχ. 30) συνδεσμολογία του αισθητήρα, ώστε το θρεπτικό μέσο μαζί με όλες τις ουσίες που εκκρίνονται από τα κύτταρα βγαίνοντας από το OoC να διοχετεύεται στο κανάλι πάνω από τους αισθητήρες, όπου γίνεται η ανίχνευση των εκάστοτε ουσιών. Πρόκειται για την πιο εύκολη και ασφαλή διάταξη καθώς δεν επηρεάζονται τα κύτταρα από τον βιοαισθητήρα (ηλεκτρόδια). Η κατασκευή της μήτρας του μικροκαναλιού έγινε με την μέθοδο της 3D εκτύπωσης. Το μικροκανάλι με διαστάσεις 12mm x 1mm κατασκευάστηκε από PDMS με την μέθοδο της μαλακής λιθογραφίας με όμοιο τρόπο με αυτόν που περιγράφηκε για το μικροκανάλι της μικρορευστονικής πλατφόρμας οργάνου σε ψηφίδα. Συνοπτικά, το προπολυμερές του PDMS αναμείχθηκε με τον παράγοντα σκλήρυνσης σε αναλογία 10:1, ακολούθησε απομάκρυνση των φυσαλίδων σε θάλαμο κενού και χύτευση στη μήτρα και ανοίχθηκαν δύο οπές στις δύο του άκρες για την είσοδο και την έξοδο των υγρών, αντίστοιχα.



Σχήμα 56. a) Μήτρα για την κατασκευή δύο μικροκαναλιών και b) κομμάτι PDMS που φέρει τα δύο μικροκανάλια.

Για την συγκόλληση αισθητήρα και μικροκαναλιού χρησιμοποιήθηκε η έμμεση συγκόλληση που συχνά προτιμάται για τη σύζευξη και τη σύνδεση δύο υποστρωμάτων από διαφορετικά υλικά. Αυτός ο τύπος συγκόλλησης είναι εξαιρετικά αποτελεσματικός στη σφράγιση του καναλιού αποτρέποντας τις διαρροές. Η συγκόλληση επιτυγχάνεται δημιουργώντας μια ομοιόμορφη οριζόντια επιφάνεια γύρω από τους αισθητήρες ή τα ηλεκτρόδια η οποία βοηθά στην καλύτερη σφράγιση της μικρορευστονικής δομής. Διάφορα υλικά έχουν προταθεί ως ενδιάμεσα στρώματα με το PDMS να είναι το πιο διαδεδομένο. Κατά την διαδικασία της συγκόλλησης με PDMS, ένα λεπτό στρώμα επιστρώνεται μεταξύ των δύο επιφανειών, το οποίο μετά τη σκλήρυνση συνδέεται μέσω πρόσφυσης στο εκάστοτε υπόστρωμα. Αυτή η διαδικασία γεμίζει τα κενά και σφραγίζει το σύστημα με έμμεσο τρόπο. Στα αρνητικά της μεθόδου είναι το πρόβλημα της συρρίκνωσης του PDMS, το οποίο αυξάνεται καθώς αυξάνεται η θερμοκρασία σκλήρυνσης.

Η συγκόλληση λοιπόν PCB με PDMS έγινε με τη βοήθεια ενδιάμεσου στρώματος από PDMS. Το ενδιάμεσο αυτό στρώμα επιστρώνεται στην επιφάνεια του κομματιού PDMS που φέρει το μικροκανάλι και μέσω spin-coating θα απομακρυνθεί από αυτό ενώ παράλληλα θα απλωθεί ομοιόμορφα στη γύρω επιφάνεια (Σχ. 57). Για την ενδιάμεση λεπτή στρώση δοκιμάστηκε καθαρό PDMS, PDMS με 60% τολουόλιο και PDMS με 80% τολουόλιο. Η ανάμειξη με τολουόλιο έγινε ώστε να ρευστοποιηθεί καλύτερα το PDMS και να απομακρυνθεί ευκολότερα από το μικροκανάλι. Μετά την επικάλυψη του μικροκαναλιού με το λεπτό στρώμα PDMS, η επιφάνεια τοποθετήθηκε προσεκτικά πάνω από το μικροκανάλι του αισθητήρα και ψήθηκαν στους 60°C για 2 ώρες. Το PDMS απομακρύνθηκε το ίδιο καλά και στις τρεις περιπτώσεις από το μικροκανάλι, επομένως προτιμήθηκε το σκέτο PDMS χωρίς την ανάμειξη με τολουόλιο για απλοποίηση της διαδικασίας.



Σχήμα 57. Ρευστό PDMS πάνω σε μικροκανάλι a) πριν το spin-coating b) μετά το spin-coating.

Για τον έλεγχο απομάκρυνσης του PDMS από το εσωτερικό του μικροκαναλιού στον περιστροφικό επιστρωτή μετρήθηκε το βάθος του καναλιού σε 3D προφιλόμετρο. Συγκεκριμένα μετρήθηκαν δύο είδη μικροκανάλιων, το πρώτο αφορά μικροκανάλια χωρίς επικάλυψη από λεπτό στρώμα PDMS και το δεύτερο μικροκανάλια με επικάλυψη PDMS που έχουν συγκολληθεί και στη συνέχεια αποκολληθεί από τον αισθητήρα. Παράλληλα, μετρήθηκε και το ύψος της ενδιάμεσης λεπτής στρώσης στα αποκολλημένα μικροκανάλια.



Σχήμα 58.3D προφιλομετρία μικροκαναλιού από PDMS πριν την συγκόλλησή του στον αισθητήρα.



Σχήμα 59.3D προφιλομετρία μικροκαναλιού από PDMS μετά την αποκόλλησή του από τον αισθητήρα.



Σχήμα 60. 3D προφιλομετρία λεπτής ενδιάμεσης στρώσης μικροκαναλιού από PDMS μετά την αποκόλλησή του από τον αισθητήρα.

Το ύψος των μικροκαναλιών χωρίς την επικάλυψη υπολογίστηκε στα $88,95 \pm 6,80$ μm, το ύψος του ενδιάμεσου στρώματος από τα μικροκανάλια με επικάλυψη στα $12,86 \pm 0,05$ μm, και τέλος, το ύψος των μικροκαναλιών που έχουν συγκολληθεί και αποκολληθεί από τον αισθητήρα στα $103,8 \pm 2,7$ μm. Από τις μετρήσεις φαίνεται ότι το κανάλι όχι μόνο δεν έχει κλείσει από το PDMS αλλά αντίθετα έχει αυξηθεί. Το γεγονός αυτό αποδίδεται στο ότι το λεπτό στρώμα PDMS έχει επικαλύψει την επιφάνεια γύρω από το κανάλι, συνεπώς βρίσκεται και στα τοιχώματά του καναλιού αυξάνοντας έτσι το συνολικό του βάθος (Σχ. 57). Επομένως,

επιβεβαιώθηκε η υπόθεση ότι με την περιστροφή θα απομακρυνθεί το PDMS από το μικροκανάλι ενώ θα απλωθεί ομοιόμορφα στην γύρω επιφάνεια.

Επειδή σε κάποιες περιπτώσεις παρατηρήθηκαν διαρροές λόγω της παρουσίας των ηλεκτρικών διασυνδέσεων στην επιφάνεια του αισθητήρα (ύψους ~40 μm) που ήταν ψηλότερες από το ενδιάμεσο στρώμα PDMS (~13 μm), διερευνήθηκε αν ήταν δυνατόν να αποφευχθούν με έναν από τους ακόλουθους τρόπους: είτε πιέζοντας το μικροκανάλι πάνω στον αισθητήρα κατά την λήψη μετρήσεων (μέσω chip-holder), είτε με μία ώρα ψήσιμο χωρίς chip-holder (ώστε να μην εισχωρήσει το PDMS στο μικροκανάλι) ακολουθούμενη από μία ώρα ψήσιμο με chip-holder. Εδώ φαίνεται αναγκαία η κατασκευή δύο chip-holder ώστε να μηδενιστούν οι πιθανότητες διαρροών.



Σχήμα 61. Ψηφίδα με τρεις αισθητήρες ενσωματωμένους σε μικροκανάλι a)χωρίς chip-holder κατά το ψήσιμο και b) με chipholder κατά το ψήσιμο.

a)

Το chip-holder για την μέτρηση (όταν δεν έχει προηγηθεί ψήσιμο με πίεση) παρασκευάστηκε από δύο κομμάτια πλεξιγκλάς που κόπηκαν σε διαστάσεις 15 mm x 35 mm, στα οποία ανοίχτηκαν δίοδοι για τέσσερις βίδες και στην πάνω πλευρά άνοιγμα στο σχήμα και το μέγεθος του καναλιού ώστε να περνάνε τα σωληνάκια εισόδου και εξόδου αλλά και να επιτρέπει οπτικό έλεγχο του καναλιού (Σχ. 62, a). Αντίστοιχα, το chip-holder που χρησιμοποιήθηκε κατά το ψήσιμο κατασκευάστηκε από μέταλλο, ώστε να είναι καλός αγωγός της θερμότητας, σε διαστάσεις 15 mm x 35mm χωρίς την διάνοιξη οπής για το μικροκανάλι (Σχ. 62, b).



Σχήμα 62. Ψη φίδα αισθητήρα με μικροκανάλι από PDMS τοποθετη μένο σε: a) σε μεταλλικό chip-holder για το ψήσιμο ή b) σε με διαφανές chip-holder από πλεξιγκλάς για τη μέτρηση.
Κεφάλαιο 4 - Ανίχνευση πρωτεΐνης IL-6 σε αισθητήρες rGO

Η ανίχνευση της IL-6 έγινε αρχικά με την μέθοδο ELISA σε πλακίδια μικροτιτλοδότησης και στη συνέχεια σε επιφάνειες Si/SiO₂/rGO ώστε να γίνει βελτιστοποίηση του πρωτοκόλλου ανίχνευσης και να επιβεβαιωθεί η προσρόφηση του αντισώματος στην επιφάνεια του rGO και συνεπώς η δυνατότητα ανίχνευσής της. Ακολούθησαν πειράματα ανίχνευσης της IL-6 σε βιοαισθητήρες rGO όπου μετρήθηκε η μεταβολή της αντίστασης του rGO υπό ροή διαλυμάτων διαφόρων συγκεντρώσεων IL-6.

4.1 ELISA

Για την ανίχνευση της IL-6 αναπτύχθηκε μέθοδος ELISA τύπου sandwich. Η IL-6 δεσμεύεται μεταξύ του αντισώματος δέσμευσης και του αντισώματος ανίχνευσης. Για να παραχθεί οπτικό σήμα από το αντίσωμα ανίχνευσης έχει τροποποιηθεί ομοιοπολικά με βιοτίνη, δηλαδή έχουν σχηματιστεί ομοιοπολικοί δεσμοί μεταξύ των αμινομάδων (NH₂) του αντισώματος ανίχνευσης με την καρβοξυλομάδα της βιοτίνης. Ως ιχνηθέτης χρησιμοποιείται σημασμένη με υπεροξειδάση της ραπανίδας (horseradish peroxidase, HRP) στρεπταβιδίνη η οποία δεσμεύεται στα μόρια βιοτίνης του αντισώματος ανίχνευσης. Στη συνέχεια, προστίθεται το υπόστρωμα 2,2'-azino-bis(3-ethylbenzthiazoline-6-sulfonic acid) (ABTS) και με τη δράση της υπεροξειδάσης παράγεται έγχρωμο προϊόν, η ποσότητα του οποίου προσδιορίζεται με μέτρηση της οπτικής απορρόφησης στα 405 nm σε φασματοφωτόμετρο μέτρησης απορρόφησης σε φρεάτια πολυστυρενίου.



Σχήμα 63. Σχηματική αναπαράσταση του sandwich ELISA [140].

4.1.1 Βιοτινυλίωση

Για να γίνει πρόσδεση μορίων βιοτίνης στο μόριο του αντισώματος ανίχνευσης πραγματοποιείται αρχικά διαπίδυση ως προς διάλυμα χλωριούχου νατρίου συγκέντρωσης 9 g/L, ώστε να απομακρυνθούν από το διάλυμα του αντισώματος ανίχνευσης μόρια που παρεμβαίνουν στην αντίδραση και να διευκολυνθεί η ρύθμιση του pH στην κατάλληλη για την αντίδραση τιμή. Για παράδειγμα, με την μέθοδο της διαπίδυσης και χρησιμοποιώντας μεμβράνη που επιτρέπει την ανταλλαγή μορίων μικρού μοριακού βάρους (12-14 kDa) απομακρύνονται ιόντα και συστατικά χαμηλού μοριακού βάρους, π.χ., νατραζίδιο, από το διάλυμα του μορίου ανίχνευσης που λειτουργεί ως συντηρητικό, αλλά παρεμποδίζει και την αντίδραση με την βιοτίνη. Αντίθετα, τα μακρομόρια (π.χ., πρωτεΐνες) με διαστάσεις σημαντικά μεγαλύτερες από τη διάμετρο των πόρων της ημιπερατής μεμβράνης εγκλωβίζονται μέσα σε αυτή.

Αφού εφαρμοστεί η μέθοδος της διαπίδυσης, ρυθμίζεται το pH του διαλύματος του αντισώματος στο 9 με προσθήκη διαλύματος ανθρακικών συγκέντρωσης 1 M, pH 9,25. Στη συνέχεια, παρασκευάζεται διάλυμα ενεργού ηλεκτριμιδο εστέρα της βιοτίνης σε DMSO (dimethyl sulfoxide) συγκέντρωσης 100 mg/mL και προστίθεται κατάλληλη ποσότητα στο διάλυμα του αντισώματος ανίχνευσης ώστε η κατά βάρος αναλογία αντισώματος/βιοτίνης να είναι 1:1. Το μίγμα της αντίδρασης επωάζεται για 2 ώρες σε θερμοκρασία δωματίου ώστε να γίνει η αντίδραση και στη συνέχεια πάλι με διαπίδυση απομακρύνονται τα παραπροϊόντα της αντίδρασης και η εναπομείνασα βιοτίνη.



Σχήμα 64. Αντίδραση ενεργού ηλεκτριμιδο εστέρα της βιοτίνης με την αμινομάδα της πρωτεΐνης.

4.1.2 Πρωτόκολλο ανοσοανάλυσης

Το πρωτόκολλο που ακολουθήθηκε σε όλα τα πειράματα είναι το εξής: Τα φρεάτια μικροτιτλοδότησης επικαλύπτονται με 100 μL διαλύματος του αντισώματος δέσμευσης και επωάζονται ολονύχτια σε θερμοκρασία δωματίου. Ακολουθούν δύο εκπλύσεις των φρεατίων με 300 μL ρυθμιστικού διαλύματος έκπλυσης και οι ελεύθερες θέσεις πρόσδεσης πρωτεΐνης της επιφάνειας καλύπτονται μέσω επώασης με 300 μL διαλύματος αποκλεισμού, δηλαδή διαλύματος με υψηλή συγκέντρωση σε αδρανή πρωτεΐνη, για 1 ώρα. Στη συνέγεια μετά από άλλες δύο εκπλύσεις, στα φρεάτια προστίθενται 50 μL διαλύματος βαθμονόμησης με διάφορες συγκεντρώσεων IL-6 και 50 μL διαλύματος βιοτυνιλιωμένου αντισώματος ανίχνευσης και ακολουθεί επώαση υπό ανάδευση. Σε κάποια φρεάτια προστίθεται διάλυμα με μηδενική συγκέντρωση IL-6 ώστε να προσδιοριστεί το σήμα μη ειδικής δέσμευσης και να αφαιρεθεί κατά την επεξεργασία των μετρήσεων από τα σήματα που αντιστοιχούν σε διαλύματα βαθμονόμησης γνωστής συγκέντρωσης σε IL-6. Μετά από το στάδιο αυτό, τα φρεάτια εκπλένονται 4 φορές με 300 μL διαλύματος έκπλυσης (το οποίο περιέχει 0,05% ο/ο του μη ιονικού επιφανειοδραστικού Tween 20 η παρουσία του οποίου ευνοεί την δράση του ενζύμου και μειώνει το σήμα μη ειδικής δέσμευσης) και ακολουθεί προσθήκη 100 μL διαλύματος συζεύγματος στρεπταβιδίνης-HRP και επώαση για 30 min υπό ανάδευση. Ύστερα, πραγματοποιούνται άλλες τέσσερις εκπλύσεις με

300 μL διαλύματος έκπλυσης και προσθέτονται ανά φρεάτιο 100 μL διαλύματος υποστρώματος της υπεροξειδάσης H₂O₂/ABTS. Μετά από επώαση 15 ή 30 λεπτών, μετράται η οπτική απορρόφηση των φρεατίων σε ειδικό φασματοφωτόμετρο σε μήκος κύματος 405 nm.



Σχήμα 65. Ενδεικτικές φωτογραφίες των πλακιδίων μικροτιτλοδότησης μετά την μέτρηση οπτικής απορρόφησης για τον προσδιορισμό της IL-6 με ELISA.

4.1.3 Βέλτιστη συγκέντρωση αντισωμάτων δέσμευσης και ανίχνευσης

Ακολουθώντας το πρωτόκολλο ELISA διεξήχθη πείραμα με διαφορετικές συγκεντρώσεις αντισώματος δέσμευσης και ανίχνευσης και σταθερή συγκέντρωση IL-6 με στόχο τον προσδιορισμό των βέλτιστων συγκεντρώσεων αντισωμάτων.

Τα διαλύματα που χρησιμοποιήθηκαν για τα διάφορα στάδια της ανοσοανάλυσης ήταν τα ακόλουθα:

- Διάλυμα επικάλυψης: διάλυμα ανθρακικών 0,05M με pH 9,2
- Διάλυμα έκπλυσης: Tris-HCl 0,01 M, pH 8,25, με 0,9% NaCl
- Διάλυμα αποκλεισμού: NaHCO₃ 0,1 M, pH 8,5, με 1% BSA
- Διάλυμα ανάλυσης: Tris-HCl 50mM, με 0,9% NaCl, pH 7,8 και 0,5% BSA

Συνοπτικά δοκιμάστηκαν οι ακόλουθες συγκεντρώσεις αντισωμάτων και ο χρόνος επώασης για κάθε στάδιο:

- ✤ Αντίσωμα δέσμευσης σε συγκεντρώσεις 2,5, 5 και 10 μg/ml
- Συγκεντρώσεις IL-6: 0 και 500 pg/ml
- Αντίσωμα ανίχνευσης σε συγκεντρώσεις 2,5, 5 και 10 μg/ml
- Επώαση για 1h

Στο Σχήμα 66 παρουσιάζονται οι τιμές οπτικής απορρόφησης που ελήφθησαν με όλους τους συνδυασμούς συγκεντρώσεων αντισώματος δέσμευσης και ανίχνευσης.



Σχήμα 66. Τιμές οπτικής απορρόφησης στα 405 nm συναρτήσει διαφορετικών συγκεντρώσεων αντισώματος δέσμευσης για συγκεντρώσεις αντισώματος ανίχνευσης 2,5 μg/ml (μαύρη γραμμή), 5 μg/ml (κόκκινη γραμμή), και 10 μg/ml (μπλε γραμμή).

Παρατηρούμε ότι τα υψηλότερα σήματα ελήφθησαν για την μικρότερη συγκέντρωση αντισώματος επικάλυψης και αντισώματος ανίχνευσης που δοκιμάστηκε. Με βάση αυτά τα αποτελέσματα δοκιμάστηκε μικρότερη συγκέντρωση του αντισώματος ανίχνευσης για σταθερή συγκέντρωση του αντισώματος δέσμευσης 2,5 μg/mL.

4.1.4 Βελτιστοποίηση συγκέντρωσης αντισώματος ανίχνευσης

Χρησιμοποιώντας τα ίδια διαλύματα για όλα τα στάδια του ανοσοπροσδιορισμού δηλαδή:

- Διάλυμα επικάλυψης: διάλυμα ανθρακικών 0,05M με pH 9,2
- Διάλυμα έκπλυσης: Tris-HCl 0,01 M, pH 8,25, με 0,9% NaCl
- Διάλυμα αποκλεισμού: NaHCO₃ 0,1 M, pH 8,5, με 1% BSA
- Διάλυμα ανάλυσης: Tris-HCl 50mM, με 0,9% NaCl, pH 7,8 και 0,5% BSA

Ελήφθησαν καμπύλες βαθμονόμησης για συγκέντρωσεις IL-6 από 0 έως 500 ng/mL χρησιμοποιώντας συγκεντρώσεις του αντισώματος ανίχνευσης 1 και 2,5 μg/ml, ώστε να επιλεγεί η βέλτιστη τιμή. Οι χρόνοι επώασης και οι συγκεντρώσεις όλων των αντιδραστηρίων ήταν οι ακόλουθες:

- 2,5 μg/ml αντισώματος δέσμευσης
- Συγκεντρώσεις IL-6: 0, 5, 10, 20, 50, 100, 200 και 500 pg/ml
- 2,5 και 1,0 μg/ml αντισώματος ανίχνευσης
- Επώαση για 1h



Σχήμα 67. Τιμές οπτικής απορρόφησης στα 405 nm συναρτήσει της συγκέντρωσης της IL-6 στα διαλύματα βαθμονόμησης για συγκέντρωση αντισώματος ανίχνευσης 1 μg/ml (μαύρη γραμμή) ή κόκκινη γραμμή 2,5 μg/ml αντίσωμα ανίχνευσης για διάρκεια ανοσοαντίδρασης 1 ώρα.

Παρατηρούμε ότι οι καμπύλες σχεδόν ταυτίζονται για τις δύο συγκεντρώσεις αντισώματος που δοκιμάστηκαν. Παρατηρείται ελάχιστα υψηλότερο σήμα στις μικρότερες συγκεντρώσεις IL-6 για συγκέντρωση αντισώματος ανίχνευσης 1 μg/ml. Επομένως, επιλέχθηκε η μικρότερη δυνατή συγκέντρωση αντισώματος ανίχνευσης για οικονομία αντιδραστηρίων.

4.1.5 Βελτιστοποίηση χρόνου επώασης αντισώματος-αντιγόνου

Στόχος του πειράματος ήταν να προσδιοριστεί ο βέλτιστος χρόνος ανοσοαντίδρασης. Για αυτό ελήφθησαν καμπύλες βαθμονόμησης για χρόνους ανοσοαντίδρασης ίσους με 0,5, 1 και 2 ώρες.

Όπως πριν τα διαλύματα που χρησιμοποιήθηκαν είναι τα ακόλουθα:

- Διάλυμα επικάλυψης: διάλυμα ανθρακικών 0,05M με pH 9,2
- Διάλυμα έκπλυσης: Tris-HCl 0,01 M, pH 8,25, με 0,9% NaCl
- Διάλυμα αποκλεισμού: NaHCO₃ 0,1 M, pH 8,5, με 1% BSA
- Διάλυμα ανάλυσης: Tris-HCl 50mM, με 0,9% NaCl, pH 7,8 και 0,5% BSA

Συνοπτικά οι χρόνοι και οι συγκεντρώσεις αντιδραστηρίων που χρησιμοποιήθηκαν ήταν οι ακόλουθοι:

- 2,5 μg/ml αντισώματος δέσμευσης
- Συγκεντρώσεις IL-6: 0, 20, 50, 100, 200 και 500 pg/ml
- 2,5 μg/ml αντισώματος ανίχνευσης
- Επώαση για 30 min, 1h και 2h



Σχήμα 68. Τιμές οπτικής απορρόφησης στα 405 nm που ελήφθησαν για διαφορετικές συγκεντρώσεις IL-6 και χρόνο επώασης αντιγόνου/βιοτινυλιωμένου αντισώματος (2.5 μg/ml) με το ακινητοποιημένο στα φρεάτια αντίσωμα δέσμευσης 2 h (μαύρη γραμμή), 1 h (κόκκινη γραμμή) και 0,5 h (μπλε γραμμή).

Από τα αποτελέσματα που παρουσιάζονται στο Σχήμα 68 προκύπτει ότι αυξανόμενης της χρονικής διάρκειας την ανοσοαντίδρασης αυξάνεται και το σήμα που λαμβάνεται για όλη την περιοχή συγκεντρώσεων της IL-6 με τις μεγαλύτερες διαφορές να λαμβάνονται όταν ο χρόνος αυξάνει από 0,5 σε 1 ώρα. Έτσι το επαναλήφθηκε πείραμα για τους δύο αυτούς χρόνους για συγκέντρωση αντισώματος ανίχνευσης ίση με 1 μg/mL, και με τις ακόλουθες συνθήκες:

- 2,5 μg/ml συγκέντρωση αντισώματος δέσμευσης
- Συγκεντρώσεις IL-6: 0, 5, 10, 20, 50, 100, 200 και 500 pg/ml
- 1 μg/ml συγκέντρωση αντισώματος ανίχνευσης
- Επώαση για 30min και 1h



Σχήμα 69. Τιμές οπτικής απορρόφησης στα 405 nm που ελήφθησαν για διαφορετικές συγκεντρώσεις IL-6 και χρόνο επώασης αντιγόνου/βιοτινυλιωμένου αντισώματος (1μg/ml) με το ακινητοποιημένο στα φρεάτια αντίσωμα δέσμευσης 0,5h (μαύρη γραμμή) ή 1h (κόκκινη γραμμή).

Από το πείραμα αυτό προκύπτει ότι η μία ώρα επώασης αντιγόνου/βιοτινυλιωμένου αντισώματος με το ακινητοποιημένο στα φρεάτια αντίσωμα δέσμευσης υπερτερεί για όλες τις συγκεντρώσεις ΙL-6 σε σχέση με την μισή.

Λαμβάνοντας υπόψη τα αποτελέσματα αυτά, επιλέχθηκε ως βέλτιστη συγκέντρωση του αντισώματος δέσμευσης τα 2,5 μg/ml και του αντισώματος ανίχνευσης το 1 μg/ml και ως βέλτιστος χρόνος επώασης η μία ώρα, ώστε αφενός να μην αυξηθεί υπερβολικά ο χρόνος της ανάλυσης αλλά να λαμβάνεται επαρκές σήμα για όλη τη περιοχή συγκεντρώσεων του αντιγόνου.

4.1.6 Βελτιστοποίηση σύστασης διαλυμάτων

Μια σημαντική παράμετρος είναι να επιλεχθούν τα διαλύματα για κάθε στάδιο καθώς και ο συνδυασμός αυτών ώστε να λαμβάνεται το υψηλότερο δυνατό σήμα. Για τον σκοπό αυτό δοκιμάστη καν διαφορετικοί συνδυασμοί ρυθμιστικών διαλυμάτων για τα διάφορα στάδια του ανοσοπροσδιορισμού.

Συγκεκριμένα δοκιμάστηκαν συνδυασμοί των ακόλουθων διαλυμάτων:

- Διάλυμα επικάλυψης ανθρακικών: 0,05M με pH 9,2
- Διάλυμα επικάλυψης φωσφορικών: 0,05M με pH 7,4
- Διάλυμα έκπλυσης: Tris-HCl 0,01 M, pH 8,25, με 0,9% NaCl
- Διάλυμα αποκλεισμού ανθρακικών: NaHCO₃ 0,1 M, pH 8,5, με 1% BSA
- Διάλυμα αποκλεισμού φωσφορικών: 0,05M με pH 7,4 και 1% BSA
- Διάλυμα ανοσοαντίδρασης Tris-HCl: 50mM, με 0,9% NaCl, pH 7,8 και 0,5% BSA
- Διάλυμα ανοσοαντίδρασης φωσφορικών: 0,05M με pH 7,4 και 1% BSA

Συνοπτικά οι χρόνοι και οι συγκεντρώσεις των αντισωμάτων που χρησιμοποιήθηκαν στα πειράματα ήταν οι ακόλουθοι:

- 2,5 μg/ml αντισώματος δέσμευσης
- ✤ 0 кал 50 µg/ml IL-6
- 1 μg/ml αντισώματος ανίχνευσης
- Επώαση για 1h



Σχήμα 70. Τιμές οπτικής απορρόφησης στα 405 nm που ελήφθησαν για σταθερή συγκέντρωση IL-6 για διαφορετικούς συνδυασμούς του διαλύματος επικάλυψης των φρεατίων, αποκλεισμού των ελεύθερων θέσεων δέσμευσης των φρεατίων και ανοσοαντίδρασης.

Με βάση τα αποτελέσματα που παρουσιάζονται στο Σχήμα 70, επιλέχθηκαν τέσσερις συνδυασμοί ρυθμιστικών διαλυμάτων και συγκρίθηκαν οι τιμές που λαμβάνονται για διαφορετικές συγκεντρώσεις ΙL-6. Οι συγκεντρώσεις αντισωμάτων και αντιγόνου ήταν οι ακόλουθες:

- 2,5 μg/ml αντισώματος δέσμευσης
- ✤ 0, 5, 20, 100 кал 500 µg/ml IL-6
- 1 μg/ml αντισώματος ανίχνευσης
- Επώαση για 1h



Σχήμα 71. Τιμές οπτικής απορρόφησης στα 405 nm που ελήφθησαν για διαφορετικούς συνδυασμούς ρυθμιστικών διαλυμάτων συναρτήσει της συγκέντρωσης της ΙL-6.

Παρατηρούμε ότι τα βέλτιστα αποτελέσματα ελήφθησαν χρησιμοποιώντας ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών ως διάλυμα επικάλυψης, αποκλεισμού και ανοσοαντίδρασης. Επομένως, για την συνέχεια των πειραμάτων επιλέχθηκαν τα ρυθμιστικά διαλύματα φωσφορικών.

4.1.7 Έκλπυση με διάλυμα υδροχλωρίου (HCl) για επαναχρησιμοποίηση της επιφάνειας

Διερευνήθηκε κατά πόσο είναι δυνατόν μετά το πέρας της ανοσοαντίδρασης να απομακρυνθούν από την επιφάνεια των φρεατίων τα συνδεδεμένα στο αντίσωμα δέσμευσης αντιγόνα και να επαναχρησιμοποιηθούν τα φρεάτια. Για το σκοπό αυτό συγκρίθηκε το σήμα που λαμβάνεται από πλακίδιο πολυστυρενίου ακολουθώντας το πρωτόκολλο της ανοσοανάλυσης με αυτό που λαμβάνεται μετά την επώαση των φρεατίων με διάλυμα υδροχλώριου (HCl). Στην περίπτωση αυτή οι αναμενόμενες τιμές απορρόφησης είναι κοντά μηδέν καθώς θα πρέπει να έχει απομακρυνθεί η IL-6. Επιπλέον συγκρίθηκε το σήμα που ελήφθει από φρεάτια στα οποία μετά την επώαση με το αντιγόνο και το βιοτινυλιωμένο αντίσωμα έγινε κατεργασία με HCl και επαναλήφθηκε η επώαση με το αντιγόνο και το βιοτινυλιωμένο αντίσωμα. Στην περίπτωση αυτή οι αναμενόμενες τιμές θα πρέπει να είναι παρόμοιες με ίσες με αυτές του πρώτου πλακιδίου, ισχύει η υπόθεση ότι το HCl απομακρύνει το αντιγόνο από το αντίσωμα δέσμευσης και επιτρέπει την επαναχρησιμοποίηση της επιφάνειας.

Τα διαλύματα που χρησιμοποιήθηκαν είναι τα ακόλουθα:

- Διάλυμα επικάλυψης φωσφορικών: 0,05M με pH 7,4
- Διάλυμα έκπλυσης: 0,05M με pH 7,4, με 0,9% NaCl
- Διάλυμα αποκλεισμού φωσφορικών: 0,05M με pH 7,4 και 1% BSA
- Διάλυμα ανάλυσης φωσφορικών: 0,05M με pH 7,4 και 1% BSA

Οι συγκεντρώσεις των αντιδραστηρίων και οι χρόνοι που χρησιμοποιήθηκαν και στα τρία πλακίδια αναγράφονται παρακάτω:

- 2,5 μg/ml αντίσωμα δέσμευσης
- IL-6 συγκεντρώσεων: 0,20,100,500 pg/ml
- 1 μg/ml αντίσωμα ανίχνευσης
- Επώαση για 1h

Όπως αναφέρθηκε παραπάνω ελήφθησαν καμπύλες IL-6 από τρία πλακίδια μικροτιτλοδότησης. Στο πρώτο πλακίδιο δεν έγινε επώαση με HCl, ακολουθήθηκε δηλαδή το πρωτόκολλο των προηγούμενων πειραμάτων ώστε να μπορούμε να αποφανθούμε για την επίδραση του HCl στα υπόλοιπα πλακίδια. Στο δεύτερο πλακίδιο η επώαση των φρεατίων με τα διαλύματα της IL-6 και το βιοτινυλιωμένο αντίσωμα ακολουθήθηκε από έκπλυση και 5 min επώαση σε 100 μl διάλυματος HCl 0.1N. Στη συνέχεια μετά από έκπλυση ακολουθήθηκε το πρωτόκολλο του ανοσοπροσδιορισμού ως συνήθως. Στο τρίτο πλακίδιο μετά την επώαση 5 λεπτών το διάλυμα HCl και την έκπλυση, ακολούθησε δεύτερη επώαση με διαλύματα IL-6 και αντίσωμα ανίχνευσης ώστε να διαπιστωθεί αν το ακινητοποιημένο αντίσωμα δέσμευσης παραμένει λειτουργικό μετά την κατεργασία με διάλυμα HCl. Στο Σχήμα 72, παρουσιάζονται τα σήματα που ελήφθησαν από τα τρία πλακίδια.



Σχήμα 72. Τιμές οπτικής απορρόφησης συναρτήσει της συγκέντρωσης IL-6 χωρίς επώαση με διάλυμα HCI (μαύρη γραμμή), με επώαση με διάλυμα HCI μετά την ανοσοαντίδραση (κόκκινη γραμμή), επώαση με HCI και δεύτερη επώαση με αντιγόνο και αντίσωμα ανίχνευσης (μπλε γραμμή).

Παρατηρούμε ότι όντως μετά την κατεργασία με διάλυμα HCl έχουμε αισθητή μείωση του σήματος (40-65%), και επομένως όντως υπάρχει μερική απομάκρυνση του αντιγόνου από το ακινητοποιημένο στα φρεάτια αντίσωμα δέσμευσης. Βέβαια, ιδανικά, το σήμα από τα φρεάτια που έχουν επωαστεί με διάλυμα HCl θα έπρεπε να είναι μηδενικό για να θεωρήσουμε ότι έχουμε πλήρη απομάκρυνση των ανοσοσυμπλεγμάτων. Το σήμα των φρεατίων μετά την κατεργασία με το διάλυμα HCl και την δεύτερη επώαση με τα διαλύματα της IL-6 και το βιοτινυλιωμένο αντίσωμα είναι μεγαλύτερο του σήματος από τα φρεάτια χωρίς κατεργασία με HCl, αποτέλεσμα αναμενόμενο αφού δεν επιτεύχθηκε πλήρης απομάκρυνση των ανοσοσυμπλεγμάτων από τη επιφάνεια κατά την κατεργασία με το διάλυμα HCl. Για να βελτιστοποιηθεί η απομάκρυνση των δεσμευμένων ανοσοσυμπλεγμάτων θα πρέπει να αφεθεί να αυξηθεί είτε ο χρόνος επώασης με HCl είτε η συγκέντρωσή του, γεγονός που σε επίπεδο αισθητήρα εγκυμονεί κινδύνους καθώς το HCl μπορεί να αλλοιώσει τις μεταλλικές ηλεκτρικές διασυνδέσεις.

4.1.8 Σταθερότητα ανοσοχημικού προσδιορισμού στο χρόνο

Για να εκτιμηθεί η σταθερότητα των αντιδραστηρίων, συγκρίθηκαν οι καμπύλες βαθμονόμησης που ελήφθησαν με χρονική απόσταση 3,5 μηνών.

Τα διαλύματα που χρησιμοποιήθηκαν ήταν τα ακόλουθα:

- Διάλυμα επικάλυψης φωσφορικών: 0,05M με pH 7,4
- Διάλυμα έκπλυσης: 0,05M με pH 7,4, με 0,9% NaCl
- Διάλυμα αποκλεισμού φωσφορικών: 0,05M με pH 7,4 και 1% BSA
- Διάλυμα ανάλυσης φωσφορικών: 0,05M με pH 7,4 και 1% BSA

Οι συγκεντρώσεις αντιδραστηρίων που χρησιμοποιήθηκαν ήταν οι ακόλουθες:

- 2,5 μg/ml αντίσωμα δέσμευσης
- ✤ IL-6 συγκεντρώσεων: 0,20,100,500 pg/ml
- 1 μg/ml αντίσωμα ανίχνευσης
- Επώαση για 1h



Σχήμα 73. Τιμές οπτικής απορρόφησης συναρτήσει της συγκέντρωσης της IL-6 που ελήφθησαν στις 3/8/22 (μαύρη γραμμή) και στις 24/11/22 (κόκκινη γραμμή).

Από τα αποτελέσματα προκύπτει ότι οι δύο καμπύλες είναι πανομοιότυπες και επομένως τα ανοσοαντιδραστήρια είναι σταθερά στον χρόνο.

4.1.9 Πείραμα σε επιφάνειες Si/SiO₂/rGO για επιβεβαίωση της ακινητοποίησης αντισώματος

Επόμενο βήμα μετά την βελτιστοποίηση του πρωτοκόλλου ELISA ήταν η δοκιμή του σε επιφάνειες πυριτίου αντί για πλακίδια μικροτιτλοδότησης. Στόχος αυτού πειράματος ήταν ο έλεγχος ακινητοποίησης των αντισωμάτων πάνω στην επιφάνεια του rGO με προσρόφηση.

Χρησιμοποιήθηκαν τρεις επιφάνειες Si/SiO₂ οι οποίες ενεργοποιήθηκαν με πλάσμα οξυγόνου και στη συνέχεια επωάστηκαν σε διάλυμα 2% (o/o) 3-aminopropyl triethoxysilane (APTES, Sigma-Aldrich Co) για 20 min και ύστερα ψήσιμο στους 120 °C για 20 min. Στη συνέχεια, εναποτέθηκε στις επιφάνειες GO με τη μορφή σταγόνων ("Single Layer Graphene Oxide Ethanol Dispersion", παρασκευασμένο με την μέθοδο του Hummer, της εταιρίας ACS Material[®]) και οι επιφάνειες θερμάνθηκαν στους 180°C για 1h ώστε με την θερμική επεξεργασία να αναχθεί το GO σε rGO.

Τα διαλύματα που χρησιμοποιήθηκαν ήταν τα ακόλουθα:

- Διάλυμα επικάλυψης φωσφορικών: 0,05M με pH 7,4
- Διάλυμα έκπλυσης: 0,05M με pH 7,4, με 0,9% NaCl
- Διάλυμα αποκλεισμού φωσφορικών: 0,05M με pH 7,4 και 1% BSA
- Διάλυμα ανάλυσης φωσφορικών: 0,05M με pH 7,4 και 1% BSA

Η πειραματική διαδικασία που ακολουθήθηκε ήταν αντίστοιχη με της ELISA. Συγκεκριμένα, προστέθηκε στο rGO διάλυμα όγκου 50 mL του αντισώματος δέσμευσης συγκέντρωσης 100 μg/ml και οι επιφάνειες επωάστηκαν ολονύχτια στο ψυγείο σε σφραγισμένο τρυβλίο με υγρασία ώστε να μην εξατμιστεί το διάλυμα του αντισώματος. Στη συνέχεια, μετά από έκπλυση, οι επιφάνειες καλύπτονται με διάλυμα αποκλεισμού αφήνεται για μία ώρα ώστε να καλυφθούν οι ελεύθερες θέσεις δέσμευσης της επιφάνειας. Ακολουθεί έκπλυση και προσθήκη 100 μL διαλύματος συγκέντρωσης 0, 20 και 100 pg/ml σε IL-6 για μισή ώρα και ύστερα έκπλυση και προσθήκη 100 μL διαλύματος 10 μg/ml του αντισώματος ανίχνευσης και ακολουθεί επώαση για μια ώρα. Μετά από έκπλυση και επώαση για μισή ώρα με διάλυμα στρεπταβιδίνης, ακολουθεί προσθήκη 100 μl ABTS και επώαση για μισή ώρα. Για να μετρηθεί η απορρόφηση συλλέχθηκαν 90 μl ABTS από την κάθε επιφάνεια και τοποθετήθηκαν σε πλακίδιο μικροτιτλοδότισης ώστε να μετρηθούν.



Σχήμα 74. a) Φωτογραφία των επιφανειών Si/SiO₂/rGO με σταγόνα διαλύματος αντισώματος δέσμευσης και b) μετρήσεις οπτικής απορρόφησης στα 405 nm συναρτήσει της συγκέντρωσης IL-6 που ελήφθησαν κατά την εκτέλεση του ανοσοπροσδιορισμού σε δισκία πυριτίου που είχε εναποτεθεί rGO.

Είναι φανερό ότι η συγκέντρωση των 20 pg/ml δεν μπορεί να ανιχνευτεί με αυτόν τον τρόπο καθώς η τιμή συμπίπτει με αυτή του διαλύματος μηδενικής συγκέντρωσης. Αντίθετα για το διάλυμα 100 pg/ml φαίνεται να μπορεί να ανιχνευτεί αλλά το σήμα που λαμβάνεται είναι πολύ χαμηλό σε σχέση με αυτό που λαμβάνεται από το ELISA, λόγω φυσικών περιορισμών της μεθόδου, όπως η έλλειψη ανάδευσης, το γεγονός ότι η σταγόνα δεν είναι περιορισμένη σε φρεάτιο καθώς και το ότι ενώ δεν ήταν δυνατό να συλλεχθούν και τα 100 μl ABTS. Παρόλα αυτά επιβεβαιώθηκε πειραματικά η ακινητοποίηση του αντισώματος δέσμευσης έναντι της IL-6.

4.2 Πειράματα ανίχνευσης IL-6 στον αισθητήρα

Η ψηφίδα του αισθητήρα (Σχήμα 75), η οποία σχεδιάστηκε στο INN και κατασκευάστηκε στη βιομηχανία, διαθέτει 3 θέσης ανίχνευσης σε απόσταση 3mm μεταξύ τους εντός ενός μικροκαναλιού (1,2cm μήκος και 1mm πλάτος). Τα ηλεκτρόδια έχουν διαστάσεις 0.25 x 0.22mm και ύψος 40μm, η απόσταση των ηλεκτροδίων σε κάθε ζεύγος είναι 0.2mm.



Σχήμα 75. Ψηφίδα με τρεις αισθητήρες ενσωματωμένους σε μικροκανάλι.

Για απλοποίηση της διαδικασίας μετρήσεων προτιμήθηκε η σφράγιση του καναλιού του αισθητήρα με πολυολεφίνη, η οποία έχει δοκιμαστεί στο παρελθόν για μετρήσεις στον αισθητήρα. Δοκιμάστηκαν δύο μέθοδοι για ακινητοποίηση των αντισωμάτων στο rGO, η πρώτη είναι με απευθείας προσρόφηση των αντισωμάτων στο rGO (Σχ. 76, a), ενώ στη δεύτερη έχουμε προσρόφηση της στρεπταβιδίνης στο rGO στην οποία προσδένεται η βιοτίνη με την οποία είναι επισημασμένο το αντίσωμα, με τον τρόπο αυτό έχουμε καλύτερη διάταξη των αντισωμάτων και ευνοείται η πρόσδεση της IL-6 (Σχ. 76, b). Και οι δύο μέθοδοι έχουν μοναδικό μειονέκτημα τον τυχαίο προσανατολισμό των αντισωμάτων στην επιφάνεια.

Για την προετοιμασία των αισθητήρων, αποτίθενται σταγόνες διαλύματος GO ("Single Layer Graphene Oxide Ethanol Dispersion", παρασκευασμένο με την μέθοδο του Hummer, της εταιρίας ACS Material[®]) μεταξύ των ηλεκτροδίων κάθε αισθητήρα, στη συνέχεια οι ψηφίδες ψήνονται για μία ώρα στους 180 °C ώστε αν αναχθεί το GO. Το αντίσωμα έναντι της IL-6 (ή η στρεπταβιδίνη) σε συγκέντρωση 100 μg/ml σε ρυθμιστικό διάλυμα επικάλυψης τοποθετείται με πιπέτα πάνω στο rGO, επωάζεται ολονύχτια στο ψυγείο σε σφραγισμένο τρυβλίο παρουσία υγρασίας. Ακολούθως, οι ψηφίδες εκπλένονται με διάλυμα φωσφορικών 0,05M, pH 7,4, και H₂O και ακολουθεί μία ώρα επώαση σε διάλυμα αποκλεισμού φωσφορικών 0,05M, pH 7,4, 1% β/ο BSA. Στη συνέχεια, οι ψηφίδες εκπλένονται με H₂O και ακολουθεί ηλεκτρική μέτρηση με ψηφιακό πολύμετρο HP34401, το οποίο ελέγχεται μέσω υπολογιστή με τη χρήση του προγράμματος Labview. Η διακίνηση των διαλυμάτων πραγματοποιείται με την βοήθεια αντλίας με ταχύτητα περίπου 30μl/min.



b)

Σχήμα 76. Σχηματική αναπαράσταση της ανίχνευσης της IL-6 σε ένα ζεύγος ηλεκτροδίων του αισθητήρα a) με απευθείας πρόσδεση των αντισωμάτων και b) με χρήση του συμπλόκου στρεπταβιδίνης-βιοτίνης.

4.2.1 Μέτρηση υπό στατικές συνθήκες και ανοιχτό κανάλι

Δοκιμάστηκε αρχικά μέτρηση της απόκρισης του αισθητήρα υπό στατικές συνθήκες, τοποθετώντας δηλαδή στο ανοιχτό κανάλι πάνω από τους αισθητήρες σταγόνες διαλυμάτων του αντιγόνου. Για τον σκοπό αυτό, προετοιμάζεται ο αισθητήρας προετοιμάζεται όπως προαναφέρθηκε και πραγματοποιείται μέτρηση για διαφορετικές συγκεντρώσεις ΙL-6. Το διάλυμα στο οποίο παρασκευάστηκαν τα διαλύματα της IL-6 ήταν πολύ χαμηλής συγκέντρωσης (διάλυμα φωσφορικών 5 μM, pH 5,5) ώστε το μήκος Debye να καλύπτει τόσο τα μόρια του αντισώματος όσο και του αντιγόνου που δεσμεύεται σε αυτό. Η εναπόθεση των διαλυμάτων διαφορετικών συγκεντρώσεων IL-6 πραγματοποιήθηκε με τη χρήση πιπέτας. Οι συγκεντρώσεις επιλέχθηκαν ώστε να είναι κοντά στις φυσιολογικές τιμές της IL-6 που παρατηρούνται σε έναν υγιή ανθρώπινο οργανισμό (περίπου 10 pg/ml) αλλά και μία τάξη μεγέθους μεγαλύτερες για να διευκολυνθεί η ανίχνευση.



Σχήμα 77. Μετρήσεις από δύο αισθητήρες, S1 και S2, υπό στατικές συνθήκες κατά την εναπόθεση διαλυμάτων IL-6 διαφορετικής συγκέντρωσης. Το μπλε παραλληλόγραμμο αντιστοιχεί σε ξήρανση του αισθητήρα λόγω εξάτμισης του διαλύματος.

Παρατηρούμε ότι οι συμπεριφορές των δύο αισθητήρων είναι εντελώς διαφορετικές, ίσως λόγω διαφορετικής ευαισθησίας. Ο S1 φαίνεται να έχει αρκετά μεγάλη ευαισθησία, χωρίς όμως να μπορούμε να εξάγουμε με βεβαιότητα συμπεράσματα (τα σημεία στο μπλε παραλληλόγραμμο αντιστοιχούν σε ξήρανση του αισθητήρα λόγω εξάτμισης του διαλύματος). Αντίθετα, ο S2 φαίνεται σταθερός και αναίσθητος στην IL-6. Προχωρήσαμε σε ανίχνευση υπό ροή, όπως θα γίνεται και στην OoC διάταξη.

4.2.2 Μέτρηση υπό ροή σε διάλυμα φωσφορικών 5μM pH 5,5

Δοκιμάζουμε τον αισθητήρα σε συνθήκες ροής. Ο αισθητήρας προετοιμάζεται όπως περιγράφεται στην παράγραφο 4.2 και στη συνέχεια για απλοποίηση της διαδικασίας σφραγίζεται με πολυολεφίνη. Συνδέουμε τον αισθητήρα στην αντλία και περνάμε μία συγκέντρωση IL-6 (500pg/ml) σε διάλυμα φωσφορικών 5μM pH 5,5. Η επιλογή της χαμηλής συγκέντρωσης του διαλύματος έγινε για να αυξηθεί το μήκος Debye και να ευνοηθεί η ανίχνευση.



Σχήμα 78. Μετρήσεις αντίστασης των τριών αισθητήρων μιας ψηφίδας συνάρτηση του χρόνου κατά την διαβίβαση υπό ροή διαλύματος 500 pg/ml IL-6. Τα πράσινα παραλληλόγραμμα σηματοδοτούν το χρόνο μεταξύ του κλεισίματος και ανοίγματος της αντλίας.

Οι δύο αισθητήρες S1 και S2 φαίνεται να συμβαδίζουν και πιθανόν να παρουσιάζουν πιο έντονες μεταβολές λόγω υψηλότερης ευαισθησίας. Το κοινό και των τριών αισθητήρων που μπορούμε να παρατηρήσουμε είναι η απότομη πτώση τους περίπου στα 25 min χωρίς όμως να μπορούμε να την αποδώσουμε με βεβαιότητα στην IL-6, ενώ η αντλία φαίνεται να επηρεάζει σημαντικά την διάταξη προκαλώντας έντονες μεταβολές κατά το άνοιγμα και κλείσιμό της.

Επαναλαμβάνουμε τις μετρήσεις για διαβίβαση υπό ροή διαλυμάτων με διαφορετικές συγκεντρώσεις IL-6 σε διάλυμα φωσφορικών 5 μM, pH 5,5.



Σχήμα 79. Μετρήσεις αντίστασης τριών αισθητήρων μιας ψηφίδας σαν συνάρτηση του χρόνου για διάφορες συγκεντρώσεις IL-6 υπό ροή. Οι διακεκομμένες γραμμές αντιπροσωπεύουν τον χρόνο που εισέρχεται το διάλυμα και τα πράσινα παραλληλόγραμμα το κλείσιμο και άνοιγμα της αντλίας.

Και στους τρεις αισθητήρες παρατηρείται μια απότομη πτώση στην απόκριση κατά τη διαβίβαση του διαλύματος των 20 pg/ml IL-6, και μια μικρότερη πτώση κατά τη διαβίβαση του διαλύματος των 100 pg/ml. Αν θεωρήσουμε ότι η απότομη αυτή πτώση είναι αποτέλεσμα της

δέσμευσης της IL-6, τότε η μη ύπαρξή ανάλογης πτώσης στα 500 pg/ml μπορεί να εξηγηθεί από την κατάληψη όλων των αντισωμάτων από τις δύο προηγούμενες συγκεντρώσεις. Οι αποκρίσεις ήταν πιο σταθερές και με μικρότερες μεταβολές λόγω του ανοίγματος και κλεισίματος της αντλίας (στους αισθητήρες S1 και S3) αλλά δεν εμφάνισαν συστηματικότητα και επαναληψιμότητα σε επόμενα πειράματα. Για τον λόγο αυτό προχωρήσαμε σε δοκιμή διαλυμάτων διαφορετικών συγκεντρώσεων και pH.

4.2.3 Μέτρηση υπό ροή σε διαλύματα φωσφορικών διαφορετικών συγκεντρώσεων και pH

Για να βελτιώσουμε τις μετρήσεις σε αυτό το πείραμα δοκιμάζουμε σε τέσσερα διαφορετικά τσιπ αισθητήρων διαφορετικές συγκεντρώσεις διαλυμάτων και pH με στόχο να απομακρύνουμε το pH από το ισοηλεκτρικό σημείο της IL-6 (όπως προτείνεται στη βιβλιογραφία) και να ρυθμίσουμε κατάλληλα το μήκος Debye. Το ισοηλεκτρικό σημείο της IL-6 είναι μεταξύ του 5 και του 6 επομένως κοντά σε αυτές τις τιμές pH η IL-6 αποκτά ουδέτερο φορτίο καθιστώντας την μη ανιχνεύσιμη. Επιπλέον, το μήκος Debye σε συγκέντρωση 0,1mM φτάνει τα 21 nm, υψηλότερο από το μήκος της IL-6 και του αντισώματος που υπολογίζονται περίπου στα 10-15 nm, ενώ παράλληλα το pH διατηρείται στο 7.





Σχήμα 80. Μετρήσεις αντίστασης τριών αισθητήρων μιας ψηφίδας σαν συνάρτηση του χρόνου, υπό ροή, σε διάλυμα φωσφορικών a) 5μm pH 7,4, b) 0,5mM pH 7,1 c) 0,5mM pH 7,1 d) 0,1mM pH 7. Οι διακεκομμένες γραμμές αντιπροσωπεύουν τον χρόνο που εισέρχεται το διάλυμα ενώ τα πράσινα ορθογώνια μεταβολές που οφείλονται στην αντλία.

Αρχικά έγινε προσπάθεια να διατηρηθεί η ίδια συγκέντρωση διαλύματος με τα προηγούμενα πειράματα και να ρυθμιστεί το pH σε υψηλότερες τιμές (Σχ. 80, a), ώστε να απομακρυνθούμε από το ισοηλεκτρικό σημείο της IL-6. Το αποτέλεσμα ήταν το διάλυμα να μην διατηρεί το pH σταθερό μετά την ρύθμιση, αλλά να μειώνεται σταδιακά με την πάροδο του χρόνου μέχρι να φτάσει την αρχική του τιμή. Πιο συγκεκριμένα, το pH ρυθμίστηκε στο 8 πριν το πείραμα, ενώ μετά το πείραμα που ξαναμετρήθηκε και η τιμή του είχε πέσει στο 6,5. Για τον λόγο αυτό, δεν προτιμήθηκε το συγκεκριμένο διάλυμα καθώς η μεταβολή στο pH θα μπορούσε να επηρεάσει την μέτρηση.

Ακολούθως, έγιναν πειράματα σε φωσφορικά διαλύματα μεγαλύτερων συγκεντρώσεων τα οποία παρουσίασαν υψηλότερες τιμές pH, χωρίς να χρειάζονται ρύθμιση (Σχ. 80, b, c, d). Η καλύτερη τιμή συγκέντρωσης διαλύματος φωσφορικών αναμένεται να είναι τα 0,1 mM που σύμφωνα με την βιβλιογραφία έχουν το επιθυμητό μήκος Debye. Εντούτοις, σε όλες τις περιπτώσεις δεν φαίνεται να έχουμε κάποιο εμφανές σήμα ή κάποια σταθερή συμπεριφορά, παρά μόνο ίσως στη μεγαλύτερη συγκέντρωση IL-6 (500 pg/ml) που χρησιμοποιήθηκε στα πειράματα αυτά. Πρέπει βέβαια να σημειωθεί ότι παρατηρούμε μία πιο σταθερή συμπεριφορά του σήματος που παραμένει ανεπηρέαστο από το άνοιγμα και κλείσιμο της αντλίας.

4.2.4 Ανίχνευση με σύμπλοκο στρεπταβιδίνης-βιοτίνης σευψηλότερες συγκεντρώσεις ΙL-6

Για να βελτιώσουμε την ακινητοποίηση του αντισώματος στο rGO δοκιμάστηκε η χρήση του σύμπλοκου στρεπταβιδίνης-βιοτίνης. Σύμφωνα με την θεωρία, όσο πιο απομακρυσμένο είναι το αντίσωμα από την επιφάνεια τόσο ευκολότερη είναι η πρόσδεση του αντιγόνου. Η επιφάνεια του rGO επικαλύφθηκε με 100 μg/mL στρεπταβιδίνη σε διάλυμα ανθρακικών pH 9.4 και επώασε ολονύχτια σε σφραγισμένο τρυβλίο με υγρασία. Στη συνέχεια, ακολούθησε αποκλεισμός των ελεύθερων θέσεων με διάλυμα αποκλεισμού φωσφορικών 50mM pH 7.4 με 1% BSA και έκπλυση με σκέτο διάλυμα φωσφορικών και νερό. Κατά την μέτρηση πέρασε υπό ροή το βιοτινυλιωμένο αντίσωμα στη συνέχεια σκέτο διάλυμα και μετά ακολούθησαν διάφορες συγκεντρώσεις IL-6. Επιλέχθηκαν σημαντικά μεγαλύτερες συγκεντρώσεις ώστε να εντοπίσουμε τα όρια ανίχνευσης.





Σχήμα 81. Μετρήσεις αντίστασης τριών τσιπ αισθητήρων σαν συνάρτηση του χρόνου, υπό ροή διαλύματος φωσφορικών με διάφορες συγκεντρώσεις IL-6. Οι διακεκομμένες γραμμές αντιπροσωπεύουν τον χρόνο που εισέρχεται το διάλυμα ενώ τα πράσινα ορθογώνια μεταβολές που οφείλονται στην αντλία.

Παρατηρούμε και στα τρία πειράματα έντονες συστηματικές πτώσεις της αντίστασης και ανάλογες της συγκέντρωσης στις μεγάλες συγκεντρώσεις της τάξης των μg/ml (Σχ. 81, b και c) ενώ σημαντική είναι η παρουσία θορύβου που πιθανόν οφείλεται στις ηλεκτρικές συνδέσεις. Αφαιρέθηκε λοιπόν ο θόρυβος από τις μετρήσεις (Σχ. 81, b και c) ώστε να φανούν καθαρά οι μεταβολές του σήματος συναρτήσει της συγκέντρωσης.





Σχήμα 82. Μετρήσεις αντίστασης δύο τσιπ αισθητήρων σαν συνάρτηση του χρόνου, υπό ροή διαλύματος φωσφορικών με διάφορες συγκεντρώσεις IL-6, μετά την αφαίρεση του θορύβου: a) από την μέτρηση του Σχ.81, b και b) από την μέτρηση του Σχ.81, a. Οι διακεκομμένες γραμμές αντιπροσωπεύουν τον χρόνο που εισέρχεται το διάλυμα ενώ τα πράσινα ορθογώνια μεταβολές που οφείλονται στην αντλία.

Μετά την αφαίρεση του θορύβου από τις μετρήσεις του Σχήματος 81 b και c γίνεται φανερό ότι έχουμε σημαντική και συστηματική πτώση της αντίστασης σαν συνάρτηση της συγκέντρωσης της IL-6 για συγκεντρώσεις της τάξης των μg/ml λίγα μόλις δευτερόλεπτα μετά την διέλευσή της από τους αισθητήρες.

Κεφάλαιο 5: Συμπεράσματα, σχολιασμός και μελλοντικές προοπτικές

Συνοψίζοντας, αρχικά κατασκευάστηκε μέσω μαλακής λιθογραφίας μικρορευστονική πλατφόρμα για όργανο σε ψηφίδα (OoC). Ένας πολύ διαδεδομένος τύπος OoC είναι αυτός που επιλέξαμε να κατασκευάσουμε, εμπνευσμένος από τις εργασίες των Jang et al. (2013) [60] και των Jang και Suh (2010) [66] που αναπτύχθηκε για μοντέλα νεφρού σε ψηφίδα. Η διάταξή μας αποτελείται από δύο τμήματα PDMS όπου το ένα φέρει μικροκανάλι κυτταρικής καλλιέργειας και ροής θρεπτικού μέσου για εφαρμογή διατμητικής τάσης στα κύτταρα και το δεύτερο φέρει δεξαμενή θρεπτικού μέσου. Τα δύο τμήματα συγκολλήθηκαν με επιτυχία παρεμβάλλοντας μεταξύ τους πορώδη διαφανή πολυεστερική μεμβράνη κατάλληλη για κυτταροκαλλιέργεια. Η μήτρα για την μαλακή λιθογραφία του μικροκαναλιού κατασκευάστηκε με την μέθοδο της φωτολιθογραφίας ξηρής ρητίνης Ordyl πάνω σε PCB. Καταφέραμε με αυτό τον τρόπο να κατασκευάσουμε μια μικρορευστονική πλατφόρμα με τρόπο εύκολο, γρήγορο και οικονομικό, η οποία κατάφερε να διατηρήσει (χωρίς αποκόλληση) ροές πολύ μεγαλύτερες από τις συνήθως χρησιμοποιούμενες στα ΟοC μοντέλα.

Στη συνέχεια, κατασκευάστηκε ένα μικροκανάλι όπου ενσωματώνεται συστοιχία αισθητήρων και το οποίο θα ενώνεται σε σειρά με την μικρορευστονική πλατφόρμα OoC. Με τον τρόπο αυτό το θρεπτικό μέσο που θα διέρχεται από τα κύτταρα θα περνάει πάνω από τους αισθητήρες δίνοντας την δυνατότητα για μέτρηση σε πραγματικό χρόνο των εκάστοτε ζητούμενων πρωτεϊνών, ενώ παράλληλα αποφεύγεται η διατάραξη των κυττάρων από τις ηλεκτρικές συνδέσεις, ή το υλικό κατασκευής του αισθητήρα. Η συγκόλληση του μικροκαναλιού από PDMS στο τσιπ του αισθητήρα, έγινε με την χρήση λεπτής επίστρωσης από PDMS και αποδείχθηκε με τη βοήθεια του 3D προφιλόμετρου ότι δεν έχει παραμένει υλικό στο μικροκανάλι μετά την περιστροφή του δοκιμίου στον περιστροφικό επιστρωτή. Για βέλτιστη συγκόλληση χρησιμοποιούμε chip-holder κατά το ψήσιμο ή chip holder κατά την λήψη μετρήσεων ώστε να εξασφαλιστεί η σφράγιση ιδιαίτερα πάνω από τις μεταλλικές ηλεκτρικές γραμμές στην επιφάνεια του τσιπ των αισθητήρων.

Τα πειράματα ELISA οδήγησαν στην βελτιστοποίηση του πρωτοκόλλου ανίχνευσης της ιντερλευκίνης 6, μίας πλειοτροπικής πρωτεΐνης που αποτελεί γνωστό βιοδείκτη φλεγμονής. Σε αυτά τα πειράματα ανιχνεύτηκαν συγκεντρώσεις έως και 5 pg/ml, τιμή κάτω από τα φυσιολογικά όρια συγκέντρωσης της πρωτεΐνης σε υγιείς ενήλικες. Τα αντίστοιχα πειράματα σε επιφάνειες πυριτίου στις οποίες είχαν εναποτεθεί κηλίδες GO και το οποίο είχε μετατραπεί θερμικά σε rGO δεν παρουσίασαν μεγάλη ευαισθησία ανίχνευσης, επιβεβαίωσαν όμως την ακινητοποίηση με την μέθοδο της προσρόφησης και την λειτουργικότητα των ακινητοποιημένων αντισωμάτων στο ανηγμένο οξείδιο του γραφενίου. Η χαμηλή ευαισθησία της μεθόδου αποδίδεται στην απουσία ανάδευσης των διαλυμάτων και την αδυναμία μέτρησης της απορρόφησης απευθείας από τα δείγματα.

Τα πειράματα που ακολούθησαν στο τσιπ του αισθητήρα για ανίχνευση της ιντερλευκίνης 6 έγιναν με σφράγιση του μικροκαναλιού με πολυολεφίνη που έχει χρησιμοποιηθεί στο παρελθόν για τον συγκεκριμένο αισθητήρα. Αρχικά, τα σήματα σε pH κοντά στο ισοηλεκτρικό σημείου της IL-6 και σε πολύ μικρές συγκεντρώσεις διαλύματος

παρουσίασαν μεγάλες διακυμάνσεις και έλλειψη επαναληψιμότητας. Επίσης, πειράματα σε μεγαλύτερες συγκεντρώσεις κοντά στο μήκος Debye και σε υψηλότερα pH μακριά από το ισοηλεκτρικό σημείο της IL-6 δεν φάνηκαν να δίνουν συστηματικό αποτέλεσμα, αν και οι διακυμάνσεις μειώθηκαν σημαντικά και οι μετρήσεις είναι πιο σταθερές. Σε αυτές τις τιμές συγκεντρώσεων IL-6 είναι πιθανό να βρισκόμαστε κάτω από τα όρια ανίγνευσης του αισθητήρα και γι' αυτό να μην παρατηρούμε κάποια εμφανή μεταβολή. Για βελτίωση της προσκόλλησης των αντισωμάτων, αντί να προσροφάται απευθείας το αντίσωμα στην επιφάνεια, πράγμα που μπορεί να επιφέρει μείωση της ικανότητάς του να συνδέεται με την IL-6, έγινε προσρόφηση στρεπταβιδίνης στο rGO η οποία συνδέεται ειδικά με τη βιοτίνη η οποία είναι προσδεμένη πάνω στο αντίσωμα. Κατ' αυτό τον τρόπο έχουμε ισχυρότερη ακινητοποίηση των αντισωμάτων στην επιφάνεια και καλύτερη διάταξή τους. Και σε αυτή την περίπτωση, για μικρές τιμές συγκεντρώσεων δεν παρατηρήθηκε σημαντική αλλαγή του σήματος, όμως σε μεγαλύτερες συγκεντρώσεις της τάξης των μg/ml έχουμε εμφανείς πτώσεις του σήματος, οι οποίες μάλιστα είναι ανάλογες της συγκέντρωσης της ΙL-6. Επομένως μπορούμε να συμπεράνουμε ότι η απόκριση οφείλεται στην διέλευση της IL-6 από τους αισθητήρες και περαιτέρω διερεύνηση μπορεί να οδηγήσει στην αύξηση της ευαισθησίας του αισθητήρα, δηλαδή μείωση στα όρια ανίχνευσης της IL-6.

Για βελτίωση της ευαισθησίας του αισθητήρα προτείνεται μελλοντικά η προσθήκη μορίων PEG στο υπόστρωμα αναγμένου οξειδίου του γραφενίου μαζί με τα αντισώματα σε διαλύματα υψηλής συγκέντρωσης φωσφορικών. Αυτή η μέθοδος αυξάνει αρκετά το μήκος Debye και αποφεύγονται φαινόμενα αλλοίωσης των πρωτεϊνών που μερικές φορές παρατηρούνται σε χαμηλής συγκέντρωσης διαλύματα. Έγιναν ήδη κάποιες δοκιμές προς αυτή την κατεύθυνση που επιβεβαίωσαν την προσκόλληση των PEG στο rGO με δύο μεθόδους: α) επώαση των PEG με μοριακό βάρος 8000 για μία ώρα στην επιφάνεια με UV ακτινοβολία και β) την ολονύχτια επώαση των PEG-silane σε διάλυμα τολουόλιου με HCl για καταλύτη. Η καλή προσρόφηση των PEG επιβεβαιώθηκε με μετρήσεις γωνιών επαφής, οι οποίες αναγράφονται αναλυτικά στο Παράρτημα 2.

Μελλοντικά, είναι χρήσιμη η προσομοίωση του συστήματος αισθητήρα-ΟοC με λογισμικό τύπου COMSOL ώστε να διερευνηθεί η βέλτιστη θέση του αισθητήρα για ανίχνευση πρωτεϊνών που εκκρίνονται από τα κύτταρα. Αν προκύψουν καλύτερα αποτελέσματα με τον αισθητήρα ενσωματωμένο στο κανάλι με την κυτταροκαλλιέργεια (βλ. Σχ. 83), θα δοκιμαστεί η ενσωμάτωσή του μέσα στο μικροκανάλι πάνω από την μεμβράνη με την κυτταρική καλλιέργεια. Η σύνδεση αισθητήρα και μικροκαναλιού γίνεται πάλι με ενδιάμεση λεπτή στρώση από PDMS. Πιο συγκεκριμένα, οι θέσεις των ηλεκτροδίων στον αισθητήρα μπορούν να καλυφθούν με κολλητική ταινία για προστασία τους από το PDMS που θα στρωθεί πάνω στον αισθητήρα. Στη συνέχεια, θα τοποθετηθεί η μεμβράνη κυτταροκαλλιέργειας προσεκτικά πάνω στο μικροκανάλι του αισθητήρα και τέλος η δεξαμενή θρεπτικού υγρού. Η μέθοδος αυτή βέβαια ενέχει δύο κινδύνους: α) την πιθανότητα ύπαρξης υπολειμμάτων PDMS πάνω στα ηλεκτρόδια του αισθητήρα και β) δεν γνωρίζουμε την επίδραση που μπορεί να έχουν τα υλικά και η λειτουργία του αισθητήρα στην ανάπτυξη των κυττάρων. Οι δύο αυτοί παράγοντες θα πρέπει να διερευνηθούν διεξοδικά.



Σχήμα 83. Σχηματική αναπαράσταση της ενσωμάτωσης του αισθητήρα μέσα στο κανάλι μαζί με την κυτταροκαλλιέργεια.

Η χρήση του ηλεκτροχημικού αυτού αισθητήρα βέβαια δεν περιορίζεται μόνο στην ανίχνευση της IL-6, αλλά μπορεί να χρησιμοποιηθεί και για άλλες πρωτεΐνες. Αναλυτικότερα, το τσιπ του αισθητήρα της παρούσας εργασίας διαθέτει τρεις θέσεις ανίχνευσης στις οποίες θα μπορούσαν να δοκιμαστούν διαφορετικοί βιοδείκτες με ακινητοποίηση ειδικού για κάθε βιοδείκτη αντισώματος σε κάθε αισθητήρα και έτσι να επιτύχουμε ταυτόχρονη ανίχνευση τριών πρωτεϊνών. Μία πρωτεΐνη που θέλουμε μελλοντικά να δοκιμαστεί είναι το kidney injury molecule-1, ένας βιοδείκτης που αυξάνεται απότομα η συγκέντρωση του στα ούρα κατά τον τραυματισμό του νεφρού, περισσότερες λεπτομέρειες υπάρχουν στο Παράρτημα 1. Στο πλαίσιο της εργασίας πραγματοποιήθηκαν πειράματα ELISA και για τον προσδιορισμό της συγκεκριμένης πρωτεΐνης, αλλά οι συγκεντρώσεις που μπορούσαν να ανιχνευτούν με τα αντισώματα που χρησιμοποιήθηκαν ήταν της τάξης των μερικών mg/ml, πολύ υψηλότερες από αυτές που παρατηρούνται στον ανθρώπινο οργανισμό και από αυτές που ανιχνεύτηκαν για την IL-6. Υπάρχει επείγουσα ανάγκη για την ανίχνευση και παρακολούθηση της νεφρικής βλάβης τόσο σε οξεία όσο και σε χρόνια νοσήματα. Το KIM-1 (kidney injury molecule-1) είναι μια διαμεμβρανική πρωτεΐνη που δεν ανιχνεύεται υπό φυσιολογικές συνθήκες στην μεμβράνη του εγγύς εσπειραμένου σωληναρίου αλλά παρουσιάζεται κατά τον τραυματισμό του. Το KIM-1 έχει αποδειχθεί εξαιρετικός βιοδείκτης νεφρικής βλάβης [141].

Το KIM-1 είναι μια γλυκοπρωτεΐνη κυτταρικής μεμβράνης τύπου 1 η οποία περιέχει στο εξωκυτταρικό της τμήμα ένα τμήμα τύπου ανοσοσφαιρίνης έξι κυστεϊνών, δύο τμήματα Νγλυκοζυλίωσης και ένα πλούσια σε T/SP περιοχή χαρακτηριστική των Ο-γλυκοσυλιωμένων πρωτεϊνών τύπου βλεννίνης [142].

Ο εξωτομέας του KIM-1 αποβάλλεται από κύτταρα in vitro και in vivo στα ούρα σε τρωκτικά και ανθρώπους μετά από τραυματισμό του εγγύς σωληναρίου. Η δράση της μεταλλοπρωτεϊνάσης έχει ως αποτέλεσμα την απελευθέρωση διαλυτού KIM-1 μέσω της δράσης των MMPs που είναι ενδοπεπτιδάσεις ψευδαργύρου και ασβεστίου που υδρολύουν εξωκυττάριες πρωτεΐνες. Οι MMPs εκκρίνονται σε απόκριση σε πολλαπλά ερεθίσματα, όπως οξειδωτικό στρες και υπεριώδη ακτινοβολία. Ο ρόλος του απορριπτόμενου εντός του σωληναρίου KIM-1 παραμένει άγνωστος όπως παραμένει να καθοριστούν και οι επιπτώσεις της μακροχρόνιας έκφρασης του KIM-1 σε ασθενείς με χρόνια νεφρική νόσο αλλά και σε επίπεδα χαμηλότερα από αυτά που ανιχνεύονται στην οξεία νεφρική βλάβη [143].



Σχήμα 84. Δομή του ΚΙΜ-1. Το ΚΙΜ-1 είναι μια διαμεμβρανική πρωτεΐνη με γλυκοζυλιωμένη βλεννίνη και περιοχές τύπου Ιg στον εξωτομέα της πρωτεΐνης. Υπάρχει και μια σχετικά μικρή ενδοκυτταρική περιοχή που είναι φωσφορυλιωμένη με τυροσίνη. Ο εξωτομέας διασπάται από μεταλλοπρωτεϊνάσες [142].

Το KIM-1 προσδίδει στα επιθηλιακά κύτταρα την ικανότητα να αναγνωρίζουν και να φαγοκυτταρώνουν τα νεκρά κύτταρα που υπάρχουν στον μετα-ισχαιμικό νεφρό και συμβάλλουν στην απόφραξη των σωληναρίων. Το KIM-1 είναι ένας υποδοχέας φωσφατιδυλοσερίνης που αναγνωρίζει τα αποπτωτικά κύτταρα κατευθύνοντάς τα στα λυσοσώματα. Χρησιμεύει επίσης ως

υποδοχέας για οξειδωμένες λιποπρωτεΐνες και ως εκ τούτου είναι ικανός να αναγνωρίζει τα σήματα «φάτε με» των αποπτωτικών κυττάρων [144].

Υπάρχουν ορισμένα χαρακτηριστικά του KIM-1 που το καθιστούν ιδανικό βιοδείκτη νεφρικής βλάβης. Αρχικά, η απουσία του KIM-1 στο υγιές νεφρό και η απότομη αύξησή του στην μεμβράνη του τραυματισμένου εγγύς σωληναρίου. Επιπλέον, η παραμονή του στο επιθηλιακό κύτταρο μέχρι να αναρρώσει πλήρως το κύτταρο, η ταχεία και ισχυρή διάσπαση του εξωτομέα όπως και η ex vivo σταθερότητα του σε θερμοκρασία δωματίου έπαιξαν σημαντικό ρόλο στην επιλογή του KIM-1 ως βιοδείκτη [145].

Παράρτημα 2

Βιβλιογραφικές αναφορές προτείνουν την προσθήκη μορίων PEG ή PEG-silane πάνω στην επιφάνεια του αισθητήρα για την αύξηση του μήκους Debye χωρίς την ανάγκη μείωσης της συγκέντρωσης του διαλύματος. Με στόχο λοιπόν την βελτίωση της ευαισθησίας του βιοαισθητήρα έγιναν τα πρώτα βήματα προς αυτή την κατεύθυνση ελέγχοντας την προσκόλληση μορίων PEG και PEG-silane σε κηλίδες rGO στην επιφάνεια δισκιδίου πυριτίου.

Για να επιβεβαιωθεί η καλή προσρόφηση των PEG στην επιφάνεια του rGO δοκιμάστηκαν δύο μέθοδοι [146] και μετρήθηκαν οι γωνίες επαφής στον Kruss drop shape analyser του Ινστιτούτου Νανοεπιστήμης και Νανοτεχνολογίας του ΕΚΕΦΕ «Δημόκριτος». Οι μετρήσεις έγιναν σε επιφάνειες Si/SiO₂ στις οποίες είχαν εναποτεθεί σταγόνες GO και ψηθεί για 1 ώρα στους 180°C. Τα πειράματα αυτά έγιναν με μελλοντική προοπτική να ενσωματωθούν και τα αντισώματα στην επιφάνεια μαζί με τα PEG και να ερευνηθεί η απόκριση του ηλεκτροχημικού βιοαισθητήρα στην IL-6, καθώς σύμφωνα με την θεωρία αυξάνεται το μήκος Debye και ευνοείται η ανίχνευση.

Στην πρώτη μέθοδο προσκόλλησης των PEG με μοριακό βάρος 8000 στο rGO πάνω στην επιφάνεια Si/SiO₂ 1% v/v υδατικό διάλυμα PEG τοποθετήθηκε με την χρήση πιπέτας πάνω στο rGO και εκτέθηκε για 1 ώρα σε UV ακτινοβολία στον mask aligner (Κεφ. 2.9) του καθαρού χώρου του ΕΚΕΦΕ «Δημόκριτος». Στο τέλος οι επιφάνειες ξεπλύθηκαν με νερό για να απομακρυνθούν τα υπολείμματα των PEG, στεγνώθηκαν με N₂ και μετρήθηκαν οι γωνίες επαφής. Στη συνέχεια, εκπλύθηκαν με νερό και ξαναμετρήθηκαν οι γωνίες επαφής για να επιβεβαιώσουμε την σταθερότητα της προσρόφησης των PEG. Τα αποτελέσματα έδειξαν:

- Σε επιφάνεια χωρίς PEG που επίσης εκτέθηκε σε υδατικό διάλυμα μετρήθηκε γωνία επαφής 63° ενώ μετά από έκπλυση με νερό 67°
- Σε επιφάνεια με PEG μετρήθηκε γωνία επαφής 30° ενώ μετά από έκπλυση με νερό 42°



Σχήμα 85. Επιφάνειες Si/SiO₂/rGO με επώαση υδατικού διαλύματος PEG και έκθεση για 1 ώρα σε UV ακτινοβολία.

Στη δεύτερη μέθοδο που δοκιμάστηκε έγινε ακινητοποίηση PEG-silane με ολονύχτια επώαση των επιφανειών Si/SiO₂/rGO σε διάλυμα τολουολίου 0.5% PEG-silane με καταλύτη 0.08% διάλυμα HCl. Ακολούθησε έκπλυση με τολουόλιο και νερό, στέγνωσαν με αέρα N2 και μετρήθηκαν οι γωνίες επαφής όπως προηγουμένως. Τα αποτελέσματα έδωσαν:

- Σε επιφάνεια χωρίς PEG μετρήθηκε γωνία επαφής 65° ενώ μετά από έκπλυση με νερό 67°
- Σε επιφάνεια με PEG μετρήθηκε γωνία επαφής 38° ενώ μετά από έκπλυση με νερό 48°

Και στις δύο περιπτώσεις είναι εμφανής η προσκόλληση των PEG και PEG-silane από την υδροφιλοποίηση της επιφάνειας. Περαιτέρω διερεύνηση χρειάζεται στο εάν η μεταβολή της μέτρησης μετά την έκπλυση με νερό οφείλεται σε απομάκρυνση των PEG και PEG-silane από την επιφάνεια, καθώς αυτό θα δημιουργούσε πρόβλημα σε μελλοντικές μετρήσεις υπό ροή, αλλά και στο πως θα επηρεάσουν τα PEG την προσρόφηση των αντισωμάτων.

Βιβλιογραφία

- ^{1.} Geschke, Oliver, Henning Klank, and Pieter Telleman. "Microsystem Engineering of Lab-on-a-chip Devices." (2004).
- ^{2.} O. Reynolds, An experimental investigation of the circumstances which determine whether the motion of water shall be direct or sinuous, and of the law of resistance in parallel channels, Philos Trans R Soc London. 174 (1883) 935–982.
- ^{3.} https://eclass.upatras.gr/modules/document/file.php/ENV227/% CE% 94% CE% B9% CE% B1% CE% BB% CE% AD% CE% BE% CE% B5% CE% B9% CF% 82/% CE% 94% CE% B9% C
 E% AC% CE% BB% CE% B5% CE% BE% CE% B7_1.pdf
- ^{4.} Tabeling, Patrick. Introduction to microfluidics. Oxford University Press on Demand, 2005.
- ^{5.} Squires T.M., Quake S.R. Microfluidics: Fluid physics at the nanoliter scale, Rev. Mod. Phys. 2005;77:977.
- ^{6.} Convery, Neil, and Nikolaj Gadegaard. "30 years of microfluidics." Micro and Nano Engineering 2 (2019): 76-91.
- ^{7.} Azizipour, Neda, et al. "Evolution of biochip technology: A review from lab-on-a-chip to organ-on-a-chip." Micromachines 11.6 (2020): 599.
- ^{8.} Terry, Stephen C., John H. Jerman, and James B. Angell. "A gas chromatographic air analyzer fabricated on a silicon wafer." IEEE transactions on electron devices 26.12 (1979): 1880-1886.
- ^{9.} A. Manz, N. Graber, and H. M. Widmer, "Miniaturized total chemical analysis systems: A novel concept for chemical sensing," Sens. Actuators, vol. B1, pp. 244–248, 1990.
- ¹⁰ H. M. Widmer, "Trends in industrial analytical chemistry," Trends Anal. Chem., vol. 2, pp. viii–x, 1983.
- ^{11.} Verpoorte, Elisabeth, and Nico F. De Rooij. "Microfluidics meets MEMS." Proceedings of the IEEE 91.6 (2003): 930-953.
- ¹² B.L. Karger, Y.-H. Chu, F. Foret, Capillary electrophoresis of proteins and nucleic acids, Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct. 24 (1995) 579–610.
- ¹³ H. Swerdlow, R. Gesteland, Capillary gel electrophoresis for rapid, high resolution DNA sequencing, Nucleic Acids Res. 18 (6) (1990) 1415–1419.
- ¹⁴ M.A. Northrup, M.T. Ching, R.M. White, R.T. Watson, DNA amplification with a microfabricated reaction chamber, Transducer '93-The 7th Int. Conf. on SolidState Sensors and Actuators, Yokohama, 1993, pp. 925–926.
- ^{15.} Chang, Chen-Min, et al. "Nucleic acid amplification using microfluidic systems." Lab on a Chip 13.7 (2013): 1225-1242.
- ¹⁶ A.W. Martinez, S.T. Phillips, M.J. Butte, G.M. Whitesides, Patterned paper as a platform for inexpensive, low-volume, portable bioassays, Angew Chemie Int Ed. 46 (8) (2007) 1318–1320.
- ^{17.} Abgrall, P., and A. M. Gue. "Lab-on-chip technologies: making a microfluidic network and coupling it into a complete microsystem—a review." Journal of micromechanics and microengineering 17.5 (2007): R15.

- ¹⁸ Chin, Curtis D., Vincent Linder, and Samuel K. Sia. "Lab-on-a-chip devices for global health: Past studies and future opportunities." Lab on a Chip 7.1 (2007): 41-57.
- ¹⁹ J. Rogal, C. Probst, P. Loskill, Integration concepts for multi-organ chips: how to maintain flexibility, Futur Sci OA. 3 (2) (2017) FSO180.
- ²⁰ D. Huh, G.A. Hamilton, D.E. Ingber, From 3D cell culture to organs-on-chips, Trends Cell Biol. 21 (12) (2011) 745–754.
- ^{21.} Bhise, Nupura S., et al. "Organ-on-a-chip platforms for studying drug delivery systems." Journal of Controlled Release 190 (2014): 82-93.
- ²² Grayson A.C.R., Shawgo R.S., Johnson A.M., Flynn N.T., Li Y., Cima M.J., Langer R. A BioMEMS review: MEMS technology for physiologically integrated devices. Proc. IEEE. 2004;92:6–21.
- ²³ https://thereader.mitpress.mit.edu/the-organ-on-a-chip-revolution-is-here/
- ²⁴ Kim, Sejoong, and Shuichi Takayama. "Organ-on-a-chip and the kidney." Kidney research and clinical practice 34.3 (2015): 165-169.
- ^{25.} Bhatia SN, Ingber DE, "Microfluidic organs-on-chips", Nat Biotechnol. 2014 Aug; 32(8):760-72.
- ²⁶ Sosa-Hernández, Juan Eduardo, et al. "Organs-on-a-chip module: A review from the development and applications perspective." Micromachines 9.10 (2018): 536.
- ^{27.} Li, Y.-S.J.; Haga, J.H.; Chien, S. Molecular basis of the effects of shear stress on vascular endothelial cells. J. Biomech. 2005, 38, 1949-1971.
- ²⁸ Ahadian, Samad, et al. "Organ-on-a-chip platforms: a convergence of advanced materials, cells, and microscale technologies." Advanced healthcare materials 7.2 (2018): 1700506.
- ²⁹ Al-Amri, Mohammad, Zeyang Liao, and M. Suhail Zubairy. "Beyond the Rayleigh limit in optical lithography." Advances in Atomic, Molecular, and Optical Physics. Vol. 61. Academic Press, 2012. 409-466.
- ³⁰ Vladimirsky, Yuli. "10. Lithography." Experimental methods in the physical sciences. Vol. 32. Academic Press, 1998. 205-223.
- ^{31.} Marinescu, Maria-Roxana, et al. "CONSIDERATIONS REGARDING THE USE OF SU-8 PHOTORESIST IN MEMS TECHNIQUE." Revista de Tehnologii Neconventionale 22.3 (2018): 10-14.
- ³² Xia, Younan, and George M. Whitesides. "Soft lithography." Angewandte Chemie International Edition 37.5 (1998): 550-575.
- ³³ Kang, Shin-Won. "Application of soft lithography for nano functional devices." Lithography. IntechOpen, 2010. 403.
- ³⁴ Zhiyong Wu, "Polymer microchips bonded by O2 plasma activation" Electrophoresis 23 (2002) pp 782 790.
- ³⁵ Ali, Norshah Rizal, Ali Ahaitouf, and Mohd Zaid Abdullah. "Irreversible bonding techniques for the fabrication of a leakage-free printed circuit board-based lab-on-chip in microfluidic platforms—a review." Measurement Science and Technology 32.5 (2021): 052001.
- ³⁶ Huh, Dongeun, et al. "Reconstituting organ-level lung functions on a chip." Science 328.5986 (2010): 1662-1668.

- ^{37.} Shao, Jianbo, et al. "Integrated microfluidic chip for endothelial cells culture and analysis exposed to a pulsatile and oscillatory shear stress." Lab on a Chip 9.21 (2009): 3118-3125.
- ³⁸ Caplin, Jeremy D., et al. "Microfluidic organ-on-a-chip technology for advancement of drug development and toxicology." Advanced healthcare materials 4.10 (2015): 1426-1450.
- ^{39.} Prot, Jean Matthieu, et al. "Improvement of HepG2/C3a cell functions in a microfluidic biochip." Biotechnology and bioengineering 108.7 (2011): 1704-1715.
- ⁴⁰ Hoeng, Julia, David Bovard, and Manuel C. Peitsch, eds. Organ-on-a-chip: engineered microenvironments for safety and efficacy testing. Academic Press, 2019.
- ^{41.} Kim, Hyun Jung, and Donald E. Ingber. "Gut-on-a-Chip microenvironment induces human intestinal cells to undergo villus differentiation." Integrative Biology 5.9 (2013): 1130-1140.
- ⁴² Jahanshahi, Maryam, et al. "An engineered infected epidermis model for in vitro study of the skin's pro-inflammatory response." Micromachines 11.2 (2020): 227.
- ⁴³ Wilmer, M.J., Ng, C.P., Lanz, H.L., Vulto, P., Suter-Dick, L., Masereeuw, R., 2016. Kidney-on-a-chip technology for drug-induced nephrotoxicity screening. Trends Biotechnol. 34, 156–170.
- ⁴⁴ Hoste, E.A., Bagshaw, S.M., Bellomo, R., Cely, C.M., Colman, R., Cruz, D.N., et al., 2015. Epidemiology of acute kidney injury in critically ill patients: the multinational AKI-EPI study. Intensive Care Med. 41, 1411-1423.
- ^{45.} Yeung, C.K., Himmelfarb, J., 2019. Kidneys on chips: emerging technology for preclinical drug development. Clin. J. Am. Soc. Nephrol. 14, 144-146.
- ⁴⁶ Lote, C.J., Lote, C.J., 1994. Principles of Renal Physiology. Springer.
- ^{47.} Ιωαννίδης, Ηρακλής. "Επίτομη κλινική νεφρολογία, εκδόσεις Ροτόντα." Εκδόσεις: Ροτόντα 7 (2007).
- ⁴⁸ Κουλουρίδης, Ε., and Ι. Κουλουρίδης. "Βασικές αρχές της παθοφυσιολογίας του νεφρικού σωληναρίου σε μοριακό επίπεδο-Basic principles of renal tubular physiology upon molecular level." Ελληνική Νεφρολογία-Hellenic Nephrology 26.3 (2014).
- ⁴⁹ https://courses.lumenlearning.com/suny-dutchess-ap1/chapter/nephrons-structure/
- ⁵⁰ Shear stress-dependent regulation of apical endocytosis in renal proximal tubule cells mediated by primary cilia. Venkatesan Raghavan, Youssef Rbaibi, Núria M. Pastor-Soler, Marcelo D. Carattino, and Ora A. Weisz, PNAS June 10, 2014 111 (23) 8506-8511.
- ⁵¹ Greka, A., Mundel, P., 2012. Cell biology and pathology of podocytes. Annu. Rev. Physiol. 74, 299-323.
- ⁵² Mccormick, J.A., Ellison, D.H., 2015. Distal convoluted tubule. Compr. Physiol. 5, 45-98.
- ⁵³ Makris, K., Spanou, L., 2016. Acute kidney injury: definition, pathophysiology and clinical phenotypes. Clin. Biochem. Rev. 37, 85-98.
- ⁵⁴ Zhou, M., Zhang, X., Wen, X., Wu, T., Wang, W., Yang, M., et al., 2016. Development of a functional glomerulus at the organ level on a chip to mimic hypertensive nephropathy. Sci. Rep. 6, 31771.

- ^{55.} Wang, L., Tao, T., Su, W., Yu, H., Yu, Y., Qin, J., 2017. A disease model of diabetic nephropathy in a glomerulus-on-a-chip microdevice. Lab Chip 17, 1749-1760.
- ⁵⁶ Musah, S., Mammoto, A., Ferrante, T.C., Jeanty, S.S.F., Hirano-Kobayashi, M., Mammoto, T., et al., 2017. Mature induced-pluripotent-stem-cell-derived human podocytes reconstitute kidney glomerular-capillary-wall function on a chip. Nat. Biomed. Eng. 1.
- ^{57.} Essig, M., Terzi, F., Burtin, M., Friedlander, G., 2001. Mechanical strains induced by tubular flow affect the phenotype of proximal tubular cells. Am. J. Physiol. Renal Physiol. 281, F751-F762.
- ⁵⁸ Praetorius HA, Spring KR. Bending the MDCK cell primary cilium increases intracellular calcium. J Membr Biol 2001; 184: 71-79.
- ⁵⁹ Ng, C.P., Zhuang, Y., Lin, A.W.H., Teo, J.C.M., 2013. A fibrin-based tissue-engineered renal proximal tubule for bioartificial kidney devices: development, characterization and in vitro transport study. Int. J. Tissue Eng. 2013, 1-10.
- ⁶⁰ Jang, K.J., Mehr, A.P., Hamilton, G.A., Mcpartlin, L.A., Chung, S., Suh, K.Y., et al., 2013. Human kidney proximal tubule-on-a-chip for drug transport and nephrotoxicity assessment. Integr. Biol. (Camb.) 5, 1119-1129.
- ^{61.} Sciancalepore, A.G., Sallustio, F., Girardo, S., Gioia Passione, L., Camposeo, A., Mele, E., et al., 2014. A bioartificial renal tubule device embedding human renal stem/progenitor cells. PLoS One 9, e87496.
- ⁶² Weber, E.J., Chapron, A., Chapron, B.D., Voellinger, J.L., Lidberg, K.A., Yeung, C.K., et al., 2016. Development of a microphysiological model of human kidney proximal tubule function. Kidney Int. 90, 627-637.
- ⁶³ Homan, K.A., Kolesky, D.B., Skylar-Scott, M.A., Herrmann, J., Obuobi, H., Moisan, A., et al., 2016. Bioprinting of 3D convoluted renal proximal tubules on perfusable chips. Sci. Rep. 6, 34845.
- ⁶⁴ King, S.M., Higgins, J.W., Nino, C.R., Smith, T.R., Paffenroth, E.H., Fairbairn, C.E., et al., 2017. 3D proximal tubule tissues recapitulate key aspects of renal physiology to enable nephrotoxicity testing. Front. Physiol. 8, 123.
- ^{65.} Baudoin, Régis, et al. "Development of a renal microchip for in vitro distal tubule models." Biotechnology progress 23.5 (2007): 1245-1253.
- ⁶⁶ Jang, Kyung-Jin, and Kahp-Yang Suh. "A multi-layer microfluidic device for efficient culture and analysis of renal tubular cells." Lab on a Chip 10.1 (2010): 36-42.
- ^{67.} Odijk, Mathieu, et al. "Measuring direct current trans-epithelial electrical resistance in organ-on-a-chip microsystems." Lab on a Chip 15.3 (2015): 745-752.
- ⁶⁸ Asif, Arun, et al. "Real-time sensors for live monitoring of disease and drug analysis in microfluidic model of proximal tubule." Microfluidics and Nanofluidics 24.6 (2020): 1-10.
- ⁶⁹ Ferrell, N., Desai, R.R., Fleischman, A.J., Roy, S., Humes, H.D., Fissell, W.H., 2010. A microfluidic bioreactor with integrated transepithelial electrical resistance (TEER) measurement electrodes for evaluation of renal epithelial cells. Biotechnol. Bioeng. 107, 707-716.
- ⁷⁰ Ashammakhi, Nureddin, et al. "Kidney-on-a-chip: untapped opportunities." Kidney international 94.6 (2018): 1073-1086.

- ^{71.} Nieskens, Tom TG, and Martijn J. Wilmer. "Kidney-on-a-chip technology for renal proximal tubule tissue reconstruction." European journal of pharmacology 790 (2016): 46-56.
- ⁷² B. Nagel, H. Dellweg, L. M. Gierasch, Glossary for chemists of terms used in biotechnology, Pure & Applied Chemistry, 1992, 64, 143-168.
- ⁷³ P. S. Petrou, D. Ricklin, M. Zavali, I. Raptis, S. E. Kakabakos, K. Misiakos, J. D. Lambris, Real-time label-free detection of complement activation products in human serum by white light reflectance spectroscopy, Biosensors & Bioelectronics, 2009, 24, 3359-3364.
- ⁷⁴ Πάγκαλη, Βαρβάρα. Ανάπτυξη οπτικών ανοσοαισθητήρων για την ταυτόχρονη ανίχνευση τοξικών ουσιών σε τρόφιμα. Diss. Εθνικό και Καποδιστριακό Πανεπιστήμιο Αθηνών (ΕΚΠΑ). Σχολή Θετικών Επιστημών. Τμήμα Χημείας. Τομέας Ι. Εργαστήριο Αναλυτικής Χημείας, 2019.
- ^{75.} L.C. Clark, C. Lyons, Electrode systems for continuous monitoring in cardiovascular surgery, Ann. N.Y. Acad. Sci., 102, 1962, p 29.
- ⁷⁶ Dong, Yongzhi, and Curtis Shannon. "Heterogeneous immunosensing using antigen and antibody monolayers on gold surfaces with electrochemical and scanning probe detection." Analytical chemistry 72.11 (2000): 2371-2376.]
- ^{77.} J.M. Berg, J.L. Tymoczko και L. Stryer. «Το ανοσοποιητικό σύστημα». Βιοχημεία. Πανεπιστημιακές Εκδόσεις Κρήτης. σελίδες 1046–1048. ISBN 960-524-191-9.
- ⁷⁸ <u>https://www.antibodies-online.com/resources/16/1208/antibodies/</u>
- ^{79.} Jung, Yongwon, Jin Young Jeong, and Bong Hyun Chung. "Recent advances in immobilization methods of antibodies on solid supports." *Analyst* 133.6 (2008): 697-701.
- ⁸⁰ Butler, J. E., et al. "The immunochemistry of sandwich elisas—VI. Greater than 90% of monoclonal and 75% of polyclonal anti-fluorescyl capture antibodies (CAbs) are denatured by passive adsorption." Molecular immunology 30.13 (1993): 1165-1175.
- ^{81.} Shen, Min, James F. Rusling, and Chandra K. Dixit. "Site-selective orientated immobilization of antibodies and conjugates for immunodiagnostics development." Methods 116 (2017): 95-111.
- ⁸² Lin, Po-Chiao, Dirk Weinrich, and Herbert Waldmann. "Protein biochips: oriented surface immobilization of proteins." Macromolecular Chemistry and Physics 211.2 (2010): 136-144.
- ⁸³ Kang, Jung Hye, et al. "Improving immunobinding using oriented immobilization of an oxidized antibody." Journal of Chromatography a 1161.1-2 (2007): 9-14.
- ^{84.} Cho, Il-Hoon, et al. "Site-directed biotinylation of antibodies for controlled immobilization on solid surfaces." Analytical biochemistry 365.1 (2007): 14-23.
- ⁸⁵ Pumera, Martin. "Graphene in biosensing." Materials today 14.7-8 (2011): 308-315.
- ⁸⁶ Chamoli, Pankaj, et al. "Characteristics of graphene/reduced graphene oxide." Handbook of Nanocomposite Supercapacitor Materials I (2020): 155-177.
- ^{87.} Eigler, Siegfried, and Andreas Hirsch. "Chemistry with graphene and graphene oxide challenges for synthetic chemists." Angewandte Chemie International Edition 53.30 (2014): 7720-7738.
- ⁸⁸ Gómez-Navarro, Cristina, et al. "Atomic structure of reduced graphene oxide." Nano letters 10.4 (2010): 1144-1148.

- ⁸⁹ Chaudhary, Karan, et al. "Protein immobilization on graphene oxide or reduced graphene oxide surface and their applications: Influence over activity, structural and thermal stability of protein." Advances in Colloid and Interface Science 289 (2021): 102367.
- ⁹⁰ Zhang, Jiali, et al. "Graphene oxide as a matrix for enzyme immobilization." Langmuir 26.9 (2010): 6083-6085.
- ^{91.} Wang, Juan, et al. "Advances in Organic Transistor-Based Biosensors." Advanced Materials Technologies 5.7 (2020): 2000218.
- ⁹² Zheng, Zhi, et al. "Overcome debye length limitations for biomolecule sensing based on field effective transistors." Chinese Journal of Chemistry 39.4 (2021): 999-1008.
- ⁹³ Chen, Hang, et al. "A new biosensor detection system to overcome the Debye screening effect: dialysis-silicon nanowire field effect transistor." International Journal of Nanomedicine 14 (2019): 2985.
- ⁹⁴ Kesler, Vladimir, Boris Murmann, and H. Tom Soh. "Going beyond the Debye length: overcoming charge screening limitations in next-generation bioelectronic sensors." ACS nano 14.12 (2020): 16194-16201.
- ^{95.} Gao, Ning, et al. "General strategy for biodetection in high ionic strength solutions using transistor-based nanoelectronic sensors." Nano letters 15.3 (2015): 2143-2148.
- ⁹⁶ Jang, Hyun-June, et al. "Electronic cortisol detection using an antibody-embedded polymer coupled to a field-effect transistor." ACS applied materials & interfaces 10.19 (2018): 16233-16237.
- ^{97.} Stern, Eric, et al. "Label-free biomarker detection from whole blood." Nature nanotechnology 5.2 (2010): 138-142.
- ⁹⁸ Maehashi, Kenzo, et al. "Label-free protein biosensor based on aptamer-modified carbon nanotube field-effect transistors." Analytical Chemistry 79.2 (2007): 782-787.
- ^{99.} Nakatsuka, Nako, et al. "Aptamer–field-effect transistors overcome Debye length limitations for small-molecule sensing." Science 362.6412 (2018): 319-324.
- ^{100.} Kulkarni, Girish S., and Zhaohui Zhong. "Detection beyond the Debye screening length in a high-frequency nanoelectronic biosensor." Nano letters 12.2 (2012): 719-723.
- ^{101.} Ferrari, E., Palma, C., Vesentini, S., Occhetta, P., & Rasponi, M. (2020). Integrating biosensors in organs-on-chip devices: A perspective on current strategies to monitor microphysiological systems. Biosensors, 10(9), 110.
- ^{102.} da Ponte, R.M.; Gaio, N.; van Zeijl, H.; Vollebregt, S.; Dijkstra, P.; Dekker, R.; Serdijn, W.A.; Giagka, V. Monolithic integration of a smart temperature sensor on a modular silicon-based organ-on-a-chip device. Sensors Actuators, A Phys. 2021, 317, 112439.
- ^{103.} Khalid, M.A.U.; Kim, Y.S.; Ali, M.; Lee, B.G.; Cho, Y.-J.J.Y.-J.; Choi, K.H. A lung cancer-on chip platform with integrated biosensors for physiological monitoring and toxicity assessment. Biochem. Eng. J. 2020, 155, 107469.
- ^{104.} Wang, T.; Green, R.; Howell, M.; Martinez, T.; Dutta, R.; Mohapatra, S.S.S.S.; Mohapatra, S.S.S.S. The design and characterization of a gravitational microfluidic platform for drug sensitivity assay in colorectal perfused tumoroid cultures. Nanomedicine Nanotechnology, Biol. Med. 2020, 30, 102294.
- ^{105.} Liang, T.; Gu, C.; Gan, Y.; Wu, Q.; He, C.; Tu, J.; Pan, Y.; Qiu, Y.; Kong, L.B.; Wan, H.; et al. Microfluidic chip system integrated with light addressable potentiometric sensor

(LAPS) for real-time extracellular acidification detection. Sensors Actuators, B Chem. 2019, 301, 127004.

- ^{106.} Rivera, K.R.; Pozdin, V.A.; Young, A.T.; Erb, P.D.; Wisniewski, N.A.; Magness, S.T.; Daniele, M. Integrated phosphorescence-based photonic biosensor (iPOB) for monitoring oxygen levels in 3D cell culture systems. Biosens. Bioelectron. 2019, 123, 131–140.
- ^{107.} Ehgartner, J.; Sulzer, P.; Burger, T.; Kasjanow, A.; Bouwes, D.; Krühne, U.; Klimant, I.; Mayr, T. Online analysis of oxygen inside silicon-glass microreactors with integrated optical sensors. Sensors Actuators B Chem. 2016, 228, 748–757.
- ^{108.} Cruz, A.F.D.; Norena, N.; Kaushik, A.; Bhansali, S. A low-cost miniaturized potentiostat for point-of-care diagnosis. Biosens. Bioelectron. 2014, 62, 249–254.
- ^{109.} Panraksa, Y.; Apilux, A.; Jampasa, S.; Puthong, S.; Henry, C.S.; Rengpipat, S.; Chailapakul, O. A facile one-step gold nanoparticles enhancement based on sequential patterned lateral flow immunoassay device for C-reactive protein detection. Sensors Actuators, B Chem. 2021, 329, 129241.
- ^{110.} Van Snick, Jacques. "Interleukin-6: an overview." Annual review of immunology 8.1 (1990): 253-278.
- ^{111.} Song, Mingchen, and John A. Kellum. "Interleukin-6." Critical care medicine 33.12 (2005): S463-S465.
- ^{112.} Verboogen, Daniëlle RJ, et al. "Interleukin-6 secretion is limited by self-signaling in endosomes." Journal of molecular cell biology 11.2 (2019): 144-157.
- ^{113.} Rincon, Mercedes. "Interleukin-6: from an inflammatory marker to a target for inflammatory diseases." Trends in immunology 33.11 (2012): 571-577.
- ^{114.} Somers, William, Mark Stahl, and Jasbir S. Seehra. "1.9 Å crystal structure of interleukin 6: implications for a novel mode of receptor dimerization and signaling." The EMBO journal 16.5 (1997): 989-997.
- ^{115.} Fonseca, J. E., et al. "Interleukin-6 as a key player in systemic inflammation and joint destruction." Autoimmunity reviews 8.7 (2009): 538-542.
- ^{116.} Scheller, Jürgen, et al. "The pro-and anti-inflammatory properties of the cytokine interleukin-6." Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular Cell Research 1813.5 (2011): 878-888.
- ^{117.} Su, Hua, Chun-Tao Lei, and Chun Zhang. "Interleukin-6 signaling pathway and its role in kidney disease: an update." Frontiers in immunology 8 (2017): 405.
- ^{118.} Nechemia-Arbely, Yael, et al. "IL-6/IL-6R axis plays a critical role in acute kidney injury." Journal of the American Society of Nephrology 19.6 (2008): 1106-1115.
- ^{119.} Laliberte, Kaitlyn E., et al. "A wearable graphene transistor-based biosensor for monitoring IL-6 biomarker." Microelectronic Engineering 262 (2022): 111835.
- ^{120.} Malhotra, Ruchika, et al. "Ultrasensitive electrochemical immunosensor for oral cancer biomarker IL-6 using carbon nanotube forest electrodes and multilabel amplification." Analytical chemistry 82.8 (2010): 3118-3123.
- ^{121.} Russell, Christopher, et al. "Development of a needle shaped microelectrode for electrochemical detection of the sepsis biomarker interleukin-6 (IL-6) in real time." Biosensors and Bioelectronics 126 (2019): 806-814.

- ^{122.} Yang, Ting, et al. "An electrochemical impedance sensor for the label-free ultrasensitive detection of interleukin-6 antigen." Sensors and Actuators B: Chemical 178 (2013): 310-315.
- ^{123.} Huang, Jingfeng, et al. "Novel biosensor for Interleukin-6 detection." Procedia Engineering 60 (2013): 195-200.
- 124. https://www.instructables.com/Photoresist-Dry-Film-a-New-Method-of-Applying-It-t/
- ^{125.} Clarson SJ, Semlyen JA, eds. 1993. Siloxane Polymers. Englewood Cliffs, NJ: Prentice Hall.
- ^{126.} B. H. Jo, L. M. Van Lerberghe, K. M. Motsegood, and D. J. Beebe, "Three-dimensional micro-channel fabrication in polydimethylsiloxane (PDMS) elastomer," J. Microelectromech. Syst., vol. 9, pp. 76–81, 2000.
- ^{127.} Fabrication of microfluidic systems in poly(dimethylsiloxane), J. Cooper McDonald, David C. Duffy, Janelle T. Anderson, Daniel T. Chiu, Hongkai Wu, Olivier J. A. Schueller, George M. Whitesides, Electrophoresis 2000, 21, 27-40.
- ^{128.} Whitesides, George M., and Abraham D. Stroock. "Flexible methods for microfluidics." Phys. Today 54.6 (2001): 42-48.
- ^{129.} Toepke, M.W., Beebe, D.J., 2006. PDMS absorption of small molecules and consequences in microfluidic applications. Lab Chip 6, 1484–1486
- 130. https://www.it4ip.be/key-features/
- ^{131.} Aydin, Suleyman. "A short history, principles, and types of ELISA, and our laboratory experience with peptide/protein analyses using ELISA." Peptides 72 (2015): 4-15.
- 132. https://axispharm.com/enzyme-linked-immunosorbent-assay-elisa/
- ^{133.} Purwidyantri, Agnes, et al. "Influence of the electrolyte salt concentration on DNA detection with graphene transistors." Biosensors 11.1 (2021): 24.
- ^{134.} Lee, Jaehyun, et al. "Effects of pH and Ion Concentration in Phosphate Buffer Solution on the Sensitivity of the Silicon Nanowire BioFETs." Journal of the Korean Physical Society 55.4 (2009): 1621-1625.
- ^{135.} Lietaer, Nicolas, et al. "Dry-film resist technology for versatile TSV fabrication for MEMS, tested on blind dummy TSVs." 2014 Symposium on Design, Test, Integration and Packaging of MEMS/MOEMS (DTIP). IEEE, 2014.
- ¹³⁶. <u>https://www.laurell.com/spin-coater/?model=WS-400-6NPP</u>
- 137. http://www.eurotek.com/Olympus/MX51
- 138. https://www.filmetrics.com/profilometers/profilm3d
- ^{139.} White, Frank M. Fluid mechanics. Tata McGraw-Hill Education, 1979.
- 140. <u>https://www.lsbio.com/antibodypairs-elisadevelopmentkits/devkit-core-human-mdk-midkine-elisa-development-kit-ls-f31233/31233</u>
- ^{141.} Han, Won K., et al. "Kidney Injury Molecule-1 (KIM-1): a novel biomarker for human renal proximal tubule injury." Kidney international 62.1 (2002): 237-244.
- ^{142.} Bonventre, Joseph V. "Kidney Injury Molecule-1 (KIM-1): a specific and sensitive biomarker of kidney injury." Scandinavian Journal of Clinical and Laboratory Investigation 68.sup241 (2008): 78-83.
- ^{143.} Bailly, Véronique, et al. "Shedding of kidney injury molecule-1, a putative adhesion protein involved in renal regeneration." Journal of Biological Chemistry 277.42 (2002): 39739-39748.
- ^{144.} Ichimura, Takaharu, et al. "Kidney injury molecule–1 is a phosphatidylserine receptor that confers a phagocytic phenotype on epithelial cells." The Journal of clinical investigation 118.5 (2008): 1657-1668.
- ^{145.} Bonventre, Joseph V. "Kidney injury molecule-1 (KIM-1): a urinary biomarker and much more." Nephrology Dialysis Transplantation 24.11 (2009): 3265-3268.
- ^{146.} Cunaj, E., et al. "Stable hydrophilization of FR4 and polyimide-based substrates implemented in microfluidics-on-PCB." Surface and Coatings Technology 334 (2018): 292-299.